

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE
MICROMICETOS DE SEDIMENTOS MARINOS DE LA BAHÍA DE
LORETO, BCS, MÉXICO**

T E S I S

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

SOPHIA GONZÁLEZ MARTÍNEZ

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. JUNIO 2016

Dedicatoria

A mi hija Michelle Terrazas González y a mi esposo Eduardo

Terrazas Lugo, gracias por todo su apoyo y por sacrificarse

conmigo para que yo pueda lograr mis sueños. Son mi

motor, los amo

Agradecimientos

A mi directora de tesis la Dra. Amelia Portillo López, por ser un gran apoyo en todos los sentidos, por todas las enseñanzas recibidas, tiempo, paciencia y llamadas de atención para la realización de este trabajo.

A la Dra. Irma Esthela Soria Mercado, por financiar parte de este trabajo de investigación así como por brindarme sus atinados comentarios y recomendaciones.

A la Dra. Nahara Ernestina Ayala Sánchez, por brindarme su tiempo y conocimientos de los hongos, así como por sus recomendaciones para que este trabajo fuera exitoso.

Al M en C. Héctor Eduardo Arellano por su tiempo y apoyo para la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca recibida para cursar este programa de posgrado.

A mi padre Ing. Jorge M. González y Vicente por todo su amor y apoyo incondicional que me han llevado hasta este punto de mi carrera profesional.

A mi madre Amalia Martínez Aguilar, que siempre me brindo sus sabios consejos y me impulsó a seguir adelante para lograr mis metas.

Este trabajo fue financiado en parte en el proyecto: Producción de principios activos de alto valor agregado a partir de hongos medicinales y evaluación de su aplicabilidad en el sector alimentario y farmacéutico, clave C0011-CONACYT-CDTI-188920.

Resumen

La biodiversidad de hongos marinos como precursores de productos biotecnológicos se encuentra poco estudiada en comparación con su contraparte terrestre que ha sido ampliamente utilizada como recurso de compuestos bioactivos. Dada su importancia, en este trabajo se presenta el primer reporte de los componentes fúngicos de sedimentos marinos provenientes de veintiséis estaciones del Golfo de California, México. Los micromicetos fueron cultivados en medio de extracto de levadura, peptona y dextrosa. Se seleccionaron diecisiete hongos halotolerantes o halófitos los cuales fueron identificados molecularmente utilizando las secuencias intergénicas del gen 5.8S ribosomal. También se determinaron las propiedades antibacterianas de las cepas seleccionadas. Los micromicetos identificados pertenecen a las Divisiones Ascomycota y Basidiomycota (16 y 1 cepas, respectivamente). De las cepas aisladas: *Cladosporium sp* representó un 29%, *Aspergillus sp* un 24%, *Talaromyces sp* un 12% y 6 cepas representaron 0.6% cada una. Dos micromicetos demostraron actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. El trabajo realizado permitió ampliar el conocimiento de la diversidad fúngica de sedimentos marinos mexicanos y se remarca la necesidad continuar el estudio de la diversidad fungal marina en la búsqueda de nuevos medicamentos.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MICROMICETOS DE
SEDIMENTOS MARINOS DE LA BAHÍA DE LORETO, BCS, MÉXICO

T E S I S

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

SOPHIA GONZÁLEZ MARTÍNEZ

APROBADA POR:



Dr. Amelia Portillo López
Director de tesis



Dra. Irma Esthela Soria Mercado
Sinodal



Dra. Nahara Ernestina Ayala Sánchez
Sinodal

Índice

Resumen.....	III
Lista de tablas.....	VII
Lista de figuras.....	VIII
I. Introducción.....	1
II. Antecedentes.....	6
III. Justificación.....	15
IV. Objetivos.....	16
<i>IV.I. Objetivo General.....</i>	<i>16</i>
<i>IV.II. Objetivos Particulares.....</i>	<i>16</i>
V. Hipótesis.....	17
VI. Materiales y Métodos.....	18
<i>VI.I. Área de estudio.....</i>	<i>18</i>
<i>VI.II. Toma de muestras.....</i>	<i>18</i>
<i>VI.III. Preparación de sedimentos.....</i>	<i>21</i>
<i>VI. IV. Aislamiento e identificación molecular de micromicetos.....</i>	<i>21</i>
VI.IV.I. Aislamiento de cepas.....	21
VII.IV.II. Observación morfológica.....	23
VI.IV.III Extracción de ADN.....	24
VI.IV.IV Amplificación de ITS.....	25
VI.IV.V Análisis Filogenético.....	26
<i>VI.V. Pruebas antibacterianas.....</i>	<i>27</i>
VII. Resultados.....	29
VIII. Discusión.....	35

IX. Conclusiones	40
X. Apéndice I: Catalogo fotográfico de las cepas identificadas	41
X. Literatura Citada	55

Lista de tablas

Número		Página
I	Relación de trabajos de hongos identificados por métodos tradicionales y por microscopía, de 1964 al 2006	6
II	Micromicetos identificados en México	10
III	Compuestos bioactivos derivados de micromicetos marinos	13
IV	Coordenadas y profundidad de las estaciones de muestreo	19
V	Números de acceso proporcionados por el Gene Bank de las cepas aisladas	27

Lista de figuras

Número		Página
1	Estaciones de muestreo (Google, 2016)	20
2	Controles ambientales colocados en la mesa de trabajo del laboratorio en medio YEPD: a) preparado con agua destilada; b) preparado con 50% de agua de mar y 50% de agua destilada	22
3	Cultivo de hongos en Microplaca con YEPD agar	24
4	Número de colonias aisladas por estación de muestreo	29
5	Relación del porcentaje de cepas aisladas y su tolerancia de crecimiento en agua de mar: No halófitas.- sin tolerancia a crecer en agua de mar; ligeramente halotolerantes.- capaces de crecer en medio con 50% de agua de mar o menos; halotolerantes.- capaces de crecer en medio con agua destilada y en medio con 100% agua de mar y halófitas.- solo crecen en medio con 100% agua de mar	30
6	Frecuencia (%) de géneros identificados	31
7	Árbol filogenético de las cepas identificadas molecularmente por medio de los cebadores ITS1/ITS2	32
8	Árbol filogenético de las cepas identificadas molecularmente por medio de los cebadores UN-SSU-817/NS4	33
9	Cepas de hongos mostrando susceptibilidad bacteriana frente a <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> y <i>P. aeruginosa</i> . Como control positivo se tomó a la cepa AMB ubicada en el cuadrante izquierdo superior, perteneciente al género <i>Penicillium</i>	34

I. Introducción

La vasta extensión oceánica provee un medio ambiente único, responsable de una gran diversidad biológica de organismos (Moghadamtousi *et al.*, 2015). El medio ambiente marino constituye un 70% de la extensión de la tierra y contiene el 95% de la diversidad biológica del planeta (De La Calle, 2007). La biosfera del subsuelo marino es uno de los ecosistemas menos estudiados, particularmente con relación a los microorganismos que lo habitan (Whitman *et al.*, 1998), menos del 0.1% de las especies de microorganismos marinos son conocidas (Moghadamtousi *op. cit.*). Estimaciones de la biomasa global indican que la biosfera del subsuelo marino puede comprender una décima parte de la biomasa total de la tierra, (Whitman *op. cit.*). En este contexto los microorganismos marinos comprenden un 90% de esta biomasa (Andreakis *et al.*, 2015). Se sabe que las técnicas clásicas de cultivo desestiman la biodiversidad microbiana que se encuentra en condiciones naturales, esto es debido a que muchos de los organismos no se han podido cultivar ya que aún no se han establecido las condiciones adecuadas para su crecimiento. La riqueza en la biodiversidad marina ha sido demostrada mediante el análisis del ADN purificado de muestras marinas. Sin embargo, los cultivos puros siguen siendo esenciales para el estudio de la fisiología de los organismos y de los procesos bioquímicos que ocurren en los subsuelos marinos (Toffin, 2004; Joint *et al.*, 2010).

En el mar profundo encontramos un medio ambiente extremo, el cual está

caracterizado por la ausencia de irradiación solar, bajas temperaturas y una presión hidrostática elevada. No obstante a pesar de estas condiciones extremas, se sabe que la vida es abundante en este ambiente (Nagahama y Nagano, 2012). Son estas condiciones extremas las que pueden influir en la diversidad genética y metabólica de los organismos, los cuales todavía se desconocen (Carvalhais *et al.*, 2012; Manivasagan *et al.*, 2013). Existen algunos estudios de micromicetos marinos de aguas poco profundas como zonas costeras y manglares sin embargo, el conocimiento de estos hongos en el mar profundo es aun limitado (Nagaham y Nagno *op. cit.*).

Los microorganismos marinos se pueden subdividir en residentes, que son aquellos que se encuentran completamente adaptados y requieren del medio ambiente marino para completar su ciclo de vida y los organismos transitorios, los cuales han sido acarreados ya sea por aire, agua o tierra y son capaces de sobrevivir tolerando las condiciones marinas. Específicamente para los micromicetos, podemos catalogarlos como: marinos obligados; aquellos que pueden crecer y esporular exclusivamente en medio marino o de estuario y los micromicetos marinos facultativos; pueden crecer también en agua dulce y hábitats terrestres (Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1972). En cuanto a los hongos marinos obligados las evidencias apuntan a que estos son hongos terrestres que han colonizado los hábitats marinos llegando a adaptarse a estas condiciones. Hasta el 2012 se conocían cerca de 530 especies de hongos marinos obligados, la mayoría encontrados en material de lignocelulosa en

descomposición proveniente de ambientes costeros, algunos otros han sido encontrados en madera en descomposición proveniente del mar profundo. Los hongos facultativos provienen de especies terrestres, estos se han aislado de una amplia variedad de ambientes marinos. Se cree que estas especies terrestres se han adaptado a las condiciones marinas pudiendo tener propiedades bioquímicas especiales (Raghukumar *et al.*, 2010).

Se ha visto que los hongos marinos poseen una gran variedad de estrategias para poder colonizar diferentes hábitats así como una amplia diversidad en sus ciclos de vida, los cuales pueden incluir organismos de vida libre, parásitos y simbioses. Aunque el papel ecológico de los hongos marinos es poco comprendido, se sabe que están implicados en la degradación de la materia orgánica, proveen protección química, patogenicidad y simbiosis a la diversa comunidad halobionte, entre otras relaciones (Andreakis *et al.*, *op. cit.*).

Las adaptaciones fisiológicas y bioquímicas que los micromicetos marinos han desarrollado pueden ser relevantes para la industria biotecnológica, por lo que han surgido como un recurso prominente de productos naturales nuevos ya sea en procesos de fermentación, biorremediación (degradación de hidrocarburos, absorción de metales pesados, entre otros), producción de biosurfactantes y polisacáridos, producción de omega 3 como complemento alimenticio, así como también su potencial terapéutico por su producción de metabolitos secundarios, de los cuales se han logrado obtener antibióticos, anticancerígenos, anti-protistas, antivirales, entre otros (Damare *et al.*, 2003).

A pesar del papel ecológico y creciente importancia en la biotecnología, la filogenia fúngica y su sistemática se encuentran ampliamente inexploradas. Antes de la década de los 80s, la clasificación de los hongos dependía tradicionalmente de las características sexuales, morfológicas y fisiológicas, muchas de las cuales son inestables en condiciones de cultivo (Andreakis *op. cit.*).

A partir de la introducción de técnicas moleculares, se ha logrado una amplia identificación de los microorganismos. Los marcadores moleculares para la identificación de hongos más utilizados son las secuencias intergénicas del gen 5.8S rARN conocidos como ITS (por sus siglas en inglés; Internal Transcribed Spacer), el gen 18S rARN de la subunidad pequeña ribosomal conocido como SSU (por sus siglas en inglés; Small Subunit) y el gen 28S rARN de la subunidad grande ribosomal conocido como LSU (por sus siglas en inglés; Large Subunit). Los ITS y SSU se utilizan para determinar filogenia y los LSU solos o combinados con ITS se utilizan para diferenciar entre especies. Actualmente hay cerca de 172,000 secuencias fúngicas de ITS depositadas en la base de datos del Gene Bank, de ellas 56% se encuentran asociadas con el nombre binomial en latín (15,500 especies y 2,500 géneros). Las secuencias sin nombre binomial pertenecen a muestras ambientales (Schoch *et al.*, 2011).

A pesar del avance en la identificación molecular de los micromicetos, es importante establecer las propiedades metabólicas y el potencial de la diversidad de estos organismos, lo cual aún presenta un gran desafío si no se

cuenta con cultivos puros (Zengler, 2002).

Debido a la importancia de la identificación de micromicetos marinos, el objetivo de este estudio es aislar por medio de cultivo e Identificar molecularmente micromicetos marinos provenientes del Golfo de California y detectar su posible potencial antibiótico.

II. Antecedentes

La presencia de los hongos en el ambiente marino comenzó a estudiarse desde 1905 por Petersen, desde entonces se ha tratado de estimar la diversidad y comprender el papel ecológico que estos representan en los diferentes nichos marinos (Jebaraj *et al.*, 2012). En la tabla I se presenta una relación de los trabajos de identificación de hongos marinos que se han realizado por técnicas tradicionales y microscopía de 1905 al 2006. Se estima que con los estudios convencionales utilizando aislamientos de cultivos solo se han podido aislar un 5% del total de la diversidad de hongos en estos ambientes, debido probablemente a inhabilidad para crecer y esporular bajo condiciones de laboratorio (Jebaraj *et al.*, *op. cit.*).

Tabla I. Relación de trabajos de hongos identificados por métodos tradicionales y por microscopía, de 1964 al 2006

Año	Autor	Tipo de estudio
1905	Petersen H. E.	Contribución al conocimiento de micromicetos presentes en la columna de agua marina
1934	Sparrow F. K. J.	Observación de Micromicetos marinos presentes en la columna de agua marina en Dinamarca
1936	Sparrow F. K. J.	Micromicetos presentes en aguas marinas de Woods Hole en Massachusetts
1944	Barghoorn E. y Linder D.	Taxonomía y biología de hongos marinos
1964	Roth F J <i>et al.</i>	Ocurrencia y distribución de micromicetos presentes en la columna de agua marina profunda de ambientes subtropicales
1972	Kohlmeyer J y Kohlmeyer E	Micología marina
1980	Gessner R.	Enzimas degradadoras presentes en micromicetos de esteros

1986	Koch J.	Hongos marinos lignícolas de Tailandia
1986	Zainal A. y Jones, E. B. G	Aparición y distribución de hongos lignícolas de aguas costeras de Kuwait
1988	Borse S.	Frecuencia de la aparición de hongos marinos en la costa de Maharashtra, India
1988	Hyde K. D.	Estudio de hongos marinos provenientes de diversos sustratos provenientes del mar de Brunei
1992	Raghukumar C. <i>et al.</i>	Hongos endolíticos de sustratos calcáreos de mar profundo provenientes del mar de la India
1992	Hyde K. D.	El efecto de la incubación en la aparición de hongos marinos colectados al azar de muestras de lignocelulosa
1993	Steinke T. D. y Jones E. B. G.	Hongos marinos y de manglar de las costas de la India del mar de Sud África
1994	Raghukumar C. <i>et al.</i>	Componentes fungales presentes en detritus marinos de mangle de Goa, India
1996	Ravikumar D. R. y Vittal B. P. R.	Diversidad fungal de biomasa en descomposición de mangle de los estuarios de la costa este de la India
1997	Prasannari K. y Sridhar K. R.	Efecto del periodo de la incubación en la aparición de hongos de madera flotante
1998	Raghukumar C. y Raghukumar S.	Barotolerancia de hongos aislados de sedimentos marinos profundos del mar de la India
1997	Takami H. <i>et al.</i>	Micromicetos presentes en lodos de mar profundo provenientes de fosas de Las Marianas (11,500 m de profundidad)
2000	Sarma V. V. y Vittal B. P. R.	Biodiversidad de hongos de mangle de los deltas Godavari y Krishna en la costa este de la India
2000	Jones E. B. G 2000	Factores que influyen en la biodiversidad de hongos marinos
2001	Sarma V. V. <i>et al.</i> , 2001	Frecuencia de aparición de hongos de mangle provenientes de la costa este de la India
2003	Prasannari K. y Sridhar K. R.	Abundancia y diversidad de hongos marinos presentes en desechos de madera intermareales, después de una prolongada incubación provenientes de la costa oeste de la India
2004	Raghukumar C <i>et al.</i>	Micromicetos cultivables de sedimentos marinos profundos del mar de la India
2006	Damare S <i>et al.</i>	Micromicetos provenientes de sedimentos marinos profundos de la cuenca central de la India (aproximadamente a 5,000 m de profundidad)

Mediante cultivos tradicionales se han logrado aislar micromicetos que pertenecen a los Phyla Ascomycota y Basidiomycota sin embargo, las técnicas independientes de cultivo han revelado la presencia de nuevos filotipos, incluyendo grupos fúngicos ancestrales desconocidos (Nagahama y Nagano *op. cit.*).

Jones (2011) estima cerca de 10,000 taxas de hongos marinos provenientes de los sedimentos de las diferentes profundidades oceánicas, columna de agua, plancton y hongos no cultivables (secuencias ambientales), lo anterior sin considerar a los hongos endófitos y levaduras. Estos hongos habían sido clasificados anteriormente como facultativos o derivados marinos. Hibbett y colaboradores (2009) realizaron un análisis de datos de tres publicaciones en el que calcularon que hay cerca de 1,120 posibles taxa nuevos que se encuentran aún sin identificar a partir de las secuencias de ADN obtenidas de muestras ambientales.

Se han reportado 530 especies de micromicetos marinos repartidos en 321 géneros, de los cuales, 16 son géneros nuevos. 424 especies pertenecen a la división Ascomycota (251 géneros), 12 especies a la división Basidiomycota (9 géneros) y 12 especies (9 géneros) son mitospóricos (Jones *et al.*, 2011). La mayoría de las especies se han descrito de 1980 a 1999. Del 2000 al 2011 solo se han descrito 54 especies nuevas (Fell *et al.*, 2011)

Las clases de micromicetos que han sido identificadas por medio de técnicas

independientes de cultivo en ambientes marinos profundos son: *Ascomycota*.- *Dothideomycetes*, *Eurotiomycetes*, *Leotiomycetes*, *Saccharomyces* y *Sordariomycetes* y de la división *Basidiomycota*.- *Agaricomycetes*, *Cystobasidiomycetes*, *Entorrhizomycetes*, *Exobasidiomycetes*, *Microbotryomycetes*, *Tremellomycetes*, *Ustilaginomycetes* y *Wallemiomycetes*. En comparación con los cultivos tradicionales en los que no se han podido cultivar *Agaricomycetes*, *Eterorrhizomycetes* y *Wallemiomycetes* (Nagahama y Nagano *op. cit.*).

En México existen estudios de aislamiento e identificación de hongos marinos que han sido estudiados en diferentes costas de México (Veracruz, Oaxaca, Chiapas, Yucatán, Quintana Roo, Colima, Jalisco, Nayarit, Tamaulipas, Sonora, Baja California Sur, Baja California y Guerrero) en sustratos como; mangle, espuma, madera a la deriva, madera encontrada en el rompe olas y arena (Kohlmeyer, 1968; Kohlmeyer y Kohlmeyer, 1971; Boyd y Kohlmeyer, 1982; González *et al.*, 2000 y 2001). Entre los trabajos reportados destaca el de Valderrama y colaboradores (2016) quienes recientemente publicaron un listado de hongos identificados molecularmente. En la tabla II se presentan los hongos marinos reportados en México.

Tabla II. Micromicetos identificados en México

Especie	Material de origen
Autor: Kohlmeyer J, 1968	
<i>Corrolospora maritima</i>	Espuma en la costa
<i>C. puchella</i>	Espuma en la costa
<i>C. trifurcata</i>	Espuma en la costa
<i>Didymosphaeria enalia</i>	Mangle
<i>Keisleriella blepharospora</i>	Mangle
<i>Leptosphaerella pneumatophorae</i>	Mangle
<i>Lulworthia sp</i>	Mangle
<i>Mycosphaerella pneumatophorae</i>	Mangle
<i>Paraliomyces lentiferus</i>	Mangle
<i>Remispora salina</i>	Mangle
<i>Torpedospora radiata</i>	Mangle
<i>Cirrenalia pseudomacrocephala</i>	Mangle
<i>C. pygmea</i>	Mangle
<i>Culcitalna achraspora</i>	Mangle
<i>Phoma sp.</i>	Mangle
Kohlmeyer J y Kohlmeyer E, 1971	
<i>Lentescospora submarina</i>	Espuma en mar abierto
<i>Lindra Marinera</i>	Espuma en mar abierto
<i>Torpedospora radiata</i>	Madera del rompe olas
Boyd P y Kohlmeyer J 1982	
<i>Varicosporina ramulosa</i>	Arena
González M et al., 2000	
<i>Gymnascella dankaliensis</i>	Arena
<i>Aspergillus terrus</i>	Arena
<i>A. fumigatus</i>	Arena
<i>A. flavofurcatus</i>	Arena
<i>A. recurvatus</i>	Arena
<i>A. auricomus</i>	Arena
<i>Gymnoascus sp.</i>	Arena
<i>Scopulariopsis brumtii</i>	Arena
<i>S. carbonaria</i>	Arena
<i>S. bervicaulis</i>	Arena
<i>S. parvula</i>	Arena
<i>Fusarium semitectum</i>	Arena
<i>F. solani</i>	Arena
<i>Chrysosporium</i>	Arena
tropicum	
<i>Geotrichum candidum</i>	Arena
<i>Microascus cinereus</i>	Arena
<i>Acremonium murorum</i>	Arena
<i>Artroderma curreyi</i>	Arena
González M. C et al 2001	
<i>Aniptodera chesapeakeensis</i>	Mangle
<i>Antennospora quadricornuta</i>	Madera
<i>A. Salina</i>	Detritus
<i>Arenariomyces parvulus</i>	Madera intermareal
<i>A. trifurcatus</i>	Espuma
<i>A. triseptatus</i>	Espuma
<i>Pharcidia blani</i>	Sin datos
<i>Caryospora rhizophorae</i>	Mangle
<i>Ceriosporopsis halima</i>	detritus
<i>Caryospora rizophorae</i>	Madera de mangle
<i>Ceriosporospois halima</i>	Detritus intermareal
<i>Corollospora angusta</i>	detritus
<i>C. gracilis</i>	detritus
<i>C. intermedia</i>	detritus
<i>C. pseudopulchella</i>	detritus
<i>Dactylospora haliotrepha</i>	Mangle
<i>Etheiropora blepharospora</i>	Mangle
<i>Falciformis lignatilis</i>	Mangle
<i>Halosarpheia abonnis</i>	Madera a la deriva
<i>H. marina</i>	Mangle
<i>H. cucullata</i>	Madera a la deriva
<i>Halosphaeriopsis mediosetigera</i>	Mangle
<i>Hydronectria tethys</i>	Mangle
<i>Leptosphaeria australiensis</i>	Mangle
<i>Lingnicola tropica</i>	Madera
<i>Lidna crassa</i>	Espuma
<i>L. thalassiae</i>	Mangle
<i>Lineolata rhizophorae</i>	Mangle
<i>Lulworthia grandispora</i>	Mangle
<i>L. kniepii</i>	Alga
<i>Massarina thalassiea</i>	Mangle
<i>Mycosphaerella salicorniae</i>	Mangle

<i>Ocastraspora apilongissima</i>	Madera de mangle
<i>Pontogeneia codiicola</i>	Rocas
<i>P. padinae</i>	Mangle
<i>Quintaria lignatillis</i>	Mangle
<i>Remispora galerita</i>	Sin informacion
<i>Savoyella lignigola</i>	Mangle
<i>Trematosphaeria lineolatispora</i>	Mangle
<i>Verruculina enalia</i>	Mangle
<i>Nia vibrissa</i>	Espuma
Gonzalez MC, 1998	
<i>Cladosporium cladosporoides</i>	Arena
<i>C. sphaerospermum</i>	Arena
<i>C. herbarum</i>	Arena
<i>C. tuberculata</i>	Arena
<i>Emericella nidulans</i>	Arena
<i>E. violacea</i>	Arena
<i>Aspergillus niger</i>	Arena
<i>A. flavus</i>	Arena
<i>A. pulverulentus</i>	Arena
<i>Stachybotrys chartarum</i>	Arena
<i>Drechslera biseptata</i>	Arena
<i>Trichoderma viride</i>	Arena
<i>Curvularia pallescens</i>	Arena
<i>C. senegalensis</i>	Arena
<i>C. lunata</i>	
<i>Nigrospora sphaerica</i>	Arena
<i>Halosphaeria salina</i>	Arena
<i>Varicosporina ramulosa</i>	Arena
<i>Myrothecium roridum</i>	Arena
<i>M. verrucaria</i>	Arena

<i>Aureobasidium pullulans</i>	Arena
<i>Acremonium rutilum</i>	Arena
<i>Exserohilum rostratum</i>	Arena
<i>Chrysonilia sitophila</i>	Arena
<i>Microascus trigonosporus</i>	Arena
<i>Alternaria alternata</i>	Arena
<i>A. citri</i>	Arena
<i>A. longipes</i>	Arena
<i>Neocosmospora vasinfecta</i>	Arena
<i>Zygosporium masonii</i>	Arena
<i>Dendryphiella arenaria</i>	Arena
<i>Alternaria citri</i>	Arena
<i>Rhodothorula rubra</i>	Arena
<i>Candida lusitania</i>	Arena
<i>Gilmaniella humicola</i>	Arena
<i>Graphium penicillioides</i>	Arena
<i>Cirrenalia tropicalis</i>	Arena
<i>Chaetomium globosum</i>	Arena
<i>Lasiodiplodia therbromae</i>	Arena
Valderrama B. et al., 2016	
<i>Chysoporthe sp</i>	Agua
<i>Paecilomyces sp.</i>	Agua
<i>Rozella sp</i>	Agua
<i>Chytriomyces</i>	Agua

Los micromicetos marinos son una fuente potencial de productos bioactivos. De los 465 productos marinos naturales nuevos reportados en el 2012, cerca del 60% fueron de origen fúngico (Andreakis *op. cit.*; Damare *et al.*, 2012). La mayoría de los compuestos bioactivos aislados de micromicetos marinos provinieron de muestras de algas, mangles y esponjas sin embargo, los micromicetos de sedimentos marinos han sido subestimados. De los compuestos antibacterianos y antifúngicos reportados del 2010 al 2015, 17.24%

fueron obtenidos de 11 cepas fúngicas provenientes de sedimentos marinos. Lo anterior es un indicativo de que estos sedimentos representan un material potencial para el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos de origen fúngico (Xu *et al.*, 2015). En la tabla III se muestran algunos compuestos bioactivos aislados de micromicetos marinos.

En cuanto a la diversidad fúngica productora de compuestos activos se dice que es limitada; la mayoría de los compuestos bioactivos de micromicetos marinos han sido aislados de la división Ascomycota, de las clases Euromicetes, Dothiideomicetes y Sordariomicetes (Hasan *et al.*, 2015).

Tabla III. Compuestos bioactivos derivados de micromicetos marinos

Fuente	Metabolito secundario	Actividad	Referencia
<i>Stilbella aciculosa</i>	Ácido fusídico	Antibacteriano	Kuznetsova T. A. <i>et al.</i> , 2001
<i>Aspergillus versicolor</i>	Aspergillitina	Antibacteriano	Lin <i>et al.</i> , 2003
<i>Aspergillus sp.</i>	Ácido penicílico	Micotoxina, potencial cancerígeno y mutagénico	Hou-jin L. <i>et al.</i> , 2010
	Alfaquinolona	Antiviral contra el virus sincitial respiratorio	Prieto C y Castro J. M., 2005
<i>Aspergillus terreus</i>	Arisugacina A	Antiviral contra el virus de herpes simple	Nong X. H. <i>et al.</i> , 2014
<i>Aspergillus sidowii</i>	Dicorcinol	Antiviral contra iflavirus	Wang J-F <i>et al.</i> , 2014
<i>Emericella unguis</i>	Guisinol	Antibacteriano	Nielsen J. <i>et al.</i> , 1999
<i>Emericella varicolor</i>	Varixanthone	Antibacteriano	Malstrom <i>et al.</i> , 2002
<i>Penicillium sp</i>	7-deacetoxyyanuthona A	Antibacteriano contra <i>S. aureus</i> resistente a metiliciclina y multiresistente (in vitro)	Li X. <i>et al.</i> , 2003
<i>Microsphaeropsis sp.</i>	Microsphaeropsina	Antifúngico	Holler U. (1999)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Penicitides A	Inhibidor del hongo patógeno <i>A. brassicae</i> , inhibe el carcinoma hepático in vitro	Gao S-S <i>et al.</i> , 2011
	Penicimonoterpeno	Inhibe el hongo patógeno <i>A. brassicae</i>	Gao S-S <i>et al.</i> , 2011
<i>Zopfiella latipes</i>	Zopfiellamideas A y B	Inhiben <i>Nematospira coryli</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Daferner M <i>et al.</i> , 2002
<i>Fusarium sp.</i>	Enniantina B	antibacteriano contra <i>S. aureus</i> y enterococos resistentes a vancomicina	Jiang Z <i>et al.</i> , 2002
	Neomanglicol B	Anticancerígeno	Renner M. K. <i>et al.</i> , 2000
<i>F. heterosporum</i>	Equisetina	Antiviral contra el virus de inmuno deficiencia humana (VIH)	Hazuda D <i>et al.</i> , 1999
<i>Curvularia lunata</i>	Lunatin 1	Antibacteriano	Jadulco R. <i>et al.</i> , 2002
	Cytoskyrina A2	Antibacteriano	Jadulco R. <i>et al.</i> , 2002
<i>Trichoderma virens</i>	Tricodermamida B	Citotóxico contra carcinoma de colon	Garo S-S <i>et al.</i> , 2003
<i>Cladosporium herbarum</i>	Ácido sumiriko	Antimicrobiano	Jadulco R. <i>et al.</i> , 2001
	Cladosporida B	Antibacteriano contra <i>B. subtilis</i> y <i>S. aureus</i>	Jadulco R. <i>et al.</i> , 2001
<i>Cladosporium sp.</i>	Norqunadolina A	Antiviral contra HIV	Peng J. <i>et al.</i> , 2013
<i>Halorosellinia oceanica</i>	Ácido halorosellínico	Antimalaria	Chinworrungsee M. <i>et al.</i> , 2001
<i>Ascochyta sp.</i>	Ascochyatatin	Antibacteriano	Kanoh K. <i>et al.</i> , 2008

<i>Stachybotrys sp</i>	Stachybogrisephenona B	Antiviral contra enterovirus 71	Qin C. <i>et al.</i> , 2014
<i>Phoma sp.</i>	Phomasetina	Antiviral contra VIH	Hazuda D. <i>et al.</i> , 1999
<i>Alternaria sp.</i>	Tetrahydroaltersolanol C	Antiviral contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino	Zheng C. J. <i>et al.</i> , 2012

III. Justificación

No obstante que se sabe que en los océanos se encuentra de un décimo a un tercio de las especies del planeta, el conocimiento de este hábitat es limitado. Se desconocen muchos aspectos de la diversidad microbiana marina, siendo los micromicetos u hongos marinos uno de los grupos de microorganismos menos estudiados.

Por medio de técnicas moleculares independientes de cultivo, se ha logrado identificar una gran diversidad de micromicetos marinos sin embargo, es indispensable lograr cultivar a estos microorganismos para poder realizar estudios fisiológicos, morfológicos y metabólicos, así como comprender su relación ecológica en este hábitat. El aislar e identificar micromicetos presentes en los sedimentos marinos del Golfo de California, puede ser un paso importante para ampliar el conocimiento de la diversidad de micromicetos. Así mismo es un primer paso para lograr comprender el papel que desempeñan en los nichos que ocupan y su relevancia tanto ecológica como económica. Por lo anterior, en este estudio se propone buscar y estandarizar condiciones de cultivo adecuadas para obtener y aislar micromicetos marinos provenientes del Golfo de California y posteriormente realizar su identificación por medio de técnicas moleculares y analizar su potencial antibacteriano.

IV. Objetivos

IV.I. Objetivo General

Aislar e Identificar micromicetos marinos provenientes de la Bahía de Loreto, BCS, México y determinar su posible potencial antibacteriano.

IV.II. Objetivos Particulares

1. Aislar micromicetos de sedimentos marinos de la Bahía de Loreto en BCS, México. por cultivo celular.
2. Identificar molecularmente los micromicetos aislados en cada cultivo.
3. Realizar pruebas para detectar la posible actividad antibacteriana a partir de las cepas de micromicetos aislados.

V. Hipótesis

- Se aislarán e identificarán molecularmente micromicetos marinos presentes en sedimentos del Golfo de California.
- Los micromicetos marinos mostrarán actividad antibiótica.

VI. Materiales y Métodos

VI.I. Área de estudio

El Golfo de California se encuentra en el Noreste de México, colinda con los estados de Sinaloa y Sonora por la parte Este y la península de Baja California en la parte Oeste y hacia el Sur se comunica con el Océano Pacífico (Castro *et al.*, 2000).

El parque nacional Bahía de Loreto (figura 1) protege las áreas terrestres y marinas de las islas: Coronado, Del Carmen, Danzante, Montserrat y Santa Catalina. Con una superficie de 206,508 hectáreas. Se ubica frente a las costas del municipio de Loreto en Baja California Sur y representa un tipo particular de hábitat donde concurren procesos ecológicos, comunidades biológicas y características físicas particulares, lo cual le confiere una relevancia nacional importante. Igualmente dentro de su polígono se encuentran especies de flora y fauna marina de alta relevancia biológica y económica, además de varios endemismos (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2002).

VI.II. Toma de muestras

Las muestras se tomaron de 26 estaciones de la Bahía de Loreto en las islas Danzante y Carmen, en la tabla IV, se muestran las coordenadas y la profundidad de cada estación y en la figura 1 se muestra la ubicación geográfica.

Tabla IV. Coordenadas y profundidad de las estaciones de muestreo

Estación	Latitud	Longitud	Profundidad (m)
1	25.806369°N	111.169548°W	
2	25.825271°N	111.182991°W	261
3	25.826609°N	111.186125°W	215
4	25.828194°N	111.186931°W	286
5	25.827734°N	111.188146°W	200
6	25.841823°N	111.184035°W	226
8	25.789948°N	111.180033°W	50
9	25.765552°N	111.21916W	238
10	25.763830°N	111.250292°W	63
11	25.7842°N	111.1842°W	47
12	25.7933°N	111.2802°W	56
13	25.7778°N	111.2802°W	44
14	25.7726°N	111.2613°W	43
15	25.7636°N	111.2522°W	53
16	25.7740°N	111.2280°W	226
17	25.7892°N	111.2240°W	304
18	25.7959°N	111.2283°W	307
19	25.8070°N	111.2349°W	306
20	25.8229°N	111.2405°W	302
21	25.8587°N	111.2409°W	270
22	25.8766°N	111.2305°W	93
23	25.8853°N	111.2508°W	303
24	25.8883°N	111.2519°W	309
26	25.8914°N	111.2509°W	275
27	25.8879°N	111.2514°W	315
28	25.8844°N	111.2513°W	308



Figura 1. Estaciones de muestreo (Google, 2016).

Los sedimentos se obtuvieron a profundidades de 43 a 311 m empleando una draga de acero inoxidable de 12 cm de longitud (Khalsico) con adaptaciones hechas por técnicos del Instituto Oceanográfico Scripps, Universidad de California, San Diego.

El material utilizado para tomar las muestras fue desinfectado con etanol al 100%. Después de sacar la draga, la muestra se tomó utilizando una espátula de metal estéril procurando que el sedimento fuera de la capa más cercana a la superficie (en los primeros 2 centímetros). Cada muestra se transfirió a bolsas estériles y se etiquetó con los datos del muestreo. Las bolsas se colocaron en una hielera para ser transportadas al laboratorio en donde se almacenaron a - 4 °C para ser analizadas posteriormente.

VI.III. Preparación de sedimentos

Los sedimentos se descongelaron y se tomó una muestra de 5 g de cada sedimento, la cual se colocó en cajas de Petri estériles. Las muestras se dejaron secar bajo una campana de flujo laminar por 24 horas.

VI. IV. Aislamiento e identificación molecular de micromicetos

VI.IV.I. Aislamiento de cepas

Se realizaron diluciones de los sedimentos 1:10 en solución salina al 2% con 0.5% de glucosa. Estas diluciones se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se homogenizó la dilución y se inocularon 100 µl (por duplicado) en cajas de Petri con el medio

de cultivo YEPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% dextrosa y 2% agar) adicionando 1 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina. Cada muestra fue inoculada en medio YEPD preparado en agua destilada y otro preparado con 50% de agua destilada y 50% agua de agua de mar. Como control se colocaron 2 cajas con medio YEPD de cada una de las concentraciones mencionadas y se dejaron sin tapar por 10 minutos tanto en la campana como en la mesa del laboratorio, con el fin de descartar micromicetos que estuvieran presentes en el ambiente y pudieran haber contaminado los cultivos, cabe mencionar que en los controles que se colocaron en la campana no se presentaron crecimientos (Figura 2).

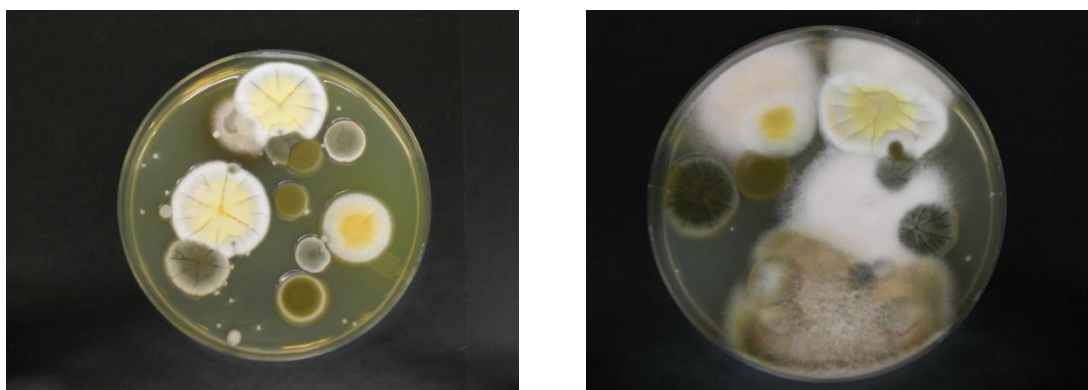


Figura 2. Controles ambientales colocados en la mesa de trabajo del laboratorio en medio YEPD: a) preparado con agua destilada; b) preparado con 50% de agua de mar y 50% de agua destilada.

Las cajas fueron incubadas a $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ en obscuridad y observadas cada 48 horas por dos meses. Las cepas que presentaron crecimiento fueron aisladas e incubadas bajo las mismas condiciones y posteriormente transferidas a medio YEPD preparado con 100% de agua de mar y ampicilina (1 $\mu\text{g/ml}$) e incubadas

en oscuridad y temperatura ambiente.

VII.IV.II. Observación morfológica

Las colonias aisladas fueron observadas y fotografiadas macroscópicamente con la ayuda de un microscopio estereoscópico marca Carl Zeiss® modelo Stemi DV4.

Para la observación microscópica de las colonias se realizó la técnica de cultivo en microplaca. En condiciones de esterilidad, se colocó en cajas de Petri con la ayuda de unas pinzas flameadas con alcohol: un papel absorbente, un triángulo de vidrio y un portaobjetos. Sobre el portaobjetos se depositó un cuadro de YEPD de aproximadamente 1 cm² (figura 3). Con un aza micológica se inoculó la cepa a observar insertándola en cada una de las orillas del cuadro de agar y se tapó con un cubreobjetos. Por último se humedeció el papel absorbente con agua destilada estéril y se tapó la caja de Petri. La preparación se dejó incubar a temperatura ambiente en oscuridad hasta observar crecimiento del hongo (de 8 a 15 días dependiendo de cada cepa). Una vez crecido el hongo se retiró el cubreobjetos con unas pinzas y se colocó en un portaobjetos con una gota de azul de algodón lactofenol. Después se retiró el cuadro de agar y se le añadió una gota de agua con jabón desengrasante al 1% sobre el portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos. Se observaron y fotografiaron ambas preparaciones de cada cepa con ayuda del microscopio óptico (marca Motic®, modelo B1 Advance) a 400 X y 1000 X (Koneman *et al.*, 1992).



Figura 3. Cultivo de hongos en Microplaca con YEPD agar.

VI.IV.III Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se realizaron cultivos en YEPD sin agar, una vez crecido el micromiceto, se tomó el micelio y se colocó sobre un portaobjetos estéril sobre hielo. Con una navaja estéril se trituró y se colocaron aproximadamente 30 mg del micelio en tubos de 1.5 ml estériles. Al micelio triturado se le adicionaron 200 μ l de solución amortiguadora de sales (200 mM Tris-HCL pH 8, 200 mM NaCL, 25 mM EDTA pH 8 y SDS 5%) y se incubó a 50 °C por 1 hora. Transcurrido el tiempo de incubación se añadieron 125 μ l de solución CTAB (100 mM Tris-HCL pH 8, 20 mi EDTA pH 8, 2% CTAB, 0.1% polyvinylpyrrolidona, 1% SDS, .2% β -mercaptoetanol) y se incubó 15 minutos a 65 °C. Después de la incubación se centrifugó la muestra a 14,000 RPM 20 °C por 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se agregó 1 volumen de Cloroformo alcohol isoamílico, se mezcló vigorosamente y se centrifugó a 10,600 RPM 20 °C por 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se colocaron

0.6 volúmenes de isopropanol al 99%, se agitó por inversión suavemente y se dejó reposar -20 °C para precipitar el material genético. Después de 15 minutos se centrifugó la muestra a 10,600 RPM 20 °C por 15 minutos. Se decantó el tubo y añadiendo 500 µl de etanol al 75% y se centrifugó a 10,600 RPM 20 °C por 5 minutos. Se decantó el alcohol y se dejaron secar los tubos abiertos invertidos sobre papel secante aproximadamente 15 minutos. El ADN fue re-suspendido en 30 µl de agua libre de ADNasas y fueron almacenados a -20 °C. Para corroborar la presencia de ADN genómico se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (Técnica de Michiels *et al.*, 2003 modificada).

VI.IV.IV Amplificación de ITS

Para la identificación molecular se utilizó se utilizaron de 10 a 50 ng de ADN genómico por reacción de PCR. Se probaron los cebadores ITS4, ITS5, NS1, NS4, LROR, LR5 y NU-SSU-1536 (Schoch *et al.*, 2012) sin éxito, finalmente las cepas fueron identificadas mediante los cebadores: ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') (Schoch *et al.*, *op. cit.*), bajo las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos, posteriormente 30 ciclos de 95 °C por un minuto, 59 °C por un minuto y 72 °C por un minuto, seguido por 10 min de extensión a 72 °C Y 10 minutos de enfriamiento a 20 °C. Las cepas que no pudieron ser identificadas con los cebadores ITS1/ITS2 se amplificaron con los cebadores UN-SSU-0817 (5'TTAGCATGGAATAATTRRAATAGGA) y NS4 (CTTCCGTCAATTCCTTTAAG) bajo las siguientes condiciones: un ciclo de

desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos, posteriormente 30 ciclos de 95 °C por un minuto, 57.5 °C por un minuto y 72 °C por un minuto, seguido por 10 min de extensión a 72 °C Y 10 minutos de enfriamiento a 20 °C, Las secuenciaciones y los cebadores se procesaron con la compañía Allele Biotech en San Diego CA, EUA.

VI.IV.V Análisis Filogenético

Las secuencias obtenidas de cada cepa se compararon con las secuencias disponibles en la base de datos del banco de genes del NCBI (por sus siglas en inglés: National Center for Biotechnology Information) por medio de la aplicación BLAST (por sus siglas en inglés: Basic Local Alignment Search Tool), posteriormente fueron alineadas por medio del programa MUSCLE (alineamiento múltiple de secuencias por log-esperanza, por sus siglas en inglés) implementado en Mega 7.0 (Kumar, *et al.*, 2015). En este mismo programa, se calcularon los árboles filogenéticos utilizando el método de máxima similitud basado en 1000 repeticiones de bootstrap. Para las secuencias obtenidas mediante los cebadores ITS1/ITS2 el árbol fue inferido utilizando el modelo de Jukes y Cantor (1969) con una distribución gama discreta para modelar las diferencias de las tasas evolutivas entre los sitios (+G, parámetro = 6) figura 7. Para el árbol de las secuencias a partir de los cebadores UN-SSU-817/NS4 se utilizó el modelo de Kimura (1980) de 2 parámetros, figura 8.

Las secuencias obtenidas se depositaron en la base de datos del Gen Bank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/index.html>), en la tabla V se enlistan los números de acceso.

Tabla V. Números de acceso proporcionados por el Gene Bank de las cepas aisladas

Cepa	Número de acceso
C4	KX236321
C5	KX236324
C9	KX236327
C11	KX219725
C15	KX236320
C25	KX236326
C33	KX236319
C34	KX236322
C35	KX236323
C36	KX236325
C38	KX219724
C39	KX219723
C41	KX219722
C42	KX219721

VI.V. Pruebas antibacterianas

Para detectar la presencia de compuestos con potencial antibacteriano, se realizaron pruebas de susceptibilidad bacteriana con cada una de las cepas de la siguiente manera: Se creció al hongo en caldo YEPD por 8 días en obscuridad a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de

incubación, se descartó el micelio y en el sobrenadante se humedeció un disco de 0.6 mm de diámetro de papel Whatman™ estéril. En cajas Petri con medio sólido Muller Hilton se sembraron de forma independiente cada una de las siguientes bacterias patógenas: *Escherichia coli* (ATCC®11775™), *Pseudomonas aureuginosa* (ATCC®27853™) o *Staphylococcus aureus subsp. aureus* (ATCC®25923™). Las cajas con los patógenos fueron divididas en cuatro y se colocó en el centro de cada cuarto el disco de papel Whatman™ humedecido, correspondiente a cada cepa. Como control se utilizó la cepa AMB correspondiente al género *Penicillium sp.* La prueba se realizó por duplicado y se incubaron por 24 horas a 38 °C. Una vez transcurrido el tiempo se observaron las cajas, se midieron los halos de inhibición y se registraron por medio de fotografías.

VII. Resultados

Se obtuvieron 38 aislados de 16 estaciones de las 26 muestreadas. En la figura 4 se representa el número de aislados por estación de muestreo.

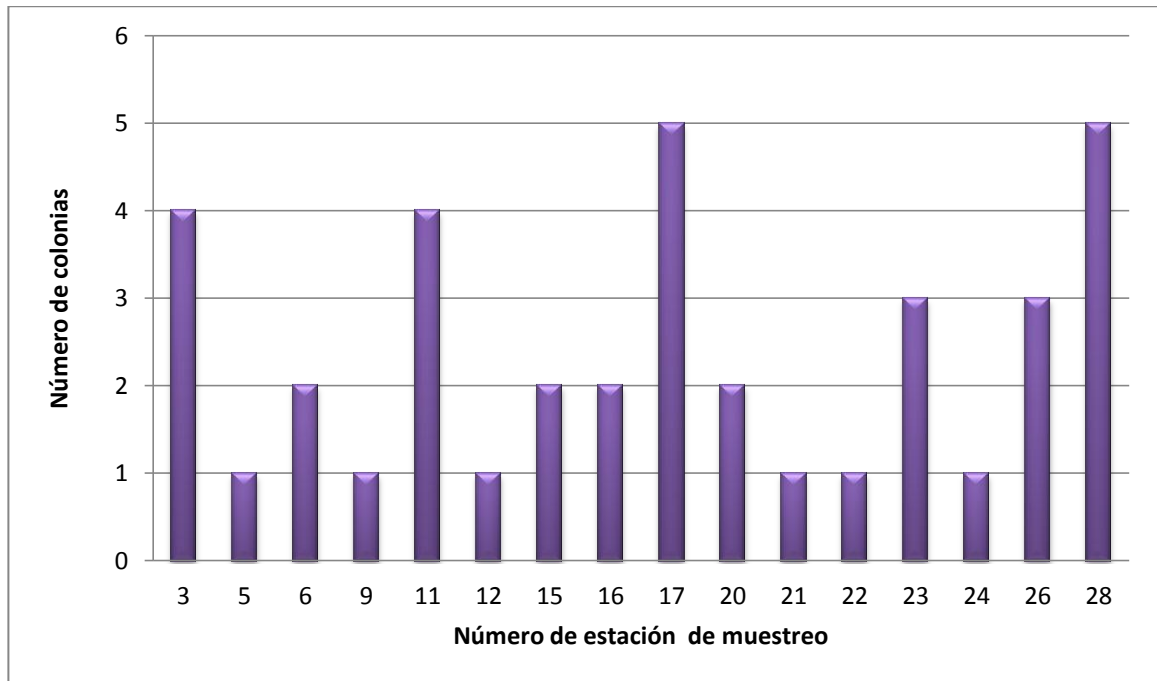


Figura 4. Número de colonias aisladas por estación de muestreo

Por el tipo de tolerancia de las cepas aisladas para crecer en agua de mar se dividieron en 4 categorías como se presenta en la figura 5.

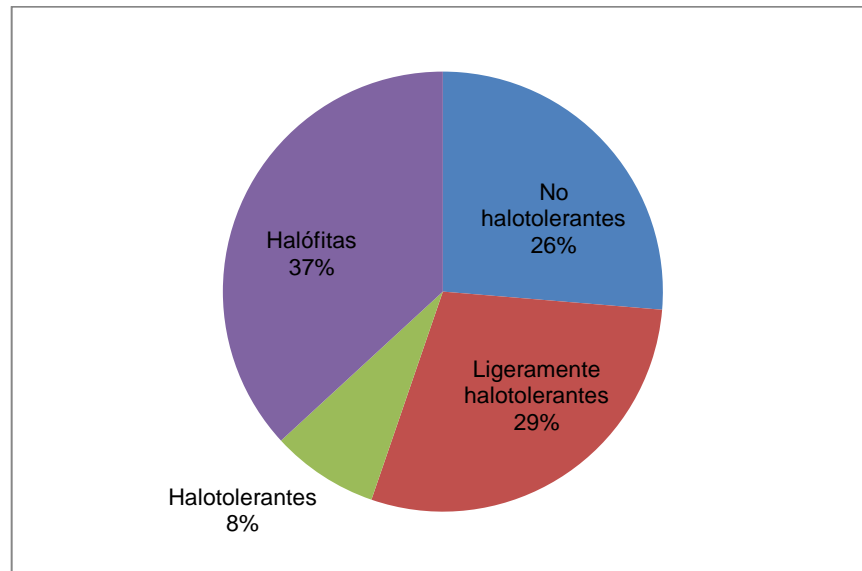


Figura 5. Relación del porcentaje de cepas aisladas y su tolerancia de crecimiento en agua de mar: No halófitas.- sin tolerancia a crecer en agua de mar; ligeramente halotolerantes.-capaces de crecer en medio con 50% de agua de mar o menos; halotolerantes.- capaces de crecer en medio con agua destilada y en medio con 100% agua de mar y halófitas.- solo crecen en medio con 100% agua de mar.

De las 38 colonias aisladas se seleccionaron 17 para su identificación, las cuales presentaban tolerancia de crecimiento en medio con 100% agua de mar. De las 17 cepas seleccionadas 3 resultaron halotolerante y 14 halófitas.

Por medio de identificación molecular se lograron identificar 12 cepas por medio de los cebadores ITS1/ITS2 y 2 por medio de los cebadores UN-SSU-817/NS4,

sin embargo dos cepas no pudieron ser identificadas ya que aunque lograron ser aisladas presentaron inviabilidad en la resiembra, por esta razón no se pudo obtener ADN de buena calidad para su identificación. Por su morfología colonial y miceliar, estas cepas fueron consideradas como *Cladosporium sp.* De las colonias trabajadas 16 pertenecieron a la división Ascomycota y solo 1 fue de la división Basidiomycota. La mayoría de las cepas identificadas pertenecieron al género *Cladosporium sp.*, seguido por el género *Aspergillus sp* y *Talaromyces sp.* El resto de las cepas fueron otros géneros, En el apéndice 1 se muestra un catálogo fotográfico de las cepas identificadas y en la figura 6. Se representa el porcentaje de los géneros identificados.

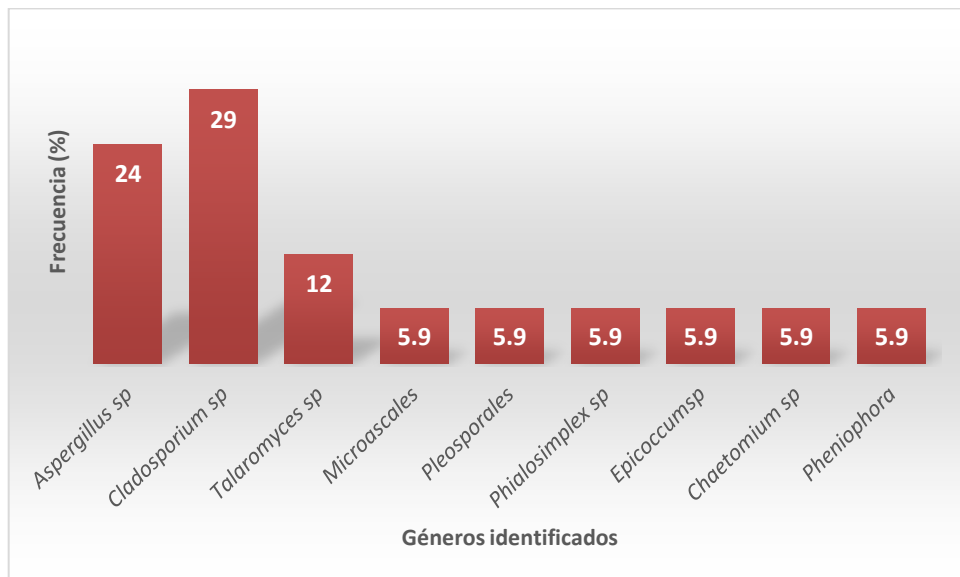


Figura 6. Frecuencia (%) de géneros identificados.

En la figura 7 y 8 se presentan los árboles filogenético de las cepas identificadas molecularmente.

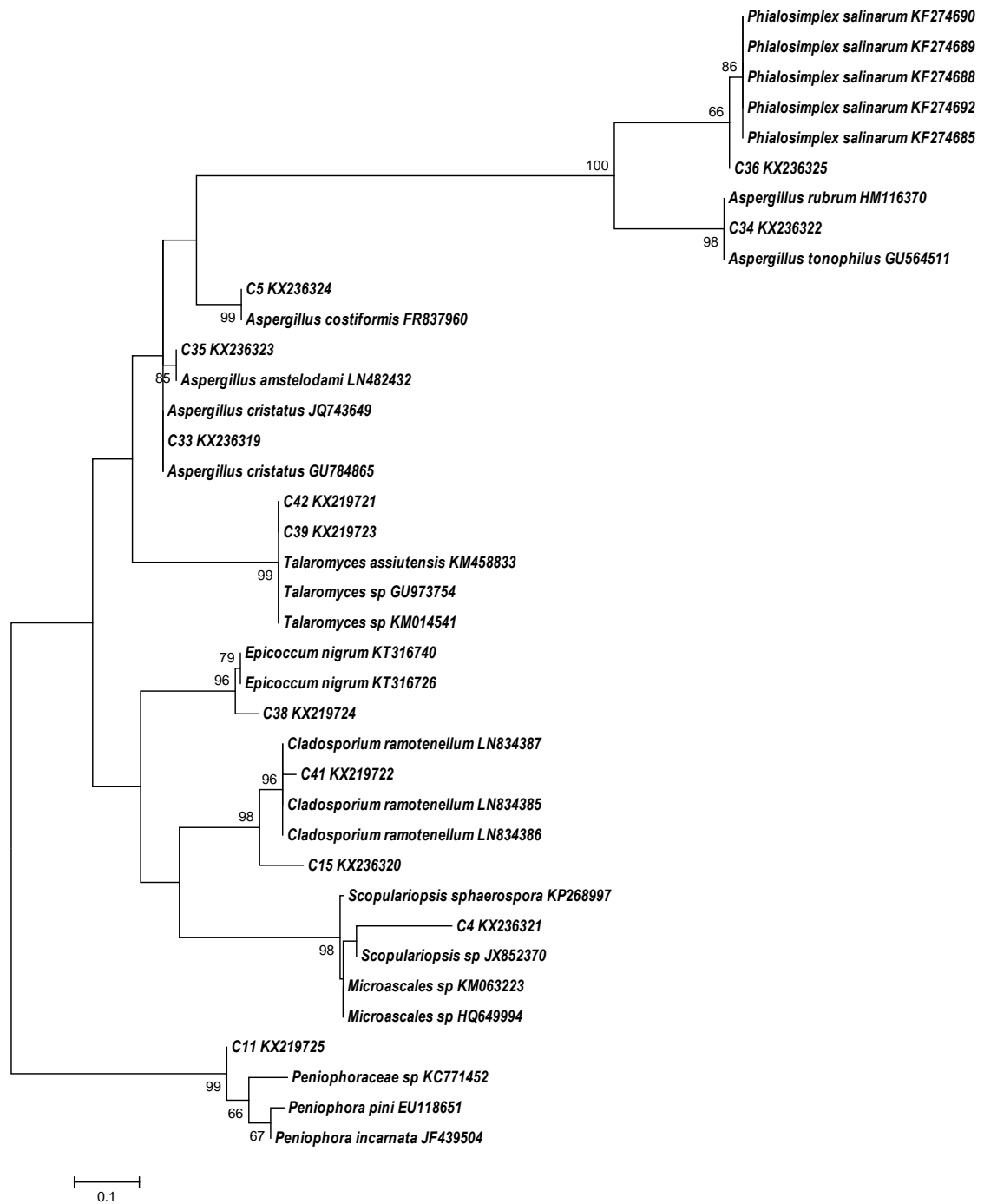


Figura 7. Árbol filogenético de las cepas identificadas molecularmente por medio de los cebadores ITS1/ITS2.

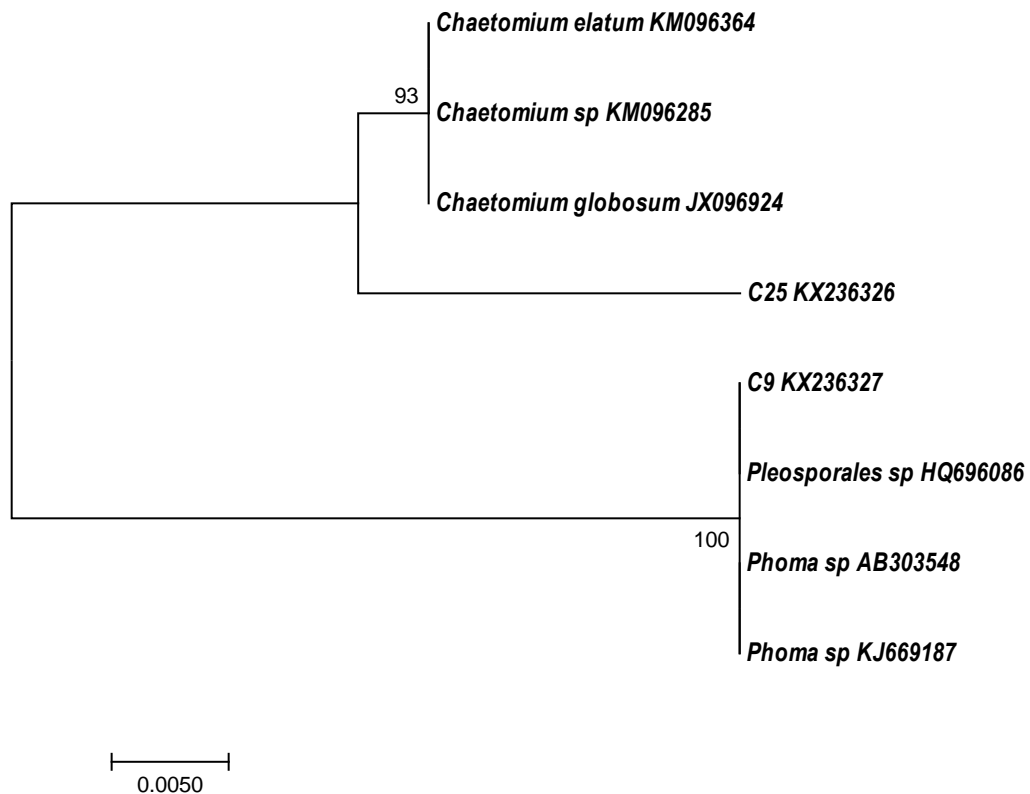


Figura 8. Árbol filogenético de las cepas identificadas molecularmente por medio de los cebadores UN-SSU-817/NS4.

Se realizaron pruebas de susceptibilidad antibacteriana, encontrando dos cepas con bioactividad, la C38 correspondiente al género *Epicoccum sp*, la cual presentó inhibición contra *E. coli* (halo de inhibición 1.55 cm) y contra *S. aureus* (halo de inhibición 1.45 cm) y la cepa C11 correspondiente al género *Peniophora sp* la cual presentó inhibición contra *S. aureus* (halo de inhibición 1.15 cm). Ninguna de las cepas presentó actividad contra *P. aeruginosa*. En la figura 9 se presentan las fotos de las pruebas de susceptibilidad de las cepas que resultaron bioactivas.

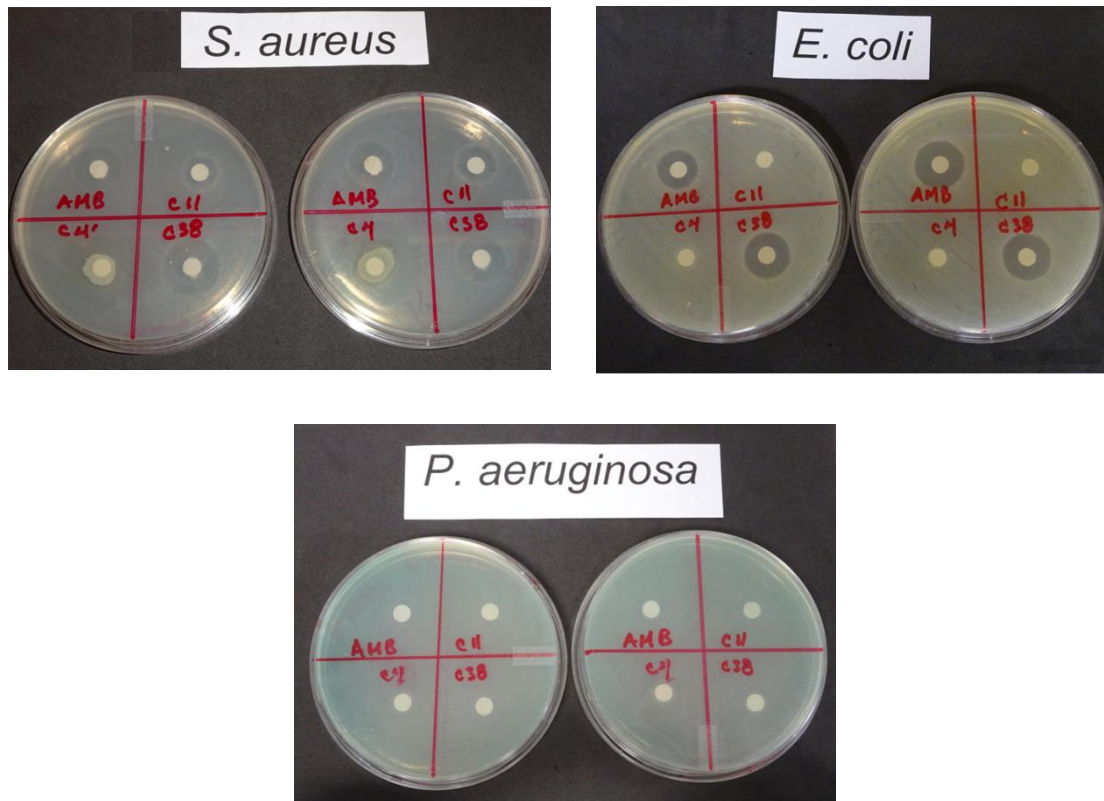


Figura 9. Cepas de hongos mostrando susceptibilidad bacteriana frente a *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*. Como control positivo se tomó a la cepa AMB ubicada en el cuadrante izquierdo superior, perteneciente al género *Penicillium* sp.

VIII. Discusión

Como se mencionó previamente, se lograron aislar 38 micromicetos de las 26 estaciones muestreadas. Se encontró que es frecuente encontrar de 1 a 2 aislados por estación de muestreo, en solo 2 estaciones se logró el máximo aislamiento (5 hongos). Para el aislamiento de micromicetos en sedimentos marinos se han utilizado diferentes condiciones de cultivo las cuales incluyen alta presión (1-200 bar), temperaturas de 5°C ó 30°C y la utilización de diferentes medios de cultivo (Roth *et al.*, 1964; Damare *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2010 y 2012) Se ha reportado que en el medio MEA (agar de extracto de malta, por sus siglas en inglés) utilizado a 1/5 de concentración a 200 bar 5°C se han obtenido el mayor número de aislamientos. En este estudio se utilizó el medio YEPD al 100% de concentración a temperatura ambiente y obscuridad, estas condiciones resultaron favorables para el aislamiento de micromicetos de sedimentos marinos en comparación con otros trabajos. Singh y colaboradores (2010) reportaron que en un estudio realizado en el 2006 obtuvo 28 micromicetos de 496 sedimentos, Damare y colaboradores (2006) pudieron aislar 181 micromicetos de 672 sedimentos y Singh y colaboradores (2010) 28 micromicetos de 20 sedimentos, todos estos estudios fueron llevados a cabo en la cuenca central de la India. Singh y colaboradores (2010) y Roth y colaboradores (1964) sugieren que la diferencia de la frecuencia de recuperación de micromicetos, puede ser debida a las condiciones oceanográficas; en este estudio observamos que también pueden depender del tipo de medio utilizado, antibiótico, obscuridad, temperatura, entre otras

condiciones de cultivo.

Con relación a la tolerancia de crecimiento en agua de mar de las cepas aisladas, podemos decir que la mayoría se encuentran adaptadas a este medio ya que un 45% de los aislados resultaron ser cepas halotolerantes (8%) y halófitas (37%). Según la clasificación de Kohlmeyer & Kohlmeyer (1972) podemos decir que las cepas no halófitas corresponden a micromicetos no marinos, las cepas halotolerantes a micromicetos marinos facultativos y las halófitas a micromicetos marinos.

De los 17 micromicetos seleccionados para su identificación el 94.11% pertenecieron a la división Ascomycota, estos fueron agrupados en 6 géneros (*Aspergillus sp*, *Cladosporium sp*, *Chaetomium sp*, *Epicoccum sp*, *Talaromyces sp* y *Phialosimplex sp*), otras dos cepas solo pudieron ser identificadas a nivel de orden, pertenecientes a Pleosporales y Microascales, y solamente un micromiceto perteneció a la división Basidiomycota, del género *Peniophora sp*. El análisis filogenético realizado a las secuencias obtenidas por medio de los cebadores ITS1/ITS2, confirma que las cepas se encuentran agrupadas con los géneros y ordenes previamente mencionados ya que cada clado se encuentra bien delimitado con un apoyo de bootstrap de más del 70%. En cuanto a las cepas identificadas por medio de los cebadores UN-SSU-817/NS4, se puede considerar que la cepa C9 pertenece al clado de Pleosporales con un soporte de bootstrap del 100%. En cuanto a la cepa C25 la secuencia con mayor similitud perteneció a *Chaetomium globosum* (Número de acceso del Gene

Bank: JX096924) con un valor de $E = 3e-158$, una identidad del 98% y una cobertura del 99%, todas las otras secuencias alineadas también pertenecieron al género *Chaetomium sp* con un valor de $E = 2e-156$, una identidad del 98% y una cobertura del 99% (Números de acceso del Gene Bank: *C. elatum*.- KM096366; *C. elatum*.- KM096364; *C. globosum*.- KM096357) sin embargo, el resultado del análisis filogenético y la prueba de bootstrap sugiere que existe una distancia filogenética entre la secuencia aislada y las obtenidas del Gene Bank, esta distancia puede deberse a que el tamaño de la región que se amplificó no fue suficiente para poder establecer la relación o que realmente se trata de otro género o especie. Para descartar estas ambigüedades será necesario amplificar otras regiones que contengan mayor número de bases para poder compararlas con las bases de datos de genes disponibles.

Los Ascomycetos han sido reportados con frecuencias altas en sedimentos marinos por otros autores (Singh *et al.*, *op. cit.*; Damare *et al.*, *op. cit.*; Jones *et al.*, 2009) lo anterior, concuerda con lo encontrado en este trabajo. En cuanto a los géneros identificados *Cladosporium sp* (29%) y *Aspergillus sp.* (24%) fueron los más frecuentes, estos géneros también han sido reportados como frecuentes y abundantes en muestras de origen marino (Raghukumar y Damare, 2008; Gunde-Cimerman y Zalar, 2014; Damare *et al.*, *op. cit.*; Singh *et al.*, 2010 y 2012). No fue posible aislar levaduras en este estudio, esto podría deberse a que las condiciones de cultivo no fueron las adecuadas para el aislamiento en levaduras. Singh y colaboradores (2010) utilizaron YEPD a 1/5

de la concentración en su estudio y obtuvieron un aislamiento del 60% de levaduras. Es posible que la utilización del medio concentrado utilizado en este estudio interfiriera con el crecimiento de levaduras.

Todos los hongos aislados en esta investigación han sido previamente reportados en muestras marinas: Pleosporales (Singh *et al.*, 2012) y *Epicoccum sp* (Ahumada-Rudolph *et al.*, 2014) aislados de sedimentos marinos; Microascales de madera de mangle (Alias & Jones, 2000); *Chaetomium sp* de playas costeras en México (González *et al.*, 1998) y de material vegetal (Jones *et al.*, *op. cit.* and Singh *et al.*, 2012) y *Peniophora sp* de esponjas marinas (Bonugli-Santos *et al.*, 2016). *Phialosimplex sclerotialis* y *P. caninus* han sido reportados recientemente en sedimentos marinos profundos (Singh *et al.*, 2012) y *Phialosimplex salinarum* fue reportada como nueva especie aislada de minas de sal en Alemania. (Greiner *et al.*, 2014).

Algunos de los micromicetos encontrados en este trabajo ya habían sido reportados en nuestro país en muestras marinas, tal es el caso de: *Aspergillus sp* (arena, González *et al.*, 1998), *Cladosporium sp* (arena, González *et al.*, *op. cit.*), Pleosporales (arena, González *et al.*, *op. cit.* y mangle, Kohlmeyer, 1968), Microascales (arena; González *et al.*, *op. cit.* y espuma, Kohlmeyer, *op. cit.*) y *Chaetomium sp* (arena, González *et al.*, *op. cit.*) sin embargo, no hay reportes en sedimentos marinos profundos para México, exceptuando este trabajo, que es el primero de ellos, reportando por primera vez a: *Talaromyces sp*, *Phialosimplex salinarum*, *Epicoccum sp*, y *Peniophora sp*.

En cuanto a la producción de metabolitos con interés biotecnológico, solo dos géneros presentaron actividad antibacteriana: *Epicoccum sp*, en contra de *S. aureus* y *E. coli* y *Peniophora sp* en contra de *E. coli*. Ya se había reportado a *Epicoccum nigrum* (aislado de algas marinas y de esponjas) como productor de Epicorazina A y B (Baute *et al.*, 1978), estos compuestos presentan actividad antibiótica superior a la ampicilina contra *S. aureus* (Xing *et al.*, 2011; Henriquez *et al.*, 2014). Se ha logrado aislar un compuesto activo (ácido masmárico) de *Peniophora latea* el cual resultó ser un antimicrobiano de amplio espectro (Kupka *et al.*, 1982). *P. affinis* produce Peniophorina A y Peniophorina B, ambos compuestos muestran actividad contra bacterias gram positivas y gram negativas (Gerber *et al.*, 1980). Drosophilina A y Drosofilina A Methyl Ether fueron purificadas de *P. fastuosa*, estos compuestos también demostraron tener propiedades antibióticas (Teunissen *et al.*, 1997). Cabe mencionar que todas las especies de *Peniophora sp* previamente mencionadas fueron aisladas de esponjas marinas. Se requieren más estudios sobre las especies aisladas en este trabajo, ya que al provenir de sedimentos marinos podrían presentar otros metabolitos secundarios distintos de las especies aisladas de esponjas y de algas, los cuales podrían ser empleados en la industria farmacéutica.

IX. Conclusiones

1. Por medio de las condiciones de cultivo propuestas, fue posible aislar por cultivo 38 micromicetos provenientes de sedimentos marinos de la Bahía de Loreto en Baja California Sur, México.
2. Fue posible identificar por medio del ITS1/ITS2 y UN-SSU-0817/NS4 catorce cepas de las treinta y ocho aisladas.
3. Se pudo comprobar la actividad antibacteriana de dos de las cepas aisladas, pertenecientes a los géneros *Epicoccum sp* y *Peniophora sp*, la primera en contra de *E. coli* y la segunda en contra de *E. coli* y de *S. aureus*.

X. Apéndice I: Catálogo fotográfico de las cepas identificadas

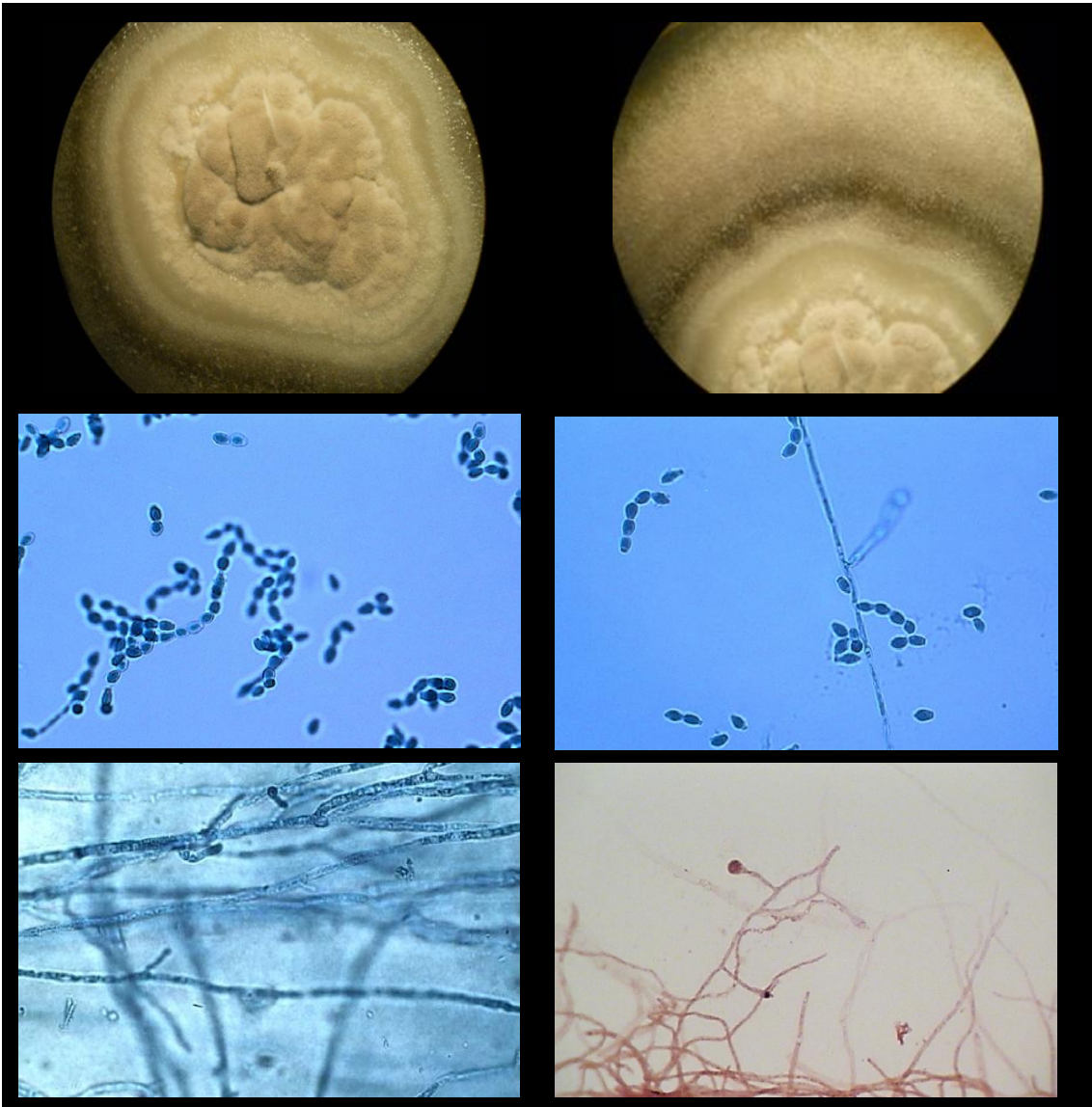
Orden: Microascales

Cepa: C4

No de identificación Gene Bank: KX236321

Estación: E3

Aumento microscopio óptico: 1000X



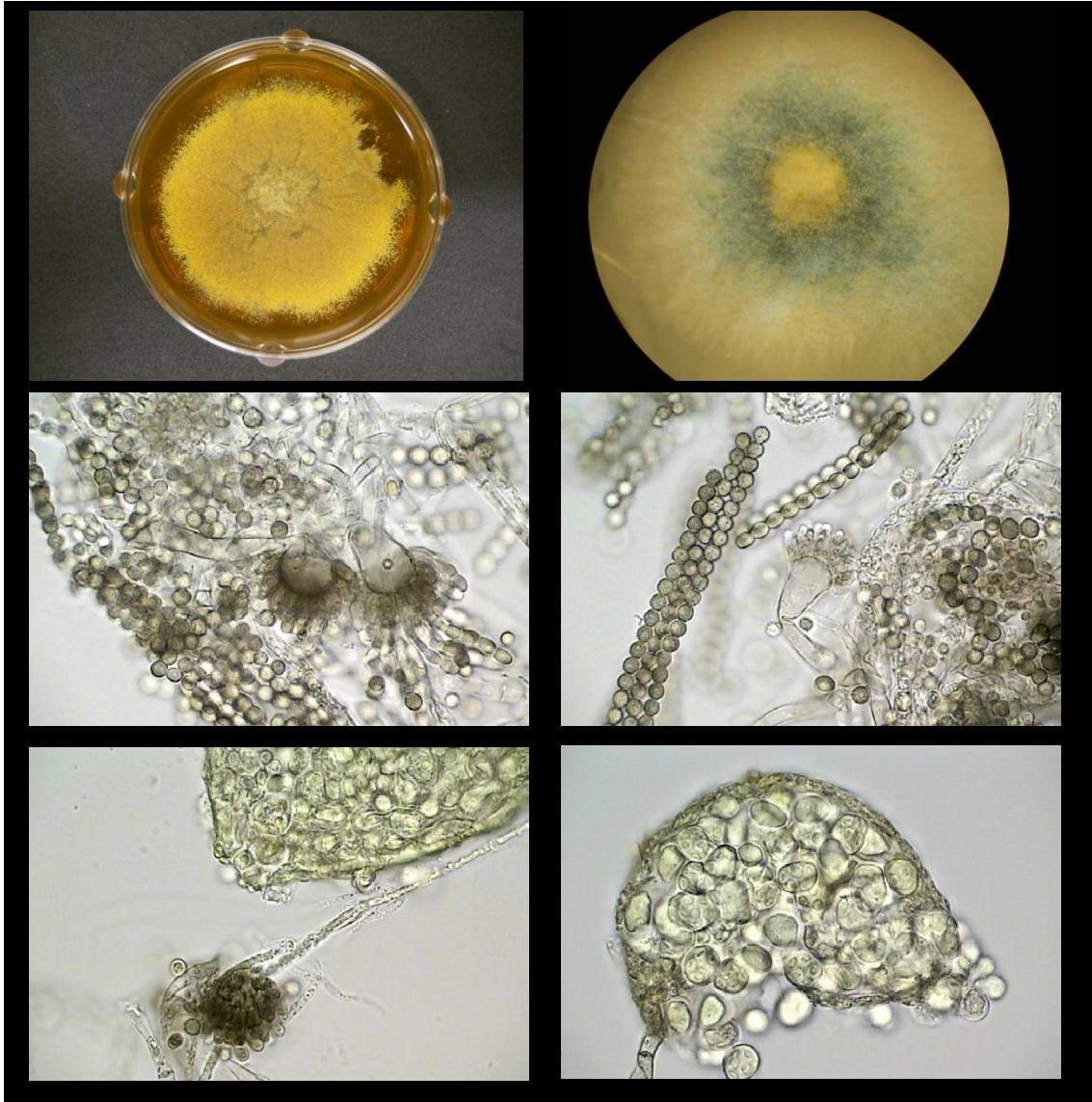
Género: *Aspergillus sp*

Cepa: C5

No de identificación Gene Bank: KX236324

Estación: E17

Aumento microscopio óptico: 1000X



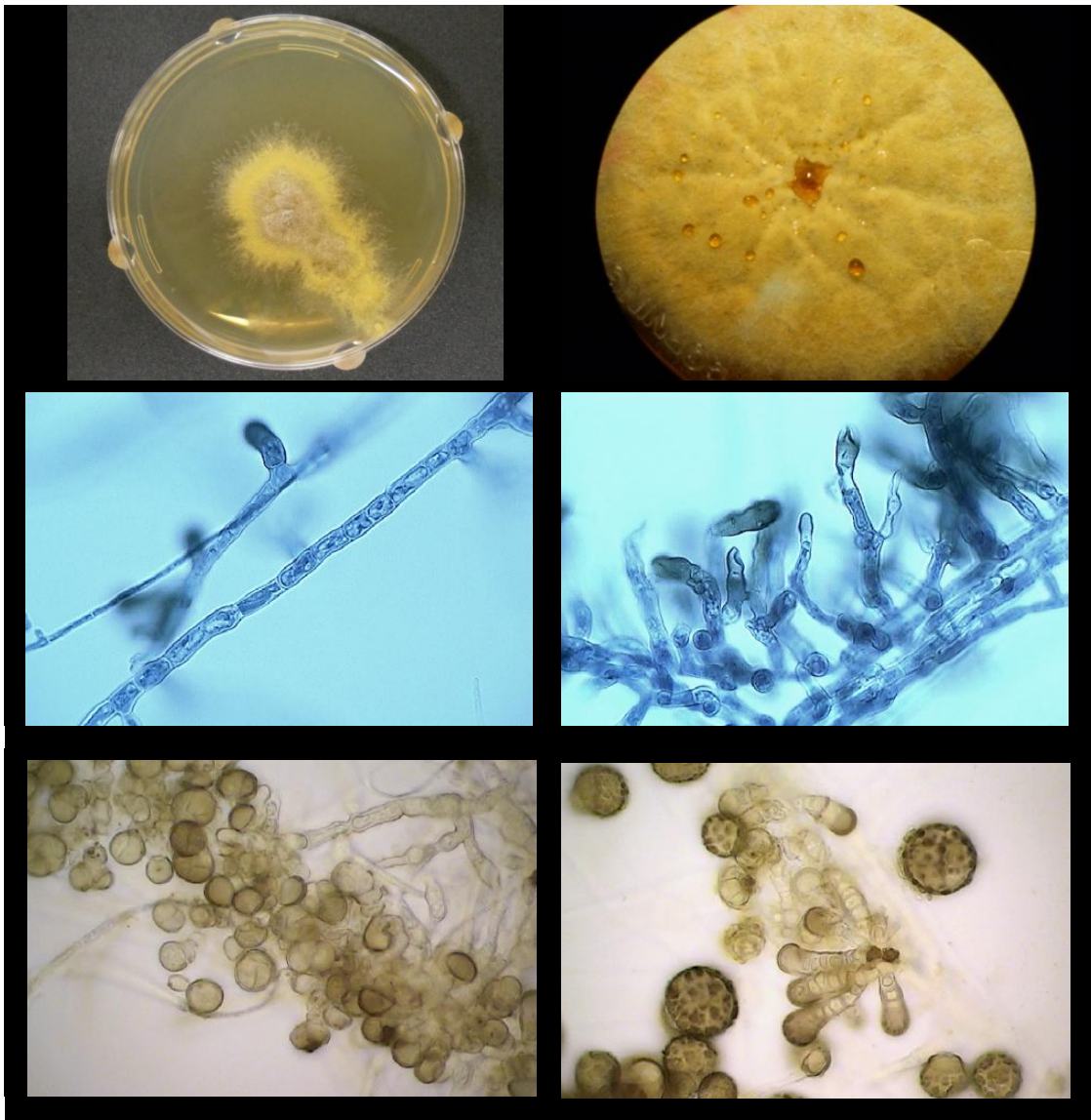
Orden: Pleosporales

Cepa: C9

No de identificación Gene Bank: KX236327

Estación: E28

Aumento microscopio óptico: 1000X



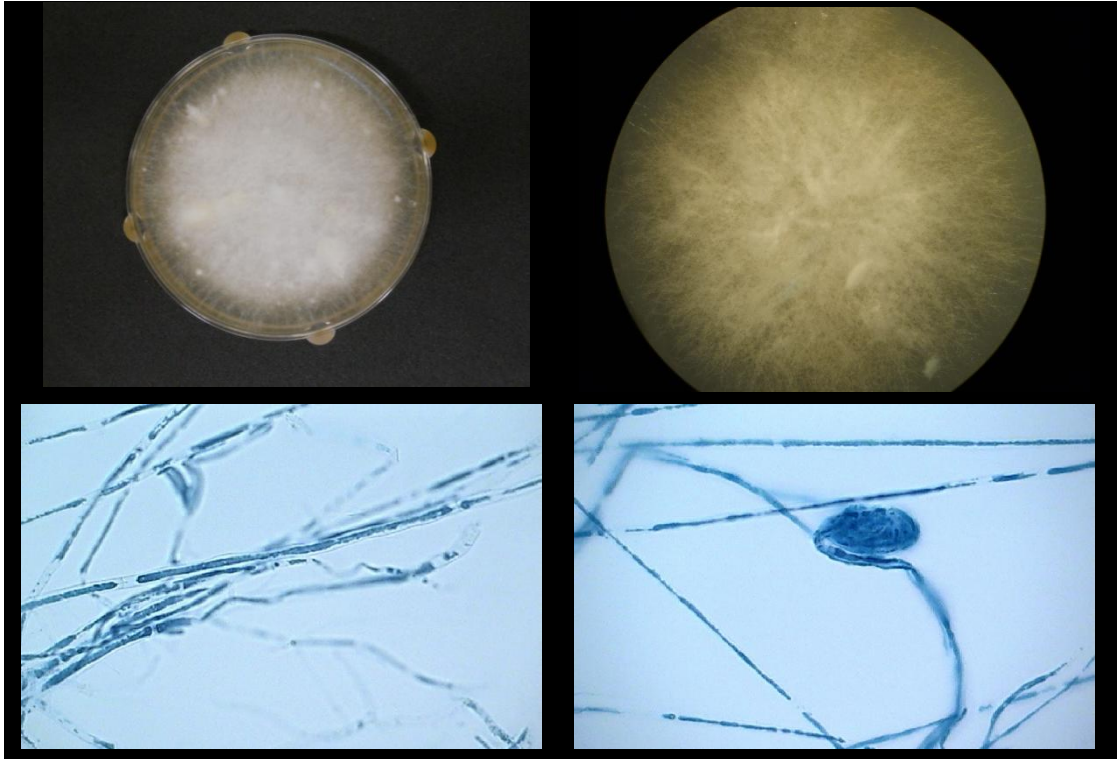
Género: *Peniophora* sp.

Cepa: C11

No de identificación Gene Bank: KX219725

Estación: E17

Aumento microscopio óptico: 1000X



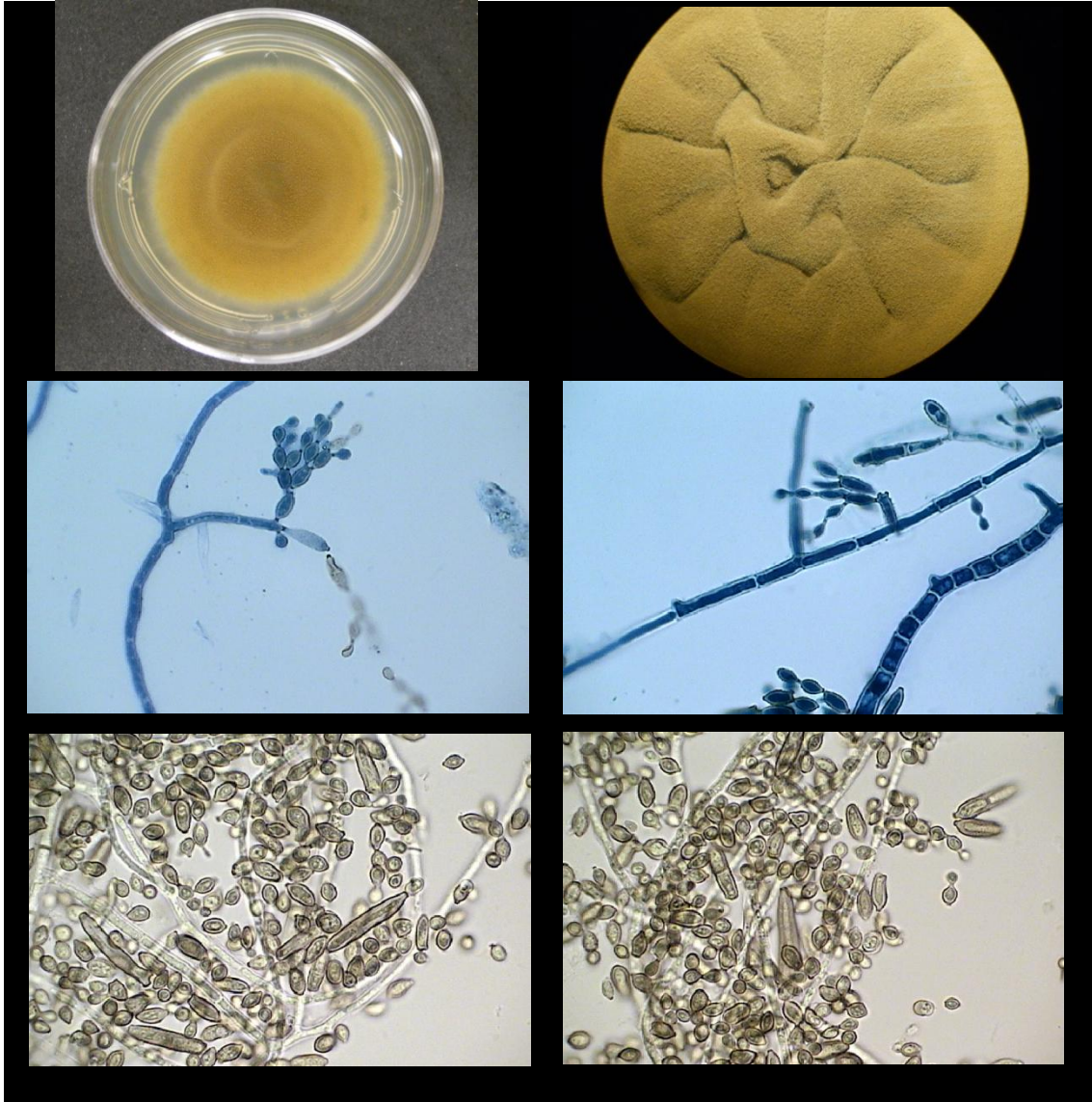
Género: *Cladosporium* sp.

Cepa: C15

No de identificación Gene Bank: KX236320

Estación: E23

Aumento microscopio óptico: 1000X



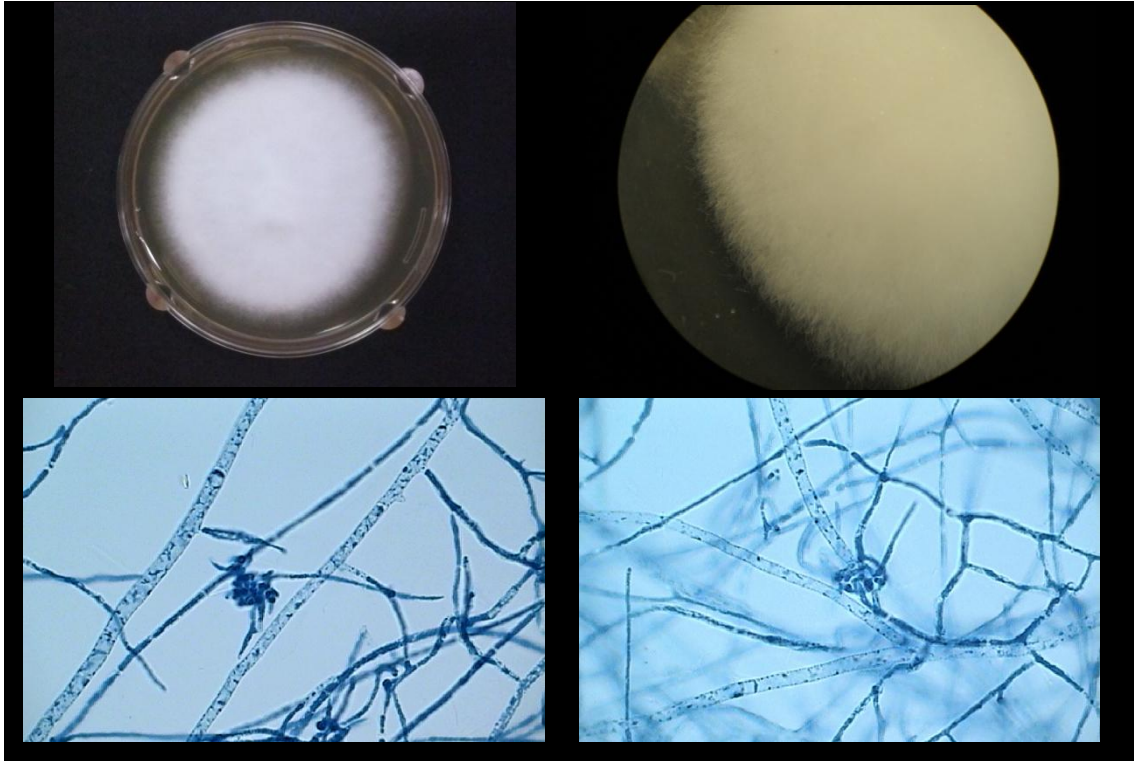
Género: *Chaetomium sp.*

Cepa: C25

No de identificación Gene Bank: KX236326

Estación: E15

Aumento microscopio óptico: 1000X



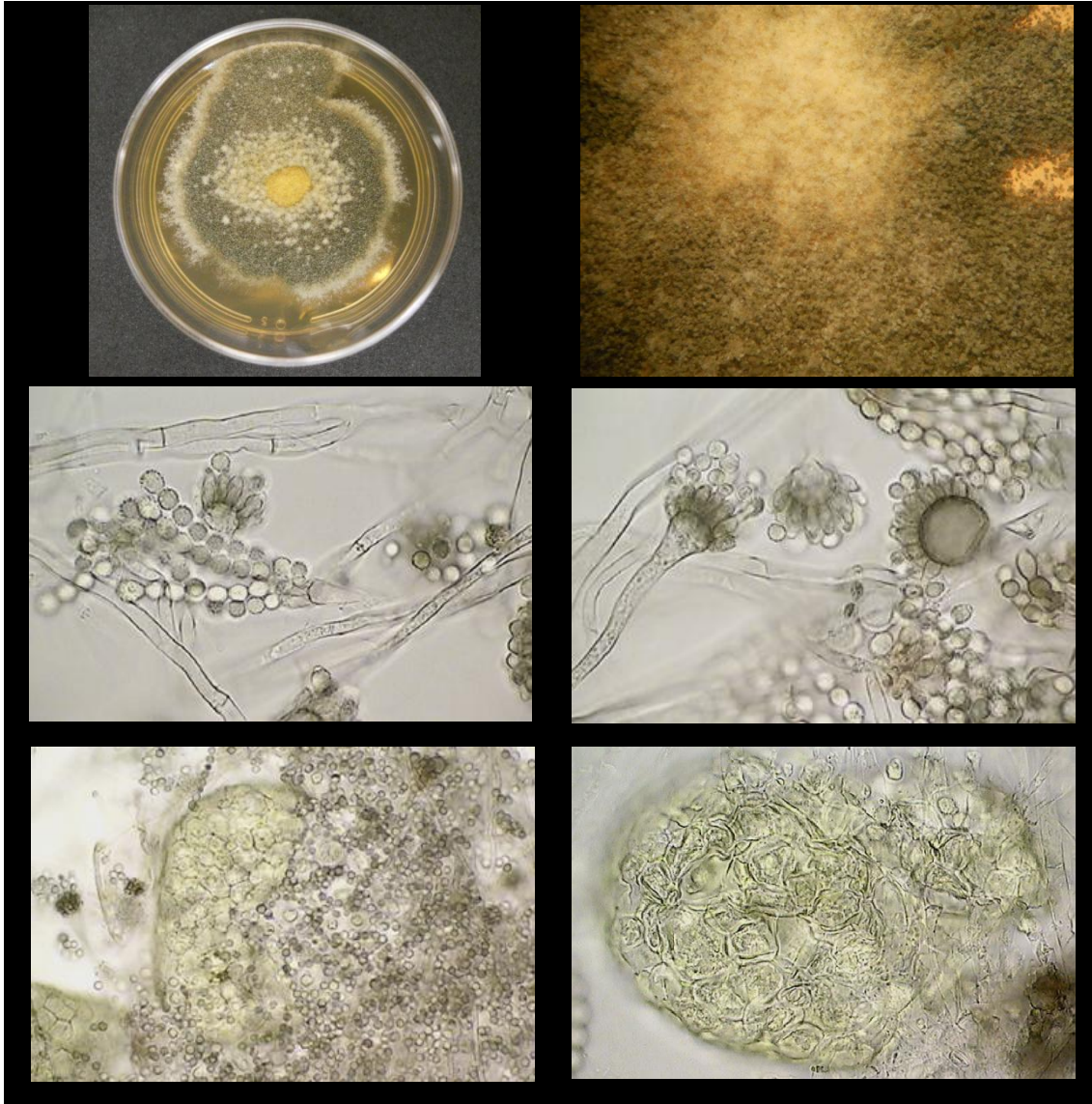
Género: *Aspergillus* sp.

Cepa: C33

No de identificación Gene Bank: KX236319

Estación: E11

Aumento microscopio óptico: 1000X



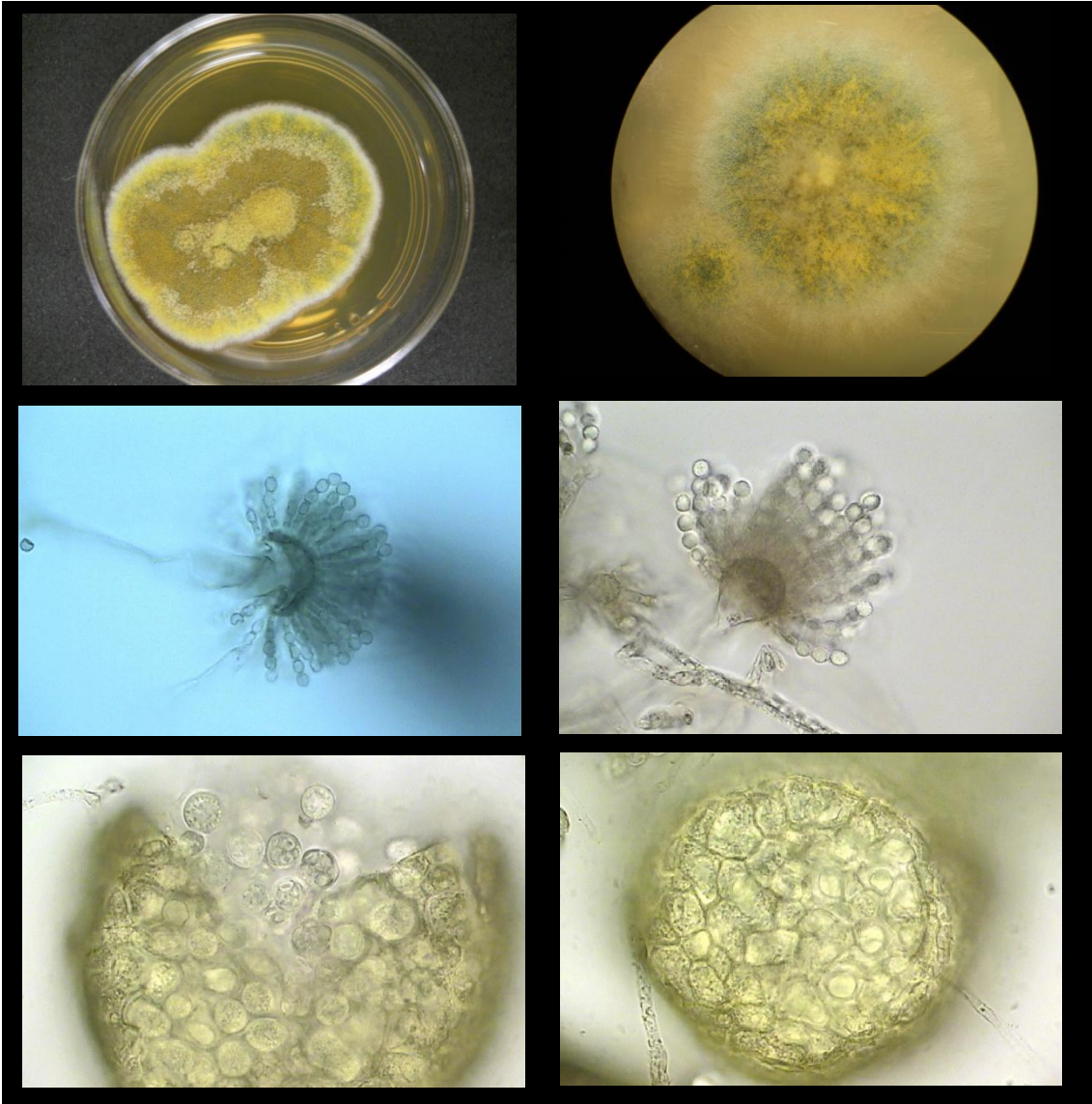
Género: *Aspergillus* sp.

Cepa: C34

No de identificación Gene Bank: KX236322

Estación: E9

Aumento microscopio óptico: 1000X



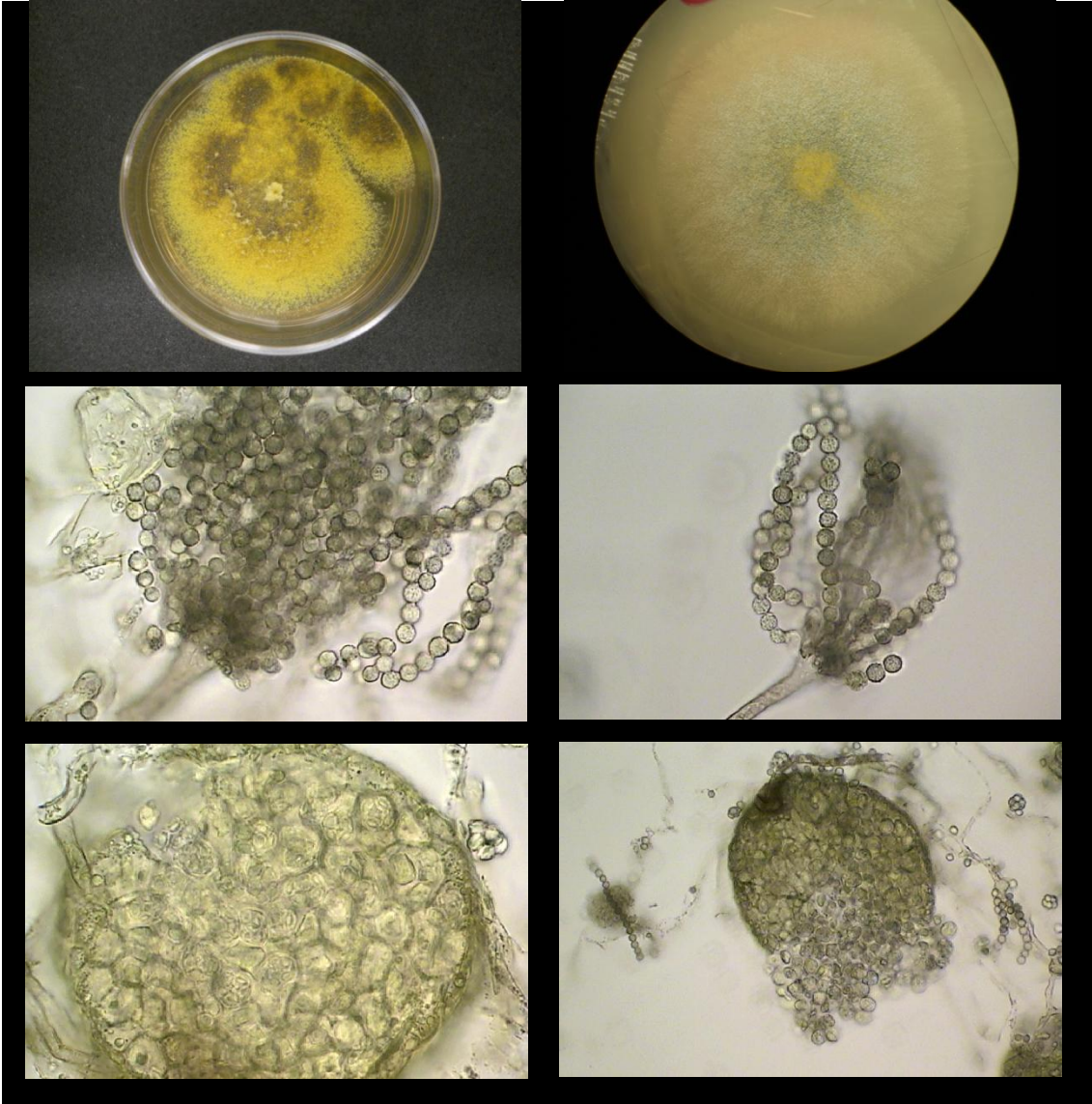
Género: *Aspergillus* sp.

Cepa: C35

No de identificación Gene Bank: KX236323

Estación: E21

Aumento microscopio óptico: 1000X



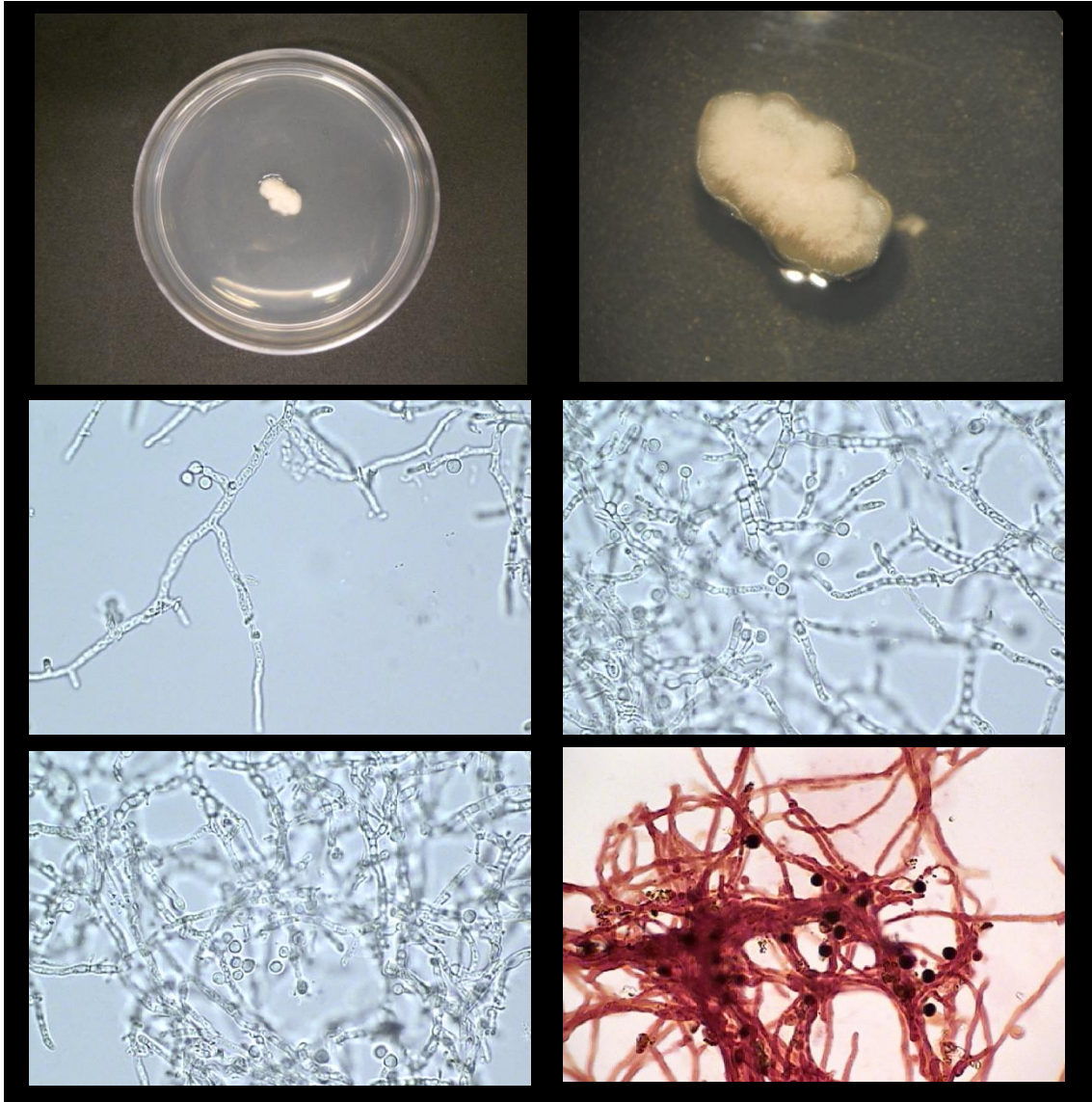
Género: *Phialosimplex* sp.

Cepa: C36

No de identificación Gene Bank: KX236325

Estación: E26

Aumento microscopio óptico: 1000X



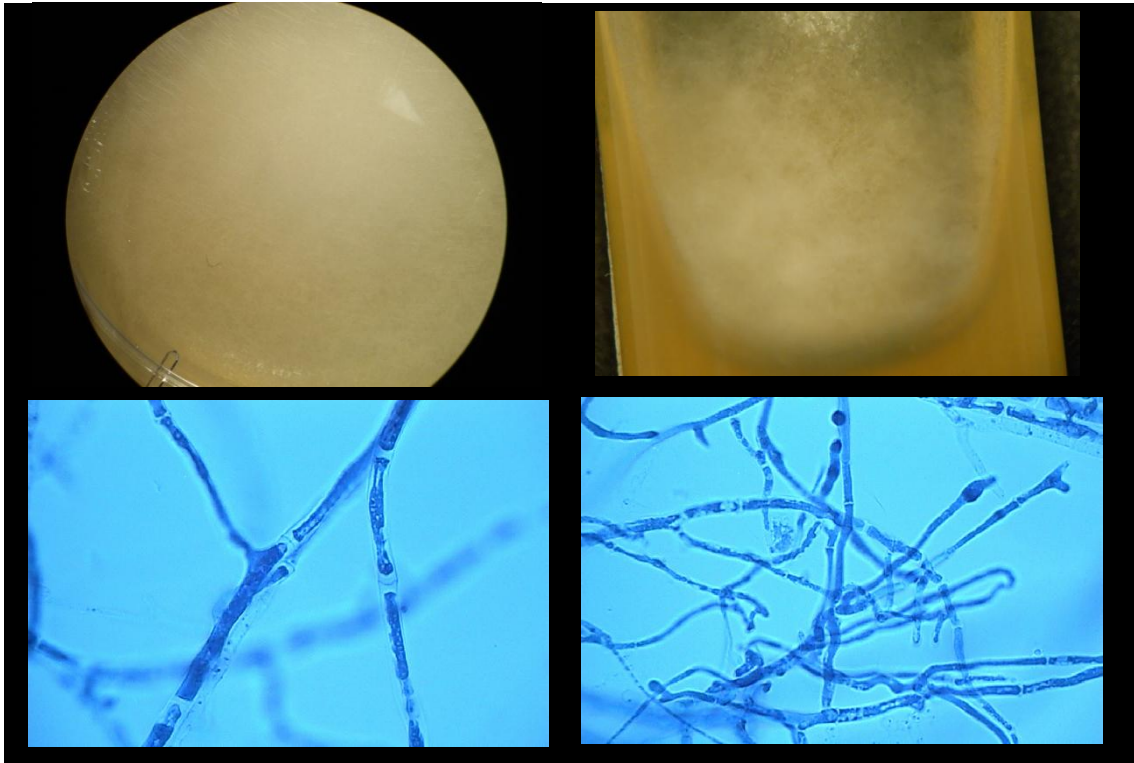
Género: *Epicoccum sp.*

Cepa: C38

No de identificación Gene Bank: KX219724

Estación: E24

Aumento microscopio óptico: 1000X



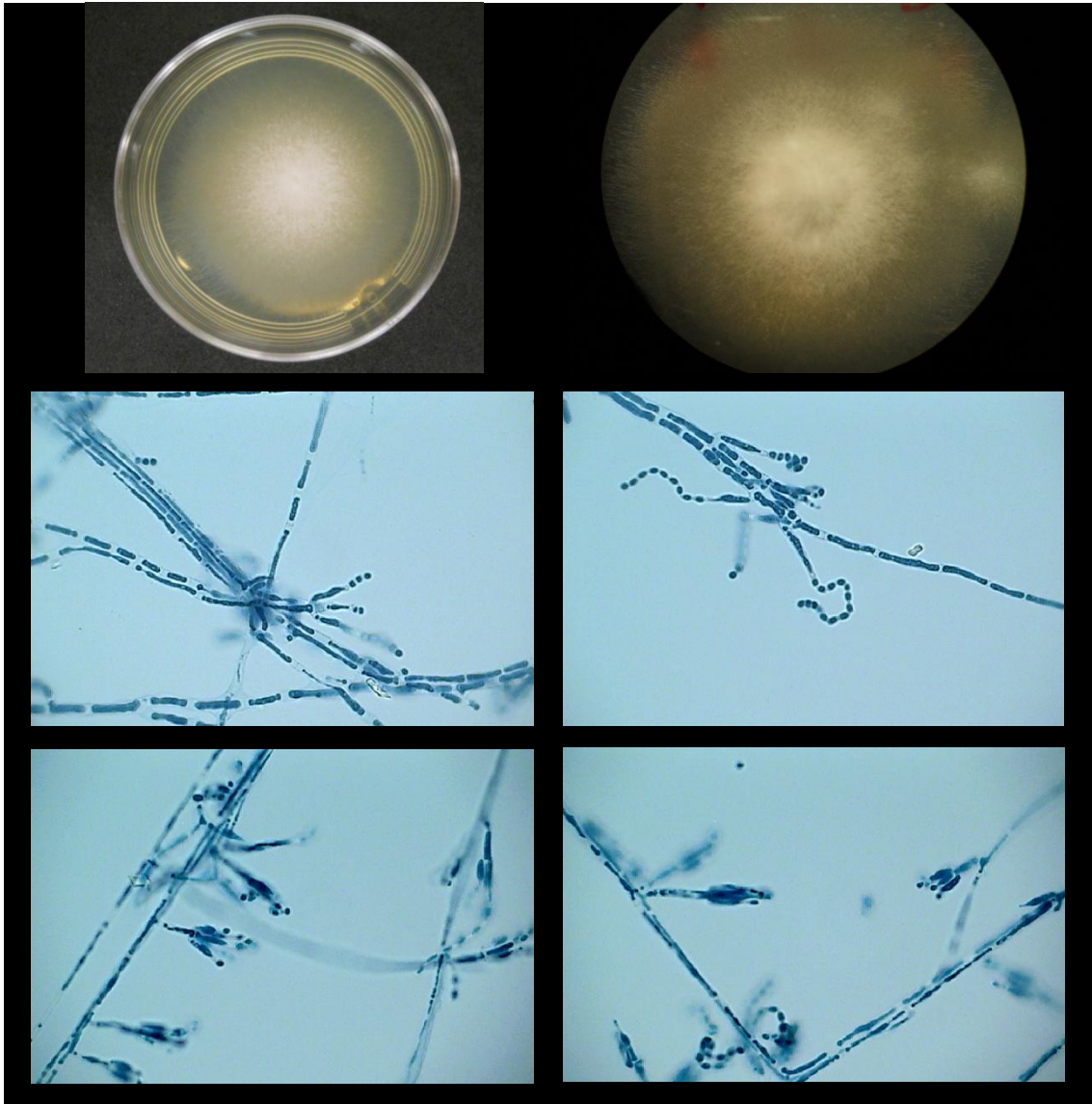
Género: *Talaromyces sp.*

Cepa: C39

No de identificación Gene Bank: KX219723

Estación: E12

Aumento microscopio óptico: 1000X



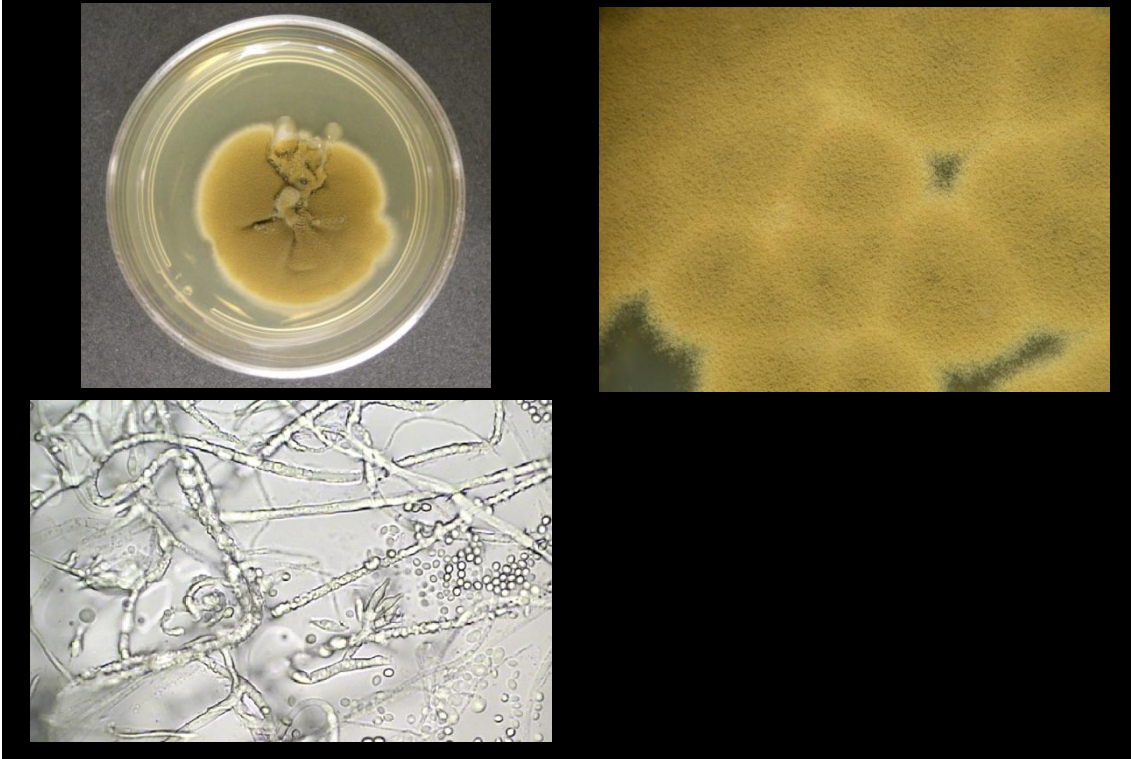
Género: *Cladosporium* sp.

Cepa: C41

No de identificación Gene Bank: KX219722

Estación: E6

Aumento microscopio óptico: 1000X



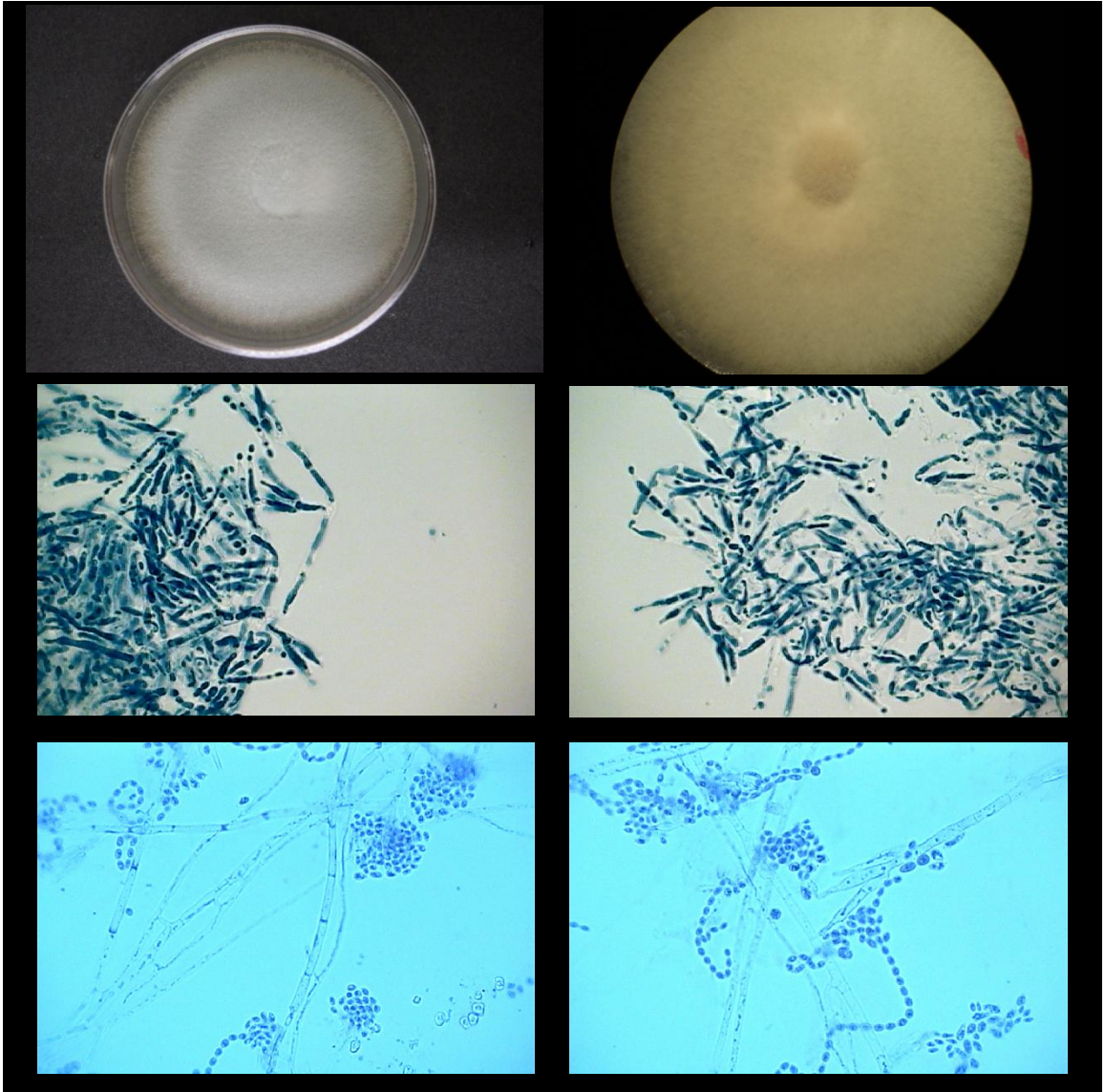
Género: *Talaromyces* sp.

Cepa: C42

No de identificación Gene Bank: KX219721

Estación: E15

Aumento microscopio óptico: 1000X



X. Literatura Citada

- Ahumada-Rudolph, R., Cajas-Madriaga, D., Rudolph, A., Reinoso, R., Torres, C., Silva, M., & Becerra, J. (2014). Variation of sterols and fatty acids as an adaptive response to changes in temperature, salinity and pH of a marine fungus *Epicoccum nigrum* isolated from the Patagonia Fjords. *Revista de Biología Marina Y Oceanografía*, *49*(2), 293–305.
- Alias, S. A., & Jones, E. B. (2000). Colonization of mangrove wood by marine fungi at Kuala Selangor mangrove stand, Malaysia. *Fungal Diversity*, *5*(1996), 9–21.
- Andreakis, N., Høj, L., Kearns, P., Hall, M. R., Ericson, G., Cobb, R. E., & Kellogg, C. A. (2015). Diversity of marine-derived fungal cultures exposed by DNA barcodes: The algorithm matters. *PLoS ONE*, *10*(8), 1–22.
- Barghoorn, E., & Linder, D. (1944). Marine fungi: their taxonomy and biology. *Farlowia*, *1*, 395–467.
- Baute, M. A., Deffieux, G., Baute, R., & Neveu, A. (1978). New antibiotics from the fungus *Epicoccum nigrum*. *The Journal of Antibiotics*, *31*(11), 1099–1101.
- Bonugli-Santos, R. C., Vieira, G. A. L., Collins, C., Fernandes, T. C. C., Marin-Morales, M. A., Murray, P., & Sette, L. D. (2016). Enhanced textile dye decolorization by marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063 using integrated statistical design. *Environmental Science and Pollution Research*. 1-10.
- Borse, S. (1988). Frequency of occurrence of marine fungi from Maharashtra coast, India. *Indian Journal of Marine Sciences*, *17*, 165–167.
- Boyd, P. E., & Kohlmeyer, J. (1982). The Influence of temperature on the seasonal and geographic distribution of three marine fungi. *Mycologia*, *74*(6), 894–902.
- Carvalho, L. C., Dennis, P. G., Tyson, G. W., & Schenk, P. M. (2012). Application of metatranscriptomics to soil environments. *Journal of Microbiological Methods*, *91*(2), 246–51.
- Castro, R., Mascarenhas, A. S., Durazo, R., & Collins, C. A. (2000). Variación estacional de la temperatura y salinidad en la entrada del Golfo de California. *Ciencias Marinas*, *26*(4), 561–583.

- Chinworrungsee, M., Kittakoop, P., Isaka, M., Rungrod, A., Tanticharoen, M., & Thebtaranonth, Y. (2001). Antimalarial halorosellinic acid from the marine fungus *Halorosellinia oceanica*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 11(15), 1965–1969.
- Daferner, M., Anke, T., & Sterner, O. (2002). Zopfiellamides A and B, antimicrobial pyrrolidinone derivatives from the marine fungus *Zopfiella latipes*. *Tetrahedron*, 58, 7781–7784.
- Damare, S., Raghukumar, C., & Raghukumar, S. (2006). Fungi in deep-sea sediments of the Central Indian Basin. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 53(1), 14–27.
- Damare, S., Singh, P., & Raghukumar, S. (2012). Biotechnology of marine fungi. En C. Raghukumar (Ed.), *Biology of marine fungi* (pp. 277–291). New York: Springer.
- De La Calle F. (2007). Fármacos de origen marino, 58, 141–155.
- Fell, J. W., Statzell-Tallman, A., Scorzetti, G., & Gutierrez, M. H. (2011). Five new species of yeasts from fresh water and marine habitats in the Florida Everglades. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 99(3), 533–549.
- Gao, S.-S., Li, X.-M., Du, F.-Y., Li, C.-S., Proksch, P., & Wang, B.-G. (2011). Secondary metabolites from a marine-derived endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S. *Marine Drugs*, 9, 59–70.
- Garo, E., Starks, C. M., Jensen, P. R., Fenical, W., Lobkovsky, E., & Clardy, J. (2003). Trichodermamides A and B, cytotoxic modified dipeptides from the marine-derived fungus *Trichoderma virens*. *Journal of Natural Products*, 66(3), 423–426.
- Gerber, N. N., Shaw, S. A., & Lechevalier, H. A. (1980). Structures and antimicrobial activity of peniophorin A and B, two polyacetylenic antibiotics from *Peniophora affinis* Burt. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 17(4), 636–641.
- Gessner, R. (1980). Degradative enzyme production by salt-marsh fungi. *Botanica Marina*, 23, 133–139.
- González, M. C., Hanlin, R. T., & Ulloa, M. (2001). A check list of higher marine fungi of Mexico. *Micotaxon*, 80, 241–253.

- González, M. C., Hanlin, R. T., Herrera, T., & Ulloa, M. (2000). Fungi colonizing hair-baits from three coastal beaches of Mexico. *Mycoscience*, *41*, 259–262.
- González, M. C., Herrera, T., Ulloa, M., & Hanlin, R. (1998). Abundance and diversity of microfungi in three coastal beaches of Mexico. *Mycoscience*, *39*, 115–121.
- Google. (2016). Google earth digital globe.
- Greiner, K., Peršoh, D., Weig, A., & Rambold, G. (2014). *Phialosimplex salinarum*, a new species of Eurotiomycetes from a hypersaline habitat. *IMA Fungus*, *5*(2), 161–172.
- Gunde-Cimerman, N., & Zalar, P. (2014). Extremely halotolerant and halophilic fungi inhabit brine in solar salterns around the globe. *Food Technology and Biotechnology*, *52*(2), 170–179.
- Hasan, S., Ansari, M. I., Ahmad, A., & Mishra, M. (2015). Major bioactive metabolites from marine fungi: A Review. *Bioinformation*, *11*(4), 176–181.
- Hazuda, D., Blau, C. U., Felock, P., Hastings, J., Pramanik, B., Wolfe, A. Singh, S. (1999). Isolation and characterization of novel human immunodeficiency virus integrase inhibitors from fungal metabolites. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, *10*, 63–70.
- Henríquez, M., Vergara, K., Norambuena, J., Beiza, A., Maza, F., Ubilla, P., & Vaca, I. (2014). Diversity of cultivable fungi associated with Antarctic marine sponges and screening for their antimicrobial, antitumoral and antioxidant potential. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *30*(1), 65–76.
- Hibbett, D. S., Ohman, A., & Kirk, P. M. (2009). Fungal ecology catches fire. *New Phytologist*, *184*(2), 279–282.
- Höller, U. (1999). *Isolation, biological activity and secondary metabolite investigations of marine-derived fungi and selected host sponges*. Technischen Universität Carolo-Wilhelmina, 149pp.
- Hou-Jin, L., Cai, Y.-T., Yun-Yun, C., Chi-Keung, L., & Wen-Jian, L. (2010). Metabolites of marine fungus *Aspergillus* sp. Collected from Soft Coral *Sarcophyton tortuosum*, *26*(3), 415–419.
- Hyde, K. D. (1988). Studies on the tropical marine fungi of Brunei. *Botanical Journal of the Linnean Society*, *98*, 135–151.

- Hyde, K. D. (1992). The effect of incubation on the occurrence of marine fungi on randomly collected lignocellulose samples K. D. Hyde. *Sydowia*, *44*, 131–136.
- Jadulco, R., Brauers, G., Edrada, R. A., Ebel, R., Wray, V., Sudarsono, & Proksch, P. (2002). New metabolites from sponge-derived fungi *Curvularia lunata* and *Cladosporium herbarum*. *Journal of Natural Products*, *65*(5), 730–733.
- Jadulco, R., Proksch, P., Wray, V., Sudarsono, Berg, A., & Gräfe, U. (2001). New macrolides and furan carboxylic acid derivative from the sponge-derived fungus *Cladosporium herbarum*. *Journal of Natural Products*, *64*(4), 527–530.
- Jebaraj, S., Forster, D., Kauff, F., & Stoeck, T. (2012). Molecular diversity of fungi from marine oxygen-deficient environments (ODEs). En C. Raghukumar (Ed.), *Biology of Marine Fungi* (pp. 190–204). New York: Springer.
- Jiang, Z., Barret, M. O., Boyd, K. G., Adams, D. R., Boyd, A. S. F., & Grant Burgess, J. (2002). JM47, a cyclic tetrapeptide HC-toxin analogue from a marine *Fusarium* species. *Phytochemistry*, *60*(1), 33–38.
- Joint, I., Mühling, M., & Querellou, J. (2010). Culturing marine bacteria - an essential prerequisite for biodiscovery. *Microbial Biotechnology*, *3*(5), 564–75.
- Jones, E. B. G., Sakayaroj, J., Suetrong, S., Somrithipol, S., & Pang, K. L. (2009). Classification of marine Ascomycota, anamorphic taxa and Basidiomycota. *Fungal Diversity*, *35*, 1–187.
- Jones, E. B. G. (2011). Are there more marine fungi to be described? *Botanica Marina*, *54*(4), 343–354.
- Jones, E. B. G. (2000). Marine fungi: some factors influencing biodiversity. *Fungal Diversity*, *4*, 53–73.
- Jukes, T. H., & Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. In M. HN (Ed.), *Protein Metabolism* (pp. 21–132). New York: Academic Press.
- Kanoh, K., Okada, A., Adachi, K., Imagawa, H., Nishizawa, M., Matsuda, S., & Utsumi, R. (2008). Ascochytatin, a novel bioactive spirodioxynaphthalene metabolite produced by the marine-derived fungus, *Ascochyta* sp. NGB4. *The Journal of Antibiotics*, *61*(3), 142–148.

- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111–120.
- Koch, J. (1986). Some lignicolous marine fungi from Thailand, including two new species. *Nordic Journal of Botany*, 6, 497–499.
- Kohlmeyer, J. (1979). Marine fungal pathogens among Ascomycetes and Deuteromycetes. *Generalia*, 35(4), 437–439.
- Kohlmeyer, J., & Kohlmeyer, E. (1972). *Marine mycology: the higher fungi*. New York: Academic Press.
- Kohlmeyer, J., & Kohlmeyer, E. (1971). Marine fungi from tropical America and Africa. *Mycologia*, 63, 831–861.
- Koholomer, J. (1968). Marine fungi from the tropics. *Mycology Society of America*, 60(2), 252–270.
- Koneman, E., Allen, S., Dowell, V. R., Janda, W., Sommers, H., & Winn, W. (1988). *Diagnóstico Microbiológico* (3a ed.). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Kumar, S., Glen, S., Tamura, K. (2015). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0.
- Kupka, J., Anke, T., Mizumoto, K., Giannetti, B. M., & Steglich, W. (1982). Antibiotics from basidiomycetes. XVII. The effect of marasmic acid on nucleic acid metabolism. *The Journal of Antibiotics*, 36(2), 155–160.
- Kuznetsova, T. A., Smetanina, O. F., Afiyatullo, S. S., Pivkin, M. V., Denisenko, V. A., & Elyakov, G. B. (2001). The identification of fusidic acid, a steroidal antibiotic from marine isolate of the fungus *Stilbella aciculosa*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29(8), 873–874.
- Li, X., Choi, H. D., Kang, J. S., Lee, C.-O., & Son, B. W. (2003). New polyoxygenated farnesylcyclohexenones, deacetoxyanuthone A and its hydro derivative from the marine-derived fungus *Penicillium sp.* *Journal of Natural Products*, 66(11), 1499–500.
- Lin, W., Brauers, G., Ebel, R., Wray, V., Berg, A., & Proksch, P. (2003). Novel chromone derivatives from the fungus. *Journal of Natural Products*, 66, 57–61.

- Malmstrøm, J., Christophersen, C., Barrero, A. F., Oltra, J. E., Justicia, J., & Rosales, A. (2002). Bioactive metabolites from a marine-derived strain of the fungus *Emericella varicolor*. *Journal of Natural Products*, *65*, 364–367.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., & Kim, S. (2013). Introduction to marine actinobacteria. In S.-K. Kim (Ed.), *Marine Microbiology: Bioactive compounds and Biotechnological Applications*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Michiels, A., Van Den Ende, W., Tucker, M., Van Riet, L., & Van Laere, A. (2003). Extraction of high-quality genomic DNA from latex-containing plants. *Analytical Biochemistry*, *315*(1), 85–89.
- Moghadamtousi, S., Nikzad, S., Kadir, H., Abubakar, S., & Zandi, K. (2015). Potential antiviral agents from marine fungi: An Overview. *Marine Drugs*, *13*, 4520–4538.
- Nagahama, T., & Nagano, Y. (2012). Cultured and uncultured fungal diversity in deep sea environments. En C. Raghukumar (Ed.), *Biology of Marine Fungi* (pp. 173 – 185). New York: Springer
- National Center for Biotechnology Information. (2016). NCBI. Obtenido el 1° de enero, 2016, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Nielsen, J., Nielsen, P. H., & Frisvad, J. C. (1999). Fungal depside, guisinol, from a marine derived strain of *Emericella unguis*. *Phytochemistry*, *50*(2), 263–265.
- Nong, X. H., Wang, Y. F., Zhang, X. Y., Zhou, M. P., Xu, X. Y., & Qi, S. H. (2014). Territrem and butyrolactone derivatives from a marine-derived fungus *Aspergillus terreus*. *Marine Drugs*, *12*, 6113–6124.
- Peng, J., Lin, T., Wang, W., Xin, Z., Zhu, T., Gu, Q., & Li, D. (2013). Antiviral alkaloids produced by the mangrove-derived fungus *Cladosporium* sp. PJX-41. *Journal of Natural Products*, *76*, 1133–1140.
- Petersen, H. E. (1905). Contributions a la connaissance des Phycomycètes marins (Chytridineeie Fischer). *Oversigt K. Danske Vidensk, Seisk. Forhandi*, *5*(439).
- Prasannarai, K., & Sridhar, K. R. (1997). Effect of incubation period of driftwood on the occurrence of marine fungi. *Indian Journal of Marine Sciences*, *26*, 380–382.

- Prasannarai, K., & Sridhar, K. R. (2003). Abundance and diversity of marine fungi on intertidal woody litter of the West Coast of India on prolonged incubation. *Fungal Diversity*, 14(3), 127–141.
- Prieto, C., & Castro, J. M. (2005). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in the boar: A review. *Theriogenology*, 63(1), 1–16.
- Qin, C., Lin, X., Lu, X., Wan, J., Zhou, X., Liao, S. & Liu, Y. (2014). Sesquiterpenoids and xanthenes derivatives produced by sponge-derived fungus *Stachybotry sp.* HH1 ZSDS1F1-2. *The Journal of Antibiotics*, 68, 121–125.
- Raghukumar, C., & Damare, S. (2008). Deep-sea fungi. En C. Michiels, D. H. Bartlett, & A. Aertsen (Eds.), *High Pressure Microbiology* (pp. 265–291). Washington DC: ASM Press.
- Raghukumar, C., Raghukumar, S., Sharma, S., & Chandramohan, D. (1992). Endolithic fungi from deep sea calcareous substrata: isolation and laboratory studies. En *Oceanography of the Indian Ocean*, Ed. (pp. 3–9). New Delhi: Oxford IBH Publication.
- Raghukumar, C., Damare, S. R., & Singh, P. (2010). A review on deep-sea fungi: Occurrence, diversity and adaptations. *Botanica Marina*, 53(6), 479–492.
- Raghukumar, C., & Raghukumar, S. (1998). Barotolerance of fungi isolated from deep-sea sediments of the Indian Ocean. *Aquatic Microbial Ecology*, 15(2), 153–163.
- Raghukumar, C., Raghukumar, S., Sheelu, G., Gupta, S. M., Nagender Nath, B., & Rao, B. R. (2004). Buried in time: Culturable fungi in a deep-sea sediment core from the Chagos Trench, Indian Ocean. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 51(11), 1759–1768.
- Raghukumar, S., Sharma, S., Raghukumar, C., Sathe-Pathak, V., & Chandramohan, D. (1994). Thraustochytrid and fungal component of marine detritus. IV. Laboratory studies on decomposition of leaves of the mangrove *Rhizophora apiculata* Blume. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 183(1), 113–131.
- Ravikumar, D. R., & Vittal, B. P. R. (1996). Fungal diversity on decomposing biomass of mangrove plant *Rhizophora* in Pichavaram estuary, east coast of India. *Journal of Marine Sciences*, 25, 142–144.

- Renner, M. K., Jensen, P. R., & Fenical, W. (2000). Mangicols: Structures and biosynthesis of a new class of sesterterpene polyols from a marine fungus of the genus *Fusarium*. *Journal of Organic Chemistry*, 65(16), 4843–4852.
- Roth, F. J. ., Orpurt, P. A., & Ahearn, D. G. (1964). Occurrence and distribution of fungi in a subtropical marine environment. *Canadian Journal of Botany*, 42(525), 375–383.
- Sarma, V. V, & Vittal, B. P. R. (2000). Biodiversity of mangrove fungi on different substrata of *Rhizophora apiculata* and *Avicennia spp.* from Godavari and Krishna deltas, east coast of India. *Fungal Diversity*, 5, 23–41.
- Sarma, V. V, Hyde, K. D., & Vittal, B. P. R. (2001). Frequency of occurrence of mangrove fungi from the east coast of India. *Hydrobiologia*, 455, 41–53.
- Schoch, C. L., Robbertse, B., Robert, V., Vu, D., Cardinali, G., Irinyi, L., & Federhen, S. (2014). Finding needles in haystacks: linking scientific names, reference specimens and molecular data for Fungi. *Database : The Journal of Biological Databases and Curation*, 2014, 1–21.
- Schoch, C. L., Seifert, K. a, Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., & Chen, W. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 6241–6246.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2002). *Resumen del programa de manejo del área natural protegida con el caracter de Parque Nacional Bahía de Loreto, Baja California Sur*. México: Diario Oficial de la Federación.
- Singh, P., Raghukumar, C., Verma, P., & Shouche, Y. (2010). Phylogenetic diversity of fungi from the deep-sea sediments of the Central Indian Basin and their growth characteristics. *Fungal Diversity*, 40, 89–102.
- Singh, P., Raghukumar, C., Meena, R. M., Verma, P., & Shouche, Y. (2012). Fungal diversity in deep-sea sediments revealed by culture-dependent and culture-independent approaches. *Fungal Ecology*, 5, 543–553.
- Sparrow, F. K. J. (1934). Observations on marine Phycomycetes collected in Denmark. *Dansk Botanisk Arkiv*, 8(6), 1–24.
- Sparrow, F. K. J. (1936). Biological observations of the marine fungi of woods hole waters. *Biological Bulletin*, 70(2), 236–263.

- Steinke, T. D., & Jones, E. B. G. (1993). Marine and mangrove fungi from the Indian Ocean coast of South Africa. *Fungal Diversity*, 8, 1–34.
- Takami, H., Inoue, A., Fuji, F., & Horikoshi, K. (1997). Microbial flora in the deepest sea mud of the Mariana trench. *FEMS Microbiology Letters*, 152(2), 279–285.
- Teunissen, P. J. M., Swarts, H. J., & Field, J. A. (1997). The de novo production of drosophilin A (tetrachloro-4-methoxyphenol) and drosophilin A methyl ether (tetrachloro-1,4-dimethoxybenzene) by ligninolytic basidiomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47(6), 695–700.
- Toffin, L., Webster, G., Weightman, A. J., Fry, J. C., & Prieur, D. (2004). Molecular monitoring of culturable bacteria from deep-sea sediment of the Nankai Trough, Leg 190 Ocean Drilling Program. *FEMS Microbiology Ecology*, 48(3), 357–67.
- Valderrama, B., Paredes-Valdez, G., Rodríguez, R., Romero-Guido, C., Martínez, F., Martínez-Romero, J., & Folch-Mallol, J. L. (2016). Assessment of non-cultured aquatic fungal diversity from different habitats in Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, (March), 0–11.
- Wang, J.-F., Lin, X.-P., Qin, C., Liao, S.-R., Wan, J.-T., Zhang, T.-Y., & Liu, Y.-H. (2014). Antimicrobial and antiviral sesquiterpenoids from sponge-associated fungus, *Aspergillus sydowii* ZSDS1-F6. *The Journal of Antibiotics*, 67, 581–583.
- Whitman, W. B., Coleman, D. C., & Wiebe, W. J. (1998). Perspective prokaryotes : the unseen majority, 95(June), 6578–6583.
- Xing, Y. M., Chen, J., Cui, J. L., Chen, X. M., & Guo, S. X. (2011). Antimicrobial activity and biodiversity of endophytic fungi in *Dendrobium devonianum* and *Dendrobium thyrsiflorum* from Vietman. *Current Microbiology*, 62(4), 1218–1224.
- Xu, L., Meng, W., Cao, C., Wang, J., Shan, W., & Wang, Q. (2015). Antibacterial and antifungal compounds from marine fungi. *Marine Drugs*, 13(6), 3479–3513.
- Zainal, A., & Jones, E. B. G. (1986). Occurrence and distribution of lignicolous marine fungi in Kuwait coastal waters. En S. Barry, D. R. Houghton, G. C. Llewellyn, & C. E. O’Rear (Eds.), *Biodeterioration* 6 (pp. 596–600). London: CAB International Mycological Institute and the Biodeterioration Society.

- Zengler, K., Toledo, G., Rappe, M., Elkins, J., Mathur, E. J., Short, J. M., & Keller, M. (2002). Cultivating the uncultured. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), 15681–6.
- Zheng, C. J., Shao, C. L., Guo, Z. Y., Chen, J. F., Deng, D. S., Yang, K. L., & Wang, C. Y. (2012). Bioactive hydroanthraquinones and anthraquinone dimers from a soft coral-derived *Alternaria* sp. fungus. *Journal of Natural Products*, 75(2), 189–197.