



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

**“Aislamiento e Identificación de Microhongos Terrestres
de Punta Fort William - Antártida”**

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del título de:

BIÓLOGO

Presentada por:

**Ahmed Sajid Ordóñez Barbero
Nadia Ivonne Ordóñez Román**

Guayaquil - Ecuador

2009

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a nuestro Director Washington B. Cárdenas, Ph. D. por su constante apoyo durante la realización de esta tesis, y demás personas que colaboraron como Marcelo Muñoz, Ph. D., Fernando Arcos, Ph. D., Paola Calle, Ph. D, Blgo. Marco Álvarez, Sr. Santiago Coello, Egre. Lorena Monserrate, Egre. Karin Saéñz de Viteri y Egre. José Medina. Un especial agradecimiento a todas las personas que forman parte del Instituto Antártico Ecuatoriano (INAE) y a Siti Aisyah, Ph, D. por su interés y sugerencias a nuestro proyecto. A todo el personal que formó parte de la XII y XIII Expedición del Ecuador a la Antártida. A Lili y Alberto del Centro de Servicio de Acuicultura por su colaboración durante el trabajo de laboratorio. Finalmente el agradecimiento al Centro de Investigación Científica y Tecnológica (CICYT) por el apoyo económico hacia este proyecto de tesis.

Nadia Ordóñez R. y Ahmed Ordóñez B.

DEDICATORIA

A mis padres Vicente Ordóñez e Ivonne Román, y a mis hermanos Vicente y Javier, por apoyarme durante toda mi carrera. A Christian Romero por su cariño y comprensión. A todos mis amigos (as) de la Facultad, por su agradable compañía.

Nadia Ordóñez R.

DEDICATORIA

Dedicado a mis padres Claire Barbery y Rodolfo Ordóñez por su apoyo incondicional, a mi hermano Abdel por su carisma y sus enseñanzas, a mis tías Ana Luisa y Germania por su cariño, a Sofía Ulloa por ser la mejor, y mi amor; a Peter, el enano por ser el mejor amigo de toda la vida, a mi mascota Zeus, que jamás la olvidaré, a mis amigos de universidad por haber sido los mejores.

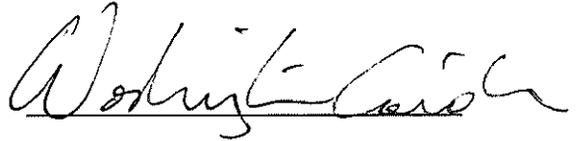
Ahmed Ordóñez B.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



M. Sc. Jerry Landívar

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



Washington B. Cárdenas, Ph. D.

DIRECTOR DE TESIS



Marcelo Muñoz, Ph. D.

VOCAL PRINCIPAL



Fernando Arcos, Ph. D.

VOCAL PRINCIPAL

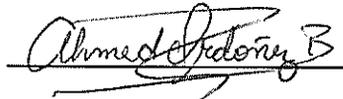
DECLARACIÓN EXPRESA

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

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)



Nadia Ordóñez R.



Ahmed Ordóñez B.

RESUMEN

En el presente estudio se aislaron e identificaron, al menos a nivel de género, microhongos terrestres de seis muestras recolectadas en Punta Fort William, Isla Greenwich, durante el verano antártico de febrero del 2008. El presente estudio constituye la primera investigación taxonómica de microhongos terrestres antárticos del Ecuador. Los microhongos presentes en el suelo fueron aislados por el método de Warcup (1), en medio sólido de patata-dextrosa agar (PDA). Luego de 7 a 12 días de incubación a 4 °C, se procedió a aislar las cepas incubándolas a 4 °C y 25 °C, para discriminar entre microhongos psicrófilos (crecimiento menor o igual a 20 °C) y psicotrofos, (crecimiento menor o igual a 25 °C), respectivamente. Las cepas se preservaron para futuras investigaciones en tubos de ensayo con PDA inclinado, a 4 °C. La identificación a nivel de género de los diferentes aislados se basó en observaciones de sus características microscópicas y macroscópicas, ayudados de manuales y artículos publicados con claves taxonómicas.

Se obtuvieron un total de 269 aislados, que se catalogaron en 6 géneros: *Geomyces* (36.6%), *Antarctomyces* (26%), *Thelebolus* (12%), *Mucor* (24%), *Mrakia* (0.6%) y *Cladosporium* (0,4%), agrupados en 5 familias: Thelebolaceae, Myxotrichaceae, Mycosphaerellaceae, Mucoraceae, y Cystofilobasidiaceae. Uno de los aislados no pudo ser identificado, pero se lo vinculó al grupo de hongos imperfectos (0,4%) por no presentar esporas sexuales. De los géneros identificados, sólo *Geomyces* y *Cladosporium* mostraron crecimiento a 25 °C, por lo que se podrían catalogar como microorganismos psicotrofos. Los géneros *Geomyces* y *Antarctomyces* fueron los taxones más frecuentes, siendo reportados en cinco de las seis muestras de suelo analizadas. Solo una de las muestras presentó la mayor frecuencia de géneros, incluyendo a: *Geomyces*, *Antarctomyces*, *Mucor*, *Mrakia* y *Cladosporium*. En todas las muestras se identificó por lo menos tres géneros de microhongos.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	VII
ÍNDICE GENERAL.....	IX
ABREVIATURAS	XII
ÍNDICE DE FIGURAS	XIV
ÍNDICE DE TABLAS	XVI
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO 1

1. GENERALIDADES.....	4
1.1 Microhongos Terrestres Antárticos	5
1.2 Clases termales	7
1.3 Importancia de los Microhongos.....	10

CAPÍTULO 2

2. ÁREA DE ESTUDIO	5
2.1 Antártida Marítima	13
2.2 Condiciones Ambientales	15
2.3 Punta Fort William-Isla Greenwich.....	17

CAPÍTULO 3

3. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1 Recolección de las muestras de suelo.....	22
3.2 Metodología de Laboratorio	24
3.2.1 Sembrado	26
3.2.2 Aislamiento	27
3.2.3 Preservación de las cepas.....	29
3.2.4 Identificación	30
3.2.4.1 Observación directa.....	31
3.2.4.2 Preservación del montaje	32

CAPITULO 4

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES	34
4.1 Análisis de Muestras de Suelo	35
4.2 Análisis del trabajo de laboratorio.....	38
4.3 Identificación de Microhongos	47
4.3.1 Familia: Thelebolaceae, Eckblad, 1968.....	48
4.3.1.1 Género: <i>Antarctomyces</i>	48
4.3.1.2 Género: <i>Thelebolus</i>	53
4.3.2 Familia: Myxotrichaceae, Currah (1985).....	62
4.3.2.1 Género: <i>Geomyces</i>	63
4.3.3 Familia: Mycosphaerellaceae Lindau, 1897.....	66
4.3.3.1 Género: <i>Cladosporium</i>	67
4.3.4 Familia: Mucoraceae.....	69

4.3.4.1 Género: <i>Mucor</i>	69
4.4.5 Familia Cystofilobasidiaceae	74
4.3.5.1 Género: <i>Mrakia</i>	74
4.3.6 Hongos Imperfectos.....	76
4.4 Tamaño de las esporas	78
4.5 Porcentaje de ocurrencia de Géneros.....	79
4.6 Frecuencia de Ocurrencia	84
CAPÍTULO 5	87
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	87
5.1 CONCLUSIONES	87
5.2 RECOMENDACIONES	89
APÉNDICES	90
BIBLIOGRAFÍA	94

ABREVIATURAS

aa	Año
CICYT	Centro de Investigación de Ciencia y Tecnología
Clo	Cloranfenicol
dd	Día
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
GIT1	Isla Greenwich-Transecto 1
GPS	Geoposicionamiento
INAE	Instituto Antártico Ecuatoriano
mm	Mes
MO	Microorganismos
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
O	Oeste
PAM	Programa Antártico de Malasia
PDA	Patata-dextrosa agar
PEVIMA	Pedro Vicente Maldonado

S	Sur
SD	Desviación Estándar
SI	Sin Identificar
SO-NE	Suroeste-Noreste
T °C	Temperatura en Grados Celsius

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clases Termales de los Microhongos según Morita (11), Ingraham & Stokes (21), Sinclair & Stokes (22).....	8
Figura 2. Regiones bioclimáticas de la Antártida.	14
Figura 3. Islas Shetland del Sur.	15
Figura 4. Ubicación de la Estación PEVIMA en Punta Fort William, Isla Greenwich.	18
Figura 5. Punta Fort William, Isla Greenwich.....	19
Figura 6. Posición de la transecta lineal GIT1 y sitios de muestreo en Punta Fort William.....	23
Figura 7. Recolección de las muestras de suelo en Punta Fort William.	24
Figura 8. Esquema de la Metodología de Laboratorio.	25
Figura 9. Sembrado de las muestras de suelo.	27
Figura 10. Aislado de las cepas en el laboratorio.	28
Figura 11. Preservación de las diferentes cepas.	29
Figura 12. Vista panorámica del sitio de muestreo.	36
Figura 13. Número de colonias fúngicas por réplica durante el sembrado inicial de los microhongos de las seis muestras de suelo de la Transecta 1.	39
Figura 14. Muestras control expuestas al ambiente del laboratorio e incubadas a 25 °C y 4 °C.	45
Figura 15. Ejemplos de diferentes niveles de densidad fúngica obtenidas durante el sembrado inicial de las muestras de suelo.	45
Figura 16. Modificación de la etapa de aislamiento para optimización de la metodología.....	47
Figura 17. <i>Antarctomyces</i> sp.....	50
Figura 18. <i>Antarctomyces</i> en medio PDA a 4 °C.....	50

Figura 19. <i>Antarctomyces</i> sp1.....	51
Figura 20. <i>Antarctomyces</i> sp2.....	52
Figura 21. <i>T. microsporus</i> (Berk. & Broome) Kimbr. 1967.....	55
Figura 22. <i>T. microsporus</i> , en medio PDA a 4 °C.....	56
Figura 23. <i>Thelebolus</i> sp1.....	58
Figura 24. <i>Thelebolus</i> sp2.....	60
Figura 25. <i>Thelebolus</i> sp2 en medio PDA a 4 °C.....	61
Figura 26. <i>Geomyces</i> sp.	63
Figura 27. <i>Geomyces</i> sp. en medio PDA a 4 °C.....	66
Figura 28. <i>Geomyces</i> sp en medio PDA a 25 °C.....	66
Figura 29. <i>C. sphaerospermum</i> Penz. 1882.	68
Figura 30. <i>Mucor</i> en medio PDA a 4 °C.....	71
Figura 31. <i>Mucor</i> y sus variantes.....	71
Figura 32. <i>M. frígida</i> , (Fell et al.) Yamada & Komagata 1987.....	75
Figura 33. Hongo Imperfecto.....	77
Figura 34. Tamaño de las esporas de los aislados encontrados.	78
Figura 35. Porcentaje de ocurrencia de géneros aislados en GIT1-0.	80
Figura 36. Porcentaje de ocurrencia de géneros aislados en GIT1-205.	80
Figura 37. Porcentaje de ocurrencia de géneros aislados en GIT1-500.	81
Figura 38. Porcentaje de ocurrencia de los géneros aislados en GIT1-700.....	82
Figura 39. Porcentaje de ocurrencia de los géneros aislados en GIT1-800.....	82
Figura 40. Porcentaje de ocurrencia de los géneros aislados en GIT1-972,5.	83
Figura 41. Porcentaje de ocurrencia global de los géneros aislados.....	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Datos de los sitios de muestreo en Punta Fort William, Isla Greenwich.	35
Tabla II. Temperatura del suelo durante el periodo de muestreo en el verano antártico 2008.	37
Tabla III. Número de colonias por muestra de suelo durante el sembrado.	39
Tabla IV. Microhongos obtenidos en etapas de sembrado y aislado.	41
Tabla V. Fechas de siembra y aislado para las diferentes muestras de suelo.	46
Tabla VI. Frecuencia de ocurrencia de los diferentes géneros aislados.	85

INTRODUCCIÓN

La Antártida constituye un ecosistema único del planeta Tierra, es considerada la zona desértica más extensa, de una extrema variabilidad climática, físicamente aislada y de gran interés científico.

Las expediciones a la Antártida se vienen realizando desde principios del siglo XIX, sin embargo la I Expedición Científica Ecuatoriana se llevó a cabo en 1987, desde entonces se han desarrollado algunos proyectos encaminados a entender la composición y funcionamiento de los diversos ecosistemas antárticos. A pesar de estos esfuerzos, la información es escasa en el área microbiológica. Las principales razones son la falta de científicos que trabajen en la misma y la dificultad de encontrar apoyo financiero en estudios en ciencias básicas.

En el presente tema de tesis "Aislamiento e Identificación de Microhongos Terrestres de Punta Fort William, Isla Greenwich-Antártida", se planteó la

hipótesis de que los microhongos antárticos podrían ser aislados e identificados en agar sólido de PDA a temperaturas de 4 °C y 25 °C, con observaciones a través del microscopio y ayuda de textos guías.

El objetivo general fue identificar, en base a características morfológicas, a los microhongos terrestres de seis muestras de suelo de la transecta denominada T1 cercana a la Base Ecuatoriana Pedro Vicente Maldonado (PEVIMA), para lo cual se plantearon tres objetivos específicos:

1. Aislar microhongos en medio de cultivo sólido de seis muestras de suelo recolectadas en Punta Fort William.
2. Clasificar funcionalmente a los microhongos aislados entre psicrófilos y psicotrofos.
3. Identificar los microhongos aislados documentándolos en un catálogo gráfico.

Este proyecto de tesis es el primer estudio ecuatoriano de microhongos terrestres provenientes de Punta Fort William, utilizando la técnica de Warcup(1). A su vez, esta tesis constituye una investigación derivada del megaproyecto denominado "Diversidad Microbiana alrededor de la Estación PEVIMA, Antártida: Distribución, Abundancia y Fisiología de hongos, algas, bacterias y cianobacterias", dirigido por el INAE y el Programa Antártico de

Malasia (PAM), donde el Laboratorio de Biomedicina de la Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar y el Centro de Investigaciones Marinas de la Universidad Malaya, colaboraron para desarrollar el subproyecto "Bioactividad y Biodiversidad de Microhongos Terrestres". Además, se contó con el financiamiento del CICYT de la ESPOL, para la adquisición de equipos e insumos.

CAPÍTULO 1

1. GENERALIDADES

La naturaleza remota y extrema de la Antártida constituye un reto para la supervivencia de los organismos que en ella habitan. Las condiciones ambientales extremas obligaron a las diferentes especies presentes en el continente blanco a desarrollar mecanismos de protección, a través de un proceso largo de adaptación (2). Muchos de los organismos que forman

parte de la flora antártica son muy primitivos como musgos y líquenes, y otros más complejos como las hepáticas, algas y gramíneas, también existen dos pequeñas plantas vasculares con flores, el clavelito antártico (*Colobanthus quitensis*) y el pasto antártico (*Deschampsia antarctica*) (3). Los invertebrados y vertebrados también forman parte del ecosistema antártico, algunos son de origen exclusivamente marino, aunque también hay otros que intercalan ciertos ciclos de sus vidas en tierra, en especial para reproducirse, como las focas y pingüinos (3-7). Sin embargo, existe una gran diversidad de microorganismos presentes en las diferentes áreas bioclimáticas de la Antártida que han podido ser aislados de muestras de hielo, agua, suelo y aire (8-13).

1.1 Microhongos Terrestres Antárticos

Los microorganismos presentes en el suelo incluyen algas, bacterias, hongos y cianobacterias, que a pesar de ocupar menos del 1% del área del suelo, su actividad biológica es bastante alta (14). Se estima que de 1,5 millones de especies de hongos existentes en el mundo,

tan solo cerca del 5% han sido descritas, y en un número más reducido (0,3%) se ha estudiado su actividad biológica (15).

Los microhongos son microorganismos eucarióticos, que tienen paredes celulares compuestas de quitina, un polímero de *N*-acetilglucosamina. Los microhongos se distinguen de los macrohongos por la presencia de un cuerpo fructífero multicelular muy pequeño que generalmente no puede ser observado a simple vista. Existe una gran diversidad de microhongos que se encuentran en casi todos los ecosistemas, algunos de ellos viven en hábitats específicos: folícolas (sobre hojas), hipogeos (bajo suelo), otros se encuentran sobre insectos, y otros huéspedes específicos. La mayor parte del cuerpo fúngico consiste en filamentos microscópicos llamados hifas que se extienden por el sustrato donde se encuentra (15).

En la Antártida continental se han reportado cerca de 190 especies de microhongos, y probablemente la diversidad microfúngica en la Antártida marítima es mucho más alta, debido a sus condiciones ambientales relativamente menos hostiles, habiéndose reportado cerca de 12 especies de Ascomycota, 13 especies de Basidiomycota y muchos Hongos Imperfectos, desconocidos para la Antártida

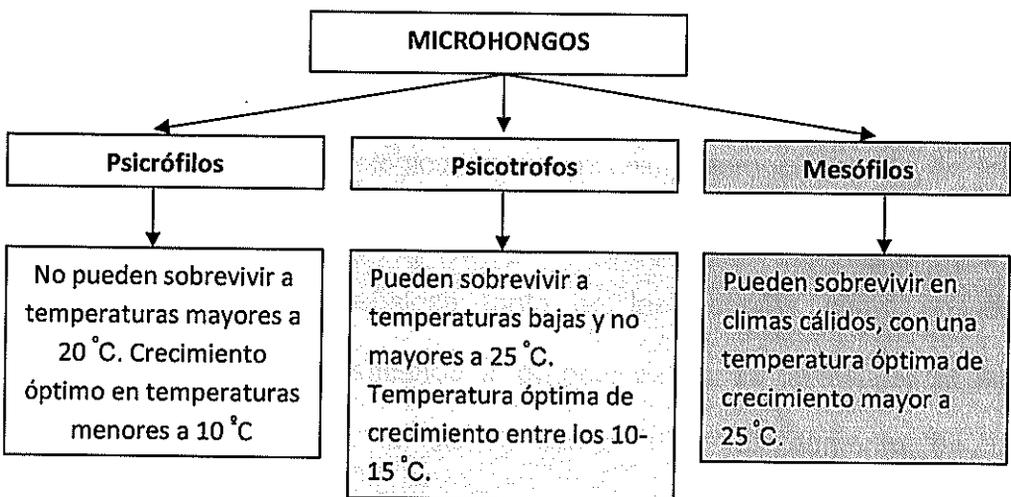
continental (16). La mayoría de microhongos que son capaces de crecer a bajas temperaturas tienen adaptaciones especiales en sus enzimas, membranas y otros componentes celulares, que les permiten tener tasas de crecimiento comparables a la de los microorganismos de climas cálidos (17).

1.2 Clases termales

Los hongos han sido clasificados en tres clases termales: Psicrófilos, Psicotrofos y Mesófilos, según su tolerancia para crecer en diferentes temperaturas. Anteriormente, los científicos subdividían a los psicrófilos en dos tipos: estrictos y facultativos, dependiendo si crecían debajo o arriba de los 20 °C, respectivamente (21, 22). Pero, actualmente existe una discusión sobre la validación de dichas definiciones, dado que los psicrófilos "facultativos" no prefieren las bajas temperaturas. Por lo que en su lugar se ha propuesto que los psicrófilos sean referidos a organismos con un crecimiento óptimo en temperaturas menores a 10 °C, con una temperatura máxima de crecimiento menor a 20 °C; y que se incorpore el término psicotrofos

para organismos tolerantes al frío, previamente nombrados como psicrófilos facultativos, siendo para estos la máxima temperatura de crecimiento hasta los 25 °C y su temperatura óptima entre 10 a 15 °C (10). Mientras que los hongos mesófilos son aquellos capaces de sobrevivir a climas cálidos, con un óptimo de crecimiento mayor a 25 °C (22) (Fig. 1).

Figura 1. Clases Termales de los Microhongos según Morita (10), Ingraham & Stokes (21), Sinclair & Stokes (22).



Los microhongos psicrófilos y psicotrofos son organismos adaptados al frío, capaces de crecer a temperaturas cercanas a 0 °C (11). Estos son considerados los verdaderos extremófilos porque poseen adaptaciones fisiológicas que les permiten sobrevivir en las limitantes

ambientales presentes en lugares permanentemente fríos, con temperaturas promedio de -5°C (12). Las bajas temperaturas limitan la tasa de reacciones químicas, siendo un gran reto para los organismos psicrófilos y psicotrofos poder mantener una apropiada tasa de catalización enzimática, especialmente aquellas relacionadas a procesos celulares esenciales, como la respiración y expresión de proteínas (13, 23). Además, temperaturas muy bajas afectan indirectamente el crecimiento, al impedir la disponibilidad de agua en estado líquido, pero por otro lado lo estimula al causar daño en el tejido celular liberando nutrientes al medio. (12).

Los mecanismos fisiológicos que confieren tolerancia al frío en los microhongos son complejos (17). Estos incluyen incremento en la concentración de trehalosa tanto en las esporas como en las células (25). Este disacárido al parecer es capaz de estabilizar las membranas durante la deshidratación (26). El aumento en la concentración de polioles mantiene la turgencia de presión en la membrana cuando existe poca disponibilidad de agua (27). También es importante la secreción de proteínas y enzimas anti-congelantes (28). Adicionalmente una de las estrategias ecológicas de los hongos para sobrevivir en el frío es la germinación

de sus esporas anualmente, durante el verano, sin embargo estas serían capaces de sobrevivir en el invierno (17).

1.3 Importancia de los Microhongos

Los microhongos están presentes en casi todos los ecosistemas y cumplen con muchas funciones ecológicas importantes, particularmente están asociados con el ciclo del carbono (8), así como en la descomposición y mineralización de nutrientes de material orgánico. Sus funciones incluyen la volatilización del hidrógeno y oxígeno, la reducción en volumen de la materia orgánica, la fragmentación de las macromoléculas y el incremento de la homogeneidad del sustrato, favoreciendo así la asimilación de nutrientes por organismos detritívoros (18). De igual manera, los hongos favorecen la disponibilidad de nutrientes para el crecimiento de las plantas (9, 19-20).

Además, durante las dos últimas décadas, ha existido un gran interés por estudiar a los microorganismos adaptados a climas fríos, en especial a los psicrófilos, el principal motivo es que son una fuente potencial de extremo-enzimas (2, 24) con variadas aplicaciones biotecnológicas en la salud, industria, agricultura y como fuentes de nuevas enzimas, razón por la cual han llamado la atención de la comunidad científica (29). Por ejemplo, algunos procesos industriales que se desarrollan bajo condiciones de baja temperatura necesitan de biocatalizadores que sean capaces de permanecer activos en dichas circunstancias (28). Adicionalmente, estos microorganismos son considerados fuentes potenciales de componentes antimicrobianos, actuando como agentes terapéuticos o biocontroladores (29-31).

CAPÍTULO 2

2. ÁREA DE ESTUDIO

El área de estudio comprende la Punta Fort William, localizada en la Isla Greenwich, la cual forma parte del conjunto de Islas Shetland del Sur, ubicadas en la región conocida como Antártida Marítima (4), aquí el comportamiento climático se caracteriza por tres aspectos definidos: bajas temperaturas, escasa precipitación pluviométrica en la gran meseta interior

y fuertes e incesantes vientos. Además, se presentan dramáticos efectos estacionales debido al ángulo de inclinación de la Tierra (3).

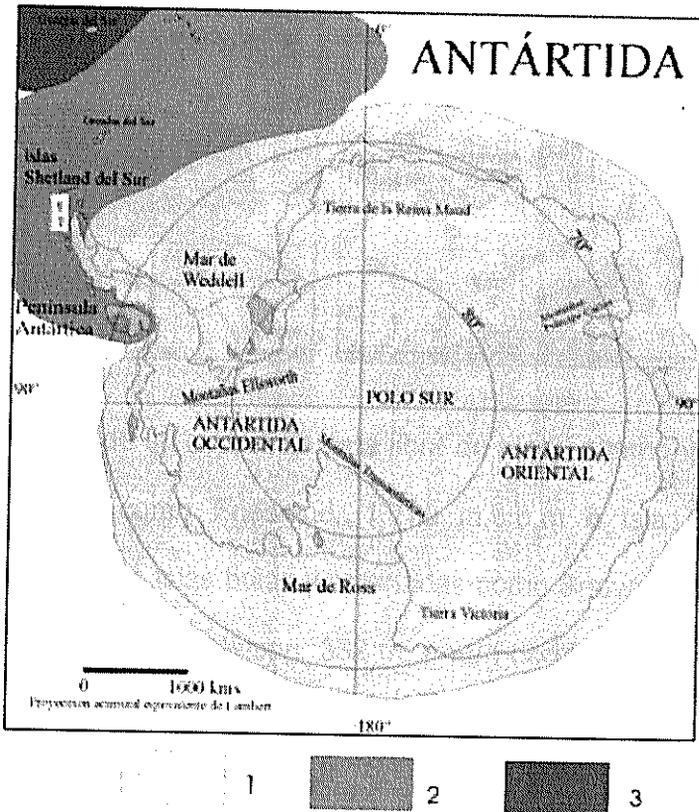
2.1 Antártida Marítima

La variedad geográfica que posee la Antártida se ha concretado en tres regiones bioclimáticas principales: la *Antártida continental*, que comprende la mayor parte del continente, la *Antártida marítima*, que corresponde a la porción septentrional de la península antártica, incluyendo a los archipiélagos de las Shetland del Sur, Orcadas del Sur y Sandwich del Sur, y la región *Subantártica*, limitada al conjunto de islas del Atlántico e Índico (Fig. 2). Las diferencias entre las tres regiones bioclimáticas se basan principalmente en el tipo y presencia de especies vegetales, las temperaturas medias anuales y estivales, las precipitaciones y variaciones en las presiones y regímenes de vientos (32, 33).

Figura 2. Regiones bioclimáticas de la Antártida.

1. Antártida Continental. 2. Antártida Marítima y 3. Región Subantártica.

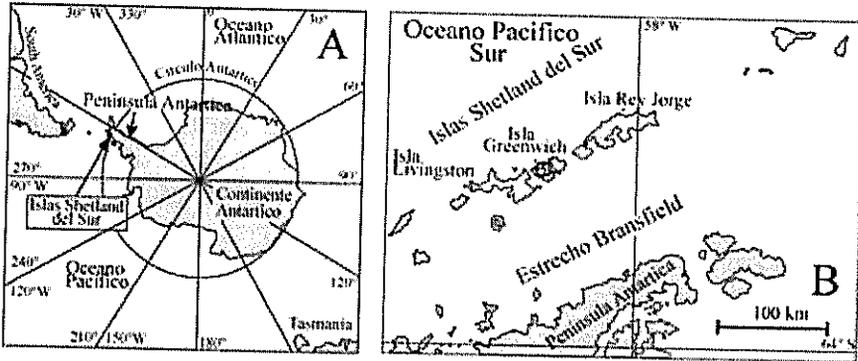
Fuente: Pickard y Seppelt (32); Blümel y Eitel (33)



Las Islas Shetland del Sur están conformadas por once islas mayores, ubicadas en la zona más meridional de la Antártida marítima, a once kilómetros de la península Antártica, entre $61^{\circ}59'$ y $63^{\circ}20'$ de latitud Sur, y $57^{\circ}40'$ y $62^{\circ}45'$ de latitud Oeste y tiene una extensión de 4.700 km^2 . El archipiélago se alinea a una distancia de 510 km en dirección SO-NE entre el Paso Drake y el mar de Bransfield, en el océano Antártico (Fig. 3).

Figura 3. Islas Shetland del Sur.

A. Ubicación en Antártida Marítima. **B.** Las principales islas del archipiélago. Fuente: Santana (35).



Sólo el 10% de su superficie está libre de hielo, alternando los medios de montaña como Friesland, 1.770 m.s.n.m e isla Smith, 2.012, m.s.n.m. con las islas bajas y aplanadas como Snow, 305 m; Low, 180 m; Robert, 385 m; y Nelson, 332 m, en un dominio glaciar de amplios domos que alcanzan 686 m.s.n.m. en Rey Jorge y 631 m.s.n.m. en Greenwich (4, 33).

2.2 Condiciones Ambientales

En el ecosistema antártico existe una extrema variabilidad climática que está relacionada a su ubicación geográfica. Las condiciones de

verano e invierno son radicalmente diferentes y alteran marcadamente la composición, distribución, metabolismo, producción e interacción de las poblaciones naturales (5). La Antártica recibe el menor porcentaje de precipitaciones del mundo, por lo que se considera el continente más seco. Además es el más ventoso, llegando incluso a presentar vientos de más de 320 km/hora (3).

La temperatura media anual en la gran meseta interior es de -50°C . Sin embargo durante el verano, en la Antártida marítima se registra una temperatura media de más de 1°C y recibe las mayores precipitaciones del continente (400-600 mm anuales), mientras que la temperatura anual para esta región bioclimática está entre los 1°C y los -21°C (3,4,6).

La humedad en la zona de la península antártica y sus alrededores mantiene una media superior al 80%, a diferencia de la zona interior del continente, cadenas montañosas y "valles secos" (dry valleys) donde la media es mucho menor. Otra de las características de este ecosistema es que el hielo que lo cubre casi en su totalidad refracta el 90% de la radiación solar (3). Diversos fenómenos, tales como lloviznas, nevadas y ventiscas, reducen frecuentemente la visibilidad

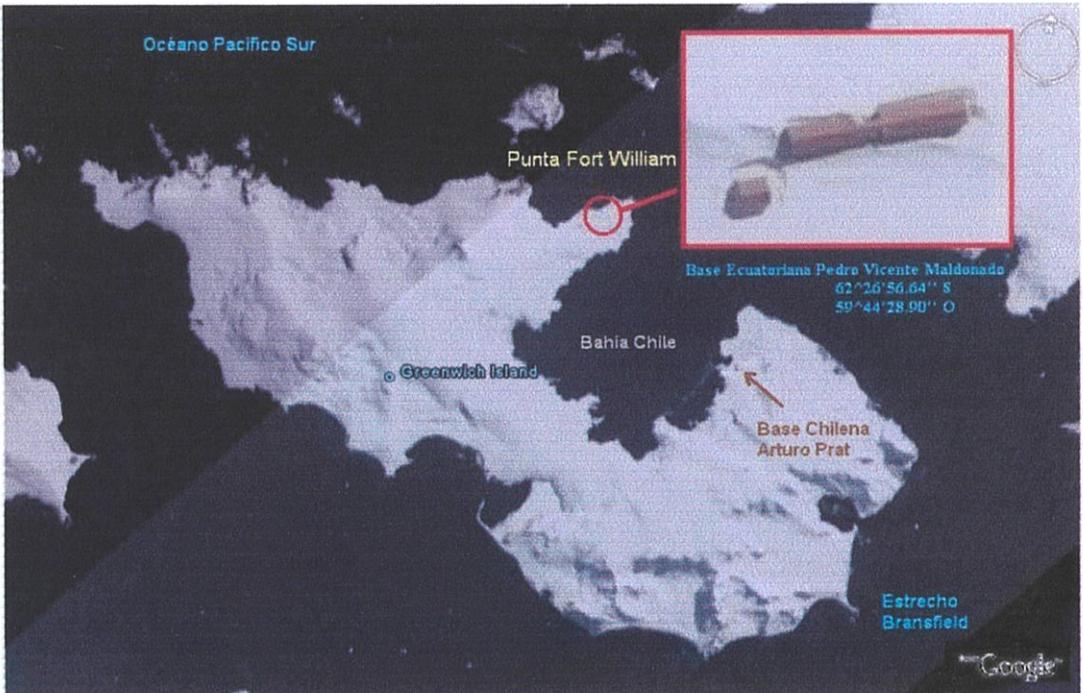
horizontal, de igual manera esta reducción suele ocurrir a veces a causa de nieblas de diversos tipos y orígenes, a pesar del fuerte viento (6, 7). Dado estas singulares y únicas condiciones ambientales de la Antártida, la convierten en foco de interés para la comunidad científica mundial (5, 6, 34), y últimamente también ha llamado la atención del sector turístico, en especial en las Islas Shetland del Sur donde el número de visitantes por año aumenta progresivamente (4).

2.3 Punta Fort William-Isla Greenwich

La Punta Fort William (también denominada Punta Sparks) forma parte de la Isla Greenwich y está localizada en el borde suroeste del Estrecho Inglés, en la esquina oeste de la entrada hacia la Bahía Chile (35). A su vez, en dicho sector se encuentra la Base Ecuatoriana PEVIMA (Fig. 4).

Figura 4. Ubicación de la Estación PEVIMA en Punta Fort William, Isla Greenwich.

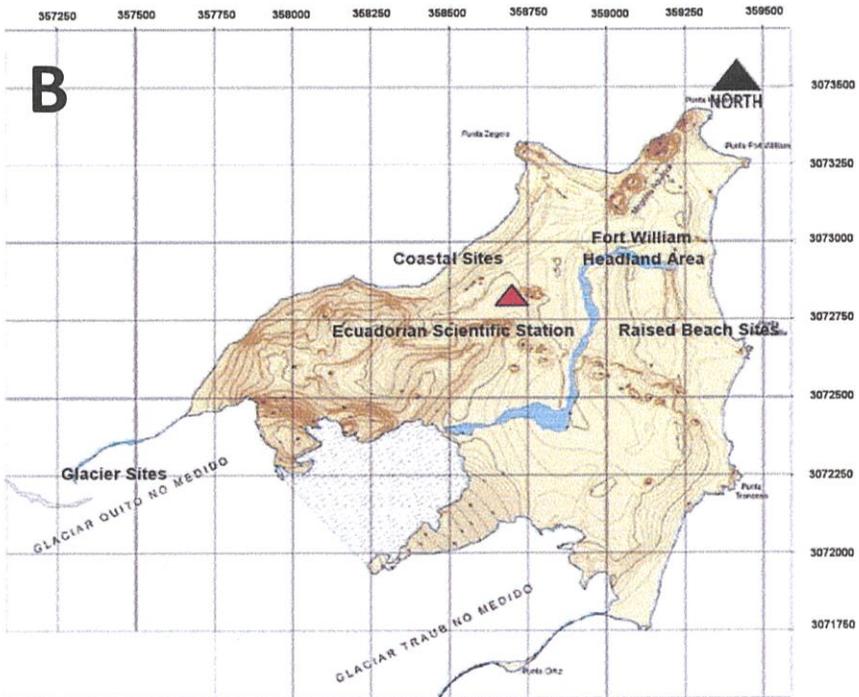
Fuente: Google Earth™.



Acerca de la historia geológica de la Isla Greenwich se conoce que está constituida por unidades volcánicas tabulares de granodioritas de edad Cretácico superior a Paleoceno (36-39). Actualmente exhibe características geomorfológicas glaciales, y áreas costeras que muestran sistemas bien desarrollados de playas levantadas alrededor de promontorios (Fig. 5) (35, 36, 40, 41).

Figura 5. Punta Fort William, Isla Greenwich.

A. Vista Panorámica, se observa la Estación PEVIMA (↓) y la roca "Lobo Dormido" (↓) de 20 m de altura. Foto. Dr. Yii, H. de la Universidad de Malasia, 2009. **B.** Mapa de Punta Fort William. Fuente: INAE, INOCAR, UPSE, Universidad de Malasia.



La exposición de superficies de tierra durante el verano en la Isla Greenwich permite la colonización y reproducción de algunas aves marinas (42-44), así como el crecimiento de plantas que prosperan a lo largo de los márgenes de lagos y ríos, y en zonas rocosas cercanas a sitios de anidación. La macroflora está compuesta principalmente por musgos y líquenes (45,46), aunque también se ha documentado la presencia de la planta vascular como *C. quitensis* (47). A su vez, existe una significativa comunidad microscópica que incluye a procariotas fotosintéticos, algas unicelulares y microhongos, pero aún no ha sido bien estudiada (34, 48). Sin embargo, en otras regiones de la Antártida se han desarrollado numerosos proyectos de investigación acerca de los microhongos: en Tierra Victoria se estudió la microbiota presente en el suelo (49-51), la biodiversidad de microhongos en la Isla Windmill (52-54), microhongos psicrófilos del Oasis de Schirmacher (31), las adaptaciones de los hongos para crecer en el ambiente extremo antártico (2, 17, 55, 56), las especies fúngicas invasoras (57) y demás.

CAPÍTULO 3

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se describen los diferentes métodos y técnicas utilizados durante el presente tema de tesis, incluyendo el trabajo de campo y de laboratorio. Algunos de los métodos y técnicas utilizados siguen los protocolos establecidos en el megaproyecto “Diversidad Microbiana alrededor de la Estación PEVIMA, Antártida: Distribución, Abundancia y Fisiología de hongos, algas, bacterias y cianobacterias”, con la finalidad de

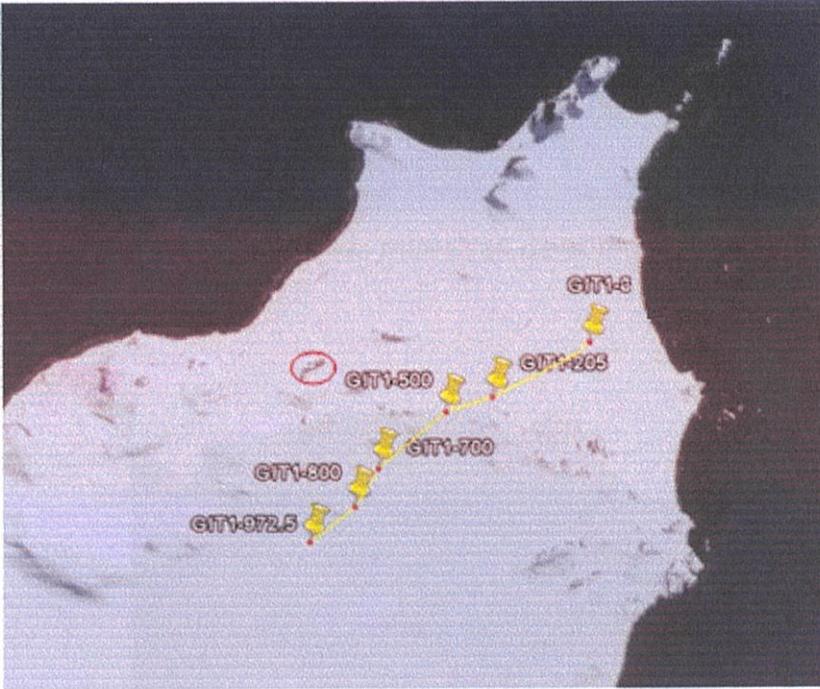
que los resultados que se generen en nuestro laboratorio sean comparables con los de nuestros colaboradores de la Universidad de Malasia.

3.1 Recolección de las muestras de suelo

Las seis muestras de suelo fueron recolectadas en el sector de Punta Fort William, en la Isla Greenwich, durante el mes de febrero en el verano antártico del 2008. Los sitios de recolección fueron georeferenciados con un D-GPS (Trimble), los mismos que corresponden a una transecta lineal que se trazó a lo largo del sector, denominada GIT1 (Isla Greenwich-Transecto1) de 0.97 km de largo (Fig. 6).

Figura 6. Posición de la transecta lineal GIT1 y sitios de muestreo en Punta Fort William.

La ubicación de la estación PEVIMA está señalada con un círculo rojo. Los números corresponden a los metros de distancia con respecto al punto de inicio de la transecta (GIT1-0). Fuente: Google Earth™.



A lo largo de la transecta GIT1 se recolectaron 6 muestras de suelo cuya ubicación se detalla en la Fig. 6 y Apéndice A. En cada sitio se recolectaron cinco réplicas en un radio de 5 m al punto georeferenciado del sitio de muestreo. Los primeros 10 cm de suelo de cada réplica se recolectaron con una espátula estéril, luego las réplicas se mezclaron y cernieron con un tamiz de ojo de malla de 2mm. Finalmente se guardaron en fundas estériles de polietileno (Whirl-Pack) y se las conservó a 0 °C hasta su análisis en el

laboratorio (Fig. 7). Las muestras se etiquetaron con el nombre de la transecta y la distancia del sitio de muestreo con respecto al punto de inicio (i.e. GT1-0). Además se registró la hora, fecha, posición geográfica y temperatura del suelo en los diferentes puntos de muestreo.

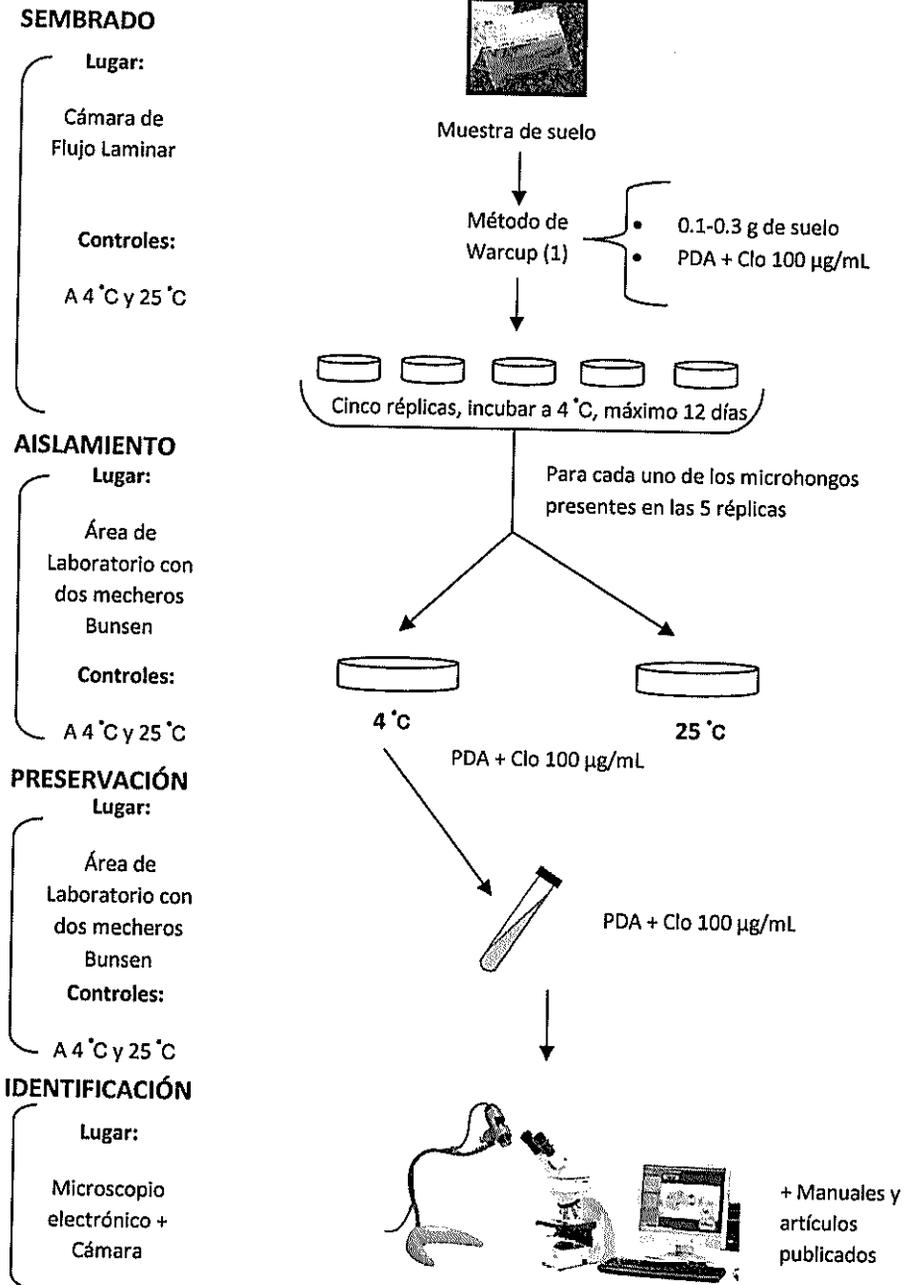
Figura 7. Recolección de las muestras de suelo en Punta Fort William.



3.2 Metodología de Laboratorio

La metodología de laboratorio consistió de cuatro etapas principales: Sembrado, Aislamiento, Preservación de las cepas e Identificación (Fig. 8).

Figura 8. Esquema de la Metodología de Laboratorio.



Adicionalmente, se realizaron 2 muestras controles:

Área no estéril del laboratorio

4 °C

25 °C

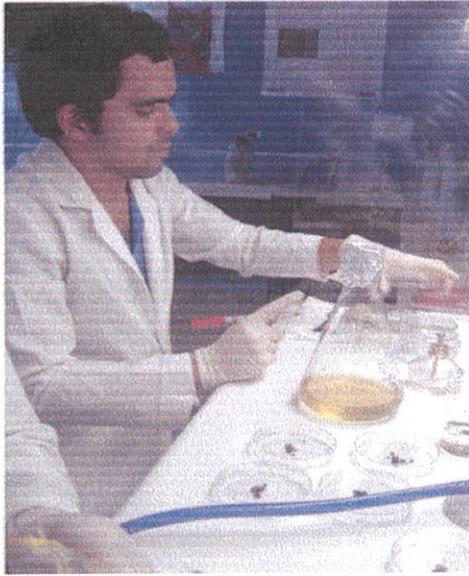
3.2.1 Sembrado

En la cámara de flujo laminar, se realizó el sembrado de las muestras de suelo, utilizando la técnica de Warcup (1). Para lo cual, se pesaron con una balanza analítica aproximadamente 0.1 a 0.3 g de suelo, realizando cinco réplicas por cada una de las muestras. La alícuota de suelo fue colocada dentro de una caja Petri y se le adicionó agar PDA (DIFCO) con una concentración final de cloranfenicol de 100 µg/mL. El cloranfenicol se adicionó después de autoclavar el medio PDA y se utilizó para restringir el crecimiento bacteriano. El suelo se esparció en la caja Petri agitándolo suavemente sobre la superficie de la cámara de flujo para evitar la aglomeración de las colonias de microhongos. Luego, éstas fueron selladas con Parafilm® e incubadas a 4 °C por 7 a 12 días (Fig. 9).

Como control de esterilidad se expuso las cajas Petri con medio PDA más cloranfenicol abiertas en la cámara de flujo laminar para posteriormente incubarlas a 4 °C y 25 °C. Estas muestras control se realizaron durante el sembrado, aislado y preservación

de las cepas. Adicionalmente, dos placas similares de PDA se abrieron al ambiente del laboratorio y fueron incubadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, como controles adicionales de contaminación.

Figura 9. Sembrado de las muestras de suelo.



3.2.2 Aislamiento

En un área del laboratorio previamente desinfectada con alcohol al 98%, y con el uso de dos mecheros Bunsen y de material de protección personal como mascarillas, gafas, guantes y mandil, se procedió a aislar las cepas que crecieron en cada una de las

réplicas. Las muestras de los diferentes microhongos se obtuvieron con una aguja enmangada, para ser cultivadas en medio PDA con cloranfenicol (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), e incubadas a 4 °C y 25 °C, para discriminar entre psicrófilos y psicotrofos, respectivamente (Fig. 10). Cada una de las cepas aisladas fue etiquetada para tener un registro adecuado de su crecimiento.

Figura 10. Aislado de las cepas en el laboratorio.



3.2.3 Preservación de las cepas

Los diferentes microhongos fueron preservados en tubos de ensayo de polietileno con tapa, en medio PDA con cloranfenicol (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a 4 °C. Para lo cual, en un área estéril del laboratorio, se obtuvo con un asa de platino una muestra de cada una de las cepas aisladas, éstas fueron inoculadas en el fondo de los tubos de ensayo, que contenían el medio de cultivo sólido, aproximadamente a unos 45° de inclinación (Fig. 11).

Figura 11. Preservación de las diferentes cepas.



3.2.4 Identificación

Los microhongos fueron identificados al menos a nivel de género, basándose en observaciones al microscopio de la forma, tamaño y tipo de hifas y esporas, así como de las características macroscópicas de la colonia, ayudados de manuales y artículos publicados con claves taxonómicas (58-62). La identificación de los aislados antárticos a nivel de especie es todo un reto por la posibilidad de encontrar cepas que aun no han sido descritas y la discrepancia entre los diversos autores respecto a la clasificación y denominación de los microhongos. Otro punto clave es un entrenamiento exhaustivo del personal científico en la identificación de estas cepas. Además de contar con equipos que permitan tener un mejor contraste de las estructuras microscópicas de los microhongos.

El tiempo para empezar la identificación fue aproximadamente entre los 30 a 40 días después realizar el aislado, debido a que, mayormente antes de este período solo se observaron hifas. Las estructuras sexuales (esporas y ascos) se observaron cuando las

colonias tenían un diámetro de entre 5 y 7 cm. Estas estructuras morfológicas son un elemento clave en la identificación de estos microorganismos.

En las observaciones al microscopio se usó una cámara Motic 480 y el programa Motic Imagine Plus 2.0, lo que nos permitió tomar fotografías y medir las estructuras morfológicas de los microhongos. Para el montaje de las muestras a observarse al microscopio, se utilizaron dos técnicas: una para observación directa agregando lugol y otra para preservar el montaje por un tiempo más prolongado.

3.2.4.1 Observación directa

En un portaobjetos se colocó una gota de lugol al 40%, luego, con un asa de platino, se tomó la muestra del microhongo y se la esparció suavemente sobre el colorante. Se colocó el cubreobjeto y se observó al

microscopio. El lugol resalta las paredes celulares de los microhongos, permitiendo obtener un mejor contraste de sus estructuras para su identificación (63).

3.2.4.2 Preservación del montaje

Para preservar los montajes de los microhongos, al menos unas tres semanas, se utilizó una solución Butterfield (59,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), a base de fosfato de potasio dihidrogenado y que se preparó de la siguiente manera: para la solución stock (85 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se mezcló 34 g del fosfato (KH_2PO_4) en 500 mL de agua destilada, a continuación se tomó una alícuota de 1,25 mL de esta solución y se la disolvió en 1 L de agua destilada, luego se autoclavó a 120 °C por 15 minutos. Finalmente, se agregó glicerol a razón de un 30%, con respecto a la solución Butterfield usada. (64).

Para el montaje de los microhongos en la solución Butterfield se procedió igual que en la observación directa, pero luego de colocar el cubreobjeto se selló con esmalte para evitar la deshidratación del montaje.

CAPITULO 4

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los resultados y discusiones vertidos a continuación corresponden tanto al trabajo de campo como de laboratorio. Al final, se exponen datos relevantes con respecto al aislamiento e identificación de los microhongos terrestres analizados.

4.1 Análisis de Muestras de Suelo

Seis muestras de suelo se recolectaron y conservaron a 0 °C, hasta su posterior análisis en el laboratorio. Se tomaron algunos datos de campo, como posición geográfica, temperatura del suelo, y aspectos relevantes del sitio (e.g. presencia de rocas, vegetación, etc) (Tabla I).

Tabla I. Datos de los sitios de muestreo en Punta Fort William, Isla Greenwich.

MUESTRAS DE SUELO	LATITUD	LONGITUD	SUELO T °C	ASPECTOS DESTACADOS DEL SITIO DE MUESTREO
GIT1-0	S 62°26'56.2"	O 59°43'35.0"	13,6	Unos metros cerca a la playa, con presencia de huesos de ballena en descomposición
GIT1-205	S 62°27'00.54"	O 59°44'01.33"	10,4	Plantas vasculares en los alrededores
GIT1-500	S 62°27'01.3"	O 59°44'09.1"	12,5	Plantas vasculares en los alrededores
GIT1-700	S 62°27'04.6"	O 59°44'20.7"	5,7	Presencia escasa de plantas
GIT1-800	S 62°27'07.2"	O 59°44'75.3"	14,6	Plantas vasculares en los alrededores
GIT1-972.5	S 62°27'09.5"	O 59°44'33.1"	6,2	Cerca a la base del glaciar, presencia de algas verdes

* GI= Isla Greenwich, los números corresponden a los metros de distancia con respecto al punto inicial de la transecta (GIT1-0), donde se recolectó la muestra de suelo.

La longitud total de la Transecta 1 fue de 0,97 km, la cual se proyectó a través del sector Punta Fort William. La transecta se inició cerca de la playa en un área con presencia de huesos de ballena en descomposición, luego atravesó un lago, y a unos cuantos metros más se encontró el río Culebra, cuya vertiente en verano propicia el crecimiento de musgo, en especial en las zonas bajas (65-67). A continuación se encontró un área plana repleta de piedras, y finalmente la transecta terminó en la base del Glaciar Quito (Fig. 6 y 12).

Figura 12. Vista panorámica del sitio de muestreo.

La transecta 1 esta superpuesta con una línea de color rojo.

Foto: Dr. Hii, de la Universidad de Malasia, 2008.



La temperatura del suelo de los primeros 10 cm se midió durante todo el periodo de muestreo, del 1 al 4 de febrero, en diferentes puntos dentro de la Isla Greenwich que incluyeron los seis sitios analizados en la presente tesis. La época de muestreo correspondió al verano antártico del 2008, periodo relativamente corto, que empieza a finales de diciembre y se extiende hasta marzo. Siendo la temperatura media del suelo 7,92 °C, con una desviación estándar de 3,33 (Tabla II y Apéndice A).

Tabla II. Temperatura del suelo durante el periodo de muestreo en el verano antártico 2008.

Descripción	Datos
Media	7,92 °C
Mediana	7,30
Desviación Estándar	3,33
Temperatura Mínima	1,90 °C
Temperatura Máxima	14,60 °C

4.2 Análisis del trabajo de laboratorio

En el análisis de las muestras de suelo se siguió la metodología establecida en el megaproyecto "Diversidad Microbiana alrededor de la Estación PEVIMA, Antártida: Distribución, Abundancia y Fisiología de hongos, algas, bacterias y cianobacterias", descrito por la Dra. Siti Aisyah, líder del subproyecto "Biodiversidad y Bioactividad de Hongos Antárticos".

Durante la etapa de sembrado inicial se obtuvieron diferentes densidades de colonias en las diferentes muestras. El rango de colonias totales entre las 5 réplicas de cada muestra varió de 9 a 96. Siendo la muestra GIT1-700 las más abundante y la GIT1-972.5 la menos abundante. (Fig. 13 y Tabla III).

Figura 13. Número de colonias fúngicas por réplica durante el sembrado inicial de los microhongos de las seis muestras de suelo de la Transecta 1.

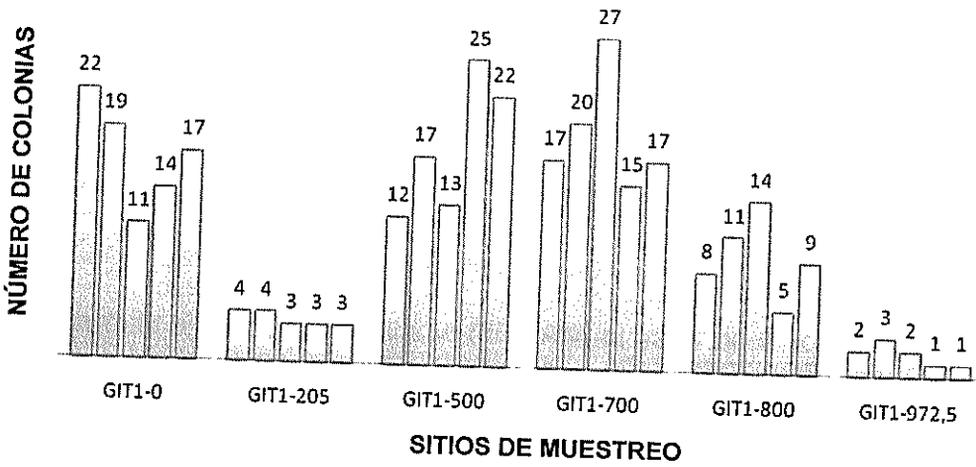


Tabla III. Número de colonias por muestra de suelo durante el sembrado.

Muestra de suelo	Total de colonias por muestra	Promedio de colonias por réplica	Desviación Estándar	Rango de colonias por muestra
GIT1-0	83	16,6	4,3	22-11
GIT1-205	17	3,4	0,5	4-3
GIT1-500	89	17,8	5,6	25-12
GIT1-700	96	19,2	4,7	27-15
GIT1-800	47	9,4	3,4	14-5
GIT1-972.5	9	1,8	0,8	3-1

A pesar de que se obtuvieron muchas colonias fúngicas en el sembrado inicial de los suelos antárticos, no siempre se pudo obtener crecimiento cuando las colonias se cultivaron en forma aislada, ya sea a 4 °C ó 25 °C. Se atribuye este hecho al sinergismo y/o propiedades bioquímicas del medio PDA utilizado. El sinergismo biológico permite a dos clases de organismos complementar sus requerimientos nutricionales o que uno de ellos acondicione el medio circundante para permitir a otros desarrollarse (68). Así, al tratar de crecer las colonias de microhongos en forma aislada, alguna de ellas no pudieron desarrollarse. De igual manera, el desconocimiento de los requerimientos nutricionales y ambientales específicos de los microhongos antárticos, así como sus relaciones sintróficas, dificultan la obtención de cultivos axénicos (69-71).

A continuación se muestran datos cuantitativos de las colonias fúngicas obtenidas en los 6 sitios de muestreo. El total de microhongos aislados, contando todas las muestras con sus réplicas, fue de 269 aislados. El porcentaje de cepas obtenidas de cada sitio de muestreo varió entre 49% a 100% (Tabla IV). No se pudo encontrar una correlación aparente entre la densidad de colonias fúngicas obtenidas del sembrado inicial de cada sitio muestreado y parámetros como temperatura del suelo, presencia de vegetación, humedad o textura

de suelo (Apéndice B). Estudios posteriores a nivel de ecosistema serán necesarios para explicar las diferentes densidades fúngicas encontradas en cada sitio de muestreo.

Tabla IV. Microhongos obtenidos en etapas de sembrado y aislado.

Muestra de suelo	Total colonias en sembrado inicial	Total cepas aisladas	% de cepas obtenidas
GIT1-0	83	83	100
GIT1-205	17	16	94
GIT1-500	89	53	60
GIT1-700	96	86	90
GIT1-800	47	23	49
GIT1-972.5	9	8	89
TOTAL	341	269	79

Las cepas fúngicas se preservaron en tubos de polietileno con medio inclinado de PDA, suplementado con cloranfenicol (100 µg/ml). La colección de microhongos servirá para establecer una línea base de biodiversidad microbiana antártica y para estudios aplicados de bioactividad.

Es interesante mencionar que para aquellos controles donde el medio PDA más cloranfenicol se expuso al ambiente del laboratorio, y que fueron incubados a 4 °C por más de 12 días, periodo correspondiente al tiempo que se trató las muestras, no se observó una contaminación evidente, en comparación con aquellos que recibieron el mismo tratamiento pero que fueron incubados a temperatura ambiente. Estos últimos controles presentaron, como era de esperarse, numerosas colonias de microorganismos (Fig. 14). Estas observaciones nos dan la seguridad de que los microhongos, procedentes de las muestras de suelo que crecieron incubados a 4 °C, son microorganismos muy bien adaptados a desarrollarse en ambientes fríos, como lo es la Antártida y de que no son producto de contaminación en el laboratorio. Mientras que, para aquellos controles donde se expuso el medio PDA más cloranfenicol abiertos en la cámara de flujo laminar, para posteriormente incubarlos a 4 °C y 25 °C, no se registró crecimiento de microorganismos. Estos controles confirman un óptimo funcionamiento del equipo y una correcta aplicación de la técnica.

Durante la ejecución de la metodología de laboratorio se identificaron algunos puntos claves para la optimización y éxito de los resultados. Esta tesis constituye el primer estudio ecuatoriano sobre las comunidades de microhongos terrestres presentes en Punta Fort

William; y aun cuando, se siguió la metodología establecida en el megaproyecto "Diversidad Microbiana alrededor de la Estación PEVIMA, Antártida: Distribución, Abundancia y Fisiología de hongos, algas, bacterias y cianobacterias", es necesario identificar a través de la experiencia práctica los puntos más vulnerables y las posibles mejoras.

Así, resulta sumamente importante establecer el mejor momento de realizar el aislamiento, el cual dependerá especialmente de dos factores: evitar que los microhongos se sobrepongan unos con otros y esperar a que estos sobresalgan un poco hacia la superficie del medio PDA. Para evitar la sobreposición de colonias es importante restringir el tiempo de espera para realizar el aislado. Siendo así que, mientras más tiempo se espere, mayor es la probabilidad de que finalmente terminen creciendo unos sobre otros. Esto dificulta mucho la obtención de cepas puras. Pero de igual manera, si se acorta demasiado el tiempo de crecimiento, la obtención de una muestra representativa para establecer la cepa fúngica se vuelve impracticable. Por lo tanto, se recomienda que se realicen observaciones diarias de las réplicas a partir del 4^{to} al 5^{to} día después de haber realizado la siembra inicial, que es cuando se puede observar pequeñas hifas que contrastan contra la luz.

Los microhongos que crecieron en las muestras de suelo sembradas, se aislaron a partir del 7^{mo} al 12^{vo} día, tomando en cuenta los factores arriba mencionados. Así, aún cuando la muestra GIT1-700, resultó tener una gran cantidad de colonias fúngicas, estas no se encontraban sobrepuestas al 11^{vo} día cuando fueron aisladas, a diferencia de las muestras GIT1-500 y GIT1-800 que tuvieron que ser aisladas al 7^{mo} día (Fig. 15, Tabla V).

Figura 14. Muestras control expuestas al ambiente del laboratorio e incubadas a 25 °C y 4 °C.

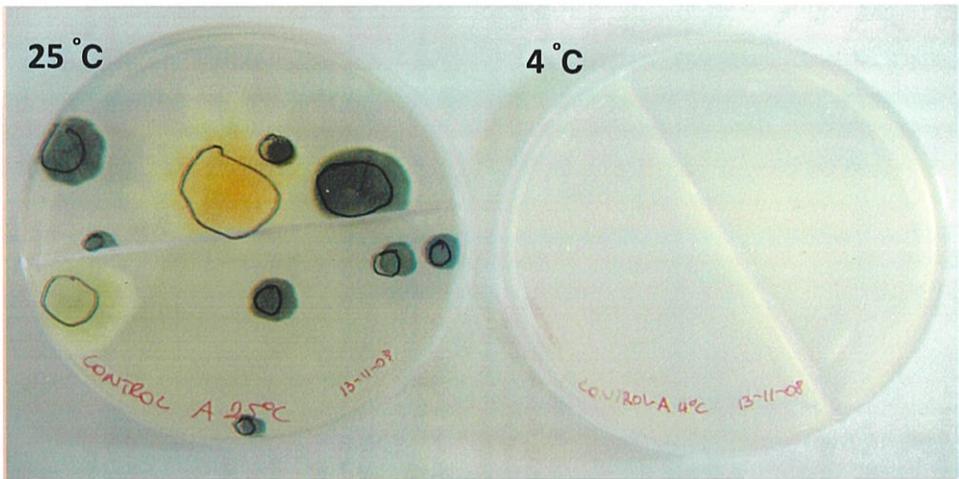
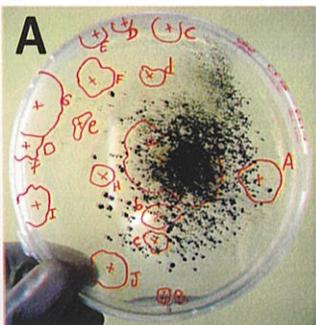


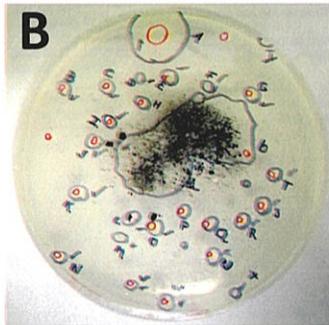
Figura 15. Ejemplos de diferentes niveles de densidad fúngica obtenidas durante el sembrado inicial de las muestras de suelo.

A. GIT1-800, alta densidad de colonias fúngicas con bordes sobrepuestos. Para evitar sobreposición de colonias, el aislamiento fúngico se realizó en 7 días post-sembrado. **B.** GIT1-700, alta densidad de colonias fúngicas sin bordes sobrepuestos, lo que permitió el aislamiento de colonias después de un periodo de incubación inicial de 11 días. **C.** GIT1-972.5, la baja densidad de colonias fúngicas permitió incrementar el periodo de incubación hasta 12 días para obtener suficiente material fúngico para el aislado.



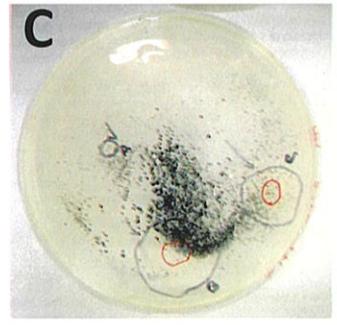
GIT1-800

7 días



GIT1-700

11 días



GIT1-972.5

12 días

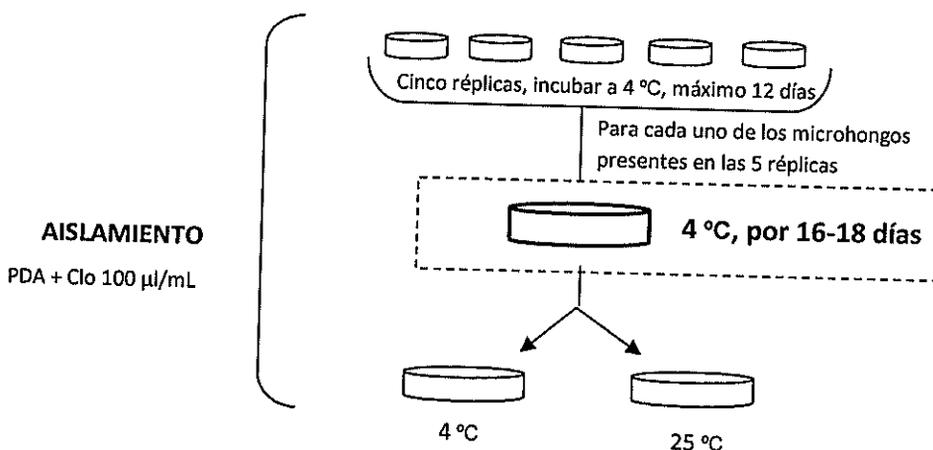
Días transcurridos entre siembra inicial y aislamiento

Tabla V. Fechas de siembra y aislado para las diferentes muestras de suelo.

Sitio de Muestreo	Fecha Siembra (dd/mm/aa)	Fecha Aislado (dd/mm/aa)	Días Transcurridos
GIT1-0	06/11/08	14/11/08	8
GIT1-205	06/11/08	17/11/08	11
GIT1-500	06/11/08	13/11/08	7
GIT1-700	06/11/08	17/11/08	11
GIT1-800	06/11/08	13/11/08	7
GIT1-972.5	06/11/08	18/11/08	12

Además, durante la etapa de aislamiento se sugiere modificar ligeramente la metodología para facilitar el aislamiento de cepas. En un principio, se estableció tomar dos muestras de cada cepa fúngica obtenida en el sembrado inicial (una para incubarla a 4 °C y otra a 25 °C), pero se encontró que sería aconsejable hacerlo primeramente solo a 4 °C. Esta necesidad es evidente, especialmente cuando dos microhongos crecen juntos corriendo el riesgo de no aislar la misma colonia a las dos temperaturas propuestas. Con nuestra sugerencia, al crecer la colonia aislada a 4 °C (mínimo durante 16 a 18 días), nos daría la facilidad de poder tomar dos muestras representativas, con certeza de la misma cepa fúngica, e incubarlas a 4 °C y 25 °C (Fig. 16).

Figura 16. Modificación de la etapa de aislamiento para optimización de la metodología.



*La modificación se señala con líneas entrecortadas (ver Fig. 8).

4.3 Identificación de Microhongos

Un total de 269 aislados se obtuvieron de las seis muestras de suelo, agrupados en 6 géneros: *Antarctomyces*, *Thelebolus*, *Geomyces*, *Mucor*, *Cladosporium*, y *Mrakia*, que a su vez se resumen en 5 familias: Thelebolaceae, Myxotrichaceae, Mycosphaerellaceae, Mucoraceae, y Cystofilobasidiaceae. Solo un aislado no pudo ser identificado, pero se la vinculó al grupo de microhongos imperfectos, por no presentar esporas sexuales.

4.3.1 Familia: Thelebolaceae, Eckblad, 1968.

Pertenece al Phylum Ascomycota, el más amplio en número de especies del reino Mycota, se incluyen alrededor de 28000 especies excluyendo a los líquenes (72). Los miembros que pertenecen a la familia Thelebolaceae poseen una característica común, la presencia de una estructura reproductora denominada asco, que comúnmente contiene 8 ascosporas (73).

4.3.1.1 Género: *Antarctomyces*

La principal característica de este género es que sus ascos son desnudos, es decir no se encuentran englobados dentro estructuras protectoras, y en ocasiones se unen en grupos de 2 o 4 ascos, son de apariencia globosa y surgen directamente de una hifa, presentando usualmente 8 ascosporas (Fig. 17) (74, 76).

Los resultados obtenidos en el laboratorio, demostraron que la cepa en un inicio es blanca, luego, alrededor de 30 días de ser aislada, toma una tonalidad azul y finalmente a los 70 días, se vuelve crema (Fig. 18).

Durante nuestro análisis se identificaron dos variantes, una denominada *Antarctomyces* sp1, que se caracteriza por un asco elipsoidal (Fig. 19), mientras que en *Antarctomyces* sp2, era más bien redondo (Fig. 20). El largo promedio de las ascosporas fue de 6 μm y 5,75 μm respectivamente, éstas tienen forma elipsoidal y presentan una pared simple, es decir no se observó estructuras adicionales a la capa externa.

Figura 17. *Antarctomyces* sp.

Comparación representativa del género. Ascus que contienen ascosporas (flechas). Fuente: Aisyah, S. (76)

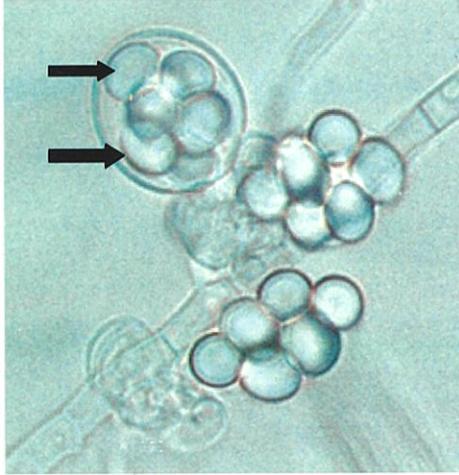


Figura 18. *Antarctomyces* en medio PDA a 4 °C.

Cambios en la coloración: **A.** alrededor de los 30 días (azulada) y **B.** 70 días de ser aislada (crema).

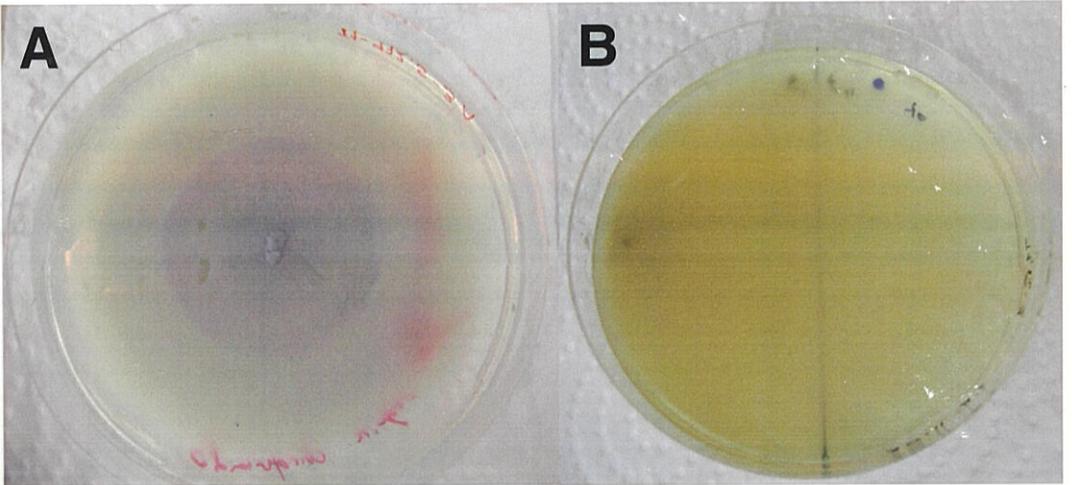


Figura 19. *Antarctomyces* sp1.

A. Ascos de apariencia elipsoidal y **B.** Ascosporas, vistos a 100x.

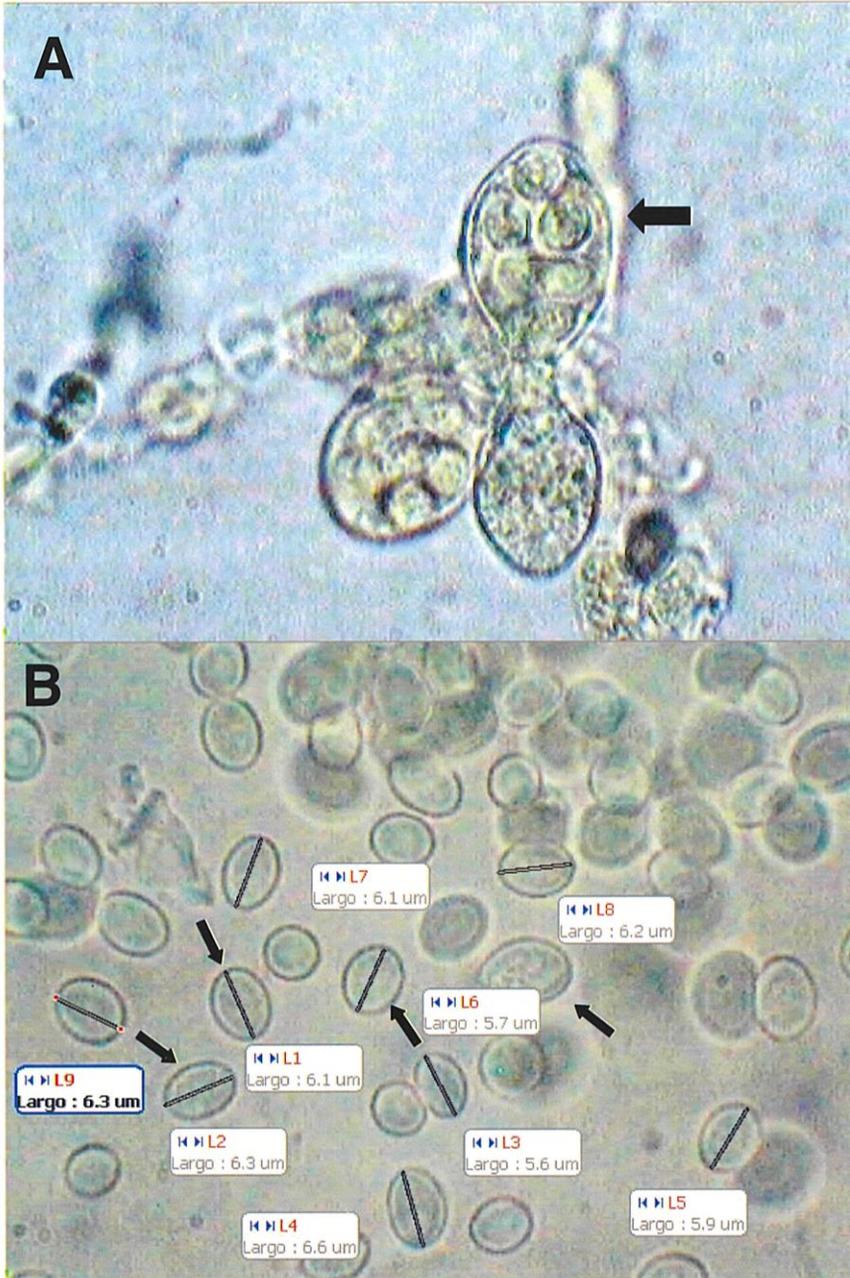
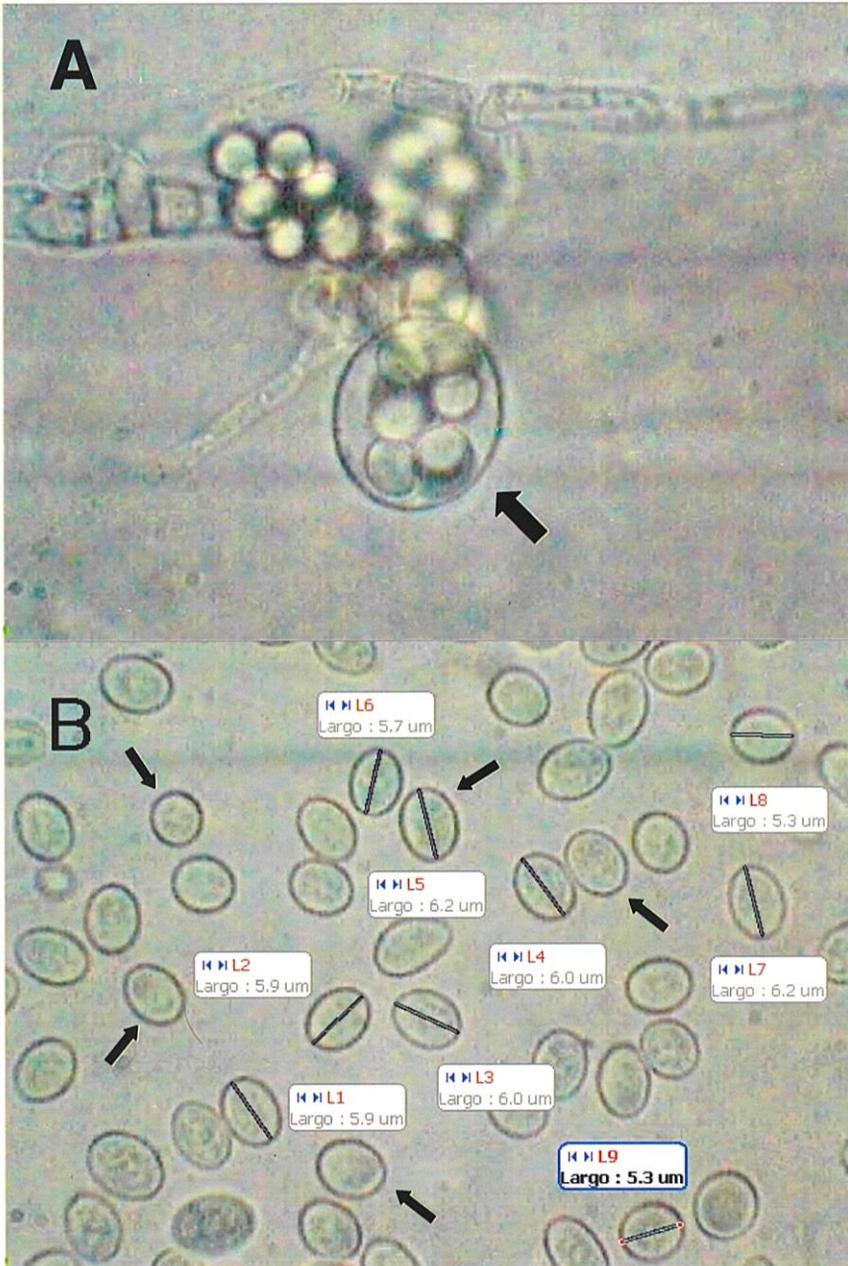


Figura 20. *Antarctomyces* sp2.

A. Asco de apariencia redonda y **B.** Ascosporas, vistos a 100x.



Esta cepa no presentó crecimiento a 25 °C, por lo que se la podría considerar un microorganismo psicrófilo, esto coincide con los reportes de Stchigel *et al.* (74) y Hoog *et al.* (77). Este género se sugiere que es endémico de la Antártida, fue aislado y descrito inicialmente por Stchigel *et al.* (74) de muestras de suelo obtenidas de la Isla Windmill. También ha sido aislado de muestras de suelo de la Isla Rey Jorge, del archipiélago Shetland del Sur (75).

4.3.1.2 Género: *Thelebolus*

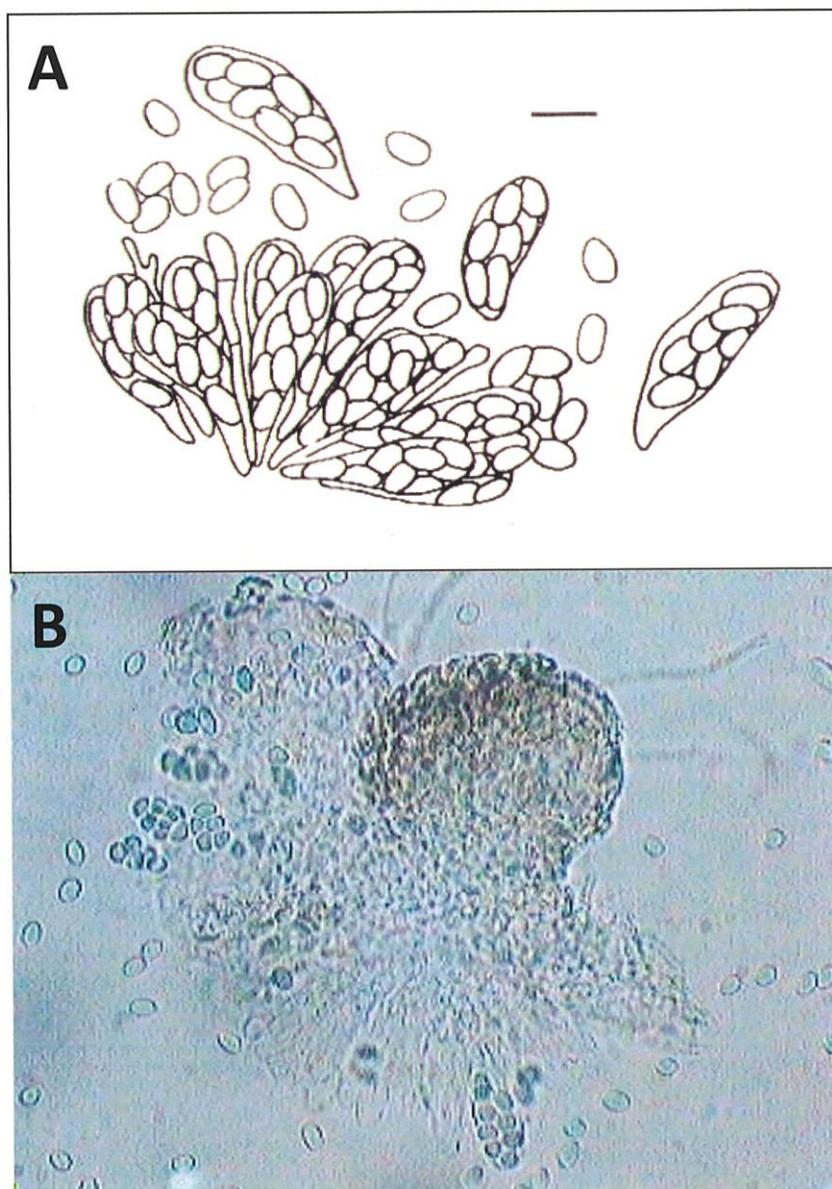
Este género desarrolla un ascoma pequeño, el cual representa el cuerpo fructífero donde alrededor de 80 ascos se encuentran adheridos, estos presentan un anillo apical por donde liberan a las ascosporas. Los ascomas suelen contener más de 2000 ascosporas de forma elipsoidal (79).

La especie *Thelebolus microsporus* (Berk. & Broome) Kimbr. 1967, que fue identificada en el presente trabajo de tesis, presentó ascomas abiertos y cerrados, que contenían ascosporas de un largo promedio de 6,18 μm (Fig. 21), éstas características coinciden por las descritas por Kimbrough (78) y Kimbrough & Korf. (79) para esta especie.

La coloración que presentó la cepa a los 30 días era crema, en ocasiones la presencia del cuerpo fructífero era bastante evidente, representado por una coloración café, concentrada principalmente en el centro de la colonia (Fig. 22). Esta especie ha sido aislada de muestras de suelo, agua, plumas y guano de aves marinas, así como del pelaje de mamíferos marinos del territorio Antártico (52, 80, 81).

Figura 21. *T. microsporus* (Berk. & Broome) Kimbr. 1967.

- A.** Dibujo de *T. microsporus* (Bar= 10 μ m) Fuente: Onofri, S. (56).
B. Ascoma, visto a 40x. **C.** Ascos y **D.** Ascosporas, vistos a 100x.



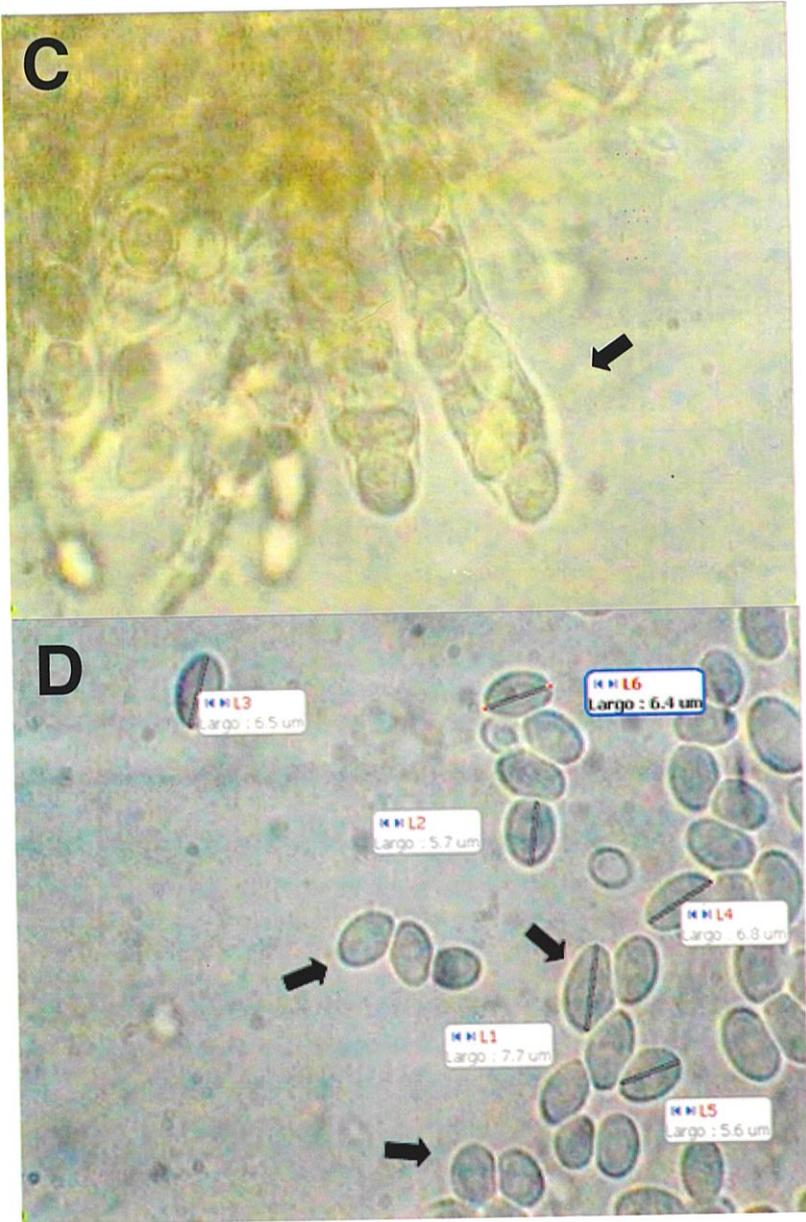


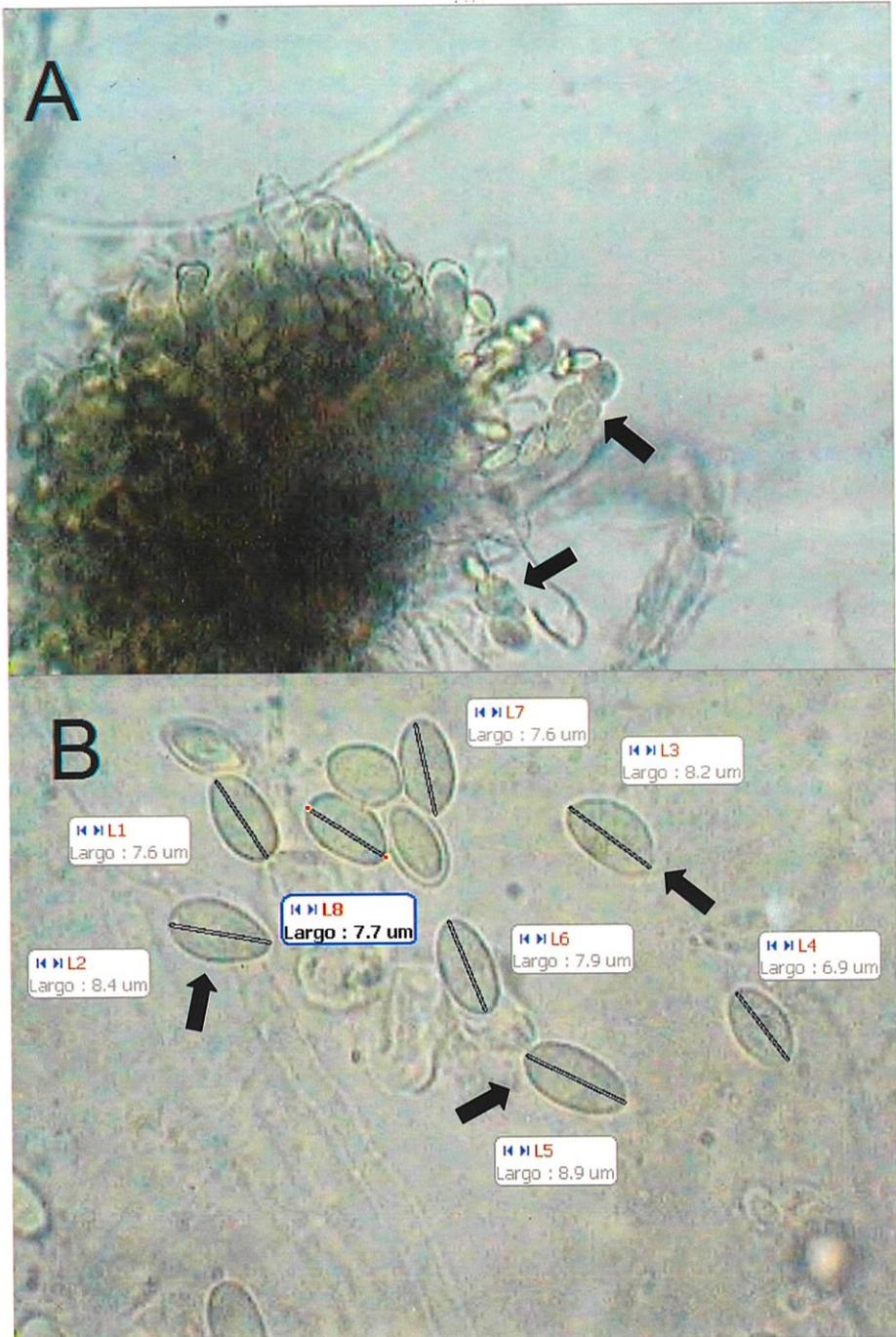
Figura 22. *T. microsporus*, en medio PDA a 4 °C.

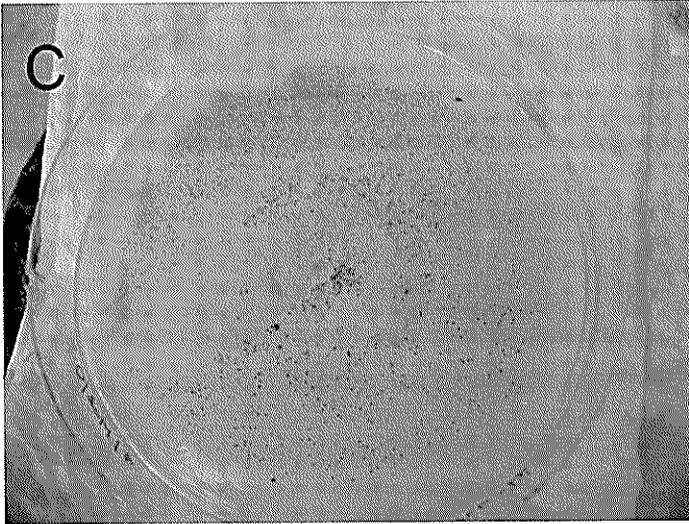


Para un grupo de aislados se encontró que las estructuras microscópicas de sus ascomas eran bastante similares a los de *T. microsporus*, no obstante las características morfológicas de la colonia eran muy diferentes. A este grupo se lo denominó *Thelebolus* sp1, pero a diferencia de *T. microsporus*, éste presentó una coloración más clara, la presencia del cuerpo fructífero se evidenciaba alrededor de los 48 días, eran unos pequeños puntos cafés distribuidos por toda la colonia, de consistencia dura, que al presionarlos expulsan los ascos. De igual manera, las ascosporas eran elipsoidales y se encontraban en números de 8, aunque el largo promedio fue mayor de 8,12 μm . Después de unos 60 días luego de ser aisladas se desarrollaban escasas estructuras algodonosas (Fig. 23).

Figura 23. *Thelebolus* sp1.

A. Ascoma (estructura oscura) y ascos (flechas), vistos a 40x. **B.** Ascosporas, vistas a 100x. **C.** Cepa en medio PDA a 4 °C.

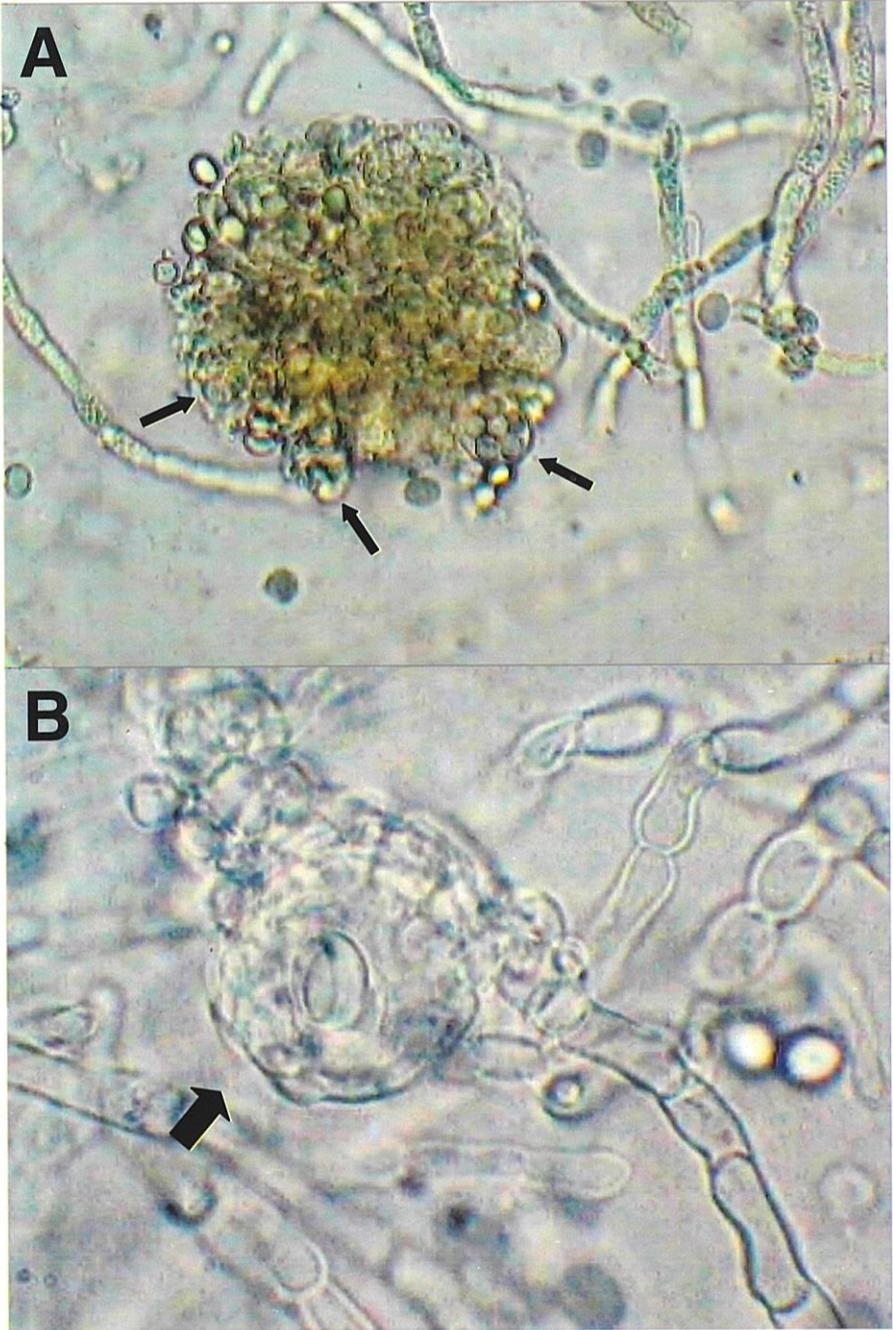


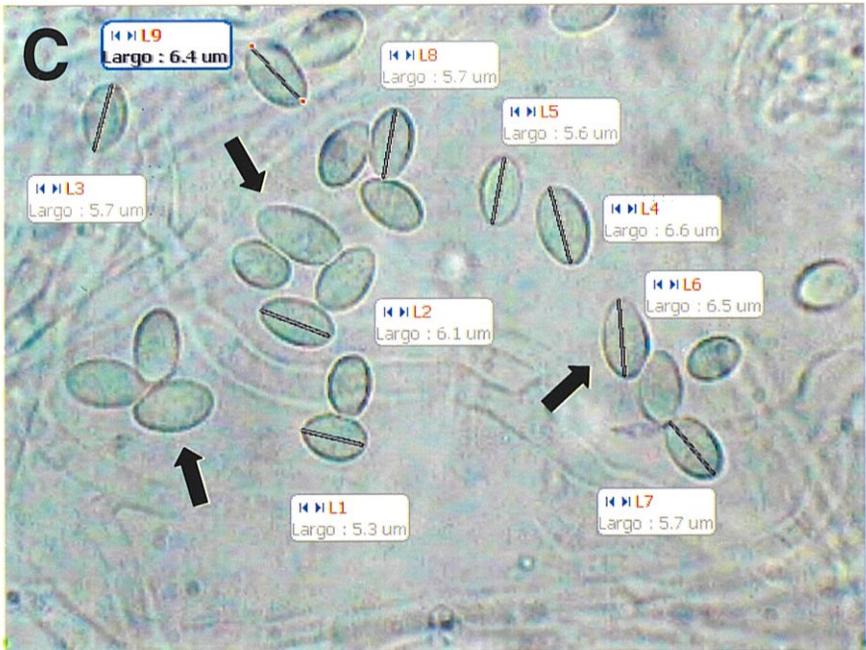


Finalmente, a otro grupo de aislados se los denominó *Thelebolus* sp2. A los 50 días aproximadamente, luego de su aislamiento, este microhongo presentó ascomas de forma circular, que contenían numerosos ascos algo redondos, con presencia de 6 a 8 ascosporas elipsoidales en su interior, características íntimamente relacionadas a este género (73, 77-79). Sin embargo, pasados los 70 días, los ascos ya no pudieron ser observados, en su lugar se encontraban numerosas ascosporas agrupadas. En ambas etapas se identificaron estructuras somáticas denominadas prosénquimas, que son un conjunto de hifas entrelazadas que se asemejan a un tejido. (Fig. 24)

Figura 24. *Thelebolus* sp2.

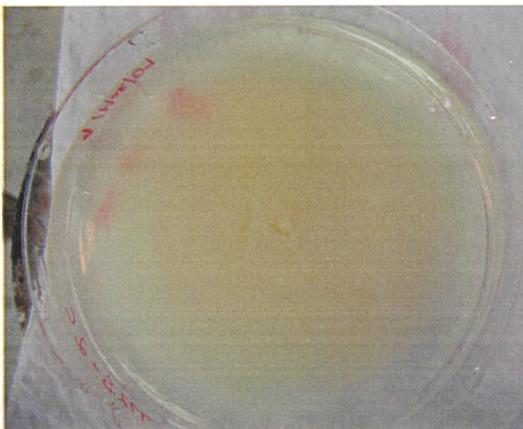
A. Ascoma y ascos (flechas), vistos a 40x. **B.** Prosénquima y **C.** Ascosporas vistas a 100x.





El largo promedio para estas ascosporas fue de 5,94 μm , tan solo una de las tres muestras relacionadas con *Thelebolus* sp2, presentó una coloración rojiza, las otras dos eran blancas (Fig.25).

Figura 25. *Thelebolus* sp2 en medio PDA a 4 °C.



Ninguno de los aislados agrupados en el género *Thelebolus* presentaron crecimiento a 25 °C, lo que coincide con lo establecido por Wicklow & Malloch (73) y Hoog *et al.* (77).

4.3.2 Familia: Myxotrichaceae, Currah (1985)

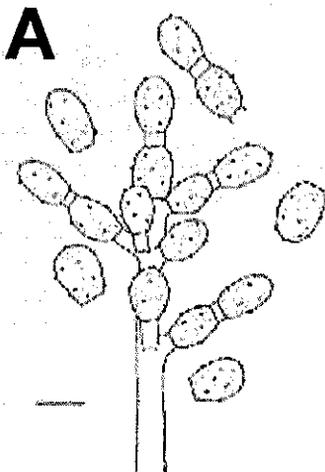
Pertenece al Phylum Ascomycota, esta familia se caracteriza por la morfología filamentosa de sus miembros, ya que estos desarrollan colonias pulverulentas, con presencia de hifas septadas o no (82). Además algunos de sus miembros forman parte del grupo de hongos imperfectos o mitospóricos, denominados así porque se desconoce su fase de reproducción sexual. Éstos se reproducen exclusivamente por conidios, que son las esporas asexuadas externas (83, 84).

4.3.2.1 Género: *Geomyces*

Este género se caracteriza por presentar conidióforos, que son la parte del micelio que sostiene y origina a las conidias, de tipo ramificado con artroconidias unicelulares, mayoritariamente con paredes finamente rugosas, pero también con paredes lisas, globosas u ovoides, con forma de clava o con forma de tonel, de base truncada (Fig. 26) (85).

Figura 26. *Geomyces* sp.

A. Dibujo de *G. pannorum* var. *pannorum*. (Bar= 5 μ m) Fuente: Onofri, S. (56). **B.** Conidióforo y **C.** Artroconidias, vistos a 100x.



B**KHL1**
Largo : 3.2 um**KHL2**
Largo : 3.2 um**KHL3**
Largo : 3.2 um**C****KHL1**
Largo : 3.7 um**KHL7**
Largo : 3.3 um**KHL9**
Largo : 3.1 um**KHL2**
Largo : 3.3 um**KHL3**
Largo : 3.4 um**KHL6**
Largo : 3.7 um**KHL8**
Largo : 2.9 um**KHL4**
Largo : 3.5 um**KHL5**
Largo : 2.9 um

La base de la colonia presentó una coloración anaranjada a café oscura, y la zona fértil se extendía sobre toda la superficie de la colonia, con color grisáceo y exudado presente en gotas castaño claro (Fig. 27). Características similares a un reporte previo de la morfología de este género (86). Además se encontró que el largo promedio de las artroconidias fue de 3,39 μm .

Este género ha sido aislado de muestras de suelo, plumas y guano de aves, musgos, algas y líquenes, presentes en distintas regiones de la Antártida (17, 52, 87). Debido a la amplia distribución y abundancia de las especies relacionadas al género *Geomyces*, se ha sugerido que se trata de microhongos propios de Antártida, con un papel importante en el ciclo de nutrientes (80).

Nuestros resultados demostraron que este tipo de ascomiceto logró crecer a 25 °C (Fig. 28), aunque su crecimiento es mucho más lento, por lo que se lo puede catalogar como psicotrofo, lo que coincide con lo encontrado por Solveig *et al* (88).

Figura 27. *Geomyces* sp. en medio PDA a 4 °C.

A. Vista superficial de la colonia y **B.** Vista posterior o base de la colonia.

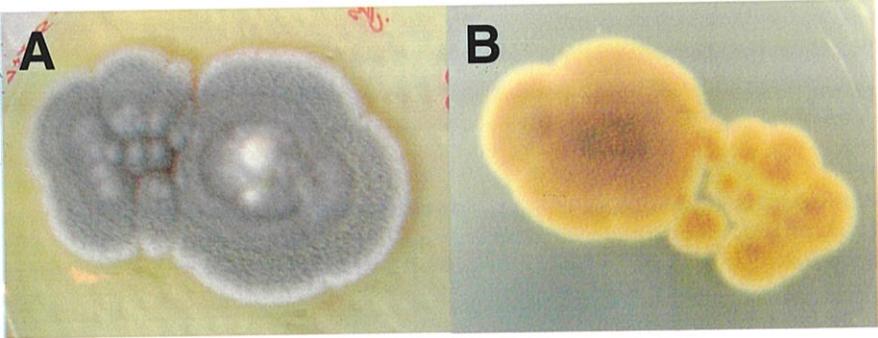


Figura 28. *Geomyces* sp en medio PDA a 25 °C.



4.3.3 Familia: Mycosphaerellaceae Lindau, 1897

Esta familia pertenece al Phylum Ascomycota, agrupa alrededor de 107 géneros, incluyendo a *Cladosporium*, uno de los más numerosos con al menos 431 especies. La mayoría de ellas se

trata de hongos anamorfos filamentosos (89, 90), mientras que otros son teleomorfos, y se los relaciona dentro de una nueva familia denominada Davidiellaceae. Por otro lado, Zalar *et al.* (65) basándose en estudios realizados en el rRNA de algunas especies del género *Cladosporium* incluyendo a *Cladosporium sphaerospermum*, sugiere que éstas deberían ser incluidas dentro de la familia Davidiellaceae (65).

4.3.3.1 Género: *Cladosporium*

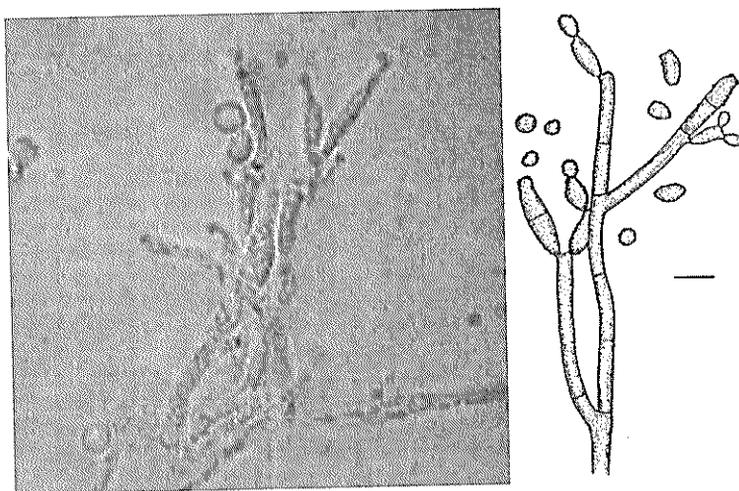
Este género se encuentra ampliamente distribuido alrededor del mundo, sus miembros se encuentran presentes principalmente en el aire, aunque también se los encuentra en muestras de suelo y como parásitos de ciertas plantas. Ellos crecen fácilmente sobre superficies de ambientes húmedos (66, 67). Generalmente producen colonias verde oliva a café oscura (91).

Dentro de los microhongos analizados se identificó a *C. sphaerospermum* Penz. 1882, una cepa anamorfa, filamentosa y con hifas septadas de morfología ramificada. Además, presentan conidióforos ramificados, con conodias de un largo entre 3-4 μm (Fig. 29) (65, 91).

El microhongo aislado presentaba una colonia de forma circular, de tonalidad verde. Esta especie ha sido aislada del musgo *Bryum pseudotriquetrum*, del aire y de sedimentos de lagunas de agua dulce en Antártida (51, 92, 93). También presentó crecimiento a 25 °C, esto coincide por lo encontrado por Zalar *et al.* (65).

Figura 29. *C. sphaerospermum* Penz. 1882.

A. Conidióforos, vistos a 100x. **B.** Dibujo de *C. sphaerospermum* (Bar=10 μm) Fuente: Onofri, S. (56).



4.3.4 Familia: Mucoraceae

Pertenece al Phylum Zygomycota, a la Clase Zygomycete, la cual comprende unas 900 especies, entre las cuales se incluye a la familia Mucoraceae, que se caracteriza por la presencia de esporangios, una estructura globosa con una membrana peridial simple, generalmente en el extremo de un esporangióforo, que contiene numerosos esporangiosporas, que se desarrolla en los extremos de largas hifas no septadas sobre la colonia (72).

4.3.4.1 Género: *Mucor*

Forman delicados filamentos tubulares y esporangios esféricos, con presencia de numerosas angiosporas (84). Se detectaron tres variantes, aunque no se pudo identificarlas a nivel de especie. Todas las cepas eran de color blanco, en un inicio con crecimiento irregular plano

que se restringía exclusivamente a la superficie del medio de cultivo, formando un tapiz. A partir de los 30 días de ser aisladas comenzaron a desarrollar hifas que se extendían hacia la tapa de la caja Petri, llegando incluso a cubrirla totalmente, a partir de este tipo de "cabello" blanco se realizó la identificación, ya que en éstas estructuras se desarrollan los esporangios, utilizados para su clasificación (Fig. 30).

Mucor sp1 se caracteriza por la presencia de hifas no septadas y con esporangios redondos, que contienen numerosas angioesporas, cuyo diámetro promedio fue de 3,26 μm . *Mucor* sp2 contiene conodiosporangios, que son esporangios que han sido liberados prematuramente, donde no se detectó ningún tipo de espora, sin embargo la naturaleza no septada de las hifas fue evidente. *Mucor* sp3 presentó esporangióforos e hifas no septadas (Fig. 31).

Figura 30. *Mucor* en medio PDA a 4 °C.

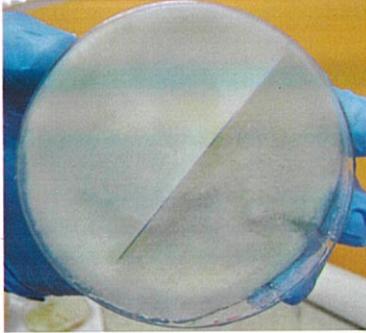
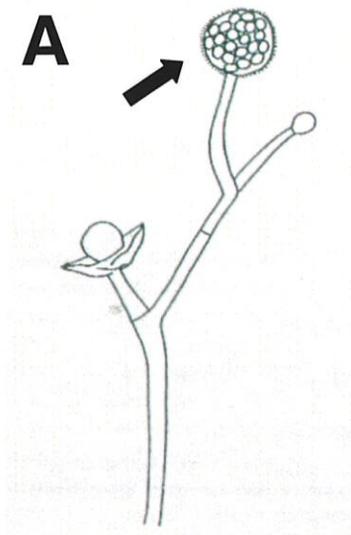
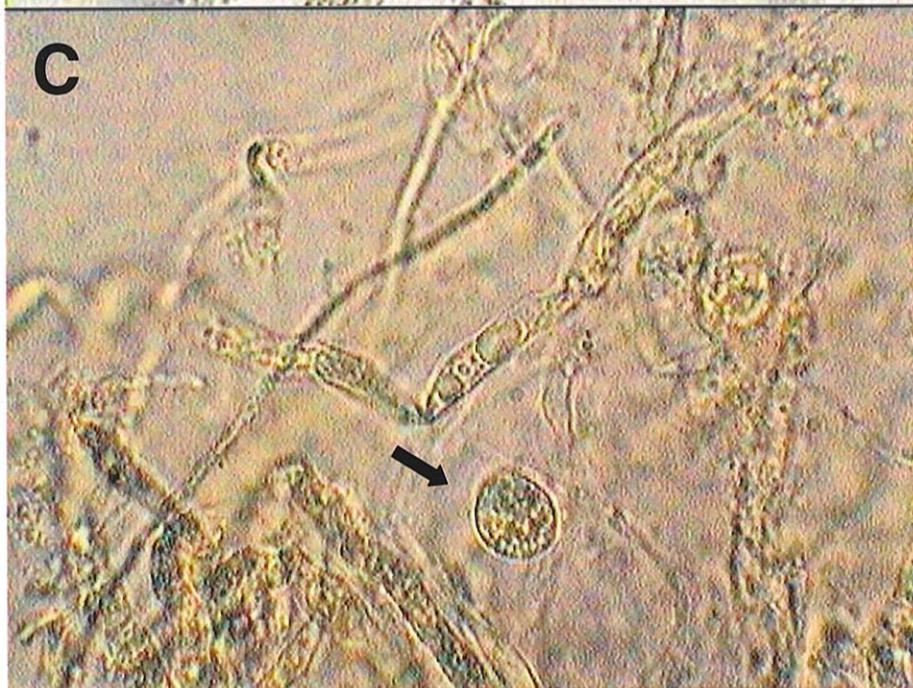
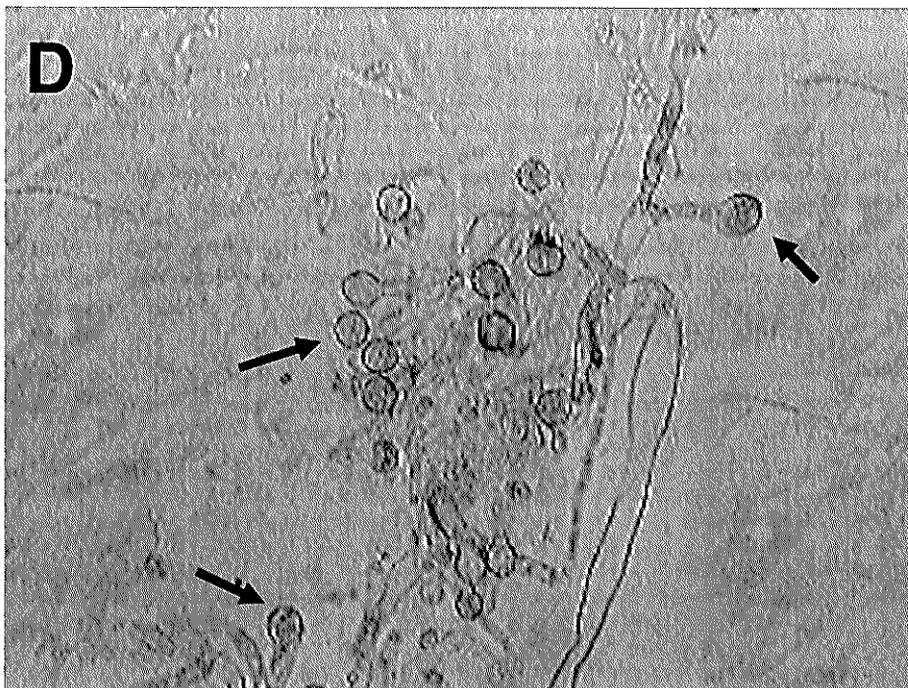


Figura 31. *Mucor* y sus variantes.

- A.** *M. circinelloides* f. *circinelloides*, la flecha señala el esporangio.
B. *Mucor* sp1. La flecha señala el esporangio que contiene a las angiosporas, visto a 40x. **C.** *Mucor* sp2. La flecha señala el conidiosporangio, visto a 100x. **D.** *Mucor* sp3. Las flechas señalan los esporangiofóros, vista a 40x.







Para todas las cepas vinculadas al género *Mucor* no se reportó crecimiento a 25 °C, por lo que se podría tratar de especies psicrófilas, estas observaciones también ha sido reportada para éste género por Robinson (17).

4.4.5 Familia Cystofilobasidiaceae

Esta familia pertenece al Phylum Basidiomycota, el cual contiene más de 16000 especies, que incluyen a los macrohongos que forman setas, pero también contiene algunos microhongos que se agrupan en diferentes órdenes (72).

4.3.5.1 Género: *Mrakia*

En este género se incluyen 5 especies, en su gran mayoría se trata de microorganismos psicrófilos o psicotrofos (94, 95). Dentro de nuestras muestras se logró identificar a la especie *Mrakia frígida*, (Fell et al.) Yamada & Komagata 1987. Las características de la colonia incluyen: tonalidad blanca a crema, consistencia suave, conidias hialinas algo globosas donde la masa de esporas, característica para esta especie, se origina directamente

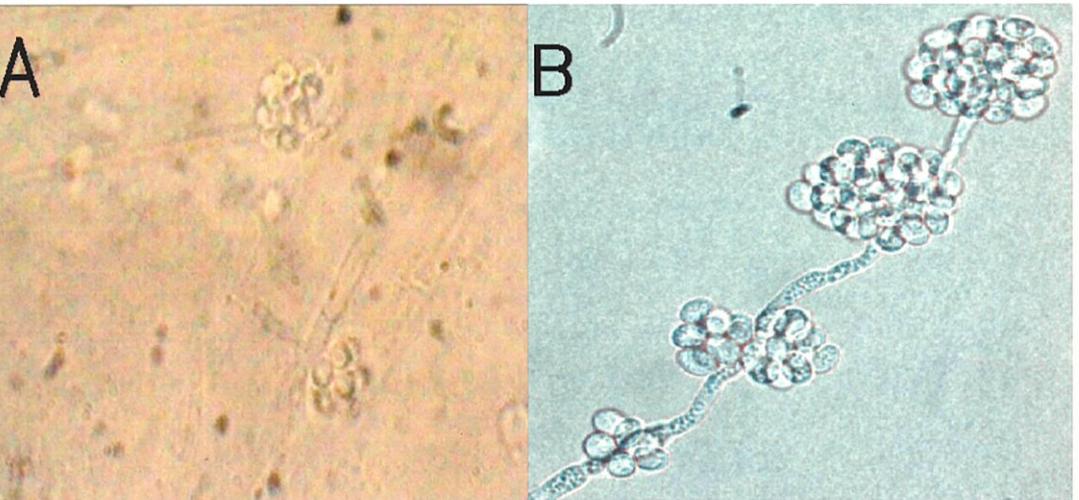
de las hifas, sin la presencia de conidióforos (Fig. 32) (96, 97).

No presentó crecimiento a 25 °C, esto coincide con lo encontrado por Díaz y Fell (94). Esta especie ha sido aislada de muestras de suelo de tierra Victoria en Antártida (98, 99).

Figura 32. *M. frígida*, (Fell et al.) Yamada & Komagata 1987.

A. Vista a 100x. **B.** Comparación representativa de la especie.

Fuente: Dr. Aisyah, S. (76).



4.3.6 Hongos Imperfectos

Antiguamente llamados deuteromicetos (Deuteromycetes) o deuteromicotas (Deuteromycota), comprenden más de 15000 especies diferentes que se clasifican juntas porque no se conoce en ellas la fase sexual de reproducción, de ahí la denominación de "imperfectos". Al carecer de estructuras reproductoras sexuadas, la identificación de los microhongos se dificulta enormemente. Se ha sugerido que se podrían tratar de especies pertenecientes al Phylum Ascomycota donde sus ascos aún no han sido descubiertos, o no se conoce la manera de provocar su desarrollo (72). Estos tipos de microhongos son dominantes en la micoflora Antártica, más de 100 especies han sido reportadas y por lo menos 10 nuevas especies han sido descritas (16).

Dentro de esta categoría se vinculó a dos microhongos con las mismas características microscópicas que fueron aislados solamente de la muestra GIT1-0, estos presentaban hifas septadas y conidias, de apariencia elipsoidal con base truncada.

(Fig. 33) El largo promedio de las esporas fue de $5,91 \mu\text{m}$. No se registró crecimiento de estos microhongos a 25°C .

Figura 33. Hongo Imperfecto.

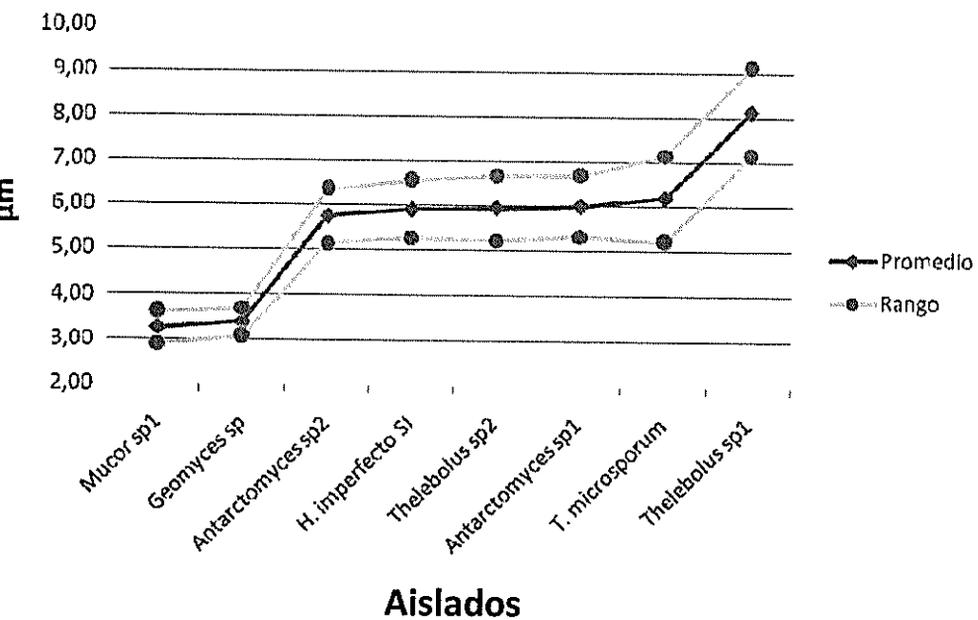
A. Hifas (Flecha) y Conidias, vistas a 40x. **B.** Conidias (flechas), vistas a 100x.



4.4 Tamaño de las esporas

Las esporas con el mayor largo promedio están relacionadas al género *Thelebolus*, en especial a la variante denominada *Thelebolus* sp1, cuyo rango del largo de sus ascosporas se encontró entre 9,11 y 7,13 μm . Mientras, que las angioesporas del género *Mucor*, se ubican entre las más pequeñas, con 3,61 y 2,91 μm (Fig. 34 y Apéndice C).

Figura 34. Tamaño de las esporas de los aislados encontrados.



SI= Sin identificar

4.5 Porcentaje de ocurrencia de Géneros

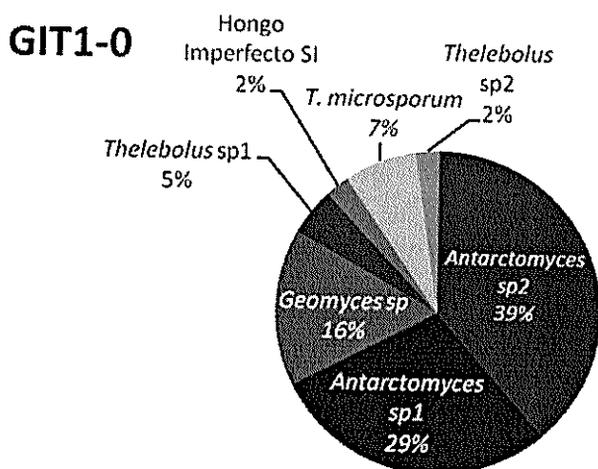
Para estimar el porcentaje de ocurrencia para cada uno de los géneros identificados por muestras de suelo y de manera global (76):

Porcentaje de Ocurrencia de cada Género

$$= \frac{\text{Número de microhongos para un género específico}}{\text{Número total de microhongos aislados}} \times 100\%$$

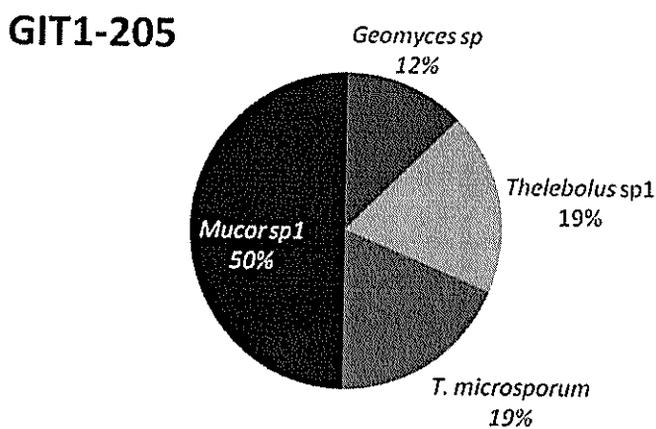
En la muestra GIT1-0, se encontró que el género más abundante fue *Antarctomyces*, representando el 68 % de un total de 83 cepas encontradas en todas las réplicas, seguido por el género *Geomyces* que representó el 16% (Fig. 35).

Figura 35. Porcentaje de ocurrencia de géneros aislados en GIT1-0.



En la muestra GIT1-205, el 50% de los microhongos correspondieron al género *Mucor*, y el 37,5 % estuvo representado por el género *Thelebolus*. En total se aislaron 16 microhongos de esta muestra (Fig. 36).

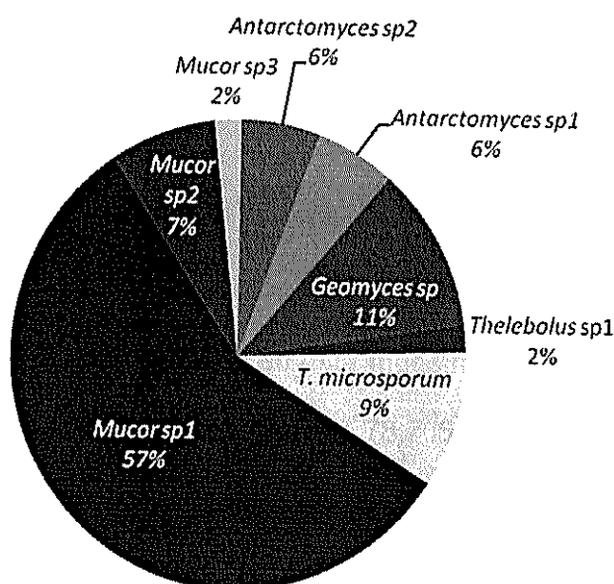
Figura 36. Porcentaje de ocurrencia de géneros aislados en GIT1-205.



En la muestra GIT1-500, el género más abundante fue *Mucor* representado el 66% de un total de 53 aislados, dentro de este género, la variante *Mucor* sp1 representó el 86,4 % del total (Fig. 37).

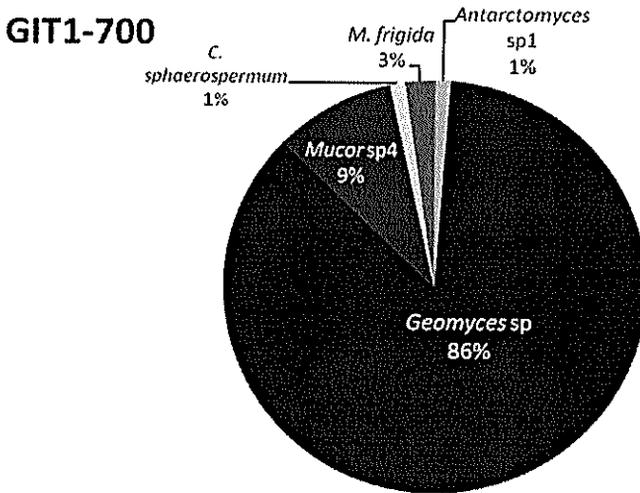
Figura 37. Porcentaje de ocurrencia de géneros aislados en GIT1-500.

GIT1-500



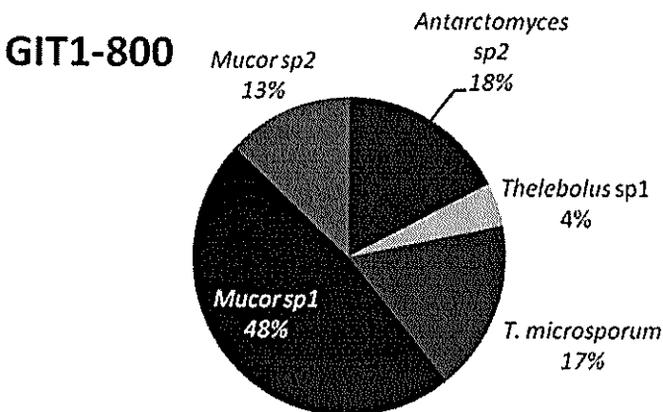
El género *Geomyces* representó el 86% de los microhongos identificados para la muestra GIT1-700, también se identificaron dos nuevas cepas, que sólo se aislaron de esta muestra de suelo: *C. sphaerospermum* y *M. frígida*, cada uno conformado el 3% del total de cepas obtenidas (Fig. 38).

Figura 38. Porcentaje de ocurrencia de los géneros aislados en GIT1-700.



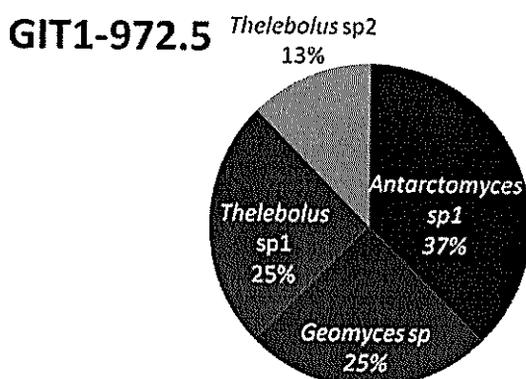
Al igual que en la muestra GIT1-500, en la muestra GIT1-800, el género *Mucor* fue el más abundante. Este último representó el 61 % de un total de 23 cepas aisladas en esta muestra. De igual manera la variante *Mucor* sp1 predominó con un 78,7 % entre los miembros relacionados con este género (Fig. 39).

Figura 39. Porcentaje de ocurrencia de los géneros aislados en GIT1-800.



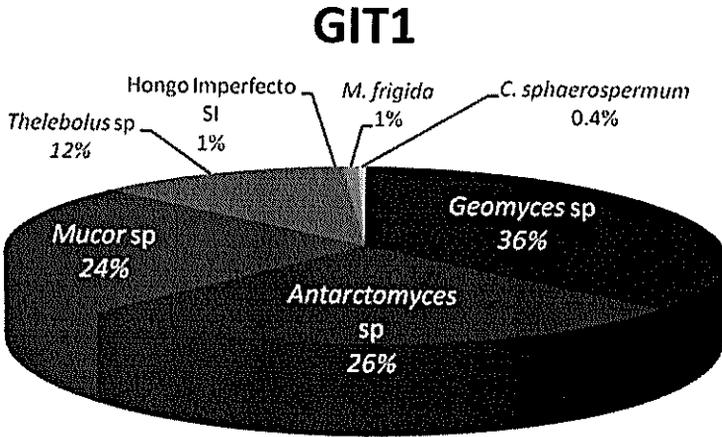
Finalmente en la muestra GIT1-972,5, no hubo una predominancia clara hacia alguno de los géneros identificados, registrándose la presencia de los géneros: *Antarctomyces*, *Thelebolus* y *Geomyces* (Fig. 40).

Figura 40. Porcentaje de ocurrencia de los géneros aislados en GIT1-972,5.



El análisis global para todas las muestras analizadas demostró que entre los géneros más abundantes se encontraba *Geomyces*, el cual representó el 36,6 % de los 269 microhongos aislados, seguido por el género *Antarctomyces* con el 26%, *Mucor* con el 24 % y *Thelebolus* con el 12%. Todos estos géneros han sido reportados en otros estudios de las comunidades de microhongos en Antártida como los más comunes y representativos (17, 52, 80, 81, 87, 88), con excepción del género *Antarctomyces*, el cual a pesar de haber sido reportado y sugerido como endémico (74), no ha sido documentado como un género abundante en Antártida (Fig. 41 y Apéndice D).

Figura 41. Porcentaje de ocurrencia global de los géneros aislados.



SI=Sin identificar

4.6 Frecuencia de Ocurrencia

La frecuencia de ocurrencia para cada uno de los géneros identificados se la definió con el símbolo "+", para reportar su presencia en cualquiera de las cinco réplicas por cada muestra de suelo. Así, "+++++" representa la presencia de un género específico en todas las réplicas, el símbolo "-", se usó para representar la ausencia del mismo (Tabla VI).

Muestra de Suelo	Géneros							
	Geomyces	Antarctomyces	Mucor	Thelebolus	Mirakia	Hongo Imperfecto SI	Cladosporium	
0	++++	+++++	-	+++++	-	++	-	
205	++	-	++++	+++	-	-	-	
500	++++	++++	+++++	++++	-	-	-	
700	+++++	+	++++	-	+	-	+	
800	-	+++	+++++	+++	-	-	-	
972,5	++	++	-	++	-	-	-	
Ocurrencia del Género en las 30 replicas	17	15	18	17	1	2	1	
Ocurrencia del Género en las 6 muestras	5	5	4	4	1	1	1	

"+" Ocurrencia del género en una réplica. "-" no se detectó. SI= Sin identificar.

El género *Geomyces* que representa el 36,6 % de los aislados, fue reportado en 17 réplicas de las 5 muestras de suelo, siendo más frecuente en GIT1-700, GIT1-0 y GIT1-500. Este género no se encontró en la muestra GIT1-800. El género *Antarctomyces* se lo encontró en 15 réplicas de las 5 muestras de suelo, principalmente en GIT1-0 y GIT1-500. No se la encontró en GIT1-205. El género más frecuente entre todas las réplicas fue *Mucor*, aunque solo se encontró en 4 de las 6 muestras de suelo analizadas. Otro género frecuente fue *Thelebolus*, aislado en 17 réplicas de 4 muestras de suelo.

En la muestra GIT1-700 se encontró la mayor frecuencia de géneros, cinco en total, y estos incluyen a: *Geomyces*, *Antarctomyces*, *Mucor*, *Mrakia* y *Cladosporium*. En todas las muestras se identificó por lo menos tres géneros de microhongos.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- 1.- Se aislaron un total de 269 microhongos que se agrupan en 6 géneros, con el siguiente porcentaje de ocurrencia: *Geomyces* (36,6%), *Antarctomyces* (26%), *Thelebolus* (12%), *Mucor* (24%), *Mrakia* (0,6%) y *Cladosporium* (0,4%). Un aislado no pudo ser identificado, pero se lo vinculó al grupo de hongos imperfectos (0,4%).

- 2.- Los géneros que reportaron crecimiento solo a 4 °C fueron: *Antarctomyces*, *Thelebolus*, *Mucor* y *Mrakia*, además del aislado sin identificar, esto indica que un 63% de las cepas aisladas corresponden a microhongos psicrófilos.
- 3.- Un 37% del total de los aislados se catalogaron como microhongos psicotrofos, estos corresponden a dos géneros: *Geomyces* y *Cladosporium*.
- 4.- Los géneros más frecuentes fueron *Geomyces* y *Antarctomyces*, encontrándolos en cinco de las seis muestras de suelo, seguidos por *Mucor* y *Thelebolus* reportados en cuatro muestras de suelo, para los demás géneros incluyendo el aislado sin identificar sólo fueron detectados en una muestra de suelo.
- 5.- Los microhongos psicrófilos predominaron entre las muestras de suelo analizadas, pero a su vez se encontró que *Geomyces*, el género más frecuente y con mayor porcentaje de ocurrencia, fue psicotrofo. Esta presencia de microhongos psicrófilos y psicotrofos es común dentro del ambiente antártico (17).

5.2 RECOMENDACIONES

- 1.- Adicionalmente se recomienda realizar la identificación de los microhongos utilizando marcadores microsatélites usando el rRNA de las cepas fúngicas, para respaldar los resultados encontrados.
- 2.- Procesar las demás muestras de suelo correspondientes al sector Punta Fort William, para tener datos más precisos sobre la composición de las comunidades de microhongos terrestres.
- 3.- Utilizar equipos más avanzados de microscopía para la obtención de fotografías con mejores contrastes (cámaras de microscopios de alta resolución para capturas de imágenes/video).
- 4.- Seguir las recomendaciones expuestas en el capítulo de resultados en cuanto a las consideraciones para proceder al aislado y la mejora sugerida para esta etapa.

APÉNDICES

APÉNDICE A. Datos recolectados durante el verano antártico del 2008 en Punta Fort William, Isla Greenwich.

Estación	Latitud (S)	Longitud (O)	Fecha	T°C
GI08-01	62 26 59.3	59 44 43.1	06-Feb	1,9
GI08-02	62 27 05.1	59 45 30.8	06-Feb	7,4
GI08-03	62 27 01.5	59 45 24.5	06-Feb	6,8
GI08-04	62 27 03.6	59 45 12.6	06-Feb	4,1
GI08-05	62 27 03.3	59 43 33.5	07-Feb	6,6
GI08-06	62 27 11.5	59 44 01.1	07-Feb	7,9
GI08-07	62 27 19.4	59 44 13.1	07-Feb	12,5
GI08-08	62 27 26.4	59 44 06.5	07-Feb	9,5
GIT1-0	62 26 56.2	59 43 35.0	01-Feb	13,6
GIT1-105	62 26 56.3	59 43 44.3	01-Feb	8,2
GIT1-205	62 27 01.3	59 44 09.1	01-Feb	10,4
GIT1-500	62 27 01.3	59 44 09.1	01-Feb	12,5
GIT1-600	62 27 07.2	59 44 25.3	01-Feb	8,9
GIT1-700	62 27 08.8	59 44 29.7	01-Feb	5,7
GIT1-800	62 27 10.1	59 44 35.6	02-Feb	14,6
GIT1-910	62 27 02.9	59 44 14.8	02-Feb	8,8
GIT1-972.5	62 27 04.5	59 44 20.6	02-Feb	6,2
GIT3-0	62 26 45.2	59 44 03.3	02-Feb	14,1
GIT3-120	62 26 48.3	59 43 58.4	02-Feb	6
GIT3-180	62 26 49.7	59 43 54.7	02-Feb	10,7
GIT3-240	62 26 50.8	59 43 50.4	02-Feb	9,8
GIT3-60	62 26 46.8	59 44 01.1	02-Feb	13
GIT4-0	62 26 48.7	59 44 16.2	03-Feb	9,1
GIT4-100	62 26 51.0	59 44 12.4	03-Feb	6,2
GIT4-1k	62 27 16.4	59 43 39.8	04-Feb	5,3
GIT4-200	62 26 53.9	59 44 07.7	03-Feb	4,3
GIT4-300	62 26 56.1	59 44 00.7	04-Feb	7,3
GIT4-400	62 26 58.7	59 43 58.9	04-Feb	3,8
GIT4-500	62 27 01.6	59 43 55.4	04-Feb	7,3
GIT4-600	62 27 04.2	59 43 51.2	04-Feb	5,2
GIT4-700	62 27 07.8	59 43 48.9	04-Feb	4,1
GIT4-800	62 27 09.8	59 43 45.6	04-Feb	4,5
GIT4-900	62 27 13.9	59 43 43.8	04-Feb	5

APÉNDICE B. Datos de textura de suelo y humedad para los seis puntos de muestreo en la transecta 1.

Sitio de Muestreo	Textura de Suelo				Humedad %
	Arenas %	Limos %	Arcillas %	Tipo de suelo	
GIT1-0	97,43	1,39	1,18	Arenoso	7,89
GIT1-205	97,38	0,54	2,08	Arenoso	9,80
GIT1-500	96,72	1,67	1,61	Arenoso	14,57
GIT1-700	93,14	3,38	3,49	Arenoso	25,92
GIT1-800	95,30	3,36	1,34	Arenoso	16,69
GIT1-972,5	96,10	1,99	1,91	Arenoso	24,53

La textura de suelo fue obtenida por el método de la pipeta modificado de Plumb (1981). Fuente: Calle, P., Laboratorio de Ecotoxicología, FIMCM-ESPOL, 2009.

APÉNDICE C. Tamaño de las esporas de los géneros identificados.

Género	Promedio μm	SD	Rango μm		Diámetro mayor (μm)	Diámetro menor (μm)	Número de muestras	Tipo de espora
<i>Aspergillus sp1</i>	3,26	0,35	3,61	2,91	3,80	2,50	25	Angioespora
<i>Aspergillus sp</i>	3,39	0,31	3,70	3,08	4,00	2,60	78	Arthroconidio
<i>Aspergillus tarctomyces 2</i>	5,75	0,60	6,35	5,15	7,10	4,00	100	Ascoespora
<i>Aspergillus imperfecto</i>	5,91	0,64	6,55	5,27	7,40	4,70	45	Arthroconidia
<i>Aspergillus telebolus sp2</i>	5,94	0,72	6,66	5,22	7,70	4,50	50	Ascoespora
<i>Aspergillus tarctomyces 1</i>	6,00	0,68	6,68	5,32	8,00	4,60	100	Ascoespora
<i>Aspergillus telebolus macrosporum</i>	6,18	0,97	7,15	5,21	9,80	4,40	100	Ascoespora
<i>Aspergillus telebolus sp1</i>	8,12	0,99	9,11	7,13	10,80	6,30	80	Ascoespora

BIBLIOGRAFÍA

- WARCUP, J. H. The soil plate method of isolation of fungi from soil. *Nature*, Lond. Vol. 166, 1950, p. 117.
- RUSSELL, N. Antarctic micro-organisms: coming in from the cold. *Culture*. Imperial College London, UK. Vol. 27 No. 2. 2006. Pp. 1-4.
- RETAMALES, J. La antártica nuestra. Una introducción a su conocimiento. Instituto Antártico Chileno. 2006. Pp. 23-33.
- SERRANO, E. Hielo, montañas, mar y fauna: El turismo en las islas Shetland del Sur (Antártida marítima). *RGA*, 2004. Pp. 9-23.

5. ANTEZANA, T., RAY, K. y MORALES, C. Ecosistema Antártico: naturaleza, efecto y conservación. Universidad de Concepción. *AMB. y DES.* Vol. 1. N° 1. 1984. Pp. 147-151.
6. SANCHÉZ, R. Antártida. Introducción a un Continente Remoto. Edit. Albatros. Buenos Aires. Cap. 1. 2007. Pp. 40-91.
7. LOVRICH, G., THATJE, S., CALCAGNO, J. y ANGER, K. Las Centollas colonizan la Antártida. *Ciencia Hoy*. Vol. 17. No. 99. 2007. Pp. 22-33.
8. CHRISTENSEN, M. A view of fungal ecology. *Mycologia*. Vol. 81. 1989. Pp. 1-19.
9. TATE, R. L. III. *Soil Microbiology*, Second Edition, Edit. John Wiley and Sons, Inc., NY. 2000. Pp. 508.
10. MORITA R.Y., Psychrophilic bacteria. *Bacterial. Rev.* Vol.39. 1975. Pp. 144-167.
11. GOUNOT, A.M. Bacterial life at low temperature: physiological aspects and biotechnological implications. *Journal of Applied Bacteriology*. Vol. 71. 1991. Pp. 386-397.
12. FELLER, G. & GERDAY, C. Psychrophilic Enzymes: Hot Topics In Cold Adaptation. *Microbiology*. Vol. 1. 2003. Pp. 200-208.

13. WYNN-WILLIAMS, D.D. Simulation of seasonal changes in microbial activity of Maritime Antarctic peat. *Soil. Boil. Biochem.* Vol. 14. 1982. Pp. 1-12.
14. SCHINNER, F. ÖHLINGER, R, KANDELER, E, y MARGESIN, R. *Methods in Soil Biology.* Springer-Verlag. Berlin. Alemania. 1996. Pp. 15-20.
15. HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimensión of biodiversity: magnitude, significance and conservation. *Mycological Research.* 1991. Pp. 641-655.
16. SECKBACH, J., *Enigmatic microorganisms and life in extreme environments.* Springer. 1999. Pp: 323-336.
17. ROBINSON, C., Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. *New Phytologist.* 2001. Pp. 341-353.
18. ALLEGRUCCI, N., CAZAU, C., CABELLO N., y ANGÉLICA M. Análisis de las Comunidades de Microhongos de la Hojarasca de *Scutia buxifolia* (Rhamnaceae) en el Este de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. *Darwiniana.* Vol. 43. 2005. Pp. 1-9.
19. STEWART, W. "The importance to sustainable agriculture of biodiversity among invertebrates and microorganisms". *The biodiversity of microorganisms and invertebrates: Its role in sustainable agriculture.* Redwood Press, Melksham, UK, 1991. p. 328.

20. LUNA, M., VEGA, C., FRANCO, M. O., VÁSQUEZ, S., TRUJILLO, N., RAMÍREZ, E. y DENDOOVEN, L. Actividad microbiana en suelos, Avance y perspectiva. Vol. 21. 2002. Pp. 328-332.
21. INGRAHJA L.M. & STOKES, L. Psychrophilic bacteria. *Bat. Rev.* Vol. 23. 1959. p. 97
22. SINCLAIR, N. A. & STOKES, J. L. Role of oxygen in the high cell yield of psychrophiles and mesophiles at low temperatures. *J. Bact.* Vol. 85. 1963. p. 164.
23. SOMERO, G.N. Proteins and temperature. *Annu. Rev. Physiol.* Vol. 57. 1995. Pp. 43-68.
24. MARGESIN, R., & SCHINNER, F. Properties of cold-adapted microorganisms and their potential role in biotechnology. *Journal of Biotechnology.* Vol. 33. 1994. Pp. 1-14.
5. LEWIS, DH., & SMITH, DC. Sugar alcohols (polyols) in fungi and green plants I. Distribution, physiology and metabolism. *New Phytologist.* Vol. 66. 1967. Pp. 143-184.
6. GOODRICH, RP., HANDEL, TMN., y BALDESCHWIELER, JD. Modification of lipid phase behavior with membrane-bound cryoprotectants. *Biochimica et Biophysica Acta.* Vol. 938. 1988. Pp. 143-154.

27. COOKE, RC., & WHIPPS, JM. *Ecophysiology of fungi*. Oxford. UK:Blackwell. 1993. Pp. 123-127.
28. GÓMEZ, J. & STEINER, W. The Biocatalytic Potential of Extremophiles and Extremozymes. *Food Technol. Biotechnol.* Vol. 42. 2004. Pp. 223-235.
29. MARGESIN R., & SCHINNER F. *Biotechnological Applications of Cold-Adapted Organisms*. Springer Verlag, Berlin, 1999. p 338.
30. VAN DEN BURG, B. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Ecology and Industrial Microbiology*. Elsevier. Vol. 6. 2003. Pp. 213-218.
31. SINGH, S., PUJA, G., y BHAT, D., Psychrophilic fungi from Schirmacher Oasis, East Antarctica. *Current Science*. Vol. 90. 2004. Pp. 1388-1392.
32. PICKARD, j., & SEPPELT, R. D. Phytogeography of Antarctica. *Journal of Biogeography*, Vol. 11, No. 1. 1984. Pp. 2-6.
33. BLÜMEL, W.D., & EITEL., B. Geocological aspects of maritime climatic and continental periglacial regions in Antarctica (S-Shetland, Antarctic peninsula and Victoria Land). *Geokodynamics*, No. 10. 1989. Pp. 201-214.
34. TORRES, G. y PALACIOS, C. Nota Preliminar sobre Algas de Nieve "snow Algae" en Punta Fort William (Isla Greenwich-Antártida), enero 2004", *Revista Tecnológica ESPOL*, Ecuador. Vol. 19. N. 1. 2006. Pp. 181-184.

5. SANTANA, E., Características granulométricas de los Cordones Litorales en Punta Fort William, Isla Greenwich, Península Antártica. *Revista Tecnológica ESPOL*, Vol. 19, N. 1. 2006. Pp. 161-172.
6. SANTANA, E. y DUMONT, J.F. Geología de los alrededores de la Estación Ecuatoriana Pedro Vicente Maldonado (Isla Greenwich) e Isla Dee, Península Antártica". *Acta Antártica Ecuatoriana 1*. 2002. Pp. 7-32.
7. AZECEDO, G.C. Caracterização geológica, geoquímica e geocronológica de ilha Dee e parte de ilha Greenwich, arquipélago das Shetland do sul, Antártica. Pós-grauação em Geociencias, Universidade Federal do Rio Grande Do Sul. 1992. Pp 35-38
8. SMELLIE, J.L., PANKURST, R.J., THOMSON, M.R.A. y DAVIES, R. The geology of the South Shetland Islands: VI, stratigraphy, geochemistry and evolution. *British Antarctic Survey*. 1984. Pp. 85-90.
9. ARAYA, R. y HERVÉ, F. Estudio geomorfológico y geológico en las Islas Shetland del Sur, Antártida. *Publicaciones del Instituto Antártico Chileno* 8, 1966. p. 76.
10. DUMONT, JF, SANTANA, E., HERVÉ F y ZAPATA. Regional Structures and Geodynamic Evolution of North Greenwich (Fort William Point) and Dee Island, South Shetland Islands, Chapter 5.6 in ANTARTICA, Contributions to global Earth Sciences, Flutterer DK, Damaske D,

- Kleinschmidt G, Miller H., Tessensohn F., (Editors). Springer Verlag. Berlin. 2006. Pp. 255-260.
41. AZHAR, H. & SANTANA, E. Geology, Glacial History and the Evolving landscape of North Greenwich Island of the South Shetland Group of Islands of the Antarctic Peninsula. *Proceedings VI Simposio Argentino y III Latinoamericano sobre investigaciones Antárticas*. Dirección Nacional del Antártico / Instituto Antártico Argentino. 2007.
42. KOESTER, F. y PIEDRAHITA, P. Censo del Petrel Gigante del Sur *Macronectes giganteus* y las Skúas *Catharacta* spp. en la Punta Fort William-Isla Greenwich y la Isla Barrientos, Shetland del Sur, Antártida. *Revista Tecnológica ESPOL*. Vol. 20 N. 1. 2007. Pp. 89-95.
43. HAASE, B. Inventario ornitológico de Punta Fort William, Isla Greenwich (Islas Shetland del Sur), durante enero y febrero 1991-1992. *Acta Antártica Ecuatoriana. PROANTEC-Ecuador* 1. No. 3. 1993. Pp. 49-54.
44. TORRES, G. Sitios de anidación de *Macronectes giganteus* y *Catharacta lonnbergi* en Punta Fort William (2004) en la Isla Greenwich-Shetland del Sur-Antártida. Reporte Técnico. Instituto Oceanográfico de la Armada, Guayaquil, Ecuador, 2004.

45. VALVERDE, F. y ARCOS, F. Estudios preliminares de la cobertura vegetal en Punta Fort William-Isla Greenwich. *Acta Antártica Ecuatoriana*, PROANTEC, Ecuador 2. 1990. Pp. 47-55.
46. SOCOLA, J. Cobertura Vegetal en las áreas circundantes a la Estación Pedro Vicente Maldonado. *Acta Antártica Ecuatoriana*, PROANTEC-Ecuador. Vol 1. 2001. Pp. 70-80.
47. ORDÓÑEZ, N. Yui, H, Cárdenas, W, Aisyah, S, Riofrio, M, Hussin, A y Burbano, L. Estudio Preliminar de la Cobertura Superficial en la Isla Greenwich, Antártida. *Revista Tecnológica ESPOL*. Vol. 21. No. 1. 2008. Pp. 17-21.
48. PEAT, H., CLARKE, A. y CONVEYS, P. Diversity and biogeography Antarctic flora. *Journal of Biogeography*. Vol. 34. 2006. Pp. 132-146.
49. ADAMS, B., Bardgett, R, Ayres, E, Wall, D, Aislabie, J, Bamforth, S, Bargagli, R, Cary, C y Cavacini, P. Diversity and distribution of Victoria Land biota. *Soil Biology & Biochemistry*. Vol. 38. 2006. Pp. 3003-3018.
50. DEL FRATE, G., & CARETTA, G. Fungi isolated from Antarctic material. *Polar Biology*. Vol. 11, 1990. Pp. 1-7.
51. TOSI, S., CASADO, B., GERDOL, R., y CARETTA G. Fungi isolated from Antarctic mosses. *Polar Biology*. Vol. 25, 2002. Pp. 262-268.

52. AZMI, O. & SEPPELT, R. The broad-scale distribution of microfungi in the Windmill Island region, continental Antarctica. *Polar Bio*, Vol. 19, 1998. Pp. 92-100.
53. MCRAE, C., & SEPPELT R. Filamentous fungi of the Windmill Islands, continental Antarctica. Effect of water content in moss turves on fungal diversity. *Polar Biology*. Vol. 22, 1999. Pp. 389-394.
54. MCRAE, C., HOCKING, A., y SEPPELT R. *Penicillium* species from terrestrial habitats in the Windmill Islands, East Antarctica, including a new species, *Penicillium antarcticum*. *Polar Biology*. Vol. 21, 1999. Pp. 97-111.
55. WALL, D., & VIRGINIA, R. Control on soil: insights from extreme environments. *Applied Soil Ecology*. Vol. 13, 1999. Pp. 137-150.
56. HUGHES, K., LAWLEY, B., y NEWSHAM K. Solar UV-B Radiation Inhibits the Growth of Antarctic Terrestrial Fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 69, 2003. Pp. 1488-1491.
57. FRENOT, Y., CHOWN, S, WHINAM, J, SELKIRK, P, CONVEY, P, SKOTNICKI, M, Y BERGSTROM, M. Biological invasion in the Antarctic: extent, impacts and implications. *Bio. Rev.* Vol. 80, 2005. Pp. 45-72.

58. ONOFRI, S., ZUCCONI, L., y TOSI, S. Continental Antarctic Fungi. Deutschen Nationalbibliografie. 2007. Pp. 30-230.
59. KOHLMAYER, J. & VOLKMANN-KOHLMEYER, B. Illustrated Key to the Filamentous Higher Marine Fungi. Botánica Básica, Vol. 34, 1991. Pp. 1-61.
60. KIFFLER, E. & MORELET, M. The Deutoromycetes, Mitosporic Fungi. Classification and Genera Keys. Edit. Science Publisher Inc. USA. 2000. Pp. 42-170.
61. ELLIS, M. Dematiaceous Hyphomycetes. Edit. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 1971. Pp. 57-130.
62. BARNETT, H. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Edit. Burgess. Minneapolis, USA, 1955. Pp. 31-132.
63. ANDRES J. Guía de Hongos de la Península Ibérica. 3ª edición. Celarayn Editorial. España, 2000, Pp. 1-40.
64. U.S. Food & Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual Online, 2001, www.cfsan.fda.gov/~ebam/R11.html, [último acceso 25 de junio 2009]
- ZALAR, P., de HOOG, G., SCHROERS, H., CROUS, P., GROENEWALD, J. y GUNDE-CIMERMAN, N. Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions

- of seven species from hypersaline environments. *Studies in Mycology*. Vol. 58. 2007. Pp. 157-183.
66. AIHARA, M., TANAKA, T., OHTA T., y TAKATORI, K. Effect of temperature and water activity on the growth of *Cladosporium sphaerospermum* and *Cladosporium cladosporioides*. *Biocontrol Science* Vol. 7. 2002. Pp. 193–196.
67. AIHARA M., TANAKA, T., y TAKATORI, K. *Cladosporium* as the main fungal contaminant of locations in dwelling environments. *Biocontrol Science* Vol. 6. 2001. Pp. 49–52.
68. STACKMAN, L y HARRAR, G. Relaciones mutuas entre organismos, ecológicas y simbióticas. *Principios de Patología Vegetal*. 2ª. Edición. Buenos Aires, 1968. Pp. 79-87.
69. CÁRDENAS, L, SASTOQUE, A y PEÑA, M. Métodos Moleculares en muestras ambientales: una alternativa para establecer la relación entre la estructura de la comunidad microbiana y la operación del sistema. Seminario Internacional sobre Métodos Naturales para el Tratamiento de Aguas Residuales. Universidad del Valle, 2001. Pp. 76-83.
70. GAMAZO, C, LÓPEZ-GOÑI, I y RAMÓN, D. Manual práctico de Microbiología. 3era Edición. MASSON. 2005. Pp. 7-10.

71. ROSAS, I., CRAVIOTO, A., y EZCURRA, E. *Microbiología Ambiental*. Publicado por Instituto Nacional de Ecología, 2004. Pp. 111-115.
72. INGOLD, C., & HUDSON, J. *The Biology of Fungi*. Kluwer Academic Publishers edit. 1993. Pp. 107-205.
73. WICKLOW, D., & MALLOCH, D., Studies in the genus *Thelebolus* temperature optima for growth and ascocarp development. *Mycologia* 63. 1971. Pp. 118-131.
74. STCHIGEL, A., CANO, J., MACCORMACK, W. y GUARRO, J. *Antarctomyces psychrotrophicus* gen. et sp. nov., a new ascomycete from Antarctica. *Mycological Research* 105, 2001, Pp. 377-382.
75. AISYAH, S., OMAR, S., FUAD, F. y SABARATNAM, V., Effect of temperatura, media, seawater, and pH on the growth of selected Antarctic fungi. *Seminar Antarctic Research in the University of Malaya*". 2005. Pp. 105-111.
76. AISYAH, S. *A Laboratory Manual for Fungal Workshop*. 2008. Pp. 17-23.
77. HOOG, G., GÖTTLICH, E., GENILLOUD, O., LEOTTA, G., y VAN BRUMMELEN, J. Evolution, taxonomy and ecology of the genus *Thelebolus* in Antarctica. *Studies in Mycology*. Vol. 51. 2005. Pp. 33-76.
78. KIMBROUGH, J. Cytology, ultrastructure and taxonomy of *Thelebolus*. *Mycologia* 13. 1981. Pp. 4-27.

79. KIMBROUGH, J & KORF, R. A synopsis of the genera and species of the tribe *Thelebolaceae*. *American Journal of Botany*. Vol 54. 1967. Pp. 9-73.
80. BRETT, E., BENJAMIN, W., HELD, J., JURGENS, R., y FARREL, R. Fungal diversity in soils and historic wood from the Ross Sea Region of Antarctica. *Soil Biology & Biochemistry* 38. 2006. Pp. 3057-3064.
81. FLETCHER, L.D., KERRY, E.J. y WESTE, G.M. Microfungi of Mac Robertson and Enderby Lands, Antarctica. *Polar Biology* Vol. 4. 1985. Pp. 81-88.
2. KOCHKINA, G., IVANUSHKINA, N., AKIMOV, N, GILICHINSKII, D., y OZERSKAYA, S. Halo- and psychrotolerant *Geomyces* fungi from Arctic cryopegs and marine deposits. *Microbiology* Vol. 76. 2007. Pp. 31-38.
3. FINOTTEI, E., MORETTO, D., MARSELLA, R., y MERCANTINI, R. (1993). Temperature effects and fatty-acid patterns in *Geomyces* species isolated from Antarctic soil. *Polar Biology*. Vol. 13. 1993. Pp. 127-130.
4. VISHNIAC H., The microbiology of Antarctic soil. En: Friedmann EI (Ed). *Antarctic Microbiology*. New York, Wiley-Liss Inc. 1993. Pp. 297-341.
5. SIGLER L., & CARMICHAEL J., Taxonomy of *Malbranchea* and some other Hyphomycetes with arthroconidia. *Mycotaxon*. Vol. 4. 1976. Pp. 349-488.

86. COMERIO, R, y MAC CORMACK, W., Algunos micromicetes del suelo y de alimentos deteriorados en la Antártida Argentina. *Rev. Iberoam. Micol.* Vol. 21. 2004. Pp. 128-134.
87. GIUSEPPE DF., & GIUSEPPE, C. Fungi from Antarctic material. *Polar Biology.* Vol.. 11. 1990. Pp. 1-7.
88. SOLVEIG, T., CASADO, B., y GERDOL, R., Fungi isolated from Antarctic Mosses. *Polar Bio.* Vol. 25. 2002. Pp. 262, 268.
89. MÖLLER, C. & GAMS, W. Two new hyphomycetes isolated from Antarctic lichens. *Mycotaxon* Vol. 48. 1993. Pp 441-450.
90. SUN, S.H., HUPPERT, M. y CAMERON, R. Identification of some fungi from soil and air of Antarctica. *Antarctic Research Series* Vol. 30. 1978. Pp. 1-26.
91. BRAUN, U., CROUS, P., DUGAN, F., GROENEWALD, J., y HOOG, G. de. Phylogeny and taxonomy of cladosporium-like hyphomycetes, including *Davidiella* gen. nov., the teleomorph of *Cladosporium* s. str. *Mycological Progress* Vol. 2. 2003. Pp. 3-18.
92. CHALMERS, M.O., HARPER, M.A. y MARSHALL, W.A. *An Illustrated Catalogue of Airborne Microbiota from the Maritime Antarctic.* British Antarctic Survey. 1996. Cambridge.

93. MONTEMARTINI, C., & GESTRO C. Fungi from mud of Antarctic ponds. *Proceedings of the 2nd meeting on 'Biology in Antarctica'*, Padova 26 – 28 February 1992. (eds Battaglia, B., Bisol, P.M. & Varotto, V.). Scienze e Cultura, Edizione Universitarie Patavine. 1994. Pp. 33–42.
94. DIAZ, M. & FELL, J., Molecular analyses of the IGS & ITS regions of rDNA of the psychrophilic yeasts in the genus *Mrakia*. Springer Netherlands. Vol. 77. N. 1. 2000. Pp. 7-12.
95. FELL, J., & STATZELL-TALLMAN, A. Descriptions of telemorphic basidiomycetous genera and species. In: Kurtzman CP & Fell JW (Eds) *The Yeasts, a Taxonomic Study*. 4th ed. Elsevier Science Publ. Amsterdam. 1998. Pp 676–677.
96. YAMADA, Y., & MATSUMOTO A. An electrophoretic comparison of enzymes in strains of species in the genus *Mrakia* Yamamada et Komagata (Filobasidiaceae). *J. Gen. App. Microbiol.* Vol. 34. 1988. Pp. 201–208.
97. YAMADA, Y., & KOMAGATA, K. *Mrakia* gen. nov., a heterobasidiomycetous yeast genus for the Q-8 equipped, self-sporulating organisms which produce a unicellular metabasidium, formerly classified in the genus *Leucosporidium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* Vol. 33. 1987. Pp. 455–457.

98. ATLAS, R.M., di MENNA, M.E. y CAMERON, R.E. Ecological Investigation of yeasts in Antarctic soils, *Antarctic Research Series* Vol. 30. 1978. Pp. 27-34.
99. CONNELL, L., REMAN, R., CRAIG, S., SCORZETTI, G., ISZARD, M. y RODRIGUEZ, R. Diversity of soil yeasts isolated from South Victoria Land, Antarctica. *Microbial Ecology* Vol. 56. 2008. Pp. 448-459.