

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

“Aislamiento e identificación de microhongos terrestres de
la Isla Greenwich, Antártida, y su potencial como
controladores biológicos”

TESIS DE GRADO

Previa la obtención del Título de:

BIOLOGO

Presentada por:

SANTIAGO COELLO AGUILAR

GUAYAQUIL – ECUADOR

AÑO

2011

AGRADECIMIENTO

Agradezco al Dr. Washington B. Cárdenas, por su apoyo constante para la realización de esta tesis, además a las personas que colaboraron como el Dr. Marcelo Muñoz, Blgo. Marco Álvarez, Blga. Nadia Ordoñez, Ing. Mariuxi Miraba, Dra. Glenda Castro, Sr. Christian Palacios, Srta. Belén Castillo, Srta. Eunice Ordoñez y Sr. Jaime Yockteng.

DEDICATORIA

A mis padres Máximo Coello y Gladys Aguilar. A mis hermanos Max y Gabriela, por apoyarme durante toda mi carrera. A Mónica Suarez por su cariño. A todos mis amigos (as) de la Facultad por su agradable compañía.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Washington B. Cárdenas, Ph. D.

DIRECTOR DE TESIS

Marcelo Muñoz, Ph. D.

MIEMBRO PRINCIPAL

Marco Alvarez, M.Sc.

MIEMBRO PRINCIPAL

DECLARACIÓN EXPRESA

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

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)

RESUMEN

En el presente trabajo se aislaron 213 cepas de microhongos procedentes del suelo de Punta Fort William, Isla Greenwich, Antártida, durante el verano antártico de febrero del 2008. Los microhongos fueron aislados en medio sólido de patata-dextrosa agar (PDA) a 4 °C por el método Warcup (1). Luego de 8 a 12 días de crecimiento, los microhongos se aislaron nuevamente a 4 °C y 25 °C para discriminar entre hongos psicrófilos (crecimiento entre 0 a 20 °C) y psicrotrofos (crecimiento de 0 a más de 20 °C). Los 213 microhongos encontrados fueron catalogados por medio de claves y artículos científicos en 5 géneros: *Antarctomyces* (50,2%), *Geomyces* (33,8%), *Thelebolus* (10,3%), *Mucor* (1,4%), y *Penicillium* (0,5%). Además se encontraron 2 hongos que se clasificaron como Hyphomycetos (3,29%), y una Levadura (0,51%). De las cepas identificadas sólo los microhongos *Geomyces*, *Hyphomyceto 2*, *Penicillium* y la Levadura fueron considerados psicrotrofos.

Se investigó la capacidad de los microhongos identificados de inhibir el crecimiento de bacterias Gram + y -, tales como: *Escherichia coli*, *Klebssiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, y *Enterococcus faecalis*, por medio del

método corcho agar (2-6). Se encontró actividad bacteriostática en los géneros *Thelebolus*, *Geomyces*, *Hyphomyceto*, *Penicillium*, y la Levadura. También se pudo observar un incremento en el espectro de inhibición al transcurrir el tiempo de crecimiento de los microhongos de 40 a 60 días. Al comparar el nivel de inhibición con discos comerciales del antibiótico Cefpodoxime, se observó que el microhongo *Thelebolus sp1*, *Thelebolus microsporus*, y la Levadura presentaron un mayor halo de inhibición frente a la bacteria *Klebsiella pneumoniae*. Además, estos dos últimos microhongos inhibieron una cepa bacteriana de *Klebsiella pneumoniae 1*, resistente a varios antibióticos incluido al antibiotico Cefpodoxime. La investigación del potencial antibacteriano de microhongos antárticos constituye el primer estudio realizado en el Ecuador.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	V
INDICE GENERAL.....	VII
ABREVIATURAS.....	XI
INDICE DE FIGURAS.....	XII
INDICE DE TABLAS.....	XV
INDICE DE ANEXOS.....	XVI
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPITULO 1

1. GENERALIDADES.....	4
1.1 Microhongos antárticos.....	7
1.2 Clases termales.....	8
1.2.1 Psicrófilos.....	8
1.2.2 Psicrotrofos.....	10
1.2.3 Mesófilos.....	10
1.3 Controladores Biológicos.....	10

CAPITULO 2

2. ÁREA DE ESTUDIO	12
2.1 Antártida Marítima.....	12
2.2 Punta Fort William, Isla Greenwich.....	13
2.3 Condiciones Ambientales	13

CAPITULO 3

3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1 Recolección de las muestras de suelo.....	16
3.2 Sembrado y aislamiento de los microhongos antárticos.....	17
3.3 Identificación.....	19
3.4 Criopreservación.....	21
3.5 Control biológico frente a bacterias.....	23
3.5.1 Inoculación bacteriana.....	23
3.5.2 Monitoreo del potencial bacteriostático de los hongos.....	25

CAPITULO 4

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES	26
4.1 Diversidad y abundancia de microhongos.....	27
4.2 Análisis de hongos Psicrófilos y Psicotrófos.....	31
4.3 Identificación de microhongos.....	37

4.3.1 Familia: Thelebolaceae.....	37
4.3.1.1 Genero: Antarctomyces.....	38
4.3.1.2 Género Thelebolus.....	41
4.3.2 Familia: Myxotrichaceae.....	44
4.3.2.1 Género Geomyces.....	44
4.3.3 Familia Trichocomaceae.....	48
4.3.3.1 Género Penicillium.....	49
4.3.4 Familia Mucoraceae.....	52
4.3.4.1 Género Mucor.....	53
4.3.5 Hyphomycetos.....	56
4.3.6 Levadura.....	60
4.4 Porcentaje de ocurrencia de especies identificadas.....	62
4.5 Potencial de los microhongos como controladores biológicos.....	67
4.5.1 Bioensayo 1.....	69
4.5.2 Bioensayo 2.....	78
4.5.3 Bioensayo 3.....	80

CAPITULO 5

5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	87
--	-----------

5.1 Conclusiones.....	87
5.2 Recomendaciones.....	90
ANEXOS.....	92
BIBLIOGRAFÍA.....	116

ABREVIATURAS

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
PDA	Patata dextrosa agar
INAE	Instituto Nacional Antártico Ecuatoriano
SCAR	Scientific Commite on Antarctic Research
PEVIMA	Pedro Vicente Maldonado
LB	LENNOX L
LB-agar	LENNOX L Agar
mm	Milímetros
μ	Micras
μg	Microgramos
μl	Microlitros
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus.</i>
<i>E. faecalis.</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>T. sp1.</i>	<i>Thelebolus sp1.</i>
<i>T. microsporus</i>	<i>Thelebolus microsporus</i>
<i>A. sp1.</i>	<i>Antarctomyces sp1.</i>
<i>A. sp2.</i>	<i>Antarctomyces sp2</i>
<i>G. sp1.</i>	<i>Geomyces sp1</i>
<i>G. sp2.</i>	<i>Geomyces sp2</i>
<i>Hypho.</i>	<i>Hyphomyceto</i>
<i>P. sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Regiones bioclimáticas de la Antártida.....	6
Figura 2. Clases termales de los Microhongos.....	9
Figura 3. Islas Shetland del Sur.....	14
Figura 4. Ubicación de la estación PEVIMA.....	14
Figura 5. Ubicación de la transecta 4 y de los puntos de muestreo.....	18
Figura 6. Esquema de la siembra y el aislamiento de los microhongos.....	20
Figura 7. Placas de muestras fijadas con Lugol y Azul de Lactofenol.....	20
Figura 8. Criopreservación de los microhongos.....	22
Figura 9. Esquema del bioensayo de control biológico contra bacterias Gram + y -.....	24
Figura 10. Número de colonias por punto de muestreo.....	28
Figura 11. Esquema del crecimiento de microhongos a partir de granos de tierra.....	31
Figura 12. Crecimiento de microhongos psicrófilos en PDA.....	33
Figura 13. Crecimiento de microhongos psicrotrofos en PDA.....	35
Figura 14. Control del medio PDA en cámara de flujo laminar.....	36
Figura 15. Especie <i>Antarctomyces sp1</i> en PDA a 4 °C.....	39
Figura 16. Especie <i>Antarctomyces sp2</i> en PDA a 4 °C.....	40

Figura 17. Especie <i>Thelebolus microsporus</i> en PDA a 4 °C	42
Figura 18 Especie <i>Thelebolus sp1</i> en PDA a 4 °C	43
Figura 19. Ramificaciones típicas del género <i>Geomyces</i>	45
Figura 20. Especies <i>Geomyces sp1</i> y <i>sp2</i> en PDA a 4 °C	46
Figura 21. Arthroconidias y conidióforos del género <i>Geomyces</i>	47
Figura 22. Esquema de la morfología de Trichocomaceae típicos.....	49
Figura 23. Género <i>Penicillium</i> en PDA a 4 °C	51
Figura 24. Esquema del ciclo sexual del Phylum Zygomycota.....	52
Figura 25. Morfología del Género <i>Mucor</i>	54
Figura 26. Género <i>Mucor</i> en PDA a 4 °C.....	54
Figura 27. Esporangiosporas y Zigosporangios de la especie <i>Mucor sp</i>	55
Figura 28. Hyphomyceto 1 en PDA a 4 °C.....	57
Figura 29. Hyphomyceto 2 en PDA a 4 °C.....	58
Figura 30 Levadura en PDA a 4 °C.....	60
Figura 31. Esporas de Levadura.....	61
Figura 32. Porcentaje de ocurrencia en GIT4 – 0.....	62
Figura 33. Porcentaje de ocurrencia en GIT4 – 200.....	63
Figura 34. Porcentaje de ocurrencia en GIT4 – 400.....	64
Figura 35. Porcentaje de ocurrencia en GIT4 – 600.....	64
Figura 36. Porcentaje de ocurrencia en GIT4 – 800.....	65
Figura 37. Porcentaje de ocurrencia en GIT4 – 1K.....	66
Figura 38. Porcentaje de ocurrencia de todas la muestras de suelo.....	67

Figura 39. Estado del Halo de inhibición de la bacteria <i>K. pneumoniae</i> frente al antibiotico cepodoxime	71
Figura 40. Diferencias de crecimiento bacteriano en PDA y LB-agar.....	73
Figura 41. Efectos de dos medios de cultivo sólido (PDA y LB-agar) en el espectro de inhibición de <i>T,microsporus</i> frente a la bacteria <i>E. coli</i>	73
Figura 42. Inhibición de la bacteria <i>K.pneumoniae 1</i> expuesta al microhongo <i>T.microsporus</i> en PDA.....	76
Figura 43. Diferencias del potencial de inhibición de cepas del microhongo <i>T. microsporus.</i> frente a la bacteria <i>E. coli</i>	77
Figura 44. Incremento del Espectro de inhibición por los microhongos <i>Geomyces sp1</i> (0-2d) y Levadura (200-3B) observado en medio de Cultivo PDA frente a bacteria <i>Staph</i>	82

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla i. Número de colonias fúngicas mayores a 2mm.....	29
Tabla ii. Número de colonias fúngicas mayores a 2 mm que crecieron después del proceso de aislamiento.....	30
Tabla iii. Especies y códigos de microhongos Antárticos usados para las pruebas de control biológico frente a bacterias.....	68
Tabla iv. Respuesta bacteriostática frente a microhongos Antárticos cultivados por 40 días en medios PDA y LB-agar.....	70
Tabla v. Porcentaje de inhibición bacteriana en el bioensayo 1.....	75
Tabla vi. Respuesta bacteriostática de los microhongos por duplicado.....	79
Tabla vii. Porcentaje de inhibición bacteriana en el bioensayo 2	79
Tabla viii. Respuesta bacteriostática de los microhongos Antárticos crecidos por 40 y 60 días.....	81
Tabla ix. Porcentaje de inhibición bacteriana en el bioensayo 3.....	84
Tabla x. Resumen del potencial bacteriostático de los microhongos antárticos frente a las bacterias ensayada.....	86

INDICE DE ANEXOS

Anexo A. Coordenadas UTM de las estaciones de muestreo.....	92
Anexo B. Colonias encontradas en réplicas por punto de muestreo.....	92
Anexo C. Resumen de ocurrencia de microhongo encontrados por punto de muestreo.....	93
Anexo D. Tamaño de esporas y micelio y su respuesta más fuerte de inhibición.....	94
Anexo E. Estadística descriptiva de los halos de inhibición por bacteria.....	94
Anexo F. Códigos del aislado y criopreservado de los microhongos identificados.....	95
Anexo G. Prueba de susceptibilidad de la bacteria <i>K. pneumoniae</i> 1.....	99
Anexo H. Prueba de susceptibilidad de la bacteria <i>K. pneumoniae</i> 2.....	100
Anexo I. Fotos de inhibiciones del bioensayo 1.....	101
Anexo J. Fotos de inhibiciones del bioensayo 2.....	104
Anexo K. Fotos de inhibiciones del bioensayo 3.....	111

INTRODUCCIÓN

La Antártida es uno de los ecosistemas más importantes en nuestro planeta. Posee el mayor porcentaje de agua dulce a nivel mundial, contenida en su casquete (7). Además, los glaciares y témpanos antárticos enfrían el océano circundante, y por efecto de las corrientes marinas y del aire regulan la temperatura global (8, 9). La exploración antártica es relativamente nueva, lo que la convierte en uno de los ecosistemas con menor impacto antropogénico (10, 11). La urgencia de preservar este ambiente, dio origen al protocolo del tratado antártico sobre la protección del medio ambiente, en Madrid en 1991 (12).

Para la protección del ecosistema antártico es necesario estudiar sus componentes, como el hábitat y sus especies residentes (12, 13). Es importante la identificación de las especies existentes y el estudio de su interacción con el ambiente y, de manera sostenible, encontrar nuevos recursos para beneficio del hombre, tales como los compuestos bioactivos (14). Es por esto que el Ecuador, a través del Instituto Antártico Ecuatoriano (INAE), realiza expediciones científicas desde 1987, con el afán de mantener este ecosistema como reserva natural, zona de paz y ciencia. Actividad fortalecida con la participación permanente en actividades de investigación

científica, en el contexto del sistema del tratado antártico. Sin embargo, las investigaciones relacionadas a la comunidad microbiana, específicamente de microhongos terrestres, no han sido suficientes. En el área de Punta Fort William, donde se localiza la estación ecuatoriana Pedro Vicente Maldonado, sólo existe un reporte ecuatoriano sobre la identificación de microhongos terrestres (16).

El presente proyecto de tesis titulado “Aislamiento e Identificación de microhongos terrestres de la Isla Greenwich, Antártida, y su potencial como controladores biológicos,” tiene como hipótesis que el suelo antártico contiene microhongos capaces de ser aislados en medio microbiano sólido y a 4 °C. Adicionalmente, algunos de estos microhongos pueden presentar actividad biológica contra bacterias Gram + y -.

El objetivo general fue el de identificar los microhongos terrestres antárticos e investigar su potencial uso como controladores biológicos. Los objetivos específicos fueron los siguientes:

1. Aislar e identificar microhongos en medio de cultivo sólido de PDA de 6 muestras de suelo recolectadas en la Isla Greenwich.
2. Clasificar funcionalmente a los microhongos aislados entre psicrófilos y psicrotrofos.

3. Determinar el potencial de inhibición de los microhongos identificados frente a bacterias de importancia en salud pública.

Este tema de tesis forma parte del mega proyecto denominado “Diversidad microbiana alrededor de la estación Pedro Vicente Maldonado, Antártida: Distribución, abundancia y fisiología de hongos, algas, bacterias y cianobacterias”, dirigido por el INAE, el Programa Antártico de Malasia y el Laboratorio de Biomedicina de la ESPOL.

CAPITULO 1

1. GENERALIDADES

La Antártida es un ecosistema único. Es considerado el ecosistema más seco y posee la mayor extensión desértica a nivel global (17). Además es el continente con mayor cantidad de agua dulce contenida en su casquete (3).

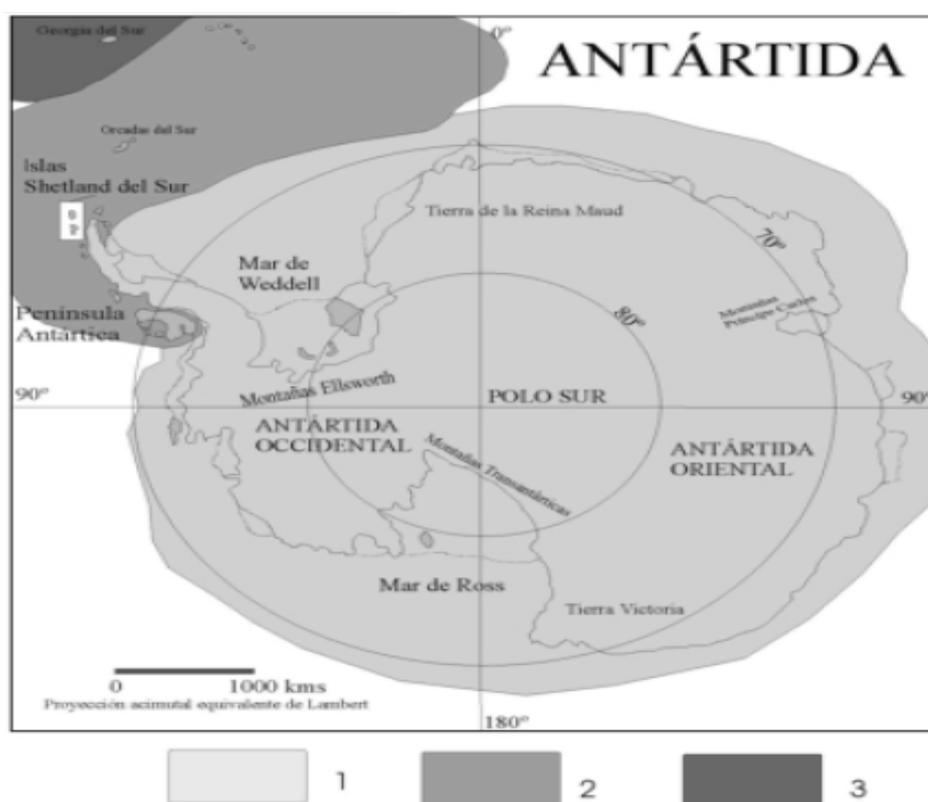
El cambio climático es una realidad en nuestro planeta, cuyo efecto principal es el aumento de la temperatura global y la posible desaparición del casquete polar, elevando hasta 6 m el nivel del mar (18). Estos

cambios pondría en peligro el equilibrio térmico global (8, 9, 18). Es por ello que SCAR (Scientific Committee on Antarctic Research), en su programa sobre la Evolución y Biodiversidad Antártica, investiga los efectos que está causando y causará el cambio climático sobre los organismos que en ella habitan (12). Para el estudio de este ecosistema se requiere de un análisis exhaustivo de los factores físicos, químicos y biológicos, que sirva de base para desarrollar programas especializados que puedan determinar la variabilidad biológica frente al cambio climático.

La Antártida se encuentra dividida por tres regiones bioclimáticas, nombradas en relación al tipo de vegetación y clima: La Antártida Continental, la Antártida Marítima y la región Subantártica (19-22) (Fig. 1).

En estas regiones viven una gran variedad de organismos con adaptaciones fisiológica para soportar y desarrollarse óptimamente en climas fríos (16, 23). Esta gran diversidad comprende organismos como: 1) vertebrados (*e.g.*, pingüinos, aves, elefantes y lobos marinos, y cetáceos); 2) invertebrados (*e.g.*, moluscos y crustáceos); y, 3) Plantas (*e.g.*, musgos y plantas vasculares). Además, se encuentran organismos más simples como bacterias y hongos.

Figura 1. Regiones Bioclimáticas de la Antártida: **1)** Antártida Continental; **2)** Antártida Marítima; y **3)** Región Subantártica. Fuente: Pickard y Seppelt, 1984 (22)



1.1 Microrganismos Antárticos

Los microhongos son organismos eucariotes que pertenecen al reino Fungi. La mayoría de los microhongos poseen una pared celular provista de quitina (24). Su característica morfológica más importante es la presencia de estructuras esféricas denominadas esporas y además filamentos microscópicos llamados hifas (25).

En el ambiente extremo antártico podemos encontrar macrohongos, microhongos filamentosos y Levaduras (16). Estos poseen adaptaciones fisiológicas que les permiten sobrevivir las bajas temperaturas del ecosistema antártico, tales como incremento intracelular de trehalosa y poliol, la presencia de proteínas anticongelantes y actividad enzimática a baja temperatura (16, 23).

Los microhongos tienen una fácil dispersión en el ambiente por la producción de esporas, facilitando la colonización de hábitats muy variados (26). Por ejemplo, algunos de ellos viven sobre hojas (folícolas) y bajo el suelo (hipogeos) (25).

La biodiversidad fúngica identificada a nivel global es de aproximadamente 90.000 especies (25), pero se estima que podrían existir alrededor de 1,5 millones de especies (16, 25).

1.2 Clases Termales

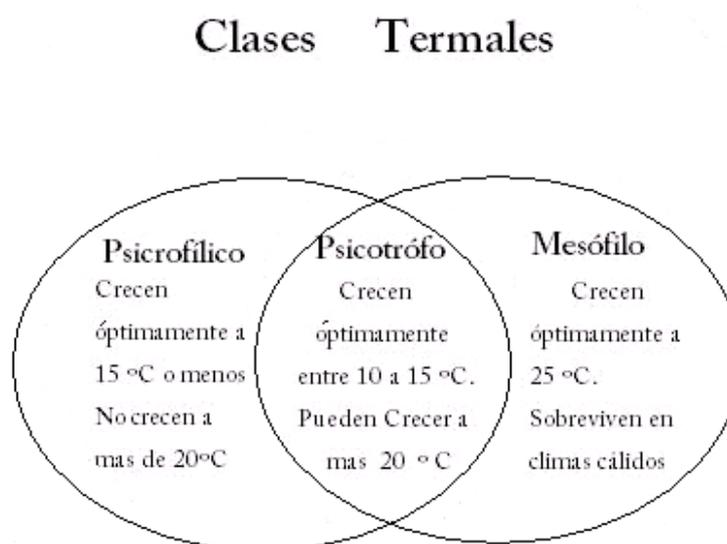
Los microorganismos son clasificados en distintas formas, una de ellas es según su resistencia o reacción a factores físicos, químicos, y/o biológicos.

La temperatura juega un papel importante en la vida de los organismos. Según su óptimo crecimiento y umbrales de tolerancia, existen diversos grupos termales de microorganismos: Psicrófilos; Psicrotrofos; y Mesófilos (Fig. 2).

1.2.1. Psicrófilos

Los hongos psicrófilos son aquellos que crecen de manera óptima entre 0 y 15 °C, pero no crecen a más de 20 °C (27). Los hongos psicrófilos generan metabolitos extremos, con un gran potencial para aplicaciones biotecnológicas (14-16).

Figura 2. Clases Termales de los Microhongos. Fuente: Morita, 1975 (27).



1.2.2. Psicrotrofos

La temperatura óptima de crecimiento para estos hongos es de 10 a 15 °C, con un rango que va de < 10 °C y puede sobrepasar los 20 °C (27).

1.2.3 Mesófilos

La temperatura óptima de crecimiento es a más de 20 °C. Generalmente no crecen a menos de 10 °C (27).

1.3 Controladores Biológicos

El término de controlador biológico fue propuesto por Baker y Cook en 1974 (28). Según estos autores se entiende como controlador biológico a aquello con capacidad de reducir la densidad o las actividades productoras de agentes patógenos o parásitos, en su estado activo o durmiente, lograda de manera natural o a través de la manipulación del ambiente o del hospedero, antagonizando así al patógeno o plaga que se quiere controlar (28, 29).

Los hongos sustentan su crecimiento gracias a los metabolitos primarios (e.g., ácidos nucleicos y aminoácidos), secretados por ellos mismo (30). Sin embargo, los metabolitos secundarios (e.g., antibióticos y ciclosporinas) son producidos en la fase estacionaria, confiriéndoles efectos tóxicos sobre animales y vegetales para así optimizar su competitividad frente a otros organismos (30).

El antibiótico es un controlador biológico que se lo puede clasificar por su mecanismo de acción para inhibir el crecimiento bacteriano. En el presente proyecto se utilizó discos de sensibilidad del antibiótico Cefpodoxima para estimar la respuesta bacteriostática de los microhongos antárticos. La Cefpodoxima es una cefalosporina de tercera generación, con su mecanismo de acción sobre la síntesis de la pared celular bacteriana. Tiene un espectro de inhibición que cubre algunas bacterias Gram -, aunque también es activa frente a bacterias Gram + (31, 32).

Los hongos, y en especial los microhongos filamentosos extremófilos, son organismos notables que producen una amplia gama de metabolitos secundarios (14, 16, 33), y es por ello que una de los objetivos de este proyecto es la observación del potencial que tienen los microhongos terrestres antárticos como controladores biológicos.

CAPITULO 2

2. ÁREA DE ESTUDIO

El presente capítulo describe las características de Punta Fort William, localizada en la isla Greenwich - Antártida, donde se recolectó las muestras analizadas.

2.1. Antártida Marítima

En esta región se encuentra el archipiélago de Las Islas Shetland que está separado del continente suramericano por el paso Drake, y de la

península Antártica por el estrecho de Bransfield (Fig. 3). Este archipiélago está conformado por once islas mayores ubicadas en la zona más meridional de la región de la Antártida Marítima (29). Una de las once islas mayores es la Isla Greenwich, donde se realizó el muestreo.

2.2. Punta Fort William, Isla Greenwich

Punta Fort William se encuentra ubicada en las costas nororientales de la Isla Greenwich, formando parte del cierre noroccidental de la bahía de Chile. Aquí se encuentra la base ecuatoriana Pedro Vicente Maldonado (PEVIMA) (Fig. 4).

2.3 Condiciones Ambientales

Las condiciones ambientales de la Antártida la convierten en uno de los ecosistemas más extremos, debido a que es el área más desértica, seca y fría del planeta (17). Además, es el más ventoso, llegando incluso a presentar vientos de hasta 320 km/hora (34, 35).

Figura 3. Islas Shetland del sur. Fuente: Cornejo, Horn, y Troian, 1993. (34)

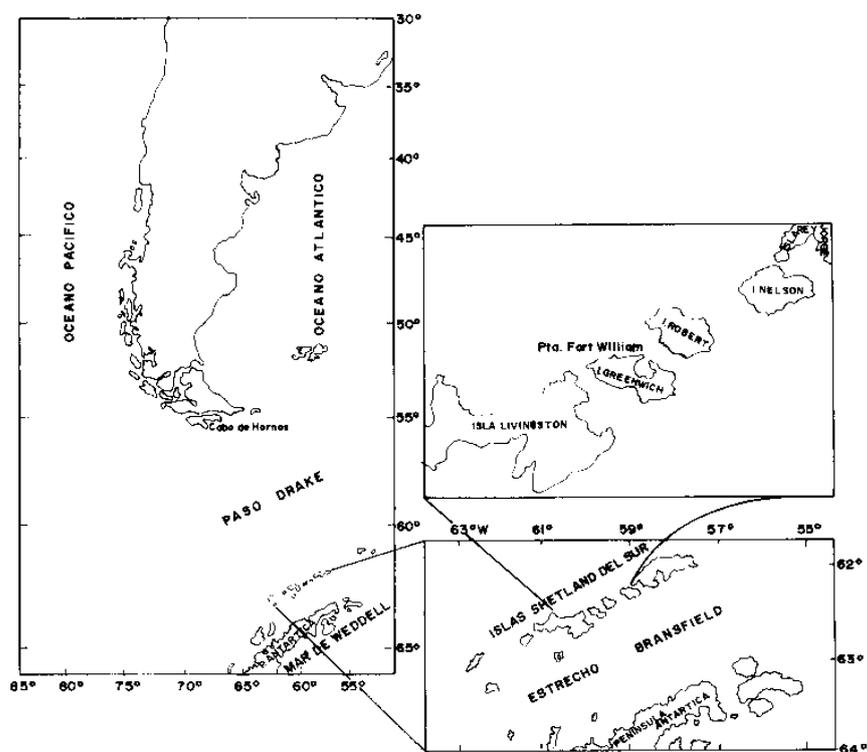


Figura 4. Ubicación de la Estación PEVIMA en Punta Fort William, Isla Greenwich.

Fuente: Ordoñez y Ordoñez, 2009 (16).



Las estaciones de invierno y verano son radicalmente diferentes, alterando la composición, distribución, metabolismo, producción e interacción de las especies que en la Antártida habitan (36). En la Antártida marítima se registra una temperatura media mayor a 1 °C durante el verano, y recibe las mayores precipitaciones del continente que van de 400 a 600 mm anuales (36). La humedad en la zona de la península antártica y sus alrededores mantiene una media superior al 80% (35). Otra de las características de este ecosistema es que el hielo que lo cubre refracta el 90% de la radiación solar (35).

CAPITULO 3

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se describe lo realizado en el laboratorio de Biomedicina de la ESPOL y siguen en su mayoría los protocolos descritos en Ordóñez y Ordóñez (16).

3.1 Recolección de las muestras de suelo

Se seleccionaron 6 puntos de muestreos de un total de 11, de la transecta 4. Los puntos seleccionados fueron: GIT4-0, GIT4-200,

GIT4-400, GIT4-600, GIT4-800, GIT4-1K, donde GI se refiere al nombre de la isla, T4 al número de la transecta y sigue la distancia en metros que separa cada punto de muestreo, a partir del punto 0 (Fig. 5). Estos puntos fueron ubicados geográficamente con coordenadas UTM (Anexo A). En cada punto se recolectaron cinco réplicas en un radio de 5 m. Los primeros 10 cm de suelo de cada réplica se recolectaron con una espátula estéril, luego las réplicas se mezclaron y tamizaron con una malla de 2 mm. Finalmente se guardaron en fundas estériles de polietileno (Whirl-Pack) y se las conservó a 0 °C hasta su análisis en el laboratorio.

3.2 Sembrado y Aislamiento de los Microhongos Antárticos

Se aislaron microhongos de 6 muestras de suelo recolectadas a lo largo de la transecta 4, en Punta Fort William-Isla Greenwich, durante el verano antártico del 2008. Cada muestra se sembró en 5 réplicas, en PDA. Para el aislamiento de los microhongos terrestres, se vertió medio PDA, suplementado con cloranfenicol (100 ug/ml, concentración final), en cajas de Petri que contenían de 0.1 a 0.3 g de suelo por réplica, Warcup 1950 (1).

Figura 5. Ubicación de la transecta 4 y los puntos de muestreo en Punta Fort William - Isla Greenwich. El círculo rojo representa la base Ecuatoriana PEVIMA. Fuente: Google Earth TM.



Las placas se incubaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ por alrededor de 10 días, tiempo promedio suficiente, empíricamente determinado, para el desarrollo de las colonias fúngicas. Cada colonia fue aislada, transfiriéndola a nuevas placas de PDA mediante el uso de una aguja enmangada, a una densidad de tres colonias por placa. Después de 20 días aproximadamente, se transfirió cada colonia a nuevas placas en forma individual, y por duplicado. Cada cepa se las incubo en dos placas. Una placa se incubó a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la otra a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, para discriminar entre hongos psicrófilos y psicrotrofos respectivamente (Fig. 6). Este proceso se realizó en una cámara de flujo laminar, para mantener los procesos en forma aséptica.

3.3 Identificación

La identificación de los diversos aislados fúngicos se realizó por sus características morfológicas macroscópicas y microscópicas. Para la identificación de sus estructuras vegetativas y reproductivas, se colocó en un portaobjetos, con una gota de Lugol al 40% o Azul de Lactofenol al 60 %, un raspado fino de la colonia fúngica (Fig. 7). Se presionó con un cubreobjetos para provocar la liberación de esporas de los cuerpos fructíferos, en caso que los hubiere.

Figura 6. Esquema de la de siembra y aislamiento, de los microhongos antárticos

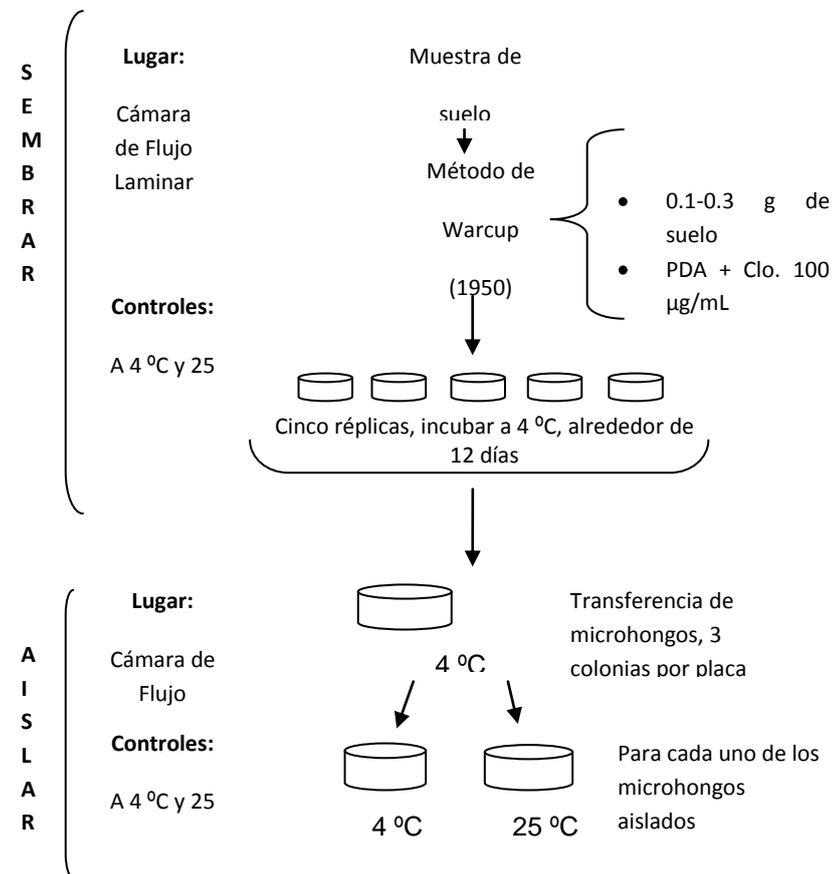
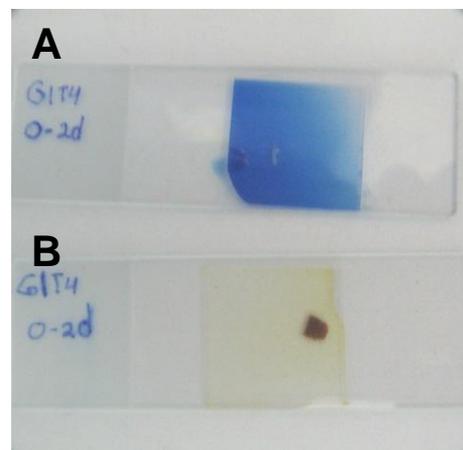


Figura 7. Placas de muestras fijadas para la observación al microscopio. A) Placas con Azul de Lactofenol; B) Placas con Lugol



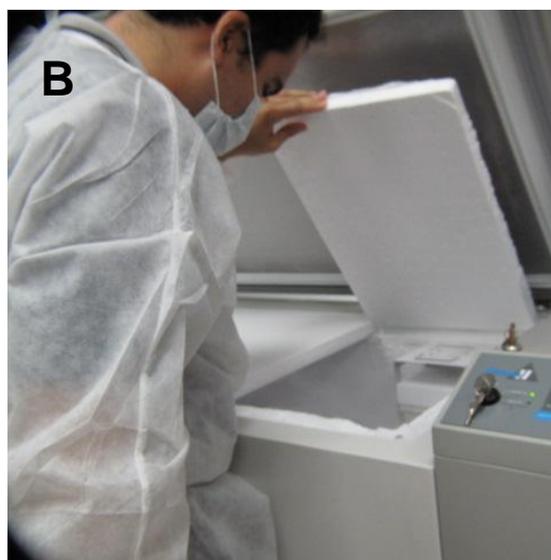
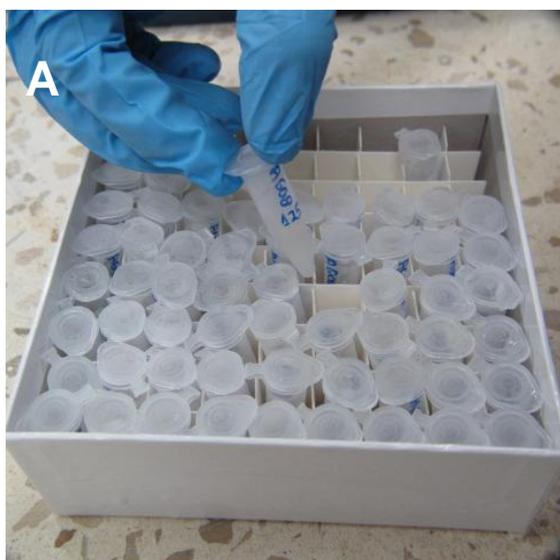
Luego se llevó la preparación al microscopio para su observación e identificación.

La identificación de los microhongos se realizó en base a la forma y tamaño de las hifas, así como de sus esporas. También se documentó las características fenotípicas de las colonias tales como coloración, tamaño y apariencia. Las observaciones macroscópicas y microscópicas fueron documentadas en forma fotográfica. Con el programa Motic Images 2.0 se realizó las mediciones microscópicas de las hifas, sacos y esporas. Se utilizó ampliaciones de 40X y 100X. Los datos obtenidos fueron comparados con publicaciones científicas y manuales de identificación para determinar, por lo menos, el género de los aislados obtenidos.

3.4 Criopreservación

La criopreservación de los microhongos identificados se realizó guardándolos en microtubos estériles de 1.5 ml donde se vertió 0.5 ml de Glicerol al 10% diluido en agua destilada, y un corcho de agar con el hongo previamente identificado (Fig. 8).

Figura 8. Criopreservación de los microhongos: A) Corchos de agar de Microhongos con Glicerol en microtubos estériles; B) Congelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$



Se esperó 10 minutos para permitir la absorción del glicerol en el hongo para luego guardarlo a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

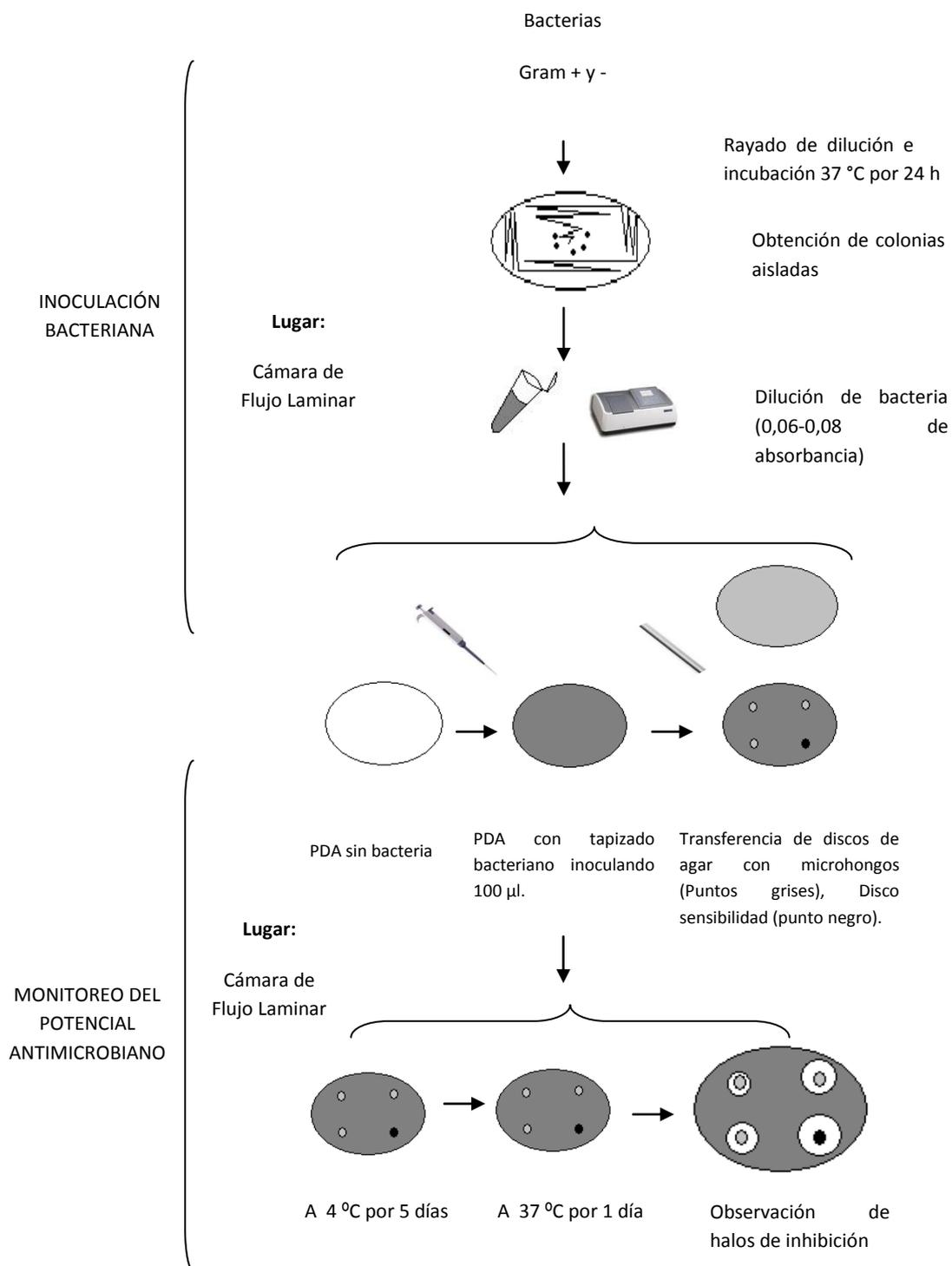
3.5 Control Biológico Frente a Bacterias

Para esta prueba se utilizó 11 microhongos previamente identificados a nivel de género y con diferencias marcadas en su morfología. Para observar el posible efecto antagónico del hongo frente al crecimiento bacteriano, las colonias fúngicas se crecieron en presencia de bacterias Gram + y - de importancia en salud pública. La lectura biológica de este bioensayo fue la presencia o ausencia de un halo de inhibición (Fig. 9).

3.5.1 Inoculación Bacteriana

El crecimiento bacteriano fue realizado en placas con medio LB-agar. Para la preparación del tapizado bacteriano, se dispersó una colonia en 1 ml de medio LB hasta obtener una densidad óptica (600nm) entre 0.06 y 0.08 unidades, valores óptimos para los bioensayos de sensibilidad (37).

Figura 9. Esquema del bioensayo de control biológico contra bacterias Gram + y -



Luego se tomó 100 μ l de la suspensión bacteriana y se la esparció en una placa de PDA sin cloranfenicol. El uso de este método aseguró una estandarización del tapizado bacteriano y, por lo tanto, una mejor interpretación de los halos de inhibición.

3.5.2 Monitoreo del potencial bacteriostático de los hongos

Para este bioensayo, fueron cultivados 11 aislados fúngicos en medio PDA sin cloranfenicol por 30, 40 y 60 días. Mediante la técnica del corcho de agar, se transfirió un corcho de agar con micelio a placas de PDA, previamente tapizadas con la bacteria respectiva (2-6). Con la ayuda de un sorbete estéril se transfirió de 3 a 4 corchos de agar, de aproximadamente 0.5 cm de diámetro, por cada placa de PDA con la bacteria indicada. Las placas fueron incubadas por 4 o 5 días a 4 °C, para permitir un limitado crecimiento de los hongos, y luego fueron transferidas a 37 °C por 24 h, para permitir el crecimiento bacteriano. Además, se realizó un duplicado del ensayo a los 30 días. Como control se colocó discos del antibiótico Cefpodoxima (cefalosporinas) en una concentración de 10 μ g. (elegido por su amplio espectro

de acción), para poder comparar los halos de inhibición de las bacterias entre el antibiótico control y los microhongos.

El halo de inhibición fue medido en milímetros desde el borde del crecimiento micelial hasta el borde de inhibición.

CAPITULO 4

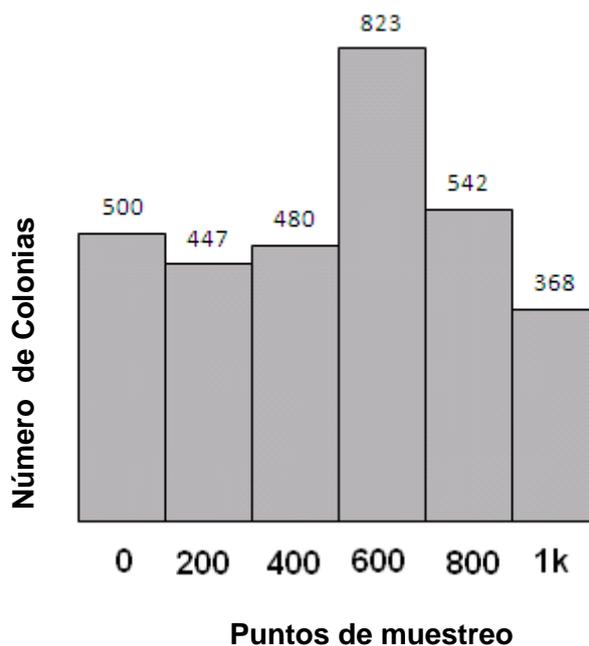
4. RESULTADOS Y DISCUSION

Se aislaron 213 hongos de los 6 puntos de muestreo, previamente establecidos. Las muestras se procesaron en el laboratorio de Biomedicina de la ESPOL. A continuación se presentan los resultados y discusión de la investigación.

4.1 Diversidad y abundancia de hongos

Durante la siembra inicial se pudo apreciar una diferencia de tamaños entre las colonias de cada muestra de suelo. Muchas colonias fueron muy pequeñas, aún después de 12 días de incubación. Esto dio como resultado una cantidad excesiva de hongos para su aislamiento e identificación (Fig.10).

Figura 10. Número total de colonias por punto de muestreo. El valor 1k corresponde al punto de muestreo que se encuentra a mil metros de distancia del punto 0.



Las colonias fúngicas se superponían unos a otros, haciendo difícil su recolección.

Se realizó una segunda siembra, donde únicamente se recolectaron los hongos con colonias mayores a 2 mm de diámetro aproximadamente. En esta segunda siembra el número colonias por estación varió de 26 a 73 (Tabla i y Anexo C).

Tabla i. Número total de colonias fúngicas, mayores a 2 mm, por cada estación. El promedio y desviación estandar se refiere a los valores de las cinco réplicas por cada estación.

Muestras de Suelo	Total de colonias	Promedio de colonias de réplicas	Desviación estandar
GIT4 - 0	62	12.4	2.6
GIT4 - 200	26	5.2	1.1
GIT4 - 400	31	6.2	1.8
GIT4 - 600	46	9.2	3.6
GIT4 - 800	73	14.6	3
GIT4 - 1K	64	12.8	1.9
Total	302		

Se obtuvieron un total de 302 colonias fúngicas de las 6 muestras de suelo antártico. Sin embargo, al realizar el aislamiento de colonias individuales sólo crecieron 213 microhongos, lo que correspondió al 70.5 % del total. Se observó que en el punto 1k se recuperó el 100%

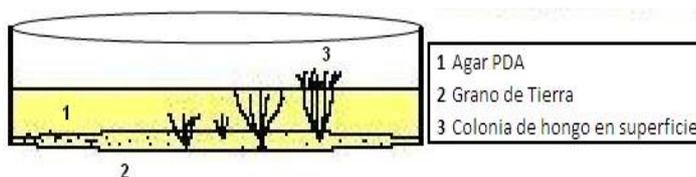
de colonias aisladas (>2mm), mientras que en el punto 0, con el 19,4 %, fue el menor porcentaje de colonias aisladas (Tabla ii).

Tabla ii. Número de colonias fúngicas >2mm por estación que crecieron después del proceso de aislamiento. Porcentaje recuperado con respecto al número total de colonias que se transfirió a placas individuales.

Muestras de Suelo	Aislado	
	Número de colonias	Porcentaje
GIT4 - 0	12	19.4
GIT4 - 200	12	46.2
GIT4 - 400	22	71.0
GIT4 - 600	45	97.8
GIT4 - 800	58	79.5
GIT4 - 1K	64	100.0
Total	213	

Una posible explicación sobre el bajo porcentaje de aislados podría atribuirse al reducido tamaño de muchos microhongos y a la aparente localización del microhongo en el fondo de la caja Petri al momento de la transferencia. Esto último pudo incidir en la recolección de poco inóculo para el aislamiento de la colonia (Fig.11). Además, el suelo antártico presente en el siembra inicial puede tener factores de crecimiento que no se encontraron en las placas de PDA donde se aislaron las colonias (38, 39).

Figura 11. Esquema del crecimiento de microhongos a partir de granos de tierra de la Antártida.



El reducido número de aislados también se puede explicar por sinergismo. Existen reportes de especies fúngicas que necesitan de otras para desarrollarse, denominándose simbioses estrictos por depender de otras especies para su crecimiento (40-42).

4.2 Análisis de microhongos Psicrófilos y Psicrotrofos

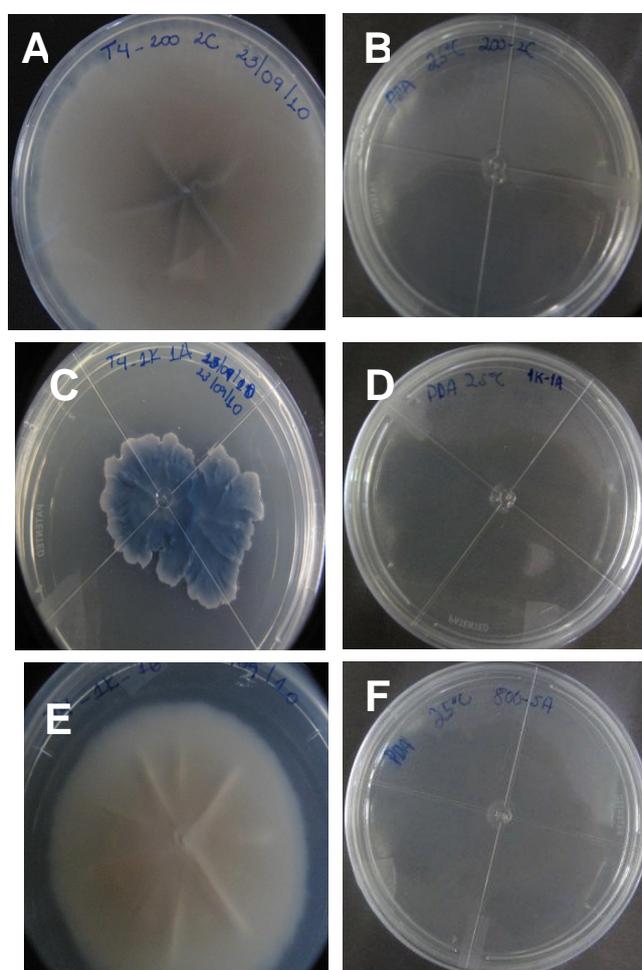
Todos los microhongos fueron cultivados por 30 días. De los hongos identificados, los géneros *Antarctomyces*, *Thelebolus*, *Mucor* y el hongo *Hyphomyceto 1* fueron considerados psicrófilos ya que crecieron sólo a 4 °C (Fig. 12). El género *Geomyces* y la Levadura presentaron crecimiento conspicuo a 4 °C, pero debido a que crecieron a 25 °C se catalogaron como psicrotrofos (Fig. 13 A, B, C y D). Los hongos *Penicillium* e *Hyphomyceto 2* presentaron mejor

crecimiento a 25 °C (Fig. 13 E, F, G y H). A pesar de que esta temperatura óptima de crecimiento es similar a la de los hongos mesófilos, se los consideró psicrotrofos porque crecieron también a 4 °C (43, 44). Microhongos que muestran similar rango de temperatura para su crecimiento también se los denominan mesófilos tolerantes al frío (45).

Existen reportes de hongos psicrotrofos, con temperatura óptima de crecimiento de 25 °C, similar a los hongos encontrados en la presente investigación, incluso se han reportado hongos mesófilos en la Antártida (43, 45).

Se realizó un control negativo del crecimiento de microhongos a 4 °C y 25 °C de la cámara de flujo laminar donde se trabajó. No hubo crecimiento microbiano, demostrando la esterilidad de la cámara y del correcto manejo de las muestras (Fig. 14). Estos controles indican que todos los microhongos identificados fueron de procedencia del suelo antártico.

Figura 12. Crecimiento de microhongos psicrófilos por 30 días en PDA, aislados de la transecta 4: **A)** *Antarctomyces* sp1 a 4 °C; **B)** *A. sp1* a 25 °C; **C)** *A. sp2* a 4 °C; **D)** *A. sp2* a 25 °C; **E)** *Thelebolus microsporus* a 4 °C; **F)** *T. microsporus* a 25°C; **G)** *T. sp1* a 4 °C; y **H)** *T. sp1* a 25 °C. **I)** *Mucor* sp. a 4 °C; **J)** *M. sp.* a 25 °C; **K)** *Hyphomyceto 1* a 4 °C; y **L)** *Hypho, 1* a 25 °C.



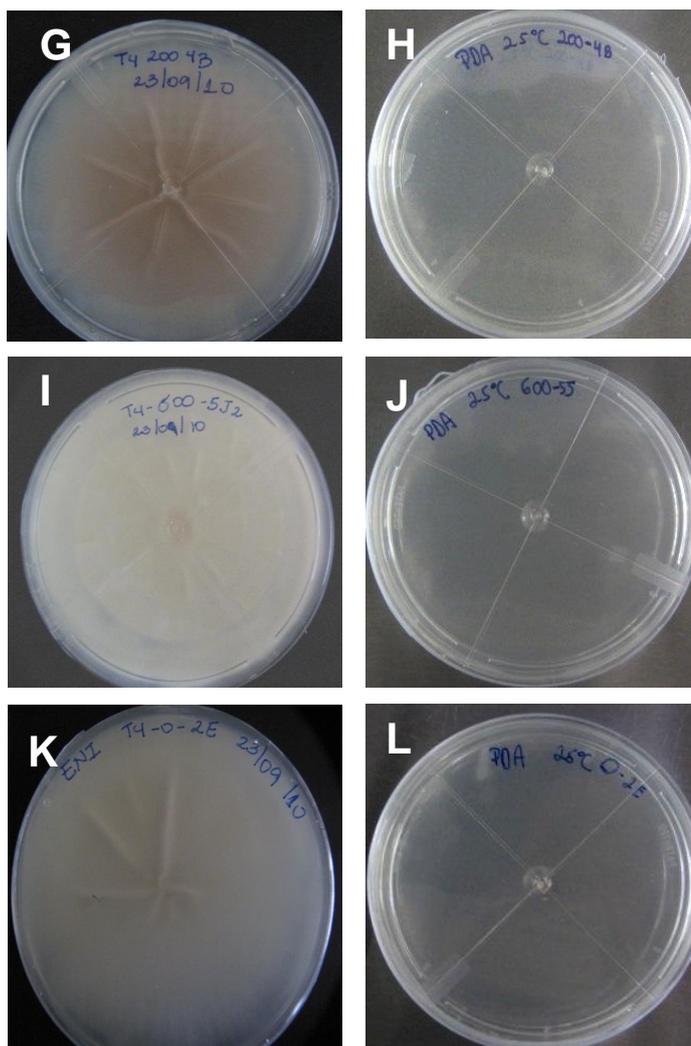


Figura 13. Crecimiento de microhongos psicrotrofos por 30 días en PDA, aislados de la transecta 4: **A)** *Geomyces* a 4 °C; **B)** *Geomyces* a 25 °C; **C)** Levadura a 4 °C; **D)** Levadura a 25 °C; **E)** *Penicillium* a 4 °C; **F)** *Penicillium* a 25°C; **G)** *Hyphomyceto 2* a 4 °C; y **H)** *Hyphomyceto 2* a 25 °C.

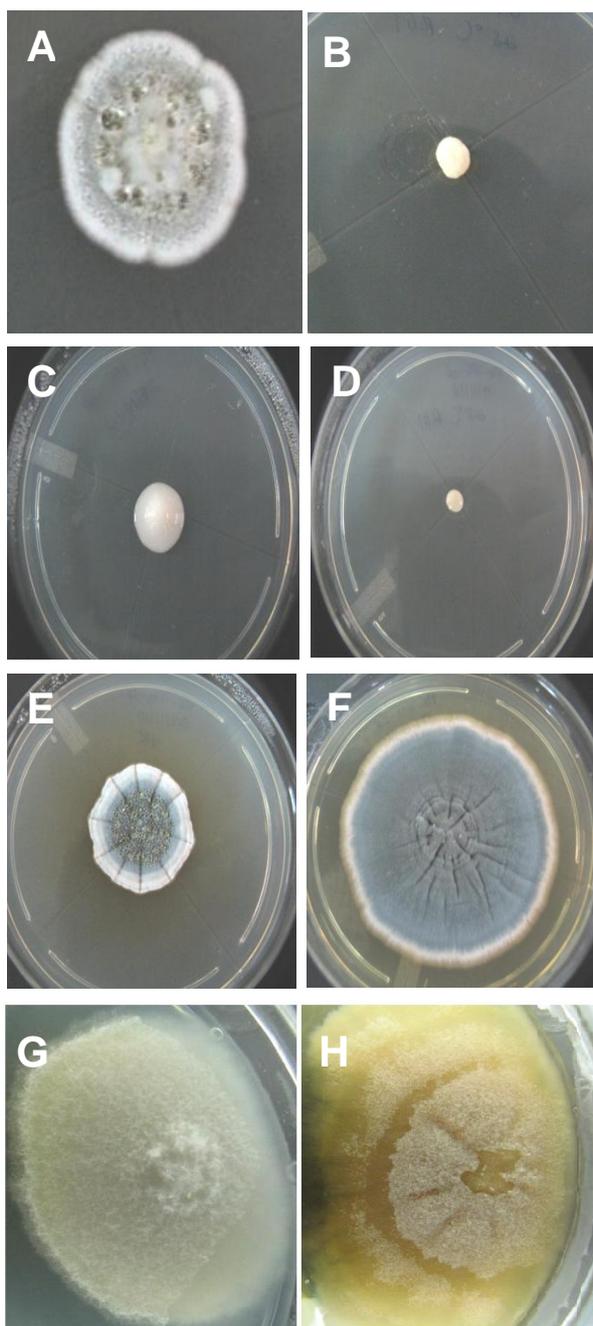
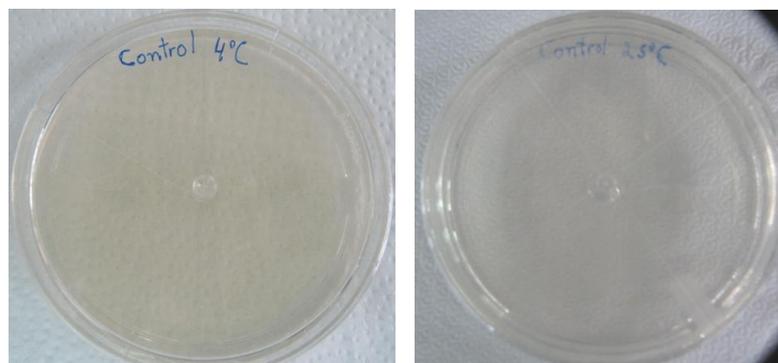


Figura 14. Control del medio PDA en cámara de flujo a 4 °C y 25 °C después de 30 días de incubación.



Varios reportes implican a las aves migratorias como posibles vectores para el transporte de hongos psicrotrofos o mesófilos al continente antártico (46, 47). Sin embargo, este tipo de clasificación puede variar de acuerdo al medio de cultivo utilizado. El hongo terrestre *Thelebolus microsporus*, previamente catalogado como psicrófilo, muestra características de crecimiento de hongos psicrotrofos en medio cultivo con agua de mar (48).

4.3 Identificación de Microhongos

Un total de 213 hongos fueron aislados, agrupándose en 4 géneros: *Antarctomyces*, *Thelebolus*, *Geomyces*, *Mucor*; dos hongos imperfectos denominados *Hyphomycetos*, y una Levadura.

4.3.1 Familia: Thelebolaceae

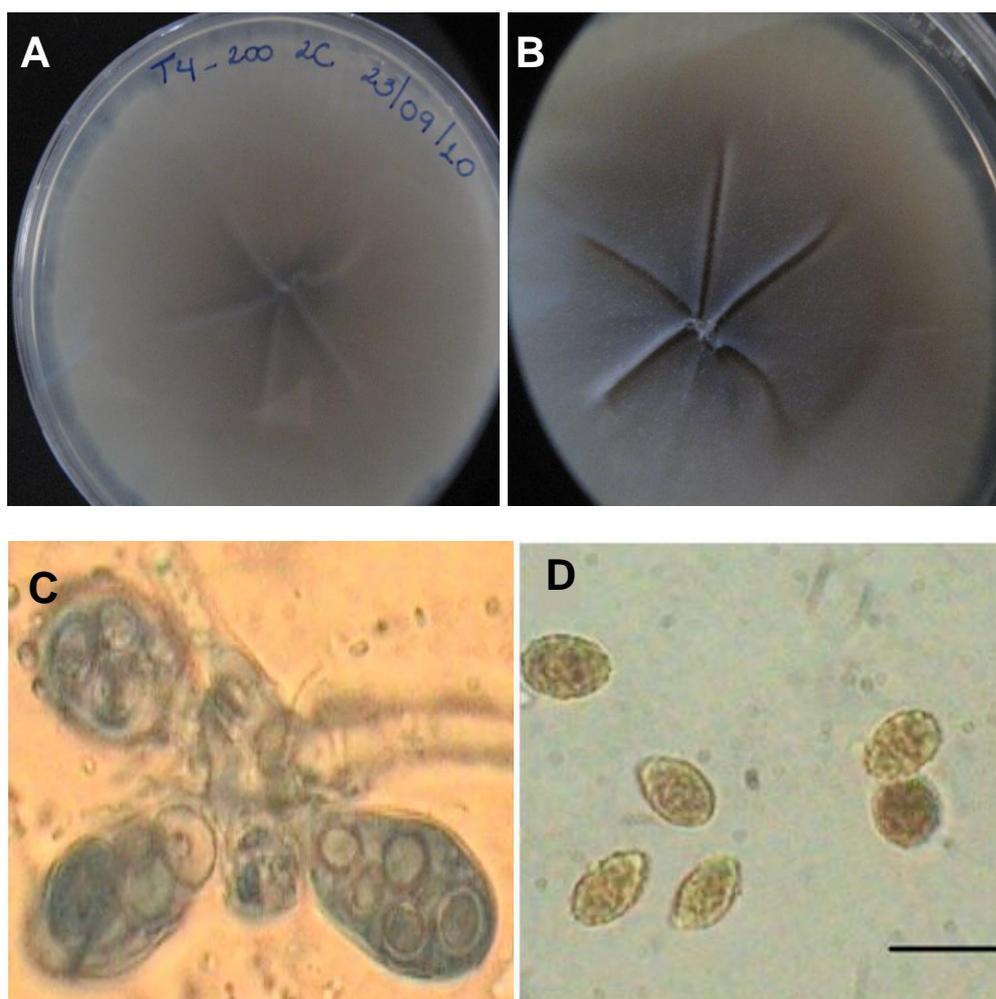
Pertenecen al Phylum Ascomicota. Este Phylum se caracteriza por ser el más diverso en el reino fungi. Aproximadamente 32.000 especies han sido reportadas (49). Una característica de los hongos de este Phylum, con excepción de las Levaduras, es la presencia de hifas septadas, además de poseer una estructura reproductora denominada asca que contiene a las esporas, denominadas ascosporas. Esta familia tiene 8 ascosporas por asca aproximadamente (50).

4.3.1.1 Genero: *Antarctomyces*, Stchigel, 2001

Posee hifas septadas y ramificadas. Todas sus estructuras microscópicas son hialinas o transparentes. Sus ascomas son aparentemente rudimentarios, y puede contener de 2 a 7 ascas (46). Sus ascas son desnudas, sin excípulo, es decir sus ascosporas no están englobadas por tejido de protección. Tienen forma elipsoidal o esférica. Estos contienen 8 esporas que son también de forma esférica o elipsoidal (51).

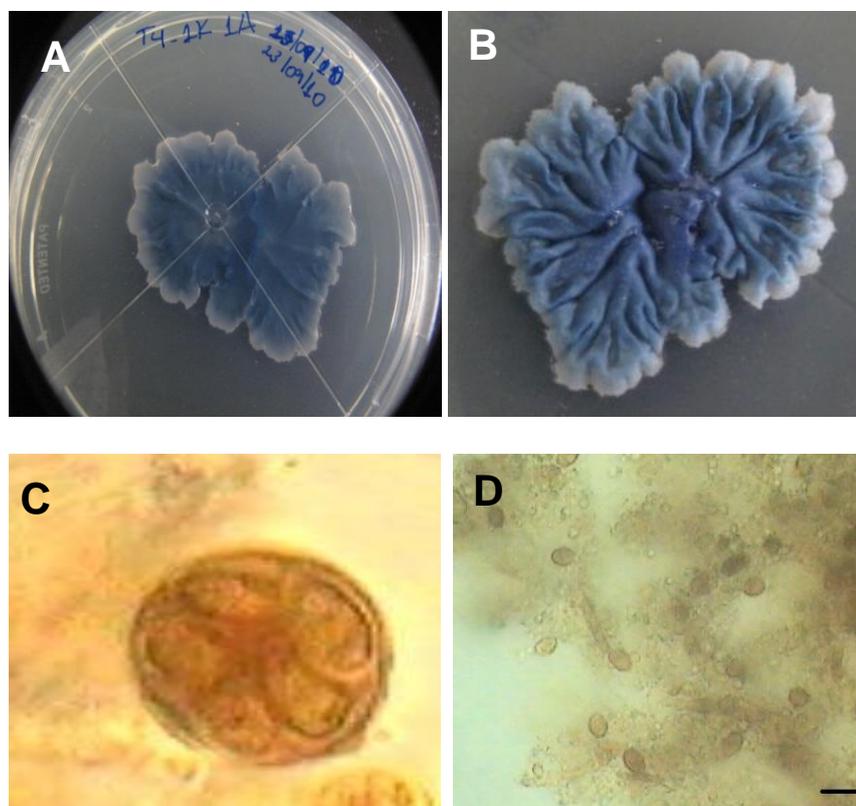
Los resultados obtenidos en este proyecto, demostraron que en un inicio el micelio es blanco y después de 30 días aproximadamente adquiere una tonalidad azul. Se encontraron dos variantes: Una denominada *Antarctomyces sp1*, que se caracterizó por tener un micelio de 33 mm de diámetro a los 6 días de cultivo (Fig 15 A y B), y un asca elipsoidal (Fig. 15 C), en donde estuvieron contenidas esporas elipsoidales con un tamaño de 5,4 a 7,5 μ , medidas desde su diámetro más largo (Fig. 15 D).

Figura 15. Especie *Antarctomyces sp1* en medio PDA a 4 °C: A) Micelio bajo el medio; B) Micelio encima del medio; C) Ascospores; y D) Esporas. Barra (10 μ).



La especie *Antarctomyces sp2* se caracterizó por formar un micelio irregular de consistencia dura y de color azul intenso, con un diámetro de 17 mm a los 6 días de crecimiento (Fig. 16 A y B). Sus ascas tuvieron forma esférica, con esporas elipsoidales de 5,5 a 6,5 μ (Fig. 16 C y D). Todas las variantes de *Antárctomyces* sólo crecieron a 4 °C, por lo que se los consideró microhongos psicrófilicos.

Figura 16. Especie *Antarctomyces sp2* en medio PDA a 4 °C: A) Micelio bajo el medio; B) Micelio encima del medio; C) Asco; y D) Esporas. Barra (10 μ).



4.3.1.2 Genero *Thelebolus*

Posee hifas septadas, sus esporas son elipsoidales y hialinas. Los ascomas de este género pueden contener de 1 a 80 ascas y de 8 a 2.000 ascosporas (52).

La especies encontradas fueron: *Thelebolus microsporus* y *Thelebolus sp1*. La primera cepa presentó una coloración crema o café claro, en el centro una coloración naranja clara, y escaso micelio aéreo (Fig. 17 A y B). El tamaño del micelio fue de 20 mm a los 6 días en PDA a 4 °C. Sus ascomas estaban dispersos por todo el micelio en forma de granos de tierra en la cual estaban contenidas las ascas, y en cada uno estas se encontraron 8 ascosporas, con un tamaño de 6 a 7 μ por spora (Fig 17 C). Esta observación coincide con el reportado de Leota *et al.*, 2002 (53).

La especie *T. sp1*. se caracterizó por presentar una coloración crema rojiza y café claro o naranja pálido en el centro y fue casi inexistente el micelio aéreo (Fig. 18 A y B). Su micelio tuvo una diámetro de 23 mm en 6 días, y sus esporas presentaron un diámetro de 6 a 7 μ (Fig.18 C y D).

Figura 17. Especie *T. microsporus* en medio PDA a 4 °C: A) bajo el medio; B) encima del medio; y C) Ascos y esporas vistos a 40 x. Barra (15 μ).

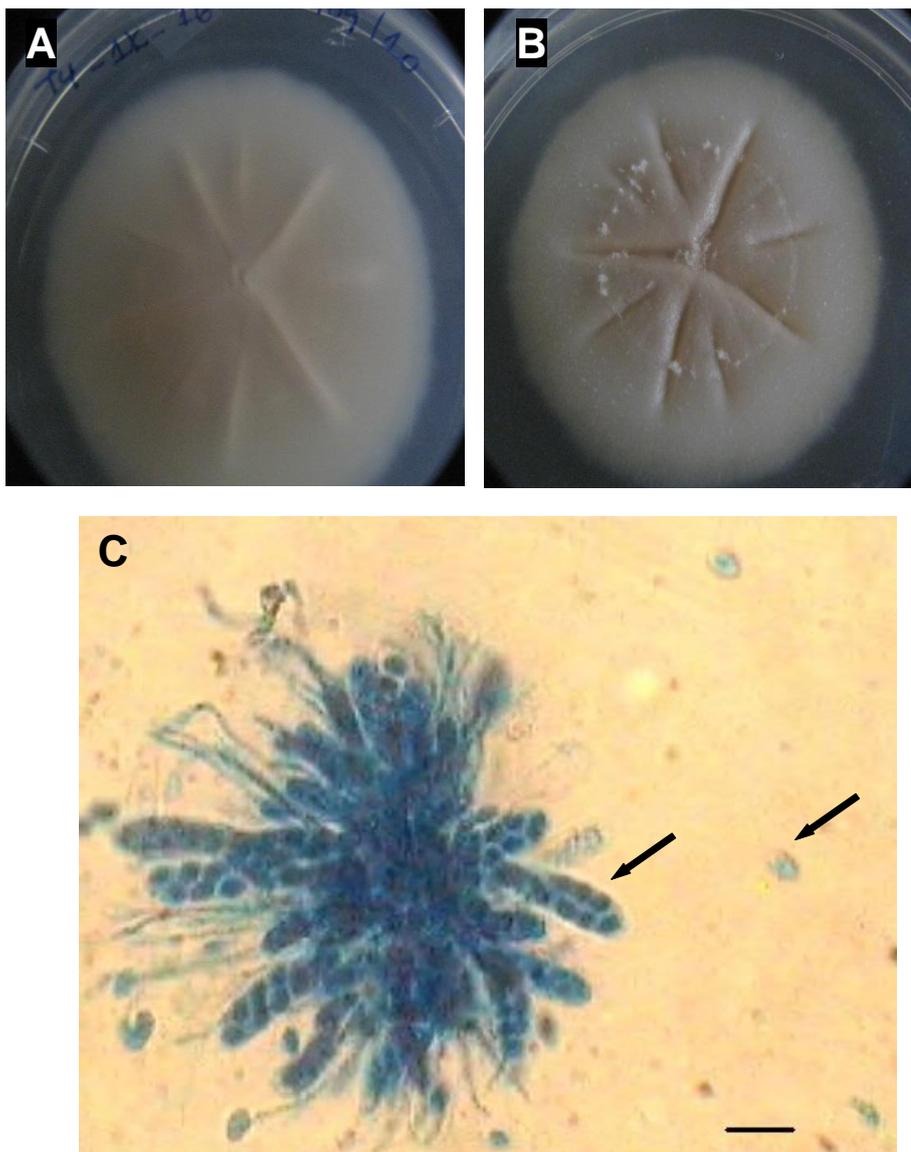
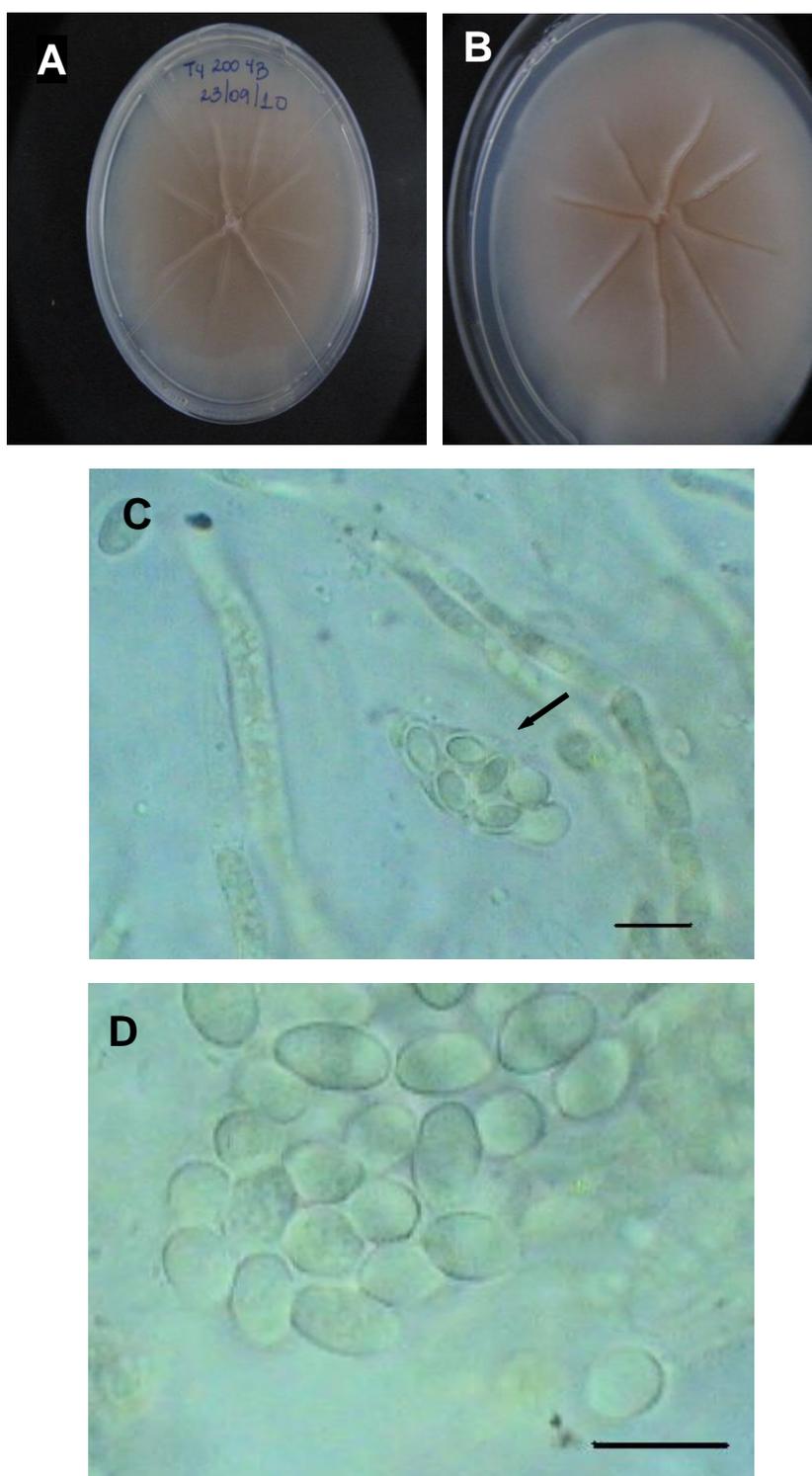


Figura 18. Especie *T. sp1* en medio PDA a 4 °C: A) bajo el medio; B) encima del medio; C) Asco visto a 100 x (Flecha); y D) Esporas Vistas a 100 x. Barra (15 μ).



4.3.2 Familia: Myxotrichaceae. Currah (1985)

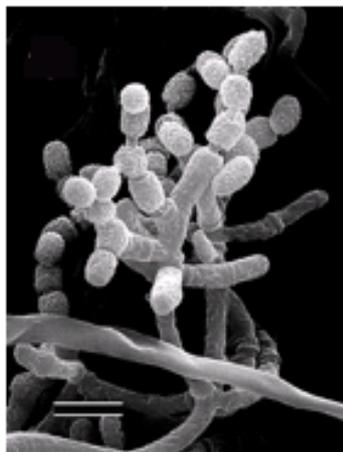
Esta familia pertenece al Phylum ascomicota y se caracteriza por tener habilidades celulíticas. Presenta características filamentosas, desarrollando colonias pulverulentas con presencia de hifas septadas o no. Algunos de sus miembros pertenecen al grupo de hongos imperfectos porque se desconoce su fase sexual (16).

4.3.2.1 Género: *Geomyces*

Una de las características de este género es la presencia de conidióforos que son la parte del micelio que sostiene y da origen a las conidias, denominadas artroconidias (16, 54). El conjunto de artroconidias y conidióforos forman ramificaciones (Fig. 19). Las artroconidias tienen forma navicular al desprenderse de su ramificación.

En el presente trabajo este género mostró una coloración café claro o café oscura. Presentó hifas aéreas en forma de algodón con ciertas diferencias observadas entre especies del mismo género.

Figura 19. Ramificaciones. Fuente: Tsuneda (2004) (54).



Estas variantes mantuvieron sus diferencias durante el desarrollo del proyecto, por lo que se consideraron dos especies distintas del género *Geomyces*.

La especie *G. sp1*. presentó una coloración café oscura bajo el medio e hifas aéreas en forma de algodón (Fig. 20 A y B). *G. sp2*. presentó una coloración café claro bajo el medio e hifas aéreas en forma de césped blanco (Fig. 20 C y D). A pesar de mantener estas diferencias, presentaron las mismas estructuras microscopicas (Fig. 21). Su micelio tuvo un crecimiento de 10 mm a los 6 días, y sus arthroconidias tuvieron un rango de tamaño de 3,2 a 4,5 μ .

Figura 20. Género *Geomyces* en medio PDA a 4 °C alrededor de 20 días de incubación. *G. sp1*: A) bajo el medio; y B) encima del medio. *G. sp2*: C) bajo el medio; y D) encima del medio.

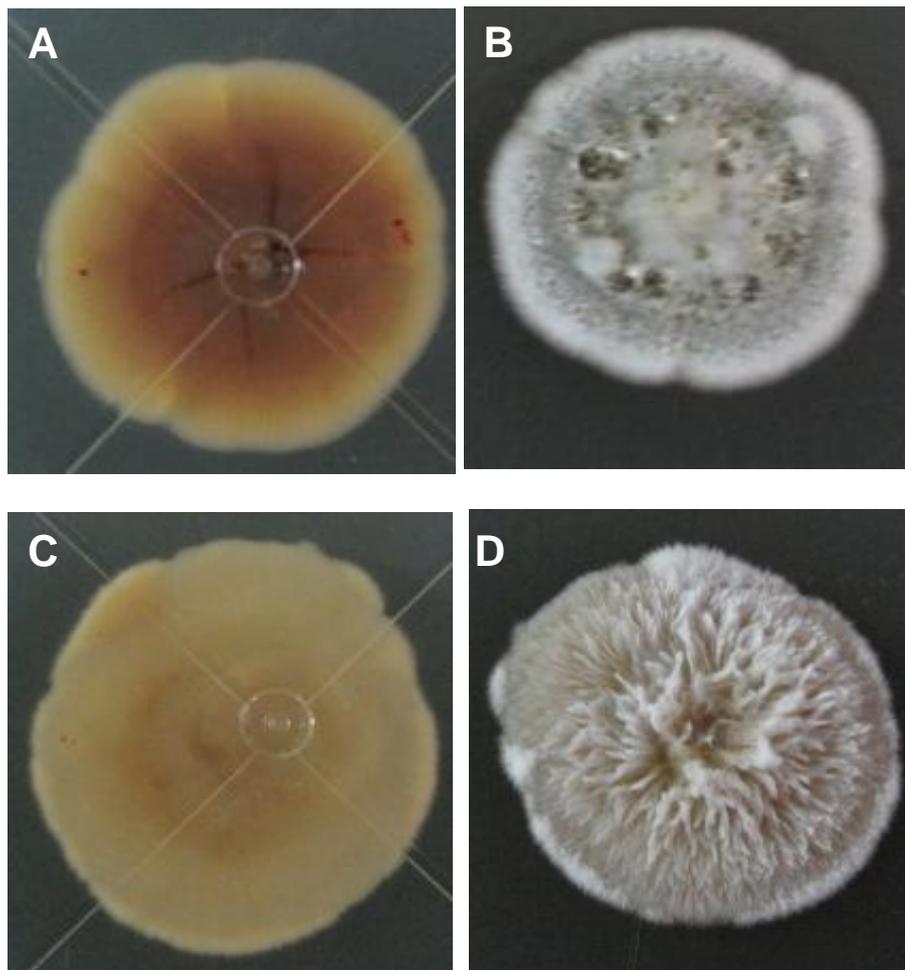
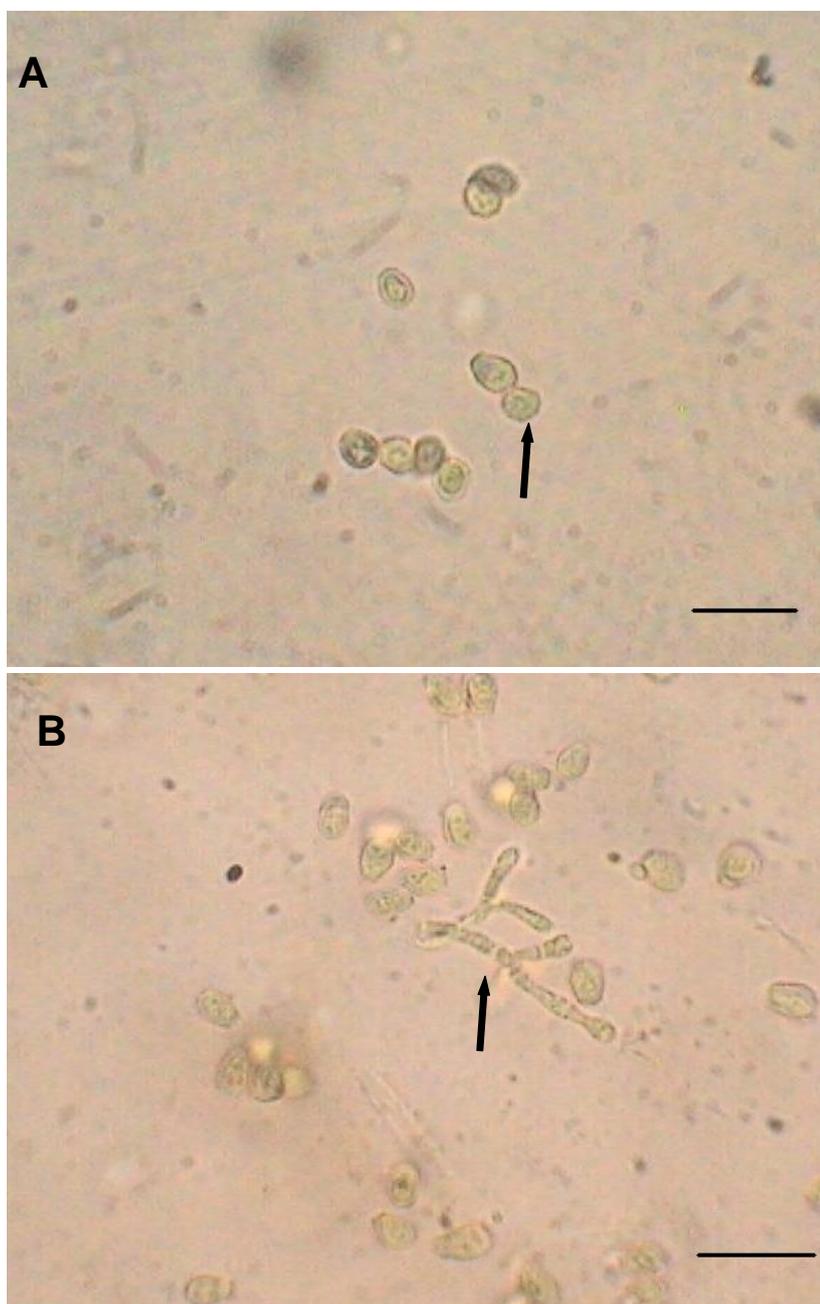


Figura 21. Artroconidias y conidióforos del Género *Geomyces* Vistos a 100x.

Barras (10 μ): A) Artroconidias(flecha); y B) Conidioforos (flecha)



Este género presentó crecimiento a 25° C, y su crecimiento fue evidentemente menor que a 4 °C. Por lo que se lo consideró psicrotrofo, lo que coincide con reportes previos (16, 55).

Este género ha sido aislado del suelo, plumas y guano de aves, musgos, algas y líquenes, presentes en distintas regiones de la Antártida (23, 56). Debido a la amplia distribución y abundancia del género *Geomyces*, se ha sugerido que se traten de microhongos propios de Antártida, a pesar de ser un género psicrotrofo (57).

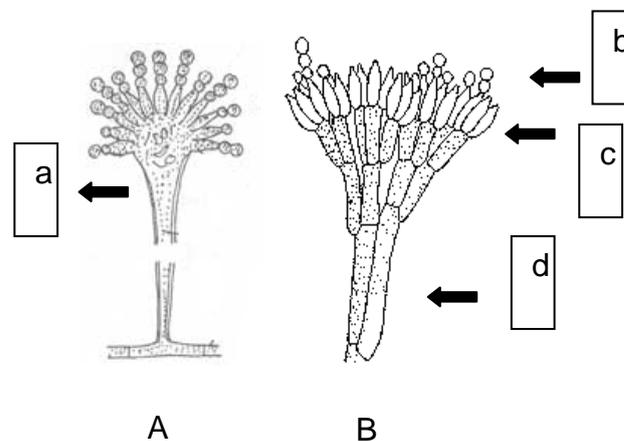
4.3.3 Familia Trichocomaceae

Esta familia es otra de las integrantes del gran Phylum Ascomycota. En esta familia se encuentran los dos géneros más abundantes de hongos anamórficos: *Aspergillus* y *Penicillium* (58). Muchos de sus miembros son importantes descomponedores de alimentos (59). Algunas de las características microscópicas de esta familia son: La presencia de hifas septadas hialinas y de conidióforos que pueden o no

terminar en una vesícula. De los conidióforos nacen hileras de fialides que dan origen a los conidios. Esta estructura les da una apariencia de brocha (60) (Fig 22 A y B).

Figura 22. Esquema de la morfología de Trichocomaceae típicos. A) *Aspergillus*, mostrando una vesícula dilatada (a). B) *Penicillium* mostrando sus Conida (b), Fialides (c), y Conidioforos (d). Fuente Samson *et al.*, 1984.

(56)



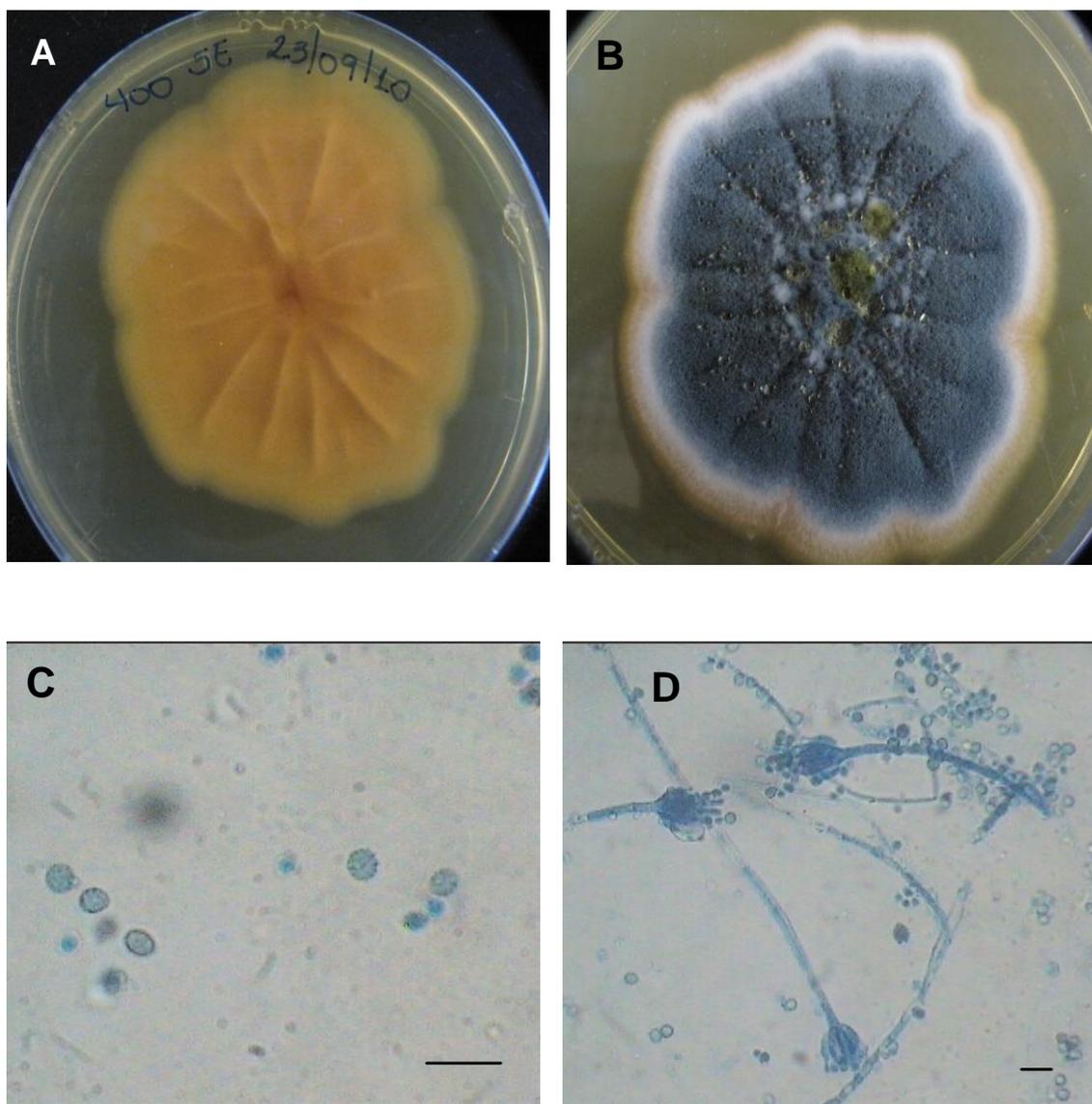
4.3.3.1 Género *Penicillium*

Posee hifas septadas hialinas y conidióforos con ausencia de vesícula en su sección terminal. Los conidióforos dan origen a una hilera de fialides, y de esta se originan las conidias. Esta estructura les da una apariencia de brocha (60) (ver Fig 22 B).

Este género presentó una coloración amarillo intensa bajo el medio y una coloración azul marino con bordes blancos sobre el medio. Su micelio tuvo un crecimiento de 24 mm a los 6 días, y sus artroconidias tuvieron un rango de tamaño de 3,5 a 4,6 μ (Fig. 23).

Se identificó sólo una cepa con estas características. Creció tanto a 4 °C como a 25 °C por lo que se lo consideró psicrotrofo, a pesar de crecer mejor a 25 °C. Esto coincide con algunos reportes de este género, donde se indica que puede crecer a 5°C, pero su temperatura de crecimiento óptima se encuentra alrededor de los 20 °C (61 - 63).

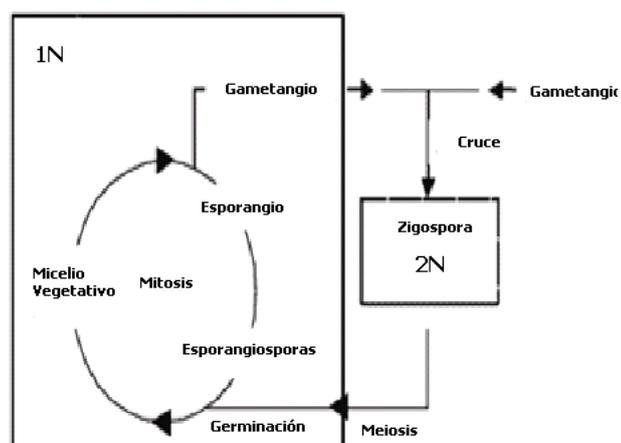
Figura 23. Género *Penicillium* en medio PDA a 4 °C alrededor de los 20 días de incubación: A) bajo el medio; B) encima del medio; C) Esporas vistas a 100 x; y D) Conidióforos vistos a 40 x. Barras (10 μ).



4.3.4. Familia Mucoraceae

Esta familia pertenece al Phylum *Zygomycota* y al Orden de los Mucorales. El Phylum *Zygomycota* posee aproximadamente 900 especies. Se caracterizan por tener zigosporas, formadas de un zigosporangio después de la fusión de dos hifas especializadas, llamadas gametangias, durante el ciclo sexual (64) (Fig 24). Una sola zigospora es formada a partir del zigosporangio. Esta zigospora normalmente tiene una pared gruesa (64). Otra característica importante es que sus hifas son cenocíticas o sin tabiques (65). Además esta familia al igual que el resto de familias del orden de los Mucorales se caracteriza por crecer rápidamente en PDA (66).

Figura 24. Esquema del ciclo sexual generalizado del Phylum *Zygomycota*. Fuente: James *et al.* (61).



Se podría considerar al grupo ecológicamente más diverso ya que se lo puede encontrar como saprófitos en diferentes sustratos tales como frutas, suelo, y estiércol. También se presentan como inofensivos hospederos en los artrópodos, en interacciones mutualistas con plantas y como patógenos en animales, plantas, así como en otros hongos (67).

4.3.4.1 Genero *Mucor*

Es el género más grande del Orden de los Mucorales, conteniendo 60 especies (68). Muchas de las especies pertenecientes a este género son saprófitas, principalmente descomponedoras de materia orgánica. Pocas especies son patógenas de plantas y animales (68). Forman delicados filamentos tubulares con zygosporangios esféricos, en los cuales están contenidas las esporangiosporas (16) (Fig. 25).

Se encontró una sola variante a la que se denominó *Mucor sp.* Mostró una coloración blanquecina bajo y sobre el medio de agar (Fig. 26).

Figura 25. Morfología del Género *Mucor*: A) Zygosporangio; y B) esporangiosporas. Fuente Bailey *et al.*, 2007 (69)

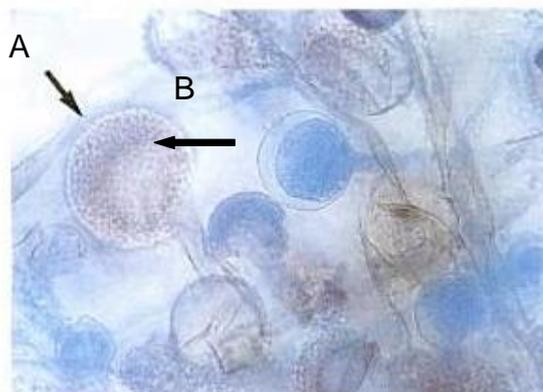
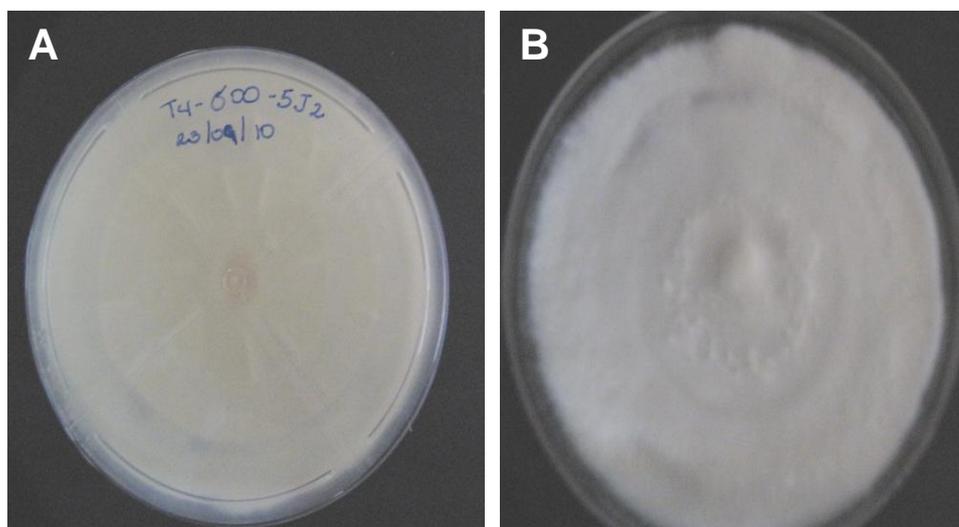


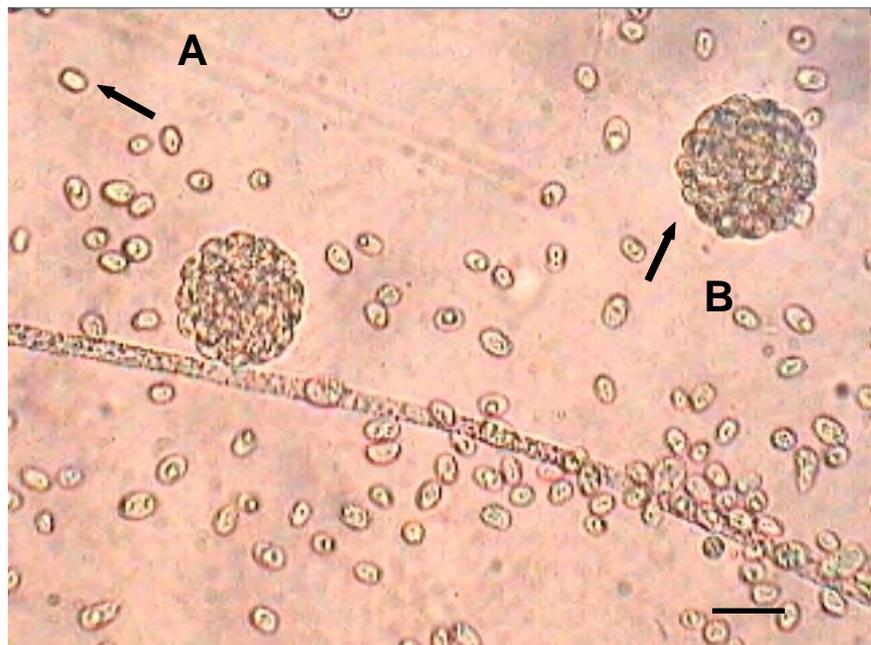
Figura 26. Género *Mucor* en medio PDA a 4 °C alrededor de los 30 días de incubación: A) bajo el medio; y B) encima del medio.



Se observó también hifas aéreas que se extendían hasta la tapa, llegando incluso a cubrirla totalmente

El tamaño del micelio fue de 41 mm, a los 6 días de crecimiento, y sus esporas tuvieron un diámetro de 6,8 a 7,8 μ (Fig. 27).

Figura 27. Esporangiosporas y Zigosporangios de la especie *Mucor* sp.; A) Esporangiosporas; y B) Zigosporangios. Barra (12 μ).



4.3.5 Hyphomycetos

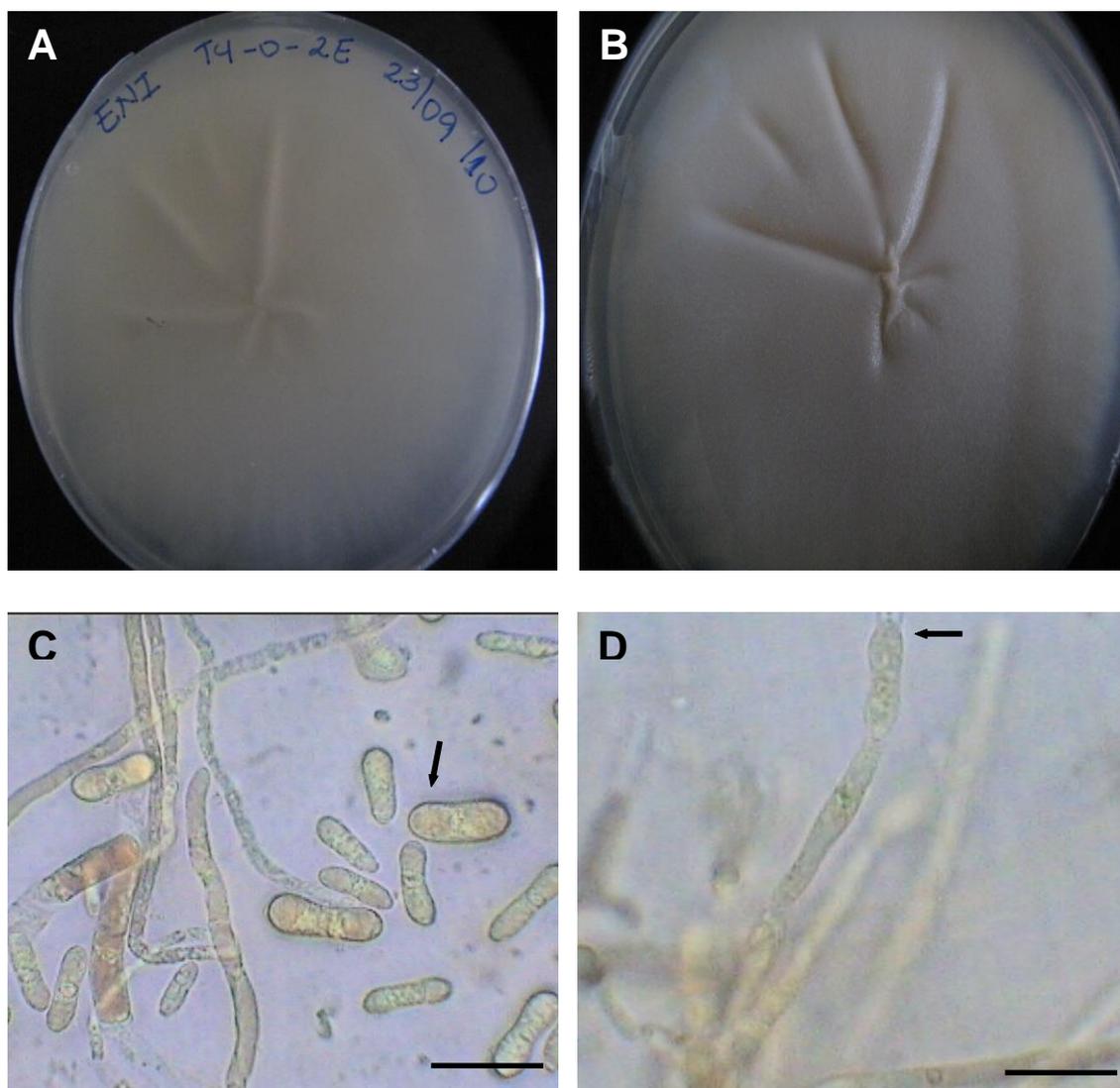
Esta clase pertenece a un grupo llamado Deutoromicota u hongos imperfectos. Estos se caracterizan por presentar una reproducción asexual por mitosis (70).

-

Los Hyphomycetos tienen forma micelial y poseen conidias nacidas directamente de las hifas llamadas conidióforos. Sus conidias pueden ser formadas individualmente o en forma grupal (70).

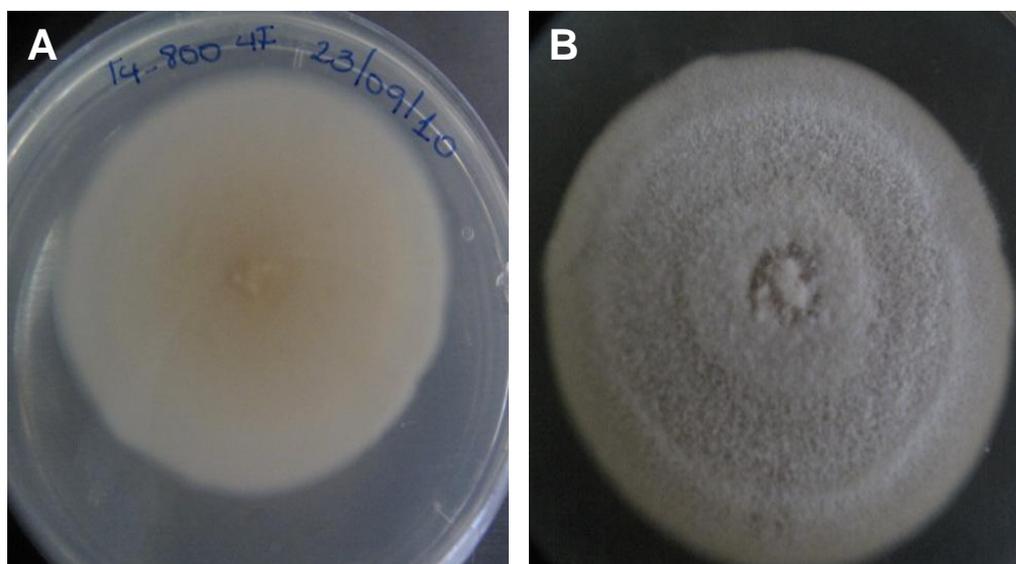
En el presente estudio se encontró dos hongos imperfectos que no se los pudo agrupar dentro de la clasificación ordinaria de Phylums: Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota. A estos hongos se los denominó Hyphomyceto 1 e Hyphomyceto 2. Los dos hongos tienen una coloración similar del micelio. Sin embargo difieren en algunos aspectos: El Hyphomyceto 1 presentó una coloración del micelio blanquecina bajo y sobre el agar, con un tamaño de 25 mm a los 6 días de crecimiento en PDA a 10 °C (Fig. 28 A y B). Sus hifas y esporas son septadas. El tamaño de sus conidias o esporas fue de 8,8 a 14,6 μm (Fig. 28 C y D). No presentó crecimiento a 25 °C, por lo que se lo considera psicrófilico.

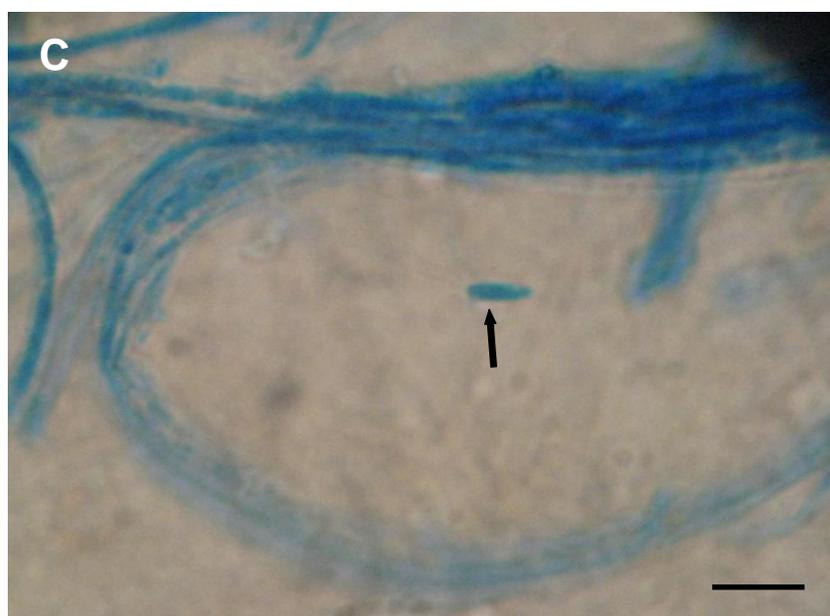
Figura 28. Hyphomyceto 1 en medio PDA a 4 °C a los 20 días de incubación: A) bajo el medio; B) sobre el medio; C) Conidias (Flecha); y D) Brote de conidia (Flecha). Barras (12 μ).



El hyphomyceto 2 presentó una coloración melón, con hifas aéreas al inicio del aislamiento. Sin embargo, al repicarla una y otra vez, su coloración melón se fue perdiendo y cambió a una coloración blanquecina (Fig. 29 A y B).. Este hongo presentó un crecimiento de 22 mm a los 6 días. El tamaño de sus conidias fue de 5,4 a 6 μm (Fig. 29 C y D).

Figura 29. Hyphomyceto 2 en medio PDA a 4 °C, a los 20 días de incubación: A) bajo el medio; B) sobre el medio; C) Conidias teñidas con azul de lactofenol; D) Conidióforo (1) y Brote de Conidia (2); Barra (9 μ).





4.3.6 Levadura

Las Levaduras son organismos unicelulares que pueden pertenecer al grupo de los Ascomycetos, Basidiomycetos, y también al grupo de los Deutoromycetos (59).

La especie que se encontró en el presente trabajo, presentó una coloración blanca de aspecto cremoso, con un diámetro de 9 mm a los 6 días (Fig. 30). El tamaño de sus esporas tuvo un rango de 2,6 a 3,1 μm , con una coloración verdosa a los 30 días (Fig. 31). Creció también a 25 °C. Sin embargo su crecimiento fue menor, por lo que se lo catalogó como psicrótrofo.

Figura 30. Levadura en PDA a 4 °C: A) bajo el medio; y B) sobre el medio.

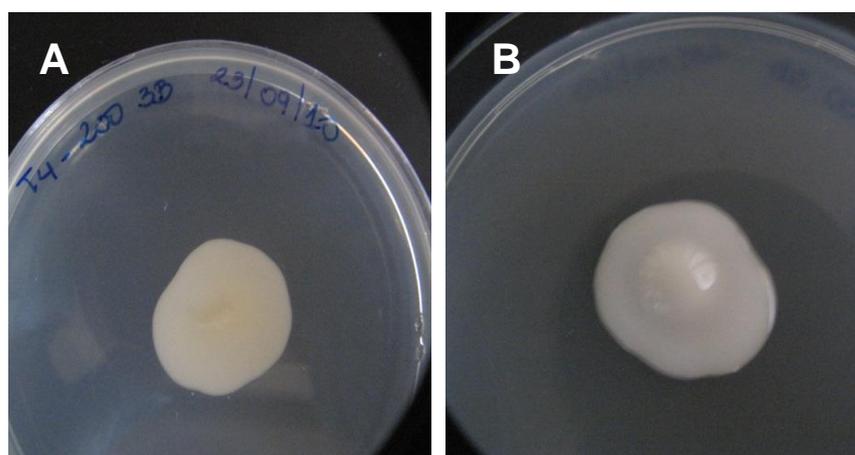
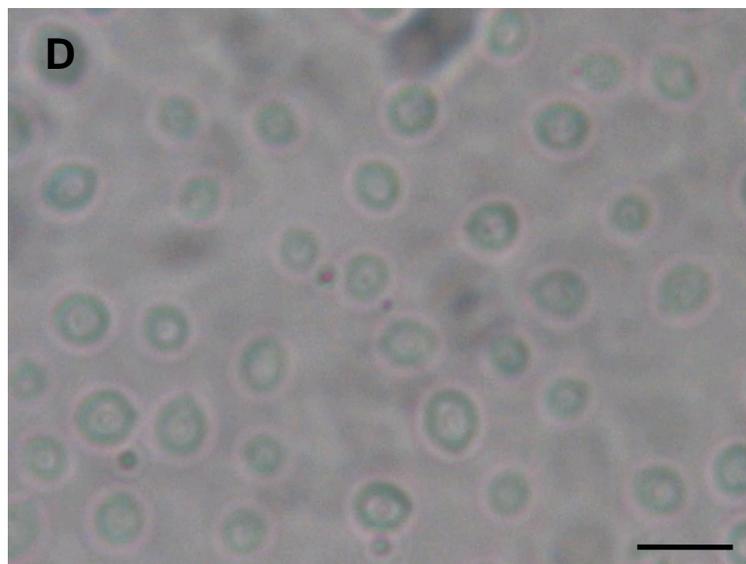
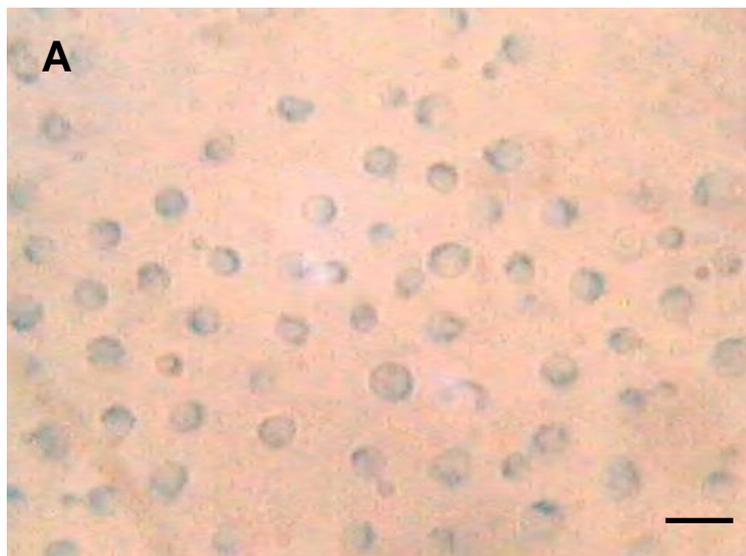


Figura 31. Esporas de Levadura: A) Esporas teñidas con azul de lactofenol; y B) Esporas sin teñir con coloración verduzca. Barras (5 μ).



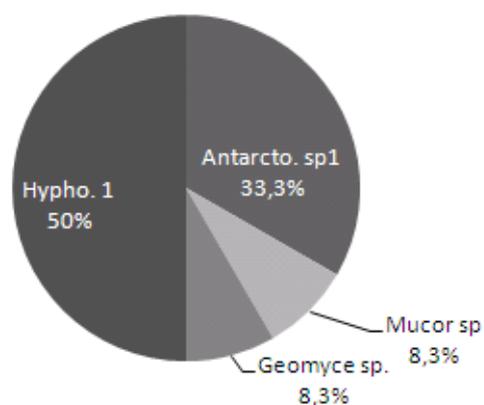
4.4 Porcentaje de Ocurrencia de las especies identificadas

El análisis de Ocurrencia se lo realizó para estimar la predominancia de las especies por punto de muestreo bajo las condiciones de cultivo utilizadas. La fórmula para este cálculo fue:

$$= \frac{\text{Total de microhongos por especie}}{\text{Total de microhongos encontrados}} \times 100$$

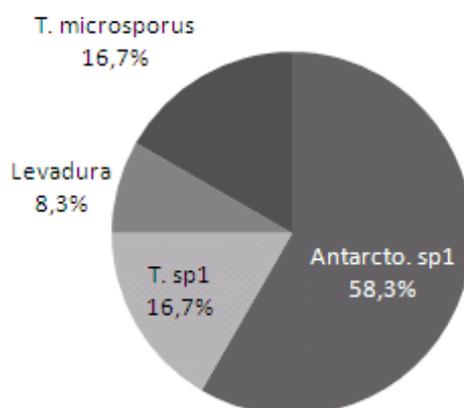
En el punto 0 se encontró como especie representativa al microhongo *Hyphomyceto 1*, conformando el 50% de la población, seguido por *Antarctomyces sp1*, con el 33,3%, *Mucor sp.* con el 8.3% y *Geomyces sp.* con el 8.3% (Fig. 32).

Figura 32. Porcentaje de ocurrencia de microhongos aislados en GIT4 - 0



En el punto 200, la especie representativa fue *Antarctomyces sp1*. con 58,3%, seguidos por *T.microsporus* y *T. sp1*. con el 16,7%. Se debe indicar que, sólo en este punto se encontró a la Levadura con un 8,3% (Fig. 33).

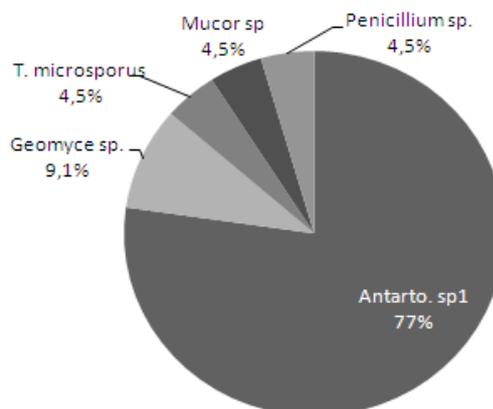
Figura 33. Porcentaje de ocurrencia de microhongos aislados en GIT4 - 200



En el punto 400 la especie representativa fue también *Antarctomyces sp1*. con el 77%, seguido por *Geomyces sp.* con el 9% de ocurrencia. Además se encontraron las especies *Penicillium sp.*, *Mucor sp.*, y *T. microsporus*, cada una con el 4,5%. Cabe recalcar que solamente en este punto se encontró a la especie *Penicillium sp.* (Fig. 34).

Figura 34. Porcentaje de ocurrencia de microhongos aislados en GIT4

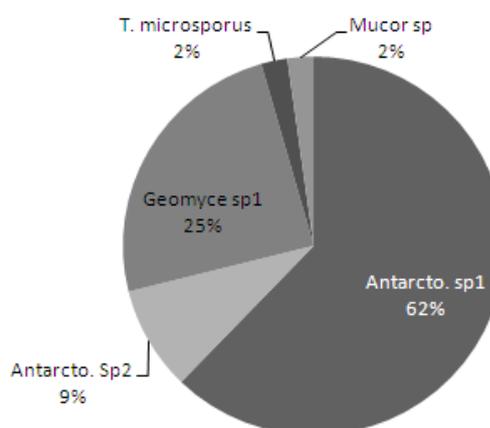
- 400



En el punto 600 se encontró, nuevamente predominó la especie *Antarctomyces sp1.*, lo que coincide con los primeros puntos de muestreo. La especie *Geomyces sp.* mostró 25% de ocurrencia, el *T. microsporus* y *Mucor sp.* con 2% cada una. Además se encontró por primera vez al microhongo *Antarctomyces sp2.* con el 9% de ocurrencia (Fig. 35).

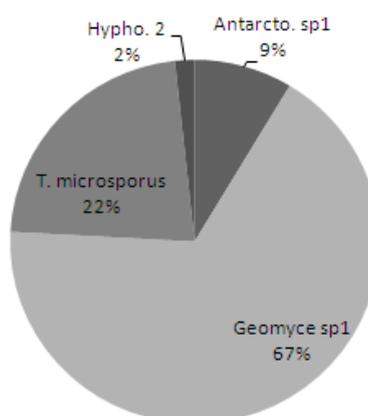
Figura 35. Porcentaje de ocurrencia de microhongos aislados en GIT4

- 600



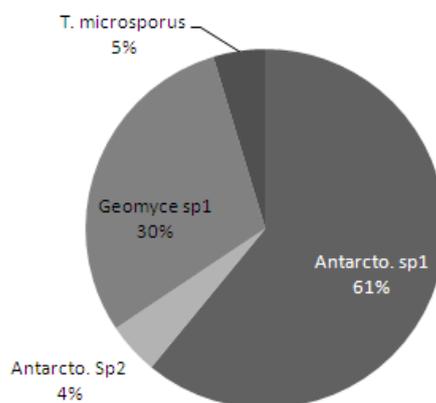
En el punto 800, a diferencia de los puntos anteriores, la especie dominante fue *Geomyces sp.* con un 67%, seguido por el microhongo *T. microsporus* con el 22% y *Antarctomyces sp1.* con el 9%. El hongo *Hyphomyceto 2* presentó una ocurrencia del 2%, apareciendo por primera vez en las muestras realizadas (Fig. 36).

Figura 36. Porcentaje de ocurrencia de microhongos aislados en GIT4 - 800



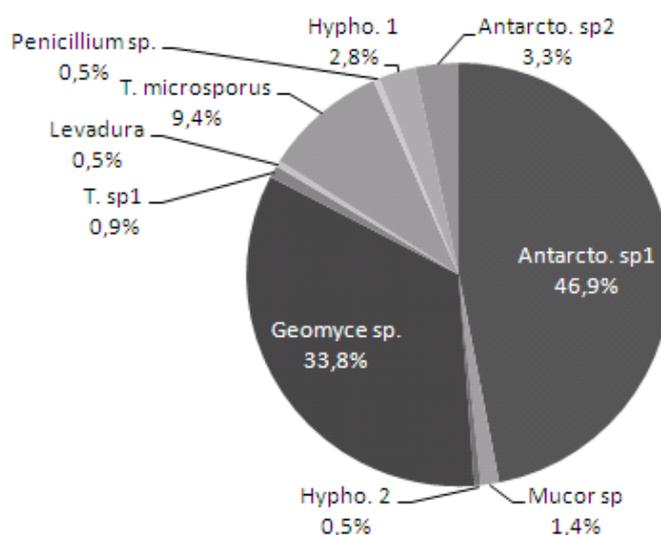
En el último punto de muestreo, 1K, se mantuvo la predominancia del microhongo *Antarctomyces sp1*, representando el 61% de la población, seguido por la especie *Geomyces sp.* con el 30%, *T. microsporus* con el 5% y *Antarctomyces sp2* con el 4% (Fig. 37).

Figura 37. Porcentaje de ocurrencia de microhongos aislados en GIT4 - 1K



En el análisis de todas los puntos de muestreo se observó predominancia de la especie *Antarctomyces sp1*, correspondiendo al 46,9%, seguido por *Geomyces sp.* con el 33,8 %, *T. microsporus* con el 9,4 %, *Antarctomyces sp2* con el 3,3%, *Hyphomiceto 1* con el 2,8%, *Mucor sp.* con el 1,4%, *T. sp1* con el 0,9%, *Penicillium sp*, y la Levadura e *Hyphomiceto 2* con el 0,5% cada una. Las especies que sólo aparecieron una vez fueron los microhongos *Hyphomyceto 2* y *Penicillium sp.* (Fig. 38 y Anexo C).

Figura 38. Porcentaje global de ocurrencia de los microhongos aislados en todas las muestras de suelo



4.5 Potencial de los microhongos como controladores biológicos

Se realizaron 3 pruebas bacteriostáticas (bioensayos) con 11 cepas fúngicas representativas para el proyecto de tesis (Tabla iii). Los hongos fueron expuestos a 6 bacterias patógenas humanas, aisladas de muestras clínicas. Cuatro bacterias Gram -: *Escherichia coli* (*E.coli*), *Klebssiella pneumoniae*, *K. pneumoniae 1* y *K. pneumoniae 2*. Estas dos últimas presentan resistencia a algunos antibióticos (ver

anexo G y H). También se probaron dos bacterias Gram +: *S. aureus* y *E. faecalis*.

Tabla iii. Especies y códigos de microhongos Antárticos usados para las pruebas de control biológico frente a bacterias.

Microhongos	Codificación del Aislado
<i>Antarctomyces sp1</i>	200-2C;400-3D
<i>Antarctomyces sp2</i>	1k-1A
<i>Geomyces sp1</i>	0-2d
<i>Geomyces sp2</i>	800-1k
<i>Thelebolus microsporus</i>	800-1B;800-2A;800-5A; 1k-1G, 800-1A
<i>Thelebolus.sp1</i>	200-4B
<i>Hyphomyceto 1</i>	0-2E
<i>Hyphomyceto 2</i>	800-4F
<i>Mucor sp.</i>	600-5J
<i>Levadura</i>	200-3B
<i>Penicillium</i>	400-5E

Los 3 bioensayos para observar el potencial de los hongos como controladores biológicos se detallan a continuación.

4.5.1 Bioensayo 1: Potencial bacteriostático en dos medios de cultivo: PDA y LB-agar

En este experimento se monitoreó el crecimiento de las 6 bacterias antes mencionadas, en los medios de cultivo PDA y LB-agar, y su sensibilidad frente a las cepas de microhongos *Antarctomyces sp1.* (200-2C, 400-3D), *Antarctomyces. sp2.* , *Geomyces sp1.*, *Geomyces sp2.*, *Thelebolus microsporus* (800-1B, 800-5^a, 1k-1G), *Thelebolus sp1.*, *Levadura*, *Penicillium sp.*, e *Hyphomyceto 2*, de 40 días de incubación, que se enfrentaron como se muestra en la tabla iv. Se midió el halo de inhibición producido por los microhongos y se comparó con el producido por el disco de inhibición del antibiótico cefpodoxime (Tabla iv).

Los microhongos solo inhibieron a las bacterias sembradas en medio PDA, a diferencia del antibiótico control, que inhibió a las bacterias en los dos medios utilizados, presentando un mayor halo de inhibición en el medio PDA comparado a LB-agar.

Las bacterias *K. pneumoniae1* y *K. pneumoniae 2*, las cuales son resistentes a algunos antibióticos (ver anexo G y H),

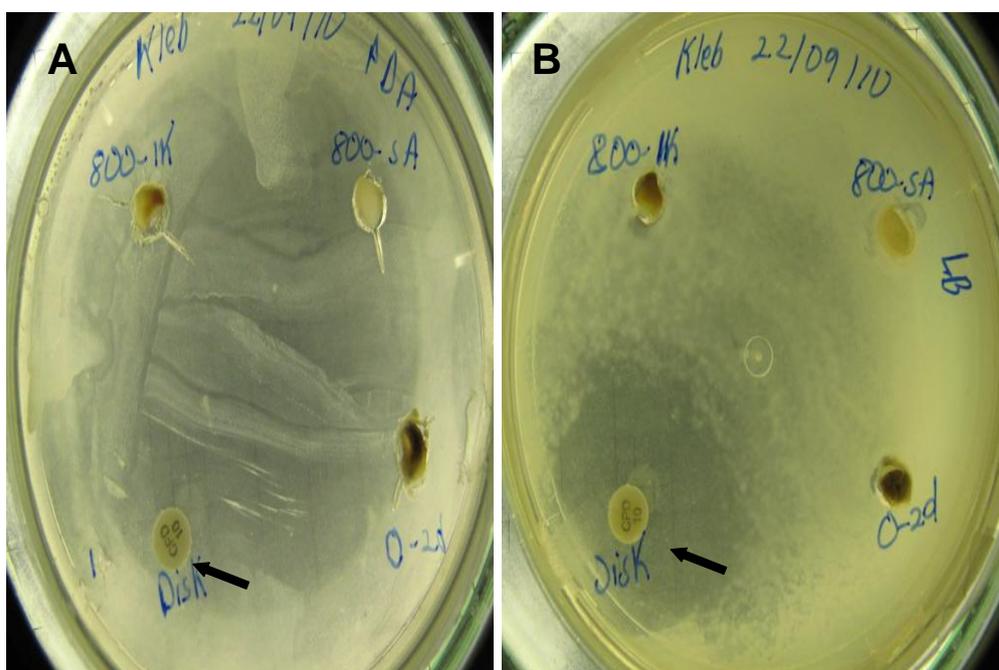
tampoco mostraron inhibición frente al antibiótico control cefpodoxima.

Las bacterias *K. pneumoniae*. y *K. pneumoniae 2* no fueron inhibidas por ningún microhongo. Sin embargo la bacteria *K. pneumoniae*. fue inhibida por el antibiótico control en los dos medios, presentando mayor susceptibilidad en medio LB-agar (ver tabla iv y Fig. 39).

Tabla iv. Respuesta bacteriostática frente a microhongos Antárticos cultivados por 40 días en medios PDA y LB-agar. Halo de inhibición en mm. Antibiótico control cefpodoxime. Los valores de inhibición de las especies con más de una cepa ensayada fueron promediadas (*T. microsporus* y *Antarctomyces sp1.*). (-) no hubo exposición a bacteria.

Medio de cultivo	Bacterias	Hongos							Antibiótico control (mm)
		Geomyces sp1. (mm)	Antarctomyces sp1. (mm)	Levadura (mm)	Penicillium sp. (mm)	Geomyces sp2. (mm)	Hypho 2 (mm)	T. microsporus (mm)	
PDA	<i>E. coli</i>	-	-	4	-	2	-	6	32
LB		-	-	0	-	0	-	0	6
PDA	<i>K. pneumoniae</i>	0	-	0	-	0	0	0	4
LB		0	-	0	-	0	0	0	10
PDA	<i>S. aureus</i>	5	0	10	0	0	0	-	39
LB		0	0	0	0	0	0	-	21
PDA	<i>E. faecalis</i>	2	-	-	-	-	0	-	25
LB		0	-	-	-	-	0	-	2
PDA	<i>K. pneumoniae 1</i>	-	-	10	-	0	-	9	0
LB		-	-	0	-	0	-	0	0
PDA	<i>K. pneumoniae 2</i>	0	-	0	-	0	0	0	0
LB		0	-	0	-	0	0	0	0

Figura 39. Estado del Halo de inhibición de la bacteria *K. pneumoniae* frente al antibiótico cefpodoxima: A) Escasa inhibición en PDA (flecha); y B) Presencia de inhibición en LB (flecha).



Las bacterias tuvieron un mejor crecimiento en el medio LB-agar que en PDA, observándose un tapizado bacteriano más denso y homogéneo (Fig. 40).

El mayor potencial de los microhongos en el medio PDA puede deberse a que este medio no es ideal para el crecimiento bacteriano, posiblemente por ser menos nutritivo (71), incapacitando su resistencia al antibiótico secretado por los microhongos (Fig. 41). Además, estos corchos con micelio pudieron haber producido mayor concentración de antibiótico en su medio y temperatura ideal al colocarlos en PDA a 4 °C por 5 días previo a la incubación de las bacterias (ver 3.5.2).

Figura 40. Diferencias de crecimiento bacteriano en PDA y LB-agar: A) PDA con tapizado bacteriano menos denso; B) LB-agar con tapizado bacteriano más denso.

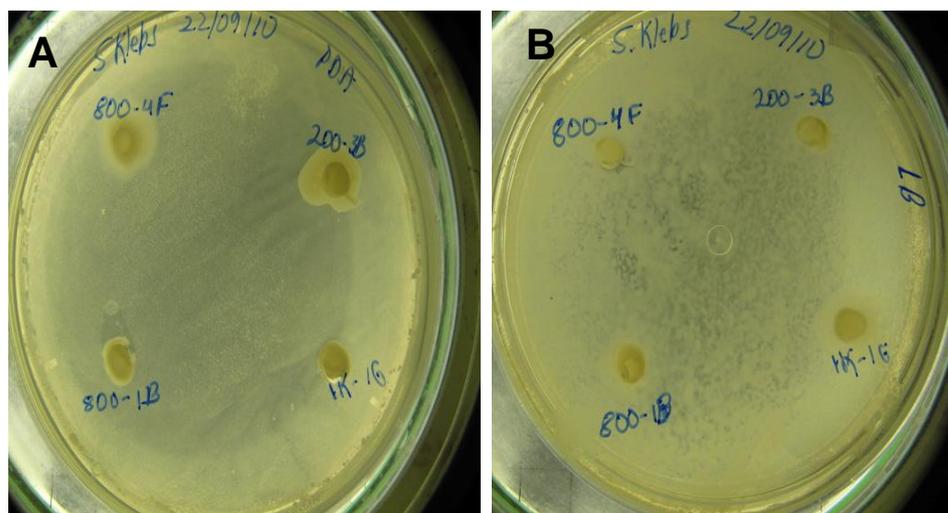
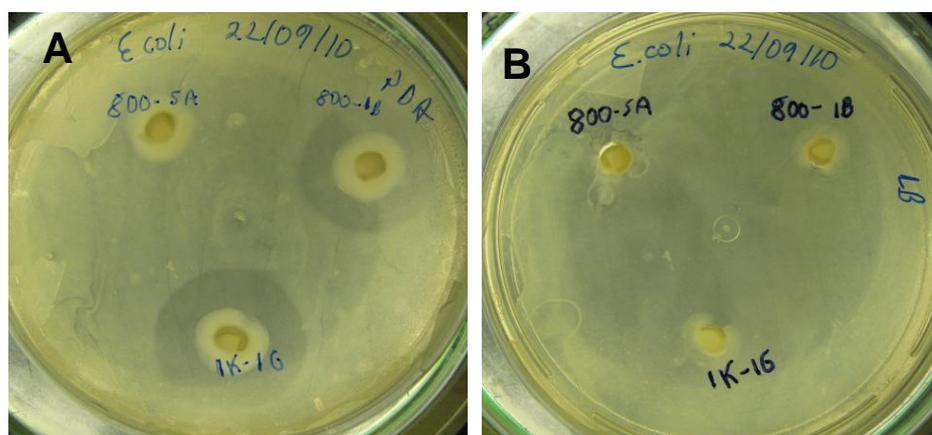


Figura 41. Efecto de dos tipos de medio de cultivo sólido (PDA y LB) en el espectro de inhibición de *T. microsporus* (800-1B, 800-5A, 1K-1G) frente a la bacteria *E. coli*. A) Se observa inhibición con los aislados 800-1B y 1K-1G en PDA; B) No se observa ninguna inhibición en LB-agar.



Para analizar el potencial de inhibición de los microhongos se comparó con el halo del antibiótico control (medido desde el centro del disco hasta el borde del halo) para cada bacteria, considerándolo a este último como el máximo referente de inhibición (100 %), como indica la fórmula:

$$\% \text{ de Inhibición por microhongo} = \frac{\text{Halo del microhongo}}{\text{Halo del Antibiótico control}} \times 100$$

En este bioensayo se puede apreciar que la levadura y *T. microsporus* presentaron los mayores porcentajes de inhibición frente a las bacterias *S. aureus.* y *E. coli* (Tabla v). En la bacteria *Entero.* solo el microhongo *G. sp1* pudo inhibirla, presentando un valor de 8% (ver Tabla v).

Tabla v. Porcentaje de inhibición bacteriana frente a microhongos Antárticos cultivados por 40 días en medios PDA y LB-agar. Las bacterias *K. pneumoniae* 1 y 2 no fueron incluidas porque no se pudo calcular sus porcentajes debido a que no fueron inhibidas por el antibiótico control. (-) no hubo exposición a bacteria.

Medio de cultivo	Bacterias	Hongos						
		Geomyces. sp1. (%)	Antartomyces sp1. (%)	Levadura (%)	Penicillium sp. (%)	Geomyces sp2. (%)	Hyplo 2 (%)	T. microsporus (%)
PDA	<i>E. coli</i>	-	-	12.5	-	6.3	-	18.8
LB		-	-	0	-	0	-	0
PDA	<i>K. pneumoniae</i>	0	-	0	-	0	0	0
LB		0	-	0	-	0	0	0
PDA	<i>S. aureus</i>	12.8	0	25.6	0	0	0	-
LB		0	0	0	0	0	0	-
PDA	<i>E. faecalis</i>	8	-	-	-	0	0	-
LB		0	-	0	-	0	0	0

La bacteria *K. pneumoniae* 1 no presentó crecimiento al dejarla incubar por 24 h a 37 °C en medio PDA, por lo que se le dejó crecer por 48 h en total para poder observar la inhibición de los hongos (Fig. 42 A-D).

Las bacterias *K. pneumoniae*. 1 y 2 no fueron inhibidas por el antibiótico control, sin embargo los microhongos *T. microsporus* y Levadura pudieron inhibir a la bacteria *K. pneumoniae* 1, por lo que se los consideró como los microhongos con mayor potencial de inhibición en el presente bioensayo.

El microhongo 800-5A fue identificado morfológicamente como *T. microsporus*, sin embargo al comparar la respuesta inhibitoria de otros microhongos identificados como *T. microsporus* (800-1B y 1K-1G) frente a la bacteria *E.coli*, no fue la misma (Fig. 43).

Figura 42. Inhibición de la bacteria *K. pneumoniae* 1 en PDA expuesta al microhongo *T. microsporus* (800-5A, 800-1B, 1K-1G) y a Levadura (200-3B): A) Crecimiento de la bacteria por 24 h expuesta a *T. microsporus*; B) Crecimiento de la bacteria por 48 h expuesta a *T. microsporus*; C) Crecimiento de bacteria por 24h expuesta a la Levadura (200-3B); y D) Crecimiento de Bacteria por 48 h expuesta a la Levadura y ausencia de inhibición por antibiótico control (Flecha).

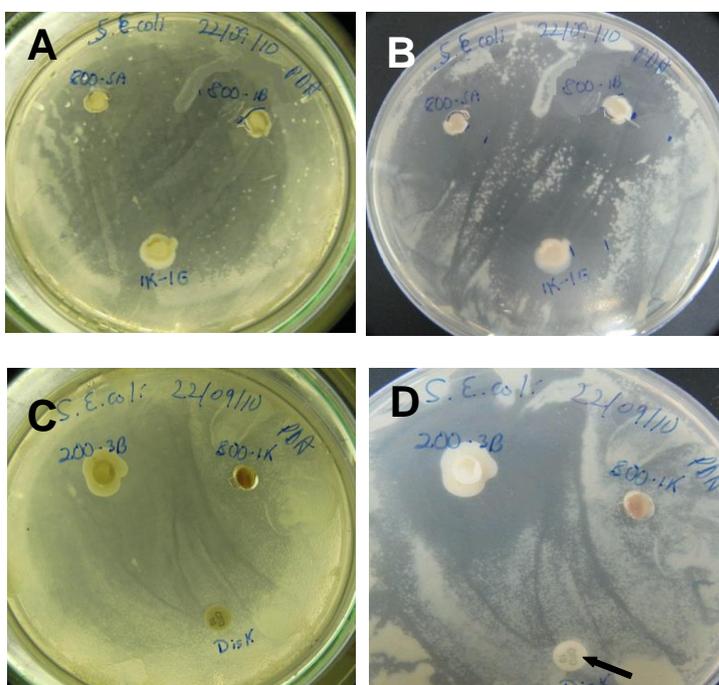
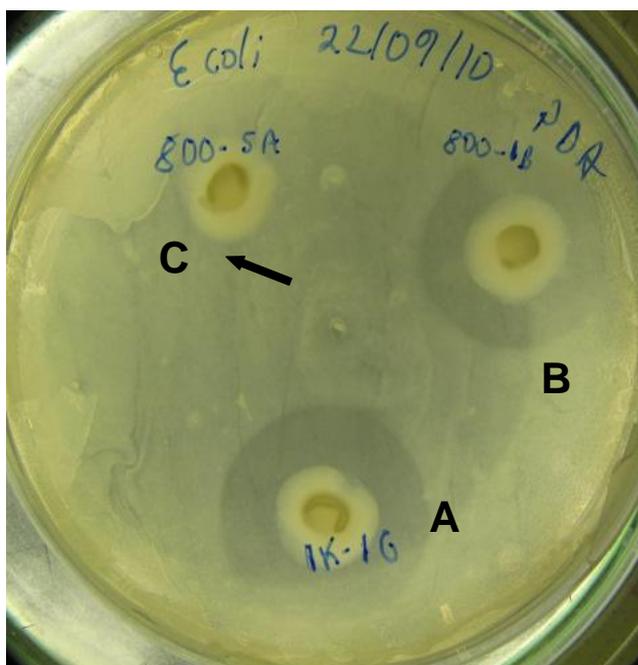


Figura 43. Diferencias del potencial de inhibición de cepas (800-5A, 800-1B, 1K-1G) del microhongo *T. microsporus*, frente a la bacteria *E. coli*: A y B) Inhibición de la bacteria *E. coli* por las cepas (800-1B,1K-1G); y C) Ausencia de Inhibición en cepa 800- 5A.



4.5.2 Bioensayo 2: Potencial bacteriostático en PDA por Duplicado

Se realizó un bioensayo por duplicado del potencial bacteriostático con todos los 11 microhongos representativos para el presente proyecto: *Geomyces sp1.*, *Geomyces sp2.*, *Antarctomyces sp1.*(200-2C, 400-3D), *Antarctomyces sp2.*, *Mucor sp.*, Hyphomyceto 1, Hyphomyceto 2, *Penicillium sp.* Levadura, *Thelebolus sp1.*, y *T. microsporus*(800-1B, 800-5^a, 1K-1G). Fueron cultivados en medio PDA por 30 días, y se los expuso a las bacterias *Escherichia. coli*, *Klebsiella pneumoniae.*, *Enterococcus faecalis.*, y *Staphylococcus aureus.* (Tabla vi).

Se observó que los microhongos *Antarctomyces sp1.*, *Antarctomyces sp2.*, *Geomyces sp2.*, y *Mucor sp.* no tuvieron actividad bacteriostática. Los microhongos que inhibieron más bacterias fueron: *Penicillium sp.*, *T. microsporus*, *Geomyces sp1*, y la Levadura (Tabla vi). Los microhongos *Thelebolus sp1.*, *T. microsporus*, y la Levadura, al menos en una de sus réplicas, lograron superar al antibiótico control frente a la bacteria *K. pneumoniae*. El resto de microhongos tuvieron un porcentaje \leq al 75% (Tabla vii).

Tabla vi. Respuesta bacteriostática de microhongos Antárticos de 30 días en medio de cultivo PDA (por duplicado). Halo de inhibición en mm. Como referencia se incluye los valores de los halos de inhibición del antibiótico control del bioensayo 1 en PDA. Los valores de inhibición de las especies con más de una cepa ensayada fueron promediadas (T. microsporus y *Antarctomyces* sp1.).

Réplicas	Hongos Bacterias	Geomyces sp1 (mm)	Geomyces sp2 (mm)	Antarctomyces sp1. (mm)	Antarctomyces sp2. (mm)	Mucor sp. (mm)	Hyplo. 1 (mm)	Hiplo. 2 (mm)	Levadura (mm)	Penicillium sp. (mm)	Thelebolus sp1. (mm)	T. microsporus (mm)	Antibiótico control (mm)
		1	E.coli	2	0	0	0	0	0	0	4	3	0
2	2	0		0	0	0	0	0	5	2	0	4	
1	K. pneumoniae	1	0	0	0	0	3	2	2	0	0	5	4
2		2	0	0	0	0	3	2	7	0	5	6	
1	S. aureus	9	0	0	0	0	0	0	8	4	0	2	39
2		10	0	0	0	0	0	0	9	8	0	2	
1	E. faecalis	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	25
2		0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	

Tabla vii. Porcentaje de inhibición bacteriana en el bioensayo 2 en medio de cultivo PDA. Se uso para el cálculo los valores de los halos de inhibición del antibiótico control del bioensayo 1 en PDA.

Réplicas	Hongos Bacterias	Geomyces sp1. (%)	Geomyces sp2. (%)	Antarctomyces sp1. (%)	Antarctomyces sp2. (%)	Mucor sp. (%)	Hyplo. 1 (%)	Hiplo. 2 (%)	Levadura (%)	Penicillium sp. (%)	Thelebolus sp1. (%)	T. microsporus (%)
		1	E.coli	6.3	0	0	0	0	0	0	12.5	9.4
2	6.3	0		0	0	0	0	0	15.6	6.3	0	12.5
1	K. pneumoniae	25	0	0	0	0	75	50	50	0	0	125
2		50	0	0	0	0	75	50	175	0	125	150
1	S. aureus	23.1	0	0	0	0	0	0	20.5	10.3	0	5.1
2		25.6	0	0	0	0	0	0	23.1	20.5	0	5.1
1	E. faecalis	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0
2		0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0

El halo de inhibición de los microhongos difirió en longitud entre las mismas especies de las réplicas del bioensayo 2, por tal motivo la cantidad del antibiótico que segregó el microhongo se consideró irregular, a pesar de haber sido cultivado en un mismo medio de cultivo y periodo de tiempo.

Se conoce que las bacterias *Klebsiella*. y *E. coli* producen beta-lactamasas que les pueden conferir resistencia hacia el antibiótico cefalosporina (72), esto podría explicar la inhibición reducida de la bacteria *K. pneumoniae* frente al antibiótico control. El microhongo *Thelebolus sp1*. no pudo inhibir a la bacteria *K. pneumoniae*, en una de sus réplicas. El crecimiento irregular de esta bacteria en PDA pudo provocar este resultado

4.5.3. Bioensayo3: Potencial bacteriostático en 40 y 60 días en PDA.

Todos los microhongos, con excepción del microhongo *Mucor sp.*, fueron cultivados en medio PDA por 40 y 60 días, antes de ser transferidos a un medio PDA con las bacterias *S. aureus.* ,

E. faecalis., *K. pneumoniae.* y *E. coli*, que se enfrentaron como se muestra en la tabla viii.

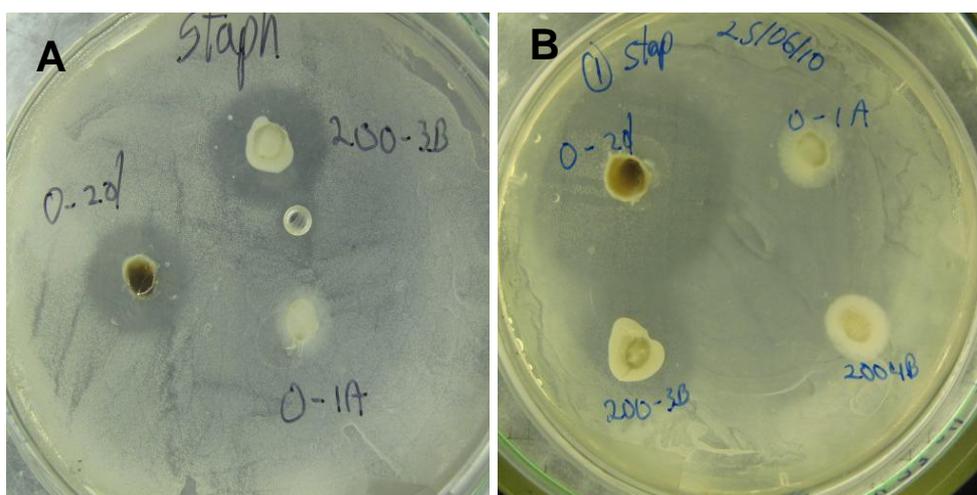
En este bioensayo no se observó potencial de inhibición en los microhongos *Antarctomyces sp1.*, *Antarctomyces sp2.*, y *Thelebolus sp1.* en los dos periodos (Tabla viii).

Tabla viii. Respuesta bacteriostática de los microhongos Antárticos cultivados por 40 y 60 días. Halo de inhibición en mm. El término Dif., en gris, se refiere a que la inhibición fue difusa y no se pudo medir. Se uso como referencia los valores de los halos de inhibición del antibiótico control del bioensayo 1 en PDA. El símbolo (-) indica que no hubo exposición a bacteria.

Tiempo (días)	Hongos		Bacterias									
	Geomyces sp1. (mm)	Geomyces sp2. (mm)	Antarctomyces sp1. (mm)	Antarctomyces sp2. (mm)	Hyplo. 1 (mm)	Hiplo. 2 (mm)	Levadura (mm)	Penicillium sp. (mm)	Thelebolus sp1. (mm)	T. microsporus (mm)	Antibiotico control (mm)	
40	E.coli	0	0	0	-	-	0	3	0	0	0	32
60		0	2	0	-	0	0	3	0	0	2	
40	K. pneumoniae	1	3	0	0	-	0	3	0	0	0	4
60		3	2	0	0	2	3	4	0	0	0	
40	S. aureus	7	3	0	0	-	0	5	3	0	0	39
60		13	12	0	-	0	1	6	3	0	0	
40	E. faecalis	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	25
60		8	5	0	0	0	7	Dif.	0	0	0	

Se observó claramente que en la mayoría de los casos el halo de inhibición se favoreció con el tiempo de crecimiento del microhongo (Fig. 44). La bacteria *K. pneumoniae* fue la única bacteria que presentó mayor inhibición a los 40 días, frente al microhongo *Geomyces sp2*. Sin embargo, al igual que en los anteriores bioensayos, su crecimiento irregular pudo afectar la lectura adecuada de inhibición.

Figura 44. Incremento del espectro de inhibición por los microhongos *Geomyces sp1* (0-2d) y Levadura (200-3B) observado en medio de cultivo PDA frente a bacteria *S. aureus*. en: A) Hongos de 40 días de edad; y B) Hongos de 60 días de edad. El incremento de inhibición en levadura fue mínimo.



La relación entre el aumento de actividad antibacteriana de los microhongos debido a la prolongación de su crecimiento en un medio de cultivo es un factor conocido, y puede ser atribuido al posible aumento de concentración de las sustancias secretadas por los microhongos (73 -76).

Los hongos *Geomyces sp1*, *Geomyces sp2.*, e *Hypho. 2* presentaron mayor inhibición frente a las bacterias *E. faecalis* y *S. aureus*. con halos mayores a 7 mm. En contraste, el hongo *Hypho. 2* presentó la menor inhibición frente a la bacteria *S. aureus.*, llegando a medir 1 mm.

La Levadura y el hongo *Geomyces sp2.* fueron considerados hongos de inhibición de amplio espectro. La Levadura inhibió a 3 de las 4 bacterias utilizadas y el hongo *Geomyces sp2.* pudo inhibir a todas las bacterias a los 60 días de crecimiento.

Al comparar los halos de inhibición causada por los microhongos con los del antibiótico control, se observa que ninguno de los microhongos supera el 100% del control. El microhongo con mayor porcentaje de inhibición fue la Levadura frente a *K. pneumoniae*, llegando a igualar al control con el

100% a 60 días. El resto de microhongos tuvieron un porcentaje \leq al 75 % (Tabla ix).

Tabla ix. Porcentaje de inhibición bacteriana en el bioensayo 3 en medio de cultivo PDA. El disco de inhibición utilizado fue cepodoxime. El asterisco en gris indica que a pesar de una aparente inhibición no pudo ser comparado debido a que el halo no fue medido.

Tiempo (días)	Bacterias	Hongos									
		Geomyces sp1. (%)	Geomyces sp2 (%)	Antarctomyces sp1. (%)	Antarctomyces sp2. (%)	Hypho. 1 (%)	Hipho. 2 (%)	Levadura (%)	Penicillium sp. (%)	Thelebolus sp1. (%)	T. microsporus (%)
40	E.coli	0	0	0	-	-	0	9.4	0	0	0
60		0	6.3	0	-	0	0	9.4	0	0	6.3
40	K. pneumoniae	25	75	0	0	-	0	75	0	0	0
60		75	50	0	0	50	75	100	0	0	0
40	S. aureus	17.9	7.7	0	0	-	0	12.8	7.7	0	0
60		33.3	30.8	0	-	0	2.6	15.4	7.7	0	0
40	E. faecalis	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0
60		32	20	0	0	0	28	*	0	0	0

No se encontró información sobre el método de corcho agar para el monitoreo de actividad antibacteriana de microhongos, solo existe información sobre ese método en otro tipo de bioensayos (2-6). Sin embargo se encontró que el género *Geomyces* presenta bioactividad frente a bacterias Gram + como *Staphylococcus* y *Enterococcus*. Y

Gram – como *E. coli* y *Klebsiella* (77), lo cual coincide con los resultados obtenidos en los bioensayos realizados (Tabla x).

Se ha reportado que el microhongo *Penicillium* inhibe a la bacteria *E. coli*, pero no a *Klebsiella* (78), además presenta actividad frente a la bacteria *Staphylococcus* (79, 80), concordando con los resultados obtenidos (Tabla x).

Otro reporte observó actividad bacteriostática frente a las bacterias *Staphylococcus* y *E. coli* en microhongos *Hyphomycetos* (81). Este microhongo, además de inhibir a la bacteria *S. aureus*, también inhibió a *K. pneumoniae*, y *E. faecalis* en el presente proyecto (Tabla x).

El microhongo *Mucor rouxii* muestra actividad inhibitoria frente a la bacteria *E. coli* (82), y frente a la bacteria *Staphylococcus* (83), sin embargo no hubo respuesta inhibitoria en el bioensayo respectivo (Tabla x).

Se ha reportado Levaduras con potencial de inhibir la bacteria *Staphylococcus* (84). La Levadura encontrada en el presente además de inhibir a la bacteria *S. aureus*, también inhibió a la bacteria *E.*

faecalis y a las Gram (-): *E. coli*, *K. pneumoniae*, y *K. pneumoniae 1* (Tabla x)

No se encontró información documentada acerca del potencial antibacteriano del género *Thelebolus*, sin embargo se conoce que contiene amilasas y proteasas (85), y que pudiera inhibir el crecimiento bacteriano (86). En este proyecto se observó inhibición de las bacterias *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. pneumoniae 1.*, y *S. aureus* por este microhongo (Tabla x).

Tabla x. Resumen del potencial bacteriostático de los microhongos antárticos frente a las bacterias ensayadas. Se indica con un Si, las presencia de inhibición en al menos uno de los bioensayos. (-) Indica que no hubo exposición a la esa bacteria.

Microhongos / Bacterias	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae 1</i>	<i>K. pneumoniae 2</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>G. sp1.</i>	Si	Si	No	No	Si	SI
<i>G. sp2.</i>	Si	Si	No	No	Si	Si
<i>A. sp1.</i>	No	No	-	-	No	No
<i>A. sp2.</i>	No	No	-	-	No	No
<i>Mucor sp.</i>	No	No	-	-	No	No
<i>Hypha. 1</i>	No	Si	-	-	No	No
<i>Hypha. 2</i>	No	Si	-	No	Si	Si
<i>Levadura</i>	Si	Si	Si	No	Si	No
<i>P. sp.</i>	Si	No	-	-	Si	Si
<i>T. microsporius</i>	Si	Si	Si	No	Si	No
<i>T. sp1</i>	No	Si	-	-	No	No

CAPITULO 5

5.CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

1. Se aislaron un total de 213 hongos que se agruparon en 10 especies, con el siguiente porcentaje de ocurrencia: *Antarctomyces sp1* (46,9%), *Geomyces sp.* (33,8%), *Thelebolus microsporus* (9,4%), *Antarctomyces sp2* (3,3%), el *Hyphomyceto 1* (2,8%), *Mucor sp.*(1.4%), y las especies T. sp1, *Penicillium sp.*,

2. Levadura e *Hyphomyceto 2* presentaron porcentajes menores a 1%.
3. Las especies *Geomyces sp.*, *Penicillium sp.*, Levadura, e *Hyphomyceto 2* mostraron crecimiento a 4°C y 25 °C que corresponde el 35,3 % del total de cepas aisladas. La especie *Geomyces sp.* y Levadura fueron consideradas psicrotrofas al igual que los microhongos *Penicillium sp.* e *Hyphomyceto 2*, sin embargo estas dos especies presentaron mejor crecimiento a 25 °C.
4. Los Géneros *Antarctomyces*, *Thelebolus*, *Hyphomyceto 1* y *Mucor* presentaron crecimiento sólo a 4 °C, que corresponden al 64,7%, por lo que fueron catalogados como psicrófilos.
5. Los Géneros representativos fueron *Geomyces* y *Antarctomyces*. Estos fueron encontrados en todos los puntos de muestreo. Similares resultados fueron reportados por Ordoñez y Ordóñez (9).

6. Al comparar los medios de cultivo LB-agar y PDA en los bioensayos de potencial de inhibición de los microhongos se observó que sólo en PDA hubo respuesta inhibitoria.
7. *K. pneumoniae* fue la bacteria que tuvo mayores problemas de crecimiento en el medio de cultivo PDA.
8. El disco del antibiotico Cefpodoxime no inhibió la *K. pneumoniae* 1, y *K. Neumoniae* 2. Sin embargo, si se observó inhibición de *K. pneumoniae* 1 por parte de los hongos *Thelebolus sp1* y Levadura de 40 días de edad.
9. La presencia de un mayor halo de inhibición se relacionó directamente con la mayor edad del microhongo. Se observó una inhibición más clara a los 60 días de crecimiento que a los 40 días, donde se detectó una tenue o ausente inhibición.

10. La metodología del corcho agar para observar el potencial de microhongos antárticos frente a bacterias patógenas humanas podría ser considerado un método ideal por ser un análisis rápido y económico.
11. El diámetro del halo de los microhongos difirió entre las réplicas del bioensayo 2, posiblemente por las diferencias de densidad bacteriana observada entre réplicas

5.2 RECOMENDACIONES

1. Estimular a la esporulación y la obtención de estructuras reproductivas para su identificación en aquellos microhongos que no lo presentaron.
2. Prevenir la contaminación con esporas de los microhongos al transferir múltiples corchos de agar en una misma placa en los bioensayos bacteriostáticos.
3. Procurar un tapizado bacteriano homogéneo en todos los bioensayos.

4. Corroborar la identificación morfológica con las secuencias genéticas de las regiones transcritas internas (ITS, siglas en Inglés).

5. Extraer e Identificar las sustancias bioactivas de los microhongos con potencial antibacteriano.