



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y TECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**DETECCIÓN MOLECULAR DE HONGOS FILAMENTOSOS PATÓGENOS
AISLADOS DEL AGUA DE 12 SITIOS DE LA BAHÍA DE PANAMÁ**

**POR:
MORENO-JIMÉNEZ, ANGIE
CIP 8-972-1195**

Trabajo de graduación sometido a consideración por la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales Exactas y Tecnología, como requisito parcial para optar por el título de Licenciada en Biología con especialización en Microbiología y Parasitología.

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ
2025

DEDICATORIA

Este trabajo de graduación quiero dedicárselo primeramente a Dios, por darme la sabiduría, la fuerza y la paciencia para concluir mis estudios de grado, así como la fortaleza para superar cada desafío en este camino académico.

A mis padres, por ser mi refugio en los momentos de incertidumbre, y mi mayor motivación a lo largo de este camino. Gracias por su amor incondicional, por sus palabras de consuelo en situaciones difíciles, por cada sacrificio y por celebrar conmigo cada pequeño logro.

A mis asesores y profesores, por compartir sus conocimientos y orientarme con dedicación. A todas las dificultades que tuve en mi camino, porque gracias a ellas aprendí a ser más fuerte y a valorar cada paso realizado.

¡A todos muchas Gracias!

Angie Moreno-Jiménez

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación e Información de Medicamentos y Tóxicos (CIIMET), dirigido por la directora Mgtr. Hilda Acosta de Patiño, de la Facultad de Medicina, Universidad de Panamá.

Este proyecto forma parte y agradece al megaproyecto más amplio titulado "Detección Molecular y Análisis Filogenético de Virus, Bacteriófagos, Bacterias, Hongos Filamentosos y Parásitos Patógenos en Aire y Agua provenientes de la Bahía de Panamá", financiado por el Fondo de Agua, Áreas Protegidas y Vida Silvestre, con la colaboración de los distinguidos Dr. Alex O. Martínez Torres y Dr. Jordi Querol-Audi, quienes aportaron su experiencia y conocimiento en el desarrollo de la investigación. Además, a la Convocatoria Universitaria de Fondos para la Investigación Año Académico 2022 (CUFI-2022) de la Universidad de Panamá, con Código de Registro de Proyecto (VIP-CEIP-01-04-08-2023-07) por la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado.

Expreso mi más sincero agradecimiento a la Dra. Gesabel Navarro-Velasco por su invaluable guía, compromiso, apoyo a lo largo de este proceso de investigación y su confianza en mis capacidades, incluso en los momentos de duda. Gracias por compartir su conocimiento y experiencia que fueron fundamentales en el desarrollo de este trabajo, motivándome a esforzarme cada vez más.

Al Mgtr. Fermín Mejía, gracias, profesor por el tiempo y la dedicación brindada durante las correcciones de este trabajo de graduación. Sus sugerencias y retroalimentaciones no solo me ayudaron a la mejora continua del proyecto, sino también por estar presente en mi desarrollo académico. Agradezco su acompañamiento constante y el compromiso a lo largo de este proceso.

Estoy agradecida de igual manera con la Mgtr. Ariadna Bethancourt por brindarme sus conocimientos y valiosos aportes que han hecho de este trabajo, un proyecto mucho más integral. Sus enseñanzas como docente, sin duda han sido de mucha ayuda en mi formación.

Quiero agradecer a Carolina Guevara y a las compañeras del laboratorio de Estudios Moleculares y Micología del CIIMET, por su colaboración y apoyo de ensayos realizados a lo largo de la investigación. Sus ayudas hicieron que este proceso fuera más enriquecedor, por lo que valoro enormemente sus contribuciones.

Mi gratitud al Dr. Celestino Aguilar por su importante colaboración en el análisis filogenético. Su disposición y experiencia me han permitido comprender con mayor facilidad esta metodología, obteniendo una solidez de los resultados logrados. Su orientación fue crucial para interpretar eficazmente los datos y avanzar en esta parte del estudio.

RESUMEN

La Bahía de Panamá, debido a su ubicación geográfica estratégica, es un lugar importante para realizar diferentes actividades socioeconómicas que contribuyen al desarrollo del país. Sin embargo, el aumento de estas actividades, así como también el impacto de las comunidades locales, ha generado preocupaciones sobre la calidad del agua, dado que la contaminación puede favorecer la proliferación de hongos filamentosos patógenos emergentes, produciendo enfermedades en individuos inmunocomprometidos. Es por esto, en el presente estudio se llevó a cabo la identificación de características a nivel morfológico y molecular de los principales hongos filamentosos patógenos aislados de muestras de agua provenientes de 12 sitios de la Bahía de Panamá, con el objetivo de determinar las relaciones filogenéticas a nivel molecular y confeccionar una base de datos que incluya los hongos patógenos que pueden provocar un posible riesgo a la salud pública. Para ello, la metodología se basó en una investigación exploratoria-descriptiva, a partir de 12 sitios de muestreo a lo largo de la zona costera de la Bahía de Panamá, cercanos a colectores de aguas servidas, desde la urbanización Costa del Este y Calzada de Amador.

A partir de las secuencias obtenidas de las cepas fúngicas, se consultaron bases de datos públicas para identificar organismos con alta similitud genética, considerando su distribución geográfica. Con esta información, se construyó un árbol filogenético utilizando el modelo evolutivo TIM2e+G4. La construcción del árbol se realizó mediante el método Neighbor-Joining. El total de los hongos filamentosos analizados son 65 cepas fúngicas, se identificaron mediante estudio molecular y análisis filogenético algunos géneros de importancia médica como: *Cladosporium tenuissimum*, *C. colocasiae*, *C. perangustum*, *C. cladosporioides*, *C. halotolerans*, *Aureobasidium melanogenum*, *Talaromyces domesticus*, *T. atrovirens*, *Diaporthe acaciaram*, *Pseudocercospora sordida*, *Neopestalotiopsis formicarum*, *Exophiala oligosperma*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Penicillium menonorum*, *P. chrysogenum*, *P. osmophilum*, *Fusarium nirenbergiae*, *F. oxysporum*. Algunas de las especies identificadas han sido reportadas como agentes fúngicos con alto potencial de patogenicidad en humanos. Se ha vinculado por presentar su amplia distribución y su capacidad de causar desde onicomycosis y queratitis hasta infecciones diseminadas en pacientes inmunosuprimidos. Esto facilitó analizar la similitud entre secuencias halladas para cada cepa fúngica correspondiente con diferentes hongos identificados en estudios previos para la elaboración de árboles filogenéticos.

Palabras clave: hongos filamentosos, patógenos, aguas, ADN genómico, insalubridad, inmunocomprometidos, aguas servidas, carga fúngica.

ABSTRACT

The Panama Bay, due to its strategic geographic location, is an important place for different socioeconomic activities that contribute to the development of the country. However, the increase in these activities, as well as the impact on local communities, has raised concerns about water quality, as contamination may favor the proliferation of emerging filamentous pathogenic fungi, leading to disease in immunocompromised individuals. For this reason, the present study was carried out to identify morphological and molecular characteristics of the main pathogenic filamentous fungi isolated from water samples from 12 sites in the Bay of Panama, in order to determine the phylogenetic relationships at the molecular level and to create a database that includes pathogenic fungi that may cause a possible risk to public health. For this purpose, the methodology was based on an exploratory-descriptive research, from 12 sampling sites along the coastal area of the Panama Bay, near sewage collectors, from the Costa del Este and Calzada de Amador urbanization.

From the sequences obtained from the fungal strains, public databases were consulted to identify organisms with high genetic similarity, considering their geographic distribution. With this information, a phylogenetic tree was constructed using the TIM2e+G4 evolutionary model. The tree was constructed using the Neighbor-Joining method. The total number of filamentous fungi analyzed are 65 fungal strains, some genera of medical importance were identified by molecular study and phylogenetic analysis as: *Cladosporium tenuissimum*, *C. colocasiae*, *C. perangustum*, *C. cladosporioides*, *C. halotolerans*, *Aureobasidium melanogenum*, *Talaromyces domesticus*, *T. atroroseus*, *Diaporthe acaciarum*, *Pseudocercospora sordida*, *Neopestalotiopsis formicarum*, *Exophiala oligosperma*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Penicillium menonorum*, *P. chrysogenum*, *P. osmophilum*, *Fusarium nirenbergiae*, *F. oxysporum*. Some of the identified species have been reported as fungal agents with high potential for pathogenicity in humans. They have been linked for their wide distribution and their ability to cause everything from onychomycosis and keratitis to disseminated infections in immunosuppressed patients. This facilitated the analysis of the similarity between sequences found for each fungal strain corresponding to different fungi identified in previous studies for the elaboration of phylogenetic trees

Key words: filamentous fungi, pathogens, water, genomic DNA, insalubrity, immunocompromised, sewage, fungal load.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	2
AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	4
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS	10
ABREVIATURAS	11
INTRODUCCIÓN	12
OBJETIVOS	14
HIPÓTESIS DE TRABAJO	14
CAPÍTULO I	15
MARCO TEÓRICO	15
1 MARCO TEÓRICO	16
1.1 ANTECEDENTES	16
1.1.1 Hongos	16
1.1.2 Hongos filamentosos	17
1.1.3 Estructuras y reproducción de los hongos	17
1.1.4 Nutrición de los hongos	26
1.1.5 Diversidad de los hongos	27
1.1.6 Taxonomía e identificación de los hongos	27
1.1.7 Hongos patógenos	30
1.1.8 Infecciones causadas por los hongos (casos relevantes)	31
1.1.9 Géneros de importancia médica	34
CAPÍTULO II	39
METODOLOGÍA	39
2. METODOLOGÍA	40
2.1 Procedencia de las muestras y diseño experimental del estudio	40
2.2 Preparación de medios	41
2.3 Proceso de reactivación de cepas fúngicas almacenadas	42
2.4 Etapa 1. Identificación Morfológica	43
2.4.1 Identificación Macroscópica	43
2.4.2 Identificación Microscópica	43
2.5 Etapa 2. Identificación molecular	44
2.5.1 Extracción de ADNg	45
2.5.2 Amplificación por PCR a punto final	47

2.5.3 Secuenciación del ADNg	48
2.5.4 Árbol filogenético	49
CAPÍTULO III	51
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
3.1 Resultados	52
3.1.1 Identificación macroscópica y microscópica	52
3.1.2 Identificación macroscópica de hongos filamentosos	55
3.1.3 Identificación microscópica de hongos filamentosos	63
3.1.4 Identificación molecular	70
3.2 DISCUSIÓN	83
CAPÍTULO IV	89
CONCLUSIONES	90
RECOMENDACIONES	92
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	93
ANEXO	105

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de reproducción sexuada y asexuada de los hongos.	18
Figura 2. Esquema representando el desarrollo y formación de una hifa en el medio ambiente.	19
Figura 3. Esquema ultraestructural de los hongos filamentosos y levaduriformes.	19
Figura 4. Esquema de las partes estructurales que conforman un conidióforo.	20
Figura 5. Esquema representativo de un conidióforo.	20
Figura 6. Esquema de las partes estructurales que conforman un esporangióforo.	22
Figura 7. Esquema de las partes estructurales que conforman una clamidoconidios.	22
Figura 8. Esquema de las partes estructurales de pseudohifas.	23
Figura 9. ¿Cómo difiere la diversidad de especies entre animales, plantas y hongos?	27
Figura 10. Sitos de Muestreo.	41
Figura 11. Características macroscópicas y microscópicas de hongos aislados provenientes del agua de la Bahía de Panamá.	52
Figura 12. Tasa de crecimiento de las colonias de cepas de hongos estudiados.	54
Figura 13. Características morfológicas macroscópicas de hongos filamentosos aislados del agua de la Bahía de Panamá, observados en medio de cultivo PDA.	55
Figura 14. Morfología macroscópica de los tipos de texturas del micelio de las colonias fúngicas en medio de cultivo PDA.	55
Figura 15. Presencia de exudados en las colonias fúngicas cultivadas en medio PDA.	56
Figura 16. Presencia de pigmentos en las colonias fúngicas cultivadas en medio PDA.	56
Figura 17. Morfología macroscópica de las cepas de hongos estudiados.	57
Figura 18. Características morfológicas microscópicas de hongos filamentosos aislados del agua de la Bahía de Panamá, observadas en medio de cultivo PDA.	63
Figura 19. Morfología microscópica de cepas de hongos estudiados. Parte I.	64
Figura 20. Porcentaje de mayor prevalencia de cepas estudiadas.	69
Figura 21. Diversidad de géneros por sitios analizados de acuerdo con el índice de Shannon en este estudio.	70
Figura 22. Análisis de electroforesis en gel agarosa 0.7% de los ADNg para verificar la integridad, la calidad y pureza.	73
Figura 23. Análisis de electroforesis en gel agarosa 1%. Se observa los productos de PCR, utilizando los primers ITS5 e ITS4.	74

Figura 24. Análisis de electroforesis en gel agarosa 1%. Se observa los productos de PCR, utilizando los primers ITS5 e ITS4.	74
Figura 25. Fragmento de cromatograma en la región ITS por géneros de cepas fúngicas analizadas.	75
Figura 26. Árbol filogenético basado en secuencias de la región ITS de las cepas estudiada basada en el análisis de Máxima Parsimonia.	76
Figura 27. Árbol filogenético de la región ITS de <i>C. halotolerans</i> , <i>C. cladosporioides</i> , <i>C. perangustum</i> , <i>C. tenuissimum</i> y <i>C. colocasiae</i> mediante el programa IQ-TREE.	77
Figura 28. Árbol filogenético de la región ITS de <i>A. melanogenum</i> mediante el programa IQ-TREE.	78
Figura 29. Árbol filogenético de la región ITS de <i>T. domesticus</i> , <i>T. atroseus</i> mediante el programa IQ-TREE.	78
Figura 30. Árbol filogenético de la región ITS de <i>D. acaciarum</i> mediante el programa IQ-TREE.	79
Figura 31. Árbol filogenético de la región ITS de <i>Pseudocercospora sordida</i> mediante el programa IQ-TREE.	79
Figura 32. Árbol filogenético de la región ITS de <i>T. longibrachiatum</i> mediante el programa IQ-TREE.	80
Figura 33. Árbol filogenético de la región ITS de <i>N. formicarum</i> mediante el programa IQ-TREE.	80
Figura 34. Árbol filogenético de la región ITS de <i>P. menonorum</i> , <i>P. osmophilum</i> , <i>P. chrysogenum</i> mediante el programa IQ-TREE.	81
Figura 35. Árbol filogenético de la región ITS de <i>E. oligosperma</i> mediante el programa IQ-TREE.	82
Figura 36. Árbol filogenético de la región ITS de <i>F. nirenbergiae</i> y <i>F. oxysporum</i> mediante el programa IQ-TREE.	82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Esquema de sitios de muestreo con las características y condiciones ambientales.	40
Tabla 2. Reactivos y condiciones utilizadas para realizar la amplificación del ADN genómico fúngico mediante la técnica de PCR.	47
Tabla 3. Programación del termociclador utilizado para la amplificación de la región ITS mediante la técnica de PCR.	48
Tabla 4. Preparación de las muestras cargadas con electroforesis en gel de Agarosa 1% para muestras de producto de PCR.	48
Tabla 5. Tasa o Tamaño de crecimiento limitado (lento) o invasivo (moderada a rápida) de las colonias de las cepas estudiadas.	53
Tabla 6. Descripción de las características morfológicas de las cepas de hongos estudiados.	60
Tabla 7. Descripción microscópica de las cepas de hongos filamentosos.	67
Tabla 8. Identificación taxonómica de las cepas de hongos estudiados.	71

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNg: Ácido Desoxirribonucleico genómico.

ADNr: Ácido Desoxirribonucleico ribosómico.

BLASTn: Basic Local Alignment Search Tool nucleotides. Herramienta en línea utilizada para comparar secuencias de ADN y buscar similitudes en bases de datos de secuencias.

bp: Base pair (par de bases).

cf: comparar con.

dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfato.

g: gramos, unidad de masa en el sistema métrico.

GenBank: National Center for Biotechnology Information

IFI: Infecciones fúngicas invasivas.

ITS: Espaciador transcrito interno (Internal Transcribed Spacer)

Kbp: Kilobase.

LAMA: Laboratorio de Microbiología de Aguas.

LAMEXA: Laboratorio de Microbiología Experimental y Aplicada.

LB: Loading buffer (buffer de carga).

MEA: Malt Extract Agar (Agar de Extracto de Malta).

MgCl₂: Cloruro de magnesio.

MINSA: Ministerio de Salud.

mL: mililitro, medida de volumen del sistema métrico.

MPM: Marcador de peso molecular.

NCBI: National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Información Biotecnológica).

ng: nanogramos, es una unidad de medida que indica una masa igual a una milmillonésima parte.

Outgroup: Grupo externo, en un análisis filogenético, es el grupo que se usa como referencia para determinar la dirección de los cambios evolutivos en el grupo de estudio.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PDA: Potato Dextrose Agar (Agar de Dextrosa de Patata).

qPCR: PCR en tiempo real.

RNaseA: endorribonucleasa que hidroliza el ARN 3' de los residuos de pirimidina y escinde el enlace fosfodiéster al nucleótido adyacente.

rpm: revoluciones por minuto, se utiliza para medir la velocidad de rotación de un eje, como el de un motor o un disco duro.

s: Segundo

sp: es la abreviatura de especie, se usa cuando se menciona un organismo, pero no se especifica su especie exacta, por ejemplo, *Aspergillus* sp.

spp: es la abreviatura de especies, se usa cuando se hace referencia a varias especies dentro de un mismo género, por ejemplo, *Aspergillus* spp. (para varias especies de *Aspergillus*).

Taq Pol: ADN polimerasa Taq.

TBE: Tampón Tris-Borato-EDTA.

μL: microlitro, medida del volumen de un líquido en el sistema métrico.

INTRODUCCIÓN

La Bahía de Panamá desde que inició la urbanización de la actual ciudad de Panamá ha sido uno de sus más importantes atractivos turísticos. En décadas pasadas los ciudadanos podían gozar de sus playas que, por lo general, se encontraban cerca de áreas urbanas. Las mismas han desaparecido en su totalidad debido a rellenos por la demanda de una expansión urbanística y las playas que aún quedan sufren un gran grado de contaminación por desagües de aguas residuales y pluviales, limitando su atractivo turístico.

El incremento en la importancia de la contaminación marina para la salud de los ecosistemas costeros está íntimamente vinculado con el aumento de la población y el desarrollo de varias actividades económicas. Las acciones incorrectas en la gestión de residuos sólidos y líquidos derivados de fuentes domésticas, agrícolas e industriales aportan de manera considerable a la degradación del medio marino, provocando consecuencias ecológicas, socioeconómicas y de salud pública. Por lo tanto, la existencia de hongos que podrían ser patógenos en aguas crudas supone un peligro significativo, dado que, frente a condiciones favorables del hospedero, pueden colonizar, infectar y causar graves problemas de salud, especialmente en grupos vulnerables.

En la actualidad, los países de la región Centroamericana, incluyendo a Panamá, no cuentan con un programa o metodologías que permitan evaluar los problemas asociados a contaminación microbiológica ambiental, principalmente a nivel de hongos filamentosos patógenos asociados a animales. Para proteger este recurso natural que es parte de la economía del país por los visitantes turistas, las zonas de recreo y la salud pública, es fundamental conocer la diversidad y cantidad de hongos filamentosos que se encuentran en estas aguas porque pueden ser potencialmente peligrosos para la salud humana.

Las investigaciones sobre la detección de hongos en agua son escasas y se basan principalmente en métodos de identificación morfológica tradicionales. Estos métodos a menudo requieren identificar la especie del hongo para determinar si es el responsable de la infección. Para validar los hallazgos de la identificación morfológica, es necesario agregar técnicas de identificación molecular, por esta razón, esta propuesta se desarrolló como un estudio exploratorio-descriptivo, que propone el empleo de herramientas de identificación morfológica clásica, molecular y el análisis filogenético, proporcionando un importante aporte para confirmar los trabajos de investigación científicas de la Universidad de Panamá.

Por ello, este estudio tiene como objetivo detectar e identificar a nivel morfológico y molecular las especies de hongos filamentosos patógenos aislados de muestras de agua provenientes de 12 sitios de la Bahía de Panamá, mediante enfoques morfológicos y moleculares. Con el fin, en primer lugar, identificar mediante técnicas morfológicas las cepas de los principales hongos filamentosos patógenos en las muestras de agua de la Bahía de Panamá, caracterizar a nivel molecular, mediante la amplificación y secuenciación de las regiones conservadas ITS de cepas fúngicas a nivel de género y de especie. Asimismo, determinar las relaciones filogenéticas entre las especies de hongos filamentosos caracterizados a nivel molecular y confeccionar una base de datos a nivel macro y micromorfológico de las cepas de los principales hongos filamentosos identificadas en las muestras de agua de la Bahía de Panamá.

Esta investigación se estructura en varios capítulos que tratan de manera progresiva los diferentes componentes del estudio. El Capítulo I se refiere al marco teórico, en la que se expone los antecedentes significativos como estudios previamente realizados, ideas fundamentales y la base científica que respalda la investigación sobre los hongos filamentosos patógenos, taxonomía e identificación, géneros de importancia médica y las infecciones causadas por los hongos. El Capítulo II describe la metodología utilizada, especificando el tipo de investigación exploratorio-descriptiva, procedencia de las muestras examinadas, así como los procedimientos y técnicas empleados para la identificación morfológica y molecular. El Capítulo III contiene los resultados y discusión alcanzados sobre los datos obtenidos, acompañados de figuras, cuadros y explicaciones que representan los descubrimientos más significativos. El Capítulo IV explica las conclusiones extraídas de la investigación, las recomendaciones para futuros estudios y anexos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Detectar a nivel morfológico y molecular las especies de hongos filamentosos patógenos aislados de muestras de agua provenientes de 12 sitios de la Bahía de Panamá.

Objetivos específicos

- Identificar mediante morfología las cepas de los principales hongos filamentosos patógenos en las muestras de agua de la Bahía de Panamá.
- Caracterizar a nivel molecular, mediante la amplificación y secuenciación de las regiones conservadas *ITS* de cepas fúngicas a nivel de género y de especie.
- Determinar las relaciones filogenéticas entre las especies de hongos filamentosos caracterizados a nivel molecular.
- Confeccionar una base de datos a nivel macro y micromorfológico de las cepas de los principales hongos filamentosos identificadas en las muestras de agua de la Bahía de Panamá.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Ha: Se confirma la presencia de hongos filamentosos patógenos aislados de muestras de agua provenientes de 12 sitios de la Bahía de Panamá.

Ho: No se confirma la presencia de hongos filamentosos patógenos aislados de muestras de agua provenientes de 12 sitios de la Bahía de Panamá.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1 MARCO TEÓRICO

1.1 ANTECEDENTES

1.1.1 Hongos

Los hongos han estado en la historia de la Tierra y sus habitantes, siendo protagonistas entre los primeros organismos eucarióticos desde la llegada de los seres vivos. Se pueden encontrar en la naturaleza, en todos los hábitats terrestre, acuático y aéreo (Ausworth *et al*, 2008). Antiguamente los hongos fueron considerados como plantas inferiores en la categoría de las criptógamas y en la división (Phylum) "Thallophita", al no realizar fotosíntesis, característica esencial de las plantas los ubicaron en su propio reino Fungae o Fungi, del latín fungus que quiere decir hongo, por ello, 1969 Robert Harding Whittaker agrupó a los seres vivos en cinco reinos (Mónera, Protista, Fungae, Plantae y Animalia), en 2002, Kendrick, teniendo en cuenta también la inmunología y la biología molecular, clasificó a los seres vivos en siete reinos (Archeabacteria, Eubacteria, Chromista, Protozoa, Fungi, Plantae y Animalia), los dos primeros tienen células procariontes y, los demás son eucariontes (Estrada & Ramírez, 2019; Cepero, 2012). Los hongos se originaron como un grupo distintivo de eucariotas unicelulares en el Precámbrico. Estimaciones recientes del origen del reino fúngico basadas en el análisis de relojes moleculares que van desde hace 760 millones de años hasta hace 1.060 millones de años (Money *et al.*, 2016).

La mayoría de los hongos poseen escaso poder patógeno, sin embargo, algunas especies han logrado adaptarse a las condiciones desfavorables impuestas por el huésped y desarrollarse en sus tejidos. Los patógenos deben poseer ciertas características que les permitan sobrevivir en tal ambiente, así como mecanismos para evadir las defensas del huésped. Las formas de virulencia de un microorganismo dependen tanto de las características del microorganismo como del propio hospedero, por lo que el establecimiento de una enfermedad infecciosa depende del estrecho equilibrio entre el hospedero y el microorganismo (Clemons & Stevens, 2000; Casadevall & Pirofski, 2001).

Actualmente, se ha observado un incremento de las infecciones por hongos porque forman parte del microbiota del ser humano, o bien, por aquellos hongos considerados saprótrofos y que se encuentran en el ambiente colonizando una gran diversidad de sustratos (suelo, agua o aire). Estos hongos, en situaciones de inmunodeficiencia del hospedero, pueden colonizar, infectar y producir enfermedad, incluso llevarlo a la muerte (Webster & Weber, 2009).

En la segunda mitad del siglo XX, las enfermedades por hongos se convirtieron en un problema médico importante, cuando los avances de la medicina moderna junto con la epidemia del VIH provocaron que un gran número de personas tuvieran la inmunidad deteriorada. Esta inmunidad deteriorada es causada por

otros problemas de la salud como el asma, SIDA, cáncer, trasplantes de órganos y terapias con corticosteroides.

Es probable que en el futuro cercano aumente la prevalencia de enfermedades fúngicas (Casadevall, 2018). Las enfermedades causadas por hongos son difíciles de controlar porque son crónicas, difíciles de diagnosticar y de erradicar con medicamentos antimicóticos. Más de 1,5 millones de personas mueren a causa de enfermedades fúngicas y más de mil millones sufren consecuencias (Bongomin et al., 2017). A pesar de que la mayoría de las muertes por micosis son evitables, siguen siendo un tema descuidado por las autoridades de salud pública.

1.1.2 Hongos filamentosos

Los hongos son organismos eucariotas únicos debido a sus características morfológicas, fisiológicas y genéticas, las mismas presentan características ubicuas y pueden colonizar cualquier matriz del entorno natural, desempeñando un papel importante en el mantenimiento de los ecosistemas. Dada la variedad de matrices, los ambientes acuáticos, tanto marinos como de agua dulce, también están constantemente colonizados por hongos. El gran éxito en la evolución de este grupo heterogéneo de organismos se debe a la gran cantidad de especies, la diversidad de nichos y hábitats ocupados, y la simbiosis (mutualista y patológica) con otros organismos, principalmente plantas, depende de su capacidad para sobrevivir (Anastasi et al., 2013).

Estos organismos eucariotas pueden presentar diferentes tipos de micelios tanto multicelulares como unicelulares, los hongos multicelulares (llamados hongos filamentosos o mohos), están compuestas de hifas filamentosas, y el conjunto de hifas recibe el nombre de micelio. Las hifas pueden estar divididas en partes generalmente multinucleadas mediante septos perforados denominadas hifas septadas o pueden no tener ningún septo denominadas cenocíticas (Carrillo & Bejarano, 2007; Estrada & Ramírez, 2019). El crecimiento filamentoso que forma hebras de micelio es una gran ventaja para la colonización del suelo donde la distribución de los nutrientes no es homogénea, es decir, estos actúan como vías para el paso de estos nutrientes que a su vez crea una red que enlaza los recursos (Baldrian, 2008). Estas estructuras son las unidades básicas de los hongos y presentan paredes celulares conformadas de quitina.

1.1.3 Estructuras y reproducción de los hongos

Los hongos para mantener su capacidad de adaptación deben poder reproducirse fácilmente. Los mismos se reproducen por medio de esporas asexuales y/o sexuales y, en casos especiales, a través de pequeños fragmentos de micelio (ver Figura 1). La reproducción involucra la formación de nuevos

individuos que posean todas las características de la especie y puede ser de dos tipos: asexual y sexual. La asexual en hongos inferiores levaduras y microhongos hay presencia de conidióforos. En la sexual en hongos superiores hay presencia de cuerpo fructíferos; por otra parte, algunos hongos presentan ambos: la reproducción asexual se denomina anamorfa o mitospórica y la reproducción sexual o también conocida como perfecta se conoce como teleomorfa. Cuando presentan ambas formas de reproducción se denominan holomorfos (Arenas, 2014).

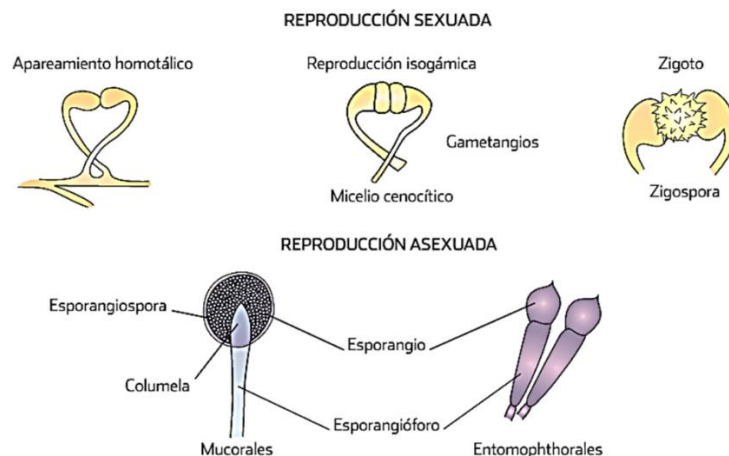


Figura 1. Esquema de reproducción de sexual y asexual de los hongos. Microorganismos cuya morfología y ciclos de vida pueden presentar talo proveniente de una sola espota y se llama homotático. Si los gametos son iguales, la reproducción es isogámica, el elemento de la fusión se denomina zigoto, y la espota, zigospora. Ésta es la reproducción sexual en zigomicotina. Modificada de Deacon JW. Introducción a la micología médica moderna. México: Noriega Limusa, 1988.

A través de su reproducción los hongos producen esporas, que son estructuras resistentes en condiciones adversas lo que le permite al hongo sobrevivir y colonizar otros lugares si los factores abióticos favorecen la germinación. Además, los hongos pueden multiplicarse indefinidamente dependiendo de los recursos disponibles y de las condiciones favorables de desarrollo (Carrillo & Bejarano, 2007).

Los hongos multicelulares están compuestos de hifas filamentosas, y el conjunto de hifas recibe el nombre de micelio. Las hifas pueden estar divididas en partes generalmente multinucleadas mediante septos perforados llamadas hifas septadas o pueden no tener ningún septo denominadas cenocíticas (Carrillo & Bejarano, 2007; Estrada & Ramírez, 2019). Las hifas tabicadas, presentan tabiques o septos a intervalos regulares. Los hongos más evolucionados tienen hifas tabicadas que ayudan a evitar la desecación y contribuyen a la diferenciación celular (ver Figura 2). Estas estructuras también permiten que el micelio se divida, lo que facilita la reparación y la contención de daños localizados (Riera et al., 2019). Estas hifas tienen una pared celular conformadas de quitina y b-glucanos, esta proporción varía según la posición sistemática de los hongos. Algunos hongos cuentan con una pared contiene una gran cantidad

de quitina (N-acetil glucosamina), mientras que otras contienen complejos polisacáridos y proteínas, donde la cisteína es el principal componente. La rigidez de la estructura del hongo se debe a estos compuestos.

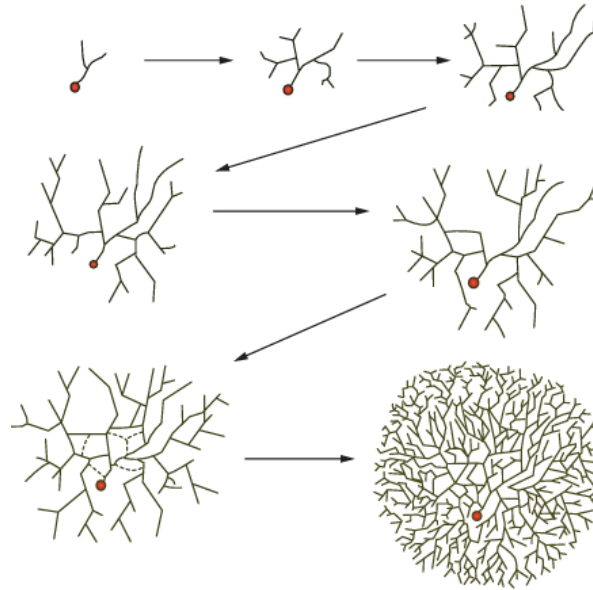


Figura 2. Esquema representando el desarrollo y formación de una hifa en el medio ambiente. Modificada de Cours superieur de mycologie médicale. Paris. Institut Pasteur, 1980.

El citoplasma avanza por la extensa pared celular del micelio de mohos para dispersarse y buscar nutrientes (Carrillo & Bejarano, 2007; Estrada & Ramírez, 2019). La membrana celular contiene orgánulos, material citoplasmático y núcleos, estas estructuras son las unidades básicas de los hongos (ver Figura 3). Todos los hongos, excepto las especies del género *Pneumocystis*, tienen ergosterol en su membrana celular, un lípido muy parecido al colesterol de las células humanas. Este esteroide puede utilizarse para la identificación y cuantificación de géneros fúngicos, y sirve como sitio diana para los antifúngicos del grupo de los azoles, alilaminas y polienos que tienen actividad fungistática o fungicida (Riera et al., 2019).

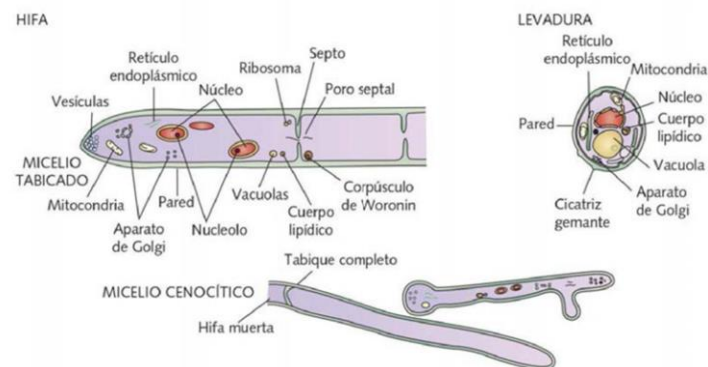


Figura 3. Esquema ultraestructural de los hongos filamentosos y levaduriformes. Modificada de Cours superieur de mycologie médicale. París. Instituto Pasteur, 1980.

En algunos hongos, una **pseudohifa** es una estructura formada por una cadena de células. Esta estructura se produce cuando las células hijas generadas por gemación se unen a la célula madre, lo que da la impresión de hifas, pero no son hifas verdaderas (Riera et al., 2019).

Los **conidióforos** son estructuras especializadas de algunos hongos filamentosos que se encargan de producir y liberar conidios (ver Figura 4). La reproducción y dispersión del hongo están a cargo de esporas asexuales llamadas conidios, que nacen directamente del micelio o dentro de cuerpos fructíferos (Cepero et al., 2012).

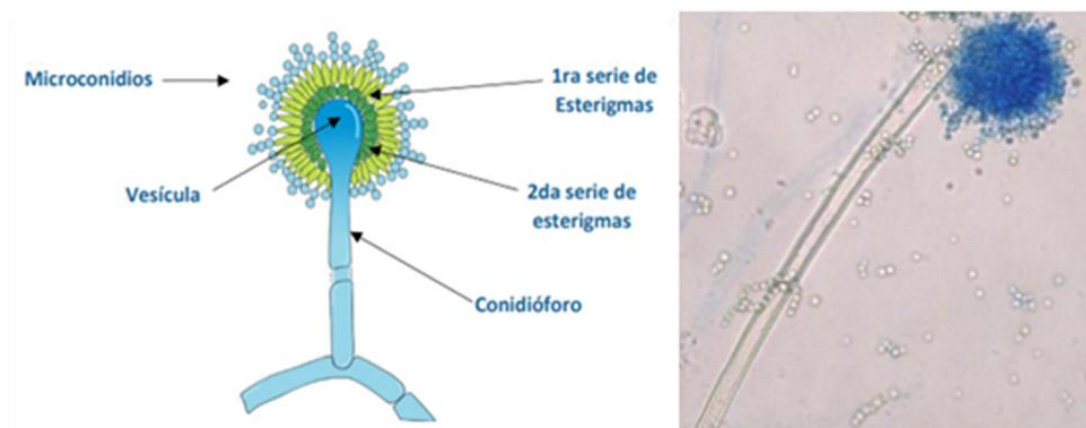


Figura 4. Esquema de las partes estructurales que conforman un conidióforo. Estructuras de conidióforo tipo *Aspergillus* sp. y Micromorfología a 40X. Tomado de Repositorio institucional por Ascencio et al., 2021.

Estas estructuras especializadas, que producen conidios de manera asexual, presentan variaciones significativas en cuanto a su forma, tamaño y disposición, lo que permite diferenciar entre géneros y especies (ver Figura 5) (Cepero et al., 2012).

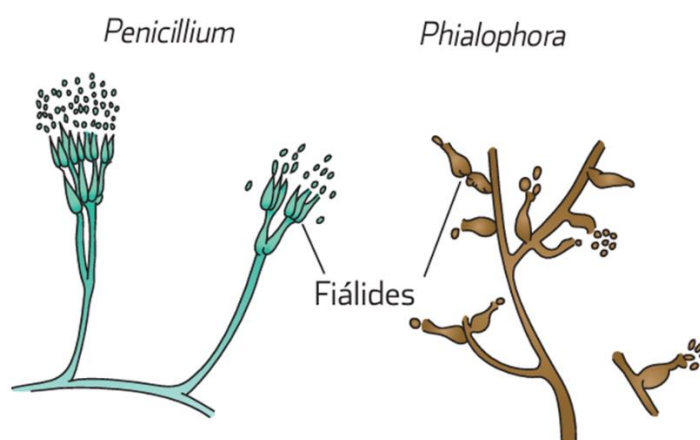


Figura 5. Esquema representativo de un conidióforo. a) muestra un conidióforo de *Penicillium* sp. b) muestra un conidióforo de *Phialophora* sp. Tomado de Eubacteria, por Gallego, E., 2016.

Reproducción asexual

Los mohos se reproducen asexualmente en la mayoría de los casos y las estructuras sexuales sólo aparecen cuando las circunstancias son favorables o se encuentran micelios de distinta polaridad (Carrillo & Bejarano, 2007). Son numerosos los hongos que comparten ambos tipos de reproducción y se integran simultáneamente en dos divisiones diferentes. Los Ascomycetes, Zygomycetes y algunos Basidiomycetes también exhiben reproducción anamórfica (Muñoz et al., 2016). En micología médica se suele emplear el nombre que identifica la forma de reproducción asexual, dejando el resto de las complejidades de la taxonomía de los hongos a los micólogos (Zubeldia et al., 2021).

La reproducción se lleva a cabo a través de esporas producidas por una célula especializada o una conidiógena, las cuales son externas y se llaman conidios, y solo las endosporas o esporangiosporas son internas en los Zigomicotas (Arenas, 2014; Carrillo & Bejarano, 2007). Una estructura diferente que sostiene una o más células conidiógenas se llama conidióforo, y el proceso se llama conidiogénesis.

La reproducción asexual es crucial para la propagación de la especie porque permite la producción de numerosos individuos, especialmente porque el ciclo asexual se repite varias veces al año (Ugalde, 2013). La ventaja de este tipo de reproducción es el gran número de esporas que se forman y la rapidez con que se lleva a cabo el proceso. Los hongos filamentosos pueden reproducirse simplemente fragmentando las hifas o creando estructuras especializadas (células conidiógenas o esporangios). Por otro lado, las levaduras pueden reproducirse mediante gemación, fisión binaria o fragmentación (Uribarren et al., 2016).

Hay formaciones que se distinguen por la presencia de algunas de las formas de reproducción asexual más comunes: un **esporangio**, estructura con forma comúnmente globosa que presenta una membrana simple que contiene muchas esporas, generalmente en el extremo de un esporóforo (ver Figura 6). Los esporangios (merosporangios) son aquellos que tienen pocas esporas. Las clamidosporas y los **esclerocios**, que están formados por un conjunto macroscópico de hifas apelmazadas como un tejido, y son estructuras de resistencia (Carrillo & Bejarano et al., 2007).

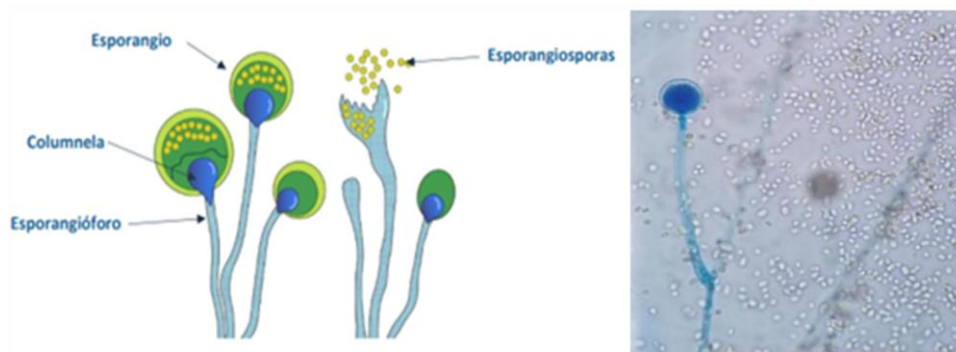


Figura 6. Esquema de las partes estructurales que conforman un esporangióforo. Características de *Mucor* sp., y muestra de examen directo teñido con azul de algodón lactofenol al 40x. Adaptado de Repositorio institucional por Ascencio et al., 2021.

Las **conidias** son estructuras que se producen por una célula especializada conocida como célula conidiógena. Esta célula también puede provenir directamente de una hifa vegetativa o de estructuras distintas. Algunos hongos producen conidias que presentan diferencia de tamaños entre pequeñas y grandes, conocidas como macroconidias y microconidias pequeñas. Las **clamidosporas** (clamidoconidias) son comunes en todos los tipos de hongos y se forman a través de la condensación del citoplasma y el espesamiento de la pared celular; forman formas de reproducción (Delgado et al., 1994). Son estructuras de resistencia con paredes gruesas que producen la levadura cuando se encuentran en ambientes adversos (ver Figura 7). Estos pueden encontrarse modificando una célula hifal preexistente de reproducción en forma intercalar o terminal (Ascencio et al., 2021).

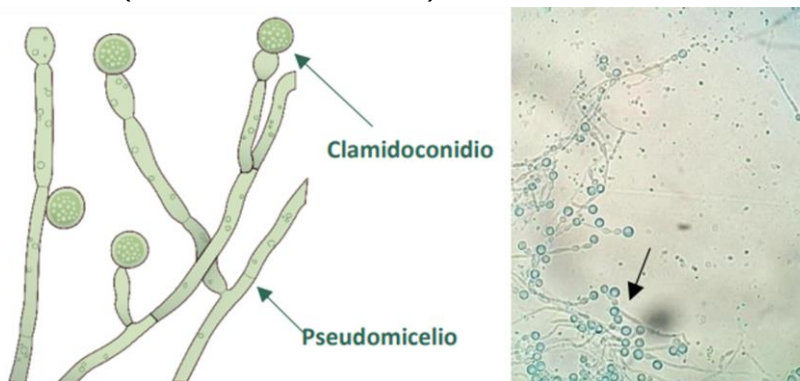


Figura 7. Esquema de las partes estructurales que conforman una clamidoconidios. Características de *Candida dubliniensis*, y muestra de exámen directo teñido con azul de algodón lactofenol al 40x. Tomado de Repositorio institucional por Ascencio et al., 2021.

Por otro lado, las **blastosporas** son conidios que se forman a partir de la gemación o blastogénesis de una célula conidiógena que permanece fija. Se pueden encontrar aislados, en racimos o cadenas (Arenas, 2014). Las **fialosporas** se desarrollan en una célula conidiógena en forma de florero llamada fiálide. Su base es ensanchada, tiene un cuello terminal y un collarrete. Es posible que estén en un conidióforo o directamente en la hifa vegetativa o que

estén en un conidióforo complejo (Arenas, 2014). Las **anelosporas** es el primer conidio se forma en la extremidad de la célula conidiógena como un simple ensanchamiento, pero cada nuevo conidio se produce por gemación a través de la cicatriz en forma de anillo que deja el conidio anterior (Arenas, 2014). Los **artroconidios** (artrosporas) se producen mediante la fragmentación de la hifa en células individuales (Estrada & Ramírez, 2019). Después de cinco a diez días de crecimiento, se observan estructuras en forma de barril con paredes gruesas de 2,5-4,3 x 3-8 μm , libres o intercaladas con una célula vacía a lo largo de la hifa, lo que permite la identificación del hongo (Riera et al., 2019).

La gemación es la producción de gemas en una posición polar, y ocasionalmente por fisión dependiendo de la especie. En medios limitados la gemación puede producir células alargadas que, cuando se alinean a lo largo del plano de división, parecen una hifa. Sin embargo, estas células se llaman **pseudohifas** o también conocidas como hifas falsas (ver Figura 8). Sin embargo, también se pueden formar algunas hifas verdaderas (Méndez-Tovar et al., 2010).

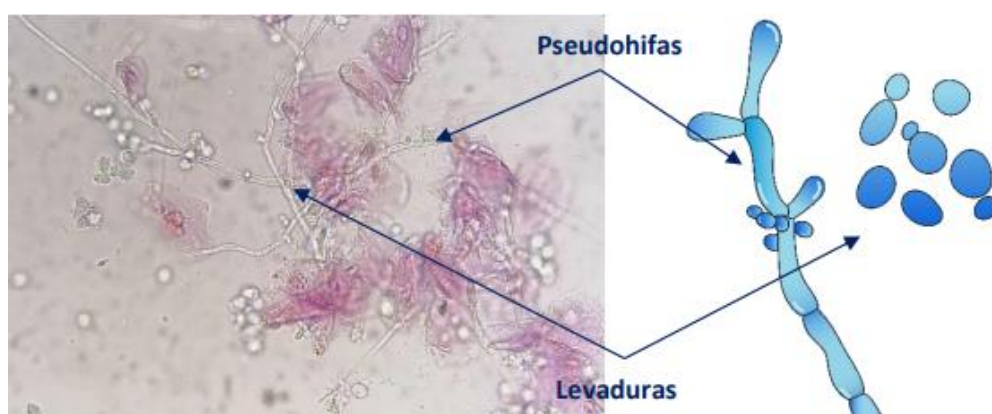


Figura 8. Esquema de las partes estructurales de pseudohifas. Muestra examinada con hidróxido de potasio al 40X. Tomado de Repositorio institucional por Ascencio et al., 2021. Identificación de hongos oportunistas de interés clínico.

Reproducción sexual

La reproducción sexual en los hongos es menos frecuente que la asexual y está regulada por factores ambientales, nutricionales y genéticos, y ocurre cuando las condiciones son adecuadas (Ugalde, 2013). La recombinación genética es responsable de la creación de nuevos genotipos y permite que los hongos se adapten a una variedad de ambientes (Cepero et al., 2012). La reproducción sexual o perfecta de los hongos se produce en los órganos sexuales, llamados gametangios, éstos pueden formar células sexuales diferenciadas llamadas gametas, o en su lugar pueden contener uno o más núcleos gaméticos. El término isogametangia e isogametas indica gametangios y gametas que son morfológicamente iguales; heterogametangia y heterogametas indica

gametangios y gametas masculinos y femeninos morfológicamente diferentes (Estrada & Ramírez, 2019).

La diferenciación sexual ocurre al principio del ciclo de reproducción sexual y en algunos hongos pueden ocurrir procesos fisiológicos como la telemorfosis y el cigotropismo, ambos controlados por feromonas, siendo la creadora de la formación de estructuras especializadas de apareamiento (Cepero et al., 2012; Carrillo & Bejarano, 2007).

Después de esta etapa inicial de diferenciación morfológica y de reconocimiento, la pared de las dos células especializadas se disuelve, lo que fusiona sus citoplasmas, permitiendo que los núcleos haploides de las dos células compatibles se encuentren en el mismo citoplasma, esta etapa se llama plasmogamia. Después de la plasmogamia, el hongo pasa de una condición monocariótica, es decir, con núcleos genéticamente uniformes, a una condición dicariótica. Luego de esta etapa, se produce la cariogamia, que es la fusión de dos núcleos haploides compatibles para formar el núcleo diploide ($2n$). Por lo tanto, dos núcleos haploides darán lugar a cuatro nuevos núcleos recombinados haploides (n). En la última fase, conocida como meiosis, ocurre una recombinación de ADN y entrecruzamientos en los cromosomas, lo que conduce a la formación de núcleos haploides que, a su vez, forman las esporas sexuales haploides (basidiosporas y ascosporas) a través de la esporogénesis. La ventaja de este tipo de reproducción es el gran número de esporas que se forman y la rapidez con que se lleva a cabo el proceso.

El reino Fungi incluye a los hongos verdaderos, organismos eucariotas que se reproducen tanto sexual como asexualmente, dependiendo de la especie y las condiciones ambientales. Actualmente, el reino se clasifica en varios filos principales, entre ellos: Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Mucoromycota y Zoopagomycota, reemplazando a la antigua categoría de Zygomycota, que ha sido desestimada por no representar un grupo monofilético (Spatafora et al., 2016).

En el filo **Ascomycota**, la reproducción puede ocurrir de manera sexual o asexual. La reproducción asexual implica la creación de esporas llamadas conidios directamente a partir de las hifas, sin la creación de un cuerpo fructífero; que posteriormente, se esparcen por varias vías (Kuhar et al., 2021). Cuando se presenta la reproducción sexual en un área del cuerpo fructífero se forma un tejido fértil en donde los ascomicetos producen esporas sexuales denominadas ascosporas, las mismas se encuentran ubicadas dentro de los ascos, que generalmente se encuentran en un cuerpo fructífero llamado ascoma, siendo esta una de las características más representativas de este grupo de hongos. Existen diferentes formas de ascomas, por ejemplo, el denominado apotecio que

se distingue por presentar la forma de una copa, como ocurre en (*Cookeina speciosa*). También puede ser estructuras globosas cerradas que se conocen como cleistotecio o en ocasiones el ascoma tiene forma de pera con una abertura llamadas ostiolo (Carrillo & Bejarano, 2007).

El filo **Basidiomycota**, se producen sus esporas sexuales conocidas como basidiosporas ubicadas sobre los basidios que se encuentran en un cuerpo fructífero llamado basidioma. Estos basidios suelen ser de gran tamaño y luego se denominan setas, o bejines si son redondos (Carrillo & Bejarano, 2007). Las basidiosporas germinan para formar micelios haploides de un solo núcleo, también conocidos como micelios primarios, en un ciclo sexual típico. Estos micelios tienen una vida corta debido a la plasmogamia rápida. Después de la plasmogamia, los hongos del filo Basidiomycota experimentan una etapa prolongada de crecimiento del micelio dicarion o secundario, con mitosis en los núcleos compatibles (Cepero et al., 2012). El micelio dicariótico, también conocido como micelio secundario, surge como resultado de este evento y se desarrolla el cuerpo fructífero, también conocido como basidioma, en cuyo himenio se desarrollarán los basidios. Estos basidios son dicarióticos al principio, pero pronto experimentan cariogamia, lo que da como resultado un solo núcleo diploide. Después, se realizan las dos fases de la división meiótica, lo que da como resultado la formación de cuatro núcleos haploides. Mientras tanto, a medida que madura el basidio, cambia su forma y forma esterigmas, prolongaciones de su citoplasma, hacia las cuales migrarán los cuatro núcleos para formar las basidiosporas.

La antigua clasificación del filo **Zygomycota** ha sido descartada, ya que estudios filogenéticos basados en datos genómicos demostraron que no constituye un grupo monofilético. En su lugar, los hongos anteriormente agrupados en este filo han sido reclasificados en dos filos principales: Mucoromycota y Zoopagomycota. Mucoromycota incluye hongos micorrízicos, saprótrofos y algunos patógenos, mientras que Zoopagomycota agrupa principalmente parásitos de pequeños animales, protistas y otros hongos. Esta nueva clasificación refleja de manera más precisa la diversidad y evolución del reino Fungi.

Los hongos del filo **Chytridiomycota** tienen hábitats acuáticos como estuarios, arroyos y cuerpos de agua marinos, lo que les permite movilidad durante el estadio reproductivo. La espora, también conocida como forma reproductiva, se presenta en forma de zoospora con un solo flagelo y, dependiendo de las condiciones ambientales, puede permanecer inactiva por mucho tiempo. Muchos "chytridios" suelen parasitar organismos planctónicos en la columna de agua, además, algunos pueden encontrarse en áreas boscosas, donde suelen parasitar plantas vasculares de familias como Cucurmitaceae y Solanaceae. Sin embargo, su lugar de residencia más común es en ambientes acuáticos. Se

pueden encontrar en hábitats acuáticos y terrestres y se consideran los más antiguos, ya que son el único grupo del reino Fungi que aún conserva esporas móviles (flageladas) en alguna etapa de su desarrollo (Grisales, 2017; Estrada & Ramírez, 2007).

El filo **Glomeromycota** se distingue por agrupar las especies más antiguas en el registro fósil y establecer vínculos simbióticos con las plantas. Las micorrizas son esas especies que forman un micelio cerca del rizoma de la planta. Las micorrizas liberan enzimas al suelo que catalizan compuestos y los hacen biodisponibles para que la planta los absorba, lo que significa que el 80% de las plantas terrestres necesitan una relación simbiótica. La generación de esporas multinucleadas para la reproducción sexual es el carácter taxonómico relevante del grupo (Grisales, 2017).

1.1.4 Nutrición de los hongos

Los hongos son seres muy productivos y esenciales para el crecimiento de la vida en la tierra, incluso pueden habitar y crecer en rocas sin hojas. La mayoría de las veces son beneficiosos para el ser humano, ya que se encargan de descomponer la materia orgánica compleja en formas químicas sencillas que se depositan en el suelo y son absorbidas por otras generaciones de plantas, lo que contribuye a la fertilidad de la tierra. A pesar de los posibles daños que estos organismos pueden causar a los seres vivos, incluyendo a los humanos, son un grupo de organismos de gran importancia (Mancilla et al., 2020).

Siendo organismos heterótrofos los hongos no producen su propio alimento y requieren la liberación de enzimas para descomponer los componentes que ingieren. Algunos hongos son saprófitos que descomponen y comen materia orgánica, mientras que otros son parásitos y dependen de sus huéspedes para sobrevivir. Además, almacenan alimentos en forma de glucógeno y lípidos. Su importancia radica en su capacidad para descomponer la hemicelulosa, la celulosa y la lignina, componentes fundamentales de las paredes celulares de las plantas y de difícil degradación.

Se ha estudiado la clasificación de este grupo y se ha comprobado que, tal como se clasificaba en la antigüedad, evolutivamente está más cerca de los animales que de las plantas (Carrillo & Bejarano, 2007). Según la nutrición, se pueden clasificar como:

- **Saprófitos:** son aquellos que obtienen su alimento de la materia orgánica muerta, ya sea animal (inclusive excremento) o vegetal, pero siempre en estado de descomposición. En este grupo de hongos se encuentran algunos comestibles como los champiñones, así como también algunos otros utilizados en la elaboración de alimentos fermentados.

- **Simbióticos:** son aquellos hongos que viven en una relación simbiótica, del tipo mutualista con otros organismos. En este tipo de relación cada uno de los organismos participantes es beneficiado. Dentro de este grupo encontramos a los hongos micorrícicos y los hongos liquenizados.
- **Parásitos:** estos hongos viven sobre o dentro de organismos vivos (animales o vegetales), causando enfermedades e incluso la muerte a su hospedero. Un grupo de gran interés son los entomopatógenos, hongos causantes de enfermedades y muerte en los insectos.

1.1.5 Diversidad de los hongos

Los hongos aparecieron por primera vez hace unos 1.300 millones de años, cuando divergieron de un ancestro común de los animales y otros organismos relacionados (ver figura 9). Los hongos ocupan el segundo lugar después de los animales invertebrados en cuanto a diversidad de especies. Una nueva estimación de especies confirma que los hongos son el segundo reino más grande de eucariotas después de los animales (State of the World's Plants and Fungi 2023).

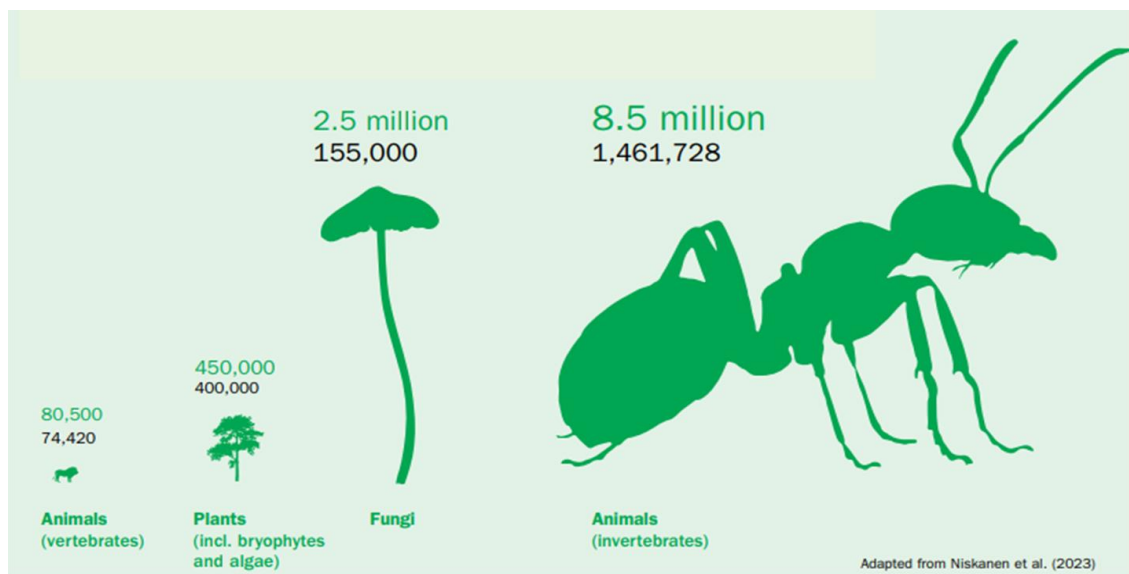


Figura 9. ¿Cómo difiere la diversidad de especies entre animales, plantas y hongos? Una estimación actualizada confirma que los hongos ocupan el segundo lugar después de los animales invertebrados en cuanto a especies diversidad (State of the World's Plants and Fungi 2023).

1.1.6 Taxonomía e identificación de los hongos

La taxonomía e identificación de los hongos se ha basado tradicionalmente en la caracterización fenotípica de los mismos. La sistemática atribuía valores taxonómicos a aspectos asociados a la morfología, tanto macroscópica como microscópica, es decir, presencia o ausencia de septos en las hifas, formación de esporas y mecanismos de liberación de estas, o aspectos de la biología y

ecología de estos organismos, así como resultados obtenidos a través de pruebas bioquímicas o el estudio de su ultraestructura. Datos que, en conjunto, han permitido establecer las diferentes categorías taxonómicas hasta nivel de especie y, en algunos casos, hasta niveles inferiores (Webster & Weber, 2007; Arias & Piñeros, 2008).

Técnicas morfológicas

En la **macroscopía** (por medios de cultivo), la descripción de los hongos para cada una de las cepas se realiza repiques a partir de los cultivos monospóricos por punción central en platos de Petri en medios de cultivos como: PDA, Extracto de Malta, Extracto de Malta, Czapeck o Avena según requerimientos de cada hongo. Los microorganismos pueden ser incubados por 5 días a 25°C-28°C, se describe el anverso y reverso de cada cepa según textura, color, diámetro de la colonia y la presencia de pigmentos difusibles al medio. Las características macroscópicas como la forma colonial, el color de la superficie y la producción de pigmentos son a menudo útiles para la identificación. La tasa de crecimiento de las colonias de hongos filamentosos depende del medio de cultivo y la temperatura de incubación, pero siempre que las condiciones estén estandarizadas, estas características se pueden tener en cuenta en el proceso de identificación. El examen morfológico de estructuras microscópicas como las esporas y las células portadoras de esporas son una parte esencial de la identificación de hongos filamentosos. Los mohos que no logran esporular son a menudo imposibles de identificar y, por lo tanto, es importante seleccionar las condiciones de cultivo que favorezcan la esporulación (Campbell et al., 2013).

En la **microscopía**, la descripción de los hongos se realiza la observación de los microcultivos con azul de lactofenol, en Microscopio Óptico en objetivo 40X y 100X siguiendo claves taxonómicas se puede determinar el género y la especie presuntiva de cada uno de los hongos estudiados. Es fundamental que las colonias de hongos se desarrollen a partir de estructuras específicas que les confieren su forma. Estas estructuras, conocidas como hifas, son elementos multicelulares que conforman la unidad funcional del hongo y, en conjunto, constituyen el micelio (Bonifaz-Trujillo, 2015).

Técnicas moleculares, secuenciación y análisis filogenético

Actualmente, la aplicación de técnicas de biología molecular, en particular el análisis de secuencias de nucleótidos del ADN y los estudios filogenéticos derivados de ellos, han cambiado muchos los conceptos tradicionales de la taxonomía fúngica (Guarro et al., 1999). Muchos laboratorios clínicos emplean hoy la secuenciación de ADN como parte de su protocolo de rutina para la identificación de hongos. En circunstancias en las que la identificación basada en la morfología no es útil, un aislado puede ser un candidato para la identificación basada en el ADN. Este método puede ser útil cuando una cepa

muestra una morfología atípica, no esporula, requiere una incubación prolongada o una incubación en medios especializados para esporular, o si los resultados fenotípicos son inespecíficos o confusos (Campbell et al., 2013).

El uso de las distintas herramientas de diagnóstico molecular constituye una alternativa, cada vez más indispensable, para la correcta y rápida identificación del agente responsable de una determinada patología. Son numerosos los estudios en los cuales la secuenciación es imprescindible para la identificación de hongos patógenos humanos, tales como especies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium* u otros patógenos emergentes (Guarro et al., 1999; Atkins & Clark, 2004; Nagy et al., 2004; Gilgado et al., 2005; Balajee et al., 2007; Balajee et al., 2009). En el campo de la epidemiología, los métodos de tipificación molecular han permitido poner en evidencia variaciones genotípicas o mutaciones útiles para el establecimiento de los patrones epidemiológicos de una especie concreta (Wengenack & Binnicker, 2009).

La PCR es la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, se ha convertido en una parte esencial y fundamental de la investigación sobre la ecología de los hongos y ha proporcionado nuevos conocimientos sobre la diversidad y la ecología de estos microorganismos. Permitiendo estudiar la ecología de los hongos en su etapa micelial dominante pero discreta, y no solo mediante estructuras fructíferas (Seiffert, 2009). Además, los análisis basados únicamente en estudios morfológicos o de laboratorio no consideran las interacciones evolutivas históricas que pueden afectar la distribución, abundancia y estructura poblacional de una especie. Incluso, es probable que las interrogantes sean resueltas mediante un enfoque molecular en combinación con métodos más tradicionales que también tengan en cuenta la estructura de la metapoblación, la estructuración histórica de la población, el flujo de genes, la especiación críptica, los efectos de vicariancia y los cambios en la demografía de la población (Bellemain et al., 2010).

El marcador de código de barras de ADN preferido para la identificación de taxones individuales y plantillas ambientales mixtas es el espaciador interno transcrito (ITS) del ADN. Se ha propuesto recientemente como el marcador de código de barras principal de los hongos, que proporciona una excelente base de datos para la identificación de taxones de hongos (Nilsson et al., 2009). Las regiones ITS1 e ITS2 de la región ITS se encuentran entre los genes 18S (SSU) y 28S (LSU) en la unidad de repetición del ADNr. La gran cantidad de copias de ITS por célula hace que la región sea un objetivo atractivo para la secuenciación de sustratos ambientales donde hay una cantidad baja de ADN. (Bellemain et al., 2010); debido a que toda la región ITS es demasiado larga para la secuenciación 454 u otras técnicas de secuenciación de alto rendimiento, tanto la región ITS1 como la ITS2 han sido objeto de estudios recientes de secuenciación de alto rendimiento. Se utilizan múltiples cebadores para

amplificar la región ITS en su totalidad o partes (Jumpponen et al., 2010). La secuenciación del ADN fúngico permite a los investigadores ampliar el trabajo taxonómico tradicional de generaciones de científicos que describieron la morfología de los hongos recolectados en el campo y cultivados en el laboratorio.

A diferencia de los caracteres morfológicos, los marcadores genéticos proporcionan una medida objetiva de parentesco y, por primera vez, los micólogos pueden organizar diferentes grupos de hongos en un robusto sistema natural de clasificación que refleja su historia evolutiva. También se utilizan técnicas moleculares para estudiar hongos que no han sido cultivados. Al amplificar genes de hongos del suelo, el agua o la madera en descomposición, los científicos han descubierto nuevas especies y, lo que es más importante, nuevas agrupaciones más grandes de hongos. Debido a que, no sabemos cómo cultivar estos hongos, es difícil estudiarlos microscópicamente.

Las relaciones evolutivas entre hongos se han examinado comparando las secuencias de genes eucariotas ubicuos. El escrutinio del grupo de genes ribosomales es la opción más común para la investigación. Este grupo codifica tres subunidades de ARN ribosómico (18S [subunidad pequeña (SSU)] y 5.8S y 28S [subunidad grande (LSU)] ARNr) y regiones intermedias, o espaciadores transcritos internos, identificados como ITS1 e ITS2 (Guarro et al., 1999; Wengenack & Binnicker, 2009).

1.1.7 Hongos patógenos

Los hongos patógenos son especies zootrópicas que requieren tejido vivo para el crecimiento, al menos durante una parte de su ciclo (Rúa-Giraldo, 2023; Corrales et al., 2018). Solamente unas 300 ó 400 especies de hongos son potencialmente patógenas para el ser humano aunado a esto, el campo de la micología médica es tan vasto y diversificado como el de los cientos de miles de especies de hongos existentes. La mayoría de las especies patógenas produce infecciones llamadas micosis; otra parte es causante de procesos alérgicos y el resto produce intoxicaciones en dos modalidades: las micotoxicosis por ingestión de toxinas de micromicetos contenidas principalmente en granos de cereales y los micetismos por ingestión de macromicetos tóxicos. Los hongos son de los seres más abundantes y ubicuos en la naturaleza, propiedades que se extienden a los patógenos para el ser humano, los cuales tienen más limitaciones para la supervivencia, ya que requieren de intervalos de temperatura, pH y nutrientes más específicos. De acuerdo al hábitat, los hongos productores de micosis se clasifican en geofílicos, zoofílicos y antropofílicos. En cuanto a la distribución geográfica las micosis pueden ser cosmopolitas o limitadas a zonas endémicas. Los hongos de las micosis cosmopolitas se adaptan a vivir en los más diversos sustratos de la naturaleza, tanto en los diferentes tipos de suelo (geofílicos) como en animales selváticos domésticos y peridomésticos (zoofílicos), otros viven

exclusivamente en el hombre sin causar necesariamente enfermedad (antropofílicos) (López Martínez, 2005).

La presencia de hongos en zonas costeras puede influir en la disminución de actividades recreativas para los turistas que frecuentan y tienen contacto directo con estas aguas pueden ser perjudicadas sus condiciones de salud debido a los hongos (Padilla & Stick, 2015). Estas enfermedades causadas por hongos están estrechamente relacionadas con alergias en la piel, infecciones y problemas respiratorios como el asma y la rinitis (Martínez & Muñoz, 2019). Por lo tanto, es vital practicar medidas preventivas de control para reducir el riesgo de adquirir enfermedades respiratorias o afecciones de la piel (Morgado, 2017).

En una población inmunodeprimida las infecciones fúngicas invasivas (IFI) por hongos filamentosos ocasionan una elevada morbilidad, al contrario de una población sana en donde la probabilidad de padecer dichas infecciones es prácticamente inexistente. Los hongos filamentosos entran en contacto con el hospedero mediante el agua, tierra, hojas, semillas e incluso abono, como en el caso del género *Aspergillus*.

Entre las micosis invasivas causadas por hongos filamentosos, las infecciones por *Aspergillus* son las más comunes, seguidas de la hialohifomicosis por el género *Fusarium*. Además, estos hongos viven en desechos orgánicos, el suelo y el agua del grifo de los hospitales. El principal punto de entrada es el tracto respiratorio, seguido de la piel. Las infecciones pulmonares son la enfermedad más común, ya que los síntomas clínicos son inespecíficos (Lobatón-Ramírez et al., 2020). Por otro lado, en sustratos orgánicos (frutas, suelo, estiércol, etc.), los hongos mucorales suelen crecer, contaminando ocasionalmente superficies de materiales inertes.

1.1.8 Infecciones causadas por los hongos (casos relevantes)

En la última década, las infecciones fúngicas pulmonares y la aspergilosis invasiva cerebral han aumentado en incidencia debido al mayor número de individuos inmunodeprimidos (Schwarz et al., 2024; Karakecili et al., 2024). En un hombre de 67 años post-COVID-19, complicada con trombosis del seno cavernoso (CST), se le realizó una muestra clínica para biopsia transesfenoidal, que confirmó la infección por el género *Aspergillus* sp. Inicialmente diagnosticado erróneamente con arteritis temporal, el paciente recibió corticosteroides, lo que exacerbó su susceptibilidad a la infección fúngica. Imágenes craneales y resonancias magnéticas revelaron una masa invasiva que afectaba el seno cavernoso y otras estructuras intracraneales. El diagnóstico se estableció mediante la biopsia, seguido de tratamiento con voriconazol y terapia antimicrobiana combinada. Este caso resalta los desafíos en el diagnóstico y manejo de infecciones fúngicas en pacientes inmunodeprimidos post-COVID-19,

subrayando la necesidad de intervenciones rápidas y específicas (Karakeçili et al., 2024).

En Colombia, la grave micosis provocada por especies de *Aspergillus* sp., como *Aspergillus fumigatus* presenta predominancia de (73.3%), en un centro hospitalario de cuarto nivel. La cohorte abarcó a 66 pacientes de 1 mes a 90 años, con Inteligencia Artificial confirmada, probable y factible. Las muestras clínicas abarcaban esputo y lavado broncoalveolar, con diagnóstico por cultivo, niveles de galactomanano en el torrente sanguíneo y descubrimientos de tomografía computarizada (nódulos y consolidaciones). El pulmón fue el órgano con mayor impacto (92,4%), y los factores de riesgo más habituales incluyen quimioterapia (39,4%) y administración de corticoides (34,8%). La mayoría de los pacientes se sometieron a la administración de voriconazol (80,3%), presentando una tasa de mortalidad del 15,2%. La investigación subraya las variaciones epidemiológicas locales y la relevancia de la supervisión para una gestión apropiada en pacientes en situación de riesgo (Goyeneche-García et al., 2021).

En un estudio realizado por Biddeci et al., (2020) en la División de Onco-Hematología pediátrica del Hospital Universitario de Padua Italia, se identificó una infección por *Fusarium solani* en un niño de 9 años con leucemia linfoblástica aguda (LLA). A partir de este caso, se recopiló información sobre casos similares en pacientes pediátricos con leucemia aguda tratados en dicho Hospital de Padua. El paciente presentó una herida profunda en el codo en el momento del diagnóstico. Posterior a la fase de inducción de la quimioterapia, desarrolló múltiples lesiones cutáneas y neumonía grave. Fue tratado con una dosis alta de anfotericina B liposomal, seguida de voriconazol. En el estudio se identificaron otros seis casos, todos estos pacientes padecían leucemia mieloide aguda (LMA) y cinco de ellos presentaban una enfermedad recidivante/refractaria. Dos de los siete pacientes murieron a causa de la infección; cinco pacientes se recuperaron de la infección, pero tres de los siete murieron a causa de la leucemia.

Por otra parte, Marín et al., (2019), quienes realizaron un estudio en el curso clínico de micosis producida por *Exophiala xenobiotica* en el Hospital Universitario de Burgos, España, indican la presencia de dos casos de micosis causada por *E. xenobiotica* en paciente con transplantado renal, una micosis cutánea localizada y una infección sistémica con afectación del sistema nervioso central. De igual manera, Espanhol et al. (2019), reporta un caso de feohifomicosis que afectó la pierna de un hombre de 45 años con transplantado renal, donde se evidenció hifas septadas dematiáceas en el examen directo, que se identificó como especie fúngica patógena *E. xenobiotica*. El paciente se trató con la escisión quirúrgica de toda la lesión y se utilizó itraconazol sistémico. De forma similar, en un estudio realizado por Morio et al., (2012), describe el caso

de un paciente masculino de 53 años residente en Francia, inmunocomprometido por VIH, con diagnóstico de feohifomicosis causada por una especie de *E. xenobiotica*. Las muestras clínicas incluyeron biopsias de tejido subcutáneo y sinovial de tumefacciones en el brazo, muñeca y rodilla, las cuales revelaron granulomas epitelioides con necrosis y elementos fúngicos, confirmados mediante tinción de Gomori-Grocott. El cultivo en agar dextrosa de Sabouraud produjo colonias de color oliva oscuro que, al microscopio, mostraron hifas negras septadas y conidios unicelulares característicos de *Exophiala*.

En otro estudio realizado por Nishikawa & Taniguchi, (2019), en el Hospital de Medicina de Kochi. Identificaron la presencia de *E. oligosperma* en una mujer (hospedero inmunocomprometido) de 86 años, que presentaba enfermedad de Still de inicio en la edad adulta, estaba en remisión clínica con prednisolona y tacrolimus, presentó una historia de 2 meses de fiebre. Se había rascado a menudo los antebrazos en el último año. El paciente recibió drenaje, hipertermia local y terapia antifúngica (itraconazol y flucitosina).

Exophiala es un hongo de color negro que puede hallarse en diversos entornos como el suelo, el agua y el organismo humano, funcionando como un potencial patógeno oportunista. Es conocido que ciertas especies son extremófilas y crecen en circunstancias desfavorables como desiertos, glaciares y hábitats contaminados (Ide-Pérez et al., 2024). La feohifomicosis se refiere a infecciones debidas a un gran grupo de organismos heterogéneos llamados hongos “dematiáceos” o “melanizados”. Estos hongos se distinguen por el predominio de melanina en sus paredes celulares, que probablemente actúa como un factor de virulencia. Estos organismos pueden causar una gran variedad de manifestaciones invasivas, incluidas infecciones locales profundas, infección pulmonar, infección cerebral y enfermedad diseminada, que se asocia con una alta mortalidad (Arcobello & Revankar, 2020).

El género *Cladosporium* sp. comprende un gran número de hongos dematiáceos con una distribución mundial y se encuentran entre los hongos transmitidos por aire más comunes. Con frecuencia son contaminantes aislados y algunas especies son patógenas y toxigénicas para los humanos y se asocian con infecciones superficiales de la piel y tejidos blandos, incluyendo sepsis diseminada con alta mortalidad (Menezes et al., 2017). En un caso clínico realizado por Garnica-Escamilla et al. (2012), describen un caso de un paciente de 57 años, presentó quemaduras por escaldadura en 37% de la superficie corporal total en el cual se identificó el desarrollo de *Cladosporium* sp. Así mismo, una investigación realizada en un paciente masculino de 59 años consultaba ambulatoriamente por hemoptisis de dos semanas de evolución en el Hospital de Paraná, Maringá, Brasil. El paciente presentó hemoptisis persistente, disnea y tos, con una radiografía de tórax que mostró opacidades en el lóbulo superior derecho y una TC con un halo de vidrio esmerilado. La muestra clínica consistió

en líquido de lavado broncoalveolar (BAL), inicialmente negativo para bacterias y hongos, y una biopsia pulmonar quirúrgica que confirmó hemorragia alveolar. El diagnóstico definitivo se realizó mediante cultivo fúngico de la biopsia en agar Sabouraud, con crecimiento de colonias de *C. cladosporioides* tras 14 días de incubación, corroborado por características morfológicas en microcultivo. En la región centroamericana y Panamá, son pocos los trabajos sobre cromoblastomycosis publicados (Mata-Delgado, 2021).

1.1.9 Géneros de importancia médica

***Aspergillus* spp.**

En el laboratorio, la identificación de *Aspergillus* hasta el nivel de especie es crucial porque la selección del fármaco que se utilizará para manejar un caso clínico depende de la susceptibilidad a los antimicóticos. El color de la colonia, el tamaño, la forma de las cabezas conidiales incluida la forma de la vesícula, la presencia o ausencia de métulas, la forma de las fiálides, el color, el aspecto de los conidios y la morfología de los conidióforos son características que permiten su identificación. Las especies del género *Aspergillus* presentan estructuras hialinas que viven en diversos lugares. Aunque vive en el suelo, sus conidios se esparcen por el aire debido a su abundante esporulación. Los mismos tienen un tamaño de 2 a 3 µm, pueden inhalarse diariamente y entrar en los alvéolos pulmonares del ser humano (Ascencio et al., 2021).

La aspergilosis es causada por hongos filamentosos del género *Aspergillus* que produce una micosis oportunista, esta enfermedad no tiene preferencia por sexo, raza o grupo de edad, fue considerado poco patógeno durante muchos años y solo causó cuadros de hipersensibilidad. Sin embargo, con el aumento de inmunocomprometidos, su condición como patógeno causante de enfermedades graves ha cambiado significativamente. La mayoría de las enfermedades causadas por *A. fumigatus* es una de las más de doscientas especies de *Aspergillus* descritas; sin embargo, existen otras especies patógenas cuya frecuencia puede variar en cada centro, como *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* y *A. nidulans*, entre otras (Riera et al., 2019).

Mucorales

Dentro del orden *Mucorales* se encuentran algunos géneros de hongos patógenos importantes. Podemos destacar a *Rhizopus* con *R. oryzae* y *R. microsporus* entre las especies más frecuentemente aisladas de muestras clínicas. En este género se han producido pocos cambios taxonómicos, pero sí los han experimentado algunos de los géneros que le siguen en orden de importancia clínica como son *Lichtheimia* y *Mucor*. Hasta hace poco el primero de ellos se conocía como *Absidia*, luego pasó a denominarse *Mycocladius* y más recientemente las especies termotolerantes, entre ellas las patógenas humanas,

se incluyeron en *Lichtheimia* como *L. corymbifera*, *L. ramosa* y *L. ornata*, mientras que las especies mesófilas se mantienen en *Absidia* (Guarro, 2012).

Dentro de *Mucor*, la especie *M. circinelloides* es la que presenta una mayor incidencia en clínica, aunque recientemente se han descrito otras especies como *M. velutinosus*. Esta especie se ha aislado de muestras clínicas en EE. UU. y recientemente ha sido descrita como causante de una infección diseminada en un paciente hematológico. Sin embargo, los cambios más importantes se han producido en dos géneros mucho menos frecuentes en clínica, pero capaces de ocasionar infecciones muy agresivas y devastadoras que con frecuencia acaban con la vida del paciente en pocos días. Se trata de los géneros *Apophysomyces* y *Saksenaea*, los cuales han demostrado ser, mediante estudios polifásicos, verdaderos complejos de especies. En el primero de ellos, la especie *A. variabilis* es la que parecía haber ocasionado la mayoría de los casos recientes, aunque *A. trapeziformis* ha estado involucrada en 13 casos de infección debidos a heridas producidas por un tornado que este año afectó al estado de Missouri en EE. UU., falleciendo cinco de los pacientes. En el caso de *Saksenaea* parece que las especies predominantes son las que integran el complejo *S. vasiformis*, aunque recientemente se ha demostrado que *S. erythrospora*, una de las especies recientemente descritas, provocó una infección fatal en un paciente herido por la explosión de una bomba en la guerra de Irak (Guarro, 2012; Álvarez et al., 2010).

Dermatofitos

Los dermatofitos pertenecen al pequeño grupo de microorganismos con los que casi todos los humanos se infectan en algún periodo de su vida. Los recientes estudios moleculares han demostrado que los cuatro géneros anamórficos tradicionales de la familia *Arthrodermataceae* (*Onygenales*): *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton* y *Chrysosporium*, no son todos ellos monofiléticos.

Por ejemplo, en los árboles filogenéticos de diferentes secuencias de ADN las especies de *Trichophyton* se acomodan dentro de los clados formados por especies de *Microsporum* y *Epidermophyton*. Además, algunas especies de *Chrysosporium* se agrupan con los *Trichophyton* geófilos, situados filogenéticamente distantes de la especie tipo de *Chrysosporium*, *C. merdarium*. Aparte de permitir reconocer nuevas especies como *T. eboreum* y su teleomorfo *Arthroderma olidum*, uno de los aspectos más interesantes que las técnicas moleculares han aportado al estudio de los dermatofitos es el hecho de haber demostrado que algunos biotipos que en base a su morfología y al tipo de infección que producían eran considerados como verdaderas especies, no lo eran en realidad. Dentro del complejo *Trichophyton* se incluyen las dos especies antropofílicas, *T. rubrum* y *T. violaceum*, que no presentan fase sexual o teleomorfo y que parece que experimentan un tipo de reproducción clonal. La

antigua especie *T. raubitschekii*, que según algunos autores presenta características epidemiológicas diferentes de *T. rubrum* y además es ureasa positiva, se considera en la actualidad sinónima de *T. rubrum*. Es de destacar también el hecho de que la especie cosmopolita *T. rubrum*, responsable de la mayoría de las tiñas de las uñas y de los pies, y la especie *T. soudanense*, endémica de África y responsable especialmente de *Tinea capitis* en jóvenes, son la misma especie. Importantes cambios taxonómicos también se han producido en el complejo *A. vanbreuseghemii*. En la actualidad, tres anamorfos de distribución mundial se asocian con este complejo: *T. tonsurans*, *T. equinum* y *T. interdigitale*. Mientras que la primera especie es antropofílica y *T. equinum* es responsable de infecciones en equinos. *T. interdigitale* es la única especie de dermatofitos que presenta heterogeneidad desde un punto de vista ecológico ya que incluye tanto cepas antropofílicas como zoofílicas. Fenotípicamente las cepas zoofílicas de *T. interdigitale* son indistinguibles de las cepas de las antiguas variedades *T. mentagrophytes* var. *granulosum* y *T. mentagrophytes* var. *Mentagrophytes* (Guarro, 2012; Gräser, et al., 2008).

***Fusarium* spp.**

El género *Fusarium* se refiere a hongos filamentosos ramificados tabicados hialinos que pueden ser fitopatógenos. Las micotoxicosis y tricotexenos pueden suprimir la respuesta inmune adaptativa humoral y celular, las infecciones localizadas, las infecciones invasoras o las enfermedades diseminadas son algunas de las muchas enfermedades que producen en los humanos. Las hialohifomicosis incluyen la patología causada por *Acremonium* spp., *Scedosporium* spp., *Aspergillus* spp., *Paecilomyces* spp. y *Penicillium* spp., entre otros hongos. Aunque tiene todos estos factores de virulencia, el hospedero necesita compromiso inmunológico para causar invasión e infección. El principal mecanismo de control de este patógeno oportunista es la inmunidad innata, la fagocitosis y lisis de conidias y fragmentos de hifas (Guarro, 2012).

Fusarium causa enfermedades invasoras en pacientes inmunocomprometidos y es el segundo hongo filamentoso productor de infecciones fúngicas invasoras después de *Aspergillus*. Las enfermedades oncohematológicas y sus tratamientos, el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas y órganos sólidos, la neutropenia prolongada, el uso de altas dosis de esteroides, la enfermedad-injerto contra el hospedero, la linfopenia y el uso de inmunosupresores son los principales factores de riesgo de infección. El grupo de riesgo determina la incidencia de esta afección diseminada (Guarro, 2012; Riera et al., 2019).

Este género incluye especies que se encuentran en la naturaleza, en el suelo, en el aire y en las plantas. Aunque es más común aislarlas en áreas tropicales, también se encuentran en una amplia gama de ubicaciones, desde el Ártico hasta los desiertos. Sus propágulos se propagan tanto por el aire como por el

agua a través de las lluvias. Son capaces de contaminar el agua y provocar queratitis fúngica. Dado que la resistencia a las drogas varía según el género, la diversidad molecular de *Fusarium* es importante (Guarro, 2012; Riera et al., 2019).

Sporothrix

Diferentes especies del complejo *Sporothrix* es el responsable de la enfermedad conocida como esporotricosis, las mismas incluyen a *S. schenckii*, *S. mexicana*, *S. globosa*, *S. brasiliensis* y *S. luriei*. Aunque ha sido reportada principalmente en países de América Latina y Asia en las últimas décadas, la enfermedad tiene una distribución mundial (Riera et al., 2019).

La micosis subcutánea común predominante en las áreas endémicas es la de adultos de 20 a 60 años, en personas relacionadas a prácticas agrícolas al momento de trabajar o manipular la tierra de cultivo, plantas ornamentales y madera. Este hongo se desarrolla principalmente en bosques y zonas de clima templado, la enfermedad se adquiere a través de la penetración del hongo en las heridas de piel (López, 2005). La presentación clínica de las formas adquiridas por estas vías en los hombres es diferente de la esporotricosis clásica, y la población más afectada son las mujeres y los niños. La adquisición de *S. schenckii* puede ocurrir por vía aérea inhalando las conidias (forma pulmonar), por trauma (localizaciones cutáneas y articulares) con material contaminado como astillas, musgo, espinas o heno; por mordedura o rasguño de un animal con patas, pico, boca u otra parte de su cuerpo contaminada con el agente etiológico. Los siguientes son factores de riesgo para la forma sistémica y la localización pulmonar: El alcoholismo, la infección por VIH, la diabetes mellitus, la cirrosis hepática, los casos ocasionales después de un trasplante renal y el uso de tacrolimus o estereoides (Riera et al., 2019).

Otros hongos filamentosos de importancia médica, en los últimos años se han publicado numerosos casos clínicos causados por una gran diversidad de especies fúngicas diferentes de las tradicionales. Especies consideradas exclusivamente saprobias o meros contaminantes de laboratorio han demostrado también ser capaces de infectar al ser humano. Entre ellas cabe citar *Acremonium* spp., *Phialemonium* spp., *Phaeoacremonium* spp. y algunas levaduras negras (Guarro, 2012).

En los últimos años se ha informado que algunas especies del género *Acremonium* son capaces de ocasionar infecciones en el hombre. *Acremonium*, aunque es un hongo saprófito, que se encuentra en el suelo y en la vegetación en descomposición, puede producir infecciones en pacientes. Según Cornejo-Juárez et al. (2007), en México se ha identificado un caso de fungemia a causa de *Acremonium* sp. en un paciente que no manifiesta síntomas.

Por la morfología de los hongos, así como por su comportamiento en clínica recuerdan a *Fusarium*, aunque la taxonomía de *Acremonium* es más confusa. Es un género muy complejo, claramente polifilético que agrupa a especies que pertenecen a diferentes familias e incluso órdenes. En un estudio reciente en el que se han identificado molecularmente numerosos aislados de origen clínico procedentes de EE. UU., se ha demostrado la existencia de numerosas posibles nuevas especies. En dicho estudio, sorprendentemente, de las 11 especies tradicionalmente consideradas como patógenas potenciales, tales como *A. ricifei*, *A. strictum* o *A. potronii* entre otras, solo fueron identificadas *A. kiliense* y *A. atrogriseum*, que juntamente con las cepas del complejo *A. sclerotigenum*, *A. egyptiacum* y *A. implicatum* fueron las predominantes (Guarro, 2012).

Algunos hongos patógenos que presentan una pigmentación oscura y producen colonias similares a las de las levaduras son las denominadas levaduras negras, la mayoría pertenecen al orden *Chaetothyriales* (clase *Eurotiomycetes*). Clínicamente les caracteriza un neurotropismo muy marcado, siendo las encefalitis una de las manifestaciones más graves. Dentro de este grupo cabe destacar a *Rhinocladiella mackenziei*, especie marcadamente neurotrópica endémica del Oriente Medio. Otras especies de interés clínico pertenecen a los géneros *Exophiala*, *Cladophialophora* y *Fonsecaea*. La diferenciación fenotípica de las especies de dichos géneros es difícil, pero el análisis de las secuencias de la región ITS ha demostrado ser muy útil para su identificación. Estudios moleculares han demostrado que *E. jeanselmei*, especie tradicionalmente causante de infecciones subcutáneas, contiene dos especies crípticas, *E. oligosperma* y *E. xenobiotica*, los cuales son agentes comunes de infecciones cutáneas. A partir de cepas de *Cladophialophora* aisladas de muestras clínicas se han podido identificar cuatro nuevas especies en dicho género, *C. saturnica* y *C. inmundata* que causan infecciones cutáneas, *C. mycetomatis* relacionada con infección subcutánea y *C. samoënsis*, un agente endémico de cromoblastomycosis (Guarro, 2012; Badali et al., 2009).

La cromoblastomycosis es una micosis crónica, cutánea o subcutánea caracterizada por la presencia de células muriformes en el tejido del hospedero. La enfermedad de implantación es causada por hongos melanizados relacionados con las levaduras negras, que, en climas tropicales húmedos, son principalmente miembros del género *Fonsecaea* (Voidaleski et al., 2020). Las especies de *Fonsecaea* han sido consideradas tradicionalmente como típicos agentes causantes de cromoblastomycosis. Recientemente utilizando técnicas de AFLP y la secuenciación de varios genes se ha demostrado que *F. compacta* es sinónimo de *F. pedrosoi* y se han propuesto dos nuevas especies, *F. monophora* y *F. nubica*, las cuales a diferencia de *F. pedrosoi*, que produce infecciones en América Central y del Sur, tienen una distribución mundial (Guarro, 2012).

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2. METODOLOGÍA

2.1 Procedencia de las muestras y diseño experimental del estudio

La propuesta presentada se desarrolló como un estudio exploratorio-descriptivo para generar los datos experimentales, realizando la metodología del estudio de aislamientos de las cepas fúngicas recolectadas de 12 sitios en la Bahía de Panamá, provincia de Panamá (ver Tabla 1 y Figura 10); donde se obtuvieron cepas de hongos filamentosos y levaduras, que fueron preservadas en tubos inclinados a 4°C y almacenadas en el laboratorio de Estudios Moleculares y Micología del Centro de Investigación e Información de Medicamentos y Tóxicos (CIIMET), Facultad de Medicina coordinado por la Dra. Gesabel Navarro-Velasco. Este estudio de investigación formó parte de un megaproyecto más amplio titulado: “Detección Molecular y Análisis Filogenético de Virus, Bacteriófagos, Bacterias, Hongos Filamentosos y Parásitos Patógenos en Aire y Agua provenientes de la Bahía de Panamá”, IP Dr. Alex O. Martínez del LAMEXA y LAMA de la Universidad de Panamá, financiado por el Fondo de Agua, Áreas Protegidas y Vida Silvestre.

Tabla 1. Esquema de sitios de muestreo con las características y condiciones ambientales.

SITIOS DE MUESTREO	
Muestra 1: Costa del Este , ubicada en una urbanización residencial e industrial que lleva el mismo nombre, donde los niveles de basura en la zona costera son elevados, de oleaje tenue y sus aguas presentan una coloración oscura.	Muestra 7: Hospital Santo Tomás , se ubica al frente del Monumento a Vasco Núñez de Balboa y cercano al Hospital del Niño. Presenta poca basura, oleaje fuerte y aguas oscuras.
Muestra 2: Panamá la Vieja , está ubicada entre la estatua Morelos y el Centro de Artesanías de Panamá Viejo, y presenta un oleaje fuerte, aguas oscuras y poca basura.	Muestra 8: Mercado del Marisco , se localiza en la parte posterior del Mercado del Marisco de la Ave. Balboa. La estación se caracteriza por poseer aguas oscuras, mucha basura, mal olor y oleajes fuertes.
Muestra 3: Coco del Mar , se localiza en un sector de multifamiliares conocido como Coco del Mar, el oleaje es tenue y el agua es oscura con poca basura.	Muestra 9: Las Bóvedas , la encontramos en el sector conocido como Casco Antiguo en el corregimiento de San Felipe, exactamente a un costado de la Plaza de Francia. Sus aguas son oscuras, sin basura, y de poco oleaje.
Muestra 4: Boca la Caja , se encuentra en el sector conocido con este mismo nombre y donde se localiza una pequeña comunidad de pescadores. Se caracteriza por presentar aguas oscuras, carecer de oleajes y basura.	Muestra 10: Avenida de los Poetas , se encuentra en la Ave de los Poetas frente a la subestación de policía del Chorrillo. Sus aguas oscuras muchas veces utilizadas para recreación por moradores del área presentan oleajes algunas veces fuertes y de poco a nada de basura.
Muestra 5: Club Unión , ubicada en el área de Paitilla, específicamente detrás del Club Unión en el lugar conocido como "La Rampa". Presenta un oleaje poco fuerte, aguas claras y libres de basura.	Muestra 11: Antigua Autoridad de la Región Interoceánica (ARI) , está al inicio de la Calzada de Amador en la parte posterior a las oficinas de la Autoridad de la Región Interoceánica (ARI). Presenta aguas tranquilas y oscuras; con algo de vegetación y nada de basura.
Muestra 6: Salida del Río Matasnillo , localizado este punto en la Ave. Balboa en la desembocadura del río Matasnillo. Generalmente se perciben malos olores; además de presentar gran cantidad de basura y un oleaje poco fuerte.	Muestra 12: Isla Flamenco , Esta estación se ubica dentro de la Calzada de Amador en la Isla Flamenco, exactamente en la parte posterior de los restaurantes. Presenta poca basura, aguas claras y oleaje tenue.

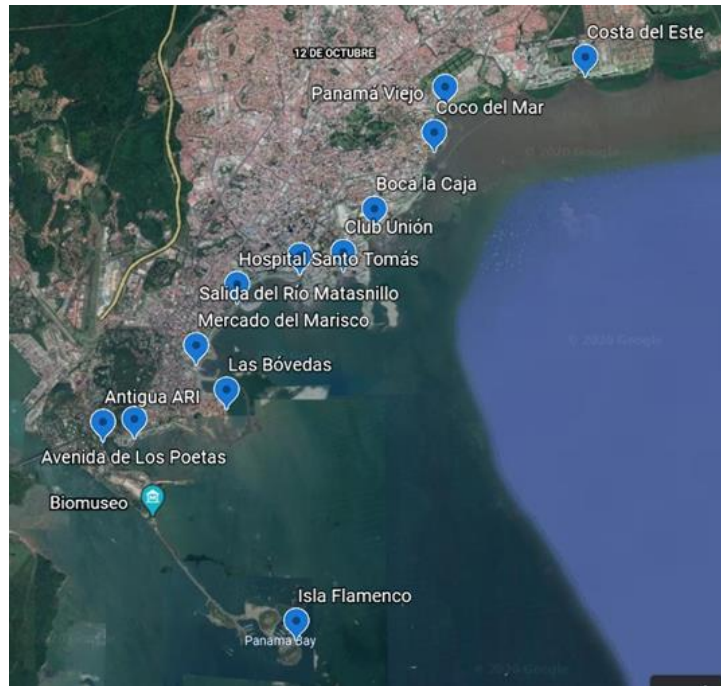


Figura 10. Sitos de Muestreo. Se muestran los 12 sitios de la Bahía de Panamá, en la zona comprendida a lo largo de la zona costera cercanos a los colectores de aguas servidas, en un tramo comprendido entre la urbanización Costa del Este y la Calzada de Amador. Información proveniente del estudio “Detección Molecular y Análisis Filogenético de Virus, Bacteriófagos, Bacterias, Hongos Filamentosos y Parásitos Patógenos en Aire y Agua provenientes de la Bahía de Panamá, de la Universidad de Panamá.

A continuación, se describen los diferentes procesos metodológicos involucrados en el estudio.

2.2 Preparación de medios

La preparación de medios de cultivo es la parte inicial del procedimiento en la fase experimental para lograr un correcto aislamiento, recuperación e identificación de los hongos filamentosos almacenados en colección. En esta fase se utilizaron medios de cultivos sólidos ricos en nutrientes que permitieran reactivar las cepas fúngicas.

El medio de cultivo agar papa dextrosa es el más utilizado por su versatilidad en el crecimiento de levaduras y hongos que, a su vez puede complementarse con ácidos o antibióticos para inhibir el crecimiento de las bacterias, este método es utilizado para cultivar hongos y levaduras clínicamente importantes. La base rica en nutrientes también conocida como infusión de papa, estimula la esporulación de mohos y la producción de pigmentos en algunos dermatofitos. Compuesto de infusión de papa deshidratada y dextrosa, favorece el crecimiento exuberante de los hongos. Muchos procedimientos estándar utilizan una cantidad específica de ácido tartárico estéril (10%) para reducir el pH de este medio a $3,5 \pm 0,1$, inhibiendo así el crecimiento bacteriano. Para este medio de cultivo se recomienda no recalentar el mismo cuando esté acidificado, ya que calentarlo en condiciones ácidas hidroliza el agar (Acumedia, 2015).

Para el proceso de preparación de los medios de cultivos anteriormente mencionados, se utilizaron botellas de 250 mL. Para el agar PDA, en primer lugar, se pesaron 9.75 g de PDA sobre una bandeja plástica o barquilla de pesaje y se disolvieron en 250 mL de agua destilada. Todo el agar se llevó al microondas hasta alcanzar el punto de ebullición, asegurando que se disolviera bien. Este proceso duró 5 minutos, con pausas de un minuto entre cada intervalo, hasta obtener una solución homogénea.

Para el agar extracto de malta (MEA), se pesaron 10 g de agar sobre una bandeja plástica o barquilla de pesaje y se disolvieron en 250 mL de agua destilada. También se llevó el agar al microondas hasta alcanzar el punto de ebullición, asegurando que se disolviera bien. Este proceso duró 5 minutos, con pausas de un minuto entre cada intervalo, hasta obtener una solución homogénea. Una vez, la solución estuviera homogénea y para evitar contaminación cada medio de cultivo antes de utilizarse se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Posteriormente, dentro de la cámara de flujo laminar tipo II, se le añadió 3,500 uL de ácido tartárico (10% previamente preparado y debidamente rotulado según el método descrito por Rhodes y Smith (1992) a las botellas de 250ml a los dos diferentes medios de cultivo. Después de añadir el inhibidor bacteriano se vertió los medios de cultivos en cajas Petri de tamaño de 100 x 15 mm en una cámara de flujo laminar. Una vez solidificado los medios de cultivos en plato Petri, las cajas se almacenaron a 4°C para su uso posterior.

2.3 Proceso de reactivación de cepas fúngicas almacenadas

Para el proceso de recuperación y reactivación de cepas fúngicas almacenadas en tubos inclinados en frío (4°C), se utilizó la técnica por siembra en plato de Petri con medio de cultivo agar papa dextrosa PDA. Los medios de cultivos antes mencionados son conocidos por proporcionar nutrientes esenciales como fuente de nitrógeno y carbono para el crecimiento de los hongos.

En la reactivación de las cepas fúngicas se utilizaron algunas de las muestras de la colección de hongos filamentosos aislados y almacenados en el laboratorio. Se llevó a cabo el proceso de inoculación de las cepas fúngicas dentro de la cámara de flujo laminar tipo II, esto ayudó a que los platos no presentaran crecimiento de contaminantes como levaduras, bacterias u otros microorganismos oportunistas.

De las cepas fúngicas almacenadas en tubos inclinados se cortó un pequeño pedazo de micelio del cultivo puro y se depositó sobre las cajas Petri con medio de cultivo PDA y posteriormente los platos fueron sellados con Parafilm. Todas las muestras se incubaron a temperatura ambiente (entre 25 y 28 °C) entre 3 a

15 días con observaciones diarias para registrar el crecimiento de colonias, hasta asegurarse que los hongos corresponden a la cepa fúngica original almacenado.

Los cambios morfológicos en el crecimiento de las colonias fúngicas, una vez las cepas mostraron estructuras morfológicas visibles, se realizó la siembra por triplicado de cada hongo filamentosos y se colocó Parafilm para sellar las cajas Petri que contenían las muestras y se incubaron. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente (entre 25 y 28 °C) durante un período máximo de 8 a 15 días. La inoculación por triplicado se llevó a cabo con propósitos diferentes: una muestra para observaciones macroscópicas, otra muestra para observaciones microscópicas y una tercera muestra para preservar las muestras en glicerol. Este enfoque ayudó a la preservación de las cepas fúngicas para cualquier uso posterior en la investigación.

2.4 Etapa 1. Identificación Morfológica

La identificación de los hongos filamentosos depende del examen de las colonias a escala macroscópica y de las características microscópicas (Solé et al., 1998). Una vez finalizado el tiempo de incubación y haber obtenido el crecimiento y purificación de las colonias fúngicas, se procedió a identificar su morfología taxonómica.

2.4.1 Identificación Macroscópica

En esta revisión para la identificación de los aislados de hongos filamentosos se tomaron medidas características como la tasa de crecimiento, establecimos como lento cuando el tiempo de crecimiento se ubicó entre 6 a 15 días, moderado o intermedio para un tiempo de crecimiento de 3 a 5 días o rápido para un tiempo de 24 a 48 horas. Presencia de micelio (sin micelio aéreo, poco micelio aéreo o mucho micelio aéreo). Textura de la colonia (aterciopelado, granular, felpa, algodonoso, cartilaginoso, pulverulento entre otros). Forma del margen de la colonia (liso, radial, irregular, nuboso, flecos entre otros). Elevación o profundidad de la colonia (convexo, plano, tubo cubierto de micelio, inmerso en el agar entre otros). Reverso de la colonia, presencia de pigmentación del medio de cultivo. Diámetro de la colonia, coloración de la colonia, la esporulación, presencia de exudados y el espesor del medio. Después de las medidas anteriores mencionadas, se fotografió las colonias de los hongos creciendo en Platos de Petri del lado anverso (frontal) y reverso (detrás).

2.4.2 Identificación Microscópica

Se llevó a cabo la técnica de **montaje directo** para todas las cepas fúngicas puras, mediante preparaciones microscópicas a partir directamente de colonias cultivadas. Para ello, se utilizó la aguja hipodérmica flameada tres veces, la cual permitió extraer una porción de la colonia, que fue colocada en un portaobjetos

al que previamente se le había añadido una gota de líquido de montaje azul de lactofenol. Luego, se cubrió con un cubreobjetos, esta placa con muestra se selló con esmalte de uñas para evitar la desecación de la muestra preparada.

Otra técnica de microscopía utilizada fue la técnica de **cinta adhesiva**, esta consistió en colocar una pequeña gota de tinte azul de lactofenol en el portaobjeto y con la ayuda de una pinza estéril se colocó la cinta adhesiva presionando ligeramente sobre la colonia del hongo con el objetivo de que se quedara pegado el micelio aéreo del hongo. Una vez obtenida la muestra del hongo, se colocó sobre el portaobjetos. Luego, se cubrió la muestra con un cubreobjeto y se llevó al microscopio para su observación.

La observación de estructuras reproductivas fueron nuevamente inoculadas en medios de cultivo MEA, con el fin de obtener alguna estructura distinta a las vegetativas del hongo. Además, se realizó la técnica de siembra en **microcultivo**. La técnica por siembra en microcultivo consistió en colocar cuidadosamente un fragmento de medio de cultivo gelificado de aproximadamente 1 cm de lado y 2 mm de espesor de una placa estéril previamente preparada después de esterilizar. La muestra del hongo se inoculó en los bordes del medio de agar y luego se cubrió con un cubreobjeto esterilizado. Posteriormente, se incubó en una cámara húmeda a temperatura ambiente.

Una vez, todas las cepas fueron examinadas a partir de un microscopio de campo claro *LEICA DM750* equipado con cámara fotográfica digital *LEICA ICC50 HD*, preparadas en placas de portaobjetos, donde se examinó las muestras utilizando primero el objetivo 4x y hasta observar con detalle la morfología filamentosa inalterada de las estructuras fúngicas. Para la identificación de las muestras se utilizó las guías “Soil and Seed Fungi” (Watanabe, 2002), Géneros ilustrados de hongos imperfectos (Barnett & Hunter, 1972), Identification of Pathogenic Fungi (Campbell, 2013) y referencias publicadas en bases de datos públicas.

2.5 Etapa 2. Identificación molecular

Las cepas seleccionadas se inocularon en platos Petri con medio de cultivo PDA, con períodos de incubación entre 7 a 10 días de crecimiento a 28 °C. Posteriormente, el micelio recogido se transfirió asépticamente a un mortero refrigerado para triturarlo con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino; posteriormente se colectó el micelio macerado y se añadió en tres tubos de 2ml por cada cepa fúngica, el material obtenido se almacenó a -80°C en congeladores mecánicos para una congelación ultra fría (Hernández, 2003).

2.5.1 Extracción de ADNg

Para las cepas con crecimiento micelial en platos de Petri con medio de cultivo, el proceso de extracción de ADN genómico (ADNg) se realizó el aislamiento a partir de las muestras de biomasa maceradas con nitrógeno líquido, que fueron previamente congeladas a -80°C para su posterior uso. La preservación en frío (criopreservación), es el método más recomendado y utilizado para reducir el riesgo de alteración genética entre las especies de hongos analizados (Montesinos-Matías et al., 2015).

Para realizar la extracción de ADN, se utilizó el protocolo del Kit Nucleo Spin Plant II (Macherey-Nagel, 2020). Se realizaron las extracciones de ADNg siguiendo las instrucciones de acuerdo con el fabricante con algunas modificaciones. A partir de este punto, se inició el proceso de extracción que consistió en pesar entre 50-200 mg (0.05-0.20g) de micelio, previamente macerado y congelado a -80°C , en tubos de 2 mL. Luego, se pesaron 150 mg (0.15 g) de perlas de cristal en tubos de 1.5 mL.

Las perlas de cristal se añadieron en los tubos donde previamente contenían el micelio, una vez añadido las perlas de cristal se agregaron 200 μL de Buffer PL1, y se homogenizó la mezcla durante 10 segundos, empleando el homogeneizador de baja velocidad marca (Vórtex VWR). Posteriormente, se añadieron otros 100 μL de Buffer PL1 y se continuó con la homogeneización de las muestras con el homogeneizador de baja velocidad.

En algunas muestras que no se homogeneizaron fácilmente, se adicionó más Buffer PL1, hasta lograr que las muestras fueran manejables. Tomando en cuenta que el volumen del Buffer PC hubo de ser incrementado proporcionalmente. Seguidamente, se añadieron 10 μL de RNAsa, se mezclaron mediante vórtex durante 10 segundos, y las muestras se incubaron en un termobloque (marca LABSTAC), a 65°C durante 60 minutos.

Al finalizar el tiempo de incubación en termobloque, se adiciona 100 μL de cloroformo y se mezclaron las muestras en vórtex durante 10 segundos. Seguidamente, para separar las fases, se centrifugaron a máxima velocidad durante 15 minutos en una centrifugadora (marca LABSTAC). Una vez finalizada la centrifugación, se pipeteó el sobrenadante que corresponde a la capa acuosa superior y se transfirió a un nuevo tubo de 1.5 mL. Luego, el sobrenadante extraído de la fase anterior se cargó en una columna NucleoSpin®Filter, que consistía en un anillo violeta colocado dentro de un tubo colector de 2 mL. Las muestras se centrifugaron a 10,690 rpm durante 2 minutos. Seguido el tiempo de centrifugación, se colectó el filtrado y se descartó el NucleoSpin®Filter.

Posteriormente, al tubo colector de 2 mL que contiene el lisado filtrado de la fase anterior se le añadieron 450 μL de Buffer PC, mezclando correctamente

mediante pipeteo. Esta mezcla se transfirió a la columna verde del NucleoSpin®Filter que consistía en colocar el anillo verde dentro de un tubo colector de 2 mL. Se cargó la muestra, asegurándose de no superar el límite máximo de 700 µL, que es la capacidad máxima del tubo colector del NucleoSpin®Filter. Luego, se centrifugó a 10,690 rpm durante un minuto y se descartó el filtrado.

El proceso de lavado y secado de la membrana de sílice inició, añadiendo 400 µL de Buffer PW1 a la columna verde y se centrifugó a 10,690 rpm durante un minuto, descartando el filtrado. Luego, se añadieron 700 µL de Buffer PW2, se centrifugó nuevamente a 10,690 rpm durante un minuto. A continuación, se adicionaron 200 µL de Buffer PW2 y se centrifugó a 10.690 rpm durante dos minutos. Después, se descartó el tubo colector y se secó completamente la membrana de sílice.

Posteriormente, el anillo verde se colocó dentro de un nuevo tubo de 1.5 mL, y se añadieron 25 µL de Buffer Elution dentro de la columna verde, esto se incubó a 65°C durante 5 minutos. Al finalizar el tiempo de incubación, se centrifugó a 10,690 rpm durante 1 minuto. Después del tiempo de centrifugación, se verificó la calidad y concentración de ADNg utilizando el espectrofotómetro NanoDrop (espectrofotómetro UV Visible BioSpec Nano (SHIMADZU). Para la cuantificación, se colocó 1 µL de ADN en el equipo NanoDrop. Finalizando este proceso se analizó el ADNg, mediante electroforesis en gel agarosa 0.7%.

La cantidad de muestras de ADNg cargadas en el gel, se distribuyó de la siguiente forma: para el pocillo que contenía el marcador de peso molecular (MPM), se utilizó 5ul de un marcador de 1kb/amresco (VWR), 2 µL de Loading Buffer 6X, y 3 µL de H₂O_{mq}. Para los pocillos que contenían las muestras de ADNg se añadió 2ul del producto de PCR, 2 µL de Loading Buffer 6X y 6 µL de H₂O_{mq}. La cantidad total de las muestras cargadas en el gel de agarosa fue 10 µL por pocillo, y se corrió a 60 V durante 60 minutos. Al finalizar el tiempo de electroforesis las bandas del ADN se visualizaron en el fotodocumentador Gel Doclte Imaging System, UVP®.

Para las cepas con crecimiento pulverulento, se les realizó extracción de ADNg mediante la técnica de esparcido de esporas. Dentro de la cámara de flujo laminar, la técnica consistió en añadir 3000 µl de agua MiliQ estéril a la cepa en platos Petri con medio de cultivo PDA. Con la ayuda de una espátula Drigalski, se desprendieron las conidias del hongo realizando movimientos delicados de esparcidos, las cuales se recogieron en un volumen de 1000 µL de la mezcla y se añadieron en tubos Eppendorf de 2 mL. Posteriormente, se eliminó el medio líquido de las colonias mediante centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos. Una vez transcurrida la primera centrifugación, se descartó el sobrenadante y el proceso se finaliza realizando 3 lavados de la muestra hasta obtener una

preparación libre de medio de cultivo. A partir de este punto, se realizó el mismo procedimiento de extracción de ADNg anteriormente mencionado, que corresponde al protocolo de extracción de ADN, kit de extracción Kit Nucleo Spin Plant II.

2.5.2 Amplificación por PCR a punto final

Las muestras de ADN fúngico se analizaron mediante la amplificación por PCR a punto final, utilizando los cebadores ITS5 e ITS4, que han sido probados en numerosas investigaciones para la identificación de cepas fúngicas (Raja et al., 2017). Esta amplificación se aplicó a todas las muestras de ADN fúngico extraído de la región transcrita interna completa conservada. Las amplificaciones se realizaron en el termociclador MyCycler Bio-Rad, cada reacción se hizo con un volumen final de 25 μ L con las siguientes concentraciones de reactivos: 100-200 ng de ADNg, 10 mM dNTPs (BioRad), 5U/ μ L Taq ADN polimerasa (Invitrogen), 10 μ M de cada cebador (ITS5for: 5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG '3 y ITS4rev: 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC '3, Buffer 10x PCR, 50 mM MgCl₂ (Invitrogen) (ver Tabla 2).

Tabla 2. Reactivos y condiciones utilizadas para realizar la amplificación del ADN genómico fúngico mediante la técnica de PCR.

Reactivos	Concentración stock	X	MIX
Buffer	10x	2,5 μ L	8.75 μ L
dNTP's	10mM	0,5 μ L	1.75 μ L
MgCl ₂	50mM	1,25 μ L	4.375 μ L
Primer ITS5 for	10 μ M	0,6 μ L	2.1 μ L
Primer ITS4 rev	10 μ M	0,6 μ L	2.1 μ L
Taq polimerasa	5U/ μ L	0,125 μ L	0.4375 μ L
H ₂ O _{mq}	-	17,925 μ L	62.7375 μ L
ADNg Molde	100-200 ng	1,5 μ L	5.25 μ L
		25 μL	87.5 μL
		Para un tubo de PCR	Para 3.5 tubos de PCR
Volumen Total	-	-	23.5 μ L MIX para cada tubo + 1.5 μ L de ADNg

Las condiciones de reacción para las amplificaciones con el kit taq DNA polymerase recombinante (Invitrogen by life technology), en el termociclador para 32 ciclos fueron las siguientes: ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 94 °C durante 15 segundos, 56 °C durante 15 segundos, elongación a 72 °C durante 40 segundos, y una extensión final a 72 °C durante 7 minutos (ver Tabla 3).

Tabla 3. Programación del termociclador utilizado para la amplificación de la región ITS mediante la técnica de PCR.

Programación	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	5 minutos	32
Desnaturalización	94°C	15 segundos	
Desnaturalización	56°C	15 segundos	
Elongación	72°C	40 segundos	
Extensión final	72°C	7 minutos	
Reposo	4°C	∞	

Para confirmar el tamaño del fragmento de los productos amplificados por PCR, estos se evaluaron mediante la electroforesis en gel de agarosa al 1%. El orden de las muestras cargadas en el gel de agarosa fue en el siguiente orden: el pocillo que contenía el marcador de peso molecular (MPM), se utilizó 5 µL de un marcador de 100 pb/amresco (VWR), 2 µL de Loading Buffer 6X, y 3 µL de H₂O_{mq}. Para los pocillos que contenían las muestras de ADN amplificadas, se añadieron 4 µL del producto de PCR, 2 µL de Loading Buffer 6X y 4 µL de H₂O_{mq} (ver Tabla 4). La cantidad total de las muestras cargadas en el gel de agarosa fue 10 µL por pocillo, y se corrió a 60 V durante 90 minutos. Al finalizar el tiempo de electroforesis el producto amplificado se visualizó en el fotodocumentador Gel DocIt Imaging System, UVP®.

La técnica mejorada que se utilizó para realizar la amplificación de ADN_g mediante PCR de las regiones ITS4 e ITS5, fue estandarizada por la Dra. Gesabel Navarro en el Laboratorio de Estudios Moleculares y Micología del Centro de Investigación e Información de Medicamentos y Tóxicos (CIIMET), Facultad de Medicina.

Tabla 4. Preparación de las muestras cargadas con electroforesis en gel de Agarosa 1% para muestras de producto de PCR.

Cepa	Prod. PCR	LB6X	H ₂ O _{mq}	Total
MPM (100pb)	5µL	2µL	3µL	10µL
Control -	4µL	2µL	4µL	10µL
Cepa 1	4µL	2µL	4µL	10µL
Cepa 2	4µL	2µL	4µL	10µL
Cepa 3	4µL	2µL	4µL	10µL

2.5.3 Secuenciación del ADN_g

La secuenciación del material génico se realizó una vez se confirmaba la concentración y los fragmentos esperados del ADN genómico de cada cepa seleccionada. Los amplicones obtenidos por PCR a punto final, fueron enviados mediante el servicio brindado por la empresa Psomagen (Maryland, Estados Unidos) y Macrogen (Seúl, Corea del Sur).

La secuenciación seleccionada fue estándar tipo Sanger como criterio de control de calidad de las secuencias de ADN obtenidas de cada cebador. Las muestras se secuenciaron en ambas direcciones (forward y reverse). La secuenciación Sanger es un procedimiento de secuenciación por síntesis, que se fundamenta

en la duplicación de una molécula de ADN mediante el ADN polimerasa. La ADN polimerasa, a partir de un oligonucleótido cebador, genera un grupo de oligonucleótidos de variados tamaños y complementarios a la hebra molde (Valderrama Martín et al., 2020).

Se revisó el contenido de guanina-citosina y los cromatogramas producidos en la secuenciación. Estos datos permitieron investigar toda la información registrada en las bases de datos sobre el orden de las secuencias similares al hongo de interés en la investigación. Se utilizó la base de información internacional del National Center for Biotechnology Information (NCBI), USA, que facilitó las conexiones con las bases de datos bibliográficas más importantes, permitiendo una conexión rápida al acceso y análisis sencillo.

En el programa BioEdit, donde se trabajó con las secuencias iniciales para obtener una secuencia consenso. Las dos secuencias forward y reverse fueron copiadas y pegadas en un nuevo archivo a través de la opción "File-New from clipboard". A continuación, se realizó un alineamiento por pares seleccionando las dos secuencias y utilizando la función "Sequence-Pairwise alignment-Align two sequences (allow ends to slide)", lo que permitió alinear ambas secuencias y observar sus similitudes y diferencias. Una vez alineadas, se generó la secuencia consenso a través de "Alignment-Create consensus sequence". Este procedimiento se repitió para todas las muestras a analizar.

Luego, con las secuencias consenso generadas, se procedió al primer chequeo de identidad utilizando la herramienta *BLASTn* en la plataforma del NCBI. Para esto, se ingresó cada secuencia consenso en el recuadro del programa, asegurándose de que incluyera el símbolo ">" al inicio, necesario para que el sistema interprete correctamente la secuencia. Con los parámetros por defecto, se realizó la búsqueda BLAST, obteniendo como resultado la secuencia más similar en la base de datos, junto con valores importantes como porcentaje de identidad. Posteriormente, debido a que las secuencias consenso pueden variar en longitud, se utilizó el programa MEGA X para realizar un alineamiento. En MEGA X, se seleccionó la opción "Edit/Build Alignment" dentro del menú ALIGN, lo que permitió crear un nuevo alineamiento especificando el tipo de datos (DNA). Esta base de datos incorpora la herramienta BLAST, que es fundamental para llevar a cabo búsquedas y así facilitar la descarga de secuencias de archivos.

2.5.4 Árbol filogenético

Al obtener información sobre las secuencias de las cepas fúngicas, se investigó toda la información registrada en las bases de datos sobre el orden de las secuencias similares al hongo de interés en la investigación. Una vez reconocidas las secuencias de los hongos con un alto porcentaje de similitud en diversas áreas geográficas, se llevó a cabo un análisis para realizar el árbol

filogenético. Finalmente, se seleccionó el modelo evolutivo TIM2e+G4 mediante el análisis de máxima verosimilitud con el software IQ-TREE, utilizando la función de selección automática de modelos (ModelFinder). Este modelo permitió representar las sustituciones nucleotídicas de forma realista, considerando distintas tasas de transición y transversión, así como la variación evolutiva entre sitios. Con este programa se construyó los árboles filogenéticos, lo que permitió visualizar las relaciones evolutivas entre las secuencias y preparar los datos para análisis posteriores.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Resultados

3.1.1 Identificación macroscópica y microscópica

En este estudio se logró reactivar y agrupar 65 cepas de hongo filamentosos de forma satisfactoria, con una diversidad amplia de características de crecimiento de colonias con micelios aéreos, de texturas desde lanoso (algodonoso), felpa, aterciopelado, cartilaginoso, inmerso, pulverulento a granulado, presencia de exudados, pigmentación del anverso y reverso de la colonia o pigmento difusible en el medio de cultivo (ver Figura 11).

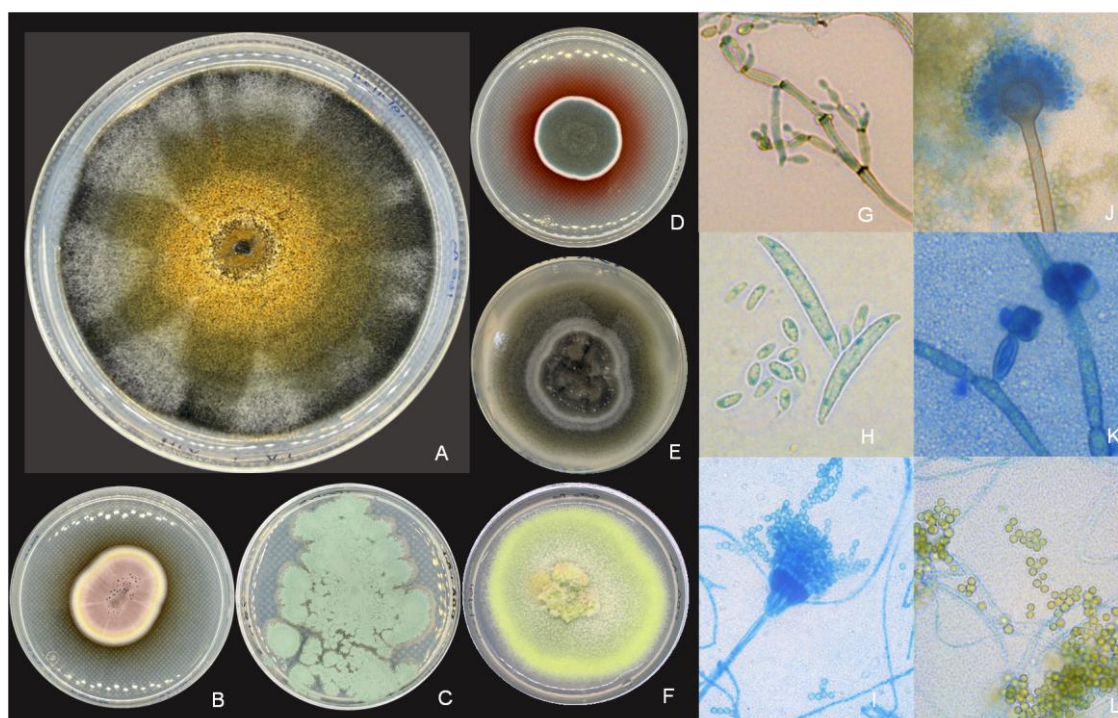


Figura 11. Características macroscópicas y microscópicas de hongos aislados provenientes del agua de la Bahía de Panamá. Se muestran ejemplos representativos de: vista frontal de las colonias en plato de Petri con PDA (A-F), conidiación tipo *Cladosporium* (G), microconidios y macroconidios (H), conidióforo biverticilado (I), conidióforo vesícula circular (J), conidiación tipo phialophora (K), conidios redondos sueltos (L).

La identificación morfológica de las cepas se basó utilizando como criterio sus características macroscópicas y microscópicas, lo que confirmó que la mayoría comprenden hongos ascomicetos conidiales o estados estériles, esto de acuerdo con características presenciales como las hifas tabicadas, crecimiento por elongación apical, presencia esporas grandes de paredes gruesas tipo clamidosporas, conidióforos biverticilado.

Del total de cepas seleccionadas, el 60% (39 cepas) presentaron un tamaño de crecimiento limitado (crecimiento lento) entre seis a 15 días de incubación, y el

40% (26 cepas) obtuvieron un tamaño de crecimiento de moderado (a invasiva), entre tres a cinco días de incubación (ver Tabla 5 y Figura 12).

Tabla 5. Tasa o Tamaño de crecimiento limitado (lento) o invasivo (moderada a rápida) de las colonias de las cepas estudiadas.

Código de cepa	Tasa de crecimiento	Tiempo en días	Sitio de Muestreo
218Ag	Lento	15	Salida del Río Matasnillo
238Ag	Lento	15	Las Bóvedas
048AgM3	Lento	15	Coco del Mar
211Ag	Lento	15	Boca La Caja
212Ag	Lento	15	Boca La Caja
40Ag	Lento	14	Panamá La Vieja
227Ag_b	Lento	13	Hospital Santo Tomás
48Ag	Lento	13	Coco del Mar
227Ag_a	Lento	13	Hospital Santo Tomás
236Ag	Lento	13	Antigua Autoridad de la Región Interoceánica
215Ag	Lento	13	Isla Flamenco
237bAg	Lento	13	Antigua Autoridad de la Región Interoceánica
233Ag_b	Lento	12	Costa del Este
233Ag_a	Lento	12	Costa del Este
233Ag	Lento	12	Costa del Este
233bAg	Lento	12	Costa del Este
165Ag	Lento	12	Boca La Caja
234Ag	Lento	11	Costa del Este
30Ag_a	Lento	11	Panamá La Vieja
216Ag	Lento	11	Isla Flamenco
56Ag	Lento	10	Coco del Mar
49Ag_a	Lento	10	Salida del Río Matasnillo
51Ag	Lento	10	Salida del Río Matasnillo
231Ag	Lento	10	Club Unión
10Ag_b	Lento	9	Antigua Autoridad de la Región Interoceánica
23Ag	Lento	9	Costa del Este
99Ag	Lento	9	Antigua Autoridad de la Región Interoceánica
6Ag	Lento	9	Isla Flamenco
26Ag	Lento	9	Panamá La Vieja
31Ag	Lento	9	Panamá La Vieja
B36Ag	Lento	9	Panamá La Vieja
A80Ag	Lento	9	Boca La Caja
95Ag	Lento	9	Avenida de los Poetas
10Ag_c1	Lento	9	Antigua Autoridad de la Región Interoceánica
10Ag_c2	Lento	9	Antigua Autoridad de la Región Interoceánica
011Ag	Lento	9	Coco del Mar
2Ag_b	Lento	8	Coco del Mar
22Ag	Lento	8	Costa del Este

2Ag	Lento	8	Coco del Mar
18Ag	Moderado	5	Costa del Este
29Ag	Moderado	5	Panamá La Vieja
58Ag	Moderado	5	Salida del Río Matasnillo
111Ag	Moderado	5	Isla Flamenco
108Ag	Moderado	5	Isla Flamenco
112Ag	Moderado	5	Antigua Autoridad de la Región Interoceánica
169Ag	Moderado	5	Isla Flamenco
115Ag	Moderado	5	Boca La Caja
8Ag_b	Moderado	5	Avenida de los Poetas
107Ag	Moderado	5	Isla Flamenco
232Ag	Moderado	5	Costa del Este
170Ag	Moderado	5	Costa del Este
27Ag_b	Moderado	4	Panamá La Vieja
82Ag	Moderado	4	Boca La Caja
83Ag	Moderado	4	Boca La Caja
163Ag	Moderado	4	Boca la Caja
109Ag	Moderado	4	Isla Flamenco
25Ag	Moderado	4	Panamá La Vieja
84Ag_a	Moderado	4	Club Unión
100Ag	Moderado	4	Antigua Autoridad de la Región Interoceánica
205Ag	Moderado	4	Boca La Caja
101Ag	Moderado	4	Antigua Autoridad de la Región Interoceánica
49Ag_b	Moderado	4	Salida del Río Matasnillo
84Ag_b	Moderado	4	Club Unión
1Ag	Moderado	3	Panamá La Vieja
4Ag	Moderado	3	Las Bóvedas

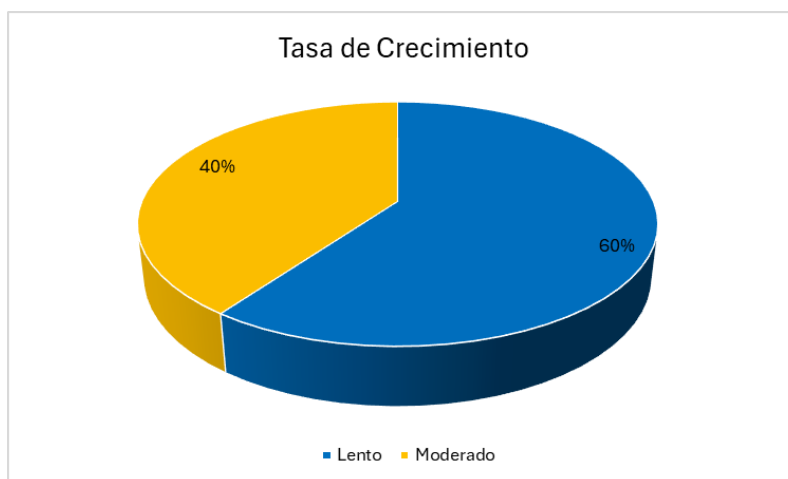


Figura 12. Tasa de crecimiento de las colonias de cepas de hongos estudiados.

3.1.2 Identificación macroscópica de hongos filamentosos

En las Figuras 13 y 14, se muestran ejemplos representativos de las características macroscópicas de los hongos estudiados, destacando que la textura más común fue la pulverulenta con un 33.8% (22 cepas), seguida por la textura aterciopelada con un 32.3% (21 cepas) y la afelpada, que representó el 23.1% (15 cepas). En menor proporción, se observaron colonias con texturas vellosa con 9.2% (seis cepas), mientras que la menos frecuente fue la algodonosa, con solo el 1.5% (una cepa).

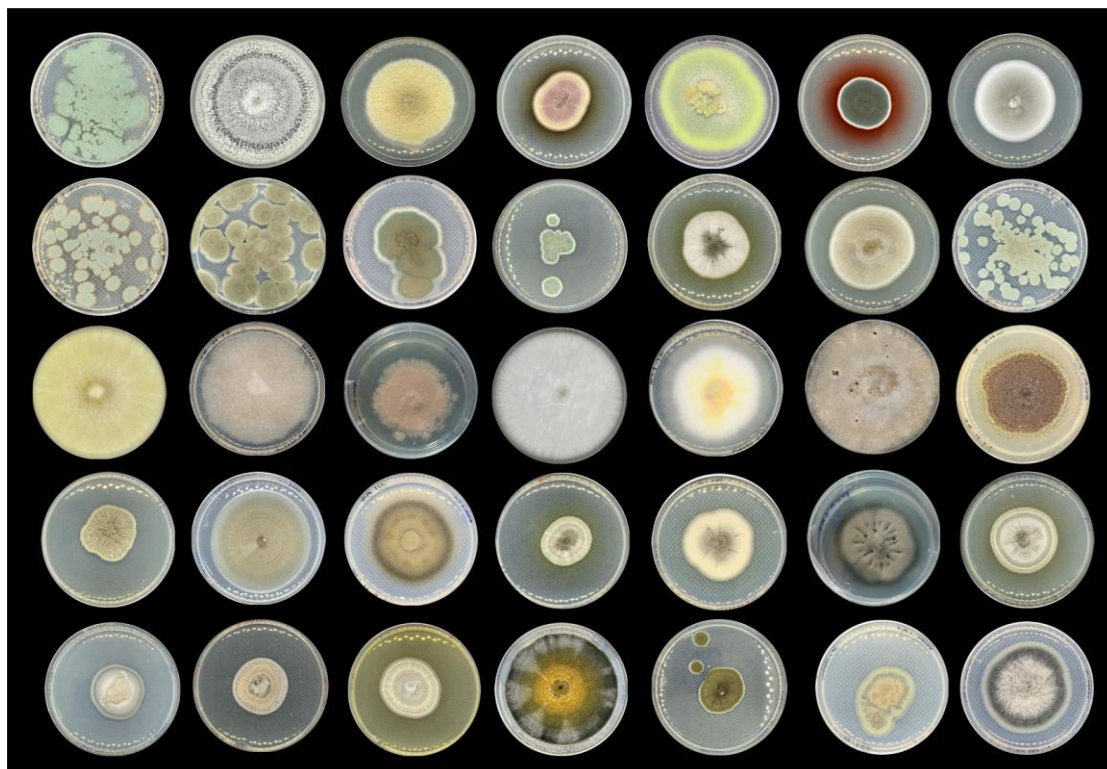


Figura 13. Características morfológicas macroscópicas de hongos filamentosos aislados del agua de la Bahía de Panamá, observados en medio de cultivo PDA. Se muestran ejemplos representativos, mostrando un micelio con sus diferentes texturas, color, forma y tamaño de las colonias fúngicas.

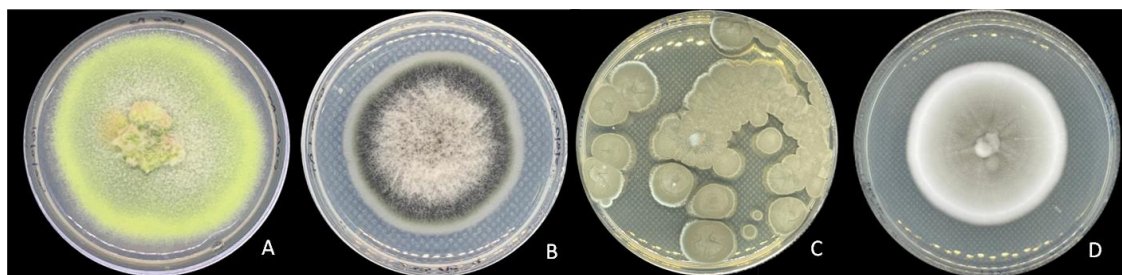


Figura 14. Morfología macroscópica de los tipos de texturas del micelio de las colonias fúngicas en medio de cultivo PDA. Se muestran ejemplos representativos de texturas afelpada (A), vellosa (B), pulverulenta (C), aterciopelada (D).

Otra característica morfológica macroscópica es la presencia de exudados en la superficie del micelio de las colonias fúngicas, el desarrollo de esta característica puede variar de color entre los géneros. El 30.8% (20 cepas) de cepas analizadas presentaron exudados, mientras que la mayoría con 69.2% (45 cepas) no lo desarrollaron al transcurrir su tiempo en incubación. El color del exudado varió entre las cepas, 12 cepas (18.5%) presentaron un exudado de color amarillo, cuatro cepas (6.2%) presentaron un color crema, dos cepas (3.1%) presentaron un color negro, una sola cepa presentó un color rojo y cepa fue traslúcida (ver Figura 15).

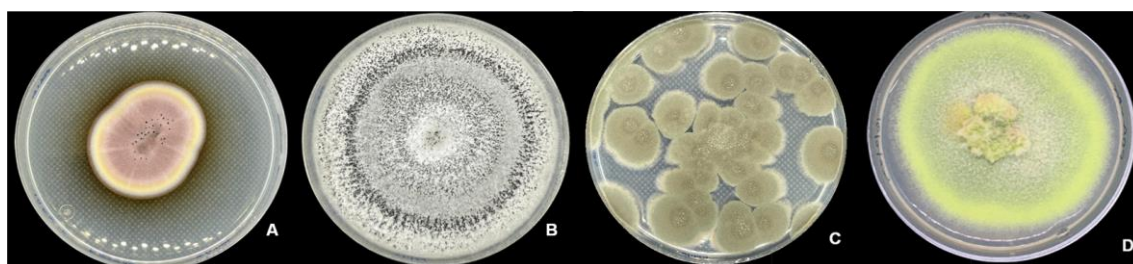


Figura 15. Presencia de exudados en las colonias fúngicas cultivadas en medio PDA. Se muestran ejemplos representativos de diferentes colores en los exudados: A) Exudados rojo. B) Exudados negro. C) Exudado crema. D) Exudados amarillo.

La Figura 16 muestra que 14 cepas (21.5%) analizadas desarrollaron pigmentación en el agar del medio de cultivo. Dentro de las cepas que desarrollaron pigmentación, el 18.5% (12 cepas) presentó una pigmentación de color amarillo, y el 3.1% (2 cepas), mostró pigmentación de color rojo.

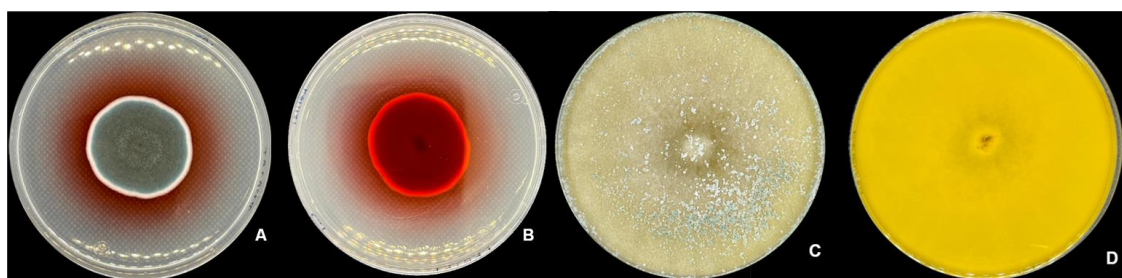


Figura 16. Presencia de pigmentos en las colonias fúngicas cultivadas en medio PDA. Se muestran ejemplos representativos de la pigmentación en el agar de la colonia frontal y en el reverso, mostrando pigmento de color rojo (A-B) y amarillo (C-D).

Estas diferentes observaciones macroscópicas de las colonias fúngicas estudiadas permiten realizar una correcta identificación y clasificación de los hongos. Toda esta información fue organizada en un cuadro descriptivo que resume las características morfológicas observadas en cada cepa fúngica estudiadas, lo que facilita la interpretación de la diversidad fúngica en las muestras y contribuye a su identificación preliminar (ver Figura 17 y Tabla 6).

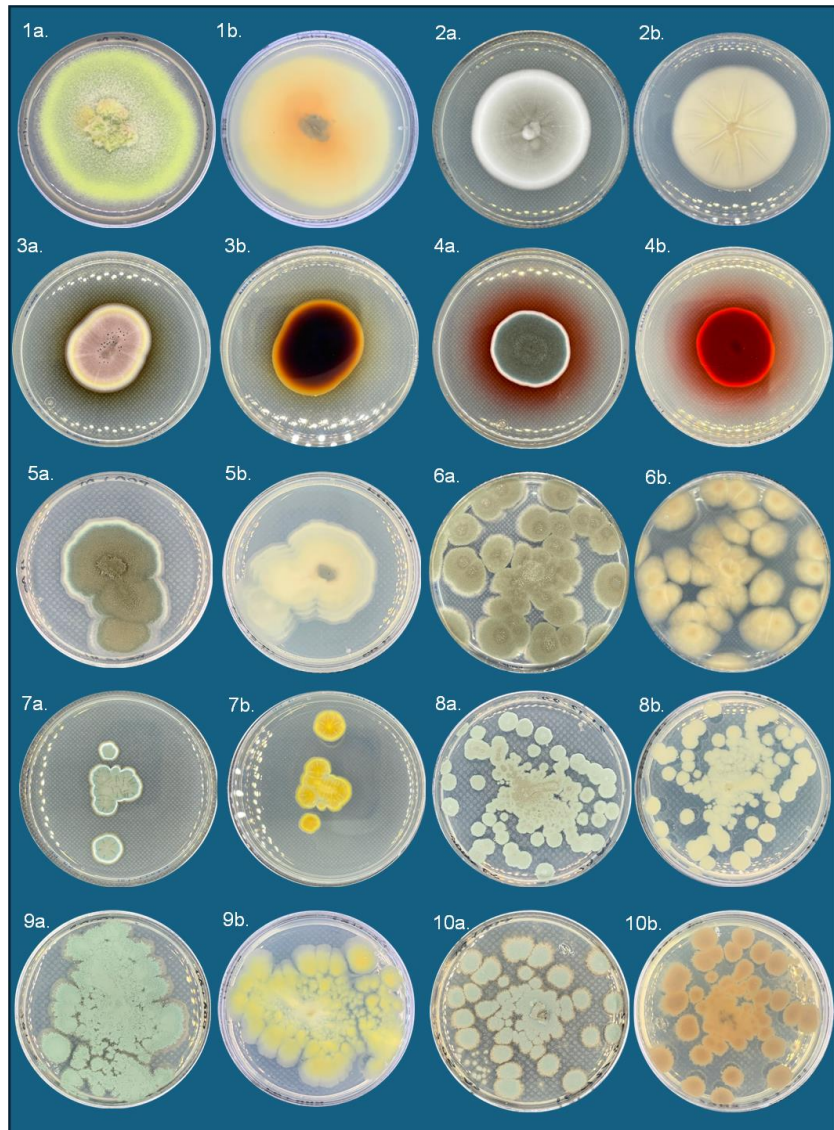


Figura 17. Morfología macroscópica de las cepas de hongos estudiados. Crecimiento de las cepas en platos de Petri en medio de cultivo en PDA para analizar las características a nivel macroscópico (anverso y reverso), tiempo de incubación durante un período de 3 a 9 días, a una temperatura de 25-28°C. Parte I.

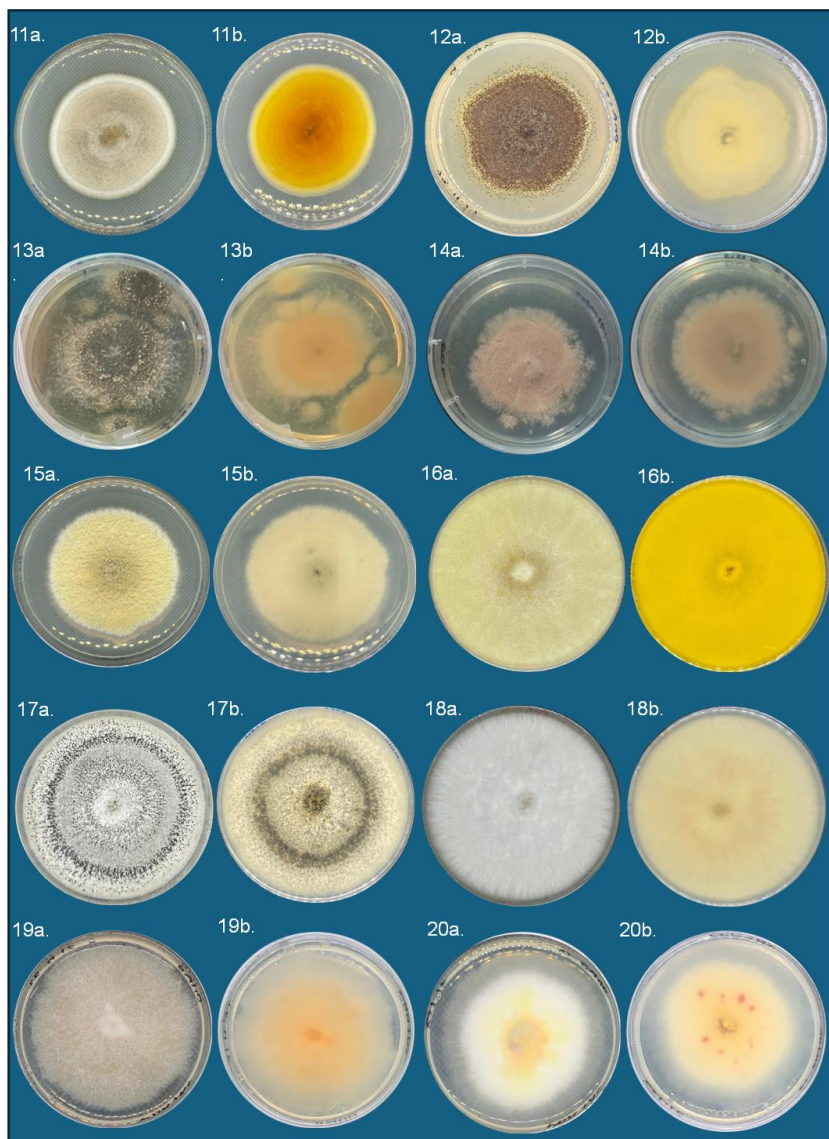


Figura 17. 1. Continuación de la Figura 17. Morfología macroscópica de las cepas de hongos estudiados. Parte II.

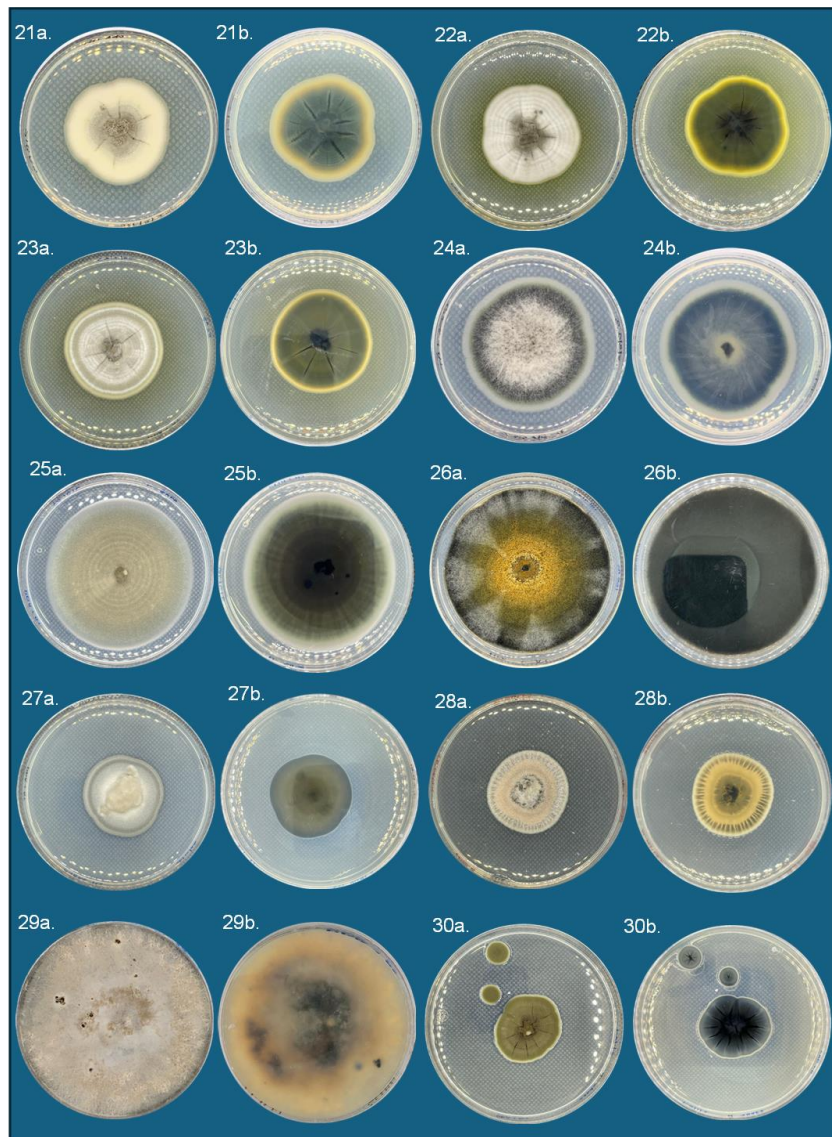


Figura 17. 2. Continuación de la Figura 17. Morfología macroscópica de las cepas de hongos estudiados. Parte III.

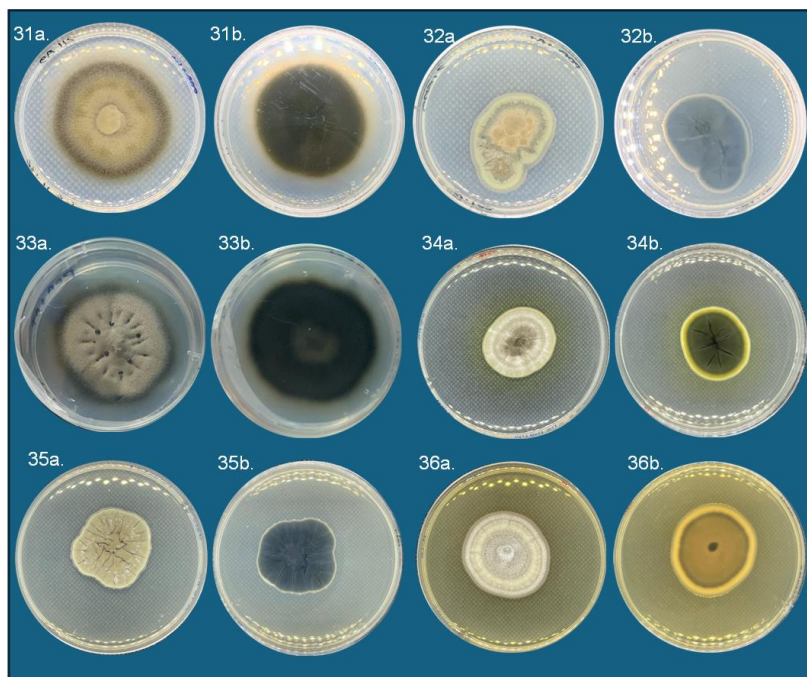


Figura 17. 3. Continuación de la Figura 17. Morfología macroscópica de las cepas de hongos estudiados. Parte IV.

Tabla 6. Descripción de las características morfológicas de las cepas de hongos estudiados.

#	Código de cepa	Características macroscópicas (Anverso y reverso)
1a -1b	10Ag_b, 23Ag, 99Ag, 6Ag, 26Ag, 31Ag, B36Ag, A80Ag, 95Ag	Colonia de textura afelpada con exudados amarillo en el centro, mucho micelio aéreo verde, margen liso con flecos y una coloración distintiva: verde en el centro que se degrada a un tono amarillo en el borde. La colonia pigmenta el medio de cultivo PDA de amarillo. Reverso de color crema, no desarrolla crecimiento de micelio inmerso en el agar.
2a -2b	10Ag_c1	Colonia de textura aterciopelada sin exudados, poco micelio aéreo de color blanco, margen liso, circular sin flecos y una coloración distinta en el centro gris que se degrada a un color blanco en el borde de la colonia. Presenta elevación plana, no desarrolló crecimiento de micelio dentro del agar. Sin pigmento en el agar, y el reverso es de color blanco.
3a -3b	10Ag_c2	Colonia con textura aterciopelada con exudados rojos en el centro de la colonia, poco micelio aéreo de color blanco, margen liso, circular sin flecos y coloración distinta en el centro rojo que se degrada a un color amarillo en el borde. Presenta elevación plana y no desarrolló crecimiento de micelio inmerso en el agar. Con pigmentación rojo en el medio PDA, reverso de color oscuro que se degrada de amarillo en el borde.
4a-4b	1Ag	Colonia de textura pulverulenta sin exudados, poco micelio aéreo de color verde, margen liso, circular sin flecos. Coloración de la colonia en el centro de color verde olivo en el centro y un color blanco muy marcado en el borde. Presenta elevación plana y no desarrolló crecimiento de micelio inmerso en el agar. Pigmentación de color rojo en el medio de cultivo PDA, y el reverso de color oscuro con una línea blanca en el borde de la colonia.
5a-5b	4Ag, 18Ag	Colonia de textura pulverulenta sin exudados, poco micelio aéreo de color verde, margen irregular, ondulado sin flecos. Coloración de la colonia en el centro de color verde olivo en el centro y un color blanco muy marcado en el borde. Elevación plana y no desarrolló crecimiento de micelio inmerso en el agar, sin pigmentación en el medio de cultivo PDA, y el reverso de la colonia es de color crema.
6a - 6b	25Ag, 84Ag_a, 84Ag_b, 163Ag	Colonia de textura pulverulenta con exudados crema en el centro, poco micelio aéreo de color verde, margen irregular, con flecos. Coloración verde con bordes blancos, elevación plana y no desarrolló crecimiento de micelio inmerso en el agar. Sin pigmentación en el medio de cultivo PDA, y el reverso de la colonia es de color crema.

7a-7b	49Ag_b	Colonia de textura pulverulenta sin exudados, coloración verde en el centro con una línea de color blanca en el borde, poco micelio aéreo de color verde, margen circular sin flecos. Presenta elevación plana, sin crecimiento de micelio inmerso en el agar. No presentó pigmentación en el medio de cultivo PDA, y el reverso de la colonia es de color amarillo.
8a-8b	29Ag, 58Ag, 82Ag, 83Ag, 108Ag, 111Ag, 109Ag, 112Ag	Colonia de textura pulverulenta sin exudados, poco micelio aéreo de color verde, margen circular sin flecos, coloración de la colonia en verde. Presenta elevación plana, no desarrolló crecimiento de micelio inmerso en el agar. Sin pigmentación en el medio de cultivo PDA, y el reverso de la colonia es de color crema.
9a-9b	100Ag	Colonia de textura pulverulenta sin exudados, micelio aéreo de color verde, coloración de la colonia verde menta, margen irregular con flecos. Presenta elevación plana, desarrolló poco crecimiento de micelio inmerso en el agar. Sin pigmentación en el medio de cultivo PDA, y el reverso de la colonia es de color amarillo en el centro con borde claro.
10a-10b	205Ag	Colonia de textura pulverulenta sin exudados, micelio aéreo de color verde con margen irregular con flecos. Coloración verde con bordes naranja. La colonia presenta elevación plana, desarrolló poco crecimiento de micelio inmerso en el agar. Sin pigmentación en el medio de cultivo PDA, y el reverso de la colonia es de color naranja.
11a-11b	101Ag	Colonia de textura aterciopelada con exudados amarillo, micelio aéreo blanco, y un margen circular. Coloración gris con bordes claros, presenta elevación plana, y sin crecimiento de micelio inmerso en el agar. Sin pigmentación en el medio de cultivo PDA, y el reverso de la colonia es de color amarillo.
12a-12b	169Ag, 115Ag, 8Ag-b	Colonia de textura pulverulenta sin exudados, mucho micelio aéreo oscuro y un margen circular liso. Coloración de la colonia oscura, presenta elevación plana, y poco crecimiento de micelio inmerso en el agar. Sin pigmentación en el medio de cultivo PDA, y el reverso de la colonia de color crema.
13a-13b	107Ag	Colonia de textura afelpada con exudados amarillo, micelio aéreo blanco, y un margen irregular con flecos, que asemejan raíces. Coloración verde que se degrada a tono crema en el borde. Presenta elevación plana, y crecimiento de micelio inmerso en el agar. Sin pigmentación en el medio de cultivo PDA, y el reverso de la colonia presenta un color amarillo en el centro, con bordes de tono crema.
14a-14b	2Ag_b	Colonia de textura aterciopelada, micelio aéreo rosado, sin exudados. Coloración de la colonia rosa, margen irregular con flecos que asemejan raíces. Presenta elevación plana, y crecimiento inmerso en el agar. Sin pigmentación en el medio de cultivo PDA. Reverso con coloración chocolate.
15a-15b	232Ag, 27Ag_b, 170Ag	Colonia de textura afelpada que se torna pulverulenta sin exudados, micelio aéreo amarillo, y un margen circular con flecos, que asemejan raíces. Coloración mostaza con línea blanca en el borde de la colonia. Presenta elevación plana, y poco crecimiento de micelio inmerso en el agar. Sin pigmentación en el medio de cultivo PDA, y el reverso de la colonia presenta un color crema.
16a-16b	22Ag	Colonia de textura pulverulenta-granulado sin exudados en el centro, micelio aéreo de color verde, sin margen, crece en todo el medio, y coloración de la colonia en verde. Presenta elevación plana y no desarrolló crecimiento de micelio inmerso en el agar. Pigmentación de color amarillo en el medio de cultivo PDA, y el reverso de color amarillo.
17a-17b	234Ag	Colonia de textura afelpada con exudados en todo el crecimiento de color oscuro, micelio aéreo de color blanco, sin margen, crece en todo el medio, y coloración de la colonia en blanco con manchas circulares oscuras, conocidas como acérvulos globosos. Presenta elevación plana, y desarrolló mucho crecimiento de micelio inmerso en el agar. Sin pigmentación en el medio de cultivo PDA, y el reverso de color crema.
18a-18b	2Ag	Colonia de textura afelpada con exudados traslúcido mucho micelio aéreo blanco, y un margen circular con flecos. Coloración de la colonia blanco. Presenta elevación plana, y crecimiento de micelio inmerso en el agar. Sin pigmentación en el medio de cultivo PDA, y el reverso de la colonia crema.
19a-19b	011Ag	Colonia de textura algodonosa o vellosa sin exudados, mucho micelio aéreo blanco, y un margen irregular con flecos, que asemejan raíces. Coloración rosa, presenta elevación plana, y crecimiento de micelio inmerso en el agar. Sin pigmentación en el medio de cultivo PDA, y el reverso de la colonia de color crema.
20a-20b	30Ag_a	Colonia de textura aterciopelada con exudados amarillo, micelio aéreo de color blanco, y margen circular con flecos que asemejan raíces. Coloración de la colonia de amarillo en el centro que degrada a blanco en el borde. Presenta elevación plana, y desarrolló mucho crecimiento de micelio inmerso en el agar. Sin pigmentación en el medio de cultivo PDA, y el reverso de color crema con machas de color rosa.
21a-21b	218Ag	Colonia de textura aterciopelada sin exudados, micelio aéreo de color blanco, margen liso, irregular sin flecos y una coloración distinta en el centro oscuro que se degrada a un color blanco en el borde de la colonia. Presenta elevación acuminada, no desarrolló crecimiento de micelio inmerso en el agar. Sin pigmentación en el medio de cultivo PDA, y el reverso cartilaginoso de color oscuro con borde claro.

22a-22b	227Ag_b	Colonia de textura aterciopelada y concéntrica sin exudados, micelio aéreo de color blanco, margen liso, circular sin flecos y una coloración distinta en el centro oscuro que se degrada a un color blanco en el borde de la colonia. Presenta elevación acuminada, no desarrolló crecimiento de micelio inmerso en el agar. Sin pigmentación en el medio de cultivo PDA, y el reverso cartilaginoso de color oscuro con borde claro.
23a-23b	56Ag	Colonia de textura aterciopelada y concéntrica sin exudados, micelio aéreo de color gris, y margen liso circular sin flecos. Coloración gris con líneas blancas en toda la colonia. Presenta elevación plana, no desarrolló crecimiento de micelio inmerso en el agar. Con pigmentación amarilla en el medio de cultivo PDA, y el reverso cartilaginoso de color oscuro con borde claro.
24-24b	238Ag, 233Ag_b, 233Ag_a, 233Ag, 233bAg, 48Ag	Colonia de textura vellosa sin exudados, mucho micelio aéreo de color blanco, y margen liso, circular sin flecos. Coloración verde olivo, presenta elevación plana, no desarrolló crecimiento de micelio inmerso en el agar. Sin pigmentación en el medio de cultivo PDA, y el reverso cartilaginoso de color oscuro con borde claro.
25a-25b	49Ag_a, 51Ag	Colonia de textura aterciopelada y concéntrica sin exudados, poco micelio aéreo de color verde, y margen liso, circular sin flecos. Coloración de la colonia en verde, presenta elevación plana, no desarrolló crecimiento de micelio inmerso en el agar. Sin pigmentación en el medio de cultivo PDA, y el reverso de color oscuro con borde claro.
26-26b	165Ag	Colonia de textura aterciopelada sin exudados, poco micelio aéreo de color oscuro-blanco, y margen liso, circular sin flecos. Coloración oscura, en el centro de la colonia de color amarillo. Presenta elevación plana, desarrolló crecimiento de micelio inmerso en el agar. Sin pigmentación en el medio de cultivo PDA, y el reverso de color oscuro.
27a-27b	048AgM3	Colonia de textura aterciopelada sin exudados, poco micelio aéreo de color verde-gris, y margen liso, circular sin flecos. Coloración de la colonia en verde, presenta elevación convexa, no desarrolló crecimiento de micelio inmerso en el agar. Sin pigmentación en el medio de cultivo PDA, y el reverso de color oscuro.
28a-28b	227Ag_a	Colonia de textura aterciopelada, poco micelio aéreo de color crema, y margen liso, circular sin flecos. Coloración crema de la colonia, presenta elevación acuminada, no desarrolló crecimiento de micelio inmerso en el agar. Sin pigmentación en el medio de cultivo PDA, y el reverso cartilaginoso de color crema.
29a-29b	40Ag	Colonia de textura afelpada-vellosa sin exudados, mucho micelio aéreo de color blanco, sin margen, crece en todo el medio con flecos que asemejan raíces. Coloración de la colonia en blanco con gránulos circulares oscuras. Presenta elevación plana, y desarrolló mucho crecimiento de micelio inmerso en el agar. Sin pigmentación en el medio de cultivo PDA, y el reverso de color crema, con el centro oscuro.
30a-30b	236Ag	Colonia de textura aterciopelada-cartilaginoso sin exudados, poco micelio aéreo de color verde oscuro, margen liso, circular sin flecos, y coloración verde de la colonia con una línea en el borde. Presenta elevación plana, no desarrolló crecimiento de micelio inmerso en el agar. Sin pigmentación en el medio de cultivo PDA, y el reverso cartilaginoso de color oscuro con una línea blanca en el borde.
31a-31b	211Ag	Colonia de textura aterciopelada, poco micelio aéreo de color chocolate, y margen liso, circular con flecos. Coloración chocolate en el centro, con bordes oscuros. Presenta elevación plana, desarrolló poco crecimiento de micelio inmerso en el agar. Sin pigmentación en el medio de cultivo PDA, y el reverso de color oscuro.
32a-32b	215Ag	Colonia de textura aterciopelada sin exudados, poco micelio aéreo de color chocolate, y margen liso, circular sin flecos. Coloración de la colonia chocolate en el centro con borde verde, presenta elevación convexa, no desarrolló crecimiento de micelio inmerso en el agar. Sin pigmentación en el medio de cultivo PDA, y el reverso de color oscuro con línea blanca en el borde.
33a-33b	237bAg	Colonia de textura aterciopelada con exudados oscuros, poco micelio aéreo de color chocolate, y margen liso, irregular con flecos. Coloración de la colonia chocolate con borde oscuro, presenta elevación plana. Presenta desarrollo de micelio inmerso en el agar. Sin pigmentación en el medio de cultivo PDA, y el reverso de color oscuro.
34a-34b	231Ag	Colonia de textura aterciopelada y concéntrica sin exudados, micelio aéreo de color gris, y margen liso circular sin flecos. Coloración gris con línea verde en la colonia. Presenta elevación plana, no desarrolló crecimiento de micelio inmerso en el agar. Pigmentación de color amarillo en el medio de cultivo PDA, y el reverso cartilaginoso de color oscuro con borde claro.
35a-35b	216Ag	Colonia de textura aterciopelada-cartilaginosa sin exudados, micelio aéreo de color verde, y margen liso irregular sin flecos. Coloración verde oscuro, presenta elevación plana, no desarrolló crecimiento de micelio inmerso en el agar. Sin pigmentación en el medio de cultivo PDA, y el reverso cartilaginoso de color oscuro con borde claro.
36a-36b	212Ag	Colonia de textura aterciopelada, poco micelio aéreo de color crema, y margen liso, circular sin flecos. Coloración crema de la colonia con líneas verdes, presenta elevación acuminada, no desarrolló crecimiento de micelio inmerso en el agar. Sin pigmentación en el medio de cultivo YPG, y el reverso de color chocolate con línea gruesa de color blanco en el borde.

3.1.3 Identificación microscópica de hongos filamentosos

Las características morfológicas microscópicas de los hongos aislados del agua de la Bahía de Panamá, observados mediante microscopía, revelaron que el 44.6% (29 cepas) desarrollaron estructuras reproductivas con conidiación característico del género *Penicillium* spp. Por otra parte, se identificó que 27.7% (18 cepas) desarrollaron estructuras de pared gruesa y con pigmento melánicos, con un tipo de conidiación característico del género *Cladosporium* spp., mientras que una sola cepa desarrolló dos tipos de conidiación, tipo *Rhinocladiella* y *Phialophora*. Otros géneros identificados fueron *Aspergillus* spp. (5 cepas), *Paecilomyces* spp. (4 cepas), *Fusarium* spp. (3 cepas), *Trichoderma* sp. (una cepa) y *Pestalotiopsis* sp. (una cepa). El 67.7% (44 cepas) de los hongos mostraron hifas hialinas, siendo esta una característica predominante en el estudio; por su parte, 32.3% (21 cepas) mostraron hifas de pared gruesa y melánicas (marrones) característico del grupo de hongos dematiáceos (ver Tabla 8 y Figura 18).

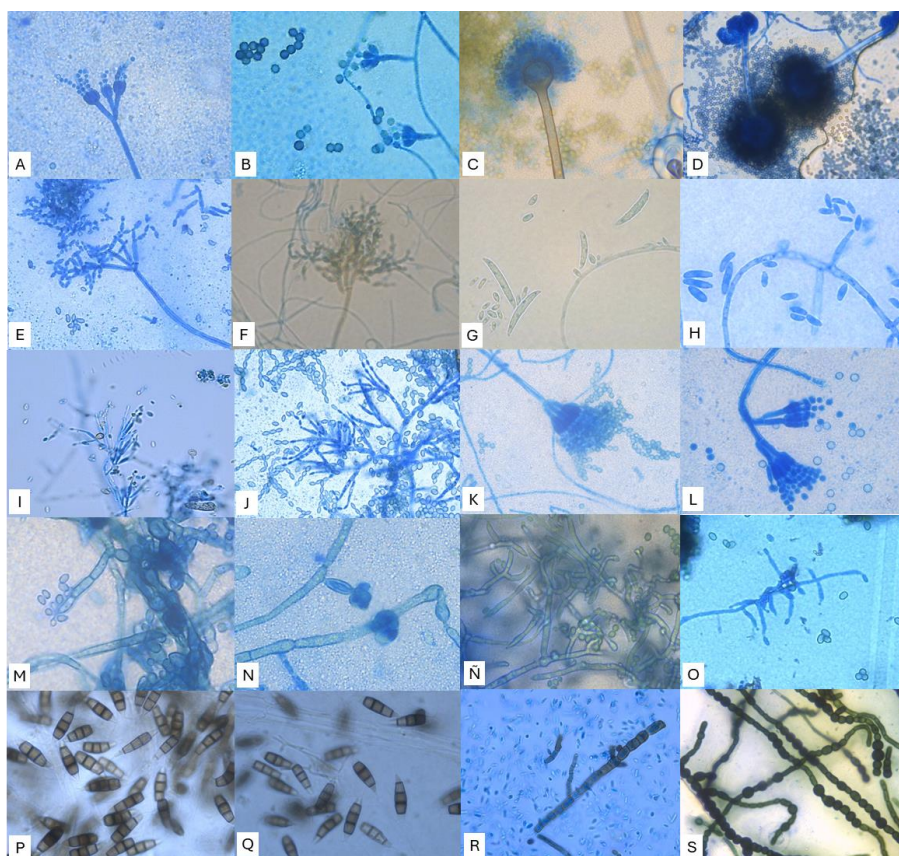


Figura 18. Características morfológicas microscópicas de hongos filamentosos aislados del agua de la Bahía de Panamá, observadas en medio de cultivo PDA. Se muestran ejemplos representativos de las estructuras reproductivas de los géneros *Penicillium* sp. (A-B), *Aspergillus* sp. (C-D), *Cladosporium* sp. (E-F), *Fusarium* sp. (G-H), *Paecilomyces* sp. (I-J), *Talaromyces* sp. (K-L), *Exophiala* sp. (M-N), *Trichoderma* sp. (Ñ-O), *Neopestalotiopsis* sp. (P-Q) y *Aureobasidium* sp. (R-S).

En general, usando el criterio de las características microscópicas y, en algunos casos, la macroscópica, se determinó que 61 cepas (93.8%) fueron identificados hasta nivel de género, sin embargo, cuatro cepas (6.2%) no se lograron identificar taxonómicamente, porque no desarrollaron estructuras reproductivas, solo estructuras vegetativas (micelia estéril) (ver Figura 19 y Tabla 8).

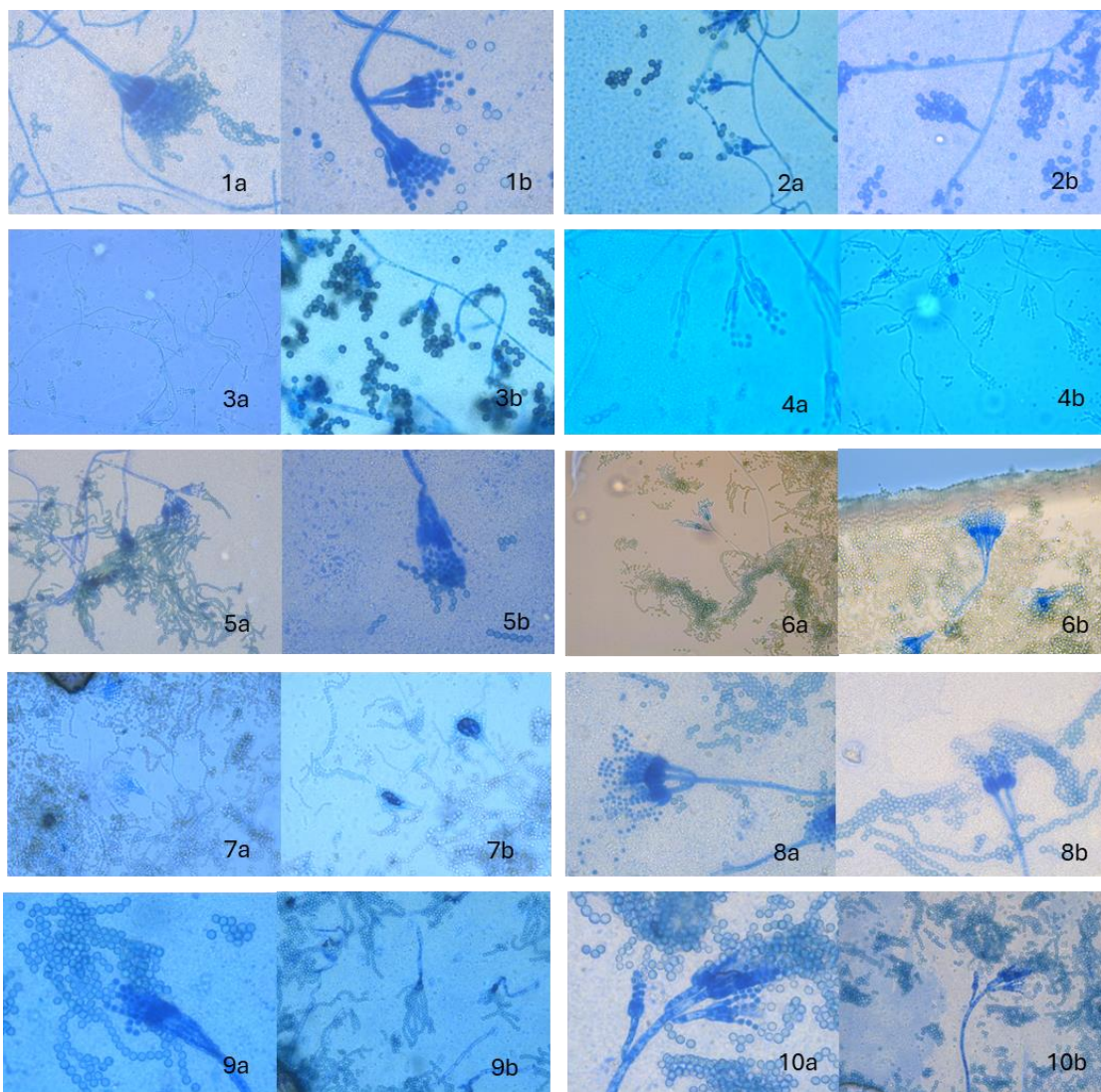


Figura 19. Morfología microscópica de cepas de hongos estudiados. Parte I.

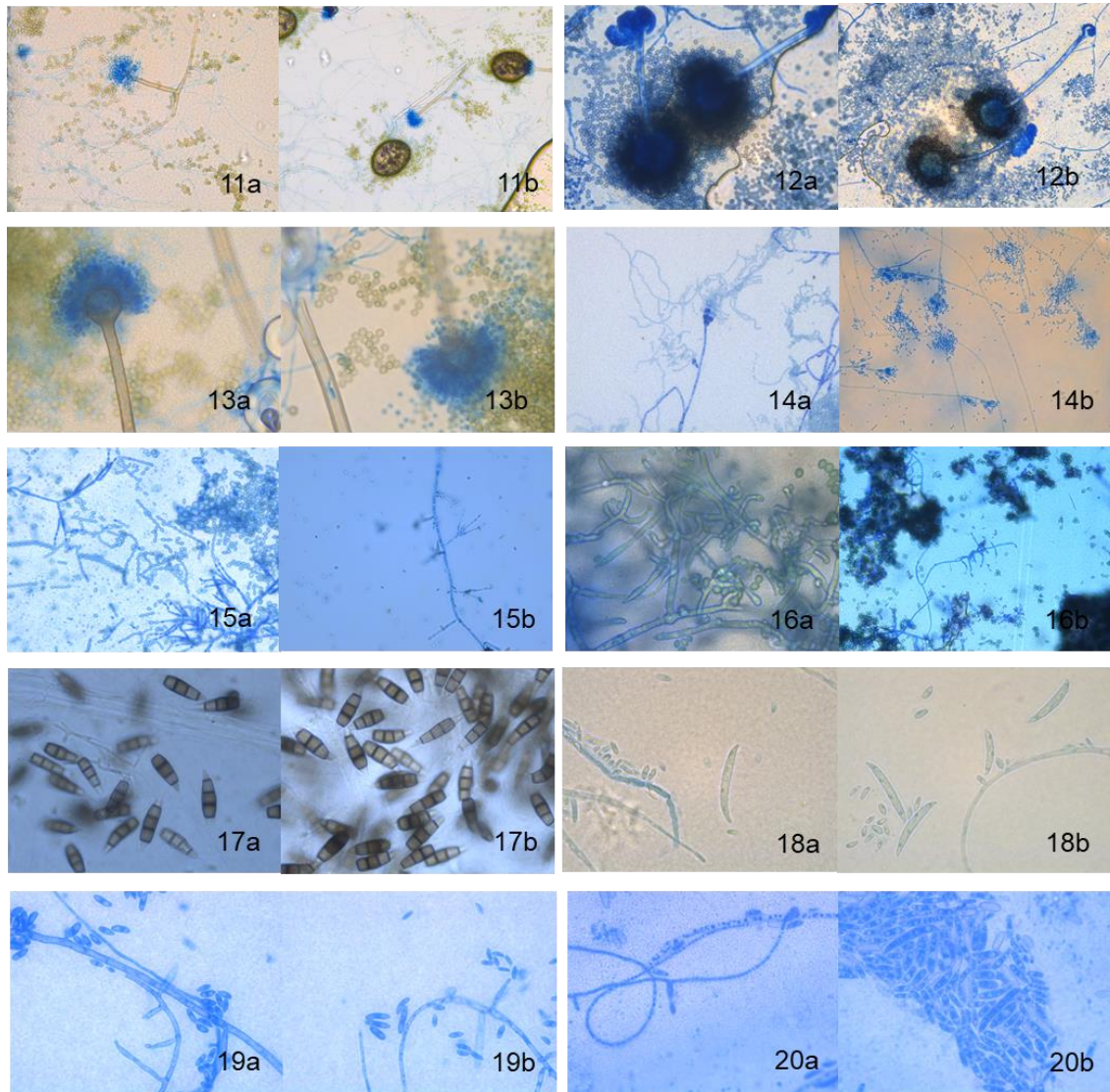


Figura 19. 1. Continuación de la Figura 19. Morfología microscópica de cepas de hongos estudiados. Parte II.

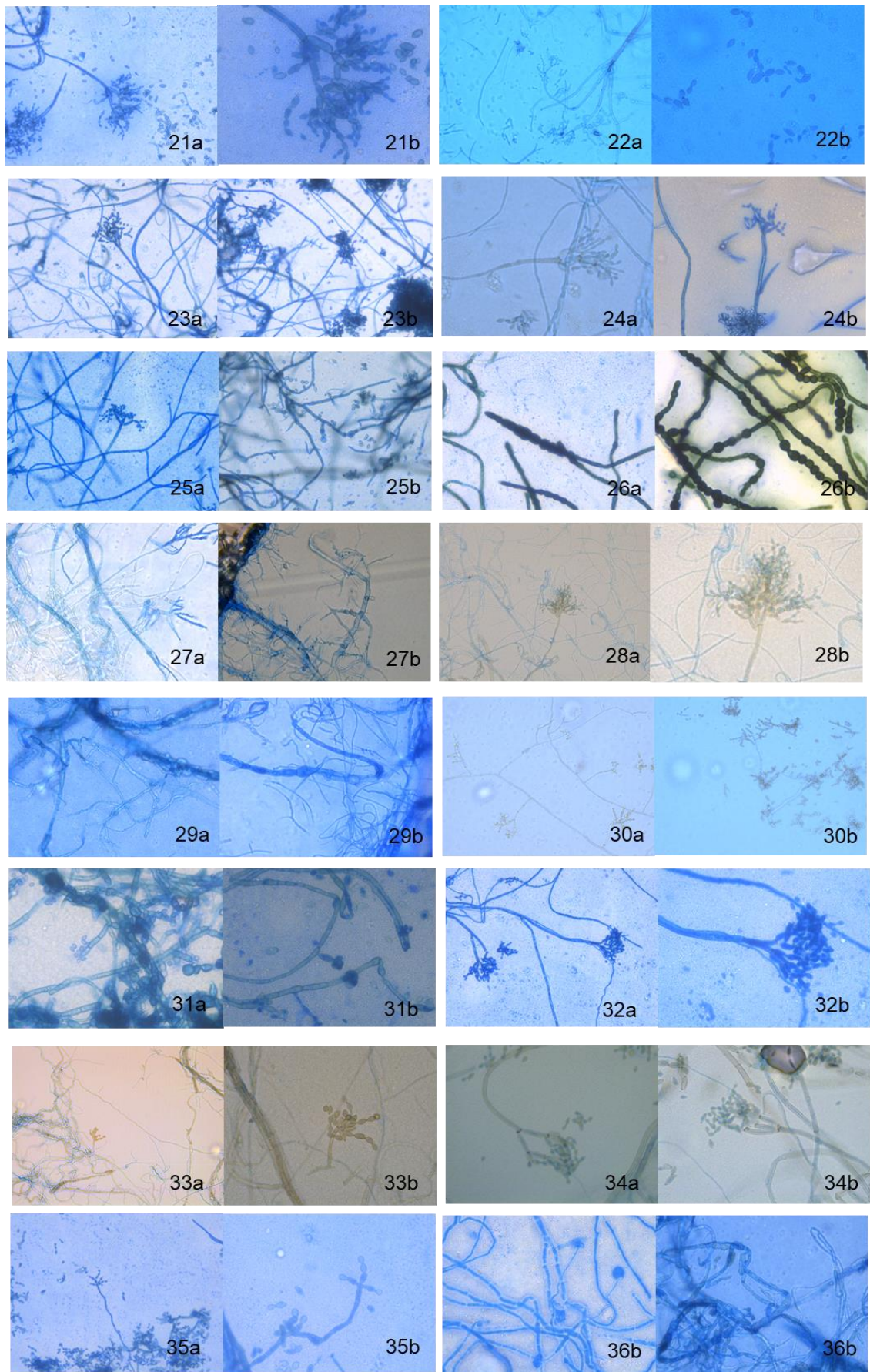


Figura 19. 2. Continuación de la Figura 19. Morfología microscópica de cepas de hongos estudiados. Parte III.

Tabla 7. Descripción microscópica de las cepas de hongos filamentosos.

#	Código de cepa	Características microscópicas
1a -1b	10Ag_b, 23Ag, 99Ag 6Ag, 26Ag, 31Ag, B36Ag, A80Ag, 95Ag	Hifas hialinas y septadas, con conidióforos asimétricos ramificados de tipo biverticilado. Se observan conidias de forma circular dispuestas en cadenas, las cuales emergen de fiálides en forma de ampolla. (100x, 100x).
2a -2b	10Ag_c1	Hifas hialinas septadas, con conidióforo cortos y simples de tipo monoverticilado. Las fiálides son robustas y producen conidias de forma circular, agrupadas en pequeñas cadenas. (100x, 100x).
3a -3b	10Ag_c2	Hifas hialinas septadas, con conidióforo cortos y simples de tipo monoverticilado. Las fiálides son robustas y producen conidias de forma circular, agrupadas en pequeñas cadenas. (40x, 100x).
4a-4b	1Ag	Hifas hialinas septadas, con conidióforos simples, simétrico de tipo monoverticilado y biverticilado. Conidias de forma circular dispuestas en largas cadenas, las cuales emergen de fiálides delgadas. (100x, 40x).
5a-5b	4Ag, 18Ag	Hifas hialinas septadas, con conidióforos simples, simétrico de tipo biverticilado. Conidias de forma circular y ovaladas dispuestas en largas cadenas, las cuales emergen de fiálides delgadas. (40x, 100x).
6a - 6b	25Ag, 84Ag_a, 84Ag_b, 163Ag	Hifas hialinas septadas, con conidióforo largo asimétrico, presentando ramificación de tipo biverticilado y triverticilado. Las fiálides son delgadas con forma larga las cuales producen los conidios circulares dispuestos en cadenas cortas. (40x, 40x).
7a-7b	49Ag_b	Hifas hialinas septadas, con conidióforo largo, presentando ramificación de tipo biverticilado. Las fiálides son delgadas con forma larga, las cuales producen conidios circulares dispuestos en largas cadenas. (40x, 40x)
8a-8b	29Ag, 58Ag, 82Ag, 83Ag, 108Ag, 111Ag, 109Ag, 112Ag	Hifas hialinas septadas, con conidióforo simple y simétrico que presenta una ramificación de tipo biverticilado. Las fiálides son delgadas y alargadas, produciendo abundantes conidios de forma circular dispuestas en cadenas. (100x, 100x).
9a-9b	100Ag	Hifas hialinas septadas, con conidióforo simple y simétrico que presenta una ramificación de tipo biverticilado. Las fiálides son delgadas y alargadas, produciendo abundantes conidios de forma circular dispuestas en cadenas. (100x, 40x).
10a-10b	205Ag	Hifas hialinas septadas, con conidióforo largo asimétrico, presentando ramificación de tipo monoverticilado y biverticilado. Las fiálides largas las cuales producen los conidios circulares dispuestos en cadenas largas. (100x, 40x).
11a-11b	101Ag	Hifas delgadas, hialinas y cenocíticas, con la base completa del conidióforo, conocida como célula del pie, desde la cual emerge una vesícula circular que da origen a las fiálides. Estas fiálides, de forma robusta y semejante a una ampolla, generan abundantes conidias de forma circular. (40x, 40x).
12a-12b	169Ag, 115Ag, 8Ag- b	Hifas hialinas septadas, con conidióforos largos con grande vesícula esférica en el ápice, las méculas cubren toda la superficie de la cual emergen las fiálides cortas. Abundantes conidios circulares de color oscuro. (40x, 40x).
13a-13b	107Ag	Hifas delgadas, hialinas y cenocíticas, con conidióforos largos desde la cual emerge una vesícula circular que da origen a las fiálides. Estas fiálides, de forma robusta y semejante a una ampolla, generan abundantes conidias de forma circular. (100x, 100x).
14a-14b	2Ag_b	Hifas delgadas, hialinas y septadas, con conidióforos ramificados que dan lugar a fiálides largas y delicadas, las cuales generan largas cadenas de conidios fusiformes. (40x, 40x).
15a-15b	232Ag, 27Ag_b, 170Ag	Hifas hialinas septadas, con conidióforos ramificados, cada uno produce fiálides con forma cilíndrica o elipsoidal. Los conidios tienen forma elipsoidal, paredes lisas dispuestos en largas cadenas divergentes. Presencia de clamidosporas intercalares y terminales subglobosas de paredes gruesas. (40x, 40x).
16a-16b	22Ag	Hifas hialinas septadas, con conidióforo corto y ramificados, que producen fiálides infladas en la base. Los conidios, de color verde, presentan formas redondeadas y ovaladas, y se agrupan en las extremidades de las fiálides. (100x, 40x).
17a-17b	234Ag	Hifas hialinas septadas, conidias son de color marrón, con cuatro septos que dividen tres células centrales oscuras y dos células hialinas en cada extremo. Además, presenta tres apéndices apicales. (100x, 100x).
18a-18b	2Ag	Hifas hialinas septadas con conidióforo corto, de forma globosa o inflada, conocidas como monofiálides. Presenta microconidias individuales, sin septos, elipsoidales y con una ligera curvatura. Las macroconidias tienen tres septos, son fusiforme, con la punta apical puntiaguda, también presentan una pequeña curvatura. (100x, 100x).
19a-19b	011Ag	Hifas hialinas septadas con conidióforo largo, conocidas como monofiálides. Presenta microconidias individuales agrupadas cerca de las fiálides, sin septos, elipsoidales y con una ligera curvatura. Las macroconidias sin septos, son elipsoidales, también presentan una pequeña curvatura. (100x, 100x).
20a-20b	30Ag_a	Hifas hialinas septadas con conidióforo corto, de forma globosa, conocidas como monofiálides. Presenta microconidias individuales, sin septos, elipsoidales y con una ligera curvatura. Las macroconidias tienen tres septos, son fusiforme, con la punta apical puntiaguda, también presentan una pequeña curvatura. (100x, 100x).
21a-21b	218Ag	Hifas oscuras de pared gruesa y septadas, con conidióforos largos, ramificados y pigmentados. Conidiación tipo <i>Cladosporium</i> , con conidios ovalados formando cadenas, algunos presentan cicatrices en los extremos. Las células escudos también son conocidos como conidios. (40x, 100x).

22a-22b	227Ag_b	Hifas oscuras de pared gruesa y septadas, con conidióforos largos, ramificados y pigmentados. Conidiación tipo <i>Cladosporium</i> , con conidios ovalados, algunos presentan cicatrices en los extremos. Las células escudos también son conocidos como conidios. (40x, 100x).
23a-23b	56Ag	Hifas oscuras de pared gruesa y septadas, con conidióforos largos, ramificados y pigmentados. Conidiación tipo <i>Cladosporium</i> , con conidios ovalados formando cadenas cortas, algunos presentan cicatrices en los extremos. Las células escudos también son conocidos como conidios. (40x, 40x).
24-24b	238Ag, 233Ag_b, 233Ag_a, 233Ag, 233bAg, 48Ag	Hifas oscuras de pared gruesa y septadas, con conidióforos largos, ramificados y pigmentados. Conidiación tipo <i>Cladosporium</i> , con conidios ovalados formando cadenas cortas, algunos presentan cicatrices en los extremos. Las células escudos también son conocidos como conidios. Presenta clamidosporas terminales. (100x, 40x).
25a-25b	49Ag_a, 51Ag	Hifas oscuras de pared gruesa y septadas, con conidióforos largos, ramificados y pigmentados. Conidiación tipo <i>Cladosporium</i> , con conidios ovalados formando cadenas cortas, algunos presentan cicatrices en los extremos. Las células escudos también son conocidos como conidios. Presenta clamidosporas intercalares y terminal. (40x, 40x).
26-26b	165Ag	Hifas oscuras de pared gruesa y septadas, no se evidenciaron estructuras reproductivas. (100x, 100x).
27a-27b	048AgM3	Hifas oscuras, no se evidenciaron estructuras reproductivas.
28a-28b	227Ag_a	Hifas oscuras septadas, con conidióforos largos, ramificados y pigmentados. Conidiación tipo <i>Cladosporium</i> , con conidios ovalados, algunos presentan cicatrices en los extremos. Las células escudos también son conocidas como conidios. (40x, 100x).
29a-29b	40Ag	Hifa hialina de pared gruesa y septadas, no se evidenciaron estructuras reproductivas.
30a-30b	236Ag	Hifas oscuras septadas, con conidióforos largos, ramificados y pigmentados. Conidiación tipo <i>Cladosporium</i> , con conidios circulares a ovalados formando cadenas, algunos presentan cicatrices en los extremos. (40x, 40x).
31a-31b	211Ag	Hifas oscuras y septadas, presentando conidióforos pigmentados. Conidiación tipo <i>Rhinochlamydomonas</i> y <i>Phialophora</i> . Los conidios tienen forma ovalada y se agrupan alrededor de las fiálides o ápice del collarete. Las fiálides presentan una forma de jarrón. También se observaron clamidosporas terminales. (100x, 100x).
32a-32b	215Ag	Hifas oscuras de pared gruesa y septadas, con conidióforos largos, ramificados y pigmentados. Conidiación tipo <i>Cladosporium</i> , con conidios ovalados formando cadenas largas, algunos presentan cicatrices en los extremos. Las células escudos también son conocidas como conidios. (100x, 40x).
33a-33b	237bAg	Hifas oscuras y septadas, con conidióforos cortos y pigmentados. Conidiación tipo <i>Cladosporium</i> , con conidios ovalados formando cadenas cortas, algunos presentan cicatrices en los extremos. Las células escudos también son conocidas como conidios. (40x, 100x).
34a-34b	231Ag	Hifas oscuras de pared gruesa y septadas, con conidióforos largos, ramificados y pigmentados. Conidiación tipo <i>Cladosporium</i> , con conidios ovalados formando cadenas cortas, algunos presentan cicatrices en los extremos. Las células escudos también son conocidos como conidios. Además, presenta clamidosporas intercalares. (100x, 100x).
35a-35b	216Ag	Hifas oscuras, septadas, con conidióforos tanto largos como cortos, ramificados y pigmentados. Conidiación tipo <i>Cladosporium</i> , con conidios ovalados que forman cadenas cortas, algunos de los cuales presentan cicatrices en los extremos. Las células escudos, también conocidas como conidios. (40x, 100x).
36a-36b	212Ag	Hifas oscuras, no se evidenciaron estructuras reproductivas.

La Figura 20 presenta la prevalencia de diferentes grupos de hongos en las diferentes áreas muestreadas. El género con mayor representación correspondió a *Penicillium* sp., con 17 aislados, lo que corresponde al 26.15% del total de hongos identificados. Le siguió el género *Talaromyces* sp., con 12 aislados, representando el 18.46% del total. El género *Cladosporium* sp., presentó 10 cepas aisladas, lo que representa el 15,38% del total. El grupo de dematiáceos no identificados presentó 7 cepas, lo que corresponde al 10.77 % del total. Otros géneros, como *Aspergillus* sp., *Paecilomyces* sp. y *Fusarium* sp., mostraron frecuencias intermedias, con valores de 5, 4 y 3, respectivamente, con porcentajes de 7.69%, 6.15% y 4.62%. Finalmente, algunos géneros se encontraron en menor proporción, como *Trichoderma* sp., *Neopestalotiopsis* sp., *Diaporthe* sp., *Exophiala* sp., *Aureobasidium* sp., *Pseudocercospora* sp., y *Setophaeosphaeria* sp., los cuales en conjunto representaron solo un representante cada uno, lo que corresponde al 1.54% del total de hongos

aislados. Estos resultados evidencian la diversidad fúngica presente en los cuerpos de agua analizados y resaltan la predominancia de ciertos géneros potencialmente patógenos.

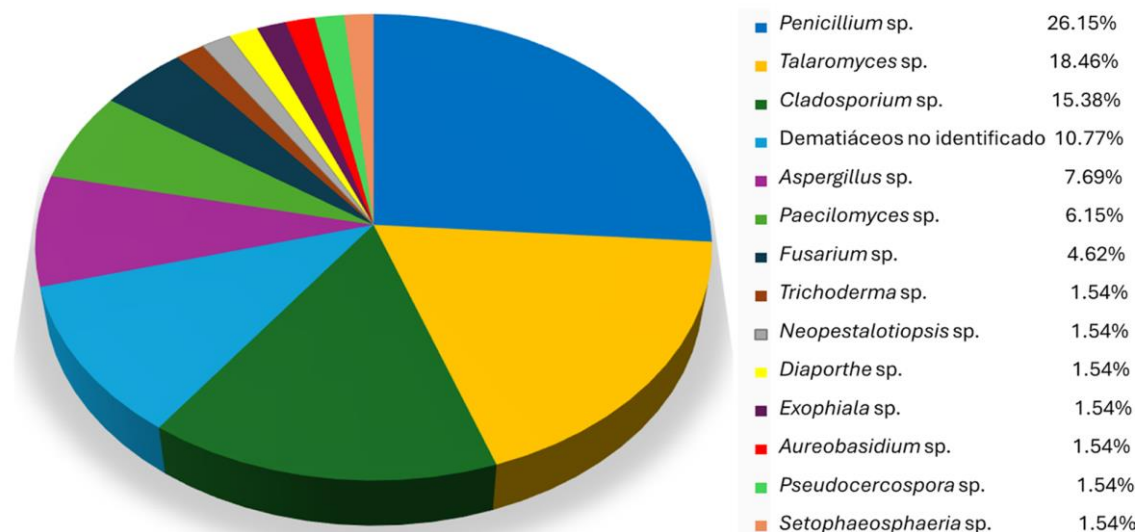


Figura 20. Porcentaje de mayor prevalencia de cepas estudiadas. Géneros a nivel morfológico en la colección almacenada de cepas fúngicas aisladas de las aguas provenientes de 12 sitios de la Bahía de Panamá.

En la Figura 21 se estimó el índice de diversidad de Shannon-Wiener (H') para cada sitio de muestreo utilizando el lenguaje de programación R (R Core Team, 2024) y el paquete especializado en análisis ecológico vegan (Oksanen et al., 2022). Este índice considera tanto la riqueza de especies como la equitatividad de sus abundancias relativas, siendo una medida ampliamente utilizada en estudios de diversidad biológica. La fórmula general del índice de Shannon es la siguiente:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln(p_i)$$

Donde:

H' es el índice de diversidad de Shannon,

S es el número total de especies,

p_i es la proporción de individuos de la especie i respecto al total de individuos en el sitio,

$\ln$ es el logaritmo natural.

El índice se calculó a partir de las matrices de abundancia de especies por sitio, utilizando la función `diversity` del paquete `vegan`, que permite calcular diferentes índices de diversidad, incluyendo el de Shannon, especificando el parámetro `index = "shannon"`.

El sitio de muestreo que presentó la mayor diversidad de especies fue aquel que registró el valor más alto del índice de Shannon (H'), lo que indica una mayor riqueza y equitativa distribución de las especies presentes. La mayor diversidad

específica se registró en el sitio de muestreo Antigua Autoridad de la Región Interoceánica (AARI), con un índice de Shannon de $H' = 1.69$, seguido por Panamá La Vieja con $H' = 1.67$. Por su parte, el sitio Boca la Caja presentó valores similares, con un índice de $H' = 1.66$ (ver Figura 21).

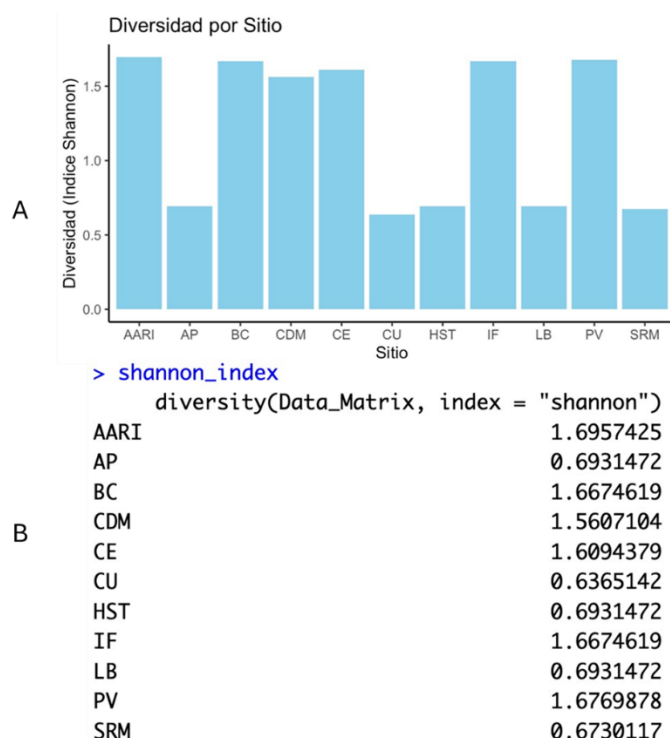


Figura 21. Diversidad de géneros por sitios analizados de acuerdo con el índice de Shannon en este estudio.

3.1.4 Identificación molecular

De acuerdo con la caracterización morfológica y molecular (ITS) se determinó 13 géneros, agrupados en nueve órdenes, todos pertenecientes al phylum Ascomycota (ver Tabla 8). Se observan los códigos de las cepas fúngicas incluidas en este estudio, detallando su división taxonómica y los respectivos sitios de muestreo de cada una. Los hongos filamentosos estudiados fueron originalmente aislados durante un estudio previo y almacenados en frío, lo que permitió su conservación y preservación hasta su investigación actual. La sección denominada datos de cepa detalla los sitios de muestreo y código asignado a cada cepa correspondiente y, la sección de taxonomía contiene la división taxonómica, que incluye desde phylum hasta género/especie identificada para cada cepa estudiada.

Tabla 8. Identificación taxonómica de las cepas de hongos estudiados.

Datos de cepa		Taxonomía				
Sitio de muestreo	Código de cepa	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género/Especie
Antigua Autoridad de la Región Interoceánica	10Ag_b	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Talaromyces domesticus</i>
	99Ag	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Talaromyces domesticus</i>
	10Ag_c1	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Penicillium menonorum</i>
	10Ag_c2	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Penicillium menonorum</i>
	112Ag	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Penicillium</i> sp.
	100Ag	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Penicillium</i> sp.
	101Ag	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Aspergillus</i> sp.
	236Ag	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Cladosporiaceae	<i>Cladosporium cladosporoides</i>
	237bAg	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Cladosporiaceae	<i>Cladosporium halotolerans</i>
Isla Flamenco	6Ag	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Talaromyces domesticus</i>
	108Ag	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Penicillium</i> sp.
	111Ag	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Penicillium</i> sp.
	109Ag	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Penicillium</i> sp.
	169Ag	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Aspergillus</i> *cf. <i>niger</i>
	107Ag	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Aspergillus</i> sp.
	215Ag	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Cladosporiaceae	***C. tipo <i>Cladosporium</i>
	216Ag	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Cladosporiaceae	<i>Cladosporium tenuissimum</i>
Panamá La Vieja	26Ag	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Talaromyces domesticus</i>
	31Ag	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Talaromyces domesticus</i>
	B36Ag	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Talaromyces domesticus</i>
	1Ag	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Talaromyces atroroseus</i>
	25Ag	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Penicillium osmophilum</i>
	29Ag	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Penicillium</i> sp.
	27Ag_b	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Thermoascaceae	<i>Paecilomyces</i> *c.f. <i>variotii</i>
	30Ag_a	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium oxysporum</i>
	40Ag	Ascomycota	Sordariomycetes	Diaporthales	Diaporthaceae	<i>Diaporthe acaciurum</i>
Boca La Caja	163Ag	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Penicillium osmophilum</i>
	82Ag	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Penicillium</i> sp.
	83Ag	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Penicillium</i> sp.

	205Ag	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Penicillium chrysogenum</i>
	115Ag	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Aspergillus</i> *cf. <i>niger</i>
	A80Ag	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Talaromyces domesticus</i>
	165Ag	Ascomycota	Dothideomycetes	Dothideales	Aureobasidiaceae	<i>Aureobasidium melanogenum</i>
	211Ag	Ascomycota	Eurotiomycetes	Chaetothyriales	Herpotrichiellaceae	<i>Exophiala oligosperma</i>
	212Ag	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Phaeosphaeriaceae	<i>Setophaeosphaeria</i> sp.
Avenida de los Poetas	95Ag	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Talaromyces domesticus</i>
	8Ag_b	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Aspergillus</i> *cf. <i>niger</i>
Las Bóvedas	4Ag	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Talaromyces</i> sp.
	238Ag	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Cladosporiaceae	<i>Cladosporium colocasiae</i>
Costa del Este	18Ag	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Talaromyces</i> sp.
	23Ag	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Talaromyces domesticus</i>
	232Ag	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Thermoascaceae	<i>Paecilomyces</i> *c.f. <i>variotii</i>
	170Ag	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Thermoascaceae	<i>Paecilomyces</i> *c.f. <i>variotii</i>
	22Ag	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
	234Ag	Ascomycota	Sordariomycetes	Amphisphaeriales	Pestalotiopsisaceae	<i>Neopestalotiopsis formicarum</i>
	233Ag_b	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Cladosporiaceae	<i>Cladosporium colocasiae</i>
	233Ag_a	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Cladosporiaceae	<i>Cladosporium colocasiae</i>
	233Ag	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Cladosporiaceae	<i>Cladosporium colocasiae</i>
	233bAg	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Cladosporiaceae	<i>Cladosporium colocasiae</i>
Club Unión	84Ag_a	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Penicillium osmophilum</i>
	84Ag_b	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Penicillium osmophilum</i>
	231Ag	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Cladosporiaceae	***C. tipo <i>Cladosporium</i>
Salida del río Matasnillo	49Ag_b	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Penicillium</i> sp.
	58Ag	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Penicillium</i> sp.
	218Ag	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Cladosporiaceae	***C. tipo <i>Cladosporium</i>
	49Ag_a	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Cladosporiaceae	***C. tipo <i>Cladosporium</i>
	51Ag	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Cladosporiaceae	***C. tipo <i>Cladosporium</i>
Coco del Mar	2Ag_b	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Thermoascaceae	<i>Paecilomyces</i> *c.f. <i>lilacinus</i>
	2Ag	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium oxysporum</i>
	011Ag	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium nirenbergiae</i>

	56Ag	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Cladosporiaceae	***C. tipo <i>Cladosporium</i>
	48Ag	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Cladosporiaceae	<i>Cladosporium colocasiae</i>
	048AgM3	Ascomycota	Dothideomycetes	Mycosphaerellales	Mycosphaerellaceae	<i>Pseudocercospora sordida</i>
Hospital Santo Tomás	227Ag_a	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Cladosporiaceae	***C. tipo <i>Cladosporium</i>
	227Ag_b	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Cladosporiaceae	<i>Cladosporium perangustum</i>

*cf.: *confer* (comparar con).

**Conidiación tipo *Rhinoctadiella*, *Phialophora* y/o *Cladosporium*, son los hongos del grupo dematiáceo no identificables.

***Cepas fúngicas no identificables en estado vegetativo no estéril.

Extracción de ADN genómico

Cuantificación de ADN

Del total de 65 cepas analizadas a nivel morfológico, se alcanzó a realizar 58 extracciones de ADNg, con un alto rendimiento de aislamiento del material génico, considerando los parámetros para la cuantificación del ADN, a través de la concentración mayor a 50ng/ul, pureza, cantidad e integridad midiendo las relaciones entre OD260/280 y OD260/230, la cual es la concentración óptima para realizar la amplificación en las regiones ITS4 e ITS5 (Figura 22).

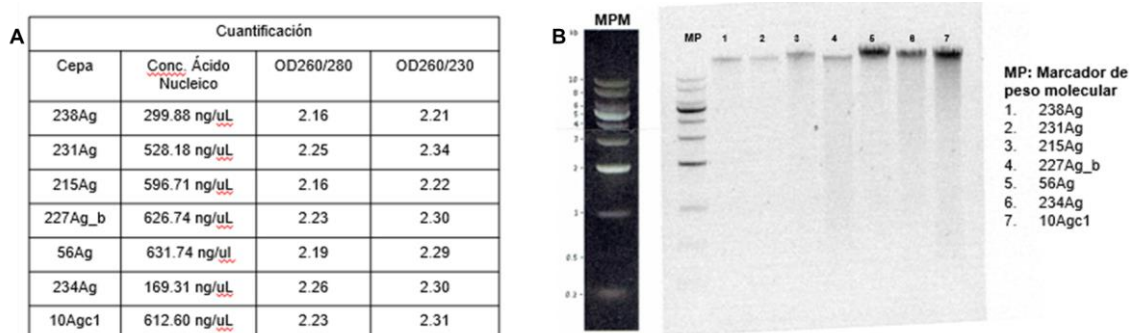


Figura 22. Análisis de electroforesis en gel agarosa 0.7% de los ADNg para verificar la integridad, la calidad y pureza. Se muestran ejemplos representativos de las muestras verificadas por electroforesis después de realizar la extracción. A) Determinación de concentración y pureza del ADN mediante espectrofotometría NanoDrop. B) Las celdas del 1 al 7 representan los ADNg extraídos a partir del micelio de los hongos estudiados. El MPM es el marcador de peso molecular 1 kbp.

Amplificación por PCR a punto final

Se obtuvieron un total de 57 amplicones mediante la PCR a punto final con la amplificación de las regiones ITS del ADN. En las Figuras 23, 24 se muestran dos ejemplos representativos de los amplicones obtenidos y verificados por electroforesis de gel agarosa al 1%, todas las cepas analizadas presentaron bandas con tamaño de 600pb, lo esperado por las regiones amplificadas.

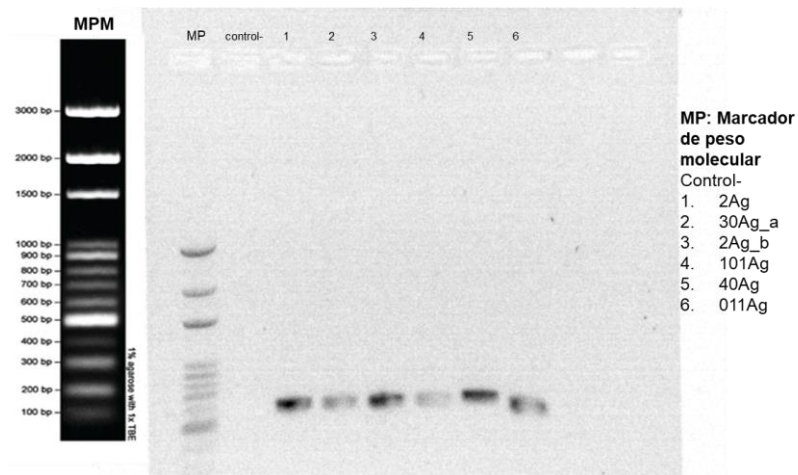


Figura 23. Análisis de electroforesis en gel agarosa 1%. Se observa los productos de PCR, utilizando los primers ITS5 e ITS4. MP: marcador de peso molecular 100bp; pocillos con números identificados 1-6: muestras con ADN de cepas fúngicas; pocillo con nombre identificado control: muestra sin ADN de cepa fúngica, se le agregó agua miliQ estéril como muestra negativa.

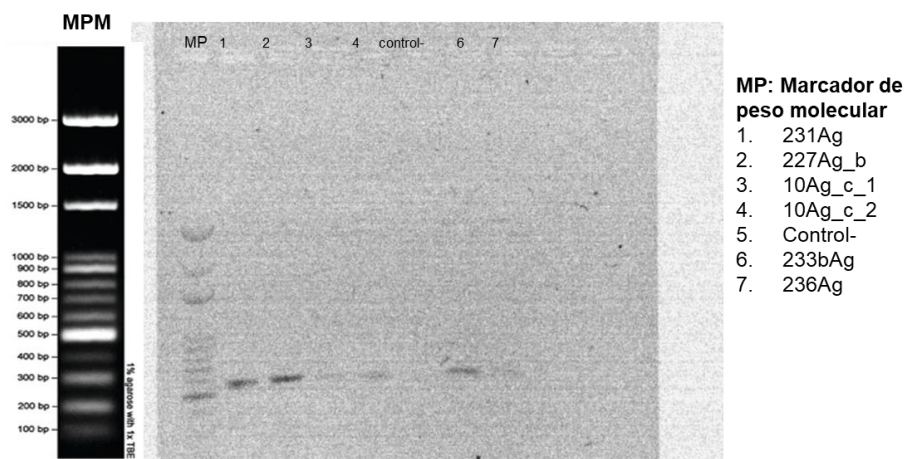


Figura 24. Análisis de electroforesis en gel agarosa 1%. Se observa los productos de PCR, utilizando los primers ITS5 e ITS4. MP: marcador de peso molecular 100bp; pocillos con números identificados 1-4;6-7: muestras con ADN de cepas fúngicas; pocillo 5 con nombre identificado control: muestra sin ADN de cepa fúngica, se le agregó agua miliQ estéril como muestra negativa.

Análisis filogenético

Del total de 65 cepas analizadas en este estudio, 21 aislados fúngicos fueron secuenciados, y los datos combinados de secuencias del espaciador transcrito interno (ITS) fueron analizados con base en Máxima Parsimonia. El análisis de las secuencias genómicas de ITS respaldó la identificación morfológica de los aislados fúngicos. Los datos de la secuenciación obtenidos a través de los servicios Psomagen y Macrogen, fueron depurados para eliminar interferencias y alineados utilizando el software MEGA 11. Luego de completar la alineación de todas las secuencias, se generó la secuencia consenso de cada una, la cual fue analizada mediante el programa BLASTn (NCBI). Esta comparación permitió identificar cada cepa analizada en este estudio a nivel de especie, tomando como

referencia el grado de similitud con otras secuencias registradas en la base de datos de nucleótidos del GenBank (ver Figura 25).

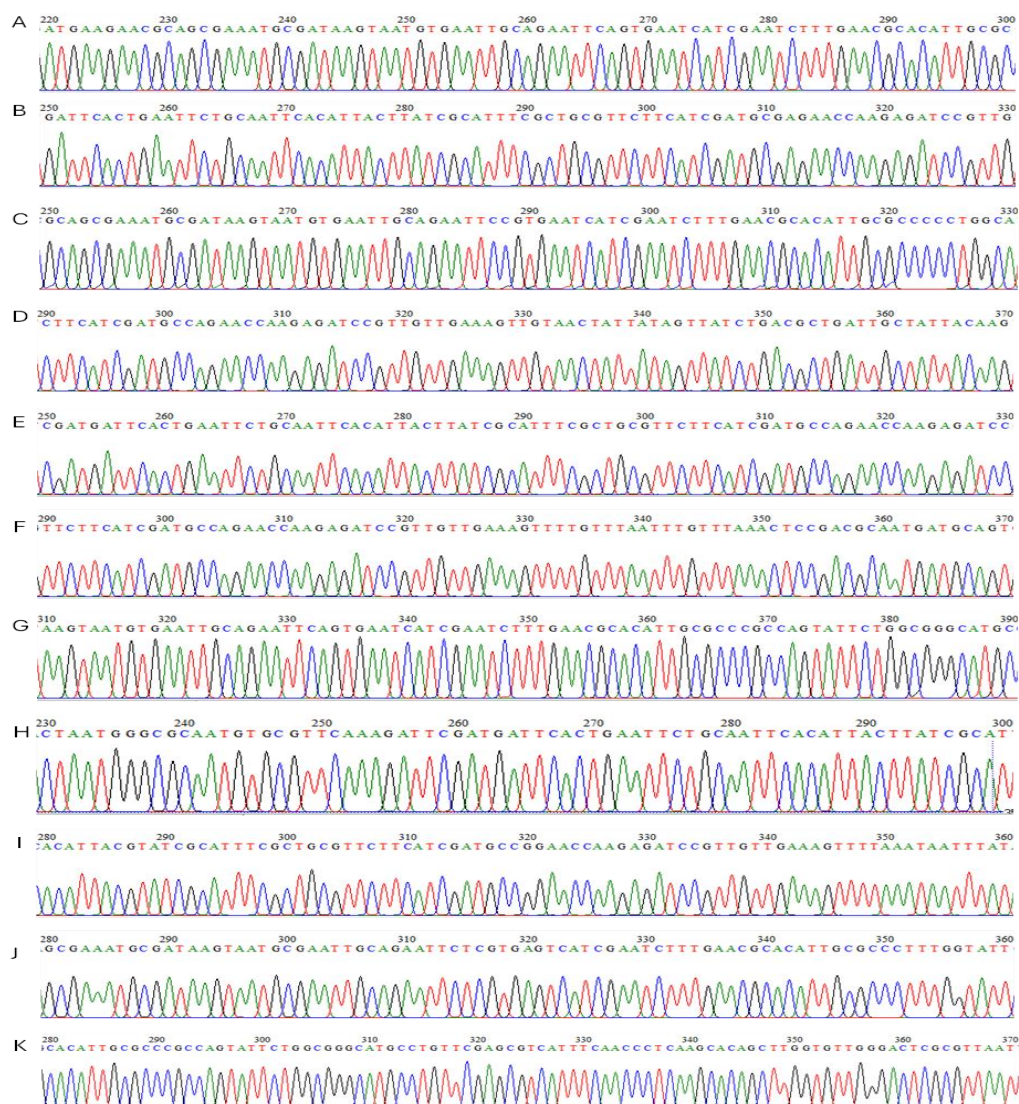


Figura 25. Fragmento de cromatograma en la región ITS por géneros de cepas fúngicas analizadas. A) *Cladosporium tenuissimum* desde 220 pb hasta 300 pb. B) *Aureobasidium melanogenum* desde 250 pb hasta 330 pb. C) *Talaromyces domesticus* desde 250pb hasta 330pb. D) *Setophaeosphaeria* sp. desde 290pb hasta 370pb. E) *Diaporthe acaciurum* desde 250pb hasta 330pb. F) *Pseudocercospora sordida* desde 290pb hasta 370pb. G) *Trichoderma longibrachiatum* desde 310pb hasta 390pb. H) *Neopestalotiopsis formicarum* desde 230pb hasta 300pb. I) *Penicillium osmophilum* desde 280pb hasta 360pb. J) *Exophiala oligosperma* desde 280pb hasta 360pb. K) *Fusarium nirenbergiae* desde 280pb hasta 370pb.

De acuerdo con la caracterización morfológica y molecular (ITS) se determinó 13 géneros y especies, agrupados en nueve órdenes, todos pertenecientes al phylum Ascomycota (ver Tabla 8). La construcción del árbol filogenético fue utilizando el programa IQ-TREE, permitiendo analizar diferentes secuencias de ADN mediante la región ITS4-ITS5, por lo tanto, la comparación entre las características morfológicas previa y el porcentaje de similitud según alineamientos en la base de datos del NCBI/BLASTn, se consiguieron identificar los siguientes hongos: *C. tenuissimum*, *C. colocasiae*, *C. perangustum*, *C.*

cladosporioides, *C. halotolerans*, *Aureobasidium melanogenum*, *Talaromyces domesticus*, *T. atrovirens*, *D. acaciarius*, *P. sordida*, *N. formicarum*, *E. oligosperma*, *T. longibrachiatum*, *P. menonorum*, *P. chrysogenum*, *P. osmophilum*, *F. nirenbergiae*, *F. oxysporum*. Para un mejor estudio, los hongos fueron agrupados en diferentes árboles filogenéticos según sus similitudes morfológicas y las secuencias de ITS analizadas. Al inicio del árbol filogenético se utilizó la especie *Cryptococcus neoformans* como outgroup, debido a su relación evolutiva. Esto permitió identificar los caracteres ancestrales y establecer la dirección evolutiva de los cambios observados en las especies estudiadas (ver Figura 26).

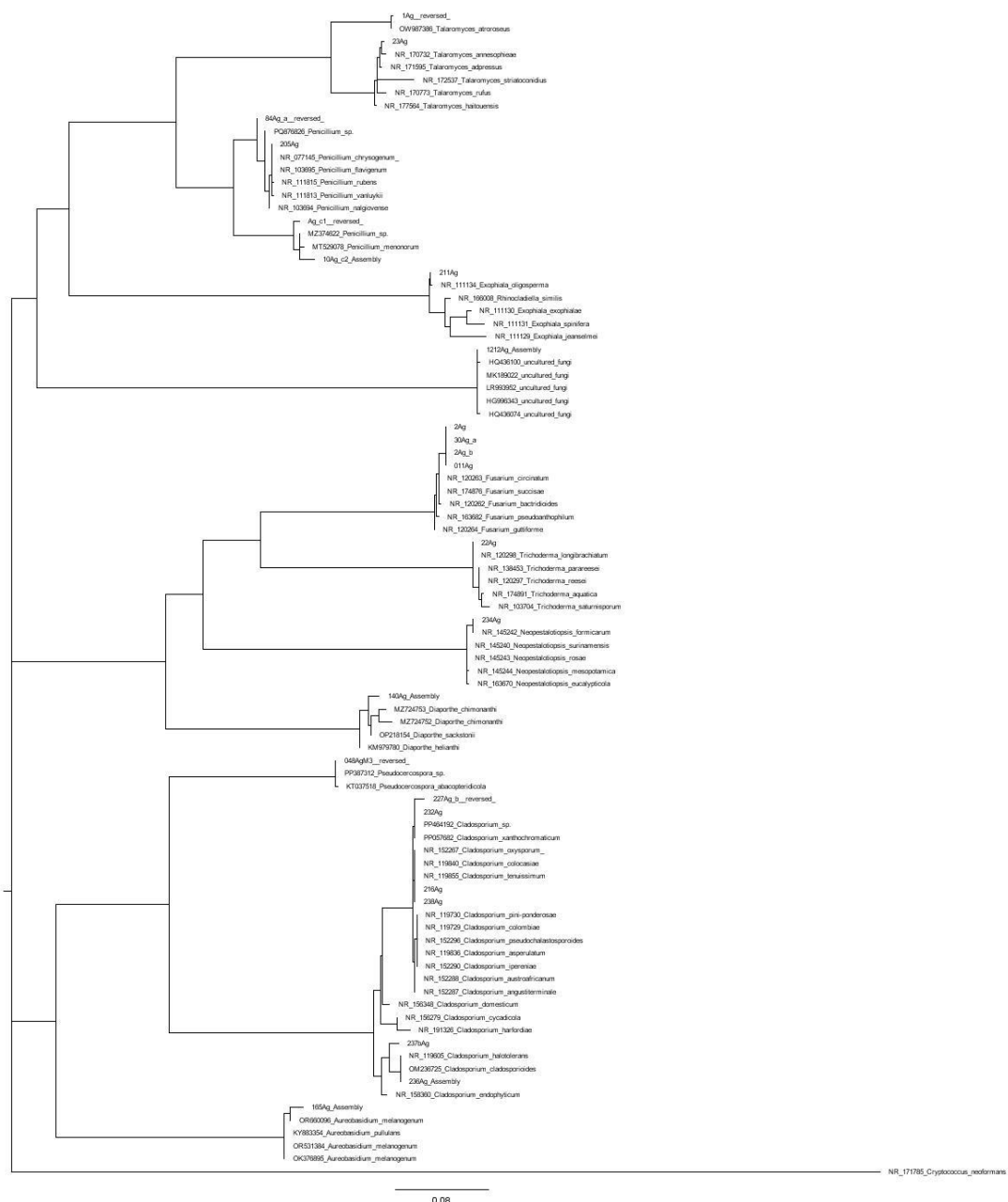


Figura 26. Árbol filogenético basado en secuencias de la región ITS de las cepas estudiada basada en el análisis de Máxima Parsimonia. Los rombos en naranja indican las secuencias obtenidas en este estudio. Los análisis fueron realizados con el software MEGA 11.

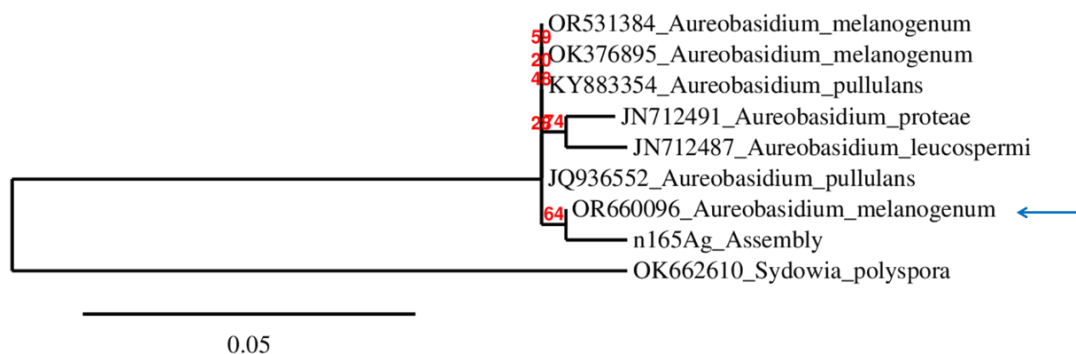


Figura 28. Árbol filogenético de la región ITS de *A. melanogenum* mediante el programa IQ-TREE. La flecha en azul indica la especie identificada en este estudio. Los análisis fueron realizados con el software MEGA 11.

En el árbol filogenético de la Figura 29, dos aislados con códigos 23Ag y 1Ag fueron agrupados con varias cepas de referencia del género *Talaromyces*. Se dividió en dos grandes ramas que consistió en el grupo externo (outgroup), este se ubicó de secuencia seleccionada de *Trichomoda paradoxa*, y la otra rama generó el nodo 22, el nodo 22, se ramificó en dos nodos superiores, el 21 y el 80, el nodo 80 se bifurcó con el nodo 85, donde el código 23Ag se ubicó con la especie *Talaromyces domesticus*. La especiación de la cepa analizada con código 1Ag, presentó especificidad con *T. atroroseus*.

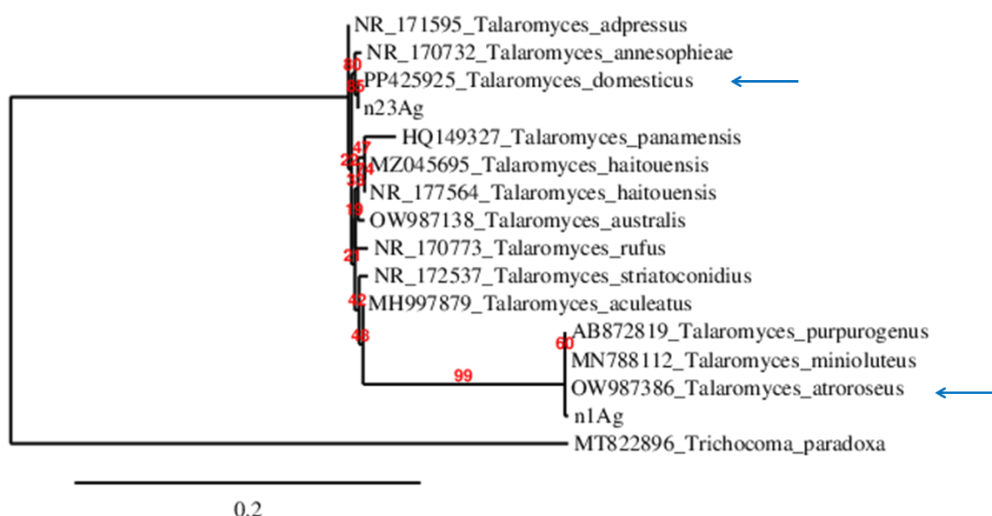


Figura 29. Árbol filogenético de la región ITS de *T. domesticus*, *T. atroroseus* mediante el programa IQ-TREE. Las flechas en azul indican la especie identificada en este estudio. Los análisis fueron realizados con el software MEGA 11.

En la Figura 30, un aislado fue agrupado con varias cepas de referencia de *Diaporthe*. El árbol filogenético se dividió en dos grandes ramas que consistió en el grupo externo (outgroup) de *Diaporthella corylina*, y la otra rama generó las especies con relacionados filogenéticamente con las especies de *Diaporthe*. La comparación entre características morfológicas de especies de *Diaporthe* y su identidad con secuencias de ITS generó el nodo 76, el cual permitió que se ubicara con *D. acaciarum*.

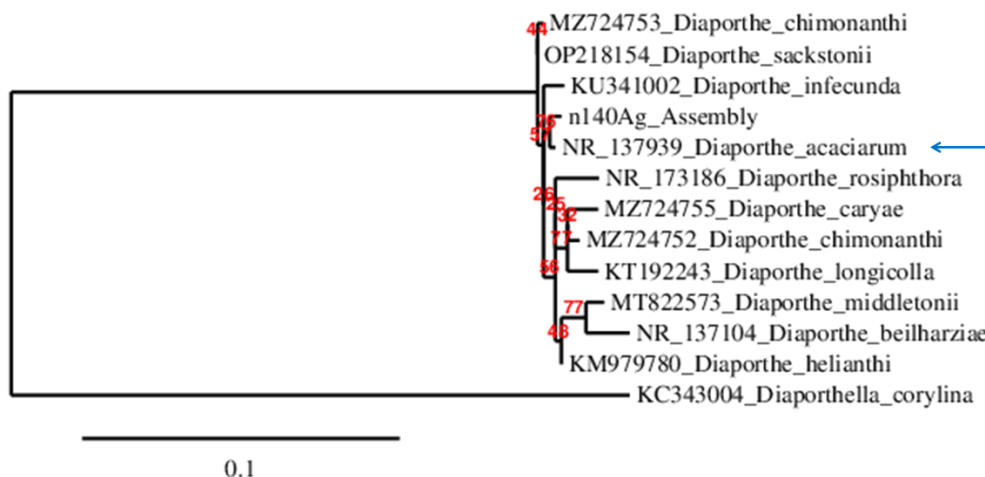


Figura 30. Árbol filogenético de la región ITS de *D. acaciarum* mediante el programa IQ-TREE. La flecha en azul indica la especie identificada en este estudio. Los análisis fueron realizados con el software MEGA 11.

En comparación entre un aislado y varias secuencias ITS de cepas con características morfológicas de *Pseudocercospora*, permitió identificar las cepas analizadas en clados definidos, indicando una relación filogenética cercana. Este árbol se dividió en dos grandes ramas, se seleccionó una secuencia de *Trochophora simplex* en función del outgroup, y la otra rama derivó las secuencias que presentaban relación filogenética con la cepa analizada. De este modo, en el nodo 72, generó una bifurcación directa que permitió que la cepa 048AgM3 se agrupara con *P. sordida* (ver Figura 31).

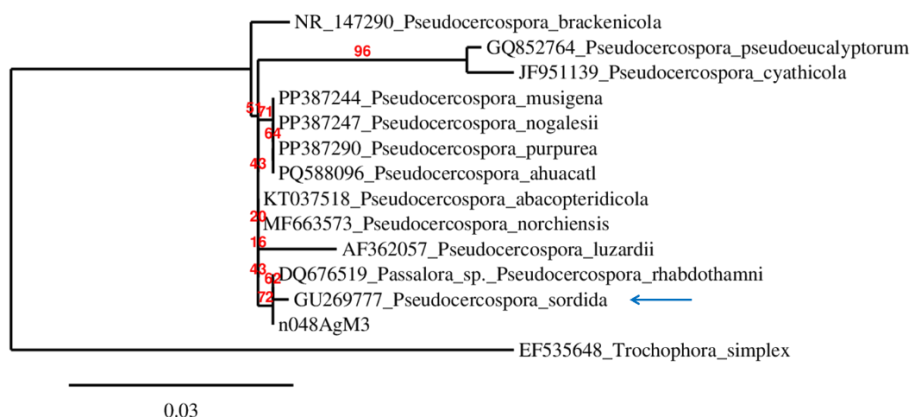


Figura 31. Árbol filogenético de la región ITS de *Pseudocercospora sordida* mediante el programa IQ-TREE. La flecha en azul indica la especie identificada en este estudio. Los análisis fueron realizados con el software MEGA 11.

Con respecto a la Figura 32, el aislado se agrupó con cepas de referencia del género *Trichoderma*, el árbol se dividió en dos grandes ramas que consistió en el grupo externo (outgroup) de *Protocrea farinosa*, y la otra rama presenta secuencias que mantienen relación filogenética de *Trichoderma*. El nodo 42 presentó una bifurcación, que generó el nodo 62, el nodo 62 permitió que se agrupara directamente la cepa 22Ag con *T. longibrachiatum*.

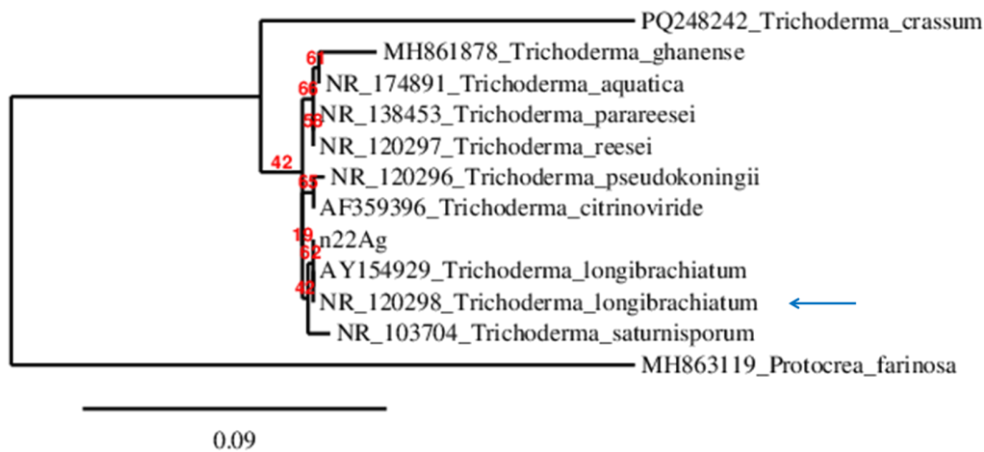


Figura 32. Árbol filogenético de la región ITS de *T. longibrachiatum* mediante el programa IQ-TREE. La flecha en azul indica la especie identificada en este estudio. Los análisis fueron realizados con el software MEGA 11.

Un aislado fue agrupado con varias cepas de referencia de *Neopestalotiopsis*. El análisis filogenético se dividió en dos grandes ramas que consistió en el grupo externo (outgrup) se ubicó de secuencia seleccionada de *Pseudoestalotiopsis* cocos, y la otra rama generó las especies con relación filogenética de secuencias seleccionadas de especies de *Neopestalotiopsis*. La comparación entre características morfológicas de especies de *Neopestalotiopsis* y su identidad con secuencias de ITS. El clado generó el nodo 92, en el nodo 92 se presentó una bifurcación directa, el cual permitió que se ubicara la cepa 234Ag con la especie *N. formicarum* (ver Figura 33).

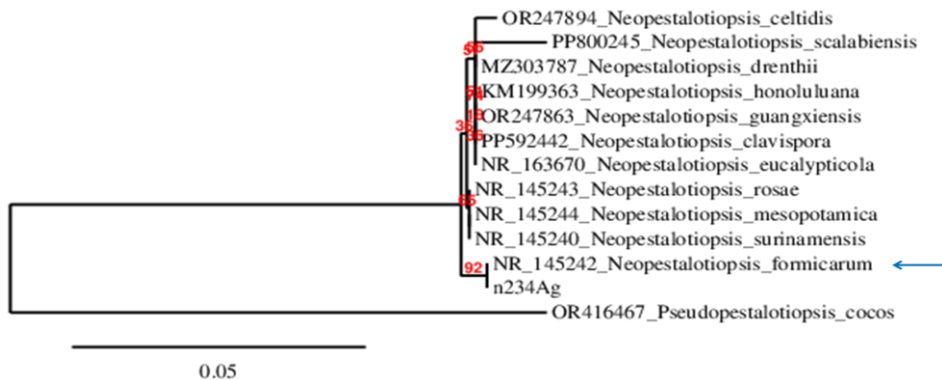


Figura 33. Árbol filogenético de la región ITS de *N. formicarum* mediante el programa IQ-TREE. La flecha en azul indica la especie identificada en este estudio. Los análisis fueron realizados con el software MEGA 11.

Dentro del complejo *Penicillium* se incluyen las dos cepas con códigos 10Ag_c1 y 10Ag_2, 205Ag y 84Ag_a. El grupo externo (outgrup) se ubicó de secuencia seleccionada de *Aspergillus flavus*, en el nodo 98, las secuencias ITS de 10Ag_c1 y 10Ag_c2 se alinearon con la secuencia de cepa *P. menonorum* disponibles a través de la secuencia BLAST. El análisis filogenético reveló que el aislado se agrupó con un aislado de referencia de *P. menonorum* y presentó diferencia a otros *Penicillium* spp. que se compararon, estas cepas se agruparon en clados distintos. Por lo tanto, este resultado indica que 10Ag_c1 y 10Ag_c2

están estrechamente relacionados con *P. menonorum*. Basado en los resultados como las características previas y la homología de secuencias en el árbol filogenético, los aislados se identifican como *P. menonorum*, mientras que el nodo 58, se ubicó la cepa 84Ag_a en relación filogenética de secuencias seleccionadas con la especie *P. osmophilum*. Del mismo modo la cepa 205Ag, se emparejó con *P. chrysogenum* (ver Figura 34).

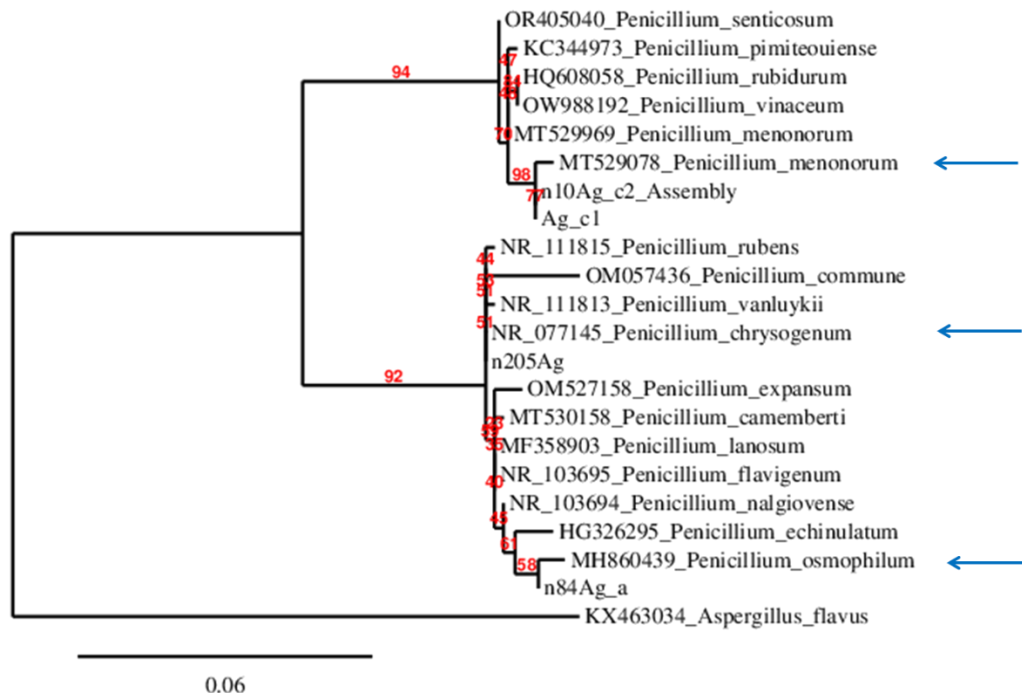


Figura 34. Árbol filogenético de la región ITS de *P. menonorum*, *P. osmophilum*, *P. chrysogenum* mediante el programa IQ-TREE. La flecha en azul indica la especie identificada en este estudio. Los análisis fueron realizados con el software MEGA 11.

Para el aislado 211Ag se agrupó con varias cepas de referencia de *Exophiala*. El mismo se dividió en dos grandes ramas que consistió en el grupo externo (outgroup) de una secuencia seleccionada para *Cyphellophora fusarioides*, y la otra rama generó las especies con relación filogenética de secuencias seleccionadas de especies de *Exophiala*. La comparación entre características morfológicas de especies de *Exophiala* y su identidad con secuencias de ITS. El clado generó el nodo 1e+02, en el nodo 1e+02 se ubicó la cepa 211Ag con la especie *E. oligosperma* (ver Figura 35).

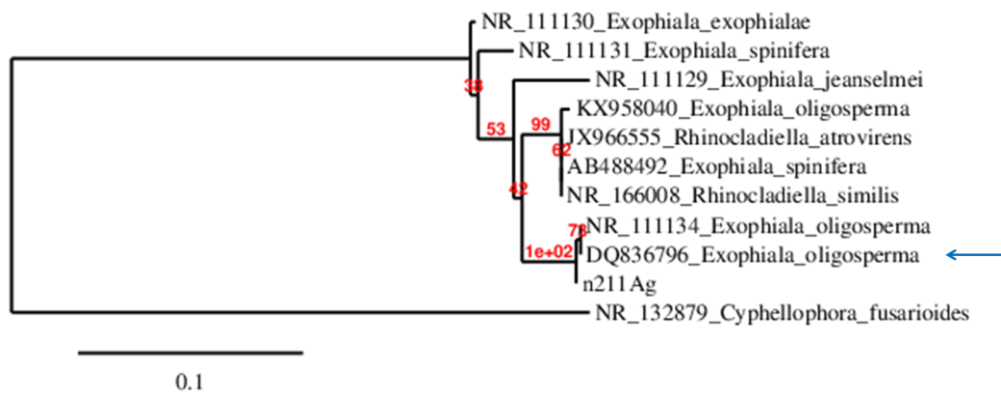


Figura 35. Árbol filogenético de la región ITS de *E. oligosperma* mediante el programa IQ-TREE. La flecha en azul indica la especie identificada en este estudio. Los análisis fueron realizados con el software MEGA 11.

Dentro del grupo de *Fusarium spp.* se incluyen tres cepas con códigos 2Ag, 30Ag_a y 011Ag. El grupo externo (outgroup) se ubicó de secuencia seleccionada a *Nectria eustromatica*. Las secuencias ITS de 2Ag y 30Ag_a se agruparon con la secuencia de cepa *F. oxysporum*, que presentaban estrecha relación. Mientras que la cepa 011Ag en relación filogenética de secuencias seleccionadas con la especie *F. nirenbergiae* (ver Figura 36).

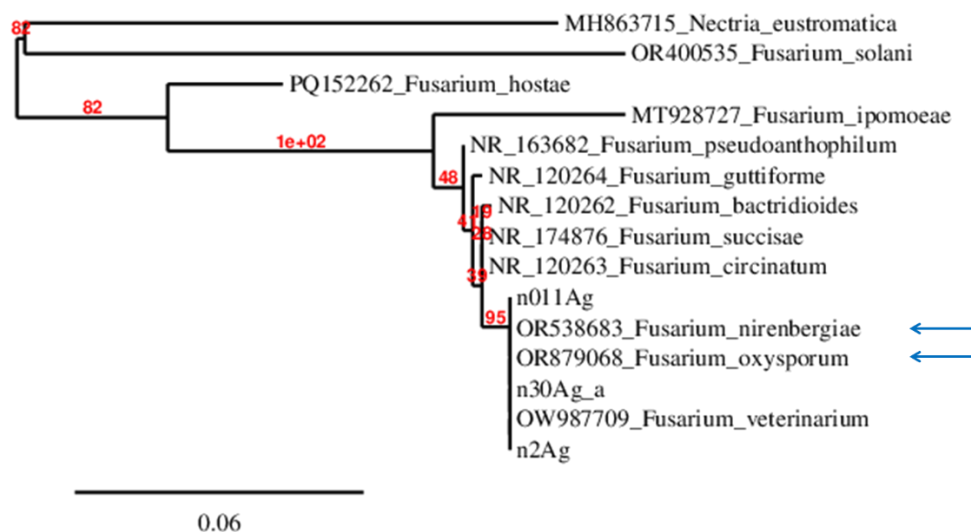


Figura 36. Árbol filogenético de la región ITS de *F. nirenbergiae* y *F. oxysporum* mediante el programa IQ-TREE. La flecha en azul indica la especie identificada en este estudio. Los análisis fueron realizados con el software MEGA 11.

3.2 DISCUSIÓN

La identificación de los hongos filamentosos provenientes de muestras de agua de los doce sitios de la Bahía de Panamá se realizó a través del uso de la caracterización morfológica y análisis molecular. La reactivación y crecimiento en medios de cultivos de PDA y MEA permitió valorar diferenciaciones en la morfología de las colonias fúngicas, incluyendo forma, tamaño, color y textura, mientras que las observaciones de estructuras reproductivas proporcionaron su clasificación preliminar. Sin embargo, la identificación basada exclusivamente en características morfológicas presenta limitaciones, principalmente en la diferenciación de especies estrechamente relacionadas con fenotipos similares (Wang et al., 2015; Raja et al., 2017). No obstante, el uso de las herramientas moleculares fue esencial para aumentar la precisión y confiabilidad en la identificación de las cepas fúngicas.

Los resultados obtenidos muestran que la identificación morfológica a nivel macroscópica y microscópica de los hongos filamentosos son taxonómicamente identificables hasta nivel de género, aunque algunos pocos casos que fueron cultivables en el laboratorio no se lograron completar su identificación porque solo desarrollaron una fase micelial estéril.

Se logró reactivar 65 cepas de hongos en total, con una diversidad variable en el cual el 60% de las cepas analizadas mostraron un crecimiento limitado con una tasa de crecimiento mayor de 10 a 15 días, aspecto característico de los hongos productores y acumuladores de melanina, conocidos como dematiáceos, entre los detectados obtuvimos a las especies del género *Cladosporium* sp., seguido de otros géneros melánicos como *Aureobasidium* sp., *Exophiala* sp., *Diaporthe* sp., *Pseudocercospora* sp., *Neopestalotiopsis* sp. y *Setophaeosphaeria* sp. Por otra parte, el 40% de las cepas estudiadas presentaron un crecimiento moderado y desarrollo de hifas hialinas, entre ellos *Penicillium* sp., *Talaromyces* sp., *Paecilomyces* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. y *Trichoderma* sp.

El grupo de hongos dematiáceos se caracterizan por tener un crecimiento lento o limitado. En el estudio realizado por Nitui et al. (2022), se amplía esta información y destaca que, los hongos negros o dematiáceos adquieren este color oscuro debido a la presencia de melanina que contienen en sus paredes celulares. Esta melanina le confiere protección física y química extracelular contra oxidantes antimicrobianos o factores ambientales adversos generados durante la defensa inmune del huésped. Sin embargo, la melanina puede ralentizar el crecimiento de estos hongos, ya que actúa como una barrera en la pared celular, reduciendo su permeabilidad y limitando la absorción de nutrientes. De esta forma influye en la velocidad para realizar sus procesos metabólicos, lo que provoca un lento crecimiento y desarrollo de estos hongos. En otro estudio realizado por Emidio et al., (2020), indica que la producción de melanina en su pared celular puede afectar su patogénesis y virulencia, ellos explican que, la melanina actúa como un factor de virulencia, ya que puede interferir disminuyendo la fagocitosis y aumentando la virulencia, incluso en presencia de complemento o suero inactivado.

Las especies de hongo filamentoso más predominantes obtenidos en este estudio fueron especies del género *Penicillium* y el grupo de dematiáceos, lo cual es consistente y coincide con varios autores. Por ejemplo, en el estudio realizado por Yuil (2011), que indica “los principales géneros de hongos encontrados en el ambiente son: *Cladosporium*, *Mucor*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Paecilomyces*, *Scopulariopsis*, entre otros”. Además, el estudio realizado por Ramos y Meza (2017), refuerza este resultado destacando que, *Cladosporium*, *Penicillium* y *Aspergillus* son los que más prevalecen en el ambiente.

De acuerdo con Avilés-Robles et al. (2016), en su estudio explican que, *Penicillium* es uno de los géneros mesófilos ambientales más abundantes en la naturaleza. En México, reportaron como primer caso de infección diseminada por *P. chrysogenum* en un paciente pediátrico. Se ha convertido en un patógeno oportunista en pacientes inmunodeprimidos. Además, está ampliamente distribuido en el medio ambiente; sus esporas se encuentran en el polvo doméstico, los edificios húmedos y la descomposición de verduras, frutas, pan y frutos secos. Los seres humanos están frecuentemente expuestos a la propagación aérea de *P. chrysogenum*. Puede ser un alérgeno, producir reactividad cutánea y colonizar las vías respiratorias de pacientes con alergias respiratorias.

Anteriormente mencionaba que el mayor porcentaje de cepas analizadas corresponden a especies del género *Penicillium* sp., demostrando una elevada prevalencia, lo que pudo presentarse gracias a su habilidad para adaptarse a diversos factores y su naturaleza oportunista, aunque destacan de manera similar el grupo de los dematiáceos. Por lo tanto, estos hongos tienen capacidad de desarrollarse en diferentes circunstancias como factores de temperaturas, variaciones de humedad y pH, facilitando el desarrollo de esporas y, por ende, la adaptación en diversos entornos.

El género *Fusarium*, conocido principalmente por su capacidad fitopatógena, también ha sido identificado como un patógeno oportunista en humanos y animales. Según Lozano & Oroval (2013), explican que, la fusariosis humana es una micosis poco frecuente, cuya presentación clínica es altamente variable y con frecuencia difícil de diagnosticar, especialmente cuando el hongo se aísla en zonas no estériles. Los principales factores de riesgo incluyen neutropenia prolongada, tratamiento con corticoides, quimioterapia citotóxica y el uso prolongado de antimicrobianos en pacientes inmunocomprometidos.

De acuerdo con Tamayo-Cevallos (2020), en su estudio indica que, los hongos marinos corresponden a un conjunto de organismos que desarrollan adaptaciones fisiológicas y morfológicas contra ecosistemas marinos y estuarios, lo que les ha permitido dominar frente a otros organismos emparentados. En otro estudio realizado por Kumar et al. (2021), sobre la ecología y evolución de los hongos marinos y su adaptación al cambio climático, señala que los hongos encontrados en aguas marinas pueden adaptarse a alta salinidad, temperatura y niveles severos de pH, lo que les proporciona una mayor variedad en aplicaciones biotecnológicas y ofrece una importante ventaja biológica en comparación a los hongos terrestres.

Según Buriticá et al. (2017), los géneros *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp., y *Penicillium* sp., son algunos de los hongos más comunes en el ambiente, debido a que sus esporas son livianas lo que permite ser transportadas con facilidad. La concentración de estas esporas en el ambiente varía en función de diversos factores biológicos, como el ritmo de esporulación y disponibilidad del sustrato para el crecimiento del micelio; factores climáticos, como el tiempo, humedad y precipitación; y factores físicos, como el movimiento del aire, turbulencia y calentamiento.

De acuerdo con Araujo Pinto et al. (2018) realizaron un estudio aislado en el suelo y aguas de la Playa de Boa Viagem en Brasil, evidenciando la predominancia de especies pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Además, señalan que es probable que la espuma de mar desempeñe una función de agente dispersor de sus esporas, provenientes de fuentes marinas, estuarinas y terrestres. También puede atribuirse a procesos de lixiviación del suelo, descargas fluviales, canales domésticos que transportan desechos fecales a lo largo de la playa, flujo y regreso de las mareas y las actividades de los turistas. Del mismo modo Bernal et al. (2020) en su estudio realizado plantea que la presencia de especies de *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. son hongos terrestres que se encuentran en una extensa diversidad de entornos, adaptándose a diferentes condiciones ambientales. Es posible que lleguen al medio marino transportados por el aire, las corrientes fluviales o la lluvia, y una vez allí, desarrollan habilidad para adaptarse a la salinidad del entorno.

Sin embargo, según Ramos et al. (2021), en su estudio realizado con hongos marinos en zonas costeras de Costa Rica, indica que, las dificultades en la investigación de hongos marinos se deben a que el cultivo de aislados fúngicos provenientes de muestras marinas frecuentemente lleva a la recuperación de microbios no fúngicos, es decir, microorganismos oportunistas, que tienen una similitud ecológica, morfológica y trófica. Adicionalmente, el cambio climático causa modificaciones en las características fisicoquímicas de los hábitats marinos, modificando la estructura ecológica, la función, la fisiología y la población de especies únicas.

De acuerdo con los resultados obtenidos reflejados en la tabla 8 que muestra las especies de hongos filamentosos identificadas de la colección almacenada de cepas fúngicas aisladas de las aguas provenientes de 12 muestreo de la Bahía de Panamá, todas las cepas fúngicas pertenecen al Phylum Ascomycota, lo cual coincide con estudios realizados en investigaciones recientes. Según Jones et al. (2015) los recientes cambios en la nomenclatura de órdenes superiores proporcionan información actualizada sobre nuevas familias, géneros y especies descritas en los últimos cinco años, esto abarcó un total de 1.112 especies distribuidas en 472 géneros. De estas, los Ascomycota representaron la mayoría, con 805 especies en 352 géneros, lo que resalta su predominancia en comparación con otros filos. En este mismo sentido, Sen et al. (2022) en su reciente estudio expresa que, generalmente, los Ascomycota, Basidiomycota y Chytridiomycota predominan en el microbioma marino mundial.

Álvarez et al (2019), realizaron un estudio de los ascomicetos marinos manglícolas, en la “Reserva Ecológica Manglares Churute”, Ecuador, describiendo los hongos manglícolas con la finalidad de emplearlos a aplicaciones biotecnológicas, reportó que a diferencia de los hongos terrestres, los hongos marinos en su mayoría son ascomicetos, esto se debe a que presentan una serie de modificaciones que les permiten dominar este ambiente, como la presencia de pequeños cuerpos de fructificación y ornamentaciones en sus esporas. A diferencia de los hongos ascomicetos, los hongos basidiomicetos parecen escasos, y generalmente se detectan Ustilaginomycetes, Agaricomycetes, Exobasidiomycetes, Wallemiomycetes y Tremellomycetes

Análisis molecular y filogenético

A través del aislamiento y caracterización molecular, se analizaron 58 extracciones de ADN genómico micelial, con un alto rendimiento de aislamiento del material génico que permitió la identificación y caracterización por secuenciación del locus ITS del ADN ribosomal. El uso de estas regiones sigue siendo un proceso fundamental para determinar especies específicas de un microorganismo determinado y ha demostrado ser eficaz para la identificación y diferenciación de especies, incluso aquellas estrechamente relacionadas, lo que lo convierte en marcadores confiables para delimitar especies dentro de diversos géneros de hongos filamentosos (Tekpinar & Kalmer, 2019). Cabe destacar que los morfotipos mostraron una coincidencia con las secuencias de referencia, lo que indicó la eficacia de la secuenciación para la identificación de géneros o especies conocidas.

En cuanto al género fúngico, los resultados revelaron que los hongos con morfotipo dematiáceo, presentaron el mayor porcentaje de recuperación. Hallazgos similares fueron reportados por Sánchez-Cárdenas et al. (2023), quien además señala el grado de infección que pueden causar estos hongos. Un ejemplo de ello es la feohifomicosis, una infección fúngica de distribución mundial que abarca manifestaciones superficiales, subcutáneas o sistémicas poco frecuentes, provocadas por hongos melanizados. En la actualidad se han descrito alrededor de 70 géneros y 150 especies entre los cuales *Exophiala*, *Fonsecaea*, *Curvularia* y *Lomentospora* producen la mayoría de los casos. Estos agentes causales son hongos saprofitos filamentosos que se encuentran en el ambiente, principalmente en el suelo y las plantas. Todos ellos producen pigmento melánico, un factor de virulencia vital que inhibe la fagocitosis y la unión a enzimas hidrolíticas, impidiendo su acción sobre las membranas, lo que puede explicar su potencial patógeno en pacientes inmunocompetentes.

Entre las especies identificadas por técnicas moleculares, se destaca *Exophiala oligosperma*. La presencia de estas especies en el agua de la Bahía de Panamá representa un posible riesgo para la salud pública, ya que este agente se ha reportado como patógeno al provocar infecciones oportunistas en humanos y otros organismos. Recientemente, estudios previos han reportado su presencia debido a su alto grado de patogenicidad. Por ejemplo, en un estudio realizado por Barrientos-Flores et al. (2024) aisló, en muestra de placa verrugosa de un paciente que presentaba infección subcutánea causada por *E. oligosperma*, lo cual demuestra que esta especie puede producir infección en individuos con estado inmunológico normal.

Además, el estudio realizado por Brufatto et al. (2024), refuerza esta información, reportando un caso donde se identifica una infección provocada por el género *Exophiala* en un trabajador agrícola brasileño de 61 años, el paciente fue ingresado en el ambulatorio dermatológico, el mismo presentó una lesión nodular, no adherente, en el antebrazo superior derecho, que evolucionó al año, creciendo hasta 1,5 cm de diámetro. El análisis microscópico directo de esta nueva lesión mostró hongos dematiáceos aislados del microcultivo. En el cultivo fue posible observar un microorganismo de coloración negra, al que se le realizó la secuenciación de los genes ITS4 e ITS5, evidenciando el agente *E. oligosperma*.

Así mismo, otra especie identificada en el estudio ha sido *Aureobasidium melanogenum*, la colonización fúngica plantea un riesgo significativo para la salud pública. Aunque las especies de *Candida* son los patógenos identificados con mayor frecuencia, se informa cada vez más sobre otros agentes que presenten un tipo de crecimiento dimórfico como *A. melanogenum*, lo que complica el diagnóstico y el tratamiento debido a los datos limitados sobre la farmacocinética antifúngica. Esos patógenos emergentes, a menudo oportunistas, subrayan la necesidad crítica de un diagnóstico temprano (Mpakosi et al., 2024).

En un estudio realizado por Chen et al. (2016), reportaron un caso de feohifomicosis superficial en un individuo inmunocompetente que presentaba síntomas parecidos a la tiña negra. El análisis microscópico mostró esporas de forma ovalada con paredes de gran grosor y septos. Un hongo con colonias mucoides negras fue aislado repetidamente, identificado como *A. melanogenum* a través de rasgos morfológicos y la secuenciación de ADN ribosómico. Ellos sugieren que la infección podría haberse propagado por actividades de jardinería. De acuerdo con Isola et al. (2021), indican que, ésta especie se puede aislar de madera terminada con aceite y también ha sido reportada como un patógeno ocasional. Del mismo modo, Van Nieuwenhuijzen et al. (2016) reportaron la detección de *A. melanogenum* en muestras de madera expuestas en los Países Bajos, Camerún, Sudáfrica, Australia y Noruega. Este hongo, conocido como moho que mancha la madera, ha sido identificado en maderas tratadas con aceite, donde contribuye a la formación de una característica mancha oscura denominada biofinish. Es un hongo ambiental ampliamente distribuido en diversos hábitats y actualmente se considera un patógeno capaz de causar una amplia gama de infecciones humanas.

Un estudio realizado por Babič y Gunde-Cimerman (2023), comparó la micobiota del agua potable en Suecia y Eslovenia, encontrando hongos en el 75% y 90% de las muestras, respectivamente. En Suecia, predominaban *Varicosporellopsis* (27,3%), *Paracremonium* (14,5%) y levaduras negras como *Cadophora*, *Cyphellophora* y *Exophiala* (18,2%). En Eslovenia, los más comunes fueron *Aspergillus* spp. (46%), *A. melanogenum* (36%) y *Exophiala* spp. (24%). Estos hallazgos señalan la importancia de rastrear la presencia de hongos emergentes con efectos conocidos sobre la salud en el agua potable y alientan a realizar más estudios sobre su transmisión desde las fuentes de agua cruda hasta los usuarios finales.

Los datos sobre la gestión de riesgos de enfermedades fúngicas son limitados por el escaso número de especialistas en esta área, lo que genera dificultades y, en consecuencia, una falta de pruebas diagnósticas para una correcta identificación en muchas unidades de gestión regional. Las investigaciones futuras deberían incluir un enfoque multidisciplinario que abarque los agentes causantes de micosis (Nardoni & Mancianti, 2023).

Numerosos estudios han registrado el uso de microorganismos beneficiosos para la reducción de enfermedades y la optimización del crecimiento de las plantas. Las especies pertenecientes al género *Trichoderma* sobresalen por sus acciones provechosas para las plantas (Ismaiel et al., 2024).

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio demuestran que los hongos filamentosos analizados provenientes de muestras de aguas, a través de la integración de las técnicas de cultivo morfológico y moleculares permitió analizar de manera más detallada las comunidades fúngicas presentes en doce sitios de la Bahía de Panamá. A través del aislamiento y la identificación morfológico y molecular, se logró detectar una diversidad hongos filamentosos, predominando *Cladosporium tenuissimum*, *C. colocasiae*, *C. perangustum*, *C. cladosporioides*, *C. halotolerans*, *Aureobasidium melanogenum*, *Talaromyces domesticus*, *T. atroroseus*, *Diaporthe acaciarum*, *Pseudocercospora sordida*, *Neopestalotiopsis formicarum*, *Exophiala oligosperma*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Penicillium menonorum*, *P. chrysogenum*, *P. osmophilum*, *Fusarium nirenbergiae*, *F. oxysporum*.

Dentro de las cepas identificadas, varias especies han sido previamente reportadas o detectadas mediante literatura como agentes fúngicos oportunistas con alto potencial de patogenicidad en humanos. Se ha vinculado como *C. cladosporioides* y *C. tenuissimum* con infecciones respiratorias, sinusales y oculares, especialmente en individuos inmunocomprometidos. *Aureobasidium melanogenum* ha sido registrado en casos de infecciones cutáneas y en sangre, mostrando un comportamiento emergente como patógeno ambiental. Igualmente, *Exophiala oligosperma*, perteneciente al grupo de los hongos negros, es una especie reconocida por causar infecciones subcutáneas, sistémicas e incluso cerebrales. A pesar de que frecuentemente se le considera como patógeno ambiental, *Trichoderma longibrachiatum* ha sido identificado en casos de fungemia y neumonía. Por su parte, *Penicillium chrysogenum*, más conocido por su habilidad para adaptarse a diversos factores y su naturaleza oportunista y su uso industrial, ha sido implicado en infecciones respiratorias y del oído medio. Finalmente, *Fusarium oxysporum* destaca por su amplia distribución y su capacidad de causar desde onicomiosis hasta infecciones diseminadas en pacientes inmunosuprimidos.

Estas especies han sido ampliamente documentados en la literatura médica y científica debido a su alta resistencia a tratamientos antifúngicos convencionales y su capacidad para persistir en distintos ambientes, incluyendo el agua y el suelo, lo que representa un riesgo importante para la salud pública. La presencia de estos hongos en los sitios muestreados sugiere una posible fuente ambiental, lo cual subraya la importancia de su monitoreo continuo y su caracterización precisa tanto morfológica como molecular.

Este análisis permitió observar la probabilidad de los datos obtenidos para la elaboración correcta de los árboles filogenéticos. Por lo tanto, facilitó analizar la

similitud entre secuencias halladas para cada cepa fúngica correspondiente con diferentes hongos identificados en estudios previos.

La confirmación de los análisis moleculares de las cepas, junto con la identificación morfológica, resalta la importancia de emplear métodos multidisciplinarios en el estudio de hongos. Este tipo de estudio no solo mejora la precisión en cuanto a la identificación taxonómica, sino que también facilita una mayor comprensión de la diversidad de los hongos en diferentes ambientes de nuestro país, por lo tanto, esta investigación sirve de referencia para estudios posteriores en la Universidad de Panamá, que permitan ampliar el conocimiento en procesos ecológicos, agricultura, salud y biotecnología, contribuyendo así al desarrollo y avance científico del país.

RECOMENDACIONES

- Para futuras investigaciones considerar el empleo de reactivos específicos para ciertos géneros o familias de hongos, con objetivo de incrementar con exactitud el análisis para la identificación molecular de hongos filamentosos, particularmente marcadores moleculares dirigidos a regiones conservadas con bajo contenido de ADN fúngico o en muestras mixtas, que además de la ITS, usar LSU, SSU o RPB2, lo cual podría aumentar la resolución taxonómica, especialmente en especies con alta variabilidad intraespecífica o difíciles de identificar con un solo marcador.
- Preservar adecuadamente las cepas fúngicas identificadas mediante técnicas moleculares, dado que representan una base de datos para investigaciones futuras.
- Mantener un registro de cepas facilita la reanudación de investigaciones en caso de nuevas problemáticas de estudio o la comparación de resultados a través del tiempo.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Acumedia. (2015). Agar Papa Dextrosa. Insumolab, (7149), 3–5. Retrieved from https://foodsafety.neogen.com/pdf/acumedia_pi/7149_sp_pi.pdf

Alvarez, E., Garcia-Hermoso, D., Sutton, DA, Cano, J.F., Stchigel, A.M., Hoinard, D., et al. (2010). Molecular phylogeny and proposal of two new species of the emerging pathogenic fungus *Saksenaia*. *J Clin Microbiol*; 48:4410–6.

Álvarez. X, Tamayo. R, Almeida. D, Robles. S, Moscoso. A. (2019). Nuevos registros de Ascomicetos marinos manglicolas para el Ecuador. Molina Moreira, N. & Galvis, F. (Comp). Primer Congreso Manglares de América. Universidad Espíritu Santo. Samborondón-Ecuador

Anastasi, A., Tigini, V., Varese G.C. (2013). The bioremediation potential of different ecophysiological groups of fungi, en Goltapeh, E.M., Danesh, Y.R., Varma, A. (eds.), *Fungi as Bioremediators*: Berlin, Springer-Verlag, 29-50.

Arce-Torres, L. F., Gómez-Díaz, I., Monge-Artavia, M., & Prado-Cordero, J. (2020). Metabolitos secundarios con actividad medicinal extraídos de hongos provenientes de Centroamérica. *Revista Tecnología En Marcha*, 33(3), Pág. 80–89. <https://doi.org/10.18845/tm.v33i3.4416>

Arcobello, J. T., & Revankar, S. G. (2020). *Phaeohyphomycosis*. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 41(01), 131–140. <https://doi.org/10.1055/s-0039-3400957>

Arenas, G. (2014). *Micología médica ilustrada. Generalidades de los hongos. Dermatofitosis*. México: McGraw-Hill Interamericana.

Arias, E. L. & Piñeros, P. A. (2008). Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestra de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde. <http://hdl.handle.net/10554/8233>.

Arispe-Vazquez, J. L., Sanchez-Arizpe, A., & Galindo-Cepeda, M. E. (2021). Microbiota Fúngica en Quesos Artesanales en Saltillo, Coahuila, México. *Revista ION*, 34(1), 7-13. <https://doi.org/10.18273/revion.v34n1-2021001>

Ascencio, M., Canela, A., Domínguez, E. (2021, agosto-diciembre). Identificación de hongos oportunistas de interés clínico. [Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Ciencias Químicas, Laboratorio de Micología]. <https://repositorioinstitucional.uaslp.mx/xmlui/handle/i/7472>.

Atkins, S. D., & Clark, I. M. (2004). Fungal molecular diagnostics: a mini review. *Journal of applied genetics*, 45(1), 3–15.

- Avilés-Robles, M., Gómez-Ponce, C., Reséndiz-Sánchez, J., Rodríguez-Tovar, A. V., Ceballos-Bocanegra, A., & Martínez-Rivera, Á. (2016). Disseminated penicilliosis due to *Penicillium chrysogenum* in a pediatric patient with Henoch–Schönlein syndrome. *International Journal of Infectious Diseases*, 51, 78–80. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.08.026>
- Aw, T. G., & Rose, J. B. (2012). Detection of pathogens in water: From phylochips to qPCR to pyrosequencing. En *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 23, Números 3, pp. 422-430). <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.11.016>
- Babič, M. N., & Gunde-Cimerman, N. (2023). Culturable mycobiota of drinking water in Göteborg (Sweden) in comparison to Ljubljana (Slovenia) with implications on human health. *Journal of Water and Health*, 21(8), 1064–1072. <https://doi.org/10.2166/wh.2023.089>
- Badali, H., Carvalho, V., Vicente, V., Attili-Angelis, D., Kwiatkowski, I., Gerrits Van Den Ende, A., et al. (2009). *Cladophialophora saturnicasp. nov.*, a new opportu-nistic species of Chaetothyriales revealed using molecular data. *Med Mycol.*; 47:51–62.
- Balajee, S. A., Houbraken, J., Verweij, P. E., Hong, S. B., Yaghuchi, T., Varga, J., & Samson, R. A. (2007). *Aspergillus* species identification in the clinical setting. *Studies in mycology*, 59, 39–46. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.05>
- Balajee, S. A., Kano, R., Baddley, J. W., Moser, S. A., Marr, K. A., Alexander, B. D., Andes, D., Kontoyiannis, D. P., Perrone, G., Peterson, S., Brandt, M. E., Pappas, P. G., & Chiller, T. (2009). Molecular identification of *Aspergillus* species collected for the Transplant-Associated Infection Surveillance Network. *Journal of clinical microbiology*, 47(10), 3138–3141. <https://doi.org/10.1128/JCM.01070-09>
- Baldrian, P. (2008). Wood-inhabiting ligninolytic basidiomycetes in soils: Ecology and constraints for applicability in bioremediation. *Fungal Ecology*. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2008.02.001>
- Barrientos-Flores, C., Vázquez-González, D., Moreno-López, L. M., Araiza, J., Nolasco-Hernández, B., Fierro-Arias, L., Ibarra-Morales, D., & Bonifaz, A. (2024). Cutaneous verrucose phaeohyphomycosis due to *Exophiala oligosperma* in an immunocompetent host. *Our Dermatology Online*, 15(1). <https://doi.org/10.7241/ourd.20241.8>
- Barnett, H.L. and Hunter, B.B. (1972) *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 3rd Edition, Burgess Publishing Co., Minneapolis, 241 p.
- Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., Kauserud, H. (2010). ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiol* 10, 189. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-189>
- Bernal, F., Yangüés, L., De Von Chong, M., & Muñoz, M. I. A. (2020). Hongos patógenos en la producción de camarón marino, *Litopenaeus vannamei* (BOONE), PANAMÁ. *Tecnociencia*, 23(1), 315–331. <https://doi.org/10.48204/j.tecno.v23n1a16>

Biddeci, G., Donà, D., Geranio, G., Spadini, S., Petris, M. G., Pillon, M., Biffi, A., & Putti, M. C. (2020). Systemic Fusariosis: A Rare Complication in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of Fungi*, 6(4), 212. <https://doi.org/10.3390/jof6040212>
Biomédicas, 7(2), 316–322. <https://doi.org/10.32997/rcb-2016-2862>

Bongomin F., Gago S., Oladele R.O., Denning D. W. (2017). Global and multi-national prevalence of fungal diseases – estimate precision. *J Fungi (Basel)*.;3:57. <https://doi.org/10.3390/jof3040057>

Bonifaz-Trujillo, A. (2015). *Micología médica básica* (5a. ed.).

Brufatto, J. P. T., Pontes, L., Schreiber, A. Z., Cintra, M. L., Souza, C. A., Gomide, L. V., Guerra, H. M. M. T., Stelini, R. F., Brum, I. V., Da Costa França, A. F. E., Magalhães, R. F., & Velho, P. E. N. F. (2024). Misleading subcutaneous mycosis: a case report of subsequent clinical mycetoma-like and histological chromoblastomycosis-like lesions. *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De São Paulo*, 66. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946202466034>

Buritacá H., H. M., Mejía, M., & Álvarez, M. del M. (2017). Aislamiento de Microorganismos en diferentes ambientes (Suelo, Agua y Aire). *Mente Joven*, 6, 09–20. https://doi.org/10.18041/2323-0312/mente_joven.0.2017.3666

Bustin, S. A. (2010). Why the need for qPCR publication guidelines? —The case for MIQE. En *Methods* (Vol. 50, Números 4, pp. 217-226). <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.12.006>

C. P. Emidio, E., E. Urán J., M., B. R. Silva, L., S. Dias, L., Doprado, M., Nosanchuk, J. D., & Taborda, C. P. (2020). Melanin as a Virulence Factor in Different Species of Genus *Paracoccidioides*. *Journal of Fungi*, 6(4), 291. <https://doi.org/10.3390/jof6040291>

Campbell, C. K., Johnson, E. M., & Warnock, D. W. (2013). *Identification of Pathogenic Fungi*. John Wiley & Sons.

Carrillo, L., & Audisio, C. (2007). Los hongos. *Manual de Microbiología de Alimentos*, (2), 31–39.

Casadevall, A. (2018). Fungal Diseases in the 21st Century: The near and far horizons. *Pathog Immun.* ;3:183-96. <https://doi.org/10.20411/pai.v3i2.249>

Castañeda Gonzalez, A. M., & Rodríguez Archilla, L. G. (2017). Diversidad Fúngica Al Servicio De La Biotecnología. *Revista Científica Guarruco*.

Castillo Jáquez, J. del C., Núñez Rodríguez, V. A., & Orgaz-Agüera, F. (2022). Calidad de las aguas en ríos que desembocan en playas turísticas. Estudio de caso en República Dominicana. *Turydes. Turismo y Desarrollo Local Sostenible*, 1–17. <https://doi.org/10.51896/turydes/emll8561>

Castón, J. J. (2006). Importancia del empleo profiláctico de aerosoles de anfotericina b deoxicolato como factor de riesgo de infección y enfermedad respiratoria por *aspergillus terreus* en pacientes con cultivo positivo para hongos filamentosos. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=69858>

Catalina, M. S. D. (2018). Evaluación de las técnicas criocongelación y cultivo seriado para la conservación de hongos filamentosos en el cepario de la Universidad El Bosque. <https://hdl.handle.net/20.500.12495/8248>

Cepero de García, M. C., Restrepo Restrepo, S., Franco-Molano, A. E., Cárdenas Toquica, M., & Vargas Estupiñan, N. (2012). *Biología de hongos* (1.^a ed.). Ediciones Uniandes-Universidad de los Andes.

Cevallos, R. T. (2020). Hongos marinos lignícolas en ecosistemas de manglar. *Revista Ecuatoriana De Medicina Y Ciencias Biológicas*, 41(2), 95–106. <https://doi.org/10.26807/remcb.v41i2.880>

Chen, W. T., Tu, M. E., & Sun, P. L. (2016). Superficial *Phaeohyphomycosis* Caused by *Aureobasidium melanogenum* Mimicking Tinea Nigra in an Immunocompetent Patient and Review of Published Reports. *Mycopathologia*, 181(7-8), 555–560. <https://doi.org/10.1007/s11046-016-9989-3>

Corrales Ramírez, L. C., Sánchez Leal, L. C., & Quimbayo Salamanca, M. E. (2018). Microorganismos potencialmente fitopatógenos en aguas de riego proveniente de la cuenca media del río Bogotá. *Nova*, 16(29), 71–89. <https://doi.org/10.22490/24629448.2691>

Cornejo-Juárez, P., Velásquez-Acosta, C., Martínez-Roque, V., Rangel-Cordero, A., Volkow-Fernández, P. (2007). Fungemia asintomática causada por *Acremonium* sp asociada a colonización de catéter venoso central (CVC). (2007). In *Gac Méd Méx* [Journal-article]. <https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2007/gm073c.pdf>

Croz, L. (1988). Survey and Monitoring of Marine pollution in the Bay of Panama. UNEP Regional Seas Reports and Studies N°97. Co-operation for Environmental Protection in the Pacific.

da Silva, L. A., de Carvalho, J. A., de Oliveira e Lima, L., da Silva Neto, F. B., de Oliveira Lima, E., da Silva Rocha, W. P., de Camargo, Z. P., Rodrigues, A. M., Dulgheroff, A. C. B., & Guerra, F. Q. S. (2024). Analyses of the Genetic Diversity and Population Structures of *Sporothrix* spp. Clinical Isolates from Paraíba, Brazil. *Journal of Fungi*, 10(12), 848. <https://doi.org/10.3390/jof10120848>

Deacon JW. Técnicas de diagnóstico en Introducción a la micología moderna. México. Noriega-Limusa 1988.

De Araujo Pinto, I. M., Cavalcanti, M. A. Q., & de Oliveira Passavante, J. Z. (2019). Hongos filamentosos aislados desde el suelo y el agua en la playa de Boa Viagem (Recife, Brasil). *Boletín Micológico*, 7. <https://doi.org/10.22370/bolmicol.1992.7.0.1279>

De la Rosa García, S., & Gamboa Angulo, M. (2004). Microorganismos acuáticos: una farmacia por visitar. *Ciencia Ergo Sum*, 11(2), 186–190. Retrieved from <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10411208>

De Sousa, BIC, Ferreira, LCF, de Lima, MMR, Netto, J. d. SB, Astacio, GS -M., Bernardes-Engemann, AR, de Macedo, PM, Gutiérrez-Galhardo, MC, & Freitas, DFS (2023). Esporotricosis osteoarticular de rodilla causada por *Sporothrix brasiliensis*: dos casos similares con diferentes resultados. *Revista de Hongos*, 9 (10), 956. <https://doi.org/10.3390/jof9100956>

Delgado, A., Prieto, S., Amich, S., y Salve, M. (1994). Laboratorio de microbiología. Madrid: McGraw.Hill Interamericana.

Espanhol, C. M., Recuero, J. K., Pagani, D. M., Ribeiro, A. C., Vettorato, G., Duquia, R. P., Luzzatto, L., & Scroferneker, M. L. (2019). Cutaneous phaeohyphomycosis caused by *Exophiala xenobiotica*: A case report. *Medical Mycology Case Reports*, 27, 39–41. <https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2019.12.003>

Estrada-Salaza, G. I., Ramírez-Galeano, M. C. (2019). Micología general. 1ed. Manizales (Colombia): Centro Editorial Universidad Católica de Manizales, ISBN 978-958-52337-1-3, 40 p

Fernández, L. E. U., Alcívar, J. M. O., Pechi, N. L., Zuñiga, A. M. A., & Perendones, M. (2019). Paracoccidioidomycosis: reporte de un caso clínico. *Revista Uruguaya De Medicina Interna*. <https://doi.org/10.26445/04.03.5>

Fry, C. (2023). State of the World's Plants and Fungi.

Gallejo Arjona, E. (2016). Los hongos y el paso del tiempo. https://www.um.es/eubacteria/Los_hongos_y_el_paso_del_tiempo.pdf

Garcia, L. E. (2016). Ecological diversity of filamentous fungi in the sand on the beaches of the north coast of Puerto Rico (Doctoral dissertation, Universidad del Turabo (Puerto Rico)).

<https://www.proquest.com/openview/4b7bb6d2f9cdf8c1c50f6666ed44c55a/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750>

García-Vidal, C., & Salavert Lletí, M. (2014). Inmunopatología de las micosis invasivas por hongos filamentosos. *Revista iberoamericana de micología*, 31(4), 219–228. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2014.09.001>

Garnica-Escamilla, M. A., Rocha, M. G., Bautista-León, R. C., & Franco-Cendejas, R. (2012). *Cladosporium* sp. El paciente quemado. In Fundación Clínica Médica Sur, Centro Nacional de Investigación y Atención a Quemados (CENIAQ), Instituto Nacional de Rehabilitación, & Centro Nacional de Investigación y Atención a Quemados (CENIAQ), Instituto Nacional de Rehabilitación, *Rev Hosp Jua Mex* (Vol. 79, Issue 4, pp. 271–272) [Journal-article]. <https://www.medigraphic.com/pdfs/juarez/ju-2012/ju124j.pdf>

Gilgado, F., Cano, J., Gené, J., & Guarro, J. (2005). Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *Journal of clinical microbiology*, 43(10), 4930–4942. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.10.4930-4942.2005>

Goyeneche-García, A., Rodríguez-Oyuela, J., Sánchez, G., & Firacative, C. (2021). Perfil clínico y epidemiológico de pacientes con aspergilosis invasiva de un hospital de cuarto nivel en Bogotá, Colombia: un estudio retrospectivo. *Journal of Fungi*, 7 (12), 1092. <https://doi.org/10.3390/jof7121092>

Gräser, Y., Scott, J. and Summerbell, R. (2008). The new species concept in dermatophytes. A polyphasic approach. *Mycopathologia*; 166:239–56.

Grisales, L. (2017). Hongos (Reino Fungi): características y clasificación o tipos. <https://naturaleza.paradise-sphinx.com/fungi/hongos.htm>

Guarro J. (2012) Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 30(1):33–39.

Guarro, J., Gene, J. and Stchigel, A.M. (1999) Development of Fungal Taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 454-500.

Gusiniano, G. G. (2009). Micosis Oportunistas. Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología, 1, 9. Retrieved from <http://ecaths1.s3.amazonaws.com/catmicromed/APUNTE Micosis oportunistas.pdf>

Gutierrez, A. C., Tornesello-Galván, J., Manfrino, R. G., Hipperdinger, M., Falvo, M., D'Alessandro, C., & Lastra, C. C. L. (2017). Organización y conservación de la colección de hongos patógenos y simbiontes de insectos y otros artrópodos del CEPAVE (CONICET-UNLP), La Plata, Argentina. *Revista Argentina De Microbiología*, 49(2), 183–188. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.09.007>

Gutiérrez, S. & C. Trujillo, L. (2019). Revisión y análisis macroscópico y microscópico de las cepas de la colección de hongos de la Universidad Católica de Manizales para verificar su contenido, viabilidad y pureza. Universidad Católica de Manizales. Retrieved from <https://repositorio.ucm.edu.co/jspui/handle/10839/2489>

Hernández Peñaranda, A. (2003). *Microbiología Industrial*. EUNED.

Ide-Pérez, M. R., Sánchez-Reyes, A., Folch-Mallol, J. L., & Del Rayo Sánchez-Carbente, M. (2024). *Exophiala chapopotensis* sp. nov., an extremotolerant black yeast from an oil-polluted soil in Mexico; phylogenetic approach to species hypothesis in the Herpotrichiellaceae family. *PLoS ONE*, 19(2), e0297232. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0297232>

Ismail, A., Jambhulkar, P. P., Sinha, P., & Lakshman, D. K. (2024). Trichoderma: Harzianum Clade in Soils from Central and South America. *Journal of Fungi*, 10(12), 813. <https://doi.org/10.3390/jof10120813>

Isola, D., Scano, A., Orrù, G., Prenafeta-Boldú, F. X., & Zucconi, L. (2021). Hydrocarbon-Contaminated Sites: Is There Something More Than *Exophiala xenobiotica*? New Insights into Black Fungal Diversity Using the Long Cold Incubation Method. *Journal of Fungi*, 7(10), 817. <https://doi.org/10.3390/jof7100817>

Johnson, R. T. (2024). La reproducción en los hongos. Guía de aprendizaje de ciencias naturales. <https://tuguideaprendizaje.co/taller-reproduccion-de-los-hongos/>

Jones, E. B. G., Suetrong, S., Sakayaroj, J., Bahkali, A. H., Abdel-Wahab, M. A., Boekhout, T., & Pang, K. (2015). Classification of marine Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota and Chytridiomycota. *Fungal Diversity*, 73(1), 1–72. <https://doi.org/10.1007/s13225-015-0339-4>

Jumpponen, A., Jones, K. L., David Mattox, J., & Yaege, C. (2010). Massively parallel 454-sequencing fungal communities in *Quercus* spp. ectomycorrhizas indicates seasonal dynamics in urban and rural sites. *Molecular ecology*, 19 Suppl 1, 41–53. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04483.x>

Karakeçili, F.; Barkay, O.; Sümer, B.; Binay, U.D.; Memiş, K.B.; Yapıcıer, Ö.; Balci, M.G. Invasive Aspergillosis with Cavernous Sinus Thrombosis Following High-Dose Corticosteroid Therapy: A Challenging Case of Rhino-Orbital-Cerebral Mycosis. *J. Fungi* 2024, 10, 788. <https://doi.org/10.3390/jof10110788>

Koch, R. (2011). Contaminación de la Bahía, Panamá.1.

Kumar, V., Sarma, V. V., Thambugala, K. M., Huang, J., Li, X., & Hao, G. (2021). Ecology and Evolution of Marine Fungi With Their Adaptation to Climate Change. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.719000>

Larsen, T. H., Williams, N. M., & Kremen, C. (2005). Extinction order and altered community structure rapidly disrupt ecosystem functioning. *Ecology letters*, 8(5), 538–547. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00749.x>

Lobatón Ramírez, J., Coronado Negrete, A., Ramírez Barranco, R., Rocha Reyes, E., Pinto Angarita, J. C., & Borré Naranjo, D. (2020). Fusariosis diseminada por *Fusarium verticillioides* en un paciente con leucemia mieloide aguda. *Revista Ciencias*

López Martínez, R., (2005). Ecología de los hongos patógenos para el hombre. *Revista Mexicana de Micología*, (21), 85-92.

Lozano, T. G., & Oroval, E. A. (2013). Fusariosis: infecciones por *Fusarium* spp. Una breve nota. *Revista Del Laboratorio Clínico*, 6(4), 185–186. <https://doi.org/10.1016/j.labcli.2013.07.003>

Mancilla, J., Mora, M., Del Carmen Montañez, D., Martínez, V., Fuentes, R., & Carranza, R. (2020). Micobiota aislada de serpientes en cuarentena del centro para investigaciones y respuestas en ofidiología de la universidad de panamá (CEREO). *Tecnociencia*, 23(1), 180–197. <https://doi.org/10.48204/j.tecno.v23n1a10>

Martí Sole, M. C., Alonso Espadalé, R. M., & Constans Aubert, A. (1999). NTP 539: Prevención del riesgo biológico en el laboratorio: Trabajo. https://www.ehu.eus/documents/2458096/2577739/ntp_539.pdf

Méndez-Tovar, L. J., López-Martínez, R., & Hernández-Hernández, F. (2010). Actualidades en Micología Médica (5.^a ed.). Editorial de la Facultad de Medicina, UNAM.

Menezes, C. P., De Lima Perez, A. L. A., & Oliveira, E. L. (2017). *Cladosporium* spp: Morfologia, infecções e espécies patogênicas. *Acta Brasiliensis*, 1(1), 23. <https://doi.org/10.22571/actabra1120176>

Montesinos-Matías R., M.A. Ayala-Zermeño, A.M. Berlanga-Padilla. 2015. Manual para la conservación y mantenimiento de hongos entomopatógenos. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. Dirección General de Sanidad Vegetal. SAGARPA. SENASICA.Tecomán, Colima, México. Pp. 59. ISBN: 978-968-5384-08-7

Morgado, W. B. (2017). Evaluación del comportamiento bioaerosoles fungí asociados a un Relleno sanitario ubicado en el Municipio de Tubara, Departamento del Atlántico. DOI: 10.13140/RG.2.2.14401.45926. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.14401.45926>

Morio, F., Berre, J. L., Garcia-Hermoso, D., Najafzadeh, M. J., De Hoog, S., Benard, L., & Michau, C. (2012). *Phaeohyphomycosis* due to *Exophiala xenobiotica* as a cause of fungal arthritis in an HIV-infected patient. *Medical Mycology*, 50(5), 513–517. <https://doi.org/10.3109/13693786.2011.648218>

Mpakosi, A., Cholevas, V., Meletiadiis, J., Theodoraki, M., & Sokou, R. (2024). Neonatal fungemia by Non-Candida Rare Opportunistic Yeasts: A Systematic Review of literature. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(17), 9266. <https://doi.org/10.3390/ijms25179266>

Muñoz, H., Meléndez, S., Puentes, G., Parada, S. y Cruz, O. (2016). Reproducción asexual. México: Universidad Autónoma de Chihuahua. <https://es.scribd.com/document/302963489/Reproduccion-Asexual>

Nagy, Z., Westerberg, H., & Klingberg, T. (2004). Maturation of white matter is associated with the development of cognitive functions during childhood. *Journal of cognitive neuroscience*, 16(7), 1227–1233. <https://doi.org/10.1162/0898929041920441>

Naranjo- Ortiz, M. A., & Gabaldón, T. (2019). Fungal evolution: diversity, taxonomy, and phylogeny of the Fungi. *Biological Reviews*, 94(6), 2101-2137.

Nardoni, S., & Mancianti, F. (2023). Mycotic diseases in Chelonians. *Journal of Fungi*, 9(5), 518. <https://doi.org/10.3390/jof9050518>

Nilsson, R., Ryberg, M., Abarenkov, K., Sjökvist, E., Kristiansson, E. (2009). The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing

technologies. FEMS Microbiology Letters. 2009;296:97–101. doi: 10.1111/j.1574-6968.01618.x.

Nishikawa, H., & Taniguchi, Y. (2019). Phaeohyphomycosis Due to *Exophiala oligosperma* in an Immunocompromised Host. *The Journal of Rheumatology*, 46(6), 652. <https://doi.org/10.3899/jrheum.180774>

Nitiu, D. S., Mallo, A. C., & Saparrat, M. C. N. (2022). Pigmentos sintetizados por hongos negros y su impacto en el deterioro del patrimonio documental en papel. *Boletín De La Sociedad Argentina De Botánica*, 57(2). <https://doi.org/10.31055/1851.2372.v57.n2.36580>

Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., ... & Wagner, H. (2022). *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.6-4. URL: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>

Padilla, L., & Stick, E. (2015). La weissenhofsiedlung y la kochenhofsiedlung como modelos de experimento y crítica del hábitat moderno. Obtenido de: <https://repositorio.cuc.edu.co/handle/11323/308>

Pinzón-Gutiérrez, Y. A., Bustamante, S. L., & Buitrago, G. (2009). Evaluación de métodos para la conservación de hongos fitopatógenos del ñame (*Dioscorea* sp). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), 8–18. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3105436.pdf>

Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of natural products*, 80(3), 756–770. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>

Ramos, R., & Meza, V. (2017). Efectos de algunos factores meteorológicos sobre la concentración de esporas de hongos en la plaza San Martín de Lima. *Ecología Aplicada*, 16(2), 143. <https://doi.org/10.21704/rea.v16i2.1018>

Ramos, S. M., Meléndez-Navarro, P., & Méndez-Rodríguez, E. (2021). Potencial biotecnológico de los hongos marinos en las zonas costeras de Costa Rica. *Revista Tecnología En Marcha*. <https://doi.org/10.18845/tm.v34i2.4430>

R Core Team. (2024). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>

Rhodes, D. J.; J. D. Smith. (1992). Techniques for Quantifying the Ecological and Pathological Characteristics of Entomopathogenic Fungal Strains. *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference Pests and Diseases*, 351-356.

Riera, F., Celi, A. P., Thompson, L., & Rabagliati, R. (2019). *Infecciones Fúngicas Sistémicas: Manual práctico* (3.^a ed.). Recursos fotográficos.

Rúa-Giraldo, Á. L. (2023). Taxonomía de los hongos: un rompecabezas al que le faltan muchas piezas. *Biomédica*, 43(1), 288-311. <https://doi.org/10.7705/biomedica.7052>

Sacheri-Viteri, K., Fernández-Cadena, J., Molina-Moreira, N., Andrade-Molina, D., (2022). Primer estudio de dos especies de *Aspergillus* aisladas de bosques de manglar en Ecuador. <https://lagranja.ups.edu.ec/index.php/granja/article/view/3650>

Sánchez-Cárdenas, C. D., Isa-Pimentel, M., & Arenas, R. (2023). Phaeohyphomycosis: A review. *Microbiology Research*, 14(4), 1751–1763. <https://doi.org/10.3390/microbiolres14040120>

Schwarz, M.C.R.; Moskaluk, A.E.; Daniels, J.B.; VandeWoude, S.; Reynolds, M.M. Current Analytical Methods and Challenges for the Clinical Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis Infection. *J. Fungi* 2024, 10, 829. <https://doi.org/10.3390/jof10120829>

Seiffert K. (2009). Progress toward DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources*. 2009;9(Suppl 1):83–89. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02635.x.

Sen, K., Sen, B., & Wang, G. (2022b). Diversity, Abundance, and Ecological Roles of Planktonic Fungi in Marine Environments. *Journal of Fungi*, 8(5), 491. <https://doi.org/10.3390/jof8050491>

Spatafora JW, Chang Y, Benny GL, Lazarus K, Smith ME, Berbee ML, Bonito G, Corradi N, Grigoriev I, Gryganskyi A, James TY, O'Donnell K, Roberson RW, Taylor TN, Uehling J, Vilgalys R, White MM, Stajich JE. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*. 2016 Sep;108(5):1028-1046. doi: 10.3852/16-042. PMID: 27738200; PMCID: PMC6078412.

Suárez-Contreras, L. Y., & Peñaranda Figueredo, F. A. (2022). Identificación molecular de hongos filamentosos y su potencial biotecnológico. *Biotecnología En el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 20(1), 194–206. <https://doi.org/10.18684/rbsaa.v20.n1.2022.1914>

Tekpinar, A. D., & Kalmer, A. (2019). Utility of various molecular markers in fungal identification and phylogeny. *Nova Hedwigia*, 109(1–2), 187–224. https://doi.org/10.1127/nova_hedwigia/2019/0528

Tomasini, A. (2007). Los hongos filamentosos, su importancia de estudio y de aplicación industrial. Departamento de Biotecnología, División de Ciencias Biológicas, 1, 6. [http://sistemas.fciencias.unam.mx/~germoplasma/files/s6/Tomasni Campocosio.pdf](http://sistemas.fciencias.unam.mx/~germoplasma/files/s6/Tomasni%20Campocosio.pdf)

Toscano, L., Vertiz, E., Cervantes, L., Amado, M., García, A., Beleño-Cabarcas, M., Castro-Toscano, M. (2015). Comparación de tres tecnologías en la preservación de conidias de hongos filamentosos y pruebas de viabilidad. *Ciencia y Tecnología*, 15, 2015, pp. 125-134 ISSN 1850-0870

Ugalde, de la C. (2013). Relaciones ecológicas de los macromicetos en diferentes tipos de vegetación presentes en la Estación científica Bosque escuela, Iturbide, N.L. (Tesis de maestría). México: Universidad Autónoma de Nuevo León. <http://eprints.uanl.mx/3733/1/1080256677.pdf>

Uribarren, B., Bazán, M. y Castañón, O. (2016). Generalidades de micología. México: UNAM. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/generalidades.html>

Valderrama Martín, J. M., Ortigosa, F., Cañas, R. A. (2020). Métodos de secuenciación de ácidos nucleicos: Primera generación. In ENCUENTROS EN LA BIOLOGÍA: Vol. XIII (Issue 173, pp. 19–20)

Valiente, C. (1993). Caracterización micológica de aguas crudas y filtradas en la Planta de Tratamiento de Tres Ríos, Costa Rica.

Van Nieuwenhuijzen, E. J., Houbraken, J. a. M. P., Meijer, M., Adan, O. C. G., & Samson, R. A. (2016). *Aureobasidium melanogenum*: a native of dark biofinishes on oil treated wood. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 109(5), 661–683. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0668-7>

Vivas-Aguas, L.J., L. Espinosa, J. Sánchez, B. Cadavid, P. Bautista, M. Quintero, J. Betancourt, J.P. Parra, L.G. Parra, I. Cuadrado, K. Ibarra. (2012). Diagnóstico y Evaluación de la Calidad Ambiental Marina en el Caribe y Pacífico colombiano. Red de vigilancia para la conservación y protección de las aguas marinas y costeras de Colombia –REDCAM. Informe técnico 2012. INVEMAR. Santa Marta, 310 p.

Voidaleski, M. F., Gomes, R. R., Azevedo, C. d. M. P. e. S. d., Lima, B. J. F. d. S., Costa, F. d. F., Bombassaro, A., Fornari, G., Cristina Lopes da Silva, I., Andrade, L. V., Lustosa, B. P. R., Najafzadeh, M. J., de Hoog, G. S., & Vicente, V. A. (2020). Environmental Screening of *Fonsecaea* Agents of Chromoblastomycosis Using Rolling Circle Amplification. *Journal of Fungi*, 6(4), 290. <https://doi.org/10.3390/jof6040290>

Watanabe, T. (2002) Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi—Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species. 2nd. Edition, CRC Press, 486. <https://doi.org/10.1201/9781420040821.bmatt3>

Webster, J. and Weber, R. (2007). Introduction to Fungi. Editor Cambridge University Press, 2007, ISBN1139461508, 9781139461504.

Wengenack, N. L., & Binnicker, M. J. (2009). Fungal molecular diagnostics. *Clinics in chest medicine*, 30(2), 391–viii. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2009.02.014>

Xavier, M. O., Poester, V. R., Trápaga, M. R., & Stevens, D. A. (2023). *Sporothrix brasiliensis*: Epidemiology, Therapy, and Recent Developments. *Journal of Fungi*, 9(9), 921. <https://doi.org/10.3390/jof9090921>

Yuil, J. R. (2011). La aeromicología y su importancia para la medicina. <https://www.revistamedicocientifica.org/index.php/rmc/article/view/285>

Zamora Martínez, S. P., & Delgado Muñoz, K. Y. (2019). Evaluación de la calidad sanitaria del agua de las playas turísticas del Caribe Norte Colombiano (Doctoral dissertation, Universidad de la Costa). URI: <https://repositorio.cuc.edu.co/handle/11323/5299>

Zubeldia, J. M., Baeza, M. I., Chivato, T., Jáuregui, I., Senent, C. J. (2021). El libro de las enfermedades alérgicas. Fundacion BBVA,

Zymo Research (s. f.). Quick-DNA Fungal Bacterial Isolation Kits. Recuperado 7 de julio de 2024, de <https://zymoresearch.eu/collections/quick-dna-fungal-bacterial-kits>

ANEXO

Tabla 9. Determinación de concentración y pureza del ADN mediante espectrofotometría NanoDrop.

Cuantificación			
Cepa	Conc. Ácido Nucleico	OD260/280	OD260/230
26Ag	35.00 ng/uL	2.15	1.67
115Ag	26.65 ng/uL	2.26	1.29
4Ag	89.60 ng/uL	2.06	2.20
1Ag	18.19 ng/uL	2.29	1.64
170Ag	39.88 ng/uL	2.23	1.99
163Ag	28.47 ng/uL	2.18	1.32
84Ag_a	28.79 ng/uL	2.21	1.01
99Ag	103.07 ng/uL	1.98	1.40
23Ag	132.82 ng/uL	2.00	1.94

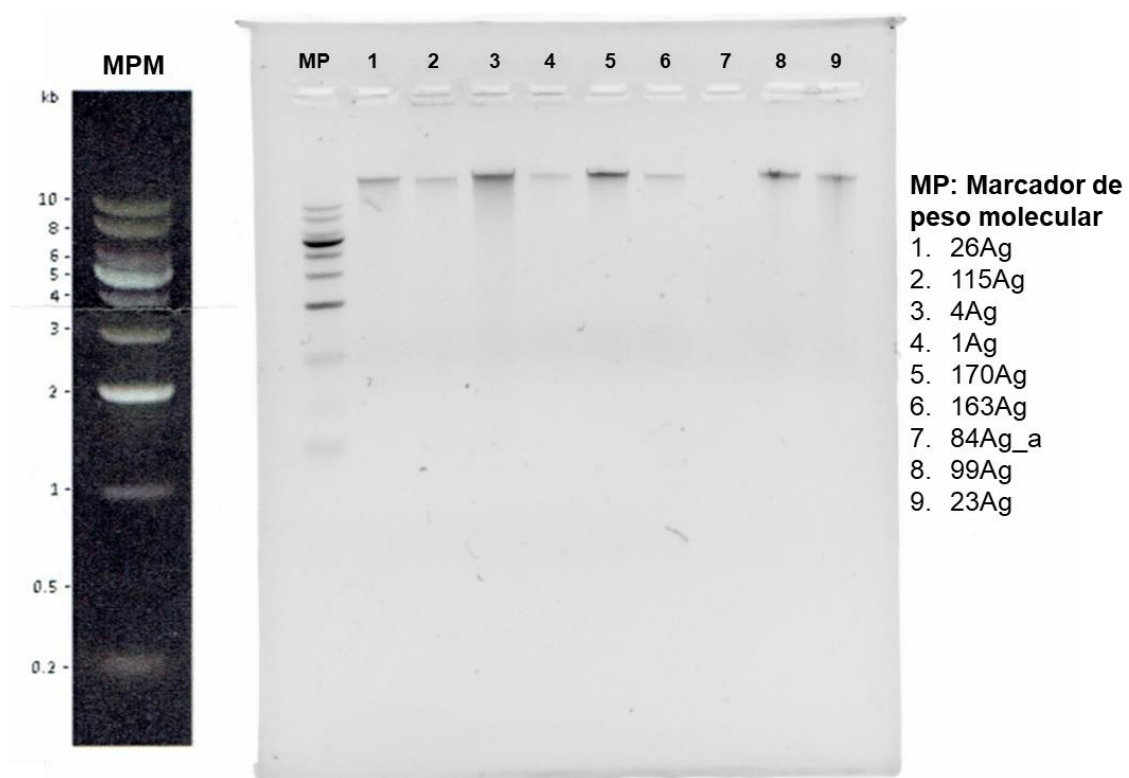


Figura 37. Análisis de electroforesis en gel agarosa 0.7% de ADNg. Se observa los ADNg de cuatro hongos filamentosos. MP: marcador de peso molecular 1 kbp; pocillos con números identificados 1-9: muestras con ADN de cepas fúngicas.

Tabla 10. Determinación de concentración y pureza del ADN mediante espectrofotometría NanoDrop.

Cuantificación			
Cepa	Conc. Ácido Nucleico	OD260/280	OD260/230
B36Ag	198.59 ng/uL	1.96	1.97

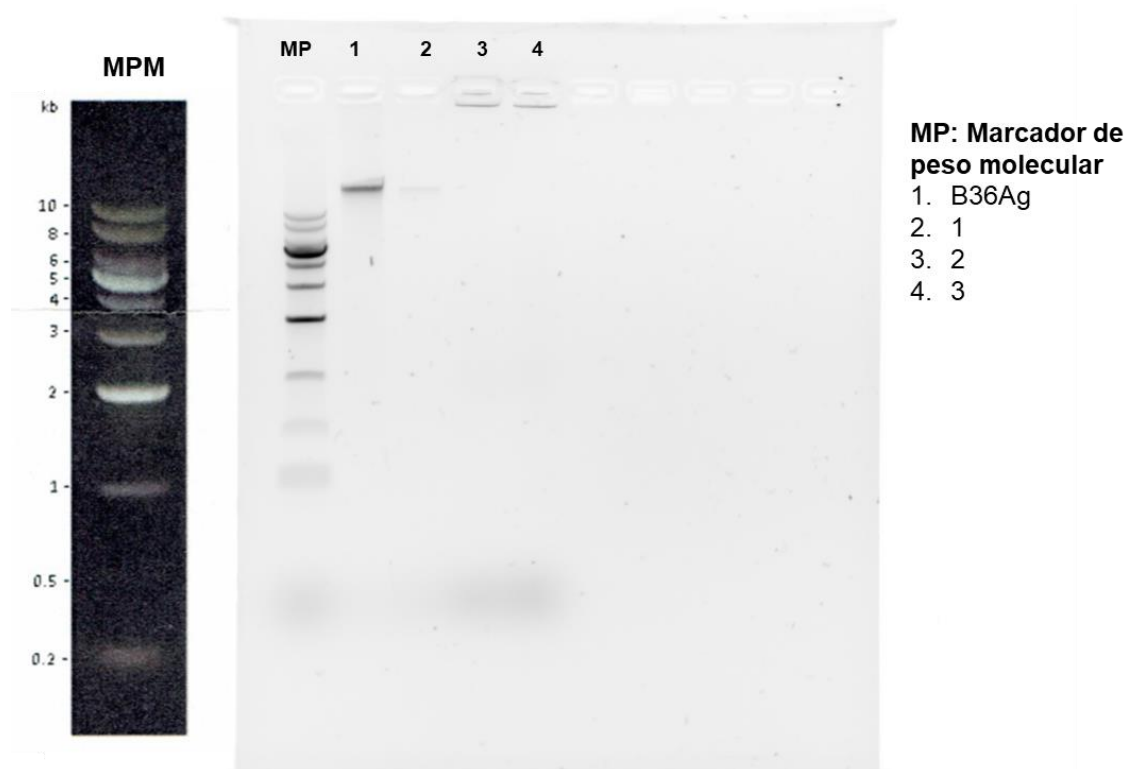


Figura 38. Análisis de electroforesis en gel agarosa 0.7% en el que se observa los ADNg de cuatro hongos filamentosos. MP: marcador de peso molecular 1 kbp; pocillos con números identificados 1-4: muestras con ADN de cepas fúngicas.

Tabla 11. Determinación de concentración y pureza del ADN mediante espectrofotometría NanoDrop.

Cuantificación			
Cepa	Conc. Ácido Nucleico	OD260/280	OD260/230
22Ag	34.45 ng/uL	2.24	1.91
49Ag_b	482.22 ng/uL	2.01	2.37
82Ag	595.34 ng/uL	2.00	2.40
112Ag	796.16 ng/uL	2.00	2.39

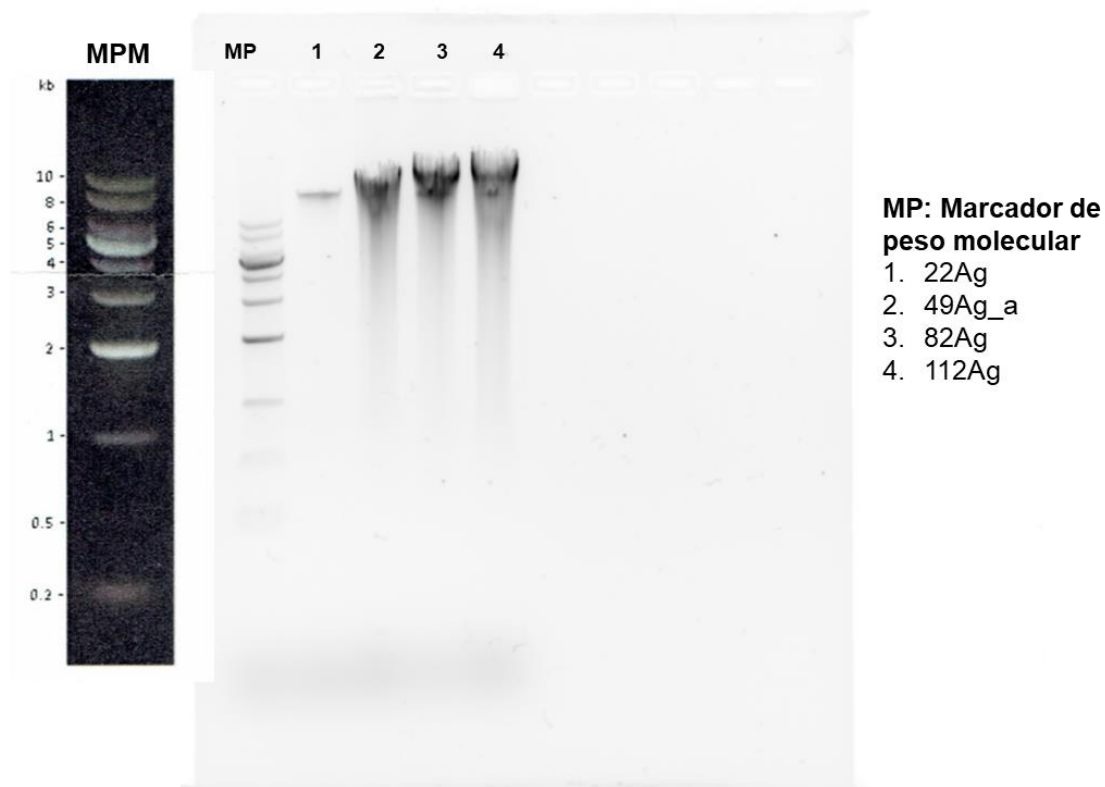


Figura 39. Análisis de electroforesis en gel agarosa 0.7% de ADNg. se observa los ADNg de cuatro hongos filamentosos. MP: marcador de peso molecular 1 kbp; pocillos con números identificados 1-4: muestras con ADN de cepas fúngicas.

Tabla 12. Determinación de concentración y pureza del ADN mediante espectrofotometría NanoDrop.

Cuantificación			
Cepa	Conc. Ácido Nucleico	OD260/280	OD260/230
6Ag	51.67 ng/uL	1.96	2.13
111Ag	899.97 ng/uL	1.99	2.35
84Ag_a	134.90 ng/uL	2.00	2.30
205Ag	650.97 ng/uL	1.99	2.35
25Ag	483.45 ng/uL	1.97	2.38
109Ag	580.75 ng/uL	1.96	2.41

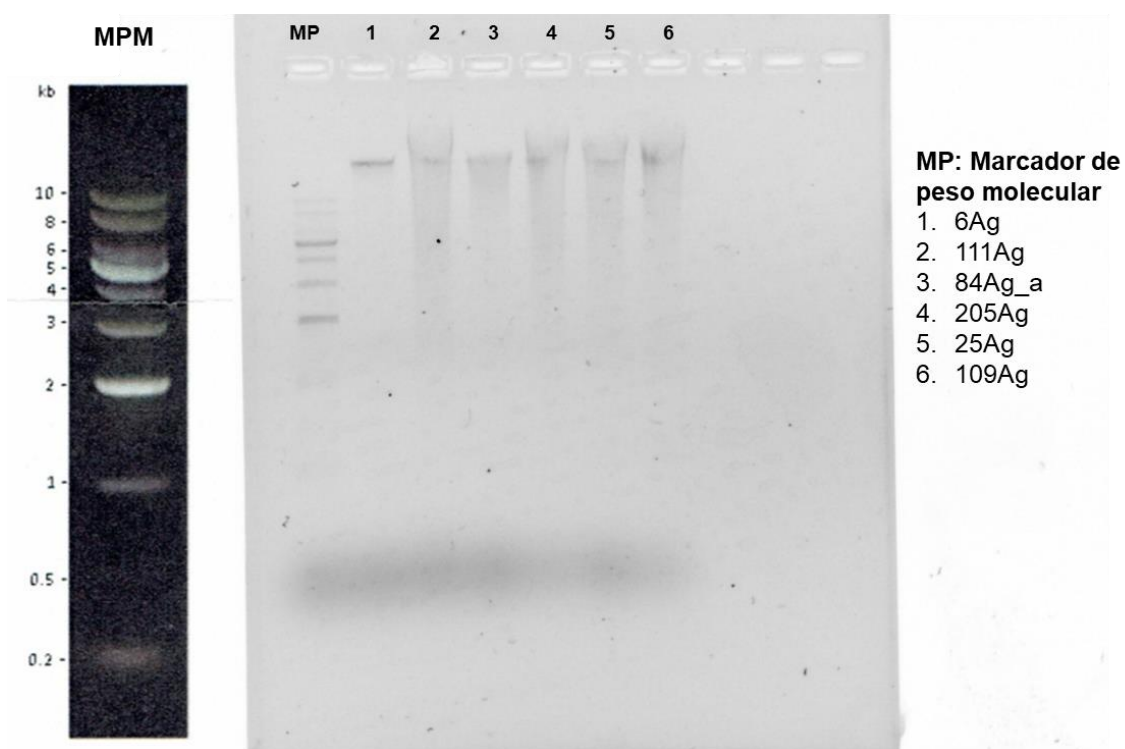


Figura 40. Análisis de electroforesis en gel agarosa 0.7% de ADNg. Se observa los ADNg de cuatro hongos filamentosos. MP: marcador de peso molecular 1 kbp; pocillos con números identificados 1-6: muestras con ADN de cepas fúngicas.

Tabla 13. Determinación de concentración y pureza del ADN mediante espectrofotometría NanoDrop.

Cuantificación			
Cepa	Conc. Ácido Nucleico	OD260/280	OD260/230
31Ag	139.44 ng/uL	1.99	2.38
1Ag	155.23 ng/uL	1.99	2.40
58Ag	73.66 ng/uL	1.97	2.28
18Ag	380.30 ng/uL	1.97	2.39

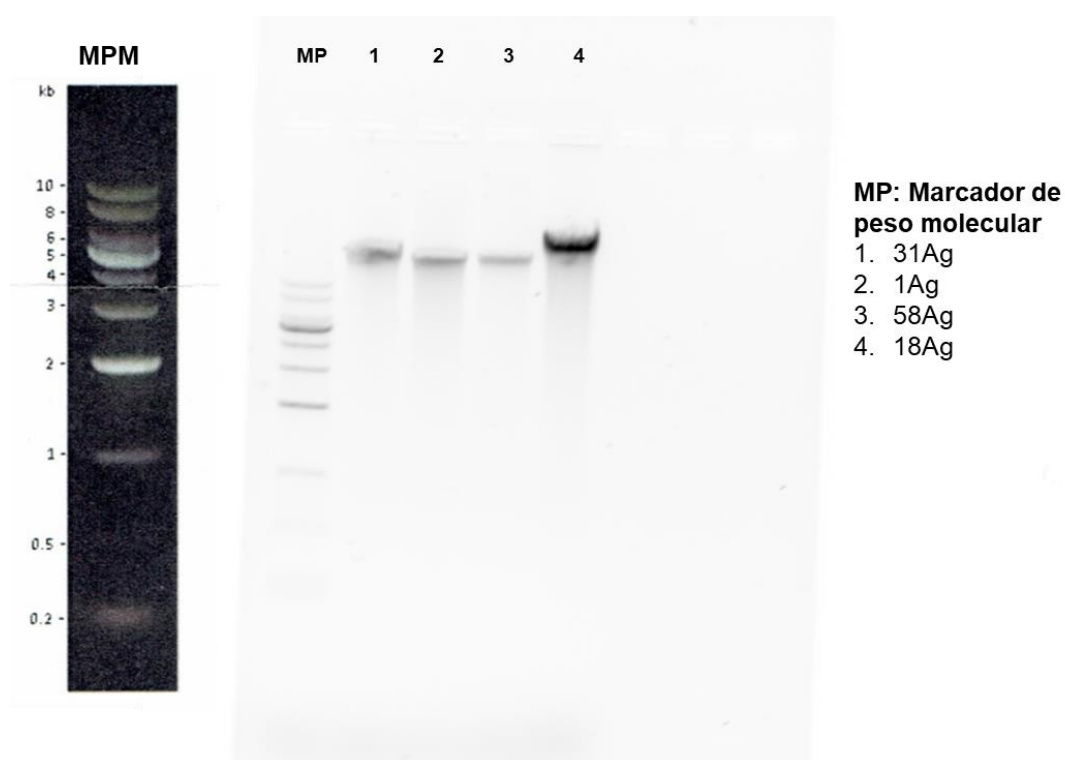


Figura 41. Análisis de electroforesis en gel agarosa 0.7% de ADNg. Se observa los ADNg de cuatro hongos filamentosos. MP: marcador de peso molecular 1 kbp; pocillos con números identificados 1-4: muestras con ADN de cepas fúngicas.

Tabla 14. Determinación de concentración y pureza del ADN mediante espectrofotometría NanoDrop.

Cuantificación			
Cepa	Conc. Ácido Nucleico	OD260/280	OD260/230
048AgM3	179.41 ng/uL	1.95	2.19
165Ag	34.63 ng/uL	1.69	1.31
49Ag_a	104.23 ng/uL	1.95	1.97
233Ag_a	22.87 ng/uL	1.79	1.56
48Ag	68.70 ng/ul	1.81	2.35

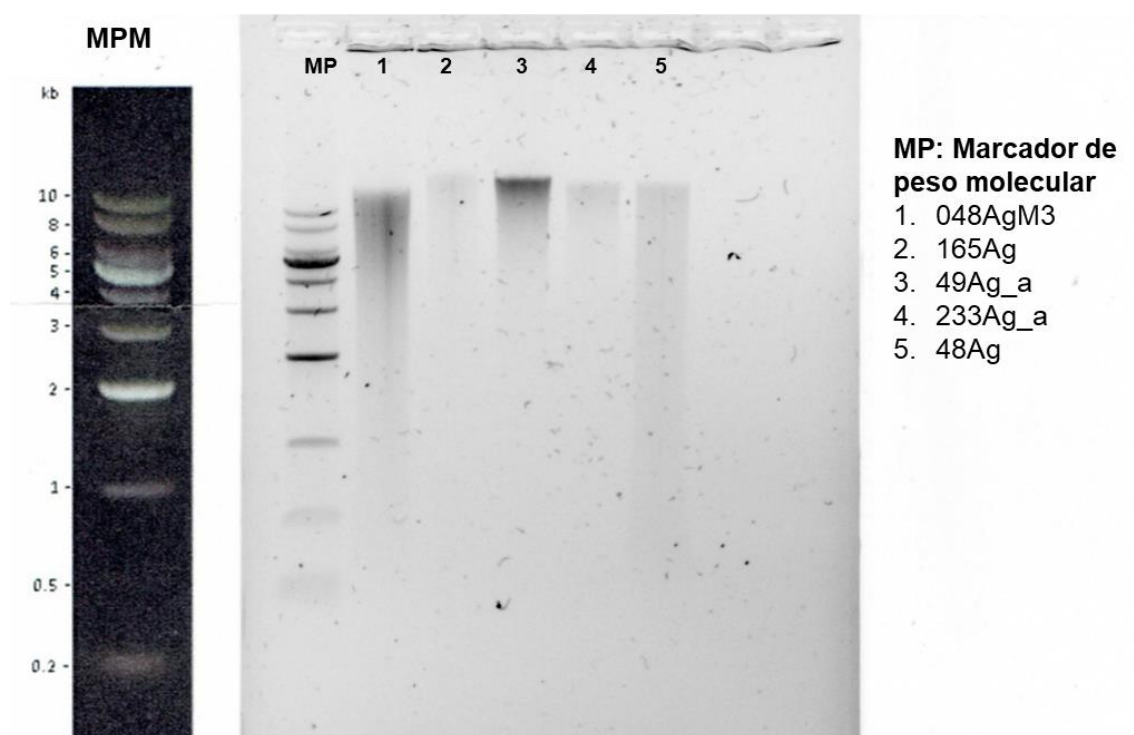


Figura 42. Análisis de electroforesis en gel agarosa 0.7% de ADNg. Se observa los ADNg de cuatro hongos filamentosos. MP: marcador de peso molecular 1 kbp; pocillos con números identificados 1-5: muestras con ADN de cepas fúngicas.

Amplificación de las regiones ITS del ADN

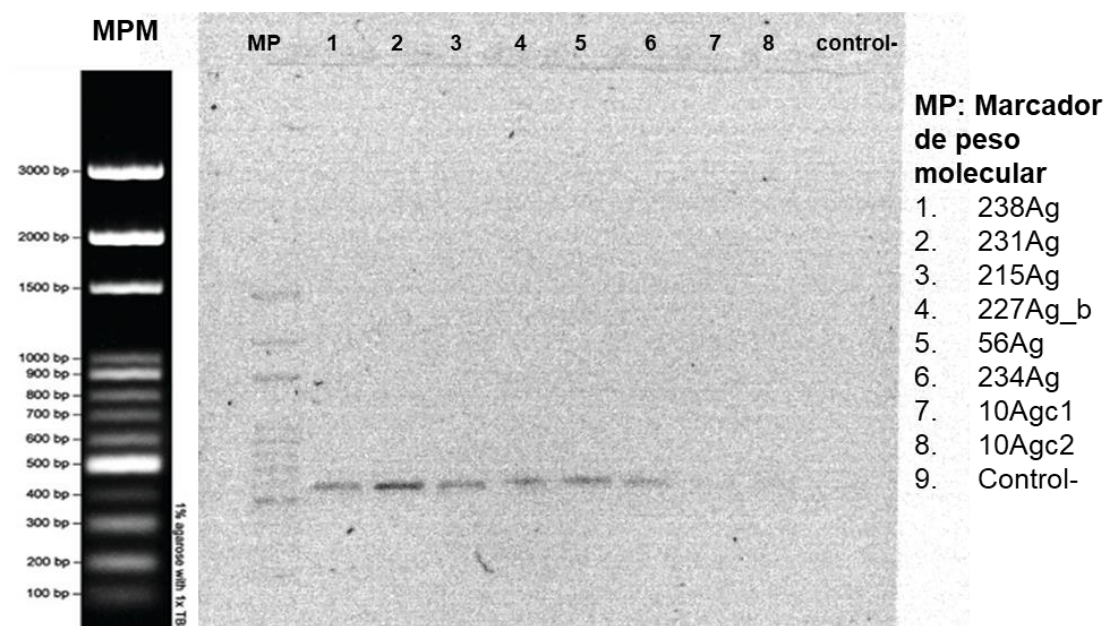


Figura 43. Análisis de electroforesis en gel agarosa 1%. Se observa los productos de PCR, utilizando los primers ITS5 e ITS4. MP: marcador de peso molecular 100bp; pocillos con números identificados 1-9: muestras con ADN de cepas fúngicas; pocillo 10 con nombre identificado control: muestra sin ADN de cepa fúngica, se le agregó agua miliQ estéril como muestra negativa.

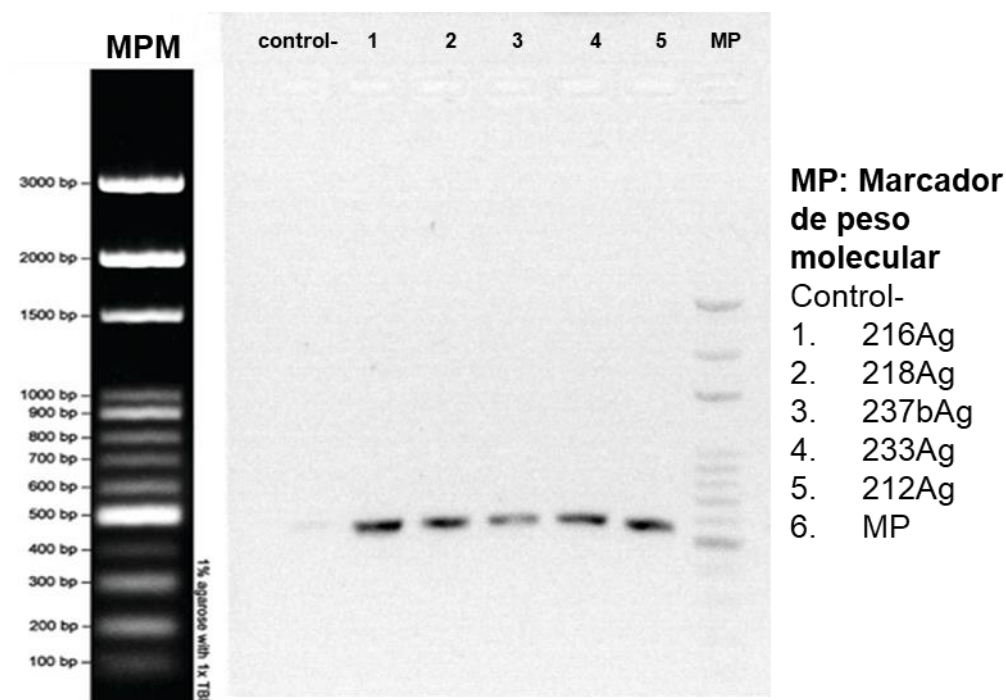


Figura 44. Análisis de electroforesis en gel agarosa 1% en el que se observa los productos de PCR, utilizando los primers ITS5 e ITS4. MP: marcador de peso molecular 100bp; pocillos con números identificados 1-5: muestras con ADN de cepas fúngicas; pocillo con nombre identificado control: muestra sin ADN de cepa fúngica, se le agregó agua miliQ estéril como muestra negativa.

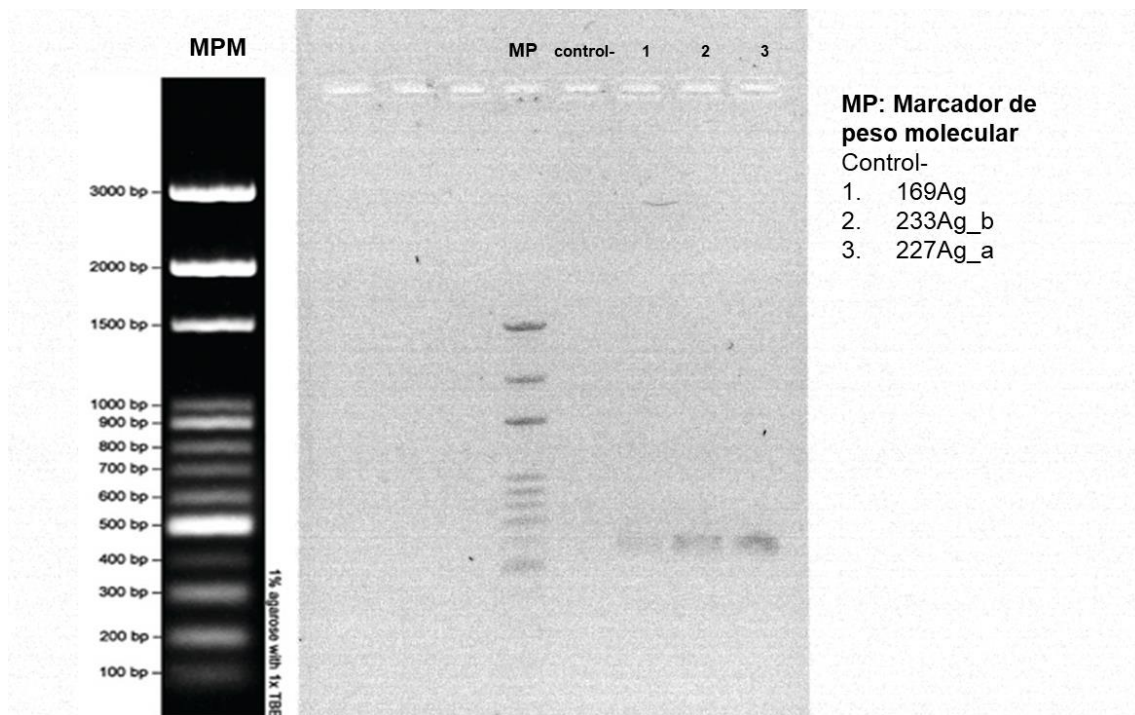


Figura 45. Análisis de electroforesis en gel agarosa 1% en el que se observa los productos de PCR, utilizando los primers ITS5 e ITS4. MP: marcador de peso molecular 100bp; pocillos con números identificados 1-3: muestras con ADN de cepas fúngicas; pocillo con nombre identificado control: muestra sin ADN de cepa fúngica, se le agregó agua miliQ estéril como muestra negativa.



Figura 46. Análisis de electroforesis en gel agarosa 1% en el que se observa los productos de PCR, utilizando los primers ITS5 e ITS4. MP: marcador de peso molecular 100bp; pocillos con números identificados 1-4: muestras con ADN de cepas fúngicas; pocillo con nombre identificado control: muestra sin ADN de cepa fúngica, se le agregó agua miliQ estéril como muestra negativa.

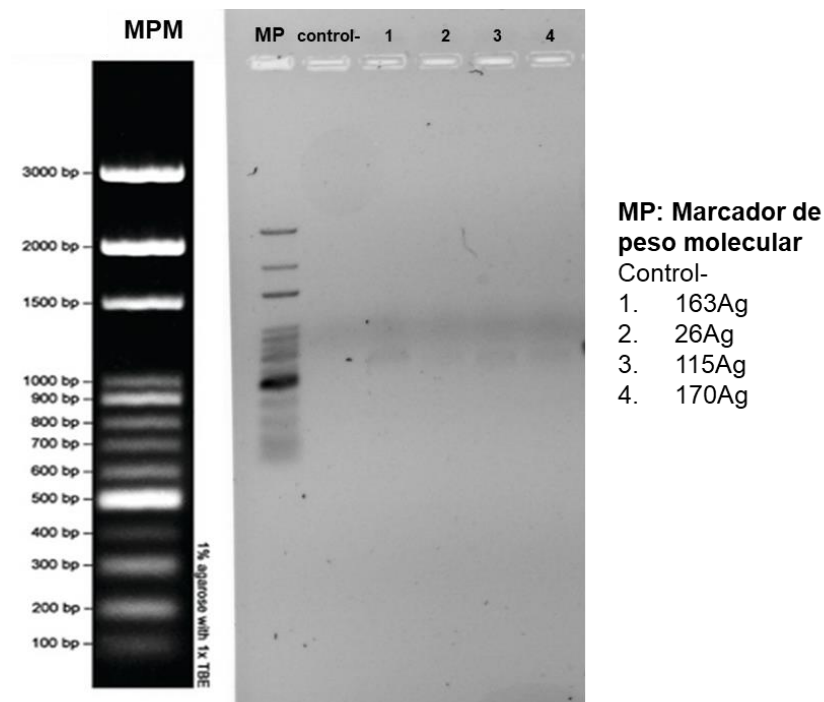


Figura 47. Análisis de electroforesis en gel agarosa 1% en el que se observa los productos de PCR, utilizando los primers ITS5 e ITS4. MP: marcador de peso molecular 100bp; pocillos con números identificados 1-4: muestras con ADN de cepas fúngicas; pocillo con nombre identificado control: muestra sin ADN de cepa fúngica, se le agregó agua miliQ estéril como muestra negativa.

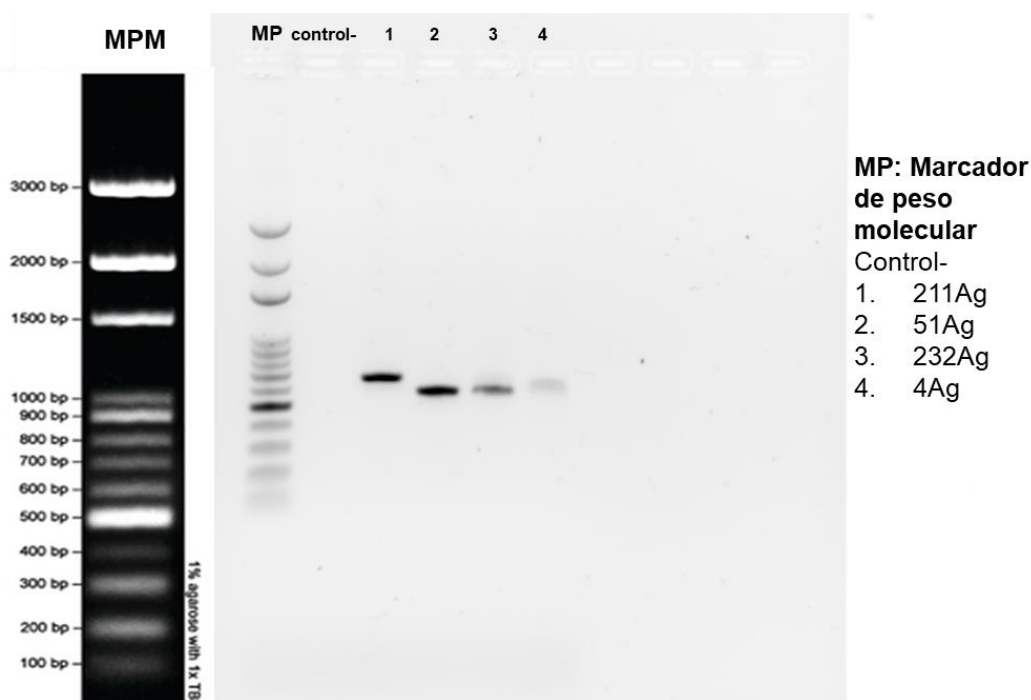


Figura 48. Análisis de electroforesis en gel agarosa 1% en el que se observa los productos de PCR, utilizando los primers ITS5 e ITS4. MP: marcador de peso molecular 100bp; pocillos con números identificados 1-4: muestras con ADN de cepas fúngicas; pocillo con nombre identificado control: muestra sin ADN de cepa fúngica, se le agregó agua miliQ estéril como muestra negativa.

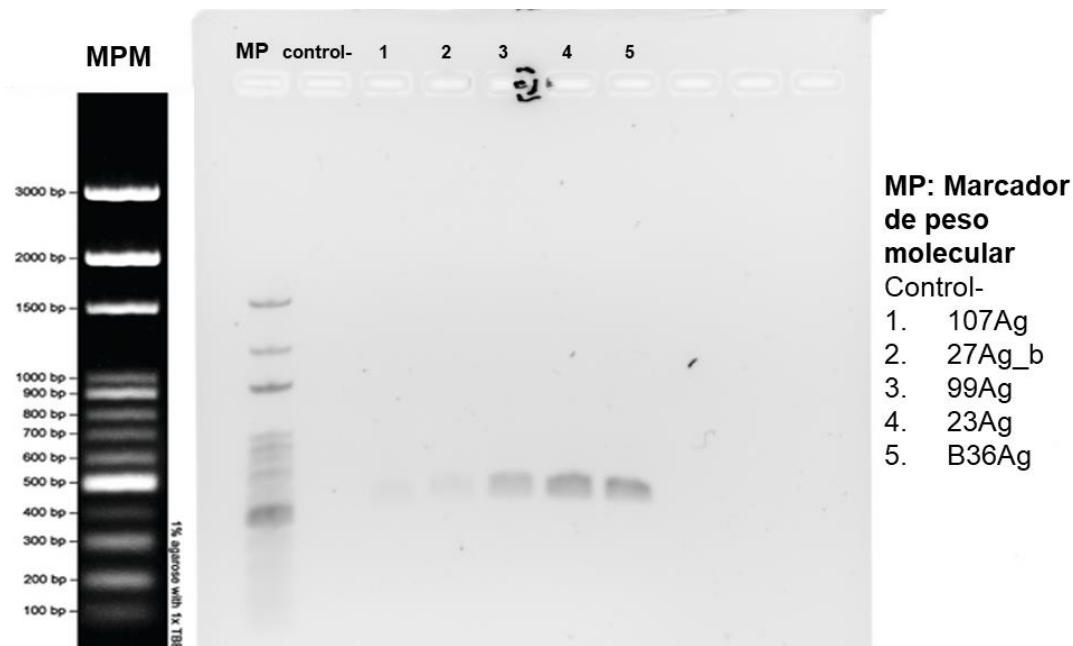


Figura 49. Análisis de electroforesis en gel agarosa 1% en el que se observa los productos de PCR, utilizando los primers ITS5 e ITS4. MP: marcador de peso molecular 100bp; pocillos con números identificados 1-5: muestras con ADN de cepas fúngicas; pocillo con nombre identificado control: muestra sin ADN de cepa fúngica, se le agregó agua miliQ estéril como muestra negativa.

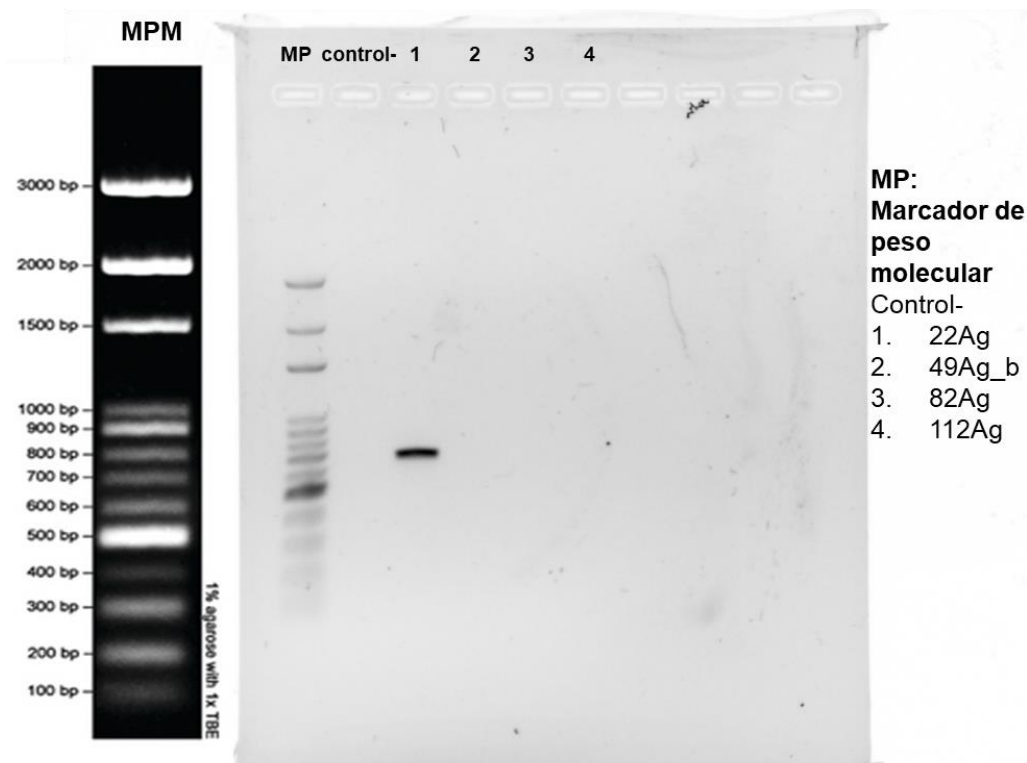


Figura 50. Análisis de electroforesis en gel agarosa 1% en el que se observa los productos de PCR, utilizando los primers ITS5 e ITS4. MP: marcador de peso molecular 100bp; pocillos con números identificados 1-4: muestras con ADN de cepas fúngicas; pocillo con nombre identificado control: muestra sin ADN de cepa fúngica, se le agregó agua miliQ estéril como muestra negativa.

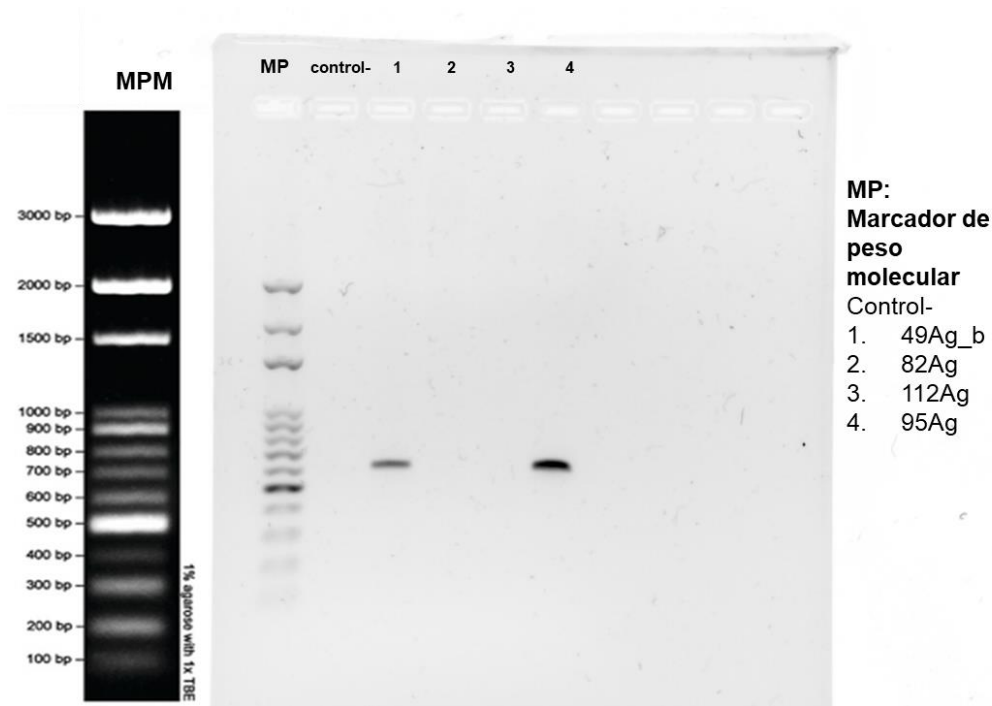


Figura 51. Análisis de electroforesis en gel agarosa 1% en el que se observa los productos de PCR, utilizando los primers ITS5 e ITS4. MP: marcador de peso molecular 100bp; pocillos con números identificados 1-4: muestras con ADN de cepas fúngicas; pocillo con nombre identificado control: muestra sin ADN de cepa fúngica, se le agregó agua miliQ estéril como muestra negativa.

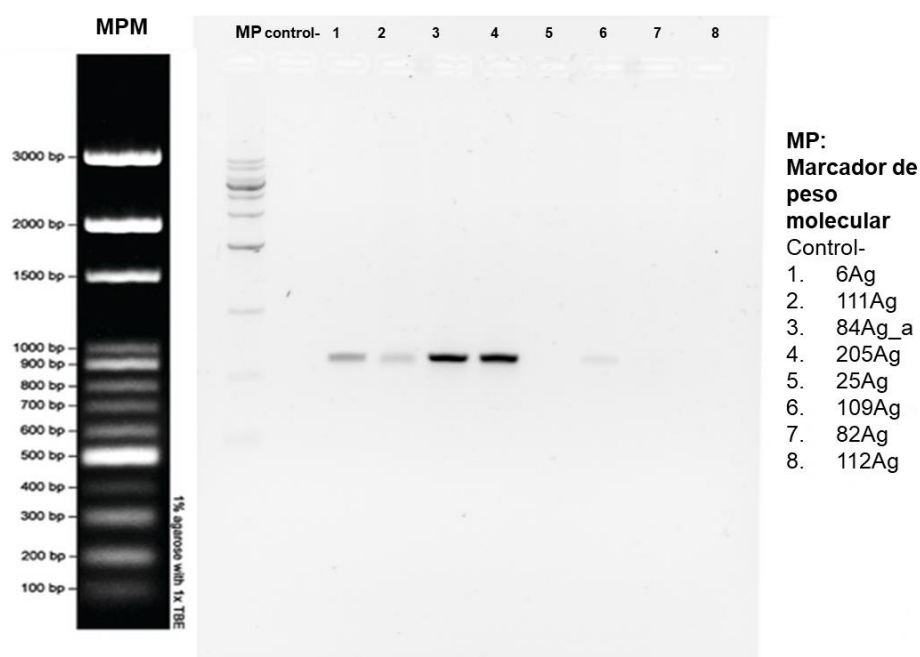


Figura 52. Análisis de electroforesis en gel agarosa 1% en el que se observa los productos de PCR, utilizando los primers ITS5 e ITS4. MP: marcador de peso molecular 100bp; pocillos con números identificados 1-8: muestras con ADN de cepas fúngicas; pocillo con nombre identificado control: muestra sin ADN de cepa fúngica, se le agregó agua miliQ estéril como muestra negativa.

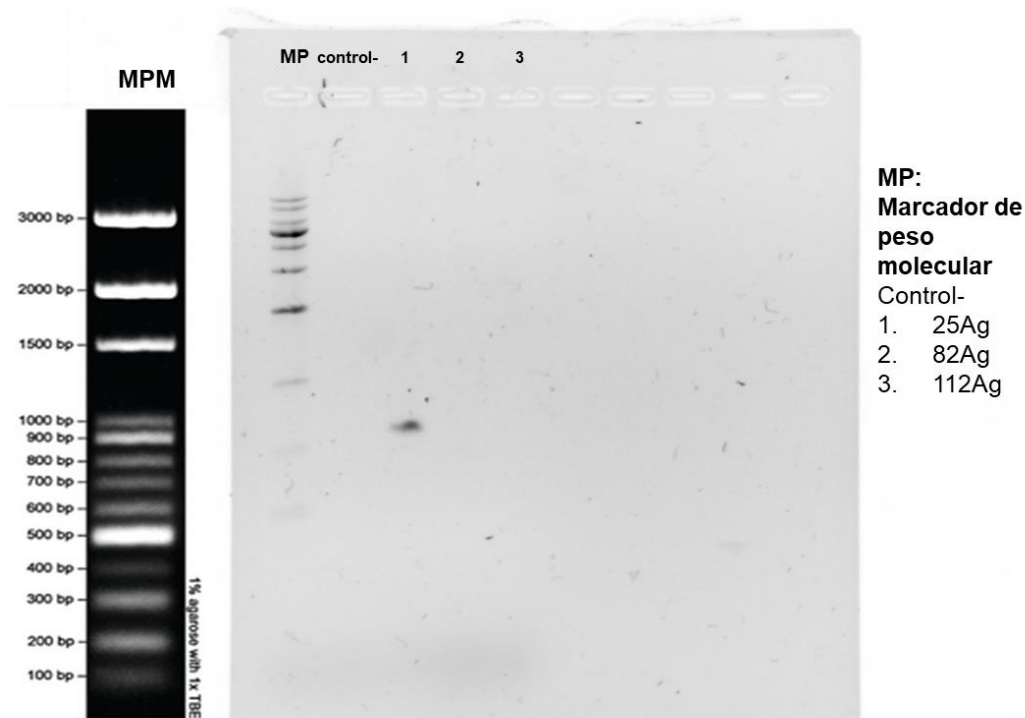


Figura 53. Análisis de electroforesis en gel agarosa 1% en el que se observa los productos de PCR, utilizando los primers ITS5 e ITS4. MP: marcador de peso molecular 100bp; pocillos con números identificados 1-3: muestras con ADN de cepas fúngicas; pocillo con nombre identificado control: muestra sin ADN de cepa fúngica, se le agregó agua miliQ estéril como muestra negativa.

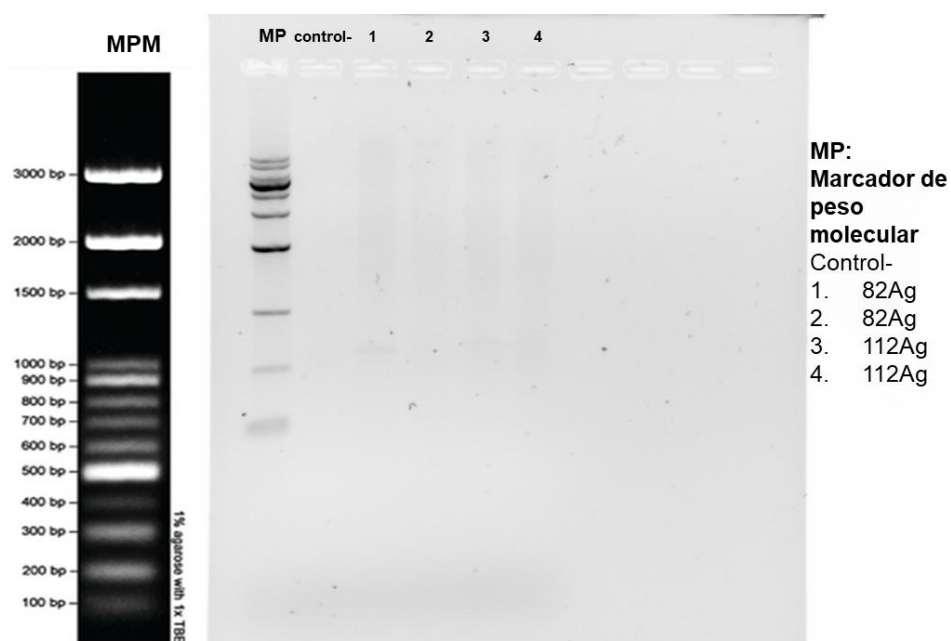


Figura 54. Análisis de electroforesis en gel agarosa 1% en el que se observa los productos de PCR, utilizando los primers ITS5 e ITS4. MP: marcador de peso molecular 100bp; pocillos con números identificados 1-4: muestras con ADN de cepas fúngicas; pocillo con nombre identificado control: muestra sin ADN de cepa fúngica, se le agregó agua miliQ estéril como muestra negativa.

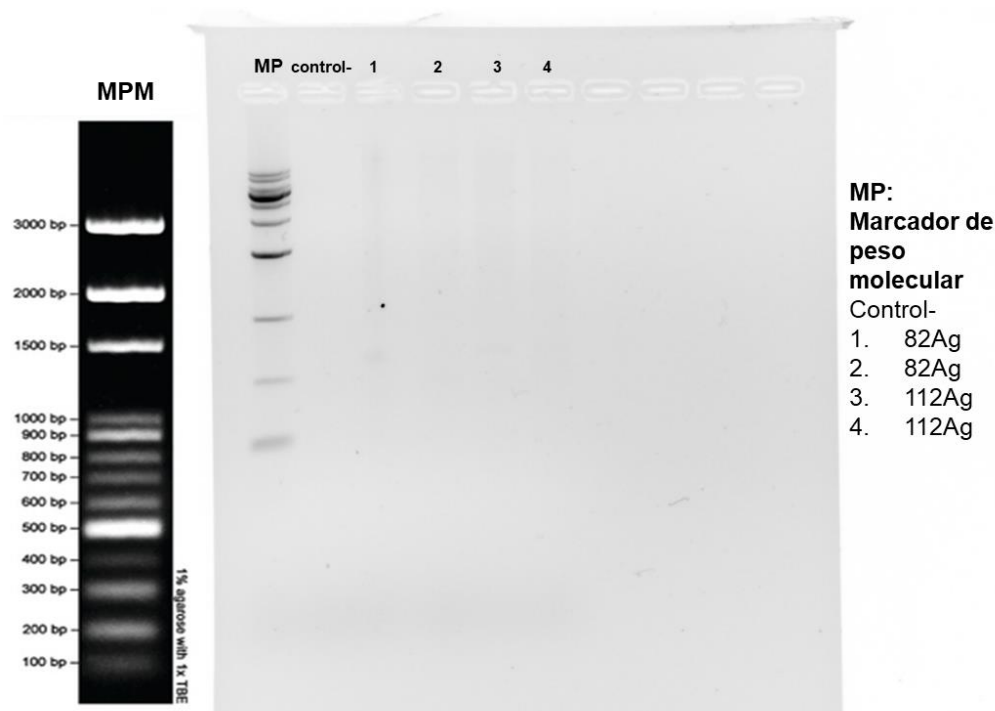


Figura 55. Análisis de electroforesis en gel agarosa 1% en el que se observa los productos de PCR, utilizando los primers ITS5 e ITS4. MP: marcador de peso molecular 100bp; pocillos con números identificados 1-4: muestras con ADN de cepas fúngicas; pocillo con nombre identificado control: muestra sin ADN de cepa fúngica, se le agregó agua miliQ estéril como muestra negativa.

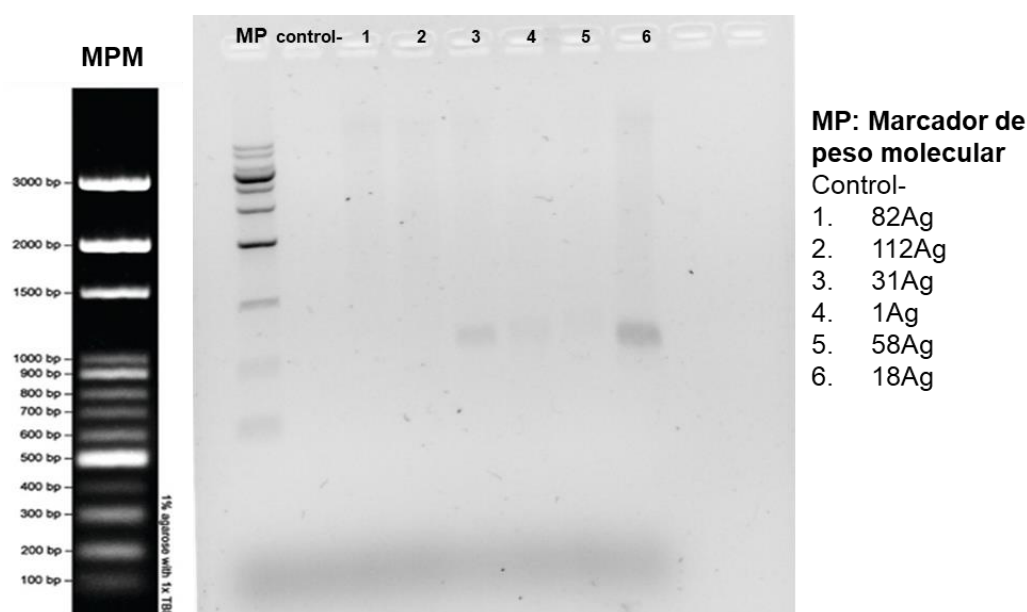


Figura 56. Análisis de electroforesis en gel agarosa 1% en el que se observa los productos de PCR, utilizando los primers ITS5 e ITS4. MP: marcador de peso molecular 100bp; pocillos con números identificados 1-6: muestras con ADN de cepas fúngicas; pocillo con nombre identificado control: muestra sin ADN de cepa fúngica, se le agregó agua miliQ estéril como muestra negativa.

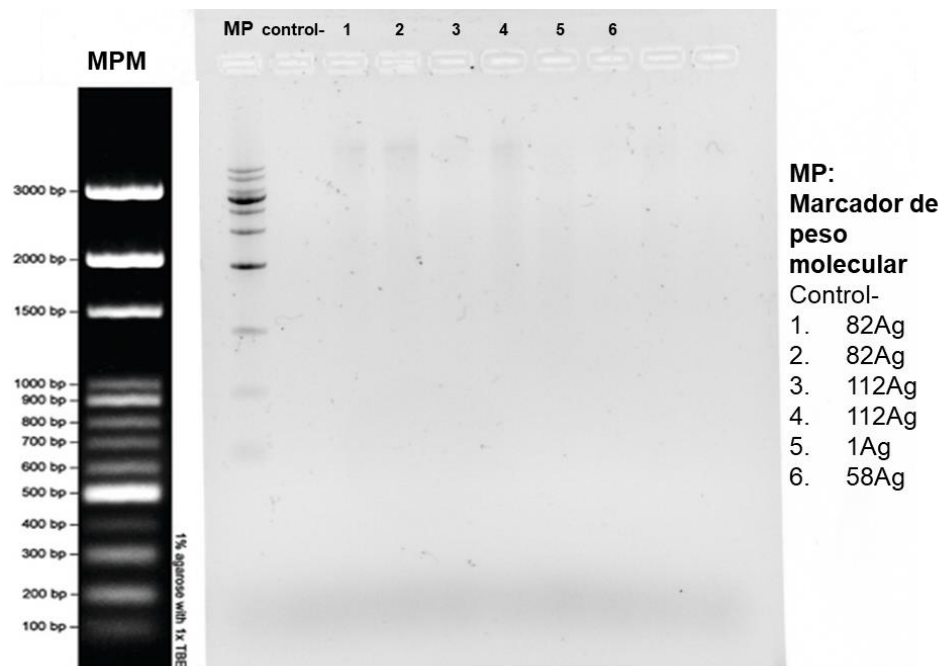


Figura 57. Análisis de electroforesis en gel agarosa 1% en el que se observa los productos de PCR, utilizando los primers ITS5 e ITS4. MP: marcador de peso molecular 100bp; pocillos con números identificados 1-6: muestras con ADN de cepas fúngicas; pocillo con nombre identificado control: muestra sin ADN de cepa fúngica, se le agregó agua miliQ estéril como muestra negativa.

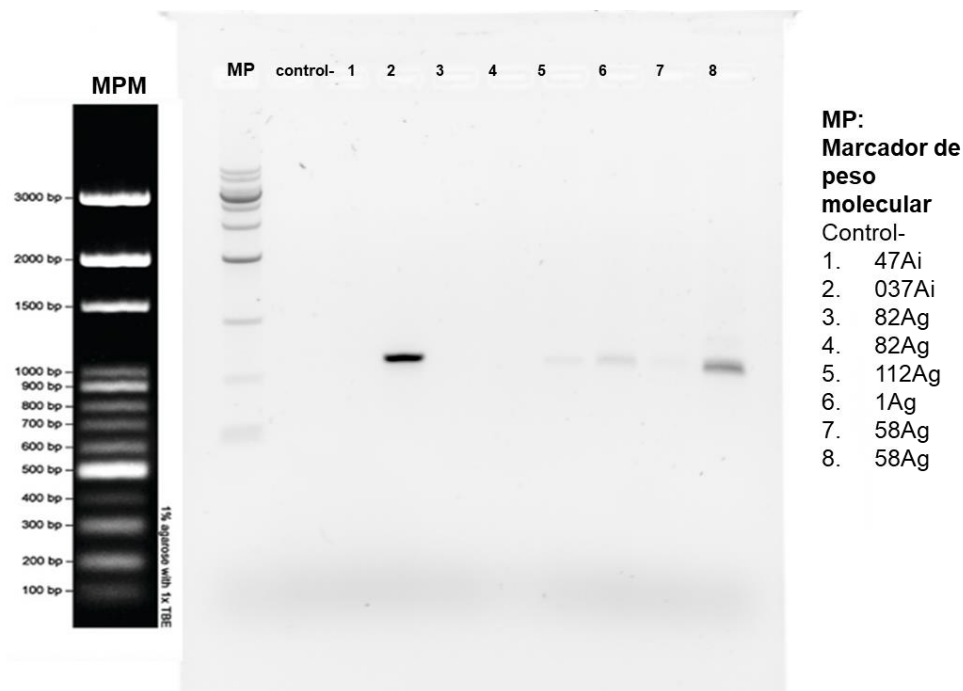


Figura 58. Análisis de electroforesis en gel agarosa 1% en el que se observa los productos de PCR, utilizando los primers ITS5 e ITS4. MP: marcador de peso molecular 100bp; pocillos con números identificados 1-8: muestras con ADN de cepas fúngicas; pocillo con nombre identificado control: muestra sin ADN de cepa fúngica, se le agregó agua miliQ estéril como muestra negativa.

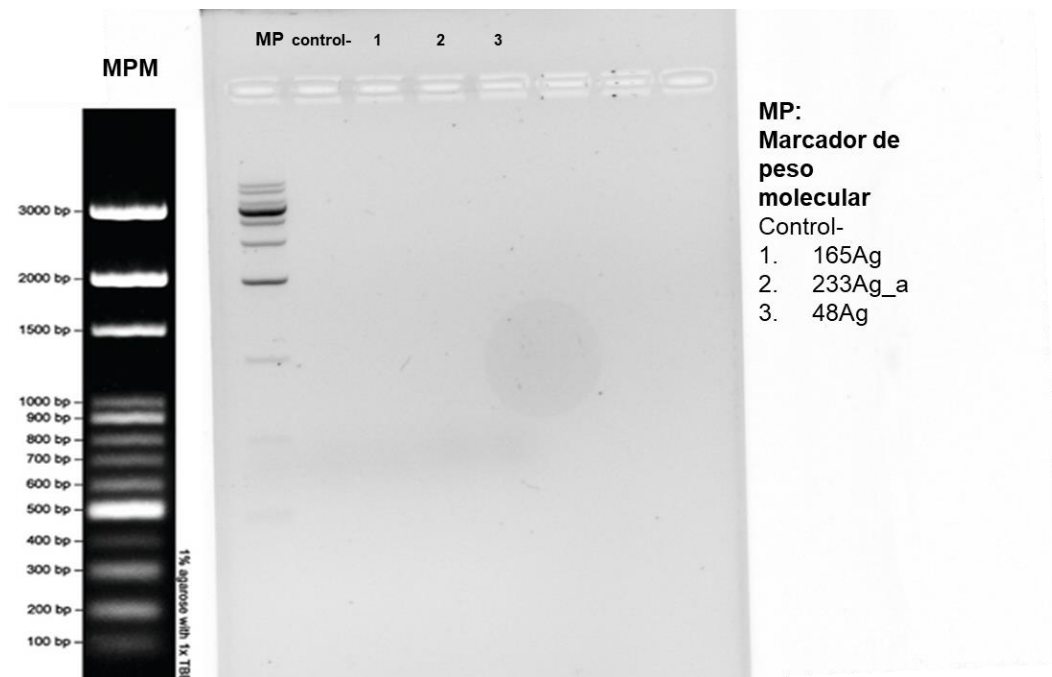


Figura 59. Análisis de electroforesis en gel agarosa 1% en el que se observa los productos de PCR, utilizando los primers ITS5 e ITS4. MP: marcador de peso molecular 100bp; pocillos con números identificados 1-3: muestras con ADN de cepas fúngicas; pocillo con nombre identificado control: muestra sin ADN de cepa fúngica, se le agregó agua miliQ estéril como muestra negativa.

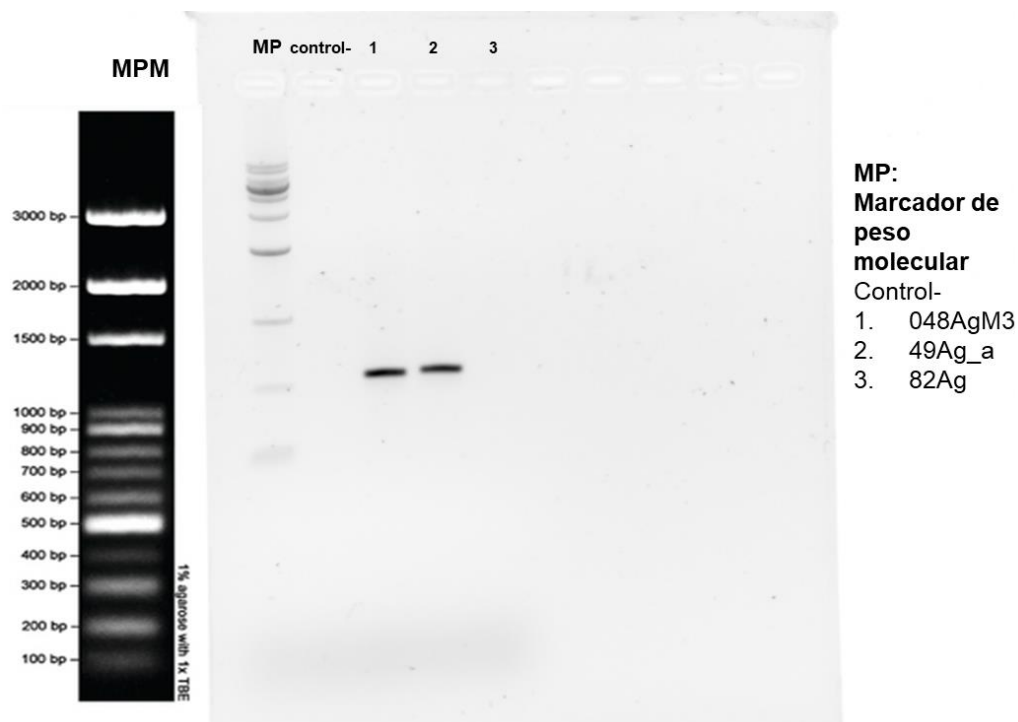


Figura 60. Análisis de electroforesis en gel agarosa 1% en el que se observa los productos de PCR, utilizando los primers ITS5 e ITS4. MP: marcador de peso molecular 100bp; pocillos con números identificados 1-3: muestras con ADN de cepas fúngicas; pocillo con nombre identificado control: muestra sin ADN de cepa fúngica, se le agregó agua miliQ estéril como muestra negativa.

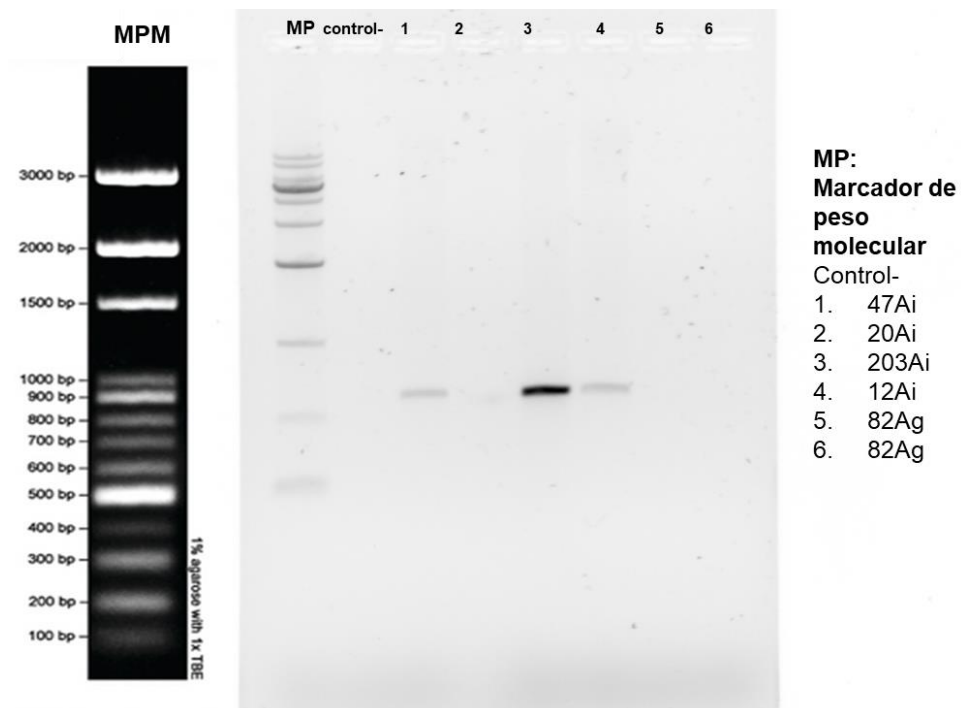


Figura 61. Análisis de electroforesis en gel agarosa 1% en el que se observa los productos de PCR, utilizando los primer ITS5 e ITS4. MP: marcador de peso molecular 100bp; pocillos con números identificados 1-6: muestras con ADN de cepas fúngicas; pocillo con nombre identificado control: muestra sin ADN de cepa fúngica, se le agregó agua miliQ estéril como muestra negativa.

Tabla 15. Registro de cepas hongos filamentosos estudiados.

#	Código de cepa	División taxonómica	Identificación morfológica	Identificación molecular	Sitio de Muestreo
1	10Ag_b	Ascomycota	*cf. <i>Penicillium</i> sp.	<i>Talaromyces annesophieae</i>	Antigua Autoridad de la Región Interoceánica
2	23Ag		*cf. <i>Penicillium</i> sp.	<i>Talaromyces annesophieae</i>	Costa del Este
3	99Ag		*cf. <i>Penicillium</i> sp.	<i>Talaromyces annesophieae</i>	Antigua Autoridad de la Región Interoceánica
4	6Ag		*cf. <i>Penicillium</i> sp.	<i>Talaromyces annesophieae</i>	Isla Flamenco
5	26Ag		*cf. <i>Penicillium</i> sp.	<i>Talaromyces annesophieae</i>	Panamá La Vieja
6	31Ag		*cf. <i>Penicillium</i> sp.	<i>Talaromyces annesophieae</i>	Panamá La Vieja
7	B36Ag		*cf. <i>Penicillium</i> sp.	<i>Talaromyces annesophieae</i>	Panamá La Vieja
8	A80Ag		*cf. <i>Penicillium</i> sp.	<i>Talaromyces annesophieae</i>	Boca La Caja
9	95Ag		*cf. <i>Penicillium</i> sp.	<i>Talaromyces annesophieae</i>	Avenida de los Poetas
10	10Ag_c1		<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium menonorum</i>	Antigua Autoridad de la Región Interoceánica
11	10Ag_c2		<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium menonorum</i>	Antigua Autoridad de la Región Interoceánica
12	1Ag		<i>Penicillium</i> sp.	<i>Talaromyces atroseus</i>	Panamá La Vieja
13	4Ag		<i>Penicillium</i> sp.	<i>Talaromyces</i> sp.	Las Bóvedas
14	18Ag		<i>Penicillium</i> sp.	<i>Talaromyces</i> sp.	Costa del Este
15	25Ag		<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	Panamá La Vieja
16	84Ag_a		<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	Club Unión
17	84Ag_b		<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	Club Unión
18	163Ag		<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	Boca La Caja
19	49Ag_b		<i>Penicillium</i> sp.		Salida del Río Matasnillo
20	29Ag		<i>Penicillium</i> sp.		Panamá La Vieja
21	58Ag		<i>Penicillium</i> sp.		Salida del Río Matasnillo
22	82Ag		<i>Penicillium</i> sp.		Boca La Caja
23	83Ag		<i>Penicillium</i> sp.		Boca La Caja

24	108Ag		<i>Penicillium sp.</i>		Isla Flamenco
25	111Ag		<i>Penicillium sp.</i>		Isla Flamenco
26	109Ag		<i>Penicillium sp.</i>		Isla Flamenco
27	112Ag		<i>Penicillium sp.</i>		Antigua Autoridad de la Región Interoceánica
28	100Ag		<i>Penicillium sp.</i>		Antigua Autoridad de la Región Interoceánica
29	205Ag		<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Boca La Caja
30	101Ag		<i>Aspergillus sp.</i>	gris y aterciopelado	Antigua Autoridad de la Región Interoceánica
31	169Ag		<i>Aspergillus niger</i> *cf.		Isla Flamenco
32	115Ag		<i>Aspergillus niger</i> *cf.		Boca La Caja
33	8Ag_b		<i>Aspergillus niger</i> *cf.		Avenida de los Poetas
34	107Ag		<i>Aspergillus sp.</i>		Isla Flamenco
35	2Ag_b		<i>Paecilomyces</i> *c.f. <i>lilacinus</i>		Coco del Mar
36	232Ag		<i>Paecilomyces</i> *c.f. <i>variotii</i>		Costa del Este
37	27Ag_b		<i>Paecilomyces</i> *c.f. <i>variotii</i>		Panamá La Vieja
38	170Ag		<i>Paecilomyces</i> *c.f. <i>variotii</i>		Costa del Este
39	22Ag		<i>Trichoderma sp.</i>	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Costa del Este
40	234Ag		<i>Pestalotiopsis sp.</i>	<i>Neopestalotiopsis formicarum</i>	Costa del Este
41	2Ag		<i>Fusarium sp.</i>	<i>Fusarium sp.</i>	Coco del Mar
42	011Ag		<i>Fusarium sp.</i>	<i>Fusarium sp.</i>	Coco del Mar
43	30Ag_a		<i>Fusarium solani</i> *c.f.	<i>Fusarium sp.</i>	Panamá La Vieja
44	218Ag		**C. tipo cladosporium		Salida del Río Matasnillo
45	227Ag_b		**C. tipo cladosporium		Hospital Santo Tomás
46	56Ag		**C. tipo cladosporium		Coco del Mar
47	238Ag		**C. tipo cladosporium	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	Las Bóvedas
48	233Ag_b		**C. tipo cladosporium	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	Costa del Este
49	233Ag_a		**C. tipo cladosporium	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	Costa del Este

50	233Ag		**C. tipo cladosporium	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	Costa del Este	
51	233bAg		**C. tipo cladosporium	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	Costa del Este	
52	48Ag		**C. tipo cladosporium	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	Coco del Mar	
53	49Ag_a		**C. tipo cladosporium		Salida del Río Matasnillo	
54	51Ag		**C. tipo cladosporium		Salida del Río Matasnillo	
55	165Ag		***	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	Boca La Caja	
56	048AgM3		***	<i>Pseudocercospora abacopteridicola</i>	Coco del Mar	
57	227Ag_a		**C. tipo cladosporium	<i>Cladosporium xanthochromaticum</i>	Hospital Santo Tomás	
58	40Ag		***	<i>Diaporthe</i> sp.	Panamá La Vieja	
59	236Ag		**C. tipo cladosporium	<i>Cladosporium</i> sp.	Antigua ARI	
60	211Ag		**C. tipo rhinocladiella, phialophora	<i>Exophiala oligosperma</i>	Boca La Caja	
61	215Ag		**C. tipo cladosporium		Isla Flamenco	
62	237bAg		**C. tipo cladosporium	<i>Cladosporium halotolerans</i>	Antigua ARI	
63	231Ag		**C. tipo cladosporium		Club Unión	
64	216Ag		**C. tipo cladosporium	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	Isla Flamenco	
65	212Ag		***	<i>Setophaeosphaeria</i> sp.	Boca La Caja	

*cf.: *confer* (comparar con).

**Conidiación tipo rhinocladiella, phialophora y/o cladosporium, son los hongos del grupo dematiáceo no identificables.

***Cepas fúngicas no identificables en estado vegetativo no estéril.

Tabla 16. Determinación de concentración y pureza del ADNg mediante espectrofotometría NanoDrop.

#	Cepa	Conc. Ácido Nucleico	OD260/280	OD260/230	PCR	Secuenciación
1	238Ag	299.88 ng/uL	2.16	2.21	✓	✓
2	231Ag	528.18 ng/uL	2.25	2.34	✓	
3	215Ag	596.71 ng/uL	2.16	2.22	✓	
4	227Ag_b	626.74 ng/uL	2.23	2.30	✓	✓

5	56Ag	631.74 ng/uL	2.19	2.29	✓	
6	234Ag	169.31 ng/uL	2.26	2.30	✓	✓
7	10Agc1	612.60 ng/uL	2.23	2.31	✓	✓
8	10Agc2	122.72ng/uL	2.09	1.91	✓	✓
9	233bAg	55.60ng/uL	2.03	2.10	✓	
10	236Ag	39.21ng/uL	2.07	1.95	✓	✓
11	216Ag	93.78ng/uL	2.03	1.07	✓	✓
12	218Ag	80.98ng/uL	2.07	1.99	✓	
13	237bAg	51.35ng/uL	2.04	2.16	✓	✓
14	233Ag	51.16ng/uL	2.08	2.20	✓	
15	212Ag	126.17ng/uL	1.96	2.37	✓	✓
16	169Ag	32.29 ng/uL	2.10	1.52	✓	
17	233Ag_b	29.40 ng/uL	2.10	1.48	✓	
18	227Ag_a	80.34 ng/uL	1.98	2.82	✓	
19	011Ag	141.55 ng/uL	1.99	1.80	✓	✓
20	30Ag_a	134.62 ng/uL	2.01	2.16	✓	✓
21	2Ag_b	175.86 ng/uL	2.01	1.92	✓	
22	2Ag	285.54 ng/uL	1.98	2.22	✓	✓
23	101Ag	291. 74 ng/uL	2.00	2.16	✓	
24	40Ag	100.65 ng/uL	2.02	1.71	✓	✓
25	107Ag	161.52 ng/uL	2.05	2.14	✓	
26	27Ag_b	124.97 ng/uL	2.09	2.21	✓	
27	211Ag	93.13 ng/uL	2.10	2.20	✓	✓
28	51Ag	64.40 ng/uL	2.18	2.01	✓	
29	232Ag	50.98 ng/uL	2.14	2.24	✓	
30	26Ag	35.00 ng/uL	2.15	1.67	✓	
31	115Ag	26.65 ng/uL	2.26	1.29	✓	
32	4Ag	89.60 ng/uL	2.06	2.20	✓	
33	170Ag	39.88 ng/uL	2.23	1.99	✓	
34	163Ag	28.47 ng/uL	2.18	1.32	✓	
35	99Ag	103.07 ng/uL	1.98	1.40	✓	
36	23Ag	132.82 ng/uL	2.00	1.94	✓	✓
37	B36Ag	198.59 ng/uL	1.96	1.97	✓	
38	22Ag	34.45 ng/uL	2.24	1.91	✓	✓

39	49Ag_b	482.22 ng/uL	2.01	2.37	✓	
40	82Ag	595.34 ng/uL	2.00	2.40	✓	
41	112Ag	796.16 ng/uL	2.00	2.39	✓	
42	95Ag	54.78ng/uL	1.99	2.39	✓	
43	6Ag	51.67 ng/uL	1.96	2.13	✓	
44	111Ag	899.97 ng/uL	1.99	2.35	✓	
45	84Ag_a	134.90 ng/uL	2.00	2.30	✓	✓
46	205Ag	650.97 ng/uL	1.99	2.35	✓	✓
47	25Ag	483.45 ng/uL	1.97	2.38	✓	
48	109Ag	580. 75ng/uL	1.96	2.41	✓	
49	31Ag	139.44 ng/uL	1.99	2.38	✓	
50	1Ag	155.23 ng/uL	1.99	2.40	✓	✓
51	58Ag	73.66 ng/uL	1.97	2.28	✓	
52	18Ag	380.30 ng/uL	1.97	2.39	✓	
53	048AgM3	179.41 ng/uL	1.95	2.19	✓	✓
54	165Ag	34.63 ng/uL	1.69	1.31	✓	✓
55	49Ag_a	104.23 ng/uL	1.95	1.97	✓	
56	233Ag_a	22.87 ng/uL	1.79	1.56	✓	
57	48Ag	68.70 ng/uL	1.81	2.35	✓	
58	84Ag_b	134.90ng/uL	2.00	2.30		
59	10Ag_b					
5	A80Ag					
61	29Ag					
62	83Ag					
63	108Ag					
64	100Ag					
65	8Ag_b					