



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS

DIVERSIDAD DE MICROMICETES DE LOS GÉNEROS
PENICILLIUM Y *ASPERGILLUS* (TRICHOCOMACEAE) Y
LEVADURAS, ASOCIADA AL SUELO DE LA CUEVA DE LOS
RISCOS, JALPAN, QUERÉTARO, MÉXICO.

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G A
P R E S E N T A
ADRIANA ESPINO DEL CASTILLO RODRÍGUEZ

TUTORA: DRA. PATRICIA E. LAPPE OLIVERAS
COTUTOR: DR. JUAN B. MORALES MALACARA



México D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

"Diversidad de micromicetes de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* (Trichocomaceae) y levaduras, asociada al suelo de la Cueva de los Riscos, Jalpan, Querétaro, México".

realizado por Espino del Castillo Rodríguez Adriana con número de cuenta 4-0305300-7 quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en Biología. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario	Dr. Teófilo Herrera Suárez	<i>T. Herrera</i>
Propietario	Dra. Genoveva García Aguirre	<i>Genoveva García A.</i>
Propietario Tutora	Dra. Patricia Ester Lappe Oliveras	<i>Patricia Lappe O.</i>
Suplente	M. en C. Guadalupe Vidal Gaona	<i>G. Vidal</i>
Suplente Co-Tutor	Dr. Juan Bibiano Morales Malacara	<i>J. Morales</i>

Atentamente,

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Ciudad Universitaria, D. F., a 21 de noviembre de 2008

EL COORDINADOR DEL COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

DR. PEDRO GARCÍA BARRERA

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

*Bosquejos que dejó en las paredes de la cueva,
Sentimientos que se quedan en el camino
Y experiencias que olvido en el pasado.
(La Cueva del Dragón, Daniel Gonçalves)*

*Los hongos nacen en silencio;
Algunos nacen en silencio;
Otros con un breve alarido,
Un breve trueno.
(Los hongos nacen en silencio..., Marosa de Giorgio)*

*A
Aso Boshet, Evovo y La Musun*

*A
Cony y Mildred*



AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es el broche que cierra uno de los capítulos más importantes de mi historia, en el que no sólo se manifiesta el aprendizaje y la complementación de mis estudios, sino que además es la prueba que sirvió para darme cuenta que soy capaz de hacer hasta lo que nunca imaginé que haría, y quiero agradecer a las personas que formaron parte indispensable en mi vida durante este proceso:

Por su puesto, a mis papás y mi hermana, quienes han sido siempre el ejemplo perfecto de que se debe seguir adelante con lo que uno es, a pesar de lo que digan los demás. La educación y formación personal recibida, la tolerancia a mis experimentos en casa y su ilimitado apoyo hacia mis locas ideas han sido más de lo que podría esperar y merecer. Mucho de lo que soy se los debo a ustedes... Me saqué la lotería con mi familia.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y autoridades del Instituto de Biología por brindarme el espacio y materiales para la realización de este trabajo.

Al Dr. Juan B. Morales Malacara, mi asesor dentro y fuera de las cuevas, quien me apoyó incondicionalmente durante el desarrollo de esta Tesis, y quien además de fungir como profesor he llegado a considerar tan cercano como a un tío.

A la Dra. Patricia E. Lappe Oliveras, quien apoyó mi proyecto y lo hizo fuerte, me guió en el camino de la micología y microbiología, estuvo conmigo de principio a fin durante el desarrollo de este trabajo y quien me enseñó a hacer un trabajo profesional.

A la M. en C. Laura Márquez Valdelamar por todo su apoyo, paciencia y dedicación en el laboratorio de Biología Molecular.

A la Dra. Rosalía Ramos Bello por su apoyo y asesoría durante los estudios edafológicos. Al Dr. Pavel Krasilnikov y la Dra. Norma García Calderón por permitirme el uso de espacio y materiales de su laboratorio, y al Pas. de Biól. Miguel Ángel Hernández Patricio por su desinteresada ayuda en los análisis de suelo.

Al Dr. Teófilo Herrera Suárez por sus valiosos comentarios en la revisión de esta Tesis, por todo su apoyo en el laboratorio de micología y todos sus conocimientos compartidos, sus pláticas y su grata compañía.

A la M. en C. Guadalupe Vidal Gaona por sus valiosos comentarios en la revisión de esta Tesis, por su previa asesoría, su apoyo y su amistad.

A la Dra. Genoveva García Aguirre por sus valiosos comentarios en la revisión de esta tesis y a la M. en C. Rebeca Martínez Flores por su apoyo y por los momentos de recreo en su laboratorio.

A mis profesores y compañeros del Taller de Bioespeleología de la Facultad de Ciencias: JBMM, Ricardo Paredes León, Laura del Castillo Martínez, Miguel A. Hernández Patricio, Marisol Vega Orihuela, Sara Soriano Morales, Itzel Sigala Regalado, Mayra Dávila Montes y Yunuen Ávila Vergara por la compañía, la paciencia y el aprendizaje que recibí de ustedes. También les agradezco

mucho a Lupita López Campos y a Julio Prieto Sagredo por todo su apoyo y su amistad fuera del área académica.

A los habitantes de las colonias San Martín, Huajales, Ahuacatlán y Jalpan, Querétaro, quienes nos recibieron en sus comunidades y mostraron interés, disposición y ayuda en nuestros proyectos.

Al Dr. Rubén Moreno Terrazas Casildo por el apoyo con las instalaciones en la Universidad Iberoamericana y el material para técnicas moleculares durante una etapa breve de la Tesis.

A la Dra. Margarita Villegas Ríos, quien me inició y de quien recibí la inspiración hacia el estudio de los hongos.

A aquellos amigos que no sólo me brindaron su amistad sino que tuvieron alguna aportación invaluable durante mi proyecto: M.en C. Sergio Vela Avitúa (Kalimán), no hay palabras para expresar mi agradecimiento hacia tí. Al Pas. de Biól. Iván Cervantes Martínez (mi rémora favorita), y al M. en C. Daniel Estrada Bárcenas.

A cada uno de los miembros del laboratorio de micología con quienes he compartido momentos muy especiales y a quienes les agradezco mucho su amistad y ayuda: Biól. Cony León Cano, M. en C. Mildred Herrera Solórzano, Biól. Samuel Aguilar Ogarrio, M. en C. Víctor Hugo Valenzuela Gasca, M. en C. Elvira Aguirre Acosta.

A mis tres hermanas postizas: Isaura Robles Espín (y fam.), Joanna Estrada Schutz y Yely Molina Aritzmendi, quienes han estado siempre conmigo a pesar de los altibajos de la amistad.

A todos mis amigos quienes son parte fundamental de mi vida: Omar Hernández, Joaquín Amaro, Miguel Ruíz, Mario Fuentes, Pastor Díaz, Antonio Álvarez, Eduardo Rangel, Arístides Alvarado, Alberto Cooper, Paola Chiapas, Guillermo Foncerrada, Marisol Torres, Jareny Ramos, Julieta Jaso, Guillermo Martínez, Daya Navarrete, Alicia Lasso, Beto Domínguez, Roberto Araujo y a todos aquellos cuyos nombres faltan pero no por eso dejan de ser importantes.

A Josefina Moreno García y familia, a quienes considero como una extensión de mi propia familia y de quienes siempre he recibido apoyo.

A Fritz Fantasma por su compañía durante la parte escrita de la tesis y especialmente a Alexis por no dejarme nunca sola.

A PT, el culpable de que esta Tesis se haya realizado y con los alcances que tuvo. De no haber sido por ti, esto, y todas las puertas que este trabajo abrió no habrían ocurrido. Irónicamente... gracias.

A todos aquellos que siguen conmigo, y a los que dejaron de estarlo.

...

¡AH! Y al Hongo de Chignahuapan.

**“We do not know what is present in a gram of soil”
Kirk *et al.*, 2004**

**“Everything is everywhere, the environment selects”
Gams, 1992**

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
ÍNDICE DE TABLAS	V
RESUMEN	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>MICROMICETES Y SU IMPORTANCIA EN EL SUELO</i>	1
1.1.1 <i>HONGOS FILAMENTOSOS DEL SUELO</i>	2
1.1.2 <i>LEVADURAS DEL SUELO</i>	3
1.2.1 <i>ECOLOGÍA E IMPORTANCIA DE LOS HONGOS EN EL HÁBITAT CAVERNÍCOLA</i>	6
1.3 <i>ANTECEDENTES</i>	6
1.3.1 <i>EL ESTUDIO DE LOS HONGOS CAVERNÍCOLAS EN EL MUNDO</i>	6
1.3.2 <i>EL ESTUDIO DE LOS HONGOS CAVERNÍCOLAS EN MÉXICO</i>	9
1.3.3 <i>EL ESTUDIO DE LOS HONGOS CAVERNÍCOLAS EN LA CUEVA DE LOS RISCOS</i>	10
2. JUSTIFICACIÓN	11
2.1 <i>OBJETIVOS</i>	11
3. GRUPOS DE ESTUDIO	12
3.1 <i>HONGOS FILAMENTOSOS</i>	12
3.1.1 <i>GÉNERO <i>Penicillium</i> LINK EX GRAY 1821</i>	12
3.1.2 <i>GÉNERO <i>Aspergillus</i> MICHELI 1729</i>	14
4. SITIO DE ESTUDIO.....	18
4.1 <i>LOCALIZACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LA CUEVA DE LOS RISCOS</i>	18
4.2 <i>ETNOESPELEOLOGÍA DE LA CUEVA DE LOS RISCOS</i>	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS	24
5.1 <i>MÉTODO EN CAMPO</i>	24
5.2 <i>MÉTODO EN LABORATORIO</i>	27
5.2.1 <i>ANÁLISIS DE SUELOS</i>	27
5.2.2 <i>AISLAMIENTO, CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE MICROBIOTA</i>	28
5.2.3 <i>IDENTIFICACIÓN Y RESIEMBRA</i>	29
5.2.3.1 <i>HONGOS FILAMENTOSOS</i>	29
5.2.3.2 <i>LEVADURAS</i>	30
5.2.4 <i>IDENTIFICACIÓN MOLECULAR</i>	31
5.2.5 <i>COMPARACIÓN CON LAS ESPECIES REGISTRADAS EN LA LITERATURA</i>	33
6. RESULTADOS	34
6.1 <i>PARÁMETROS FÍSICOS EN LOS PUNTOS DE MUESTREO</i>	34
6.2 <i>ANÁLISIS QUÍMICO DE LAS MUESTRAS DE SUELO</i>	35

6.3 CUANTIFICACIÓN, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE MOHOS Y LEVADURAS.....	36
6.3.1 ESPECIES IDENTIFICADAS	41
6.4 DISTRIBUCIÓN DE LA DIVERSIDAD DE MOHOS Y LEVADURAS EN LA CUEVA DE LOS RISCOS Y SU PRESENCIA EN CADA MUESTRA DE SUELO.	83
6.5 COMPARACIÓN CON LAS ESPECIES REGISTRADAS EN LA LITERATURA	85
7. DISCUSIÓN	87
8. CONCLUSIONES	99
9. GLOSARIO Y ABREVIATURAS.....	101
10. LITERATURA CITADA	110
11. APÉNDICE	118
11.1. MEDIOS DE CULTIVO PARA CRECIMIENTO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Penicillium</i>, <i>Aspergillus</i> Y LEVADURAS.....	118
11.2. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO TOTAL	120

ÍNDICE DE FIGURAS

1.1 Distribución de plantas y animales en una cueva	5
1.2 Relaciones climáticas en una cueva	5
3.1 Tipos de penicilios, del más simple al más complejo, que se presentan el género <i>Penicillium</i>	13
3.2 Formas y estructuras características que se presentan en las diferentes especies de <i>Aspergillus</i>	15
3.3 Formas y estructuras características que se presentan en las levaduras.....	17
4.1 Colonia San Martín, municipio de Jalpan de Serra, Querétaro, México	19
4.2 Esquema de la Cueva de los Riscos, Jalpan, Querétaro, México	20
4.3 Aporte de materia orgánica en la Cueva de los Riscos, Jalpan.....	22
4.4 Contaminación en la Cueva de los Riscos.....	23
5.1 Diagrama de flujo de la metodología seguida en el campo y en laboratorio.....	25
5.2 Esquema de la Cueva de los Riscos, con el túnel principal sombreado y las zonas que abarca. Se muestran los 4 puntos de colecta	26
5.3 Fotografías de los puntos de muestreo dentro de la Cueva de los Riscos	28
5.4 Método esquematizado para la inoculación de las placas de diferentes medios de cultivo para la identificación de <i>Penicillium</i>	29
6.1 <i>Aspergillus aculeatus</i>	41
6.2 <i>Aspergillus</i> sp. afin a <i>flavipes</i>	42
6.3 <i>Aspergillus flavus</i>	43
6.4 <i>Aspergillus japonicus</i>	44
6.5 <i>Aspergillus niger</i>	45
6.6 <i>Aspergillus pseudotamarii</i>	46
6.7 <i>Aspergillus versicolor</i>	47
6.8 <i>Penicillium</i> sp. afin a <i>adametzioides</i>	48
6.9 <i>Penicillium brevicompactum</i>	50
6.10 <i>Penicillium brevicompactum</i>	51
6.11 <i>Penicillium chrysogenum</i>	52
6.12 <i>Penicillium citrinum</i>	54
6.13 <i>Penicillium citrinum</i>	54
6.14 <i>Penicillium commune</i>	55

6.15 <i>Penicillium commune</i>	56
6.16 <i>Penicillium concentricum</i>	57
6.17 <i>Penicillium decaturense</i>	58
6.18 <i>Penicillium granulatum</i>	59
6.19 <i>Penicillium herquei</i>	60
6.20 <i>Penicillium janthinellum</i>	62
6.21 <i>Penicillium lanosum</i>	64
6.22 <i>Penicillium lanosum</i>	64
6.23 <i>Penicillium lanosum</i>	64
6.24 <i>Penicillium minioluteum</i>	65
6.25 <i>Penicillium raistrickii</i>	67
6.26 <i>Penicillium roseopurpureum</i>	68
6.27 <i>Penicillium sclerotiorum</i>	69
6.28 <i>Penicillium steckii</i>	70
6.29 <i>Penicillium vinaceum</i>	71
6.30 <i>Candida catenulata</i>	72
6.31 <i>Naumovia dairenensis</i>	73
6.32 <i>Pichia guilliermondii</i>	74
6.33 <i>Cryptococcus laurentii</i>	76
6.34 <i>Cryptococcus randhawii</i>	77
6.35 <i>Trichosporon chiropterorum</i>	77
6.36 <i>Trichosporon laibachii</i>	78
6.37 <i>Trichosporon shinodae</i>	79
6.38 <i>Trichosporon sp.</i>	79
6.39 Total de especies por muestra.....	83
6.40 Esquema de la Cueva de los Riscos con la distribución de la diversidad de micromicetes, y el porcentaje de especies con que cada género se presenta por muestra ..	84

ÍNDICE DE TABLAS

5.1 Características morfofisiológicas requeridas para la identificación los aislados de levaduras	30
5.2 Compuestos de carbono que contiene la galería para identificación de levaduras ID32C bioMériux	31
6.1 Parámetros físicos registrados en cada punto de muestreo	34
6.2 Comparación de los valores de temperatura y humedad relativa registrados en el túnel principal de la Cueva de los Riscos en julio-noviembre de 1985, abril de 2006 y diciembre de 2006.	35
6.3 Análisis químicos realizados a las cuatro muestras de suelo obtenidas en la Cueva de los Riscos	35
6.4 Unidades formadoras de colonias por gramo de suelo en los diferentes medios de cultivo utilizados.....	36
6.5 Especies aisladas de las cuatro muestras de suelo obtenidas en el túnel principal de la Cueva de los Riscos	38
6.6A Morfología colonial y celular de las especies de levaduras obtenidas en el presente estudio (Ascomicetes).....	74
6.7A Comparación de las pruebas de fermentación, asimilación y crecimiento con las diagnosis de las especies en la base de datos del CBS (Ascomicetes)	75
6.6B Morfología colonial y celular de las especies de levaduras obtenidas en el presente estudio (Basidiomicetes).....	80
6.6C Morfología colonial y celular de las especies de levaduras obtenidas en el presente estudio (Basidiomicetes sin diagnosis publicada).....	80
6.7B Comparación de las pruebas de fermentación, asimilación y crecimiento con las diagnosis de las especies en la base de datos del CBS (Basidiomicetes)	81
6.7C Descripción de las pruebas de fermentación, asimilación y crecimiento de las especies obtenidas sin diagnosis en la base de datos del CBS (Basidiomicetes).....	82
6.8 Especies de micromicetes registradas en el presente estudio y en otras investigaciones realizadas en diferentes cuevas del mundo	85

RESUMEN

Uno de los aspectos más interesantes de la biodiversidad es el estudiarla en hábitats estresantes, tales como los ambientes cavernícolas, que ofrecen las condiciones físicas y químicas ideales, así como las condiciones de protección para la supervivencia y crecimiento de una diversa microbiota saprobia que puede encontrarse a todo lo largo de las cuevas.

En este estudio se evaluaron algunos de los factores bióticos y abióticos del ambiente y del suelo de la Cueva de los Riscos en relación con la distribución de los microorganismos. Se obtuvieron cuatro muestras de diferentes tipos de suelo: suelo con hojarasca, migajón arenoso, migajón limoso y migajón limoso con guano de murciélago hematófago, y se comprobó que la heterogeneidad del suelo determina la naturaleza y distribución de los microorganismos. La diversidad de micromicetes en las muestras de suelo con hojarasca y de suelo con guano sanguinolento fue mayor que la presentada en las muestras de migajón arenoso y migajón limoso.

Se determinaron los hongos filamentosos de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, y las levaduras asociadas a los cuatro tipos de suelo, para lo cual se aisló, cuantificó y determinó la microbiota presente en las cuatro muestras. Se realizaron distintos métodos de aislamiento, purificación e identificación morfofisiológica dependiendo del grupo de estudio y siguiendo las monografías correspondientes de identificación tradicional. Posteriormente se efectuó la identificación molecular de la región ITS1-5.8S-ITS2 con extensión a 18S para los mohos, y del dominio D1/D2 del gene 26S ARNr para las levaduras, y se llevó a cabo la extracción, amplificación y secuenciación del ADN genómico de cada una de las cepas obtenidas para hacer coincidir la secuencia con las características morfológicas y fisiológicas descritas para cada especie.

Se generaron nuevos registros de micromicetes de sustratos cavernícolas en el mundo tales como: *Aspergillus aculeatus*, *A. pseudotamarii*, *Penicillium chrysogenum*, *P. commune*, *P. concentricum*, *P. decaturense*, *P. granulatum*, *P. herquei*, *P. janthinellum*, *P. raistrickii*, *P. roseopurpureum*, *P. sclerotiorum*, *P. vinaceum*, *Naumovia dairenensis* y *Cryptococcus randhawii*. Se obtuvieron las diagnósicas morfofisiológicas de *C. randhawii*, *Trichosporon chiropterorum* y *T. shinodae* determinadas sólo genótipicamente. Se aislaron tres posibles especies nuevas de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichosporon*, y se obtuvieron cepas de especies de importancia médica y biotecnológica como: *A. versicolor*, *A. flavus*, *P. citrinum*, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. minioluteum*, *P. steckii*, *Pichia guilliermondii* y *T. laibachii*, entre otros, y especies con características toxígenas o de patógenos oportunistas como: *A. flavus*, *A. japonicus*, *A. niger*, y *C. laurentii*, entre otros. Se sugiere por primera vez considerar al género *Candida* y a las especies *A. flavus*, *A. niger*, *A. versicolor*, *P. lanosum*, *T. chiropterorum*, *T. shinodae* y *T. laibachii* como especies troglófilas y/o guanófilas.

Palabras clave: microbiota; ambiente cavernícola; identificación fenotípica y genotípica.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 MICROMICETES Y SU IMPORTANCIA EN EL SUELO

El suelo es el material suelto compuesto de roca intemperizada y otros minerales además de materia orgánica parcialmente descompuesta que cubre grandes extensiones de la superficie terrestre (Singer & Munns, 1991; Wild, 1994), y que constituye el hábitat natural de una comunidad microbiana compleja, de la cual dependen todos los organismos de la biosfera (Kirk *et al.*, 2004). Dicha microbiota se desarrolla en la superficie del suelo y a través de los primeros centímetros de profundidad y está compuesta por bacterias, actinobacterias y hongos, principalmente (Ulloa *et al.*, 2006).

Los hongos tienen una amplia distribución y existen en casi todos los ambientes y sustratos. En el suelo puede encontrarse una micobiota constituida por hongos filamentosos y levaduras y su presencia en estos hábitats depende de las características propias de cada especie (habilidades reproductivas y competitivas) así como su interacción con los factores bióticos y abióticos (Phaff *et al.*, 1978; Lachance & Starmer, 1998).

Las bacterias y hongos se encuentran en todos los tipos de suelo con pH neutros y se desarrollan activamente en climas húmedos a una temperatura de 35° C, aunque algunos hongos pueden tolerar climas secos y condiciones de pH que van desde una acidez de 3 hasta una alcalinidad de 9 (Pitt, 1979; Ulloa *et al.*, 2006), esta ubicuidad les permite ejercer una gran influencia en el ecosistema edáfico.

El papel funcional de los hongos del suelo está determinado por sus características morfológicas y fisiológicas. Como organismos heterótrofos pueden ser saprobios, parásitos o simbioses y juegan directa o indirectamente papeles vitales contribuyendo a la producción primaria. Como degradadores de materia orgánica descomponen macromoléculas complejas, como lignina o quitina, y hacen más disponibles algunos nutrientes como C, N, P, y S; por lo que son considerados agentes importantes en el ciclo global de elementos nutricionales (Kendrik & Parkinson, 1990; Wuczkowski *et al.*, 2003).

De este modo la diversidad de bacterias y hongos aumenta la calidad del suelo, afectando su aglomeración e incrementando la fertilidad del mismo (Kirk *et al.*, 2004), además de que gran parte de los productos de desecho de la sociedad humana son desintoxicados gracias a la microcomunidad del suelo (Giller, 1996).

Las condiciones ambientales bióticas y abióticas regulan la presencia de los microorganismos del suelo (Goodman & Larsh, 1966). En el caso de los hongos la diversidad está afectada por varios factores, tales como la distribución de sustratos orgánicos e inorgánicos, animales que viven y mueren en el suelo, el balance de las proporciones de muerte y crecimiento, la humedad disponible, la temperatura y el pH (Kendrik & Parkinson, 1990). La diversidad está además controlada por

factores como la exposición al sol y la longevidad de algunas especies, aunado a la habilidad de resistencia local competitiva a otros organismos del suelo (hongos, bacterias, protozoarios y nemátodos) especialmente aquellos que producen antibióticos o toxinas (Phaff *et al.*, 1978).

Dentro de una misma muestra de suelo, la distribución y diversidad fúngica frecuentemente varía con la profundidad y la naturaleza heterogénea del suelo (Kendrik & Parkinson, 1990), tanto en el caso de hongos filamentosos como en el de las levaduras, la diversidad es mayor en las capas superficiales del sustrato (de 2 a 10 cm) (Phaff *et al.*, 1978; Dix & Webster, 1995).

Aunque la diversidad de las comunidades de hongos del suelo está relacionada con la diversidad de las comunidades vegetales, la riqueza de especies de la microbiota es desconocida y tal vez indeterminable (Chistensen, 1981) lo que puede atribuirse a una extensa diferenciación de microhábitats (Frankland, 1981).

La naturaleza cosmopolita de los hongos del suelo fue enfatizada por Domsch & Gams (1972), sin embargo se han encontrado diferencias considerables entre especies aisladas de diferentes biomas.

1.1.1 HONGOS FILAMENTOSOS DEL SUELO

Los hongos filamentosos que existen en el suelo presentan diversas estructuras morfológicas. En la mayoría de los micromicetes saprobios, con excepción de algunos Chytridiomycetes y levaduras, el cuerpo vegetativo o talo es el micelio, el cual está constituido por un conjunto de filamentos tubulares o hifas que representan la unidad estructural de los hongos (Dix & Webster, 1995). Las hifas pueden ser somáticas o fértiles y de su diferenciación se deriva una gran diversidad de estructuras relacionadas con las funciones asimilativas y reproductoras (Dix & Webster, 1995). Pueden ser efímeras, longevas o perennes; y tienen la capacidad de crecer rápidamente en sustratos simples (diversas fuentes de carbono como monosacáridos, disacáridos, etc.) o complejos como la celulosa o la lignina.

Con su amplia relación superficie/volumen/radio, las hifas son estructuras importantes para la descomposición de la materia orgánica. Están morfológicamente adaptadas para ramificarse sobre los sustratos, penetrar en ellos y digerir y absorber los nutrientes solubles (Kendrik & Parkinson, 1990). El micelio juega un importante papel en la estabilización del suelo pues enlaza los agregados del suelo y reduce la erosión, ayudando a incrementar la capacidad de retención de agua y aireación (Dix & Webster, 1995; Wuczkowski *et al.*, 2003).

Otras estructuras características de los hongos filamentosos son las esporas y los esclerocios. Las esporas son una unidad de propagación con la capacidad de originar un nuevo individuo, y están involucradas en la supervivencia, migración, distribución de la variabilidad genética y en la reproducción sexual y asexual de especies, por lo que se pueden distinguir varios tipos de esporas. (Dix & Webster, 1995, Ulloa & Hanlin, 2006).

Los esclerocios son estructuras duras de resistencia, con forma, tamaño y color variables, que resisten condiciones adversas del medio, y tienen la capacidad de germinar y producir nuevo micelio (Dix & Webster, 1995).

Los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* presentan una distribución cosmopolita en todo tipo de suelos y son los que con mayor frecuencia predominan en la micobiota edáfica (Raper & Fennell, 1977; Pitt, 1979; Christensen, 1981, 1989, Domsch *et al.*, 1993).

1.1.2 LEVADURAS DEL SUELO

Las especies de levaduras que presentan una vida saprobia tienen acceso a todos los tipos de suelo (Di Menna, 1964; Kurtzman & Fell, 1998), y éste es considerado más como un reservorio que como un hábitat en el que las levaduras pueden desarrollarse libremente (Phaff *et al.*, 1978). Estos microorganismos no tienen la capacidad de degradar sustratos complejos, como la celulosa y otros polisacáridos, por lo que dependen de actividad enzimática de las bacterias y los hongos del suelo, que despolimeriza estos compuestos en sustancias simples disponibles, para el uso de las levaduras.

El papel más importante que las levaduras realizan en el suelo consiste en la descomposición de la materia orgánica en azúcares simples, y los aminoácidos en polímeros más resistentes como la lignina y complejos de ácido húmico del suelo (Sláviková, en prensa). Los factores limitantes para las levaduras en el suelo son la temperatura y el contenido de humedad.

Las levaduras pueden encontrarse en el suelo como células aisladas de diversas formas y tamaños; como cadenas de células o pseudomicelio o formando un micelio bien desarrollado que puede o no fragmentarse en artrosporas. Generalmente se reproducen vegetativamente por gemación, aunque algunos géneros se reproducen por fisión. La reproducción sexual en los ascomicetes se realiza mediante la formación de ascas que no están contenidas dentro de un cuerpo fructífero y donde se lleva a cabo la generación de endosporas sexuales. En los basidiomicetes la formación de las esporas sexuales (basidiosporas) es de manera externa en los basidios o teliosporas. (Kurtzman & Fell, 1998)

A pesar de que la mayoría de las levaduras son sáprobias (Phaff *et al.*, 1978) el total de levaduras encontradas en el suelo es proporcionalmente pequeño en comparación con el número de bacterias y hongos filamentosos presentes en este sustrato. Las poblaciones van desde ninguna a varios cientos de células por gramo de suelo (Phaff *et al.*, 1978, Kurtzman & Fell, 1998).

En sus estudios sobre la distribución de levaduras en suelo de bosques, Di Menna (1964), Phaff *et al.* (1978) y Wuczkowski *et al.* (2003) han señalado que existe una marcada predominancia de Basidiomycetes, con una alta frecuencia de especies de *Trichosporon* y *Cryptococcus*, este último considerado cosmopolita junto con el género *Debaryomyces* (Kurtzman & Fell, 1998).

1.2 MICROMICETES EN EL ECOSISTEMA CAVERNÍCOLA

Se podría pensar que los hábitats hipogeos son ambientes hostiles para la vida en general dado que se considera que la oscuridad no permite el desarrollo de la vida vegetal, y por consiguiente tampoco la producción primaria como se conoce en los ambientes epigeos, por lo que los animales sufren de la escasez de recursos alimenticios (Gunde-Cimerman *et al.*, 1998). Sin embargo los ambientes cavernícolas ofrecen las condiciones físicas (oscuridad, humedad y temperatura constante) y químicas (sustrato nutritivo derivado de residuos vegetales y animales) ideales para la supervivencia y crecimiento de una diversa micobiota saprobia y patógena que influye en la dinámica poblacional de la biota de toda la cueva (Gunde-Cimerman *et al.*, 1998; Nieves-Rivera, 2003; Montagna *et al.*, 2003; Benoit *et al.*, 2004).

Dentro de una cavidad la génesis del suelo es variada e insignificante en comparación con el suelo normal, ya que nunca se constituirá un perfil edáfico como tal dentro de las cuevas (Hoffmann *et al.*, 1986). Los hongos pueden encontrarse a todo lo largo de ellas, y en los cuatro biotopos reconocidos para las mismas: suelo/pared, agua, guano y murciélagos, a diferencia de otros organismos como las plantas, los musgos y las algas, que se encuentran sólo en los primeros metros a partir de las entradas. Otros organismos troglobios, troglófilos y trogloxenos se presentan de modo regular dentro de las cuevas, pero siempre presentan límites de distribución determinados por sus características morfofisiológicas, que evitan su llegada, establecimiento y colonización en la zona profunda, o bien, evitan el paso hacia las zonas de transición y de entrada, según sea el caso (Fig. 1.1).

Las cuevas además generan condiciones de protección para la micobiota interna al prevenir la desecación y evitar el estrés del ambiente exterior y de las adversidades climáticas como la luz UV, los cambios de temperatura y el viento (Montagna *et al.*, 2003). En la figura 1.2 se muestra cómo la intensidad luminosa disminuye y la humedad atmosférica aumenta notablemente con la profundidad de la cueva. El clima del interior de las cuevas es menos variable que en el exterior, y generalmente se mantiene como un sistema estable, donde la temperatura a lo largo de la cueva es aproximadamente igual a la media anual de la región y no fluctúa demasiado (Hoffmann *et al.*, 1986).

Las investigaciones realizadas por Northup *et al.*, 1994 indican que muchos microorganismos presentes en las profundidades de las cuevas son idénticos a los encontrados en la superficie, siendo oportunistas activos sólo bajo condiciones desfavorables de crecimiento. Benoit *et al.* (2004) asumen que la mayoría de los hongos de las cuevas son saprobios que se originan del suelo, hojas frescas y basura orgánica (restos de plantas y animales). La micobiota conocida para estos sustratos es dominada por hongos mitospóricos (géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Histoplasma*, *Acremonium*, *Geotrichum*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Sepedonium*, *Trichoderma*, *Paecilomyces* y otros hifomicetes) y zigomicetes (géneros *Mucor* y *Rhizopus* principalmente) que proliferan cuando encuentran una fuente de alimento (Orpurt, 1964; Carvajal Zamora, 1977a; Volz & Ji Ping Yao, 1991;

Northup *et al.*, 1994; Cunningham *et al.*, 1995; Gunde-Cimerman *et al.*, 1998; Koilraj *et al.*, 1999; Reeves *et al.*, 2000; Nieves-Rivera, 2003; Griskhan *et al.*, 2003; Benoit *et al.*, 2004; Ulloa *et al.*, 2006).

Región antes de la cueva	Región de la entrada		Región de transición		Región oscura (profunda)
	Zona externa	Zona interna	Zona externa	Zona interna	
Plantas con flor	→				
Pteridofitas			→		
Musgos				→	
Algas					→
Bacterias/Hongos					→
Troglóbios				←	
Troglófilos					→
Troglóxenos				→	

Figura 1.1 Distribución de plantas y animales en una cueva. Línea continua = presencia regular; línea punteada = límite de la zona de población (modificado por Dobat, 1996).

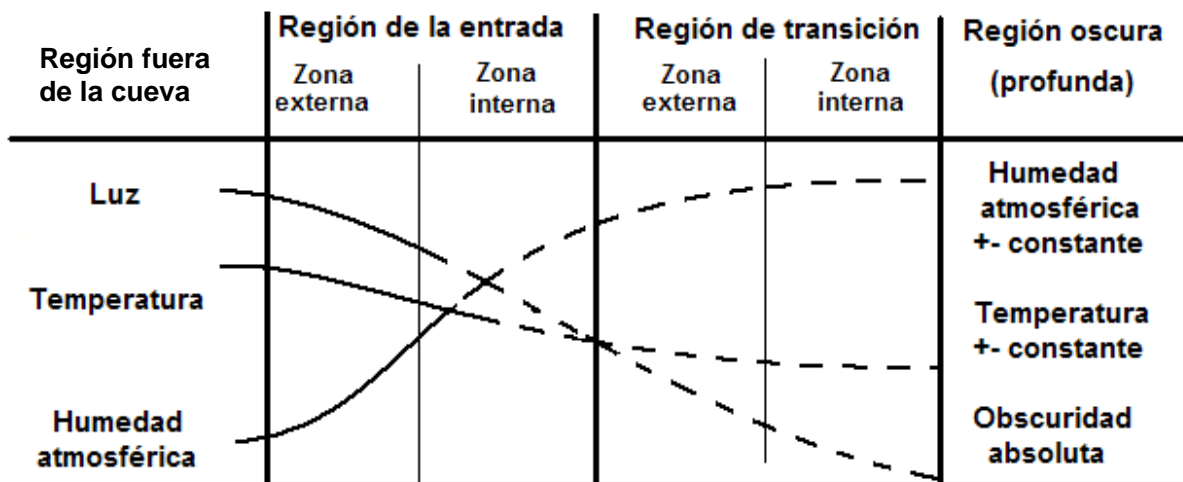


Figura 1.2 Relaciones climáticas en una cueva (Dobat, 1996)

Las levaduras asociadas a ambientes cavernícolas han sido someramente estudiadas; los géneros que se han identificado son *Candida*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* *Trichosporon*, entre otros (Martini, 1961; Martini, 1963; Orpurt, 1964; Ajello *et al.*, 1977; Vaughan-Martini *et al.*, 2000; Montagna *et al.*, 2003; Sugita *et al.*, 2005; Ulloa *et al.*, 2006). La diversidad de especies de esta biota es el resultado tanto de presiones externas asociadas al clima de la región y a los periodos de precipitación, como a la presencia de animales y el hombre (Vaughan-Martini *et al.*, 2000).

Los hongos pueden ingresar a las cuevas por tres medios de arrastre principales:

- *Agua*: las lluvias, inundaciones, infiltraciones (agua vadosa) y ríos subterráneos. (Cunningham *et al.*, 1995; Northup *et al.*, 1997; Northup & Lavoie, 2001).
- *Viento*: corrientes de aire e intercambio gaseoso en la entrada de las cuevas, ocasionado por las presiones barométricas y de temperatura. (Carvajal-Zamora, 1977b; Cunningham *et al.*, 1995; Northup *et al.*, 1997).
- A través de materia orgánica y animales:
 - Transporte en plantas y otros materiales orgánicos (Benoit *et al.*, 2004) que entran en las cuevas por gravedad u otros medios.
 - Transporte en troglóxenos y troglófilos, vertebrados e invertebrados (Martini, 1963; Cunningham *et al.*, 1995; Northup *et al.*, 1997; Northup & Lavoie, 2001; Nieves-Rivera, 2003; Benoit *et al.*, 2004).
 - Por heces fecales (guano) y otros desechos orgánicos de vertebrados. (Orpurt, 1964; Mok *et al.*, 1982; Ulloa *et al.*, 2006). Los depósitos de guano de murciélagos carnívoros, insectívoros y frugívoros representan un factor dominante en la presencia y proliferación de micromicetes dentro de la cueva (Orpurt, 1964; Vaughan-Martini *et al.*, 2000).

1.2.1 ECOLOGÍA E IMPORTANCIA DE LOS HONGOS EN EL HÁBITAT CAVERNÍCOLA

Las bacterias junto con los hongos del suelo son microorganismos activos que degradan materia orgánica, sintetizan vitaminas, oligoelementos y factores de crecimiento favoreciendo así la producción de fuentes de alimentos y haciéndolos más accesibles a la comunidad cavernícola (Galán, 2004). Esto convierte a ambos grupos microbianos en un componente indispensable en la cadena trófica en el ecosistema de la cueva. Además los hongos y las levaduras son consumidos comúnmente por insectos, ácaros, protozoarios y otros animales (Phaff *et al.*, 1978, Koilraj *et al.*, 1999), y a su vez, estos organismos ayudan a la distribución de los micromicetes dentro de la cueva.

Asimismo, los hongos contribuyen al mantenimiento de la estructura del suelo facilitando la aeración y la retención del agua. Son promotores activos y pasivos de las reacciones de óxido-reducción que influyen en las formaciones geológicas cavernícolas (espeleotemas) induciendo la mineralización y formando lo que se conoce como biokarst (Cunningham *et al.*, 1995; Northup & Lavoie, 2001; Benoit *et al.*, 2004).

1.3 ANTECEDENTES

1.3.1 EL ESTUDIO DE LOS HONGOS CAVERNÍCOLAS EN EL MUNDO

A nivel mundial se ha descrito una gran variedad de microorganismos que viven en los hábitats terrestres y acuáticos cavernícolas. Una de las primeras publicaciones fue la de Høeg (1946) quien

estudió las cianofitas y las bacterias presentes en las paredes de cuevas de Noruega. En 1949, Emmons aisló de la naturaleza el hongo *Histoplasma capsulatum*, agente causal de la histoplasmosis, y señaló que su hábitat natural son las acumulaciones de guano de diversas aves (incluyendo aves de corral) y de murciélagos (Emmons, 1949).

En la década de los 60's Martini (1961, 1963) inició la investigación sobre micromicetes, en particular, acerca de la diversidad de levaduras en ambientes cavernícolas de Perugia, Italia (Caverna di Monte Cucco en Pian delle Rotte y Parrano).

Posteriormente Orpurt (1964) publicó una lista de especies de hongos filamentosos y levaduras aislados del suelo de varias cuevas de la isla Eleuthera en las Bahamas, que se encontraban habitadas por murciélagos.

Ajello y colaboradores (1977) aislaron el hongo *H. capsulatum* a partir de muestras de suelo de una cueva habitada por murciélagos en el norte de Israel, utilizando el método de la inoculación en ratón. También obtuvieron aislamientos de otros micromicetes de importancia médica (*Candida parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*, *Petriellidium boydii*, entre otros). Carvajal Zamora (1977a y b) refirió el aislamiento de *H. capsulatum* del aire y del suelo de las cuevas de Aguas Buenas, Puerto Rico; McMurray y Russell (1982) realizaron un estudio acerca de la contribución de los murciélagos en el mantenimiento y diseminación de *H. capsulatum* en la cueva Bracken Cave, Texas para lo cual colectaron murciélagos y muestras de suelo.

En diversos estudios realizados en la cueva Ramioul, Bélgica, Malloch y Hubart (1987) describieron la especie de *Microascus caviariformis*; posteriormente Malloch *et al.*, (1987) aislaron de las paredes de la cueva esclerocios fósiles de *Cenococcum geophilum*, y Malloch y Khan (1988) registraron la presencia de hongos entomopatógenos.

En 1991 Volz y Ji Ping Yao determinaron la diversidad de hongos filamentosos en muestras de sedimento de la cueva Hendrie River Water Cave, Michigan, EUA (Volz & Ji Ping Yao, 1991), y a continuación Landolt *et al.* (1992) establecieron la presencia de especies de *Dictyostelium* y de *Polysphondylium* en 23 cuevas del oeste de Virginia, EUA.

En 1994, Rutherford y Huang determinaron la microbiota en sedimentos de cuevas en Virginia, E.U.A. y el mismo año Northup y colaboradores publicaron un trabajo sobre la diversidad de invertebrados, hongos y bacterias de la cueva Lechuguilla en Nuevo México, E.U.A, e indicaron que los géneros más abundantes y ubicuos en este ambiente eran *Penicillium* y *Aspergillus* (Northup *et al.*, 1994). Posteriormente surgió interés por estudiar las interacciones entre los microorganismos y el sustrato cárstico en esa misma cueva, iniciándose así la geomicrobiología de las cuevas y el concepto de *biokarst*. Cunningham *et al.* (1995) obtuvieron resultados de estas interacciones entre bacterias y hongos con el crecimiento de espeleotemas en la misma cueva. Northup *et al.* (1997) publicaron en las noticias de la National Speleological Society una revisión de los microorganismos cavernícolas, su importancia y su conservación.

La presencia de los hongos en el ecosistema cavernícola empezó a ser cada vez más evidente. Con su estudio de la micobiota de los cadáveres de grillos cavernícolas, Gunde-Cimerman *et al.* (1998) señalaron el papel que tienen los hongos como reguladores de las poblaciones de insectos en estos ambientes y la utilización de los cadáveres como fuente de alimento para la micobiota saprobia.

Koilraj *et al.* (1999) realizaron un análisis comparativo de la diversidad de especies de hongos y su distribución en las zonas de la entrada, penumbra y oscuridad de seis cuevas del sur de la India (cueva Samanar, cueva Pannian, cueva KKB I, cueva KKB II, cueva Ramanathapuram y cueva Veerasihamani) y señalaron que los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* predominaban en número de especies en la entrada de las cuevas.

Durante el estudio de los cortes de diversos sustratos obtenidos en las cuevas de las montañas de Guadalupe, Nuevo México, EUA, Northup *et al.* (2000) observaron la interacción geomicrobiológica entre el crecimiento mineral y organismos semejantes a bacterias y estructuras filamentosas similares a hifas. En el mismo año Reeves *et al.* publicaron un listado de los hongos y la fauna existente en 52 cuevas en Georgia, EUA; y Vaughan-Martini y colaboradores investigaron el efecto que tenía la visita de animales y humanos en la ecología de las levaduras en tres cuevas, Grotta del Vento, Grotta del Fiume y Grotta del Santuario, ubicadas en el complejo Frasassi en la región Marche de Italia, y enlistaron las especies de levaduras aisladas del suelo, depósitos de guano y paredes. Dichas especies fueron identificadas por sus características fenotípicas (morfofisiológicas) y genotípicas (determinación de los cariotipos en electroforesis en campo pulsado de PFGE).

Posteriormente Northup y Lavoie (2001) publicaron una revisión de geomicrobiología en cuevas y localidades, donde evidenciaron la presencia de hongos en los procesos de disolución de espeleotemas y en el crecimiento de cristales, y su papel como promotores pasivos de las reacciones de óxido-reducción en las cuevas.

Nieves-Rivera (2003), presentó un listado de la micobiota (39 especies) aislada de muestras de guano de murciélago, hojarasca, madera, agua y suelo en el sistema de cuevas de Río Camuy en Puerto Rico; Grishkan *et al.*, (2003), registraron 68 especies de micromicetes de la cueva salina Arubotaim en Israel y Montagna *et al.* (2003), informaron, por vez primera, la presencia del hongo patógeno *Cryptococcus neoformans* en muestras de guano de murciélago, guano de palomas y heces de zorro procedentes de tres cuevas en Apulia, Italia.

Continuando con los estudios sobre la micobiota cavernícola, Benoit *et al* (2004) aislaron e identificaron los hongos asociados a cadáveres de grillos troglóxicos de las cuevas Coon-in-the-Crak y Laurel, Kentucky, EUA. Galán (2004) publicó bajo los auspicios de la Federación Espeleológica de América Latina y del Caribe (FEALC) un boletín en el que se describían las características del ambiente hipogeo y se reconocía el papel preponderante de los hongos y las bacterias en la generación de la producción primaria dentro de las cuevas.

En una investigación realizada en cuevas de Japón habitadas por murciélagos. Sugita *et al.* (2005) identificaron por métodos tradicionales (morfofisiológicos) y moleculares (secuenciación del dominio D1/D2 del gene 26S ADNr y de las regiones pITS-F-5.8S-pITS-R ADNr) varias especies de levaduras de los géneros *Trichosporon*, *Candida*, *Saccharomyces*, y *Cryptococcus*, algunas de las cuales son reconocidas como agentes patógenos para el hombre por lo que representan un peligro inminente para los espeleólogos y visitantes de las cuevas.

Asimismo, en la última década se han realizado varias investigaciones en la cueva Lascaux, Francia, reconocida mundialmente por su valor antropológico por las pinturas prehistóricas de animales que se encuentran en ella, y que están siendo afectadas por el crecimiento de *Fusarium solani*. Los estudios se enfocan en conocer las causas del crecimiento de dicho hongo y su erradicación para la conservación de las pinturas (Simons, 2007).

1.3.2 EL ESTUDIO DE LOS HONGOS CAVERNÍCOLAS EN MÉXICO

Las primeras investigaciones bioespeleológicas realizadas en el país fueron las del naturalista austriaco Bilimek en 1866, quien colectó y describió los primeros animales cavernícolas de las Grutas de Cacahuamilpa, Guerrero (Hoffmann *et al.*, 1986). A partir de esa fecha continuaron las investigaciones de la biota cavernícola de esta gruta, y se registró la presencia de *H. capsulatum* (Hoffmann *et al.*, 1986).

El nacimiento de la bioespeleología formal en México tuvo lugar en 1940, con la llegada al país de los españoles Bolívar y Bonet, quienes se instalaron en el país y realizaron estudios y descripciones de especies de animales cavernícolas. Posteriormente Hoffmann y Palacios Vargas (1978) participaron en un estudio interdisciplinario en la Cueva del Diablo, Morelos, y obtuvieron los primeros registros de micobiota (*Aspergillus*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Rhizopus*, y un “hongo levaduriforme no identificado”) presente en sustratos de dicho ambiente.

Hoffmann *et al.* (1986) publicaron el Manual de Bioespeleología, el cual incluye un listado de la micobiota, de la flora y de la fauna identificada en cuevas de Morelos y Guerrero. Los hongos incluidos en la lista son los géneros: *Actinomucor*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Gliocladium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Chaetomium* y *Coprinus*, y las especies *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus niger* y *Penicillium notarum*.

Con el fin de determinar la micobiota presente en el hábitat natural de *H. capsulatum* en el estado de Guerrero, México, Ulloa *et al.* (2006) aislaron a partir de muestras de suelo mezclado con guano de murciélago, colectadas en varias cuevas y minas, de excretas de aves de corral y del contenido estomacal de murciélagos con diversos hábitos alimenticios, hongos filamentosos y levaduras que se identificaron a nivel de especie considerando sus características morfofisiológicas; sólo para algunas especies cuya identidad fue dudosa se corroboró mediante la secuencia de pares de bases del dominio D1/D2 del gene 26S ADNr.

1.3.3 EL ESTUDIO DE LOS HONGOS CAVERNÍCOLAS EN LA CUEVA DE LOS RISCOS

La primera exploración de la Cueva de los Riscos fue realizada en agosto de 1966 por los espeleólogos J. Fish, D. Mackenzie, J. J. Reddell y R. Smith, todos ellos miembros de la Asociación para el Estudio de Cuevas de México (Reddell, 1981). Desde entonces La Cueva de los Riscos ha sido objeto de interés, debido a la biodiversidad de organismos encontrada dentro de ella. En 1986, Morales-Malacara y Vázquez realizaron estudios acerca de la diversidad de fauna y flora dentro de la cueva, y obtuvieron un listado de las especies encontradas. Entre los hongos encontrados incluyen *Xilaria sp.* y *Polyborus sp.*, ésta última asociada con coleópteros de los géneros *Trechus*, *Colpodes* y *Bradycellus*. Posteriormente Morales-Malacara (2005) efectuó un trabajo comparativo de dicha diversidad, y actualmente encabeza un grupo interdisciplinario de investigadores y estudiantes enfocados en el estudio bioespeleológico integral de la mencionada cueva, así como de otras localizadas en la región de Pinal de Amoles, Querétaro.

Durante el evento espeleológico anual, Semana de Cuevas 2006, realizado en la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, Espino del Castillo expuso un trabajo preliminar sobre la micobiota asociada al suelo de la Cueva de los Riscos, donde se presentaron los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium* y *Trichoderma*. De entre ellos, los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* mostraron la mayor diversidad de aislados.

2. JUSTIFICACIÓN

En años recientes el interés mundial en la bioespeleología ha crecido significativamente. Esta ciencia ha tenido grandes progresos generando conocimiento sobre las diversas y complejas formas de vida que habitan en las cuevas.

Algunos estudios se han enfocado en el conocimiento de la diversidad microbiana, y en particular de la micobiota presente en los ecosistemas cavernícolas, y aún así se considera que el avance en este campo de estudio es aún incipiente (Montagna *et al.*, 2003). Ciertas investigaciones se han centrado en la detección de organismos patógenos y alérgenos para los espeleólogos y otros visitantes asiduos de las cuevas, como los turistas y los trabajadores de cuevas artificiales o minas. Otras investigaciones se han enfocado en el estudio de microorganismos quimiolitotróficos (geomicrobiología).

El escaso conocimiento de la diversidad de la micobiota presente en ambientes cavernícolas en el país subraya la importancia de realizar estudios sobre la diversidad, distribución y ecología de dichos organismos, y de evaluar los riesgos potenciales de dicha micobiota por la patogenicidad en estos ambientes.

2.1 OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo fue identificar las especies de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, así como de las levaduras asociadas al suelo y al guano del túnel principal de la Cueva de los Riscos. Los objetivos particulares derivados del anterior fueron los siguientes:

1. Aislar, cuantificar e identificar fenotípica y genotípicamente la micobiota presente (de los grupos seleccionados) en muestras de suelo colectadas en cuatro diferentes puntos a lo largo del túnel principal de la cueva.
2. Conocer las características abióticas (temperatura, humedad e intensidad luminosa) en cada punto de colecta que propician el desarrollo de dichos hongos.
3. Conocer los parámetros químicos de los sustratos que favorecen el desarrollo de los hongos.
4. Comparar la lista de especies encontradas con las registradas en la literatura.

3. GRUPOS DE ESTUDIO

3.1 HONGOS FILAMENTOSOS

Para el presente estudio se consideraron los géneros *Penicillium* Link ex Gray y *Aspergillus* Micheli, que son hongos mitospóricos de la familia Trichocomaceae (División: Ascomycota, Orden: Eurotiales) (Samson & Pitt, 2000). Las especies de estos géneros son saprobias ubicuas y sus conidios se distribuyen fácilmente a través de la atmósfera (Raper & Fennell, 1977; Pitt, 1979; Domsch *et al.*, 1993).

El género *Aspergillus* suele presentarse con mayor frecuencia en regiones cálidas, mientras que el género *Penicillium* se encuentra más relacionado con ambientes de zonas templadas (Domsch *et al.*, 1993).

Ambos son de los géneros de hongos más estudiados debido a: 1) su distribución, ya que son cosmopolitas, 2) su ubicuidad, porque se presentan en diferentes tipos de sustratos y ambientes, 3) su importancia industrial, por su capacidad de producir metabolitos secundarios de relevancia económica, 4) su importancia médica, por las especies toxígenas y patógenas oportunistas, y 5) la facilidad de manejo en condiciones de laboratorio (Romer-Rassing & Gürtler, 2000).

A continuación se describen las características principales de estos géneros.

3.1.1 GÉNERO *Penicillium* LINK EX GRAY 1821

Penicillium Link ex Gray *nom. cons. prop.* 1821. Nat. Arr. Br. Pl. 1: 554.

Penicillium Link, 1832. Obs. Mycol. 1:16, 1809 (*nom. inval.*, Art. 13f) *non* Link ex Fr., Syst. Mycol. 3: 406, *nom. Rej. Prop.*

Coremium Link ex Gray, 1821. Nat. Arr. Br. Pl. 1: 563.

Citromyces Wehmer, 1893. Bleitr. Kennt. Pilze 1:1.

DIAGNOSIS: El género *Penicillium* presenta un conidióforo constituido por un pedicelo y un cepillo o peine (penicilios) con un patrón de ramificaciones diverso. Pueden ser monoverticilados, biverticilados, triverticilados, cuadvverticilados o poliverticilados, donde se incluyen estructuras tales como ramas, ramillas, métulas, fiálides y conidios. (Fig. 3.1). Es quizá el género más ubicuo de todos, con gran cantidad de especies, la mayoría de las cuales son saprobias, algunas patógenas de importancia médica y otras de importancia industrial o económica (Pitt, 1979). Entre las especies más comunes están: *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. janthinellum*, *P. notatum*, *P. viridicatum* y *P. purpurogenum* (Patterson & McGinnis, 2007) de las cuales *P. chrysogenum* y *P. notatum* son utilizadas para la producción de antibióticos como la penicilina.

El género *Penicillium* ocasionalmente induce casos de infección en humanos, lo que se conoce como peniciliosis, y se presenta en pacientes inmunodeprimidos. De Hoog y Guarro (1995)

señalan a *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. commune*, *P. marneffeii* y *P. purpurogenum* como algunas especies patógenas oportunistas, y las especies *P. oxalicum*, *P. verrucosum*, *P. citeonigrum*, *P. islandicum*, *P. expansum*, *P. roqueforti*, *P. griseofulvum*, *P. purpurogenum*, entre otras, son productoras de micotoxinas (Carrillo, 2003).

En promedio, los hongos del género *Penicillium* pueden representar hasta el 35 % de la microbiota del suelo, donde la diversidad generalmente alcanza más de 75 especies por gramo de tierra (Christensen 1981, 1989).

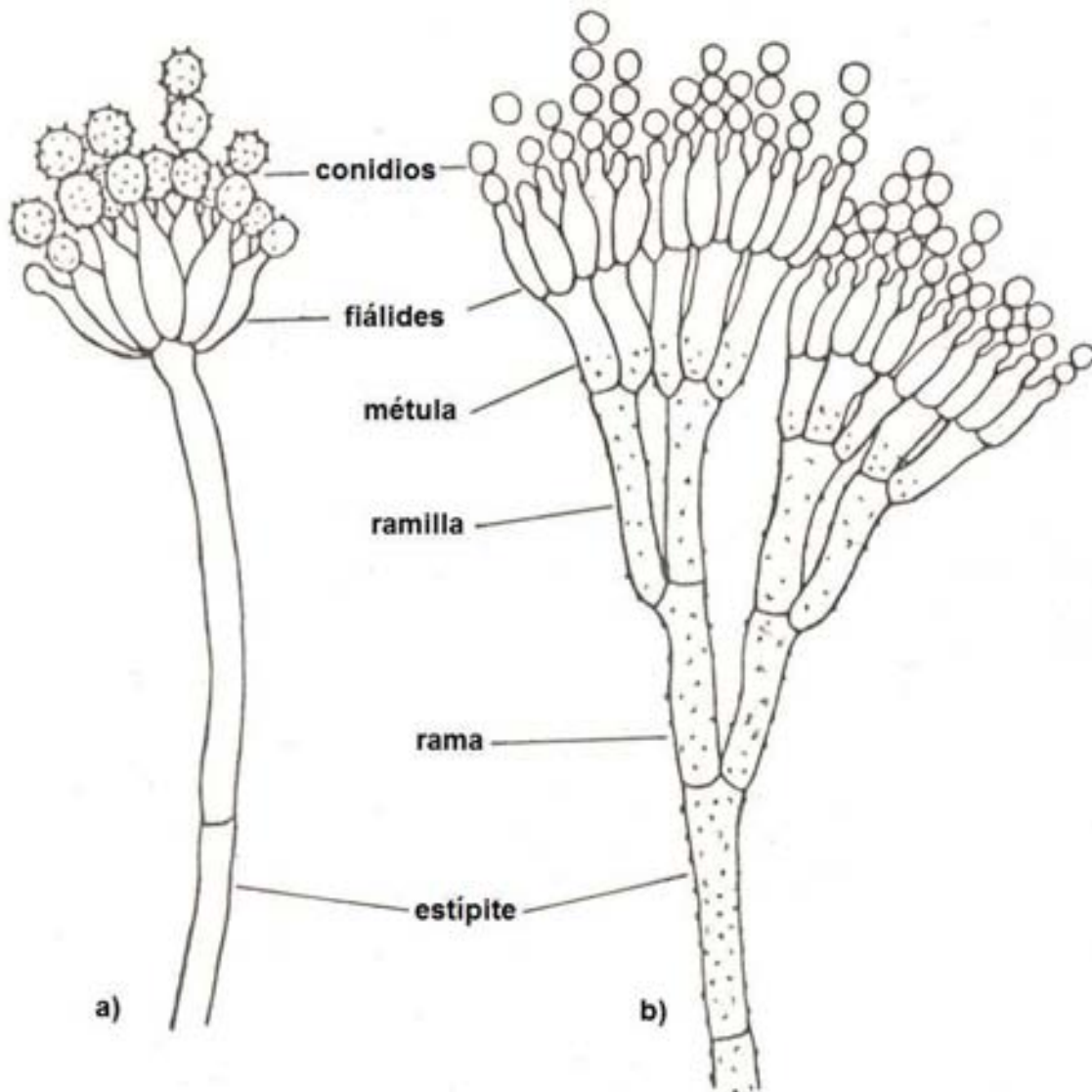


Figura 3.1. Tipos de penicilios, del más simple al más complejo, que se presentan en el género *Penicillium*. a) Monoverticilado, b) Cuadriverticilado (Pitt, 1979).

3.1.2 GÉNERO *Aspergillus* MICHELI 1729

Aspergillus Michelli, 1729. Nova Plantarum Genera, p. 212, lámina 91.

Eurotium Link, 1809. Observationes, p. 31, lámina 2, Fig. 44.

Sterigmatocystis Cramer, 1859. Vierteljahresschrift Naturforsch. Ges. Zurich, 4 (Heft 4), p. 325, lámina II, Figs. 1-15.

Inzengaea Borzi, 1884. Jahrb. Wiss. Botan. (Pingsheim), 16: 450-463, Láminas 19-20.

Emericella Berkeley and Broome, 1891. Berkeley's Introduction to Cryptogamic Botany, pp. 340-341, Fig. 76 (1857); Patouillard. Bull. Soc. Mycol. France 7: 43-49, lámina 4, Figs. 6-12; Benjamin, 1955. Mycologia 47: 678-679.

Euspergillus Ludwig, 1892. Lehrbuch der niederen Kryptogamen, p. 258.

Aspergillopsis Spegazzini, 1911. Anales museo Nacl. Buenos Aires, Ser. 3, 13: 434.

Diplostephanus Langeron, 1922. Comp. Rend. Soc. Biol. 87: 343-345.

Sartorya Vuillemin, 1927. Compt. Rend. 184: 136-137; Benjamin, 1955. Mycologia 47: 678, Fig.10.

DIAGNOSIS: El género *Aspergillus* se caracteriza por presentar un conidióforo con célula pie que termina en una cabezuela conidial, constituida por una vesícula cubierta parcial o totalmente por una o dos series de células, la uniseriada únicamente presenta fiálides, y la biseriada presenta métulas y fiálides. Los conidios pueden formar cadenas largas (Fig. 3.2). Este género representa uno de los hongos más ubicuos, con distribución cosmopolita y con gran cantidad de especies saprobias, algunas parásitas y otras son toxígenas (Raper & Fennell, 1977).

Entre los géneros de hongos filamentosos, *Aspergillus* es el que se ha aislado con más frecuencia de infecciones invasivas; alrededor de 20 especies, de un total de 185, han sido registradas como agente causal de infecciones oportunistas en el hombre conocidas como aspergilosis, y ocupa el segundo lugar como agente causal de micosis, después del género *Candida*. Las especies *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. niger* son las más conocidas como patógenas; *A. clavatus*, *A. flavipes*, *A. japonicus*, *A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. tamarii*, *A. terreus*, *A. ustus* y *A. versicolor* incluyen algunas patógenas oportunistas (de Hoog & Guarro, 1995; Patterson & McGinnis, 2007) y junto con las anteriores, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, y *A. giganteus* entre otras, son productoras de micotoxinas.

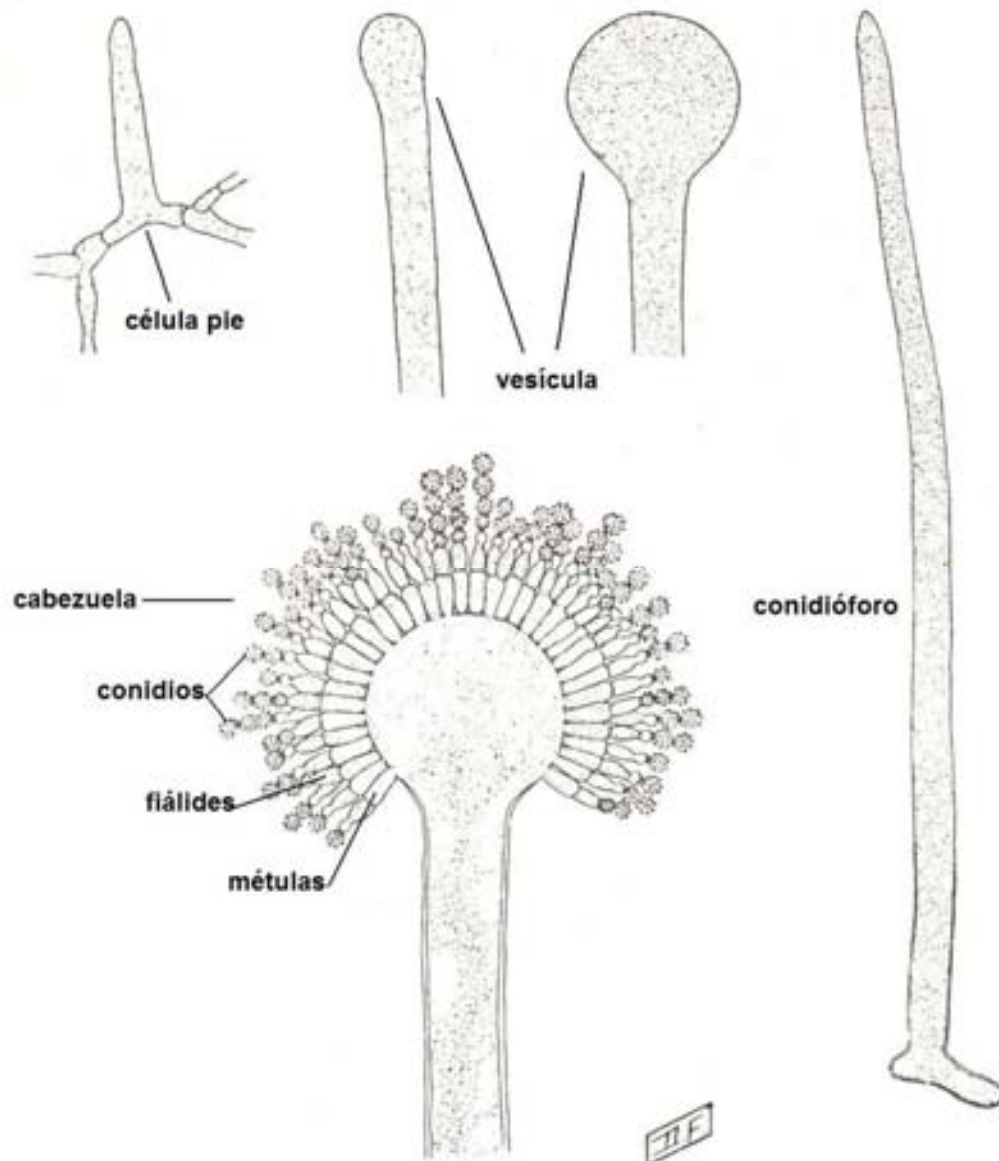


Figura 3.2. Formas y estructuras características que se presentan en las diferentes especies de *Aspergillus* (Klich, 2002).

3.2 LEVADURAS

Las levaduras constituyen un grupo artificial de hongos unicelulares filogenéticamente diverso, cuyos teleomorfos se clasifican en los phyla Ascomycota y Basidiomycota (Kreger-van Rij, 1984; Kurtzman *et al.* 1983). Son un grupo muy estudiado a nivel económico e industrial por sus propiedades fermentativas, tal es el caso de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, sin embargo también se conocen casos de patogenicidad en humanos por levaduras asociadas al suelo, como son las especies *Candida albicans*, *C. guilliermondii*, *C. pseudotropicalis*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus neoformans*, entre otras (Sugita *et al.*, 2005).

DIAGNOSIS: Las levaduras se caracterizan por presentar un talo unicelular uninucleado, con forma y tamaño variable. En la figura 3.3a se muestran las diferentes formas que se presentan en las células de las levaduras, entre las que pueden encontrarse: esférica, ovoide, ojival, elongada, apiculada, ampuliforme y curvada (Phaff *et al.*, 1978), lo cual depende de diversos factores, especialmente del sustrato en que viven y de la edad del cultivo (Olalde, 2003).

Las levaduras se reproducen vegetativamente por gemación (Fig. 3.3b); esta puede ser unilateral, bilateral o multilateral (Phaff *et al.*, 1978), sólo en los casos de algunas levaduras primitivas se presenta la reproducción mediante fisión. Algunas especies de levaduras tienen la capacidad de formar seudomicelio (Fig. 3.3c), que está compuesto por cadenas de células alargadas, separadas entre sí por un septo, que han sido formadas por gemación; sin embargo algunas especies producen hifas septadas verdaderas. En ocasiones las hifas septadas se rompen o se desarticulan en artrosporas de una sola célula (Fig. 3.3d) (Kurtzman & Fell, 1998).

En el caso de los Ascomicetes se producen ascas durante la reproducción sexual (Fig. 3.3e) y su pared celular tiene dos capas finas dispuestas estrechamente una junto a la otra. Los Basidiomicetes presentan teliosporas o basidios (Fig. 3.3f), donde las basidiosporas sexuales se forman de manera externa, su pared celular se presenta con varias series de capas (Kurtzman & Fell 1998).

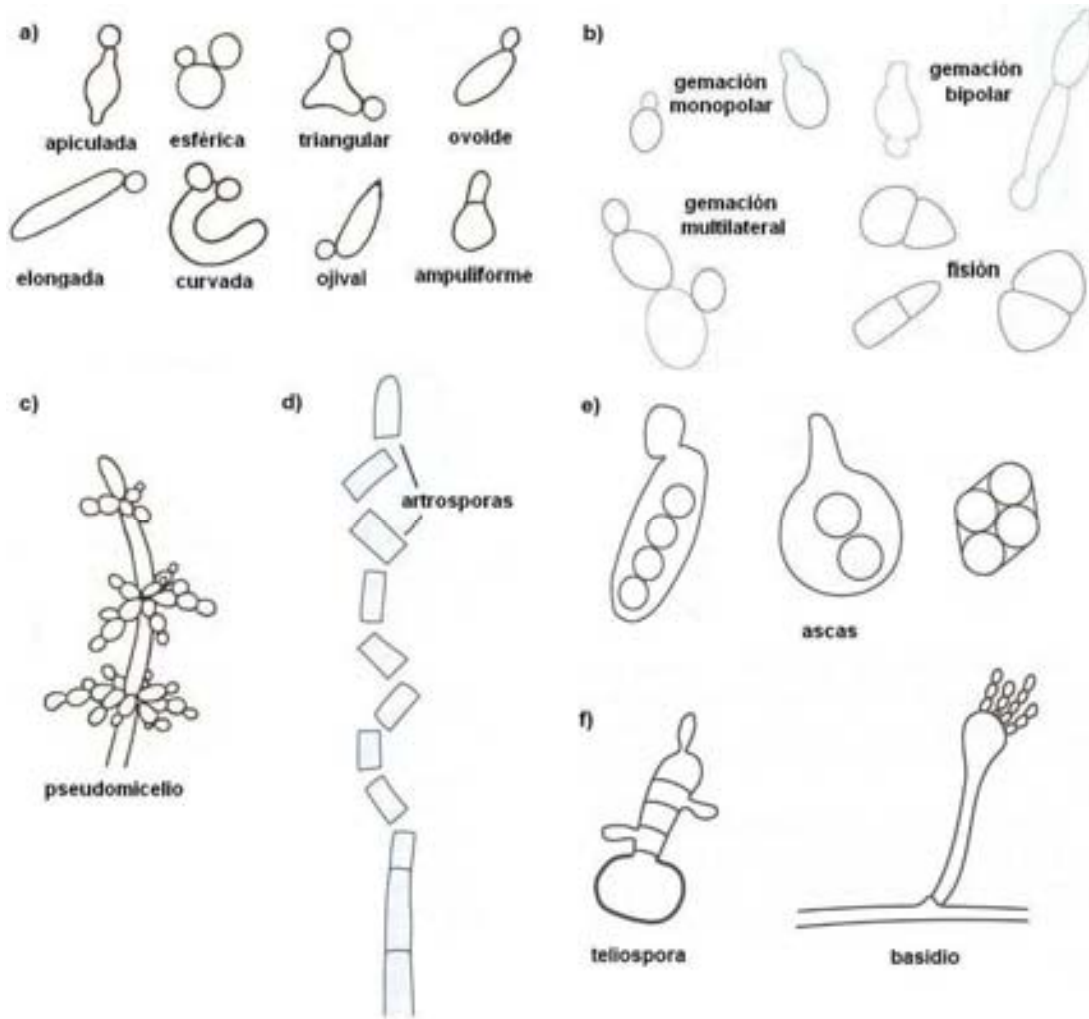


Figura 3.3. Formas y estructuras características que se presentan en las levaduras (Phaff *et al.*, 1978; Kurtzman & Fell, 1998).

4. SITIO DE ESTUDIO

4.1 LOCALIZACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LA CUEVA DE LOS RISCOS

La Cueva de los Riscos es una cavidad fósil originada por las calizas de la formación el Abra, se localiza en el municipio de Jalpan de Serra en el estado de Querétaro (Fig. 4.1), a 3 km del puente de Dios del río Jalpan, unos metros arriba del cauce del mismo río a una altitud de 1122 msnm y a 21° 11' 38" latitud norte, 99° 30' 50" longitud oeste (Lazcano Sahagún, 1986b).

Las condiciones físicas dentro de la Cueva de los Riscos están asociadas a los factores externos dados por el clima de la región y los periodos de precipitación. La permanencia del agua dentro de la cueva es variable dada la entrada ocasional del río por la diferencia en los periodos de sequía y lluvia. La máxima precipitación es entre junio y noviembre y la época más seca va de diciembre a mayo; la precipitación media anual es de 48.9 mm/24 h (Comisión de Estudios del Territorio Nacional CETENAL, 1986; Comisión Nacional del Agua CNA, 2004), y la temperatura media anual es de 24° C (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, INEGI, 1996; Coordinación General de los Servicios Nacionales de Estadística, Geografía e Informática CGSNEGI, 2004). Las numerosas filtraciones producidas por las lluvias han originado gran cantidad de concreciones dentro de la cueva.

El clima que se presenta es de tipo semicálido subhúmedo (A)C₁(wo)(w) según la clasificación de Köppen modificada por García (1981) y la categoría de vegetación presente en los alrededores de la cueva es de bosque mesófilo de montaña (Carabias Lillo *et al.*, 1999). La textura del suelo es migajón arenoso, con aproximadamente los mismos porcentajes de limo y arcilla, pero con una preponderancia mayor de arena (Morales-Malacara & Vázquez, 1986).

La cueva es un sistema mixto pero con desarrollo preponderantemente horizontal formado en un macizo sedimentario con una profundidad de 35 m y una longitud de cerca de 550 m (Lazcano Sahagún, 1986; Morales-Malacara & Vázquez, 1986). Se encuentra dividida en ocho zonas designadas de la A-H (Fig. 4.2) según los accidentes topográficos dentro de ella. Para este estudio se consideró como túnel principal de la cueva el de mayor longitud, que comprende las zonas A, C y D.

La Cueva de los Riscos tiene cuatro entradas, tres laterales que corresponden a pasillos estrechos (zonas E, F y H) y desembocan en una amplia galería; y la entrada principal, la cual forma un puente natural que accede a una amplia boca que se abrió por un antiguo colapso (zona A), y como consecuencia de ello, el vestíbulo está provisto de grandes bloques rocosos por donde se descienden 25 m hasta llegar a un espacioso salón (zona C) con 100 m de largo por 25 m de ancho y 18 m de alto que presenta gran cantidad de concreciones.



Figura 4.1. Colonia San Martín, municipio de Jalpan de Serra, Querétaro, México.

La zona A es un espacio inclinado que se caracteriza por estar completamente iluminado y presenta flora y fauna similar a la que se encuentra en el exterior de la cueva. La vegetación encontrada consta principalmente de las siguientes especies: *Tectaria heracleifolia* (Polypodiaceae), *Chamaedorea sartorio* (Arecaceae), *Dendropanax sp.* (Araliaceae), *Hibiscus sp.* (Malvaceae), *Trichilia havanensis* (Meliaceae), *Urtica sp.* (Urticaceae), *Teperonia quadriphyllia* (Tiperaceae) y *Tillandsia recurvata* (Bromeliaceae). Esta zona comprende también la entrada a una gran galería al pie de los bloques rocosos, cuyo sustrato es arena y aún está bien iluminado.

Esta parte conecta con la zona C del lado izquierdo y con la zona B del lado derecho, que es un túnel amplio, poco iluminado con meandros. Al fondo presenta una zona de derrumbe de 35 m de altura aproximadamente, cubierta por formaciones calcáreas. La elevación conecta con otros túneles cortos.

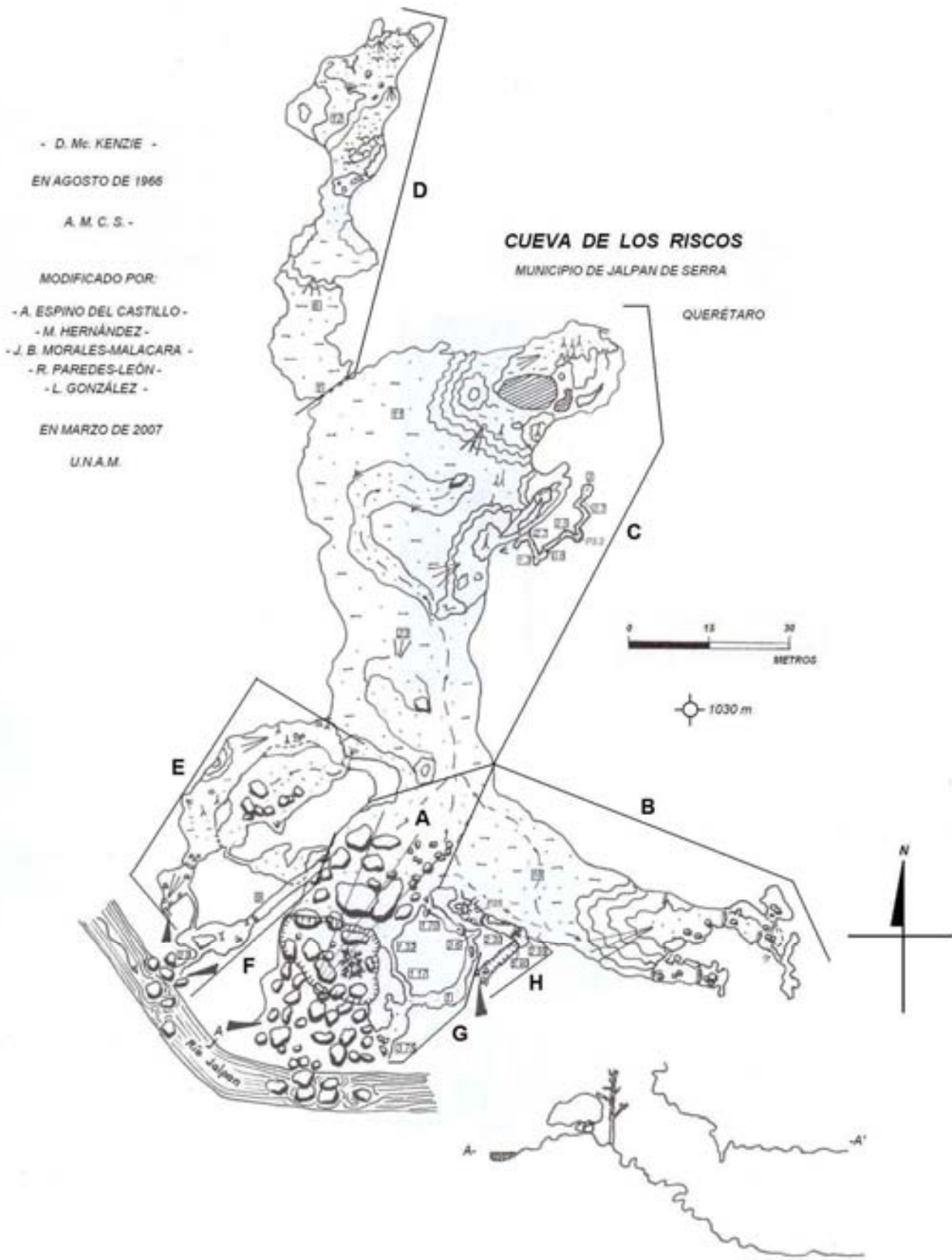


Figura 4.2. Esquema de la Cueva de los Riscos, Jalpan de Serra, Querétaro. Se muestran las letras designadas para cada zona. Las puntas de flecha marcan cada una de las entradas.

La zona C consta de un pasillo largo y amplio con poca iluminación, cuyo sustrato es barro seco. Conforme se avanza hacia adentro, el barro se presenta más compacto y cuarteado. El túnel es atravesado longitudinalmente por un meandro de aproximadamente dos metros de profundidad que parece ser huella de un antiguo río formado por la entrada de las crecidas del río Jalpan. Del lado derecho, en la parte media del túnel, se encuentra una elevación formada por una colada de concreción calcárea con una gran estalagmita en el remate. Más delante se halla otra elevación calcárea de aproximadamente 8 m de altura, que conecta con un pasillo accidentado en forma de herradura, ahí se encuentra un gour permanente de aproximadamente 3 m de diámetro con cerca de 50 cm de profundidad. Se presentan pequeñas pozas de escurrimiento y una gran depresión causada probablemente por un gour fósil. Esta zona es de completa oscuridad.

Del lado izquierdo y al fondo de la zona C continúa la zona D, que es un túnel con niveles escalonados. Es una zona de completa oscuridad, en cuyo fondo se presentan poblaciones de murciélagos vampiro (*Desmodus rotundus* y *Diphylla ecaudata*), por lo que el sustrato de esta zona es típicamente de guano sanguinolento. También presenta escurrimientos importantes formando pequeños gour temporales.

Además de los murciélagos, la fauna dentro de la Cueva de los Riscos incluye anuros (*Syrhophus longipes* y *Buffo valiceps*), peces (*Astyanax mexicanus*), anélidos, crustáceos (Isopoda), dípteros, ortópteros (Gryllidae), coleópteros (Tenebrionidae), lepidópteros, tisanuros (Machilidae), arácnidos (Pholcidae, Dipluridae, Ctenidae, Linyphidae), opiliones (Laniatore y Palpatore), hemípteros, himenópteros, quilópodos y diplópodos, así como ácaros parásitos de murciélagos y protozoarios (Sigala, 2008).

En esta cueva existe un aporte continuo de materia orgánica donde la parte vegetal está constituida por semillas, plántulas, hojarasca y otros restos arrastrados hacia el interior de la cueva mediante agua, viento y gravedad (Figura 4.3A). La materia orgánica animal proviene de los desechos de troglófilos y troglóxenos que entran, viven y mueren en la cueva (Figura 4.3B).

La cantidad y tipo de materia orgánica varía conforme aumenta la profundidad de la cueva. Así la materia orgánica vegetal predomina en las inmediaciones del vestíbulo o zona A: plantas, musgos, fragmentos vegetales, hojarasca, esporas, hongos, y otros (Morales-Malacara & Vázquez, 1986).

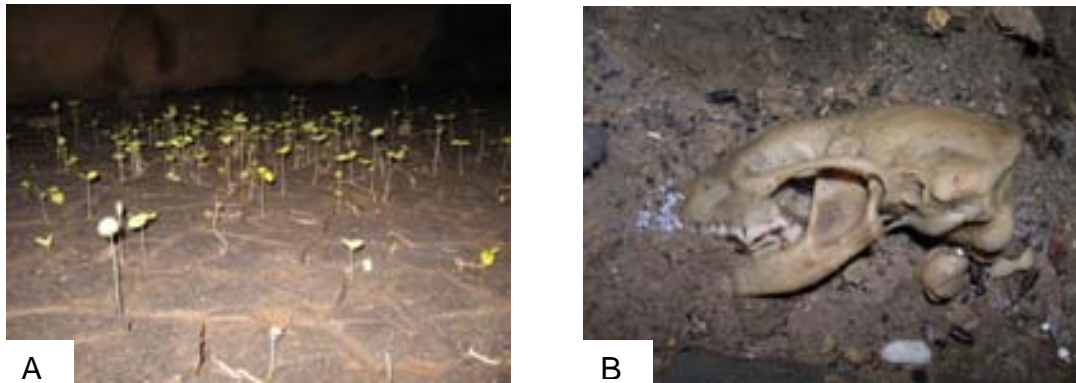


Figura 4.3. Aporte de materia orgánica. (A) Plántulas creciendo en el interior de la Cueva de los Riscos como producto del transporte por viento y agua. (B) Restos de mamífero encontrados en el interior de la Cueva de los Riscos. (Fotos de A. Espino del Castillo 2006/2007).

4.2 ETNOESPELEOLOGÍA DE LA CUEVA DE LOS RISCOS

Partiendo de la carretera, a la altura de la Colonia San Martín (Fig. 4.1), se localiza la brecha que conduce a la entrada de la Cueva de los Riscos. El recorrido puede durar de 30 minutos a 1 hora caminando por un terreno que tiende a ser accidentado en algunas partes.

Aún así, los pobladores de las colonias Ahuacatlán, Huajales y San Martín la visitan a menudo, según la información obtenida en entrevistas hechas en el año 2007.

Orgullosos de tener una cueva que pueden visitar, los habitantes la consideran un sitio turístico, de esparcimiento y diversión donde pueden además realizar reuniones familiares y sociales e inclusive celebraciones religiosas.

Las zonas más visitadas corresponden a las designadas con las letras A, B, C, E, y en ocasiones la D. Estas zonas comprenden formaciones que la gente reconoce con los nombres “El Púlpito”, “El Caracol”, “Las Campanas”, “Las Pilas” y “La Casa de los Murciélagos”, entre otros.

Hace 15 años aproximadamente, los habitantes de las tres colonias acostumbraban realizar procesiones desde sus pueblos hacia la Cueva de los Riscos durante la celebración de la Semana Santa, principalmente el lunes de Pascua. Las personas solían llevar asadores a la cueva que descendían con mecates. Había además música de viento y banda. La gente bailaba y comía hasta el anochecer.

Según lo estima la gente que conoce la cueva, en la actualidad el número de personas y la frecuencia con que la visitan ha disminuido, en parte por algunos accidentes que sucedieron dentro, o durante el recorrido para llegar a la cueva, y también por el desinterés por continuar una tradición. Aún así hay grupos de jóvenes que la frecuentan periódicamente en tiempo de sequía, cuando el río se encuentra completamente seco y es más fácil el acceso directo por la entrada principal.

Como resultado de estas visitas se puede notar un deterioro que incluye el saqueo de estalactitas, la presencia de “grafittis”, restos de fogatas, veladoras y una cantidad considerable de

desechos orgánicos y basura (Fig. 4.4). En zonas más ocultas (como el túnel sinuoso que baja de la zona C) puede encontrarse basura que arrastra el río a través de grietas que llevan hacia el interior de la cueva, lo que deja a la cueva en el papel de coladera del río Jalpan.

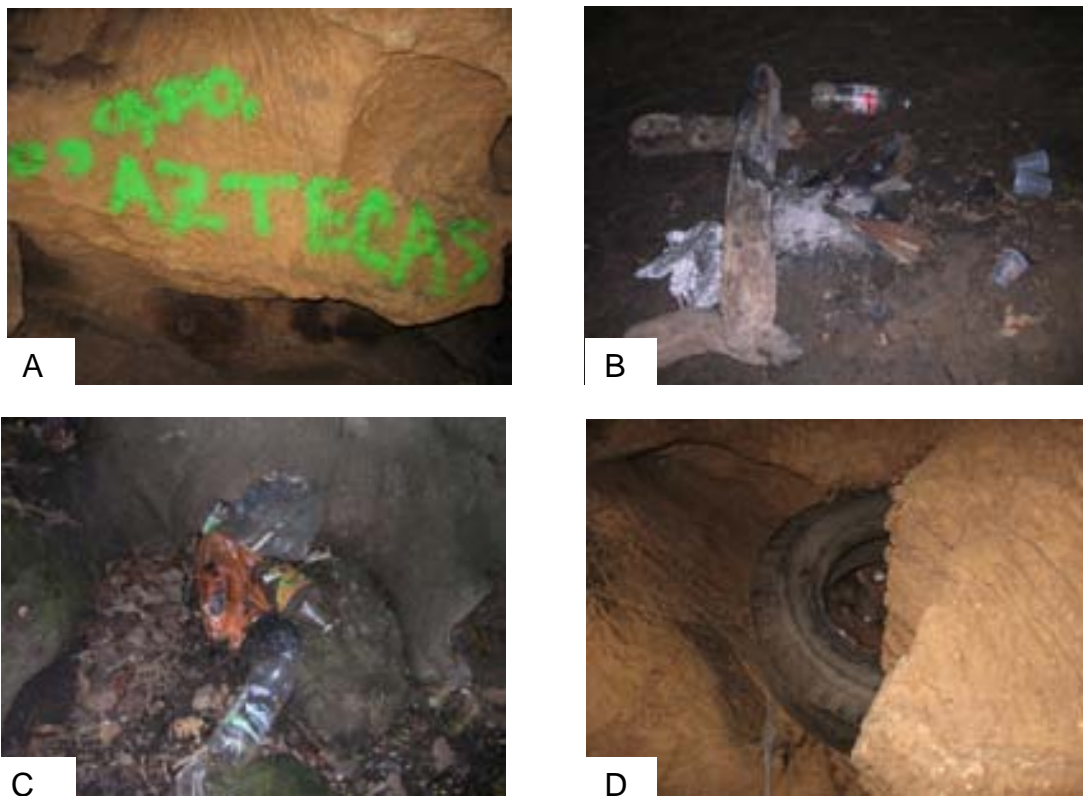


Figura 4.4. Contaminación en la Cueva de los Riscos. (A) “Grafittis” encontrados en el techo y en las paredes en diversas zonas de la cueva. (B) Restos de fogata y basura inorgánica hallados en la zona C. (C) Área de acumulación de basura en zona A. (D) Túnel sinuoso de la zona C donde se concentra la basura filtrada del río. (Fotos de A. Espino del Castillo y R. Paredes-León, 2007).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio tuvo dos fases, una realizada en campo y otra en el laboratorio, que incluyó análisis químicos de suelo, pruebas morfofisiológicas para la identificación de hongos filamentosos y levaduras, y técnicas moleculares para la identificación de especies (Fig. 5.1).

5.1 MÉTODO EN CAMPO

Obtención de las muestras: Se realizó una visita a la Cueva de los Riscos, Querétaro, en el mes de diciembre de 2006 (final de la época de lluvias). Se seleccionaron 4 puntos de colecta a lo largo del túnel principal de la cueva, que comprende las zonas A, C y D (Figs. 5.2 y 5.3A-D), de donde se obtuvieron muestras de 200 g aproximadamente de la capa superficial del suelo para los análisis de suelo. Además se tomaron alrededor de 8 g del suelo para la obtención de micobiota, que se recolectaron directamente en recipientes de plástico de 125 ml (Nalgene, Nueva Cork, E.U.A) previamente esterilizados en autoclave (American Sterilizer Company 53 PM, Mississippi, E.U.A.) durante 15 min a 120° C y 20 lbs de presión. Los recipientes se envolvieron en doble bolsa de polipapel que se sellaron y etiquetaron debidamente, y se depositaron en un recipiente de plástico limpio, seco y con tapa que se mantuvo a temperatura ambiente durante dos días hasta llegar al Laboratorio de Micología del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, IBUNAM.

Las 4 muestras tomadas fueron designadas con las claves M1, M2, M3 y M4 de acuerdo a la zona de muestreo. Las características de cada punto de colecta se señalan a continuación:

M1: Localizado en la zona de derrumbe de la zona A, a 25 m de la entrada principal de la cueva, sobre terreno pedregoso y accidentado, con pendiente de 37° y de 15-20 m de longitud. El tipo de suelo es migajón arenoso (Morales-Malacara & Vázquez 1986), con abundante hojarasca que proviene de la vegetación existente en esta zona (Fig. 5.3A).

M2: Localizado en el límite entre la zona A y la zona C, a 10 m aproximadamente de la base de la pendiente y a 55 m de la entrada principal de la cueva. El tipo de suelo es migajón arenoso (Morales-Malacara & Vázquez, 1986). No hay presencia de hojarasca, pero si hay germinación de plántulas y acumulaciones de basura (Fig. 4.4C) en los espacios cercanos al punto de muestreo (Fig. 5.3B).

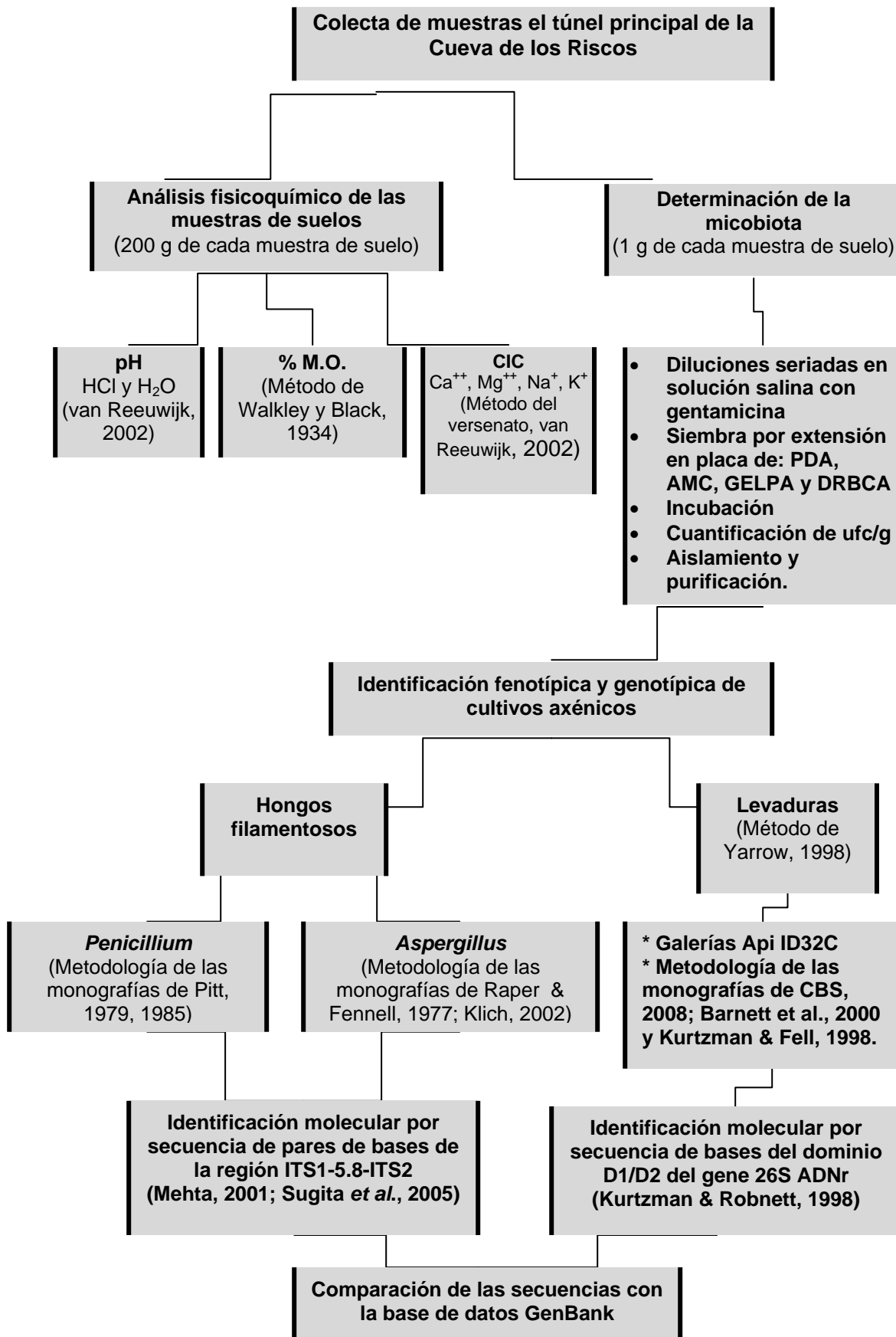


Figura 5.1. Diagrama de flujo de la metodología seguida en el campo y en laboratorio.

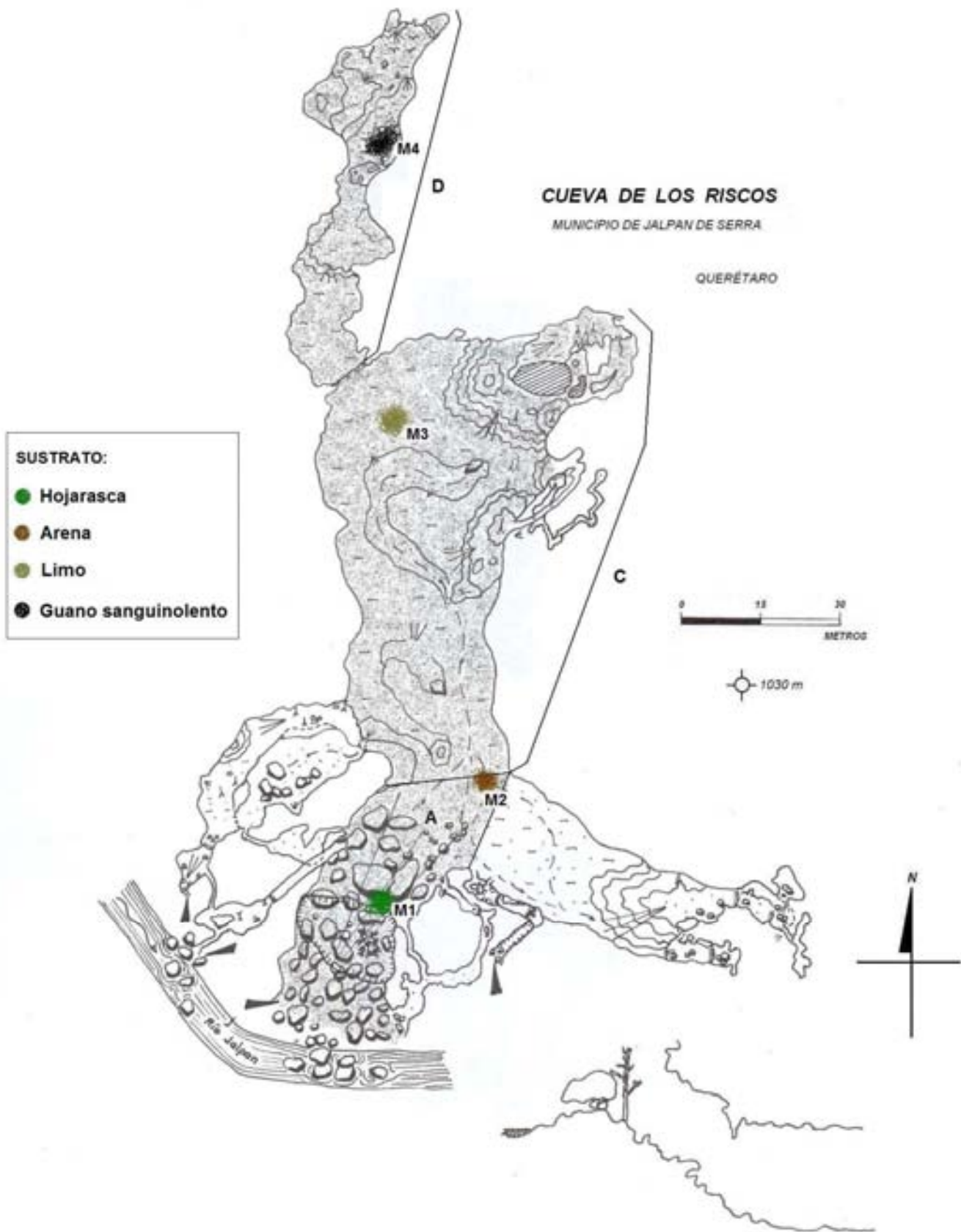


Figura 5.2. Esquema de la Cueva de los Riscos, Jalpan de Serra, Querétaro, con el túnel principal sombreado y las zonas que abarca. Se muestran los 4 puntos de colecta. Las puntas de flecha marcan las entradas de la cueva.

M3: Localizado en la parte profunda de la zona C, a 115 m aproximadamente de la entrada principal de la cueva, entre la elevación que conduce al gour, y la entrada a la zona D. El tipo de suelo es migajón limoso (Morales-Malacara & Vázquez, 1986), que se encuentra más compacto que el anterior, presenta agrietamientos, rastros de actividad humana y germinación de plántulas (Figs. 4.3A, 4.4B y 5.1C)

M4: Localizado en la parte profunda y baja de la zona D, a 165 m en línea recta desde la entrada principal de la cueva. El tipo de suelo es migajón limoso con guano sanguinolento de murciélago vampiro (*Desmodus rotundus* y *Diphylla ecaudata*). No hay presencia de plántulas ni rastros de actividad humana (Fig. 5.3D).

Medición de parámetros fisicoquímicos: En cada punto de colecta se registró la temperatura y la humedad ambiental con un termohigrómetro (IAQ-Calc 8760) y la intensidad luminosa con un luxómetro (EXTECH instruments 0-2000 luxes, Waltham, E.U.A.).

5.2 MÉTODO EN LABORATORIO

5.2.1 ANÁLISIS DE SUELOS

Los análisis de las muestras de suelo se realizaron en el Laboratorio de Edafología de la Facultad de Ciencias, UNAM, y las pruebas efectuadas fueron las siguientes:

- 1) Determinación de pH: Para obtener la acidez real se hizo una suspensión de suelo (10 g) con agua destilada (25 ml). Para obtener la acidez potencial se hizo una suspensión de suelo (10 g) y ácido clorhídrico (HCl, 25 ml). Para ello se utilizó una balanza analítica Mettler (México, D.F. México) y el pH se midió con la ayuda de un potenciómetro Conductronic pH 20 (Puebla, México) con un electrodo.
- 2) Cuantificación de materia orgánica (M.O.) y carbono orgánico (C.O.): Se realizaron por el método de Walkley y Black (1934) descrito en van Reeuwijk, 2002. Se pesó 0.2 g de M1, 0.5 g de M2 y M3, y 0.1 g de M4, que fue determinado por el color de la muestra. Se tituló con sulfato ferroso 0.5 N.
- 3) Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC): para Ca^{++} y Mg^{++} siguió el método del versenato o EDTA (ácido etilendiaminotetracético) (van Reeuwijk, 2002). El Na^+ y el K^+ se cuantificaron por flamometría con un flamómetro Corning 400 (Monterrey, México), en donde los resultados se presentan en meq/100g.



Figura 5.3. Fotografías de los puntos de muestreo dentro de la Cueva de los Riscos. (A) M1, muestra de suelo y hojarasca en zona A. (B) M2, muestra de mijajón arenoso en límite entre zona A y zona C. (C) M3, muestra de migajón limoso compactado en la parte profunda de la zona C. (D) M4, muestra de guano sanguinolento en la zona D.

5.2.2 AISLAMIENTO, CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE MICOBIOTA

Para aislar y cuantificar las unidades formadoras de colonias (ufc) se suspendió un gramo de muestra de suelo homogeneizado en 9 ml de solución salina (solución isotónica de cloruro de sodio 0.9% Abbott, México) con 0.1% de gentamicina. A partir de la suspensión inicial se hicieron diluciones decimales seriadas hasta 1:10⁴. Alícuotas de 0.1 ml de cada una de las diluciones se inocularon por el método de extensión sobre placa en 4 diferentes medios de cultivo, por triplicado.

Los medios de cultivo utilizados para el aislamiento fueron PDA (papa-dextrosa-agar) adicionado con cloranfenicol (Sigma) 0.1%, AMC (agar micobiótico, Bioxón, México), GELPA (Glucosa-extracto de levadura-peptona-agar) acidificado a pH 3.7 con HCl 1N (Lachance & Starmer, 1998) y Dicloran-rosa de Bengala-cloranfenicol-agar (DRBCA, Difco, Michigan, E.U.A)^a.

Las placas se mantuvieron a 27° C durante 4-5 días en una incubadora Blue M-Electric Company 543H (Wisconsin, E.U.A), se revisaron diariamente y se cuantificaron las ufc. Las colonias con características coloniales diferentes se reislaron en placas del mismo medio de cultivo, hasta la obtención de cultivos puros para posteriormente resembrarlos en los medios específicos recomendados en las monografías de cada género y lograr su identificación.

^a Las fórmulas de preparación de cada uno de los medios de cultivo se encuentran descritas en el Apéndice 10.1.

5.2.3 IDENTIFICACIÓN Y RESIEMBRA

5.2.3.1 HONGOS FILAMENTOSOS

Cada uno de los aislados se observó en los microscopios estereoscópico y fotónico para verificar su pureza, separar los diferentes géneros y reconocer los aislados pertenecientes a *Penicillium* y *Aspergillus*.

Los aislamientos fueron identificados a nivel de especie siguiendo la metodología y las claves de las monografías de Raper & Fennell (1977) y Klich (2002) para el género *Aspergillus*, y de Pitt (1979) y Pitt (1985) para el género *Penicillium*. Las cepas fueron cultivadas y examinadas bajo condiciones estandarizadas de laboratorio. Para obtener cultivos monospóricos y prevenir la formación de colonias de esporas dispersas, se prepararon inóculos a partir de suspensiones semisólida de Agua Agar + Tween 80 para resembrarlas en los medios correspondientes.

La inoculación se llevó a cabo de acuerdo con el esquema de la figura 5.4, donde se recomienda, para el género *Penicillium*, inocular tres puntos de cada cepa en las placas de CZA (Czapeck Dox-Agar) y EMA (Extracto de malta agar), que se incubaron a 27° C. Dos cepas pueden ser inoculadas en una misma placa en 5° C, 37° C y en G25N (Glicerol Nitrato agar) a 27° C. En el caso del género *Aspergillus* no se realizan las siembras en G25N, CZA a 37° C ni a 5° C.

Para determinar el color de las colonias (exudado, micelio, conidióforos, esporas, etc.) se utilizó el Manual de colores Methuen de Kornerup & Wanscher (1967).

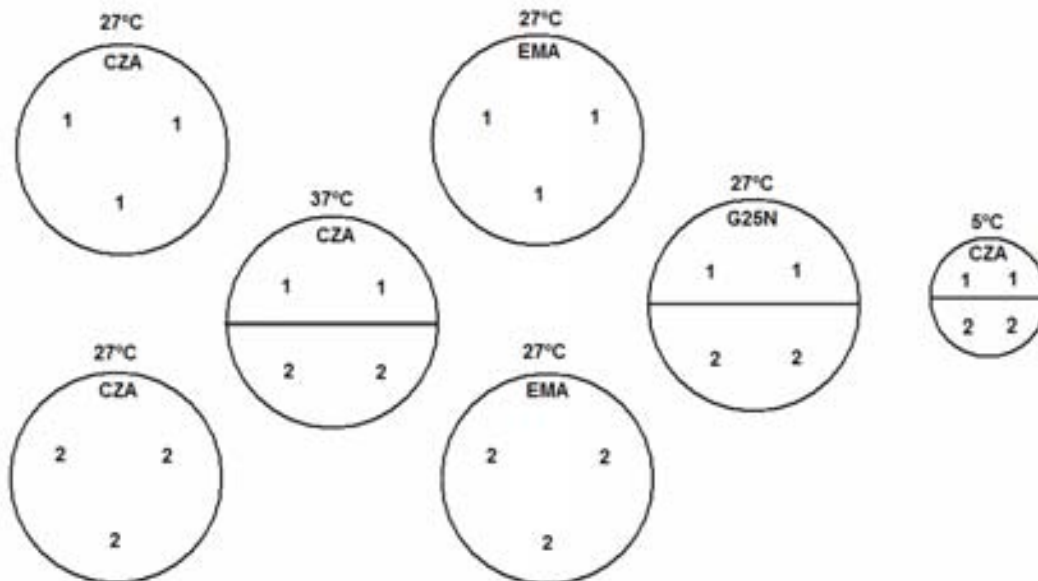


Figura 5.4. Método esquematizado para la inoculación de las placas de diferentes medios de cultivo para la identificación de *Penicillium* (Pitt, 1979).

Tabla 5.1. Características morfofisiológicas requeridas para la identificación los aislados de levaduras (Yarrow, 1998).

Características morfológicas	Características fisiológicas y bioquímicas
<p>A. Macromorfología o características culturales de los aislados.</p> <p>1. Crecimiento en medio líquido GELP, formación de película o de anillo.</p> <p>2. Crecimiento en medio GELPA. Desarrollo de colonia gigante para observar textura, color, superficie, elevación, margen y tamaño.</p> <p>B. Micromorfología</p> <p>1. Características de las células vegetativas.</p> <p>a) Morfología en medios GELPA, PDA y EMA.</p> <p>b) Morfología en medio líquido GELP.</p> <p>c) Formación de pseudomicelio y micelio verdadero en PDA.</p> <p>2. Características de la reproducción sexual en medio de McClary.</p> <p>a) Proceso de formación del asca y sus características.</p> <p>b) Características y número de ascosporas por asca.</p>	<p>A. Utilización de compuestos de carbono.</p> <p>1. Fermentación de glucosa.</p> <p>2. Asimilación de 14 compuestos de carbono: inulina, almidón soluble, D-arabinosa, metanol, etanol, ribitol, α metil D glucósido, salicina, succinato, citrato, xilitol, arbutina, hexadecano y gluconolactona</p> <p>3. Asimilación de 32 compuestos de carbono que incluye la galería ID32C.</p> <p>B. Asimilación de 7 compuestos de nitrógeno: nitrato de sodio, nitrito de potasio, etilamina, lisina, creatina, creatinina, y D-Glucosamina.</p> <p>C. Resistencia al antibiótico cicloheximida (100 y 1000 ppm).</p> <p>D. Crecimiento en medios de alta presión osmótica.</p> <p>1. Tolerancia a 50% de glucosa</p> <p>2. Tolerancia a 10% NaCl + 5% glucosa</p> <p>E. Crecimiento a 25° C, 30° C, 37° C y 40° C en GELP.</p> <p>F. Reacción al colorante azul de diazonio (DBB).</p> <p>G. Producción de almidón extracelular.</p> <p>H. Hidrólisis de Urea.</p>

5.2.3.2 LEVADURAS

Para la identificación tradicional (morfofisiológica) de las levaduras se realizaron las pruebas señaladas en la metodología de Yarrow (1998) (Tabla 5.1). Con el fin de agilizar esta caracterización se utilizaron las galerías comerciales Api ID32C bioMérieux (Durham, Francia) (Tabla 5.2); siguiendo la metodología y las especificaciones del fabricante.

El resto de las pruebas morfológicas y fisiológicas (asimilación y fermentación) requeridas en la metodología de Yarrow (1998), así como las pruebas de hidrólisis de urea y la reacción al colorante azul de diazonio (DBB) (propuesta por Hagler y Ahearn, 1981 y descrita en Kreger-van Rij, 1984), se realizaron de forma manual.

Para la identificación se utilizaron las claves taxonómicas y se cotejaron las descripciones de cada una de las especies en los tratados de Barnett *et al.* (2000), Kurtzman & Fell (1998), y en la base de datos de la colección Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) 2008.

Tabla 5.2. Compuestos de carbono que contiene la galería para identificación de levaduras ID32C bioMérieux.

símbolo	Sustratos	símbolo	Sustratos
GAL	D- GAL actosa	SOR	D- SOR bitol
ACT	Cicloheximida (ACT idiona)	XYL	D- XIL osa
SAC	D- SAC arosa	RIB	D- RIB osa
NAG	N -Acetil- G lucosamina	GLY	GL icerol
LAT	Ácido LÁ ctico	RHA	L- RHA mnosa
ARA	L- ARA binosa	PLE	Pa LatinosA
CEL	D- CEL obiosa	ERY	ER lritol
RAF	D- RAF inosa	MEL	D- MEL ibiosa
MAL	D- MAL tosa	GRT	Glucu RonaTo sódico
TRE	D- TRE halosa	MLZ	D- MeLe Citosa
2KG	2-ceto G luconato potásico	GNT	Glucu NaTo potásico
MDG	Metil-D-G lucopiranosido	LVT	LeVulina To
MAN	D- MAN itol	GLU	D- GLU cosa
LAC	D- LAC tosa	SBE	L- SorBos A
INO	INO sitol	GLN	D- GL ucosamiNa
0	Sin sustrato	ESC	ESC ulina citrato férrico

5.2.4 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Con el fin de corroborar la identidad de las especies de mohos y levaduras obtenidas se realizó la identificación molecular de las mismas por secuencia de pares de bases de la región ITS1-5.8-ITS2 para las especies de *Penicillium* y *Aspergillus*, y del dominio D1/D2 del gene 26S para las levaduras.

Extracción de ADN: Se realizó siguiendo el protocolo de extracción de ADN genómico con CTAB (Bromuro de cetil-trimetilamonio) para *Fasciola hepática* modificada por G. Ballesteros (Com. Pers). Se modificó la técnica de la ruptura de las células de dicho protocolo^b.

La calidad del ADN obtenido se evaluó por electroforésis en un gel de agarosa al 1% y buffer TBE 0.5X. Las condiciones de la corrida fueron 25 min a 100 Volts y 500 mA. Se determinó la

^b El protocolo de extracción de ADN genómico total que fue utilizado para este estudio se encuentra descrito en el Apéndice 10.2

cantidad de lo obtenido utilizando el espectrofotómetro GeneQuant pro (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Inglaterra).

Amplificación: La reacción de amplificación (PCR) se realizó utilizando el Kit CLP (Taq MasterMix 100 units, San Diego, C.A.) tanto para hongos filamentosos como para levaduras.

Para los hongos filamentosos se amplificó la región ITS1- 5.8S -ITS2 con extensión a 18S con los iniciadores universales ITS-5 (5'-GGA-AGT-AAA-AGT-CGT-AAA-3') e ITS-4 (5'-TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC-3'). Los iniciadores fueron solicitados a los laboratorios de Accesolab (México D.F., México).

El programa del termociclador (Applied Biosystems 9720, Foster City, C.A.) consistió de un paso inicial de 94° C por 1 min para la desnaturalización, seguido por 30 ciclos de 94° C por 1 min, 58° C por 2 min, 72° C por 1 min, con una extensión final de 72° C por 5 min (Naumova, 2004).

Para las levaduras se amplificó el dominio D1/D2 del gene 26S ARNr con los iniciadores universales NL-1 (5'-GCA-TAT-CAA-TAA-GCG-GAG-GAA-AAG-3') y NL-4 (5'-GGT-CCG-TGT-TTC-AAG-ACG-G-3') de acuerdo con el protocolo de Kurtzman y Robnett (1998).

El programa del termociclador consistió de un paso inicial de 95° C por 15 min para la desnaturalización, seguido por 40 ciclos de 94° C por 1 min, 52° C por 55 seg, 72° C por 2 min, con una extensión final de 72° C por 8 min (Kurtzman y Robnett, 1998).

Los productos de PCR se purificaron con el kit QIAquick (Qiagen, Santa Clarita, C.A.) de acuerdo con los procedimientos del fabricante.

Secuenciación: Para la reacción de secuencia se utilizó el kit Big dye terminador v3.1 de Applied Biosystems, (Foster City, C.A.), cuyo programa para el termociclador consiste en un paso inicial de 96° C por 10 seg, seguido por 25 ciclos de 50° C por 5 seg y 60° C por 4 min. Las secuencias de nucleótidos se obtuvieron con el secuenciador automático Applied Biosystems 3100 (Foster City, C.A.).

El análisis y la edición de las secuencias obtenidas se hicieron con el programa BioEdit Hall, (2007), y se compararon con las existentes en el GenBank con el programa BLAST estándar de nucleótidos (Basic Local Alignment Search Tool) de National Center for Biotechnology Information (NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Las secuencias obtenidas se registraron en dicho banco y los números de acceso se presentan en la sección de Resultados y Discusión.

La identificación polifásica de todos los aislamientos se realizó utilizando la base de datos del CBS, que considera las características morfofisiológicas y la secuencia de bases de nucleótidos obtenidas. También se investigaron las sinonimias e información taxonómica actual para cada especie obtenida en las monografías de: Raper & Fennell (1977), Pitt (1979), Pitt (1985), Kurtzman & Fell (1998), Samson & Pitt (2000), Barnett, *et al.* (2000), Klich (2002) y Robert *et al.* (2005).

5.2.5 COMPARACIÓN CON LAS ESPECIES REGISTRADAS EN LA LITERATURA

En esta sección se analizaron las listas de especies de micromicetes obtenidas en otras investigaciones realizadas en suelos de cuevas (Martini, 1961; Martini, 1963; Orpurt, 1964; Volz & Ji Ping Yao, 1991; Landolt *et al.*, 1992; Rutherford & Huang, 1994; Northup *et al.*, 1994; Cunningham *et al.*, 1995; Gunde-Cimerman *et al.*, 1998; Reeves *et al.*, 2000; Vaughan-Martini *et al.*, 2000; Nieves-Rivera, 2003; Griskhan *et al.*, 2003; Montagna *et al.*, 2003; Benoit *et al.*, 2004; Sugita *et al.*, 2005; Ulloa *et al.*, 2006) y se compararon con la lista obtenida en este trabajo, con la finalidad de reconocer las especies comunes que pueden considerarse troglófilas y/o guanófilas.

6. RESULTADOS

6.1 PARÁMETROS FÍSICOS EN LOS PUNTOS DE MUESTREO

La temperatura, la humedad relativa y la intensidad luminosa registrada en cada uno de los puntos de muestreo (PM) se presentan en la tabla 6.1.

Tabla 6.1. Parámetros físicos registrados en cada punto de muestreo.

Punto de Muestreo	Tipo de suelo	Temperatura (°C)	Humedad relativa (%)	Intensidad luminosa (luxes)
PM1	Migajón arenoso + hojarasca	16.87	77.00	5.0
PM2	Migajón arenoso	16.25	84.80	3.2
PM3	Migajón limoso	17.75	88.00	0
PM4	Migajón limoso + guano sanguinolento	18.25	94.25	0

La temperatura ambiental en los sitios de muestreo varió de 16.25 a 18.25° C y la humedad relativa fue de 77 a 94.25%. Se pudo observar que tanto la temperatura como la humedad relativa aumentaron con la profundidad de la cueva; así, la zona más cálida y la más húmeda fue la zona D, que correspondió a la zona más profunda y es el sitio de anidación de los murciélagos.

Se realizó una comparación de los datos registrados en época de lluvias, julio-noviembre de 1985 (Morales-Malacara & Vázquez, 1986), en época de secas, abril de 2006 (M. Hernández, *Com. pers*), mismos que se señalan en la tabla 6.2 junto con los obtenidos en el presente estudio al final de la época de lluvias en diciembre de 2006, en esta tabla se indican las zonas de muestreo abordadas en cada estudios y se señala su equivalencia con las del presente trabajo. Es importante mencionar que para el punto PM2 no existe zona equivalente en los estudios previos.

La temperatura registrada en el año 1985 en las zonas A y C (PM1 y PM3 respectivamente) no presentaron gran variación con la registrada en el año 2006, sin embargo, en la zona D (PM4) la temperatura fue menor (15.82° C) a la registrada en el año 2006 (18.5-18.25° C).

Con respecto a la humedad relativa, esta se mantuvo en porcentajes elevados y siempre aumentó con la profundidad de la cueva.

La presencia de luz sólo se registró en los puntos PM1 y PM2, donde la intensidad luminosa fue de 5.0 y 3.2 luxes respectivamente. Estos valores se consideran de penumbra o bien el “límite oscuro del crepúsculo bajo un cielo despejado” (Waynant & Ediger, 2000).

Tabla 6.2. Comparación de los valores de temperatura y humedad relativa registrados en el túnel principal de la Cueva de los Riscos en julio-noviembre de 1985, abril de 2006 y diciembre de 2006.

Zona	Temperatura (° C)			Humedad relativa (%)		
	Jul-Nov 1985	Abril 2006	Diciembre 2006	Jul-Nov 1985	Abril 2006	Diciembre 2006
A = PM1	16.125	16.0	16.87	89.5	85.5	77.0
PM2	-	-	16.25	-	-	84.8
C ≈ PM3	16.25	16.0	17.75	90.25	93.0	88.0
D = PM4	15.82	18.5	18.25	91.75	98.5	94.25

6.2 ANÁLISIS QUÍMICO DE LAS MUESTRAS DE SUELO

Los resultados de los análisis químicos realizadas a las muestras de suelo (M) se presentan en la tabla 6.3.

Tabla 6.3. Análisis químicos realizados a las cuatro muestras de suelo obtenidas en la Cueva de los Riscos.

Muestra	pH		Materia orgánica (%)	Carbono orgánico (%)	Bases intercambiables (meq/100gr)			
	Potencial KCl	Real H ₂ O			Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺
M1	5.8	6.6	4.41	2.56	26.0	4.0	10.57	2.41
M2	5.9	6.3	18.94	10.98	50.0	10.0	21.14	14.48
M3	6.0	6.7	4.01	2.33	26.0	9.0	13.21	2.76
M4	7.5	8.5	63.23	36.67	27.0	8.0	383.24	141.4

Los análisis químicos muestran que el pH real varió de ligeramente ácido (6.3-6.7) en las muestras M1, M2 y M3, a ligeramente alcalino (8.5) en la muestra M4 (Miguel-Sánchez, 2006).

El porcentaje de M.O. varió de 4.01% en la muestra de M3 (migajón limoso) a 63.23 % en la muestra M4 (migajón limoso con guano sanguinolento). Según Ortiz-Villanueva & Ortiz-Solorio (1990), los cuatro sustratos son considerados medios ricos; M2 muy rico y M4 con exceso de M.O.

A partir de los análisis de las bases intercambiables se pudieron observar algunas diferencias en la concentración de los cuatro cationes analizados. Las concentraciones más altas de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ (50 y 10 meq/100gr respectivamente) se presentaron en M2, y las de Na⁺ y K⁺ (383.24 y 141.4 meq/100gr respectivamente) en M4. En las muestras M1, M2 y M3 se observó que el Ca⁺⁺ fue el catión predominante, lo que es común en suelos ácidos calcáreos; en M4 el catión predominante fue el Na⁺.

6.3 CUANTIFICACIÓN, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE MOHOS Y LEVADURAS

En la tabla 6.4 se presenta el número de ufc por gramo de muestra en cada medio de cultivo utilizado. Se aislaron 161 colonias de micromicetes diferentes, de donde se reaislaron 46 aislamientos de *Penicillium*: *P. concentricum* (1), *P. decaturense* (1), *P. janthinellum* (1), *P. sclerotiorum* (1), *P. raistrickii* (1), *P. vinaceum* (1), *Penicillium sp.* afín a *adametzioides* (2), *P. brevicompactum* (2), *P. citrinum* (2), *P. granulatum* (2), *P. crysogenum* (3), *P. minioluteum* (3), *P. steckii* (4), *P. commune* (5), *P. lanosum* (5), *P. roseopurpureum* (5), *P. herqueii* (7); 7 de *Aspergillus*: *A. aculeatus* (1), *A. sp* afín a *flavipes* (1), *A. flavus*, *A. pseudotamarii* (1), *A. versicolor* (1) y *A. niger* (3); y 26 de levaduras *Candida catenulata* (1), *Cryptococcus randhawii* (1), *Trichosporon sp.* (1), *T. chiropterorum* (1), *Cryptococcus laurentii* (2), *Naumovia dairenensis* (2), *T. shinodae* (2), *Pichia guilliermondii* (5), *T. laibachii* (13).

Tabla 6.4. Unidades formadoras de colonias por gramo de suelo en los diferentes medios de cultivo utilizados.

Muestra	Medio de cultivo	Ufc/g	Muestra	Medio de cultivo	Ufc/g
M1	PDA	38 x 10 ³	M3	PDA	Contaminado ^a
	DRBCA	219 x 10 ³		DRBCA	122 x 10 ³
	GELPA	40 x 10 ³		GELPA	Contaminado
	AMC	83 x 10 ³		AMC	158 x 10 ³
M2	PDA	55 x 10 ³	M4	PDA	104 x 10 ⁴
	DRBCA	322 x 10 ³		DRBCA	47 x 10 ³
	GELPA	54 x 10 ³		GELPA	37 x 10 ⁴
	AMC	97 x 10 ³		AMC	40 x 10 ³

^a Se consideró como "contaminado" a las placas que presentaron hongos de rápido crecimiento que enmascararon el desarrollo de otras especies de hongos.

Las especies de *Penicillium* y *Aspergillus* se identificaron fenotípicamente de acuerdo con la metodología y las claves de las monografías de Pitt (1979, 1985) y Raper & Fennell (1977) y Klich (2002) respectivamente, y se comprobó la identidad de las especies mediante la secuencia de pares de bases de la región ITS1-5.8S-ITS2.

Para la identificación de las especies de levaduras se realizaron las pruebas requeridas en la metodología de Yarrow (1998) y se utilizaron las claves de las monografías de Barnett *et al.* (2000), Kurtzman y Fell (1998) y la base de datos del Centraalbureau voor Schimmelculture, CBS (2008). Se comprobó la identidad de las especies mediante la secuencia de pares de bases del dominio D1/D2

del gene 26S ADNr, con la información fenotípica, genotípica y ecológica se realizó la identificación polifásica utilizando la base de datos del CBS.

En la tabla 6.5 se presentan las especies identificadas en cada una de las muestras. Se señalan las diferencias morfofisiológicas observadas en comparación con la diagnosis de las especies publicadas en la literatura, así como la similitud de la secuencia con las registradas en el banco de genes (GenBank), para lo que se tomó en consideración el criterio de Kurtzman y Robnett (1998), quienes señalan que secuencias con un 1-2% de sustituciones de bases de nucleótidos son consideradas coespecíficas. Los géneros incluyen especies ubicuas, micotoxígenas y patógenas oportunistas. Se presenta también la clave de acceso a las secuencias obtenidas en el presente trabajo depositadas en el GenBank (GB). Las especies nuevas y las que presentan diferencias en la morfología microscópica no fueron registradas en el GenBank, ya que necesitan ser estudiadas con mayor profundidad.

Se identificaron 16 especies de *Penicillium*, de ellas cuatro presentaron diferencias en su morfología colonial o en algunas estructuras morfológicas como: *P. brevicompactum* (cepas P1.19 y P1.28), *P. citrinum* (cepas P1.28 y P8.2), *P. commune* (cepas P8.1 y P4.2), y *P. lanosum* (cepas P4.1, P11.4 y P11.6). Además es probable que la cepa P1.23, afín a *P. admetzioides* corresponda a una nueva especie.

Del género *Aspergillus* se identificaron seis especies y es probable que la cepa A1.8 afín a *A. flavipes* sea una especie nueva.

Los 26 aislamientos de levaduras se identificaron en ocho especies pertenecientes a los géneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Naumovia*, *Pichia* y *Trichosporon*. La especie *T. laibachii* (cepas L8.6 y L11.2) presentó variación en su morfología colonial, aunque todas las pruebas fenotípicas y genotípicas coincidieron con la diagnosis de la especie. Además se obtuvo un aislamiento también de este género que probablemente corresponde a una nueva especie.

A continuación se presenta un listado de las especies identificadas en el que se incluye su estado taxonómico actual, una síntesis de su diagnosis y se señalan las diferencias observadas en las cepas estudiadas. Las diferencias en color observadas en algunas de las cepas estudiadas se basan en el Manual de colores Methuen (Kornerup & Wanscher, 1967).

Tabla 6.5. Especies aisladas de las cuatro muestras de suelo obtenidas en el túnel principal de la Cueva de los Riscos.

Especie	cepa	Muestra de la que se obtuvo el aislado				Diferencias con la descripción morfológica	% de similitud con secuencias GenBank	Número de acceso de la secuencia depositada en GenBank
		M 1	M 2	M 3	M 4			
Hongos filamentosos								
<i>Aspergillus aculeatus</i> Lizuka	A19	X				Ninguna.	100 EU326206	EU833205
<i>Aspergillus</i> sp. afín a <i>favipes</i> (Barnier & Satory) Thom & Church	A18	X				Ninguna.	95 AY214443	-
<i>Aspergillus flavus</i> Link	A17	X				Conidióforo de 100-300 µm.	99 AB369896	EU833206
<i>Aspergillus japonicus</i> Saito	A11	X				Ninguna.	98 AJ27994	EU833207
<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem	A12	X				Ninguna.	100 AB369898	EU833208
<i>Aspergillus pseudotamarii</i> (Ito, Peterson, Wicklow & Goto	A110	X				Ninguna.	99 DQ467987	EU833209
<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuille) Tiraboschi	A1112			X		Ninguna.	99 EU326209	EU833210
<i>Penicillium</i> sp. afín a <i>adametzioides</i> Abe ex. Smith	P123	X				Ninguna.	94 DQ661325	-
<i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx	P119, P128	X				Cepa P119 ninguna. Cepa P128 conidiogénesis concéntrica en CZA a 27° C.	99 AY373697	EU833211
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	P117			X		Ninguna.	100 AF455490	EU833212
<i>Penicillium citrinum</i> Thom	P121	X				25 mm de diámetro en EMA a 27° C.	99 EF127876	EU833213
-	P82		X			12 mm de diámetro en EMA a 27° C. No cruce en G25N. Conidióforos ligeramente rugosos y conidios de 3.5 µm.	100 DQ681331	EU833214
<i>Penicillium commune</i> Thom	P81		X			Se presentó como biverticilado.	100 AF455544	EU833215
-	P42		X			Ninguna.	99 AJ005482	EU833216
<i>Penicillium concentricum</i> Samson, Stolk & Hadjilok	P111			X		15 mm de diámetro en EMA a 27° C.	98 DQ681333	EU833217

Tabla 6.5. Continuación.

Especie	cepa	Muestra de la que se obtuvo el aislado				Diferencias con la descripción morfológica	% de similitud con secuencias GenBank	Número de acceso de la secuencia depositada en GenBank
		M 1	M 2	M 3	M 4			
<i>Penicillium decaburense</i> Peterson, Bayer & Wicklow	P1.29	X				20 mm de diámetro en CZA y EMA a 27° C.	99 AF125946	EU833218
<i>Penicillium granulatum</i> Bailar	P4.6		X			30 mm de diámetro en G25N a 27° C.	99 DQ681334	EU833219
<i>Penicillium herquei</i> Bailar & Sartory	P1.1	X				Ninguna.	99 EFS36027	EU833220
<i>Penicillium lanthiuelum</i> Biourge	P11.16			X		Diámetro, textura y exudado diferentes en CZA a 27° C. No creció en G25N a 27° C.	99 AY373921	EU833221
<i>Penicillium lanosum</i> Westling	P4.1		X			Diferencias en cantidad y color del exudado y pigmento soluble en CZA a 27° C.	99 DQ681336	EU833223
"	P11.4 P11.6			X		Diferencias en cantidad y color del exudado y pigmento soluble en CZA a 27° C.	99 DQ681336	Cepa P11.4 EU833224
<i>Penicillium minioluteum</i> Dierckx	P1.17	X				Diámetros en EMA y en G25N a 27° C diferentes. No creció a 37° C.	98 AY213674	EU833222
<i>Penicillium raistrickii</i> Smith	P11.10			X		Producto exudado y pigmento soluble rojo. No creció a 5° C. Con diámetro de 18-20 mm en CZA a 37° C.	96 DQ681336	-
<i>Penicillium roseo-purpureum</i> Dierckx	P1.36	X				Diámetro en EMAY G25N a 27° C fue mayor. No fue estrictamente monoverficilado.	96 AF455492	EU833225
<i>Penicillium sclerotiorum</i> Béyma	P1.3	X				No creció en G25N. No fue estrictamente monoverficilado, y los conidios fueron esféricos o subesféricos.	98 AY373921	-
<i>Penicillium steckii</i> Zalesky	P1.12	X				Con abundancia de penicilios monoverficilados.	93 DQ123656	EU833226
<i>Penicillium vineorum</i> Gilman & Abbott	P11.5			X		Diámetro en CZ y EMA a 27° C fue mayor.	99 DQ681340	EU833227

Tabla 6.5. Continuación.

Especie	cepa	Muestra de la que se obtuvo el aislado				Diferencias con la descripción morfológica	% de similitud con secuencias GenBank	Número de acceso de la secuencia depositada en GenBank
		M 1	M 2	M 3	M 4			
Levaduras Ascomycetes								
<i>Candida catenulata</i> Diddens & Lodder	L2.1	X				Asimiló arbutina y no asimiló oxalato.	100 AY242295	EU633228
<i>Naumonia dairenensis</i> (Nagasaki) Kurtzman	L3.2 L3.3	X				Crecieron a 37 y 40°C. La cepa L3.2 creció en glucosa 50%, la cepa L3.3 No.	98 AY049169	EU633231
<i>Pichia guilliermondii</i> Wichernam	L3.1 L3.2	X	X			Ninguna.	100 EU182216	EU633236
Levaduras Basidiomycetes								
<i>Cryptococcus laurentii</i> (Kufferath) Skinner	L2.2	X				Ninguna.	100 AJ555467	EU633229
<i>Cryptococcus rancharuui</i> Khan & Ahmad	L3.4	X				Especie no descrita en CBS.	100 AJ876599	EU633230
<i>Trichosporon chiropterorum</i> Sugita, Takshima & Kikuchi	L11.1			X		Especie no descrita en CBS.	98 AB180197	EU633232
<i>Trichosporon laibachii</i> (Windisch) Guého & Smith	L8.6			X		No asimiló arbutina, glicerol, melancol y creció a 37°C.	100 AF075514	EU633233
"	L11.2			X		Ninguna.	99 AF075514	EU633234
<i>Trichosporon shinodae</i>	L11.11			X		Especie no descrita en CBS.	100 AB180201	EU633235
<i>Trichosporon</i> sp.	L11.4			X		Con porcentajes bajos de similitud con especies de <i>Trichosporon</i> .	94 AB164372	-

³ La caracterización de las especies se siguió utilizando los tratados: Raper & Fennell, 1977 para el género *Aspergillus*; Pitt, 1979 y Pitt, 1985 para el género *Penicillium*; y Kurtzman & Fell, 1998; Barnett et al., 2000, y la base de datos de la colección CBS, 2008 para las levaduras.

6.3.1 ESPECIES IDENTIFICADAS

Género *Aspergillus*

1. *Aspergillus aculeatus* Iizuka 1953 J. Agr. Chem. Soc. Japan 27: 806, Figs.1-2.

Grupo *A. niger*

Aspergillus aculeatus Iizuka,

SINONIMIA: *Aspergillus yezoensis* Y. Sasaki 1950 (MB292865)

Aspergillus japonicus var. *viridiflavus* Iizuka 1953.

Aspergillus japonicus var. *aculeatus* (Iizuka) Al-Musallam 1980 (MB118399)

DIAGNOSIS: **CZA:** Diámetro de la colonia de 50-60 mm a 25° C en 12 días. Colonia de apariencia plana, conidios en masa de color púrpura-marrón a púrpura-negro (5-6F4). Reverso incoloro o en tonos amarillos. Pigmento soluble de color amarillo. Exudado ausente.

Características microscópicas: Cabezuela conidial globosa de 500-700 µm hasta 1 mm de diámetro. Conidióforos uniseriados, incoloros, de pared gruesa y lisa, y en ocasiones con material granular, de 100-200 µm de largo. Vesículas alargadas a globosas, con tonos marrones, de 35-100 µm de diámetro, fértil en toda la superficie. Fíalides de 6.5-10 µm de largo. Conidios elípticos a globosos de 3.5-4.0x4.5-5.0 µm, equinulados.

EMA: Se presentan las mismas características macro y microscópicas que en CZA.

DISCUSIÓN: La descripción macro y micromorfológica de la cepa A1.9 (Fig. 6.1A, B) coincidió con la diagnosis de la especie. Además, la secuencia de pares de bases de la región ITS1-5.8S-ITS2 presentó un 100% de similitud con la cepa EU326206 GB; y quedó depositada en dicho banco con el número EU833205 (Tabla 6.5).

REFERENCIAS TAXONÓMICAS: Raper & Fennell, 1977; Klich, 2002; Robert *et al.*, 2005.



Figura 6.1. *Aspergillus aculeatus* (cepa A1.9). A) CZ. B) EMA.

2. *Aspergillus sp.* afín a *flavipes* (Bainier & Sartory) Tom & Church 1926, The Aspergilli, p. 155; Thom & Raper, 1945. A Manual of the Aspergilli, pp. 179-181, Fig. 51, lámina IVF.

Grupo *A. flavipes*

SINONIMIA: *Sterigmatocystis flavipes* Bainier & Sartory 1911 (MB452855)
Aspergillus archiflavipes Blochwitz 1934 (MB257217)
Aspergillus terreus var. *floccosus* Y.K. Shih 1936 (MB499550)
Aspergillus terreus var. *subfloccosus* Y.K. Shih 1936 (MB493821)
Aspergillus niveus var. *indicus* Lal & A.K. Sarbhoy 1972 (MB352616)

DIAGNOSIS: **CZA**: Diámetro de la colonia de 30-50 mm a 25° C en 10 días. La colonia se presenta frecuentemente surcada con esporulación abundante de color ante a avellana (5-6B-C2-3). Usualmente produce exudado abundante de color ámbar y el reverso es comúnmente de color amarillo a marrón o con tonos rojizos.

Características microscópicas: Cabezuela conidial columnar de 50-80 µm. Conidióforo de pared lisa o ligeramente granular, de 500-800 µm de largo y en ocasiones mayor a 2-3 mm. Vesículas biseriadas subglobosas o alargadas de 18-25 µm de diámetro. Métulas de 5.5-7.5 µm de largo, y fiálides de 5-7 µm. Conidios globosos a subglobosos de pared lisa, de 2-3 µm de diámetro, prácticamente incoloros.

EMA: Crece de manera similar que en CZA pero con apariencia más plana y más velutinosa. Exudado ausente y reverso con tonos marrón. Las características microscópicas son similares a las que se presentan en CZA.

DISCUSIÓN: La descripción colonial y micromorfológica de la cepa A1.8 (Fig. 6.2A, B) coincidió con las características descritas para *A. flavipes*, difiriendo sólo en que no produjo exudado, lo que puede presentarse en algunas cepas de esta especie. La secuencia de la región ITS1-5.8S-ITS2 presentó un 95% de similitud con la cepa AY214443 registrada en GenBank (Tabla 6.5) por lo que no se consideró coespecífica y será necesario repetir la secuencia y caracterización para evaluar si se trata de una nueva especie. La secuencia no fue depositada en GB.

REFERENCIAS TAXONÓMICAS: Raper & Fennell 1977; Klich, 2002; Robert *et al.*, 2005.

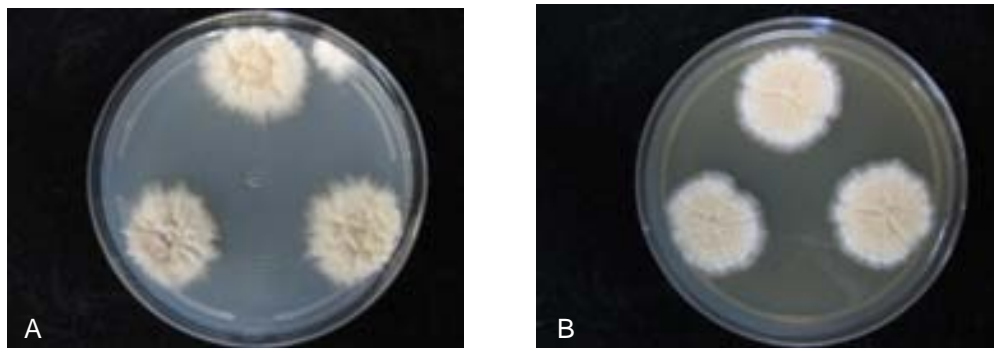


Figura 6.2. *Aspergillus sp.* afín a *flavipes* (cepa A1.8). A) CZ. B) EMA.

3. *Aspergillus flavus* Link 1809, Ges. Natura. Freunde Berlin Mag. Neuesten Entdeck. Gesamten Natura. 3: 16: Fr. – Neotipo (Kozakiewicz, 1982): No. 124930 (IMI).

Grupo *A. flavus*

SINONIMIA: *Monilia flava* (Link) Pers. 1822 (LEG; MB209842)
Eurotium Aspergillus flavus De Bary & Woronin 1870.
Sterigmatocystis lutea Tiegh. 1877 (LEG; MB209842)
Aspergillus luteus (Tiegh.) C.W. Dodge 1935 (LEG; MB209842)
Aspergillus flavus var. *proliferans* Anguli, Rajam, Thirum., Rangiah & Ramamurthi 1965 (LEG; MB209842).

DIAGNOSIS: **CZA**: Diámetro de la colonia generalmente de 30-70 mm a 25° C en 10 días. La colonia es comúnmente plana o con surcos radiales. Conidios en masa de color verde olivo (1-3D-E6-7) a olivo-amarillo (2-4B-C6). En muchos cultivos produce esclerocios. Reverso incoloro, marrón o anaranjado.

Características microscópicas: Cabezuela conidial radiada de 300-400 µm de diámetro. Conidióforos de pared rugosa hialina, de 250-2500 µm de largo. Vesículas alargadas al principio y después globosas de 10-65 µm de diámetro, pueden ser uniseriadas o biseriadas. Métulas de 6-16 µm de largo, y fiálides de 6-14 µm de largo. Conidios globosos a subglobosos, de 3-6 µm de diámetro, en ocasiones elípticos, de pared equinulada.

EMA: El crecimiento es semejante al que se presenta en CZA, en ocasiones de color verde oscuro (30E-F7-8). Puede presentar esclerocios de color marrón que varían en forma y tamaño. Reverso incoloro, amarillo o gris. Las características microscópicas son similares a las que se presentan en CZA.

DISCUSIÓN: La descripción de la cepa A1.7 (Fig. 6.3A, B) coincidió con la diagnosis de la especie. La única diferencia observada fue la longitud del conidióforo de 100-300 µm, que es ligeramente menor a lo descrito para la especie. En lo que se refiere a la secuencia de la región ITS1-5.8S-ITS2, esta presentó un 99% de similitud con la cepa AB369896 GB, y quedó depositada en dicho banco con el número EU833206 (Tabla 6.5).

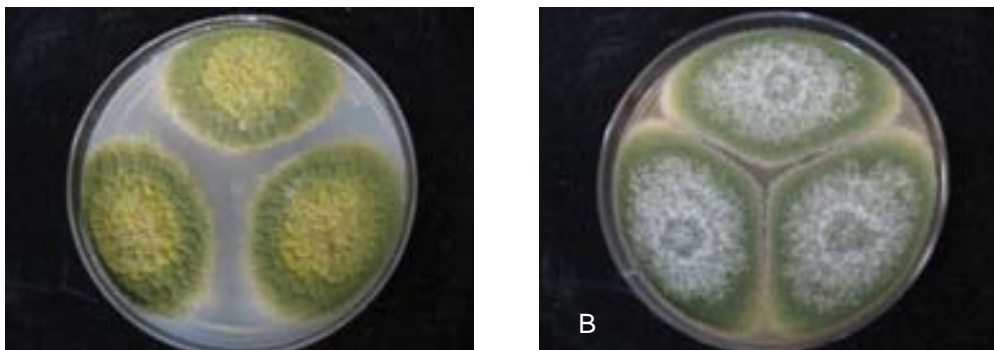


Figura 6.3. *Aspergillus flavus* (cepa A1.7). A) CZ. B) EMA.

4. *Aspergillus japonicus* Saito 1906 Bot. Mag. Tokio 20: 61 – Neotipo (Samson & Gams. 1985): No. 114.51 (CBS).

Grupo *A. niger*

SINONIMIA: *Aspergillus japonicus* var. *capillatus* Nakaz., Takeda & Suematsu 1932 J. Agr. Chem. Soc. Japan 8: 12-17, Fig. 5 (LEG; MB160656)

Aspergillus atroviolaceus Mosseray 1934 (LEG; MB160656)

Aspergillus japonicus var. *atrofuscus* Iizuka 1953 J. Agr. Chem. Soc. Japan 27:807, Fig.4.

Aspergillus brunneoviolaceus Batista & Maia 1955 Anais Soc. Biol. Pernambuco 13: 91-93, Figs. 1, 2 (LEG; MB160656)

DIAGNOSIS: **CZA:** Diámetro de la colonia de 50-60 mm a 25° C en 10 días. La colonia es comúnmente plana o con surcos radiales, con textura velutinosa a ligeramente flocosa. Micelio blanco y conidios en masa de color púrpura-negro (5-6F6). El reverso es marrón. En algunos cultivos se forman abundantes esclerocios blancos y globosos. Exudado ausente o en ocasiones es de color claro.

Características microscópicas: Cabezuela conidial radiada, generalmente de 300 µm de diámetro. Conidióforos de pared lisa con pigmento debajo de la cabezuela, de 500-1000 µm de largo. Vesículas subglobosas uniseriadas de color marrón, de 15-45 µm de diámetro. Fiálides de 5-10 µm de diámetro. Conidios hialinos a marrón, globosos, subglobosos o elípticos de 4-5x3-4 µm, de pared equinulada.

EMA: Diámetro de la colonia de 70-80 mm a 25° C en 10 días. Exudado ausente y reverso incoloro o amarillo claro. Las cabezuelas conidiales son más grandes.

DISCUSIÓN: La descripción macro y micromorfológica de la cepa A1.1 (Fig. 6.4A, B) coincidió con la diagnosis de la especie. La secuencia de la región ITS1-5.8S-ITS2 presentó un 99% de similitud con la cepa AJ27994 registrada en GB (Tabla 6.5), por lo que se le considera coespecífica. El acceso a la secuencia depositada en GB es EU833207.

REFERENCIAS TAXONÓMICAS: Raper & Fennell 1977; Samson & Pitt, 2000; Klich, 2002; Robert *et al.*, 2005.

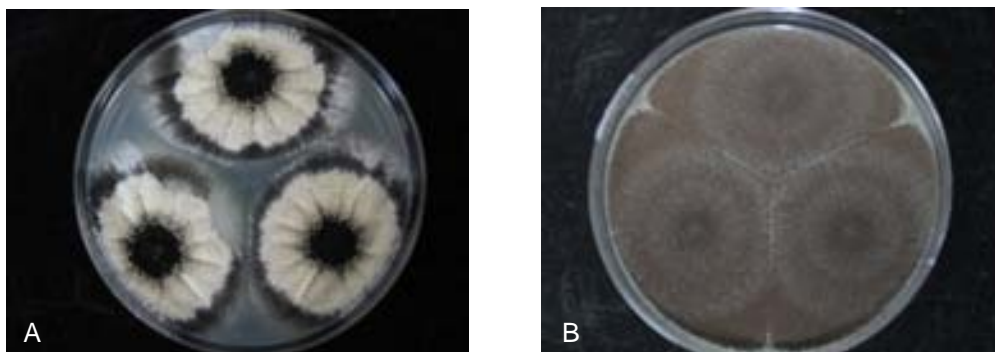


Figura 6.4. *Aspergillus japonicus* (cepa A1.1). A) CZ. B) EMA.

5. *Aspergillus niger* van Tieghem 1867 Ann. Sci. Nat. Botan., Ser. 5, 8: 240 – Neotipo CBS 554.65.

Grupo *A.niger*

SINONIMIA: *Aspergillus fuliginosus* Peck 1873 (LEG; MB284309).

Sterigmatocystis nigra (Tieghem) van Tieghem 1877 (LEG; MB284309).

Aspergillopsis nigra (Tieghem) Speg. 1910 (LEG; MB284309).

Aspergillus niger var. *altipes* Schiemann 1912 (LEG; MB284309).

Aspergillus fuscus E. Schiemann 1912 (LEG; MB284309).

Aspergillus schiemaninae Thom 1916 (LEG; MB284309).

Aspergillus niger var. *cinnamomeus* (E. Schiemann) Thom & Raper 1945

DIAGNOSIS: **CZA:** Diámetro de la colonia de 25-30 mm a 25° C en 10 días. La colonia es comúnmente plana y densa, de textura granular a flocosa y en ocasiones con surcos radiales. Micelio blanco y conidios en masa de color negro o marrón negruzco. Exudado ausente o limitado, de color claro. Reverso incoloro o amarillo. Pigmento soluble ausente. Puede presentar esclerocios.

Características microscópicas: Cabezuela conidial globosa radiada de 700-800 µm de diámetro. Conidióforos de pared lisa, de 400-3000 µm de largo. Vesículas globosas, biseriadas, de 45-75 µm de diámetro, de color marrón. Métulas de color marrón de 20-70 µm de largo. Fiálides de 7-10 µm de largo. Conidios globosos de 4-5 µm de diámetro, de pared irregularmente rugosa y de color marrón.

EMA: Diámetro colonial de 50-60 mm a 25° C en dos semanas, la textura y color son similares a las que se presentan en CZA. Los conidióforos pueden ser más cortos que en CZA.

DISCUSIÓN: La cepa A1.2 (Fig. 6.5A, B) no presentó ninguna diferencia con la descripción de la especie. La secuencia de la región ITS1-5.8S-ITS2 presentó 100% de similitud con la cepa AB369898 registrada en GB (Tabla 6.5), y su número de acceso al mismo banco es EU833208.

REFERENCIAS TAXONÓMICAS: Raper & Fennell 1977; Samson & Pitt, 2000; Klich, 2002; Robert *et al.*, 2005.

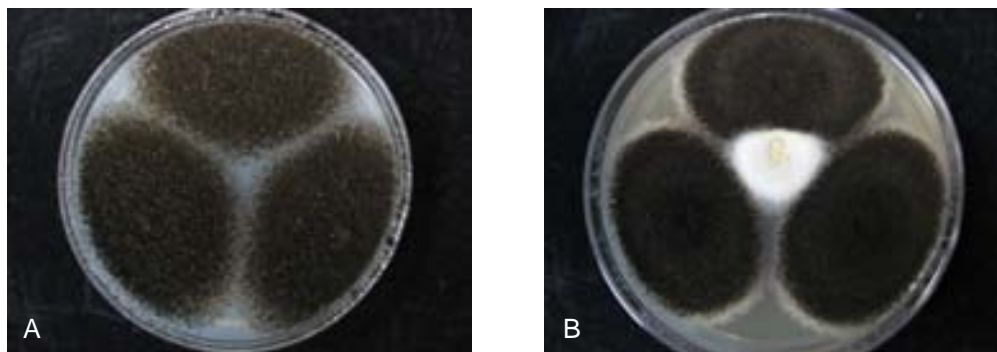


Figura 6.5. *Aspergillus niger* (cepa A1.2). A) CZ. B) EMA.

6. *Aspergillus pseudotamarii* Ito, Peterson, Wicklow & Goto 2001 *Flavi. Mycol. Res.* 105 (2): 233-239.

Grupo *A. flavus*

DIAGNOSIS: CZA: Diámetro colonial de 60-70 mm a 25° C en 7 días y de 30-35 mm a 37° C. La colonia presenta textura velutinosa con abundantes cabezuelas de color anaranjado a marrón. Pigmento soluble del color del medio de cultivo. Forma esclerocios globosos a subglobosos. Reverso de la colonia color amarillo pálido.

Características microscópicas: Cabezuela conidial globosa radiada, de 500-700 µm de diámetro. Conidióforos de pared finamente rugosa. Vesículas globosas a subglobosas de 26-38 µm, biseriadas. Métulas de 8.1-9.6x3.1-3.9 µm. Fiálides de 4.5-6.1x3.1-4.5 µm. Conidios globosos de 3.9-9.9 µm de diámetro, de pared equinulada.

EMA: Diámetro colonial de 60-70 mm a 25° C en 7 días. La colonia presenta una textura más flocosa y con cabezuelas de color verde olivo.

DISCUSIÓN: La cepa A1.10 (Fig. 6.6A, B) no presentó ninguna diferencia con la diagnosis de la especie. La secuencia de la región ITS1-5.8S-ITS2 presentó un 99% de similitud con la cepa DQ467987 registrada en GB (Tabla 6.5), por lo que se consideró coespecífica, y su número de acceso al GB es EU833209.

REFERENCIAS TAXONÓMICAS: Ito *et al.*, 2001; Klich, 2002; Robert *et al.*, 2005.

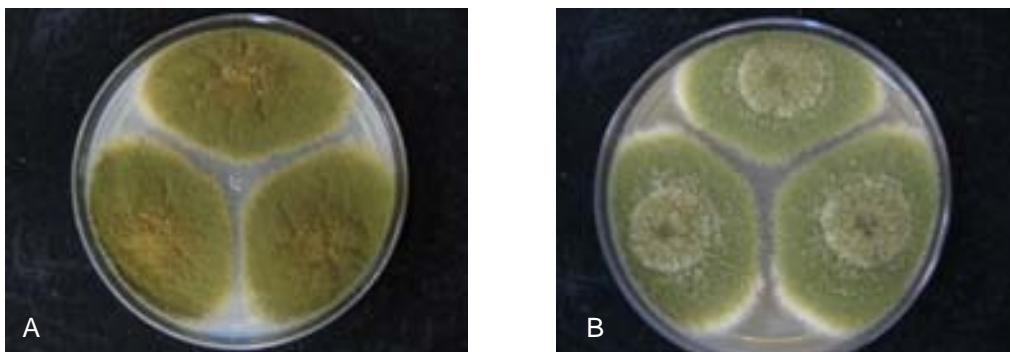


Figura 6.6. *Aspergillus pseudotamarii* (cepa A1.10). A) CZ. B) EMA.

7. *Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tiraboschi 1908 Ann. Bot. (Roma) 7: 9.

Grupo *A. versicolor*

SINONIMIA: *Sterigmatocystis versicolor* Vuill. 1903 (LEG; MB172159).

Aspergillus amoenus Roberg 1931 (LEG; MB1721599).

Aspergillus versicolor var. *fulvus* Nakaz. et al. 1932 (LEG; MB172159).

Aspergillus versicolor var. *rutilobrunneus* Rai, Agarwal & Tewari 1971 (LEG; MB172159).

DIAGNOSIS: **CZA:** Diámetro de la colonia de 20-30 mm a 25° C en dos semanas. La colonia es plana y ocasionalmente presenta surcos, con textura velutinosa. Micelio blanco y conidios en masa de color gris verdoso a amarillo verdoso (28C-D3-4). Puede presentar exudado incoloro o marrón rojizo. Reverso incoloro o con tonos marrón a púrpura. Puede presentar pigmento soluble de color rosa, anaranjado o marrón.

Características microscópicas: Cabezuela conidial hemisférica de 100-125 µm de diámetro. Conidióforos de pared lisa, hialinos o amarillentos, de 120-700 µm de largo. Vesículas globosas de 9-16 µm de diámetro, biseriada. Métulas de 4-8x2.5-3.5 µm. Fiálides de 5-9x2-3 µm. Conidios globosos de 2-3 µm diámetro, de pared equinulada.

EMA: Diámetro de la colonia de 30-40 mm a 25° C en 10 días. La colonia es usualmente plana. Los conidios en masa son de color gris turquesa (24C4) a gris verdoso (25-28C-E3-5). Reverso incoloro a marrón. Textura velutinosa a granular. Exudado ausente. Las características microscópicas se presentan como en CZA. Los conidióforos son más cortos que en CZA.

DISCUSIÓN: La cepa A11.12 (Fig. 6.7A, B) no presentó diferencias con la descripción de la especie. La secuencia de la región ITS1-5.8S-ITS2 tuvo un 99% de similitud con la cepa EU326209 registrada en el GB, por lo que se consideró coespecífica. El número de acceso a la secuencia depositada en dicho banco es EU833210.

REFERENCIAS TAXONÓMICAS: Raper & Fennell 1977; Samson & Pitt, 2000; Klich, 2002; Robert et al., 2005.

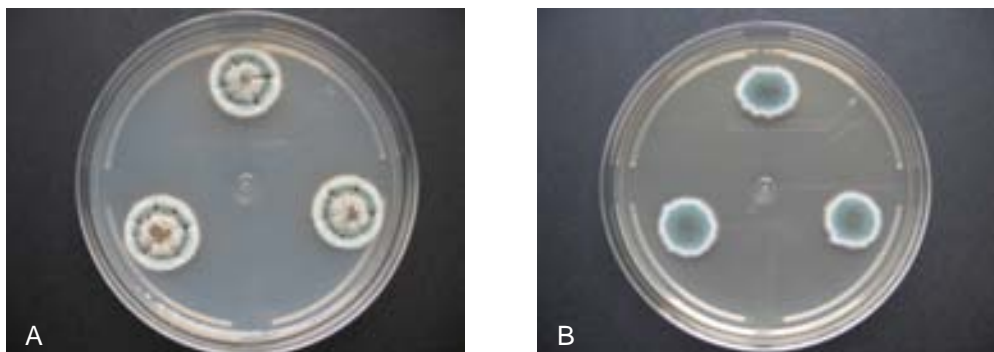


Figura 6.7. *Aspergillus versicolor* (cepa A11.12). A) CZ. B) EMA.

Género *Penicillium*

8. *Penicillium* sp. afín a *adametzioides* Abe ex. G. Smith 1963 Trans. Br. Mycol. Soc. 46: 335.

Subgénero *Aspergilloides* Dierckx

SINONIMIA: *P. adametzioides* es actualmente considerado sinónimo de *P. sclerotiorum* J.F.H. Beyma 1937 (Robert *et al.*, 2005).

DIAGNOSIS: **CZA**: Diámetro de la colonia de 22-26 mm a 25° C en 7 días. La colonia presenta surcos anillados, levantada o crateriforme. Con crecimiento lento, denso, velutinoso. Micelio blanco inconspicuo y conidios en masa con crecimiento moderado de color verde grisáceo (25C-3). En ocasiones presenta exudado claro y pigmento soluble de color marrón. Reverso de color amarillo pálido a marrón en presencia de pigmento soluble.

CZA 5° C: Solamente germina.

CZA 37° C: No crece.

Características microscópicas: Conidióforos delicados de 40-100 µm de largo, de pared lisa y estrictamente monoverticilados. Fiálides de ampuliformes a acerosas de 7-10x2.2-3 µm. Conidios subesféricos a elípticos, de pared lisa a finamente rugosa, de 2.2-3x1.8-2.2 µm, en cadenas cortas desordenadas.

EMA: Diámetro de la colonia de 20-30 mm a 25° C en 7 días, convoluta en el centro. La periferia es plana o con surcos radiales, con textura estrictamente velutinosa. Conidios en masa con crecimiento moderado de color gris verdoso (26B3-D2). Exudado ausente, y abundante pigmento soluble de color marrón. Reverso de color amarillo pálido.

G25N: Diámetro de la colonia de 14-18 mm a 25° C en 7 días. La colonia es de crecimiento bajo, denso y velutinoso. Conidios en masa en colores similares a los que presenta en CZA. Exudado y pigmento soluble ausentes. Reverso amarillo pálido.

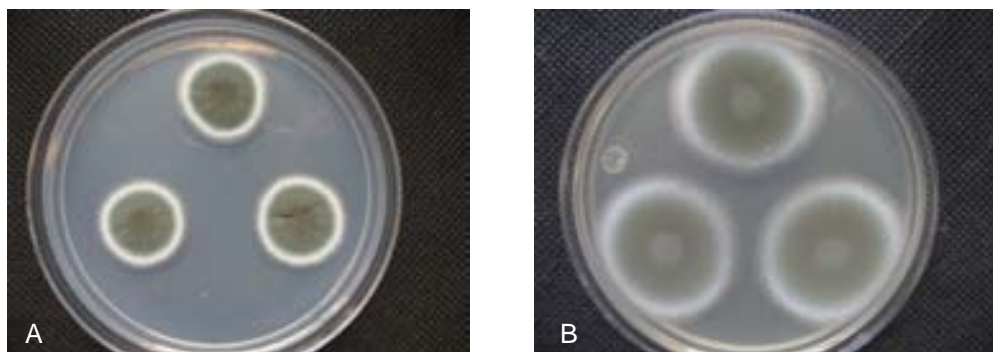


Figura 6.8. *Penicillium* sp. afín a *adametzioides* (cepa P1.23). A) CZ. B) EMA.

DISCUSIÓN: La cepa P1.23 (Fig. 6.8A, B) coincidió con la descripción de *Penicillium adametzioides* en las monografías de Pitt (1979) y presentó 94% de similitud con la cepa DQ681325 registrada en GB para la especie *P. adametzioides* (Tabla 6.5), por lo que no se consideró coespecífica y será necesario repetir la secuencia y la caracterización para evaluar si se trata de una nueva especie. La secuencia no fue depositada en GB.

REFERENCIAS TAXONÓMICAS: Pitt, 1979; Pitt 1985; Robert *et al.*, 2005.

9. *Penicillium brevicompactum* Dierckx 1901 Ann. Soc. Sci. Bruxelles 25: 88 – Neotipo (Pitt, 1980): No. 40225 (IMI).

Subgénero *Penicillium* Pitt

SINONIMIA: *Penicillium griseobrunneum* Dierckx 1901 (LEG; MB149773)
Penicillium stoloniferum Thom 1910 (LEG; MB149773)
Penicillium tabescens Westling 1911 (LEG; MB149773)
Penicillium monstrosum Sopp 1912 (LEG; MB149773)
Penicillium szaferi K.M. Zalesky 1927 (LEG; MB149773)
Penicillium biourgeianum K.M. Zalesky 1927 (LEG; MB149773)
Penicillium hagemii K.M. Zalesky 1927 (LEG; MB149773)
Penicillium patris-mei K.M. Zalesky 1927 (LEG; MB149773)
Penicillium brunneostoloniferum S. Abe 1956 (LEG; MB149773)
Penicillium brunneostoloniferum S. Abe ex C. Ramírez 1982 (LEG; MB149773)

DIAGNOSIS: **CZA:** Diámetro de la colonia de 20-30 mm a 25° C en 7 días. La colonia presenta surcos radiales, en ocasiones umbonado en el centro. Con crecimiento denso, profundo, velutinoso, y ocasionalmente flocoso, con el margen blanco y denso. Conidios en masa con crecimiento ligero a moderado de color verde oscuro a azul verdoso (25-28D-E3), y en ocasiones con tonos más pálidos en el margen. Exudado claro usualmente presente, de colores pálidos a marrón rojizo. Pigmento soluble generalmente presente, de color amarillo a marrón rojizo. Reverso pálido, amarillo o marrón rojizo.

CZA 5° C: Formación de microcolonias a colonias de 4 mm.

CZA 37° C: No crece.

Características microscópicas: Conidióforos de pared lisa, de 500-800x4-6 µm, típicamente triverticilados, aunque pueden presentar penicilios verticilados irregulares y cuadvverticilados. Ramas aisladas de 15-20x4-5 µm, ocasionalmente en verticilos de 2-4. Cuando se encuentra presente la ramilla es similar a la rama más corta. De 5-7 métulas de 9-12x3.5-5 µm por verticilo. De 6-10 fiálides ampuliformes de 6-9x2.5-3 µm,

en verticilos divergentes. Conidios elípticos de 2.5-3.5x2-2.5 μm , de pared lisa a finamente rugosa que se desarrollan en cadenas desordenadas divergentes.

EMA: Diámetro de la colonia de 12-20 mm a 25° C en 7 días, rara vez es mayor. La colonia es generalmente plana y en ocasiones con surcos radiales, de velutinoso a flocosa, con márgenes angostos e irregulares. Micelio blanco inconspicuo. Conidios en masa de color similar al presentado en CZA, en ocasiones más pálido o con tonos azules. Ocasionalmente produce exudado claro a marrón rojizo. Pigmento soluble ausente. Reverso pálido o marrón.

G25N: Diámetro de la colonia de 16-22 mm a 25° C en 7 días. La colonia es de apariencia plana o con surcos radiales, con textura de apariencia granular. Conidios en masa en colores similares a los que presenta en CZA, a veces es más grisáceo. Ocasionalmente produce exudado y pigmento soluble. Reverso pálido, amarillo o marrón rojizo.

DISCUSIÓN: A partir de la muestra de migajón arenoso con hojarasca (M1) se obtuvieron dos aislamientos de la misma especie pero que presentaron diferencias morfológicas: La cepa P1.19 (Fig. 6.9A, B) no presentó ninguna diferencia con la descripción de la especie. La cepa P1.28 (Fig. 6.10A, B) presentó crecimiento conidial concéntrico. Ambos aislamientos tuvieron la misma secuencia de pares de bases en la región ITS1-5.8S-ITS2, y presentaron un 99% de similitud con la cepa AY373897 registrada en GB (Tabla 6.5), por lo que se consideraron coespecíficas con *P. brevicompactum*. El número de acceso de la cepa P1.19 es EU833211.

REFERENCIAS TAXONÓMICAS: Pitt, 1979; Pitt, 1985; Samson & Pitt, 2000; Robert *et al.*, 2005.

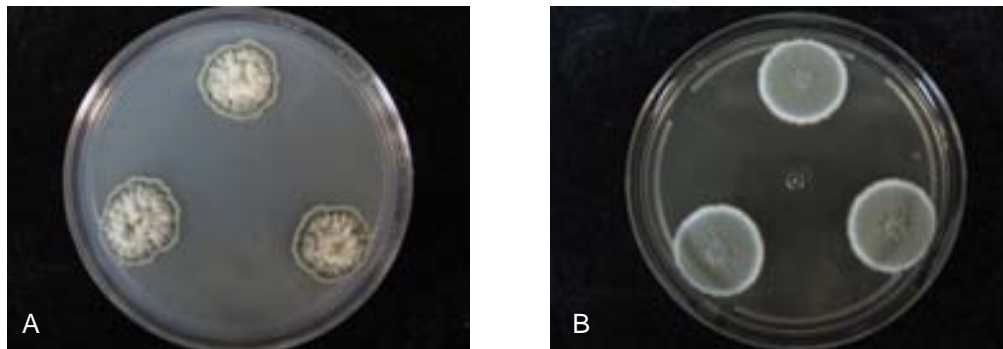


Figura 6.9. *Penicillium brevicompactum* (cepa P1.19) A) CZ. B) G25N.

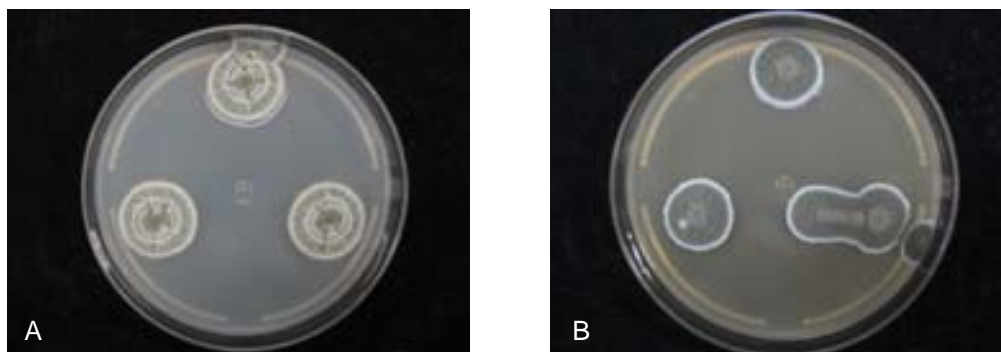


Figura 6.10. *Penicillium brevicompactum* (cepa P1.28). A) CZ. B) EMA.

10. *Penicillium chrysogenum* Thom 1910 U.S.D.A. Bur. Anim. Industr. Bull. 118:58 – Neotipo (Pitt. 1980): No. 24314 (IMI).

Subgénero *Penicillium* Pitt

SINONIMIA: *Penicillium brunneorubrum* Dierckx 1901 (LEG; MB165757)
Penicillium griseoroseum Dierckx 1901 (LEG; MB165757)
Penicillium baculatum Westling 1910 (LEG; MB165757)
Penicillium notatum Westling 1911 (LEG; MB165757)
Eurotium baculatum (Westling) Sacc. & Trotter 1913 (LEG; MB165757)
Penicillium meleagrinum Biourge 1923 (LEG; MB165757)
Penicillium roseocitreum Biourge 1923 (LEG; MB165757)
Penicillium rubens Biourge 1923 (LEG; MB165757)
Penicillium chlorophaeum Biourge 1923 (LEG; MB165757)
Penicillium cyaneofulvum Biourge 1923 (LEG; MB165757)
Penicillium flavidomarginatum Biourge 1923 (LEG; MB165757)
Penicillium fluorescens Laxa 1932 (LEG; MB165757)
Penicillium camerunense R. Heim 1949 (LEG; MB165757)
Penicillium aromaticum f. *microsporum* Romankova 1955 (LEG; MB165757)
Penicillium harmonense Baghd. 1968 (LEG; MB165757)

DIAGNOSIS: **CZA:** Diámetro de la colonia de 35-45 mm a 25° C en 7 días. La colonia presenta surcos radiales o pliegues, es generalmente umbonada. Con crecimiento bajo, velutinoso, aunque se presenta también moderadamente profundo y algo flocoso. Micelio blanco en el margen y en el centro de color amarillo a anaranjado claro (3-5A2). Conidios en masa de color gris turquesa (24-25D-E3-4) o azul verdoso, en ocasiones se presenta amarillo verdoso debido al exudado. Exudado y pigmento soluble generalmente presente, de color amarillo pálido a brillante o marrón. Reverso de color amarillo brillante o marrón.

CZA 5° C: Formación de microcolonias o colonias de 4 mm.

CZA 37° C: La respuesta de crecimiento es variable y en ocasiones puede alcanzar más de 5 mm de diámetro.

Características microscópicas: Conidióforo de pared lisa, triverticilado de 200-300x3-4 µm. Penicilios típicamente triverticilados, raramente biverticilados o cuadvérticilados. En cada conidióforo presenta 1-2 ramas de 15-20x3-4 µm, en ocasiones divergentes. Métulas de 8-12x2.5-4 µm, en verticilos de 3-5. De 4-7 fiáldes ampuliformes de 7-8x2.2-2.5 µm por verticilo. Conidios elípticos a subesféricos de 2.5-4x2.2-3.5 µm, de pared lisa, en columnas irregulares largas.

EMA: Diámetro de la colonia de 25-35 mm a 25° C en 7 días. La colonia es generalmente plana y raramente con surcos radiales o centralmente umbonada, de textura velutinosa, y en ocasiones flocosa o granular en el centro. Micelio inconspicuo de color blanco o anaranjado pálido (5A3). Conidios en masa con crecimiento moderado a abundante de color similar al presentado en CZA. Exudado y pigmento soluble ausentes. Reverso amarillo pálido, marrón o marrón rojizo.

G25N: Diámetro de la colonia de 20-22 mm a 25° C en 7 días, ocasionalmente con 2 mm de más o de menos. La colonia es densa, con crecimiento flocoso y con surcos radiales. Micelio blanco y conidios en masa con crecimiento moderado a abundante, en colores similares a los presentados en CZA. No produce exudado ni pigmento soluble. Reverso amarillo pálido, marrón o marrón rojizo.

DISCUSIÓN: La cepa P11.7 (Fig. 6.11A, B) no presentó diferencias con la descripción de la especie. Sólo se indica que alcanzó 15 mm de diámetro en CZA a 37° C en 7 días. La secuencia de la región ITS1-5.8S-ITS2 presentó 100% de similitud con la cepa AF455490 registrada en GenBank (Tabla 6.5), y el número de acceso es EU833212.

REFERENCIAS TAXONÓMICAS: Pitt, 1979; Pitt, 1985; Samson & Pitt, 2000; Robert *et al.*, 2005.

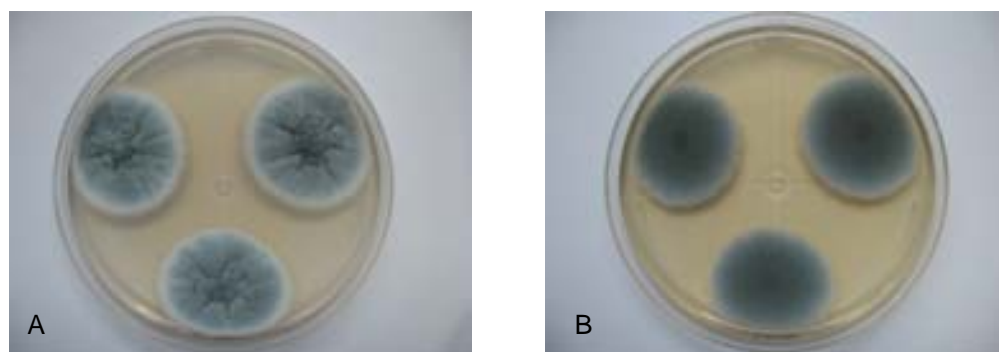


Figura 6.11. *Penicillium chrysogenum* (cepa P11.7). A) CZ. B) EMA.

11. *Penicillium citrinum* Thom 1910 U.S.D.A. Bur. Anim. Industr. Bull. 118: 61 – Neotipo (Pitt, 1980): No. 92196ii (IMI).

Subgénero *Furcatum* Pitt

SINONIMIA: *Citromyces subtilis* Bainier & Sartory 1912 (LEG; MB165293)
Penicillium subtile (Bainier & Sartory) Biourge 1923 (LEG; MB165293)
Penicillium aurifluum Biourge 1923 (LEG; MB165293)
Penicillium sartoryi Thom 1930 (LEG; MB165293)
Penicillium gorlenkoanum Baghd. 1968 (LEG; MB165293)
Penicillium botryosum Bat. & H. Maia 1977 (LEG; MB165293)

DIAGNOSIS: **CZA**: Diámetro de la colonia de 25-30 mm a 25° C en 7 días. La colonia presenta surcos radiales, con el margen velutinoso y el centro flocoso. Micelio de color blanco en la periferia, y blanco a gris anaranjado (6B5-6) en el centro. Conidios en masa con crecimiento moderado de color gris turquesa (24C2-3) o gris azul cielo. Exudado abundante incoloro, amarillo o marrón rojizo, raramente ausente. Pigmento soluble color amarillo brillante, o ausente. Reverso amarillo, marrón, con tonos rojizos y en ocasiones de color olivo.

CZA 5° C: No crece.

CZA 37° C: Crece hasta 10 mm e inusualmente no hay crecimiento.

Características microscópicas: Conidióforos de pared lisa, de 100-300x2.2-3 µm, biverticilados con 3-5 métulas espatuladas o vesiculadas de 12-15x2.2-3 µm, terminales bien definidas y ocasionalmente en ramas divergentes. De 8-12 fiálides ampuliformes de 7-8x2.2-2.5 µm por verticilo, usualmente con cuello corto. Conidios esféricos a subsféricos de 2.2-3.0 µm de diámetro, de pared lisa a finamente rugosa, en columnas bien definidas.

EMA: Diámetro de la colonia de 14-18 mm (raramente alcanza 22 mm) a 25° C en 7 días. La colonia se presenta generalmente plana o con surcos radiales, profunda, densa y ocasionalmente con textura flocosa, el margen es angosto y típicamente irregular. Conidios en masa con crecimiento moderado a abundante, de color gris azulado o verde opaco (26-27E3). Exudado y pigmento soluble ausente. Reverso de color marrón pálido o amarillo con tonos marrón.

G25N: Diámetro de la colonia de 13-18 mm a 25° C en 7 días. La colonia presenta surcos radiales, es y umbonada en el centro, velutinosa, ocasionalmente flocosa en el centro. Conidiogénesis moderada a abundante de color verde opaco (25-26C-D3-4) a blanco verdoso o verde pistache. Exudado y pigmento soluble ausentes. Reverso pálido, marrón opaco, amarillo con tonos marrones y ocasionalmente color olivo.

DISCUSIÓN: Se obtuvieron dos aislamientos a partir de las muestras M1 y M3: La cepa P1.21 (Fig. 6.12A, B) de M1, alcanzó 25 mm de diámetro colonial en EMA a 27° C. La secuencia de la región ITS1-5.8S-ITS2 presentó 99% de similitud con la cepa EF127876 (Tabla 6.5), por lo que se consideró coespecífica. El número de acceso de la secuencia depositada en GB es EU833213.

La cepa P8.2 (Fig. 6.13A, B), aislada de M3, presentó conidios inmaduros en CZA a 27° C en 7 días. En EMA, la colonia alcanzó 12 mm de diámetro colonial a 27° C en 7 días, conidios inmaduros con aspecto similar al presentado en CZA, reverso de color amarillo intenso. No creció en G25N. En CZA los conidióforos se presentaron ligeramente rugosos y los conidios alcanzaron 3.5 µm. La secuencia de la región ITS1-5.8S-ITS2 presentó 100% de similitud con la cepa DQ681331 (Tabla 6.5), y el número de acceso de la secuencia depositada en GB es EU833214.

REFERENCIAS TAXONÓMICAS: Pitt, 1979; Samson & Pitt, 2000; Robert *et al.*, 2005.

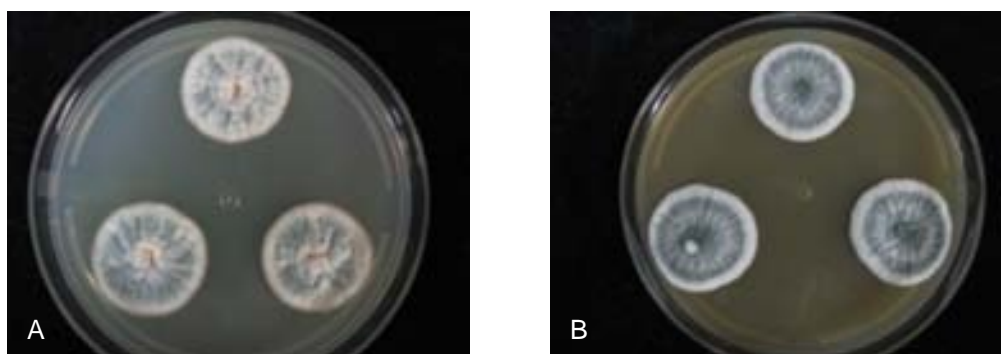


Figura 6.12. *Penicillium citrinum* (cepa P1.21). A) CZ. B) EMA.

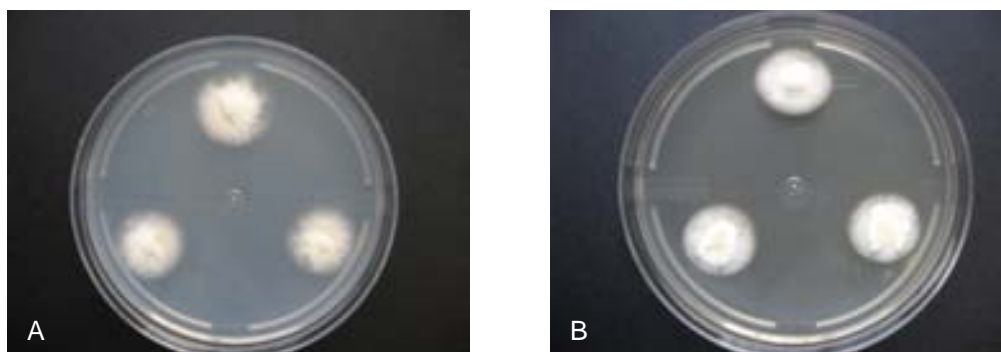


Figura 6.13. *Penicillium citrinum* (cepa P8.2). A) CZ. B) EMA.

12. *Penicillium commune* Thom 1910 U.S.D.A. Bur. Anim. Industr. Bull. 118: 56 – Neotipo (Samson & Pitt, 2000): No. 39812 (IMI).

Subgénero *Penicillium* Pitt

SINONIMIA: *Penicillium flavoglaucum* Biourge 1923 (LEG; MB164241)

Penicillium fuscoglaucum Biourge 1923 (LEG; MB164241)

Penicillium lanosogriseum Thom 1930 (LEG; MB164241)

Penicillium lanosoviride Thom 1930 (LEG; MB164241)

Penicillium ochraceum var. *macrosporum* Thom 1930 (LEG; MB164241)

Penicillium psittacinum Thom 1930 (LEG; MB164241)

Penicillium cyclopium var. *album* G. Sm. 1951 (LEG; MB164241)

Penicillium roqueforti var. *punctatum* S. Abe 1956 (LEG; MB164241)

Penicillium verrucosum var. *album* (G. Sm.) Samson, Stolk & Hadlok 1976 (LEG; MB164241)

Penicillium cyclopium f. *album* (G. Sm.) Fassat. 1977 (LEG; MB164241)

DIAGNOSIS: CZA: Diámetro de la colonia de 28-40 mm a 25° C en 10-12 días. Colonia con crecimiento moderado y con textura de velutinosa a flocosa, con surcos radiales. El margen es de color blanco. Conidios en masa con crecimiento zonado de color gris verdoso a verde olivo. Frecuentemente produce exudado incoloro o amarillo claro, en ocasiones con tono rosado. Pigmento soluble ausente. Reverso de color crema a amarillo o incoloro.

Características microscópicas: Conidióforos de pared finamente rugosa hasta granular, de 100-500x3-4 µm, típicamente triverticilados. Ramas de 15-25x3-4 µm. Métulas de 8-20x3-5 µm de largo, que se desarrollan a diferentes niveles. Fiálides ampuliformes de 9-12x2.5-3 µm, de pared lisa. Conidios esféricos a subesféricos y ocasionalmente elípticos, de 4-5x2.5-3.5 µm de pared lisa.

EMA: Diámetro de la colonia del doble de la presentada en CZA, plana, velutinosa, conidios en masa con crecimiento zonado. Exudado ausente. Reverso incoloro a amarillo.

G25N: Las diagnosis de la especie no incluyen descripción para el medio G25N, ni para CZA a 5° C y 37° C (Robert *et al.*, 2005).

DISCUSIÓN: Se obtuvieron dos aislamientos diferentes a partir de las muestras M2 y M3. La cepa P8.1 (Fig. 6.14A, B) de la muestra M3, presentó más penicilios biverticilados que triverticilados. La secuencia de la región ITS1-5.8S-ITS2 tuvo 100% de similitud con la cepa AF455544 registrada en GenBank (Tabla 6.5), y quedó depositada con el número EU833215.

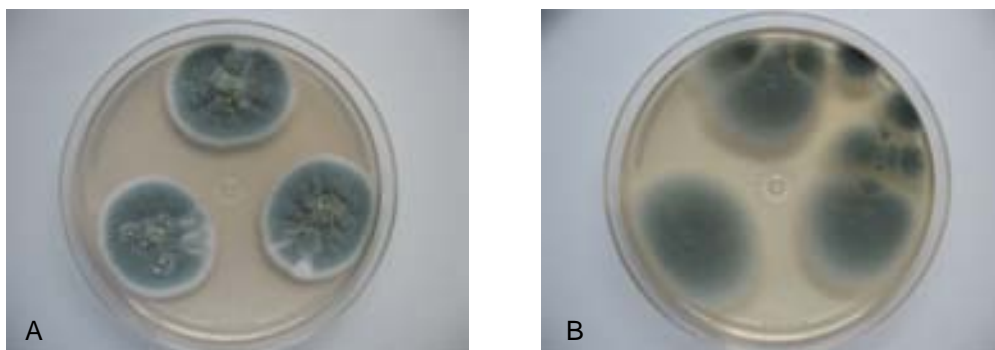


Figura 6.14. *Penicillium commune* (cepa P8.1). A) CZ. B) EMA.

La cepa P4.2 (Fig. 6.15A, B) de la muestra M2, alcanzó 30 mm de diámetro colonial en G25N a 27° C en 7 días, y 8 mm a 5° C en CZA. La secuencia de la región ITS1-5.8S-ITS2 presentó 99% de similitud con la cepa AJ005482 (Tabla 6.5) registrada en GenBank, por lo que se consideró coespecífica de *P. commune*. El número de acceso a la secuencia es EU833216.

REFERENCIAS TAXONÓMICAS: Pitt, 1979; Pitt, 1985; Samson & Pitt, 2000; Robert *et al.*, 2005.

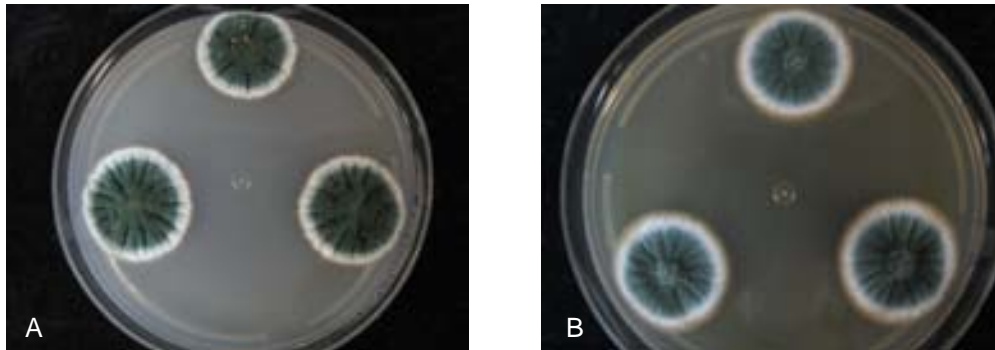


Figura 6.15. *Penicillium commune* (cepa P4.2). A) CZ. B) EMA.

13. *Penicillium concentricum* Samsom, Stolk & Handlok 1976 Stud. Mycol. 11: 17- Holotipo: No. 477.75 (CBS).

Subgénero *Penicillium* Pitt

SINONIMIA: *Penicillium glandicola* var. *glaucovenetum* Frisvad 1990 (LEG; MB319263).

DIAGNOSIS: **CZA**: Diámetro de la colonia de 28-36 mm a 25° C en 14 días, ocasionalmente de 46 mm. La colonia es densa, a veces granular con formación de algunos sinemas en las zonas marginales y usualmente en zonas concéntricas, textura fasciculada. Conidios en masa de color verde oscuro, con olor dulce o herbal. Exudado copioso en gotas amarillas. Puede producir pigmento soluble de color anaranjado. Reverso color anaranjado a rojo.

Características microscópicas: Conidióforos de pared lisa, hialina, de 80-300x3-4 µm, con penicilios triverticilados. Pueden estar solitarios o formando sinemas laxos. Ramas cilíndricas de 12-20x3-3.5 µm. Métulas cilíndricas de 9-13x3-3.5 µm, lisa. Fiálides ampuliformes de 5-10x2.2-2.5 µm, y en 3-6 por verticilo. Conidios elípticos de 3.2-3.7x2-2.5 µm, de pared lisa color verde, que forman columnas radiadas.

EMA: Diámetro de la colonia de 23-33 mm a 25° C en 14 días. La colonia es menos densa, pero con colores similares a los presentados en CZA, y con sinemas más evidentes en zonas concéntricas.

G25N: Las diagnósis de la especie no incluyen descripción para el medio G25N, ni para CZA a 5° C y 37° C. (Robert *et al.*, 2005)

DISCUSIÓN: La cepa P11.1 (Fig. 6.16. A, B) no formó sinemas. El diámetro de la colonia en EMA alcanzó 15 mm a 27° C en 7 días. La secuencia presentó 98% de similitud con la cepa DQ681333 registrada en GenBank (Tabla 6.5), por lo que se consideró coespecífica con la especie *P. concentricum*. El número de acceso a la secuencia es EU833217.

REFERENCIAS TAXONÓMICAS: Samson & Pitt, 2000; Robert *et al.*, 2005.

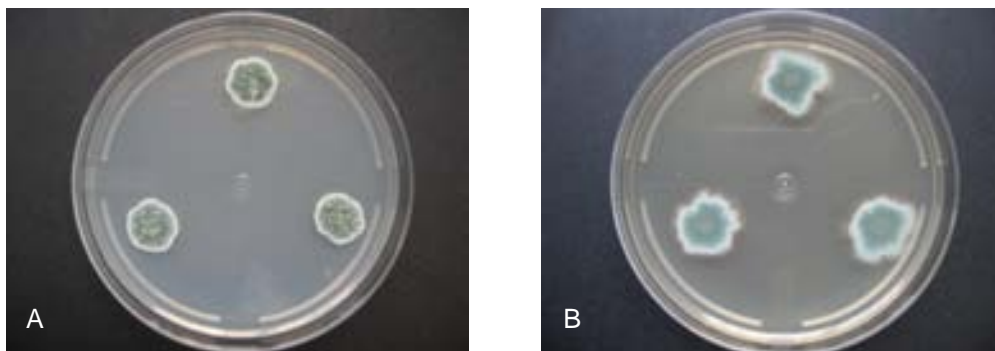


Figura 6.16. *Penicillium concentricum* (cepa P11.1). A) CZ. B) EMA.

14. *Penicillium decaturense* Peterson, Bayer & Wicklow 2005 Mycologia 96(6):1290.

Subgénero *Furcatum* Pitt

DIAGNOSIS: **CZA**: Diámetro de la colonia de 31-37 mm a 25° C en 7 días. La colonia presenta textura velutinosa y con surcos. Conidios en masa con crecimiento abundante de color blanco a gris azulado intenso, con tonos amarillos a rojizos en el centro debido al exudado producido. Exudado de color amarillo. Pigmento soluble ausente. Reverso de color amarillo.

CZA 5° C: No crece.

CZA 37° C: No crece.

Características microscópicas: Conidióforos de pared lisa, de más de 150 µm de largo, y el diámetro debajo de la métula es de 2.5-3 µm, con penicilios biverticilados. Métulas de 10-15x2.5-4 µm. Fiálides ampuliformes de 6-10x2.5 µm. Conidios globosos de pared lisa de 2.0-2.5 µm de diámetro.

EMA: Diámetro de la colonia de 26-27 mm a 25° C en 7 días. Conidios en masa con crecimiento abundante de color verde olivo. Exudado y pigmento soluble ausentes. Reverso verde pálido.

G25N: Diámetro de la colonia de 15-17 mm a 25° C en 7 días.

DISCUSIÓN: La cepa P1.29 (Fig. 6.17A, B) sólo alcanzó 20 mm de diámetro colonial a 27°C en 7 días en CZA y EMA. La secuencia de la región ITS1-5.8S-ITS2 presentó un 99% de similitud con la cepa AF125946 (Tabla 6.5), por lo que se consideró coespecífica con *P. decaturense*, y está depositada en GB con el número EU833218.

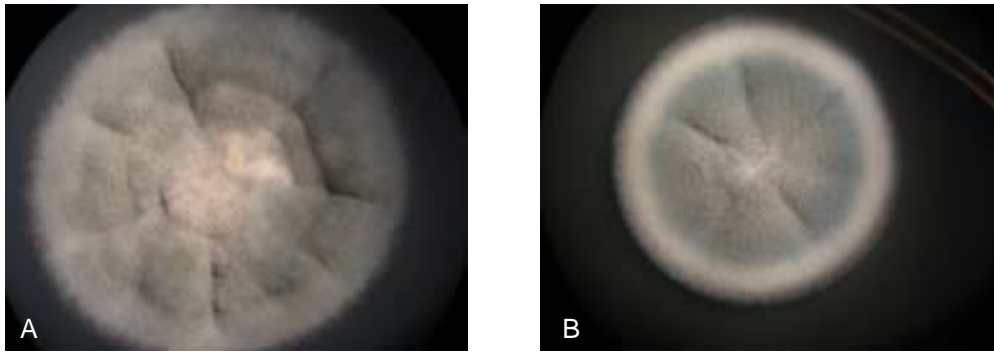


Figura 6.17. *Penicillium decaturense* (cepa P1.29). A) CZ. B) EMA.

15. *Penicillium granulatum* Bainier 1905 Bull. Trimest. Soc. Mycol. Fr. 21: 126.

Subgénero *Penicillium* Pitt

SINONIMIA: actualmente se considera sinónimo de *P. glandicola* (Oudem.) Seifert & Samson 1985
Coremium glandicola Oudem. 1903 (LEG; MB174620)
Penicillium divergens Bainier & Sartory 1912 Bull. Trimest. Soc. Mycol. Fr. 28: 270.
Penicillium schneeggii Boas 1914 (LEG; MB174620)
Penicillium granulatum var. *globosum* Bridge, D. Hawksw., Kozak., Onions, R.R.M. Paterson, Sackin & Sneath 1989 (LEG; MB174620)

DIAGNOSIS: **CZA:** Diámetro de la colonia de 22-28 mm a 25° C en 7 días. No crece a 37° C. La colonia es plana o con surcos radiales, densa con apariencia granular por la presencia de pequeños coremios, ocasionalmente es flocosa en zonas centrales o marginales. Micelio blanco a amarillo opaco. Conidios en masa con crecimiento moderado de color verde opaco (26-27D3-4) o verde pistache. Exudado usualmente presente y llega a ser abundante, de color amarillo claro. Pigmento soluble de color amarillo a marrón o color ladrillo (7D-E7). Reverso del mismo color que el pigmento soluble.

CZA 5° C: Presenta microcolonia de 5 mm.

CZA 37° C: No crece.

Características microscópicas: Conidióforos solitarios o en coremios bien definidos, de pared rugosa, típicamente largos, con penicillios triverticilados y cuadriverticilados. Ramas de 12-20x3.5-4 µm, de 1-2 por penicilio, con paredes rugosas. Ramilla similar a la rama más corta. Métulas de 8-12x3.5-5 µm, con pared rugosa, de 3-5 por verticilo. Fiálides ampuliformes de 7-9x2.5-3 µm, de 5-8 por verticilo. Conidios elípticos, raramente subesféricos, de pared lisa, de 3.0-3.5x2.8-3.2 µm en cadenas compactas o columnas bien definidas.

EMA: Diámetro de la colonia de 16-22 mm a 25° C en 7 días. La colonia es plana, profunda, con superficie típicamente granular debido a la presencia de coremios pequeños, pero ocasionalmente puede ser flocosa. Presenta márgenes irregulares con frecuencia. Micelio blanco a marrón pálido. Conidios en masa con crecimiento moderado en colores similares a los que se presentan en CZA. Exudado ausente. Pigmento soluble de color marrón. Reverso amarillo brillante a anaranjado marrón.

G25N: Diámetro de la colonia de 16-20 mm a 25° C en 7 días. La colonia se presenta plana con textura flocosa a coremiforme. Micelio blanco. Conidios en masa con crecimiento ligero a moderado en colores similares a los presentados en CZA. Exudado y pigmento soluble ausentes. Reverso de color amarillo brillante a marrón.

DISCUSIÓN: La cepa P4.6 (Fig. 6.18A, B) alcanzó 30 mm de diámetro colonial con surcos radiales profundos en G25N a 27° C en 7 días. La secuencia de la región ITS1-5.8S-ITS2 presentó un 99% de similitud con la cepa DQ681334 (Tabla 6.5) por lo que se consideró coespecífica con *P. granulatum*. El número de acceso a la secuencia depositada en GenBank es EU833219.

Referencias taxonómicas: Pitt, 1979; Pitt, 1985; Samson & Pitt, 2000; Robert et al., 2005.

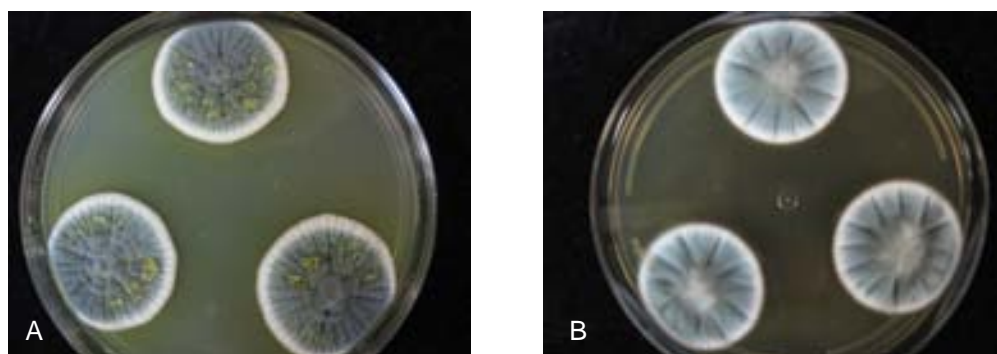


Figura 6.18. *Penicillium granulatum* (cepa P4.6). A) CZ. B) G25N.

16. *Penicillium herquei* Bainier & Sartory 1912 Bull. Soc. Mycol. Fr. 28: 121 – Neotipo (Pitt, 1980): No. 28809 (IMI).

Subgénero *Furcatum* Pitt

SINONIMIA: *Penicillium elegans* Sopp 1912 (LEG; MB152951)

Penicillium lemonii Sopp 1912 (LEG; MB152951)

Penicillium luteocoeruleum Saito 1949 (LEG; MB152951)

Penicillium coralligerum Nicot & Pionnat 1962.

DIAGNOSIS: **CZA:** Diámetro de la colonia de 20-32 mm a 25° C en 7 días. La colonia presenta surcos radiales y ocasionalmente es plana, es velutinoso a densamente flocosa. El micelio es color amarillo (2A5-6), en algunos aislados es también verde brillante (28A8) o anaranjado (5A5) en el centro. Conidios en masa con crecimiento ligero a moderado

de color verde opaco (25-27D-E3) a gris verdoso o gris azulado. Exudado usualmente presente de color amarillo claro a brillante. Pigmento soluble de color amarillo, amarillo verdoso a marrón y ocasionalmente de color verde oscuro. Reverso de color olivo marrón a marrón oscuro (4-6F7). Algunos aislamientos pueden presentar esclerocios.

CZA 5° C: Puede presentar germinación.

CZA 37° C: No crece.

Características microscópicas: Conidióforos de pared extremadamente rugosa, raramente lisa, de 200-400x3.5-4 µm, biverticilados con 4-6 métulas de 10-15x3-5 µm, en forma de clava, en verticilos terminales y en ocasiones irregulares. Fiálides ampuliformes de 7-12x2.5-3 µm, 6-12 por verticilo. Conidios elípticos de 3.5-4x2.2-3.0 µm, de pared típicamente lisa a conspicuamente rugosa, raramente subesféricos, en cadenas desordenadas o bien definidas.

EMA: Diámetro de la colonia de 30-40 mm a 25° C en 7 días. La colonia es plana o con surcos radiales, con textura flocosa, raramente velutinosa, con el margen profundo y entero. Micelio de color amarillo, raramente anaranjado con el centro verde como se presenta en CZA. Puede presentar esclerocios abundantes. Crecimiento conidial de ligero a moderado en los mismos colores que en CZA. Exudado ausente. Ocasionalmente producción de pigmento soluble, de color amarillo a marrón. Reverso de color olivo a marrón con tonos rojizos.

G25N: Diámetro de la colonia variable, usualmente de 10-14 mm a 25° C en 7 días, pero puede medir de 6-20 mm. La colonia es típicamente plana y profundamente flocosa. Micelio amarillo a anaranjado o en ocasiones blanco. Conidios en masa con crecimiento moderado de color similar al presentado en CZA, pero puede estar ausente. Exudado ausente. Pigmento soluble regularmente presente. Reverso de color amarillo, anaranjado o marrón rojizo.

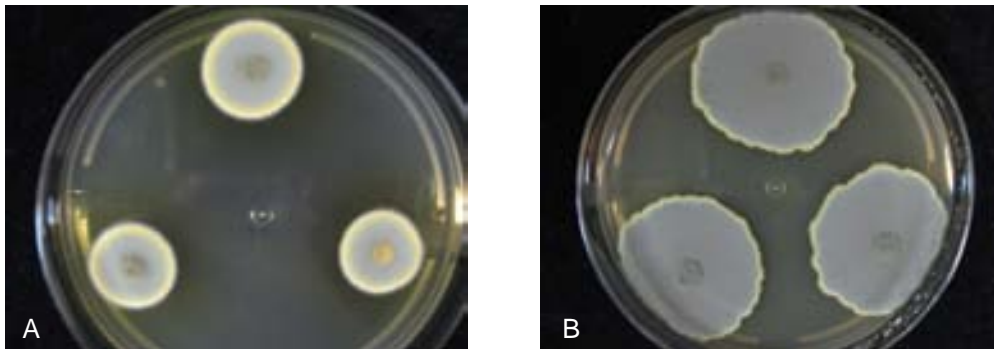


Figura 6.19. *Penicillium herquei* (cepa P1.1). A) CZ. B) EMA.

DISCUSIÓN: La cepa P1.1 (Fig. 6.19A, B) no presentó diferencias con la descripción de la especie. La secuencia de la región ITS1-5.8S-ITS2 presentó un 99% de similitud con la cepa EF536027 (Tabla 6.5), por lo que se consideró coespecífica con *P. herquei*. El número de acceso de la secuencia depositada en GenBank es EU833220.

REFERENCIAS TAXONÓMICAS: Pitt, 1979; Samson & Pitt, 2000; Robert *et al.*, 2005.

17. *Penicillium janthinellum* Biourge 1923 Cellule 33: 258 – Neotipo (Pitt, 1980): No. 40238 (IMI).

Subgénero *Furcatum* Pitt

SINONIMIA: *Spicaria simplicissima* Oudem 1903 (LEG; MB119134)
Penicillium piscarium Westling 1911 (LEG; MB119134)
Penicillium glaucoroseum Demelius 1923 (LEG; MB119134)
Penicillium populi J.F.H. Beyma 1937 (LEG; MB119134)
Penicillium pulvillorum Turfitt 1939 (LEG; MB119134)
Penicillium glaucolanosum Chalab. 1950 (LEG; MB119134)
Penicillium echinulonalgiovense S. Abe 1956 (LEG; MB119134)
Penicillium raperi G. Sm. 1957 (LEG; MB119134)
Penicillium vitale Pidopl. & Bilai 1961 (LEG; MB119134)
Penicillium guttulosum J.C. Gilman & E.V. Abbott 1977 (LEG; MB119134)
Penicillium novae-caledoniae var. *album* C. Ramírez & A.T. Martínez 1981 (LEG; MB119134)
Penicillium cieglerei Quintan 1982 (LEG; MB119134)

DIAGNOSIS: **CZA:** Diámetro de la colonia de 35-50 mm a 25° C en 7 días, ocasionalmente más pequeñas. La colonia presenta surcos radiales o convoluta, con textura flocosa. El micelio puede ser de color blanco, gris beige, amarillo claro o rosa pálido. Crecimiento de conidios en masa de ligero a moderado, de color verde opaco (25-27C-D3-4) a gris verdoso o azul verdoso. Exudado de color claro a marrón, y pigmento soluble de color rojo a marrón ocasionalmente producido. Reverso con gran variación de colores, de pálido a marrón rojizo o verde oscuro (29F7).

CZA 5° C: Puede o no germinar.

CZA 37° C: Diámetro de la colonia de 10-30 mm, ocasionalmente más pequeña y raramente no crece. La colonia es usualmente convoluta, densa y velutinosa, a veces es flocosa. Micelio blanco o ante. Conidios en masa con crecimiento ausente o moderado, de color amarillo verdoso o gris. Exudado de color claro, y pigmento soluble de color marrón producidos ocasionalmente. Reverso pálido a marrón rojizo.

Características microscópicas: Conidióforos de pared delgada y lisa, de 200-400x2-2-5 µm, pero puede ser más corto (30-70 µm), con penicilios monoverticilados y

biverticilados, con 2-3 métulas de 12-20x2-2.5 μm y en ocasiones más largas, por verticilo, regulares o irregulares. Fiálides ampuliformes de 7-11x2-2.5 μm , 4-8 por métula. Conidios comúnmente esféricos, de 2.2-3.0 μm de diámetro, en ocasiones pueden ser piriformes o elípticos de 2.2-3.0x2.0-2.5 μm , con pared lisa a finamente rugosa, en cadenas desordenadas cortas a moderadamente largas.

EMA: Diámetro de la colonia de 35-45 mm a 25° C en 7 días. La colonia es usualmente flocosa, con micelio inconspicuo a predominante de color blanco. Conidios en masa con crecimiento ligero a abundante en colores similares a los presentados en CZA. Exudado ausente. Ocasionalmente produce pigmento soluble de color amarillo a marrón. Reverso de colores variados dependiendo del aislado.

G25N: Diámetro de la colonia de 12-16 mm a 25° C en 7 días, raramente con 2 mm más grande o más pequeña. La colonia es típicamente plana o ligeramente umbonada, con textura velutinosa a flocosa. Micelio blanco o amarillo. Crecimiento de conidios en masa ausente, si está presente es de color gris verdoso. Exudado y pigmento soluble ausentes. Reverso de colores variados.

DISCUSIÓN: La cepa P11.16 (Fig. 6.20A, B) alcanzó 20 mm de diámetro en CZA a 27° C en 7 días, plana, con textura velutinosa y conidiogénesis inmadura. Exudado ausente. No creció en G25N. Las características microscópicas coincidieron con las de la diagnosis de la especie. Pitt (1985) afirma que de todas las especies de *Penicillium*, *P. janthinellum* es la que presenta más variaciones y es difícil de definir. La secuencia de la región ITS1-5.8S-ITS2 presentó un 99% de similitud con la cepa AY373921 (Tabla 6.5), por lo que se consideró coespecífica con *P. janthinellum*. El número de acceso a la secuencia depositada en GenBank es EU833221.

REFERENCIAS TAXONÓMICAS: Pitt, 1979; Pitt, 1985; Samson & Pitt, 2000; Robert *et al.*, 2005

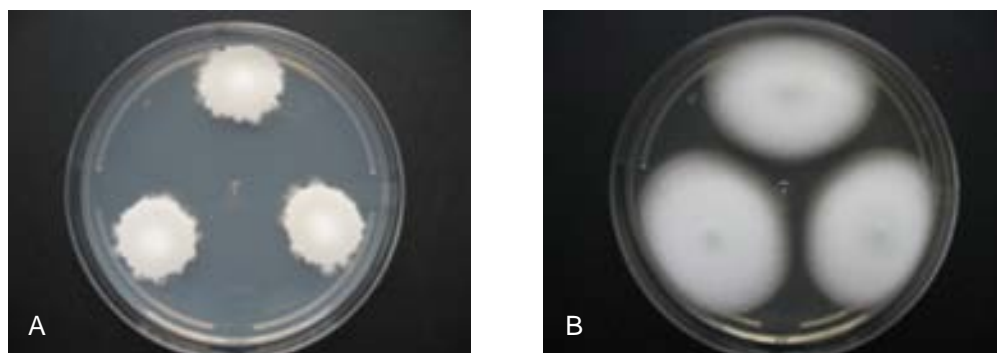


Figura 6.20. *Penicillium janthinellum* (cepa P11.16). A) CZ. B) EMA.

18. *Penicillium lanosum* Westling 1911 Ark. Bot. 11(1): 1-56 – Neotipo (Samson & Pitt, 2000): No. 40224 (IMI).

Subgénero *Penicillium* Pitt

SINONIMIA: *Penicillium kojigenum* Sm. 1961 (LEG; MB178497)

DIAGNOSIS: **CZA**: Diámetro de la colonia de 20 mm a 25° C en 7 días (25-30 mm en 10-14 días). La colonia es flocosa con surcos irregulares. De color blanco a gris claro en la zona central. Conidios en masa de color verde pálido a gris azulado o gris oscuro. Exudado ausente o limitado, de color claro. Olor ausente o indefinido. Reverso incoloro o amarillo claro

Características microscópicas: Conidióforos de pared lisa a finamente rugosa, de 100-600x2.5-3 µm, biverticilado y triverticilado. Con métulas de 7-12x2-2.5 µm. Fiálides ampuliformes de 7-8.5x2-2.5 µm, 5-10 por métula. Conidios globosos a subglobosos de 2.5-3.0 µm de diámetro, de pared finamente granulosa, en apariencia gris verdoso en masa.

EMA: Diámetro de la colonia de 25-30 mm a 25° C en 10 días. Colonia plana, con textura velutinosa. Los conidios en masa tienen crecimiento abundante con coloración gris olivo.

G25N: Las diagnósis de la especie no incluyen descripción para el medio G25N, ni para CZA a 5° C y 37° C. (Robert *et al.*, 2005).

DISCUSIÓN: Se obtuvieron tres aislamientos de la misma especie de las muestras M3 y M4: Las cepas P4.1 (Fig. 6.21A, B) aislada de M3, y la P11.4 (Fig. 6.22A, B) aislada de M4, presentaron exudado de color amarillo intenso (2 A6) en CZA a 27° C en 7 días, a veces con gotas color marrón oscuro. Ambas presentaron pigmento soluble color amarillo del mismo tono. Las colonias de las cepas P4.1 y P11.4 presentaron 4-12 mm de diámetro en CZA a 37° C, con textura velutinosa, umbonada, de color blanco con verde claro (menta) en el centro; el reverso fue de color blanco con tonos de color rosa.

La colonia de la cepa P11.6 (Fig. 6.23A, B), en CZA a 27° C, presentó exudado copioso en gotas grandes de color amarillo y anaranjado o ámbar (3 A7), con pigmento soluble también de color ámbar. Alcanzó un diámetro de 10-15 mm a 37° C y el reverso tuvo los mismos colores que las cepas P4.1 y P11.4.

La secuencia de la región ITS1-5.8S-ITS2 de los tres aislamientos obtenidos presentó un 99% de similitud con la cepa DQ681336 (Tabla 6.5), por lo que se les consideró coespecíficas con la especie *P. lanosum*. Los números de acceso a las secuencias depositadas de las cepas P4.1 Y P11.4 son EU833223 y EU833224 respectivamente.

REFERENCIAS TAXONÓMICAS: Pitt, 1979; Pitt, 1985; Samson & Pitt, 2000; Robert *et al.*, 2005.

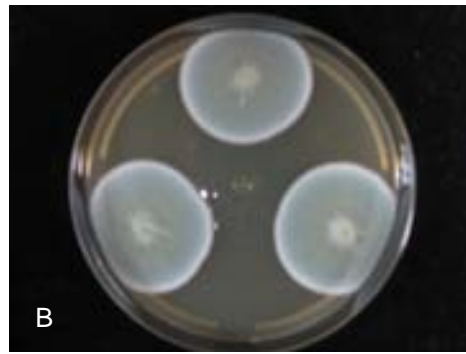
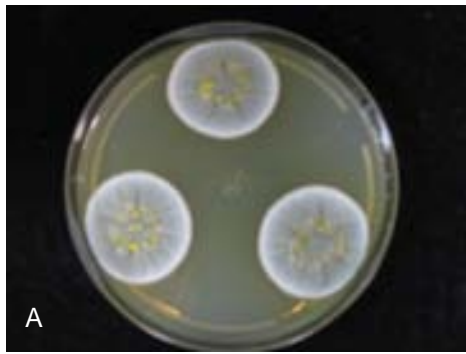


Figura 6.21. *Penicillium lanosum* (cepa P4.1). A) CZ. B) EMA.

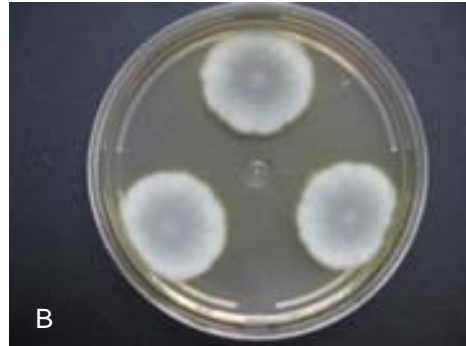
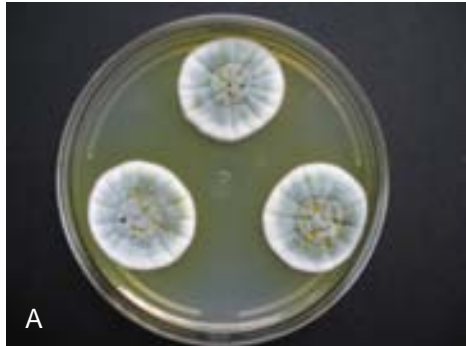


Figura 6.22. *Penicillium lanosum* (cepa P11.4). A) CZ. B) EMA.

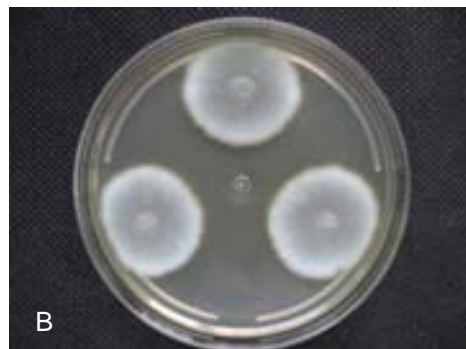


Figura 6.23. *Penicillium lanosum* (cepa P11.6). A) CZ. B) EMA.

19. *Penicillium minioluteum* Dierckx 1901 Ann. Soc. Sci. Bruxelles 25: 87 – Neotipo (Samson & Pitt 2000): No. 642.68 (CBS).

Subgénero *Biverticillium* Dierckx

SINONIMIA: *Penicillium gaditanum* Ramírez & Martínez 1981 (LEG; MB157378)

Penicillium samsonii Quintan. 1985 (LEG; MB157378)

DIAGNOSIS: **CZA**: Diámetro de la colonia de 25-40 mm a 25° C en 7 días. La colonia es plana, densa con textura velutinosa a ligeramente flocosa. Micelio de color blanco en el margen, algunas veces permanece así, pero comúnmente se vuelve amarillo. Conidios en masa con crecimiento abundante de color verde opaco (25-26D-E3-4) o azul verdoso, y en presencia de micelio amarillo es de color verde jade (27-28E-F5). En

ocasiones produce exudado de color claro en pequeñas gotas. Pigmento soluble ausente. Reverso pálido en el margen y rojo en el centro (9-11C-F8).

CZA 5° C: No crece

CZA 37° C: Diámetro de la colonia de 5-15 mm de diámetro en 7 días. La colonia crece umbonada o convoluta, velutinoso a ligeramente flocosa, con micelio de blanco a anaranjado o rojizo. Conidios en masa con crecimiento ausente o abundante de color gris o verde. Exudado y pigmento soluble ausentes. Reverso marrón rojizo o rojo oscuro.

Características microscópicas: Conidióforos de pared lisa de 150-200x3-3.2 μm , pero pueden ser más largos (250-600 μm), en algunos aislamientos se presentan pigmentados. Típicamente con penicilios biverticilados terminales. Métulas ligeramente divergentes de 8-15x2.8-3.2 μm , en verticilos de 6-9. Fiálides acerosas de 8-12x2.2-2.5 μm , de 6-9 por métula, en 2-3 niveles. Conidios elípticos, en ocasiones apiculados de 2.8-3.5x2.2-2.5 μm , de pared lisa, en cadenas desordenadas.

EMA: Diámetro de la colonia de 35-45 mm a 25° C en 7 días. La colonia varía de plana con textura velutinoso a flocosa-funiculosa. Micelio blanco o amarillo verdoso. Crecimiento de conidios en masa abundante de color similar al presentado en CZA. Exudado y pigmento soluble ausentes. Reverso pálido o rojo.

G25N: Diámetro de la colonia de 3-7 mm a 25° C en 7 días. La colonia es plana o umbonada, con micelio blanco. Conidios en masa con crecimiento ligero a moderado, con coloración similar al presentado en CZA. Reverso pálido, verde oscuro o marrón rojizo.

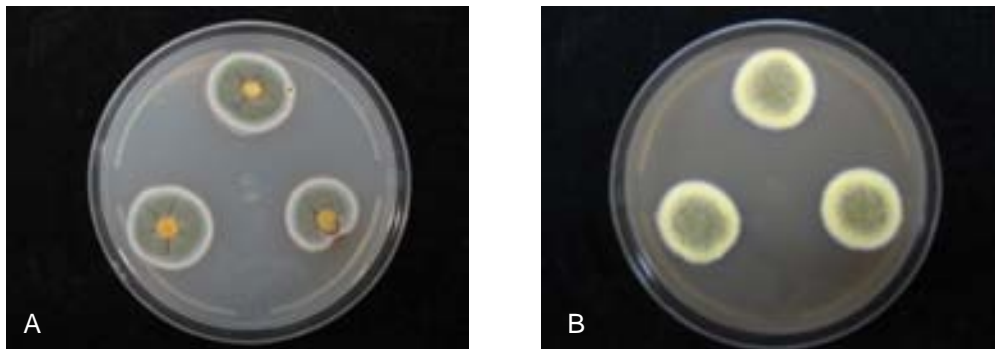


Figura 6.24. *Penicillium minioluteum* (cepa P11.17). A) CZ. B) EMA

DISCUSIÓN: La cepa P1.17 (Fig. 6.24A, B) presentó surcos profundos radiales que convergen en un centro liso en CZA a 27° C en 7 días, ligeramente umbonado y velutinoso de color anaranjado (3 A8). El diámetro en EMA fue de 20-25 mm a 27° C en 7 días; y en G25N creció de 16-18 mm de diámetro a 27° C en 7 días. No creció a 37° C en 7 días. La secuencia de la región ITS1-5.8S-ITS2 presentó un

98% de similitud con la cepa AY213674 (Tabla 6.5), por lo que se consideró coespecífica con *P. minioluteum*, y su número de acceso al GenBank es EU833222.

REFERENCIAS TAXONÓMICAS: Pitt, 1979; Pitt, 1985; Samson & Pitt, 2000; Robert *et al.*, 2005.

20. *Penicillium raistrickii* Smith 1933 Trans. Brit. Mycol. Soc. 18: 90 – Neotipo (Pitt, 1980): No. 40221 (IMI).

Subgénero *Furcatum* Pitt

SINONIMIA: *Penicillium castellae* Quintan. 1982 (LEG; MB276069)

DIAGNOSIS: **CZA**: Diámetro de la colonia de 35-45 mm a 25° C en 7 días. La colonia es plana excepto por áreas con surcos ligeros, o umbonada en el centro. La textura varía de moderada a densamente flocosa. Micelio de color blanco y a veces amarillo pálido (1-3A3). Esclerocios usualmente abundantes. Conidios en masa con crecimiento abundante, algunas veces moderado, confinado en zonas centrales, de color verde opaco (26-27D3) o azul verdoso. Exudado usualmente presente de color claro, en ocasiones abundante. Pigmento soluble ausente. Reverso pálido, amarillo o marrón.

CZA 5° C: Puede o no germinar, con un diámetro de 2-4 mm.

CZA 37° C: No crece.

Características microscópicas: Conidióforos de pared gruesa y rugosa de 300-500x3-4 µm, con penicilios biverticilados. Métulas hinchadas o en forma de clava de 12-15x3-3.5 µm, en ocasiones de pared rugosa, en verticilos divergentes de 3-5. Fiálides acerosas-ampuliformes de 7-9x2.2-3 µm, con collar angosto, de 5-8 por métula. Conidios esféricos a subesféricos de 2.0-3.0x2-2.5 µm, de pared lisa, en columnas divergentes largas.

EMA: Diámetro de la colonia de 40-45 mm a 25° C en 7 días, pero ocasionalmente menor, 30 mm. La colonia es plana extensa con textura velutinosa a moderadamente flocosa. Micelio blanco a amarillo claro (3-4A3-4). Esclerocios generalmente abundantes. Conidios en masa con crecimiento abundante de color similar al presentado en CZA. Ocasionalmente produce exudado de color marrón rojizo. Pigmento soluble ausente. Reverso pálido o amarillo marrón.

G25N: Diámetro de la colonia de 18-26 mm a 25° C en 7 días. La colonia es plana o con surcos ligeros radiales, a menudo flooso en el centro. Micelio blanco. Conidios con crecimiento moderado a abundante, con color similar al presentado en CZA. Esclerocios, exudado y pigmento soluble ausentes. Reverso pálido.

DISCUSIÓN: La cepa P11.10 (Fig. 6.25A, B) presentó exudado y pigmento soluble de color rojo (11C8) en CZA a 27° C en 7 días, el reverso fue de color rojo oscuro a negro. No creció a 5° C, pero sí a 37° C con un diámetro colonial de 18-20 mm, con textura de moderada a densamente flocosa y con

micelio blanco. No formó esclerocios. La secuencia de la región ITS1-5.8S-ITS2 presentó un 98% de similitud con la cepa DQ681338 (Tabla 6.5), por lo que se consideró coespecífica con *P. raistrickii*, sin embargo no quedó depositada en GenBank, hasta evaluar de nuevo sus características de crecimiento en los diferentes medios y su secuencia de bases.

REFERENCIAS TAXONÓMICAS: Pitt, 1979; Pitt, 1985; Samson & Pitt, 2000; Robert *et al.*, 2005

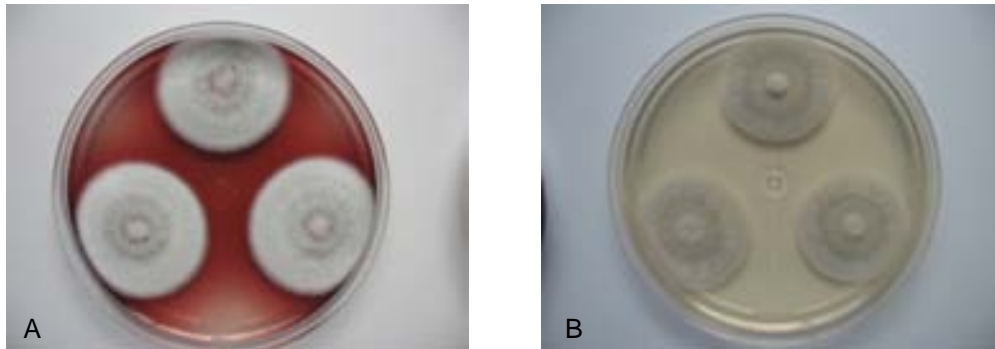


Figura 6.25. *Penicillium raistrickii* (cepa P11.10). A) CZ. B), EMA.

21. *Penicillium roseopurpureum* Dierckx 1901 Ann. Soc. Sci. Bruxelles 25: 86– Neotipo (Pitt, 1980): No. 40573 (IMI).

Subgénero *Aspergilloides* Dierckx

SINONIMIA: *Penicillium carminoviolaceum* Dierckx 1901 (LEG; MB213447)

Citromyces sanguifluus Sopp 1912 (LEG; MB213447)

Citromyces cesiae Bainier & Sartory 1913 (LEG; MB213447)

Penicillium cesiae (Bainier & Sartory) Biourge 1923 (LEG; MB213447)

Penicillium sanguifluum (Sopp) Biourge 1923 (LEG; MB213447)

Penicillium vaccaeorum Quintan. 1977 (LEG; MB213447)

DIAGNOSIS: **CZA**: Diámetro de la colonia de 12-20 mm a 25° C en 7 días. Colonia con surcos radiales o convoluta, con textura velutinosa. Micelio de color gris anaranjado (5B3) o ante. Conidios en masa con crecimiento ausente o ligero de color gris pálido. Exudado producido en algunos aislamientos, de color marrón rojizo (9C7). Pigmento soluble generalmente producido de color rojo, anaranjado o vino.

CZA 5° C: Puede germinar.

CZA 37° C: No crece.

Características microscópicas: Conidióforos de pared lisa, de 20-50x1.5-2 µm, estrictamente monoverticilados. Fiálides ampuliformes de 6-8x1.5-2 µm, de 5-8 por verticilo (en EMA más de 12). Conidios esféricos de 2.0-2.5 µm de diámetro, de pared finamente rugosa, creciendo en columnas cortas bien definidas.

EMA: Diámetro de la colonia de 10-15 mm a 25° C en 7 días. Colonia densa y velutinosa, con surcos radiales. Micelio blanco o amarillo pálido. Crecimiento de conidios en masa de ligero a moderado de color gris verdoso (26C-D2) o gris azulado. Exudado y pigmento soluble ausentes. Reverso color marrón-anaranjado.

G25N: Diámetro de la colonia de 10-15 mm a 25° C en 7 días. Colonia baja y densa, con micelio de color blanco a gris-anaranjado, a veces con pigmento soluble color marrón. Reverso pálido o anaranjado-marrón.

DISCUSIÓN: La cepa P1.36 (Fig. 6.26A, B) alcanzó 33-38 mm en EMA y 24-26 mm en G25N a 27° C en 7 días. Presentó penicilios biverticilados en igual proporción que los monoverticilados. La secuencia de la región ITS1-5.8S-ITS2 tuvo un 98% de similitud con la cepa AF455492 (Tabla 6.5), por lo que se consideró coespecífica con *P. roseopurpureum*. El número de acceso a la secuencia depositada en GenBank es EU833225.

REFERENCIAS TAXONÓMICAS: Pitt, 1979; Samson & Pitt, 2000; Robert *et al.*, 2005.

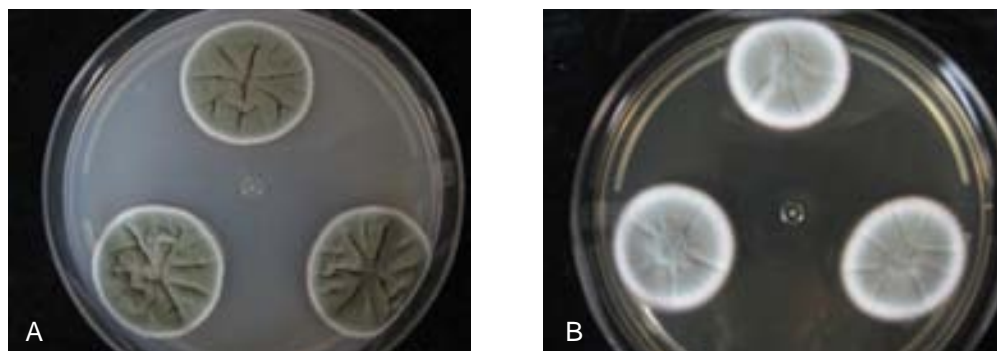


Figura 6.26. *Penicillium roseopurpureum* (cepa P1.36). A) CZ. B), G25N.

22. *Penicillium sclerotiorum* Beyma 1937 Zentralbl. Bakteriolog., 2. Abt., 96: 418 – Neotipo (Pitt, 1980): No. 40569 (IMI).

Subgénero *Aspergilloides* Dierckx

SINONIMIA: *Penicillium multicolor* Grig.-Man. & Porad. 1915 (LEG; MB277708)

Penicillium implicatum var. *aureomarginatum* Thom 1930 (LEG; MB277708)

Penicillium adametzioides S. Abe 1956 (LEG; MB277708)

Penicillium adametzioides S. Abe ex G. Sm. 1963 (LEG; MB277708)

DIAGNOSIS: **CZA:** Diámetro de la colonia de 30-40 mm a 25° C en 7 días, en ocasiones de 20-25 mm. Colonia baja a moderadamente densa, con surcos radiales, en ocasiones con anillos concéntricos o convoluta. Micelio de color blanco en el margen y amarillo-anaranjado en el centro de la colonia. Puede formar numerosos esclerocios. Conidios en masa de color gris turquesa, verde opaco o gris verdoso (24-26D2-3). Exudado limitado a abundante, de color amarillo claro, anaranjado o rojo. Pigmento soluble

generalmente producido, de color amarillo a marrón. Reverso color ámbar, amarillo o anaranjado (4-6B6 a 5-7D-F7-8).

CZA 5° C: Típicamente no germina.

CZA 37° C: No crece.

Características microscópicas: Conidióforos de 100-300x2-3.2 µm, de pared lisa a finamente rugosa, estrictamente monoverticilados. Vesículas de 4-6 µm de diámetro. Con más de 16 fiálides ampuliformes de 7-9x2.5-3 µm, por verticilo. Conidios elípticos de 2.5-3.0x2-2.5 µm, de pared lisa a finamente rugosa, en largas cadenas desordenadas o en ocasiones en columnas bien definidas.

EMA: Diámetro de la colonia de 30-40 mm a 25° C en 7 días, ocasionalmente de 25 mm. Colonia plana, baja y densa con textura flocosa, con surcos radiales o convoluta. Esclerocios ocasionalmente presentes. Conidios en masa con crecimiento moderado de color similar al presentado en CZA. Exudado ocasionalmente producido, de color anaranjado. Pigmento soluble generalmente ausente. Reverso color marrón anaranjado (8B8).

G25N: Diámetro de la colonia de 13-18 mm a 25° C en 7 días. Colonia convoluta o crateriforme en el centro. Micelio de color blanco a anaranjado. Conidios en masa con crecimiento ligero a moderado en colores similares a los presentados en CZA. Exudado anaranjado comúnmente presente. Pigmento soluble producido en ocasiones, de color amarillo a marrón. Reverso de color similar al presentado en CZA, o raramente en tonos pálidos, amarillo u olivo.

DISCUSIÓN: La cepa P1.3 (Fig. 6.27A, B) no creció en G25N y no formó esclerocios en ningún medio de cultivo. No se presentó estrictamente monoverticilado, y los conidios fueron esféricos o subesféricos. La secuencia de la región ITS1-5.8S-TIS2 presentó un 98% de similitud con la cepa AY373931 (Tabla 6.5), por lo que se consideró afín a *P. sclerotiorum*, sin embargo la secuencia no fue depositada en GenBank ya que la cepa presentó diferencias en la morfología microscópica que requieren mayor revisión.

REFERENCIAS TAXONÓMICAS: Pitt, 1979; Pitt 1985; Samson & Pitt, 2000; Robert *et al.*, 2005

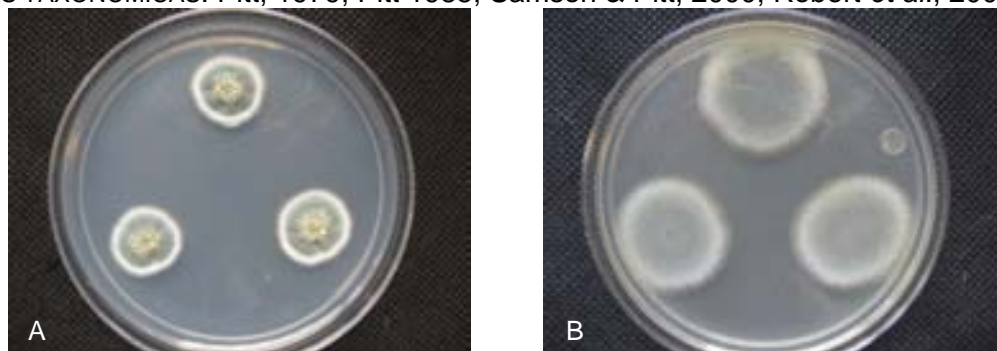


Figura 6.27. *Penicillium sclerotiorum* (cepa P1.3). A) CZ. B) EMA

23. *Penicillium steckii* Zalesky 1927 Bull. Int. Acad. Polon. Sci., Cl. Sci. Math., Sér. B, Sci. Nat. – Neotipo (Samson & Pitt, 2000): No. 40583 (IMI).

Subgénero *Furcatum* Pitt

SINONIMIAS: *Penicillium sumatrense* Szilvinyi 1936 (LEG; MB278769)

Penicillium baradicum Baghd. 1968 (LEG; MB278769)

DIAGNOSIS: **CZA:** Diámetro de la colonia de 20 mm a 25° C en 10-12 días. La colonia se presenta plana o con surcos radiales o irregulares con textura velutinosa o ligeramente fibrosa, a menudo zonada. Micelio blanco a amarillo opaco. Crecimiento de conidios en masa abundante de color verde oscuro o gris versoso. Exudado limitado a abundante en pequeñas gotas incoloras o de color amarillo claro. Reverso incoloro al principio y después amarillo u olivo en 2-3 semanas.

Características microscópicas: Conidióforos abundantes, cortos con pared lisa, que en raras ocasiones sobrepasan los 200-250x2.8-3.3 µm. Típicamente biverticilados con 3-5 métulas por verticilo, de 12-15x2.8-3 µm. Con 8-10 fiálides ampuliformes por verticilo, de 8-10x1.8-2.2 µm. Conidios de pared lisa a finamente rugosa, globosos a subglobosos de 2.0-2.5 µm de diámetro, en largas cadenas.

EMA: La colonia es más delgada, plana y estrictamente velutinosa, al principio azonada pero comúnmente zonada en las zonas marginales después de 2-3 semanas. Exudado ausente. Reverso incoloro.

G25N: La diagnosis de la especie no incluyen descripción para el medio G25N, ni para CZA a 5° C y 37° C. (Robert *et al.*, 2005).

DISCUSIÓN: La cepa P1.12 (Fig 6.28A, B) presentó penicilios monoverticilados en igual o mayor proporción que biverticilados y algunos triverticilados en CZA a 27° C a los 7 días de crecimiento. La secuencia de la región ITS1-5.8S-ITS2 tuvo un 98% de similitud con la cepa DQ123666 (Tabla 6.5), por lo que se consideró coespecífica con *P. steckii*, y que fue depositada en GenBank con el número EU833226.

REFERENCIAS TAXONÓMICAS: Samson & Pitt, 2000; Robert *et al.*, 2005.

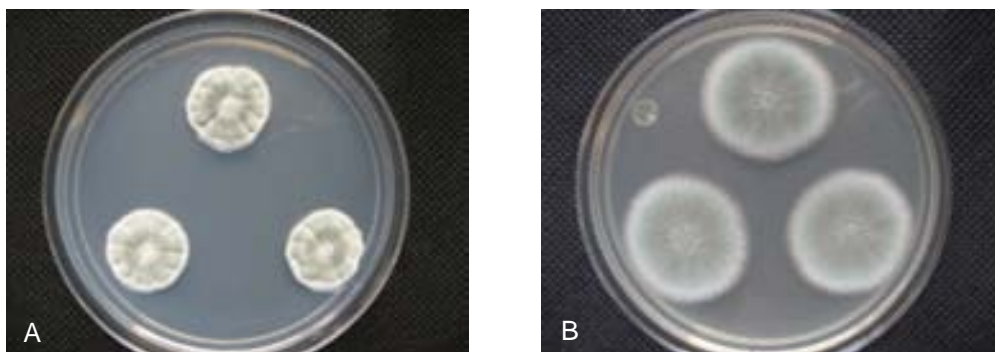


Figura 6.28. *Penicillium steckii* (cepa P1.12). A) CZ. B) EMA.

24. *Penicillium vinaceum* Gilman & Abbott 1927 Iowa State Coll. J. Sci. 1: 299 – Neotipo (Pitt, 1980): No.29189 (IMI).

Subgénero *Aspergilloides* Dierckx

DIAGNOSIS: **CZA**: Diámetro de la colonia de 20-25 mm a 25° C en 7 días. Colonia profunda, densa con textura flocosa con surcos radiales. Micelio de color gris blanco en el margen, y el resto de color gris rubí a rubí oscuro (12D5-F8). Crecimiento de conidios en masa ligero de color gris verdoso. Exudado abundante de color amarillo a rojo rubí (12D5-F8). Pigmento soluble de color amarillo a marrón. Reverso de color en tonos de vino.

CZA 5° C: No crece.

CZA 37° C: Diámetro de la colonia de 8-20 mm. La colonia es plana o con surcos radiales, con micelio gris a marrón. Conidios en masa con crecimiento ausente o ligero; a veces produce exudado y pigmento soluble color marrón. Reverso color marrón.

Características microscópicas: Conidióforos cortos, aparentemente de pared lisa, de 15-40x1.5-2.2 µm, estrictamente monoverticilados. Fiálides ampuliformes de 6-9x2-2.5 µm, con 4-8 por verticilo. Conidios esféricos a elípticos de 2.0-3.0 µm de diámetro, de pared lisa, en cadenas desordenadas cortas.

EMA: Diámetro de la colonia de 12-25 mm a 25° C en 7 días. Colonia plana, densa, con textura flocosa, a menudo con la superficie convexa. Micelio de blanco en el margen, el resto de color ante o marrón. Crecimiento de conidios en masa de ligero a moderado de color gris verdoso (26-27D2) o azul verdoso. Exudado ausente o muy limitado en cantidad y no de color rubí. Pigmento soluble típicamente presente de color amarillo a marrón. Reverso de color marrón.

G25N: Diámetro de la colonia de 9-12 mm a 25° C en 7 días. Colonia plana o con surcos radiales, con textura flocosa. Micelio de color blanco. Conidios en masa con crecimiento ausente o ligero. Exudado y pigmento soluble ausentes. Reverso pálido, olivo o marrón.

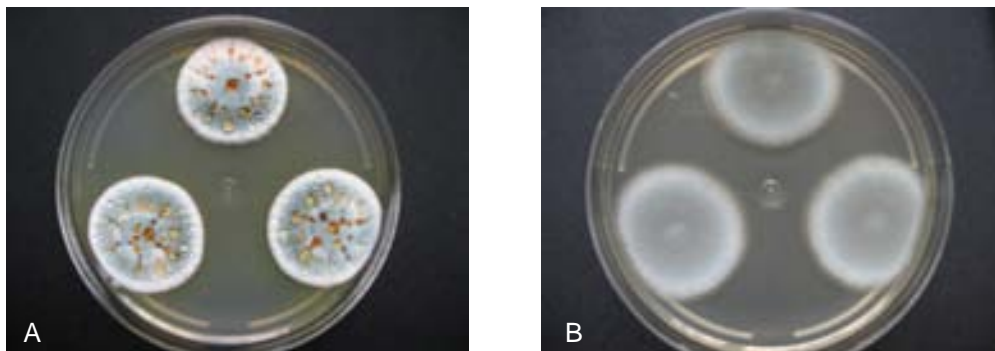


Figura 6.29. *Penicillium vinaceum* (cepa P1.12). A) CZ. B) EMA.

DISCUSIÓN: La cepa P11.5 (Fig. 6.29A, B) alcanzó 25-30 mm de diámetro en CZA y 30-35 mm en EMA a 27° C en 7. En CZA produjo pigmento soluble y exudado color amarillo y/o ámbar (3A7). La secuencia de la región ITS1-5.8S-ITS2 presentó un 99% de similitud con la cepa DQ681340 (Tabla 6.5), por lo que se consideró coespecífica con *P. vinaceum*. El número de acceso a la secuencia depositada en GenBank es EU833227.

REFERENCIAS TAXONÓMICAS: Pitt, 1979; Samson & Pitt, 2000; Robert *et al.*, 2005.

Levaduras. Ascomicetes

25. *Candida catenulata* Diddens & Lodder 1942 Die anaskosporogenen Hefen, II Hälfte: 486. 1942.

Ascomycota; Saccharomycotina; Saccharomycetes; Saccharomycetales

SINONIMIA: *Candida ravautii* Langeron & Guerra 1935 (LEG; MB284767)

Blastodendron brumptii Guerra, 1935

Mycotorula brumptii (Guerra) Krasil'nikov 1954

DIAGNOSIS: **Morfología colonial y celular:** Colonia de color blanco a crema, con textura butirosa. Reproducción vegetativa por gemación. Células ovoides o cilíndricas de 1.5-4.5x4-12 µm, se encuentran aisladas, en pares y en cadenas. Presenta pseudohifas simples a complejas. No presenta reproducción sexual.

Caracterización fisiológica: La diagnosis de las pruebas de crecimiento, fermentación y asimilación de la base de datos del CBS se registran en la tabla 6.7A.

DISCUSIÓN: La cepa L2.1 (Fig. 6.30), cuyas características morfológicas se indican en la tabla 6.6A, presentó 98.80% de similitud en la taxonomía polifásica con la base CBS. Asimiló arbutina, pero no asimiló citrato (Tabla 6.7A). La secuencia del dominio D1/D2 del gene 26S ARNr tuvo 100% de similitud con la cepa AY242295 (Tabla 6.5), y el número de acceso a la secuencia depositada en GenBank es EU833228.

REFERENCIAS TAXONÓMICAS: Kurtzman & Fell, 1998; Barnett, *et al.*, 2000; Robert *et al.*, 2005.



Figura 6.30. *Candida catenulata* (cepa L2.1), GELPA.

26. *Naumovia dairenensis* (Naganishi) Kurtzman 2003 FEMS Yeast Research 4(3): 241.

Ascomycota; Saccharomycotina; Saccharomycetes; Saccharomycetales; Saccharomycetaceae

SINONIMIA: *Saccharomyces dairenensis* Nagan. 1917 (LEG; MB487620)

DIAGNOSIS: **Morfología colonial y celular:** Colonia de color blanco a crema, con textura butirosa. Reproducción vegetativa por gemación. Células globosas, ovoides o alargadas de 3.0-5.5x3.5-7 μm , aisladas o en pares. Presenta pseudohifas simples a complejas. En medio McClary forma ascas persistentes con hasta cuatro ascosporas redondas de pared lisa. Aislada de p ersimo seco (*Diospyros* sp.)

Caracterización fisiológica: La diagnósis de las pruebas de crecimiento, fermentación y asimilación de la base de datos del CBS se registran en la tabla 6.7A.

DISCUSIÓN: Las cepas L3.2 y L3.3 (Figs. 6.31A, B), cuyas características morfológicas se indican en la tabla 6.6A, presentaron 99.20% de similitud en la taxonomía polifásica al comparar con la base de datos CBS. Ambas cepas crecieron a 37 y 40  C. La cepa L3.2 s  creció en glucosa 50%, pero la cepa L3.3 no (Tabla 6.7A). La secuencia del dominio D1/D2 del gene 26S ARNr de ambos aislados tuvo un 98% de similitud con la cepa AY048168 (Tabla 6.5), por lo que se les consideró coespecíficas con *N. dairenensis*. El número de acceso a la secuencia depositada en GenBank es EU833231.

REFERENCIAS TAXONÓMICAS: Kurtzman & Fell, 1998; Barnett, *et al.*, 2000; Robert *et al.*, 2005.

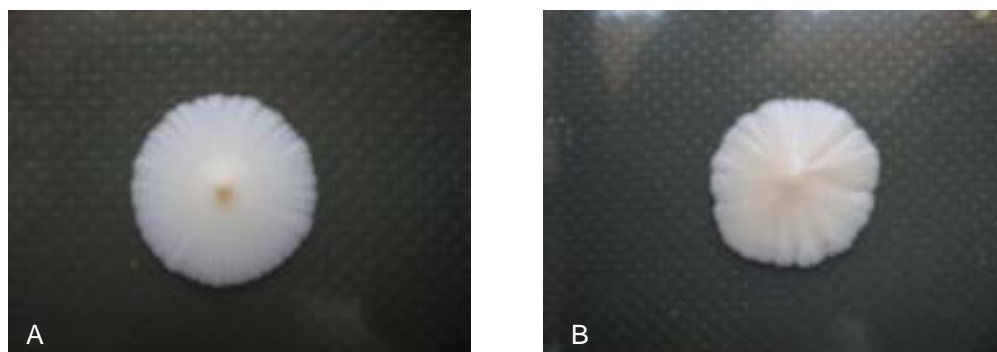


Figura 6.31. *Naumovia dairenensis* A (cepa L3.2). B (cepa L3.3), GELPA.

27. *Pichia guilliermondii* Wicherham 1966 Journal of Bacteriology 92: 1269.

Ascomycota; Saccharomycotina; Saccharomycetes; Saccharomycetales; Saccharomycetaceae.

SINONIMIA: *Yamadazyma guilliermondii* (Wick.) Billon-Grand 1989 (LEG; MB337010)

Endomycopsis guilliermondii Wick. & Burton 1954 (LEG; MB337010)

Endomyces lacteus Castell. 1912 (LEG; MB337010)

Endomyces lacticolor Castell. 1912 (LEG; MB337010)

DIAGNOSIS: **Morfología colonial y celular:** Colonia de color blanco a crema, con textura butirosa. Reproducción vegetativa por gemación. Células ovoides o alargadas de 1.5-4.8x2.0-15.0 μm , aisladas, en pares o en cadenas cortas. Puede presentar pseudohifas

complejas. Levadura heterotálica, que después de la conjugación entre dos células, forma ascas evanescentes con hasta cuatro ascosporas con forma de sombrero. Su anamorfo es *Candida guilliermondii*

Caracterización fisiológica: La diagnosis de las pruebas de crecimiento, fermentación y asimilación de la base de datos del CBS se registran en la tabla 6.7A.

DISCUSIÓN: La cepa L3.1 (Fig. 6.32), cuyas características morfológicas se indican en la tabla 6.6A, presentó 99.70% de similitud en la taxonomía polifásica con la base de datos del CBS (Tabla 6.7A). La secuencia del dominio D1/D2 del gene 26S ARNr tuvo 100% de similitud con la cepa EU182216 (Tabla 6.5), y fue depositada en GenBank con el número EU833236.

REFERENCIAS TAXONÓMICAS: Kurtzman & Fell, 1998; Barnett, *et al.*, 2000; Robert *et al.*, 2005.



Figura 6.32. *Pichia guilliermondii* (cepa L3.1), GELPA.

Tabla 6.6A. Morfología colonial y celular de las especies de levaduras obtenidas en el presente estudio. (Ascomicetes).

Morfología	<i>C. catenulata</i> 2.1	<i>N. dairenensis</i> 3.2	<i>P.guilliermondii</i> 3.1
Margen de la colonia	otro ^c /entero	otro/ondulado	otro/entero
Color de la colonia	blanco/crema	blanco/ crema	blanco/crema
Apariencia de la colonia	Lisa	lisa	lisa
Textura de la colonia	Butirosa	butirosa	butirosa
Presencia de filamentos	pseudo- hifa	sin hifa	pseudo- hifa
Reproducción asexual	gemación multilateral	gemación multilateral	gemación multilateral
Forma de la célula	ovalada/cilíndrica	redonda/ovalada	ovalada/cilíndrica
Forma del asca	sin asca	No con forma de clava	sin asca
Forma del ascospora	-	globosa	-

^cLa categoría de *otro* se le dio a las cepas que presentaron margen de la colonia diferente a las categorías que se presentan en la base de identificación polifásica del CBS.

Tabla 6.7.A.Comparación de las pruebas de fermentación, asimilación y crecimiento con las diagnosis de las especies en la base de datos del CBS. (Ascomicetes). (+) positivo, (-) negativo, (w) débil, (d) retrasado, (v) variable, (*) diferencias.

Pruebas	<i>C. catenulata</i>		<i>N. dairenensis</i>		<i>P. guilliermondii</i>	
	2.1	CBS	3.2	CBS	3.1	CBS
Fermentación de glucosa	w	w	+	+	+	w,d
Asimilación						
Glucosa	+	+	+	+	v	+
D-galactosa	+	+	+	+	v	+
L-sorbosa	-	-	-	-	-	-,+
D-glucosamina	+	-,+	-	-	-	w,d,+
D-ribosa	-	w,d,-	-	-	v	w,d,+
D-xilosa	v	-,+	-	-	+	+
L-arabinosa	-	-	-	-	v	-,+
L-ramnosa	-	-	-	-	-	-,+
Sacarosa	-	-	-	-	v	+
Maltosa	v	-,+	-	-	+	w,d,+
Celobiosa	-	-	-	-	v	-,+
Salicina	-	-	-	-	+	-,+
Arbutina	+*	-	-	-	+	-,+
Melibiosa	-	-	-	-	v	-,+
Lactosa	-	-	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-	v	w,d,+
Melezitosa	-	-	-	-	v	-,+
Inulina	-	-	-	-	-	-,+
Almidón	-	-,+	-	-	+	w,d,-
Glicerol	+	-,+	-	-	v	w,d,+
Eritritol	-	-	-	-	v	-
Ribitol	+	-,+	-	-	v	w,d,+
Xilitol	-	-	-	-	+	w,d,+
D-manitol	+	-,+	-	-	v	-,+
Inositol	-	-	-	-	v	-
D-glucono-1,5-lactona	v	w,d,-	+	W,d,+	+	-,+
2-ceto-D-gluconato	v	-,+	-	-	v	+
D-gluconato	-	w,d,-	-	-	v	-,+
D-glucuronato	-	-	-	-	-	-
D-L-lactato	+	+	-	-	v	-,+
Succinato	+	w,d,+	-	-	+	w,d,+
Citrato	-*	+	-	-	+	+
Palatinosa	v	?	-	?	v	?
Levulinato	-	?	-	?	v	?
KNO3	-	-	-	-	-	-
NaNO2	-	-	-	-	-	-,+
Etilamina	+	w,d,+	-	-	+	+
L-lisina	+	+	-	-	+	+
Creatina	-	-	-	-	v	-
Creatinina	-	-	-	-	v	-
D-Glucosamina	-	-	-	-	+	-,+
Cicloheximida 0.01%	+	+	-	W,d,+	v	w,d,+
Cicloheximida 0.1%	+	w,d,+	-	-	+	-,+
NaCl 10% + 5% glucosa	+	+	-	-	v	+
Metanol	-	-	-	-	-	-
Etanol	+	+	-	-	+	-
Formación de almidón	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de urea	-	-	-	-	+	-
DBB	-	-	-	-	v	-
Glucosa 50%	+	v	+,-*	-	+	v
25° C	+	+	+	+	+	+
30° C	+	+	+	+	+	v
37° C	+	v	+*	-	+	v
40° C	+	v	+*	-	+	v

Levaduras. Basidiomicetes

28. *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner 1950 The American Midland Naturalist 43: 249.

Basidiomycota; Hymenomyces; Tremellales; Tremelalles mitospórico

SINONIMIA: *Torula laurentii* Kuff. 1920 (LEG; MB296158)

Torulopsis laurentii (Kuff.) Lodder 1934 (LEG; MB296158)

Rhodotorula laurentii (Kuff.) T. Hasegawa et al. 1960 (LEG; MB296158)

Rhodotorula nitens Mackenzie & Auret 1963 (LEG; MB296158)

DIAGNOSIS: **Morfología colonial y celular:** Colonia de color crema, amarillo, rosa o tostado, con textura de mucoide a butirosa. Reproducción vegetativa por gemación. Células esféricas, ovoides o alargadas de 2.0-5.5x3.0-7.0 μm , aisladas, en pares o en cadenas cortas de tres o cuatro células. Puede presentar pseudohifas simples y/o hifas septadas. No presenta reproducción sexual.

Caracterización fisiológica: La diagnosis de las pruebas de crecimiento, fermentación y asimilación de la base de datos del CBS se registran en la tabla 6.7B.

DISCUSIÓN: La cepa L2.2 (Fig. 6.33), cuyas características morfológicas se indican en la tabla 6.6B, presentó 98.80% de similitud en la taxonomía polifásica de la base de datos del CBS, y no presentó diferencias en las 68 pruebas analizadas (Tabla 6.7B). La secuencia del dominio D1/D2 del gene 26S ARNr presentó 100% de similitud con la cepa AJ555467 (Tabla 6.5), y el número de acceso a la secuencia depositada en GenBank es EU833229.

REFERENCIAS TAXONÓMICAS: Kurtzman & Fell, 1998; Barnett, et al., 2000; Robert et al., 2005.



Figura 6.33. *Cryptococcus laurentii* (cepa L2.2), GELPA.

29. *Cryptococcus randhawii* Khan & Ahmad (no publicado).

Basidiomycota; Hymenomyces; Tremellales; Tremelalles mitospórico

DIAGNOSIS: No existe descripción morfofisiológica de la especie. Los autores únicamente la caracterizaron genotípicamente (Khan & Ahmad, 2005, en: Robert et al., 2005). La especie fue aislada de *Ficus religiosa* en Mahdir Marg, Nueva Delhi, India. La

descripción de la morfología colonial y celular de la cepa L3.4 obtenida en este estudio se indica en la tabla 6.6C y la descripción de su fisiología en la tabla 6.7C.

DISCUSIÓN: La secuencia del dominio D1/D2 del gene 26S ARNr de la cepa L3.4 (Fig. 6.34) presentó 100% de similitud con la cepa AJ876599 (Tabla 6.5), y fue depositada en GenBank con el número EU833230.

REFERENCIAS TAXONÓMICAS: Robert *et al.*, 2005.



Figura 6.34. *Cryptococcus randhawii* (cepa L3.4), GELPA.

30. *Trichosporon chiropterorum* Sugita, Takshima & Kikuchi (no publicado).

Basidiomycota; Agaricomycotina; Tremellomycetes; Tremellales

DIAGNOSIS: No existe descripción morfofisiológica de la especie. Los autores únicamente la caracterizaron genotípicamente (Sugita, 2004, *en*: Robert *et al.*, 2005). Fue aislada de guano de murciélago en cueva de Nishitama-gun, Tokio, Japón. La descripción de la morfología colonial y celular de la cepa L11.1 obtenida en este estudio se indica en la tabla 6.6C y la descripción de su fisiología en la tabla 6.7C.

DISCUSIÓN: La secuencia del dominio D1/D2 del gene 26S ARNr de la cepa L11.1 (Fig. 6.35) presentó 98% de similitud con la cepa AB180197 (Tabla 6.5), por lo que se le consideró coespecífica de *T. chiropterorum*, y está depositada en GenBank con el número EU833232.

REFERENCIAS TAXONÓMICAS: Robert *et al.*, 2005.



Figura 6.35. *Trichosporon chiropterorum* (cepa L11.1), GELPA.

31. *Trichosporon laibachii* (Windisch) Guého & Smith 1992 Hoog, Billon-Grand, Christen, Batenburg-van de Vegte, Antonie van Leeuwenhoek 61(4): 302.

Basidiomycota; Agaricomycotina; Tremellomycetes; Tremellales

SINONIMIA: *Endomyces laibachii* Windisch 1965 [LEG; MB361472]

Trichosporon loubieri var. *laibachii* (Windisch) Shinoda & Sugita 1994 [LEG; MB361472]

Trichosporum multisporum G. Cochet 1940 [LEG; MB361472]

Trichosporon cutaneum var. *multisporum* (Cochet) Lodder & Kreger-van Rij 1952 [LEG; MB361472]

DIAGNOSIS: **Morfología:** Colonia color crema o beige, con textura membranosa, seca y finamente farinosa. Reproducción vegetativa por gemación. Sus conidios son esféricos de 4 µm de diámetro. Presenta hifas septadas y arthroconidios. No presenta reproducción sexual. Se ha aislado de suelos y heces de rata.

Caracterización fisiológica: La diagnosis de las pruebas de crecimiento, fermentación y asimilación de la base de datos del CBS se registran en la tabla 6.7B.

DISCUSIÓN: Se obtuvieron dos aislados de la misma especie. La cepa L8.6 (Fig 6.36A), aislada de M3, presentó 98.60% de similitud en la taxonomía polifásica con la base de datos del CBS. No asimiló arbutina, glicerol ni metanol y creció a 37° C (Tabla 6.7B). La cepa L11.2 (Fig. 6.36B), aislada de M4, tuvo 99.80% de similitud en CBS sin diferencias con las pruebas analizadas. Las características morfológicas de las dos cepas se indican en la tabla 6.6B. Ambas cepas presentaron aspecto colonial ligeramente diferente. La secuencia del dominio D1/D2 del gene 26S ARNr de las cepas L8.6 y L11.2, presentaron 100 y 99%, respectivamente, de similitud con la cepa AF075514 registrada en GenBank (Tabla 6.5), y están depositadas en dicho banco con los números EU833233 y EU833234 respectivamente.

REFERENCIAS TAXONÓMICAS: Kurtzman & Fell, 1998; Barnett, *et al.*, 2000; Robert *et al.*, 2005.

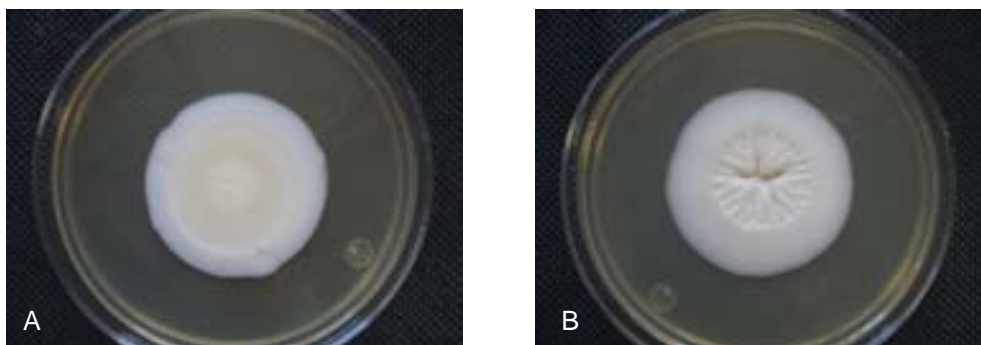


Figura 6.36. *Trichosporon laibachii* A(cepa L8.6). B(cepa L11.2), GELPA.

32. *Trichosporon shinodae* Sugita, Takshima & Kikuchi (no publicado).

Basidiomycota; Agaricomycotina; Tremellomycetes; Tremellales

DIAGNOSIS: No existe descripción morfofisiológica de la especie. Los autores únicamente la caracterizaron genotípicamente (Sugita, 2004, *en*: Robert *et al.*, 2005). Fue aislada de guano de murciélago en cueva de Nishitama-gun, Tokio, Japón. La descripción de la morfología colonial y celular de la cepa L11.11 obtenida en este estudio se indica en la tabla 6.6C y la descripción de su fisiología en la tabla 6.7C.

DISCUSIÓN: La secuencia del dominio D1/D2 del gene 26S ARNr de la cepa L11.11 (Fig. 6.37) presentó 100% de similitud con la cepa AB180201 (Tabla 6.5) registrada en GenBank, y está despositada en dicho banco con el número EU833235.

REFERENCIAS TAXONÓMICAS: Robert *et al.*, 2005.



Figura 6.37. *Trichosporon shinodae* (cepa L3.1), GELPA.

33. *Trichosporon sp.*

Basidiomycota; Agaricomycotina; Tremellomycetes; Tremellales

DIAGNOSIS: La descripción de la morfología colonial y celular de la cepa L11.4 obtenida en este estudio se indica en la tabla 6.6C y la descripción de su fisiología en la tabla 6.7C.

DISCUSIÓN: La secuencia del dominio D1/D2 del gene 26S ARNr de la cepa L11.4 (Fig 6.38) presentó porcentajes muy bajos de similitud (94%) con la cepa AB164372 (Tabla 6.5) y otras especies de *Trichosporon* registradas en GenBank.

REFERENCIAS TAXONÓMICAS: Robert *et al.*, 2005.



Figura 6.38. *Trichosporon sp.* (cepa L11.1), GELPA.

Tabla 6.6B. Morfología colonial y celular de las especies de levaduras obtenidas en el presente estudio. (Basidiomicetes).

Morfología	<i>C. laurentii</i>	<i>T. laibachii</i>	
	2.2	8.6	11.2
Margen de la colonia	otro ^d /entero	otro/entero	otro/entero
Color de la colonia	amarillo/ rosa/ anaranjado	blanco	Blanco
Apariencia de la colonia	Lisa	lisa/ harinosa	lisa/ harinosa
Textura de la colonia	mucoide/ butirosa	butirosa/ membranosa	butirosa/ membranosa
Presencia de filamentos	Pseudohifa	hifa septada y pseudohifa	hifa septada y pseudohifa
Reproducción asexual	Gemación	gemación/ artroconidios	Gemación/ artroconidios
Forma de la célula	redonda/ ovalada/ cilíndrica	redonda/ ovalada/ cilíndrica	redonda/ ovalada/ cilíndrica
Forma del asca	sin asca	sin asca	sin asca
Forma del ascospora	-	-	-

^dLa categoría de *otro* se le dio a las cepas que presentaron margen de la colonia diferente a las categorías que se presentan en la base de identificación polifásica del CBS.

Tabla 6.6C. Morfología colonial y celular de las especies obtenidas en el presente estudio. (Basidiomicetes sin diagnóstico publicada).

Morfología	<i>C. randhawii</i>	<i>T. chiropterorum</i>	<i>T. shinodae</i>	<i>Trichosporon sp.</i>
	3.4	11.1	11.11	11.4
Margen de la colonia	entero	otro ^e /fimbriado	otro/lobado	otro/entero
Color de la colonia	blanco/ crema/ rosa	blanco/ crema	blanco/ crema	amarillo/ crema
Apariencia de la colonia	Lisa	lisa/ harinosa	rugosa	harinosa
Textura de la colonia	butirosa/ mudoide	butirosa/ membranosa	butirosa/ membranosa	butirosa/ membranosa
Presencia de filamentos	sin hifa	hifa y pseudohifa	hifa y pseudohifa	pseudohifa
Reproducción asexual	gemación multilateral	gemación/ artro- conidios	gemación multilateral	gemación multilateral
Forma de la célula	redonda	redonda/ ovalada/ cilíndrica	redonda/ ovalada	cilíndrica/ fusiforme
Forma del asca	sin asca	sin asca	sin asca	sin asca
Forma del ascospora	-	-	-	-

^eLa categoría de *otro* se le dio a las cepas que presentaron margen de la colonia diferente a las categorías que se presentan en la base de identificación polifásica del CBS.

Tabla 6.7.B.Comparación de las pruebas de fermentación, asimilación y crecimiento con las diagnós de las especies en la base de datos del CBS. (Basidiomicetes). (+) positivo, (-) negativo, (w) débil, (d) retrasado, (v) variable, (*) diferencias.

Pruebas	<i>C. laurentii</i>		<i>T. laibachii</i>		
	2.2	CBS	8.6	11.2	CBS
Fermentación de glucosa	-	-	-	-	-
Asimilación					
Glucosa	+	+	+	+	+
D-galactosa	+	+	v	v	+
L-sorbosa	-	-,+	-	v	-,+
D-glucosamina	-	-,+	v	v	-,+
D-ribosa	-	w,d,+	+	+	+
D-xilosa	+	+	+	+	+
L-arabinosa	+	-,+	v	v	w,d,+
L-ramnosa	+	w,d,+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	v	+
Maltosa	+	+	+	v	+
Celobiosa	+	+	v	+	+
Salicina	+	w,d,+	+	+	+
Arbutina	+	w,d,+	- *	+	+
Melibiosa	+	+	v	v	+
Lactosa	+	+	v	+	+
Rafinosa	+	-,+	+	+	+
Melezitosa	+	+	-	-	-,+
Inulina	+	w,d,-	-	-	-
Almidón	+	-,+	+	+	+
Glicerol	-	-,+	- *	v	+
Eritritol	-	-,+	-	-	-
Ribitol	+	-,+	v	+	w,d,-
Xilitol	+	w,d,+	+	+	-,+
D-manitol	-	w,d,+	-	v	-,+
Inositol	v	w,d,+	+	+	+
D-glucono-1,5-lactona	+	-,+	v	+	-,+
2-ceto-D-gluconato	+	+	+	+	+
D-gluconato	+	+	v	+	+
D-glucuronato	+	+	+	+	+
D-L-lactato	-	-,+	+	v	+
Succinato	+	w,d,+	v	v	+
Citrato	-	w,d,+	v	v	+
Palatinosa	-	?	v	+	?
Levulinato	-	?	-	v	?
KNO3	-	-	-	-	-
NaNO2	-	-,+	-	-	-,+
Etilamina	+	-,+	+	+	+
L-lisina	+	-,+	+	+	+
Creatina	+	-,+	+	+	-,+
Creatinina	+	-,+	+	+	-,+
D-Glucosamina	-	-,+	+	+	+
Cicloheximida 0.01%	v	-,+	+	+	w,d,+
Cicloheximida 0.1%	+	-,+	+	v	-,+
NaCl 10% + 5% glucosa	v	-,+	-	-	-
Metanol	-	-	- *	w	+
Etanol	+	v	+	+	V
Formación de almidón	-	v	-	-	-
Hidrólisis de urea	+	+	+	+	+
DBB	+	+	+	w	+
Glucosa 50%	-	v	W	-	-
25° C	+	+	+	+	+
30° C	+	v	+	+	v
37° C	+	v	+ *	-	-
40° C	w	-	-	-	-

Tabla 6.7.C. Descripción de las pruebas de fermentación, asimilación y crecimiento de las especies obtenidas sin diagnosis en la base de datos del CBS. (Basidiomicetes). (+) positivo, (-) negativo, (w) débil, (d) retrasado, (v) variable.

Pruebas	<i>C. randhawii</i>	<i>T. chiropterorum</i>	<i>T. shinodae</i>	<i>Trichosporon sp.</i>
	3.4	11.1	11.11	11.4
Fermentación de glucosa	-	w	-	w
Asimilación				
Glucosa	+	+	+	v
D-galactosa	v	v	+	-
L-sorbosa	v	-	v	-
D-glucosamina	-	v	-	v
D-ribosa	v	-	v	v
D-xilosa	+	-	-	v
L-arabinosa	v	v	v	v
L-ramnosa	+	v	v	v
Sacarosa	+	v	+	-
Maltosa	+	-	+	v
Celobiosa	+	-	+	v
Salicina	-	+	+	+
Arbutina	+	+	+	-
Melibiosa	-	-	+	-
Lactosa	v	-	+	v
Rafinosa	+	-	+	-
Melezitosa	+	-	+	-
Inulina	-	-	-	-
Almidón	-	+	+	-
Glicerol	v	v	v	-
Eritritol	-	v	v	-
Ribitol	-	+	v	+
Xilitol	v	+	v	+
D-manitol	v	-	+	-
Inositol	v	-	+	v
D-glucono-1,5-lactona	-	+	v	+
2-ceto-D-gluconato	+	v	+	+
D-gluconato	+	v	+	+
D-glucuronato	+	v	+	v
D-L-lactato	v	v	v	v
Succinato	-	+	-	+
Citrato	-	+	-	+
Palatinosa	+	v	v	-
Levulinato	v	v	+	-
KNO ₃	-	-	-	-
NaNO ₂	-	-	-	-
Etilamina	-	+	+	+
L-lisina	-	+	v	+
Creatina	-	-	v	+
Creatinina	-	-	v	-
D-Glucosamina	-	-	v	-
Cicloheximida 0.01%	-	-	v	v
Cicloheximida 0.1%	+	-	-	+
NaCl 10% + 5% glucosa	-	-	-	-
Metanol	-	w	w	w
Etanol	w	+	+	+
Formación de almidón	-	-	-	-
Hidrólisis de urea	-	+	+	+
DBB	+	+	+	+
Glucosa 50%	-	+	-	+
25° C	+	+	+	+
30° C	+	+	+	+
37° C	+	-	-	+
40° C	+	-	-	+

6.4 DISTRIBUCIÓN DE LA DIVERSIDAD DE MOHOS Y LEVADURAS EN LA CUEVA DE LOS RISCOS Y SU PRESENCIA EN CADA MUESTRA DE SUELO.

En la figura 6.39 se señala el total de especies obtenidas en cada una de las muestras de suelo estudiadas, y en la figura 6.40 se ubica en el mapa de la Cueva de los Riscos el porcentaje de la riqueza de especies de cada género en cada uno de los sitios de muestreo. Se presentan también los sitios donde se observaron rastros de actividad humana, tales como basura, desechos orgánicos, residuos de fogatas, “graffittis” y saqueo de estactitas.

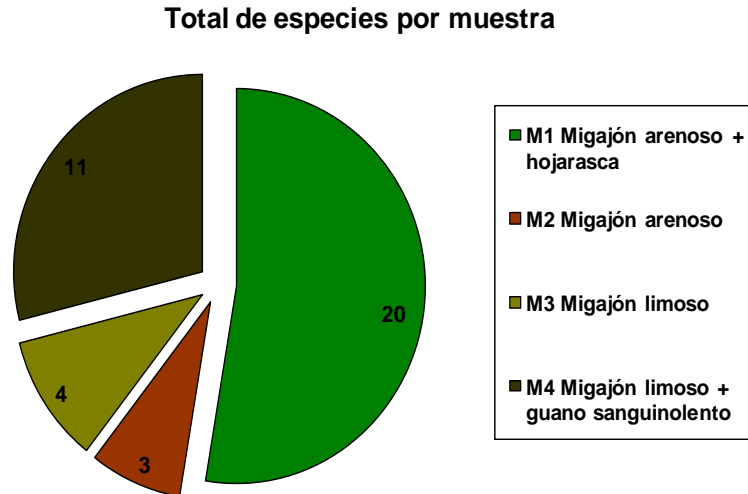


Figura 6.39 Total de especies en cada muestra de suelo estudiada. En cada cuadrante de la figura se indica el número de especies obtenidas en cada muestra (M1= Migajón arenoso + hojarasca; M2= Migajón arenoso; M3= Migajón limoso; M4= Migajón limoso + guano sanguinolento)

La muestra con más diversidad fue la M1 con 20 especies pertenecientes a seis géneros diferentes: 6 *Aspergillus*, 9 *Penicillium*, 1 *Candida*, 2 *Cryptococcus*, 1 *Naumovia* y 1 *Pichia* (Figs 6.1 y 6.2).

La muestra M4 es la que ocupa el segundo lugar en diversidad con 11 especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichosporon*, con 1, 4 y 6 especies respectivamente.

La muestra M3 está compuesta por cuatro especies que comparte con la M1, M2 y M4, de los géneros *Penicillium*, *Pichia* y *Trichosporon*, y la muestra con menor diversidad fue M2 con tres especies del género *Penicillium*;

En la figura 6.2 se puede apreciar que las muestras M1, M2 y M3 se encuentran cerca de sitios donde fueron detectados rastros de actividad humana.

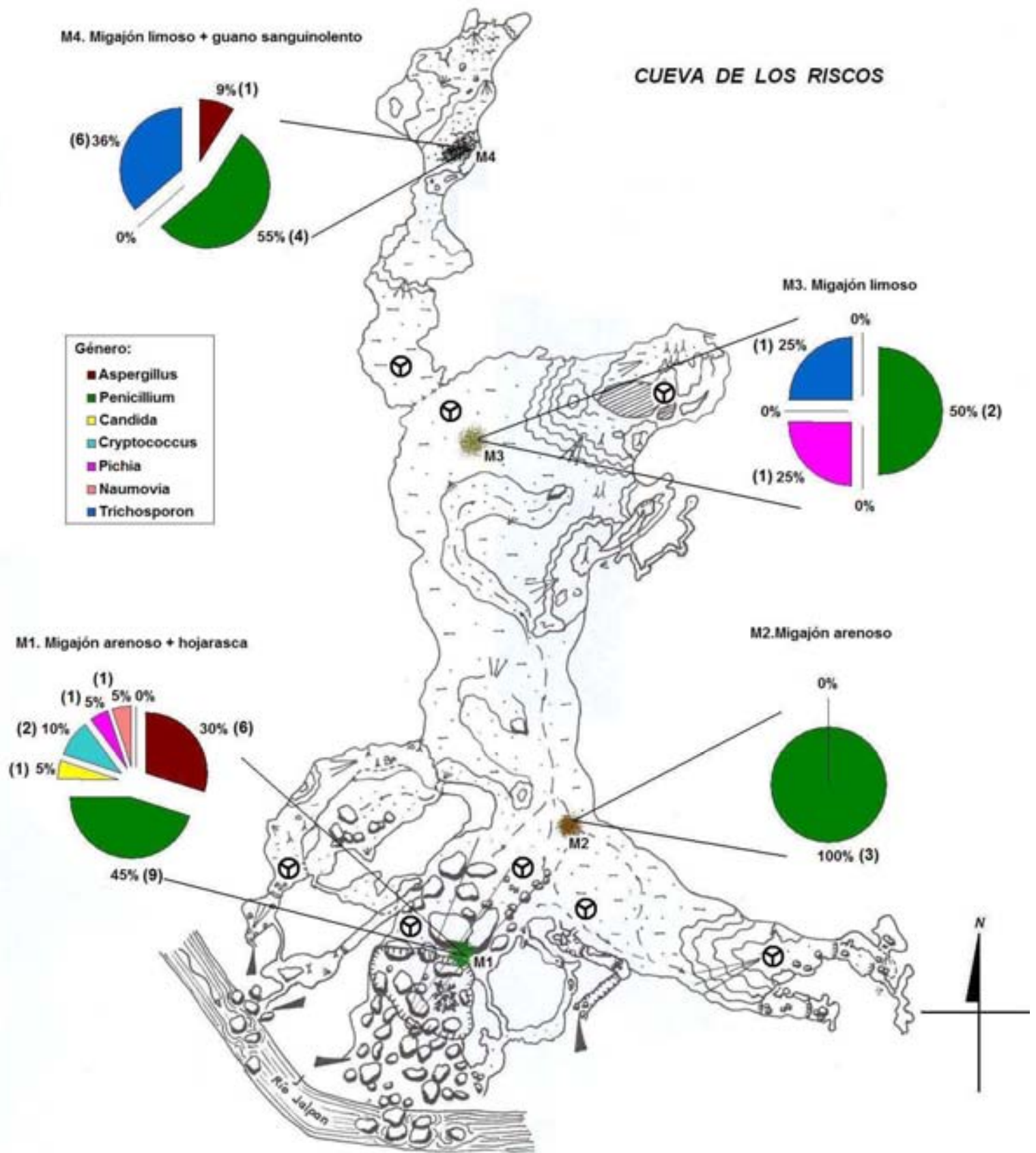


Figura 6.40. Esquema de la Cueva de los Riscos en el que se señala la distribución de la diversidad de mohos y levaduras, y el porcentaje de cada género por muestra, el número entre paréntesis es el número de especies aisladas. Los símbolos circulares representan los sitios donde fueron observados rastros de actividad humana.

6.5 COMPARACIÓN CON LAS ESPECIES REGISTRADAS EN LA LITERATURA

En la tabla 6.7 se presenta las especies encontradas en este estudio que coinciden con las registradas en otras investigaciones realizadas en diferentes sustratos dentro de diferentes cuevas.

Tabla 6.8. Especies de micromicetes registradas en el presente estudio y en otras investigaciones realizadas en diferentes cuevas del mundo.

Nombre de la especie	Autor	Localidad	Sustrato
<i>Aspergillus flavipes</i>	Orpurt, 1964	Cueva en la isla de Eleuthera, Bahamas	Suelo
<i>Aspergillus flavus</i>	Orpurt, 1964	Cueva en la isla de Eleuthera, Bahamas	Suelo
	Hoffmann <i>et al.</i> , 1986	Cueva del Diablo, Tepoztlán, Morelos, México	Suelo
	Koilraj <i>et al.</i> , 1999	Seis cuevas al sur de la India	Suelo
	Nieves Rivera, 2003	Sistema subterráneo del Río Camuy, Puerto Rico	Suelo
	Grishkan <i>et al.</i> , 2003	Cueva Saline Arubotaim, Israel	Suelo/pared
<i>Aspergillus japonicus</i>	Koilraj <i>et al.</i> , 1999	Seis cuevas al sur de la India	Suelo
<i>Aspergillus niger</i>	Volz y Ji Ping Yao, 1991	Hendrie River Water Cave, Mackinac County, Michigan	Suelo
	Koilraj <i>et al.</i> , 1999	Seis cuevas al sur de la India	Suelo
	Nieves Rivera, 2003	Sistema subterráneo Río Camuy, Puerto Rico	Suelo
	Grishkan <i>et al.</i> , 2003	Cueva salina Arubotaim, Israel	Suelo/pared
	Benoit <i>et al.</i> , 2004	Cueva Coon-in-the-Crack y Cueva Laurel, Kentucky	Cadáveres de grillos
<i>Aspergillus versicolor</i>	Orpurt, 1964	Cueva en la isla de Eleuthera, Bahamas	Suelo
	Koilraj <i>et al.</i> , 1999	Seis cuevas al sur de la India	Suelo
	Grishkan <i>et al.</i> , 2003	Cueva salina Arubotaim, Israel	Suelo/pared
	Ulloa <i>et al.</i> , 2006	9 cuevas y una huerta en Guerrero, México	Guano de murciélago
<i>Penicillium brevicompactum</i>	Grishkan <i>et al.</i> , 2003	Cueva salina Arubotaim, Israel	Suelo/pared
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Nieves Rivera, 2003	Sistema subterráneo del Río Camuy, Puerto Rico	Suelo
	Gunde-Cimerman <i>et al.</i> , 1998	Túnel artificial en Kaozlov rob, Eslovenia	Cadáveres de grillos
<i>Penicillium citrinum</i>	Grishkan <i>et al.</i> , 2003	Cueva salina Arubotaim, Israel	Suelo/pared
	Gunde-Cimerman <i>et al.</i> , 1998	Túnel artificial en Kaozlov rob, Eslovenia	Cadáveres de grillos

Tabla 6.8. Continuación.

Nombre de la especie	Autor	Localidad	Sustrato
<i>Penicillium lanosum</i>	Orpurt, 1964	Cueva en la isla de Eleuthera, Bahamas	Suelo
	Grishkan <i>et al.</i> , 2003	Cueva salina Arubotaim, Israel	Suelo/pared
	Montagna <i>et al.</i> , 2003	25 cuevas en Apulia, Italia	Guano de murciélago
	Sugita <i>et al.</i> , 2005	20 cuevas de Japón	Guano de murciélago
<i>Penicillium minioluteum</i>	Munoz, 1972 (<i>En</i> : Pitt, 1979)	Cueva en la isla Mona, Puerto Rico	Suelo
<i>Penicillium steckii</i>	Grishkan <i>et al.</i> , 2003	Cueva salina Arubotaim, Israel	Suelo/pared
	Rutherford & Huang, 1994	Cuevas en Virginia del oeste, E.U.A.	Suelo
<i>Candida catenulata</i>	Ulloa <i>et al.</i> , 2006	9 cuevas y una huerta en Guerrero, México	Guano de murciélago
<i>Candida guilliermondii</i>	Ulloa <i>et al.</i> , 2006	9 cuevas y una huerta en Guerrero, México	Guano de murciélago
<i>Cryptococcus laurentii</i>	Orpurt, 1964	Cueva en la isla de Eleuthera, Bahamas	Suelo
	Vaughan-Martini <i>et al.</i> , 2000	Grotta del Vento, Grotta di Fiume y Grotta del Santuario, Italia	Suelo
<i>Trichosporon chiropterorum</i>	Sugita, 2004 ^f	Cueva en Nishitama-gun, Tokio, Japón	Guano de murciélago
<i>Trichosporon laibachii</i>	Sugita <i>et al.</i> , 2005	20 cuevas de Japón	Guano de murciélago
<i>Trichosporon shinodae</i>	Sugita, 2004 ^f	Cueva en Nishitama-gun, Tokio, Japón	Guano de murciélago

^f La secuencia está depositada en GenBank y está registrada en CBS, la diagnosis no está publicada.

7. DISCUSIÓN

En los cuatro puntos de muestreo, la temperatura registrada es menor a la temperatura óptima reconocida para el crecimiento de la mayoría de los hongos (27° C, Herrera & Ulloa, 1990; para *Penicillium*: min 5° C, opt. 25° C, máx. 37° C (Pitt, 1979); *Aspergillus*: min. 4° C, opt. 23-26° C, máx. 45-50° C (Raper & Fennell, 1977; Santos Chona, 1999); Levaduras: min. 12° C, opt. 20-25° C, máx. 46-48° C (Phaff, 1978; Kurtzman & Fell, 1998). La temperatura es un factor importante a ser considerado en el estudio de la microbiota ya que, aunque el proceso de desarrollo puede ser normal a menores temperaturas, la tasa de crecimiento microbiano generalmente es retardada (Landolt *et al.*, 1992). Montagna *et al.* (2003) aislaron a *Cryptococcus neoformans*, *C. laurentii* y *C. albidus* de muestras de suelo de cuevas con temperatura ambiental de 12-18° C y humedad relativa de 72-81 %, por lo que estas levaduras están presentes aún en temperaturas menores a la óptima.

La humedad relativa en los sitios de muestreo (77-94.25 %) fue favorable para el crecimiento de los hongos (75-100%, Santos Chona, 1999; Ulloa *et al.*, 2006).

La luz directa puede afectar a los hongos que carecen de pigmentos (Ortiz-Villanueva & Ortiz-Solorio, 1990), sin embargo, en los sitios de muestreo de PM1 y PM2, la luz del día fue difusa, por lo que no tuvo un efecto de inhibición sobre los mismos.

El pH ligeramente ácido que se presentó en las muestras M1, M2 y M3 está relacionado con el suelo ácido típico de las zonas calcáreas, mientras que el pH ligeramente alcalino y el exceso de M.O. que presentó M4, están dados por la presencia del guano sanguinolento, ya que la sangre presenta un pH de 7.4. Algunos hongos y levaduras pueden tolerar espectros amplios de pH que van desde una acidez de 3 hasta una alcalinidad de 9 (Pitt, 1979; Kurtzman & Fell, 1998; Ulloa *et al.*, 2006).

La composición química de la roca caliza consiste principalmente de carbonatos de calcio, magnesio y potasio, y como podría esperarse en estas cuevas calcáreas, los niveles de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ en las cuatro muestras fueron elevados, situación que puede ser favorable para cualquier especie de hongo que crezca bien en ambientes ricos en calcio (Landolt *et al.*, 1992) y magnesio. En particular, se explican los niveles altos en la muestra M2 por la meteorización y la lixiviación que ocurre en PM1, desde donde se desliza el material debido a la pendiente y se deposita en PM2.

En la muestra M4 el catión predominante fue el Na⁺ debido a la alta proporción de guano sanguinolento presente en ella. La sangre presenta altos niveles de Na⁺ (135-145 meq/L) y K⁺ (3.7-5.2 meq/L)^a como resultado de su ingesta en la dieta, y su presencia en el guano de los murciélagos hematófagos está dada por el filtrado a través del riñón, su salida por la orina y algo también se pierde por las heces (o el guano) y el sudor.

^a Intervalo normal para los niveles de sodio y potasio en la sangre humana. No se obtuvieron datos de los niveles de estos cationes en sangre de murciélagos u otros mamíferos.

A diferencia de lo señalado por Ulloa *et al.* (2006) en la cueva del Ramal del Infierno, donde el pH ácido del guano está relacionado con el alto contenido de M.O., en este estudio se determinó que el pH de la muestra M4 es alcalino debido al alto contenido de sangre, ya que ésta presenta pH de 7.4 normalmente, y al proceso de carbonatación. En la muestra M2 las altas concentraciones de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ no están relacionadas con pH alcalino.

La mayoría de los hongos mitospóricos aislados en este estudio fueron micromicetes saprobios, y algunos de ellos estaban presentes como esporas o creciendo como micelio sobre los diferentes sustratos dentro de la cueva (Fig 5.3 A-D). La elección de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* en este trabajo se debió al interés en conocer su incidencia en los diferentes sustratos de la cueva estudiada, dadas sus características cosmopolitas, ubicuas, toxígenas y su importancia médica e industrial.

La mayoría de los aislamientos se obtuvieron durante los primeros días (4-6) de incubación de las placas de diferentes medios de cultivo, lo que indica que una gran parte de las especies aisladas son de crecimiento rápido (Herrera & Ulloa, 1990). No obstante, la observación de las placas se continuó hasta completar los 30 días con la finalidad de aislar los hongos que presentaban un crecimiento más lento, (tales como algunas las levaduras) y de esa manera obtener mayor fidelidad de los resultados de riqueza de especies.

Penicillium fue el género dominante en la Cueva de los Riscos. Puede explicarse que *Aspergillus* no sea tan abundante ni diverso debido a la temperatura templada registrada dentro de la cueva, ya que *Aspergillus* por lo general es un género afín a zonas cálidas. Las levaduras más abundantes fueron los basidiomicetes del género *Trichosporon*.

Aspergillus aculeatus fue aislada de la muestra de migajón arenoso con hojarasca (M1). Esta especie ha sido aislada también de suelos tropicales (Raper & Fennell, 1977) y de raspado de lengua de un paciente con enfermedad respiratoria (Robert *et al.*, 2005). No hay registros previos de esta especie en sustratos de cuevas, siendo este el primer registro a nivel mundial en sustratos cavernícolas.

Aspergillus sp., afín a *flavipes* se aisló de M1. *A. flavipes* es una especie ubicua que ha sido aislada previamente de muestras de suelo de Haití (Robert *et al.*, 2005), de suelos tropicales (Raper & Fennell, 1977), y de suelo alcalino de cuevas en las Bahamas (Orpurt, 1964) (Tabla 6.8). Se encuentra relacionada con aspergilosis cutánea y osteomielitis, por lo que representa un riesgo para personas con sistema inmunológico debilitado. Será necesario repetir la secuencia de bases de la región ITS1-5.8S-ITS2 de su ADN y las observaciones morfofisiológicas de la cepa aislada en este estudio para determinar que se trata de una nueva especie.

Aspergillus flavus fue aislada de la muestra M1. Esta especie tiene una distribución ubicua, siendo más común en regiones subtropicales; se presenta normalmente como saprobio en el suelo y en muchos tipos de materia orgánica (Robert *et al.*, 2005), ha sido aislada de suelos de bosque,

suelos cultivados, semillas, pan y alimentos almacenados en general, también de zonas extremas como en suelos de sureste de Alaska, de lagos congelados y de excretas de animales del ártico, y en zonas extremadamente secas en Chile, entre otros (Robert *et al.*, 2005). Su distribución en el suelo parece no estar limitada por el pH o la profundidad del mismo. Ha sido también aislada de suelo alcalino de una cueva en las Bahamas (Orpurt, 1964), de suelo de cuevas de origen volcánico y calcáreo en México (Hoffmann *et al.*, 1986), de suelo de cuevas de la India (Koilraj *et al.*, 1999), de suelo de cuevas calcáreas de Puerto Rico (Nieves Rivera, 2003), y de suelo y pared de una cueva calcárea-salina en Israel (Grishkan *et al.*, 2003) (Tabla 6.8), por lo que en este estudio se sugiere que sea considerada como especie troglófila. Esta especie se encuentra relacionada con casos de aspergilosis en los bronquios, pulmones, piel, uñas, ojos, oídos, hígado y cerebro, provoca sinusitis micóticas, endocarditis, y produce aflatoxinas que pueden tener efectos cancerígenos en quien las consume (Robert *et al.*, 2005), por lo que representa un riesgo para personas con sistema inmunocomprometido.

Aspergillus japonicus se aisló de la muestra M1. Ha sido aislado de suelo de Panamá, Costa Rica, Japón, India, Bahamas, Tahití, Pakistán, Brasil, Turquía y Sudáfrica. Frecuentemente ha sido obtenido a partir de suelo de bosque, suelos cultivados y no cultivados, hojarasca, helechos, trigo y de alimentos almacenados (Robert *et al.*, 2005), y también se ha aislado de suelo de cuevas al sur de la India (Koilraj *et al.*, 1999) (Tabla 6.8). Esta especie está relacionada con casos de otitis en humanos (Robert *et al.*, 2005).

Aspergillus niger fue aislada de la muestra M1. Esta especie es ubicua y saprobia, se encuentra distribuida en suelos y en vegetación principalmente, se puede encontrar en suelos glaciares y desérticos, en hojarasca, granos, semillas, frutos y otros alimentos, en excretas de conejo y aves, y en un gran número de sustratos orgánicos. Puede ser un gran competidor. Se considera más un invasor del suelo que un habitante del suelo. (Robert *et al.*, 2005), y es un contaminante de varios sustratos tales como alimento y especias secadas al sol. Se ha aislado de suelo y sedimentos de una cueva en E.U.A. (Volz & Ji Ping Yao, 1991), de suelo de cuevas al sur de la India (Koilraj *et al.*, 1999), de suelo de cuevas calcáreas en Puerto Rico (Nieves Rivera, 2003), de suelo y pared de una cueva calcárea-salina en Israel (Grishkan *et al.*, 2003), y de cadáveres de grillos cavernícolas en cuevas de E.U.A (Benoit *et al.*, 2004) (Tabla 6.8), por lo que en este estudio se sugiere que sea considerada como especie troglófila. Está relacionado con aspergilosis en pulmones, piel, ojos y oídos, sinusitis micóticas, peritonitis y endocarditis, provoca micetomas en pies y oídos, por lo que puede representar riesgo para personas con sistema inmunológico comprometido.

Aspergillus pseudotamarii fue aislada de la muestra M1. Ha sido aislado de suelo de campo de té (*Camellia sinensis*) en Japón y también de suelo de Argentina, pero no de sustratos cavernícolas, siendo este el primer registro a nivel mundial para estos ambientes. La especie produce micotoxinas: ácido ciclopiazónico, ácido kójico y aflatoxina B1 y B2 (Ito *et al.*, 2001), estos últimos son

cancerígenos naturales y se considera que pueden ser mutágenos, teratógenos y hepatotóxicos (Santos Chona, 1999). La ruta más conocida de exposición de aflatoxinas para humanos y animales es a través de la dieta, pero existe evidencia de que las aflatoxinas pueden entrar por vía respiratoria siendo inhaladas como partículas de polvo y provocando casos agudos y crónicos de intoxicación (Santos Chona, 1999). En caso de presentarse dicha intoxicación, el blanco principal es el hígado, pero puede causar daño en la vesícula, en el sistema nervioso, sistema inmune o sistema reproductivo, por ello representa un riesgo para personas inmunocomprometidas y para quienes frecuentan los ambientes donde se encuentre este hongo sin las precauciones necesarias. En las cuevas, las partículas de polvo pueden ser levantadas a través de las pisadas de los visitantes, por lo que se recomienda el uso de botas, mascarilla y overol completo.

Aspergillus versicolor fue aislada de la muestra de migajón limoso con guano sanguinolento (M4). Esta especie es una de las más ubicuas del género *Aspergillus*, se distribuye por todo el mundo y se encuentra en casi todo tipo de suelo. A diferencia de otras especies de *Aspergillus*, *A. versicolor* puede encontrarse en regiones más frías como en pastos de zonas alpinas, en suelos de Alaska, en lagos congelados de Antártica y otros (Robert *et al.*, 2005). Hay numerosos registros de esta especie en suelos cultivados y algunos de suelos de bosque, se ha aislado también de aire, agua contaminada, hojarasca, excretas de conejo, ganado y aves, en madrigueras y nidos, cereales, queso, semillas, especias, carne y es común en ambientes de interior (Robert *et al.*, 2005). Se ha registrado de suelo alcalino de cuevas de las Bahamas (Orpurt, 1964), de suelo de cuevas al sur de la India (Koilraj *et al.*, 1999), de suelo y pared de una cueva calcárea-salina de Israel (Grishkan *et al.*, 2003), y de guano de murciélago en espacios cerrados y abiertos (Ulloa *et al.*, 2006) (Tabla 6.8), por lo que en este estudio se sugiere que debe ser considerada como especie troglófila y guanófila. Es frecuente en capas profundas de suelo, y presenta una amplia gama de tolerancia a pH, lo que se pudo observar en la M4 con pH de 8.5. Puede causar hematoma y lesiones en el bazo, micosis variadas y osteomielitis. Además produce micotoxinas: nidulotoxina, antraquinonas y sterigmatocistina (Robert *et al.*, 2005), esta última es un cancerígeno y actúa de manera similar que las aflatoxinas, por lo que representa un riesgo para las personas con sistema inmune debilitado y para quienes presentan exposición frecuente a ambientes donde se encuentra dicho hongo sin las precauciones convenientes.

Penicillium sp., afin a *adametzioides* se aisló de la muestra M1. En la diagnosis de *P. adametzioides* de Pitt (1979), se indica que no se tienen registros del sustrato del cual se aisló dicha especie, se presume que el aislamiento original pudo proceder de Japón. Esta especie es considerada en la actualidad un sinónimo de *P. sclerotiorum* (Robert *et al.*, 2005). Será necesario repetir la secuencia de bases de la región ITS1-5.8S-ITS2 de su ADN y las observaciones morfofisiológicas de la cepa aislada en este estudio, para determinar que se trate de una nueva especie.

Las dos cepas de *P. brevicompactum* fueron aisladas de la muestra M1. Esta especie es cosmopolita y se encuentra distribuida por todo el mundo. Se ha aislado de suelo de bosque, de suelos cultivados, de aire de fábricas, de alimentos procesados y en descomposición, de basura, de cosméticos, de madera para construcción, creciendo en macromicetes, de cadáveres de insectos, de huesos humanos, entre otros. Fue aislado de suelo de una cueva calcárea-salina en Israel (Griskhan *et al.*, 2003) (Tabla 6.8). La especie tiene aplicaciones en biotecnología, ya que produce ácido micofenólico que es usado para el tratamiento de algunas enfermedades, tales como en la prevención del rechazo en trasplantes de hígado y corazón (Robert *et al.*, 2005). Algunas cepas de *A. brevicompactum* producen además las micotoxinas: botriodiploidina y brevianamida A y B.

Penicillium chrysogenum fue aislada de la muestra M4. La especie es muy común, es ubicua y se encuentra distribuida por todo el mundo. Se presenta en todo tipo de suelos, ambientes cerrados, desiertos, alimento seco, quesos y vegetación en descomposición (Robert *et al.*, 2005). Fue aislada de suelo de cuevas calcáreas en Puerto Rico (Nieves Rivera, 2003) y de cadáveres de grillos cavernícolas en un túnel artificial de Eslovenia (Gunde-Cimerman *et al.*, 1998) (Tabla 6.8). *P. chrysogenum* es utilizada en la biotecnología ya que produce: penicilina, xantocilina, roquefortina C, meleagrina, crisogina, ácido secalónico, entre otras (Robert *et al.*, 2005). Además está relacionada con casos de micosis en los oídos, ojos, piel y uñas; endocarditis, infecciones cerebrales y sistémicas, por lo que representa un riesgo para personas con sistema inmunológico debilitado. Este es el primer registro de esta especie para el sustrato de suelo con guano sanguinolento de cuevas a nivel mundial.

Penicillium citrinum se aisló a partir de las muestras M1 y M3 (migajón arenoso con hojarasca y migajón limoso respectivamente). La presencia de esta especie en la M3 puede ser explicada por el transporte desde PM1 hasta PM3 por las visitas frecuentes a la cueva, y las diferencias morfológicas y de crecimiento que se presentan entre los aislamientos pueden estar relacionadas con adaptaciones al medio. *P. citrinum* es una especie ubicua, común en zonas tropicales y subtropicales, se ha aislado de suelo, de vegetación en descomposición, de cereales y especias, puede presentarse en ambientes cerrados (Robert *et al.*, 2005). Se ha aislado de suelo/pared de cuevas de Israel (Griskhan *et al.*, 2003) y de cadáveres de grillos cavernícolas en un túnel artificial de Eslovenia (Gunde-Cimerman *et al.*, 1998). Esta especie está relacionada con casos de infecciones en las vías urinarias, en los pulmones, en casos de keratitis y en ocasiones causa reacciones alérgicas. La mayoría de los aislamientos producen ácido kójico y citrina, que no son considerados carcinogénicos; la citrina actúa como antibiótico y puede causar toxicidad renal (Robert *et al.*, 2005). Por ello deben tomarse las medidas necesarias de precaución debido a las posibles infecciones que pueden adquirirse al entrar en contacto con dicho hongo.

Penicillium commune fue aislada de las muestras M2 y M3 (migajón arenoso y migajón limoso respectivamente). La presencia de esta especie en la M3 puede ser explicada por el arrastre o acarreo desde PM2 hasta PM3 por las visitas frecuentes a la cueva. Las diferencias morfológicas y de

crecimiento que se presentan entre los aislamientos pueden estar relacionadas con adaptaciones al medio. Es una especie ubicua y se encuentra distribuida en zonas templadas principalmente, se ha aislado de queso en refrigeración, semillas, pan húmedo, pescado seco, fruta, madera, en larvas de insectos y suelo. Se considera un contaminante de quesos, ya que puede producir ácido ciclopiazónico directamente sobre ellos, y en ocasiones también en la carne. Produce otros metabolitos secundarios (Robert *et al.*, 2005). Este es el primer registro de esta especie en sustratos cavernícolas a nivel mundial.

Penicillium concentricum se aisló de la muestra M4, que corresponde a migajón limoso con guano sanguinolento. Esta especie es considerada coprófila lo que explica su presencia en la muestra M4, se ha aislado de excretas de venado, suelo mezclado con excretas de animal, agua contaminada y en raras ocasiones de alimento como quesos o salami (Robert *et al.*, 2005). Presenta gran distribución por Europa y E.U.A, y no hay registros de su presencia en sustratos de cuevas, por lo que este es el primer registro a nivel mundial de esta especie en ambientes cavernícolas. *P. concentricum* produce varias toxinas antibióticas, tales como: patulina, patulidina, ácido barcelonéico y meleagrina, que pueden ser tóxicas para los humanos.

Penicillium decaturense es considerada como colonizadora de macromicetes y principalmente de aquellos asociados a troncos o madera en descomposición (Peterson *et al.*, 2004). En el presente estudio fue aislada de la muestra M1 que corresponde a migajón arenoso con hojarasca, en donde pudieron haber restos de troncos y ramas en descomposición (Fig. 5.3 A). Esta especie no ha sido aislada previamente de sustratos cavernícolas, por lo que este es el primer registro a nivel mundial.

Penicillium granulatum (sinónimo de *P. glandicola*) fue aislada de la muestra de migajón arenoso (M2). Es una especie cosmopolita que ha sido aislada de suelo, roble, bellotas, corchos de vino, suelo con excretas, suelo de bosque, y suelo con pH ácido. Puede producir micotoxinas tales como: patulina, patulidina, roquefortina C y D, glandicolina A/B y penitremo A, y algunas micotoxinas volátiles que pueden afectar el sabor y contaminar el vino. *P. granulatum* no había sido aislada previamente de cuevas, siendo este el primer registro a nivel mundial.

Penicillium herquei fue aislada de la muestra M1. Esta especie fue aislada de una hoja de *Agauria pirifolia*, de un pastel de maíz y arroz, de semillas de *Hordeum vulgare* en Francia, de aire en Londres, y de madera y suelo en E.U.A (Pitt, 1979). Previamente no había sido encontrada en sustratos de cuevas, por lo que este es el primer registro de esta especie en ambientes cavernícolas. Pitt (1979) considera a esta especie como poco común.

Penicillium janthinellum fue aislada de la muestra M4. Esta especie es típicamente de suelo con distribución universal (Pitt, 1979, Pitt, 1985), y en ocasiones se ha aislado de otros sustratos como el tabaco. No había sido registrada anteriormente para sustratos de cuevas, siendo este el primer registro para el sustrato de suelo mezclado con guano sanguinolento y para el ambiente cavernícola.

Penicillium lanosum fue aislada de las muestras M2 y M4 (migajón limoso y migajón limoso con guano sanguinolento respectivamente). La presencia de esta especie en la M4 puede ser explicada por el arrastre o acarreo desde PM2 hasta PM4 por las visitas frecuentes a la cueva y las diferencias morfológicas y de crecimiento que se presentaron entre los aislados pueden estar relacionadas con adaptaciones al medio. Es una especie con amplia distribución. Ha sido aislada principalmente de suelo y vegetación en descomposición, así como también de suelo alcalino de una cueva de las Bahamas (Orpurt, 1964), de suelo/pared de una cueva calcárea-salina en Israel (Grishkan *et al.*, 2003), y de guano de murciélago en cuevas de Italia y de Japón (Montagna *et al.*, 2003; Sugita *et al.*, 2005), es por ello que se sugiere que esta especie sea considerada como troglófila y guanófila.

Penicillium minioluteum fue aislada de la muestra M1. Esta especie ha sido aislada principalmente de suelo pero también se ha visto relacionada con casos de biodeterioro en alimentos refrigerados (Pitt, 1979). Existe un registro del aislamiento de esta especie a partir de suelo de una cueva de Puerto Rico (Munoz, 1972, *En*: Pitt, 1979).

Penicillium raistrickii se aisló de la muestra M4. Esta especie ha sido aislada de algodón, alimento de ganado, contenido de rumen de ovejas, hojarasca, semillas y es considerada un agente activo de biodeterioro (Pitt, 1979; Pitt, 1985). En este estudio se registra por primera vez para el sustrato de suelo mezclado con guano sanguinolento y para el ambiente cavernícola.

Penicillium roseopurpureum se obtuvo a partir de la muestra M1. Esta especie ha sido aislada de suelo principalmente. Pitt (1979) afirma que, aunque se considera que se encuentra ampliamente distribuida, esta especie ha sido aislada en raras ocasiones. No hay registros previos de la presencia de este hongo en sustratos de cuevas, siendo este el primero a nivel mundial.

Penicillium sclerotiorum se aisló de la muestra M1. Es una especie cosmopolita que ha sido aislada principalmente de suelo, y ocasionalmente de aire, agua, pastura de ovejas y de textiles y papeles de fábricas (Pitt, 1979). Este es el primer registro de su aislamiento a partir de sustratos cavernícolas en el mundo.

Penicillium steckii se obtuvo de la muestra M1. La especie ha sido aislada a partir de una fábrica de algodón en Panamá (Robert *et al.*, 2005), de suelo en cuevas en Virginia del oeste, E.U.A. (Rutherford & Huang, 1994) y de suelo/pared de una cueva calcárea-salina en Israel (Grishkan *et al.*, 2003). Se ha relacionado con infecciones del tracto urinario, pulmones y keratitis (Robert *et al.*, 2005), por lo que representa un riesgo para personas con sistema inmunológico comprometido.

Penicillium vinaceum fue aislada a partir de la muestra M4. Pitt (1979) considera que esta es una especie poco común y es estrictamente de suelo. El aislamiento obtenido en este estudio representa el primer registro de esta especie para el sustrato de suelo mezclado con guano sanguinolento y para ambientes cavernícolas.

Candida catenulata fue aislada de la muestra M1. Esta especie ha sido aislada de suelo, agua, cacao fermentado, quesos, heces de diversos animales y del hombre, y de algunos casos clínicos (Kurtzman & Fell, 1998; Barnett *et al.*, 2000; Robert *et al.*, 2005), se ha obtenido también de guano de murciélago de cuevas de México (Ulloa *et al.*, 2006). Otras especies de *Candida* (*C. rugosa*, *C. norvegica*, *C. saitoana* y *C. tropicalis*) han sido aisladas previamente de suelo, lodos, paredes y suelo mezclado con guano de cuevas de Italia (Martini, 1961; Vaughan-Martini *et al.*, 2000) y de suelo alcalino de una cueva en las Bahamas (Orpurt, 1964), es por ello que se puede considerar a *Candida* como un género troglófilo. Ulloa *et al.* (2006) señalan que los aislamientos que obtuvieron de esta especie a partir de guano de murciélago, presentaron diferencias morfofisiológicas con las descritas en la diagnosis de la especie, ya que no asimiló citrato, tal como la cepa L2.1 aislada en este trabajo.

Las dos cepas de *Naumovia dairenensis* (L3.2, L3.3) fueron obtenidas de la muestra M1. Esta especie sólo ha sido aislada a partir de pèrsimo seco (Robert *et al.*, 2005), por lo que en este trabajo se registra por primera vez para suelo de cuevas y para el país. Las diferencias morfofisiológicas que presentaron las dos cepas aisladas (crecimiento a 37 y 40° C, y en glucosa 50 %) pueden ser consideradas como respuesta a una adaptación al medio.

Pichia guilliermondii fue obtenida de las muestras M2 y M3, que al igual que con *P. commune*, la presencia en estos puntos de muestreo se explican por el arrastre. Esta especie presenta una amplia distribución, ha sido aislada de aire, suelo, sedimentos, frutos, mantequilla, leche, insectos, heces, muestras clínicas, entre otros (Kurtzman & Fell, 1998; Barnett *et al.*, 2000; Robert *et al.*, 2005), y de de guano de murciélago de cuevas de México (Ulloa *et al.*, 2006). Se encuentra relacionada con casos de otitis y endocarditis, por lo que pueden representar un riesgo para visitantes que se presenten sistema inmunológico debilitado.

Cryptococcus laurentii fue aislada de la muestra M1. Esta especie se distribuye ampliamente, ha sido aislada de semillas, plantas tropicales, maíz, hojarasca, suelo de bosque, dentro de madrigueras, de heces de aves, agua de mar, botellas de cervecera, y de algunos casos clínicos como tumores o bronquitis pulmonares (Robert *et al.*, 2005). Se ha obtenido también a partir de suelo alcalino de una cueva en las Bahamas (Orpurt, 1964) y de suelo/pared de cuevas de Italia (Vaughan-Martini *et al.*, 2000). Las especies de *Cryptococcus* (excepto *C. neoformans*) son consideradas como oportunistas o no patógenas, sin embargo se ha relacionado a la especie *C. laurentii* con enfermedades infecciosas en mamíferos, aves y humanos con sistema inmunocomprometido (Decostere *et al.*, 2003), por lo que puede representar un riesgo para los visitantes.

Cryptococcus randhawii fue aislada de la muestra M1. Esta especie sólo ha sido aislada a partir de árbol de *Ficus religiosa* en la India (Robert *et al.*, 2005) y su diagnosis no ha sido publicada. En este estudio se registra por primera vez la presencia de esta especie en sustratos cavernícolas y en el país, así como su diagnosis morfofisiológica.

Trichosporon laibachii se aisló de las muestras M3 y M4, al igual que en otras especies, la presencia en ambas muestras puede explicarse por el transporte debido a las visitas frecuentes. Esta especie es principalmente saprobia, con distribución cosmopolita, ha sido aislada de suelo, aire, agua de lagos y mares, frutos y vegetales, exudado de árboles, heces de animales, aves y humanos, entre otros (Ulloa *et al.*, 2006); y además de guano de murciélago en cuevas de Japón (Sugita *et al.*, 2005). Debido a que en este estudio se obtuvieron 9 aislamientos de la muestra M4, se sugiere que sea considerada como una especie guanófila. Algunas especies de este género son de importancia clínica, ya que pueden ser oportunistas y pueden estar involucradas en infecciones sistémicas en pacientes con sistema inmune comprometido (Ulloa *et al.*, 2006).

La especies *Trichosporon chiropterorum* y *T. shinodae* fueron aisladas de la muestra M4. Ambas han sido aisladas previamente a partir de guano de murciélago en cuevas de Japón (Sugita, 2004, en: Robert *et al.*, 2005), siendo identificadas por taxonomía molecular, pero su diagnóstico tradicional no ha sido publicada. En este estudio se registran por primera vez en sustratos cavernícolas y en el país, y se presentan sus diagnósticos morfofisiológicos.

Será necesario repetir la secuencia de pares de bases del dominio D1/D2 de su ADN y las pruebas morfofisiológicas de la cepa L11.4 de *Trichosporon sp.*, que se obtuvo de la muestra de suelo con guano sanguinolento, para determinar que se trata de una nueva especie.

De los hongos identificados en este estudio, algunas especies ya habían sido previamente aisladas a partir de diferentes tipos de suelo de cuevas (Orpurt, 1964; Hoffmann *et al.*, 1986; Volz y Ji Ping Yao, 1991; Koilraj *et al.*, 1999; Vaughan-Martini *et al.*, 2000; Grishkan *et al.*, 2003; Nieves-Rivera, 2003), y a partir de suelo mezclado con guano de murciélago colectado en cuevas, de suelo y guano de murciélagos y/o aves en espacios abiertos (huertas y jardines) y en espacios cerrados (minas y áticos) (Montagna *et al.*, 2003; Sugita *et al.*, 2005; Ulloa *et al.*, 2006; Sugita, 2004, en: Robert *et al.*, 2005). En los trabajos de Montagna *et al.* (2003) y Ulloa *et al.* (2006) se especifica la familia o especies de murciélagos de los cuales se obtuvo el guano que fue estudiado. Montagna *et al.* (2003) señala que *Cryptococcus laurentii* fue aislado de guano de murciélago insectívoro de la familia Rhinolophidae; y en Ulloa *et al.* (2006) puntualizan que *Aspergillus versicolor*, *Candida catenulata* y *C. guilliermondii* se aislaron a partir de guano de murciélago de las especies: *Pteronotus parnellii*, *P. dayvi*, *Myotis californicus*, *Mormoops megalophylla* (insectívoros), *Desmodus rotundus* (hematófago), *Glossophaga soricina* (nectarívoro/polinívoro) y *Artibeus hirsutus* (frugívoro). En el presente trabajo la muestra M4 estuvo mezclada con guano de *D. rotundus* y *Diphylla ecaudata* (hematófagos).

La mayor diversidad de especies fue detectada en la muestra M1, seguida por la muestra M4, M3 y M2. La M1, que corresponde a migajón arenoso con hojarasca, presentó pH ligeramente ácido (Miguel-Sánchez, 2006), altos porcentajes de bases intercambiables y fue rico en materia orgánica (4.41%), la cual tiene una influencia decisiva en los organismos del suelo, especialmente bajo condiciones húmedas. Esto puede explicar la presencia de la microbiota encontrada.

La muestra M4, que corresponde a migajón limoso con guano sanguinolento, fue la segunda muestra con mayor número de especies de diferentes géneros. La muestra analizada presentó un pH ligeramente alcalino (8.5) con excesivo contenido de materia orgánica (63.23 %), de Na⁺ y de K⁺, dado por el contenido de sangre. Aunque los suelos con mayor contenido de materia orgánica son capaces de soportar una población microbiana más densa, el pH de 8.5 pudo resultar inhibitorio para el crecimiento de algunos hongos.

El número de especies aisladas en M3, que corresponde a migajón limoso, fue también bajo en comparación con el encontrado en M1, pero en este caso la diversidad fue mayor que en M2, ya que se obtuvieron dos especies de *Penicillium* (*P. citrinum* y *P. commune*), una de *Pichia* (*P. guilliermondii*) y una de *Trichosporon* (*T. laibachii*). El suelo de M3 fue ligeramente ácido (Miguel-Sánchez, 2006), rico en materia orgánica (18.94 %) y con alto contenido de bases intercambiables, no tuvo influencia del medio externo, salvo por las visitas de troglófitos, y también se encuentra contaminado por actividad humana (Figs. 4.4 B y 6.40). Las muestras M1 y M3 presentan características fisicoquímicas similares, sin embargo la composición de especies es diferente en ambas. En M3 la totalidad de aislamientos estuvo representada por dos especies que compartió con M1 (*Penicillium citrinum*, cepa P 8.2; y *Pichia guilliermondii*, cepa L8.2), una especie que compartió con M2 (*P. commune*, cepa P8.1) y otra que compartió con M4 (*T. laibachii*, cepa L8.6), pero no presentó especies propias de este sitio. Esto se puede explicar por las visitas frecuentes de troglófitos y troglófitos, quienes acarrear las esporas de los hongos desde las zonas más externas hasta este punto. La presencia de *T. laibachii* en M3 puede ser explicada por la cercanía de este punto con la entrada al túnel que dirige al sitio de anidación de los murciélagos, donde se encuentra localizada M4.

En la muestra M2, que corresponde a migajón arenoso, la diversidad de especies fue la más pobre, sólo se identificaron tres especies de *Penicillium* (*P. commune*, *P. granulatum* y *P. lanosum*). El suelo presentó un alto contenido de materia orgánica de casi cinco veces más que la de M1, pH ácido y altas concentraciones de las cuatro bases intercambiables, haciéndolo un medio idóneo para el crecimiento de micobiota, sin embargo la escasa diversidad encontrada indica que hay otros factores que influyen en el desarrollo o en la inhibición de los hongos. Las diferencias de diversidad de especies y parámetros fisicoquímicos entre las muestras M1 y M2 pueden ser explicadas por la lixiviación (debido a los factores externos) que se presenta en PM1, que proporciona el flujo de las corrientes de agua en tiempo de lluvias hacia la parte baja de la pendiente. Esto hace que PM2 se vea enriquecido con mayores concentraciones de materia orgánica y de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ provenientes de la roca caliza; pero el agua también acarrea basura y puede lavar los propágulos de los hongos. Otro factor de deterioro son las continuas visitas a estas porciones iluminadas de la cueva, lo que daña el suelo por el pisoteo de los habitantes de las colonias aledañas.

En general, la distribución de hongos en las cuevas tiende a ser parchada (Landolt *et al.*, 1992; Ulloa *et al.*, 1998), pero en los puntos aislados donde se llegan a presentar estos organismos, pueden alcanzar niveles sorprendentemente altos de diversidad, como fue el caso en M1.

Ninguna de las especies aisladas se encontró en las cuatro muestras, lo que significa que los hongos tienen una distribución altamente localizada en el suelo debido a factores bióticos y abióticos. Sólo cinco especies se presentaron en dos tipos de suelo: *Penicillium citrinum* (cepa P1.21 en M1 y cepa P8.2 en M3), *P. commune* (cepa P4.2 en M2 y cepa P8.1 en M3), *P. lanosum* (cepa 4.1 en M2, y cepas P11.4 y 11.6 en M4), *Pichia guilliermondii* (cepa L3.1 en M1 y cepa L8.2 en M3) y *Trichosporon laibachii* (cepa L8.6 en M3 y cepa L11.2 en M4); sin embargo, es evidente que las características morfológicas y/o fisiológicas de estas especies pueden variar con el sustrato a partir del cual fueron aisladas, quizá como respuesta a una adaptación al medio.

Esto confirma que la acción sinérgica de los cationes elementales y otros nutrientes, junto con la humedad del suelo y del aire, la temperatura, el pH óptimo, la textura y aereación del suelo, la acción de insectos y otros artrópodos, y la presencia de guano, son factores ecológicos que hacen que la cueva sea un nicho habitable para la micobiota (Carvajal Zamora, 1977a y b); y que la diferencia ente los diferentes tipos de suelo, aunado a las condiciones bióticas y abióticas, provee una diversidad de microhábitats para las poblaciones de micromicetes (Volz & Ji Ping Yao, 1991).

Las especies *A. aculeatus*, *A. pseudotamarii*, *P. commune*, *P. concentricum*, *P. decaturense*, *P. granulatum*, *P. herquei*, *P. janthinellum*, *P. miniouluteum*, *P. roseopurpureum*, *P. sclerotiorum*, *P. raistrickii*, *P. vinaceum*, *C. randhawii*, *N. dairenensis*, *T. chiropterorum* y *T. shinodae* son primeros registros para suelo/guano de cuevas en México, en el caso de *P. chrysogenum* es también primer registro para el sustrato de suelo con guano sanguinolento. Además en este trabajo se describe por primera vez la diagnosis morfológica y fisiológica para las especies *C. randhawii*, *T. chiropterorum* y *T. shinodae*, que fueron identificadas por sus autores únicamente por taxonomía molecular, lo cual no es válido en el código de nomenclatura biológica. Además se consideran por primera vez a *A. flavus* y *A. niger*, junto con el género *Candida*, como especies troglófilas, a *T. chiropterorum*, *T. shinodae* y *T. laibachii* como especies guanófilas, y las especies *A. versicolor* y *P. lanosum* como especies troglófilas y guanófilas. Todos estos hongos viven asociados con animales y sus productos, incluyendo: estiércol, pelo, plumas, uñas y hueso, sustratos que se encuentran comúnmente en el ambiente cavernícola (Ulloa *et al.*, 1998 a,b).

Como señalan Ulloa *et al.* (1998) la mayoría de los hongos que muestran patogenicidad potencial se encuentran en la entrada de la cueva y algunos que prosperan en el guano de los murciélagos. En el presente estudio sólo se encontraron patógenos oportunistas, pero no puede descartarse la probabilidad de adquirir una infección al entrar y permanecer en la cueva sin la protección recomendada (casco, mascarilla, guantes, botas y overol que cubra brazos y piernas), y si los visitantes presentan un sistema inmune comprometido.

El que la mayor parte de las especies aisladas sean comunes de suelo, puede estar determinado por haber utilizado medios de cultivo que permitían el desarrollo principalmente de especies saprobias con la capacidad de utilizar rápidamente el sustrato. Las placas de crecimiento favorecen a aquellos microorganismos que crecen de manera más rápida y aquellos hongos que producen gran número de esporas (Dix & Webster, 1996). No obstante, se debe tener en cuenta que en las cuevas, los microorganismos pueden generar mecanismos elaborados para asimilar los nutrientes en condiciones extremas de escasez, pero cuando estos organismos son expuestos a los nutrientes ricos de las placas de crecimiento, no pueden cambiar esas adaptaciones y rápidamente pueden morir por estrés osmótico. Es por esto que se piensa que sólo una pequeña parte de los microorganismos de las cuevas pueden crecer en placas de crecimiento estandarizadas (Barton, 2006). Para obtener mayor diversidad de especies se pueden utilizar técnicas independientes de cultivo por desnaturalización DGGE o TGGE, donde se hace un aislamiento total de ADN sin cultivar la muestra, por lo que es posible superar los problemas que representa el crecimiento en placa, y se detecta el 90-99% de las especies de una comunidad.

Se desconoce si la esporulación dentro de la cueva es significativa, pero los parches de crecimiento observados pueden indicar que los hongos se encuentran activos, que la materia orgánica en el sustrato está aumentando, o que han sido recientemente introducidos (Northup *et al.*, 1994). En las cuevas las esporas se mantienen viables pero en general no germinan realmente, o si la germinación se lleva a cabo, el patrón de crecimiento para las poblaciones es tan bajo que la formación de estructuras reproductoras raramente ocurre (Landolt *et al.* 1992), pero la verdadera pregunta es si los hongos son realmente biológicamente activos dentro de la cueva.

8. CONCLUSIONES

Los estudios bioespeleológicos representan una propuesta original en su concepción, por su carácter multidisciplinario, en virtud de que evalúan diversas variables del ambiente subterráneo en relación a las biocenosis establecidas en estos ambientes extremos. Además reconocen la riqueza biológica que habita en las cuevas y determinan las modificaciones morfofisiológicas adaptativas de los organismos cavernícolas, lo que permite incluso reconocer especies nuevas. En la actualidad se reconocen a las cuevas como excelentes laboratorios naturales.

En este trabajo se evaluaron algunos factores bióticos y abióticos ambientales (temperatura, humedad relativa e intensidad luminosa) y del suelo (pH, M.O., Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Na⁺, y K⁺) de la Cueva de los Riscos en relación con la distribución de los microorganismos. Se comprobó que la heterogeneidad del suelo (dada por la meteorización, lixiviación, topografía, procesos de carbonatación y disolución de la roca madre, y otros procesos químicos relacionados con la presencia materia orgánica y de guano de murciélago) determina la naturaleza y distribución de los mismos, siendo este un fenómeno que se puede presentar no sólo en esta cueva, sino en otros ambientes subterráneos. También se valoró el efecto de las actividades humanas sobre la biodiversidad encontrada, y se pudo observar que la basura acumulada y las visitas frecuentes son un factor de deterioro importante en esta comunidad.

Se hizo un reconocimiento de la riqueza de micromicetes de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (Trichocomaceae) y de las levaduras que habitan en el suelo de la Cueva de los Riscos. Se observó la dominancia de especies de *Penicillium* en los cuatro sustratos estudiados y gran tolerancia del género *Trichosporon* al sustrato alcalino representado por guano de murciélago hematófago.

Una de las aportaciones de este estudio es la generación de nuevos registros de micromicetes de sustratos cavernícolas en el mundo tales como: *Aspergillus aculeatus*, *A. pseudotamarii*, *Penicillium chrysogenum*, *P. commune*, *P. concentricum*, *P. decaturense*, *P. granulatum*, *P. herquei*, *P. janthinellum*, *P. raistrickii*, *P. roseopurpureum*, *P. sclerotiorum*, *P. vinaceum*, *Naumovia dairenensis* y *Cryptococcus randhawii*, de entre los cuales *N. dairenensis*, *C. randhawii* y las especies *Trichosporon chiropterorum* y *T. shinodae* (aisladas de cuevas de Japón) son primeros registros en México. De estas tres últimas especies, determinadas sólo genotípicamente, se obtuvieron también las diagnósis morfofisiológicas.

Se aislaron tres posibles especies nuevas de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichosporon*, además se obtuvieron cepas de especies de importancia médica y biotecnológica como: *A. pseudotamarii*, *A. versicolor*, *A. flavus*, *P. citrinum*, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. concentricum*, *P. granulatum*, *P. minioluteum*, *P. steckii*, *Pichia guilliermondii* y *T. laibachii*, y especies

con características toxígenas o de patógenos oportunistas como: *A. flavus*, *A. japonicus*, *A. niger*, *A. pseudotamarii*, *A. versicolor*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. concentricum*, *P. steckii*, *Pichia guilliermondii* y *C. laurentii*. Entre ellas se encuentran especies de naturaleza cosmopolita tales como: *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. versicolor*, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. commune*, *P. granulatum*, *P. janthinellum*, *P. lanosum*, *P. sclerotiorum* y *Trichosporon laibachii*, y otras con distribución limitada como: *A. aculeatus*, *P. decaturense*, *P. herquei*, *P. roseopurpureum*, *P. vinaceum*, *N. dairenensis* y *C. randhawii*.

Se sugiere por primera vez considerar al género *Candida* y a las especies *A. flavus*, *A. niger*, *A. versicolor*, *P. lanosum*, *T. chiropterorum*, *T. shinodae* y *T. laibachii* como especies troglófilas y/o guanófilas debido a los estudios previos donde se les ha encontrado en sustratos del medio subterráneo.

Lo expuesto en este trabajo es una visión parcial de la micobiota que está asociada a los ambientes cavernícolas. Se recuperaron las especies más representativas de los grupos de estudio elegidos de dicha comunidad, y los datos obtenidos sugieren que este hábitat ha sido colonizado por una gran variedad de microorganismos, lo que apoya la idea de que la riqueza de especies en las comunidades fúngicas del suelo es desconocida y quizá indeterminable (Christensen, 1981).

CONSIDERACIONES

Dada la experiencia en este trabajo, se recomienda que para dichos estudios se consideren replicas de cada muestra para obtener un índice de diversidad y poder acompañar el valor de dicho índice con el de alguna medida de dispersión (varianza, desviación estándar, coeficiente de variación), esto con la finalidad de darle validez estadística a los resultados obtenidos. También se sugiere un estudio de la variación de la micobiota en el tiempo, ya que esto puede ser útil para conocer los cambios estacionales en la diversidad de especies. Se recomienda efectuar los análisis de la química de los suelos antes de preparar los medios de cultivo, con la finalidad hacerlo con las características químicas de cada muestra y evitar el posible estrés osmótico de los microorganismos, así como realizar análisis de la concentración de nitrógeno y fósforo en las muestras de suelo, ya que son elementos que favorecen el crecimiento de la fase micelial e infectiva de algunos hongos (Chávez-Tapia *et al.*, 2005). También se pueden utilizar técnicas independientes de cultivo por desnaturalización DGGE o TGGE para determinar mayor diversidad de especies.

9. GLOSARIO Y ABREVIATURAS

Los conceptos y definiciones que se presentan en este glosario fueron recopilados de las obras de: Hoffmann *et al.*, 1986; Ortiz-Villanueva & Ortiz-Solorio, 1990; Field, 2002; y Ulloa & Hanlin, 2006.

Ampuliforme: (lat., *ampulliformis* en forma de ampolla, pequeña vasija de forma ovalada). De forma de botella, hinchada, particularmente en la parte basal. Se aplica especialmente a la célula conidiógena llamada fiálide.

Apiculado: (neolat. *apiculatus*, muy puntiagudo). Que termina en punta.

Artrospora: (gr. *árthron*, articulación + *sporá*, espora). Espora que resulta de la fragmentación de una hifa. Sin. de artroconidio.

Asca: (gr. *askós*, saco, asca). Célula especializada en la que se forman las ascosporas internamente, por un proceso llamado formación de células libres, usualmente después de la cariogamia y la meiosis. Es de carácter distintivo en ascomicetes y generalmente contiene un número definido de ascosporas.

Aspergilosis: (lat. *aspergillo*, hisopo, rociador + suf. gr. *-osis*, estado o condición). Amplia gama de enfermedades de animales y humanos causada por algunas especies cosmopolitas de *Aspergillus*, las cuales, como invasores cosmopolitas, provocan infecciones secundarias en pacientes inmunosuprimidos.

Basidio: (lat. *basidium*, pequeña base). Célula especializada, característica de los basidiomicetes, sobre la que se forman las basidiosporas sostenidas por los esterigmas, después de que se lleva a cabo la cariogamia y la meiosis. Es homólogo del asca en cuanto concierne a la célula madre y a los procesos citológicos que en ella ocurren, aunque difieren esencialmente en que el basidio origina esporas exógenas, en tanto que el asca las produce endógenamente.

Bioespeleología: (gr. *bíos*, vida + *spélaion*, cueva, + *logos*, tratado, estudio) Estudio científico de la vida cavernícola. Un biólogo especializado en este estudio es llamado bioespeleólogo.

Biokarst: (gr. *bíos*, vida + *karst*, referente a roca caliza en disolución) Fenómeno de erosión y consolidación de cuevas y roca caliza, como resultado de la dominancia de influencias orgánicas en procesos específicos, como la disolución y modificación de la roca.

Biotopo: (gr. *bíos*, vida y *tópos*, lugar). Lugar físico donde se desarrollan individuos de una o varias especies.

Blastospora: (gr. *blastós*, brote, yema, germen + *sporá*, espora). Espora de reproducción asexual, que se origina por gemación, como la de las levaduras y algunos hongos filamentosos.

Calcáreo: (lat. *calcarius*, compuesto de carbonato de calcio). Hecho de, o que contiene carbonato cálcico; de color blanco-grisáceo.

Cárstico: Referente a *Karst* (nombre tomado del propio de una región montañosa cerca de Trieste), definido como grandes zonas de roca caliza con formaciones geomorfológicas superficiales y subterráneas características, tales como las dolinas y las cuevas.

Catión: (gr. *ion*, que va, radical simple que se disocia de las sustancias al disolverse) Ión (sea átomo o molécula) con carga eléctrica positiva, esto es, con defecto de electrones. Los cationes se describen con un estado de oxidación positivo.

Cavernícola: (lat. *caverna*, concavidad profunda subterránea o entre rocas + suf. neolat. *-ícola*, habitante) Organismo que se encuentra en cuevas, grutas o cualquier cavidad subterránea, sin importar su grado de adaptación. Referente a las cuevas.

Colonia: (lat. *colonia* < *colonus*, colono < *colere*, habitar). Grupo de individuos de la misma especie que viven conjuntamente. En los hongos el término se refiere generalmente a la masa de hifas (micelio) o células individuales que proliferan desde un punto central (centrífugamente) para formar una entidad con las características típicas de la especie.

Concreción: (lat. *concretio*, *-ónis*, acumulación de partículas que se unen para formar masas) Depósito de materia mineral localizado en solución con sedimentos dentro de las cuevas, usualmente es de forma irregular.

Conidio: (neolat. *conidium* < gr. *kónis*, polvo + suf. dim. *-ídion* > lat. *-idium*). Sin. de conidiospora. Espora asexual nucleada, inmóvil, que generalmente se forma en el ápice o a un lado de una célula esporógena (conidiógena) especializada.

Conidióforo: (neolat. *conidium* < gr. *kónis*, polvo + suf. dim. *-ídion* > lat. *-idium* + suf. gr. *-phóros*, portador). Hifa simple o ramificada, que está morfológica y/o fisiológicamente diferenciada de una hifa somática para producir y portar conidios; éstos se encuentran generalmente sobre células conidiógenas especializadas, las cuales se pueden disponer de diversas maneras. Para algunas especies los términos conidióforo y célula conidiógena se aplican indistintamente.

Conidiogénesis: (neolat. *conidium* < gr. *kónis*, polvo + suf. dim. *-ídion* > lat. *-idium* + lat. *genesis* < gr. *génésis*, origen) Proceso de formación de conidios por una célula conidiógena o una hifa indiferenciada.

Coremio: (neolat. *coremium* < gr. *kórema*, escoba + suf. dim. lat.- *ium*) Manojito erecto de conidióforos flojamente unidos, con el ápice parecido a una escoba. Es un tipo de sinema.

CTAB: (ing. Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) Bromuro de cetil-trimetilamonio. Es un tensoactivo catiónico que se utiliza, entre otras cosas, como solución buffer para la extracción del Ácido Desoxirribonucleico (ADN).

Desnaturalización: (pref. des- lat. *dis-* negación o inversión de significado + lat. *naturâlis*, naturaleza, o conforme a la calidad de las cosas) En bioquímica es un cambio estructural de las proteínas o ácidos nucleicos, en el que pierden su estructura nativa, y como consecuencia su óptimo funcionamiento; a veces también cambian sus propiedades físico-químicas.

Edáfico: (gr. *édafos* + suf. *-ikós*, perteneciente o relativo a). Que pertenece al suelo o tiene relación con él.

EDTA: (ing. ethylenediaminetetraacetic acid), ácido etilendiaminotetraacético. Sustancia utilizada como agente quelante y formadora de complejos coordinados cíclicos de anillo (no iónicos), en técnicas moleculares para la extracción y conservación del ADN. La sal disódica del mismo ácido se utiliza en edafología para la titulación en técnicas de determinación de cationes intercambiables.

Electroforésis: (gr. *élektron*, eléctrico, electricidad + gr. *phorésis*, acto de llevar, transmisión).

Método de cromatografía mediante el cuál partículas con carga eléctrica (como ADN, ARN, proteínas) son separadas por un campo eléctrico, debido a su migración diferencial en una matriz inerte (agarosa en el caso de ADN y ARN).

Endospora: (gr. *éndon*, dentro + *sporá*, espora). Término que se aplica para las esporas asexuales que se forman por gemación interna de las hifas de algunas especies de levaduras con micelio verdadero, como *Trichosporon capitatum* y *T. fermentans*.

Equinulado: (neolat. *echinulatus*, provisto de pequeñas espinas o con aspecto de espinas < gr. *echinos*, espina, *-ado*, provisto de o semejanza) Cubierto de espinas pequeñas. Se aplica principalmente cuando se trata de estructuras microscópicas o de microorganismos.

Esclerocio: (neolat. *sclerotium* < gr. *sklerotés*, dureza < *sklerós*, duro). Estructura endurecida compuesta de tejido fúngico que resiste condiciones desfavorables del medio; los esclerocios están compuestos de plecténquima, con una corteza firme, frecuentemente quitinizada y son capaces de germinar y reiniciar un crecimiento vegetativo.

Espeleología: (gr. *spélaion*, cueva + *lógos*, tratado). Disciplina que se encarga del estudio de las cuevas, grutas y cavernas; de su génesis y evolución, del medio físico que representa, de sus poblaciones biológicas actuales y pasadas, y de las técnicas adecuadas para su investigación.

Espeleotema: (gr. *spélaion*, cueva + neolat. suf. *-thema*, forma). Es la denominación formal para lo que comúnmente se conoce como "formaciones de las cavidades". La palabra, procedente del griego "depósito de las cavidades", se refiere generalmente a depósitos minerales secundarios formado en la génesis de las cuevas. Las más conocidas son las estalactitas, que cuelgan del techo o la pared, y las estalagmitas, que crecen del suelo hacia el techo.

Exudado: (lat. *exudare* < *ex*, fuera de, desde + *sudare*, sudar). Cualquier líquido más o menos fluido o denso que, por exudación, sale de las hifas de muchos mohos, y que se acumula en pequeñas gotas de diversas tonalidades según las especies y condiciones de crecimiento.

Fiálide: (gr. *phialís*, genit. *phialídis*, dim. de *phialé*, vaso o pomo). Tipo de célula conidiógena, de forma de botella, que produce conidios blásticos en sucesión basípeta, a partir de un locus o

varios loci, sin que haya un aumento en la longitud de la fíalide misma. Son las células conidiógenas más comunes entre los hongos conidiales.

Flocoso: (lat. *floccosus*, lleno de mechones de lana). Flojamente algodonoso o lanoso, o más densamente aglomerado en copos como la franela. Las colonias de muchos hongos, que se forman tanto en condiciones naturales como en cultivo en medios de agar, presentan una apariencia flocosa.

Gour: (fr. *gour*, superficie cóncava) Concreción en forma de tabique o piscina desarrollada sobre una pendiente por la que circula un curso activo. Dan lugar a represamientos escalonados.

Guano: (Voz quichua, que significa estiércol) Depósito fosfático formado por los excrementos de los murciélagos y aves. En ciertas cuevas de murciélagos o en sitios colonizados por aves, algunas veces el guano se acumula en tal cantidad que es usado comercialmente como fertilizante.

Heterotálico: (gr. *héteros*, otro, distinto + *thallós*, talo + suf. *-íkos* > lat. *-icus*, perteneciente o relativo a). 1. Organismo con los órganos sexuales masculinos y femeninos segregados en talos distintos, de modo que se requieren dos talos para que ocurra la reproducción sexual, es decir, que es dióico. 2. Organismo en el que los órganos sexuales masculinos y femeninos se originan en el mismo talo, pero que es autoestéril (autoincompatible), por lo que es necesario que se unan dos talos compatibles (fertilización cruzada) para llevar a cabo la reproducción sexual.

Heterótrofo: (gr. *héteros*, otro, distinto + *trophós*, que nutre, que sirve de alimento). Organismo que debe alimentarse de materia orgánica elaborada por otros organismos, porque es incapaz de sintetizar hidratos de carbono a partir de elementos inorgánicos.

Hifa: (neolat. *hypha*, hifa < gr. *hyphé*, tejido). Filamento tubular que representa la unidad estructural (talo) de la mayoría de los hongos. Las hifas pueden ser somáticas o fértiles y de su diferenciación se deriva una gran diversidad de estructuras relacionadas con las funciones asimilativas y reproductoras. Las dos formas generales de hifas que presentan los hongos son las *cenocíticas* y las *septadas*.

Hipogeo: (gr. *hypó*, debajo + *geo*, suelo, tierra). Que crece o se desarrolla subterráneamente.

Histoplasmosis: (< gén. *Histoplasma* < gr. *hístos*, tejido + *plásma*, la materia primordial de los seres vivos + suf. *-osis*, estado o condición). Infección pulmonar principalmente que se adquiere por la inhalación de conidios y fragmentos hifales del hongo dimórfico *Histoplasma capsulatum*, abundante en algunos suelos, especialmente en los de cuevas contaminados con estiércol de murciélagos y de aves.

Iniciadores universales: Son segmentos cortos de ARN o ADN, con veinte o menos bases. También llamados oligonucleótidos (oligos) o primers, son utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación, donde se obtiene un gran número de copias de un fragmento de ADN.

Inóculo: (ing. *inoculum*, porción de gérmenes, < *inoculare*, implantar, injertar, sembrar). Material fúngico (micelio, esporas, etc.) que es transferido a un organismo, un sustrato o un medio de cultivo con el fin de propagarlo.

Intemperizado: (lat. *intemperies*, desigualdad del tiempo. A cielo descubierta, sin techo + suf. *-atus* > esp. *-ado*, provisto de o semejanza) Cuerpo que ha sufrido modificaciones físicas o químicas a causa de su exposición a los agentes comunes en la intemperie. Estos agentes suelen ser los rayos solares, la lluvia, el viento y los cambios de temperatura. Pueden llegar a presentarse otros agentes o mecanismos de acción según el tipo de clima predominante en el ambiente. No se debe confundir este término con alteración o erosión, ya que conceptualmente estos procesos están involucrados en el intemperismo.

Meandro: (gr. *maeandros*, río que avanza serpenteando). Curva regular descrita por un río. Se forma con mayor facilidad en el sedimento de una llanura aluvial.

meq/100gr: Miliequivalentes en 100 gr. de suelo seco al aire. Unidades para referir los valores de la Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC) en el suelo, es equivalente a las unidades de centimoles de cargas (c) por kg del peso del material ($\text{cmol}_{(+) } \text{kg}^{-1}$).

Métula: (lat. *metula*, dim. de *meta*, pirámide, extremo de algo). Pequeña rama del conidióforo que origina fiálides o células conidiógenas, también se reconoce como profiálide.

Micelio: (neolat. *mycelium* < gr. *mýkes*, hongo +suf. lat. *-elis*, concerniente a). Conjunto o masa de hifas que constituye el cuerpo vegetativo o talo de un hongo.

Micobiota: (gr. *mýkes*, hongo + neolat. *biota*, los seres vivos de una región o período particular).
Conjunto de hongos indígenas de un lugar o hábitat.

Micosis: (gr. *mýkes*, hongo + suf. *-osis*, condición, proceso, estado). Amplia gama de infecciones del hombre y de los animales superiores, causadas por diversas especies de hongos. Usualmente las micosis se clasifican en categorías basadas en el grado de profundidad anatómica de la infección, es decir, superficiales, cutáneas, subcutáneas, o sistémicas.

Micromicete: (lat. *micromycete* < gr. *mykrós*, pequeño, diminuto + *mýkes*, genit. *mýketos*, hongo). Hongo de tamaño muy pequeño, usualmente con estructuras esporíferas microscópicas. Se presentan en todos los grupos principales de hongos.

Mitospórico: (gr. *mítos*, filamento + *sporá*, espora + suf. *-ikós*, perteneciente o relativo a). Hongos que se reproducen asexualmente y/o parasexualmente por mitosis o supuesta mitosis (no han sido correlacionados con ningún estado meiótico).

Moho: (esp. *mogo* < lat. *mucor*, genit. *mucoris*, enmohecer < *muceo*, moho). Se aplica a cualquier micromicete, principalmente de Mucoraceae y de los hongos asexuales conidiales, especialmente los géneros moniliáceos (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Monilia* y *Botrytis*), los cuáles se desarrollan en materiales orgánicos en descomposición, cubriéndolos con un micelio más o menos denso, por lo común de aspecto afelpado, aterciopelado o pulverulento, debido de la masa de esporas e hifas.

Parásito: (gr. *parásitos* < *pará*, junto, al lado de + *sítos*, pan alimento en general). Organismo que deriva su alimento de otro organismo vivo, ya sea una planta, un animal o un hongo; si el parásito invade y causa enfermedad se considera como *patógeno*.

Patogenicidad: (gr. *páthos*, enfermedad + *génos*, origen). Capacidad o incapacidad de un agente infeccioso de producir una enfermedad en un huésped susceptible.

Patógeno: (gr. *páthos*, enfermedad + *génos*, origen). Organismo capaz de causar enfermedad en un huésped particular o en una gama de huéspedes, no necesariamente como parásito.

PCR: (ing. Polymerase Chain Reaction). Reacción en cadena de la polimerasa, es una técnica de biología molecular descrita en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran

número de copias de un fragmento de ADN en particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde.

Penicilo: (lat. *penicillus*, pincel). Cabeza conidial de forma de pincel, constituida por un conidióforo o pedicelo que soporta un racimo de células conidiógenas (fiálides), y que también puede tener otros elementos (como ramas y métulas), dependiendo de la especie. Característico del género *Penicillium* y otros géneros como *Paecilomyces* y *Gliocladium*.

pH: El término significa potencial de hidrógeno para (lat. *pondus*, peso, < *potentia*, potencia + *hydrogenium*, hidrógeno), es una medida de la acidez o basicidad de una solución. Es la concentración de iones o cationes hidrógeno [H⁺] presentes en determinada sustancia.

Propágulo: (neolat. *propagulum* < *propages*, soltarse, zafarse, desprenderse + suf. dim. *-ulum*). En general cualquier estructura que sirve para propagar o multiplicar vegetativamente a un organismo; en los hongos, los propágulos pueden ser esporas, bulbilos, fragmentos de micelio, isidios y soledios, entre otros.

Pseudomicelio: (gr. *pseûdos*, falso + neolat. *mycelium* < *mýkes*, hongo + suf. lat. *-elis*, concerniente a). Agrupación de células dispuestas en cadenas pequeñas flojamente unidas, como ocurre en diversas especies de levaduras. Se origina por gemación y se distingue del micelio verdadero porque este último se forma por una extensión continua de una hifa que no está constreñida a nivel de los septos que delimitan las células.

Rpm: Revoluciones por minuto.

Sanguinolento: (lat. *sanguinolentus*, sangriento, *sanguilentus*, de *sanguis*, sangre) Referente a la sangre, que expulsa o que está mezclado con sangre.

Saprobio: (gr. *saprós*, podrido, pútrido + *bios*, vida). Organismo que se desarrolla sobre un ser orgánico muerto o sobre sustancias orgánicas, y utiliza estos sustratos como alimento. La mayoría de los hongos son saprobios.

SDS: Sodio Dodecil Sulfato, compuesto utilizado para la digestión y rompimiento de las células en la extracción de su ADN.

Simbionte: (gr. *sympiōntos* < *sympiōo*, vida en común + *ōntos*, ser). Cada uno de los organismos de una simbiosis, donde dos o más organismos viven en común con beneficio mutuo.

Sinema: (gr. *sýn*, con, junto con + *nêma*, filamento) Racimo compacto de conidióforos erectos que portan conidios en el ápice y algunas veces a lo largo de los lados; los conidióforos individuales pueden o no estar unidos lateralmente.

Terreno pedregoso: Áreas que contienen suficientes rocas como para impedir el uso de maquinaria, usualmente de 15 a 90% de la superficie está cubierta de rocas.

Troglobio: (gr. *tróglos*, cavidad + *bios*, vida). Seres que viven únicamente en las cavernas con adaptaciones fisiológicas y modificaciones morfológicas.

Troglófilo: (gr. *tróglos*, cavidad + *filos*, amigo). Seres que gustan de vivir en las cavernas, donde pueden reproducirse y pasar toda su existencia, pero que no están estrechamente limitados a ella, pues se les puede encontrar en el exterior.

Trogloxeno: (gr. *tróglos*, cavidad + *xeno*, extraño). Seres ajenos a las cavernas pero que se pueden encontrar en ellas como habitantes ocasionales. No presentan adaptaciones a la vida cavernícola.

UFC: Unidades Formadoras de Colonias.

Umbonado: (neolat. *umbonatus*, provisto de umbo o escudo < *umbo*, genit. *umbonis*, prominencia, escudo + suf. *-atus* > esp. *-ado*, provisto de). 1. Que tiene una prominencia central en forma de cono. 2. De forma de umbo o pezón.

Velutinoso: (neolat. *velutinus*, terciopelo). Aterciopelado, es decir, con una superficie brillante u opaca en la que los pelos son cortos, finos y suaves, dispuestos compactamente, como las de algunas especies de *Penicillium*.

Verticilado: (neolat. *verticillatus*, dispuesto en un verticilo < lat. *verticillus*, verticilo + suf. *-atus* > esp. *-ado*, provisto de). Tipo de ramificación en el que las ramas (pedicelos, métulas, fiálides, etc.) nacen a un mismo nivel en la hifa o soporte (esporangióforo, conidióforo, etc.) y crecen oblicuamente hacia arriba con respecto al eje central, generalmente alcanzando la misma longitud y rodeando a la hifa o soporte.

10. LITERATURA CITADA

- Ajello, L., E. S. Kuttin, A. M. Beemer, W. Kapla & A. Padhye. 1977. Occurrence of *Histoplasma capsulatum* Darling, 1906 in Israel, with a review of the current status of histoplasmosis in the Middle East. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 26: 140-147.
- Barnett, J. A., R. W. Payne & D. Yarrow. 2000. *Yeasts: Characteristics and Identification*, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Benoit, J. B., J. A. Yoder, L. W. Zettler & H. H. Hobbs III. 2004. Mycoflora of a Trogloneic Cave Cricket, *Hadenocercus cumberlandicus* (Orthoptera: Rhabdophoridae), from two small caves in northeastern Kentucky. *Entomological Society of America* 97(5): 989-993.
- Brooth, C. 1971. *The Genus Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey, Inglaterra.
- Carabias Lillo, J., Provencio E., de la Maza Elvira J. & Ruiz Corzo M. 1999. Programa de manejo Reserva de la Biosfera Sierra Gorda, México. Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT. México.
- Carrillo, L. 2003. Micotoxinas. Capítulo 6. *En: Microbiología agrícola*: 1-7.
<http://www.unsa.edu.ar/matbib/micragri/micagricap6.pdf>, agosto 2008.
- Carvajal-Zamora, J. R. 1977a. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil in the Aguas Buenas Caves, Aguas Buenas, Puerto Rico. I. An ecological approach. *Mycopathologia* 60(3): 157-161.
- 1977b. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from the air in the Aguas Buenas Caves, Aguas Buenas, Puerto Rico. *Mycopathologia* 60(3): 163-165.
- Centraalbureau voor Schimmelcultuur CBS. 2008 Fungal Biodiversity Center, Database.
<http://www.cbs.knaw.nl/databases/index.htm>, agosto 2008.
- Chávez-Tapia, C. B., G. Peña-Sandoval, G. Rodríguez-Arellanes, M. de R. Reyes-Montes, E. Duarte-Escalante, M. L. Taylor. 2005. Aislamiento de *Histoplasma capsulatum* en los murciélagos *Desmodus rotundus* (no migratorio) y *Tadarida brasiliensis* (migratorio de larga distancia): primeros registros en México. *Revista Mexicana de Micología* 20: 61-70.
- Christensen, M. 1981. Species diversity and dominance in fungal communities: 201-232 *En: D. T. Wicklow y G. C. Carroll (Eds.). The fungal community, its organization and role in the ecosystem*. Marcel Dekker, Nueva York.
- Christensen, M. 1989. A view of fungal ecology. *Mycologia* 8: 1-19.
- Christensen, M., J. C. Frisvad & D. E. Tuthill. 2000. *Penicillium* species diversity in soil and some taxonomic and ecological notes: 309-320. *En: R. A. Samson & J. I. Pitt. Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*, Harwood Academic Publishers, Amsterdam.

- Comisión de Estudios del Territorio Nacional CETENAL. 1986. Precipitación y probabilidad de la lluvia en la República Mexicana y su evaluación. Querétaro e Hidalgo. Serie climas. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Comisión Nacional del Agua CNA. 2004. Registro mensual de temperatura media en ° C., *En: Anuario Estadístico de Querétaro de Arteaga*. Inédito.
<http://www.queretaro.gob.mx/sedesu/deseeco/esteco/perfeco/anuest/PDF/Capitulos/C1.pdf>, agosto 2008.
- Comisión Nacional del Agua CNA. 2004. Registro mensual de precipitación pluvial en mm. *En: Anuario Estadístico de Querétaro de Arteaga*. Inédito.
- Coordinación General de los Servicios Nacionales de Estadística, Geografía e Informática CGSNEGI. 2004. Carta de climas, 1:1000 000, *En: Anuario Estadístico de Querétaro de Arteaga*.
<http://www.queretaro.gob.mx/sedesu/deseeco/esteco/perfeco/anuest/PDF/Capitulos/C1.pdf>, agosto 2008.
- Cunningham, K. I., D. E. Northup, R. M. Pollastro, W. G. Wright & E. J. LaRock. 1995. Bacteria, fungi and biokarst in Lechuguilla Cave, Carlsbad Caverns National Park, New Mexico. *Environmental Geology* 25: 2-8.
- Decostere, A., K. Hermans, T. De Baere, F. Pasmans & F. Haesebrouck. 2003. First report on *Cryptococcus laurentii* associated with feather loss in a glossy starling (*Lamprotornis chalybaeus*). *Avian Pathology* 32(3): 309-311.
- de Hoog, G. S. & J. Guarro. 1995. *Atlas of Clinical Fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures / Universitat Rovira I Virgili. Baarn.
- Di Menna, M. E. 1964. Yeasts in New Zealand Soils. *New Zealand Journal of Botany* 3: 194-203.
- Dix, N. J. & J. Webster. 1995. Fungi of soil and rhizosphere. Capítulo 7. *Fungal Ecology*. Chapman & Hall. Cambridge: 173-183.
- Dobat, K. 1996. Flore (Lichens, bryophytes, pteridophytes, spermatophytes):1311-1324. *En: C. Juberthie & V. Decu. Enciclopedia Biospeologica* TII. Société de Biospéologie, Moulis-Bucarest.
- Domsch, K. H. & W. G. Gams. 1972. *Fungi in Agricultural Soils*. Longman Group, Harlow, Essex.
- Domsch, K. H., W. G. Gams & T-H. Anderson. 1993. *Compendium of Soil Fungi*. V.I. IHW-Verlag, Londres.
- Emmons, C. W. 1949. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil. *Public Health Report* 64: 892-896.
- Field, M. S. 2002. *A Lexicon of Cave and Karst Terminology with Special Reference to Environmental Karst Hydrology*. National Center for Environmental Assessment- Washington Office, Washington.

- Frankland, J. C. 1981. Mechanism in fungal sucesions: 403-426. *En: D. T. Wiclow & G. C. Caroll (Eds.). The fungal community, its organization and role in the ecosystem.* Marcel Dekker, Nueva York.
- Galán, C. 2004. Características del ambiente hipogeo. *Boletín informativo de la Comisión de Geoespeleología.* Federación Espeleológica de América Latina y el Caribe 48: 2-9.
- García, E. 1981. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana. 3ª ed. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Giller, P. S. 1996. The diversity of soil communities, the "poor man's tropical rainforest". *En: Biodiversity and Conservation.* Springer Neatherlands (Eds) 5 (2): 135-168.
- Goodman, N. L. & H. W. Larsh. 1966. Environmental factors and growth of *Histoplasma capsulatum* in soil. *Mycopathologica et Mycologia Applicata* 33: 145-156.
- Grishkan I., E. Nevo & S. P. Wasser. 2003. Micromycetes from the Saline Arubotaim Cave: Mount Sedom, The Dead Sea Southwestern Shore, Israel. *Journal of Arid Environments* 57 (4): 431-443.
- Gunde-Cimerman, N., P. Zalar & S. Jeram. 1998. Mycoflora of cave cricket *Troglophilus neglectus* cadavers. *Mycopathologia* 141: 111-114.
- Hall, T. 2007. BioEdit v.7.0.9.0. <http://www.mbio.nesu.edu/BioEdit/>, agosto 2008.
- Harrigan, W. F. & M. E. McCance. 1957. *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology.* Academic Press, Londres.
- Herrera, T. & M. Ulloa. 1990. *El Reino de los Hongos. Micología básica y aplicada.* UNAM / Fondo de Cultura Económica.
- Høeg, O. A., 1946. Cyanophyceae and bacteria in calcareous sediments in the interior of limestone caves in Nord-Rana, Norway. *Nytt Magazin for Naturvidenskapene* 85: 99-104.
- Hoffmann, A. & J. G. Palacios-Vargas. 1978. *Introducción al Estudio de la Bioespeleología de la primera sección de la Cueva del Diablo, Tepoztlán, Morelos.* Biología de Campo, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Hoffmann, A., J. G. Palacios-Vargas & J. B. Morales-Malacara. 1986. *Manual de Bioespeleología, con nuevas aportaciones para Morelos y Guerrero, México.* Dirección General de Publicaciones, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática INEGI. 1986. Síntesis geográfica, Nomenclator y Anexo cartográfico del Estado de Querétaro.
- Ito, Y., S. W. Peterson, D. T. Wicklow & T. Goto. 2001. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycological Research* 105 (2): 233-239.
- Kendrick, W. B. & D. Parkinson. 1990. Soil Fungi: 49-68. *En: D. L., Dindal. Soil Biology Guide.* John Wiley & Sons. Nueva York.

- Kirk, J. L., L. A. Beaudette, M. Hart, P. Moutoglis, J. N. Klironomos, H. Lee & J. T. Trevors. 2004. Methods of studying microbial diversity. *Journal of Microbiology Methods* 54: 169-188.
- Klich, M. A. 2002. *Identification of common Aspergillus species*. Centraalbureau voor Schimmelcultuur, Utrecht.
- Koilraj, J. A., G. Marimuthu, K. Natarajan, S. Saravanan, P. Maran & M. J. Hsu. 1999. Fungal diversity inside caves of southern India. <http://144.16.79.155/currsci/oct25/articles25.htm>, agosto 2008.
- Kornerup, A. & J. H. Wanscher. 1967. *Methuen Handbook of Colour*. 3rd ed. Eyre Methuen. Londres.
- Kreger-van Rij, N. J. W. 1984. *The Yeasts, A Taxonomy Study*. 3rd ed. Elsevier Amsterdam.
- Kurtzman, C. P., H. P. Phaff & S. A. Meyer. 1983. Nucleic acid relatedness among yeasts: 139-166. *En: J. F. T. Spencer, D. M. Spencer & A. R. W. Smith (Eds.). Yeasts Genetics. Fundamental and applied aspects*. Springer-Verlag, Nueva York.
- Kurtzman, C. P. & J. W. Fell. 1998. *The Yeasts, A Taxonomic Study*. 4th ed. Elsevier, Amsterdam.
- Kurtzman, C. P. & C. J. Robnett. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 331-371.
- Lachance, M. A., W. T. Starmer & H. J. Phaff. 1988. Identification of yeasts found in decaying cactus tissue. *Canadian Journal of Microbiology* 34: 1025-1036.
- Lachance, M. A. & W. T. Starmer. 1998. Ecology and yeasts. Capítulo IV. *En: C. P. Kurtzman & J. W. Fell (Eds). The Yeasts, A Taxonomic Study*, 4th ed., Elsevier, Amsterdam: 21-30.
- Landolt, J. C., S. L. Stephenson & C. W. Stihler. 1992. Cellular slime molds in west Virginia Caves including notes on the occurrence and distribution of *Dyctyostelium rosarium*. *Mycologia* 84 (3): 399-405.
- Lazcano, S. C. 1986a. *Las Cavernas de la Sierra Gorda*. Tomo I. Universidad Autónoma de Querétaro. México.
- 1986b. *Las Cavernas de la Sierra Gorda*. Tomo II. Universidad Autónoma de Querétaro. México.
- Malloch, D., D. Grenville & J. M. Hubart. 1987. An unusual subterranean occurrence of fossil fungal sclerotia. *Canadian Journal of Botany* 65: 1281-1283.
- Malloch, D. & J. M. Hubart. 1987. An undescribed species of *Microascus* from the Cave of Ramioul. *Canadian Journal of Botany* 65: 2384-2388.
- Malloch, D. & R. S. Khan. 1988. Three fungal records from the Cave of Ramioul. *Bulletin des Chercheurs de Wallonie* 28: 189-197.
- Martini, A. 1961. La Microflora della Caverna di Monte Cucco. I^o Nota: I Blatomiceti. *Annali della Facoltà di Agraria Perugia XVI*: 87-97.
- Martini, A. 1963. Yeasts in cavern environments. *Archiv für Mikrobiologie* 45: 111-114.

- McMurray, D. N. & L. H. Russell. 1982. Contribution of bats to the maintenance of *Histoplasma capsulatum* in a cave microfocus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 31: 527-531.
- Mehta, Y. R. 2001. Molecular and pathogenic variability of *Drechslera* isolates from oats. *Fitopatologia Brasileira* 26 (3): 1-15.
- Miguel Sánchez, C. 2006. Enmiendas calizas – corrección de suelos ácidos. http://www.engormix.com/enmiendas_calizas_correccion_suelos_s_articulos_950_AGR.htm, agosto 2008.
- Mok, W. Y., R. C. C. Luizao & M. S. Barreto da Silva. 1982. Isolation of fungi from bats of the Amazon Basin. *Applied and Environmental Microbiology* 44: 570-575.
- Montagna, M.T., M. P. Santacroce, G. Caggiano, D. Tatò & L. Ajello. 2003. Cavernicolous habitats harbouring *Cryptococcus neoformans*: results of a speleological survey in Apulia, Italy, 1999-2000. *Medical Mycology* 41: 451-455.
- Morales-Malacara, J. & I. Vázquez. 1986. *Bioespeleología de algunas cuevas del estado de Querétaro*. Trabajo no publicado. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Naumova, E. S., N. N. Sukhotina & G. I., Naumov. 2004. Molecular-genetic differentiation of the dairy yeast *Kluyveromyces lactis* and its closest wild relatives. *FEMS Yeast Research* 5: 263-269.
- National Center for Biotechnology Information Database NCBI, 2008. Bethesda, Maryland. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, agosto 2008.
- Nieves-Rivera, A. M. 2003. Mycological survey of Río Camuy Caves Park, Puerto Rico. *Journal of Cave and Karst Studies* 65(1): 22-28.
- Northup, D. E., D. L. Carr, M. T. Crocker, K. I. Cunningham, L. K. Hawkins, P. Leonard & W. C. Welbourn. 1994. Biological Investigations in Lechuguilla Cave. *National Speleological Society Bulletin* 56: 54-63.
- Northup, D. E., K. H. Lavoie & L. Mallory. 1977. Microbes in Caves. *National Speleological Society News* 55(4): 111.
- Northup, D. E., C. N. Dahm, L. A. Melim, M. N. Spilde, L. J. Crossey, K. H. Lavoie, L. M. Mallory, P. J. Boston, K. I. Cunningham, S. M. Barns. 2000. Evidence for Geomicrobiological interactions in Guadalupe caves. *Journal of Cave and Karst Studies* 62(2): 80-90.
- Northup, D. E. & K. H. Lavoie. 2001. Geomicrobiology of Caves: a review. *Geomicrobiology Journal* 18: 199-222.
- Olalde, A. M. 2003. *Aislamiento e identificación de cepas de levaduras marinas en columna de agua y sedimento en una zona coralífera en Cozumel, Quintana Roo, México. Un estudio polifásico*. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

- Orpurt, P. A. 1964. The Microfungal Flora of bat cave soils from Eleuthera Island, The Bahamas. *Canadian Journal of Botany* 42: 1629-1623.
- Ortiz-Villanueva, B. & C. A. Ortiz-Solorio. 1990. *Edafología*. Universidad Autónoma de Chapingo Texcoco. Departamento de Suelos.
- Patterson, T. F. & M. R. McGinnis. 2007. *Doctor Fungus* website. www.doctorfungus.org, agosto 2008.
- Peterson, S. W., E. M. Bayer & D. T. Wicklow. 2004. *Penicillium thiersii*, *Penicillium angulare*, and *Penicillium decaturense*, new species isolated from wood-decay fungi in North America and their phylogenetic placement from multilocus DNA sequence analysis. *Micologia* 96 (6): 1280-1293.
- Phaff, H. J., M. W. Miller & E.M. Mrak. 1978. *The Life of Yeasts*. Harvard University Press. Cambridge.
- Pitt, J. I. 1979. *The Genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces*. Academic Press. Londres.
- Pitt, J. I. 1985. *A laboratory guide to common Penicillium species*. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Research. North Ryde.
- Raper, K. B. & D. I. Fennell. 1977. *The Genus Aspergillus*. Robert E. Krieger Publishing Company Huntington, Nueva York.
- Reddell, J. R. 1981. A review of the cavernicole fauna of Mexico, Guatemala and Belize. *Bulletin of the Texas Memorial Museum* 27: 69-70.
- Reeves, W. K., J. B. Jensen & J. C. Ozier. 2000. New Faunal and Fungal Records from Caves in Georgia, USA. *Journal of Cave and Karst Studies* 62(3): 169-179.
- Robert, V., G. Stegehuis & J. Stalpers. 2005. The MycoBank engine and related databases. <http://www.mycobank.org>, agosto 2008.
- Romer-Rassing, B. y H. Gürtler. 2000. The potencial of *Penicillium* and *Aspergillus* in drug lead discovery: 495-499. *En*: R. A. Samson & J. I. Pitt. *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Rutherford, J. M. & L. H. Huang. 1994. A study of fungi of remote sediments in west Virginia caves and a comparison with reported species in the literature. *Journal of Cave and Karst Studies* (NSS Bull.) 56 (1): 38-45.
- Samson, R. A. & J. I. Pitt. 2000. *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Santos Chona, O. M. 1999. Importancia y efectos de la aflatoxina en los seres humanos. *MedUNAB*; 2(6): 124-129.
- Sigala, I. 2008. *Registro protozoológico en cinco biotopos de la Cueva de los Riscos, Querétaro, México*. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

- Simons M. 2007. Fungus once again threatens french cave paintings. *The New York Times*.
<http://www.nytimes.com/2007/12/09/world/europe/09cave.html>
- Singer, M. J. & D. N. Munns. 1991. *Soils an Introduction*. Macmillan Publishing Company. Republica de Singapur.
- Sláviková, E. Diversity of yeasts and yeast-like organisms in agricultural soil – their activity and survival. Slovak Academy of Sciences (en prensa).
- Sugita, T., K. Kikuchi, K. Makimura, K. Urata, T. Someya, K. Kamei, M. Niimi & Y. Uehara. 2005. *Trichosporon* species isolated from guano samples obtained from bat-inhabited caves in Japan. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (11): 7626-7629.
- Tapia-Tussell, R., P. Lappe, M. Ulloa, A. Quijano-Ramayo, M. Cáceres-Farfán, A. Larqué-Saavedra & D. Perez-Brito. 2006. A rapid and simple method for DNA extraction from yeasts and fungi isolated from *Agave fourcroydes*. *Molecular Biotechnology* 33: 67-70.
- Ulloa, M., P. Lappe, S. Aguilar, A. Pérez-Mejía, C. Toriello & M. L. Taylor. 1998a. Levaduras asociadas con el hábitat natural de *Histoplasma capsulatum* en Guerrero, México. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias México* 11(3): 162-172.
- 1998b. Hongos filamentosos asociados con el hábitat natural de *Histoplasma capsulatum* en Guerrero, México. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias México* 11(3): 173-182.
- Ulloa, M., P. Lappe, S. Aguilar, H. Park, A. Pérez-Mejía, C. Toriello & M. L. Taylor. 2006. Contribution to the knowledge of the mycobiota present in the natural habitats of *Histoplasma capsulatum*: an integrative study in Guerrero, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 77: 153-168.
- Ulloa, M. & R. T. Hanlin. 2006. *Nuevo Diccionario Ilustrado de Micología*. American Phytopathological Society St. Paul.
- Van Reeuwijk, L. P. 2002. *Procedures for soil analysis*. 6th ed. International Soil Reference and Information Centre, ISRIC. Holanda.
- Vaughan-Martini, A., P. Angelini & L. Zacchi. 2000. The influence of human and animal visitation on the yeast ecology of three Italian caverns. *Annals of Microbiology* 50: 133-140.
- Volz, P. A. & Ji Ping Yao. 1991. Micro-fungi of the Hendrie River Water Cave, Mackinac County, Michigan. *National Speleological Society Bulletin* 53: 104-106.
- Walkley, A. & I. A. Black. 1934. An examination of the method for determining soil organic matter and proposed modification of the chromi acid titration method. *Soil Science* 37:29.
- Waynant, R. W. & M. N. Ediger. 2000. *Electro-Optics Handbook*. 2^a ed. McGraw Hill.
http://www.burle.com/cgi-bin/byteserver.pl/pdf/Electro_Optics.pdf, agosto 2008.
- Wild, A. 1994. *Soils and the Environment: An Introduction*. Cambridge University Press. Gran Bretaña.

- Wuczkowski, M., K. Sterflinger, G. F. Kraus, B. Klug & H. Prillinger. 2003. Diversity of microfungi and yeasts in soils of the alluvial zone national park along the river Danube downstream of Vienna, Austria ("Nationalpark Donauauen"). *Die Bodenkultur* 54(2): 109-117.
- Yarrow, D. 1998. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. Capítulo 11. *En: The yeasts, A taxonomic Study*, 4th ed. C. P. Kurtzman & J. W. Fell (Eds.). Elsevier, Amsterdam: 77-105.

11. APÉNDICE

11.1. MEDIOS DE CULTIVO PARA CRECIMIENTO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Penicillium*, *Aspergillus* Y LEVADURAS

PDA: Papa-dextrosa-agar: infusión de 300 g de papa blanca pelada y cortada en cuadros en 1000 ml de agua, pasada a través de una doble capa de manta de cielo. Agregar 20 g de glucosa y 20 g de agar bacteriológico (Bioxon, México), aforar a 1000 ml con agua destilada (Booth, 1971).

DRBC: Diclorán-rosa de Bengala-cloranfenicol-agar: 31.6 g de DRBC Difco (Michigan), 10 g de agar bacteriológico en 1000 ml de agua destilada.

La fórmula del DRBC consiste en: 5 g de proteosa peptona No.3, 10g de dextrosa, 1 g de fosfato monopotásico, 0.5 g de sulfato de magnesio, 2 mg de dicloran, 25mg de rosa de Bengala, 1 g de cloranfenicol y 15 g de agar (indicaciones del fabricante).

GELPA: Glucosa-extracto de levadura-peptona-agar: 20 g de glucosa, 10 g de peptona, 5 g de extracto de levadura, 20 g de agar bacteriológico (Bioxon) en 1000 ml de agua destilada. El medio GELP es el mismo sin agar.

Para la acidificación del medio: una vez frío (40° C), después de haber sido esterilizado, se añade gota a gota una solución de HCl 1N hasta obtener una solución con pH 3.5 (Lachance *et al.*, 1988).

AMC: Agar micobiótico (Bioxon): 10 g de peptona de soya (Bioxon), 10 g de dextrosa, 20 g de agar bacteriológico, 0.1 g de cicloheximida, 0.1 g de cloranfenicol en 1000 ml de agua destilada (indicaciones del fabricante).

CZA: Czapek Dox-Agar: 48 g de medio Czapek Dox-Agar (Merck, Darmstadt, Alemania) (30 g de sacarosa, 3 g de nitrato de sodio, 0.5 g de sulfato de magnesio, 0.5 de cloruro de potasio, 0.01 g de sulfato de ferroso, 1 g de fosfato dipotásico). Añadir 14 g de agar bacteriológico en 1000 ml de agua destilada (indicaciones del fabricante).

Concentrado de Czapeck: 30 g de nitrato de sodio, 5 g de cloruro de potasio, 5 g de sulfato de manganeso y 0.1 g de sulfato ferroso, en 100 ml de agua destilada (Pitt, 1979).

Agua Agar + Tween 80: 2 g de agar bacteriológico (Bioxon), 0.5 g de detergente polisorbitán 80 (Tween 80) en 1000 ml de agua destilada (Harrigan & McCance, 1957; Pitt, 1979).

EMA: Extracto de Malta agar: 20 g de extracto de malta (Difco), 1 g de peptona, 20 g de glucosa, 20 de agar bacteriológico (Bioxon) en 1000 ml de agua destilada (Pitt, 1979).

G25N: Glicerol nitrato agar: 0.75g de K_2HPO_4 (fosfato dipotásico), 7.5 g de concentrado de Czapeck, 3.7 g de extracto de levadura (Bioxon), 250 g de glicerol, 12 g de agar bacteriológico (Bioxon) en 750 ml de agua destilada (Pitt, 1979).

Mc Clary Agar: 1 g de Glucosa (Bioxon), 1.8 g de cloruro de potasio, 8.2g de acetato de sodio trihidratado, 2.5 g de extracto de levadura (Bioxon), 15 de agar bacteriológico (Bioxon) en 1000 ml de agua destilada (Yarrow, 1988).

Sabouraud Dextrosa Broth (Difco): 10 g de neopeptona (Difco), 20 g de dextrosa, 5 g de extracto de levadura (Bioxon), 30 g de Sabouraud (Difco), 20 g de agar bacteriológico (Bioxon) (Yarrow, 1988).

Glucosa 50%: 50 g de glucosa, 100 ml de agua destilada, 0.5 g de extracto de levadura, 2 % de agar bacteriológico (Bioxon) (Yarrow, 1988).

Para la prueba DBB: Azul de diazonio (Hagler & Ahearn, 1981): disolver 15 mg de colorante azul de diazonio en 15 ml de buffer Tris 0.25 M frío, pH 7 (Yarrow, 1988).

Carbón-base urea-agar: Disolver 11.7 g de base de carbón levadura (Bacto, Australia), 0.2 g de fuccina ácida, y 20 g de agar bacteriológico (Bioxon) en 900 ml de agua destilada. Esterilizar y añadir 100 ml de solución de urea al 20% (microfiltrada) utilizando un agitador magnético (Yarrow, 1988).

Christensen Urea Agar: 1 g de peptona, 5 g de cloruro de sodio, 2 g H_2PO_4 (fosfato inorgánico), 12 mg de Rojo Fenol, 20 g de agar bacteriológico (Bioxon), ajustar a pH 6.8 (Yarrow, 1988).

*Todos los medios de cultivo se esterilizan a 20 lbs de presión Y 120° C durante 15 minutos.

11.2. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO TOTAL

Técnica de extracción para *Fasciola hepatica* de G. Ballesteros Rodea, modificada en el rompimiento de la célula.

1. Se inocula el hongo en medio GELP y se incuba a 27° C en agitación a 100 rpm. Después de 72 h se extrae una esfera (pellets) de micelio. Las levaduras pueden también inocularse en medio sólido (PDA, EMA, GELPA, Sabouraud) y tomar la muestra a las 48 ó 72 h de crecimiento con un asa de cultivo estéril.
2. La muestra se trata con cualquiera de los siguientes métodos hasta quedar como polvo fino o una mezcla líquida homogénea^a:
 - a. Congelación con nitrógeno líquido en morteros estériles.
 - b. Extracción mecánica utilizando pistilos estériles y macerando en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.
 - c. Extracción mecánica con municiones de cobre en un tubo estéril de 15 ml, se agita en vórtex a máxima velocidad por 5 min. Posteriormente se centrifuga a 13000 rpm por 5 min.
 - d. Extracción mecánica con perlas de vidrio 425-600 µl (Sigma) en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml, se agita en vórtex a máxima velocidad por 5 min.
3. Se transfiere la muestra macerada a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.
4. Agregar 30 µl de sodio dodecil sulfato (SDS) al 10%, 6 µl de proteinasa K 20 mg/ml (Fermentas, Ontario, Canadá) y 6 µl de RNAsa 10 mg/ml (Amresco, Ohio, E.U.A). Incubar en baño María durante 1 hora a 37° C.
5. Agregar 100 µl de NaCl 5M y 80 µl de CTAB/NaCl (Bromuro de cetiltrimetilamonio con cloruro de sodio) e incubar a 65° C durante 10 min.
6. Agregar cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 (4° C) en volumen igual al que se tiene en el tubo, aprox. 700 µl. Mezclar agitando el tubo suavemente y dejando escapar los vapores. Centrifugar por 5 min a 14000 rpm. El sobrenadante se pasa a otro tubo de microcentrífuga.
7. Agregar un volumen igual de una solución de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico 25:24:1 (4° C) respectivamente. Mezclar y centrifugar por 5 min a 14000 rpm. El sobrenadante se pasa a otro tubo.
8. Agregar 60% del volumen que hay en el tubo con isopropanol (alcohol isopropílico) -20° C. Mezclar y centrifugar a 14000 rpm por 5 min. Decantar el sobrenadante dejando el pellet en el fondo.

^a Cualquiera de las cuatro técnicas de maceración pueden ser utilizadas tanto para mohos como para levaduras. Sin embargo en el presente estudio se observó que el nitrógeno líquido y los pistilos son más efectivos en mohos, mientras que las municiones de cobre y las perlas de vidrio funcionan mejor para levaduras.

9. Lavar por duplicado con etanol a 70% (-20° C) y centrifugar por 5 min a 14000 rpm. Decantar el sobrenadante
10. Secar el pellet a temperatura ambiente en vacuofuga (Eppendorf, Hamburg, Alemania).
11. El DNA obtenido se resuspende con 50 µl de Tris-HCl 1Mm-EDTA 1Mm, buffer pH 7.6, y se conserva a 4° C para la reacción de PCR y purificación, y en -20° C para su almacenamiento a largo plazo.