www.ujat.mx/publicaciones/uciencia

Número Especial I: 39-50, 2004

LAS LEVADURAS MARINAS COMO HERRAMIENTAS CIENTÍFICA Y BIOTECNOLÓGICA

Marine yeasts as Scientific and Biotechnology tools

JL Ochoa ✉, R Vázquez-Juárez

(JLO) (RVJ) Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Mar Bermejo 195, Col. Playa Palo Santa Rita
La Paz, 23090, BCS. México
jlochoa@cibnor.mx

Ensayo recibido: 28 de junio de 2004
Ensayo aceptado: 28 de octubre de 2004

RESUMEN. Las levaduras marinas constituyen un grupo de organismos cuya existencia ha sido cuestionada. Por lo tanto, el conocimiento sobre su fisiología y aplicación biotecnológica es escaso. La importancia ecológica de las levaduras marinas radica, al menos en parte, en que participan en el reciclaje de la materia orgánica en el océano. Además, son útiles como fuentes de reactivos biológicos, proteína unicelular, vitaminas, pigmentos y probióticos. Los trabajos realizados en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) han permitido configurar la primera Colección de Levaduras Marinas en México, con muestras obtenidas de la costa occidental de Baja California Sur, México, en una zona de transición templado-tropical. A través de la aplicación de pruebas convencionales de identificación morfológica, bioquímica, fisiológica y molecular, la Colección de Levaduras Marinas del CIBNOR está conformada actualmente por 64 aislamientos pertenecientes a seis géneros (*Aspergillus, Candida, Debaryomyces, Exophiala, Rhodotorula* y *Yarrowia*). La colección se enriquecerá con nuevos aislamientos de otras regiones en el futuro. La potencialidad de este grupo de microorganismos en Biotecnología Marina se analiza como herramienta científica.

Palabras clave: Levaduras Marinas, Biotecnología Marina, *Aspergillus, Candida, Debaryomyces, Exophiala, Rhodotorula, Yarrowia.*

ABSTRACT. Marine yeasts comprise a group of microorganisms which existence has been questioned. As a result, the knowledge about its physiology and biotechnology use is scarce. The ecological importance of the marine yeasts is due, at least in part, to their contribution in the ocean's organic matter recycling. In addition, they are valuable sources of biological reagents, cell protein, vitamins, pigments, and probiotics. The work carried out at the Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, (CIBNOR), has allowed the establishment of the first Collection of Marine Yeast in Mexico, with samples obtained from the temperate-tropical transition zone off the western coast of Baja California Sur, Mexico, in a temperate-tropical transition zone. By the application of conventional morphology, biochemical, physiological and molecular identification tests, the Marine Yeast Collection of CIBNOR is now composed of 64 specimens belonging to six genus (*Aspergillus*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Exophiala*, *Rhodotorula*, and *Yarrowia*). The collection will be enriched with new isolates of the other regions in the future. The potential of such microorganisms in Marine Biotechnology is analysed as a scientific tool.

Key words: Marine yeasts, Marine Biotechnology, *Aspergillus*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Exophiala*, *Rhodotorula*, *Yarrowia*.

INTRODUCCIÓN

El conocimiento disponible sobre la microbiota distribuida en el ecosistema marino se puede enmarcar desde dos puntos de vista: el ecológico y el de la salud. El primero es importante porque sustenta la explicación de la función que los microorganismos desempeñan en el ámbito marino, lo cual da la pauta para su preservación y aprovechamiento. La identificación de los componentes microbiológicos de los ecosistemas marinos permite elabo-

rar inventarios y programas de preservación de un patrimonio que representa un importante potencial para la obtención y estudio de compuestos biológicamente activos y como indicadores de impacto ambiental, particularmente en zonas costeras en donde la actividad humana esté alterando el ecosistema. El punto de vista relacionado a aspectos de salud se refiere básicamente a aquellos microorganismos que, en un momento determinado, pueden afectar la salud de la población humana y de especies económicamente importantes. Las levaduras forman parte del ecosistema marino y son un tema de investigación relativamente nuevo. Pero, ¿existen realmente levaduras de origen marino?, ¿son abundantes, diversas y ubicuas en todos los ecosistemas marinos? y finalmente, ¿qué hacen ahí? y ¿sirven para algo?

La Microbiología Marina mantiene una estrecha relación con las diferentes ramas de la oceanografía en particular con la química marina, la fisiología microbiana y la microbiología molecular. El avance de esta materia ha sido posible, en parte, a consecuencia de los modernos buques oceanográficos que facilitan el trabajo experimental inmediato después de la recolecta de una muestra de agua o de sedimento para simular el microcosmos acuático fuera de él, en tubo de ensayo o matraz. Los resultados de estos experimentos pueden ser utilizados como modelos a los que se aplica todo el arsenal de herramientas y procedimientos moleculares y fisiológicos desarrollados para estudiar a los microorganismos de ecosistemas terrestres, considerados “convencionales”. Con estos procedimientos se ha aprendido que la adaptación de los microorganismos a la salinidad característica del ecosistema marino y su capacidad para la utilización de diversas fuentes de energía y desarrollarse con una baja disponibilidad de nutrientes, son causa de cambios morfológicos, de comportamiento y de habilidades específicas que les permiten crecer y reproducirse en ambientes poco propicios.

Las levaduras por definición son hongos unicelulares, usualmente de forma ovalada, con estados vegetativos que se reproducen predominantemente por gemación o fisión, dando por resultado un crecimiento unicelular, aunque algunas pueden ser dimórficas o bifásicas y crecer como micelio bajo condiciones ambientales apropiadas. Este grupo de microorganismos está incluido taxonómicamente en la División Eumicota y, dadas sus características de reproducción sexual, se pueden ubicar en tres subdivisiones: Ascomicotina, que comprende a levaduras que pueden formar esporas contenidas dentro de una asca, Basidiomicotina, en donde los representantes forman esporas externas localizadas sobre basidios o esterigmas, y Deuteromicotina en donde se incluyen todas aquellas levaduras para las que no ha sido posible demostrar que presentan una fase sexual en su ciclo de vida.

La clasificación de las levaduras ha sido confusa, y apenas en 1970 se unificaron criterios taxonómicos que han ayudado a reconocer a más de 500 especies como miembros del Taxón Levaduras (Spencer & Spencer 1997).

Las levaduras registran una amplia distribución en un variado tipo de hábitat terrestres. Sin embargo, es poco lo que sabemos de las levaduras de ecosistemas acuáticos, particularmente del marino. En el mar, las levaduras pueden provenir con la erosión o acarreos producidos por las corrientes de agua superficiales y también encontrarse asociadas a la fauna y flora acuática de los océanos. En los últimos 40 años, evidencias suficientes se han reunido para establecer que las levaduras que han sido aisladas del medio ambiente marino son parte constitutiva de la población microbiana marina, por lo que se les puede considerar como “Levaduras Marinas”. En ellas se incluyen a todas aquellas levaduras y organismos levaduriformes capaces de constituir y perpetuar poblaciones en el medio marino, o aquellas cuya reproducción y crecimiento ocurren preferentemente en el mar, o en condiciones óptimas a las concentraciones normales de sales en el mar, entre 2.4 - 4 % de cloruro de sodio. También hay algunas levaduras que son capaces de distribuirse en ambientes salinos no marinos y son altamente halofílicas o halotolerantes.

OBTENCIÓN Y AISLAMIENTO DE LEVADURAS MARINAS

En los ecosistemas acuáticos, la mayoría de las levaduras probablemente crecen en condiciones no óptimas. Para su desarrollo, eventualmente requieren de sitios de amplificación de las poblaciones como sedimentos, detrito y, de manera importante, estar asociadas a organismos acuáticos (Roth *et al.* 1962; Sallenave-Namont *et al*. 2000). Del salmón del atlántico se han aislado diferentes especies de levaduras, con cuentas de hasta 3 $X10^3$ células/g de intestino. Las especies dominantes fueron *Debaryomyes hansenii, Sacharomyces cerevisiae, Rhodotorula rubra* y *Rhodotorula glutinis* (Andlid 1995*).* La mayoría de las células en tránsito por el intestino de peces son eliminadas rápidamente debido al continuo flujo de agua, situación que pone en duda la presencia de una microflora normal en estos tejidos (Roth *et al*. 1962). Sin embargo, se ha demostrado que algunas especies de levaduras poseen mecanismos que les permite colonizar el intestino de peces y eventualmente amplificar la población (Andlid 1995). Otros estudios mas detallados han establecido el mecanismo de colonización, el cual parece estar mediado por la participación de adhesinas específicas y la hidrofobicidad típica de este tipo de células (Vázquez-Juárez 1996). Actualmente, hay un modelo que propone que las células tienen capacidad para cambiar rápidamente su fenotipo de superficie celular (hidrofóbico - hidrofílico) en respuesta a la disponibi-

lidad de nutrientes, lo que les confiere capacidad de crecer con componentes de la mucosa como única fuente de energía y establecer una relación estrecha a través del reconocimiento específico de ciertos componentes de la mucosa. Así, es posible explicar el hecho de que una nueva especie del género *Rhodotorula* haya sido aislada del gusano *Lamellibrachia* sp., el cual fue recolectado a una profundidad de 1 156 m en la Bahía de Sagami, Japón (Nakayama *et al*. 2001a).

De otros animales bentónicos y sedimentos recolectados a grandes profundidades, Nakayama *et al*. (2001b) aislaron 99 cepas de levaduras, entre las cuales predominaron 40 pigmentadas. Cerca del 82 y 11 % de los aislamientos fueron obtenidos de animales y sedimentos respectivamente, y todas las levaduras pigmentadas correspondieron a los géneros *Rhodotorula* y *Sporobolomyces*. En base a sus características morfológicas y fisiológicas, las levaduras en cuestión fueron identificadas como *Rhodotorula aurantiaca, R. glutinis, R. minuta* y *R. mucilaginosa*, y como *Sporobolomyces salmonicolor* y *S. shibatanus*. De éstas, *R. glutinis* y *R. mucilaginosa* fueron aisladas solamente de sedimentos, el resto se obtuvo de animales. El análisis filogenético de estos organismos contribuyó a confirmar que 22 de las cepas aisladas eran *R. glutinis*, lo que indica su amplia distribución en el fondo marino a gran profundidad. Por otra parte, cinco aislamientos correspondieron a *R. minuta*, los cuales fueron obtenidos solamente de animales bentónicos. Por lo expuesto, la distribución de las diversas especies de levadura en el ambiente marino se considera heterogénea.

Aunque en los casos de las cepas de los géneros *Sporobomyces* y *Rhodotorula,* éstas pudieron ser identificadas fenotípica y filogenéticamente, algunas pudieron distinguirse como nuevas especies en base a los análisis moleculares. Por ejemplo, 11 cepas del género *Kluyveromyces* aisladas de sedimento, una almeja y un cangrejo, a profundidades desde 1 000 hasta 2000 m, en la Bahía de Suruga, Japón, se caracterizaron por tener una asca evanescente y la ubiquinona Q-6 como la más abundante. Mediante el análisis filogenético estas cepas se ubicaron cercanas a *Kluyveromyces aestuarii*. Sin embargo, resultaron ser genéticamente distintas, ya que estos aislamientos carecen de la facultad fermentativa que distingue al género. Estas cepas han sido, por tanto, tentativamente identificadas como *Kluyveromyces nonfermentans* sp. nov. (Nakayama *et al.* 1999).

En la columna de agua, Velegraki-Abel *et al*. (1987) observaron la incidencia de levaduras en las costas de la Península de Ática, Grecia. Ellos registraron variación en la densidad de su población y en su distribución al comparar las recolectas de primavera, verano y otoño. En la época de verano la densidad de levaduras aumentó considerablemente, ya que se detectaron hasta 30 especies diferentes. Especial importancia reviste el hecho de que entre las más abundantes se encontraron algunas especies consideradas patógenas, tales como *Rhodotorula* spp., *Candida* spp., y *Torulopsis glabrata*. Otros investigadores han registrado una estrecha correlación entre la presencia y abundancia de levaduras patógenas con la contaminación (Hagler *et al*. 1986). El muestreo de levaduras marinas en el litoral del Pacifico Mexicano en el área circunvecina al estado de Baja California Sur, en 1986, produjo más de 140 aislamientos repartidos en 37 estaciones en un área geográfica comprendida entre los paralelos 27º10' N y 110º28'45" O; 27º26'38" N, 114º45' O; 23º53'20" N, 110º11'15" O; y 23º 8'40" N, 112º 30' O en la costa occidental de la Península de Baja California (Hernández-Saavedra *et al*. 1992; 1995a). Esta zona de la costa registra mínima actividad humana y, por tanto, presenta nulos o bajos valores de contaminación. En esa ocasión, las muestras fueron recolectadas en los meses de mayo y junio con botellas van Dorn a profundidades de 0.3m (superficial), 25, 50 y 100 m de profundidad. Para la recuperación de levaduras se elaboraron alícuotas de 5 ml de las muestras de agua, las cuales fueron inoculadas en un medio de cultivo que contenía glucosa, peptona, extracto de levadura y antibióticos en agua de mar, ajustando el pH a 4.5 e incubando a 25º C, con agitación a 100rpm. Con este procedimiento se consiguió aislar 141 cepas de levaduras, de las cuales el género dominante (32%) fue *Sporobolomyces*. La identificación a nivel de especie (*S. roseus*, *S. holsaticus* y *S. Puniceus*) se efectuó mediante técnicas bioquímicas. La distribución de estas tres especies en la zona de aislamiento es heterogénea, ya que resultaron más abundantes en la zona oceánica que en la nerítica, y a mayor profundidad que en la superficie. Esta distribución sugiere que el origen de estos microorganismos no es terrestre y que, al menos en esa época, los acarreos por precipitación o viento no fueron importantes. La relación entre la distribución y abundancia de este grupo de levaduras con la salinidad, oxígeno y temperatura no fue significativa (Hernández-Saavedra *et al.* 1992), lo que hace pensar en una alta capacidad de adaptación a distintos ambientes, tanto marinos como terrestres. El género *Candida* (22%) fue el segundo grupo mejor representado (Hernández-Saavedra *et al.* 1995b). En este caso, entre los aislamientos se distinguieron cinco grupos de acuerdo a sus respuestas de asimilación a varias fuentes de carbono y nitrógeno y se confirmó su dominancia en la zona nerítica y de baja profundidad. Es decir, a diferencia del género *Sporobolomyces*, la abundancia de las levaduras del género *Candida* resultó baja en la zona oceánica y prácticamente ausentes a la profundidad máxima de muestreo de 100 m. Esta distribución coincidió con los hallazgos de Taysi y Uden (1964) quienes constataron que el número de espe-

cies disminuye con la distancia de la boca de los esteros al explorar la ocurrencia de levaduras en esteros de Portugal adyacentes al Atlántico. *Debaryomyces* y *Rhodotorula* fueron los géneros mejor representados tanto dentro, como fuera, de los esteros. Las especies como *Candida intermedia*, *C. lambica*, *C. silvicola* y *Torulopsis candida* solamente se observaron dentro de los esteros. En las costas del sur de California, EUA, se registró la presencia de *Cryptococcus* y *Rhodotorula* en la columna de agua, desde la línea de costa hacia mar abierto, mientras que *Metschnikowia* solamente fue recolectada en los ecosistemas costeros (Uden & Branco 1963). Por otra parte, *M. zobellii* fue aislada del intestino de algunos peces y de materia en descomposición, en tanto que *Torulopsis glabrata*, *Candida tropicalis* y *C. krusei* fueron aisladas de los intestinos de algunas aves pero no del mar.

Varios autores han sugerido que la presencia de levaduras marinas en la columna de agua se explica por su participación en el reciclaje de la materia orgánica en este ecosistema (Rhishipal & Philip 1998). La distribución de estos organismos en el mar profundo ha logrado ser demostrada y se ha estudiado bajo condiciones simuladas con equipo de alta presión (Lorenz & Molitoris 1997).

OBTENCIÓN DE BIOMASA CELULAR DE LEVADURAS MARINAS

La producción a gran escala de antibióticos, enzimas, vitaminas, y/o proteína unicelular a partir de levaduras marinas requiere de procedimientos que puedan tomar ventaja de su origen marino. La experiencia en la industria en el empleo de levaduras de origen terrestre es amplia, como por ejemplo en la elaboración de cerveza, en la destilación y producción de vino, así como de proteína celular, tanto en acuacultura como para consumo humano. Sin embargo, el rezago en el uso de levaduras de origen marino es considerable, a pesar de que presentan propiedades atractivas, como el requerir bajas concentraciones de fuentes de carbono para su crecimiento y desarrollo (Ochoa *et al.* 1995).

El agua de mar que se puede emplear en la formulación de los medios de cultivo para el desarrollo de este tipo de levaduras favorece su crecimiento en forma selectiva y reduce riesgos y costos derivados de la contaminación. Esta contaminación se observa usualmente en procesos que utilizan el agua destilada como solvente y se presume que con el agua de mar se ve disminuida. Otra ventaja del uso de agua de mar en la formulación de los medios de cultivo para la producción de biomasa es que proporciona minerales y nutrientes que complementados con bajas concentraciones de extractos de levadura y peptona permite rendimientos que se equiparan a los de procesos industriales (Ramírez-Orozco *et al*. 1998). La levadura *D. hansenii* crece a pH tan extremos como 4 ó 9, aunque no tan eficiente como en el intervalo de 5 a 7, a 500 rpm y una temperatura de 30 ° C con un óptimo desarrollo. En el caso de las levaduras marinas, las ventajas inherentes al uso de agua de mar como solvente en el proceso de fermentación, conlleva la oportunidad de trabajar en condiciones que, eventualmente, pueden traducirse en oportunidades económicas.

PROBIÓTICOS A PARTIR DE LEVADURAS MARINAS

Los Probióticos son cultivos de organismos especiales que han sido utilizados como aditivos de alimentos desde los 70's del siglo pasado. El concepto de "Probioticum" fue acuñado en 1974 al mismo tiempo que el empleo de cultivos vivos en los alimentos de animales para reemplazar el uso de antibióticos. Actualmente, los probióticos se utilizan no solamente como suplemento alimenticio o farmacéutico, sino en alimentos fundamentales como productos lácteos, jugos de frutas, chocolates y hasta cárnicos.

La selección del organismo es un requisito para la elaboración del probiótico. Éstos deben ser capaces de pasar la barrera impuesta por el estómago y el duodeno en estado viable y multiplicarse en el lugar al cual están destinados dentro del intestino. Además, los organismos elegidos deben ser capaces de producir metabolitos antagónicos hacia los saprófitos dominantes en la microflora y que muestren un crecimiento competitivo. Estas características son comunes entre las bacterias ácido-lácticas, como por ejemplo los lactobacilos y las bifidobacterias. Sin embargo, muchas especies no poseen cualidades tecnológicas que puedan aprovecharse para ser agregadas a los alimentos porque su viabilidad decrece rápidamente en condiciones desfavorables. Por ello se piensa que otros microorganismos esporulantes, como las levaduras, pueden servir como probióticos. Hay que reconocer que a las levaduras no se les tiene consideradas como probióticos de primera línea por algunas de sus características fisiológicas y origen, por lo que es importante determinar su eficacia en pruebas experimentales con animales. Los aspectos de seguridad, que hacen posible el uso de las levaduras como probióticos en animales, han sido analizados considerando las cuestiones de patogenicidad y toxicidad (Reuter 2001). Algunos casos exitosos en acuacultura marina de peces y crustáceos hacen pensar en un futuro promisorio en la aplicación de las levaduras marinas como probióticos (Tovar-Ramírez *et al.* 2002) y permiten augurar que los probióticos podrán reemplazar a los antibióticos nutricionales.

Dos aspectos han motivado la consideración del uso de levaduras como probióticos en acuacultura: Primero, el difundido y probado efecto benéfico de levaduras en diversos modelos que incluyen al hombre (McFarland & Bernasconi 1993). Segundo, la demostración de la presen-

cia de levaduras en el tracto digestivo de peces con una alta capacidad de colonización (Andlid 1995; Vázquez-Juárez *et al.* 1993; Vázquez-Juárez 1996). La levadura *Saccharomyces boulardii* es ampliamente utilizada en varios países de Europa en el tratamiento de enteritis infecciosa aguda, en desordenes producidos por el uso de antibióticos y colitis asociadas a infecciones por *Clostridium difficile* (McFarland & Bernasconi 1993). El género *Candida sp*. se utiliza en el cultivo a gran escala de rotíferos (James *et al.* 1987). Diversos mecanismos del efecto benéfico han sido descritos y se sugiere que la expresión de enzimas intestinales es favorecida por poliaminas secretadas por el organismo.

En peces, la diferenciación y maduración del tracto digestivo durante el desarrollo larvario ha recibido especial interés en respuesta a la creciente demanda de optimizar sistemas de crianza. Entre los factores involucrados en el proceso de maduración se encuentran los de tipo nutricional. Recientemente, el papel de las poliaminas en la maduración del tracto digestivo de la lubina (*Dicentrarchus labrax*) fue puesto en evidencia por la incorporación de espermina pura a la dieta (Péres *et al*. 1997). Dado que en el tracto digestivo un porcentaje de las poliaminas se suministra externamente vía la dieta y/o la microbiota (Bardócz *et al.* 1995) se ha propuesto el uso de organismos probióticos seleccionados por su habilidad para colonizar los tejidos de la mucosa, sintetizar y secretar poliaminas. Con este antecedente, una evaluación de la producción de poliaminas se realizó para diferentes especies de levaduras y los resultados indicaron que las cepas de *Debaryomyces hansenii* CBS-8339 y *Saccharomyces cerevisiae* CBS-7765 fueron las más eficientes. Estas levaduras han sido aisladas de peces y por ello son atractivas para ser evaluadas como probióticos en estos organismos. Además, la capacidad de adhesión de estos organismos al tracto digestivo de la lubina y cabrilla arenera se determinó por medio de varios experimentos, en los cuales se demostró que la cepa *D. hansenii* CBS-8339 presentó los niveles más altos de adhesión (Tovar-Ramírez 2002). Estos resultados confirmaron la capacidad de adhesión de esta levadura al moco intestinal de salmón del Atlántico, la que fue observada por Vázquez-Juárez *et al.* (1997) y Andlid *et al*. (1998). Con estas bases, la levadura *D. hansenii* se evaluó como potencial probiótico para favorecer el crecimiento de larvas de lubina y el desarrollo de su sistema digestivo a través de una dieta compuesta como control y dos niveles experimentales de la levadura. La biomasa de levadura obtenida de manera semejante al procedimiento arriba descrito, recolectada en la fase estacionaria por centrifugación y lavada con agua destilada, se incorporó a la dieta para obtener un peletizado con un proceso final de secado a baja temperatura (45 °C) durante 20 minutos. El número de células en la dieta Dh-1% correspondió a 1.0 x10^6 UFC g^{-1} de alimento, y su viabilidad se evaluó periódicamente a lo largo del experimento. De esta forma, a los 30 días de crecimiento se recuperaron 9.6 X 10^4 UFC en larvas alimentadas con esta dieta, lo que confirmó la capacidad de colonización del tracto digestivo por la levadura. Así mismo, en las larvas alimentadas con la dieta control, es decir sin levadura, no se aisló alguna levadura del tracto digestivo correspondiente. El crecimiento de las larvas de lubina con la dieta Dh-1% se incrementó casi al doble comparado con la dieta Dh-5.7%, o con la dieta control sin levadura. Esta observación es importante y sugiere que el efecto observado no es de tipo nutricional y que, como probiótico, es funcional a bajas concentraciones. Respecto a los niveles de sobrevivencia y/o la presencia de deformaciones, también se observó un mejoramiento significativo para el lote de larvas alimentadas con la dieta DhH-1%.

Para la evaluación del desarrollo del sistema digestivo se detectaron las actividades enzimáticas diversas para inferir el potencial de las larvas para utilizar los nutrientes de la dieta. Dado que el planteamiento teórico del experimento consideró la hipótesis de un efecto de las levaduras sobre la expresión de algunas enzimas digestivas mediado por la excreta de poliaminas, se determinó la actividad enzimática de tripsina, amilasa y lipasa en los días 26 y 36. Así mismo, la expresión de los genes correspondientes a estas enzimas se evaluó mediante un sistema de RT-PCR (Reverse transcription-Polymerase Chain Reaction) y *primers* o iniciadores diseñados para la detección específica de los ARN_m correspondientes (Tovar-Ramírez 2002). Finalmente, en respuesta a que se ha sugerido que el incremento en la actividad de enzimas de las células del borde de cepillo del epitelio intestinal (i.e. maltasa, fosfatasa alcalina y aminopeptidasa) representa el paso de una digestión citosólica a una digestión extracelular, se efectuó también esta determinación. Los resultados obtenidos a los 26 días indicaron que la actividad de tripsina fue más alta en larvas alimentadas con levadura que en el lote control. Sin embargo, los niveles de ARN_m fueron semejantes en todos los casos. Por otra parte, a las 36 horas, tanto la actividad específica, como los niveles de ARN_m correspondiente a tripsina, fueron más altos en el lote alimentado con la dieta Dh-1%. En el caso de la amilasa, la actividad específica fue más alta en el grupo control que en los alimentados con las dietas con levaduras, y los niveles de ARN_m exhibieron un nivel semejante a las 26 hr, aunque a las 36 hr se observó una tendencia parecida a la actividad específica. Para la lipasa se encontró el mismo patrón que la tripsina, tanto a las 26 como a las 36 hr. Los niveles más altos de actividad específica y de ARN_m ocurrieron en los lotes alimentados con dieta con levadura, sin embargo los niveles del ARN_m para esta enzima no fueron significativamente diferentes ni a las 26 ni a las 36 hr, para todos los grupos

experimentales. En las enzimas de células del borde de cepillo se incrementó significativamente la maltasa (32%), fosfatasa alcalina (62%) y aminopeptidasa (47%) en el lote de larvas alimentadas con la dieta Dh-1%. Este incremento es consecuencia del aumento en la actividad de las enzimas del borde de cepillo que caracteriza la maduración de los enterocitos en mamíferos (Henning 1987) y en peces (Zambonino- Infante & Cahu 2001), lo que a su vez, sugiere la maduración del tracto digestivo de las larvas.

En resumen, un efecto positivo en el crecimiento y maduración del tracto digestivo de larvas lubina fue observado mediante la inclusión de levadura viva, en este ejemplo *D. hansenii*, administrada con la dieta, a través de la modulación de diversas actividades enzimáticas digestivas en los primeros 27 días del desarrollo larvario. El uso de métodos moleculares (Ricke & Pillar 1999) para entender la funcionalidad de los organismos considerados probióticos, ha constituido una herramienta útil para abatir el escepticismo que en un principio generó este concepto en la comunidad científica.

Las evaluaciones bromatológicas de *D. hansenii* indican un promedio de 49 % de proteína, 21 % de carbohidratos, 3.4 % de lípidos y 8 % de cenizas, lo que hace factible considerar su uso como aditivo para aumentar, no solamente el valor nutricional de los alimentos, sino también proporcionar textura, sabor y aspectos palatables (Halasz & Lasztity 1991; Nell 1993).

LA OBTENCIÓN DE REACTIVOS BIOLÓGICOS A PARTIR DE LEVADURAS MARINAS

Un paso fundamental para la obtención de cualquier molécula cuya síntesis y destino final es el citoplasma, es una eficiente desintegración de la envoltura celular. En el laboratorio se aplican varios métodos de lisis celular, entre los cuales la desintegración de la pared celular mediante el uso de enzimas líticas, la disrupción con ultrasonido y la disrupción mecánica con perlas de vidrio, son muy comunes. Para levaduras convencionales, como las pertenecientes al Phylum Ascomycota, cuya pared celular está compuesta de glucanos, el uso de zimoliasa o liticasa (obtenida de *Arthrobacter luteus*), es un procedimiento adecuado. En la misma forma, la disrupción de la pared de las levaduras pertenecientes al Phylum Basidiomicota, compuesta principalmente de quitina y celulosa, puede lograrse con enzimas obtenidas de *Trichoderma hazarium* para la obtención de esferoplastos, o incluso conseguir la completa lisis celular (Kurtzman & Fell 1999). Sin embargo, la pared celular de las levaduras marinas presenta una composición y arreglo diferente a las terrestres, por lo que el uso de dichas enzimas ha resultado poco eficiente.

El uso de enzimas líticas resulta bastante costoso, si se considera la necesidad de llevar el proceso a escala industrial. Por lo anterior, para la obtención de contenidos intracelulares de levaduras de interés se han ensayado a través de otras estrategias como la “permeabilización” celular con solventes orgánicos, la cual facilita el paso de moléculas hacia el medio extracelular. Desafortunadamente, estos métodos tampoco han resultado ser eficientes, particularmente en el caso de las levaduras marinas que presentan pared celular compleja. Finalmente, el ultrasonido, como método de ruptura celular, puede afectar la estructura terciaria y cuaternaria de proteínas de interés particular, por lo que llega a ser inapropiado en algunos casos.

Con levaduras marinas se ha logrado aplicar la disrupción mecánica bajo condiciones de temperatura controlada de manera exitosa (Ramírez-Orozco *et al.* 1998). El aislamiento y purificación de la enzima Cu,Zn-Superóxido Dismutasa (Cu,Zn-SOD) de la levadura marina *D. hansenii* con potencial aplicación en cosméticos y como anti-inflamatorio (Hernández-Saavedra & Ochoa 1999; Hernández-Saavedra *et al.* 1998; García-González & Ochoa 1999) es un caso interesante de la potencialidad que guardan las levaduras marinas como fuente de reactivos biológicos. La enzima Cu,Zn-SOD se ha empleado en el tratamiento de un gran número de desórdenes patológicos de diferentes órganos como el hígado (Nikishimi & Machlin 1975), la piel (Chedekel *et al.* 1978), los ojos (Bunce 1994) y el cerebro (Rothstein *et al.* 1994). Esta enzima también se ha utilizado para controlar los efectos indeseables de la radioterapia (Nelson *et al.* 1994) y quimioterapia (Peskin *et al.* 1977), así como en enfermedades inflamatorias (Oyanagui, 1976), reumatismo (Puig-Parellada y Planas 1978) y aterosclerosis (Frazer & Brady 1978).

La actividad “biocontroladora” o “asesina” (“killer”), de algunas levaduras marinas ha sido ya reconocida (Ramírez-Orozco *et al.* 2001) y su aplicación como agente antimicótico o para controlar el crecimiento de organismos contaminantes en los procesos de fermentación parece tener futuro (Buzzini & Martín 2001; Magliani *et al.* 1997; Ramírez-Orozco *et al.* 2001). Sin embargo, en algunos casos, esta propiedad es causa de preocupación pues puede resultar en patogenicidad a organismos de interés económico (Sallenave-Namont *et al.* 2000).

PROCESOS INDUSTRIALES CON LEVADURAS MARINAS

Varios tipos de levaduras marinas de los géneros *Candida* y *Debaryomyces* aisladas de zonas costeras han sido registradas como productoras de alcohol, casi tan eficientes como las levaduras convencionales (Urano *et al.* 1998). Esta última levadura ha sido de utilidad en procesos industriales para la producción de xilitol a partir de extractos de madera (Cruz *et al.* 1999).

BIORREMEDIACIÓN

La necesidad de contar con herramientas biológicas auxiliares para el tratamiento de contaminantes ha generado investigaciones y desarrollos que se han traducido en algunas opciones (Gadd & Edwards 1986). Sin embargo, es importante verificar si los productos que se ofrecen comercialmente hacen posible este objetivo. Por ejemplo, al evaluar ocho productos microbiológicos que, de acuerdo a las empresas que los producen tienen la capacidad de degradar el aceite crudo, se encontró que comparándolos con un inóculo natural obtenido de un sitio en el cual la única fuente de carbono era precisamente el aceite crudo, éstos eran capaces de oxidar el aceite crudo con mayor eficacia (Thouand *et al.* 1999).

La cepa tropical de *Yarrowia lipolytica*, NCIM 3589 puede producir emulsificantes en presencia de hidrocarburos o petróleo crudo que permite su remoción, lo cual significa que es efectiva como agente de limpieza o depuración (Zinjarde & Pant 2002). Al parecer, el mecanismo de asimilación de los hidrocarburos se realiza a través de la adherencia de la levadura a las gotas de aceite, lo que hace que se produzca un emulsificante (lipido-carbohidrato-proteína) asociado con la pared celular durante la fase de crecimiento. Ya en la fase estacionaria, el organismo libera el emulsificante en exceso de carbono y limitación de fuente de nitrógeno a un pH inicial de 8.0 en presencia de cloruro de sodio del 2 al 3% (342 a 513 mM).

Por lo anterior, las experiencias en este contexto apuntan a que los candidatos más apropiados para la transformación de compuestos hidrocarburos aromáticos policíclicos son aquellos aislados de sedimentos costeros altamente contaminados y entre ellos destaca *Trichosporin penicillatum* para la transformación de fenantrenos (MacGillivray & Shiaris 1993). En general, las levaduras muestran un perfil de aprovechamiento de fuentes de carbono más amplio que otros microorganismos proporcionándoles una mayor versatilidad (Bhosle & Mavinurve 1980). Otras aplicaciones de la capacidad de degradación de compuestos orgánicos pueden involucrar la hidrólisis de alginatos con el objeto de modificar su viscosidad (Moen *et al.* 1995), o para eliminar la presencia de plaguicidas organofosforados, metales pesados (Jayasree & Saramma 1996) y uranio (Pshenin 1960).

LAS LEVADURAS MARINAS COMO MODELO DE HALOTOLERANCIA Y OSMOREGULACION

Estudios fisiológicos con las levaduras marinas han puesto en evidencia un amplio margen de adaptabilidad en algunas de ellas. Por ejemplo, al estudiar el efecto de la presión osmótica se encontraron diferentes respuestas para organismos de los géneros *Aurobasidium*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces* y *Rhodotorula* (Hernández-Saavedra *et al.* 1994; 1995b). Dos estrategias generales de los organismos se han registrado para sobrevivir en ambientes de alta salinidad: uno es la exclusión de sodio del citoplasma acumulando grandes cantidades de solutos compatibles para evitar la pérdida de agua (sodio-excluyentes); otro, el que los organismos usan y acumulan altas concentraciones de sodio sin que éste represente un problema de toxicidad para la célula (sodio-incluyentes). Las levaduras han sido un modelo eucariote ampliamente utilizado para entender el fenómeno de halotolerancia. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo sodio-excluyente. Algunos de los genes involucrados en el mecanismo de halotolerancia en esta levadura son el *Nha*1que trabaja como una bomba antiporter Na^+ $(K^+)/H^+$ (Bañuelos *et al*. 1998) y los genes *ENA* 1-4 que tienen una función de ATPasa (Benito *et al.* 1997; Garciadeblas 1993). La eliminación de cualquiera de estos genes en *S. cerevisiae* genera cepas sensibles a incrementos en concentración de sodio.

La levadura *D. hansenii* puede ser aislada de ambientes con baja actividad de agua o con salinidades relativamente altas, como el medio marino. Desde hace más de 30 años se demostró que esta levadura tiene la capacidad de resistir altas concentraciones de NaCl por lo que originalmente se le consideró el modelo eucariótico ideal para estudios de halotolerancia. Posteriormente, se demostró que esta levadura puede acumular altas concentraciones de Na^+ intracelular (Neves *et al*.1997), que el Na^+ mejora su funcionalidad bajo diferentes condiciones de estrés (Almagro *et al.* 2000), y que la acumulación de sodio intracelular, hasta de 800 mM, no ejerce algún efecto tóxico en su metabolismo (Prista *et al.* 1997). Por estas razones, y no obstante que *D. hansenii*, acumula glicerol como soluto compatible, se considera que es un organismo halofílico de comportamiento sodio-incluyente.

De especial relevancia han sido los estudios con dos genes, dh*ENA*1 y dh*ENA*2, de *D. hansenii* que codifican para Na^+-ATPasas, los cuales han sido clonados y secuenciados. Estos genes presentan una alta homología con los análogos de la levadura *Schwanniomyces occidentalis* (So*ENA*1) (una levadura sodio-incluyente) y su expresión en cepas de *S. cerevisiae*, carentes de un sistema de exclusion de Na^+, ha permitido claramente definir su relación al fenotipo de ATPasas involucrado en la extrusión de sodio. Estos resultados dan pauta a preguntarse sobre la relevancia fisiológica de un sistema de exclusión de sodio en una levadura que normalmente no se intoxica con la presencia de este ión. Probablemente, las proteínas Ena (productos de los genes *ENA*) juegan un papel importante en el mantenimiento de niveles balanceados de cationes intracelulares al asegurar una homeostasis iónica en la célula. Estas bombas podrían transportar cationes al exterior

de la célula para prevenir una acumulación que podría representar un problema osmótico a la célula (Almagro *et al*. 2001).

No obstante que *D. hansenii* es una levadura sodio-incluyente, los primeros estudios relacionados a su carácter halofílico estuvieron dirigidos a la producción de glicerol como soluto compatible (Adler *et al.* 1985). Al respecto, se ha demostrado que la enzima glicerol-3P-deshidrogenasa NAD^+GPD controla la síntesis de glicerol en células sometidas a estrés salino. La obtención de mutantes de *D. hansenii* incapaces de metabolizar glicerol permitió evaluar la respuesta de esta levadura al estrés salino (Adler *et al.* 1985). La regulación por estrés salino de este gene a nivel de transcripción, fue demostrado en estudios fisiológicos y, posteriormente confirmado a través de estudios de Northern blot (Thome & Trench 1999).

La genética y biología molecular de *D. hansenii* se ha desarrollado tardíamente a partir de la última década. La gran mayoría de las cepas son haploides, se aparean muy esporádicamente y forman diploides de manera muy transitoria produciendo ascas de una sola espora. Recientemente, con el desarrollo de nuevas estrategias en genómica funcional se ha explorado el genoma *de D. hansenii* y comparado con el de *Saccharomyces cerevisiae* para un análisis global de funciones específicas. La producción y transporte de metabolitos, y de algunas enzimas detectadas sobreexpresadas en *D. hansenii*, explican en parte las diferencias fisiológicas observadas en ambas especies (Lepingle *et al.* 2000). Por ejemplo, la existencia de dos genes codificantes para la enzima Cu,Zn-SOD, que al parecer son regulados y expresados de manera diferente, pueden constituir un mecanismo de protección valioso en condiciones de estrés (Hernández-Saavedra *et al.* 1998). Con esta estrategia, también se ha puesto en evidencia que existe un incremento generalizado en la expresión de genes asociados con funciones de transporte en *D. hansenii*.

A pesar de los avances y logros mencionados, es claro que el fenómeno de regulación osmótica no ha sido aún explicado de manera completa a nivel molecular. La tolerancia a la sal es un fenómeno complejo para el cual la naturaleza ha desarrollado un número de estrategias diferentes. La búsqueda de nuevos genes, así como de rutas de señal, por medio de las nuevas herramientas disponibles, permitirá establecer la importancia relativa de cada mecanismo en una perspectiva global.

CONCLUSIONES

La Microbiología Marina en México, particularmente en el estudio de levaduras en los mares mexicanos, ha alcanzado un limitado conocimiento. El esfuerzo del grupo, dedicado a la conformación de la Colección de Levaduras Marinas del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste se ha expresado en algunas publicaciones y en la formación de recursos humanos, pero es insuficiente para conseguir una imagen real sobre la distribución y abundancia de las levaduras marinas en México. La promoción de este campo de estudio en México es imprescindible, pues en él residen aplicaciones que pudieran traducirse en nuevas oportunidades de negocio, al mismo tiempo de apoyar los programas de manejo y conservación de los ecosistemas marinos.

Los ejemplos elegidos en esta aportación ilustran el tema, pero se reconoce que no constituye una revisión exhaustiva. Así mismo, las aplicaciones de las levaduras marinas no están limitadas a los casos aquí mencionados y es muy factible que la imaginación y capacidad creativa de los investigadores generen más ideas, mejores productos y procesos. La Biotecnología Marina está apenas en sus albores y seguramente en el corto plazo se empezarán a disfrutar de sus aportaciones en los campos de la medicina y la producción de nutraceúticos basados en el aprovechamiento de las levaduras marinas.

AGRADECIMIENTOS

El Apoyo de CONABIO (V020) permitió rescatar y configurar la primera colección de Levaduras Marinas de México.

El apoyo del personal Técnico del CIBNOR (BM. Hever Latisnere; IBQ Norma Ochoa, MC Martín Ramírez, QB Marte Virgen) y la crítica y aporte científico de la Dra. Norma Hernández Saavedra son altamente apreciados.

LITERATURA CITADA

Adler L, Blomberg A, Nilsson A (1985) Glycerol metabolism and osmoregulation in the salt-tolerant yeast D*ebaryomyces hansenii*. J. Bacteriol. 162: 300-306.

Almagro A, Prista C, Castro S, Quintas C, Madeira-Lopes A, Ramos J, Loureiro-Dias MC (2000) Effects of salts on *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions. Int. J. Food Microbiol. 56: 191-197.

Almagro A, Prista C, Benito B, Loureiro-Dias MC, Ramos J (2001) Cloning and expression of two genes coding for sodium pumps in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. J. Bacteriol. 183: 3251-3255.

Andlid T (1995) Ecological physiology of yeasts colonizing the intestine of fish. PhD thesis. University of Goteborg, Sweden.

Andlid T, Vázquez-Juárez R, Gustafsson L (1998) Yeast isolated from the intestines of rainbow trout adhere and grow in intestinal mucus. Mol. Mar. Boil. Biotech. 7: 115-126

Bardócz S, Duguid TJ, Brown DS, Grant G, Pusztai A, White A, Ralph A (1995) The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth. British Journal Nutrition (England) 73: 819-828.

Bañuelos M, Sychrova H, Bleykasten-Grosshans C, Souciet JL, Potier S (1998) The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. Microbiology 144: 2749-2758.

Benito B, Quintero FJ, Rodríguez-Navarro A (1997) Overexpression of the sodium ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*: conditions for phosphorylation from ATP and Pi. Biochim. Byophys. Acta 1328: 214-225.

Bhosle NB, Mavinkurve S (1980) Hydrocarbon-utilizing micro-organisms from Dona Paula bay, Goa. Marine Environ. Res. 81: 53-58.

Bunce GE (1994) Evaluation of the impact of nutrition intervention on cataract prevalence in China. Nutr Rev. 52: 99-101.

Buzzini P, Martini A (2001) Large-scale screening of selected *Candida maltosa*, *Debaryomyces hansenii*, and *Pichia anomala* Killer toxin activity against pathogenic yeasts. Med. Mycol. 39: 479-482.

Chedekel MR, Smith SK, Post PW, Opoka A, Vessel DL (1978) Photodestruction of pheomelanin: role of oxygen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 5395-5399.

Cruz JM, Domínguez JM, Domínguez H, Parajo JC (1999) Solvent extraction of hemicellulosic wood hydrolysates: a procedure useful for obtaining both detoxified fermentation media and polyphenols with antioxidant activity. Food Chem. 67: 147-153.

Frazer PD, Brady FO (1978) Superoxide dismutase in bovine fetal ductus arteriosus, throacic aorta, and pulmonary and umbilical arteries. Proc. Soc. Exp. Boil. Med. 159: 30-33.

Gadd GM, Edwards SW (1986) Heavy-metal induced flavin production by *Debaryomyces hansenii* and possible connections with ion metabolism. Br. Myco. Soc. 87: 533-542.

Garciadeblas B, Rubio F, Quintero FJ, Bañuelos M, Haro R, Rodríguez-Navarro A (1993) Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genet. 236: 363-368.

García-González A, Ochoa JL (1999) Anti-inflammatory activity of *Debaryomyces hansenii* Cu,Zn-SOD. Arch. Med. Res. 30: 69-73.

Hagler AN, Mendonca-Hagler LC, Santos EA, Forage S, Filo JBS, Shrank A, de Oliveira RB (1986) Microbial pollution indicators in Brazilian tropical and subtropical marine surface waters. Science of the Total Environment 58: 151-160.

Halasz A, Lasztity R (1991) Use of yeast biomass in food production, CRC Press, Boca Raton FA, pp 312.

Henning SJ (1987) Functional development of the gastrointestinal tract. En: Johnson's LR (Ed) Physiology of the gastrointestinal tract. 2nd Edition. Raven Press, New York. 285-300 pp.

Hernández-Saavedra NY, Hernández-Saavedra D., Ochoa JL (1992) Distribution of *Sporobolomyces* (Kluyver et van Niel) Genus in the Western coast of Baja California Sur, Mexico. System. Apply. Microbiol. 15: 319-322.

Hernández-Saavedra NY, Ochoa JL, Vázquez-Duhalt R (1994) Effect of salinity in the growth of the marine yeast *Rhodotorula rubra*. Microbios 80: 99-106.

Hernández-Saavedra NY, Ochoa JL, Vázquez-Duhalt R (1995a) Osmotic adjustment in marine yeast. J. Plankton Res. 17: 59-69.

Hernández-Saavedra NY, Hernández-Saavedra D, Ochoa JL (1995b) Factors affecting the distribution of the Genus *Candida* (Berkhout) along the West coast of Baja California Sur, Mexico. System. Appl. Microbiol. 18: 109-112.

Hernández-Saavedra NY, Egly JM, Ochoa JL (1998) Cloning and sequencing of a cDNA encoding a Copper-Zinc Superoxide dismutase enzyme from the marine yeast *Debaryomyces hansenii*. Yeast 14: 573-581.

Hernández-Saavedra NY, Ochoa JL (1999) Coper-Zinc Superoxide Dismutase from the marine yeast *Debaryomyces hansenii.* Yeast 15: 657-668.

James CM, Dias P, Salman AE (1987) The use of marine yeast (*Candida sp*.) and baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in combination with *Chlorella* sp. for mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Hydrobiologia 147: 263-268.

Jayasree R, Saramma AV (1996) Effect of pesticide and heavy metals on growth of marine yeasts *Candida parapsilosis* and *Debaryomyces hansennii*. *Indian J. Mar. Sci*. 25: 373-375.

Kurtzman CP, Fell JW (1999) The yeast, a taxonomic study (4Th Ed.). Elsevier Sci. Publ. B.V., Amsterdam, 1055 pp.

Lepingle A, Casaregola S, Neuveglise C, Bon E, Nguyen H, Artiguenave F, Wincker P, Gaillardin C (2000) Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 14. *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii*. FEBS Lett 487:82-86.

Lorenz R, Molitoris HP (1997) Cultivation of fungi under simulated deep sea conditions. Mycological Res. 101: 1355-1365.

Magliani W, Conti S, Gelonin M, Bertolotti D, Polonelli L (1997) Yeast killer systems. Clin. Microbiol. Rev. 10: 369-400.

McFarland IV, Bernasconi P (1993) *Saccharomyces boulardii*: A review of an innovative Biotherapeutic agent. Microbiol. Ecol. Health Dis. 6: 157-167.

MacGillivray AR, Shiaris MP (1993) Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by yeasts isolated from coastal sediments. Appl. Environm. Microbiol. 59: 1613-1618.

Moen AP, Alvarez-Colsa B, Larsen A, Ostgaard K (1995) Degradation of alginate by the marine fungus *Dendryphiella salina*. J. Mar. Biotechnol. 3: 140-142.

Nakayama T, Hamamoto M, Nakase T, Horikoshi K (1999) *Kluyveromyces nonfermentans* sp. nov., a new yeast species isolated from the deep sea. Int. J. Syst. Bacteriol. 49:1899-1905.

Nakayama T, Hamamoto M, Nakase T, Horikoshi K (2001a) *Rhodotorula lamellibrachii* sp. nov., a new yeast species from a tubeworm collected at the deep-sea floor in Sagami bay and its phylogenetic analysis. Antonie Van Leeuwenhoek 80: 317-322.

Nakayama T, Hamamoto M, Nakase T, Takami H, Horikoshi K (2001b) Distribution and identification of red yeasts in deep-sea environments around the northwest Pacific Ocean. Antonie Van Leeuwenhoek 80: 101-110.

Nell JA (1993) The development of oyster diets. Aust. J. Agr. Res. 44: 557-566.

Nelson SK, Bose SK, McCord J (1994) The toxicity of high-dose superoxide dismutase suggests that superoxide can both initiate and terminate lipid peroxidation in the reperfused heart. Free Rad. Biol. Med. 16: 195-200.

Neves M, Oliveira RP, Lucas C (1997) Metabolic flux response to salt-induced stress in the halotolerant yeast Debaryomyces hansenii. Microbiology 143: 1133-1139.

Nikishimi M, Machline LJ (1975) Oxidation of alpha-tocopherol model compound by superoxide anion. Arch. Biochem. Biophys. 170: 864-689.

Ochoa JL, Ramírez-Orozco M, Hernández-Saavedra NY, Hernández D, Sánchez-Paz A (1995) Halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii* as an alternative source of Cu/Zn superoxide dismutase (SOD). J. Mar. Biotechnol. 3: 224-227.

Oyanagui Y (1976) Inhibition of superoxide anion production in macrophages by anti-inflammatory drugs. Biochem Pharmacol. 25: 1473-1480

Péres A, Cahu CL, Zambonino-Infante (1997) Dietary spermine supplementation induces intestinal maturation in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Fish. Physiol. Biochem. 16: 479-485.

Peskin AV, Koen YM, Zbarsky IB, Konstantinov AA (1977) Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in tumors. FEBS Lett. 78: 41-45

Prista C, Almagro A, Loureiro-Diaz MC, Ramos J (1997) Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. Appl. Environm. Microbiol. 63: 4005-4009.

Pshenin LP (1960) The accumulation of U-UX1 by nitrogen-fixing micro-organisms of the Black Sea. C.R. Acad. Sci. U.R.S.S. 133: 1090-1091.

Puig-Parellada P, Planas JM (1978) Synovial fluid degradation induced by free radicals. *In vitro* action of several free radical scavengers and anti-inflammatory drugs. Biochem. Pharmacol. 27: 535-537.

Ramírez-Orozco M, Hernández-Saavedra NY, Ascencio-Valle F, Acosta-González B, Ochoa JL (1998) Cell yield and Superoxide Dismutase activity of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* under different culture conditions. J. Mar. Biotechnol. 6: 255-259.

Ramírez-Orozco M, Hernández-Saavedra NY, Ochoa JL (2001) *Debaryomyces hansenii* growth in nonsterile seawater ClO2-peptone-containing medium. Can. J. Microbiol. 47: 676-679.

Reuter G (2001) Probiotics-possibilities and limitations of their application in food, animal feed, and in pharmaceutical preparations for men and animals. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 114: 410-419.

Rhishipal R, Philip R (1998) Selection of marine yeasts for the generation of single cell protein from prawn-shell waste. Bioresource Technol. 65: 255-256.

Ricke SC, Pillar SD (1999) Conventional and molecular methods for understanding probiotic bacteria functionality in gastrointestinal tracts. Crit. Rev. Microbiol. 25: 19-38.

Roth FJ, Ahearn DG, Fell JW, Movers SP, Meyer SA (1962) Ecology and taxonomy of yeasts isolated from various marine substrates. Limnol. Oceanogr. 7: 178-185.

Rothstein JD, Bristol LA, Hosler B, Brown RH, Kunel RW (1994) Chronic inhibition of superoxide dismutase produces apoptotic death of spinal neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 4155-4159.

Sallenave-Namont C, Pouches YF, Robiou T, Lassus P, Verbist JF (2000) Toxigenic saprophytic fungi in marine shellfish farming areas. Mycopathologia 149: 21-25.

Spencer JFT, Spencer DM (1997) Yeasts in Natural and Artificial Habitats. Springer-Verlag, Berlin.

Taysi I, Uden NV (1964) Occurrence and population densities of yeast species in an estuarine-marine area. Limnol. Oceanogr. 9: 42-45.

Thome PE, Trench RK (1999) Osmoregulation and the Genetic Induction of Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase by NaCl in the Euryhaline Yeast *Debaryomyces hansenii*. Mar. Biotechnol. 1: 230-238.

Thouand G, Bauda P, Outdo J, Kirsch G, Sutton C, Vidalia JF (1999) Laboratory evaluation of crude oil biodegradation with commercial or natural microbial inocula. Can. J. Microbiol. 45: 106-115.

Tovar-Ramírez D (2002) Comparación de los efectos de la flora digestiva en peces marinos de aguas templadas y tropicales. Tesis de Doctorado. CIBNOR. La Paz, B.C.S. México.

Tovar-Ramírez D, Zambonino-Infante JL, Cah CH, Gatesoupe FJ, Vázquez-Juárez R, Lésel R (2002) Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass larvae. Aquaculture 204: 113-123.

Uden NV, Branco RC (1963) Distribution and population densities of yeast species in Pacific water, air, animals, and kelp off Southern California. Limnol. Oceanogr. 8: 323-329.

Urano N, Hirai H, Ishida M, Kimura S (1998) Characterization of ethanol-producing marine yeasts isolated from coastal water. Fisheries Sci. 64: 633-637.

Vázquez-Juárez R (1996) Factors involved in the colonization of fish intestine by yeasts. PhD thesis. University of Goteborg, Sweden.

Vázquez-Juárez R, Ascencio F, Andlid T, Gustafsson L, Wadstrom T (1993) The expression of potential colonization factors of yeasts isolated from fish during different growth conditions. Can. J. Microbiol. 39: 1135-1141.

Vázquez-Juárez R, Andlid T, Gustafsson L (1997) Adhesion of yeast isolated from fish gut to crude intestinal mucus of rainbow trout, *Salmo gairdner.* Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 6: 64-71.

Velegraki-Abel A, Marselou-Kinti U, Richardson C (1987) Incidence of yeasts in coastal sea water of the Attica Peninsula, Greece. Water Res. 21: 1363-1369.

Zambonino-Infante JL, Cahu CL (2001) Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. 130: 477-487.

Zinjarde SS, Pant A (2002) Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. J. Basic Microbiol. 42: 67-73.