



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**

*La Universidad Católica de Loja*

**ÁREA BIOLÓGICA**

**TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**Aislamiento y caracterización de hongos a partir de sedimentos  
marinos con fines de bioprospección**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**AUTORA:** Pasaca Tenesaca, María Del Cisne

**DIRECTOR:** Cartuche Flores, Luis Emilio, M.Sc.

**LOJA- ECUADOR**

**2016**



*Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>*

Septiembre, 2016

## APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Magíster

Luis Emilio Cartuche Flores

**DIRECTOR DE LA TITULACIÓN**

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación “**Aislamiento y caracterización de hongos a partir de sedimentos marinos con fines de bioprospección**” realizado por **Pasaca Tenesaca María Del Cisne**, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Agosto de 2016

f).....

M.Sc. Luis Emilio Cartuche Flores.

**DIRECTOR.**

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo Pasaca Tenesaca María Del Cisne declaro ser autora del presente trabajo de titulación: **“Aislamiento y caracterización de hongos a partir de sedimentos marinos con fines de bioprospección”**, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Luis Emilio Cartuche Flores director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Además declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen a través o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

f).....

**Autora:** Pasaca Tenesaca María Del Cisne

**Cédula:** 1104405640

## DEDICATORIA

*A DIOS por derramar sus bendiciones sobre mí, llenarme de fuerza y valentía para vencer todos los obstáculos en mi vida.*

*A mi madre, Olga Del Carmen, ejemplo de lucha y sacrificio, mi razón de ser.*

*A mi padre, Tito Hernán, mi fuente de valor y ángel guardián.*

*A mi hermana, María Fernanda, alegría y luz de mi vida.*

*A mi familia y amigos.*

**María Del Cisne Pasaca T.**

## AGRADECIMIENTO

*A DIOS por bendecirme, guiarme en cada paso, darme esperanza y amor incondicional.*

*A mi madre, Olga Del Carmen, quien jamás dejó de creer y confiar en mí, mi compañera de vida y mi mejor amiga. Gracias Mamita Linda. ¡Te amo!*

*A mi padre, Tito Hernán, quien me ha dado el valor de luchar siempre por lo que más quiero.*

*A mi hermana, María Fernanda, gracias por tu cariño y sonrisa que iluminan mis días.*

*A mis abuelitos, Luis Tenesaca (†) y Josefina Guilcamaygua por sus sabios consejos que me permitieron aprovechar cada oportunidad.*

*Agradezco de manera especial al M.Sc Luis Cartuche, por dirigir cada paso e impartir sus conocimientos en el desarrollo de esta investigación.*

*Al Ph.D Darío Cruz y BQF. Oscar Flores por su colaboración y conocimientos compartidos que hicieron posible la culminación de este trabajo.*

*A mis grandes amigos, los que conocí durante mi etapa universitaria y aquellos con los que he forjado lazos de amistad durante mi niñez y adolescencia, gracias por cada momento compartido, por sus palabras de apoyo y confianza puestos en mí.*

*A todos los que hicieron esto posible ¡Gracias!*

**María Del Cisne Pasaca T.**

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA .....	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN .....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS .....	iii
DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTO .....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I.....	5
MARCO TEÓRICO .....	5
1.1. Reino fungi.....	6
1.2. Hongos marinos.....	6
1.2.1. Clasificación taxonómica. ....	7
1.2.1.1. Caracterización de hongos. ....	8
1.2.1.1.1. Identificación morfológica.....	8
1.2.1.1.2. Identificación molecular.....	9
1.2.2. Importancia en la bioprospección.....	9
1.2.3. Sistemas de aislamiento de hongos marinos.....	12
1.3. Ensayos de actividad invitro. ....	13
1.3.1. Ensayos de actividad biológica. ....	13
1.3.1.2. Concentración mínima inhibitoria (CIM). ....	14
1.3.2. Ensayos de actividad enzimática. ....	15
1.3.2.1. Enzima $\alpha$ -amilasa.....	15
1.3.2.2. Enzima $\alpha$ -glucosidasa. ....	16
CAPÍTULO II.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
2.1. Sitio de recolección de la muestra. ....	19
2.2. Aislamiento y cultivo. ....	19
2.3. Caracterización de hongos.....	19
2.3.1. Caracterización morfológica. ....	20
2.3.2. Caracterización molecular. ....	20

2.4. Análisis filogenético. ....	21
2.5. Producción de biomasa y obtención de extractos. ....	22
2.6. Ensayos de actividad invitro. ....	23
2.6.1. Actividad antibacteriana.....	23
2.6.1.1. Método de microdilución en caldo. ....	23
2.6.1.2. Cultivo overnight.....	23
2.6.1.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	23
2.6.2. Actividad enzimática. ....	24
2.6.2.1. Enzima $\alpha$ -amilasa.....	24
2.6.2.2. Enzima $\alpha$ -glucosidasa.....	24
CAPÍTULO III.....	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	26
3.1. Aislamiento y cultivo. ....	27
3.2. Caracterización de hongos.....	29
3.2.1. Caracterización morfológica. ....	29
3.2.2. Caracterización molecular. ....	36
3.3. Producción de biomasa y obtención de extractos. ....	39
3.4. Ensayos de actividad invitro. ....	42
3.4.1. Actividad antibacteriana.....	42
3.4.2. Actividad enzimática. ....	44
CONCLUSIONES.....	47
RECOMENDACIONES.....	48
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
ANEXOS.....	60
ANEXO 1. Preparación de medio de cultivo. ....	61
ANEXO 2. Análisis de PCR del ADN genómico extraído de los cinco morfotipos....	62

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Agrupación de cepas de hongos aislados.....	28
<b>Tabla 2.</b> Morfotipos obtenidos a nivel macroscópico al clasificar las 17 cepas de hongos en grupos de acuerdo a las características de la colonia.....	29
<b>Tabla 3.</b> Análisis microscópico e identificación presuntiva de géneros de hongos aislados.....	31
<b>Tabla 4.</b> Análisis molecular comparativo de secuencias reportadas en el NCBI realizado en BLAST. Porcentaje de cobertura y similitud.....	37
<b>Tabla 5.</b> Características fisicoquímicas y obtención del micelio en medio de cultivo líquido YNPD (mg/L).....	40
<b>Tabla 6.</b> Características y porcentaje de rendimiento de los extractos obtenidos en relación a la cantidad de biomasa producida por cada hongo (mg/L). ....	41
<b>Tabla 7.</b> Concentración mínima inhibitoria (CIM) de los extractos frente a microorganismos patógenos en análisis de ensayo antibacteriano. ....	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cultivo inicial de las muestras de sedimentos marinos: A, MJ001; B, MJ002; C, MJ004; D, MJ005; E, MJ006; F, MJ007; G, MJ008; H, MJ010; I, MJ013; J, MJ014; K, MJ016; L, MJ018; M, MJ019; N, MJ021; O, MJ023; P, MJ025.....	27
<b>Figura 2.</b> Ilustración microscópica a 10 $\mu\text{m}$ de los morfotipos pertenecientes al género <i>Cladosporium</i> . A: MJDP <sub>1</sub> , <i>Cladosporium</i> sp. 01; B: MJEM <sub>1</sub> , <i>Cladosporium</i> sp. 02; C: MJJP <sub>1</sub> , <i>Cladosporium</i> sp. 03.....	33
<b>Figura 3.</b> Ilustración microscópica de los morfotipos pertenecientes a los géneros <i>Penicillium</i> y <i>Phoma</i> . A: MJRY <sub>1</sub> : <i>Penicillium</i> sp; B: MJHP <sub>1</sub> , <i>Phoma</i> sp. ....	34
<b>Figura 4.</b> A) Picnidio B) Estructura interna del picnidio (células conidiógenas).....	35
<b>Figura 5.</b> Hipótesis filogenética por Maximun Likelihood para la región ITS-5.8S y LSU parcial de hongos aislados de sedimentos marinos. Árbol enraizado en punto medio. ....	38
<b>Figura 6.</b> Producción de micelio en medio YNDP. A, MJDP <sub>1</sub> ; B, MJEM <sub>1</sub> ; C, MJJP <sub>1</sub> ; D, MJRY <sub>1</sub> ; y E, MJHP <sub>1</sub> .....	40
<b>Figura 7.</b> Porcentaje de inhibición de los diferentes extractos de hongo frente a las enzimas $\alpha$ -amilasa y $\alpha$ -glucosidasa en los ensayos de actividad enzimática.....	46

## RESUMEN

Los hongos provenientes de ambientes marinos se han establecido como una fuente viable en la producción de metabolitos secundarios que poseen estructuras químicas de alto potencial terapéutico con propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antiparasitarias y anticancerígenas. En este estudio se realizó el aislamiento, caracterización (morfo-molecular) y producción de biomasa (micelio) de hongos marinos. Así mismo, la evaluación de su actividad antibacteriana e hipoglucemiante de extractos, macerando el micelio con AcOEt. Se aisló un total de 17 cepas fúngicas las cuales se agrupan en cinco morfotipos y molecularmente se clasifican dentro de tres géneros del filo Ascomycota: *Cladosporium*, *Penicillium* y *Phoma*. Ninguna de las cepas fúngicas evaluadas presentaron actividad inhibitoria frente a las bacterias patógenas. Sin embargo, en el análisis enzimático las cepas MJEM1 (*Cladosporium* sp. 02) presentó actividad inhibitoria del 55,98% y 53,43% para las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa, respectivamente; y las cepas MJRY1 (*Penicillium* sp.) y MJHP1 (*Phoma* sp.) presentaron porcentajes de inhibición enzimático del 50,92% y 50,03% para la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, respectivamente.

**Palabras claves:** *Cladosporium*, *Penicillium*, *Phoma*, ITS-5.8S, morfotipos, actividad biológica, actividad enzimática.

## ABSTRACT

Fungi from marine environments have been established as a viable source in the production of secondary metabolites possessing chemical structures of high therapeutic potential with antibacterial, antifungal, antiviral, antiparasitic and anticancer properties. In this study was conducted the isolation, characterization (morphological and molecular) and biomass production (mycelium) of marine fungi. Likewise, the evaluation of their antibacterial and hypoglycemic activity of extracts, macerating the mycelium with AcOEt. A total of 17 fungal strains were isolated which are grouped into five morphotypes and molecularly are classified into three genera of the phylum Ascomycota: *Cladosporium*, *Penicillium* and *Phoma*. None of the tested fungal strains showed biological activity against pathogenic bacteria. However, in the enzymatic analysis MJEM1 (*Cladosporium* sp. 02) strains presented 55.98% and 53.43% of inhibitory activity for the enzymes  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase, respectively; and MJRY1 (*Penicillium* sp.) and MJHP1 (*Phoma* sp.) strains showed percentages of 50.92% and 50.03% for  $\alpha$ -glucosidase, respectively.

**Key words:** *Cladosporium*, *Penicillium*, *Phoma*, ITS-5.8S, morphotypes, biological activity, enzymatic activity.

## INTRODUCCIÓN

El reino fungi posee una amplia diversidad biológica y cuenta con un aproximado total de 1,5 millones de especies que se diferencian unas de otras por su ciclo de vida y morfología variables (Aguirre-Acosta, Ulloa, Aguilar, Cifuentes, & Valenzuela, 2014). Los hongos al poseer características fenotípicas variables que permiten identificarlos macroscópicamente y microscópicamente a nivel morfológico posibilitan su clasificación en las diferentes categorías del reino fungi (Montes, Respetro, & McEwen, 2003). Sin embargo, en las últimas décadas se han empleado análisis moleculares que permiten analizar las secuencias genéticas de diversos especímenes permitiendo obtener un resultado más preciso y confiable de clasificación taxonómica de los organismos fúngicos (Jayasiri et al., 2015).

Los hongos representan al grupo ecológico más estudiado a nivel mundial, tanto por su distribución y ubicación geográfica y por su diversidad biológica, cuyas especies fúngicas poseen en su estructura molecular compuestos de alto potencial terapéutico de gran importancia a nivel biomédico e industrial, principalmente (Jayasiri et al., 2015; Mouton, Postma, Wilsenach, & Botha, 2012; Swathi, Sowjanya, Narendra, Reddy, & Satya, 2013).

Los hongos más representativos en cuanto a producción de metabolitos secundarios bioactivos con propiedades terapéutica antibacterianas, antifúngicas, anticancerígenas y antivirales son los hongos provenientes de ambientes marinos, de los cuales anualmente se aíslan alrededor de 150 – 200 nuevos compuestos (Bhadury, Mohammad, & Wright, 2006; Sutani, Ueno, Nakagawa, & Sawayama, 2015; Yoiprommarat et al., 2015). Los compuestos más destacados de estos organismos fúngicos son los policétidos, alcaloides, péptidos, terpenos y sesquiterpenos que adquieren propiedades farmacológicas de gran interés (Yoiprommarat et al., 2015).

Los hongos marinos comprenden alrededor de 500 variedades de especies pertenecientes a la división Deuteromycota, Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota (Blunt, Buckingham, & Munro, 2012), las mismas que se agrupan en los géneros *Eupenicillium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Chrysosporium*, *Chaetomium*, *Cephalosporium*, *Cladosporium*, *Mycosphaerella*, *Leptosphaeria*, *Pleospora*, *Talaromyces*, *Fusarium*, *Halosphaeria*, *Anthostomella* y *Alternaria*, para hongos del filo Ascomycota; y *Artomyces*, *Cystofilobasidium*, *Trichosporon*, *Cryptococcus*, *Dioszegia*, *Filobasidium*, *Leucosporidium*, *Rhodosporeidium*, *Sporobolomyces*, *Erythrobasidium*, *Haloaleurodiscus*, *Digitatispora*, *Fulviformes*,

*Grammothele*, *Hyphoderma*, *Mycaureola*, *Nia*, *Halocyphina*, *Calathella*, *Tilletiopsis*, *Parvulago* y *Flamingomyces*, para el filo Basidiomycota (Jones et al., 2015; Sutani et al., 2015).

La presente investigación se enfocó en el aislamiento y la caracterización de hongos provenientes de muestras de sedimentos marinos y su posterior utilización como fuentes de metabolitos (obtención de extractos macerados en Acetato de etilo) para evaluar su potencial antibacteriano frente a bacterias patógenas Gram positivas y Gram negativas. Finalmente, su capacidad de inhibir sistemas enzimáticos importantes como las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa, involucradas en la digestión de carbohidratos.

## **CAPÍTULO I**

### **MARCO TEÓRICO**

## **1.1. Reino fungi.**

El reino fungi representa ser uno de los reinos más grandes en cuanto a biodiversidad, posee organismos de gran importancia, tanto a nivel ecológico y económico. Entre los organismos que lo conforman se destacan las setas, royas, trufas, mohos y levaduras, así como otros organismos menos conocidos. Cuenta con un número aproximado de 1,5 millones de especies, las mismas que difieren en variabilidad morfológica y ciclos de vida (Aguirre, Ulloa, Aguilar, & Cifuentes, 2014).

Los hongos son organismos eucariotas cuya pared celular está constituida principalmente por quitina y algunos por celulosa, son abundantes y se encuentran ampliamente distribuidos (Feofilova, 2001). No poseen clorofila, son saprófitos, simbiontes y parásitos, se desarrollan en diversos hábitats, incluyendo ambientes extremos. Se reproducen asexual y sexualmente, algunos son unicelulares y pluricelulares y algunos pueden formar micorrizas, es decir, tienen una relación simbiótica con las plantas (Manoharachary, Kunwar, & Reddy, 2010).

Los hongos se reproducen sexual o asexualmente. En el primer caso, estos microorganismos intercambian su material genético prolongando su tiempo de reproducción en cada etapa del ciclo vital, permitiendo así la evolución y adaptación de las especies. En cambio, la reproducción asexual es un proceso mitótico y rápido que promueve la propagación de la especie, permite la producción de numerosos individuos y genera células reproductoras especializadas (Charya, 2015). Esto puede ocurrir en hongos unicelulares como las levaduras que presentan variación morfológica y se caracterizan por reproducirse sexual y asexualmente. Su reproducción sexual consiste en la formación de esporas, mientras que, la asexual la realizan por gemación o fisión binaria (Orberá, 2004; Uribe, 2007). Por otro lado, los hongos pluricelulares denominados mohos, se diferencian por presentar estructuras macroscópicas denominadas hifas, que representan ser el cuerpo verdadero del hongo el cual se denomina micelio (Kuhar, Castiglia, & Papinutti, 2013).

## **1.2. Hongos marinos.**

El océano es el ecosistema más grande del planeta, representa las  $\frac{3}{4}$  partes de la Tierra y en él habitan más del 80% de organismos vivos presentes en la tierra (Kim & Venkatesan, 2015). Su diversidad comprende un aproximado de 300 000 variedades de especies, entre las que se encuentran: animales marinos, algas, ascidias, corales,

esponjas, bacterias y hongos (Moghadamtousi, Nikzad, Kadir, Abubakar, & Zandi, 2015). Estos organismos marinos se desarrollan en condiciones acuáticas extremas de temperatura, pH, humedad y presión, donde el contenido de clorofila, sal y calidad del agua los hacen productores únicos de compuestos biológicos activos (Kim & Venkatesan, 2015).

Los hongos marinos comprenden alrededor de 500 variedades de especies distribuidas principalmente en los filos Deuteromycota (hongos imperfectos), Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota, diferenciándose uno de otro por su sistema de formación de esporas (zigosporas, ascos y basidios para los tres últimos grupos, respectivamente, siendo los hongos ascomicetos y deuteromicetos los más representativos en el medio marino y más investigados químicamente. (Blunt et al., 2012; Webster & Weber, 2007).

### **1.2.1. Clasificación taxonómica.**

La taxonomía de los hongos se rige en una serie de categorías: reino, división, clase, familia, género y especie (Montes et al., 2003). Esta clasificación establece un código específico para cada morfotipo identificado, es decir, que al analizar molecularmente a un hongo, su código genético es la huella que nos permite buscar en una base de datos comparaciones entre las posibles especies en las que se podría encontrar, enfatizando porcentajes de confianza en base a su análisis secuencial (Voigt & Kirk, 2011).

La clasificación de los hongos estaba concentrada desde un inicio en dos grandes grupos; 1) Myxomycota, en el que se encuentran los hongos sin pared celular y al que pertenecen los filos Acrasiomycota, Hidromyxomycota, Myxomycota y Plasmodiophoromycota. Y 2) Eumycota, que comprende los hongos con pared celular, denominados hongos verdaderos y se encuentra conformado por los filos Mastigomycota o Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota (Montes et al., 2003).

La clasificación de los hongos marinos se encuentra distribuida en los géneros *Eupenicillium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Chrysosporium*, *Chaetomium*, *Cephalosporium*, *Cladosporium*, *Mycosphaerella*, *Leptosphaeria*, *Pleospora*, *Talaromyces*, *Fusarium*, *Halosphaeria*, *Anthostomella* y *Alternaria*, para hongos del filo Ascomycota; y *Artomyces*, *Cystofilobasidium*, *Trichosporon*, *Cryptococcus*,

*Dioszegia, Filobasidium, Leucosporidium, Rhodosporidium, Sporobolomyces, Erythrobasidium, Haloaleurodiscus, Digitatispora, Fulvifomes, Grammothele, Hyphoderma, Mycaureola, Nia, Halocyphina, Calathella, Tilletiopsis, Parvulago y Flamingomyces*, para el filo Basidiomycota (Jones et al., 2015; Sutani et al., 2015).

Los hongos marinos se encuentran inmersos en dos categorías, los hongos marinos facultativos y hongos marinos obligados (Suryanarayanan, 2012). Los primeros son de origen terrestre o acuático y poseen la capacidad de adaptarse a las condiciones marinas; mientras que los hongos marinos obligados se desarrollan exclusivamente en ambientes marinos donde crecen y se reproducen, sin posibilidad de adaptarse a otras condiciones (Mouton et al., 2012).

Los hongos marinos presentan en su estructura molecular compuestos activos de gran importancia, tanto a nivel químico, bioquímico, farmacológico, biológico, molecular cosmético, agrícola, etc. Por tal motivo, clasificar a los hongos en sus diferentes categorías involucra también conocer su composición y utilidad (Mouton et al., 2012). Es más, establecer una base de datos mejora su organización y almacenamiento, con la finalidad de que en futuras investigaciones, la identificación de hongos sea más precisa y concisa, promoviendo su eficacia y conservación, optando por los mejores candidatos de alto potencial para futuros propósitos de gran prospecto (Jayasiri et al., 2015).

#### **1.2.1.1. Caracterización de hongos.**

La identificación de especímenes se basa tanto en el análisis morfológico de estructuras macro y microscópicas características de cada organismo, así como de estudios a nivel molecular que permiten clasificarlos dentro de una jerarquía taxonómica (Flores, 2015; Jayasiri et al., 2015).

##### **1.2.1.1.1. Identificación morfológica.**

La identificación morfológica establece como primera instancia un examen macroscópico visual del hongo para analizar la forma y coloración de la colonia. Seguido de un estudio microscópico del micelio donde se reconocen las estructuras características del espécimen como las ramificaciones y proporción de las hifas,

presencia o ausencia de septos y clamps, tamaño y forma de las esporas, así como la presencia de uno a más núcleos en sus células (Geiser, 2004); facilitando la clasificación del microorganismo en las diversas jerarquías de reino fungi en base a claves taxonómicas (Carranza, 2006).

#### *1.2.1.1.2. Identificación molecular.*

El análisis morfológico de hongos resulta ser muy subjetivo para la clasificación de éstos especímenes, es por ello que, estudios realizados a nivel molecular en base a análisis genéticos y secuenciales de ADN/ARN confirman y precisan la relación morfotipo-ADN/ARN de hongos, permitiendo obtener un resultado más confiable de clasificación taxonómica de los organismos fúngicos (Jayasiri et al., 2015).

La identificación taxonómica de una cepa fúngica se logra con el estudio molecular, bioquímico y genético de su composición biológica (Mouton et al., 2012). Y durante las últimas dos décadas el uso de datos moleculares basados en la secuencia de ADN ha posibilitado la reconstrucción evolutiva de toda clase de especie que habita en el planeta, perfeccionando su clasificación taxonómica (Jayasiri et al., 2015).

La identificación molecular utiliza una amplia base de datos con secuencias de todos los grupos de hongos (Geiser, 2004), donde el análisis convencional del material genético de estos microorganismos se basa en la técnica de recombinación del ADN, la reacción en cadena de polimerasa o PCR que permite amplificar fragmentos específicos de ADN (Mouton et al., 2012). La PCR permite obtener secuencias ribosómicas de la sistemática molecular de hongos, las que representan ser marcadores específicos de estos especímenes. Entre estas secuencias se destacan las regiones ITS y 18S, que permiten la identificación de especies y géneros, respectivamente (Geiser, 2004; Voigt & Kirk, 2011).

#### **1.2.2. Importancia en la bioprospección.**

La bioprospección es una herramienta básica enfocada en la búsqueda, descubrimiento, manejo, aprovechamiento y creación de nuevos productos de excelente calidad a partir de organismos biológicos con fines comerciales (Murugaiyan, 2015). La bioprospección genera beneficios a las industrias farmacéuticas, biotecnológicas, agrónomas, medicina huma y medicina botánica; con

la finalidad de proporcionar recursos biológicos significativos de gran valor comercial. La bioprospección involucra la investigación sistemática incesante de acontecimientos bioquímicos y genéticos que promuevan el desarrollo de nuevas fuentes de compuestos químicos valiosos de la naturaleza (Gomes, Duarte, & Rocha-Santos, 2016).

La bioprospección marina se ha centrado principalmente en el estudio de organismos macroscópicos que se están disponibles en una amplia gama de nichos ecológicos marinos donde su captura y manejo son fáciles de realizar. Sin embargo, en los últimos años las poblaciones de microorganismos extremófilos que habitan en las profundidades del océano y que se han adaptado satisfactoriamente a las condiciones ambientales en las que viven han ido desarrollando reacciones metabólicas únicas de supervivencia que los convierten en fuentes prometedoras e interesantes de compuestos bioactivos. Donde el empleo de técnicas de manipulación adecuadas en microorganismos marinos deben garantizar su estabilidad genética con la finalidad de que estructuras moleculares no presenten gran variación y así no pierdan su funcionalidad, pues al ser organismos poco explorados se provee de información necesaria que asegure su supervivencia, no así, de la requerida en la toma de la muestra, la cual varía según el sitio de recolección, y que es el principal factor que afecta la estabilidad y calidad de la misma (Gomes et al., 2016; Murugaiyan, 2015).

Los estudios que involucran bioprospección promueven desarrollo sostenible y la conservación de los recursos biológicos mediante el uso de la biotecnología, ciencia definida por el Convenio de la Diversidad Biológica (CBD) de las Naciones Unidas, establecido el 22 de Junio de 1992, como: "Toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos" (G. Romero, 2008).

La biotecnología es un área multidisciplinaria que ha sido clasificada y codificada con un color en específico según su campo de estudio y funcionalidad: Roja, relacionada al campo de la salud; verde, vinculada en el medio ambiente; blanca, correspondiente al tratado bioindustrial de genes y azul, propia para la investigación marina (Chambergó & Valencia, 2016).

La biotecnología marina engloba una serie de herramientas que trabajan en el descubrimiento, desarrollo y producción de compuestos naturales que producen los organismos marinos (Khamthong, Rukachaisirikul, Phongpaichit, Preedanon, &

Sakayaroj, 2014). La biotecnología marina tiene como objetivo principal crear productos deseables con un modelo genético, molecular y biológico que mejoren la calidad de vida humana, originen un impacto en la economía de una sociedad y generen oportunidades para el desarrollo de materiales innovadores. Sin duda alguna, la biotecnología marina es fundamental en el desarrollo de fuentes marinas, cuyos biomateriales son indispensables en la búsqueda de nuevos candidatos de producción sustentable (Kim & Venkatesan, 2012).

El descubrimiento de nuevas drogas se ha establecido como papel fundamental en el estudio de los organismos marinos, destacando a los hongos marinos como principales constituyentes de productos naturales que poseen una amplia variedad de estructuras moleculares activas (Khamthong et al., 2014). El ecosistema marino posee gran biodiversidad, es amplio, complejo y evidencia la producción de muchos productos naturales (Blunt et al., 2012). Esta diversidad biológica se encuentra habitada por aproximadamente 800 microorganismos marinos, de los cuales más del 50% son de origen fúngico (Ma, Liu, Zhu, Liu, & Zhu, 2016). Los microorganismos marinos se han adaptado a las condiciones de vida oceánica, perfeccionando mecanismos de defensa y supervivencia que han infringido en su desarrollo, permitiéndoles de esta manera generar productos naturales con estructuras químicas de gran importancia (Ma et al., 2016).

Los hongos marinos son reconocidos por su gran diversidad en metabolitos secundarios, adquieren estructuras químicas naturales y originan principios activos puros, pues su disposición anatómica les confiere un esqueleto específico que los hace únicos en comparación a otros microorganismos (Yoiprommarat et al., 2015). Los hongos marinos tienen antecedentes genéticos importantes y únicos para el descubrimiento y formación de nuevos compuestos que tienen como objetivo la contribución a nivel farmacéutico y agroquímico, tanto para la producción o desarrollo de nuevos medicamentos y restauración ambiental, según corresponda (Holler et al., 2000).

Los hongos marinos se han establecido como una fuente viable en la producción inusual de metabolitos secundarios, gracias a su crecimiento y desarrollo en ambientes extremos (Bhadury et al., 2006). Se han descrito alrededor de 100 metabolitos aislados de hongos marinos (Holler et al., 2000), pero actualmente se han registrado más de 1000 compuestos provenientes de 80 especies fúngicas (Yoiprommarat et al., 2015) y aproximadamente una vez al año se aíslan de 150 - 200

nuevos compuestos a partir de hongos marinos (Sutani et al., 2015). Los hongos marinos presentan una amplia composición química que les provee de principios activos, entre los que se destacan policétidos, alcaloides, péptidos, terpenos y sesquiterpenos que adquieren propiedades farmacológicas de gran interés (Yoiprommarat et al., 2015).

Los metabolitos secundarios provenientes de hongos marinos poseen alto potencial como compuestos terapéuticos y al proceder del grupo ecológico más representativo a nivel mundial, por distribución y ubicación geográfica, son los más estudiados por su diversidad biológica (Swathi et al., 2013). Tienen propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales y antiparasitarias para el tratamiento de enfermedades infecciosas (Yoiprommarat et al., 2015), además cuentan con actividad anticancerígena que incluye el tratamiento del cáncer (Bhadury et al., 2006).

### **1.2.3. Sistemas de aislamiento de hongos marinos.**

La diversidad fúngica se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y su estudio implica saber a detalle las condiciones óptimas en las que estos organismos se desarrollan y reproducen, con la finalidad de entender y conocer la importancia que tienen su aislamiento, identificación y conservación para el desarrollo de futuras investigaciones (Flores, 2015).

Los hongos marinos son aislados frecuentemente de vegetales y madera en descomposición que se encuentran en aguas costeras, esponjas, corales, fuentes hidrotermales de aguas profundas e incluso sedimentos marinos (Mouton et al., 2012). Estos especímenes marinos se encuentran fisiológicamente adaptados a concentraciones altas de sal y glucosa dentro de su hábitat marino (Arias & Piñeros, 2008). Es por ello, que al realizar un aislamiento artificial se deben implantar métodos de manipulación y siembra concretos para estos organismos, en donde se establezcan medios de cultivos específicos que cuenten con los nutrientes necesarios para su desarrollo (Mouton et al., 2012).

Los medios de cultivos determinados para el aislamiento de hongos marinos están enriquecidos con gran variedad de nutrientes, entre los que destacan los compuestos orgánicos; principalmente la glucosa, compuestos inorgánicos; como sulfato de magnesio y fosfato de potasio, y compuestos de carbono complejo como almidón y

celulosa. También se encuentran los sustratos de carbono y nitrógeno inorgánico como peptona, malta y levadura (Arias & Piñeros, 2008; Holler et al., 2000). Los medios de cultivo empleados actualmente en el aislamiento de hongos marinos son: Agar Extracto de Malta (MEA), Papa Dextrosa (PDA), Sabouraud Dextrosa (SDA), Harina de Soja (MSA), principalmente (Holler et al., 2000; Mouton et al., 2012; Sutani et al., 2015).

### **1.3. Ensayos de actividad invitro.**

#### **1.3.1. Ensayos de actividad biológica.**

Los metabolitos secundarios producidos por hongos están involucrados en una serie de interacciones biológicas con plantas, animales e insectos, y principalmente con microorganismos como bacterias, virus, parásitos, y los mismos hongos. La diversidad de algunas especies de hongos en conjunto con sus compuestos bioactivos, le proporcionan a ciertos patógenos la capacidad de sobrevivir en condiciones ambientales diferentes a las de su desarrollo, proporcionándoles resistencia a los cambios medioambientales. Sin embargo, existen géneros de hongos que combaten a un sin número de organismos patógenos causantes de diversas patologías en humanos, animales y plantas (Palacios, Burtin, & Leech, 2004).

La necesidad del descubrimiento de nuevos antibióticos, antimicóticos, antiparasitarios y antihelmínticos es exigente, pues la creciente necesidad de medicamentos para controlar enfermedades producidas por bacterias, principalmente Gram negativas, hongos y parásitos confirma que cepas de estos organismos patógenos han desarrollado la capacidad de resistencia a ciertos medicamentos (Amraoui, Amraoui, Cohen, & Fassouane, 2014).

Los metabolitos secundarios producidos por organismos marinos tienen novedosas y únicas estructuras moleculares de gran actividad biológica que se encuentran relacionadas con la diversidad marina y que son indispensables para el desarrollo de nuevos compuestos o sustancias que se vinculan a los ámbitos de medicina y farmacología humana, animal y de plantas. (Chen et al., 2015).

Estudios relacionados con la actividad biológica de hongos establecen que a concentraciones mínimas los compuestos fúngicos activos podrían o no inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos. Entre las bacterias y hongos patógenos utilizados en ensayo invitro frente a compuesto derivados de hongos marinos se destacan: *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium smegmatis*, *Micrococcus luteus*, *Fusarium avenaceum*, *Candida sepedonicus* y *Candida albicans* (Chen et al., 2015; Mathan, Smith, Kumaran, & Prakash, 2011).

### **1.3.1.2. Concentración mínima inhibitoria (CIM).**

La microdilución en caldo es una técnica útil para determinar la CIM en un gran número de muestras donde la sensibilidad y especificidad de los resultados radica en el empleo de cantidades pequeñas de los compuestos o sustancias en ensayo que nos permitan obtener el mínimo margen de error. Por ello, el empleo de microdilución en placa con la utilización de concentrados o extractos de principio activos frente a organismos patógenos es ventajoso, pues no solo nos permite medir a concentraciones muy pequeñas efectos positivos, sino también efectos negativos como reacciones tóxicas, biológicas o fúngicas (Langfield et al., 2004).

La concentración mínima inhibitoria o CIM se establece como la cantidad mínima que se requiere de un fármaco, medicamento o compuesto activo para inhibir el crecimiento de un microorganismo patógeno en particular, es decir, que dicho organismo infeccioso a pesar de encontrarse en todas las condiciones favorables para su crecimiento, no podrá desarrollarse satisfactoriamente (Follmann, Brittain, & Powers, 2013).

La CIM establece protocolos en los que se emplean tubos de ensayo o placas multipocillos donde se realiza la interacción de las diluciones de los extractos vegetales, bacterianos o fúngicos con los respectivos microorganismos de ensayo invitro, empleándose controles positivos y negativos, ya sea de antibióticos o antifúngicos (Andrews, 2001). Luego de un lapso de 24 horas de incubación se mide la concentración mínima inhibitoria o CIM observando el grado de turbidez de la inoculación (desarrollo del microorganismo), la dilución donde no se presente crecimiento, se establece como la CIM necesaria del fármaco, sustancia o compuesto activo para inhibir el crecimiento microbiológico (Romero, 2015).

### **1.3.2. Ensayos de actividad enzimática.**

“Las enzimas son catalizadores biológicos que se encuentran constituidos parcial o totalmente por proteínas que regulan de manera específica todos los procesos químicos y bioquímicos del metabolismo celular” (Doss & Anand, 2012). Las enzimas se clasifican de acuerdo a la reacción que van a catalizar en: oxido-reductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas (Teijón, 2006).

La actividad enzimática de varios microorganismos se ha puesto en marcha por la gran demanda de estudios que promueven la búsqueda de nuevos compuestos activos biológicos de gran interés a nivel industrial (Doss & Anand, 2012). Las enzimas de origen microbiano tienen aplicaciones en industrias farmacéuticas, agrónomas, alimentarias y textiles; en centros de investigación, como biología molecular, genética e inmunología, y se emplean en tratamientos médicos con fines de salud y calidad de vida (Bhagobaty & Joshi, 2012).

Entre la diversidad de microorganismos productores de enzimas extracelulares se destacan los hongos filamentosos, que son fáciles de cultivar y producir, y poseen enzimas de gran potencial, característica que se les atribuye por su capacidad de crecer en ambientes únicos y extremos. Las enzimas de mayor importancia biotecnológica que se han identificado en microorganismos son la  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa, cuya característica fundamental es la degradación, siendo la  $\alpha$ -amilasa la que ocupada el primer lugar en explotación comercial (Bhagobaty & Joshi, 2012; Doss & Anand, 2012).

#### **1.3.2.1. Enzima $\alpha$ -amilasa.**

La enzima  $\alpha$ -amilasa se localiza en seres humanos en el cromosoma 1p21 en el gen AMY1A como la isoforma EC 3.2.1.1, es liberada por el páncreas, cuenta con un peso molecular de 57,6 kDa y posee gran actividad y estabilidad biológica a pH 5.5 – 8.0. Es una enzima que depende principalmente de calcio para mantener su integridad, estabilidad y cumplir sus funciones biológicas y/o bioquímicas implicadas en el desarrollo de reacciones metabólicas sobre los hidratos de carbono (Monteiro de Souza, 2010; Sales, Souza, Simeoni, & Magalhães, 2012; Sivaramakrishnan, Gangadharan, Madhavan, Soccol, & Pandey, 2006).

La  $\alpha$ -amilasa es un glucósido hidrolasa que cataliza polisacáridos, principalmente carbohidratos y enlaces  $\alpha$ -1,4 glucosídicos, transformando el almidón en maltosa y en pequeños oligosacáridos de múltiples tamaños. Las  $\alpha$ -amilasas son una de las enzimas más importantes a nivel industrial y farmacológico, se derivan básicamente de las enzimas endoamilasas, exoamilasas y transferasas, y ocasionan también la transglicosilación (formación de ciclodextrinas) de algunas especímenes fúngicas como lo es el caso de la especie *Aspergillus oryzae*. (Janecek, Svensson, & MacGregor, 2014; Monteiro de Souza, 2010; Sales et al., 2012; Sivaramakrishnan et al., 2006).

La  $\alpha$ -amilasa se localiza también en diversas especies de plantas ayudando a su germinación y maduración; en animales contribuyendo a la digestión del almidón por la formación de azúcares; y en variedades de microbios desempeñando un papel fundamental en el metabolismo de carbohidratos; (Doss & Anand, 2012; Mohamed, Almulaiky, Ahmed, Al-Bar, & Ibrahim, 2014). Por ello, se han implementado varios procesos de fácil optimización donde estudios químicos analíticos cuantitativos, como lo es la espectrofotometría, nos permiten determinar las concentraciones de la enzima en conjunto con su nivel de actividad para ser aplicados en estudios a nivel clínico, farmacológico, médico, alimentario e industrial (Mohamed et al., 2014; Sivaramakrishnan et al., 2006).

### **1.3.2.2. Enzima $\alpha$ -glucosidasa.**

La  $\alpha$ -glucosidasa es una enzima que tiene la capacidad de hidrolizar enlaces  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 de oligosacáridos y disacáridos, que se acoplan a residuos de D-glucosa, implicados en la etapa final de la digestión de los carbohidratos que están directamente relacionado con los niveles de glucosa en el plasma (Gou et al., 2015). Esta enzima se encuentra presente en varios organismos vivos, entre los que se incluyen los seres humanos, animales, plantas y microorganismos (Avellaneda, 2013; Gou et al., 2015).

La enzima  $\alpha$ -glucosidasa en seres humanos está presente en el cromosoma 17q25 en el gen GAA como dos isoformas que presentan la denominación EC 3.2.1.1.3 y EC 3.2.1.20, ambas poseen carácter ácido (Avellaneda, 2013). En animales, la  $\alpha$ -glucosidasa está presente como la isoforma  $\alpha$ -Glucosidasa II o  $\alpha$ -GLC II, se distribuye en órganos del aparato digestivo, secreciones salivales y la hemolinfa, desempeñando su papel en la digestión de los alimentos (Avellaneda, 2013; Singh, Kaur, & Kaur,

2015). La  $\alpha$ -GLC en plantas es abundante y actúa como un mecanismo de defensa natural al degradar el almidón, conjuntamente con la  $\alpha$ -amilasa (Avellaneda, 2013; Singh et al., 2015).

La  $\alpha$ -glucosidasa, en microorganismos como bacterias y hongos, degrada polímeros, moléculas de oligosacáridos y disacáridos, que intervienen en los procesos de obtención de energía y correcto funcionamiento de las actividades vitales en éstos organismos (Avellaneda, 2013). Estudios realizados por (Singh et al., 2015), han demostrado que las toxinas producidas por hongos tienen la capacidad de proteger a plantaciones agrícolas contra plagas de insectos al inhibir su crecimiento y función de las enzimas digestivas.

## **CAPÍTULO II**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

## **2.1. Recolección de las muestras.**

Las 25 muestras de sedimentos marinos etiquetadas desde MJ001 a MJ025 se obtuvieron del Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Química, en la Sección de Química Básica y Aplicada, de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL), las cuales formaron parte del proyecto “PROY\_QUI\_817. Recolección, caracterización y evaluación del potencial farmacológico de actinomicetos y basidiomicetos en la Región Sur del Ecuador”

## **2.2. Aislamiento y cultivo.**

Se colocó aproximadamente 1g de sedimento marino en un tubo falcón de 25 mL con 10 mL de solución buffer PBS a pH 7.4. Cada tubo se etiquetó con el nombre de la muestra y fecha de inoculación y se agitó con movimientos rotatorios en forma vertical para disolver la muestra; finalmente se dejó reposar en una gradilla hasta que sedimente. Se tomaron 100  $\mu$ L del sobrenadante de cada tubo y se inocularon independientemente en cajas petri con medios MEA, PDA y YNPD al 75% agua de mar artificial (Anexo 1) y 56  $\mu$ L de penicilina (4'000.000 U) por cada 100 mL de agar preparado. Se etiquetaron las cajas y llevaron a incubación a temperatura ambiente, monitoreando su crecimiento, alrededor de 3 a 5 para detectar características macroscópicas distintivas y asignar un código por cada espécimen aislado. La purificación de los cultivos se realizó por resiembra de las cepas obtenidas en nuevos medios de cultivo de agares MEA, PDA y YNPD (sin antibiótico), los cuales favorecieron el crecimiento de las colonias y facilitaron su identificación taxonómica.

## **2.3. Caracterización de hongos.**

Para la caracterización de las muestras aisladas y purificadas se procedió a emplear sistemas de clasificación “naturales” y de “cajón” empleando claves taxonómicas en identificación morfológica y estudios secuenciales de ADN con análisis filogenéticos en análisis moleculares (Burge, 1992).

### **2.3.1. Caracterización morfológica.**

Las cepas de hongos previamente aisladas se clasificaron en grupos de acuerdo a claves taxonómicas. De cada morfotipo obtenido se tomó una pequeña muestra del hongo y se la diluyó en 25  $\mu$ L de KOH con 25  $\mu$ L de Floxín en un portaobjetos, se observó al microscopio y se identificaron las estructuras morfológicas como: hifas, septos, fiálides y esporas, principalmente. Se realizó una ilustración de cada muestra visualizada al microscopio en una resolución de 10  $\mu$ m y se tomaron capturas fotográficas, las mismas que posibilitaron medir el tamaño de las esporas y fiálides en dimensiones precisas gracias al programa “iWorks 2.0”.

Las ilustraciones y fotografías de los morfotipos permitieron establecer características microscópicas propias de cada hongo, como la presencia o ausencia de ramificaciones y septos en las hifas y la disposición, forma y tamaño de sus esporas. Todas estas particularidades ayudaron a identificar la clase de hongo que tratábamos y basándonos en guías taxonómicas de ilustraciones de hongos, se hizo posible el reconocimiento a nivel de Género de cada morfotipo en estudio.

### **2.3.2. Caracterización molecular.**

Los hongos identificados fenotípicamente también fueron estudiados a nivel molecular en base a análisis de secuencias de ADN, aplicando el kit y protocolo estándar sugerido en REExtract-N-Amp™ PCR Ready Mix™. Inicialmente se extrajo el ADN de cada morfotipo; se tomó una pequeña muestra de cada hongo, se la colocó en tubos eppendorf de 0,5 mL y centrifugó por aproximadamente 30 segundos, con la finalidad de que las muestras descendan. Luego se colocaron 20  $\mu$ L de buffer de extracción en cada tubo y se llevó a incubar a 95°C por 10 minutos en un bloque calentador. Transcurrido este tiempo se realizó un vortex a la mezcla y se adicionaron 20  $\mu$ L de buffer de dilución y se dejó actuar por unos minutos. En otros tubos eppendorf se colocaron 2  $\mu$ L de la muestra de ADN con 8  $\mu$ L de solución súper mix (Primers ITS1 y NL4) y se llevó al termociclador durante 2 horas.

En el termociclador se ejecutó la amplificación del ADN por la reacción en cadena de polimerasa o PCR. Esta técnica emplea un proceso continuo de 35 ciclos que constan de tres fases (Mulet et al., 2001):

1. La desnaturalización, en donde a una temperatura de 94°C por 30 segundos las dobles cadenas de ADN se separan;
2. Alineamiento, aquí se unen los Primers a sus respectivas cadenas complementarias del ADN molde para amplificarla, este proceso se realiza por aproximadamente 30 segundos a una temperatura de 60°C; y
3. Extensión, donde se genera la nueva cadena de ADN, incrementando la temperatura a unos 72°C por un tiempo de 10 minutos.

La respectiva evaluación de la amplificación del ADN se determinó por la técnica de electroforesis en gel, donde se utilizó gel de agarosa al 1% más solución buffer TBE 1X. Los pocillos del gel de agarosa se cargaron; en el primer pocillo se colocaron 2 µL del marcador de 1000 pb y del segundo pocillo en adelante 2 µL de las muestras (1 µL de ADN y 1 µL de buffer de carga 5X Green GoTaq® Reaction Buffer). Una vez corrido el gel de agarosa se lo llevó a observar a luz UV donde se presenció que los pesos del ADN amplificado fueron estimados en comparación con el marcador de peso molecular de 1000 pb (Anexo 2), dando como resultado productos positivos para la secuenciación del ADN. La secuenciación del ADN fue realizada por la empresa Macrogen, en Seoul - Corea.

#### **2.4. Análisis filogenético.**

Las secuencias de ADN obtenidas de los cinco morfotipos se modificaron previo al análisis filogenético en el programa Codon Code Aligner V.4.2.4 para luego ser comparadas con secuencias disponibles en la base de datos GenBank. Para ello se ingresó a la página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> en la opción BLAST donde se seleccionó el comando "nucleotide blast". Aquí se ingresó la secuencia original de cada muestra analizada y al seleccionar la opción BLAST se observó un sin número de respuestas que coinciden con la secuencia ingresada, las mismas que fueron emitidas por el programa. Se eligieron aquellas secuencias que tuvieron una cobertura y similitud de entre 98-100%. Se descargaron cinco diferentes secuencias para cada morfotipo, como mínimo.

Las secuencias originales y nuevas fueron ingresadas en un nuevo documento en formato TXT con una nueva denominación: para las secuencias originales, el código de la muestra seguido del código de secuenciación; y para las nuevas secuencias, el código de acceso en el NCBI seguido del respectivo nombre de la especie a la que

pertenece dicha secuencia. Por ejemplo: >MJDP1\_A01\_ITS1 y >KT276985\_ *Cladosporium\_sp*, respectivamente.

Las secuencias finales, tanto originales como comparativas, fueron ingresadas a “BBEdit” para ser convertidas en formato fasta, luego se alinearon en el programa “Terminal” utilizando la opción “GINS-i”, observando el alineamiento final de las secuencias en “Se-A1”. Finalmente se obtuvo un árbol filogenético enraizado en punto medio empleando el análisis “Maximum Likelihood” a través del software MEGA V.5 (Bolaños et al., 2015; Nikolaou et al., 2009).

## **2.5. Producción de biomasa y obtención de extractos.**

Para la obtención de extractos se realizó en primera instancia la producción de biomasa de los hongos identificados. Para ello, se prepararon 250 mL de medio YNPD (ver Anexo 1) que se distribuyeron proporcionalmente en cinco frascos boeco de 100 mL para ser llevados a esterilización en autoclave a 120°C por 20 minutos. Transcurrido este tiempo y una vez que los medios se encontraron a temperatura ambiente, se procedió a inocular cada hongo en el medio de cultivo con la ayuda de un asa plástica y se llevaron a un plato agitador a 500 rpm hasta obtener crecimiento microbiológico. Al existir una confluencia del 50 al 75% de crecimiento se transfirieron los 50 mL de cultivo inicial a los 500 mL de medio YNPD contenidos en los frascos boeco de 1000 mL y se incubaron en un plato agitador a 400 rpm a 35°C por 7 días.

Transcurrido el tiempo de incubación se filtró el medio de cultivo obteniendo dos productos, el sólido o biomasa del hongo (micelio) y el filtrado o medio líquido, los mismos fueron tratados con acetato de etilo. El micelio se llevó a una estufa a 37°C para retirar el contenido de agua, se obtuvo su peso y una vez seco se lo introdujo en a un matraz erlenmeyer de 500 mL, y se procedió a macerarlo por 24 horas con 250 mL de acetato de etilo. Se filtró la solución y se la llevó a concentrar a un rotaevaporador a 34°C. En cambio, al líquido filtrado se lo colocó en un embudo de decantación de 1000 mL y se adicionó 500 mL de acetato de etilo. Se lo agitó constantemente y luego se lo dejó reposar por 20 minutos, se recuperó la fase orgánica filtrándola con sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) para eliminar residuos de agua. Este filtrado se incorporó al primer concentrado y se rotaevaporó hasta obtener un extracto seco. Se obtuvo el peso real y rendimiento porcentual de los extractos.

## **2.6. Ensayos de actividad invitro.**

### **2.6.1. Actividad antibacteriana.**

#### **2.6.1.1. Método de microdilución en caldo.**

Para realizar el método de microdilución en caldo se preparó una solución del extracto a partir de 20 mg de extracto fúngico en 1 mL de DMSO, para obtener una solución inicial de 1000 µg/mL en la placa de ensayo.

#### **2.6.1.2. Cultivo overnight.**

La preparación de los cultivos bacterianos se realizó con la inoculación de 30 µL de reservas bacterianas, conservadas a -80 °C, en los respectivos medios de cultivo. Las bacterias *Escherichia coli* (*Ec*), *Klebsiella pneumoniae* (*Kp*), *Pseudomona aeruginosa* (*Pa*) y *Staphylococcus aureus* (*Sa*), fueron inoculadas en Caldo Soya Tripticasa. *Proteus vulgaris* (*Pv*) en Caldo Muller Himnton. *Salmonella typhimurium* (*St*) en Caldo Oxoid. Y *Salmonella entérica* (*Se*) en Caldo Nutritivo. Las inóculos de las bacterias se incubaron a 37°C por 14-16 horas.

#### **2.6.1.3. Concentración mínima inhibitoria (CMI).**

Sobre placas multipocillos se colocaron 180 µL de caldo Muller Hinton en la primera fila (A1-A12) de una placa de 96 pocillos y en el resto de pocillos se colocaron 100 µL del mismo medio. Se adicionaron 20 µL de la solución de cada extracto en la primera fila para completar un volumen de 200 µL. A partir de esta solución se realiza el procedimiento de dilución doble seriada, tomando 100 µL del primer pocillo transfiriéndolo al segundo; se repite el procedimiento consecutivamente hasta obtener las diluciones deseadas. Se prepararon los controles necesarios bajo las mismas condiciones, inoculando una concentración conocida de un antibiótico y del disolvente empleado para la solubilización de los extractos. Las cajas se incubaron a 37°C durante 24 horas y se procedió a la lectura de los resultados. La concentración mínima inhibitoria se obtuvo al determinar la menor concentración del extracto frente a la cual las cepas bacterianas ensayadas no exhibieron crecimiento visible.

## **2.6.2. Actividad enzimática.**

### **2.6.2.1. Enzima $\alpha$ -amilasa.**

Para el ensayo de  $\alpha$ -amilasa se utilizó la acarbosa como control positivo. Se preparó una solución de almidón disolviendo 1 g en 50 mL de NaOH 0,4 M y se calentó durante 5 minutos a 100 °C. Se dejó enfriar para proceder a ajustar el pH de la solución a 7 con HCl 2mM, finalmente se añadió H<sub>2</sub>O hasta completar un volumen de 100 mL. La solución de los extractos se realizó disolviendo 10 mg de extracto en 1 mL de MeOH: H<sub>2</sub>O (1: 1). Se tomaron 35  $\mu$ L de solución PBS (Buffer fosfato salino), 35  $\mu$ L de sustrato (almidón) y 5  $\mu$ L de la muestra, y se mezclaron en una placa de microtitulación de 96 pocillos y se dejó incubar a 37°C durante 1 minuto. A continuación se añadieron 20  $\mu$ L de la solución de  $\alpha$ -amilasa de 50 mg/mL (SIGMA-A3176) a cada pocillo se dejó incubar durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se adicionaron 50  $\mu$ L de HCl 0,1 M; luego se añadieron 150  $\mu$ L de 5 mM de solución de yodo (5 mM I<sub>2</sub> and 5 mM KI) y finalmente se midió la absorbancia en el lector de microplacas "EPOCH 2 (BIOTEK ®)" a 580 nm. La actividad inhibidora (%) se calculó de acuerdo con la fórmula descrita por Kusano et al (2011):

Fórmula:

$$Inhibition (\%) = [1 - (ABS_2 - ABS_1)/(ABS_4 - ABS_3) \times 100]$$

De donde:

ABS<sub>1</sub> es la absorbancia de la solución incubada que contiene la muestra, el almidón y amilasa, ABS<sub>2</sub> es la absorbancia de la solución incubada que contiene la muestra y el almidón, ABS<sub>3</sub> es la absorbancia de la solución incubada que contiene almidón y amilasa, y ABS<sub>4</sub> es la absorbancia de solución incubada que contiene almidón.

### **2.6.2.2. Enzima $\alpha$ -glucosidasa.**

Para la actividad inhibidora de  $\alpha$ -glucosidasa se utilizó una placa de microtitulación de 96 pocillos con p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (PNPG, SIGMA N1377) como sustrato. La solución de la muestra se realizó al disolver 10 mg de extracto en 1 mL de MeOH:

H<sub>2</sub>O (1: 1). En primer lugar se mezclaron 75 µL de PBS, 5 µL de la muestra y 20 µL de la solución de enzima (SIGMA G5003, 0,15U/ml en PBS pH 7,4) y se dejó incubar a 37°C durante 5 minutos. Posteriormente se añadieron 20 µL de PNPG (5 mM en tampón fosfato, pH 7,4), se incubó a 37 ° C durante 60 minutos y se procedió a medir la cantidad de p-NP liberado en el lector de microplacas “EPOCH 2 (BIOTEK ®)” a 405 nm cada 5 minutos. La actividad inhibitoria (%) se calculó de acuerdo a la fórmula descrita por Choi, Lee, & Kim (2015):

Fórmula:

$$Inhibition (\%) = [(A_0 - A_s)/A_0] \times 100$$

De donde:

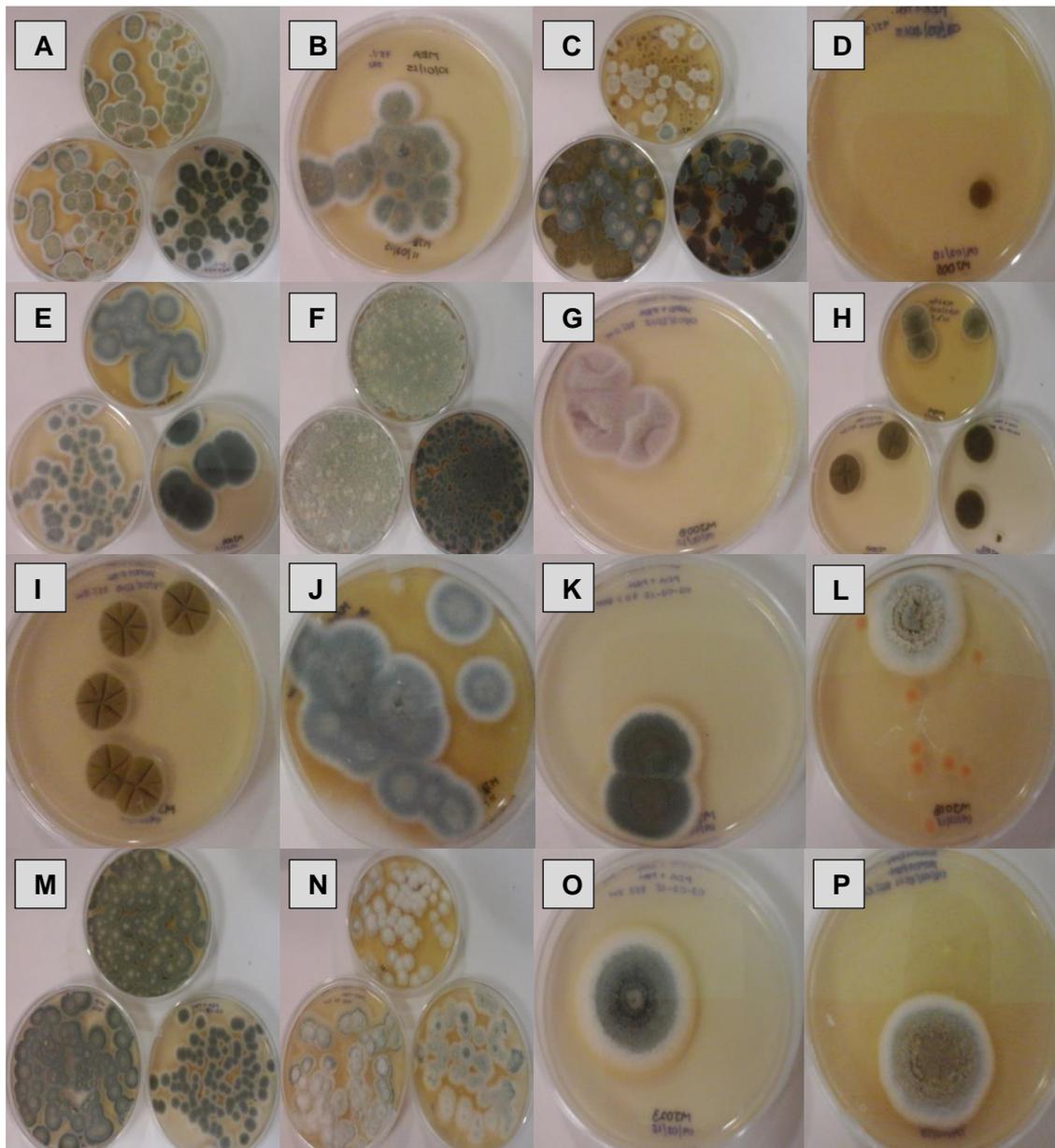
A<sub>0</sub> es la absorbancia registrada para la actividad enzimática sin inhibidor (control), y A<sub>s</sub> es la absorbancia registrada para la actividad enzimática en presencia del inhibidor (muestra).

## **CAPÍTULO III**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### 3.1. Aislamiento y cultivo.

De las 25 muestras de sedimento marino inoculadas en los tres diferentes medios de cultivo se logró aislar 17 cepas fúngicas con diversas características fenotípicas (**Figura 1**), lo que representa una efectividad de aislamiento del 68%. Dicho resultado estableció que estos hongos se desarrollaron satisfactoriamente de manera artificial con los nutrientes necesarios que poseían los medios de cultivo y las condiciones adecuadas de 14 a 21°C de temperatura ambiente, según Arias & Piñeros (2008); y Mahyudin, Blunt, Cole, & Munro (2014).



**Figura 1.** Crecimiento micelar de los cultivos iniciales desde las muestras de sedimentos marinos. Las cepas corresponden a diferentes códigos: **A**, MJ001; **B**, MJ002; **C**, MJ004; **D**, MJ005; **E**, MJ006; **F**, MJ007; **G**, MJ008; **H**, MJ010; **I**, MJ013; **J**, MJ014; **K**, MJ016; **L**, MJ018; **M**, MJ019; **N**, MJ021; **O**, MJ023; **P**, MJ025.

**Fuente:** Autora.

En la **Tabla 1** se detalla la agrupación (en función de las características de la colonia) de los microorganismos fúngicos con el nuevo código de cepa aislada, denotados como **MJFM<sub>1</sub>**, de donde: **MJ**, Manglar de Jambelí (Provincia de El Oro); **F**, designación alfabética de acuerdo al número de la muestra procesada; **M, Y o P**, inicial del nombre del medio de cultivo de donde se aisló (**M**= MEA, **Y**= YNPD y **P**= PDA); y **1** (como subíndice), número de colonias identificadas en la placa. El símbolo “+” representa crecimiento en las placas de cultivo.

**Tabla 1.** Agrupación de las diferentes cepas de hongos aislados según su medio de cultivo para cada sedimento original.

Código de la muestra de sedimento	Medio de cultivo + PEN <sup>‡</sup>	Aislamiento Placa	Número de colonias	Código de cepa aislada
<b>MJ001</b>	MEA	+	1	MJAM <sub>1</sub>
	YNPD	+		MJAY <sub>1</sub>
	PDA	+		MJAP <sub>1</sub>
<b>MJ002</b>	MEA	+	1	MJBM <sub>1</sub>
<b>MJ004</b>	MEA	+	2	MJDM <sub>1</sub> ; MJDM <sub>2</sub>
	YNPD	+		MJDY <sub>1</sub> ; MJDY <sub>2</sub>
	PDA	+		MJDP <sub>1</sub> ; MJDP <sub>2</sub>
<b>MJ005</b>	MEA	+	1	MJEM <sub>1</sub>
<b>MJ006</b>	MEA	+	1	MJFM <sub>1</sub>
	YNPD	+		MJFY <sub>1</sub>
	PDA	+		MJFP <sub>1</sub>
<b>MJ007</b>	MEA	+	1	MJGM <sub>1</sub>
	YNPD	+		MJGY <sub>1</sub>
	PDA	+		MJGP <sub>1</sub>
<b>MJ008</b>	MEA	+	1	MJHM <sub>1</sub>
	YNPD	+		MJHY <sub>1</sub>
	PDA	+		MJHP <sub>1</sub>
<b>MJ010</b>	MEA	+	1	MJJM <sub>1</sub>
	YNPD	+		MJJY <sub>1</sub>
	PDA	+		MJJP <sub>1</sub>
<b>MJ013</b>	YNPD	+	1	MJMY <sub>1</sub>
	PDA	+		MJMP <sub>1</sub>
<b>MJ014</b>	MEA	+	1	MJNM <sub>1</sub>
<b>MJ016</b>	MEA	+	1	MJPM <sub>1</sub>
	YNPD	+		MJPY <sub>1</sub>
	PDA	+		MJPP <sub>1</sub>
<b>MJ018</b>	MEA	+	1	MJRM <sub>1</sub>
	YNPD	+		MJRY <sub>1</sub>
	PDA	+		MJRP <sub>1</sub>
<b>MJ019</b>	MEA	+	1	MJSM <sub>1</sub>
	YNPD	+		MJSY <sub>1</sub>
	PDA	+		MJSP <sub>1</sub>
<b>MJ021</b>	MEA	+	1	MJUM <sub>1</sub>
	YNPD	+		MJUY <sub>1</sub>
	PDA	+		MJUP <sub>1</sub>
<b>MJ023</b>	PDA	+	1	MJWP <sub>1</sub>
<b>MJ025</b>	MEA	+	1	MJZM <sub>1</sub>
<b>Total de hongos aislados</b>			<b>17</b>	

<sup>‡</sup>PEN: Penicilina

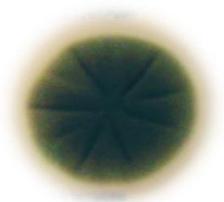
Fuente: Autora

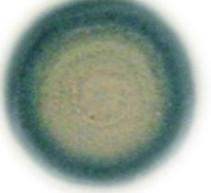
## 3.2. Caracterización de hongos.

### 3.2.1. Caracterización morfológica.

Las 17 cepas aisladas se analizaron en base a las características macroscópicas y microscópicas de la colonia, estudiando con énfasis aquellas cepas que presentaban un desarrollo de 1 a 2 meses con colonias que ocupaban una confluencia del 50 al 75% de crecimiento en el medio de cultivo. Análisis que permitió observar mejor las estructuras características de identificación en hongos: las esporas, claves en la pigmentación y coloración del hongo; y las hifas, importantes en el aspecto de la colonia. A nivel macroscópico las cepas se agruparon en cinco morfotipos con variabilidad significativa en su coloración, observando así colonias verde grisáceas, marrón oscuras, rosas o verde olivas, identificando además su textura algodonosa o pulverulenta y la presencia o no de bordes definidos (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Morfotipos según sus características macroscópicas de crecimiento de la colonia para las 17 cepas de hongos.

Imagen y código de muestra		Características macroscópicas	Morfotipo
 <b>MJDP<sub>1</sub></b>		Colonia algodonosa, verde grisácea con bordes definidos.	1
 <b>MJEM<sub>1</sub></b>		Colonia pulverulenta, color marrón oscura con bordes definidos.	2
 <b>MJJP<sub>1</sub></b>	 <b>MJMP<sub>1</sub></b>	Colonia algodonosa, color verde grisáceo, con bordes definidos de color blanquecino a marrón.	3

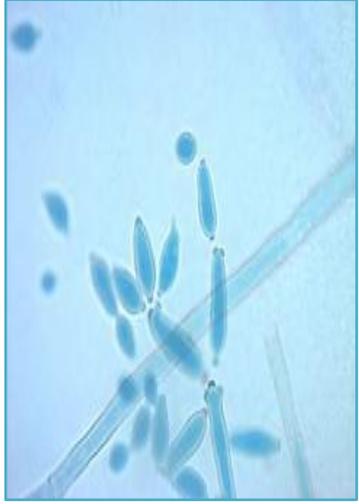
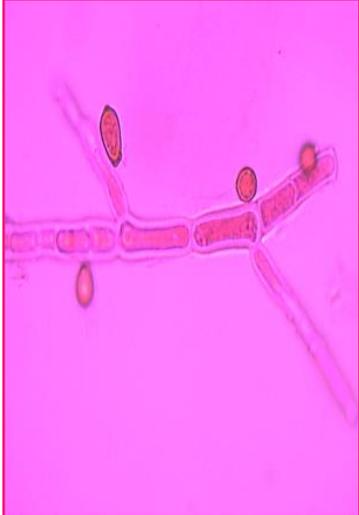
 <p style="text-align: center;"><b>MJHP<sub>1</sub></b></p>			<p>Colonia algodonosa, color rosa, con bordes definidos.</p>	4
 <p style="text-align: center;"><b>MJAM<sub>1</sub></b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>MJBM<sub>1</sub></b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>MJDM<sub>1</sub></b></p>	<p>Colonia pulverulenta, color verde oliva a verde grisáceo.</p>	5
 <p style="text-align: center;"><b>MJFM<sub>1</sub></b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>MJGM<sub>1</sub></b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>MJNM<sub>1</sub></b></p>		
 <p style="text-align: center;"><b>MJPM<sub>1</sub></b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>MJRY<sub>1</sub></b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>MJSY<sub>1</sub></b></p>		
 <p style="text-align: center;"><b>MJUM<sub>1</sub></b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>MJWP<sub>1</sub></b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>MJZM<sub>1</sub></b></p>		

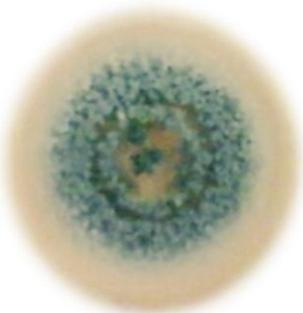
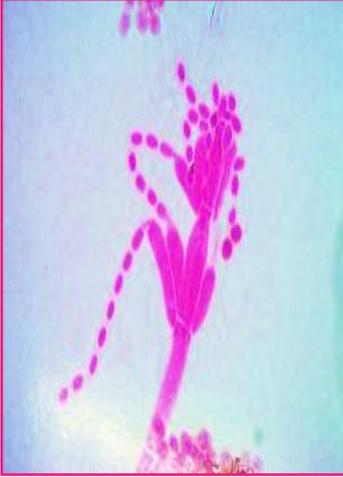
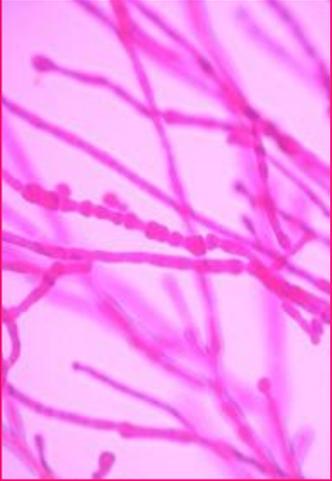
Fuente: Autora

Geiser (2004), en sus análisis realizados sobre la identificación taxonómica de especies hongos, estudió las características microscópicas del micelio aéreo de 283 hongos de distintos géneros y familias; identificando y diferenciando la forma y tamaño de las esporas, y la presencia o ausencia de septos, clamps y ramificaciones

en las hifas, para poder establecer una clasificación adecuada de estos especímenes. Las mismas claves taxonómicas de identificación morfológica fueron empleadas por el HUTPL (Herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja) para agrupar a los cinco morfotipos en tres géneros pertenecientes al Filo Ascomycota: *Cladosporium*, *Penicillium* y *Phoma* (Tabla 3). A pesar del extenso análisis morfológico realizado sobre los cinco especímenes, su identificación a nivel de especie estuvo limitada, pues no se logró diferenciar estructuras sexuales o ciclos reproductivos en nuestras cepas.

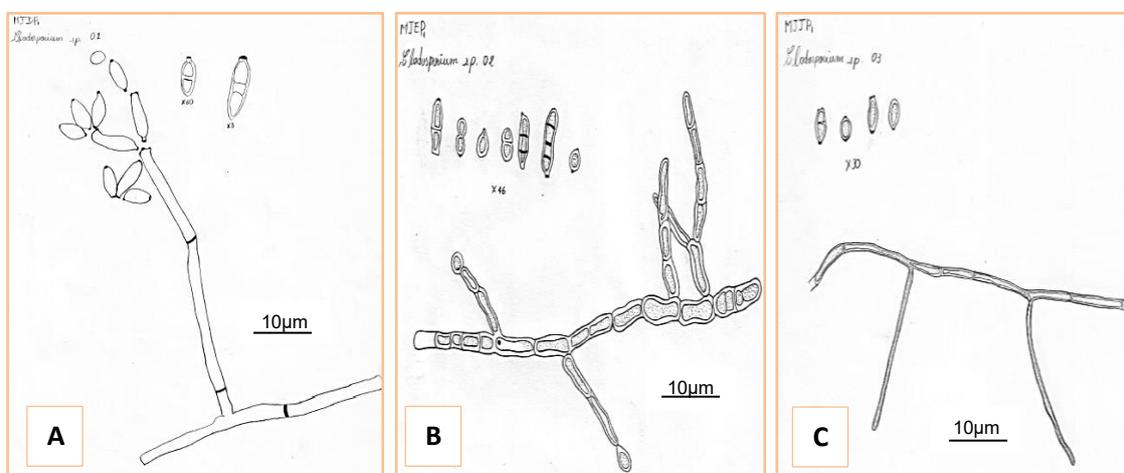
**Tabla 3.** Microscopía e identificación presuntiva de géneros para los cinco morfotipos de los hongos aislados.

Código de muestra	Cultivo en placa	Clasificación preliminar a nivel microscópico (Tinción <sup>†</sup> )
MJDP <sub>1</sub>		 <p data-bbox="938 1350 1185 1384"><i>Cladosporium</i> sp. 01</p>
MJEM <sub>1</sub>		 <p data-bbox="938 1966 1185 2000"><i>Cladosporium</i> sp. 02</p>

<p><b>MJJP<sub>1</sub></b></p>		 <p><i>Cladosporium</i> sp. 03</p>
<p><b>MJRY<sub>1</sub></b></p>		 <p><i>Penicillium</i> sp.</p>
<p><b>MJHP<sub>1</sub></b></p>		 <p><i>Phoma</i> sp.</p>

†Floxine y Eosina, aumento 100X; Ilustración a 10µm.  
Fuente: Autora

Estudios realizados por Bensch et al (2012) acerca de la identificación y clasificación de 993 taxones pertenecientes al género *Cladosporium*, determinaron las características de estos especímenes con relevancia en los análisis macroscópicos de la colonia en cultivo y microscópicos del micelio aéreo. Esta investigación concuerdan con los resultados obtenidos en el análisis de las cepas **MJDP<sub>1</sub>**, **MJEM<sub>1</sub>** y **MJJP<sub>1</sub>**, donde se observaron las colonias de color oliva, verde, marrón y grisáceo hasta llegar a una coloración oscura, las hifas de textura lisa, finas, septadas y ramificadas de color hialino o marrón. Sus conidióforos pueden ser simples o poco ramificados, de una coloración marrón oscura, verdosa y de textura lisa con ramificaciones agrupadas formando una cadena continua de septos y la formación de conidióforos fusiformes con nudos en la parte superior e inferior, a partir del cual se desprendían los conidios, cuya forma era cilíndrica, elipsoide o fusiforme con tabiques en su parte interna, tal y como se pueden apreciar en la **Figura 2**.



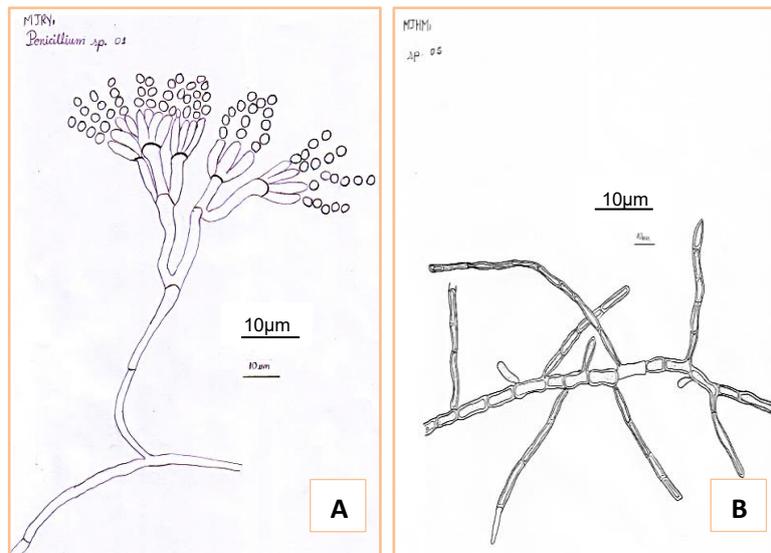
**Figura 2.** Ilustración microscópica a 10 µm de los morfotipos pertenecientes al género *Cladosporium*. A: MJDP<sub>1</sub>, *Cladosporium* sp. 01; B: MJEM<sub>1</sub>, *Cladosporium* sp. 02; C: MJJP<sub>1</sub>, *Cladosporium* sp. 03.

**Fuente:** Autora.

Los hongos del género *Cladosporium* son uno de los grupos más numerosos de organismos fúngicos con alrededor de 772 denominaciones (Narayan & Seung, 2008; Schubert & Braun, 2005). Se caracterizan por la ausencia de la fase sexual en su ciclo de reproducción celular, son hongos imperfectos (Deuteromycetes) que pertenecen al filo Ascomycota y a la familia Mycosphaerellaceae (Almatar & Makky, 2016). Son de distribución cosmopolita, pueden habitar ambientes extremos, se desarrollan normalmente a temperaturas de entre 18 a 28°C con un crecimiento rápido, pero también pueden llegar a desarrollarse de manera tardía a unos 0°C (Kasprzyk et al., 2016). Califican como organismos saprofitos y patógenos, se aíslan principalmente

de materiales del suelo como la tierra, piedras, hormigón, ladrillos, también del papel y cuero, así como del aire (Bensch et al., 2010; Kasprzyk et al., 2016). Muchas especies de *Cladosporium* originan afecciones en animales, ocasionan la descomposición de hojas y tallos en plantas, y provocan el deterioro de los alimentos y productos textiles (Kasprzyk et al., 2016; Narayan & Seung, 2008). Existen también algunas especies de *Cladosporium* que producen enfermedades en seres humanos, principalmente rinitis alérgica y con poca frecuencia infecciones profundas como la micosis pulmonar (Sandoval-Denis et al., 2015).

Los resultados obtenidos durante la observación microscópica para los géneros *Penicillium* y *Phoma*, revelan la presencia de hifas septadas en ramificaciones primarias, secundarias y terciarias (**Figura 3**).



**Figura 3.** Ilustración microscópica de los morfotipos pertenecientes a los géneros *Penicillium* y *Phoma*. A: MJRY<sub>1</sub>: *Penicillium* sp; B: MJHP<sub>1</sub>, *Phoma* sp.  
**Fuente:** Autora.

Adams & Moss (2008); Pitt & Hocking (2009) y Webster & Weber (2007) en sus análisis relacionados con la identificación de caracteres del género *Penicillium*, destacan como principal característica la forma similar del hongo a la de un pincel, con la peculiaridad de formar conidios ramificados con dos, tres o cuatro ramificaciones que tienen su terminación células conidiógenas denominadas fiálides, de las cuales se desprenden las clamidosporas en una cadena continua no ramificada, identificando además la forma cilíndrica o elipsoide de las esporas; características idénticas que se muestran en la **Figura 3-A**.

Los hongos del género *Penicillium* presentan colonias regularmente circulares, de textura algodonosa, son filamentosas y de rápido crecimiento. A nivel superficial el color del micelio durante sus primeras etapas de vida es de color blanquecino, pero conforme pasa el tiempo se tornan de color anaranjado, púrpura, verde azulado, grisáceo, gris verdoso, gris oliva, amarillo verdoso, amarillentas y rosadas; cuyo reverso es pálido, blanco o amarillento (Adams & Moss, 2008). El género *Penicillium* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza con un aproximado de 225 especies (Redondo, Cubero, & Melgarejo, 2009).

El género *Phoma*, según lo establecen Chande et al (2010) y Wöstemeyer (2013) al estudiar la diferenciación morfológica y genética de cuatro especies de *Phoma* y clasificar 278 taxones del orden Pleosporales, respectivamente, indican que la característica específica de este género es la presencia de picnidios que a nivel macroscópico se observan como puntos negros en medio de cultivo artificial y microscópicamente se visualizan como cuerpos redondeados, esféricos o fusiformes grandes de coloración oscura (**Figura 4**).



**Figura 4.** A) Picnidio  
**Fuente:** A, Universidad Estatal de Nuevo México (2015)

La formación del picnidio, como estructura característica de *Phoma* no se observó en nuestra investigación, sin embargo, estudios macro y microscópicos de la colonia nos permitieron identificar a nuestra cepa fúngica como una especie del género *Phoma*, donde Webster & Weber (2007) nos mencionan que en cultivos artificiales las colonias de *Phoma* son un principio blanquecinas, tornándose posteriormente olivas, grisáceas o rosas, son algodonosas, vellosas, suaves y en ciertas ocasiones planas, tal y como

se observaron en la **Tabla 3**, pudiendo llegar a presentar una coloración marrón u oscuro, donde sus hifas presentan coloración hialina o café y son septadas (**Figura 3-B**).

Las especies pertenecientes al género *Phoma* se establecen geográficamente en múltiples nichos ecológicos, son hongos filamentosos de reproducción rápida, algunas son organismos saprofitos inofensivos y otras son patógenos oportunistas de plantaciones en valiosos cultivos económicos agrícolas (W. Kim et al., 2016; Kumar & Vaibhav, 2014). *Phoma* pertenece al orden Pleosporales y familia Didymellaceae del filo Ascomycota, es un género imperfecto de hongo y posee más de 2 000 o 3 000 especies, de las cuales pocas han sido parcialmente estudiadas y no cuentan con una taxonomía estable o definida de diferenciación (Aveskamp, Gruyter, Woudenberg, Verkley, & Crous, 2010; Harris, 1986; Wöstemeyer, 2013). Las especies pertenecientes al género *Phoma* se han aislado de plantas y suelo, recuperándose también de medios aéreos y acuáticos, principalmente de ecosistemas marinos (Chande et al., 2010).

### **3.2.2. Caracterización molecular.**

De acuerdo a Jayasiri et al (2015) los estudios taxonómicos basados únicamente en la morfología de los hongos es muy difícil y a veces subjetiva, por lo que, la clasificación moderna, recomendada, se basa en el estudio de los datos de secuencias y análisis filogenéticos.

Las secuencias de ADN provenientes de los cinco morfotipos establecidos morfológicamente presentaron una variabilidad de entre 695 a 1319 pares de bases en su análisis molecular y al ser ingresadas en BLAST para compararlas con secuencias fijas de la base de datos del NCBI, se observó un porcentaje de cobertura del 100% y similitud del 98-100% para especies de los géneros *Cladosporium*, *Penicillium* y *Phoma* (**Tabla 4**), los mismos que coinciden con la clasificación preliminar de los géneros establecidos a través de claves taxonómicas en la **Tabla 3**.

**Tabla 4.** Análisis molecular comparativo de secuencias reportadas en el NCBI realizado en BLAST. Porcentaje de cobertura y similitud.

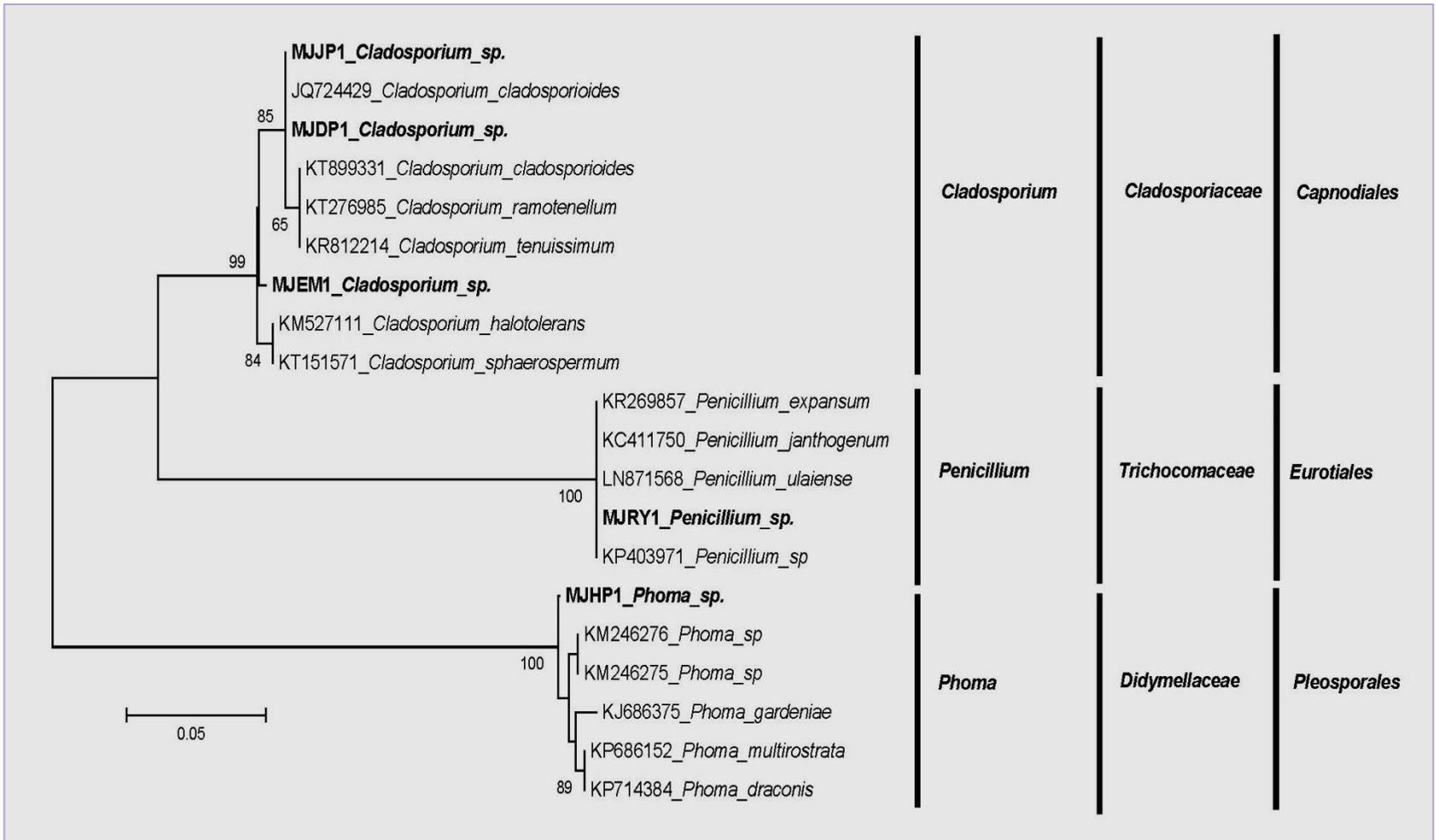
Código de muestra	BLAST	Región transcripcional	% Cobertura	% Similitud
MJDP <sub>1</sub>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	ITS-5.8S	100	98
MJEM <sub>1</sub>	<i>Cladosporium halotolerans</i>	ITS-5.8S	100	100
MJJP <sub>1</sub>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	ITS-5.8S	100	99
MJRY <sub>1</sub>	<i>Penicillium expansum</i>	ITS-5.8S	100	100
MJHP <sub>1</sub>	<i>Phoma multirostrata</i>	ITS-5.8S	100	99

ITS: Espacio transcrito interno

Fuente: Autora

La caracterización molecular de las secuencias de los hongos aislados a partir de sedimentos marinos se basó en el análisis de los genes 18S, 5.8S y 28S que conforman la región del rADN nuclear de hongos más utilizada en la identificación genética y que se encuentran separados por la región ITS o espacio transcrito interno que comprende las regiones ITS-1, 5.8S e ITS-2. Según Rampersad (2014) al estudiar la diferenciación intraespecífica de especies fúngicas estableció que la región 5.8S es la más conservada y que las regiones ITS-1 e ITS-2 de los hongos presentan mayor interés para la identificación y tipificación de estos especímenes, y al emplear estas regiones en nuestro análisis comparativo con secuencias en BLAST determinamos géneros específicos para cada morfotipo, debido a la variabilidad y alto polimorfismo que las regiones ITS presentan.

Ghikas, Kouvelis, & Typas (2010) hacen referencia a que las técnicas moleculares han evolucionado e implementado la taxonomía de especies, incluyendo aquellas especies crípticas (similares fenotípicamente y variables a nivel genético) que han sido descritas morfológicamente, en donde se han empleado estudios a gran escala que precisan la clasificación taxonómica de un organismo en particular basándose en su genealogía. Es así como, nuestro análisis comparativo de las secuencias de los cinco morfotipos frente a secuencias establecidas en la base de datos del GenBank, nos permitió obtener mediante un análisis filogenético la relación de parentesco, evolución y distribución entre especies o taxones, a través de un árbol filogenético (**Figura 5**).



**Figura 5.** Hipótesis filogenético basada en Maximun Likelihood para la región ITS-5.8S y LSU parcial de hongos aislados de sedimentos marinos. Árbol enraizado en punto medio.  
**Fuente:** Autora

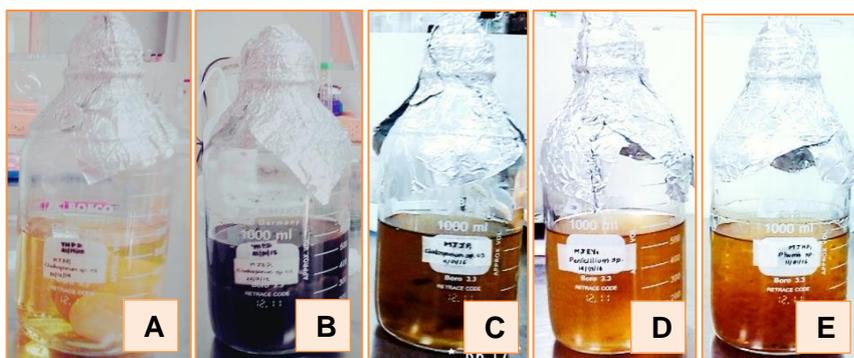
El análisis filogenético realizado mediante el estudio "Maximun Likelihood" nos permitió obtener un árbol filogenético enraizado en punto medio para la región ITS-5.8S y LSU parcial con valores de similitud superiores al 65% para los nodos. El análisis de la región rDNA nuclear reveló la existencia de tres clados con precisión estadística superior al 98% a nivel de género: a) 99% *Cladosporium*; b) 100% *Penicillium*; y c) 100% *Phoma* (**Figura 5**). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Carlsohn (2011) y Montes et al (2003) en donde establecen que la similitud de genes en un análisis filogenético con valores superiores al 97% indican precisión taxonómica de géneros, pero se limita a la designación de especie por lo que solamente se agrupan organismos monofiléticos y no polifiléticos.

La distribución filogenética de nuestro análisis nos permitió describir además las familias *Cladosporiaceae*, *Trichocomaceae* y *Didymellaceae*; y los órdenes *Capnodiales*, *Eurotiales* y *Pleosporales* para los géneros *Cladosporium*, *Penicillium* y *Phoma*, respectivamente; todos pertenecientes a la división Ascomycota.

Los cinco morfotipos mostrados en la **Tabla 3** corresponden a la agrupación de cuatro genotipos identificados en el análisis filogenético (**Figura 5**): Genotipo-1 perteneciente a los morfotipos con código de muestra MJJP1 y MJDP1 y Genotipo-2 a MJEM1, ambos pertenecientes al género *Cladosporium*; Genotipo-3 a MJRY1 para *Penicillium*; y Genotipo-4 a MJHP1 para el género *Phoma*. Resultado que concuerda con lo manifestado por Bickford et al (2006) acerca de las especies crípticas, donde menciona que dos especies pueden ser fenotípicamente idénticas pero a nivel genético poseen amplia variabilidad o viceversa; lo cual ocurrió con las muestras codificadas como **MJJP<sub>1</sub>** y **MJDP<sub>1</sub>** donde a nivel morfológico presentaron variabilidad en las características macroscópicas de la colonia (**Tabla 2**) pero genéticamente se agruparon como un solo genotipo (**Figura 5**) mediante análisis filogenético.

### **3.3. Producción de biomasa y obtención de extractos.**

De los cultivos realizados en medio líquido YNPD obtuvimos una producción de micelio (biomasa) de aproximadamente el 50% de confluencia (volumen ocupado por el micelio vs volumen de medio de cultivo) (**Figura 6**) a las condiciones establecidas anteriormente (véase apartado **2.5**).



**Figura 6.** Producción de micelio en medio YNDP. A, MJDP<sub>1</sub>; B, MJEM<sub>1</sub>; C, MJJP<sub>1</sub>; D, MJRY<sub>1</sub>; y E, MJHP<sub>1</sub>  
**Fuente:** Autora

Los datos de producción de biomasa se describen en la **Tabla 5** donde también se pueden apreciar las características fisicoquímicas del micelio de los cinco morfotipos fúngicos en medio de cultivo líquido.

**Tabla 5.** Características fisicoquímicas y obtención del micelio en medio de cultivo líquido YNDP (mg/L).

Código de muestra	Peso de micelio (seco) en mg por Litro de cultivo	Características fisicoquímicas	
	P <sub>T</sub>	Color	Consistencia
<i>Cladosporium sp. 01</i> (MJDP <sub>1</sub> )	2 791,2 mg	Verde grisáceo	Viscosa
<i>Cladosporium sp. 02</i> (MJEM <sub>1</sub> )	2 909,0 mg	Verde oscuro	Viscosa
<i>Cladosporium sp. 03</i> (MJJP <sub>1</sub> )	2 101,4 mg	Café	Viscosa
<i>Penicillium sp.</i> (MJRY <sub>1</sub> )	3 234,5 mg	Amarillo verdoso	Viscosa
<i>Phoma sp.</i> (MJHP <sub>1</sub> )	3 603,0 mg	Café	Viscosa

P<sub>T</sub>: Peso total de micelio seco

**Fuente:** Autora

Los compuestos provenientes de la producción de biomasa fueron extraídos del micelio y medio de cultivo de cada hongo utilizando acetato de etilo (AcOEt), método empleado por Gomes et al (2016) donde afirma que los extractos de hongos provenientes de ambientes marinos producen compuestos hidrófobos de gran actividad biológica y el empleo de este solvente orgánico es la técnica más versátil que ayuda a conservarlos.

La producción de biomasa permitió la obtención de cinco extractos con un rendimiento variable que dependió de las características fisicoquímicas propias de cada hongo (**Tabla 6**). Resultados que concuerdan con los establecidos por León et al (2011)

donde expone que las diferencias porcentuales del rendimiento de los extractos fúngicos obedecen la naturaleza química del metabolito que poseen y la polaridad del solvente que se ha empleado para extraerlos.

**Tabla 6.** Características y porcentaje de rendimiento de los extractos obtenidos en relación a la cantidad de biomasa producida por cada hongo (mg/L).

Código de muestra	Cantidad de extracto en mg por Litro de cultivo $P_T$	% de Rendimiento	Características fisicoquímicas		Solubilidad
			Color	Consistencia	
<i>Cladosporium</i> sp. 01 (MJDP <sub>1</sub> )	119 mg	8,7893	Amarillo	Viscosa	AcOEt
<i>Cladosporium</i> sp. 02 (MJEM <sub>1</sub> )	124,4 mg	8,8317	Amarillo	Viscosa	AcOEt
<i>Cladosporium</i> sp. 03 (MJJP <sub>1</sub> )	47,1 mg	4,5100	Amarillo	Viscosa	AcOEt
<i>Penicillium</i> sp. (MJRY <sub>1</sub> )	61,1 mg	3,6275	Amarillo	Viscosa	AcOEt
<i>Phoma</i> sp. (MJHP <sub>1</sub> )	40,2 mg	2,0702	Café	Viscosa	AcOEt

$P_T$ : Peso total de extracto

Fuente: Autora

La obtención de los extractos por maceración del micelio seco con AcOEt (1:3) y, del medio de cultivo filtrado mediante bipartición con AcOEt (1:1) presentan relación con los estudios de Ding, Qin, Li, & Chi (2008); Qi, Shao, Liu, Qi, & Wang (2014); y Wang et al (2012) sobre extracción de metabolitos de los géneros *Cladosporium*, *Penicillium* y *Phoma*, respectivamente; donde enuncian que al emplear dichas concentraciones se producen extractos confiables de los metabolitos secundarios presentes en estos especímenes. De acuerdo a Acosta, Guevara, & Crescente (2011), el empleo de este solvente orgánico en especies de hongos marinos facilita el paso de los compuestos activos a través de las membranas celulares de los microorganismos en ensayos de actividad biológica, ya que este solvente mantiene y conserva las características de los compuestos activos permitiendo obtener resultados confiables de la actividad de los extractos crudos.

### 3.4. Ensayos de actividad invitro.

#### 3.4.1. Actividad antibacteriana.

Los cinco extractos de los cinco morfotipos evaluados por el método de microdilución en caldo frente a siete bacterias patógenas no presentaron actividad inhibitoria a la dosis más alta probada contra estos patógenos (**Tabla 7**).

**Tabla 7.** Concentración mínima inhibitoria (CIM) de los extractos frente a microorganismos patógenos en análisis de ensayo antibacteriano.

Extracto	Bacterias patógenas						
	Gram positiva	Gram negativas					
	<i>Sa</i>	<i>Ec</i>	<i>Kp</i>	<i>Pa</i>	<i>Pv</i>	<i>Se</i>	<i>St</i>
<i>Cladosporium</i> sp. 01 (MJDP <sub>1</sub> )	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Cladosporium</i> sp. 02 (MJEM <sub>1</sub> )	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Cladosporium</i> sp. 03 (MJJP <sub>1</sub> )	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Penicillium</i> sp. (MJRY <sub>1</sub> )	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Phoma</i> sp. (MJHP <sub>1</sub> )	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ATB (Control positivo)	1,953 µg/mL	3,906 µg/mL	<1,953 µg/mL	15,625 µg/mL	15,625 µg/mL	<1,953 µg/ml	7,813 µg/mL

ATB: Antibiótico; NA: No activo a la concentración máxima ensayada; Sa: *Staphylococcus aureus*; Ec: *Escherichia coli*; Kp: *Klebsiella pneumoniae*; Pa: *Pseudomona aeruginosa*; Pv: *Proteus vulgaris*; Se: *Salmonella entérica*; St: *Salmonella typhimurium*.

Fuente: Autora

Sin embargo, Christophersen et al (1999) al estudiar un total de 277 especímenes fúngicos aislados de ambientes marinos agrupados en los géneros *Eupenicillium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Emericella*, *Alternaria* y *Gliocladium* confirman el gran potencial antibacteriano que los hongos marinos poseen. Es decir, la inexistencia de actividad biológica en nuestros extractos marinos no descarta la actividad inhibitoria actual que los hongos marinos tienen frente a diversos microorganismos patógenos, pues más del 60% de los 456 nuevos compuestos naturales microbianos reportados en el 2012 fueron producidos por hongos marinos,

lo que los convierte en una fuente productiva y prometedora de nuevos compuestos bioactivos con gran potencial terapéutico (Andreakis et al., 2015).

Ensayos biológicos han reportado y confirmado la actividad antibacteriana de los tres géneros que hemos estudiado. En análisis realizados por Montemartini, Liotta, Venturi, & Calegari (2000) acerca de la actividad antibacteriana de 25 especímenes del género *Penicillium* aisladas de ambientes extremos afirman que siete especies poseen CIM para las bacterias *E. Coli* y *S. aureus*; y Nicoletti & Trincone (2016) al investigar la bioactividad de los compuestos de 39 especímenes del género *Penicillium* de las cuales 28 provenían de sedimentos marinos confirman que nueve de estos especímenes poseían CIM frente a las bacterias *S. aureus*, *E. Coli* y *P. aeruginosa*. Dentro de los principales metabolitos secundarios producidos por hongos *Penicillium* se encuentran los antibióticos, alérgenos, hormonas, inmunomoduladores e inmunosupresores y alcaloides como la quinolina, existiendo algunos metabolitos tóxicos como las micotoxinas, entre las que se encuentran la ocratoxina, patulina y citrinina (Antipova et al., 2011; Kozlovskii, Zhelifonova, & Antipova, 2013; Kozlovsky, Zhelifonova, Antipova, & Zelenkova, 2011; Zhelifonova, Antipova, & Kozlovsky, 2010).

Los hongos del género *Phoma* poseen gran diversidad de especies y compuestos activos, sin embargo, sus especies no poseen una taxonomía estable y bien definida que haga posible la diferenciación de compuestos bioactivos característicos para cada especie (Aveskamp et al., 2010). No obstante, investigaciones recientes prueban la importancia de la actividad biológica que estos hongos tienen dentro del campo terapéutico. Es así como, Bhimba, Pushpam, Arumugam, & Prakash (2012) al estudiar la actividad biológica de los compuestos derivados de ésteres de ácido ftálico pertenecientes al hongo marino *Phoma herbarum* confirman su análisis bacteriológico frente a *S. aureus* y *S. typhimurium*. Chen et al (2015) al analizar la actividad antimicrobiana del hongo marino identificado como *Pleosporales sp* mencionan la CIM de 9.48 µg/mL que este organismo posee frente a la bacteria Gram-positiva *Clavibacter michiganense*. Las moléculas activas presentes en este género son las micotoxinas, terpenos, esteroides, alcaloides, ciclopéptidos, cumarinas y colorantes, con actividad antifúngica, antibacteriana y antitumoral, principalmente (Kumar & Vaibhav, 2014; Wang et al., 2012).

Los análisis biológicos reportados para el género *Cladosporium* indican la considerable importancia biomédica-farmacológica que estos hongos presentan frente a una diversidad de microorganismos patógenos. Xiong, Qi, Xu, Miao, & Qian (2009) demuestran la actividad biológica que los compuestos derivados del hongo

*Cladosporium* marino tienen actividad frente a las bacterias *Laribacter hongkongensis* (Gram-Negativa) y *Micrococcus luteus* (Gram-Positiva) con una ICM de 800µg/mL y 100µg/mL, respectivamente; Silber, Ohlendorf, Labes, Erhard, & Imhoff (2013) mencionan su actividad frente a *Staphylococcus epidermidis*; y Silber et al (2014) indican su análisis biológico que inhibe el crecimiento de las bacterias *Xanthomonas campestris* (Gram-Negativa) y *Staphylococcus epidermidis* (Gram-Positiva). Entre los principales compuestos de uso medicinal y agroquímico que producen las especies de *Cladosporium* se destacan principalmente los antibióticos, que inhiben el crecimiento de ciertos microorganismos patógenos, tales como *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Y otros actúan como potentes insecticidas biológicos contra insectos que desarrollan resistencia química (Almatar & Makky, 2016; Narayan & Seung, 2008).

La ausencia de actividad antibacteriana en nuestros cinco extractos fúngicos estuvo relacionada con los métodos de producción de biomasa, haciendo énfasis en el medio de cultivo líquido que empleamos y los nutrientes que lo componen, y las condiciones de incubación del hongo utilizadas (véase apartado 2.5); y obtención de extractos, donde el tiempo de maceración del hongo en AcOEt fue insuficiente. Resultado que concuerda con lo establecido por Kavala (2012), donde nos menciona que el empleo de condiciones inapropiadas y la falta de nutrientes en un medio de cultivo artificial cuestionan el desarrollo y crecimiento de microorganismos con la consecuente disminución en la productividad de biomasa y producción de compuestos activos. En comparación con las investigaciones expuestas anteriormente, se han empleado los medios PDA, MEA, SDA o CYA (Agar extracto de levadura Czapek), y las condiciones de 100 a 120 rpm durante 15 a 24 días a 20 – 22°C.

#### **3.4.2. Actividad enzimática.**

La inhibición de las enzimas  $\alpha$ -amilasa pancreática y  $\alpha$ -glucosidasa son claves para el tratamiento de la diabetes mellitus que se caracteriza principalmente por los niveles elevados de glucosa (hiperglucemia) que afecta a los seres humanos debido a los defectos de secreción o resistencia a la insulina (Khacheba, Djeridane, & Yousfi, 2014).

Sales, Souza, Simeoni, & Magalhães (2012); y Unnikrishnan, Suthindhiran, & Jayasri (2015) nos mencionan que el método más adecuado para el tratamiento de la Diabetes tipo 2 es disminuir los niveles de glucosa en el plasma post-prandrial, sistemática que

se logra con la reducción de la digestión de los carbohidratos responsables de la descomposición de oligosacáridos y disacáridos que son adecuados para la absorción de glucosa, todo ello a través de la inhibición de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa que son claves en la digestión de los carbohidratos.

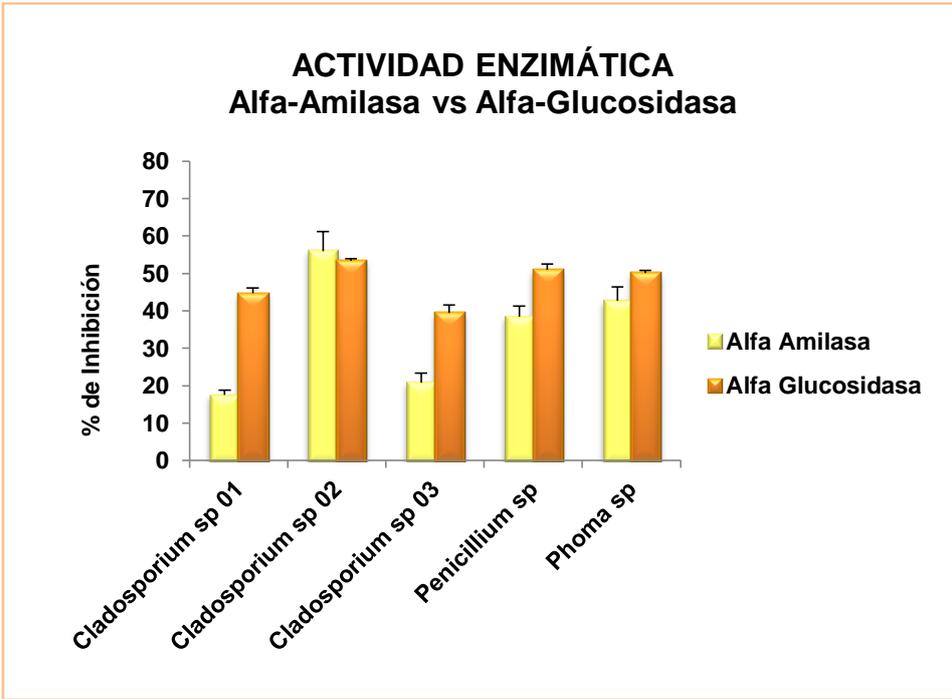
La acarbosa, el miglitol y la voglibosa son inhibidores de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa que fueron obtenidos de fuentes naturales (Cui et al., 2016), por ello las investigaciones que se han realizado y se realizan sobre la búsqueda de nuevos compuestos con actividad enzimática han indagado en el estudio de los microorganismos, donde Ying et al (2014) afirma que los organismos fúngicos han demostrado ser reservorio de nuevos compuestos naturales farmacológicamente activos y significativos que podrían ser utilizados para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

De los cinco extractos de hongos evaluados en el análisis enzimático solamente tres presentaron actividad inhibitoria con un porcentaje de inhibición mayor o igual al 50%: El extracto de ***Penicillium sp. (MJRY<sub>1</sub>)*** demostró una inhibición del 50,92% ( $\pm 1,65$ ), resultado que posee similitud con los datos reportados por Bisht, Sharma, & Agarwal (2016) donde manifiestan que el extracto metanólico y de cloroformo de una especie del género *Penicillium* presentó actividad inhibitoria in vitro frente a  $\alpha$ -glucosidasa con una  $IC_{50}$  de 46,76  $\mu$ g/mL y 59,20  $\mu$ g/mL, respectivamente.

Singh, Kaur, Kaur, Manhas, & Kaur (2016) al estudiar la actividad enzimática del extracto metanólico del hongo *Cladosporium velox* del género *Cladosporium* nos indican que este organismo inhibe a la enzima  $\alpha$ -glucosidasa a una concentración de 450 $\mu$ g/mL (extracto fúngico) con un porcentaje de inhibición del 85%. Comparando con nuestros resultados el efecto inhibitorio  $\alpha$ -glucosidasa de 53,43% ( $\pm 0,53$ ) que presentó el extracto de ***Cladosporium sp. 02 (MJEM<sub>1</sub>)*** es bajo, sin embargo, este resultado se obtuvo a una concentración del extracto de 416,67 $\mu$ g/mL que resulta ser un buen efecto inhibitorio a una concentración mucho más baja. Para  $\alpha$ -amilasa se obtuvo una inhibición del **55,98%** ( $\pm 5,24$ ).

El extracto de ***Phoma sp. (MJHP<sub>1</sub>)*** presentó actividad inhibitoria  $\alpha$ -glucosidasa de 50,04% ( $\pm 0,75$ ). No se han reportado resultados comparativos para la actividad enzimática de este género.

Los resultados de actividad enzimática de los cinco extractos de hongo frente a las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa se encuentran en la **Figura 7**, donde se evidencia que existe una mayor actividad inhibitoria frente a  $\alpha$ -glucosidasa.



**Figura 7.** Porcentaje de inhibición de los diferentes extractos de hongo frente a las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa en los ensayos de actividad enzimática.  
**Fuente:** Autora

## CONCLUSIONES

- De las 25 muestras de sedimento marino se aislaron 17 cepas fúngicas (68%). Cuatro cepas se identificaron como *Cladosporium*, doce pertenecieron al género *Penicillium* y una correspondió al género *Phoma*.
- El análisis molecular de la región ITS-5.8S es efectivo para la amplificación de 100% de las cepas analizadas.
- Los rendimientos porcentuales de los cinco extractos fúngicos obtenidos al emplear Acetato de Etilo se consideran buenos en relación con los obtenidos en algunos extractos de plantas y hongos filamentosos de ambiente terrestre.
- Los cinco extractos fúngicos analizados no presentaron actividad antibacteriana frente a las siete bacterias patógenas, pero existen estudios que han demostrado su actividad inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- La mayoría de los extractos fúngicos poseen actividad enzimática frente a  $\alpha$ -glucosidasa con porcentajes de inhibición del 50,04% al 53,43% para los extractos de ***Cladosporium sp. 02 (MJEM<sub>1</sub>)***, ***Penicillium sp. (MJRY<sub>1</sub>)*** y ***Phoma sp. (MJHP<sub>1</sub>)***. El extracto de ***Cladosporium sp. 02 (MJEM<sub>1</sub>)*** presentó un porcentaje de inhibición del 55,98% para  $\alpha$ -amilasa.

## RECOMENDACIONES

- Emplear análisis moleculares que involucren el estudio de la región ITS-5.8S para la clasificación taxonómica de los microorganismos.
- Utilizar condiciones de cultivo adecuadas que favorezcan el crecimiento y desarrollo de microorganismos para conseguir una mayor producción de biomasa y mejorar significativamente el rendimiento porcentual de los extractos.
- Realizar estudios complementarios que permitan identificar los compuestos activos presentes en extractos crudos, como análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia o HPLC, con el fin de emplear mejores técnicas de extracción de compuestos activos que favorezcan estudios biológicos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, M., Guevara, M., & Crescente, Ó. (2011). Actividad biológica de extractos en acetato de etilo de los hongos *Fusarium camptoceras* wollenw y reinking y *Aspergillus flocculosus* frisvad y samson, aislados de ambientes marinos. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, 40(1), 25–39.
- Adams, M. R., & Moss, M. O. (2008). *Food Microbiology* (Third Edition., pp 1 - 478). London.
- Aguirre-Acosta, E., Ulloa, M., Aguilar, S., Cifuentes, J., & Valenzuela, R. (2014). Biodiversidad de hongos en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 76–81. doi:10.7550/rmb.33649
- Almatar, M., & Makky, E. A. (2016). *Cladosporium cladosporioides* from the perspectives of medical and biotechnological approaches. *3 Biotech*. doi: 10.1007/s13205-015-0323-4
- Amraoui, B., Amraoui, M., Cohen, N., & Fassouane, A. (2014). Antifungal and antibacterial activity of marine microorganisms. *Annales Pharmaceutiques Francaises*, 72(2), 107–111. doi: 10.1016/j.pharma.2013.12.001
- Andreakis, N., Lone, H., Kearns, P., Hall, M. R., Ericson, G., Cobb, R. E., Evans-illidge, E. (2015). Diversity of marine-derived fungal cultures exposed by DNA barcodes: The algorithm matters. *Plos One*, 1–23. doi: 10.1371/journal.pone.01 36130
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(1), 5–16.
- Antipova, T. V, Zhelifonova, V. P., Baskunov, B. P., Ozerskaya, S. M., Ivanushkina, N. E., & Kozlovsky, A. G. (2011). New producers of biologically active compounds-fungal strains of the genus *Penicillium* isolated from permafrost. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47(3), 288–292. doi: 10.1134/S0003683811030033
- Arias, E., & Piñeros, P. (2008). *Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde*. (Trabajo de grado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.

- Avellaneda, I. (2013). *Evaluación de la actividad inhibitoria de la  $\alpha$ -glucosidasa in vitro por extractos vegetales*. (Trabajo de grado). Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.
- Aveskamp, M., Gruyter, J., Woudenberg, J., Verkley, G., & Crous, P. (2010). Highlights of the didymellaceae: A polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. *Studies in Mycology*, 65, 1–60. doi: 10.3114/sim.2010.65.01
- Bensch, K., Braun, U., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2012). The genus *Cladosporium*. *Studies in Mycology*, 72, 1–401. doi: 10.3114/sim0003.INTRODUCTION
- Bensch, K., Groenewald, J. Z., Dijksterhuis, J., Andersen, B., Summerell, B. A., Shin, H., & Dugan, F. M. (2010). Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex ( Davidiellaceae, Capnodiales ). *Studies in Mycology*, 67(1), 1–94. doi: 10.3114/sim.2010.67.01
- Bhadury, P., Mohammad, B. T., & Wright, P. C. (2006). The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33, 325–337. doi: 10.1007/s 10295-005-0070-3
- Bhagobaty, R., & Joshi, S. (2012). Enzymatic activity of fungi endophytic on five medicinal plant species of the Pristine Sacred Forests of Meghalaya, India. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17, 33–40. doi: 10.1007/s12257-011-0453-4
- Bhimba, B., Pushpam, A., Arumugam, P., & Prakash, S. (2012). Phthalate derivatives from the marine fungi *Phoma herbarum* VB7. *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research*, 3(4), 507-512.
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K. L., Meier, R., Winker, K., Das, I. (2006). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(3), 148-155. doi: 10.1016/j.tree.2006.11.004
- Bisht, R., Sharma, D., & Agarwal, P. K. (2016). Antimicrobial and antidiabetic activity of an *Penicillium oxalicum* isolated from *Cupressus Torulosa*. *International Journal of Biotechnology and Biomedical Sciences*, 2(2), 119–122.

- Blunt, J., Buckingham, J., & Munro, M. (2012). *Taxonomy and marine natural products research*. Recuperado de <http://doi.org/10.1007/978-90-481-3834-0>
- Bolaños, J., León, L., Ochoa, E., Darías, J., Raja, H., Shearer, C., Caballero-George, C. (2015). Phylogenetic diversity of sponge-associated fungi from The Caribbean and the Pacific of Panama and their in vitro effect on angiotensin and endothelin receptors. *Marine Biotechnology*, 17, 533–564. doi: 10.1007/s10126-015-9634-z
- Burge, H. A. (1992). Classification of the fungi. *Clinical Reviews in Allergy*, 10(1), 153 – 163.
- Carlsohn, M. (2011). *Isolation and characterization of mine-dwelling actinomycetes as potential producers of novel bioactive secondary metabolites*. (Doctoral dissertation). Jena University, Germany.
- Carranza, Z. (2006). *Selección e identificación de especies de hongos ectomicorizógenos del estado de hidalgo más competentes en medio de cultivo sólido*. (Tesis de grado). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- Chambergo, F. S., & Valencia, E. Y. (2016). Fungal biodiversity to biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 2567–2577. doi: 10.1007/s00 253-016-7305-2
- Chande, A., Kövies, G. J., Sandhu, S. S., & Rai, M. K. (2010). Morphological and genetic differentiation among four pigment producing Indian species of Phoma (Saccardo, 1899). *Indian Journal of Microbiology*, 50, 110–116. doi: 10.1007/s 12088-010-0067-0
- Charya, S. (2015). *Fungi: An overview*. Recuperado de <http://doi.org/10.1007/978-81-322-2286-6>
- Chen, C. J., Zhou, Y. Q., Liu, X. X., Zhang, W. J., Hu, S. S., Lin, L. P., Ge, H. M. (2015). Antimicrobial and anti-inflammatory compounds from a marine fungus *Pleosporales* sp. *Journal homepage*, 1–7. doi: 10.1016/j.tetlet.2015. 09.079
- Choi, C.-I., Lee, S. L., & Kim, K. H. (2015). Antioxidant and alpha-glucosidase inhibitory activities of constituents from *Euonymus alatus* twigs. *Industrial Crops & Products*, 76, 1055–1060. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.08.031

- Christophersen, C., Crescente, O., Frisvad, J. C., Gram, L., Nielsen, J., Nielsen, H., & Rahbæk, L. (1999). Antibacterial activity of marine-derived fungi. *Mycopathologia*, *143*, 135–138.
- Cui, H., Liu, Y., Yang, N., Liu, Z., Chen, S., Zhang, Z., She, Z. (2016). Polyketides from the mangrove-derived endophytic fungus *Nectria* sp . HN001 and Their  $\alpha$ -glucosidase. *Marine Drugs*, *14*(86), 1–10. doi:10.3390/md14050086
- Ding, L., Qin, A. E. S., Li, A. E. F., & Chi, A. E. X. (2008). Isolation, antimicrobial activity and metabolites of fungus *Cladosporium* sp. associated with red alga *Porphyra yezoensis*. *Journal of Current Microbiology*, *56*, 229–235. doi: 10.1007/ s00284-007-9063-y
- Doss, A., & Anand, S. (2012). Purification and characterization of extracellular amylolytic enzyme from *Aspergillus* species. *African Journal of Biotechnology*, *11*(83), 14941–14945. doi: 10.5897/AJB12.2542
- Feofilova, E. P. (2001). The kingdom fungi: Heterogeneity of physiological and biochemical properties and relationships with plants, animals, and prokaryotes (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, *37*(2), 124–137.
- Flores, O. (2015). *Caracterización molecular de Basidiomycetes a partir de aislamientos y fructificaciones recolectadas en la Reserva Biológica San Francisco RBFS*. (Trabajo de fin de titulación). Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador.
- Follmann, D., Brittain, E., & Powers, J. H. (2013). Discordant minimum inhibitory concentration analysis: A new path to licensure for anti-infective drugs. *Clinical Trails*, *10*, 876–885.
- Geiser, D. M. (2004). *Practical molecular taxonomy of fungi*. En Tkacz, J., and Lange, L. (First edition), *Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine* (pp. 1-445). New York.
- Ghikas, D. V, Kouvelis, V. N., & Typas, M. A. (2010). Phylogenetic and biogeographic implications inferred by mitochondrial intergenic region analyses and ITS1-5.8S-ITS2 of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *B. brongniartii*. *BMC Microbiology*, *10*(174), 1-15.

- Gomes, A. R., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. A. P. (2016). *Analytical techniques for discovery of bioactive compounds from marine fungi*. Recuperado de <http://doi.org/10.1007/978-3-319-19456-1>
- Gou, L., Zhan, Y., Lee, J., Li, X., Lü, Z., Zhou, H., & Lu, H. (2015). Effects of L-malic acid on alpha-glucosidase: inhibition kinetics and computational molecular dynamics simulations. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175, 2232–2245. doi: 10.1007/s12010-014-1429-6
- Harris, J. R. (1986). The association of *Phoma sclerotoides* with root diseases of cereals, legumes and weeds. *Australasian Plant Pathology*, 15(1), 1–4.
- Holler, U., Wright, A. D., Matthe, G. F., König, G. M., Draeger, S., Aust, H.-J., & Schulz, B. (2000). Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. *Mycological Research*, 104(11), 1354–1365.
- Janecek, S., Svensson, B., & MacGregor, E. A. (2014).  $\alpha$ -Amylase: an enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71, 1149–1170. doi: 10.1007/s00018-013-1388-z
- Jayasiri, S. C., Hyde, K. D., Ariyawansa, H. A., Bhat, J., Buyck, B., Cai, L., Promputtha, I. (2015). The faces of fungi database: fungal names linked with morphology, phylogeny and human impacts. *Fungal Diversity*. doi: 10.1007/s13225-015-0351-8
- Jones, G., Suetrong, S., Sakayaroj, J., Bahkali, A. H., Abdel-Wahab, M. A., Boekhout, T., & Pang, K.-L. (2015). Classification of marine *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Blastocladiomycota* and *Chytridiomycota*. *Fungal Diversity*. doi: 10.1007/s13225-015-0339-4
- Kasprzyk, I., Michal, B., Elzbieta, K., Nowak, M., Sulborska, A., Kaczmarek, J., Jedryczka, M. (2016). Warm and dry weather accelerates and elongates *Cladosporium* spore seasons in Poland. *Aerobiologia*, 32(1), 109–126. doi: 10.1007/s10453-016-9425-7
- Kavala, P. (2012). Production of antibiotics by marine actinomycetes induced by human pathogens. (Tesis de maestría). National Institute of Technology Rourkela, Odisha.
- Khacheba, I., Djeridane, A., & Yousfi, M. (2014). Twenty traditional algerian plants used in diabetes therapy as strong inhibitors of  $\alpha$ -amylase activity. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*. doi: 10.1155/2014/287281

- Khamthong, N., Rukachaisirikul, V., Phongpaichit, S., Preedanon, S., & Sakayaroj, J. (2014). An antibacterial cytochalasin derivative from the marine-derived fungus *Diaporthaceae* sp. PSU-SP2/4. *Phytochemistry Letters*, *10*, 5–9. doi: 10.1016/j.phytol.2014.06.014
- Kim, SK., & Venkatesan, J. (2015). *Introduction to marine biotechnology*. En Kim, SK. (Firts edition), *Springer handbook of marine biotechnology* (pp. 1-1517). New York.
- Kim, W., Peever, T. L., Park, J.-J., Park, C.-M., Gang, D. R., Xian, M., Chen, W. (2016). Use of metabolomics for the chemotaxonomy of legume-associated *Ascochyta* and allied genera. *Nature Publishing Group*, 1–12. doi: 10.1038/srep20192
- Kozlovskii, A. G., Zhelifonova, V. P., & Antipova, T. V. (2013). Fungi of the genus *Penicillium* as producers of physiologically active compounds (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, *49*(1), 1–10. doi: 10.1134/S0003683813 010092
- Kozlovsky, A. G., Zhelifonova, V. P., Antipova, T. V, & Zelenkova, N. F. (2011). Physiological and biochemical characteristics of the genus *Penicillium* fungi as producers of ergot alkaloids and quinocitrinins. *Applied Biochemistry and Microbiology*, *47*(4), 426–430. doi: 10.1134/S0003683811040065
- Kuhar, F., Castiglia, V., & Papinutti, L. (2013). Reino Fungi : morfologías y estructuras de los hongos. *Revista Boletín Biológica*, *28*, 11–18.
- Kumar, M., & Vaibhav, R. (2014). Advances in taxonomy of genus *Phoma*: polyphyletic nature and role of phenotypic traits and molecular systematics. *Indian Journal of Microbiology*, *54*(2), 123–128. doi: 10.1007/s12088-013-0442-8
- Kusano, R., Ogawa, S., Matsuo, Y., Tanaka, T., Yazaki, Y., & Kouno, I. (2011). Alpha-amylase and lipase inhibitory activity and structural characterization of *Acacia Bark* proanthocyanidins, *74*, 119–128.
- Langfield, R. D., Scarano, F. J., Heitzman, M. E., Kondo, M., Hammond, G. B., & Neto, C. C. (2004). Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the peruvian medicinal plant *Peperomia galioides*. *Journal of Ethnopharmacology*, *94*, 279–281. doi: 10.1016/j.jep.2004.06.013

- León, J., Aponte, J., Rojas, R., Cuadra, D'Í., Ayala, N., Tomás, G., & Guerrero, M. (2011). Estudio de actinomicetes marino aislados de la costa central del Perú y su actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes y *Enterococcus faecalis* vancomicina resistentes. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(2), 4–5.
- Ma, H., Liu, Q., Zhu, G., Liu, H., & Zhu, W. (2016). Marine natural products sourced from marine-derived *Penicillium* fungi. *Journal of Asian Natural Products Research*, 18(1), 92–115. doi: 10.1080/10286020.2015.1127230
- Manoharachary, C., Kunwar, I. K., & Reddy, V. (2010). *Biodiversity, phylogeny and evolution of fungi*. Recuperado de [http://doi.10.1007/978-81-8489-992-4\\_10](http://doi.10.1007/978-81-8489-992-4_10)
- Mathan, S., Smith, a. A., Kumaran, J., & Prakash, S. (2011). Anticancer and antimicrobial activity of *Aspergillus protuberus* SP1 isolated from marine sediments of South Indian Coast. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 9(4), 286–292. doi: 10.1016/S1875-5364(11)60066-6
- Mahyudin, N. A., Blunt, J. W., Cole, A. L. J., & Munro, M. H. G. (2014). Effect of salinity on growth and cytotoxicity of extracts from a marine-derived *Penicillium* sp . (LY1L5), 683–688. doi: 10.1007/978-981-287-077-3
- Moghadamtousi, S. Z., Nikzad, S., Kadir, H. A., Abubakar, S., & Zandi, K. (2015). Potential antiviral agents from marine fungi: an overview. *Marine drugs*, 13, 4520–4538. doi: 10.3390/md13074520
- Mohamed, S. A., Almulaiky, Y. Q., Ahmed, Y. M., Al-Bar, O. A., & Ibrahim, I. H. (2014). Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase from Miswak *Salvadora persica*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(119), 1–10. doi: 10.1186/1472-6882-14-119
- Monteiro de Souza, P. (2010). Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 850–861.
- Montemartini, A., Liotta, M., Venturi, C. B., & Calegari, L. (2000). Antibacterial activity of *Penicillium* sp. strains isolated in extreme environments. *Polar Biology*, 23, 294–297.
- Montes, B., Respetro, A., & McEwen, J. (2003). Nuevos aspectos sobre la clasificación de los hongos y su posible aplicación médica. *Biomédica*, 23, 213–224.

- Mouton, M., Postma, F., Wilsenach, J., & Botha, A. (2012). Diversity and characterization of culturable fungi from marine sediment collected from St. Helena Bay, South Africa. *Microbial Ecology*, 64, 311–319. doi: 10.1007/s00248-012-0035-9
- Mulet, E., Ferrer, C., Colom, F., Frase, S., Abad, J. L., & Alio, J. L. (2001). Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(8), 2873–2879. doi: 10.1128/JCM.39.8.2873
- Murugaiyan, K. (2015). *Marine fungal diversity and bioprospecting*. En Kim, SK. (Firts edition), *Springer handbook of marine biotechnology* (pp. 1-1517). New York.
- Narayan, P., & Seung, Y. (2008). Two species of endophytic *Cladosporium* in pine trees in Korea. *Mycobiology*, 36(4), 211–216.
- Nicoletti, R., & Trincone, A. (2016). *Bioactive compounds produced by strains of Penicillium and Talaromyces of marine origin*. *Marine drugs*, 14(37), 1-35. doi: 10.3390/md14020037
- Nikolaou, E., Agrafioti, I., Stumpf, M., Quinn, J., Stansfield, I., & Brown, A. J. P. (2009). Phylogenetic diversity of stress signalling pathways in fungi. *Biomed Central*, 9(44), 1–18. doi: 10.1186/1471-2148-9-44
- Orberá, T. (2004). Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Revista Iberoamericana de Micología*, 21, 15–19.
- Palacios, N., Burtin, D., & Leech, M. (2004). Biología molecular, una herramienta para la bioprospección del metabolismo secundario de plantas en Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5(2), 67–77.
- Pitt, J., & Hocking, A. (2009). *Penicillium and related genera*. Recuperado de <http://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>
- Qi, J., Shao, C., Liu, M., Qi, X., & Wang, C. (2014). Bioactive steroids from a marine-derived fungus *Penicillium* sp. from The South China Sea, 50(3), 489–491.
- Rampersad, S. N. (2014). ITS1, 5.8S and ITS2 secondary structure medelling for intra-specific differentiation among species of the *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato species complex. *Springer Plus*, 3(684), 1–10.

- Redondo, C., Cubero, J., & Melgarejo, P. (2009). Characterization of *Penicillium* species by ribosomal DNA sequencing and BOX , ERIC and REP-PCR analysis. *Mycopathologia*, 168, 11–22. doi: 10.1007/s11046-009-9191-y
- Romero, E. (2015). *Establecimiento de procedimientos para el aislamiento, cultivo y fermentación de hongos basidiomicetos colectados en bosque húmedo tropical*. (Trabajo de fin de titulación). Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador.
- Romero, G. (2008). Biotecnología: generalidades , riesgos y beneficios. Recuperado de <http://www2.uned.es/experto-biotecnologia/TrabajosSelecc/GloriaRomero.pdf>
- Sales, P. M. De, Souza, P. M. De, Simeoni, L. A., & Magalhães, P. D. (2012).  $\alpha$ -amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 15(1), 141–183.
- Sandoval-Denis, M., Sutton, D. A., Martin-Vicente, A., Cano-Lira, J. F., Wiederhold, N., Guarro, J., & Gené, J. (2015). *Cladosporium* species recovered from clinical samples in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(9), 2990–3000. doi: 10.1128/JCM.01482-15
- Schubert, K., & Braun, U. (2005). Taxonomic revision of the genus *Cladosporium* s. lat. 1. Species reallocated to *Fusicladium*, *Parastenella*, *Passalora*, *Pseudoceercospora* and *Stenella*. *Mycological Progress*, 4(2), 101–109.
- Silber, J., Ohlendorf, B., Labes, A., Erhard, A., & Imhoff, J. F. (2013). Calcarides A–E, antibacterial macrocyclic and linear polyesters from a *Calcarisporium* strain. *Marine drugs*, 11, 3309–3323. doi: 10.3390/md11093309
- Silber, J., Ohlendorf, B., Labes, A., Wenzel-Storjohann, A., Näther, C., & Imhoff, J. F. (2014). Malettinin E, an antibacterial and antifungal tropolone produced by a marine *Cladosporium* strain. *Marine Biotechnology*, 1(35), 1–6. doi: 10.3389/fmars.2014.00035
- Singh, B., Kaur, T., & Kaur, S. (2015). An alpha-glucosidase inhibitor from an endophytic *Cladosporium* sp . with potential as a biocontrol agent. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175, 2020–2034. doi: 10.1007/s12010-014-1325-0

- Singh, B., Kaur, T., Kaur, S., Manhas, R. K., & Kaur, A. (2016). Insecticidal potential of an endophytic *Cladosporium velox* against *Spodoptera litura* mediated through inhibition of alpha glycosidases. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1–7. doi: 10.1016/j.pestbp.2016.01.004
- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Madhavan, K., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2006).  $\alpha$ -amylase from microbial sources - an overview on recent developments. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 173–184.
- Suryanarayanan, T. S. (2012). The diversity and importance of fungi associated with marine sponges. *Botánica Marina*, 55(6), 553–564. doi: 10.1515/bot-2011-0086
- Sutani, A., Ueno, M., Nakagawa, S., & Sawayama, S. (2015). Melon aroma-producing yeast isolated from coastal marine sediment in Maizuru Bay, Japan. *Fisheries Science*. doi: 10.1007/s12562-015-0912-5
- Swathi, J., Sowjanya, K. M., Narendra, K., Reddy, K. V. N. R., & Satya, A. K. (2013). Isolation, identification & production of bioactive metabolites from marine fungi collected from coastal area of Andhra Pradesh, India. *Journal of Pharmacy Research*, 6(6), 663–666. doi: 10.1016/j.jopr.2013.04.052
- Unnikrishnan, P. S., Suthindhiran, K., & Jayasri, M. A. (2015). Alpha-amylase inhibition and antioxidant activity of marine green algae and its possible role in diabetes management. *Pharmacognosy Magazine*, 11(44), 511–516.
- Uribe, L. (2007). *Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de mora*. (Trabajo de grado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Voigt, K., & Kirk, P. M. (2011). Recent developments in the taxonomic affiliation and phylogenetic positioning of fungi: impact in applied microbiology and environmental biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90, 41–57. doi: 10.1007/s00253-011-3143-4
- Wang, L., Xu, B., Wang, J., Su, Z., Lin, F., Zhang, C., & Kubicek, C. P. (2012). Bioactive metabolites from *Phoma* species, an endophytic fungus from the chinese medicinal plant *Arisaema erubescens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 1231–1239. doi: 10.1007/s00253-011-3472-3
- Webster, J., & Weber, R. (2007). *Introduction to fungi* (Third Edit., 1 - 875). New York.

- Wöstemeyer, J. (2013). *Disease management of Phoma infections*. En Kempken, F. (Second Edition), *The mycota* (1-198). Germany.
- Xiong, H., Qi, S., Xu, Y., Miao, L., & Qian, P.-Y. (2009). Antibiotic and antifouling compound production by the marine-derived fungus *Cladosporium* sp . F14. *Journal of Hydro-Environment Research*, 2(4), 264–270. doi: 10.1016/j.jher.2008.12.002
- Ying, Y., Zhang, L., Zhang, X., Bai, H., Liang, D., & Ma, L. (2014). Phytochemistry terpenoids with alpha-glucosidase inhibitory activity from the submerged culture of *Inonotus obliquus*. *Phytochemistry*, 108, 171–176. doi: 10.1016/j.phytochem.2014.09.022
- Yoiprommarat, S., Srichomthong, K., Deelai, S., Suetrong, S., Sakayaroj, J., Bunyapaiboonsri, T., & Unagul, P. (2015). Secondary metabolites of the marine fungus *Paradendryphiella arenariae* BCC 17999. *Botánica Marina*, 58(5), 393–399. doi: 10.1515/bot-2015-0013
- Zhelifonova, V. P., Antipova, T. V., & Kozlovsky, A. G. (2010). Secondary metabolites in taxonomy of the *Penicillium* fungi. *Microbiology*, 79(3), 277–286. doi: 10.1134/S002626171003001X

## **ANEXOS**

**ANEXO 1.** Preparación de medio de cultivo.

- **Medios de cultivo formulados:**

<b>A. Agar Extracto de Malta - MEA (1 Litro de Disolución)</b>	
Extracto de malta	30 g
Peptona	5 g
*Agar Bacto	15 g
Agua de Mar Artificial (75%)	750 mL
Agua destilada (25%)	250 mL

<b>B. Medio YNPD (1 Litro de Disolución)</b>	
Glucosa	10 g
Extracto de malta	10 g
*Agar Bacto	10 g
Peptona	2 g
Extracto de levadura	2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1 g
Vitamina	10 mL
Agua de Mar Artificial (75%)	750 mL
Agua destilada (25%)	250 mL

- **Medio líquido PDA:**

<b>C. Medio Agar Papa Dextrosa - PDA (1 Litro de Disolución)</b>	
PDA	39 g
Agua de Mar Artificial (75%)	750 mL
Agua destilada (25%)	250 mL

**NOTA:** Adicionar \*Agar Bacto cuando se requiera preparar agar.

**ANEXO 2.** Análisis de PCR del ADN genómico extraído de los cinco morfotipos.

