



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**  
**Facultad de Ingeniería Marítima Ciencias Biológicas,**  
**Oceánicas y Recursos Naturales**

**“IDENTIFICACIÓN GENÉTICA Y DETERMINACIÓN  
DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE  
MICROHONGOS TERRESTRES RECOLECTADOS  
EN PUNTA FORT WILLIAM, ISLA GREENWICH,  
ANTÁRTIDA”**

**TESIS DE GRADO**

Previo a la obtención del Título de:

**BIÓLOGO**

Presentada por:

Eunice Eleonora Ordóñez Enireb

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2014

## AGRADECIMIENTO

A mi mamá, quien con fortaleza y grandiosa humanidad me ha educado para saber vivir y servir.

A mi director de tesis, Dr. Washington B. Cárdenas M., por su enseñanza, paciencia y exigencia, virtudes que alentaron el interés por escoger este Trabajo de Tesis.

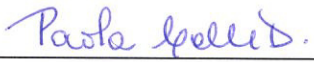
A mis profesores y a la ESPOL en general, por incentivar me a ser una profesional productiva para la sociedad.

A mis amigos, Santiago, Mariuxi, Jaime y Roberto que colaboraron en la realización de mi Tesis.

## DEDICATORIA

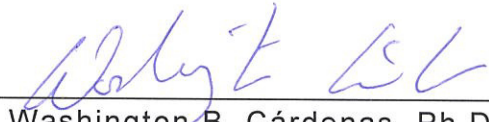
A quienes asumimos y  
sentimos a la biología  
como componente  
esencial de nuestro  
ecosistema.

## TRIBUNAL DE GRADUACION



---

Paola Calle D., Ph.D  
**PRESIDENTE**



---

Washington B. Cárdenas, Ph.D.  
**DIRECTOR DE TESIS**



---

Efrén Santos O., Ph.D.  
**MIEMBRO ALTERNO**

## DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL).

  
\_\_\_\_\_  
Eunice Ordóñez Enireb

## RESUMEN

El continente antártico se caracteriza por ser uno de los lugares más inhóspitos del planeta, donde la biota existente, representada mayormente por microorganismos, ha desarrollado características fisiológicas específicas para adaptarse a las condiciones extremas de la Antártida. Entre estas adaptaciones se destaca la producción de metabolitos secundarios sintetizados por microhongos, los cuales se consideran como importante biorecurso para la síntesis de compuestos con aplicaciones biotecnológicas. El presente estudio busca identificar especies fúngicas con actividad antibacteriana para la obtención de nuevos medicamentos antibiótico. Se aisló 17 cepas de microhongos terrestres, colectados alrededor de la estación científica ecuatoriana Pedro Vicente Maldonado (PEVIMA). Las cepas aisladas se identificaron molecularmente mediante el análisis de la región transcrita interna (ITS, por sus siglas en inglés). Se identificaron las especies *Antarctomyces psychrotrophicus*, *Thelebolus microsporus*, *Geomyces pannorum*, *Penicillium lividum*, *Coniochaeta savoryi*, *Morteriella sp.* y *Cryptococcus gilvescens*.

Posteriormente, 11 cepas fueron escogidas para investigar su potencial antibacteriano en tres períodos de crecimiento (*i.e* 15, 30 y 60 días). En cada bioensayo se midió el tamaño del halo de inhibición que desarrolla el microhongo frente a bacterias de importancia clínica, estas fueron: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*. Los bioensayos de inhibición demostraron actividad antibacteriana en siete cepas antárticas, representadas por las especies *T. microsporus*, *G. pannorum*, *P. lividum* y *C. savoryi*, y *Cr. gilvescens*, esta última se destacó por presentar potencial en todos los bioensayos analizados. La diferencia de bioactividad con respecto al período de crecimiento se reflejó únicamente en los bioensayos en los que se expusieron a las cepas de *T. microsporus* frente a *E. coli* y al aislado *C. savoryi* frente a *En. faecalis* ( $p < 0.05$ ).

Se logró establecer un protocolo para identificación genética de los microhongos antárticos aislados mediante el análisis de la región ITS. Adicionalmente los resultados demuestran el potencial antibacteriano de 7 microhongos antárticos, los cuales pueden ser utilizados para la obtención de futuros compuestos antibióticos.

# ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	V
ÍNDICE GENERAL.....	VII
ABREVIATURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XI
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO 1 .....	4
1 MARCO TEÓRICO .....	4
1.1 Continente Antártico.....	4
1.2 Microhongos antárticos .....	7
1.2.1 Reino Fungi.....	7
1.2.2 Diversidad de microhongos terrestres en la Antártida .....	9
1.2.3 Mecanismos de adaptación de microhongos criofílicos.....	12
1.2.4 Importancia farmacéutica de microhongos adaptados al frío .....	13
1.3 Identificación genética de hongos.....	16
1.3.1 Identificación por secuenciación del ITS .....	18
CAPÍTULO 2 .....	20
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
2.1 Identificación genética de microhongos de suelo antártico .....	22
2.1.1 Extracción de ADN.....	22
2.1.2 Amplificación del espacio transcrito interno (ITS).....	24
2.1.3 Análisis filogenético .....	27
2.2 Determinación del potencial antibacteriano de microhongos antárticos.....	27
2.2.1 Bioensayos de inhibición.....	28
2.2.2 Medición del halo de inhibición y análisis estadístico.....	31



CAPÍTULO 3 .....	32
3. Resultados .....	32
3.1 Diversidad filogenética de microhongos terrestres colectados en Punta Fort William.....	32
3.2 Selección de los microhongos antárticos con potencial antibacteriano.....	36
3.2.1 Análisis de prueba antimicrobiana realizada a las bacterias enfrentadas contra microhongos antárticos .....	36
3.2.2 Análisis del potencial antibacteriano de microhongos antárticos .....	37
CAPÍTULO 4 .....	45
4. DISCUSIÓN .....	45
CAPÍTULO 5 .....	57
5.1 CONCLUSIONES.....	57
5.2 RECOMENDACIONES.....	60
ANEXOS.....	62
BIBLIOGRAFÍA.....	84

## ABREVIATURAS

ARNr	Ácido Ribonucléico Ribosomal
BLAST	Básic Local Alignment Search Tool
bs	Bootstrap
g	gramo, gravedad
ID	Identidad
ITS	Internal Transcribed Spacer
LB	Luria-Bertani
mm	milímetros
nm	nanómetro
PDA	Potato Dextrosa Agar
PEVIMA	Pedro Vicente Maldonado
UFC	Unidad formadora de colonia
μl	microlitro

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA I. MEZCLA PARA REACCIÓN DE PCR .....	24
TABLA II. RESULTADO DE ALINEACIÓN DE LOS AISLADOS ANTÁRTICOS .....	35
TABLA III. RESULTADO SINTETIZADO DE LA PRUEBA ANTIMICROBIANA REALIZADA A LAS BACTERIAS ENFRENTADAS CONTRA MICROHONGOS ANTÁRTICOS.....	37
TABLA IV. POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE MICROHONGOS ANTÁRTICOS TRABAJADOS EN BIOENSAYOS DE INHIBICIÓN .....	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL SECTOR ESTUDIADO. ....	6
FIGURA 2. UBICACIÓN DE LOS PUNTOS DE MUESTREO EN PUNTA FORT WILLIAM, ISLA GREENWICH. ....	21
FIGURA 3. ESQUEMA DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ADN .....	23
FIGURA 4. REGIÓN AMPLIFICADA DEL ESPACIO TRANSCRITO INTERNO (ITS).....	24
FIGURA 5. PROGRAMA DE PCR PARA AMPLIFICACIÓN DEL ESPACIO TRANSCRITO INTERNO (ITS).....	25
FIGURA 6. ESQUEMA DEL PROCESO DE AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL ITS DE MICROHONGOS.....	26
FIGURA 7. ESQUEMA DEL BIOENSAYO ANTIBACTERIANO DE LOS MICROHONGOS ANTÁRTICOS .....	29
FIGURA 8. ÁRBOL FILOGENÉTICO DE LA REGIÓN ITS.....	34
FIGURA 9. POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE MICROHONGOS ANTÁRTICOS.. ..	41
FIGURA 10. SENSIBILIDAD BACTERIANA FRENTE A MICROHONGOS ANTÁRTICOS.....	44

## INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antimicrobianos es un tema de salud que cada vez causa mayor impacto a nivel global. En Estados Unidos, por ejemplo, las infecciones por bacterias resistentes causan la muerte de al menos 23.000 personas cada año (1). Generalmente el riesgo causado por estas bacterias (e.g. *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*), alojadas principalmente en el ambiente hospitalario se atribuye a la administración inadecuada de compuestos antibióticos, obtenidos de hongos u otros microorganismos

A partir de este problema se contempla la necesidad de encontrar nuevos compuestos antibióticos, más aún si consideramos que en las últimas tres décadas no se han descubierto nuevas clases de antimicrobianos; tiempo durante el cual se han producido netamente modificaciones de las clases de medicamentos antimicrobianos previamente existentes (2).

La búsqueda de compuestos incentiva la exploración de biorecursos con actividad antimicrobiana. Se considera que el reino Fungi contiene unos de los microorganismos más importantes como fuentes de compuestos activos en salud humana, entre ellos se destaca la penicilina, descubierta por Fleming a inicios del siglo XX.

En consideración a este requerimiento esencial que aporta a la salud pública, la presente tesis investiga nuevas fuentes de antibióticos en hongos que habitan en uno de los lugares menos explorados del planeta, la Antártida. El continente blanco se caracteriza por tener condiciones climáticas extremas, situación que lo convierte en un territorio novedoso en el campo de la investigación direccionado al descubrimiento de nuevos compuestos antibióticos, provenientes de metabolitos secundarios sintetizados por microhongos, las cuales se generan como respuesta al ambiente antártico.

Debido a la importancia biotecnológica de los microorganismos fúngicos, es indispensable identificar las especies que sintetizan los compuestos con actividad antibacteriana, para lo cual, el uso de técnicas moleculares se convierte en una herramienta válida para identificación de hongos.

Según estos criterios se desarrolló el presente trabajo de investigación, titulado: "Identificación genética y determinación del potencial antibacteriano de microhongos de suelo antártico, colectados en Punta Fort William, Isla Greenwich." El objetivo planteado fue identificar genéticamente los microhongos aislados de muestras del suelo Antártico y determinar aquellos

aislados con potencial actividad antibacteriana. Para tal efecto se desarrollaron los siguientes tres objetivos específicos:

1. Se amplificó y analizó el espacio transcrito interno (ITS, por sus siglas en inglés) de diecisiete microhongos terrestres antárticos.
2. Se determinó el potencial antibacteriano de microhongos antárticos, contra bacterias de importancia en salud pública.
3. Se estableció un banco genético y de microhongos antárticos terrestres.

El estudio es continuación de investigaciones previas realizadas en el laboratorio de Biomedicina de la ESPOL, las cuales formaron parte del mega proyecto “Diversidad microbiana alrededor de la estación Pedro Vicente Maldonado, Antártida: Distribución, abundancia y fisiología de hongos, algas, bacterias y cianobacterias”

# CAPÍTULO 1

## 1 MARCO TEÓRICO

### 1.1 Continente Antártico

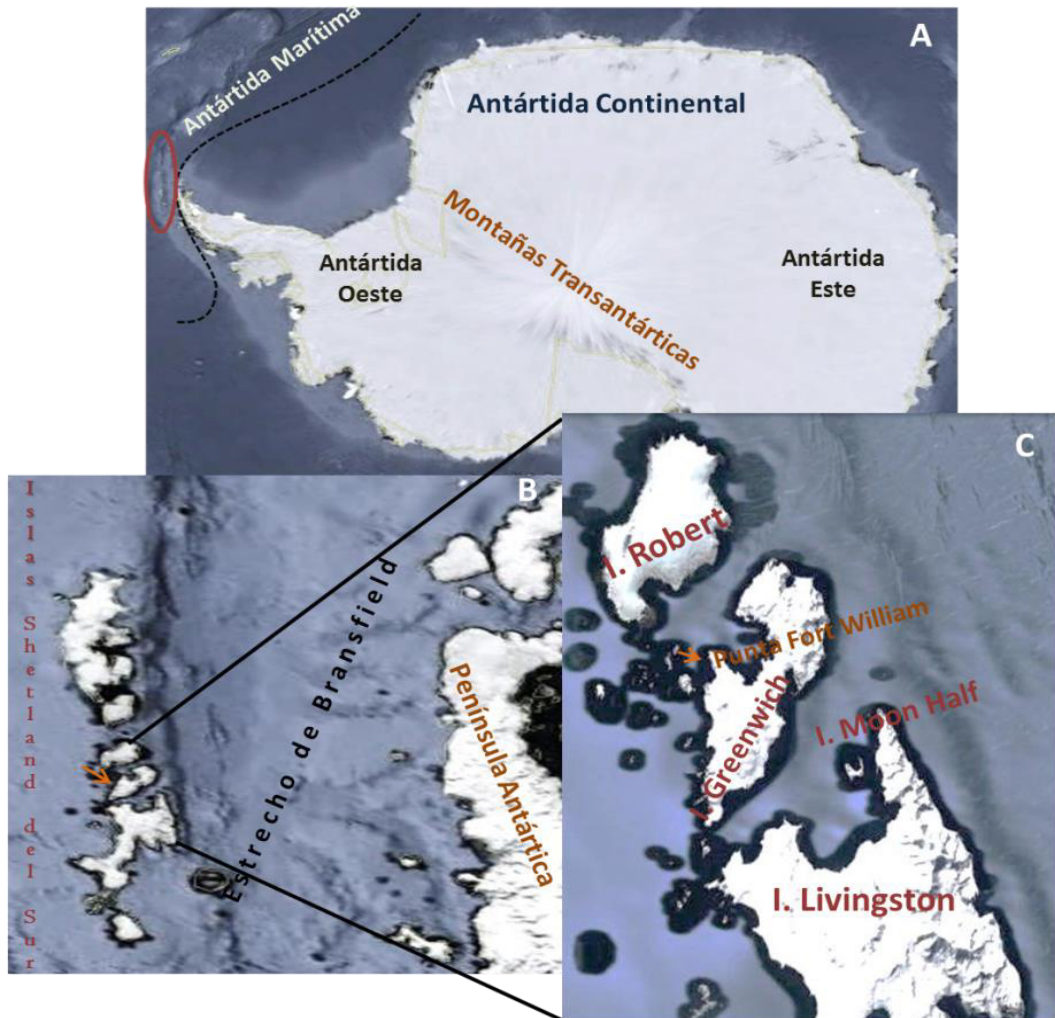
El territorio antártico, ubicado a 60°S del planeta Tierra, posee 13.66 millones de km<sup>2</sup> y ocupa el 10% de la superficie terrestre (3). La Antártida es el desierto frío más grande del planeta, 98% de su territorio está cubierto por hielo, motivo por el que también ha adquirido el nombre de “Continente Blanco”.



Longitudinalmente el cinturón montañoso Trans-Antártico divide al continente blanco en dos regiones principales: Antártida Este y Antártida Oeste (4). El bloque oriental es el más grande y geológicamente cartónico -porción continental estable- a diferencia del bloque occidental, el cual forma parte del Anillo de Fuego y se caracteriza por ser no cartónico y de menor tamaño (5,6).

A la región oeste pertenece la Isla Greenwich, incluida en el grupo de las Islas Shetland del Sur, las cuales están paralelas a la Península Antártica. En Greenwich, uno de los sectores más relevantes por su extensión, es Punta Fort William (7) (Fig. 1), lugar donde está ubicada la base científica ecuatoriana Pedro Vicente Maldonado (PEVIMA).

En la Isla Greenwich y en general, en toda la superficie del continente antártico, algunas de las condiciones climáticas que se presentan son: frío extremo, baja humedad, alto nivel de radiación UV, constantes ciclos de derretimiento y congelación, estrés osmótico, baja cantidad de nutrientes y eventualmente alcalinidad en el suelo (8–10). Estas características adversas convierten a la Antártida en el lugar más inhóspito del planeta; sin embargo, algunos grupos de organismos, principalmente microorganismos, han logrado adaptarse y colonizar el continente blanco.



**Figura 1.** Ubicación geográfica del sector estudiado. A) Vista general del continente antártico. La línea punteada señala la separación entre la región Continental y la región Marítima (encerrada en rojo). B) Grupo de Islas Shetland del Sur. La flecha señala la Isla Greenwich. C) Señalización de la Estación Científica PEVIMA, ubicada en Punta Fort William.

La microbiota antártica está principalmente representada por: arqueas, bacterias, protozoarios, micro algas y hongos (levaduras y filamentosos) (8,9).

Las investigaciones relacionadas con microhongos antárticos se han realizado en menor cantidad en comparación con bacterias, arqueas y algas antárticas (11); sin embargo, a pesar que el continente está perdiendo su carácter pristino (12,13), se enfatiza el estudio en microhongos debido al interés como biorecurso para el desarrollo biotecnológico enfocado principalmente en el área industrial como degradadores de hidrocarburos (14).

## **1.2 Microhongos antárticos**

### **1.2.1 Reino Fungi**

El Reino Fungi comprende organismos eucariotas cosmopolitas, con formas de vida unicelular o pluricelular; su nutrición heterótrofa consiste en un mecanismo de digestión por absorción externa (14,15) y, con excepción de las formas de vida más primitivas, su pared celular está cubierta de quitina (15,16). El reino de los hongos alberga una cantidad de organismos similar al Reino Animalia y superior al Reino Viridiplantae (17); este grupo incluye los

parásitos vegetales royas y tizones, líquenes, setas, levaduras y hongos filamentosos (17,18).

Algunos estudios se han enfocado en describir la ruta evolutiva de los organismos fúngicos (19–21). Se sugiere que los hongos están estrechamente relacionados con los animales (22); ambos divergieron de una población eucariota acuática con zoosporas flageladas, de la cual se dividieron dos linajes que posteriormente originaron a los dos reinos eucariotas más abundantes: Animalia y Fungi (18). Este último evolutivamente perdió su flagelo para colonizar ecosistemas terrestres (19,20).

La clasificación taxonómica del reino Mycota se mantiene ambigua debido a que aún no se precisa filogenéticamente el rango y la ubicación de ciertos grupos relacionados a este reino (20,23–25). Se conoce que los mycota están divididos por el subreino Dikarya, comprendido por los filum Ascomycota y Basidiomycota (26). Se suman además cuatro filum tradicionalmente establecidos: Glomeromycota, Blastocladiomycota, Zygomycota y Chytridiomycota. Los integrantes de este último taxón presentan flagelo (27). Recientemente se insertó el nuevo filum Cryptomycota, propuesto como la base evolutiva del reino de los hongos, y el cual forma un clado con los catalogados parásitos eucariotas: Microsporidias (15,16).

Se ha determinado que la diversidad reino Fungi está distribuida en 536 familias (28); no obstante, aunque la abundancia de este reino aún no se establece con exactitud (29–32), está considerado por la mayoría de autores un estimado total, catalogado como conservativo, de 1.5 millones de especies. Esta cantidad fue propuesta por Hawksworth (33) quien se basó en una relación 6:1 entre hongos y plantas, es decir que por cada planta existen 6 especies de hongos. De este valor se considera que el 7% de hongos están descritos (34) , siendo los más abundantes los fila Ascomycota y Basidiomycota (17,18).

### **1.2.2 Diversidad de microhongos terrestres en la Antártida**

El componente biológico en la Antártida es altamente endémico, producto de una selección natural a nivel molecular, estructural y fisiológico (35). Mayormente la biota está dominada por microorganismos (36), cuya presencia se debe principalmente al resultado del aislamiento geográfico (37) que resultó de la separación con el bloque continental Gondwana y la formación del Frente Polar, hace más de 10 millones de años (38).

Entre la microbiota antártica se incluyen a los microhongos. Este término se atribuye al cuerpo fúngico constituido principalmente por filamentos

microscópicos, que pueden ser visibles sólo después de adherirse y crecer sobre un sustrato (36). En el ecosistema, los hongos interactúan con otros organismos en una relación mutualista o patógena, además tienen un rol como descomponedores de materia orgánica (13). Por otro lado, también ofrecen beneficios económicos en aplicaciones biotecnológicas a nivel industrial (*e.g.* en industria farmacéutica) (39).

Según su origen, la diversidad de microhongos en la Antártida está conformada por especies endémicas, autóctonas y cosmopolitas (40). Las dos primeras categorías son especies nativas extremófilas, restringidas a desarrollar su ciclo de vida bajo las condiciones físicas que se manifiestan en continente blanco (41); mientras que las especies cosmopolitas, en forma de propágulos, son importadas al continente por factores de transporte global, a través del viento y aves migratorias o por introducción antropogénica, entre otros (36,42,43). Estos organismos cosmopolitas son los más comunes en la Antártida, sin embargo están restringidos a condiciones climáticas favorables para completar su ciclo de reproducción (9).

Los registros de identificación y aislamiento de hongos en la Antártida datan desde inicios del siglo XX (44). Hasta el 2012 se reportaron 1000 especies de hongos en la Antártida, excluyendo a los líquenes (45). Sin embargo falta descubrir la verdadera magnitud de la micodiversidad antártica. Una revisión

bibliográfica acerca de estudios latinoamericanos en el continente, menciona que las investigaciones relacionadas a hongos ocupan el último lugar (3% del total), con respecto a otros organismos (46). Se conoce además que los estudios de microhongos antárticos están más direccionados a especies marinas que a terrestres (9,46).

De acuerdo a la adaptación térmica de crecimiento, algunos autores categorizan a los microhongos de ambientes fríos como psicrófilicos y psicrótróficos, según clasificación propuesta por Morita (47). El rango de temperatura entre estas dos categorías no está claramente definido (44,48,49), pero se ha establecido que la adaptación de los psicrófilicos no sobrepasa los 20°C e idealmente crecen a una temperatura igual o menor a 15°C (39). Los microhongos psicrótróficos pueden crecer hasta los 25°C (12).

Por otro lado, Hoshino *et al.* (44) redefinen una nueva clasificación enfocada en las medidas óptimas de crecimiento de hongos; es así que en base a su comportamiento ecológico proponen el término “hongos criófilicos”. Este término incluye a todos los hongos que habitan en la criósfera, completan su ciclo de vida (con reproducción sexual y/o asexual) y crecen a temperaturas menos cero donde el agua se mantiene en estado sólido como nieve o hielo (44)

### **1.2.3 Mecanismos de adaptación de microhongos criofílicos**

La supervivencia de hongos en la criósfera terrestre, se debe en mayor medida a un mecanismo de evasión del crecimiento durante los períodos más fríos, mientras que temperaturas más favorables reactivan su desarrollo a partir de esporas (39). Es importante destacar que durante períodos de estrés, estos organismos ejecutan diferentes estrategias metabólicas para adaptarse a las condiciones adversas del ambiente (9).

Algunos de estos mecanismos incluyen: a) modulación lipídica para mejorar el flujo a través de la membrana celular (*e.g.*, aumento de ácidos grasos insaturados) (8,50); b) síntesis de proteínas anticongelantes y crioprotectores (51,52); c) reducción del crecimiento y consumo de glucosa (53); d) aumento de respuesta antioxidante a través de compuestos no enzimáticos (*e.g.*, fenol) (54); aumento de la producción de energía y activación de rutas metabólicas alternas para metabolismo de carbohidratos (53); e) elevada expresión de las denominadas “proteínas de choque frío,” que probablemente intervienen en procesos para la producción de las demás proteínas (48), el plegamiento entre proteínas, control de estructuras secundarias de ácidos nucleicos y en procesos de transcripción y traducción (52); y f) alta actividad enzimática, que puede ser 10 veces mayor que sus homólogos mesofílicos, lograda por desestabilización de toda la proteína o



del sitio activo, permitiendo que el centro catalítico sea más flexible a temperaturas cercanas a la congelación (55).

Dentro de un contexto general, los microorganismos adaptados a ambientes fríos tienen un gran potencial biotecnológico (56). Es así que, por desarrollar diversos mecanismos de adaptación a bajas temperaturas, los hongos criofílicos están considerados como un atractivo biorecurso dentro de este grupo de microorganismos (54). Entre sus aplicaciones, se conoce que las enzimas producidas por los microhongos antárticos pueden ayudar a mejorar los procesos industriales en condiciones de baja temperatura (14).

#### **1.2.4 Importancia farmacéutica de microhongos adaptados al frío**

Aunque las propiedades terapéuticas de los hongos ya habían sido descritas antes del descubrimiento de la penicilina, a inicios del siglo 20, fue este último el que catapultó a los hongos como biorecurso con aplicaciones farmacéutica (57). A nivel global están considerados como los mayores participantes en la industria (58). A pesar que algunos compuestos sintetizados por hongos son perjudiciales para el ser humano (*e.g.*, aflatoxinas) (59), existen numerosos compuestos de origen fúngico con beneficios terapéuticos, principalmente como antifúngicos, antitumorales y antibacterianos (60). Adicionalmente se destaca también sus cualidades como inmunosupresores y agentes hipocolesterolémicos (58).

Los hongos filamentosos son uno de los grupos biológicos que producen la mayor diversidad de compuestos naturales (61). El beneficio farmacéutico de los micetos se atribuye a los metabolitos secundarios que ellos sintetizan. Estos metabolitos son compuestos orgánicos que presentan estructuras muy diversas, de bajo peso molecular, y se originan a partir de intermediarios del metabolismo primario (57,61).

La cantidad y desempeño de las funciones de los metabolitos secundarios de origen fúngico no se conoce totalmente, considerándose además que el potencial de estos compuestos está subestimado (62). Algunos de estos metabolitos son terpenos, péptidos no ribosomales, poliquétidos y compuestos derivados de ácidos grasos y de aminoácidos (63).

La mayoría de los medicamentos de origen fúngico han provenido de hongos de climas templados o tropicales; escasos estudios han evaluado el potencial de los metabolitos secundarios secretados por micetos que habitan en regiones frías como el Ártico, Antártida o los Alpes (64).

Las enzimas derivadas de organismos criofílicos, ofrecen una alta actividad catalítica a temperaturas bajas y moderadas (56). Esta característica proyecta un creciente interés en el aislamiento de enzimas de utilidad industrial, provenientes de microhongos antárticos (65). Así como su

importancia en aplicaciones biomédicas como potenciales agentes antitumorales y antibacterianos (66).

La bioprospección de metabolitos secundarios secretados por microhongos terrestres antárticos, promueve el interés de estudiar estos organismos como biorecurso para la obtención de nuevos medicamentos antibióticos, necesarios para enfrentar el grave problema de salud mundial que representa la multiresistencia a los antibióticos.

Entre los compuestos antibacterianos sintetizados por hongos están: beta lactámicos (cefalosporinas y penicilina sintetizados por péptidos no ribosomales), benzopironas (cumarina), macrólidos (phomolides) y alcaloides (epidithiodioxopiperazina), siendo el betalactámico penicilina uno de los más estudiados (67).

La resistencia que han adquirido las bacterias a los medicamentos actuales, se derivó principalmente del uso descontrolado de los antibióticos (68). En este contexto, las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (SAMR) son uno de los casos más preocupantes a nivel global (67).

En el caso de algunos países de América Latina, hasta el 90% de las infecciones por *S. aureus* están representados por la variedad SAMR (69); en

Ecuador, hasta el año 2010, esta cepa se detectó en el 29% de los casos (69). La resistencia puede manifestarse en las bacterias que hasta ahora son susceptibles a los antibióticos actuales (70), por lo que es importante profundizar en la búsqueda de biorecursos para la obtención de nuevos medicamentos antibacterianos.

Considerando la importancia medicinal de los hongos, el potencial biotecnológico de los ejemplares criofílicos y el escaso estudio de los compuestos terapéuticos derivados de los micetos terrestres en la Antártida, se torna importante identificar claramente –mediante el uso de diferentes técnicas taxonómicas- las especies fúngicas del continente blanco que pueden ser utilizadas como biorecurso en el área farmacéutica.

### **1.3 Identificación genética de hongos**

Los marcadores moleculares, junto con las claves morfológicas y la caracterización química de metabolitos, conforman un conjunto de herramientas taxonómicas para la identificación de hongos (71). El uso integral de estas herramientas es necesario para precisar ciertos aspectos morfológicos que comúnmente dificultan la identificación de estos organismos (e. g. diferencia en caracteres según el estadio sexual o asexual

del hongo) (17), evitando así, catalogar con diferentes nombres a la misma especie (72).

El desarrollo de técnicas moleculares para estudios taxonómicos en hongos (a partir de la década de los 90), contribuyó principalmente a la caracterización de especies pleomórficas. Consecuentemente, la aplicación de la taxonomía molecular incrementó a nivel global la identificación de micetos (27), incluyendo a aquellos que habitan en ecosistemas extremos como la Antártida (14).

A nivel molecular, se han determinado algunos genes claves para la identificación de hongos, tales como las subunidades 18S, 28S e ITS del ARN ribosomal (ARNr), el gen mitocondrial citocromo C oxidasa (COI), genes codificadores de las proteínas RPB1 y RPB2 (subunidades de mayor tamaño de la ARN polimerasa II) y MCM7 (proteína de mantenimiento de minicromosomas) (65,73). No obstante, el espacio transcrito interno (ITS) es el código de barras genético más aceptado para estudios filogenéticos en hongos (74) y su uso ha sido sustentado en algunas investigaciones (75,76).

### **1.3.1 Identificación por secuenciación del ITS**

El espacio transcrito interno (ITS) es un segmento tri-fragmentado, con múltiples copias codificadas por el ADN ribosomal (ADNr) (77).

Este gen originalmente es transcrito en el nucléolo por la ARN polimerasa I, produciendo un pre-ARN ribosomal que contiene las subunidades eucariotas 18S, 5.8S y 28S (25S en levaduras). Estas subunidades están separadas entre sí por las fracciones ITS1 e ITS2, las cuales en conjunto con la subunidad 5.8S completan el segmento ITS. A su vez, el pre-ARN ribosomal está flanqueado por los espacios externos transcritos ETS1 y ETS2 (77,78). Durante el proceso de maduración del ADNr los nucleótidos correspondientes a las regiones ITS y ETS son eliminados, dando como resultado individual las subunidades 18S (SSU) 5.8S y 28S (LSU) (79,80). En hongos el tamaño de la región ITS varía entre 450 y 750pb (81).

El ADNr es una familia multigénica, repetida en tándem y posicionada en varios loci del cromosoma. El uso de secuencias del ADNr para estudios taxonómicos se debe a su alta homogeneidad intraespecies y variabilidad interespecífica (82). Esta característica se explica por un proceso de evolución concertada, producto de la homogenización de genes durante un intercambio genético (83). Sin embargo, en relación con el ITS, un estudio menciona que esta región no es producto de una evolución concertada,

debido a que hay polimorfismo intraindividual, intraespecífico, lo que sugiere que no siempre el ADNr evoluciona en un modo altamente concertado (84).

A pesar de existir incertidumbre en el proceso evolutivo de la región ITS, algunos autores destacan ciertas características de esta secuencia para sustentar su uso en la taxonomía molecular de hongos, entre las cuales se destacan: i) alto grado de variabilidad interespecífica; ii) sitios bien conservados, lo que facilita el uso de iniciadores para amplificar esta región; iii) por su naturaleza ribosomal, existen múltiples copias dentro del genoma (81); iv) gran disponibilidad de secuencias en el banco de genes (GenBank) (74); y v) puede ser amplificado a partir de poca cantidad de muestra (77).

# **CAPÍTULO 2**

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

Los microhongos antárticos analizados en este estudio provinieron de muestras de suelo colectadas en el 2008 durante la XII Expedición Antártica Ecuatoriana (85). A partir de estas muestras se elabora el presente trabajo de tesis, el cual es una continuación del estudio realizado por Coello (86), quien aisló e identificó morfológicamente las cepas antárticas analizadas en esta investigación (Fig. 2).





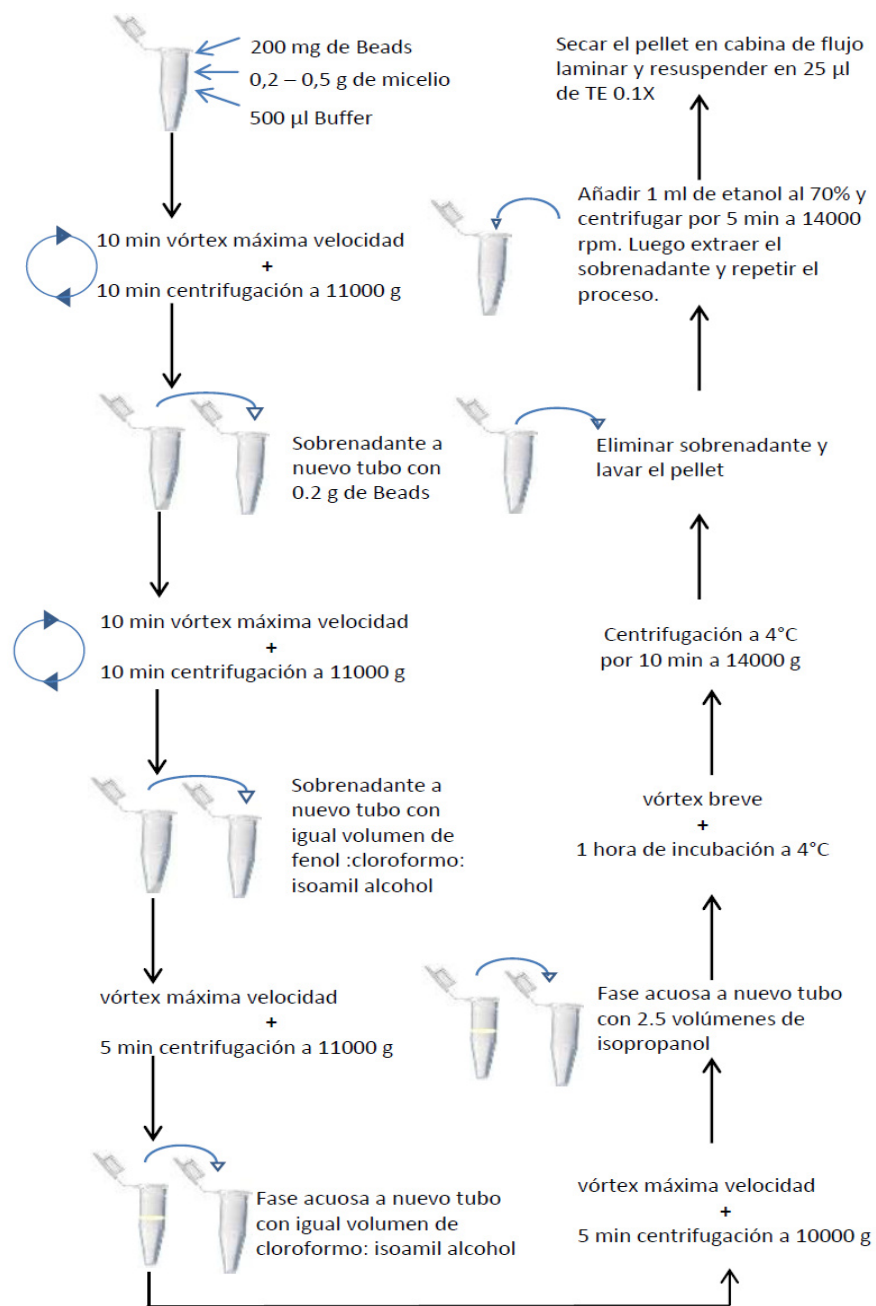
**Figura 2.** Ubicación de los puntos de muestreo en Punta Fort William, Isla Greenwich. El círculo rojo señala la Base Científica Ecuatoriana PEVIMA ubicada a  $62^{\circ}26'56.64''S$   $59^{\circ}44'28.9''O$ . Fuente: Coello, 2011 (86)

## **2.1 Identificación genética de microhongos de suelo antártico**

Se realizó la identificación genética de diecisiete microhongos terrestres antárticos. Las cepas fueron previamente aisladas por Coello (86) y están cultivadas en medio nutritivo PDA con Cloranfenicol (100µg/ml, concentración final) a 4°C.

### **2.1.1 Extracción de ADN**

El material genético se extrajo de diecisiete microhongos con 20 a 30 días de crecimiento. La extracción de ADN se adaptó a un protocolo previamente descrito (87). La metodología se basa en una extracción fenólica utilizando inicialmente esferas de zirconia/silicio (0.2 mm de diámetro), para asegurar el rompimiento de la pared celular. Posteriormente se procede a separar la fase de ácidos nucleicos y finalmente se precipita el ADN, el cual es pelletizado y resuspendido en una solución de 0.1X TE (1mM Tris pH8, 0.1mM EDTA) (Fig. 3 y Anexo A).



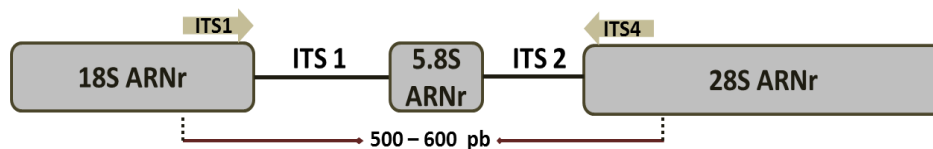
**Figura 3.** Esquema del proceso de extracción de ADN

### 2.1.2 Amplificación del espacio transcrito interno (ITS)

La región ITS fue amplificada por medio de una PCR convencional, utilizando primers universales para hongos ITS1 e ITS4 (88). Para la reacción de PCR se siguieron las condiciones recomendadas por el fabricante, para la enzima polimerasa “PlatinumTaq DNA polymerase” (Invitrogen), ajustando el volumen final de la mezcla a 20  $\mu$ l (Tabla I y Figura 4).

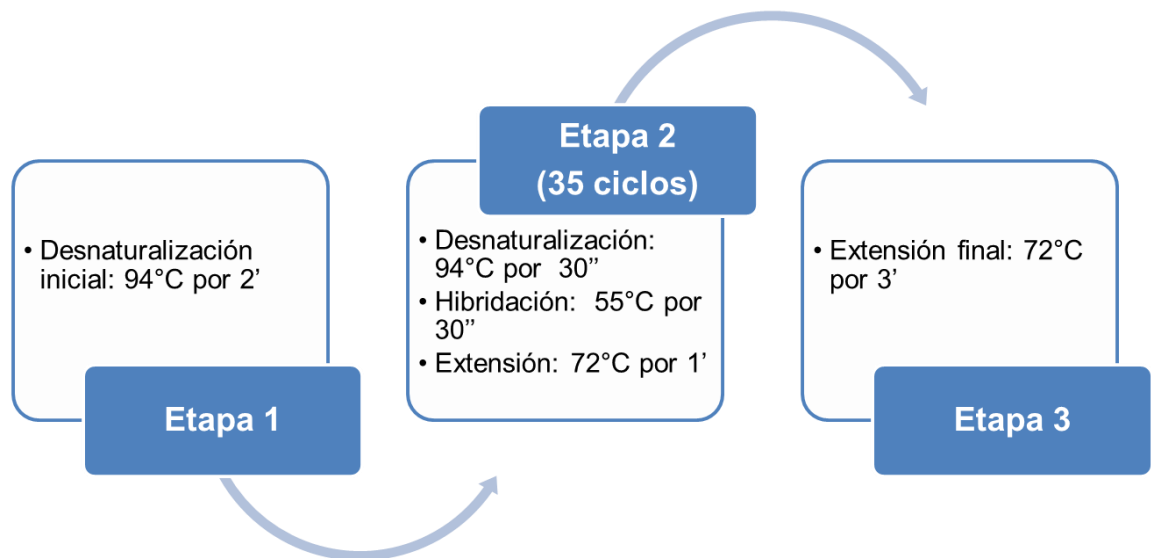
**Tabla I.** Mezcla para reacción de PCR

Reactivo	Concentración inicial	Volumen inicial	Concentración final
PCR Buffer	10X	2.0 $\mu$ l	1X
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	0.6 $\mu$ l	1.5 mM
dNTP's mix	10 mM	0.4 $\mu$ l	0.2 mM
Primers mix	10 $\mu$ M	1.0 $\mu$ l	0.5 $\mu$ M
PlatinumTaq		0.08 $\mu$ l	1 U
H <sub>2</sub> O		14.92 $\mu$ l	
ADN		1.0 $\mu$ l	

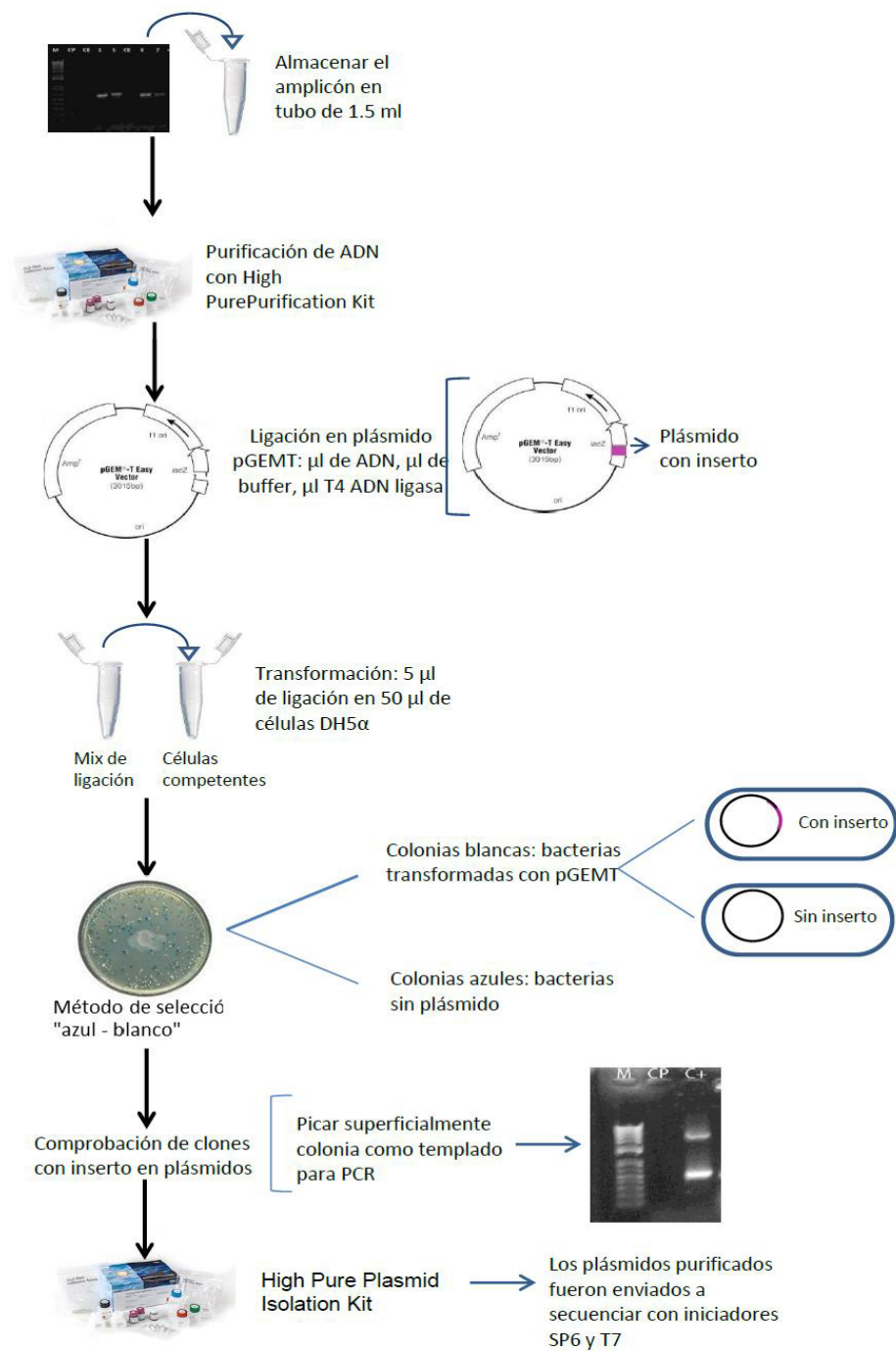


**Figura 4.** Región amplificada del Espacio Transcrito Interno (ITS)

La PCR se corrió con 35 ciclos de amplificación, en la Figura 5 se detalla el programa utilizado. Finalmente el amplicón obtenido se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%, teñido con SYBR Safe. Las bandas entre 500 y 600 pares de bases (pb) se cortaron para posterior clonación y secuenciación. Los fragmentos de la región ITS fueron insertados en el plásmido pGEMT (Promega) y purificados con “High Pure Plasmid Isolation Kit” (Roche) por cada muestra se envió a secuenciar un clon con el inserto ITS (Figura 6).



**Figura 5.** Programa de PCR para amplificación del espacio transcrito interno (ITS)



**Figura 6.** Esquema del proceso de amplificación y secuenciación del ITS de microhongos

### **2.1.3 Análisis filogenético**

Se prestaron los servicios de la compañía Genewiz (New Jersey, Estados Unidos) para obtener la secuencia completa de la región ITS. Con el programa BLAST (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) del NCBI se agruparon las 17 secuencias obtenidas con otras publicadas en el banco de genes (GenBank). Se utilizó el programa ClustalW del software MEGA6 para alinear las secuencias y posteriormente construir un árbol filogenético.

El árbol fue construido con el método estadístico de máxima verosimilitud. Se utilizó el modelo evolutivo basado en el parámetro-2 Kimura con bootstraps de 1000 repeticiones. Los valores <50% fueron eliminados.

## **2.2 Determinación del potencial antibacteriano de microhongos antárticos**

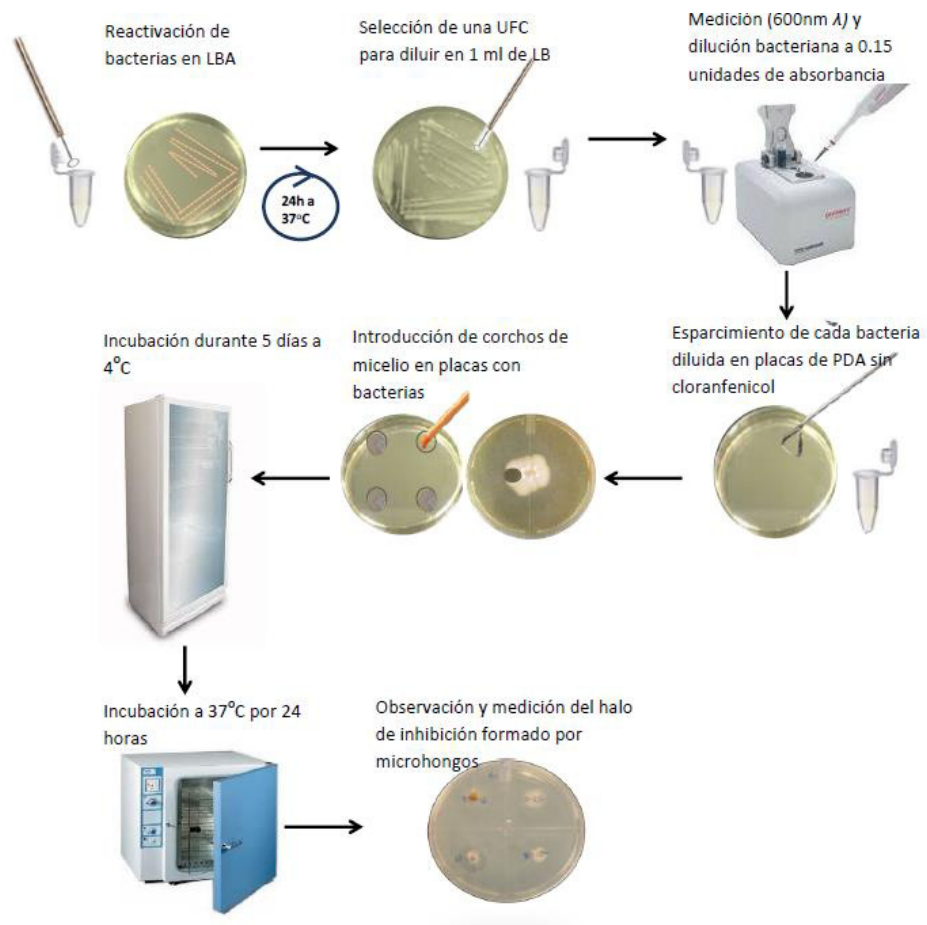
El potencial antibacteriano fue evaluado en 11 aislados antárticos con 15, 30 y 60 días de incubación. La bioactividad de los microhongos se comprobó mediante bioensayos con corchos de micelio (89), exponiendo a los hongos contra cuatro bacterias de interés clínico, estas fueron: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*. Las

bacterias utilizadas fueron otorgadas por diferentes centros de salud de la ciudad de Guayaquil; se destaca además que previo a la realización de este trabajo, las cepas bacterianas fueron enviadas al laboratorio clínico “Dra. Glenda Castro Cañarte” para su respectivo análisis de susceptibilidad.

### **2.2.1 Bioensayos de inhibición**

Los bioensayos de inhibición se realizaron con un método de selección rápido, definiendo como antibacteriano a aquellas cepas fúngicas capaces de inhibir el crecimiento de las bacterias, sin discriminar el tamaño del halo formado. Para los bioensayos, cada microhongo fue resembrado individualmente en PDA, sin cloranfenicol, e incubado a 4°C durante el respectivo período de crecimiento (*i.e.* 15, 30 o 60 días) (Figura 7). Las bacterias se mantenían criopreservadas a -80°C con 15% de glicerol en medio LB.





**Figura 7.** Esquema del bioensayo antibacteriano de los microhongos antárticos

### **2.2.1.1 Dilución de bacterias**

Las bacterias fueron diluidas a una absorbancia de 0.15 a 600 nm. Para la dilución, las bacterias criopreservadas fueron reactivadas en agar LB e incubadas por 24 horas a 37°C. Luego se colectó una unidad formadora de colonia (UFC) y se diluyó en un 1ml de LB (por el pequeño tamaño de las colonias, en *Enterococcus faecalis* se colectó una masa de UFC para la dilución). La densidad bacteriana fue medida en el cuantificador NanoDrop 2000 a una densidad óptica de 600nm. Finalmente 100 µl de cada dilución bacteriana fue esparcido en placas con PDA.

### **2.2.1.2 Enfrentamiento de microhongos antárticos contra bacterias patógenas**

Por cada hongo a evaluar se tomó, desde el extremo distal de la colonia fúngica, un corcho de micelio y se lo colocó en una placa de PDA tapizado con la bacteria a investigar (por cada bacteria se colocaban máximo cuatro corchos). Las placas fueron incubadas a 4°C durante 5 días para permitir el crecimiento del hongo. Posteriormente, el crecimiento bacteriano fue activado con una incubación a 37°C por 24h. El potencial antibacteriano de los aislados antárticos fue evaluado por la formación de un halo de inhibición.

Se realizó un mínimo de tres réplicas por cada bioensayo a los 15, 30 y 60 días de crecimiento del microhongo. Como control positivo en cada réplica se

utilizó un disco de inhibición con 7.5 mcg Cefotaxime, antibiótico de amplio espectro.

### **2.2.2 Medición del halo de inhibición y análisis estadístico**

El diámetro del halo de inhibición bacteriano fue medido en milímetros. Por cada halo observado se calculó un promedio entre tres medidas realizadas desde el borde externo de la colonia fúngica hasta el borde de la zona inhibida. El programa Motic Images Plus 2.0 fue utilizado para las mediciones. Con el programa SPSS 19 se realizó el análisis estadístico de los halos de inhibición formados por las muestras fúngicas; la homogeneidad de los resultados fue evaluada con las pruebas Kruskal – Wallis y Mann Whitney, con un nivel de confianza del 95%.

# CAPÍTULO 3

## 3. Resultados

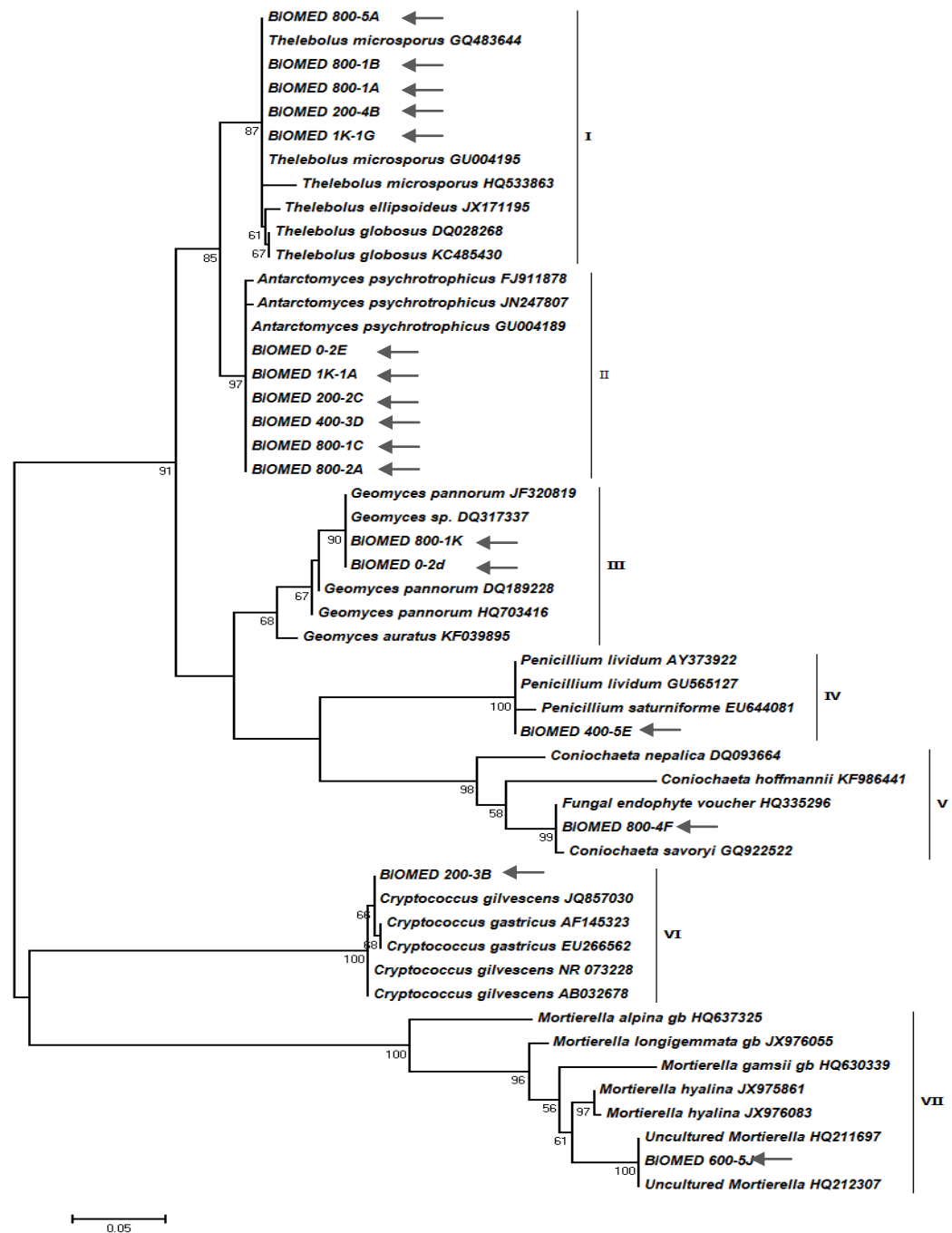
### 3.1 Diversidad filogenética de microhongos terrestres colectados en Punta Fort William

Diecisiete cepas de microhongos antárticos fueron identificadas y agrupadas en siete clados según análisis de la región ITS. El filum Ascomycota fue el más abundante y diverso, representado por las especies *Thelebolus microsporus* y *Antarctomyces psychrotrophicus*, como las más numerosas, seguido por *Geomyces pannorum*, *Penicillium lividum* y *Coniochaeta savoryi*. En otro grupo fue identificado la cepa *Mortierella* sp., categorizada como

Zygomyceto, la cual se ubicó en una distancia cercana del Basidiomyceto, *Cryptococcus gilvescens*.

Exceptuando al grupo de *Cr. gilvescens*, los grupos formados por las cepas antárticas reflejaron una consistencia mayor al 80% de bs (ver Fig. 8). Además, se señala que con todas las secuencias de los hongos reportados se obtuvieron valores altos de similitud (98% - 100%), en las alineaciones con la base de datos de la región ITS (Tabla II).

Los clados I y II, donde se agrupan los taxones *T. microsporus* y *A. psychrotrophicus* fueron los únicos formados con secuencias exclusivas de la Antártida.



**Figura 8.** Árbol filogenético de la región ITS. Los valores de bootstraps están representados como porcentaje en cada nodo. Se señala (con flecha) los 17 microhongos antárticos muestreados en este estudio.

**Tabla II.** Resultado de alineación de los aislados antárticos

Cepa	Especie propuesta	Resultado BLAST			
		Secuencia referencia	% ID	Proc.	Año
200-4B, 800-1A, 800-5A, 800-1B, 1K-1G	<i>Thelebolus microsporus</i>	<i>Thelebolus microsporus</i> (GU004195)	100%	Antártida/ suelo	2009
0-2E, *200-2C, *400-3D, 800-2A, *800-1C, 1K-1A	<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i>	<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i> (GU004189)	100%	Antártida/ suelo	2009
0-2d, 800-1K	<i>Geomyces pannorum</i>	<i>Geomyces sp.</i> (DQ317337)	100%	Antártida/ suelo o madera	2005
		<i>Geomyces pannorum</i> (JF320819)	99%	<i>Cordyceps sinensis</i>	2011
400-5E	<i>Penicillium lividum</i>	<i>Penicillium lividum</i> (AY373922)	100%	N/A	2003
800-4F	<i>Coniochaeta savoryi</i>	<i>Coniochaeta savoryi</i> (GQ922522)	98%	N/A CBS	2012
		Fungal endophyte (HQ335296)	99%	Antártida/ endofítico	2010
600-5J	<i>Mortierella sp.</i>	Uncultured <i>Mortierella</i> (HQ211697)	99%	Ártico/ suelo	2010
200-3B	<i>Cryptococcus gilvescens</i>	<i>Cryptococcus gilvescens</i> (JQ857030)	100%	Antártida	2012

\*Identidad 99% con respecto a la secuencia referencia

## **3.2 Selección de los microhongos antárticos con potencial antibacteriano**

### **3.2.1 Análisis de prueba antimicrobiana realizada a las bacterias enfrentadas contra microhongos antárticos**

El antibiograma realizado a los aislados bacterianos mostró que las cepas Gram negativas *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* presentan resistencia con tres o más familias de antibióticos. Resultado similar se manifestó con la cepa gram positiva *Enterococcus faecalis*; en contraste *Staphylococcus aureus* reflejó total susceptibilidad con los antibióticos probados.

En la Tabla III se muestra un resumen del antibiograma, exponiendo las clases de antibióticos y su efecto sobre las bacterias arriba mencionadas. Los agentes antimicrobianos utilizados por cada clase de antibiótico se detallan en los anexos B y C.



**Tabla III.** Resultado sintetizado de la prueba antimicrobiana realizada a las bacterias enfrentadas contra microhongos antárticos.

Clase de antibióticos	Aztreonam	Aminoglucósidos	Carbapenemas	Cefalosporinas	Fenicoles	Fluoroquinolonas	Fosfonatos	Lincosamida	Linezolidas	Macrólidos	Nitrofuranos	Oxazolidinona	Penicilinas	Ansamicinas	Tetraciclinas	Trimetoprima/ Sulfonamides	
Bacterias																	
<i>E. coli</i>	S	S	S	S	-	R	S	-	-	-	S	-	R	-	S	R	
<i>K. pneumoniae</i>	R	R	S	R	-	R	S	-	-	-	R	-	R	-	R	I	
<i>En. faecalis</i>	-	R	S	-	R	S	S	-	S	-	S	-	S	R	R	-	
<i>S. aureus</i>	-	S	-	S	S	S	-	S	S	S	-	-	S	S	S	S	

R, resistente; S, sensible; I, intermedio; -, no aplica.

### 3.2.2 Análisis del potencial antibacteriano de microhongos antárticos

Se observó actividad antibacteriana en 7 de los 11 hongos analizados. Ninguna de las cepas evaluadas del aislado *A. psychrotrophicus* mostró bioactividad antibacteriana (0-2E, 200-2C y 400-3D). Se obtuvo similar resultado con *T. microsporus* 800-5A (Tabla IV).

**Tabla IV.** Potencial antibacteriano de microhongos antárticos trabajados en bioensayos de inhibición

<b>Microhongo</b>	<b>Código de la cepa</b>	<b>Potencial antibacteriano</b>
	800-5A	-
<i>T. microsporus</i>	800-1B	+
	1K-1G	+
	0-2E	-
<i>A. psychrotrophicus</i>	200-2C	-
	1K-1A	-
	0-2d	+
<i>G. pannorum</i>	800-1K	+
<i>P. lividum</i>	400-5E	+
<i>C. savoryi</i>	800-4F	+
<i>C. gilvescens</i>	200-3B	+

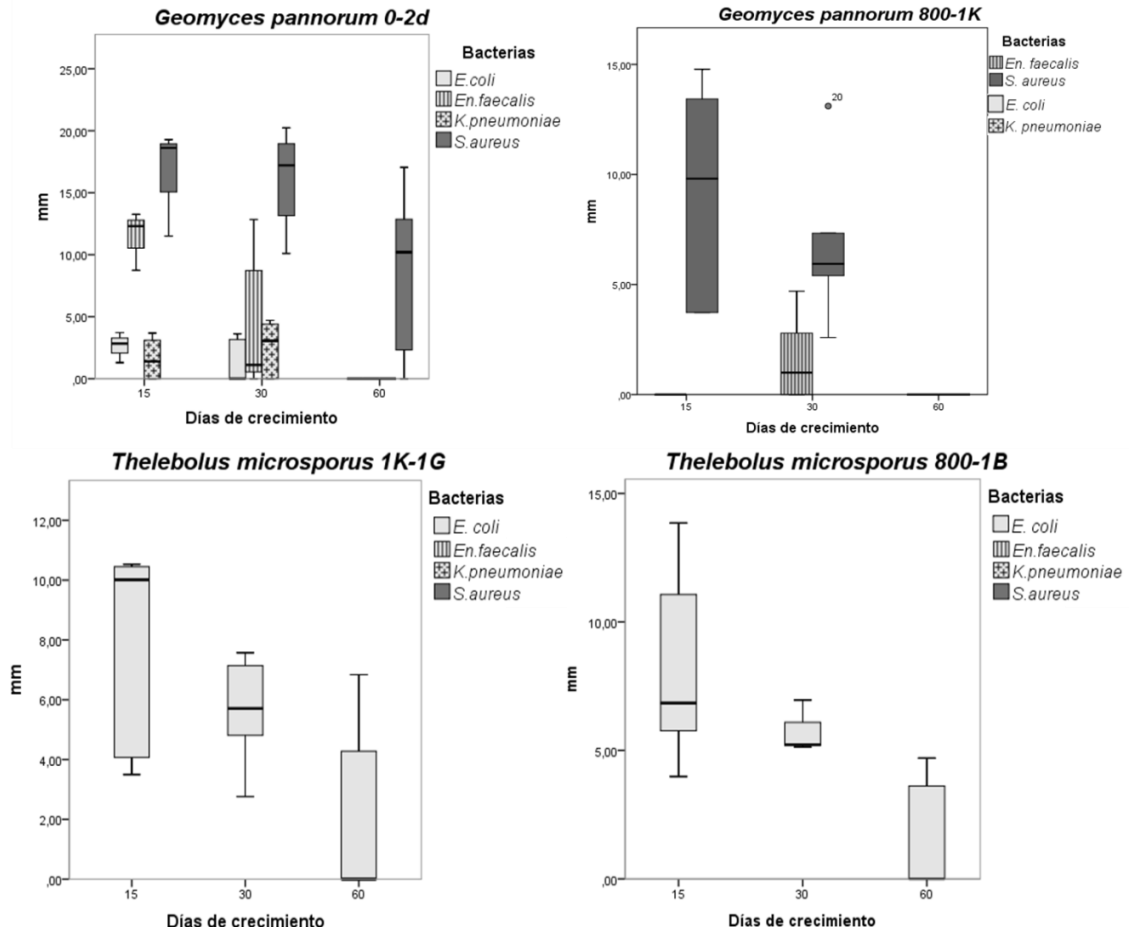
+, Presencia de actividad antibacteriana. -, Ausencia de actividad antibacteriana

*Cryptococcus gilvescens* fue el único aislado antártico que en todos los bioensayos mostró actividad contra las bacterias *E. coli*, *En. faecalis*, *K. pneumoniae* y *S. aureus*.

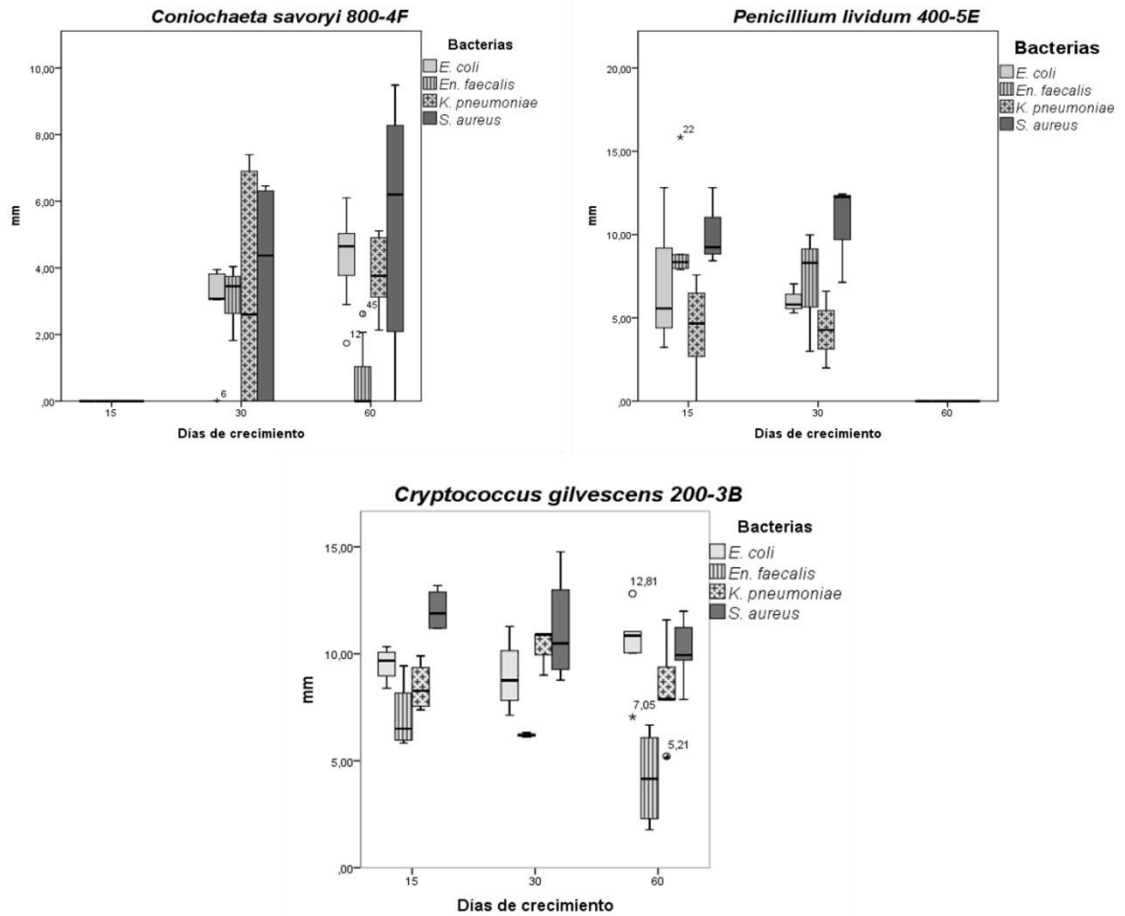
El efecto antibacteriano de *T. microsporus* fue similar en las cepas 1K-1G y 800-1B. Ambas cepas inhibieron a *E. coli* en los tres períodos de crecimiento del hongo. Con respecto a *G. pannorum*, se observó diferente comportamiento de bioactividad entre las dos cepas de esta especie. Durante los 15 y 30 días de crecimiento el aislado 0-2d, inhibió todas las bacterias analizadas, mientras que a los 60 días solo se observó su potencial antibacteriano contra *S. aureus*. En contraste, la cepa 800-1K solo mostró potencial para inhibir a *S. aureus* a los 15 y 30 días y a *En. faecalis* a los 30 días de crecimiento (Figura 9).

El microhongo *C. savoryi* 800-4F, incubado durante 30 y 60 días mostró potencial inhibitorio frente a las cuatro bacterias analizadas. Similares resultados se observó a los 15 y 30 días del aislado *P. lividum* 400-5E (Figura 9).

**Figura 9**



**Figura 9. Continuación**



**Figura 9.** Potencial antibacteriano de microhongos antárticos. El diagrama de cajas muestra el tamaño del halo de inhibición, medido en milímetros, formado por los microhongos frente a cada una de las bacterias evaluadas. Los casos atípicos (°) y extremos (\*) están representados en el interior del diagrama.

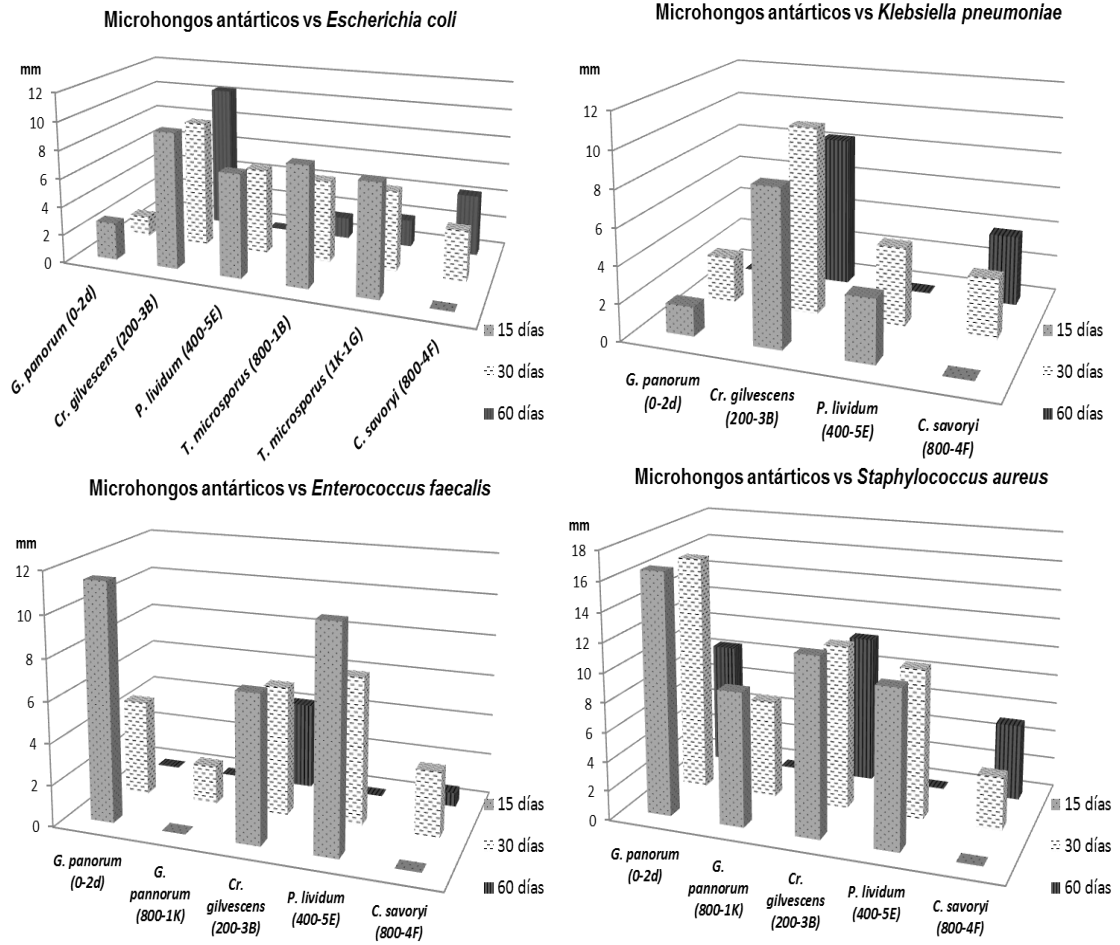
Es importante mencionar que en ciertas réplicas se obtuvieron resultados negativos en los bioensayos realizados, por lo que hubo la necesidad de efectuar más de tres repeticiones para verificar el potencial antibacteriano de los ejemplares antárticos.

Según el caso, se aplicaron 2 pruebas de homogeneidad para analizar el efecto del período de incubación sobre el tamaño del halo de inhibición desarrollado por cada microhongo antártico. En los casos donde se obtuvieron resultados en dos períodos de crecimiento (*i.e.*, *Geomyces* 800-1K, *Coniochaeta* 800-4F y *Penicillium* 400-5E) se aplicó la prueba de Mann Whitney; mientras que la prueba de Kruskal-Wallis se aplicó con los aislados antárticos que mostraron resultados en los tres periodos evaluados (*i.e.*, *G. pannorum* 0-2d, *T. microsporus* 1K-1G y 800-1B, y *Cr. gilvescens* 200-3B). La heterogeneidad del tamaño del halo de inhibición en los diferentes períodos de crecimiento de los aislados antárticos, se reflejó únicamente con ambas cepas de *T. microsporus* expuestos a *E. coli* y con *C. savoryi* frente a *En. faecalis* ( $p < 0.05$ ) (Anexos E y F)

En resumen, *E. coli* fue inhibida por la mayor cantidad de microhongos antárticos, siendo *C. gilvescens* con 60 días de incubación el que produjo el mayor halo inhibitorio. En contraste, la bacteria *K. pneumoniae* fue sensible a la menor cantidad de aislados antárticos. Con respecto a las cepas *G.*

*pannorum* 0-2d y *P. lividum*, se destaca la producción de un halo de inhibición de mayor tamaño con las bacterias Gram positivas en comparación con las Gram negativas (*i.e.*, *En. faecalis* y *S. aureus*) (Fig. 10).

Por otro lado, todas las bacterias mostraron sensibilidad frente al antibiótico control cefotaxima, el cual produjo, en promedio, un halo de inhibición de 9 cm.



**Figura 10.** Sensibilidad bacteriana frente a microhongos antárticos. El diagrama de barras refleja -en milímetros- la media del halo de inhibición, calculado con las réplicas de cada bioensayo.



# CAPÍTULO 4

## 4. DISCUSIÓN

La discrepancia sobre la utilidad de la región ITS para identificación de hongos, se mantiene por algunos autores, sugiriendo que se puede obtener información filogenética más precisa a partir de los genes RPB1, RPB2 (genes de ARN polimerasa II), Tsr1 (proteína putativa de la biogénesis de ribosomas) y Cct8 (componente putativo del complejo de chaperoninas TCP-1) (90). Además se ha reportado que el ITS tiene desventajas en la identificación de ciertas especies del género *Penicillium*, motivo por lo que se recomienda el uso de secuencias de  $\beta$ -tubulina y calmodulina (91).

Aunque los casos anteriormente descritos manifiestan un nivel de ambigüedad en la información que proporciona la región ITS, este estudio destaca su utilidad para precisar ciertos aspectos taxonómicos que no son aclarados por las claves morfológicas, tal como lo describe Coello (86) en un trabajo previo donde identificó las 17 cepas antárticas analizadas en este estudio.

En referencia a los resultados taxonómicos previamente publicados (86), se resalta la concordancia en la identificación morfológica y molecular –a través de la región ITS- de las cepas 1K-1G, 800-1B, 800-1A y 800-5A, como ejemplares de la especie *Thelebolus microsporus*; a este grupo se añade la cepa 200-4B, inicialmente identificada como *Thelebolus sp.1* por presentar estructuras morfológicas diferentes a las demás especies de *T. microsporus*. Todos los aislados dentro de este clado comparten 100% de similitud con su homólogo antártico *T. microsporus* (GenBank GU004195).

Por otro lado, la identificación morfológica hasta nivel de género se aproxima con la identificación molecular de las cepas 0-2d, 800-1K, como *Geomyces pannorum* y 400-5E, como *Penicillium lividum*. Adicionalmente el aislado 200-3B, catalogado inicialmente como Levadura, fue identificado como *Cryptococcus gilvescens* en base a la secuencia de su ITS. Así mismo, la previa clasificación fenotípica de *T. microsporus* y *Mucor sp.*, basado en sus

estructuras reproductivas (86), discrepa con el análisis genético del presente estudio, identificándolas como *A. psychrotrophicus* 800-2A y *Mortierella* sp. 600-5J, respectivamente.

Según análisis de la región ITS, se comprueba que existe una estrecha relación filogenética entre las especies *T. microsporus* y *A. psychrotrophicus* (familia *Thelebolaceae*), manifestándose que ambas divergieron de un ancestro común. Se considera que genéticamente estos dos géneros están sufriendo un reciente proceso evolutivo con un bajo nivel de mutaciones y probablemente sus diferentes características físicas se desarrollan bajo el efecto de las condiciones extremas presentes en la Antártida (92).

Se destaca además que en base a las observaciones micro y macroscópicas se reportaron dos variantes del género *Antarctomyces*: *Antarctomyces* sp1 (las cepas 400-3D, 800-1C y 200-2C) y *Antarctomyces* sp2 (la cepa 1K-1A) (86). De manera similar Krishnan y colaboradores, identificaron morfológicamente ocho especies en este género (*Antarctomyces* sp1-sp8) (93). No obstante, en base al análisis molecular realizado en este estudio, no se detectaron diversificaciones en *Antarctomyces*, por lo que todas las cepas fueron catalogadas como *A. psychrotrophicus*, mostrando 100% de similitud con la cepa GU004189. Este resultado concuerda con Stchigel y

colaboradores, quienes descubrieron por primera vez a esta especie y la reconocieron como monotípica dentro del género *Antarctomyces* (94).

Con respecto a los aislados antárticos 0-2E y 800-4F, Coello resaltó que por visualizarse estructuras asexuales (conidias), incluyó a estas cepas en el grupo de hongos imperfectos, identificándolos como *Hyphomyceto 1* e *Hyphomyceto 2*, respectivamente. Esta clasificación previa fue aclarada en este estudio mediante la identificación molecular con la región ITS. Es así que el aislado 0-2E pertenece a la especie *A. psychrotrophicus*, mientras que el 800-4F es la especie *Coniochaeta savoryi*. Aunque estas cepas estuvieron presentes en su estadio anamorfo, su clasificación taxonómica pudo determinarse en base al análisis de la región ITS.

El caso arriba descrito confirma que la ausencia de estructuras sexuales u otras claves morfológicas son limitantes de la taxonomía clásica, situación que destaca la importancia del uso de técnicas moleculares para la identificación de organismos fúngicos. Sin embargo, se considera que actualmente la taxonomía debe ser aplicada de manera integral, concordando con otros autores que la apropiada identificación en hongos debe estar guiada por herramientas morfológicas, moleculares y bioquímicas (71,91). Este trabajo sugiere que la región ITS aporta a los estudios

filogenéticos en microhongos antárticos y, por lo tanto, contribuye a la identificación de futuros recursos biotecnológicos.

Entre los microhongos reportados en este trabajo, *A. psychrotrophicus* es la única especie endémica de la Antártida (94). Además de habitar en ecosistemas terrestres, esta especie también ha sido identificada en superficies de madera o en muestras de aire colectadas en la Antártida (13,42,95). Aunque en este estudio no se detectó actividad antibacteriana en ninguna de las tres cepas de *A. psychrotrophicus* (i.e., 0-2E, 200-2C y 1K-1A), se conoce que esta especie tiene actividad biodegradadora de hidrocarburos (65).

A más del continente antártico, *T. microsporus* está distribuido en otros lugares fríos del planeta (92,96). En la Antártida esta especie ha logrado colonizar ecosistemas terrestres y acuáticos (13,92). Está altamente asociado con aves antárticas, reportándose en muestras intestinales, traqueales o material de anidación de skuas (97). El transporte por aves podría explicar la presencia de esta especie en otros ecosistemas. Se ha reportado que la actividad biológica de *T. microsporus* se destaca en la producción de pigmentos carotenoides, ácido linolénico –ácido graso con importantes aplicaciones médicas- y actividad enzimática alfa amilasa extracelular, con aplicaciones en la industria textil (98).

El género *Penicillium* tiene importantes aportes a nivel industrial. Entre sus aplicaciones de mayor impacto, se destaca a la especie *P. chrysogenum* como una de las mayores fuentes del antibiótico penicilina (99). Por otro lado, estudios realizados en microhongos asociados con esponjas antárticas han detectado que especies del género *Penicillium* muestran actividad antibacteriana, antifúngica y tripanocida (40,66). Según la información obtenida hasta la realización de este trabajo, esta es el primer reporte de *P. lividum* en la Antártida. Otros estudios han reportado a este microhongo cosmopolita en ecosistemas acuáticos y terrestres (100,101). El presente trabajo también observó actividad antibacteriana del microhongo antártico *P. lividum* contra bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*) y bacterias Gram positivas (*Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*).

El aislado 800-4F, identificado como *C. savoryi*, compartió 98% de identidad con la cepa CBS415.73 (GQ922522), la cual originalmente fue colectada en muestras de suelo arenoso en los Países Bajos y ha sido registrada, con su nomenclatura sinónima, en otros países de Europa (102,103). Por otro lado, *C. savoryi* 800-4F comparte 99% de similitud con la cepa antártica HQ335296, esta cepa endofítica aislada en la isla Rey Jorge fue agrupada

dentro de la subclase *Sordariomycetidae* –a la cual pertenece el género *Coniochaeta*- y nombrada como EFOMIA 04 (75). La actividad biológica del género *Coniochaeta* se ha detectado en la especie *C. ellipsoidea*, la cual tiene potencial antimicrobiano contra levaduras y bacterias Gram positivas (104). En el caso de la especie *C. savoryi* 800-4F, se reporta su capacidad para inhibir bacterias Gram positivas y Gram negativas.

*Cryptococcus gilvescens* fue reportado por primera vez en la Antártida en el año 2012 (105). En el presente trabajo, la cepa *Cr. gilvescens* 200-3B se agrupó con la cepa antártica JQ857030, pero ambas se separan filogenéticamente de las cepas noruegas NR073238 y AB032678. Por su distribución, se considera que *Cr. gilvescens* es propia de ecosistemas fríos (106). La región ITS analizada en este estudio, al igual que el dominio D1/D2 de la subunidad 26S del ARNr, refleja que esta especie está genéticamente relacionada con *Cr. gastricus* (106). Adicionalmente se ha establecido que estas dos especies no son distinguibles morfológicamente (107). Una investigación en los Alpes italianos reportó que, *Cr. gilvescens* posee actividad lipolítica/esterásica extracelular (108); mientras que en la cepa antártica (JQ857030) se ha detectado actividad amilasa, lipasa y proteasa extracelular (105). Con respecto a la actividad biológica de *Cr. gilvescens*, en el presente estudio, se observó actividad antibacteriana en todos los bioensayos realizados.

El aislado 600-5J fue el único microhongo que por medio de la región ITS solo pudo identificarse hasta nivel de género, por lo que fue denominado como *Mortierella* sp. La presencia de este género ha sido previamente reportada en la Antártida (36), sin embargo la cepa 600-5J mostró total similitud con dos aislados colectados en muestras de suelo ártico: HQ211697 y HQ212307, denominadas “Unculture *Mortierella*”. Filogenéticamente la cepa *Mortierella* sp. 600-5J se ubicó cercana a la especie *M. hyalina*. Con respecto a la bioactividad de este género, se conoce que algunas especies de *Mortierella* son potenciales bioproductores de ácidos grasos (109).

Las cepas antárticas 0-2d y 800-1K representaron a la especie *Geomyces pannorum*. Esta especie está ampliamente distribuida en el continente antártico y está asociada a ecosistemas marinos, superficies terrestres contaminadas por hidrocarburos y suelo influenciado por aves (66,110). Además se ha encontrado en madera y en artefactos utilizados en expediciones antárticas (13). *G. pannorum* ha sido categorizada como una especie halotolerante en la región ártica (111). Las dos cepas antárticas analizadas en este trabajo presentaron actividad antibacteriana, sin embargo esta actividad difiere entre las dos cepas. Es así que el aislado 800-1K solo inhibe a *S. aureus*, mientras que su homólogo 0-2d actúa contra las cuatro bacterias evaluadas.



Un estudio previo destaca la actividad antibacteriana, antitumoral y antioxidante del aislado antártico *G. pannorum*, mencionando además que la actividad antimicrobiana (contra *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *X. campestris* y *C. michiganensi*) varió entre cepas de la misma especie (66). Un comportamiento similar se reportó con la producción relativa de las enzimas amilasa, celulasa y proteasa, de 10 cepas colectadas en la Isla Rey Jorge (93).

El nivel de producción de metabolitos secundarios determina el potencial biomédico que presentan ciertos micetos. Este metabolismo está vinculado con el estadio sexual del hongo. Estudios en *Aspergillus nidulans* y *Penicillium chrysogenum* demostraron que la disminución del desarrollo sexual es directamente proporcional a la actividad en las rutas metabólicas secundarias (112,113). Según este vínculo de desarrollo sexual/metabolismo secundario, se podría determinar que los factores externos (e.g. disponibilidad de nutrientes, feromonas fúngicas, condiciones de estrés, sustrato sólido y luz) que influyen en la diferenciación de hifas vegetativas, indirectamente también rigen la síntesis de metabolitos secundarios (114). Otras señales externas que directamente influyen en el metabolismo secundario son fuente de carbono, nitrógeno, temperatura y pH (115).

Paralelamente a los componentes arriba descritos, se conocen factores moleculares que co-regulan el metabolismo secundario y el desarrollo fúngico, entre ellos, el más estudiado es el complejo Velvet. Este complejo es una unidad transcripcional heterotrimérica formada por las proteínas VelB/VeA/LaeA (112). En conjunto, la fisiología de estas proteínas depende de las señales lumínicas a las que estén expuestas, por ejemplo, se ha detectado que en períodos oscuros VelA y VelB predominan en el núcleo y aumentan la actividad de LaeA, lo cual direcciona al desarrollo sexual y, por ende, la producción de metabolitos secundarios (116). En el hongo filamentoso *Aspergillus flavus* se ha descrito, recientemente, que la respuesta al estrés oxidativo está también relacionada con el metabolismo secundario (117).

Se sugiere que en respuesta las condiciones físicas que se presentan en el entorno natural, donde habita el aislado fúngico, las señales moleculares podrían regular de manera heterogénea las rutas metabólicas secundarias, lo que conlleva a la producción de diferentes extrolitos entre cepas de la misma especie fúngica. Bajo esta hipótesis se podría explicar la diferente expresión antibacteriana detectada entre las cepas *T. microsporus* y *G. pannurum*, o la diferencia en la pigmentación de la cepa *A. psychrotrophicus* 1K-1A con respecto a las demás cepas de su especie.

La determinación del potencial antibiótico de organismos fúngicos requiere un trabajo de investigación minucioso y, por ende, un control estricto de las condiciones de cultivo, pues se ha afirmado que las condiciones del medio cultivo son uno de los factores *ex situ* que permiten la expresión de determinados metabolitos secundarios fúngicos (62,91). Sin embargo, el método de selección rápido aplicado en este estudio, permitió determinar efectivamente -bajo las condiciones ensayadas en el laboratorio- la presencia de actividad antibacteriana en ciertos microhongos antárticos, lo cuales podrían ser candidatos para futuras aplicaciones biomédicas.

Los bioensayos realizados demostraron diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al período de crecimiento y el efecto antibacteriano de las cepas *T. microsporus* (1K-1G y 800-1B) y *C. savoryi* 800-4F, enfrentadas a las bacterias *E. coli* y *En. faecalis* respectivamente; en ambas especies es notoria la disminución del tamaño del halo de inhibición a los 60 días de incubación. Por otro lado, con los demás aislados antárticos que mostraron potencial antibacteriano no se detectó diferencia ( $p > 0.05$ ) entre los tres períodos de crecimiento. De esta manera se sugiere que este estudio determina el período de crecimiento mínimo necesario para que las diferentes cepas evaluadas expresen su característica antibacteriana

Adicionalmente, los resultados obtenidos en el antibiograma reflejan que las bacterias *E. coli*, *K. pneumoniae* y *En. faecalis* son cepas multiresistentes, por no presentar susceptibilidad a 3 o más clases de antibióticos (118). La bacteria Gram positiva *S. aureus* fue sensible a todos los antibióticos probados antibiograma. Favorablemente, los aislados antárticos mostraron bioactividad contra las bacterias menos susceptibles a antibióticos de uso comercial.

# CAPÍTULO 5

## 5.1 CONCLUSIONES

1. Se identificó genéticamente 17 cepas de microhongos antárticos, las cuales se colectaron en sectores próximos a la estación científica PEVIMA (en Punta Fort William).
2. La secuenciación del segmento ITS permitió realizar el estudio filogenético de los 17 aislados antárticos, agrupados dentro de 7 clados fuertemente sustentados (100% bs).
3. La mayor diversidad de los hongos identificados perteneció al filum Ascomycota, representado por las especies: *Thelebolus microsporus*,

*Antarctomyces psychrotrophicus*, *Geomyces pannorum*, *Penicillium lividum* y *Conoichaeta savoryi*; mientras que las especies *Cryptococcus gilvescens* y *Mortierella sp.* representaron a los fila Basidiomycota y Zygomycota, respectivamente. Las especies *A. psychrotrophicus* y *T. microsporus* fueron las más abundantes

4. Las variedades fenotípicas que se visualizaron en los géneros *Thelebolus* y *Antarctomyces* no se reflejaron en el genotipo de estos microhongos, motivo que permitió ubicar consistentemente a todas las cepas de estos géneros dentro los grupos *T. microsporus* y *A. psychrotrophicus*.
5. El análisis de las secuencias ITS permitió identificar taxonómicamente dos cepas fúngicas en su estado asexual (*i.e.*, *A. psychrotrophicus* 0-2E y *C. savoryi* 800-4F), destacando así la utilidad del uso de técnicas moleculares para identificación de los denominados hongos imperfectos.
6. El potencial antibacteriano se evaluó en once representantes de las especies identificadas, con excepción de la cepa *Motierella sp.* Bajo las condiciones trabajadas *C. gilvescens* fue el único microhongo que mostró actividad antibacteriana en todos los bioensayos, en contraste ninguna

de las tres cepas evaluadas de la especie *A. psychrotrophicus* reflejó potencial antibacteriano.

7. Se demostró diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en la expresión del potencial antibacteriano con las cepas *T. microsporus* 1K-1G y 800-1B, y en el caso de *C. savoryi* 800-4F enfrentada a *En. faecalis*; En los demás aislados antárticos con efecto antibacteriano no se logró demostrar heterogeneidad en el tamaño del halo de inhibición durante los tres períodos de incubación evaluados (*i.e.*, 15, 30 y 60 días).
8. Se determinó que *S. aureus* fue inhibida por 5 aislados fúngicos. Similares resultados se observaron con la cepa multiresistente *E. faecalis*; mientras que *E. coli* y *K. pneumoniae* –ambas multiresistentes– fueron sensibles a 6 y 4 cepas antárticas, respectivamente. Este hecho revela que estos microhongos antárticos pueden ser un valioso biorecurso farmacéutico, especialmente para enfrentar microorganismos que actualmente son resistentes a antibióticos comerciales.
9. Este estudio contribuye con información acerca de la micodiversidad y bioactividad de microhongos terrestres alrededor de la estación científica PEVIMA; además según los conocimientos adquiridos hasta la

realización de este estudio, este es el primer trabajo que aporta con un banco genético de organismos fúngicos en Punta Fort William.

## 5.2 RECOMENDACIONES

1. Utilizar otras regiones moleculares (*e.g.*, ETS, RPB1, RPB2) y realizar pruebas bioquímicas (*e.g.* síntesis de enzimas alfa-amilasa), para confirmar los resultados obtenidos por análisis de la secuencia ITS, principalmente en aquellos hongos donde la morfología difería en una misma especie.
2. Realizar estudios donde se varíen las condiciones de los bioensayos realizados en este estudio (*e.g.*, medio de cultivo, temperatura de crecimiento), para determinar los factores externos que influyen en la expresión de actividad antibacteriana en los microhongos analizados, con la posibilidad de detectar además el potencial antibacteriano en nuevas especies.
3. Someter a los microhongos a condiciones de estrés durante su crecimiento, con el objetivo que determinar los factores en los que pueden expresar mayor actividad antibacteriana.



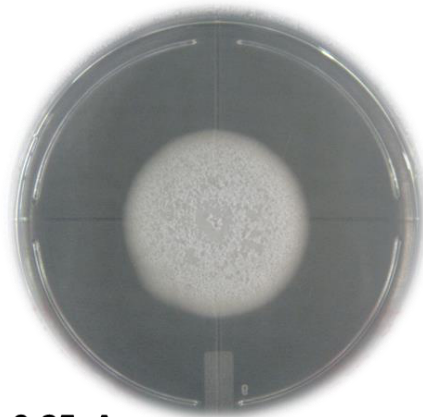
4. Controlar totalmente las variables que influyen en el crecimiento de los microhongos, para evitar posibles cambios que influyan sobre su bioactividad.
  
5. Analizar los metabolitos secundarios que secretaron los microhongos durante su enfrentamiento con las bacterias evaluadas en este trabajo, de esta manera se podría detectar la existencia de un nuevo compuesto medicinal de origen antártico.

# **ANEXOS**

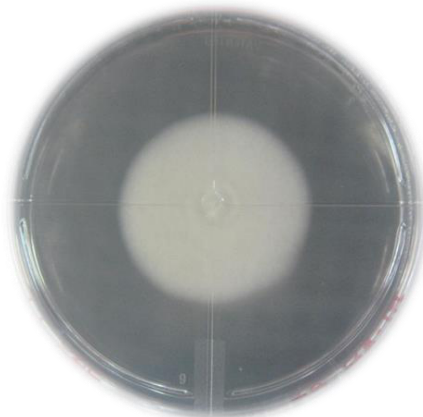
## **ANEXO A. Protocolo de extracción de ADN en microhongos.**

Colocar 200 mg de beads de sirconia/sílice en un tubo para microcentrífuga de 1.5 ml, luego añadir 200 - 500 mg de micelio y finalmente 500 µl de solución buffer para beads (5% SDS, NaCl y Tris-HCl). Mezclar con vórtex a máxima velocidad durante 10 minutos y centrifugar a 11000g por 10 minutos. Decantar el sobrenadante a nuevos tubos y repetir el procedimiento de extracción, sin añadir nuevamente la solución buffer. Extraer el nuevo sobrenadante y añadir igual volumen de fenol: cloroformo: isoamil alcohol (en una proporción aproximada 25:24:1), mezclar por vórtex breve y centrifugar. Remover la fase acuosa -sin tocar la fase intermedia- y transferirla a un nuevo tubo, donde se añadió igual volumen de cloroformo: isoamil alcohol (49:1), hacer vórtex rápido y centrifugar por 5 min a 10000g. Transferir la fase acuosa resultante a un tubo limpio, agregarle 2.5 volúmenes de isopropanol y hacer vórtex breve. Incubar mínimo 1 hora a 4°C. Luego centrifugar por 10 min a 14000g, eliminar el isopropanol y dejar el pellet. Lavar el pellet añadiendo 1ml de etanol frío al 70% y centrifugar por 5 min a 14000 rpm. Repetir una vez más el lavado. Extraer todo el etanol y dejar secar el pellet. Finalmente resuspender el ADN en 25 µl de TE 0.1X (Tris pH8 1mM, 0.1mM EDTA) y almacenar a -80°C.

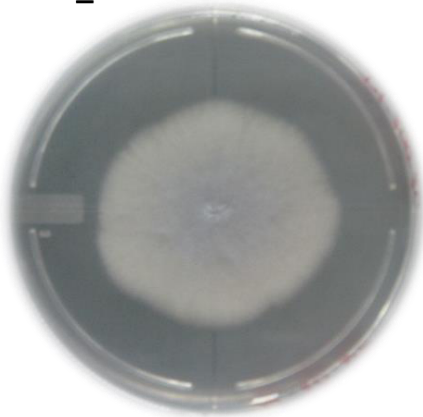
**Anexo B. Microhongos antárticos con 17 días de crecimiento. Vista superior (A) e inferior (B).**



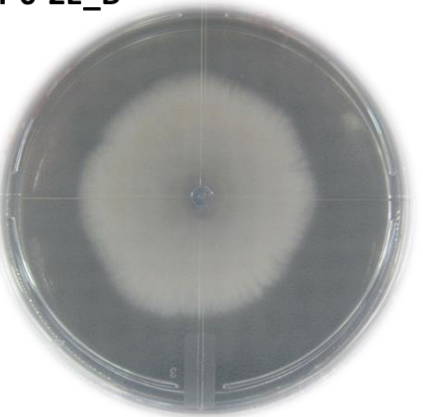
**T4-0-2E\_A**



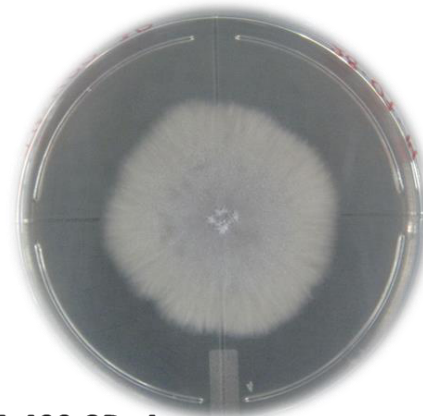
**T4-0-2E\_B**



**T4-200-2C\_A**



**T4-200-2C\_B**

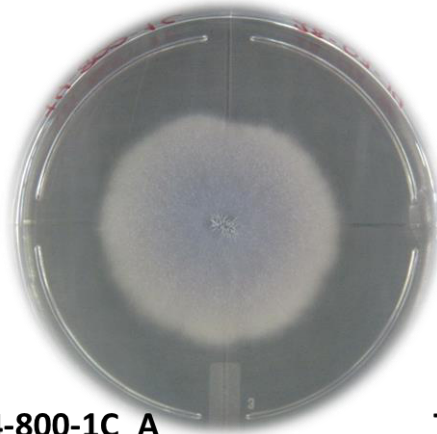


**T4-400-3D\_A**

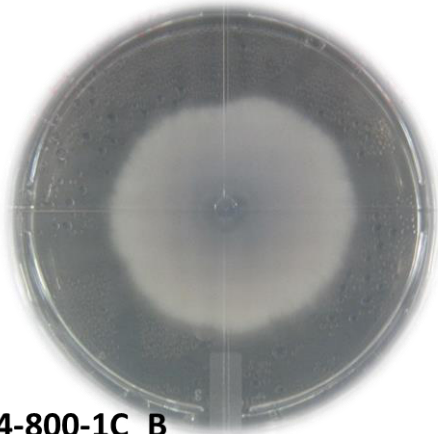


**T4-400-3D\_B**

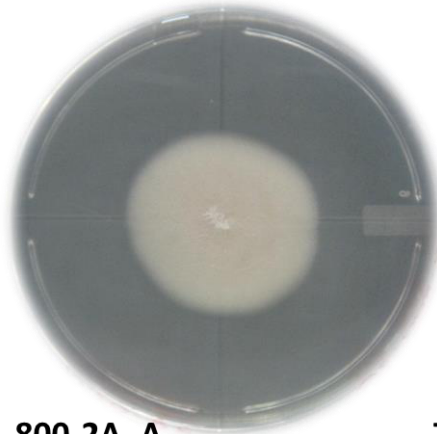
**Continuación...**



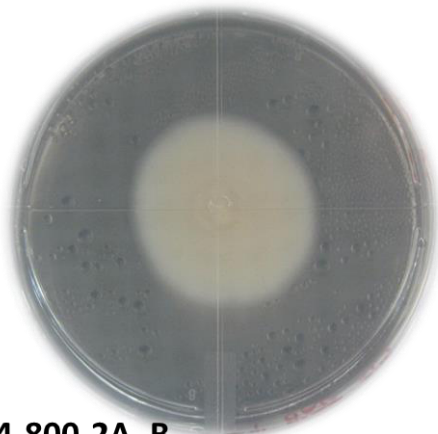
**T4-800-1C\_A**



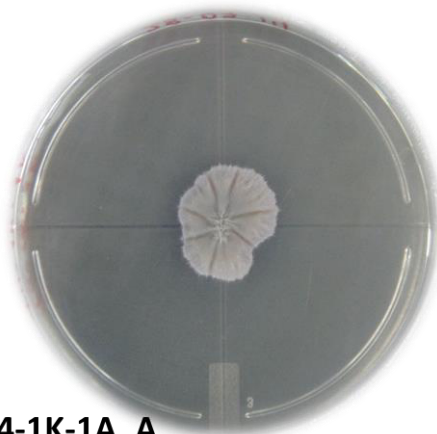
**T4-800-1C\_B**



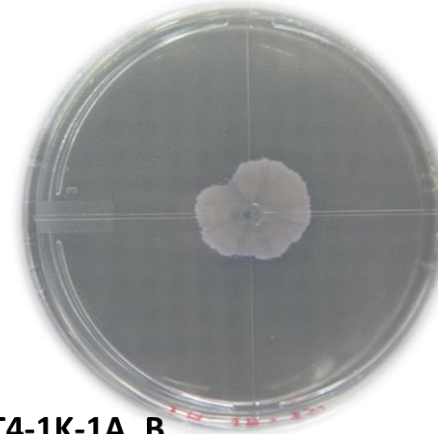
**T4-800-2A\_A**



**T4-800-2A\_B**



**T4-1K-1A\_A**

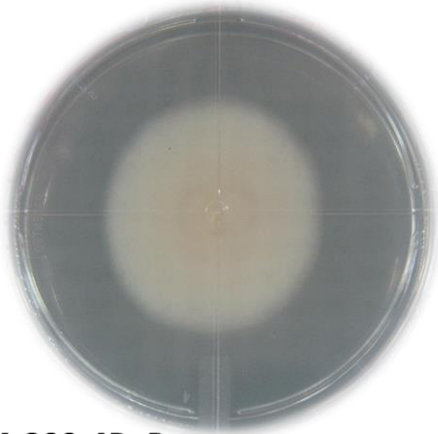


**T4-1K-1A\_B**

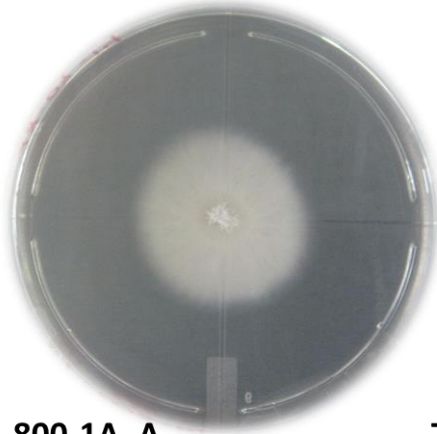
**Continuación...**



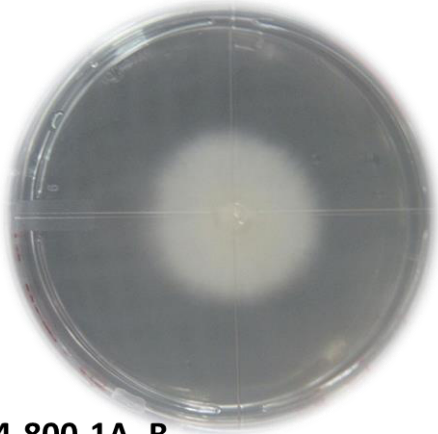
**T4-200-4B\_A**



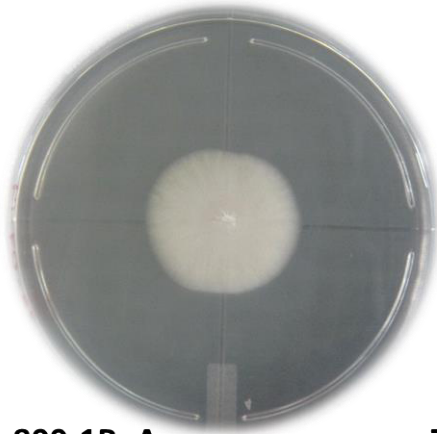
**T4-200-4B\_B**



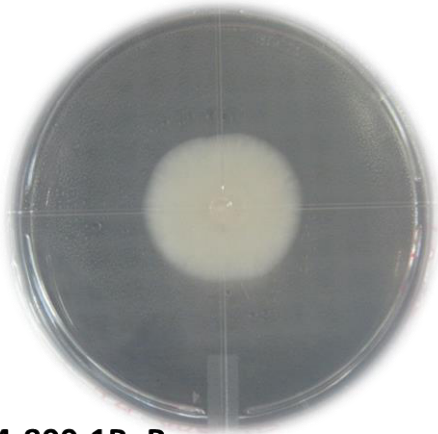
**T4-800-1A\_A**



**T4-800-1A\_B**

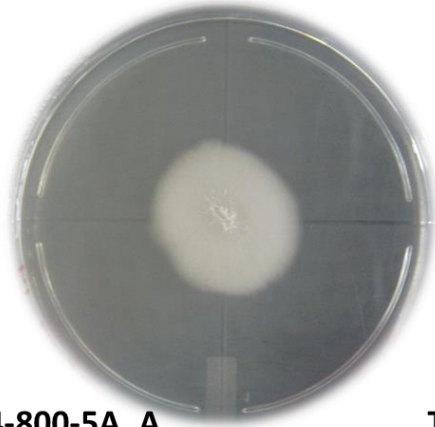


**T4-800-1B\_A**

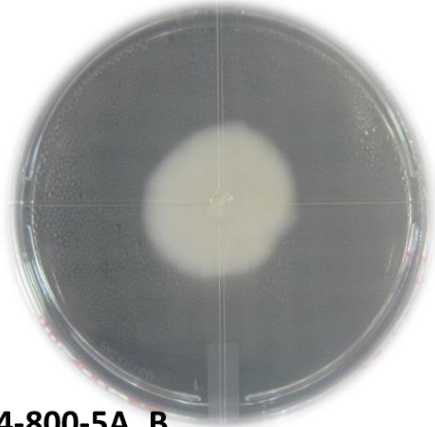


**T4-800-1B\_B**

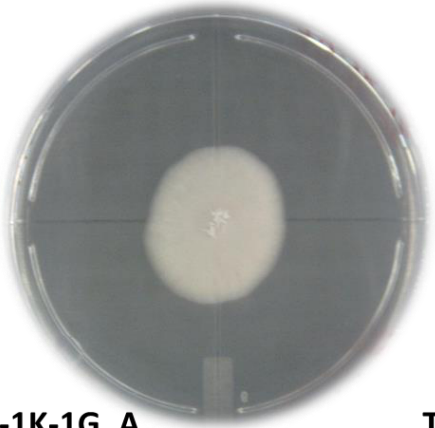
***Continuación...***



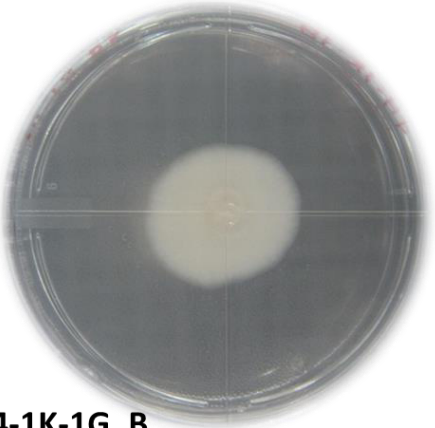
**T4-800-5A\_A**



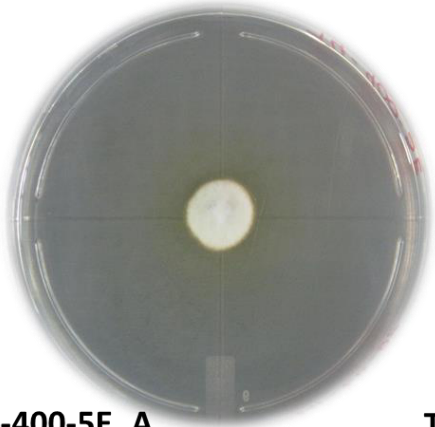
**T4-800-5A\_B**



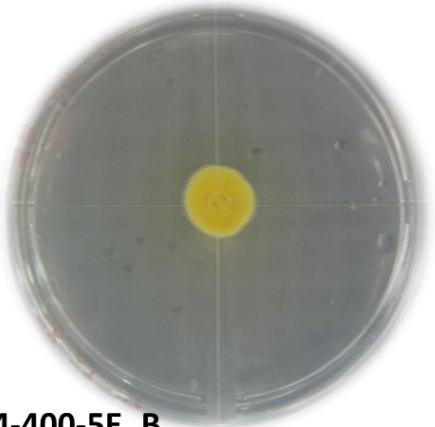
**T4-1K-1G\_A**



**T4-1K-1G\_B**



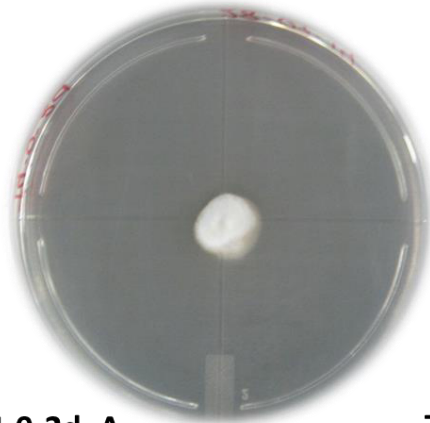
**T4-400-5E\_A**



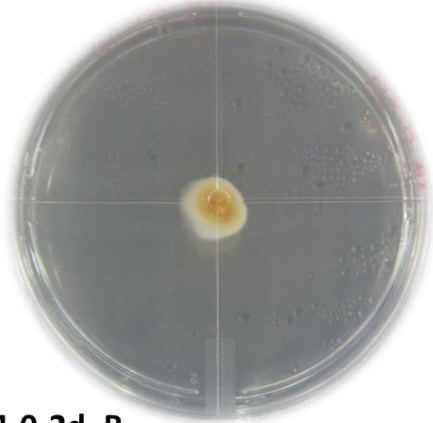
**T4-400-5E\_B**



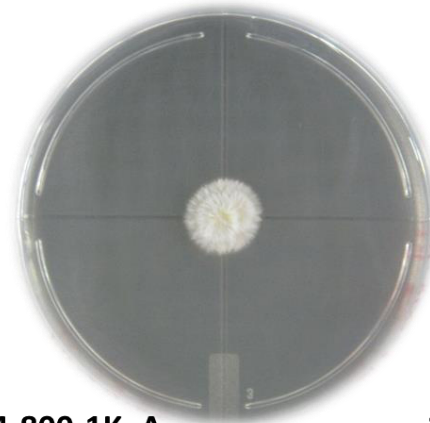
**Continuación...**



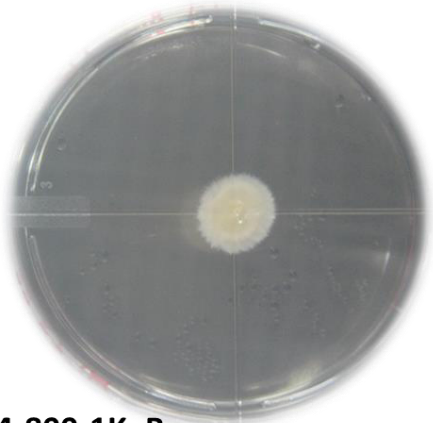
**T4-0-2d\_A**



**T4-0-2d\_B**



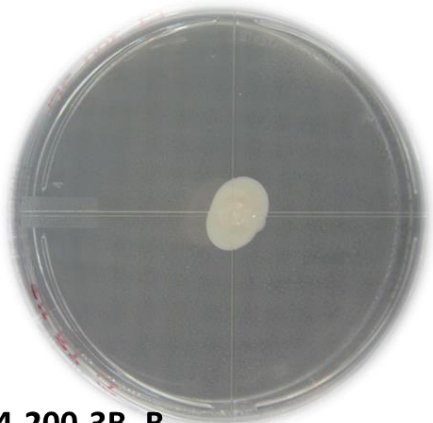
**T4-800-1K\_A**



**T4-800-1K\_B**



**T4-200-3B\_A**



**T4-200-3B\_B**



**Anexo C. Detalle de las familias de antibióticos a las que fueron sensibles las bacterias según resultado de prueba de susceptibilidad.**

<b>Bacteria: <i>Escherichia coli</i> (Gram negativo)</b>		
<b>Familia de antibiótico</b>	<b>Antibiótico</b>	<b>Resultado</b>
Penicilinas	Ampicilina	R
	Amoxicilina+Ac.	R
	Calvucánico	
	Ampicilina+Sulbactam	S
	Piperacilina+Tazobactam	S
Cefalosporinas	Cefalotina	I
	Cefepima	S
	Cefotaxima	S
	Ceftriaxona	S
	Cefoxitina	S
	Ceftazidima	S
	Cefuroxima	S
Aztreonam	Aztreonam	S
Carbapenemas	Ertapenem	S
	Imipenem	S
	Meropenem	S
Aminoglucósidos	Gentamicina	S
	Tobramicina	S
	Amikacina	S
Tetraciclinas	Minociclina	S
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	R
	Levofloxacina	I
	Norfloxacina	R
	Ácido nalidixico	R
Trimetoprima/Sulfonamides	Sulfatrimetoprim	R
Fosfonatos	Fosfomicina	S
Nitrofuranos	Nitrofurantoina	S

---

---

**Bacteria: *Staphylococcus aureus* (Gram positivo)**

<b>Familia de antibiótico</b>	<b>Antibiótico</b>	<b>Resultado</b>
Penicilinas	Oxacilina	S
Cefalosporinas	Cefoxitina	S
Aminoglucósidos	Gentamicina	S
Macrólidos	Amikacina	S
	Azitromicina	S
	Eritromicina	S
Tetraciclinas	Tetraciclina	S
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	S
	Levofloxacina	S
Lincosamida	Clindamicina	S
Trimetoprima/Sulfonamides	Sulfatrimetoprim	S
Fenicoles	Cloranfenicol	S
Ansamidas	Rifampicina	S
Linezolid	Linezolid	S

---

---

**Bacteria: *Enterococcus faecalis* (Gram positivo)**

<b>Familia de antibiótico</b>	<b>Antibiótico</b>	<b>Resultado</b>
Penicilinas	Ampicilina	S
Vancomicina	Vancomicina	S
Tetraciclinas	Tetraciclina	R
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	S
	Levofloxacina	S
Nitrofuranos	Nitrofurantoina	S
Ansamidas	Rifampicina	R
Fosfonatos	Fosfomicina	S
Fenicoles	Cloranfenicol	R
Linezolid	Linezolid	S
Aminoglucósidos	Gentamicina	R
	Streptomina	R
Carbapenemas	Imipenem	S

---

---

**Bacteria: *Klebsiella pneumoniae* (Gram negativo)**

---

<b>Familia de antibiótico</b>	<b>Antibiótico</b>	<b>Resultado</b>
Penicilinas	Ampicilina	R
	Amoxicilina+Ac.	
	Calvucánico	R
	Ampicilina+Sulbactam	R
	Piperacilina+Tazobactam	R
Cefalosporinas	Cefalotina	R
	Cefepima	R
	Cefotaxima	R
	Ceftriaxona	R
	Cefoxitina	S
	Ceftazidima	R
	Cefuroxima	R
Aztreonam	Aztreonam	R
Carbapenemas	Imipenem	S
	Meropenem	S
Aminoglucósidos	Gentamicina	S
	Tobramicina	R
	Amikacina	R
Tetraciclinas	Minociclina	R
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	R
	Levofloxacina	R
	Norfloxacina	R
	Ácido nalidixico	R
Trimetoprima/Sulfonamides	Sulfatrimetoprim	I
Fosfonatos	Fosfomicina	S
Nitrofuranos	Nitrofurantoina	R

---

**ANEXO D: Resultado de Prueba de susceptibilidad aplicada a las bacterias evaluadas.**



**LABORATORIO CLINICO BACTERIOLOGICO**

*Dra. Glenda Castro Carrión*

**MEDICA BACTERIOLOGO**

**DEL INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE  
ESPECIALIZADA EN JAPON Y CUBA**

**EXAMEN:** Prueba de susceptibilidad  
**FECHA:** 13 de Septiembre del 2011  
**GERMEN IDENTIFICADO:** *Escherichia coli.* **Muestra 1697**

**PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD**

**Metodo:** Kirby Bauer (Método de disco)  
**Medio de cultivo:** Agar Muller - Hinton.

Zona de puntos de interpretación de los  
diametros mm.

<b>Antibioticos:</b>	<b>Resultados</b>	<b>Sensible</b>	<b>Intermedio</b>	<b>Resistente</b>
Ampicilina 10 ug	6 mm (R)	≥ 17	14 - 16	≤ 13
Amoxicilina+ác. Clavulánico 20/10 ug	10 mm (R)	≥ 18	14 - 17	≤ 13
Ampicilina+Sulbactam 10/10 ug	15 mm (S)	≥ 15	12 - 14	≤ 11
Piperacilina+Tazobactam 100/10 ug	27 mm (S)	≥ 21	18 - 20	≤ 17
Cefalotina 30 ug	16 mm (I)	≥ 18	15 - 17	≤ 14
Cefepima 30 ug	32 mm (S)	≥ 18	15 - 17	≤ 14
Cefotaxima 30 ug	32 mm (S)	≥ 26	23 - 25	≤ 22
Ceftriaxona 30 ug	34 mm (S)	≥ 23	20 - 22	≤ 19
Cefoxitina 30 ug	28 mm (S)	≥ 18	15 - 17	≤ 14
Ceftazidima 30 ug	30 mm (S)	≥ 21	18 - 20	≤ 17
Cefuroxima 30 ug	25 mm (S)	≥ 23	15 - 22	≤ 14
Aztreonam 30 ug	34 mm (S)	≥ 21	18 - 20	≤ 17
Ertapenem 10 ug	32 mm (S)	≥ 23	20 - 22	≤ 19
Imipenem 10 ug	30 mm (S)	≥ 23	20 - 22	≤ 19
Meropenem 10 ug	30 mm (S)	≥ 23	20 - 22	≤ 19
Gentamicina 10 ug	20 mm (S)	≥ 15	13 - 14	≤ 12
Tobramicina 10 ug	20 mm (S)	≥ 15	13 - 14	≤ 12
Amikacina 30 ug	21 mm (S)	≥ 17	15 - 16	≤ 14
Minociclina 30 ug	20 mm (S)	≥ 16	13 - 15	≤ 12
Ciprofloxacina 5 ug	15 mm (R)	≥ 21	16 - 20	≤ 15
Levofloxacina 5 ug	16 mm (I)	≥ 17	14 - 16	≤ 13
Norfloxacina 10 ug	12 mm (R)	≥ 17	13 - 16	≤ 12
Ácido nalidixico 30 ug	6 mm (R)	≥ 19	14 - 18	≤ 13
Sulfatrimetoprim 1.25/23.75 ug	6 mm (R)	≥ 16	11 - 15	≤ 10
Fosfomicina 200 ug	18 mm (S)	≥ 16	13 - 15	≤ 12
Nitrofurantoina 300 ug	23 mm (S)	≥ 17	15 - 16	≤ 14

**Nota:** Cepa bacteriana no productora de BLEE.

**FIRMA**



## LABORATORIO CLINICO BACTERIOLOGICO

*Dra. Glenda Castro Cañarte*

MEDICA BACTERIOLOGO  
DEL INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE  
ESPECIALIZADA EN JAPON Y CUBA

**EXAMEN:** Prueba de susceptibilidad  
**FECHA:** 13 de Septiembre del 2011  
**GERMEN IDENTIFICADO:** *Klebsiella pneumoniae* **Muestra 1699**

### PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD

**Metodo:** Kirby Bauer (Método de disco)

**Medio de cultivo:** Agar Muller - Hinton.

Zona de puntos de interpretación de los  
diametros mm.

Antibioticos:	Resultados	Sensible	Intermedio	Resistente
Ampicilina 10 ug	6 mm ( R )	≥ 17	14 - 16	≤ 13
Amoxicilina+ác. Clavúlanico 20/10 ug	6 mm ( R )	≥ 18	14 - 17	≤ 13
Ampicilina+Subactam 10/10 ug	6 mm ( R )	≥ 15	12 - 14	≤ 11
Piperacilina+Tazobactam 100/10 ug	15 mm ( R )	≥ 21	18 - 20	≤ 17
Cefalotina 30 ug	6 mm ( R )	≥ 18	15 - 17	≤ 14
Cefepima 30 ug	10 mm ( R )	≥ 18	15 - 17	≤ 14
Cefotaxima 30 ug	6 mm ( R )	≥ 26	23 - 25	≤ 22
Ceftriaxona 30 ug	6 mm ( R )	≥ 23	20 - 22	≤ 19
Cefoxitina 30 ug	20 mm ( S )	≥ 18	15 - 17	≤ 14
Ceftazidima 30 ug	10 mm ( R )	≥ 21	18 - 20	≤ 17
Cefuroxima 30 ug	6 mm ( R )	≥ 23	15 - 22	≤ 14
Aztreonam 30 ug	6 mm ( R )	≥ 21	18 - 20	≤ 17
Imipenem 10 ug	26 mm ( S )	≥ 23	20 - 22	≤ 19
Meropenem 10 ug	30 mm ( S )	≥ 23	20 - 22	≤ 19
Gentamicina 10 ug	20 mm ( S )	≥ 15	13 - 14	≤ 12
Tobramicina 10 ug	6 mm ( R )	≥ 15	13 - 14	≤ 12
Amikacina 30 ug	13 mm ( R )	≥ 17	15 - 16	≤ 14
Minociclina 30 ug	8 mm ( R )	≥ 16	13 - 15	≤ 12
Ciprofloxacina 5 ug	6 mm ( R )	≥ 21	16 - 20	≤ 15
Levofloxacina 5 ug	6 mm ( R )	≥ 17	14 - 16	≤ 13
Norfloxacina 10 ug	6 mm ( R )	≥ 17	13 - 16	≤ 12
Ácido nalidixico 30 ug	6 mm ( R )	≥ 19	14 - 18	≤ 13
Sulfatrimetoprim 1.25/23.75 ug	14 mm ( I )	≥ 16	11 - 15	≤ 10
Fosfomicina 200 ug	18 mm ( S )	≥ 16	13 - 15	≤ 12
Nitrofurantoina 300 ug	8 mm ( R )	≥ 17	15 - 16	≤ 14

**Nota:**

**Cepa bacteriana productora de BLEE.**

  
FIRMA



## LABORATORIO CLINICO BACTERIOLOGICO

*Dra. Glenda Castro Cañarte*  
MEDICA BACTERIOLOGO  
DEL INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE  
ESPECIALIZADA EN JAPON Y CUBA

**EXAMEN:** Prueba de susceptibilidad  
**FECHA:** 13 de Septiembre del 2011  
**GERMEN IDENTIFICADO:** *Enterococcus faecalis* **Muestra 1702**

### PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD

**Metodo:** Kirby Bauer (Método de disco)  
**Medio de cultivo:** Agar Muller - Hinton. **Zona de puntos de interpretación de los diámetros mm.**

Antibioticos:	Resultados	Sensible	Intermedio	Resistente
Ampicilina 10 ug	17 mm ( S )	≥ 17	15 - 16	≤ 14
Vancomicina 30 ug	17 mm ( S )	≥ 17	15 - 16	≤ 14
Tetraciclina 30 ug	6 mm ( R )	≥ 19	15 - 18	≤ 14
Ciprofloxacina 5 ug	25 mm ( S )	≥ 21	16 - 20	≤ 15
Levofloxacina 5 ug	26 mm ( S )	≥ 17	14 - 16	≤ 13
Nitrofurantoina 300 ug	24 mm ( S )	≥ 17	15 - 16	≤ 14
Rifampicina 5 ug	13 mm ( R )	≥ 20	17 - 19	≤ 16
Fosfomicina 200 ug	25 mm ( S )	≥ 16	13 - 15	≤ 12
Cloranfenicol 30 ug	8 mm ( R )	≥ 18	13 - 17	≤ 12
Linezolid 30 ug	24 mm ( S )	≥ 23	21 - 22	≤ 20
Gentamicina 120 ug	6 mm ( R )	≥ 10	7 - 9	6
Streptomocina 300 ug	6 mm ( R )	≥ 10	7 - 9	6
Imipenem 10 ug	24 mm ( S )	≥ 12	-	< 12

FIRMA



## LABORATORIO CLINICO BACTERIOLOGICO

*Dra. Glenda Castro Cañarte*

MEDICA BACTERIOLOGO  
DEL INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE  
ESPECIALIZADA EN JAPON Y CUBA

EXAMEN: Prueba de susceptibilidad  
FECHA: 13 de Septiembre del 2011  
GERMEN IDENTIFICADO: *Staphylococcus aureus*. Muestra 1701

### PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD

Metodo: Kirby Bauer (Método de disco)  
Medio de cultivo: Agar Muller - Hinton. Zona de puntos de interpretación de los diámetros mm.

Antibioticos:	Resultados	Sensible	Intermedio	Resistente
Oxacilina 1 ug	22 mm ( S )	≥ 13	11 - 12	≤ 10
Cefoxitina 30 ug	28 mm ( S )	≥ 22	-	≤ 21
Gentamicina 10 ug	24 mm ( S )	≥ 15	13 - 14	≤ 12
Amikacina 30 ug	20 mm ( S )	≥ 17	15 - 16	≤ 14
Azitromicina 15 ug	23 mm ( S )	≥ 18	14 - 17	≤ 13
Eritromicina 15 ug	25 mm ( S )	≥ 23	14 - 22	≤ 13
Tetraciclina 30 ug	25 mm ( S )	≥ 19	15 - 18	≤ 14
Ciprofloxacina 5 ug	30 mm ( S )	≥ 21	16 - 20	≤ 15
Levofloxacina 5 ug	27 mm ( S )	≥ 19	16 - 18	≤ 15
Clindamicina 2 ug	23 mm ( S )	≥ 21	15 - 20	≤ 14
Sulfatrimetoprim 1.25/23.75 ug	25 mm ( S )	≥ 16	11 - 15	≤ 10
Cloranfenicol 30 ug	21 mm ( S )	≥ 18	13 - 17	≤ 12
Rifampicina 5 ug	20 mm ( S )	≥ 20	17 - 19	≤ 16
Linezolid 30 ug	30 mm ( S )	≥ 21	-	≤ 20

Nota: *Staphylococcus aureus*, oxacilina/meticilina sensible.

FIRMA

**ANEXO E: Detalle de resultados estadísticos obtenidos en bioensayos de inhibición hongos contra bacterias.**

<b>Hongos vs <i>Escherichia coli</i></b>																			
		<i>G. pannorum</i> 0-2d			<i>Cr. gilvescens</i> 200-3B			<i>P. lividum</i> 400-5E			<i>T. microsporus</i> 800-1B			<i>C. savoryi</i> 800-4F			<i>T. microsporus</i> 1K-1G		
Descriptivos		15 días	30 días	60 días	15 días	30 días	60 días	15 días	30 días	60 días	15 días	30 días	60 días	15 días	30 días	60 días	15 días	30 días	60 días
Media		2,62	1,47	0	9,52	8,98	10,36	7,21	6,05	0	8,30	5,78	1,49	0	3,47	4,30	7,71	5,62	1,92
IC 95% Media	Límite inferior	-0,4	0,12	0	8,21	6,24	7,74	-5,21	3,82	0	3,27	3,23	-0,27	0	2,72	2,94	3,25	3,79	-0,4
	Límite superior	5,66	2,82	0	10,83	11,73	12,98	19,63	8,27	0	13,33	8,32	3,25	0	4,23	5,67	12,18	7,44	4,28
Mediana		2,84	0,00	0	9,68	8,76	10,85	5,57	5,8	0	6,84	5,23	0,000	0	3,45	4,65	10,01	5,71	0,00
Desviación Estándar		1,22	1,75	0	0,82	1,73	2,11	5	0,89	0	4,05	1,03	2,11	0	0,48	1,48	3,59	1,73	2,82
N		3	9	7	4	4		3	3	3	5	3	8	6	4	7	5	6	8
Kruskal Wallis Test/ Mann Whitney Test		0,292			0,495			0,827			0,006			0,122			0,018		
Asymp. Sig.		0,292			0,495			0,827			0,006			0,122			0,018		



### Hongos vs *Klebsiella pneumoniae*

Descriptivos		<i>G. pannorum 0-2d</i>			<i>Cr. gilvescens 200-3B</i>			<i>P. lividum 400-5E</i>			<i>C. savoryi 800-4F</i>		
		15 días	30 días	60 días	15 días	30 días	60 días	15 días	30 días	60 días	15 días	30 días	60 días
Media		1,597	2,533	0	8,457	10,27	8,383	4,34	4,288	0	0	3,25	3,87
IC 95%	Límite inferior	-0,263	0,178	0	6,643	7,538	5,478	1,374	-1,443	0	0	-0,56	2,78
	Límite superior	3,456	4,889	0	10,272	13,002	11,287	7,316	10,02	0	0	7,06	4,95
Mediana		1,400	3,050	0	8,275	10,9	7,88	4,665	4,28	0	0	2,60	3,76
Desviación Estándar		1,772	2,244	0	1,141	1,1	2,339	2,831	2,307	0	0	3,63	1,18
N		6	6	6	4	3	5	6	3	3	5	6	7
Kruskal Wallis Test/ Mann Whitney Test		0,318			0,267			1			1		
Asymp. Sig.													

### Hongos vs *Enterococcus faecalis*

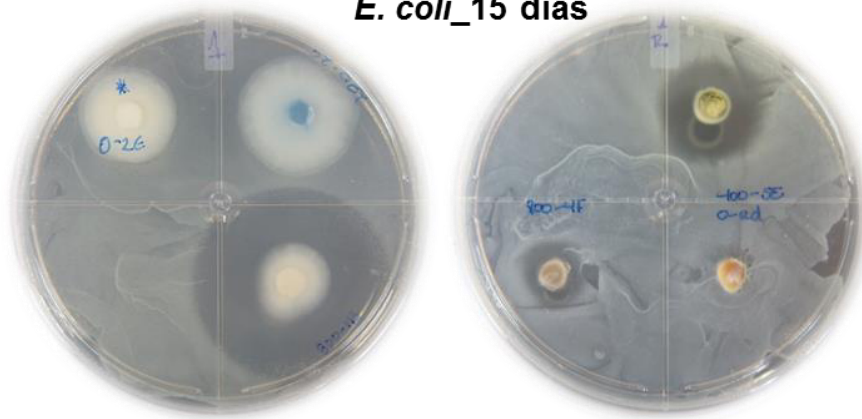
Descriptivos	<i>G. pannorum</i> 0-2d			<i>Cr. gilvescens</i> 200-3B			<i>P. lividum</i> 400-5E			<i>C. savoryi</i> 800-4F			<i>G. pannorum</i> 800-1K			
	15 días	30 días	60 días	15 días	30 días	60 días	15 días	30 días	60 días	15 días	30 días	60 días	15 días	30 días	60 días	
Media	11,44	4,64	0	7,06	6,20	4,19	9,53	7,09	0	0	3,10	0,67	0	1,88	0	
IC 95% Media	Límite inferior	5,53	-0,4	0	4,44	5,94	0,56	6,26	-1,96	0	0	0,25	-0,4	0	-0,1	0
	Límite superior	17,35	9,67	0	9,69	6,46	7,81	12,80	16,14	0	0	5,96	1,74	0	3,89	0
Mediana	12,31	1,11	0	6,5	6,2	4,15	8,34	8,3	0	0	3,45	0	0	1,55	0	
Desviación Estándar	2,38	5,44	0	1,65	0,10	2,28	3,12	3,64	0	0	1,15	1,15	0	1,92	0	
N	3	7	7	4	3	4	6	3	3	4	3	7	3	6	3	
Kruskal Wallis Test/ Mann Whitney Test	0,086			0,223			0,795			0,039			-			
Asymp. Sig.																

### Hongos vs *Staphylococcus aureus*

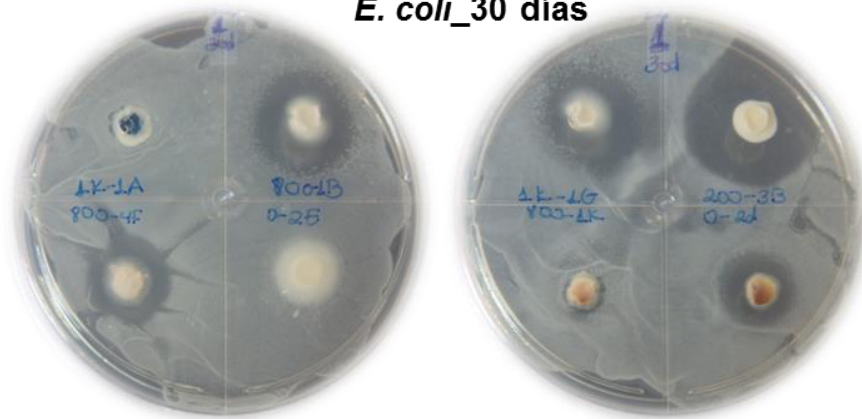
Descriptivos	<i>G. pannorum</i> 0-2d			<i>Cr. gilvescens</i> 200-3B			<i>P. lividum</i> 400-5E			<i>C. savoryi</i> 800-4F			<i>G. pannorum</i> 800-1K				
	15 días	30 días	60 días	15 días	30 días	60 días	15 días	30 días	60 días	15 días	30 días	60 días	15 días	30 días	60 días		
Media	16,47	16,15	8,477	12,04	11,13	10,15	10,61	10,16	0	0	3,58	5,20	9,09	6,72	0		
IC 95% Media	Límite inferior		5,76	11,99	3,22	10,44	6,95	8,18	3,12	4,36	0	0	0,50	1,55	2,60	3,04	0
	Límite superior		27,18	20,30	13,73	13,64	15,30	12,11	18,09	15,97	0	0	6,67	8,85	15,58	10,39	0
Mediana	18,62	17,21	10,20	11,89	10,48	9,94	12,26	9,23	0	0	4,37	6,2	9,81	5,94	0		
Desviación Estándar	4,31	3,958	6,29	1,00	2,62	1,58	3,01	2,34	0	0	2,94	3,95	5,23	3,50	0		
N	3	6	8	4	4	5	3	3	3	5	6	7	5	6	3		
Kruskal Wallis Test/ Mann Whitney Test	1			0,355			0,827			0,385			0,465				
Asymp. Sig.																	

**ANEXO F: Observación del halo de inhibición formado por microhongos antárticos en diferentes períodos de crecimiento**

***E. coli*\_15 días**



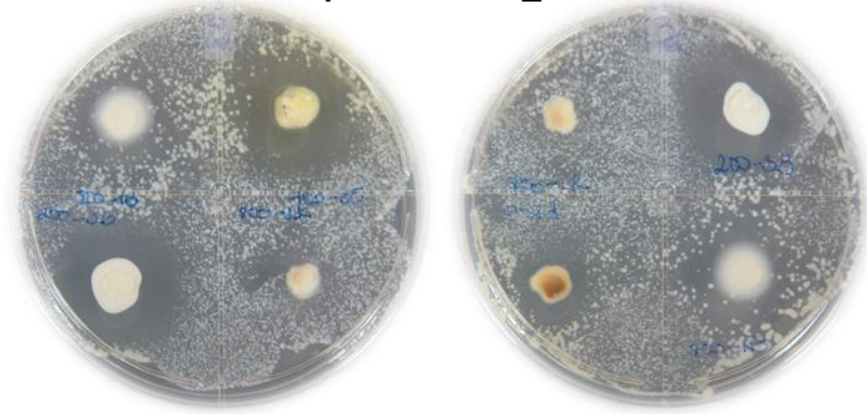
***E. coli*\_30 días**



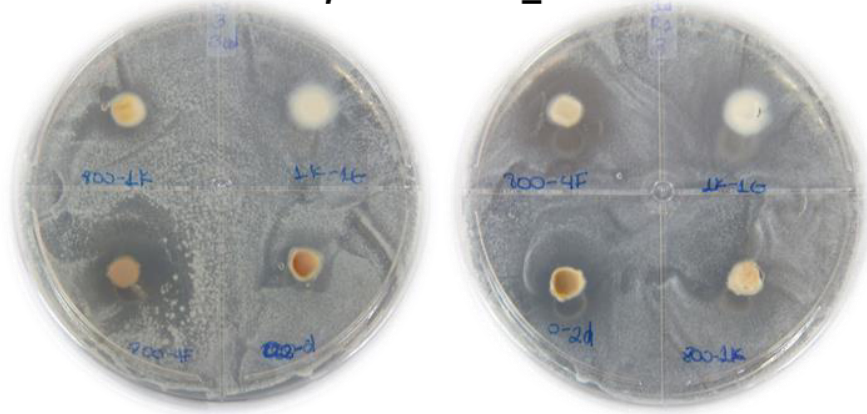
***E. coli*\_60 días**



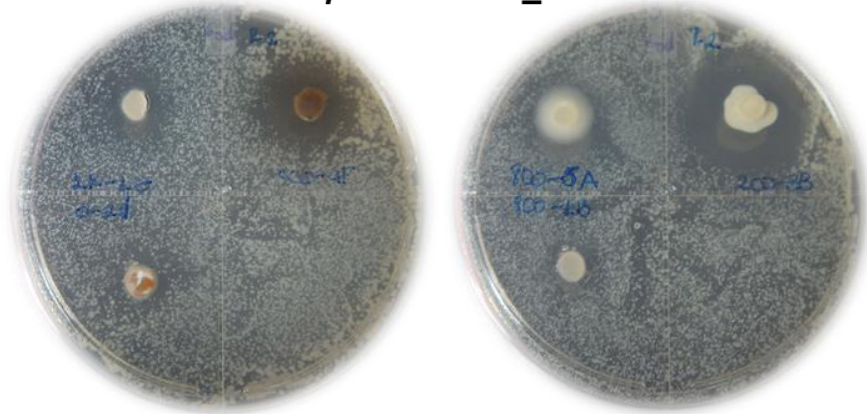
***K. pneumoniae*\_15 días**



***K. pneumoniae*\_30 días**



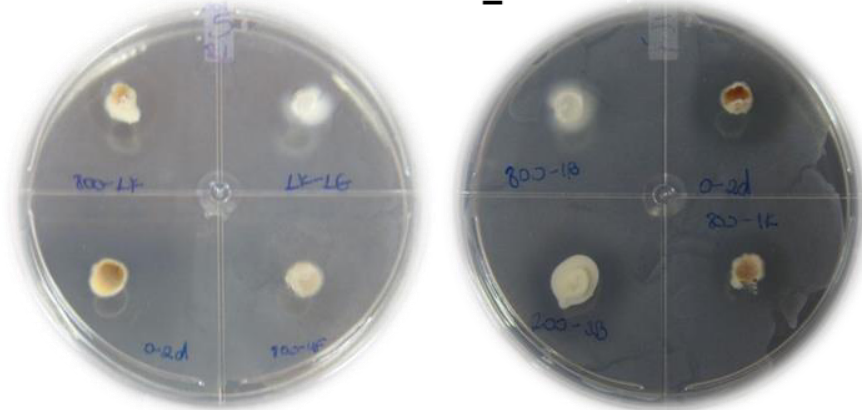
***K. pneumoniae*\_60 días**



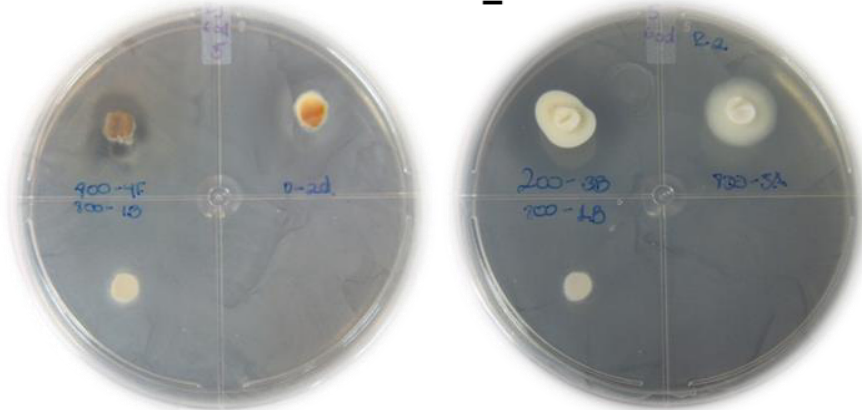
***E. faecalis*\_15 días**



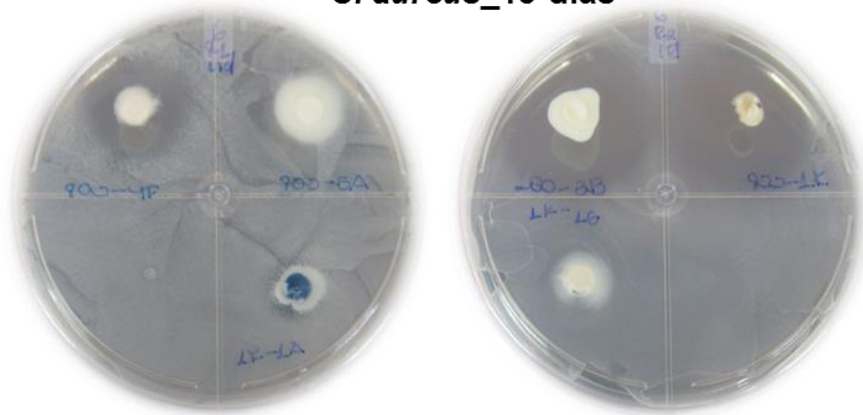
***E. faecalis*\_30 días**



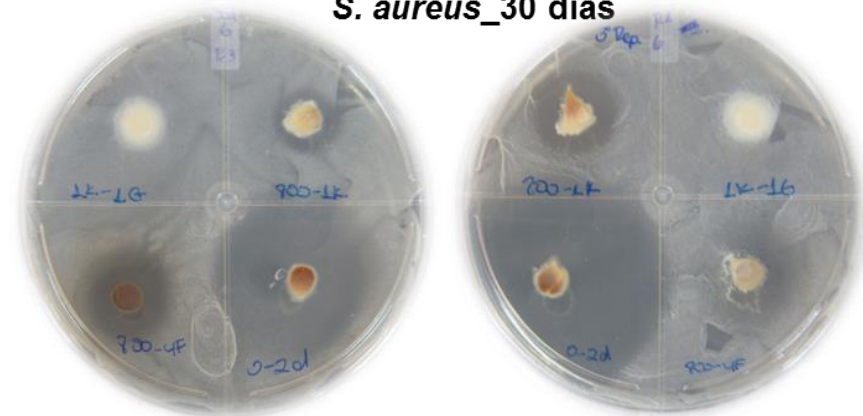
***E. faecalis*\_60 días**



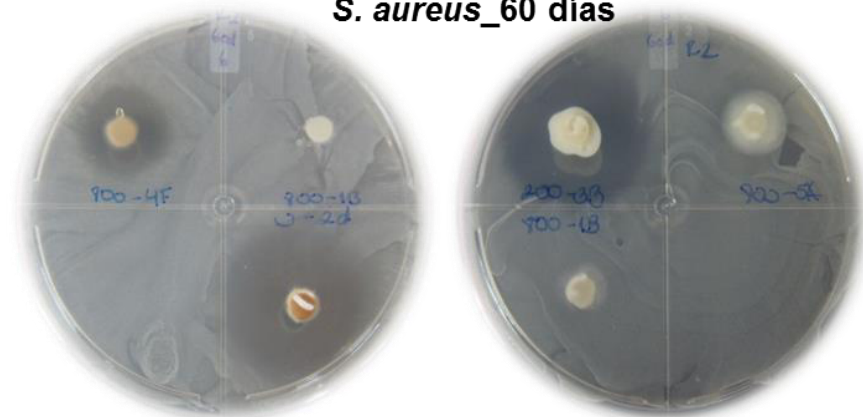
**S. aureus\_15 días**



**S. aureus\_30 días**



**S. aureus\_60 días**



# BIBLIOGRAFÍA

1. CDC. Threat Report 2013 | Antimicrobial Resistance | CDC [Internet]. United States: Centers for Disease Control and Prevention, CDC; 2013. Recuperado a partir de: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>
2. Silver LL. Challenges of Antibacterial Discovery. *Clin Microbiol Rev.* 1 de enero de 2011;24(1):71-109.
3. Bargagli R. Antarctic Ecosystems: Environmental Contamination, Climate Change, and Human Impact. Springer; 2006. 408 p.
4. Campbell IB, Claridge GGC. Antarctic Permafrost Soils. En: Margesin PDR, editor. *Permafrost Soils* [Internet]. Springer Berlin Heidelberg; 2009 [citado 14 de octubre de 2013]. p. 17-31. Recuperado a partir de: [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-69371-0\\_2](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-69371-0_2)
5. Duncan SM. Fungal Diversity and Cellulytic Activity in the Historic Huts, Ross Island, Antarctica [Internet] [Thesis]. The University of Waikato;



2007 [citado 14 de octubre de 2013]. Recuperado a partir de:

<http://researchcommons.waikato.ac.nz/handle/10289/2563>

6. Reusch AM, Nyblade AA, Benoit MH, Wiens DA, Anandakrishnan S, Voigt D, et al. Mantle transition zone thickness beneath Ross Island, the Transantarctic Mountains, and East Antarctica. *Geophys Res Lett*. 2008;35(12):n/a - n/a.
7. Cornejo R, Horn F. N, Troian FL. Geomorfología de Punta Fort William, Isla Greenwich, Islas Shetland del sur, Antártida. *Geomorphology of Point Fort William, Greenwich Island, south Shetland, Antarctica* [Internet]. 1993 [citado 14 de octubre de 2013]; Recuperado a partir de: <http://www.oceandocs.org/handle/1834/3769>
8. Margesin R, Miteva V. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Res Microbiol*. abril de 2011;162(3):346-61.
9. Ruisi S, Barreca D, Selbmann L, Zucconi L, Onofri S. Fungi in Antarctica. *Rev Environ Sci Biotechnol*. 1 de agosto de 2007;6(1-3):127-41.
10. Onofri S, Selbmann L, de Hoog GS, Grube M, Barreca D, Ruisi S, et al. Evolution and adaptation of fungi at boundaries of life. *Adv Space Res*. 2007;40(11):1657-64.
11. Gunde-Cimerman N, Sonjak S, Zalar P, Frisvad JC, Diderichsen B, Plemenitaš A. Extremophilic fungi in arctic ice: a relationship between

adaptation to low temperature and water activity. *Phys Chem Earth Parts ABC*. 2003;28(28–32):1273-8.

12. Cowan DA, Chown SL, Convey P, Tuffin M, Hughes K, Pointing S, et al. Non-indigenous microorganisms in the Antarctic: assessing the risks. *Trends Microbiol*. 1 de noviembre de 2011;19(11):540-8.
13. Arenz BE, Held BW, Jurgens JA, Farrell RL, Blanchette RA. Fungal diversity in soils and historic wood from the Ross Sea Region of Antarctica. *Soil Biol Biochem*. octubre de 2006;38(10):3057-64.
14. Nevalainen H, Bradner R, Wadud S, Mohammed S, McRae C, Te'o J. Enzyme activities and biotechnological applications of cold-active microfungi. En: Anitori, Roberto Paul, editor. *Extremophiles : microbiology and biotechnology* [Internet]. Wymondham : Caister Academic Press; 2012 [citado 26 de enero de 2014]. p. 89-108.  
Recuperado a partir de:  
[http://www.researchonline.mq.edu.au/vital/access/manager/Repository/mq:18897?f0=sm\\_creator%3A%22Mohammed%2C+Suja%22](http://www.researchonline.mq.edu.au/vital/access/manager/Repository/mq:18897?f0=sm_creator%3A%22Mohammed%2C+Suja%22)
15. James TY, Pelin A, Bonen L, Ahrendt S, Sain D, Corradi N, et al. Shared Signatures of Parasitism and Phylogenomics Unite Cryptomycota and Microsporidia. *Curr Biol*. 19 de agosto de 2013;23(16):1548-53.

16. Jones MDM, Forn I, Gadelha C, Egan MJ, Bass D, Massana R, et al. Discovery of novel intermediate forms redefines the fungal tree of life. *Nature*. 9 de junio de 2011;474(7350):200-3.
17. Blackwell M. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *Am J Bot*. 2 de marzo de 2011;98(3):426-38.
18. Stajich JE, Berbee ML, Blackwell M, Hibbett DS, James TY, Spatafora JW, et al. Primer -- The Fungi. *Curr Biol CB*. 29 de septiembre de 2009;19(18):R840-5.
19. James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, et al. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*. 19 de octubre de 2006;443(7113):818-22.
20. Liu YJ, Hodson MC, Hall BD. Loss of the flagellum happened only once in the fungal lineage: phylogenetic structure of Kingdom Fungi inferred from RNA polymerase II subunit genes. *BMC Evol Biol*. 29 de septiembre de 2006;6(1):74.
21. Lutzoni F, Kauff F, Cox CJ, McLaughlin D, Celio G, Dentinger B, et al. Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *Am J Bot*. 10 de enero de 2004;91(10):1446-80.
22. Idnurm A, Verma S, Corrochano LM. A glimpse into the basis of vision in the kingdom Mycota. *Fungal Genet Biol FG B*. noviembre de 2010;47(11):881-92.

23. Garcia-Solache MA, Casadevall A. Phylogenetics and Evolution of Virulence in the Kingdom Fungi. En: Sibley LD, Howlett BJ, Heitman J, editores. Evolution of Virulence in Eukaryotic Microbes [Internet]. John Wiley & Sons, Inc.; 2012 [citado 27 de enero de 2014]. p. 70-90.  
Recuperado a partir de:  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118308165.ch4/summary>
24. Liu Y, Steenkamp ET, Brinkmann H, Forget L, Philippe H, Lang BF. Phylogenomic analyses predict sistergroup relationship of nucleariids and Fungi and paraphyly of zygomycetes with significant support. BMC Evol Biol. 25 de noviembre de 2009;9(1):272.
25. Ebersberger I, Simoes R de M, Kupczok A, Gube M, Kothe E, Voigt K, et al. A Consistent Phylogenetic Backbone For the Fungi. Mol Biol Evol. 22 de noviembre de 2011;msr285.
26. Carr M, Baldauf SL. The Protistan Origins of Animals and Fungi. En: Pöggeler S, Wöstemeyer J, editores. Evolution of Fungi and Fungal-Like Organisms [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011 [citado 29 de enero de 2014]. p. 3-23. Recuperado a partir de: <http://eprints.hud.ac.uk/15543/>
27. Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. Mycol Res. mayo de 2007;111(5):509-47.

28. Cannon PF, Kirk PM. Fungal Families of the World [Internet]. CABI; 2007. 476 p. Recuperado a partir de:  
[http://books.google.com.ec/books?id=Lw1VLSH1xnAC&pg=PR1&lpg=PR1&dq=last+version+fungal+dictionary&source=bl&ots=\\_XiZVjcnAn&sig=XHrKLw\\_9d3tecenEXXjxO0lsN0M&hl=es-419&sa=X&ei=RIjtUqykBumnsQSfxoHgCg&ved=0CIABEOgBMAg#v=onepage&q=last%20version%20fungal%20dictionary&f=false](http://books.google.com.ec/books?id=Lw1VLSH1xnAC&pg=PR1&lpg=PR1&dq=last+version+fungal+dictionary&source=bl&ots=_XiZVjcnAn&sig=XHrKLw_9d3tecenEXXjxO0lsN0M&hl=es-419&sa=X&ei=RIjtUqykBumnsQSfxoHgCg&ved=0CIABEOgBMAg#v=onepage&q=last%20version%20fungal%20dictionary&f=false)
29. Bass D, Richards TA. Three reasons to re-evaluate fungal diversity 'on Earth and in the ocean'. *Fungal Biol Rev.* diciembre de 2011;25(4):159-64.
30. Mora C, Tittensor DP, Adl S, Simpson AGB, Worm B. How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? Mace GM, editor. *PLoS Biol.* 23 de agosto de 2011;9(8):e1001127.
31. Hawksworth DL. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol Res.* diciembre de 2001;105(12):1422-32.
32. Schmit JP, Mueller GM. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. *Biodivers Conserv.* 1 de enero de 2007;16(1):99-111.
33. Hawksworth DL. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol Res.* 1991;(6):641-55.
34. Hawksworth, D L. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. *Stud Mycol.* 2004;50:9-18.

35. Rogers AD. Evolution and biodiversity of Antarctic organisms: a molecular perspective. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 29 de diciembre de 2007;362(1488):2191-214.
36. Bradner JR. Antarctic microfungi as a potential bioresource [Internet] [Thesis (PhD)]. [Australia]: Macquarie University; 2004 [citado 4 de febrero de 2014]. Recuperado a partir de:  
[http://www.researchonline.mq.edu.au/vital/access/manager/Repository/mq:5819;jsessionid=CA69E10271567677C31BC9B26B012ACA?f0=sm\\_subject%3A%22bioresource%22](http://www.researchonline.mq.edu.au/vital/access/manager/Repository/mq:5819;jsessionid=CA69E10271567677C31BC9B26B012ACA?f0=sm_subject%3A%22bioresource%22)
37. Vyverman W, Verleyen E, Wilmotte A, Hodgson DA, Willems A, Peeters K, et al. Evidence for widespread endemism among Antarctic micro-organisms. *Polar Sci.* agosto de 2010;4(2):103-13.
38. Vincent WF. Evolutionary origins of Antarctic microbiota: invasion, selection and endemism. *Antarct Sci.* 2000;12(03):374-85.
39. Margesin R, Neuner G, Storey KB. Cold-loving microbes, plants, and animals--fundamental and applied aspects. *Naturwissenschaften.* febrero de 2007;94(2):77-99.
40. Godinho VM, Furbino LE, Santiago IF, Pellizzari FM, Yokoya NS, Pupo D, et al. Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. *ISME J.* julio de 2013;7(7):1434-51.

41. Azeem Jadoon W, Nakai R, Naganuma T. Biogeographical note on Antarctic microflorae: Endemism and cosmopolitanism. *Geosci Front.* noviembre de 2013;4(6):633-46.
42. Farrell RL, Arenz BE, Duncan SM, Held BW, Jurgens JA, Blanchette RA. Introduced and indigenous fungi of the Ross Island historic huts and pristine areas of Antarctica. *Polar Biol.* 1 de noviembre de 2011;34(11):1669-77.
43. Chown SL, Huiskes AHL, Gremmen NJM, Lee JE, Terauds A, Crosbie K, et al. Continent-wide risk assessment for the establishment of nonindigenous species in Antarctica. *Proc Natl Acad Sci.* 5 de marzo de 2012;201119787.
44. Hoshino T, Xiao N, Yajima Y, Tkachenko OB, Yumoto I. Fungi in Cryosphere: Their Adaptation to Environments. *Cold-Adapted Microorganisms [Internet].* Horizon Scientific Press; 2013. p. 51.  
Recuperado a partir de:  
<http://books.google.com.ec/books?id=Ts8AAgAAQBAJ&pg=PA53&dq=psychrophile+and+psychrotolerant+fungi&hl=en&sa=X&ei=sEfxUpn8G8iSkQem8YGgCQ&ved=0CEUQ6AEwBg#v=onepage&q=psychrophile%20and%20psychrotolerant%20fungi&f=false>
45. P. D. Bridge BMS. Non-lichenized Antarctic fungi: transient visitors or members of a cryptic ecosystem? *Fungal Ecol.* 2012;5(4):381-94.

46. Stotz GC, Salgado-Luarte C, Rios RS, Acuña-Rodríguez IS, Carrasco-Urra F, Molina-Montenegro MA, et al. Trends in Antarctic ecological research in Latin America shown by publications in international journals. *Polar Res* [Internet]. 17 de septiembre de 2013 [citado 2 de febrero de 2014];32(0). Recuperado a partir de:  
<http://www.polarresearch.net/index.php/polar/article/view/19993>
47. Morita RY. Psychrophilic bacteria. *Bacteriol Rev.* junio de 1975;39(2):144-67.
48. Cavicchioli R, Thomas T. Extremophiles. En: Schaechter M, editor. *Desk Encyclopedia of Microbiology* [Internet]. Academic Press; 2003. p. 436-53. Recuperado a partir de:  
<http://books.google.com.ec/books?id=W-zZ95f42doC&pg=PA442&dq=psychrophile+and+psychrotolerant+fungi&hl=en&sa=X&ei=sEfxUpn8G8iSkQem8YGgCQ&ved=0CCoQ6AEwAQ#v=onepage&q=psychrophile%20and%20psychrotolerant%20fungi&f=false>
49. Zak J, Wildman H. Fungi in stressful environments. En: Mueller GM, Bills GF, Foster MS, editores. *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods* [Internet]. Academic Press; 2011. p. 303-17. Recuperado a partir de:  
<http://books.google.com.ec/books?id=Tr9joZRnZIsC&pg=PA305&dq=psychrophile+and+psychrotolerant+fungi&hl=en&sa=X&ei=sEfxUpn8G8iS>



kQem8YgCQ&ved=0CCUQ6AEwAA#v=onepage&q=psychrophile%20and%20psychrotolerant%20fungi&f=false

50. Singh P, Tsuji M, Singh SM, Roy U, Hoshino T. Taxonomic characterization, adaptation strategies and biotechnological potential of cryophilic yeasts from ice cores of Midre Lovénbreen glacier, Svalbard, Arctic. *Cryobiology*. abril de 2013;66(2):167-75.
51. Xiao N, Suzuki K, Nishimiya Y, Kondo H, Miura A, Tsuda S, et al. Comparison of functional properties of two fungal antifreeze proteins from *Antarctomyces psychrotrophicus* and *Typhula ishikariensis*. *FEBS J*. enero de 2010;277(2):394-403.
52. D'Amico S, Collins T, Marx J-C, Feller G, Gerday C. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO Rep*. abril de 2006;7(4):385-9.
53. Kostadinova N, Vassilev S, Spasova B, Angelova M. COLD STRESS IN ANTARCTIC FUNGI TARGETS ENZYMES OF THE GLYCOLYTIC PATHWAY AND TRICARBOXYLIC ACID CYCLE. *Biotechnol Biotechnol Equip*. 2011;25(4):50-7.
54. Maggi O, Tosi S, Angelova M, Lagostina E, Fabbri AA, Pecoraro L, et al. Adaptation of fungi, including yeasts, to cold environments. *Plant Biosyst - Int J Deal Asp Plant Biol*. 2013;147(1):247-58.
55. Feller G, Gerday C. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nat Rev Microbiol*. diciembre de 2003;1(3):200-8.

56. Gerday C, Aittaleb M, Bentahir M, Chessa JP, Claverie P, Collins T, et al. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends Biotechnol.* marzo de 2000;18(3):103-7.
57. Keller NP, Turner G, Bennett JW. Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol.* diciembre de 2005;3(12):937-47.
58. Demain A, Velasco J, Adrio J. Industrial Mycology: Past, Present, and Future. *Handbook of Industrial Mycology [Internet].* New York, N.Y.: CRC Press; 2004 [citado 20 de abril de 2014]. p. 1-25. Recuperado a partir de: <http://www.crcpress.com/product/isbn/9780824756550>
59. Wild CP, Turner PC. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis.* 11 de enero de 2002;17(6):471-81.
60. Peláez F. Biological Activities of Fungal Metabolites. *Handbook of Industrial Mycology [Internet].* CRC Press; 2004 [citado 20 de abril de 2014]. p. 49-92. Recuperado a partir de: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9780203970553.ch3>
61. Calvo AM, Wilson RA, Bok JW, Keller NP. Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. *Microbiol Mol Biol Rev.* septiembre de 2002;66(3):447-59.
62. Wiemann P, Keller NP. Strategies for mining fungal natural products. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 22 de octubre de 2013;

63. Dirk Hoffmeister NPK. Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Nat Prod Rep.* 2007;24(2):393-416.
64. Frisvad JC. Cold-Adapted Fungi as a Source for Valuable Metabolites. En: Margesin R, Schinner F, Marx J-C, Gerday C, editores. *Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology* [Internet]. Springer Berlin Heidelberg; 2008 [citado 10 de febrero de 2014]. p. 381-7. Recuperado a partir de: [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-74335-4\\_22](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-74335-4_22)
65. Ferrari BC, Zhang C, van Dorst J. Recovering Greater Fungal Diversity from Pristine and Diesel Fuel Contaminated Sub-Antarctic Soil Through Cultivation Using Both a High and a Low Nutrient Media Approach. *Front Microbiol* [Internet]. 15 de noviembre de 2011 [citado 6 de noviembre de 2013];2. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3219075/>
66. Henríquez M, Vergara K, Norambuena J, Beiza A, Maza F, Ubilla P, et al. Diversity of cultivable fungi associated with Antarctic marine sponges and screening for their antimicrobial, antitumoral and antioxidant potential. *World J Microbiol Biotechnol.* enero de 2014;30(1):65-76.
67. Saleem M, Nazir M, Ali MS, Hussain H, Lee YS, Riaz N, et al. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Nat Prod Rep.* febrero de 2010;27(2):238-54.

68. Bérdy J. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *J Antibiot (Tokyo)*. agosto de 2012;65(8):385-95.
69. WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014 [Internet]. World Health Organization; Recuperado a partir de: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>
70. Livermore DM. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 15 de enero de 2003;36(Suppl 1):S11-23.
71. Lumbsch HT, Leavitt SD. Goodbye morphology? A paradigm shift in the delimitation of species in lichenized fungi. *Fungal Divers*. 1 de septiembre de 2011;50(1):59-72.
72. Hawksworth DL. Managing and coping with names of pleomorphic fungi in a period of transition. *IMA Fungus*. junio de 2012;3(1):15-24.
73. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci*. 27 de marzo de 2012;201117018.
74. Begerow D, Nilsson H, Unterseher M, Maier W. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1 de junio de 2010;87(1):99-108.

75. Yu NH, Kim JA, Jeong M-H, Cheong YH, Hong SG, Jung JS, et al. Diversity of endophytic fungi associated with bryophyte in the maritime Antarctic (King George Island). *Polar Biol.* 1 de enero de 2014;37(1):27-36.
76. Groenewald M, Robert V, Smith MT. The value of the D1/D2 and internal transcribed spacers (ITS) domains for the identification of yeast species belonging to the genus *Yamadazyma*. *Persoonia Mol Phylogeny Evol Fungi.* junio de 2011;26:40-6.
77. Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N, Larsson K-H. Intraspecific ITS Variability in the Kingdom Fungi as Expressed in the International Sequence Databases and Its Implications for Molecular Species Identification. *Evol Bioinforma Online.* 26 de mayo de 2008;4:193-201.
78. Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, Coissac E, Taberlet P, Kauserud H. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiol.* 9 de julio de 2010;10:189.
79. Coleman AW. Analysis of Mammalian rDNA Internal Transcribed Spacers. *PLoS ONE* [Internet]. 19 de noviembre de 2013 [citado 21 de abril de 2014];8(11). Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3834078/>

80. Moy TI, Boettner D, Rhodes JC, Silver PA, Askew DS. Identification of a role for *Saccharomyces cerevisiae* Cgr1p in pre-rRNA processing and 60S ribosome subunit synthesis. *Microbiol Read Engl.* abril de 2002;148(Pt 4):1081-90.
81. Blaalid R, Kumar S, Nilsson RH, Abarenkov K, Kirk PM, Kauserud H. ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for fungi. *Mol Ecol Resour.* marzo de 2013;13(2):218-24.
82. Eickbush TH, Eickbush DG. Finely Orchestrated Movements: Evolution of the Ribosomal RNA Genes. *Genetics.* febrero de 2007;175(2):477-85.
83. Naidoo K, Steenkamp ET, Coetzee MPA, Wingfield MJ, Wingfield BD. Concerted Evolution in the Ribosomal RNA Cistron. *PLoS ONE* [Internet]. 12 de marzo de 2013 [citado 24 de abril de 2014];8(3). Recuperado a partir de:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3595265/>
84. Li Y, Jiao L, Yao Y-J. Non-concerted ITS evolution in fungi, as revealed from the important medicinal fungus *Ophiocordyceps sinensis*. *Mol Phylogenet Evol.* agosto de 2013;68(2):373-9.
- 85.
86. Coello Aguilar S. Aislamiento e identificación de microhongos terrestres de la isla Greenwich, Antártida y su potencial como controladores biológicos [Internet] [Tesis de Grado]. [Guayaquil]: ESPOL; 2011.

Recuperado a partir de:

<http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/19147>

87. Plaza GA, Upchurch R, Brigmon RL, Whitman WB, Ulfing K. Rapid DNA Extraction for Screening Soil. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2004;13(3):315-8.
88. White T, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis M, Gelfand D, Shinsky J, White T, editores. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press; 1990. p. 315-22.
89. Fusaro RM. Inoculation Technique for Fungus Cultures. *Appl Microbiol*. enero de 1972;23(1):174-6.
90. Houbraken J, Samson RA. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Stud Mycol*. 15 de noviembre de 2011;70(1):1-51.
91. Houbraken J, Frisvad JC, Samson RA. Taxonomy of *Penicillium* section *Citrina*. *Stud Mycol*. 15 de noviembre de 2011;70(1):53-138.
92. G.S. de Hoog, E. Göttlich, G. Platas, O. Genilloud, G. Leotta, J. van Brummelen. Evolution, taxonomy and ecology of the genus *Thelebolus* in Antarctica. *Stud Mycol*. 2005;51:33-76.
93. Krishnan A, Alias SA, Wong CMVL, Pang K-L, Convey P. Extracellular hydrolase enzyme production by soil fungi from King George Island, Antarctica. *Polar Biol*. 1 de octubre de 2011;34(10):1535-42.

94. Stchigel AM, Cano J, Mac Cormack W, Guarro J. *Antarctomyces psychrotrophicus* gen. et sp. nov., a new ascomycete from Antarctica. *Mycol Res.* marzo de 2001;105(3):377-82.
95. Duncan SM, Farrell RL, Jordan N, Jurgens JA, Blanchette RA. Monitoring and identification of airborne fungi at historic locations on Ross Island, Antarctica. *Polar Sci.* agosto de 2010;4(2):275-83.
96. Anupama Pd PK. A psychrophilic and halotolerant strain of *Thelebolus microsporus* from Pangong Lake, Himalaya. *Mycosphere.* 2011;
97. Leotta GA, Paré JA, Sigler L, Montalti D, Vigo G, Petruccelli M, et al. *Thelebolus microsporus* mycelial mats in the trachea of wild brown skua (*Catharacta antarctica lonnbergi*) and South Polar skua (*C. maccormicki*) carcasses. *J Wildl Dis.* abril de 2002;38(2):443-7.
98. Singh SM, Singh PN, Singh SK, Sharma PK. Pigment, fatty acid and extracellular enzyme analysis of a fungal strain *Thelebolus microsporus* from Larsemann Hills, Antarctica. *Polar Rec.* 2012;50(01):31-6.
99. Böhm J, Hoff B, O’Gorman CM, Wolfers S, Klix V, Binger D, et al. Sexual reproduction and mating-type-mediated strain development in the penicillin-producing fungus *Penicillium chrysogenum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 22 de enero de 2013;110(4):1476-81.
100. Kacprzak M, Neczaj E, Okoniewska E. The comparative mycological analysis of wastewater and sewage sludges from selected wastewater



- treatment plants. *Desalination*. 1 de noviembre de 2005;185(1–3):363-70.
101. Di Menna. Biodiversity of indigenous tussock grassland sites in Otago, Canterbury and the central North Island. V. *Penicillia* and *aspergilli*. *J R Soc N Z*. 2007;37:131-7.
102. García D, Stchigel AM, Guarro J. A new species of *Poroconiochaeta* from Russian soils. *Mycologia*. 5 de enero de 2003;95(3):525-9.
103. García D, Stchigel AM, Cano J, Caldusch M, Hawksworth DL, Guarro J. Molecular phylogeny of *Coniochaetales*. *Mycol Res*. noviembre de 2006;110(11):1271-89.
104. Segeth MP, Bonnefoy A, Brönstrup M, Knauf M, Schummer D, Toti L, et al. Coniosetin, a novel tetramic acid antibiotic from *Coniochaeta ellipsoidea* DSM 13856. *J Antibiot (Tokyo)*. febrero de 2003;56(2):114-22.
105. Carrasco M, Rozas JM, Barahona S, Alcaino J, Cifuentes V, Baeza M. Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the sub-Antarctic region. *BMC Microbiol*. 6 de noviembre de 2012;12:251.
106. Branda E, Turchetti B, Diolaiuti G, Pecci M, Smiraglia C, Buzzini P. Yeast and yeast-like diversity in the southernmost glacier of Europe (Calderone Glacier, Apennines, Italy). *FEMS Microbiol Ecol*. 2010;72(3):354-69.

107. Fonseca Á, Boekhout T, Fell JW. *Cryptococcus Vuillemin* (1901). En: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T, editores. *The Yeasts* [Internet]. Fifth Edition. London: Elsevier; 2011 [citado 11 de mayo de 2014]. p. 1661-737. Recuperado a partir de:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444521491001385>
108. Turchetti B, Buzzini P, Goretti M, Branda E, Diolaiuti G, D'Agata C, et al. Psychrophilic yeasts in glacial environments of Alpine glaciers. *FEMS Microbiol Ecol.* 2008;63(1):73-83.
109. Hou CT. New bioactive fatty acids. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2008;17 Suppl 1:192-5.
110. Hafizah SH, Alias SA, Siang HY, Smykla J, Pang K, Guo S, et al. Studies on diversity of soil microfungi in the Hornsund area, Spitsbergen. *Pol Polar Res.* 2013;34(1):39-54.
111. Gilichinsky D, Rivkina E, Bakermans C, Shcherbakova V, Petrovskaya L, Ozerskaya S, et al. Biodiversity of cryopegs in permafrost. *FEMS Microbiol Ecol.* 1 de junio de 2005;53(1):117-28.
112. Bayram O, Krappmann S, Ni M, Bok JW, Helmstaedt K, Valerius O, et al. *VelB/VeA/LaeA* Complex Coordinates Light Signal with Fungal Development and Secondary Metabolism. *Science.* 13 de junio de 2008;320(5882):1504-6.

113. Hoff B, Kamerewerd J, Sigl C, Mitterbauer R, Zadra I, Kürnsteiner H, et al. Two Components of a velvet-Like Complex Control Hyphal Morphogenesis, Conidiophore Development, and Penicillin Biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Eukaryot Cell*. 8 de enero de 2010;9(8):1236-50.
114. Bayram O, Braus GH. Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiol Rev*. enero de 2012;36(1):1-24.
115. Yin W, Keller NP. Transcriptional regulatory elements in fungal secondary metabolism. *J Microbiol Seoul Korea*. junio de 2011;49(3):329-39.
116. Tisch D, Schmoll M. Light regulation of metabolic pathways in fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*. 14 de noviembre de 2009;85(5):1259-77.
117. Amare MG, Keller NP. Molecular mechanisms of *Aspergillus flavus* secondary metabolism and development. *Fungal Genet Biol*. mayo de 2014;66:11-8.
118. Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. marzo de 2012;18(3):268-81.