



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
HONGOS EXTREMÓFILOS DEL COMPLEJO VOLCÁNICO
IZTACCÍHUATL

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

PATRICIA ISABEL VILLANUEVA GARCÍA

MARCELA ZARAGOZA GONZÁLEZ

DIRIGIDA POR

Dr. JUAN CAMPOS GUILLEN

M. en C. ROSA PAULINA CALVILLO MEDINA

SINODALES

Dr. JUAN CAMPOS GUILLEN
DIRECTOR

M. en C. ROSA PAULINA CALVILLO MEDINA
CO DIRECTOR

M. en C. ALMA DELIA BERTADILLO JILOTE
SINODAL

M. S. P. SERGIO PACHECO HERNÁNDEZ
SINODAL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
HONGOS EXTREMÓFILOS DEL COMPLEJO VOLCÁNICO
IZTACCÍHUATL**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

PATRICIA ISABEL VILLANUEVA GARCÍA

MARCELA ZARAGOZA GONZÁLEZ

DIRIGIDA POR

Dr. JUAN CAMPOS GUILLEN

M. en C. ROSA PAULINA CALVILLO MEDINA

Santiago de Querétaro, Qro. a Enero de 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
HONGOS EXTREMÓFILOS DEL COMPLEJO VOLCÁNICO
IZTACCÍHUATL**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

PATRICIA ISABEL VILLANUEVA GARCÍA

MARCELA ZARAGOZA GONZÁLEZ

DIRIGIDA POR

Dr. JUAN CAMPOS GUILLEN

M. en C. ROSA PAULINA CALVILLO MEDINA

SINODALES

Dr. JUAN CAMPOS GUILLEN
DIRECTOR

M. en C. ROSA PAULINA CALVILLO MEDINA
CO DIRECTOR

M. en C. ALMA DELIA BERTADILLO JILOTE
SINODAL

M. S. P. SERGIO PACHECO HERNÁNDEZ
SINODAL

Dedico esta tesis a mis padres Julio Villanueva e Isabel García por siempre estar para mí y apoyarme incondicionalmente.

A mi hermano Alberto Villanueva por soportarme en mis días de estrés.

A mi familia por siempre darme ánimos.

A mis amigos.

A mis directores de tesis Juan Campos y Rosa Paulina Calvillo por siempre estar dispuestos a compartir sus conocimientos y hacer posible este bello trabajo

A mi amiga y compañera de tesis Marcela Zaragoza

Al M. en C. Efraín Escudero Leiva por su contribución en el árbol bayesiano

Patricia Villanueva

Dedico esta tesis a mis padres María Luz e Hilario que me apoyaron incondicionalmente, moral y económicamente para poder culminar mis estudios.

A mi hermana Alexia por su apoyo en mis días de universitaria.

A mis Directores de Tesis Juan y Rosa, por mostrarme que la ciencia está presente hasta en las pequeñas y microscópicas cosas que habitan entre nosotros.

Al M. en C. Efraín Escudero Leiva por su apoyo en la elaboración del dendograma.

A Patricia por ser mi compañera, amiga y guía para poder llevar a cabo este bonito trabajo.

A esas personitas que me observan desde el cielo y que siempre han sido mi motivación de vida.

Marcela Zaragoza

AGRADECIMIENTOS

Patricia Villanueva agradece:

Agradezco a mis padres y hermano por nunca dejarme rendir e impulsarme a luchar por mis sueños.

A mi amiga Ana que siempre estuvo para mí, aunque no quisiera. A todas aquellas personas que sin mencionarlas estuvieron siempre presentes, creyendo y apoyándome sin dudarlo

Por mucho que me esfuerce, no encuentro maneras de agradecerte tus esfuerzos tal y como te lo mereces por brindarme tu apoyo sin dudarlo, por creer en mí, por ser parte de mi vida.

Marcela Zaragoza agradece:

A Dios, a mis hermanas de corazón, a esas personitas brillosas que han estado conmigo en las buenas y en las malas. A todas esas personas que se han cruzado en mi camino y en algún momento fueron un soporte para poder seguir creciendo como persona y profesionalmente.

A todos los que creyeron en mí.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
Índice general	i
Índice de cuadros	iii
Índice de figuras	iv
Resumen	
1 Antecedentes	1
1.1 Los glaciares	1
1.2 Los glaciares en México	5
1.2.1 Iztaccíhuatl	6
1.3 Microorganismos extremófilos	7
1.4 Levaduras y hongos en hábitats glaciales	9
1.5 Hongos extremófilos causantes de infecciones	12
2 Hipótesis	14
3 Objetivos	15
3.1 Objetivo general	15
3.2 Objetivos específicos	15
4 Metodología	16
4.1 Aislamiento de las levaduras y hongos filamentosos	16
4.2 Identificación morfológica (macro y microscópica)	16
4.3 Extracción de ADN por el método de CTAB	17
4.4 PCR	17
4.5 Electroforesis	19
4.6 Secuenciación de Nucleótidos	20
4.7 Análisis filogenético	20
4.8 Caracterización fúngica: Termotolerancia y actividad hemolítica	20
4.9 Caracterización fúngica: Evaluación de la resistencia a antifúngicos (itraconazol y ketoconazol) a diferentes concentraciones	21
5 Resultados y discusión	22

5.1 Aislamiento de hongos psicotolerantes del Iztaccíhuatl	22
5.2 Identificación de los hongos aislados del Iztaccíhuatl	23
5.2.1 Identificación genotípica: PCR	23
5.2.2 Identificación genotípica: Inferencia filogenética	24
5.2.3 Caracterización fenotípica de los hongos identificados del Iztaccíhuatl	31
5.3 Caracterización de los hongos psicotolerantes: Termotolerancia y actividad hemolítica	46
5.4 Caracterización de los hongos psicotolerantes: susceptibilidad/resistencia a antifúngicos (ketoconazol e itraconazol)	59
6 Conclusiones	75
7 Referencias	76

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadros	Página
1 Clasificación de los microorganismos en función de su temperatura óptima de crecimiento	8
2. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR del fragmento ITS1-5.8S rDNA-ITS2	18
3. Condiciones para la amplificación por PCR del fragmento ITS1-5.8S rDNA-ITS2	19
4. Medio usado y concentración de los antifúngicos empleados	21
5. Comparación de los resultados de BLAST y filogenia de las muestras del Iztaccíhuatl	25
6. Capacidad hemolítica de los hongos del Iztaccíhuatl a 37°C	48
7. Susceptibilidad a antifúngicos ketoconazol e itraconazol a 37°C	61
8. Susceptibilidad a ketoconazol a 4°C	64
9. Susceptibilidad a itraconazol a 4°C	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1 Dinámica del glaciar	3
2. Biomas glaciares	4
3. Faja Volcánica Transmexicana	5
4. Principales respiraderos volcánicos del Iztaccíhuatl	6
5. Total de hongos aislados del Iztaccíhuatl que lograron ser identificados y no identificados	22
6. Electroforesis del DNA extraído después de su amplificación por PCR	24
7. Electroforesis del DNA extraído después de su amplificación por PCR	24
8. Árbol filogenético	28-30
9. Porcentaje de ocurrencia para los diferentes aislados	31
10. Descripción macro y microscópica de los hongos del Iztaccíhuatl	32-44
11. Caracterización macroscópica de hongos del Iztaccíhuatl en agar sangre	50-55
12. Estrategias de <i>Candida albicans</i> para la explotación de hierro dentro del huésped	57

RESUMEN

Los ambientes extremos se consideraban hostiles para la vida, hasta que se descubrió que están habitados por una gran diversidad de microorganismos, entre ellos hongos extremófilos que pueden ser oportunistas para el ser humano y adaptarse de un ambiente en extremo frío. Para aislar los hongos, se utilizó la siembra directa de muestras agua de cuatro puntos del Iztaccíhuatl. La identificación taxonómica, se realizó mediante la morfología macro y microscópica; y un análisis de inferencia filogenética basado en la región ITS. Para caracterizar los hongos, se analizó la capacidad de crecer a 37°C, actividad hemolítica y resistencia/sensibilidad a itraconazol y ketoconazol, en PDA y HMA suplementado con sangre humana. Se pudieron identificar 39 cepas agrupándose: *Aureobasidium* (3%), *Candida* (3%), *Cryptococcus* (3%), *Cystofilobasidium* (5%), *Cladosporium* (5%), *Holtermanniella* (3%), *Mrakia* (13%), *Naganishia* (10%), *Protomyces* (3%), *Rhodotorula* (3%), *Basidiomycota* (10%), *Tremellomycetes* (15%), *Microbotryomycetes* (5%), *Leucosporidiaceae* (5%), *Ascomycota* (3%), *Epicoccum* (5%), *Fungi* (5%) y *Guehomyces* (3%). Veintiún muestras presentaron actividad hemolítica, 2 aislados presentaron hemólisis parcial y el resto hemólisis total. Se observó la resistencia a itraconazol (0.1, 0.5 y 1 µg /disco) y ketoconazol (0.5, 1 y 2.5 µg /disco) de *Rhodotorula* sp. a 37°C. Se realizó la prueba a 4°C, se evaluaron concentraciones de itraconazol (0.1, 0.5, 1, 5, 10, 30, 50 y 70 µg /disco) y de ketoconazol (0.35, 0.5, 1, 2.5, 10, 25, 30, 50 y 70 µg/disco). Se mostró resistencia a bajas concentraciones de antifúngicos, a excepción de R6 *Candida* sp. Este trabajo representa el primer reporte donde se ha descrito taxonómicamente y se caracterizó parte de la microbiota fúngica del Iztaccíhuatl.

1. ANTECEDENTES

1.1 Los glaciares

El hielo en la naturaleza, ha sido considerado desde hace tiempo como un micro ambiente que presenta características únicas donde los microorganismos que han sido depositados aleatoriamente en su superficie y pueden mantenerse en latencia (Gostinčar y col., 2009). Sin embargo, ahora se sabe que diferentes tipos de hielo proporcionan entornos donde se genera el crecimiento y reproducción de los microorganismos (Ramírez y col., 2006).

La mayor parte de la superficie del planeta, incluidas las regiones polares, las de alta montaña y las profundidades marinas (90% del agua de mar está a menos de 5°C), presenta bajas temperaturas medias, entre 0°C y 20°C. La Antártida, se encuentra constantemente a bajas temperaturas, debido a que sus aguas están alimentadas durante los meses de verano con agua y hielo de los glaciares circundantes. Cuando el hielo es permanente se le denomina glaciar (García y Giraudó, 2014).

El agua es el disolvente universal para la vida y debe estar presente en estado líquido para que ésta ocurra. Esto pone un límite para el crecimiento de organismos por debajo de los 0°C. Típicamente los organismos psicrófilos pueden crecer en temperaturas por debajo de los 5°C, aunque su rango de temperaturas de crecimiento pueden ir desde los 20°C hasta menos de 0°C (Ramírez y col., 2006).

Según el Centro Nacional de Datos de Hielo y Nieve (NSIDC por sus siglas en inglés), un glaciar es una masa de hielo que se origina en la tierra y se compone de nieve depositada, que en el transcurso de los años se comprime en grandes y gruesas masas de hielo glacial. La formación de glaciares se presenta cuando la nieve se mantiene en el mismo lugar el tiempo suficiente para que suceda la transformación glacial, esta condición le da a los glaciares la capacidad de tener un movimiento lento pero dinámicos (Alpala, 2016).

Los glaciares en el contexto científico son considerados como relictos de la última Edad de Hielo, cuando las bajas temperaturas permitieron que el hielo polar avanzara hacia zonas de baja latitud (Alpala, 2016). En la actualidad los glaciares cubren aproximadamente el 10% de la superficie de la tierra que almacenan cerca de 33 millones de km³ de agua dulce, constituyéndose así en los mayores reservorios de este recurso (García y Giraudo, 2014). Con la mayor parte en las regiones polares y con un bajo porcentaje en las zonas montañosas. En ambos casos las temperaturas con el tiempo tienden a ser más cálidas, razón por la cual y especialmente en las zonas montañosas, los glaciares están desapareciendo (Alpala, 2016).

Los glaciares se mantienen por la dinámica de sus partes, el área en la cual el cuerpo de hielo gana masa es conocida como Zona de Acumulación, por lo general es la zona más alta del glaciar donde cae la nieve. Así mismo los glaciares tienen una Zona de Ablación, en la cual se pierde la masa y ocurren los procesos de fusión y evaporación, en este proceso se forman las escorrentías superficiales que alimentan los ríos (Delgado Granados y col., 2007). Cuando la pérdida y la ganancia de masa glaciar son iguales, la línea de Equilibrio se mantiene, de lo contrario se dice que se rompe la Línea de Equilibrio. Estos tres fenómenos son cambiantes, razón por la que los glaciares son dinámicos en el tiempo y a diferentes escalas, así como tienen periodos de retroceso y pasan por etapas de recarga glaciar (Alpala, 2016). El agua producida, al derretirse la superficie del glaciar fluye por diferentes grietas, generando ríos y arroyos. Estos cuerpos acuíferos de origen glaciar se consideran ambientes sub-glaciares por arrastrar sedimentos que se encontraban atrapados dentro del hielo o ubicados en el suelo donde éste se encuentra (Fig 1) (García y Giraudo, 2014).

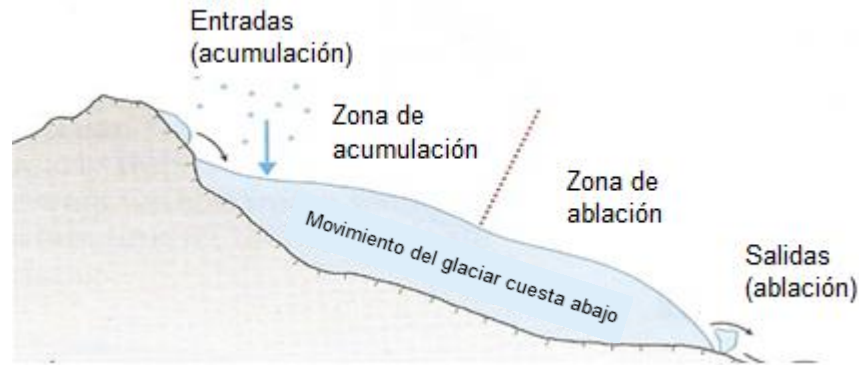


Figura 1. Dinámica del glaciar. Está gobernada fundamentalmente por los siguientes procesos: 1) La acumulación de nieve y hielo en las partes superiores del glaciar, 2) El descenso de esta masa de hielo hacia la parte inferior del glaciar, 3) La ablación del hielo, 4) La formación de torrentes de agua por el deshielo o el transporte del hielo/agua evaporada a través de la atmósfera.

Sin embargo, biológicamente, el hielo glacial ha sido considerado durante mucho tiempo inactivo o sólo como un medio donde se mantenían los organismos en latencia, recolectando y preservando microorganismos depositados, obtenidos a través de la precipitación atmosférica (Butinar, 2007). Estudios han revelado que partes de un glaciar con ciertas condiciones físicas y químicas pueden ser un ambiente favorable que apoya a comunidades activas y diversas, no sólo de micro, sino también de macrobióticas (Hodson, 2008; Anesio y Laybourn Parry, 2012).

La superficie del glaciar ablativo recibe radiación solar, durante la estación de verano produciendo agua, esencial para los procesos biológicos. El agua está cubierta por partículas (la cantidad de escombros aumenta generalmente hacia el extremo del glaciar) que actúan como fuente de elementos biogénicos como nitrógeno y fósforo (Kennedy, 1993; Anésio, 2009; Franzetti, 2013). El depósito de polvo oscuro, conocido como crioconita en cantidades suficientes, reduce el albedo de la superficie del hielo y acelera la fusión. A medida que el hielo se derrite, se forma un agujero con agua, y crioconita que permite la generación mantenimiento de la vida (Anesio, 2010).

Cuando los procesos de fusión glacial, se generan gradualmente (derretimiento superficial de la nieve del invierno), la línea de nieve retrocede y se lleva a cabo la

ablación del hielo expuesto. En consecuencia, la zona de ablación viene a parecerse a una esponja de hielo rígida saturada con agua y enriquecida con partículas minerales y orgánicas transportadas por el viento, capaces de permitir la vida. Sin embargo, los organismos que prosperen aquí, tienen que tolerar intensa radiación UV, ciclos de congelación/descongelación, pH bajo, déficits de nutrientes y otros factores extremos (Edwards, 2014).

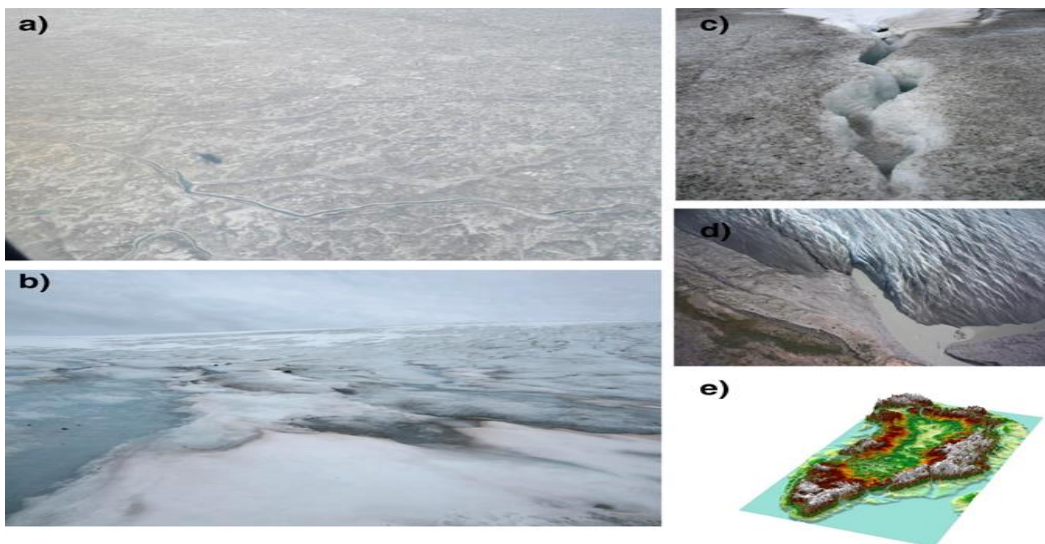


Figura 2. Biomas glaciares. Los diferentes tonos de colores y los hábitats de los biomas glaciares. a) Capa de hielo de Groenlandia que muestra la extensión de impurezas y la colonización de algas en la superficie del hielo; b) Glaciar Mittivakkat muestra una variedad de diferentes hábitats de superficie, desde nieve “limpia” hasta hielo “sucio”; c) una pequeña grieta en Groenlandia. Las características como está proporcionan oportunidades para el transporte de material de la superficie del hielo al sistema en glacial; d) Esguerrimiento del glaciar Leveret (oeste de Groenlandia-Kangerlussuaq) que contiene una gran cantidad de agua subglacial (rica en sedimentos); e) Visualización en 3D del cañón bajo la capa de hielo de Groenlandia (Foto de J. Bamber, 2013), la cantidad de agua almacenada bajo el hielo es desconocida (Anesio, 2017).

Actualmente, la mayoría de los glaciares del mundo están retrocediendo rápidamente como resultado del calentamiento global (Delgado Granados y col., 2007). Los glaciares del Monte Tronador Patagonia, Argentina, son un claro ejemplo, habiendo experimentado un constante retroceso durante los últimos 100 años (Villarosa, 2008). El glaciar Perito Moreno en el Calafate Argentina, es uno de

los pocos glaciares que se encuentran en una situación estable, es decir, no está avanzando ni retrocediendo. El estudio de las poblaciones microbianas psicrotróficas en este hábitat frágil es de creciente interés científico (Branda, 2010).

1.2 Los glaciares en México

El eje volcánico transversal (EVT) es un conjunto de volcanes alineados sobre una franja que cruza el territorio mexicano de oeste a este, desde Cabo Corrientes, Nayarit hasta la sierra Chinconquiaco, Veracruz (Ferrusquia- Villafranca, 2007), que se localiza principalmente entre los 19° y 21° de latitud norte y entre los 1500 y 3000 m de altitud (Ferrusquia-Villafranca, 2007). Los volcanes que conforman la EVT, presentan aún en actividad, este eje neo volcánico, se ha formado durante los últimos 19 millones de años, a lo largo de 4 grandes episodios de vulcanismo (Espinosa y Ocegueda, 2007). Entre los mayores edificios volcánicos del país se encuentran: Pico de Orizaba, Popocatépetl, Iztaccíhuatl, Nevado de Toluca, Tancítaro, Nevado de Colima, figura 3 (Caballero y col., 2016).

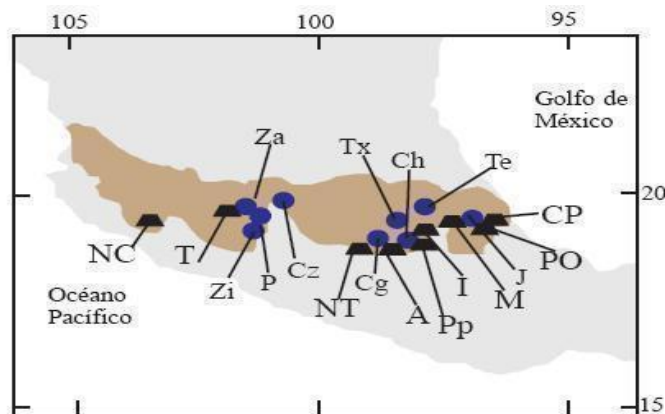


Figura 3. Eje volcánico transversal. Mapa de localización del eje de este a oeste (sombreado café). Volcanes (negro): CP=Cofre de Perote, PO=Pico de Orizaba, M=Malinche, I=Iztaccíhuatl, Pp=Popocatépetl, A=Ajusco, NT=Nevado de Toluca, T=Tancítaro, NC=Nevado de Colima, Lagos (azul) J = Jalapasquillo, Te = Tecocomulco, Ch = Chalco, Tx = Texcoco, Cg = Chignahuapan, Cz = Cuitzeo, P = Pátzcuaro, Zi = Zirahuén, Za = Zacapu (Ferrusquia-Villafranca, 2007).

1.2.1 Iztaccíhuatl

El Iztaccíhuatl es un gran complejo volcánico cuaternario dentro del EVT que consiste de varios cráteres, con los principales respiraderos volcánicos alineados a lo largo de un eje N-NO a S-SE como se observan en la Figura 4 (Schneider y col., 2008).

Se han documentado emisiones difusas de gases en el cráter de “La Panza” del Iztaccíhuatl. En base a esto se considera al Iztaccíhuatl como un volcán activo, siguiendo la definición de que un volcán se considera activo cuando han tenido actividad eruptiva en los últimos 10 000 años (Delgado y col., 2005).



Figura 4. Principales respiraderos volcánicos del Iztaccíhuatl. Del náhuatl Mujer Blanca, es la tercera cima más alta de México, puede verse el perfil de una mujer acostada con cabeza, pechos, panza y pies como formaciones principales, algunos la llaman la Mujer Dormida.

Después del Pico de Orizaba (también conocido como Citlaltepétl, 5675 msnm) y Popocatepetl (5452 msnm), el Iztaccíhuatl (5286 msnm) es el tercer pico más alto en México y, al igual que el Citlaltepétl, aún está cubierto por hielo (Granados, 2007). Sus rocas andesíticas y dacíticas (12,000-900,000 años de antigüedad, Nixon, 1989) constituyen la base del sistema glaciario de este volcán. Vázquez-Selem y Heine, 2011 describen la evolución de los glaciares durante los últimos 21,000 años. Los glaciares del volcán Iztaccíhuatl perdieron el 43% de su área en solo 30 años (Granados y col., 2015). El hielo de esos glaciares es muy vulnerable

a los cambios de temperatura porque su temperatura promedio es $\sim -1.5^{\circ}\text{C}$ (Granados y col., 2015). No hay datos meteorológicos a la altitud donde están los glaciares, pero las estaciones meteorológicas más cercanas muestran patrones decrecientes y crecientes en precipitación y temperatura respectivamente (Delgado-Granados, 2007).

Actualmente solo existen estudios de la biomasa microbiana del glaciar Ayoloco en el volcán Iztaccíhuatl que se determinó mediante la composición de los ácidos grasos de fosfolípidos (PLFA) enlazados con éster del suelo, mostrando un cambio de la comunidad microbiana con la edad del suelo. Observándose un aumento significativo de PLFA fúngicos para los suelos de mediana edad, y una disminución posterior. Para los protozoos, se observó un pico en los suelos de mediana edad, ubicados a una elevación entre 4500 y 4825 msnm (Insam y col., 2017)

1.3 Microorganismos extremófilos

El término extremófilo fue usado por vez primera por Macelroy en 1974. “Ambiente extremo”, es un término relativo, ya que los ambientes que pueden ser extremos para ciertos organismos, y pueden ser esenciales para la supervivencia de otro. Los extremófilos se desarrollan bajo condiciones donde la vida no prospera para otros seres vivos. Los ambientes extremos incluyen aquellos con temperaturas muy elevadas (55°C - 121°C) o bajas (0°C a -20°C), alta salinidad (NaCl 2-5 M) y alta alcalinidad (pH arriba de 8) o alta acidez (pH menor de 3) (Ramírez y col., 2006).

Los microorganismos que sobreviven y prosperan en condiciones que son perjudiciales para la mayoría de otras especies han producido interés en la comunidad científica en los últimos años, generando algunos descubrimientos innovadores sobre los mecanismos de tolerancia al estrés. Los extremófilos son modelos biológicos prometedores para profundizar nuestra comprensión de la evolución y en la adaptación al estrés (Gostinčar y col., 2009). Los extremófilos han generado interés en el ámbito industrial, debido a sus proteínas en particular sus enzimas. Sin embargo, las extremo-enzimas, empiezan a operar justo en el punto donde las de los organismos mesófilos dejan de funcionar. Existen numerosos

procesos industriales que requieren el uso de estos catalizadores químicos, tal es el caso de las enzimas que participan en la producción de edulcorantes y papel, síntesis de detergentes, elaboración de alimentos, extracción de petróleo, obtención de biochips para la identificación de personas y el diagnóstico de enfermedades (Ramírez y col., 2006).

Los hábitats donde viven los extremófilos incluyen suelos y mares polares fríos, glaciares alpinos y zonas volcánicas, en el cuadro 1 se muestra la clasificación de los microorganismos en función de su temperatura.

Cuadro 1. Clasificación de los microorganismos en función de su temperatura óptima de crecimiento (Ramírez y col., 2006).

Temperatura	Descripción
Hipertermófilos	Su temperatura óptima de crecimiento está por encima de los 80°C y el máximo crecimiento de cultivos, se ha llegado a dar entre 110 y 112°C.
Termófilos	Crecimiento óptimo después de los 45°C.
Mesófilos	Temperatura óptima alrededor de 37°C. Frecuentemente son capaces de crecer en rangos alrededor de 25 a 45°C.
Psicrófilos	Capaces de crecer por debajo de 5°C y con temperaturas máximas de 20°C. Frecuentemente son capaces de crecer en rangos alrededor de 10°C.
Psicrófilos facultativos	Temperatura óptima de crecimiento es de 15°C. Llegando a alcanzar los 20°C, son capaces de crecer hasta por debajo de 0°C.

En México, se han aislado bacterias y arqueas extremófilas de pozos petroleros (Miranda y col., 2004), aguas termales (Castro y col., 2005; Pinzón y col., 2010),

zonas desérticas (Souza y col., 2006), suelos alcalinos (Valenzuela y col., 2008; Ruiz y col., 2009), zonas volcánicas (Cavicchioli y col., 2011), entre otros; revelando la gran biodiversidad y el gran potencial biotecnológico de la microbiota mexicana (Oliart y col., 2016).

La presencia de estos microorganismos extremófilos en regiones geográficamente distantes (por ejemplo, alta montaña arriba de los 5000 msnm) podría ser el resultado de un proceso ecológico y la adaptación genética que les permitió aumentar y mejorar su supervivencia en estos ambientes específicos (Margesin y col., 2007b, Rossi y col., 2009).

1.4 Levaduras y hongos en hábitats glaciales

En los glaciares viven microorganismos como algas, bacterias y hongos adaptados para la vida a bajas temperaturas. Los hongos filamentosos y las levaduras están adaptados al frío y presentan actividad metabólica. Producen proteínas anticongelantes u otros metabolitos que son liberados al medio y permiten la supervivencia de la comunidad de microorganismos que las rodea (García y Giraudo, 2014). Los hongos y levaduras psicrófilos desempeñan un papel esencial en el ciclo de los biogeoquímico de los elementos, de los nutrientes y en los procesos de producción de biomasa en ecosistemas fríos (Margesin y col., 2007a).

Los hongos filamentosos y las levaduras son organismos eucarióticos, que se reproducen de manera, sexual o asexual (Vargas y Villamizar, 2005). Así mismo, tienen una pared celular formada por quitina el cual es un compuesto (polisacárido) rígido que le confiere protección al medio ambiente (Moreno, 2000).

La biología ha empleado diversas áreas del conocimiento para generar el concepto de especie fúngica como la taxonomía y la biología molecular. Los métodos de taxonomía molecular, como el uso de marcadores moleculares (genes ribosomales) basándose en la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y la secuenciación de los fragmentos amplificados (Cuervo y col., 2014) así como los análisis filogenéticos han permitido aumentar la discriminación entre variantes genéticas; esto ha

aumentado la resolución para la identificación de especies (Vargas y Villamizar, 2005).

La estructura de los hongos está constituida por filamentos tubulares microscópicos que se ramifican y se entrecruzan. Cada filamento se denomina hifa y un conjunto de hifas forma lo que se conoce con el nombre de micelio (García, 2004). Las esporas (de origen sexual) y los conidia (de origen asexual) son estructuras fúngicas de reproducción y de dispersión que forman los hongos. Las esporas, son casi siempre, morfológicamente diferenciadas de los conidia (Moreno, 2000).

Las levaduras son unicelulares con una forma esférica u oval típica. La mayoría de las levaduras se reproducen asexualmente por gemación y unas pocas por fisión binaria (García, 2004). En el proceso de gemación se forma una pequeña protuberancia en la periferia de la célula, la cual se agranda, hasta que se forma la célula hija la cual, se desprende de la madre (García, 2004). Algunas levaduras producen brotes que no pueden separarse y forman una cadena corta de células denominadas pseudohifas (Tortora y col., 2007). Las levaduras conforman, hasta ahora, un reducido conjunto de especies conocidas (2.000 especies aproximadamente), si se lo compara con lo que se conoce de otros microorganismos (bacterias, algas, etc.). En los últimos años este número de especies se ha incrementado exponencialmente; de hecho, se estima que el número de especies conocidas representan alrededor del 1% de la biodiversidad de levaduras real existente en los ambientes naturales (García y Giraud, 2014). Algunos hongos, en particular las especies patógenas, muestran dimorfismo, es decir dos formas de crecimiento, los cuales pueden desarrollarse como un hongo filamentoso o como una levadura (Tortora y col., 2007).

La distribución de especies de levaduras ascomicotas y basidiomicotas en hábitats glaciales ha sido recientemente revisada y discutida por algunos autores (Connell y col., 2008, Branda y col., 2010, de García y col., 2010). Estos estudios mostraron que las especies dominantes difieren con el área geográfica y que el género más común aislado de glaciares y hábitats relacionados es *Cryptococcus*. Otros géneros

de basidiomicetos aislados fueron: *Bulleromyces*, *Cystofilobasidium*, *Dioszegia*, *Erythrobasidium*, *Filobasidium*, *Guehomyces*, *Leucosporidiella*, *Leucosporidium*, *Malassezia*, *Mastigobasidium*, *Mrakia*, *Mrakiella*, *Rhodospodium*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus*, *Trichosporony*, *Udeniomyces* (Connell y col., 2008, Branda y col., 2010, de García y col., 2010).

Además, se han descrito recientemente varias especies nuevas aisladas del ambiente frío: *Mrakia robertii*, *Mrakia blollopis*, *Mrakiella niccombsii* (Thomas Hall y col., 2010), *Wickerhamomyces patagonicus* (de García y col., 2010), *Rhodotorula arctica* (Vishniac y Takashima 2010), así como *Dioszegia antarctica* y *Dioszegia cryoxerica* (Connell y col., 2010). Esto ilustra aún más la rica y aún no explorada biodiversidad de levaduras que ocurre en tales hábitats extremos y en desaparición (Connell y col., 2010).

Hay especies cosmopolitas pertenecientes a géneros comunes de micro hongos que, a primera vista, no parecen muy diferentes de los aislamientos de otros lugares. Sin embargo, un estudio que incluyó análisis moleculares de las poblaciones de *Penicillium crustosum* aisladas de glaciares en la isla de Spitsbergen (Svalbard, Noruega) demostró que la mayoría de estos aislamientos árticos se agrupan en dos grupos principales distintos de cepas aisladas en otras partes del mundo (Sonjak y col., 2009).

Las especies del género *Thelebolus* tienden a ser psicrófilas (Wicklow y Malloch, 1971). *Thelebolus microsporus* ocurre a nivel mundial en las zonas climáticas boreales, mientras que en el clima extremo de la Antártida, se ha desarrollado en dos genotipos endémicos; estos tienen una morfología fuertemente reducida y no pueden producir interacciones sexuales. Estos dos genotipos fueron descritos como especies nuevas: *Thelebolus ellipsoideus* y *Thelebolus globosus* (de Hoog y col., 2005).

1.5 Hongos extremófilos causantes de infecciones

Algunos hongos extremófilos han sido encontrados en aislados clínicos como, por ejemplo, estas especies:

- Las especies de *Rhodotorula* son levaduras basidiomicotas ambientales que han surgido como causa de fungemia en seres humanos inmunosuprimidos. En un catéter venoso central en el cuerpo humano, se identificó a *Rhodotorula* como un factor de riesgo importante para la fungemia. A continuación presentamos un caso clínico donde de un catéter médico estaba relacionado con la infección del torrente sanguíneo debido a *Rhodotorula mucilaginosa* (*R. mucilaginosa*). La fiebre del paciente persistió después del tratamiento empírico con el antifúngico micafungina. Un cambio al azol voriconazol en dosis vía oral, resolvió la fungemia (Kitazawa, 2018).
- *Rhodotorula* spp., es una levadura ambiental pero también, en los últimos años se ha considerado una levadura patogénica emergente. A menudo las infecciones debido a estas levaduras se encuentran en pacientes con más factores de riesgo como la inmunosupresión por retrovirales así como con inmusupresores. Se documentó un caso clínico de un infante con infección de *R. mucilaginosa* en la piel debido a la terapia con inmunosupresores (Tligui, 2018).
- En las últimas décadas, la incidencia de infecciones fúngicas, particularmente en la piel se han relacionado con levaduras, siendo *Candida* spp. el microorganismo patógeno que mayor incidencia. Sin embargo otras levaduras han estado involucradas en las infección cutáneas (Coppola, 2015).
- Levaduras de los géneros *Leucosporidium* así como *Rhodotorula* han sido parte de estudios clínicos debido a su comensalismo con el ser humano. Se encontraron presentes en la piel, la faringe como comensales y en algunos casos causando infecciones Estas levaduras no eran consideradas parte de los hongos debido a sus características distintas (Rose, 1977).

En los últimos años se ha visto una gran incidencia de hongos ambientales que están involucrados en infecciones oportunistas en seres humanos. Las infecciones por lo general se adquieren en el área quirúrgica hospitalaria. Muchos aspectos respecto a cómo estudiar y prevenir estas infecciones nosocomiales dentro de los hospitales aún no se han resuelto. Por ejemplo la periodicidad de la toma de muestra, la identificación de las áreas de riesgo, interpretación de los recuentos y la falta de conocimiento respecto a las especies que son potencialmente patógenas y que no se consideraban así. En algunos países se está llevando a cabo continuos monitoreos respecto a los niveles de bioseguridad ambiental, a pesar del poco conocimiento tangible que se tiene respecto a los hongos y su papel dentro de los nosocomios respecto a las infecciones oportunistas en seres humanos. (García, 2015). Los hongos tienen una enorme importancia ecológica debido a la amplia diversidad morfológica, las estrategias de vida, su capacidad de interactuar con diversos componentes bióticos y abióticos del medio ambiente (Hawksworth 1991; Peay y col., 2008). Los hongos psicrófilos y psicrotolerantes, tienen la capacidad de crecer en ambientes fríos y sitios donde hay pocos nutrientes disponibles (oligotróficos) (Connell y col., 2008) así como de producir enzimas activas en frío (Buzzini y col., 2012), pero su función ecológica es poco conocida (Buzzini y col., 2012; Dynowska y col., 2013).

Sin embargo, aún no existen estudios acerca de la microbiota de hongos psicrófilos y psicrotolerantes de los glaciares mexicanos debido a que al auge en la investigación está siendo enfocado en otras ramas/áreas de la investigación, en donde estos microorganismos tienden a estar olvidados en especial por la región en donde se encuentran. Es importante su conocimiento para poder realizar una identificación, aislamiento, así como *a posteriori* poder seguir trabajando con ellos, ya que al ser especies desconocidas en México puedan ser aprovechadas para el bien de la comunidad como alternativa de otros recursos.

2 HIPÓTESIS

Los hongos extremófilos del complejo volcánico Iztaccíhuatl tienen capacidad termotolerante, hemolítica y mecanismos de resistencia a antifúngicos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- Aislar, identificar y caracterizar el potencial de infección (la termotolerancia, la capacidad hemolítica y la resistencia a antifúngicos) de levaduras y hongos filamentosos de muestras tomadas de ambientes extremos del complejo volcánico Iztaccíhuatl.

3.2 Objetivos específicos

- Aislar, identificar y caracterizar el potencial de infección (la termotolerancia, la capacidad hemolítica y la resistencia a antifúngicos) de levaduras y hongos filamentosos de muestras tomadas de ambientes extremos del complejo volcánico Iztaccíhuatl.
- Realizar un análisis de inferencia filogenética mediante marcadores moleculares y el método bayesiano.
- Caracterizar los hongos de acuerdo a su potencial de infección: termotolerancia, capacidad hemolítica y resistencia a antifúngicos (ketoconazol e itraconazol).

4. METODOLOGÍA

4.1 Aislamiento de las levaduras y hongos filamentosos

La recolección de las muestras se hizo de dos glaciares y dos cráteres del Iztaccíhuatl (Glaciar "La Panza": N 19° 10.056' W 098° 38.327' 5065 msnm; Lago del cráter volcánico "La Panza": N 19° 10.003' W 098° 38.203' 5010 msnm; Lago del cráter volcánico "Monte de Venus": N 19° 09.810' W 098° 38.277' 4950 msnm ; Glaciar "El Pecho": N 19° 10.609' W 098° 38.475' 5200 msnm). Se tomaron muestras en los márgenes de los glaciares del "Pecho" y de la "Panza" (Sitio 1 y 4) y dos muestras de dos conos volcánicos (Sitio 2 y 3). Las muestras se recolectaron en frascos de vidrio estériles. Se utilizó un piolett estéril con alcohol al 96°, se cavó un agujero de 60 cm se llenaron los frascos *in situ* y se transportaron al laboratorio a 4°C. Se realizaron tres réplicas técnicas por cada punto de recolección. La muestra de hielo se descongelaron a 4°C y se filtraron inmediatamente usando filtros de membrana Millipore (0.45 mm). Los filtros se cortaron en pequeños pedazos usando tijeras y pinzas estériles y se colocaron los pedazos en la placa de agar Agar Dextrosa Sabouraud con cloranfenicol al 1% (SDA) para evitar el crecimiento bacteriano. También se plaquearon 200 µL del agua obtenida de las muestras y se extendieron sobre toda la placa de SDA con una varilla codada estéril. Haciendo así, un total de 4 réplicas de cada punto obtenido. Las placas de agar se incubaron a 28°C y 4°C hasta que se observaron el crecimiento de los microorganismos. Una vez sucedido esto, se procedió a realizar el aislamiento de cultivos axénicos en Agar Papa Dextrosa (PDA).

4.2 Identificación morfológica (macro y microscópica)

Se realizó una descripción de las características coloniales de los hongos creciendo en PDA, tomando en cuenta la textura, la superficie y la producción de pigmento. Para la descripción microscópica se tomó una asada del cultivo y se colocó en un portaobjetos, se le adiciono una gota de azul de algodón lactofenol (solución de lactofenol al 20 % con de azul de algodón al 10%) para la observación en el microscopio óptico de campo claro y se describió el tipo de micelio y las estructuras de reproducción asexual.

4.3 Extracción de ADN por el método de CTAB

A partir de un cultivo en medio sólido se recuperó un pedazo de la biomasa con ayuda de un asa bacteriológica. Se agregaron 10 mL de nitrógeno líquido y maceraron en un mortero estéril, hasta la obtención de un polvo fino para realizar la extracción de ADN. Se añadió 1 mL de bromuro de cetiltrimetilamonio nuclear (CTAB) al 2%, EDTA 50 mM, Tris base 200 mM, pH 8.0, NaCl 2 M y polivinil pirrolidona al 0.5%. Se mezcló para obtener una suspensión homogénea. Se dividió la suspensión en microtubos de 1.5 mL (0.5 mL en cada uno), se agregaron 2 μ L de RNAasa (10 mg/mL) y se incubaron 1 h a 65°C, la muestra se dejó hasta que alcanzó la temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionó un volumen de 500 μ L de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se mezclaron en vortex hasta formar una emulsión. Se centrifugaron a 13 000 g por 10 min a temperatura ambiente y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. Se adicionó 1/10 de volumen de CTAB al 10% (CTAB al 10% y NaCl 0.7 M) y se hicieron tres extracciones con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), conservando la fase acuosa. Se transfirió el sobrenadante a un microtubo limpio, adicionando un volumen de isopropanol y se mezcló por inversión, se mantuvieron las muestras a -20°C toda la noche. El DNA se recuperó por centrifugación a 13 000 g por 10 min a 4°C. Se lavó la pastilla con etanol al 70% dos veces y se centrifugó a 13 000 g por 10 min a 4°C, el sobrenadante se desechó y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente. Se resuspendió el DNA en 50 μ L de agua desionizada estéril. Para determinar la calidad del DNA se realizó una electroforesis en gel de agarosa.

4.4 PCR

Para amplificar el marcador molecular ITS se realizó PCR (agregando 1 μ L del ADN obtenido). En un tubo se agregó la cantidad adecuada de reactivo para el número de muestras con el que se trabajó como se indica en la cuadro 2, adicionando hasta al final los dNTPs (deoxinucleótidos), primers (cebadores, iniciadores o partidores) y la Taq polimerasa (*Thermus aquaticus* polimerasa), se homogeneizó la mezcla con vórtex. Finalmente se tomaron 24 μ L del Master Mix en cada tubo de

200 μL , se agregó 1 μL de cada muestra de hongo. Las cuales se hicieron agregando 50 μL de H_2O DEPC (Dietilpirocarbonato) en un tubo microtubo,

Para la amplificación por PCR, se utilizaron los primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para poder amplificar el fragmento ribosomal del rRNA ITS1-5.8S-ITS4 (Dyavaiah y col., 2007). El proceso se realizó en el Termociclador en el cual, se colocaron los microtubos de manera ordenada y se corrió el programa siguiendo las condiciones indicadas en el cuadro 3.

Cuadro 2. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR del fragmento ITS1-5.8S rRNA-ITS2.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN (μL)
MUESTRA	---	1
INICIADOR FW ITS1	20 μM	1
INICIADOR RV ITS4	20 μM	1
dNTP'S	0.2 mM	1
Taq polimerasa	2.5 U/ μL	0.5
MgCl_2	3 mM	3
Regulador	10 X	5
H_2O DEPC	---	12.5
VOLUMEN FINAL	---	25

Cuadro 3. Condiciones para la amplificación por PCR del fragmento ITS1-5.8S rRNA-ITS2.

CICLOS	TEMPERATURA A °C	TIEMPO
1 CICLO	95	5 min
35 CICLOS	95	1 min
	54	1 min
	72	1 min
1 CICLO	72	10 min
	4	Mantener hasta su uso

4.5 Electroforesis

Se usaron geles al 1% de agarosa diluida en TAE 1X (Tris 40 mM, ácido acético 11.42 mL/L-EDTA 2 mM). La mezcla de agarosa y TAE se calentó en un microondas hasta ver una disolución clara y sin grumos. Se dejó enfriar hasta llegar a una temperatura de aproximadamente 40°C y se vació la solución en un molde retirando todas las burbujas que pudieron afectar la porosidad del gel.

Antes de que polimerizara la solución, se colocó una plantilla en forma de peineta con el fin de formar pozos rectangulares y donde se agregaron las muestras. Una vez polimerizado el gel, se acomodó en el equipo de electroforesis (apagado) cubriéndolo con una solución de TAE 1X.

Se colocaron en los pocillos 3 µL de la muestra y 3 µL de buffer de carga con GelRed (3 µL de GelRed más 997 µL de buffer de carga: 60% glicerol, 0.05% de azul de bromofenol), se homogeneizó la muestra con ayuda de una micropipeta y se colocaron en el pocillo. Se utilizó un marcador de peso molecular para corroborar el peso molecular de las muestras. Se colocó 1 µL de 100 Kpb. Las

muestras migraron a través del gel mediante un corriente de 80 voltios y 400 miliamperios por 30 minutos. Las muestras de ADN se observaron con ayuda del transiluminador. Los productos de PCR que dieron positivo a la amplificación, se almacenaron a -20°C.

4.6 Secuenciación de Nucleótidos

Los productos de PCR que mostraron un amplicon con el peso molecular correcto para la ITS se enviaron a la empresa MACROGEN en Seúl, Corea del Sur para su secuenciación. Una vez obtenidos los resultados, las secuencias se analizaron utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con la base de datos del GenBank colectada por el NCBI (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Se obtuvieron secuencia que resultaron similares a las secuencias problema y se realizó un análisis de inferencia filogenética.

4.7 Análisis filogenético

Las secuencias se alinearon automáticamente usando CLUSTALX (Larkin, 2007), y las alineaciones se ajustaron manualmente usando SEAVIEW (Galter, 1996). Para estimar las relaciones filogenéticas sobre el fragmento ribosomal del rRNA ITS1-5.8S-ITS4 se realizó en PhyML (Guindon, 2010), un análisis para obtener el mejor modelo de sustitución nucleotídica. En Fig Tree (Andrew Rambaut, 2007) se visualizó y editó el árbol filogenético, determinando la clasificación taxonómica.

4.8 Caracterización fúngica: Termotolerancia y actividad hemolítica

Se prepararon cajas con agar sangre humana al 5% para evaluar la hemólisis de los hongos identificados. Se sembraron las muestras por estriado en las cajas, se incubaron a 37°C y 4°C por 72 horas y se observó el crecimiento de los hongos, así como presencia o ausencia de hemólisis.

4.9 Caracterización fúngica: Evaluación de la resistencia a antifúngicos (itraconazol y ketoconazol) a diferentes concentraciones

Se basó en el método de difusión en disco (M44-A “Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline”) en donde se evaluaron concentraciones de itraconazol a 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 30, 50 y 70 µg /disco y de ketoconazol 0.35, 0.5, 1, 2.5, 10, 25, 30, 50 y 70 µg/disco en agar Mueller Hinton con un suplemento de sangre humana al 5%, se prepararon las placas con 0.5 mm de grosor para poder llevar a cabo la metodología. Para recuperar y ajustar las concentraciones de células fúngicas, a las levaduras se le añadió 10 mL de un buffer fosfatos (PBS con pH: 7) en la placa de agar haciendo un raspado del agar con una varilla codada de vidrio estéril y recuperando la solución en un tubo de 10 mL. Se hicieron diluciones 1:10, 1:100, 1:1000 para cuantificar las células existentes en la solución recuperada. Se calculó la concentración de células por mililitro para así poder poner una concentración de 1×10^6 300 µl sobre la placa de agar, dejando secar y después colocar los discos y los antifúngicos a diferentes concentraciones e incubar a una temperatura de 37°C y 4°C por 48 hrs o hasta observar crecimiento de los microorganismos.

Cuadro. 4 Medio usado y concentraciones de antifúngico empleados.

MEDIO (AGAR) Y CONCENTRACIÓN DE LOS ANTIFÚNGICOS			
Agar papa dextrosa (37°C)		Mueller Hinton con 5% Sangre (4°C)	
Ketoconazol (µg/disco)	Itraconazol (µg/disco)	Ketoconazol (µg/disco)	Itraconazol (µg/disco)
0.5	0.1	0.35	0.1
1	0.5	0.5	0.5
2.5	1	1	1
10	5	2.5	5
25	10	10	10
		25	30
		30	50
		50	70

5. Resultados y discusión

5.1 Aislamiento de hongos psicotolerantes del Iztaccíhuatl

Existe una gran diversidad de microorganismos fúngicos que logran desarrollarse en el Iztaccíhuatl a pesar de ser un ambiente extremo. Las muestras recolectadas de los diferentes puntos del glaciar y lagos se lograron aislar un total de 91 hongos en total.

En la figura 5 se puede observar la relación de los hongos que se pudieron aislar de las muestras recolectadas en los diferentes puntos del volcán Iztaccíhuatl, de las cuales 39 muestras se pudieron identificar mediante inferencia filogenética quedando 52 muestras de hongos sin ser identificadas. Esto debido a que no en todos los hongos se pudo llevar a cabo la PCR ya que se inhibe la ADN polimerasa debido a los pigmentos que presentan los hongos. Cabe resaltar que las muestras del Lago del cráter volcánico "La Panza" son las que se lograron identificar en su gran mayoría con un total de 17 hongos identificados (Fig 5).

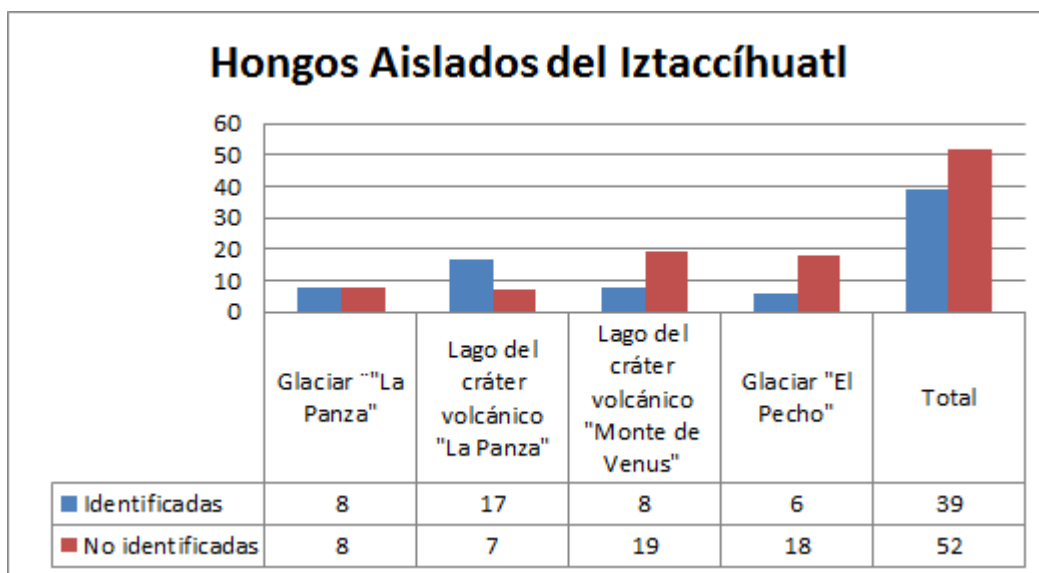


Figura 5. Total de hongos aislados del Iztaccíhuatl que lograron ser identificados y no identificados en los puntos de recolección de las muestras.

Por el contrario las muestras que se pudieron aislar del Glaciar "La Panza" y "El Pecho" son en menor porcentaje que los hongos aislados de los conos volcánicos. Según Investigadores del Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medio Ambiente (INIBIOMA, CONICET-Comahue) en el hielo existen microcanales por donde el agua líquida fluye a temperaturas de dos o tres grados bajo cero, este estado se conoce como supercongelado y es en ese ambiente donde viven estas levaduras. Además se dice que el hielo las preserva y pueden vivir mucho más que aquellas que se hallan en ambientes cálidos.

Por lo que se podría decir que al descongelarse estos glaciares lleva consigo además de estos hongos otros componentes que pueden ser de ayuda o influyen en el crecimiento y desarrollo de los mismos, sin embargo en este trabajo, no se evaluaron las características del agua y hielo de donde se recolectaron las muestras. Además, que no es de un solo lugar de donde llega esta agua, hablando de los conos volcánicos específicamente, donde toda el agua del descongelamiento del glaciar desemboca y se queda de cierta forma "estancada" y quizá por tal motivo se logró aislar un mayor número de hongos que en el glaciar como tal.

5.2 Identificación de los hongos aislados del Iztaccíhuatl

5.2.1 Identificación genotípica: PCR

En las figuras 6 y 7 se observan ejemplos de los geles de electroforesis realizados después de la extracción de DNA y la amplificación por PCR, las muestras de las cuales no resultó efectiva la extracción se volvió a realizar para de esta manera asegurarse de tener una muestra adecuada y mandar a secuenciar.

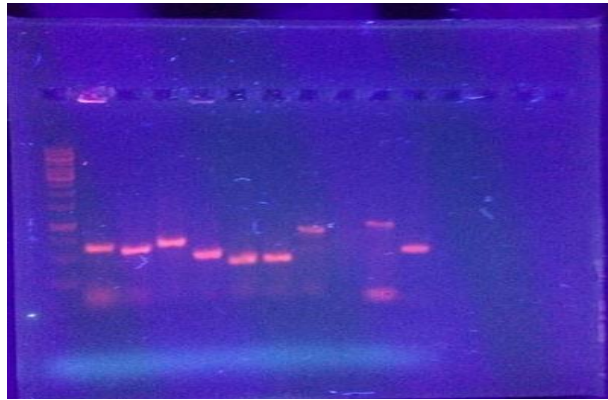


Figura 6. Electroforesis del DNA extraído después de su amplificación por PCR del fragmento ribosomal del rRNA ITS1-5.8S-ITS4. De izquierda a derecha se muestra el marcador de 100 Kpb, R22, R30, R7, R13, R10, R2, R8, R18, R12, R4.

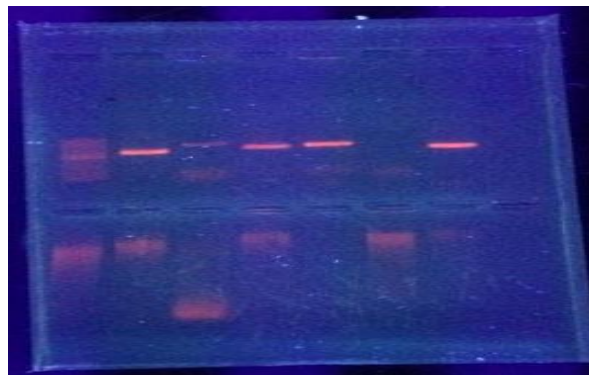


Figura 7: Electroforesis del DNA extraído después de su amplificación por PCR del fragmento ribosomal del rRNA ITS1-5.8S-ITS4. De izquierda a derecha se muestra el marcador de 100 Kpb, R14, R16, R23, R11, R24, R3.

5.2.2 Identificación genotípica: Inferencia filogenética

La filogenia es el estudio de las relaciones evolutivas. Un análisis filogenético no sólo nos indica las relaciones evolutivas entre las secuencias o especies, las cuales descienden de ancestros comunes, también puede indicarnos cuales son las distancias entre ellas. Los métodos de reconstrucción filogenética más habituales asumen que todas las secuencias o especies provienen a partir de un ancestro común mediante divergencias evolutivas (Bioinformatics at Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana, COMAV; 2018).

Cuadro 5. Comparación de los resultados de BLAST y filogenia de las muestras aisladas del Iztaccíhuatl.

Cont...

Sitio de aislamiento	Strain	Gen Bank	Código	BLAST*	Bayesiano
Sitio 1: Glaciar "La Panza" N 19° 10.003' W 098° 38.203' 5010 msnm	IOM 325337	MK045395	R15	<i>Rhodotorula</i>	<i>Rhodotorula</i> sp.
	IOM 325340	MK045398	R19	<i>Mrakiella</i>	<i>Mrakiella aquatica</i>
	IOM 325342	MK045400	R21	<i>Rhodotorula</i>	<i>Microbotryomycetes</i> sp.
	IOM 325346	MK045404	R25	<i>Epicoccum</i>	<i>Epicoccum</i> sp.
	IOM 325347	MK045405	R26	<i>Cladosporium</i>	<i>Cladosporium delicatulum</i>
	IOM 325348	MK045406	R27	<i>Leucosporidium</i>	<i>Fungi</i> sp.
	IOM 325349	MK045407	R28	<i>Asterophora</i>	<i>Fungi</i> sp.
	IOM 325350	MK045408	R29	<i>Aureobasidium</i>	<i>Aureobasidium</i> sp
	IOM 325326	MK045384	R2	<i>Mrakia</i>	<i>Mrakia frigida</i>
Sitio 2: Lago del cráter volcánico "La Panza" N 19° 10.056' W 098° 38.327' 5065 msnm	IOM 325327	MK045385	R3	<i>Naganishia</i>	<i>Naganishia</i> sp.
	IOM 325328	MK045386	R4	<i>Cryptococcus</i>	<i>Cryptococcus statzelliae</i>
	IOM 325338	MK045396	R16	<i>Goffeauzyma</i>	<i>Tremellomycetes</i> sp.
	IOM 325339	MK045397	R18	<i>Protomyces</i>	<i>Protomyces inouyei</i>
	IOM 325331	MK045389	R7	<i>Rhodotorula</i>	<i>Microbotryomycetes</i> sp.
	IOM 325332	MK045390	R8	<i>Thelebolus</i> sp.	<i>Ascomycota</i> sp.
	IOM 325333	MK045391	R10	<i>Goffeauzyma</i>	<i>Basidiomycota</i> sp.
	IOM 325334	MK045392	R11	<i>Mrakia</i>	<i>Mrakia frigida</i>
	IOM 325335	MK045393	R12	<i>Cystofilobasidium</i>	<i>Cystofilobasidium</i> sp.
	IOM 325336	MK045394	R13	<i>Holtermanniella</i>	<i>Holtermanniella takashimae</i>
	IOM 325343	MK045401	R22	<i>Leucosporidium</i>	<i>Leucosporidium drummi</i>
	IOM 325344	MK045402	R23	<i>Leucosporidium</i>	<i>Leucosporidium</i> sp.
	IOM 325345	MK045403	R24	<i>Naganishia</i>	<i>Naganishia liquefaciens</i>
	IOM 325351	MK045409	R30	<i>Goffeauzyma</i>	<i>Tremellomycetes</i> sp.
	IOM 325354	MK045412	R33	<i>Phenoliferia</i>	<i>Basidiomycota</i> sp.
IOM 325363	MK045421	R14	<i>Cystofilobasidium</i>	<i>Cystofilobasidium</i> sp.	

Sitio 3: Lago del cráter volcánico "Monte de Venus" N 19° 09.810' W 098° 38.277' 4950 msnm	IOM 325352	MK045410	R31	<i>Phenoliferia</i>	<i>Basidiomycota</i> sp.
	IOM 325341	MK045399	R20	<i>Phenoliferia</i>	<i>Basidiomycota</i> sp.
	IOM 325329	MK045387	R5	<i>Phaffia</i>	<i>Tremellomycetes</i> sp.
	IOM 325330	MK045388	R6	<i>Candida</i>	<i>Candida</i> sp.
	IOM 325358	MK045416	R39	<i>Naganishia</i>	<i>Naganishia friedmanni</i>
	IOM 325359	MK045417	R40	<i>Cladosporium</i>	<i>Cladosporium delicatulum</i>
	IOM 325360	MK045418	R41	<i>Phenoliferia</i>	<i>Basidiomycota</i> sp.
Sitio 4: Glaciar "El Pecho" N 19° 10.609' W 098° 38.475' 5200msnm	IOM 325361	MK045419	R42	<i>Naganishia</i>	<i>Naganishia</i> sp.
	IOM 325362	MK045420	R43	<i>Phaffia</i>	<i>Tremellomycetes</i> sp.
	IOM 325353	MK045411	R32	<i>Phenoliferia</i>	<i>Basidiomycota</i> sp.
	IOM 325364	MK045422	R37	<i>Mrakia</i>	<i>Mrakia frigida</i>
	IOM 325355	MK045413	R34	<i>Mrakia</i>	<i>Mrakia frigida</i>
	IOM 325356	MK045414	R36	<i>Tausonia</i> sp.	<i>Guehomyces</i> sp.
	IOM 325357	MK045415	R38	<i>Ampelomyces</i>	<i>Epicoccum</i> sp.

Simbología: * Basado en el % de identidad de acuerdo al análisis de BLAST del Gen Bank al de inferencia filogenética mediante el método bayesiano.

Debido a la gran importancia genética que reflejan las secuencias, los métodos de filogenia deben ser cuidadosamente elegidos para hacer análisis correcto de la información genética y generar hipótesis evolutivas confiables. Existen muchos métodos de construcción de árboles. Pueden ser clasificados en distintas categorías según se basen en:

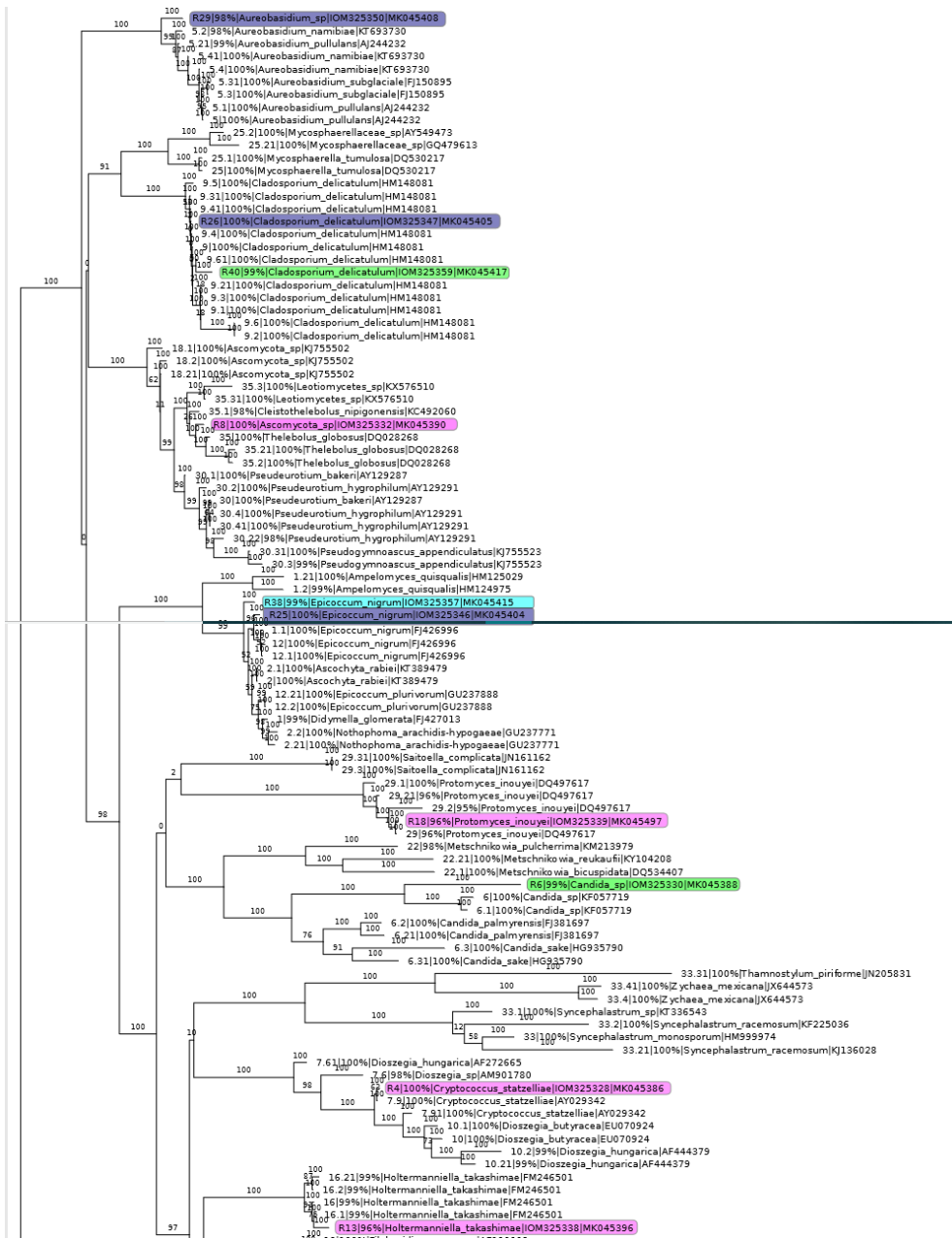
- distancias.
- parsimonia.
- máxima verosimilitud.
- bayesianos.

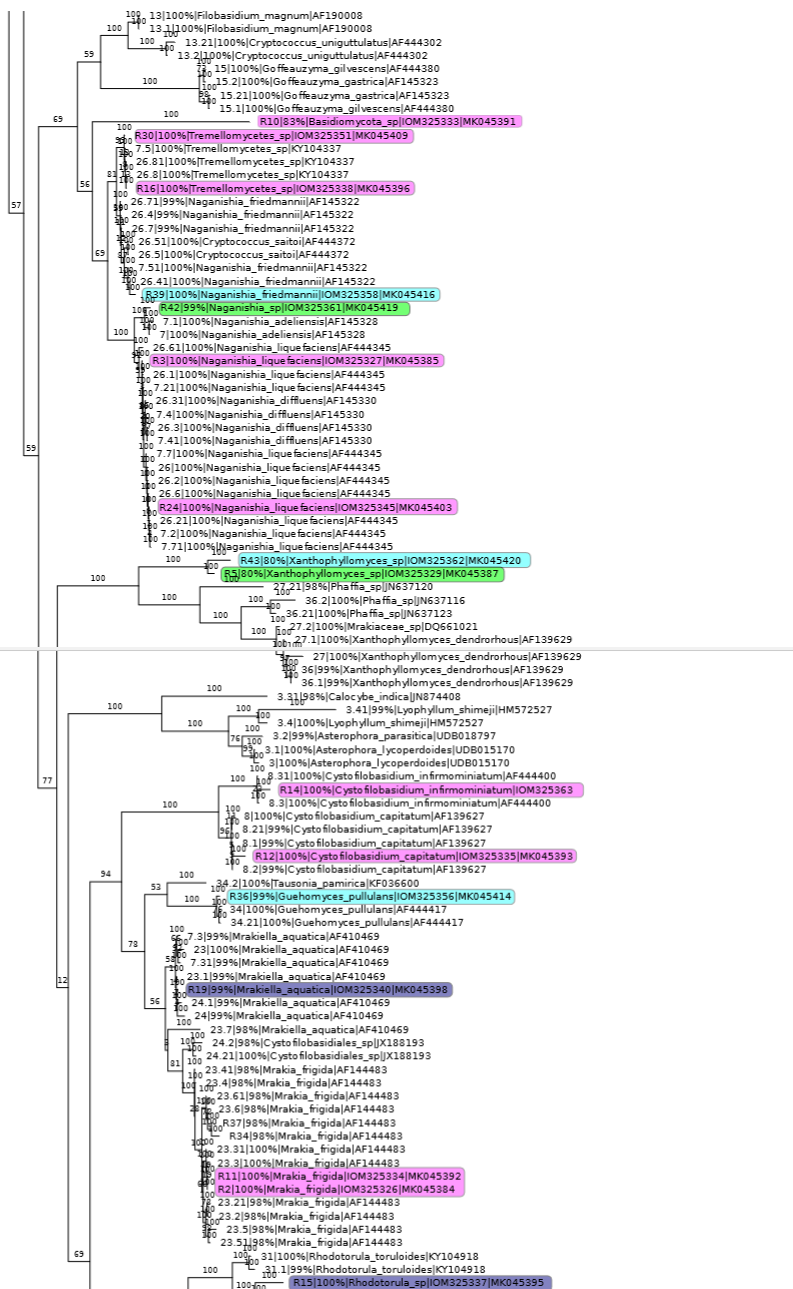
La inferencia bayesiana calcula una probabilidad *a posteriori* para cada árbol posible dado un modelo de evolución y unas observaciones. Es decir, a partir de observaciones la inferencia bayesiana genera las probabilidades de las relaciones evolutivas representadas en los árboles filogenéticos (Bioinformatics at Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana, COMAV; 2018).

Los árboles filogenéticos, son representaciones en forma de diagrama donde a partir de un análisis cuidadoso es posible establecer cuantitativamente el parecido entre dos o más secuencias cuyo resultado al final puede ser expresado en porcentaje de identidad o similitud entre los organismos del estudio. Con esto logramos esclarecer que tan cercana es la relación evolutiva entre las especies y así poder categorizar y nombrar a las especies (Bioinformatics at Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana, COMAV; 2018).

En la Figura 8, se muestra el árbol filogenético que relaciona las cepas aisladas de Iztaccíhuatl a las cuales se les amplificó el fragmento ribosomal del rRNA ITS1-5.8S-ITS4 junto con las secuencias de referencia obtenidas del Gen Bank. Respecto a la amplificación de la región ITS del rRNA, se observó una diversidad de pesos moleculares en los fragmentos de los hongos aislados, esto se debe a un alto grado de cambios de los nucleótidos que existen entre organismos. Esto se debe a los cambios en los nucleótidos puntuales, en los genes ribosomales, generados por un cambio genético azaroso o por la divergencia evolutiva entre las especies que conforman en dendograma (Tavares, 2004).

Como se observa en el cuadro 4, los resultados de la base de datos (BLAST) y el árbol nos arrojan datos diferentes, en algunos casos no se especifica la especie a la cual pertenecen las cepas aisladas. Para esto, se comparó el porcentaje de identidad, según las secuencias ya reportadas en el GenBank y el filograma creado a partir de secuencias de DNA de mismos géneros o familias al cual puede pertenecer nuestro aislado. Los resultados diferentes nos indican una falta de información, al usar solo una pequeña porción del ADN ribosomal así como una alta diversidad fúngica existente y de la cual se tiene muy poca información, siendo poco representativo para la distribución de la población.





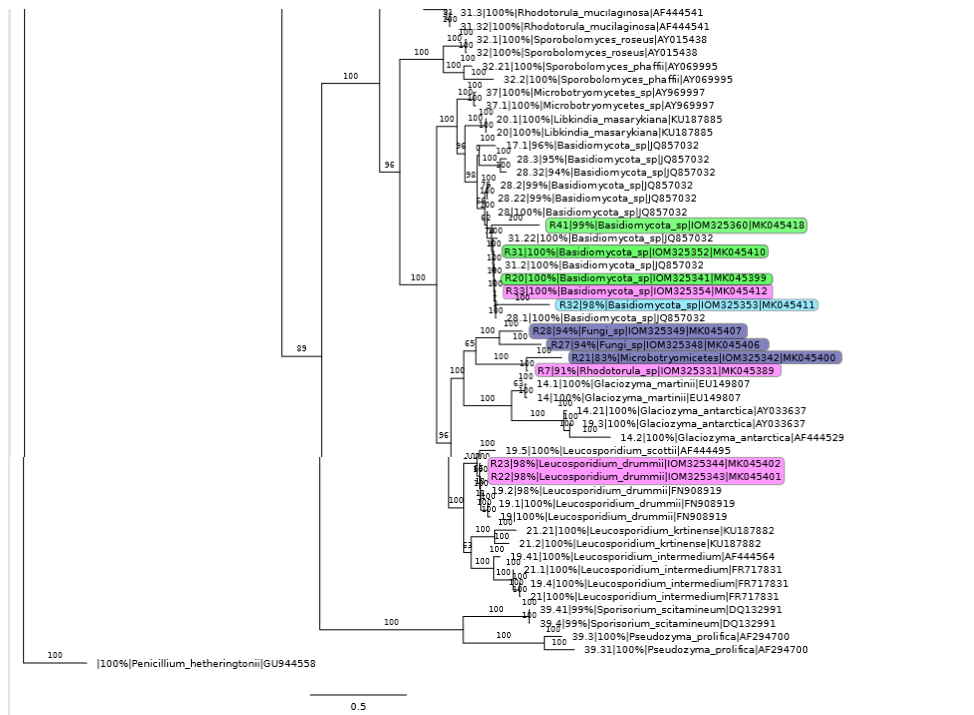


Figura 8. Árbol filogenético de hongos y levaduras de muestras de hielo recolectadas en glaciar y lago del Complejo Volcánico Iztaccíhuatl, en base a ITS de rDNA. Las secuencias del gen rRNA ITS del Complejo Volcánico Iztaccíhuatl y el emparejamiento de los hongos más cercanos se usaron para la construcción del árbol filogenético, utilizando *Penicillium hetheringtonii* [GU944558] como grupo para el enraizamiento de los árboles. En donde cada color representa un sitio de aislamiento (Morado: Glaciar “La Panza”; Rosa: Lago de cráter “La Panza”; Verde: Lago de cráter “Monte de Venus”; Verde aqua: Glacial “El Pecho”.

Del total de los hongos aislados y cultivados se pudieron identificar 39, los cuales se agrupan en los siguientes grupos taxonómicos: *Aureobasidium* (3%), *Candida* (3%), *Cryptococcus* (3%), *Cystofilobasidium* (5%), *Cladosporium* (5%), *Holtermanniella* (3%), *Mrakia* (13%), *Naganishia* (10%), *Protomyces* (3%), *Rhodotorula* (3%), *Basidiomycota* (10%), *Tremellomycetes* (15%), *Microbotryomycetes* (5%), *Leucosporidiaceae* (5%), *Ascomycota* (3%), *Epicoccum* (5%), *Fungi* (5%) y *Guehomyces* (3%) (Fig 9).

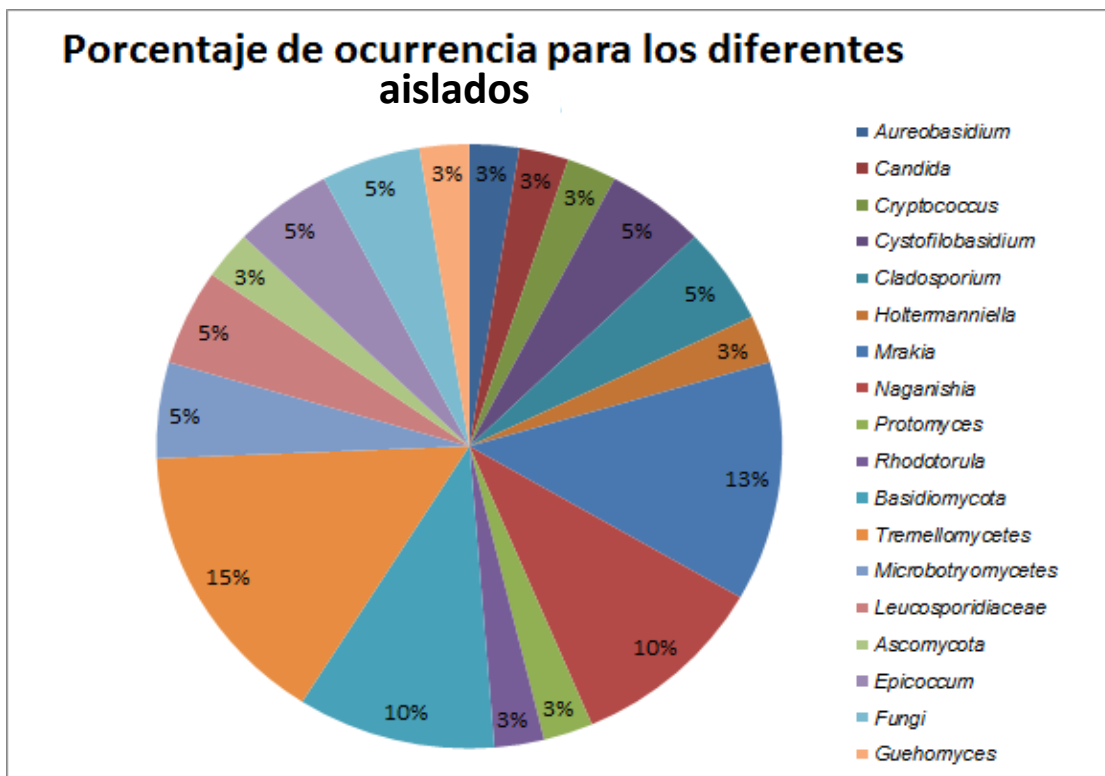


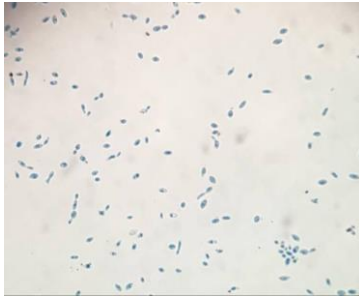
Figura 9. Porcentaje de incidencia de los aislados del volcán Iztaccíhuatl. *Aureobasidium* (3%), *Candida* (3%), *Cryptococcus* (3%), *Cystofilobasidium* (5%), *Cladosporium* (5%), *Holtermanniella* (3%), *Mrakia* (13%), *Naganishia* (10%), *Protomyces* (3%), *Rhodotorula* (3%), *Basidiomycota* (10%), *Tremellomycetes* (15%), *Microbotryomycetes* (5%), *Leucosporidiaceae* (5%), *Ascomycota* (3%), *Epicoccum* (5%), *Fungi* (5%) y *Guehomyces* (3%), según el análisis de inferencia filogenética realizado.

5.2.3 Caracterización fenotípica de los hongos identificados del Iztaccíhuatl

En la figura 10 se pueden observar las características fenotípicas macroscópicas y microscópica de cada hongo que fue identificado. Algunos muestran características muy particulares de su género, como el caso de *Rhodotorula* (aislado R15, *Rhodotorula* sp.). El género *Rhodotorula* es un grupo de levaduras pigmentadas, muy variadas en color, siendo de color crema a naranja, rojo, rosa o amarillo, *Rhodotorula* es la forma anamorfa de *Rhodosporidium* y su color naranja se debe a que posee carotenoides. En especial la *Rhodotorula mucilaginosa* se ha asociado con infecciones humanas, estos microorganismos son capaces de adaptarse al frío

R2: *Mrakia frigida*

Células ovals, se observan algunas en gemación, teñidas con azul de algodón y el núcleo más colorido.

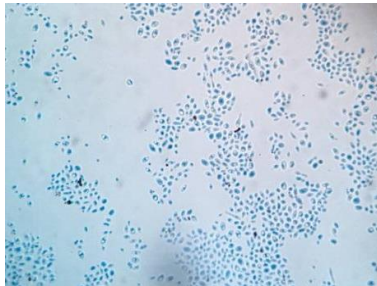


Levadura de color blanquecino; consistencia cremosa; superficie convexa lisa.



R3: *Naganishia sp.*

Células ovals y algunas en gemación, y muestran núcleo más colorido.

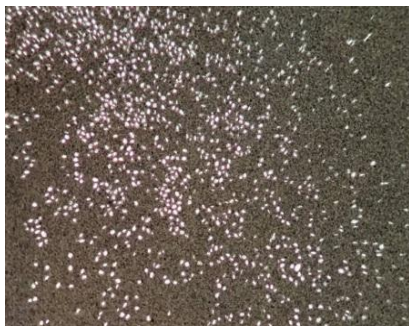


Colonia color crema; consistencia cremosa; superficie convexa lisa.





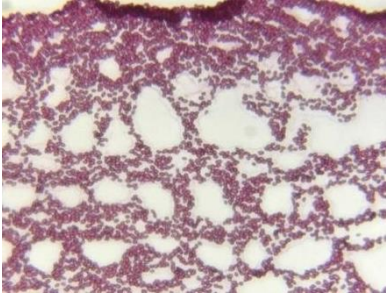

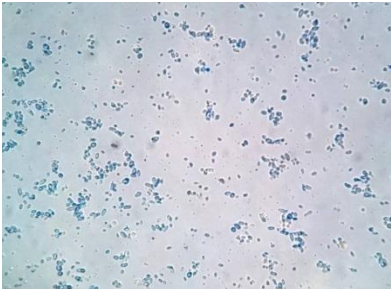

R4: *Cryptococcus statzelliae*

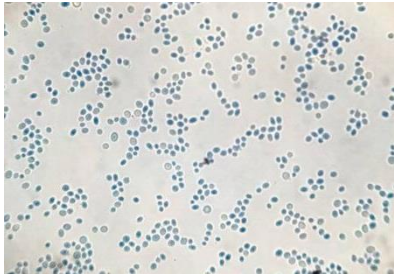
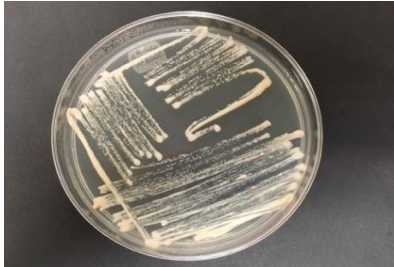
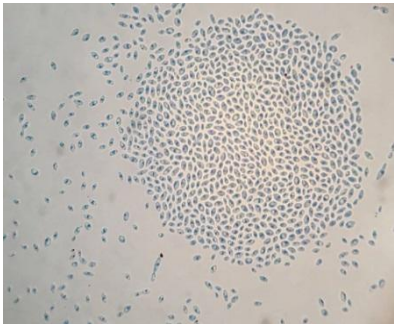

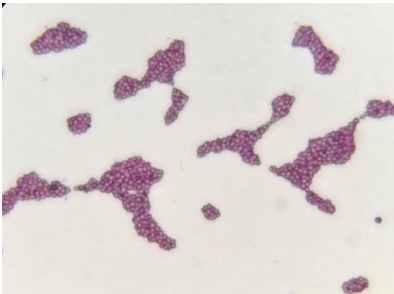

Blastoconidias redondeadas u ovaladas, pared gruesa y refringente, con un halo capsular, teñida con tinta china.



Levadura color naranja, consistencia cremosa, colonia de superficie convexa lisa.

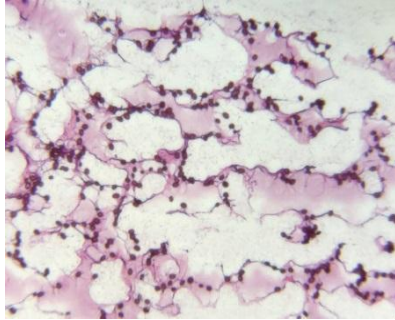


R5: <i>Tremellomyces</i> sp.	
<p>Células circulares, núcleo más pigmentado</p> 	<p>Levadura color blanquecino; consistencia lechosa; colonia pequeña y convexa; bordes regulares.</p> 
R6: <i>Candida</i> sp.	
<p>Células ovales, teñidas con gram.</p> 	<p>Levadura de color blanquecino, consistencia cremosa, colonia convexa y pequeña, bordes regulares.</p> 
R8: <i>Ascomycota</i> sp.	
<p>Células ovales y algunas en gemación, con el núcleo más colorido.</p> 	<p>Levadura color naranja, consistencia áspera, bordes irregulares, se observan filamentos alrededor de la colonia, superficie convexa.</p> 

R10: <i>Basidiomycota</i> sp.	
<p>Células en su mayoría ovales con el núcleo más colorido.</p> 	<p>Colonia de color rosado claro; convexa con centro más elevado; consistencia cremosa; bordes regulares.</p> 
R11: <i>Mrakia frígida</i>	
<p>Células ovales, núcleo más colorido.</p> 	<p>Levadura color blanquecino; consistencia cremosa; colonia convexa</p> 
R12: <i>Cystofilobasidium</i> sp.	
<p>Células circulares, en racimos, teñidas con gram.</p> 	<p>Levadura de color rosado, consistencia lechosa, no se observan colonias.</p> 

R14: *Cystofilobasidium* sp.

Células circulares, teñidas con gram, se observa el mucilageno teñido de rosa más claro.

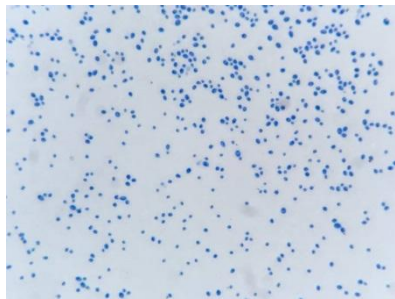


Levadura de color rosado, consistencia lechosa, no se observan colonias.



R15: *Rhodotorula* sp.

Células redondas, se observa el núcleo más pigmentado.

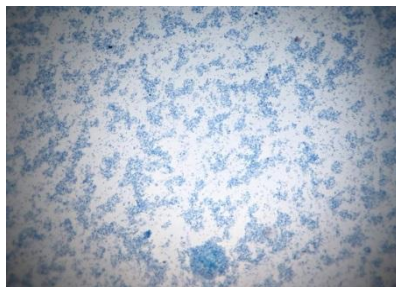


Colonia color melón; consistencia lechosa, elevación convexa, bordes irregulares.



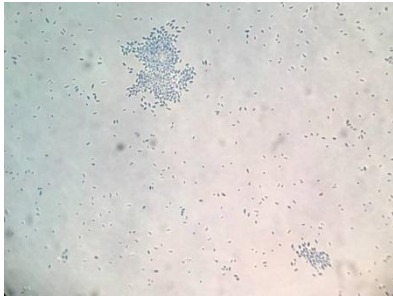

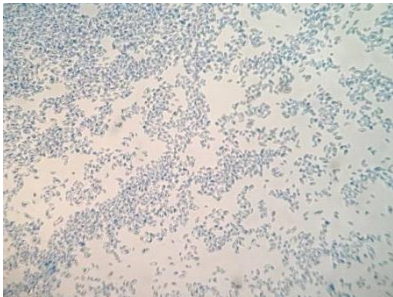



R16: *Tremellomycetes* sp.



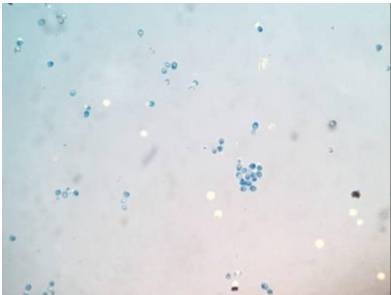

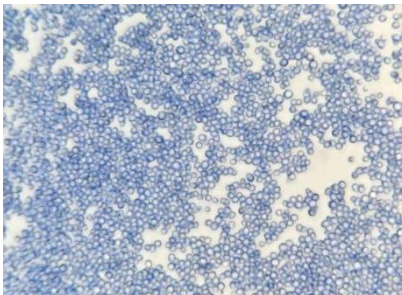

Células circulares teñidas con azul de algodón y el núcleo más pigmentado.



Levadura de lento crecimiento, color naranja claro, consistencia cremosa.



R18: <i>Protomyces inouyei</i>	
<p>Células en forma oval, (y otros sin teñir), con el núcleo más pigmentado.</p> 	<p>Levadura color rosado claro; consistencia cremosa; la colonia es de superficie convexa y lisa.</p> 
R19: <i>Mrakiella aquatica</i>	
<p>Células ovales, núcleo más pigmentado.</p> 	<p>Levadura de color blanquecino; colonia pequeña y convexa; bordes regulares; consistencia cremosa.</p> 
R20: <i>Basidiomycota</i> sp.	
<p>Células ovales</p> 	<p>Levadura de color blanquecino; consistencia cremosa.</p> 

<p align="center">R21: <i>Microbotrymicetes</i> sp.</p>	
<p>Células circulares y cilíndricas, teñidas con azul de algodón.</p> 	<p>Colonia pequeña rosado claro; consistencia lechosa; superficie convexa; bordes regulares.</p> 
<p align="center">R22: <i>Leucosporidium drummi</i></p>	
<p>Células circulares, algunas se observan en gemación, núcleo más colorido.</p> 	<p>Levadura color blanquecino, consistencia lechosa, no se observan colonias.</p> 
<p align="center">R23: <i>Leucosporidium</i> sp.</p>	
<p>Células circulares y con el núcleo más teñido.</p> 	<p>Levadura de color blanquecino, consistencia cremosa, colonia pequeña y de superficie convexa.</p> 

R24: *Naganishia liquefaciens*

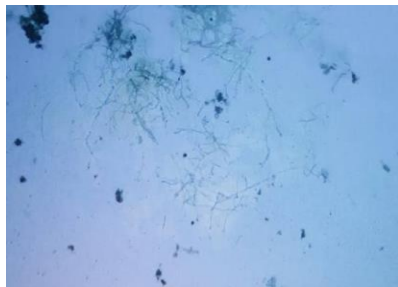
Blastoconidias grandes redondeadas, pared gruesa y refringentes, con un halo capsular, teñidas con tinta china.



Levadura color blanquecino, consistencia cremosa, colonia de superficie convexa y lisa.

**R25: *Epicoccum* sp.**

Se observan hifas septadas, los conidios suelen estar presentes en masas densas de los grupos de conidióforos.



Presentó textura pulverulenta, micelio superficial, de color naranja-rojizo a ambos lados del cultivo, no produjo halos ni exudados, pero si produjo un pigmento difusible al final de color amarillo.

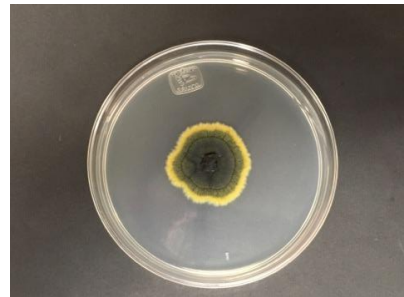


R26: *Cladosporium* sp.

Se observan hifas segmentadas

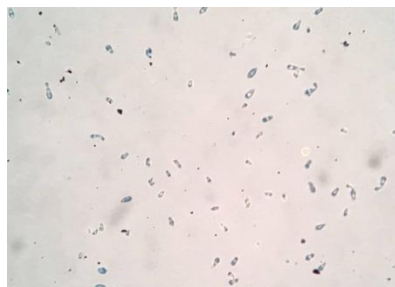


Presentó textura pulverulenta, micelio superficial, de color verde oscuro a ambos lados del cultivo, no produjo halos ni exudados, pero si produjo un pigmento difusible en el medio de color amarillo.



R27: *Fungi* sp.

Células ovals, teñidas con azul de algodón, se observan dos núcleos más coloridos.



Levadura de color rosado claro, consistencia cremosa, colonia pequeña de superficie convexa, bordes regulares.



<p align="center">R29: <i>Aureobasidium sp.</i></p>	
<p>Células biesporuladas, de forma ovalada y color verde, dispuestas a manera de cadena, lo cual concuerda con la descripción de Webster & Weber (2007).</p> 	<p>Colonia de forma circular, borde rizoide (se observan filamentos), elevación convexa, por delante su color es verde oscuro, por atrás negro, consistencia seca (dura).</p> 
<p align="center">R30: <i>Tremellomycetes sp.</i></p>	
<p>Se observan células ovaladas y circulares, con el núcleo más pigmentado.</p> 	<p align="center">Sin imagen</p>
<p align="center">R31: <i>Basidiomycota sp.</i></p>	
<p>Células ovals, núcleo más pigmentado.</p> 	<p>Levadura de color blanquecino; consistencia cremosa; colonia convexa.</p> 

<p align="center">R32: <i>Basidiomycota</i> sp.</p>	
<p>Células en forma circular en su mayoría y con el núcleo más pigmentado.</p> 	<p>Levadura de color blanquecino; consistencia lechosa; se observan filamentos alrededor.</p> 
<p align="center">R33: <i>Basidiomycota</i> sp.</p>	
<p>Células circulares muy pequeñas con el núcleo más teñido.</p> 	<p>Levadura de color crema; consistencia cremosa; colonia convexa con bordes regulares; se observan filamentos alrededor.</p> 
<p align="center">R34: <i>Mrakia frígida</i></p>	
<p>Células muy pequeñas y circulares, mínimamente teñidas de azul de algodón.</p> 	<p>Levadura de color blanquecino; consistencia lechosa; se observan filamentos alrededor.</p> 

R36: *Guehomyces* sp.

Células ovals pequeñas, en algunas se observa el núcleo más colorido.

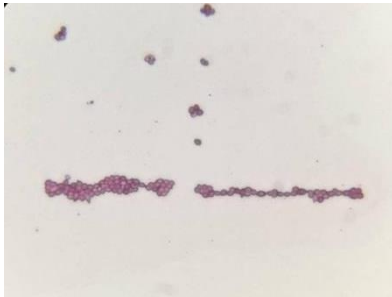


Colonia pequeña color blanquecino; consistencia cremosa; superficie convexa y bordes irregulares.

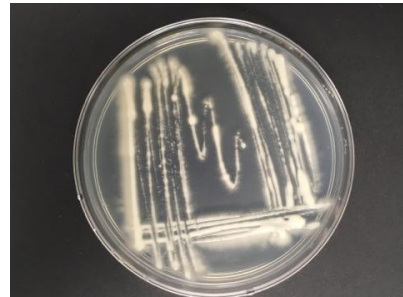


R37: *Mrakia frígida*

Células circulares, en racimos, teñidas con gram.

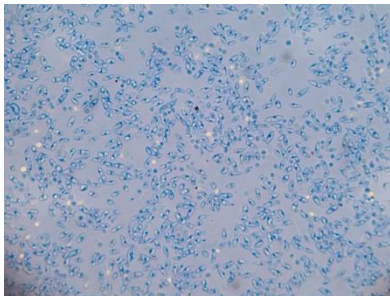


Levadura de color amarillo-blanquecino, consistencia cremosa; se observan filamentos alrededor.



R38: *Epicoccum* sp.

Células ovals, núcleo más colorido.

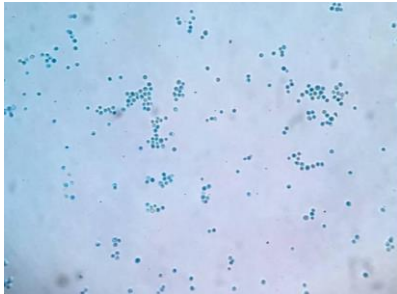


Levadura de color crema; consistencia cremosa; colonia convexa; bordes regulares.



R39: *Naganishia friedmanni*

Células circulares, teñidas con azul de algodón.



Colonia color blanquecina, superficie convexa, consistencia cremosa.

**R40: *Cladosporium delicatulum***

Se observan hifas segmentadas teñidas.



Presentó textura pulverulenta, micelio superficial, de color verde seco a ambos lados del cultivo, no produjo halos ni exudados, pero si produjo un pigmento difusible en el medio de color amarillento.



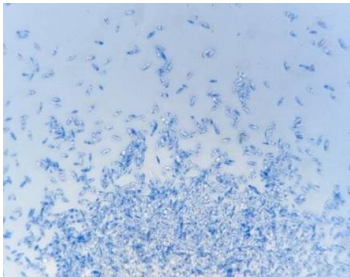



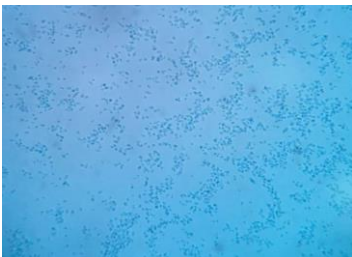

R41: <i>Basidiomycota</i> sp.	
<p>Se observan células ovales, en algunas se muestra el núcleo más pigmentado</p> 	<p>Levadura blanca, consistencia cremosa.</p> 
R42: <i>Naganishia</i> sp.	
<p>Células circulares, núcleo más colorido, algunas en gemación.</p> 	<p>Levadura de color amarillento, consistencia cremosa, colonia con bordes regulares, superficie convexa lisa.</p> 
R43: <i>Tremellomycetes</i> sp.	
<p>Células circulares y ovales, núcleo más colorido</p> 	<p>Levadura de color amarillo, consistencia cremosa</p> 

Figura 10. Descripción macro y microscópica de los hongos identificados del Iztaccíhuatl. Tinción Gram (R6, R12, R14 y R37) azul de algodón (R2, R3, R5, R8, R10, R11, R15, R16, R18, R19, R20, R21, R22, R23, R25, R26, R27, R29, R30, R31, R32, R33, R34, R36, R38, R39, R40, R41, R42 y R43) y tinta china (R4 y R24). Vista en el microscopio 400X. Crecimiento de los hongos en agar PDA. Imágenes 400X.

debido a que sintetizan enzimas con modificaciones bioquímicas que les permiten funcionar a bajas temperaturas, así como moléculas que reducen el punto de congelación del agua dentro de la célula. (Libkind et al., 2004). Los *Cryptococcus* sp. (R4, *C. statzelliae*), son levaduras redondas (4-6 µm de diámetro), en ocasiones ovaladas y excepcionalmente formadoras de pseudomicelio. Tanto las levaduras “madre”, como los blastoconidios se caracterizan por la presencia de cápsula.

La distribución mundial de *Cryptococcus* se da debido a la tolerancia a la temperatura extrema y la capacidad de utilizar los nutrientes de ambientes hostiles, sin embargo actualmente con el calentamiento global que se está viviendo y el derretimiento de los glaciares, se abre la posibilidad de adaptación de estos microorganismos a las condiciones actuales y que con ello causen infecciones a los seres humanos (Libkind et al., 2004).

El aislado R24 podría ser una *Naganishia liquefaciens* según su análisis filogenético, sin embargo, en el BLAST resultó que podría tratarse de una *Naganishia* sp. o un *Cryptococcus* sp., en el cual queda la incógnita de lo que podría ser en realidad. Si se compara las tinciones en fresco que se hicieron para este microorganismo (tinta china y azul de algodón) se puede observar la presencia de un capsula ya que con azul de algodón las levaduras quedaban sin teñir y con la tinta chinas, se observa el halo capsular, característico del género *Cryptococcus*.

Algunos otros aislados se quedaron hasta nivel de orden, clase y familia fueron: R5 *Tremellomycetes* sp., R7 *Microbotryomycetes* sp., R8 *Ascomycota* sp., R10 *Basidiomycota* sp., R16 *Tremellomycetes* sp., R20 *Basidiomycota* sp., R21 *Microbotryomycetes* sp., R27 *Fungi* sp., R28 *Fungi* sp., R30 *Tremellomycetes* sp., R31 *Basidiomycota* sp., R32 *Basidiomycota* sp., R33 *Basidiomycota* sp., R41 *Basidiomycota* sp., R43 *Tremellomycetes* sp. Todos estos aislados presentaron diferentes características entre las mismas familias u orden al cual pertenecen y por tales motivos no se pudo realizar su identificación a nivel de especie.

En general las levaduras presentaron formas circulares u ovales, algunas en gemación y dependiendo del tipo de tinción (azul de algodón, tinta china o gram) se pudieron observar los núcleos más teñidos. A nivel macroscópico resultaron con una gran variedad de pigmentos en las levaduras desde blanco, beige, amarillo, rosa, hasta el anaranjado. En algunas colonias de levaduras se observaron hifas alrededor de las colonias (dimorfismo). Las levaduras presentaron distinta consistencia, cremosa o lechosa. Los hongos filamentosos por su parte, presentaron características representativas de su género. Por ejemplo R26 y R40 pertenecientes al género de *Cladosporium* sp.

Actualmente se han descrito varias especies nuevas aisladas de estos ambientes fríos como la *Mrakia robertii*, *Mrakia blollopis*, *Mrakiella niccombsii* (Thomas Hall y col., 2010), *Wickerhamomyces patagonicus* (de Garcia y col., 2010), *Rhodotorula arctica* (Vishniac y Takashima 2010), así como *Dioszegia antarctica* y *Dioszegia cryoxerica* (Connell y col., 2010). Con esto se abre la posibilidad de que muchos de los hongos aislados e identificados en este proyecto sean nuevas especies para la ciencia. Sin embargo es necesario realizar análisis filogenéticos más detallados para poder caracterizar nuevas especies de hongos.

5.3 Caracterización de los hongos psicrotolerantes: Termotolerancia y actividad hemolítica

Los resultados de la termotolerancia mostraron que de los 39 aislados todos pudieron crecer a 37°C menos R7 *Fungi* sp. y R28 *Microbotryomycetes* sp. Sin embargo, debido a la adaptación a la temperatura de 37°C y diferentes nutrientes en el medio de cultivo, a algunas les llevo 2 semanas para que se observará un crecimiento visible. Algunas levaduras presentaron una morfología diferente a la que se reporta en la cuadro 5 debido a las condiciones y estrés a las que se les está sometiendo a estos microorganismos.

De los hongos aislados del Iztaccíhuatl, 21 presentaron actividad hemolítica, entre ellos 18 levaduras presentaron hemólisis, 2 fueron hemólisis parciales (alfa-

hemólisis) y los demás totales (beta- hemólisis). En cuanto a los hongos filamentosos 3 presentaron hemólisis total (beta hemólisis). Los resultados respecto al crecimiento, se esperaban a las 72 hrs como máximo (Cuadro 6). Una característica de estas levaduras fue que el crecimiento en agar sangre, hacía que se desprendiera un olor dulce demasiado fuerte, en especial a las que producían hemólisis, debido a que al estarse formando está tiende a expresar otros genes, así como metabolitos secundarios, que se encuentran compuestos orgánicos volátiles a los cuales se les atribuye un papel determinante en la comunicación entre los microorganismos. En algunos hongos tienden a ser compuestos aromáticos, los cuales se ha demostrado que están involucrados en una interacción interespecie (*quorum sensing*) Estos mecanismos de comunicación entre especie pueden servir para dar una señal de alerta o repeler a algún otro microorganismo (Sinuco, 2017).

Las levaduras, en medio agar sangre, presentaron un crecimiento lento y en la cual se observaron los cambios en la morfología debido a los diferentes nutrientes que obtenían del medio y temperatura de 37°C totalmente diferente a las de su crecimiento habitual.

En la cuadro 6 se muestra la hemólisis de los hongos filamentosos (R26 *Cladosporium delicatum*, R25 *Epicoccum* sp. y R40 *Cladosporium delicatum*) en el cual se observa claramente que los tres hongos producen hemólisis total en la placa de agar sangre, a pesar de que se observó un crecimiento muy lento del hongo, puesto que al ser otra temperatura diferente a la que crece le cuesta adaptarse y proliferar, las cajas se incubaron por 72 horas y hasta 7 días para observar crecimiento alguno y hemólisis, sin embargo en algunos casos se el crecimiento fue lento y poco abundante como se observa en la figura 11.

Cuadro 6. Capacidad hemolítica de los hongos del Iztaccíhuatl a 37 ° C

Cont...

Código	Género	Crec. en agar sangre	Hemólisis
R2	<i>Mrakia frígida</i>	✓	Total
R3	<i>Naganishia sp.</i>	✓	Total
R4	<i>Cryptococcus statzelliae</i>	✓	=
R5	<i>Tremellomycetes sp.</i>	✓	Parcial
R6	<i>Candida sp.</i>	✓	Total
R7	<i>Microbotryomicetes sp.</i>		
R8	<i>Ascomycota sp.</i>	*	=
R10	<i>Basidiomycota sp.</i>	✓	=
R11	<i>Mrakia frígida</i>	✓	Total
R12	<i>Cystofilobasidium sp.</i>	✓	Total
R13	<i>Holtermanniella takashimae</i>	✓	
R14	<i>Cystofilobasidium sp.</i>	✓	Total
R15	<i>Rhodotorula sp.</i>	✓	Parcial
R16	<i>Tremellomycetes sp.</i>	✓	=
R18	<i>Protomyces inouyei</i>	✓	=
R19	<i>Mrakiella aquatica</i>	✓	Total
R20	<i>Basidiomycota sp.</i>	✓	=
R21	<i>Microbotryomicetes sp.</i>	✓	
R22	<i>Leucosporidium drummi</i>	✓	Total
R23	<i>Leucosporidium sp.</i>	✓	Total

R24	<i>Naganishia liquefaciens</i>	✓	=
R25	<i>Epicoccum</i> sp.	✓	Total
R26	<i>Cladosporium delicatulum</i>	✓	Total
R27	<i>Fungi</i> sp.	✓	=
R28	<i>Fungi</i> sp.		=
R29	<i>Aureobasidium</i> sp	*	=
R30	<i>Tremellomycetes</i> sp.	✓	=
R31	<i>Basidiomycota</i> sp.	✓	=
R32	<i>Basidiomycota</i> sp.	✓	Total
R33	<i>Basidiomycota</i> sp.	✓	Total
R34	<i>Mrakia frígida</i>	✓	Total
R36	<i>Guehomyces</i> sp.	✓	Total
R37	<i>Mrakia frígida</i>	✓	Total
R38	<i>Epicoccum</i> sp.	✓	
R39	<i>Naganishia friedmannii</i>	✓	=
R40	<i>Cladosporium delicatum</i>	✓	Total
R41	<i>Basidiomycota</i> sp.	✓	Total
R42	<i>Naganishia</i> sp.	✓	Total
R43	<i>Tremellomycetes</i> sp.	✓	=

* Hongos de crecimiento lento (más de una semana), no se pudo observar la hemólisis. Crec.: Crecimiento.

Cont...

R2: *Mrakia frígida*



Levadura de color translúcida, convexa, consistencia cremosa, con halo traslucido alrededor.

R3: *Naganishia* sp.



Levadura de color marrón rojizo, convexa, consistencia cremosa, bordes regulares, halo traslúcido.

R5: *Tremellomycetes* sp.




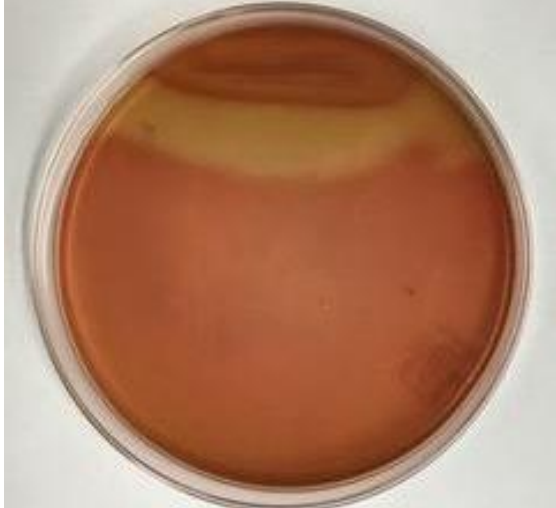
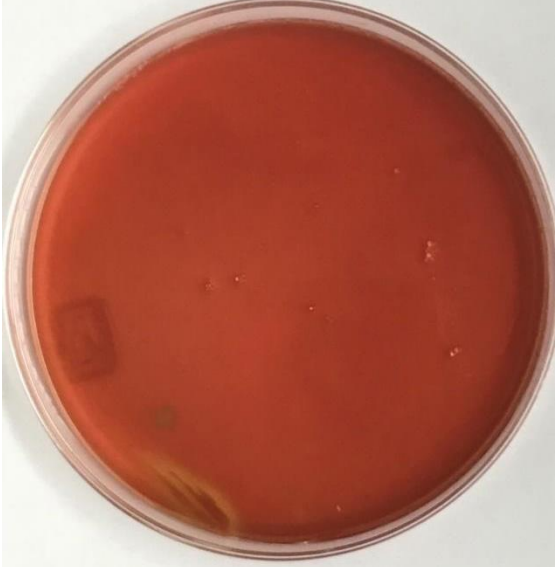

Levadura traslúcida, convexa, colonia pequeña, consistencia cremosa, halo color verdoso.

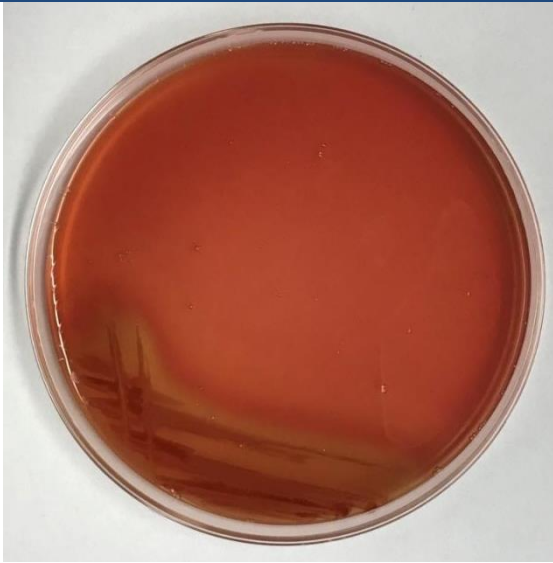
R6: *Candida* sp.



Colonia naranja oscuro, consistencia cremosa, convexa, halo traslúcido.

Cont...

<p>R11: <i>Mrakia frígida</i></p>	<p>R12: <i>Cystofilobasidium</i> sp.</p>
 <p>Colonia blanca, convexa, pequeña, cremosa, con halo traslúcido.</p>	 <p>Colonia marrón rojizo, consistencia cremosa, convexa y lisa, con halo traslúcido.</p>
<p>R14: <i>Cystofilobasidium</i> sp.</p>	<p>R15: <i>Rhodotorula</i> sp.</p>
 <p>Colonia marrón rojizo, convexa, consistencia cremosa, halo traslúcido. Crecimiento lento.</p>	 <p>Colonia marrón rojizo, consistencia cremosa, pequeña, delimitada, convexa con halo verdoso. Crecimiento rápido a las 72 hrs. Cont...</p>
<p>R19: <i>Mrakiella aquatica</i></p>	<p>R22: <i>Leucosporidium drummii</i></p>



Colonia marrón rojizo, convexa, consistencia cremosa, halo traslúcido.

R23: *Leucosporidium* sp.



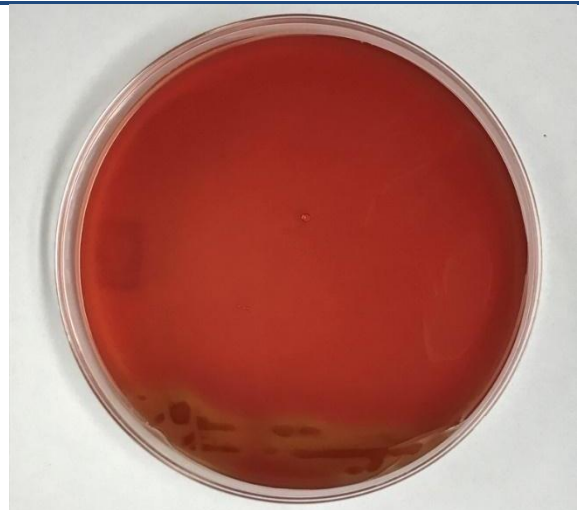
Colonia traslúcida, convexa, cremosa, halo traslúcido.

R32: *Basidiomycota* sp.



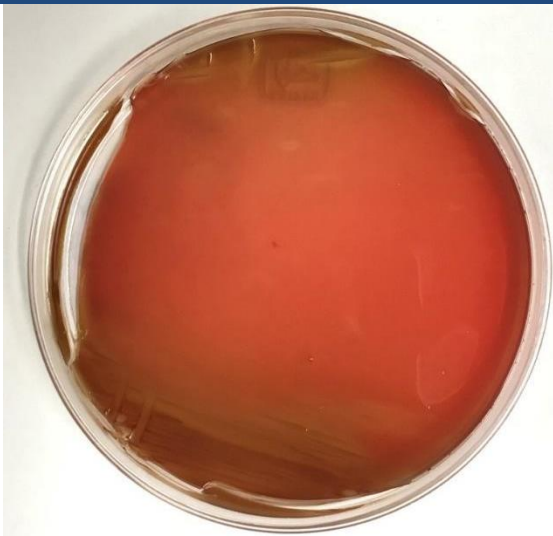
Colonia marrón rojizo, cremosa, convexa, lisa, con halo traslúcido.

R33: *Basidiomycota* sp.



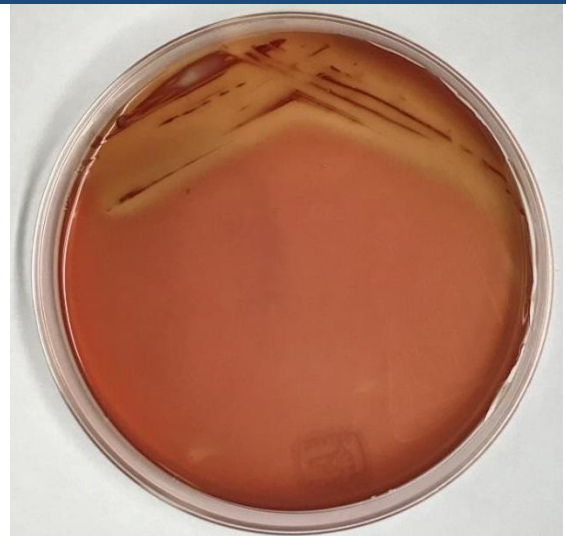
Colonia marrón rojizo, cremosa, convexa lisa, halo traslúcido. Crecimiento lento.

R34: *Mrakia frigida*



Colonia marrón rojizo, convexa lisa, cremosa, con halo traslúcido verdoso.

R36: *Guehomyces* sp.



Colonia marrón rojizo, convexa lisa, cremosa, halo traslúcido.

R41: *Basidiomycota* sp.



Colonia marrón rojizo, consistencia cremosa, presencia de los halos traslúcidos.

R42: *Naganishia* sp.



Colonia marrón rojizo, consistencia cremosa, convexa lisa, presencia de halo traslúcido.

R37: *Mrakia frigida*



Colonia marrón rojizo, convexa, cremosa con presencia de halo traslúcido alrededor.

R13: *Holtermanniella takashimae*



Levadura de color translúcida, convexa, consistencia cremosa, con halo traslucido alrededor.

R16: *Tremellomycetes sp.*Cont...



Colonia color marrón claro, cremosa sin presencia de halo alrededor, además de observarse un crecimiento bajo de la levadura.

R26: *Cladosporium delicatum*



Colonia color marrón claro, cremosa, sin presencia de halo alrededor.

R25: *Epicoccum sp.*

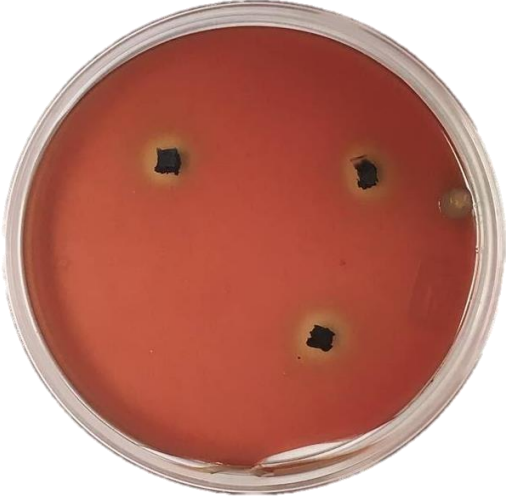

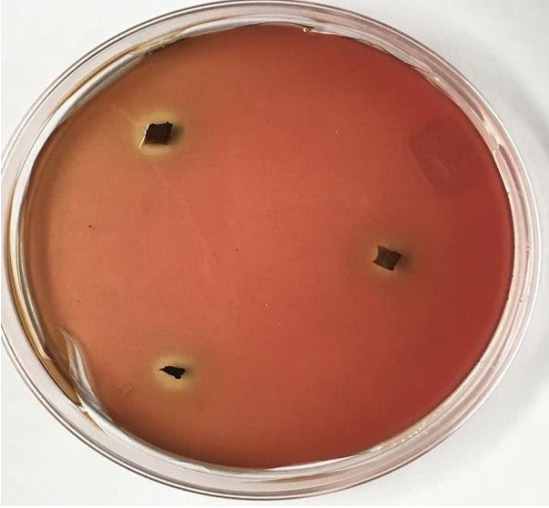
 <p>Se observó un crecimiento lento del hongo filamentoso, sin embargo se observa halo traslúcido alrededor del inóculo.</p>	 <p>No se observa crecimiento del hongo filamentoso, sin embargo se observa halo traslúcido alrededor del inóculo.</p>
<p>R40: <i>Cladosporium delicatum</i></p>	
 <p>Crecimiento lento del hongo filamentoso, sin embargo, se observa halo traslúcido alrededor del inoculo.</p>	

Figura 11. Caracterización macroscópica de hongos del Iztaccíhuatl en medio agar sangre. Crecimiento en medio agar base sangre, suplementado con 5% de sangre humana, coloración de colonia y observación de hemólisis parcial o total.

Según Bassetti, 2015; los hongos oportunistas son aquellos que normalmente no causarían enfermedades en personas sanas (inmunocompetentes), pero que pueden causar problemas en algunas circunstancias (personas inmunosuprimidas), y para ello deben poseer cierto potencial de virulencia. Las personas inmunosuprimidas son susceptibles a las infecciones causadas por este tipo de hongos, teniendo en cuenta esto es importante evaluar el riesgo de los nuevos hongos identificados. Crecer a bajas/altas temperaturas les podría permitir una mejor adaptación a las condiciones ambientales actuales, lo que les puede ayudar a infectar nuevos hospederos como el ser humano. Con la prueba de hemólisis que demostró la capacidad hemolítica total o parcial junto con la termotolerancia que presentan estos microorganismos (37°C) (correspondiente a la del cuerpo humano) sugiere que dichos aislados podrían tener cierto potencial para establecerse y causar micosis en seres humanos con un sistema inmune comprometido. Se sabe que la hemólisis en bacterias se divide en tres tipos: La alfa hemólisis hace referencia a una lisis parcial de eritrocitos que produce una coloración verde en el agar sangre, la cual se observa alrededor de las colonias (debido a la oxidación de la hemoglobina a metahemoglobina). La hemólisis beta se refiere a un halo de hemólisis completamente claro y gamma hemólisis ausencia de hemólisis (Cruz y col; 2017). Teniendo en cuenta esta información se podría dilucidar que sucede algo similar a los hongos pudiendo clasificar como alfa, beta o gamma hemólisis dependiendo del hongo y la coloración que presenta durante su crecimiento en el medio enriquecido con sangre.

A pesar de la poca información sobre levaduras que generan infecciones fúngicas en humanos, se han realizado estudios en el género *Candida* spp. Los cuales han descrito la resistencia emergente a los azoles, y han demostrado distintos factores de virulencia, entre ellos: la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares, como fosfolipasa y proteinasa, las cuales, facilitan una adherencia, así como la hemolisina. Dichos factores de virulencias se han descrito en otras especies de levadura que afectan humanos (Bassetti, 2015). Debido estas adaptaciones, las infecciones generadas por este tipo de hongos, generan altas tasas de mortalidad y

hospitalización prolongada, dando un alto costo de atención médica (Caggiano, 2015; Motta, 2010).

Basándonos en un modelo en el cual el requerimiento del hierro, es esencial como cofactor para varias proteínas, es necesario para numerosos procesos bioquímicos que incluyen respiración y metabolismo celular, transporte de oxígeno, metabolismo de fármacos así como para la síntesis de ADN (Welch, 2001). En el mundo microbiano, hay una competencia constante por el hierro, tanto entre los microorganismos dentro de las comunidades microbianas como entre los microorganismos y sus hospederos. La absorción de hierro durante la infección se considera un factor de virulencia e incluso la colonización y proliferación sólo son posibles si el hongo tiene suficiente hierro (Sutak, 2008).

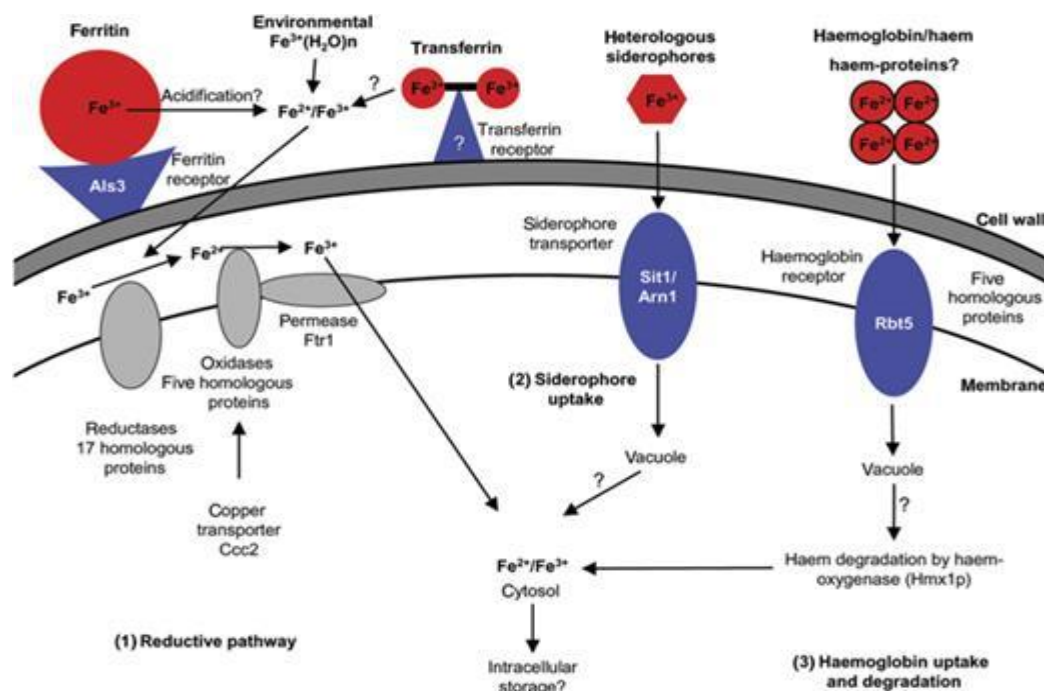


Figura 12. Estrategias de *Candida albicans* para obtención de hierro dentro del huésped. Para adquirir hierro, *C. albicans* posee tres sistemas de adquisición de hierro de alta afinidad: (1) un sistema reductivo responsable de la explotación de hierro a partir de transferrina, ferritina o del medio ambiente; (2) un sistema de captación de sideróforo responsable de la adquisición de hierro a partir de una serie de sideróforos producidos por otros organismos; y (3) un sistema de absorción y degradación de hierro-hemo capaz de adquirir hierro a partir de la hemoglobina y probablemente de las proteínas del hemo (Almeida, 2009).

Entonces, se sugiere que los hongos psicrotolerantes aislados del Iztaccíuhatl podría presentar mecanismos similares a los usados por *Candida* spp. (Figura 12) para la obtención de este elemento (del agar sangre) esencial en el metabolismo fúngico.

Se sabe que la capacidad de utilizar hemoglobina como fuente de hierro fue la primera estrategia descrita de la explotación de hierro de *C. albicans* a partir de una proteína del hospedador (Moors, 1992). El primer paso en la utilización del hierro de la hemoglobina por *C. albicans in vivo* es probablemente a través de la unión a los eritrocitos. Las hifas de *Candida albicans* pueden interactuar con los eritrocitos y generar una forma de roseta a través de moléculas similares al receptor del complemento (Moors, 1992). Para la lisis de los eritrocitos, *C. albicans* posee un factor hemolítico, probablemente una manoproteína unida a la superficie de las células fúngicas (Watanabe, 1999). Aunque las hidrolasas extracelulares pueden estar involucradas, el mecanismo por el cual *C. albicans* causa hemólisis y la base molecular de este mecanismo sigue siendo desconocida. Después de su liberación, la absorción de hemoglobina está mediada por receptores de hemoglobina específicos en la superficie de *C. albicans*. Una vez que la hemoglobina se internaliza dentro de las vacuolas por la vía endocítica, debe hidrolizarse o desnaturalizarse, probablemente a través de proteasas vacuolares y/o del pH ácido vacuolar para liberar el grupo hemo (Weissman, 2008). Para obtener el hierro del grupo hemo, *C. albicans* posee una hemo oxigenasa (Santos, 2003).

La unión de la hemoglobina a la superficie de *C. albicans* (discutida anteriormente) desencadena la expresión de supuestos receptores de superficie que permiten que el hongo se una a fibronectina, la laminina y el fibrinógeno (Yan, 1998). En base a estos hallazgos, se ha sugerido que la unión a la hemoglobina puede estimular *C. albicans* unión a proteínas adicionales de la superficie de la célula huésped y la matriz extracelular. Cuando se encuentra hemoglobina libre en la sangre, este mecanismo puede ayudar al hongo introducirse rápidamente del torrente sanguíneo

a los tejidos del hospedero. Además, se ha demostrado que los mecanismos de reconocimiento de hemoglobina puede permitir que el hongo entre en el torrente sanguíneo o permee las barreras endoteliales durante la invasión tisular (Pendrak, 2004b).

Esto sirve de pauta para tratar de conocer los mecanismos por los cuales las levaduras además de la *Candida* puedan hacer uso de la hemoglobina, quizá estos hongos aislados de ambientes extremos puedan tener receptores de hemoglobina en la membrana fúngica (su función aún no está del todo descubierta) lo cual les permitiría desarrollar infecciones fúngicas en el torrente sanguíneo que ponen en peligro la vida de los pacientes inmunosuprimidos y en estado crítico. El inicio rápido de la terapia antimicótica es crucial para estos pacientes, pero los hemocultivos para la detección de hongos tardan varios días, lo que dificulta un diagnóstico rápido. Debido a la falta de identificación de enzimas que se expresaron durante el crecimiento en este agar con diferente sustrato, no se sabe con exactitud cuál es la que se está expresando, que factores en la membrana se activan para degradar la hemoglobina, y; creando así la hemólisis alfa o beta.

Por otro lado, las levaduras que solo tuvieron un crecimiento sin ninguna expresión de hemólisis se puede deber a que la levadura estuvo manteniendo como sustrato a la peptona en donde la coloración de la colonia no se afectó, por lo que son de color blanco o traslúcidas y no se observa la degradación de la hemoglobina.

5.4 Caracterización de los hongos psicotolerantes: susceptibilidad/resistencia a antifúngicos (ketoconazol e itraconazol)

Mendez, y Herrera; 2001 señalan que los azoles como antifúngicos fueron introducidos a finales de 1960, pero solamente un grupo de ellos ha demostrado actividad antifúngica sistémica, el miconazol, ketoconazol, fluconazol y el itraconazol. Uno de los mecanismo por el cual los azoles inhiben el crecimiento de

los hongos es mediante la inhibición del citocromo P-450 dependiente de enzimas, lo que resulta en la síntesis trunca del ergosterol y la degradación de dicho compuesto en la membrana de la célula fúngica.

El Miconazol y el Ketoconazol fueron establecidos como agentes imidazoles de amplio espectro para una amplia variedad de patógenos fúngicos, incluyendo levaduras, hongos dimórficos, hongos filamentosos, dermatofitos y patógenos oportunistas.


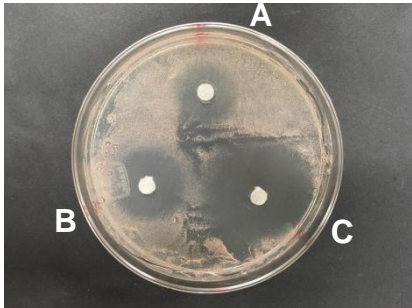
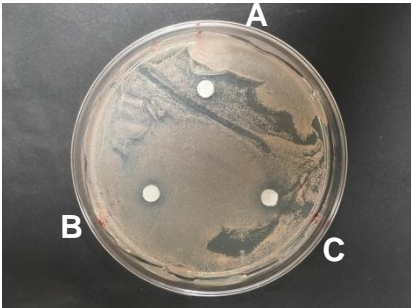
El itraconazol es un componente lipofílico que se caracteriza por su buena absorción por vía oral, distribución extensiva en los tejidos y una larga vida media en el suero. Esta droga se une fuertemente a las proteínas plasmáticas y penetra ligeramente dentro del fluido cerebroespinal y a la orina pero lo hace bien en la piel y en los tejidos, (Mendez y Herrera; 2001).

Habiendo comprobado la capacidad de las levaduras de crecer a 37°C y sugiriendo que probablemente estos hongos sean capaces de infectar al ser humano, se realizó la prueba de resistencia a antifúngicos a esta temperatura en agar PDA, con diferentes concentraciones de itraconazol (0.1, 0.5, 1.0, 5 y 10 µg/disco) y ketoconazol (0.5, 1.0, 2.5, 10 y 25 µg/disco). Sin embargo de las 15 levaduras que se probaron en este estudio, solo R15 *Rhodotorula* sp. logró crecer en las distintas concentraciones de los dos antifúngicos. El resto de las levaduras no mostró crecimiento. Esto pudo deberse a que se usó medio PDA en lugar de agar sangre y a las concentraciones de los antifúngicos que eran demasiado altos (en 5 y 10 µg/disco para itraconazol y 10 y 25 µg/disco para ketoconazol) e inhiben el crecimiento total del hongo.

Al tener este conflicto, se volvió a realizar la prueba con una concentración de antifúngico 10 veces menor, para descartar cualquier posibilidad de que el antifúngico estaba demasiado concentrado o en realidad combinación de factores de la temperatura y los antifúngicos inhibe el crecimiento. Sin embargo aunque la temperatura si es un factor que influye de manera importante pues son organismos que crecen a bajas temperaturas, si logran crecer a 37°C tardando más de 2

semanas, lo cual resulta un problema también, ya que el medio de cultivo se deshidrata y se inhibe el crecimiento de las levaduras por la desecación. Únicamente la R15 *Rhodotorula* sp. logró crecer en ambos ensayos y se observó que esta levadura es sensible a las concentraciones de 0.5, 1.0, 2.5, 10 y 25 $\mu\text{g}/\text{disco}$ de ketoconazol y 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{disco}$ de itraconazol, con un halo de inhibición más pequeño que con el ketoconazol, mostró resistencia a las concentraciones de 0.1, 0.5 y 1.0 $\mu\text{g}/\text{disco}$ de itraconazol como se observa en el cuadro 7.

Cuadro 7. Susceptibilidad a antifúngicos (ketoconazol e itraconazol) a 37°C

R15: <i>Rhodotorula</i> sp.					
Halo de inhibición Ketoconazol			Halo de inhibición Itraconazol		
A 1 $\mu\text{g}/\text{disco}$	B 10 $\mu\text{g}/\text{disco}$	C 25 $\mu\text{g}/\text{disco}$	D 1 $\mu\text{g}/\text{disco}$	E 5 $\mu\text{g}/\text{disco}$	F 10 $\mu\text{g}/\text{disco}$
					
0.45	No medible	No medible	Ausente	0.55	0.85
Halo de inhibición Ketoconazol			Halo de inhibición Itraconazol		
A 0.5 $\mu\text{g}/\text{disco}$	B 1 $\mu\text{g}/\text{disco}$	C 2.5 $\mu\text{g}/\text{disco}$	A 0.1 $\mu\text{g}/\text{disco}$	B 0.5 $\mu\text{g}/\text{disco}$	C 1 $\mu\text{g}/\text{disco}$
					
0.75	1.25	1.95	Ausente	Ausente	Ausente

Se realizó la prueba de susceptibilidad de antifúngicos a 4°C, en medio Mueller Hinton Agar suplementado con 5% de sangre humana. El resultado fue muy interesante, debido a que a esta temperatura las levaduras que producen hemólisis no lo hicieron, crecieron en su gran mayoría aún a altas concentraciones de los antifúngicos y tenían un olor dulce muy penetrante, que a 37°C no presentaron. Así como el cambio de coloración y en la morfología de la de colonia, debido a la nueva adaptación y nuevos metabolitos que se crearon para este nuevo medio.

Algunas que tenían pigmentos a 37°C como lo son la R4,R41, R37, R10 siendo pigmentación de amarillo y rosas pasaron a ser blancas creciendo en frío, también algunos de los aislados se volvieron muy lechosas y mucilaginosas con una coloración verdosa, en donde al final no se pudo comprobar si este color verde provenía del cambio de coloración del agar y si se debía a una oxidación de la hemoglobina, ya que a pesar de ser muy lechosa la levadura estaba igual de color verdoso. Aunque en las imágenes se observa que fue debido a un cambio de color en la morfología, esto debido a los nutrientes que tomo del agar sin hacer daño del eritrocito, dando así esa coloración marrón, pudiendo ser del extracto de carne o alguno otro que interfiriera en su crecimiento con el estrés que era el antifúngico.

La prueba de susceptibilidad a antifúngicos a 4°C mostró crecimiento de las levaduras a las 72 horas, la prueba se hizo con concentraciones para itraconazol (5, 1, 0.5 y 0.1 µg/disco) y ketoconazol (2.5, 1, 0.5 y 0.35 µg/disco) para comprobar si crecían con esas concentraciones. En las tablas 8 y 9 se muestran los resultados obtenidos, se observa que todas las levaduras tuvieron crecimiento. Sin embargo, a esta temperatura no muestran hemólisis y las características de la colonia son totalmente diferentes a cuando crecen en PDA a 37°C.

Las levaduras que presentaron halo de inhibición fueron:

- R6 *Candida* sp. presentó halos de 2.8, 2.9, 2.3, y 2.0cm de diámetro para las concentraciones de 2.5, 1, 0.5 y 0.35µg/disco de ketoconazol y para itraconazol presentó halos de 2.3, 2.2, 2.1 y 1.9cm de diámetro con



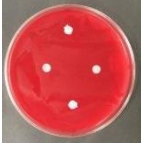





concentraciones de 5, 1, 0.5 y 0.1 $\mu\text{g}/\text{disco}$ respectivamente. Cabe destacar que aunque se observa un halo más marcado, aun así existieron colonias que crecieron dentro de la zona de inhibición.








- R24 *Naganishia liquefaciens*, con halos de 3, 2.8, 2.5 y 2.0 cm de diámetro para las concentraciones de 2.5, 1, 0.5 y 0.35 $\mu\text{g}/\text{disco}$ de ketoconazol respectivamente y para itraconazol presentó halos de 2.3, 2.1, 2.0 y 1.5 cm de diámetro para las concentraciones de 5, 1, 0.5 y 0.1 $\mu\text{g}/\text{disco}$.
- R37 *Mrakia frígida*, con un halo de 1.5 cm de diámetro para la concentración de 2.5 $\mu\text{g}/\text{disco}$ para ketoconazol, con crecimiento dentro del mismo halo.










Como se observa en la tabla 8 y 9 se tienen los resultados de ketoconazol e itraconazol respectivamente a 4°C, las levaduras que presentaron una respuesta con halos de inhibición fueron las siguientes:

- R2 *Mrakia frígida*, con halos de 2.3, 2.8 y 2.7 cm de diámetro para las concentraciones de 1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{disco}$ de itraconazol, respectivamente.
- R3 *Naganishia* sp., con halos de 2.5, 2.6 y 2.6 cm de diámetro para las concentraciones de 1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{disco}$ de itraconazol, respectivamente, presentando crecimiento total en ketoconazol.
- R37 *Mrakia frígida*, presentó halos de inhibición para las concentraciones de 10 y 25 $\mu\text{g}/\text{disco}$ de ketoconazol con halos de 2.0 y 4.0 cm de diámetro; 1.0, 1.3 y 1.1 cm de diámetro para las concentraciones de 1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{disco}$ de itraconazol.
- R6 *Candida* sp. presentó halos de 2.0, 2.5 y 4.0 cm para las concentraciones de 1, 10 y 25 $\mu\text{g}/\text{disco}$ de ketoconazol; 2.5, 2.8 y 2.9 cm de diámetro para 1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{disco}$ de itraconazol, sin embargo también se observó crecimiento dentro del halo.

Cuadro 8. Susceptibilidad a ketoconazol. Prueba de susceptibilidad a ketoconazol con diferentes concentraciones del antifúngico: 0.35, 0.5, 1, 2.5, 10, 25, 30, 50, 70 $\mu\text{g}/\text{disco}$, agar Mueller Hinton con 5% de sangre humana a 4°C.

Levadura	Halo de inhibición Ketoconazol (diámetro cm)												
	Características de la colonia	$\mu\text{g}/\text{disco}$				Características de la colonia	$\mu\text{g}/\text{disco}$			Características de la colonia	$\mu\text{g}/\text{disco}$		
		0.35	0.5	1	2.5		1	10	25		30	50	70
R2 <i>Mrakia frigida</i>	NS	SP	SP	SP	SP	 Levadura blanca	-	-	-	 No crecimiento en placa.	NM	NM	NM
R3 <i>Naganishia sp.</i>	 Levadura traslúcida	-	-	-	-	 Levadura de color blanco, crecimiento no uniforme crecimiento en el disco de 5 μg .	-	-	-	 Se observa muy poco crecimiento alrededor de la caja.	NM	NM	NM
R5 <i>Tremellomyces sp.</i>	 Levadura de color marrón, crecimiento total en la caja petri.	-	-	-	-	 Levadura de color marrón de consistencia lechosa, no se observan halos de inhibición.	-	-	-	 Levadura de color marrón, crecimiento en toda la placa, consistencia lechosa.	-	-	-

R6 <i>Candida</i> sp.	 Levadura blanca con crecimiento dentro del halo	2	2.3	2.9	2.8	 Levadura de color blanquecino con crecimiento dentro del halo	2	2.5	4	 Se observa crecimiento alrededor de la caja.	NM	NM	NM
R15 <i>Rhodotorula</i> sp.	-NS	SP	SP	SP	SP	NS	SP	SP	SP	 Se observa muy bajo crecimiento, sin halo definido.	NM	NM	NM
R19 <i>Mrakiella aquatica</i>	 Crecimiento completo en la caja, levadura de color marrón.	-	-	-	-	NS	SP	SP	SP	 Levadura de color marrón, colonias grandes, crecimiento no uniforme.	-	-	-
R21 <i>Microbotryomycetes</i> sp.	NS	SP	SP	SP	SP	NS	SP	SP	SP	 Levadura de color blanquecino.	3.2	4	4.2









<p>R23 <i>Leucosporidium</i> sp.</p>	 Levadura blanca	-	-	-	-	 Levadura color marrón, crecimiento no uniforme en la placa.	-	-	-	 Halo no claro, crecimiento en las orillas de la caja, inhibición completa cerca de los discos.	NM	NM	NM
<p>R24 <i>Naganishia liquefaciens</i></p>	 Levadura blanca, se observa crecimiento dentro del halo.	2	2.5	2.8	3	 Levadura de color blanquecino, no se observa halo de inhibición.	-	-	-	 Levadura de color blanquecino, no se observa halo de inhibición.	-	-	-
<p>R33 <i>Basidiomycota</i> sp.</p>	 Levadura blanca.	-	-	-	-	 Levadura blanca, crecimiento uniforme en toda la placa.	-	-	-	 Levadura de color blanco, crecimiento uniforme en toda la placa.	-	-	-

Cont...







<p>R36 <i>Guehomyces</i> sp.</p>	 Levadura marrón.	-	-	-	-	 Levadura marrón, aspecto lechoso	-	-	-	 Levadura de color marrón claro, crecimiento total en la placa.	-	-	-
<p>R37 <i>Mrakia frigida</i></p>	 Levadura blanca	-	-	-	1.5	 Levadura blanca	-	2	4	 Levadura blanca.	3	3.2	3.6
<p>R41 <i>Basidiomycota</i> sp.</p>	 Crecimiento completo en la caja, levadura de color blanco.	-	-	-	-	NS	-	-	-	 Levadura de color marrón, crecimiento en toda la placa.	-	-	-

Simbología: SP Sin Prueba, NM No Medible, NS No Significativo









Cuadro 9. Susceptibilidad a Itraconazol. Prueba de susceptibilidad a itraconazol con diferentes concentraciones del antifúngico: 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 30, 50, 70 µg/disco, agar Mueller Hinton con 5% de sangre humana a 4°C.





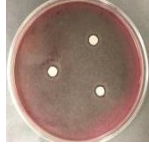







Levadura	Halo de inhibición Itraconazol (diámetro cm)												
	Características de la colonia	µg/disco				Características de la colonia	µg/disco			Características de la colonia	µg/disco		
		0.1	0.5	1	5		1	5	10		30	50	70
R2 <i>Mrakia frigida</i>	NS	SP	SP	SP	SP	 Levadura de color blanco.	2.3	2.8	2.7	 Levadura blanca con crecimiento dentro del halo	2.3	3	3.2
R3 <i>Naganishia sp.</i>	 Levadura translúcida.	-	-	-	-	 Levadura de color blanquecino, se observan halos	2.5	2.6	2.6	 No se observa crecimiento dentro del halo	2.3	2.5	2.7
R5 <i>Tremellomyces sp.</i>	 Levadura de color marrón.	-	-	-	-	 Levadura de color marrón.	-	-	-	 Levadura de color marrón, se observa un cambio de coloración en el agar.	-	-	-

Cont...




<p>R6 <i>Candida</i> sp.</p>	 Levadura de color blanquecino.	1.9	2.1	2.2	2.3	 Levadura blanquecina con crecimiento dentro del halo	2.5	2.8	2.9	Sin imagen	2.2	2.4	2.5
<p>R10 <i>Basidiomycota</i> sp.</p>	 Levadura de color blanco	-	-	-	-	 Levadura de color blanquecino, consistencia cremosa, sin halo	-	-	-	 Se observa crecimiento dentro del halo	2.1	2.3	2.5
<p>R15 <i>Rhodotorula</i> sp.</p>	-NS	SP	SP	SP	SP	NS	SP	SP	SP	 Levadura de color blanquecino con crecimiento dentro del halo	1.7	2	2.2

Cont...

<p>R19 <i>Mrakiella aquatica</i></p>	 <p>Crecimiento completo en la caja, levadura de color marrón.</p>	-	-	-	-	NS	SP	SP	SP	 <p>Crecimiento no uniforme, además de un cambio de coloración tanto en el medio como en la levadura.</p>	-	-	-
<p>R21 <i>Microbotryom icetes sp.</i></p>	-	SP	SP	SP	SP	NS	SP	SP	SP	-	1.2	1.3	1.4
<p>R23 <i>Leucosporidium sp.</i></p>	 <p>Levadura blanca.</p>	-	-	-	-	 <p>Levadura de color marrón, colonias grandes, crecimiento no uniforme.</p>	-	-	-	 <p>Levadura de color blanquecino con crecimiento dentro del halo</p>	2	2.1	2.3
<p>R24 <i>Naganishia liquefaciens</i></p>	 <p>Levadura de color blanco</p>	1.5	2	2.1	2.3	 <p>Levadura de color blanco.</p>	-	-	-	 <p>Levadura e color blanquecino, crecimiento no homogéneo.</p>	-	-	-

R33 <i>Basidiomycota</i> sp.	 Levadura blanca.	-	-	-	-	 Levadura de color blanquecino, sin halo	-	-	-	 Levadura de color blanco, sin halo.	-	-	-
R36 <i>Guehomyces</i> sp.	 Levadura color marrón.	-	-	-	-	 Levadura de color marrón, sin halo de inhibición.	-	-	-	 No se observa halo de inhibición.	-	-	-
R37 <i>Mrakia frigida</i>	 Levadura de color blanquecino.	-	-	-	-	 Levadura de color blanquecino.	1	1.3	1.1	 Levadura de color blanquecino.	1.4	1.5	1.5
R38 <i>Epicoccum</i> sp.	 Crecimiento lento	-	-	-	-	 Levadura blanca sin observa halo	-	-	-	 Poco crecimiento en la placa.	-	-	-

Cont...

<p>R41 <i>Basidiomycot</i> <i>a sp.</i></p>	 <p>Crecimiento completo en la caja, levadura de color blanco.</p>	-	-	-	-	 <p>Levadura de color marrón, de consistencia lechosa.</p>	-	-	-	 <p>Levadura de color marrón, consistencia lechosa, crecimiento completo en la placa.</p>	-	-	-
--	---	---	---	---	---	--	---	---	---	--	---	---	---

Simbología: SP Sin Prueba, NM No Medible, NS No Significativo

Como la gran mayoría de las levaduras presentaron crecimiento a estas concentraciones se volvió a realizar la prueba con concentraciones de 30, 50 y 70 $\mu\text{g}/\text{disco}$ de ketoconazol e itraconazol, los resultados se muestran en los cuadros 8 y 9.

- R3 *Naganshia* sp., presentó halos no medibles con muy poco crecimiento alrededor de la caja de ketoconazol y presentó halos de inhibición sin crecimiento dentro del halo, para las concentraciones de itraconazol, 2.3, 2.5 y 2.7 cm de diámetro para los 30, 50 y 70 $\mu\text{g}/\text{disco}$ respectivamente.
- R23 *Leucosporidium* sp., presentó halos no medibles con crecimientos alrededor de la caja de ketoconazol, con inhibición completa cerca de los discos, para el itraconazol presentó halos de 2.0, 2.1 y 2.3 cm de diámetro con crecimiento dentro del halo.
- R24 *Naganishia liquefaciens*, presenta algo muy curioso puesto que a las bajas concentraciones tiene halo de inhibición (con crecimiento dentro del halo) y para las concentraciones de 30, 50 y 70 $\mu\text{g}/\text{disco}$ de itraconazol y ketoconazol se presenta la levadura en toda la placa.
- R38 *Epicoccum* sp., no creció a las concentraciones de ketoconazol, pero si se observa muy bajo de crecimiento para itraconazol.

Cuando aparecen colonias dentro del halo de inhibición, puede tratarse de mutantes resistentes, o distintos fenotipos de hongos (Cantón, R. y col.; 2000). Sin embargo los hongos se aislaron y se dejaron cultivos axénicos, es decir sin contaminaciones por diferentes microorganismos por lo que sería más probable que fueran mutantes resistentes dentro del mismo aislado.

También se sabe que el dimorfismo es la capacidad de cambiar entre levaduras y filamentos y generalmente se reconoce como un factor de virulencia importante además de la capacidad hemolítica de los microorganismos (Sudbery, 2004; Kumamoto y Vines, 2005) de los cuales la R8 *Ascomycota* sp., R29 *Aureobasidium* sp., R32 *Basidiomycota* sp., R33 *Basidiomycota* sp. R34 *Mrakia frígida*, R36 *Guehomyces* sp. y R37 *Mrakia frígida*, presentaron dimorfismos, sin

embargo, de estos solo R33 *Basidiomycota* sp., R34 *Mrakia frigida*, R36 *Guehomyces* sp y R37 *Mrakia frigida*. presentaron hemólisis total y R33 *Basidiomycota* sp., R36 *Guehomyces* sp. fueron resistentes a las concentraciones de 30, 50 y 70 µg/disco de ketoconazol e itraconazol.

La falta de éxito de la terapia antifúngica puede ser debida a la resistencia que se observa *in vitro* (resistencia que puede ser intrínseca a la cepa o adquirida durante el tratamiento) o a una resistencia clínica. Los mecanismos de resistencia antifúngica pueden ser primarios y secundarios y dependen de las características intrínsecas o adquiridas de los patógenos fúngicos. Varios mecanismos conducen a una resistencia adquirida a azoles, siendo el más común la inducción de bombas de eflujo codificadas por los genes MDR o CDR, y la adquisición de mutaciones puntuales en el gen que codifica para la enzima blanco de estos fármacos (*gen ERG11*). Existen dos mecanismos por los que *Candida* puede adquirir resistencia a un azol. El primer mecanismo se debe a mutaciones de la enzima diana del antifúngico, como la alteración de las enzimas relacionadas en la síntesis del ergosterol; el segundo mecanismo se debe a la formación de barreras de permeabilidad o sistemas de bombeo del antifúngico fuera de la célula, como la alteración en las bombas de expulsión: ATP-binding cassette (ABC) y facilitadores mayores (MF) (López, K; 2016).

6. Conclusiones

1 En este trabajo muestra un primer acercamiento para la caracterización taxonómica de los hongos extremófilos aislados de los cuerpos acuíferos y glaciares del Iztaccíhuatl. Haciendo uso de del fragmento ribosomal del rRNA ITS1-5.8S-ITS4 y de la morfología. Sin embargo hace falta la utilización de otros marcadores moleculares para lograr una identificación de estos microorganismos a nivel de especie.

2 Los microorganismos que se pudieron aislar e identificar muestran capacidad para ser causantes de infecciones del ser humano, debido a su adaptación a temperaturas de 37°C, actividad hemolítica, dimorfismo y resistencia a antifúngicos.

3 La información obtenida de este proyecto abre puerta para seguir indagando acerca de la virulencia de estos microorganismos extremófilos y su capacidad de adaptación para provocar enfermedades a los seres humanos.

4 Así como seguir en la identificación de las enzimas que producen y que a su vez nos pueda servir para nuevas tecnologías en pro a la solución de problemas que se desarrollan en nuestro país.

7. Referencias

- **Alpala-Aguilar**, Rosa Liliana. **2016**. Evolución del glaciar del volcán Nevado del Huila a través del tratamiento de imágenes satelitales (1987-2016).
- **Andrews**, JH., Spear, RN., Nordheim, EV. Population biology of *Aureobasidium pullulans* on apple leaf surfaces. *Can J Microbiol.* **2002**;48: 500–513.
- **Anesio**, Alexandre M., Lutz S., Christmas N. A. M., Benning L. G., The microbiome of glaciers and ice sheets. Nanyang Technological University. **2017**; 1-11 pg.
- **Arenas**, R. *Micología Médica Ilustrada. Clínica, laboratorio y terapéutica.* Primera Edición. McGraw Hill. México D.F. **1993**. 397 pg.
- **Arias**, E., Piñeros, P. **2008**. Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- **Bermejo**, JM., Dominguez, JB., Goni, FM., Uruburu, F. Influence of pH on the transition from yeast-like cells to chlamydospores in *Aureobasidium pullulans*. *Antonie van Leeuwenhoek.* **1981**;47: 385–392.
- Obtenido de la página de internet: Bioinformatics at COMAV; https://bioinf.comav.upv.es/courses/intro_bioinf/filogenias.html
- **Borrero**, C., Silva H. Efectos de trichoderma (in vitro) en los microorganismos no patógenos descomponedores de la materia orgánica de un suelo oxisol clase IV del piedemonte llanero Orinoquia. **2005**;9: 6-14.
- **Buzzini**, P., Branda, E., Goretti, M., Turchetti, B. Psychrophilic yeasts from worldwide glacial habitats: diversity, adaptation strategies and biotechnological potential. *FEMS Microbiol Ecol.* **2012**; 82:217–241.
- **Caballero**, Margarita, Lozano-García, Socorro, Vázquez-Selem, Lorenzo, Ortega, Beatriz. Evidencias de cambio climático y ambiental en registros glaciales y en cuencas lacustres del centro de México durante el último

máximo glacial. Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana. **2010**;62: 359-377.

- **Cantón R**, García JE, Gómez L, Martínez L, Rodríguez C, Vila, J, García J.A Procedimientos en Microbiología Clínica. Métodos Básicos Para el Estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos en Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Editor Picazo J J. **2000**; 6. <http://www.seimc.org>
- **Christner**, BC., Mosley-Thompson, E., Thompson, LG., Zagorodnov, V., Sandman, K., Reeve, JN. Recovery and identification of viable bacteria immured in glacial ice. *Icarus* **2000**;144: 479–485.
- **Colakoglu**, G. Airborne fungal spores at the Belgrad forest near the city of Istanbul (Turkey) in the year 2001 and their relation to allergic diseases. *J Basic Microb.* **2003**;43: 376–384.
- **Connell**, L., Redman, R., Craig, S., Scorzetti, G., Iszard, M., Rodriguez, R. Diversity of soil yeasts isolated from South Victoria Land, Antarctica. *Microb Ecol.* **2008**; 56:448–459.
- **Cruz**, J., Ortiz, M., Reyes, Y. Streptococcus B-Hemolítico del grupo A en Hisopado Faríngeo de estudiantes del Centro Escolar Dr. José Antonio Quiroz, departamento de San Miguel. **2017**.
- **Cuervo**, J., Romero, T., López, P., Ramírez, M. El cultivo del cacao, enfermedades, identificación de hongos, modelado y métodos de control. *Revista de divulgación técnica agrícola y agroindustrial.* **2014**; 58:1-8.
- **De Hoog**, GS., Göttlich, E., Platas, G., Genilloud, O., Leotta, G., Van Brummelen, J. Evolution, taxonomy and ecology of the genus *Thelebolus* in Antarctica. *Stud Mycol.* **2005a**;51: 33–76.
- **Delgado-Granados**, H., Vázquez, J., Cortés, P., Julio, G., Ontiveros, V., Soto, H. La Criósfera en México. Reporte Mexicano de Cambio Climático. Primera Edición. CONACyT, México. **2015**:79-111.
- **Delgado-Granados**, Hugo. Climate Change Vs. Volcanic Activity: Forcing Mexican Glaciers to Extinguish and Related Hazards, Proc. First Intern. Conf. on the Impact of Climate Change on High-Mountain Systems, Instituto de

Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales, Bogotá, Colombia. **2007**:153-168.

- **Dynowska**, M., Wojczulanis-Jakubas, K., Pacynska, JA., Jakubas, D., Ejdys, E. Potentially pathogenic yeast isolated from the throat and cloaca of an Arctic colonial seabird: the little auk (*Alle alle*). *Polar Biol* **2013**; 36:343–348.
- **García**, Virginia; Giraudo-De van Broock, María Rosa. Habitantes microscópicos de los glaciares: Levaduras. **2014**; 11:10-15.
- **García**, V. Introducción a la Microbiología. 2a Edición. Editorial EUNED. **2004**; 256 pages.
- **Gostinčar**, C., Grube, M., De Hoog, S., Zalar, P., Gunde-Cimerman, N. Extremotolerance in fungi: evolution on the edge. *FEMS Microbiology Ecology*. **2009**; 71:2-11.
- **Gostinčar**, C., Turk, M., Trbuha, T., Vaupotič, T., Plemenitaš, A., Gunde-Cimerman, N. Expression of fatty-acid-modifying enzymes in halotolerant black yeast *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud under salt stress. *Stud Mycol*. **2008**;61: 51–59.
- **Gostinčar**, C., Grube, M., De Hoog, S., Zalar, P., Gunde-Cimerman, N. Extremotolerance in fungi: evolution on the edge. *FEMS Microbiology Ecology*. **2009**; 71:2-11.
- **Gunde-Cimerman**, N., Sonjak, S., Zalar, P., Frisvad, JC., Diderichsen, B., Plemenitaš, A. Extremophilic fungi in Arctic ice: a relationship between adaptation to low temperature and water activity. *Phys Chem Earth*. **2003**;28: 1273–1278.
- **Gunde-Cimerman**, N., Zalar, P., De Hoog, S., Plemenitaš, A. Hypersaline waters in salterns – natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiol Ecol*. **2000**;32: 235–240.
- **Insam**, Heribert. Delgado Granados, Hugo. Nagler, Magdalena. Waldhuber, Sebastian. Podmired, Sabine Marie. Quideau, Sylvie. Soil microbiota along Ayoloco glacier retreat area of Iztaccíhuatl volcano, Mexico. *CATENA*.
- **Hawksworth**, DL. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol Res* **1991**;95:641–655

- **Kim, J-H.**, Kim, M-R., Lee, J-H., Lee, J-W., Kim, S-K. Production of high molecular weight pullulan by *Aureobasidium pullulans* using glucosamine. *Biotechnol Lett.* **2000**;22: 987–990.
- **Kogej, T.**, Gostinčar, C., Volkmann, M., Gorbushina, AA., Gunde-Cimerman, N. Mycosporines in extremophilic fungi – novel complementary osmolytes? *Environ Chem.* **2006**;3: 105–110.
- **Kogej, T.**, Ramos, J., Plemenitas, A., Gunde-Cimerman, N. The halophilic fungus *Hortaea werneckii* and the halotolerant fungus *Aureobasidium pullulans* maintain low intracellular cation concentrations in hypersaline environments. *Appl Environ Microb* **2005**;71: 6600–6605.
- **Leathers, TD.** Biotechnological production and applications of pullulan. *Appl Microbiol Biot* **2003**;62: 468–473.
- **López, K.**, Dzul, K., Lugo, C., Arias, J., Zavala, J. Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Una revisión. *Rev Biomed.* **2016**; 27: 127-136.
- **Lugauskas, A.**, Sveistyte, L., Ulevicius, V. Concentration and species diversity of airborne fungi near busy streets in Lithuanian urban areas. *Ann Agr Env Med.* **2003**;10: 233–239
- **Ma, LJ.**, Rogers, SO., Catranis, CM., Starmer, WT. Detection and characterization of ancient fungi entrapped in glacial ice. *Mycologia* **2000**;92: 286–295.
- **Margesin R,** Neuner G, Storey KB. Cold-loving microbes, plants, and animals—fundamental and applied aspects. *Naturwissenschaften* **2007**; 94:77–99.
- **Mendez, J.** y Herrera, M. Métodos de susceptibilidad antifúngica. Revisión metodológica. *Rev. méd. Hosp. Nac. Niños (Costa Rica)* vol.36 n.1-2. **2001**
- **Nixon, GT.** La geología del volcán Iztaccíhuatl y las áreas adyacentes de Sierra Nevada y Valle de México. *Geol. Soc. A.m. Especulación. Papilla.* **1989**; 219:58.

- **Oliart-Ros**, Rosa María, Manresa-Presas, Ángeles, Sánchez-Otero, María Guadalupe. Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. *CienciaUAT*. **2016**;11: 79-90.
- **2017**; 153:83-88.
- **Onofri**, S. **1999**. Antarctic microfungi. *Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environments* (Seckbach J ed), pp. 323–336. Kluwer Academic, Dordrecht, the Netherlands.
- **Peay**, KG., Kennedy, PG., Bruns, TD. Fungal community ecology: a hybrid beast with a molecular master. *Bioscience* **2008**;58:799–810
- **Price**, PB., Sowers, T. Temperature dependence of metabolic rates for microbial growth, maintenance, and survival. *P Natl Acad Sci USA* **2004**;101: 4631–4636.
- **Price**, PB. Microbial genesis, life and death in glacial ice. *Can J Microbiol*. **2009**; 55:1–11.
- **Ramírez D.**, Ninfa, Serrano R., José Antonio, Sandoval T., Horacio, Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. **2006**; 37:56-71.
- **Ranta**, HM. Effect of simulated acid rain on quantity of epiphytic microfungi on Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles. *Environ Pollut*. **1990**;67: 349–359.
- **Rohde**, RA., Price, PB. Diffusion-controlled metabolism for long-term survival of single isolated microorganisms trapped within ice crystals. *P Natl Acad Sci USA*. **2007**;104: 16592–16597.
- **Rossi** M, Buzzini P, Cordisco L, Amaretti A, Sala M, Raimondi S, Ponzoni C, Pagnoni UM, Matteuzzi D. Growth, lipid accumulation, and fatty acid composition in obligate psychrophilic, facultative psychrophilic, and mesophilic yeasts. *FEMS Microbiol Ecol* **2009**; 69:363–372.
- **Singh**, RS., Saini, GK., Kennedy, JF. Pullulan: microbial sources, production and applications. *Carbohydr Polym*. **2008**;73: 515–531.

- **Sonjak**, S., Frisvad, J.C., Gunde-Cimerman, N. Genetic variation among *Penicillium crustosum* isolates from the Arctic and other ecological niches. *Microb Ecol* **2007a**;54: 298–305.
- **Sonjak**, S., Ursic, V., Frisvad, J.C., Gunde-Cimerman, N. *Penicillium svalbardense*, a new species from Arctic glacial ice. *Antonie van Leeuwenhoek* **2007b**;92: 43–51.
- **Sonjak**, S., Frisvad, J.C., Gunde-Cimerman, N. Fingerprinting using extralite profiles and physiological data shows sub-specific groupings of *Penicillium crustosum* strains. *Mycol Res* **2009**;113: 836–841.
- **Tortora**, G., Funke, B., Case, C. *Introducción a la Microbiología*. Ed. Médica Panamericana, **2007**, 959 pages.
- **Turk**, M., Abramovic, Z., Plemenitas, A., Gunde-Cimerman, N. Salt stress and plasma-membrane fluidity in selected extremophilic yeasts and yeast-like fungi. *FEMS Yeast Res.* **2007**;7: 550–557.
- **Vázquez-Selem**, L., Heine, K. Late Quaternary glaciation in Mexico. J. Ehlers, P.L. Gibbard, P.D. Hughes (Eds.), *Developments in Quaternary Science*. **2011**; 15:849-861.
- **Vadkertiova**, R., Slavikova, E. Killer activity of yeasts isolated from the water environment. *Can J Microbiol.* **1995**;41: 759–766.
- **Wicklów**, D., Malloch, D. Studies in the genus *Thelebolus* temperature optima for growth and ascocarp development. *Mycologia.* **1971**;63: 118–131.
- **Webb**, J.S., Van der Mei, H.C., Nixon, M., Eastwood, I.M., Greenhalgh, M., Read, S.J., Robson, G.D., Handley, P.S. Plasticizers increase adhesion of the deteriorogenic fungus *Aureobasidium pullulans* to polyvinyl chloride. *Appl Environ Microb* **1999**;65: 3575–3581.
- **Zalar**, P., Gostinčar, C., De Hoog, G.S., Uršič, V., Sudhadham, M., Gunde-Cimerman, N. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Stud Mycol.* **2008b**;61: 21–38.