

**INVENTARIO DE HONGOS ASOCIADOS A SUELO
ENRIQUECIDO CON GUANO DE MURCIÉLAGO EN
CUEVA DE LOS CULEBRONES, EN LA RESERVA MATA DE
PLÁTANO (ARECIBO, PUERTO RICO)**

por

Gloria María Natal Molina

Tesis presentada en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

**MAESTRIA EN CIENCIAS
en
BIOLOGÍA**

**UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO DE MAYAGÜEZ
2013**

Aprobada por:

Rafael Montalvo Rodríguez, PhD
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Carlos Rodríguez Minguela, PhD
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Sandra L. Maldonado Ramírez, PhD
Presidente, Comité Graduado

Fecha

John Fernandez Van Cleve, PhD
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Nanette Difffoot Carlo, PhD
Director, Departamento de Biología

Fecha

ABSTRACT

A cave is defined as any natural area below the earth's surface that extends beyond the dark zone and is accessible to humans. Caves are considered extreme environments for life that provide resources to oligotrophic microorganisms. In such restricted environments, bat's guano enriches soil for fungal development. Cave fungi are habitual saprophytes although some may play a pathogenic role. Moreover the wide distribution and abundance of fungi in these habitats contribute to support the food chain as certain insects feed on spores and mycelia. In recent years cave research focusing on fungi have been published from countries such as India, France, Canada, Mexico, and the United States. However, in Puerto Rico no study has been conducted in guano-enriched cave soil to document commensal and potential pathogenic fungal strains. For this purpose, Cueva de Los Culebrones in the Mata de Plátano Reserve (Arecibo, Puerto Rico) was used as sampling site for this study, relying on culture-dependent and molecular techniques for the characterization of fungal isolates. Three areas in the cave (entrance, middle, and end) were selected to collect soil samples. The soil was homogenized using a Stomacher and serial dilutions were made using phosphate buffer. Samples were inoculated using the spread technique and incubated at 25°C, 37°C, and 40°C to provide temperature conditions similar to those recorded for the sampling areas. As statistical analysis was used Jaccard index. A FastDNA[®] SPIN for Soil Kit was used extract genomic DNA from fungal isolates (n=40 morphotypes) using a modified version of the manufacturer's protocol. These morphotypes include mycelial fungi and yeast which were classified into nine genera: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Oidiodendron*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, *Uncinocarpusii*, as well a strains classified by Ascomycota and Eurotiomycetes. The genus *Aspergillus* as mycelial fungi and the yeast genus *Rhodotorula* was the most abundant in both

samples and all areas of the cave. *Uncinocarpus reesii* no has been previously reported from cave environments in Puerto Rico. The identification of opportunistic fungi such as *Aspergillus fumigatus*, *A. parasiticus*, *Cladosporium* spp., *Rhodotorula mucilaginosa* and *Uncinocarpus reesii* from Cueva De Los Culebrones provide new information about potential health risks for people who enjoy visiting this cave.

RESUMEN

Una cueva se define como cualquier espacio natural por debajo de la superficie terrestre que se extiende más allá de la zona oscura y es accesible a los humanos. Las cuevas son consideradas ambientes extremos para la vida. En estos ambientes extremos, el guano de murciélago enriquece el suelo, para el crecimiento de hongos. Los hongos de las cuevas son saprofitos, aunque algunos pueden desempeñar un rol patogénico. Además, la amplia distribución y abundancia de los hongos en estos hábitats contribuye a la dieta de organismos de algunos insectos que se alimentan de micelio y esporas. En años recientes se han publicado investigaciones enfocadas en hongos de las cuevas en India, Francia, Canada, México y los Estados Unidos. Sin embargo, en Puerto Rico no se ha realizado estudios en guano de murciélago en cuevas que documente colonias de hongos comensales y potencialmente patogénicos. Con este fin, la cueva de los Culebrones en la Reserva Mata de Plátano (Arecibo, Puerto Rico) fue utilizada como sitio de muestreo para el estudio, utilizando técnicas dependientes de cultivo y técnicas moleculares para la caracterización de los aislados. Se seleccionaron tres zonas en la cueva (entrada, medio y final), para tomar tres muestras de suelo. Cada muestra se homogenizó utilizando un Stomacher y se realizaron diluciones en serie utilizando amortiguador fosfatado. Los hongos se inocularon por técnica de esparcido y se incubaron a 25°C, 37°C y 40°C para proveer las condiciones de temperatura documentadas en las áreas de muestreo. Como análisis estadístico se utilizó el índice de Jaccard. Para llevar a cabo la extracción del ADN genómico de los aislados cultivables se utilizó el *FastDNA®SPIN for Soil Kit* con una versión modificada del protocolo del fabricante. Estos morfotipos incluyen hongos miceliales y levaduras los cuales se clasificaron dentro de nueve géneros: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Oidiodendron*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhodotorula*,

Uncinocarpus, también se recuperaron morfotipos clasificados como Ascomycota y Eurotiomycetes. El género *Aspergillus* como hongo filamento y la levadura *Rhodotorulla* fueron los más abundantes en ambos muestreos y todas las zonas de la cueva. *Uncinocarpus reesii* no se ha reportado previamente en cuevas de Puerto Rico. La identificación de especies de hongos patógenos oportunistas como *Aspergillus fumigatus*, *A. parasiticus*, *Cladosporium* spp., *Rhodotorula mucilaginosa* y *Uncinocarpus reesii* de la Cueva De Los Culebrones provee nueva información acerca de los potenciales riesgos a la salud para las personas que disfrutan de visitar esta cueva,.

DECLARATORIA DE DERECHOS DE AUTOR

© Gloria M. Natal Molina. Mayo, 2013.

DEDICATORIA

En primer lugar, le agradezco a Dios por darme la fortaleza mental y espiritual para poder salir adelante ante las diferentes etapas que fueron parte de mi vida durante este tiempo. A toda mi familia que con su confianza y consejos, me ayudaron a llegar hasta donde estoy hoy. Mis padres, Ada E. Molina Rivera y Orlando Natal Rodríguez, a quien le debo ser como soy, porque siempre me brindaron las herramientas necesarias para alcanzar todas las metas que me he propuesto y me apoyan en los peldaños venideros. A mi hermana, Esmeraldina Natal Molina, la cual es más que una hermana, es mi mejor amiga. Mis abuelos, Pablo Molina Olivo (fallecido) y Esmeraldina Rivera Rodríguez, quienes son mis segundos padres y a los que adoro y respeto por su inteligencia y sabiduría.

AGRADECIMIENTOS

Es meritorio agradecer al Dr. Armando Rodríguez, el Dr. Bert Rivera y al Sr. Abel Vale por hacer posible el acceso a la Reserva Mata de Plátano en Arecibo, lugar donde está ubicada la cueva. A la Dra. Sandra L. Maldonado Ramírez por dejarme formar parte de su grupo de estudiantes graduados y ofrecerme la oportunidad de poder alcanzar una de mis grandes metas profesionales. También al Dr. Carlos Rodríguez y Dr. Rafael Montalvo, por sus sugerencias en parte de la investigación. Al Sr. Julio O. Acevedo Matos y al Dr. Hernán Torres Pratts por su ayuda en la recolección de las muestras.

También cabe destacar a mi compañera de laboratorio y amiga Catherine Osorio Quintero, por su ayuda en la parte de análisis de datos y su compañía en los momentos en los cuales los días tenían más de 24 horas. A Edna P. Toscón Peñaranda, por la ayuda con la optimización del proceso de limpieza del ADN. En adición, a Katherine Carrero Figueroa por ofrecerme su amistad y su ayuda en el área de la filogenia.

Gracias a las estudiantes Carlina Román Abrams y Deborah M. Marrero Lebrón por haberme ayudado en el trabajo de laboratorio, ambas fueron fundamentales en mi progreso. Finalmente quisiera agradecer al Departamento de Biología de la Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayaguez por proveer el espacio de laboratorio y otras facilidades utilizadas para la realización de esta investigación.

TABLA DE CONTENIDO

ABSTRACT.....	ii
RESUMEN.....	iv
DEDICATORIA.....	vii
AGRADECIMIENTOS.....	viii
TABLA DE CONTENIDO.....	ix
LISTA DE TABLAS.....	x
LISTA DE FIGURA.....	xi
LISTA DE APENDICE.....	xiii
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 PROPÓSITO.....	4
1.2 REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2 MATERIALES Y METODOS.....	12
2.1 ÁREA DE MUESTREO.....	12
2.2 MUESTREO Y TRABAJO EN EL CAMPO.....	13
2.3 TRABAJO DE LABORATORIO.....	15
2.3.1 CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DE AISLADOS CULTIVABLES.....	16
2.3.2 EXTRACCIÓN DE ADN.....	16
2.3.3 REACCIÓN DE POLIMERASA EN CADENA (PCR).....	18
2.3.4 SECUENCIACIÓN DE ADN.....	19
2.3.6 ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	19
2.3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	19
3 RESULTADOS	21
3.1 PARAMETROS FÍSICOS.....	21
3.2 CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DE AISLADOS CULTIVABLES.....	22
3.2.1 DESCRIPCION DE AISLADOS CULTIVABLES.....	24
3.3 COMPOSICIÓN DE HONGOS DE SUELO ENRIQUECIDO CON GUANO MEDIANTE EXTRACCIÓN DE ADN DE CULTIVOS PURO.....	37
3.4 COMPOSICION DE MICOFLORA: ANALISIS ESTADISTICO.....	44
4 DISCUSIÓN.....	48
5 CONCLUSIÓN Y TRABAJOS FUTUROS.....	54
REFERENCIAS.....	57
APENDICE A. SECUENCIAS ADN CULTIVOS PUROS.....	67

LISTA DE TABLAS

TABLAS	PÁGINA
Tabla 1. Parámetros físicos documentados por muestreo en las áreas de muestreo.....	21
Tabla 2. Morfotipos por área de muestreo.....	23
Tabla 3. Identificación de la microbiota de la Cueva de los Culebrones en la Reserva Mata de Plátano, Arecibo Puerto Rico utilizando <i>Gen Bank</i>	47

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
Figura 1. Mapa Cueva de los Culebrones.....	14
Figura 2. Instrumento Kestrel 4000 (Nielsen-Kellerman).....	15
Figura 3. Esquema representativo de la organización del gen ribosomal presente en la mayoría de los hongos.....	18
Figura 4. Abundancia relativa de los hongos dominantes por género en los dos muestreos y sus areas de recolección.....	22
Figura 5. Características morfológicas de <i>Aspergillus fumigatus</i>	25
Figura 6. Características morfológicas de <i>Aspergillus parasiticus</i>	26
Figura 7. Características morfológicas de <i>Aspergillus tamarii</i>	28
Figura 8. Características morfológicas de <i>Aspergillus sojae</i>	29
Figura 9. Características morfológicas de <i>Aspergillus caelatus</i>	30
Figura 10. Características morfológicas de <i>Geothichum candidum</i>	31
Figura 11. Características morfológicas de <i>Geothichum sp.</i>	33
Figura 12. Características morfológicas de <i>Cladosporium cladosporoides</i>	34
Figura 13. Características morfológicas de <i>Cladosporium shaerospermum</i>	35
Figura 14. Características morfológicas de <i>Penicillium corylophilum</i>	36
Figura 15. Gel de extracción ADN de cultivos puros.....	37
Figura 16. Gel de PCR de muestras de ADN extraído de cultivos puros.....	39
Figura 17. Cromatograma de secuencia de ADN de la levadura <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	39
Figura 18. Filogénia de las especies de <i>Aspergillus</i>	40
Figura 19. Filogénia de las especies de <i>Penicillium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Rhodotorulla</i> , <i>Oidiodendron</i> , <i>Unciniocarpus</i> , <i>Paecilomyces</i> y <i>Geotrichum</i>	41

Figura 20. Filogénia de las especies de <i>Cladosporium</i>	42
Figura 21. Filogénia de los 19 microorganismos identificados en los muestreos a la Cueva De los Culebrones en la Reserva Mata de Plátano en Arecibo, Puerto Rico.....	43
Figura 22. Dendrograma de agrupamiento basado en ausencia/presencia de las especies identificadas utilizando el índice de Jaccard.....	45

LISTA DE APÉNDICES

APÉNDICE	PÁGINA
APÉNDICE A. Secuencias ADN cultivos puros.....	67

1 INTRODUCCIÓN

Una cueva se define como cualquier espacio natural por debajo de la superficie terrestre que se extiende más allá de la zona oscura y es accesible a los humanos (Gillieson, 1996; Hill y Forti, 1997). Las cuevas se consideran ambientes extremos para la vida (Northup y Lavoie, 2001), ya que proveen un ambiente oligotrófico en el cual los microorganismos que habitan en ella sobreviven bajo condiciones deficientes de nutrientes (Barton y Jurado, 2007). Los parámetros físicos, sin embargo, tienden a ser menos restrictivos, son predecibles y constantes, con altas concentraciones de minerales y diferentes nichos ecológicos con alta especialización para algunos organismos (Bastian *et al.*, 2009; Northup y Lavoie, 2001). El ambiente de una cueva consiste de varias áreas, comenzando con la zona de entrada que está fuertemente impactada por las condiciones de la superficie terrestre. Mas hacia el interior se encuentra la zona oscura, donde la penetración de luz es limitada y las condiciones inherentes a una cueva son predominantes, presentando diferencias sustanciales con las condiciones del exterior. En la zona profunda, es donde hay ausencia total de luz, la temperatura es semejante o cercana a la temperatura promedio anual de la superficie MAST, por las siglas en ingles, (Northup y Lavoie, 2001). Los sedimentos de las cuevas contienen compuestos inorgánicos, derivados de la parte superior y paredes de la cueva, al igual que tienen influencia del sedimento y el suelo del exterior de la cueva. Además, contiene compuestos orgánicos, que pueden llegar al interior de la cueva por diversas formas (Hofreiter *et al.*, 2003).

En términos generales, el suelo es un ecosistema complejo en donde los microorganismos viven en comunidades heterogéneas. Sin embargo, el comportamiento de las especies individuales de muchos microorganismos es hasta el momento desconocido por la falta de

técnicas de detección e identificación adecuadas (Akkermans *et al.*, 1994). Las estratas del suelo están compuestas por material duradero como arena, limo y partículas de arcilla, derivados del material parental y menos persistente como la materia orgánica derivada de plantas y material traído por animales. La biomasa del suelo está predominantemente constituida por microorganismos, y la proporción de los hongos presentes varía ampliamente entre distintos tipos de suelo y terrenos agrícolas (Ritz y Young, 2004). En los primeros centímetros de la superficie del suelo se encuentra una abundante microbiota, representada por bacterias, actinobacterias y hongos (Ulloa *et al.*, 2006).

La micobiota del suelo en la cueva está constituida por hongos filamentosos y levaduras, cuya presencia en este hábitat depende de las características de las especies y sus habilidades competitivas y reproductivas, así como de su interacción con los factores abióticos y bióticos (Phaff *et al.*, 1966; Lachance y Starmer, 1998). A pesar de esto una cueva es el lugar ideal para los hongos, ya que provee la temperatura y humedad adecuadas, la ausencia de luz y el sustrato necesario para su crecimiento (Nováková, 2009b). La micoflora que habita en las cuevas se puede encontrar mayormente asociada al suelo, sedimento, heces fecales de murciélago (guano) y materia orgánica (Nováková, 2009a y Nieves-Rivera *et al.*, 2009). Las esporas de hongos son ubicuas y se pueden encontrar en muestras de dentro y fuera de la cueva (Wang *et al.*, 2010). Muchos hongos aislados de las profundidades de las cuevas son idénticos a las formas aisladas de la superficie, organismos oportunistas, activos solo bajo condiciones favorables para su crecimiento (Dickson y Kirk, 1976; Jones y Motyka, 1987). Muchos de estos hongos no son residentes, sino que son transportados a la cueva por el agua, el aire, sedimento o animales (Northup y Lavoie, 2001 y Vanderwolf *et al.*, 2013). Las esporas de estos hongos se pueden mantener viables en la cueva por largos periodos de tiempo en diversos sustratos y el air`e y/o

asociados a otros organismos (Nováková, 2009a). La amplia distribución de los elementos fúngicos contribuye a la dieta de organismos micófagos como los artrópodos del orden Collembola, los cuales se alimentan de esporas y micelio (Nieves-Rivera, 2003; Dickson y Kirk, 1976; Sustr *et al.*, 2005; Walochnik y Mulec, 2009; Bastian *et al.*, 2010). La función de los hongos en este ambiente recae principalmente en la descomposición de materia orgánica (saprófitos), haciéndola disponible para otros miembros de la comunidad y/o ser patógenos de organismos residentes y/o visitantes de la cueva (Northup *et al.*, 1997 y Nieves-Rivera *et al.*, 2009). Cuando la materia orgánica está disponible, los hongos son los microorganismos más abundantes en las cuevas debido a su alta producción, diseminación de esporas y su capacidad colonizadora (Jurado *et al.*, 2010). Por lo tanto, los hongos contribuyen en gran medida al incremento de la biomasa en la cueva (Pedro y Ramos-Bononi, 2007). En adición, ellos producen grandes cantidades de compuestos hidrófobos que afectan las características de infiltración del agua en el suelo de la cueva. Además, los hongos pueden ser importantes en la formación y la estabilización de agregados del suelo (Lynch y Bragg, 1985). Diversos estudios han intentado dilucidar el rol de la microflora en la formación y estabilización de agregados del suelo (Harris *et al.*, 1964 y Moloche *et al.*, 1987), y han concluido que su contribución principal es debido al enredo de las hifas en las partículas del suelo (Moloche y Page, 1986). La forma en la que crecen los filamentos fúngicos es una adaptación particularmente efectiva para vivir en un ambiente como el suelo (Ritz y Young, 2004).

Hasta el momento el conocimiento sobre la biodiversidad de hongos asociados a suelo en las cuevas es limitado en comparación con las comunidades bacterianas en el mismo ambiente (Anderson y Cairney, 2004). Por tal motivo, se ha intentado implementar el uso de técnicas independientes de cultivo en muestras de suelo. La obtención de ácido desoxirribonucleico

(ADN) de estas muestras proveen la oportunidad de identificar microorganismos no cultivables, cuyos requerimientos nutricionales no son reproducibles en el laboratorio (Barton, 2006).

Aun así, los estudios micológicos en las cuevas de Puerto Rico han sido basados en el uso de técnicas dependientes de cultivos. Desde 1960, cuando se diagnosticó el primer caso de histoplasmosis por exposición al interior de una cueva los estudios se enfocaron en la distribución y ecología del hongo *Histoplasma* (Torres-Blasini y Carrasco-Canales, 1966, Díaz-Martínez, 1972) mediante identificación de aislados de suelo, madera en descomposición, plantas y guano de murciélago. El diagnóstico de esta micosis y su agente causante en la Cueva de Aguas Buenas fue documentado durante aproximadamente dos décadas (Torres-Blasini *et al.*, 1960, Beck *et al.*, 1976 y Carvajal-Zamora, 1977). Estudios recientes documentan hongos en guano de murciélago, pedazos de madera y otras muestras colectadas en las áreas de estudio en el Parque de las Cuevas de Camuy (Nieves-Rivera, 2003), también en la Cueva La Tuna en Cabo Rojo, Cueva de Malano en Sistema de Los Chorros San Germán y Cueva Viento, Guayanilla-Peñuelas en el sureste de Puerto Rico (Nieves-Rivera *et al.*, 2009).

1.1 PROPÓSITO

Esta investigación se llevó a cabo por que existe la necesidad de aportar al conocimiento de la composición de hongos en el sistema del karso, particularmente en cuevas, donde este tipo de estudios han sido esporádicos (Gadd, 2004; Engel, 2007; Vaughan *et al.*, 2011, Nieves-Rivera *et al.*, 2009). Aun así, la amplia distribución de los hongos en las cuevas ha llamado la atención de algunos investigadores dando base a estudios recientes (Nieves-Rivera *et al.*, 2009), ya que muchos de los hongos identificados son productores de metabolitos secundarios. La

identificación de nuevos metabolitos secundario es importante por que muchos de estos pueden representar daños a la salud, generando afecciones de salud a humanos o pueden proveer fuentes de nuevos medicamentos o compuestos con diversas aplicaciones industriales. Además, actualmente con el aumento significativo del turismo a las cuevas es necesario proveerle al público el conocimiento sobre los patógenos potenciales presentes en las cuevas, determinando su fuente de crecimiento e informándole a los visitantes sobre las posibles consecuencias de su visita a este ambiente (Jurado *et al.*, 2010) e implementar mecanismos de protección personal para los visitantes. La importancia de esta investigación recae en que es el primer estudio en Puerto Rico donde se combinan técnicas dependientes de cultivo con el uso de técnicas moleculares para identificar cultivos puros asociados a la comunidad fúngica de suelo enriquecido con guano de una cueva en Puerto Rico.

1.2 REVISIÓN DE LITERATURA

La gran mayoría de las especies microbianas no están asociadas a lugares energéticamente favorables (Barton y Jurado, 2007). Aún entre los microorganismos que habitan en cuevas, los cuales sobreviven bajo condiciones pobres de nutrientes se observa una inesperada diversidad (Barton y Jurado, 2007). Los hongos se han documentado en diversos ambientes, incluyendo suelos (Gilman, 1957; Barron, 1968; Paul y Clark, 1989), semillas, plantas pantanosas (Apinis *et al.*, 1972; Pugh y Mulder, 1971) plantas en lagos (Mishra y Dwivedi, 1983), aguas residuales, aguas contaminadas y también en cuevas (Semilolenny, 1997; Koilraj *et al.*, 1999; Cunningham *et al.*, 1995; Nieves-Rivera, 2003; Santos-Flores y Betancourt-López, 1997 y Betancourt *et al.*, 1988). El transporte de los hongos al suelo enriquecido por guano en el

interior de la cueva ocurre debido a la interacción de quirópteros, insectos y roedores con el ecosistema (Nieves-Rivera, 2003). Según Vanderwolf *et al.*, 2013 los murciélagos también pueden afectar la diversidad de hongos encontrados en las cuevas, ya que ellos los transportan sobre su cuerpo y los depositan mediante guano y sus cadáveres.

Investigaciones previas en suelos de cuevas, han demostrado de forma limitada una gran diversidad de hongos cultivables en estos suelos. Una de estas investigaciones realizada en seis cuevas del sureste de India (Koilaraj *et al.*, 1999) documentó 35 especies de hongos mesofílicos y siete morfotipos carentes de estructuras de reproducción. *Aspergillus flavus*, *Penicillium cyclopium* y *Chaetomium* sp., predominaron en todas las muestras de suelos en las seis cuevas (Koilaraj *et al.*, 1999). En zonas donde entraba luz se aislaron representantes de *Aspergillus chevalieri*, *A. versicolor*, *A. sydowii*, *Aspergillus* spp., *Curvularia brachyspora*, *Fusarium* spp., *Geotrichum candidum*, *Penicillium felluranum*, *Mucor* spp. y *Rhizopus stolonifer* (Koilaraj *et al.*, 1999). En esta investigación también se aisló *Syncephalis* sp., solo se aisló en la zona oscura de la cueva.

En 1995 en la Cueva Lechuguilla en el Parque de las Cavernas Carlsbad (Nuevo México) Cunningham *et al.*, 1995, identificaron 92 especies de hongos cultivables representando 19 géneros en muestras obtenidas de suelo y pozas. De esos 19 géneros, los dominantes fueron *Penicillium* (13 especies), *Aspergillus* (3 especies), *Cylindrocladium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Fusarium*, *Epicoccum* y diversos micelios. En adición, muestras de minerales observados bajo el microscopio electrónico de rastreo revelaron filamentos de hongos identificados tentativamente como *Aspergillus* spp.

En Taiwán se estudió la diversidad de microhongos termofílicos de muestras de suelo de bosques bajos y cuevas en el sur del país (Hsu y Agaramoorthy, 2001). Se tomaron muestras del

suelo al azar en el bosque y diferentes zonas de la cueva: entrada, zona limitada de luz y zona oscura. De estas muestras se aislaron 11 especies de hongos termofílicos pertenecientes a ocho géneros. *Aspergillus niger*, *A. tamarisii* y *A. wentii* se aislaron en las tres zonas de la cueva, mientras que *Absidia corymbifera*, *Talaromyces duponi*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor pusillus* y *Myricoccum albonyces*, hongos termotolerantes y termofílicos fueron aislados tanto en el suelo del bosque como en la entrada de la cueva.

Estudios en sedimentos de las grandes cuevas del karso en Greenbrier, West Virginia revelaron una gran variedad de bacterias, actinomicetes y hongos (Rutherford y Huang, 1994). Un total de 35 taxones de hongos fueron aislados, de los cuales 31 son deuteromicetes, dos miembros de Mastigomycotina, y un ascomiceto. Los aislados de micelo estéril fueron los más abundantes, seguidos por *Aspergillus aureolatus*, *Byssochlamys fulva*, *Penicillium steckii*, *Gliocladium roseum*, *Paecilomyces varioti*, *Mortierella alpina*, *Aspergillus caespitoses* y *Fusarium oxysporum*.

Ulloa *et al.*, 2006, en la búsqueda de la microbiota presente en los hábitats naturales de *Histoplasma capsulatum*, como guano de murciélago, excreta de aves de corral y contenido intestinal de murciélago en Guerrero, México, aisló varios ascomicetos, hongos mitosporicos y levaduras. Del guano de murciélago identificaron a los ascomicetos *Aphanoascus fluvescens*, *Gymnascella citrina*, *Gymnoascus dankaliensis* y *Chaetomidium fimeti*, hongos mitosporicos como *Aspergillus flavo-furcatis*, *A. terreus*, *A. terreus* var. *aureus*, *Penicillium* spp., *Malbranchea aurantiaca* y *Sporothrix* spp. y levaduras *Candida catenulata*, *C. ciferrii*, *C. famata* var. *flareri*, *C. guilliermondii* var. *guilliermondii* y *Rhodotorula* spp.

Según Volz y Yao, 1991 en estudios realizados a muestras de suelo colectadas dentro y fuera de la cueva en agua del río Hendrie en el pueblo de Mackinac, Michigan, se pudo notar

variaciones entre las especies encontradas dentro de la cueva en comparación con los aislados fuera de la cueva. La micoflora fue más abundante en suelo fuera de la cueva, por tal razón concluyeron que las condiciones existentes dentro de la cueva limita el crecimiento y la supervivencia de los hongos miceliales.

En la investigación aerobiológica llevada a cabo por Wang *et al.*, 2010 en la cueva Mongo Grottoes en Dunhuan, China se utilizó el Andersen de seis etapas entre los meses de septiembre, 2008 a agosto, 2009. El hongo con mayor prevalencia a través de todas las muestras fue *Cladosporium* spp., hongos no esporuladores, *Penicillium* spp., *Alternaria* spp. y *Aspergillus* spp. También se observó que la mayor cantidad de esporas es generalmente más alta en la parte cerrada de la cueva y el exterior en comparación con las áreas semi abiertas y abiertas de la cueva.

Un total de 54 especies pertenecientes a 16 generos y 2 micelios estériles fueron aisladas de la cueva Mandeepkhol en Chhattisgarh, India (Karkun *et al.*, 2012). Estos especímenes se aislaron de muestras de guano, troncos, ramas y hojas colectadas asépticamente. El mayor número de aislados se recuperó de guano, seguido por las hojas y las ramas.

Durante el periodo español en Puerto Rico no se hicieron mayores esfuerzos por llevar a cabo estudios micológicos en las cuevas. Sin embargo, se generó un esfuerzo enorme con la minería de guano. El guano o suelo enriquecido con guano es uno de los más importantes substratos para los hongos en las cuevas junto con estiércol, restos vegetales, cadáveres y otros restos orgánicos (Nieves-Rivera *et al.*, 2009). A finales del siglo 19, expediciones americanas y británicas exploraron la cueva de Aguas Buenas o “La Cueva Oscura”. Sin embargo, los primeros estudios micológicos en las cuevas de Puerto Rico fueron enfocados en la distribución y ecología del hongo *Histoplasma*. Este hongo es comúnmente encontrado en el suelo y en las

cuevas donde duermen murciélagos (Nieves-Rivera *et al.*, 2009) al igual que estructuras accesibles al mamífero. El primer caso de histoplasmosis en cuevas en Puerto Rico fue diagnosticado en el 1960. El segundo caso fue diagnosticado en 1962 y fue confirmado *post-mortem* mediante muestras de tejidos. Estudios micológico posteriores de Torres-Blassini y Carrasco-Canales (1966) en febrero de 1963 con muestras de suelo en la Cueva de los Panes (Utua) y en la Cueva de Aguas Buenas, confirmaron la patogenicidad de *Histoplasma capsulatum* en tejido de ratón. En el 1972 Díaz-Martínez estudio ocho casos de *Histoplasma* pulmonar reportados por hombres jóvenes que exploraron la Cueva Peñón del Barrio Rosario en San Germán. Veinte años más tarde Nieves-Rivera y Betancourt-López (1994) aislaron los oomicetes, *Saprolegnia ferax* y *Achlya americana* del flujo del estanque conocido como Charco Azul en el sistema de cuevas El Convento en el suroeste de Puerto Rico. Sin embargo, se han generado varios inventarios micológicos durante las pasadas tres décadas (Betancourt *et al.*, 1988; Santos-Flores y Betancourt-López, 1997; Nieves-Rivera, 2003) en cuatro de las cuevas que forman parte del Sistema de Cavernas del Río Camuy (La Catedral, Clara, Sumidero de Empalme y Sumidero Tres Pueblos). Las muestras estudiadas de estas cuevas incluyen muestras de guano, hojarasca, madera, suelo, escorrentías de agua y pozas de agua (Nieves-Rivera, 2003). Para aislar los hongos se utilizaron medios rutinarios como el agar de papa y dextrosa con 10% de ácido láctico, agar de rosa de bengala y el agar de dextrosa (Sabouraud). Entre los diecisiete géneros totales de hongos aislados en el guano y el suelo, mayormente se aislaron representantes de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Curvularia*, *Gliocladium*, *Hirsutella* y *Sepedonium* (Nieves-Rivera, 2003). Para actualizar la información de los mixomicetos Landolt *et al.*, (2006), realizaron un inventario en nueve cuevas de los Estados Unidos, San Salvador, Bahamas y Puerto Rico (1990-2005). Recientemente,

Santos-Flores y Nieves-Rivera (2007), condujeron un estudio preliminar de hongos acuáticos relacionados al sistema de cuevas y manantiales El Convento y hongos terrestres en cuevas del suroeste de Puerto Rico. En la investigación usaron como cebos discos cortados de hojas de pomarrosa (*Syzygium jambos*) esterilizadas. De esos discos se recuperaron mayormente representantes de los géneros *Fusarium* y *Triposporium*.

A pesar de su importancia, recientemente la población conocida de hongos ha sido estimada entre 5-10% de un estimado 1.5 millones de especímenes (Hawksworth, 1991). Una de las razones principales por lo cual se conoce tan poco de la población de hongos es por la dificultad de su recuperación en cultivos puros (Viaud *et al.*, 2000). Por tal razón es sumamente importante la implementación de las técnicas moleculares en los esfuerzos de recuperación de aislados. La diversidad de técnicas disponibles en la ecología microbiana molecular ha mejorado por el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y proporcionan una herramienta sensible y específica para detectar y caracterizar microorganismos ante la ausencia de crecimiento. La identificación de los componentes de las comunidades microbianas se basa en secuencias de ADN que codifican ARN ribosomal, de ADNr (Viaud *et al.*, 2000). Para ello se utiliza la región ITS, la cual consiste de dos regiones variables no-codificadas llamadas ITS1 e ITS2, localizadas entre la subunidades 18S y la 5.8S y entre la 5.8S y la 28S, respectivamente. La hipervariabilidad de los nucleótidos de la región ITS ha demostrado ser eficiente para distinguir entre especies en diversos géneros como *Fusarium* (Bridge y Arora, 1998).

Teniendo en cuenta el limitado transfondo de investigaciones en cuevas de Puerto Rico, el presente proyecto integró la extracción del ADN de los cultivos puros con los métodos dependientes de cultivo para ampliar las posibilidades de identificar una mayor cantidad de

hongos filamentosos y confirmar las identificaciones morfológicas con la caracterización molecular.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 ÁREA DE MUESTREO

La reserva Mata de Plátano está situada a siete kilómetros al suroeste de Arecibo en la zona del karso del norte central de Puerto Rico, dentro del área del bosque sub-tropical. El bosque sub-tropical forma el 58% del total del área de Puerto Rico con una precipitación de entre 100 a 220 cm por año y vegetación que cuenta con una altura de 20m (Ewel y Whitmore, 1973). La flora y fauna descrita en la reserva es muy diversa. Hay 500 especies de árboles nativos, 6 especies de murciélagos, 209 especies de aves, 41 especies de reptiles y 22 especies de anfibios. Sin embargo, la característica más reconocida de la reserva es la interacción entre murciélagos y boas que allí ocurre, reportándose así la depredación de murciélagos por la boa (Rodríguez y Reagan, 1984) puertorriqueña (*Epicrates inornatus*), listada por el Servicio de Pesca y Vida Silvestre de Estados Unidos como especie en peligro de extinción. Por otra parte, se estima que la población de murciélagos en Cueva de los Culebrones está alrededor de los 300,000 representando seis especies que incluyen; *Pteronotus quadridens*, *P. parnelli*, *Erophylla sezekorni* (*E. bombifrons*), *Brachyphylla cavernarum*, *Monophyllus redmani* y *Momops blainvillii*. Esto a su vez representa el 46% de las especies que habitan la isla (Dittmar *et al.*, 2011).

La Cueva de los Culebrones está localizada dentro de la reserva natural Mata de Plátano (18.44 °N, 66.70°O). Esta cueva es clasificada como caliente, ya que su temperatura fluctúa entre los 26.2 °C y 34 °C (Dittmar y Mayberry, 2010). La única entrada a la cueva está ubicada a 77 °NE y cuenta con dos cámaras (pasajes I y II) con una medida de 5m de ancho, 3m de alto y

8m de profundidad, accesible por una pequeña rampa empinada. El pasaje principal es de 182m de largo y consiste de tres cuartos distribuidos a lo largo del túnel principal. A 20m de la entrada, dos de los cuartos pequeños se ramifican del principal. El tercer y más largo cuarto está localizado a 80m de la entrada (Puente-Rolón y Bird-Pico, 2004). Las áreas de muestreo para este estudio están localizadas en una de las cámaras internas en la Cueva de Los Culebrones. Las áreas muestreadas están marcadas con una X roja en la Figura 1.

2.2 MUESTREO Y TRABAJO DE CAMPO

Se visitó la Cueva de los Culebrones en dos ocasiones: 10 de enero de 2009 y 21 de noviembre de 2009, para realizar la remoción de suelo enriquecido con guano en tres zonas diferentes (entrada, centro y final) (Figura 1). Para la caracterización espacial se tomó en cuenta el área limitante de entrada a la cueva. En cada zona se tomaron tres muestras de suelo (50g) a una profundidad de 12 cm, utilizando cucharas estériles y bolsas estériles. Los 50g se colectaron luego de retirar la capa superficial del suelo. En adición, se documentaron los siguientes parámetros físicos: temperatura, humedad e índice de calor utilizando un instrumento Kestrel 4000 (Nielsen-Kellerman) ilustrado en la Figura 2. Al extraer las muestras de suelo de la cueva se colocaron en una nevera con material aislante (*poliestireno*) para estabilizar la temperatura de la muestra hasta su procesamiento en el laboratorio.

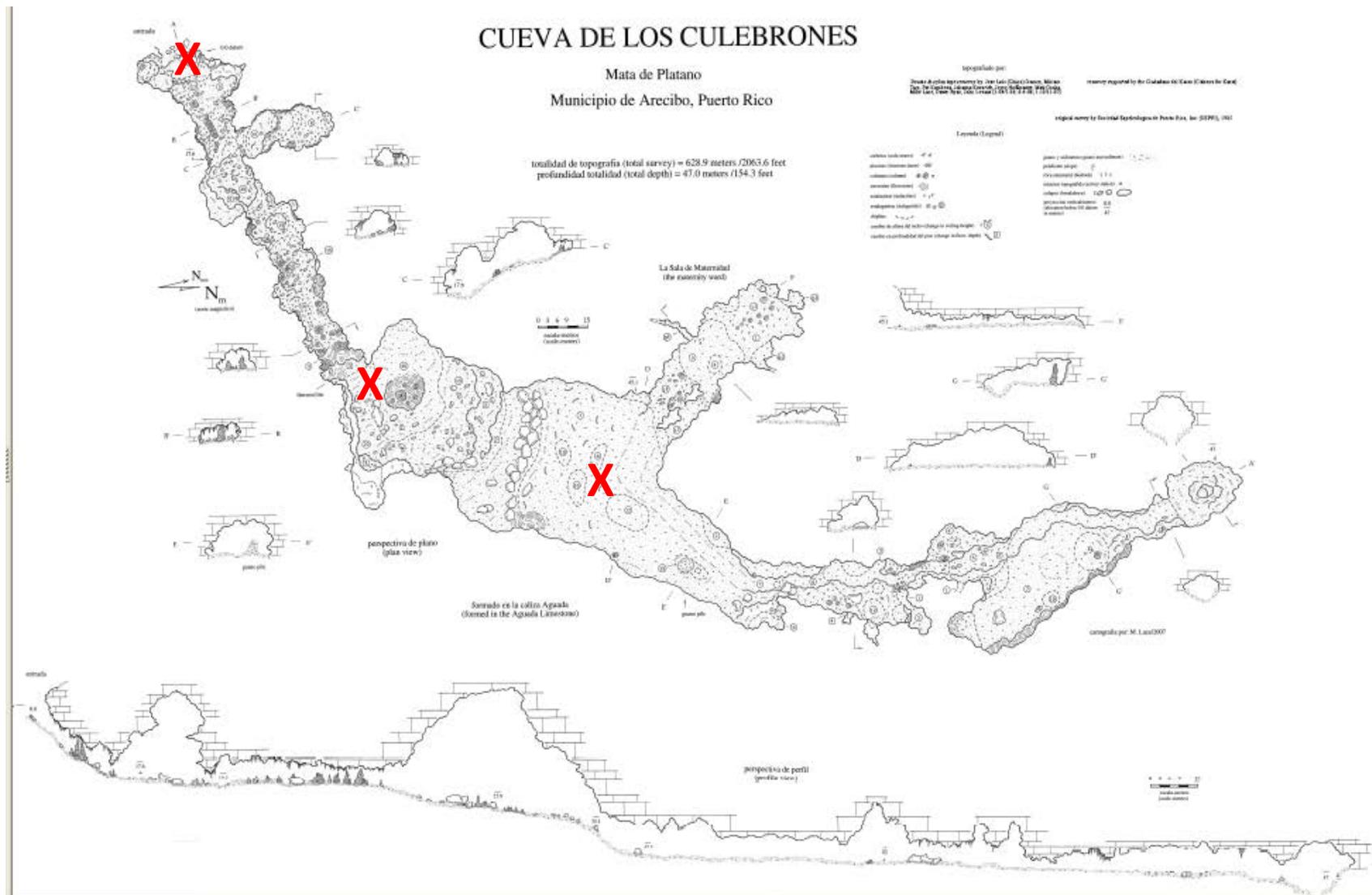


Figura 1. Mapa Cueva de los Culebrones. La X indica el área de muestreo. Suministrado por el Sr. Abel Vale con el Permiso de la Administración de la Reserva Mata de Plátano, Arecibo.



Figura 2. Instrumento Kestrel 4000 (Nielsen-Kellerman).

2.3 TRABAJO DE LABORATORIO

Las muestras de suelo enriquecido con guano se procesaron mediante diluciones en serie según Garret (1963) con una modificación. La modificación consistió en añadir 90ml de amortiguador de fosfato suplementado con cloranfenicol a una bolsa de *Stomacher* (Seward, Stomacher 400) que contenía una muestra de 10g de suelo para luego homogenizar en el *Stomacher* (Tekmar Company, modelo STO-400) por cinco minutos. La suspensión resultante fue diluida en serie (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}). De cada tubo de dilución se extrajeron 0.5ml y 0.1ml individualmente y se esparcieron en platos Petri con medio de cultivo *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) con cloranfenicol (1ml/100ml). Dos réplicas de cada plato fueron incubadas a 25, 37 y

40°C, respectivamente por 7-10 días. Con estas temperaturas se intentó proveer a las muestras condiciones de temperatura similares a las documentadas en las distintas áreas de muestreo dentro de la cueva (Tabla 1). También se colocó un plato de SDA sellado por cada zona de la cueva como control para corroborar que el medio no estuviese contaminado.

2.3.1 CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DE AISLADOS

CULTIVABLES

Luego del periodo de incubación se observaron todas las colonias crecidas en cada plato y se aislaron cultivos puros de las colonias con diferentes características macroscópicas (pigmentación y crecimiento). A partir de cámaras húmedas preparadas según Riddel (1950) se observó el tipo de hifa, las estructura de reproducción, la pigmentación y el arreglo y tamaño de las colonias. Las características microscópicas y macroscópicas se documentaron mediante fotografía digital y se utilizaron para identificar cada hongo utilizando las claves taxonómicas correspondientes para cada género. En adición, se preservaron las laminillas permanentes y los cultivos puros en glicerol a -80°C en el laboratorio 218-A del Departamento de Biología de la Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez (UPR-RUM).

2.3.2 EXTRACCIÓN DE ADN

Para llevar a cabo la extracción del ADN de los aislados de muestras de suelo enriquecido con guano se utilizó el *FastDNA®SPIN for Soil Kit* con las modificaciones sugeridas por el Dr. Carlos Rodríguez Mínguela (Rodríguez-Mínguela *et al.*, 2009) para cultivos puros. Las modificaciones consistieron en colocar todo el micelio aéreo del cultivo puro en el *Lysis Matrix E Tube* y luego añadir 978ul de amortiguador de sodio fosfatado (SPB) y 122ul de

MT Buffer. Esta preparación se homogenizó en un agitador horizontal por 10 minutos y luego se centrifugó a 14,000rpm por 10 minutos. Inmediatamente se transfirió el sobrenadante a un microtubo limpio de 1.5ml pipeteando suavemente para no re suspender el particulado. El próximo paso consistió en añadir 250ul de *Protein Precipitation Solution* (PPS) y mezclar por inversión manual 10 veces. Luego se centrifugó a 14,000rpm por 15 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo de 15ml con 1.0ml de *Binding Buffer Matrix Suspension* (BMS). Se mezcló la solución invirtiendo manualmente por 10 minutos y después se dejó asentar por 10 minutos para que toda la matriz estuviese en el fondo del tubo. Se removió 1.0ml del sobrenadante y el sobrenadante restante se resuspendió y se transfirió a un *Spin Filter* donde se centrifugó a 14,000rpm por 1 minuto. Luego se añadieron 500ul de la solución de lavado SEW-M al *Spin Filter* y se centrifugó a 14,000rpm por 1 minuto. Se extrajo la columna del tubo de recolección y se vació el contenido pipeteando. La columna se colocó nuevamente en el tubo de recolección y se centrifugó a 14,000rpm por 2 minutos. Se removió la columna y se colocó en un tubo de recolección nuevo y se dejó secar por 5 minutos. Al pasar los 5 minutos se añadieron 100ul de DES (*DNase/Pyrogen-Free Water*) y se resuspendió la matriz, para centrifugarla a 14,000rpm por 1 minuto, se descartó la columna y se almacenó el filtrado que contenía el ADN de la muestra a -20C.

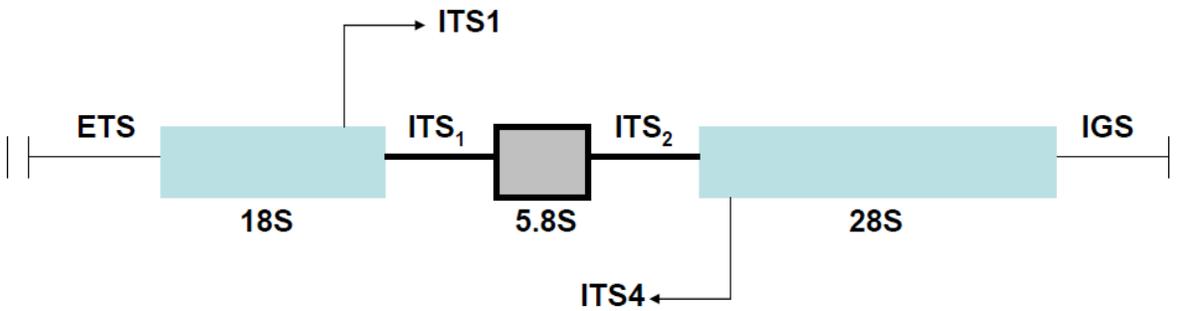


Figura 3. Esquema representativo de la organización del gen ribosomal presente en la mayoría de los hongos. Áreas de interés para su amplificación la región ITS y 5.8S, puntualizadas con líneas más gruesa (reproducido de Díaz-Muñoz, 2006).

2.3.3 REACCIÓN DE POLIMERASA EN CADENA (PCR)

La taxonomía molecular de hongos se basa en utilizar regiones conservadas, similares al 18S y la región variable como los ITS (Díaz- Muñoz, 2006). Según White *et al*, 1990 se puede utilizar para amplificación de la región variable ITS (Figura 3) los iniciadores ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT G-3'). Las reacciones de PCR se prepararon en volúmenes de 12.5ul, 25ul y 50ul. Para cada reacción de PCR se utilizaron 10ng de ADN de cada cultivo puro, *Green Master Mix* (la mitad del volumen final), 1.0ul de los iniciadores ITS1 e ITS4 a 50pmol y se completó con el ddH₂O necesario para llegar al volumen final deseado. Los parámetros para la amplificación fueron los siguientes: 35 ciclos con el paso inicial de desnaturalización de 95°C por 3 minutos, alineamiento a 56°C por 1 minuto, elongación a 72°C por 2:30 minutos y la elongación final de 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR se limpiaron con el *MinElute PCR Purification Kit* (QUIAGEN Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para verificar el producto de PCR se corrió una gel de agarosa al 2%, que se tiñó con bromuro de etidio (0.5 µg/mL), y se observó bajo la luz ultravioleta. La concentración de las muestras se obtuvo utilizando el Nanodrop (ND-1000).

2.3.5 SECUENCIACIÓN DE ADN

Cuarenta productos de PCR representativos de los cultivos purificados fueron enviados al *Nevada Genomics Center* en la Universidad de Nevada en Reno. Las muestras fueron procesadas para secuenciación siguiendo las instrucciones provistas por la institución.

2.3.6 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Las secuencias obtenidas comparadas con secuencias similares disponibles en la base de datos GenBank usando el programa BLAST. Estas fueron alineadas utilizando los programas Clustal X versión 2.0 y Bioedit versión 7.0.5.3. El valor de similitud entre las secuencias fue calculado por comparación de pares de las secuencias dentro de la alineación. Con las secuencias editadas y alineadas se prepararon árboles filogenéticos utilizando el programa MEGA 4. La historia evolutiva se infirió utilizando el método de *Neighbor-Joining* (Saitou y Nei, 1987). La prueba de *bootstrap* proveyó el consenso de las ramificaciones a base de 1000 réplicas (Felsenstein, 1985). Las secuencias obtenidas se depositaron en GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnología (NCBI).

2.3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos se analizaron utilizando análisis de conglomerado de dos vías y curvas de dominancia con el índice de similitud de Jaccard. Para este análisis el índice de Jaccard se basó en la presencia o ausencia de los hongos aislados asociados al suelo enriquecido con guano de la cueva. En adición, se realizó el análisis de Procedimiento de Multi-Respuestas de Permutación (MRPP), para comparar las riquezas específicas entre las zonas muestreadas, temperatura de incubación y las muestras evaluadas. Estos análisis se realizaron con PC-ORD

versión 6 (McCune y Mefford, 2011). También se preparó un dendrograma con el índice de Jaccard utilizando el programa PAST versión 2.17b (4.1 MB) (Hammer *et al.*, 2001). Este dendrograma permite visualizar la exclusividad de ciertos morfotipos con respecto a las diferentes zonas muestreadas.

3 RESULTADOS

3.1 PARÁMETROS FÍSICOS

Los parámetros físicos de las áreas de muestreo de la Cueva Culebrones en la Reserva Mata de Plátano en Arecibo se presentan en la Tabla 1. La temperatura del interior de la cueva resulto ser mayor a la del exterior, mientras que la humedad relativa es mayor en el exterior en comparación con el interior de la cueva. Por otro lado, el índice de calor (la combinación de la temperatura ambiente con la humedad relativa) es mayor en el interior de la cueva que en el área media o la entrada de la cueva.

Tabla 1. Parámetros físicos documentados por muestreo en las áreas de muestreo

Muestreo	Área de la cueva	Temperatura del suelo (°C)	Temperatura ambiente (°C)	Índice de Calor (°C)	Humedad relativa (%)
	Entrada	21	29	37.7	90
Primer (enero, 2009)	Medio	22	29	38.2	88
	Interior	22	31.5	44.7	87
	Entrada	20	28	36.5	89
Segundo (noviembre, 2009)	Medio	22	28	38	90
	Interior	22	30.5	45	90

3.2 CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DE AISLADOS CULTIVABLES

Del primer muestreo realizado el 10 de enero 2009 se aislaron 128 morfotipos, incluyendo las tres temperaturas de incubación. Representantes de estos morfotipos corresponden a los géneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Geotrichum* y *Rhodotorula*. Del segundo muestreo llevado a cabo el 21 de noviembre 2009 se pudieron aislar 71 morfotipos, correspondientes a las tres temperaturas de incubación, asociados a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Oidiodendron*, *Rhodotorula* y *Uncinocarpus* (Figura 4).

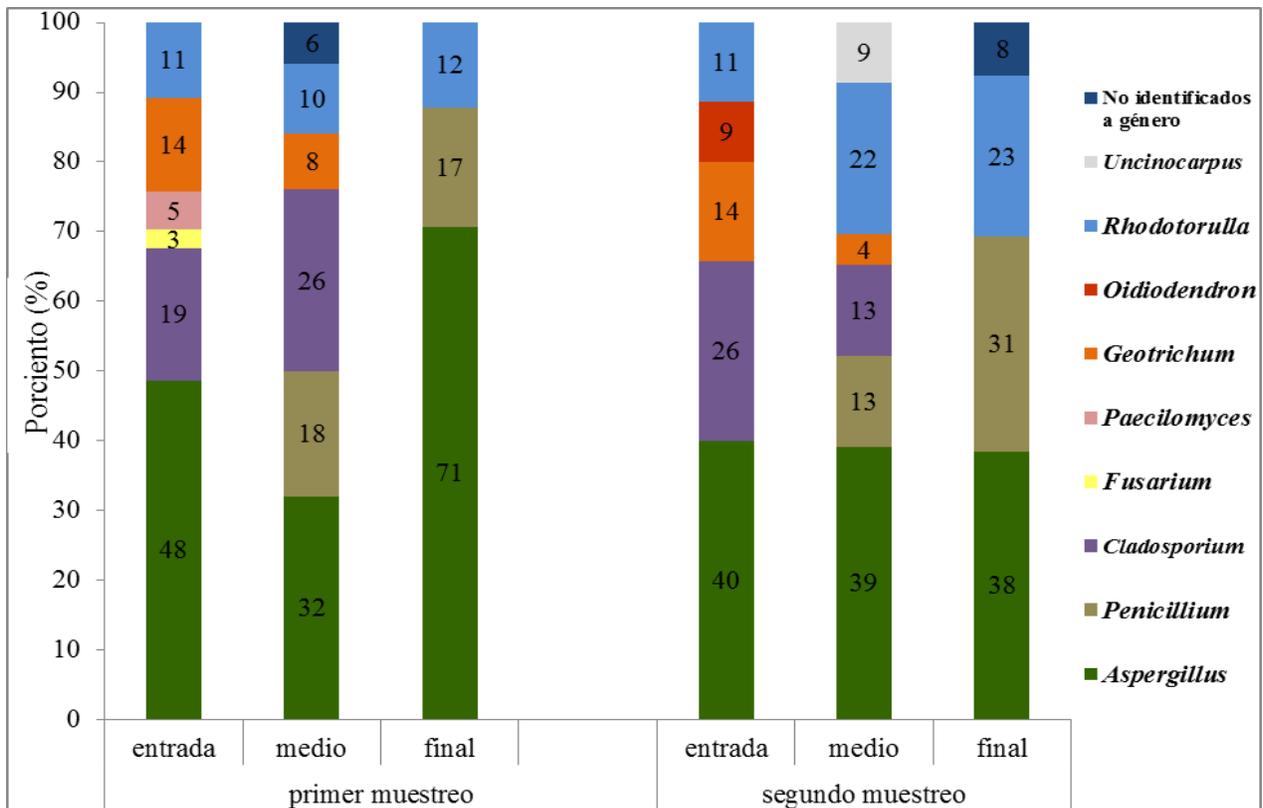


Figura 4. Abundancia relativa de los hongos dominantes (por género) en los dos muestreos para cada ázona muestreada.

Del total de 199 morfotipos (Tabla 2) entre los dos muestreos, se diferenciaron 55 morfotipos distintos por sus características macroscópicas. Estos luego se identificaron mediante características microscópicas utilizando microscopia de luz y Nomarsky. La identificación microscópica permitió documentar 40 aislados diferentes a nivel de especie. A estos 40 aislados se les extrajo su ADN, a partir de los cuales se generaron los productos de PCR enviados a secuenciar al *Nevada Genomics Center*.

Los resultados de la secuenciación confirmaron la identidad de 15 hongos miceliales y 3 hongos levaduriformes y se pudo obtener la clasificación a nivel de filo del morfotipo M58 y a nivel de clase del morfotipo SM2 (Tabla 3).

Tabla 2. Morfotipos por área de muestreo

Muestreo	Área de muestreo			Total de CFU`s
	Entrada	Medio	Final	
Primero	37	50	41	128
Segundo	35	23	13	71

3.2.1 DESCRIPCIÓN DE AISLADOS CULTIVABLES

***Aspergillus fumigatus* (Fresen., Beitr. 1863)**

Figura 5. – Anverso de color olivo oscuro o verde bien oscuro, reverso sin pigmentación. La textura de la colonia es polvorienta. El micelio es hialino, los conidióforos mayormente son radiales, predominan las estructuras de reproducción uniseriadas aunque algunas colonias pueden ser biseriadas. Las conidias son globosas de pared rugosa. El tamaño de las conidias es entre 2.3-3um

***Aspergillus parasiticus* (Speare, 1912)**

Figura 5. – Colonia en medio de SDA. En la parte anverso es color verde olivo y el reverso es carente de pigmentación. El micelio es hialino, uní seriado con conidias elípticas de color olivo. El tamaño de las conidias es entre 4.5-5.6um.

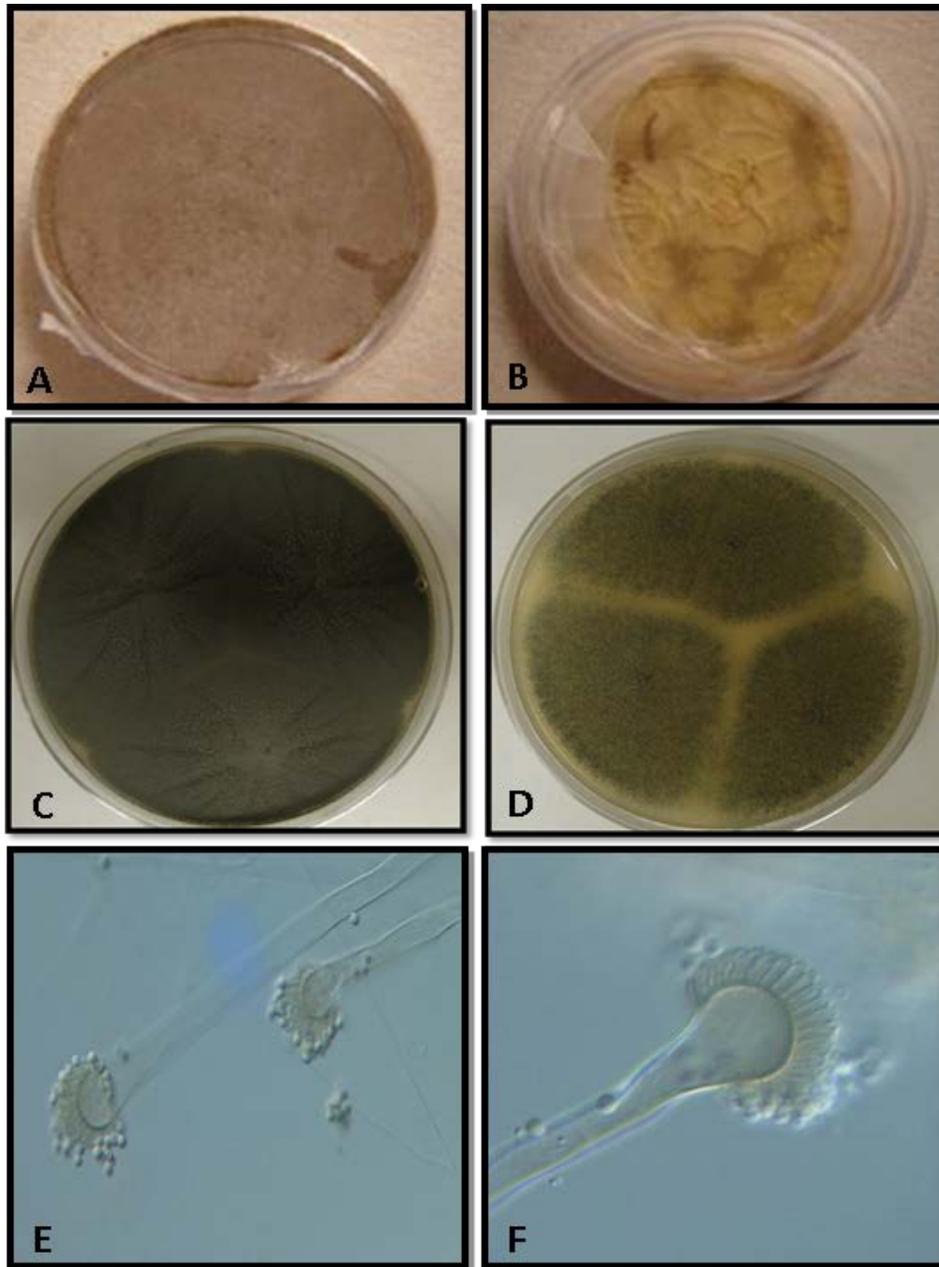


Figura 5. Características morfológicas de *Aspergillus fumigatus*. Colonia en SDA anverso (A), reverso de la colonia (B), colonia en CYA37 (C), colonia en MEA (D), conidióforo y conidias en Nomarski 40X (E), estructuras de reproducción en Nomarski 40X (F).

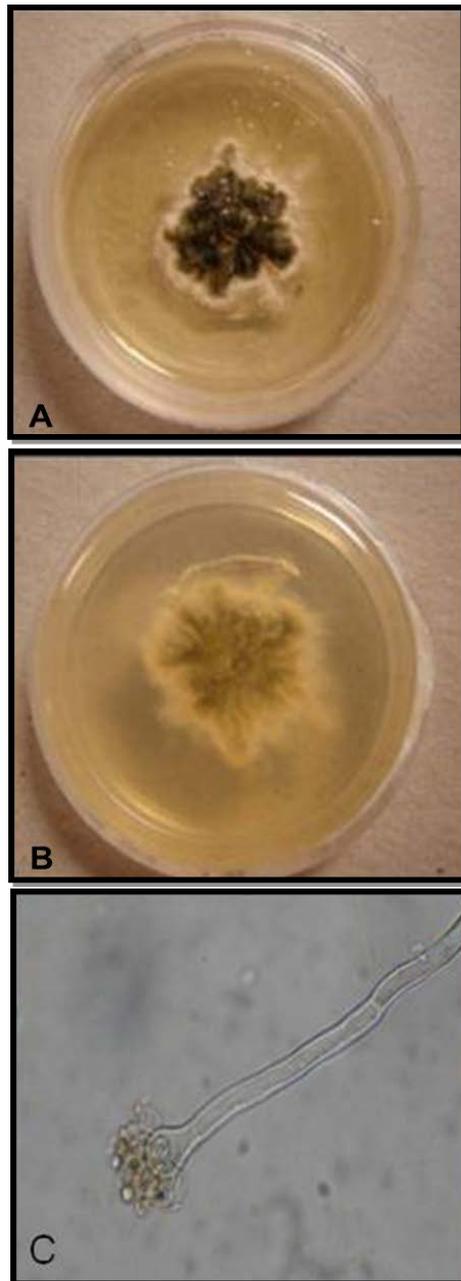


Figura 6. Características morfológicas de *Aspergillus parasiticus*. Colonia en SDA anverso (A), reverso de la colonia (B), conidióforo y conidias en Nomarski 40X (C).

***Aspergillus tamarii* (Kita, Zentbl. Bakt. 1913)**

Figura 7. – Colonia en medio SDA. Es de color marrón en el anverso y carente de color en el reverso. El micelio es hialino, uniseriado con conidias elípticas de color olivo. Las conidias miden entre 5-6.5um.

***Aspergillus sojae* (Sakaguchi y Yamada ex Murak, 1971)**

Figura 8. – Anverso de color olivo oscuro o marrón oscuro, reverso sin pigmentación o un gris pálido. La textura de la colonia puede ser variable. El micelio es hialino, los conidióforos radiales en forma de columna, predominan las estructuras de reproducción uniseriadas aunque una gran cantidad de colonias pueden ser biseriadas. Las conidias son esféricas y de pared rugosa, su tamaño es entre 4.0-5.6um.

***Aspergillus caelatus* (B.W. Horn, 1997)**

Figura 9. – La colonia en la parte anverso es de color verde-amarillo, lanosa, y el reverso es blanco o carente de pigmentación. El micelio es hialino, las vesículas varían en forma desde esféricas hasta elongadas, las conidias son globosas a elípticas de color olivo. Puede observarse aislados biseriados en CYA25, mientras que en MEA la formación de fiálidos es uniseriada.

***Geotrichum candidum* (Link: Fr.)**

Figura 10. – Colonia en medio de SDA. La colonia en la parte anverso es algodonosa de color amarillo. El micelio es hialino, sus artrosporas se generan en cadenas luego de la separación y división de la hifa. La medida de las artrosporas es entre 6.5-7um.



Figura 7. Características morfológicas de *Aspergillus tamarii*. Colonia en SDA anverso (A), reverso de la colonia (B), conidióforo y conidias en Nomarski 40X (C).

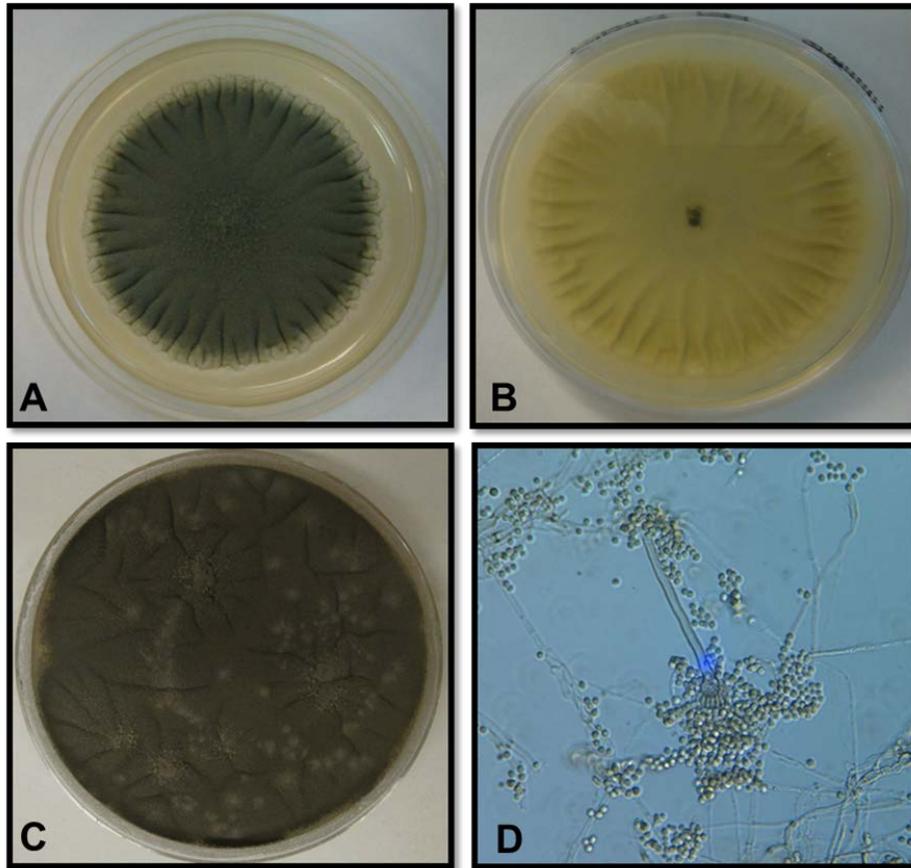


Figura 8. Características morfológicas de *Aspergillus sojae*. Colonia en SDA anverso (A), reverso de la colonia (B), Colonia en CYA37 (C), estructuras de reproducción en Nomarski 40X (D).

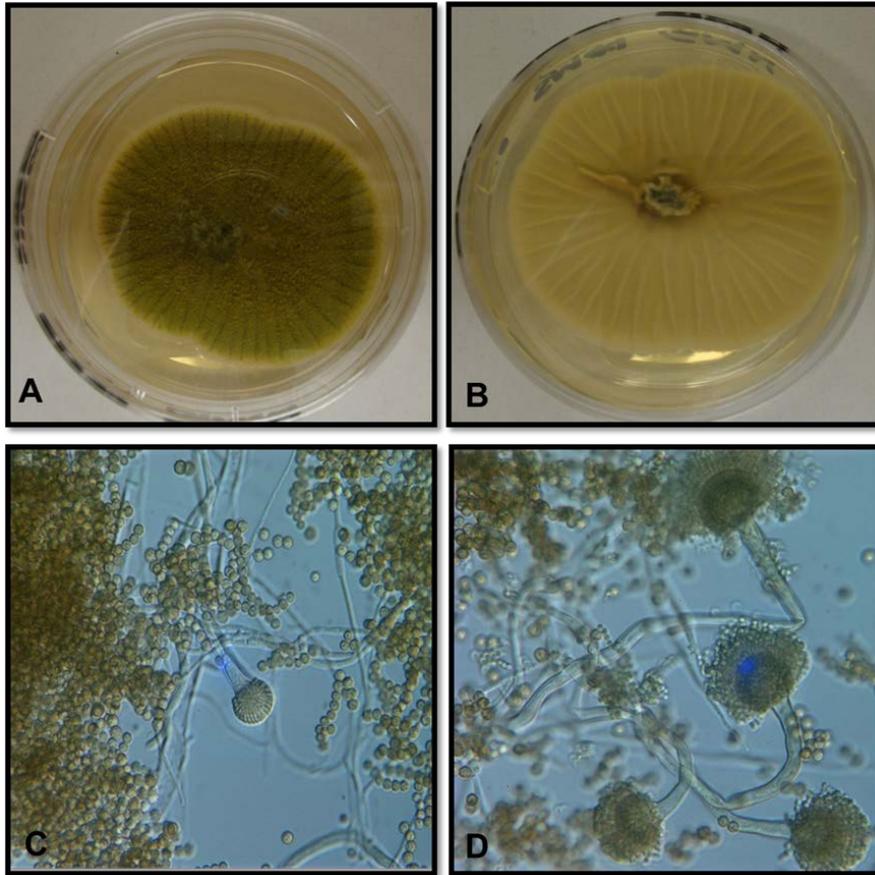


Figura 9. Características morfológicas de *Aspergillus caelatus*. Colonia en SDA anverso (A), reverso de la colonia (B), conidióforo y conidias en Nomarski 40X (C-D).

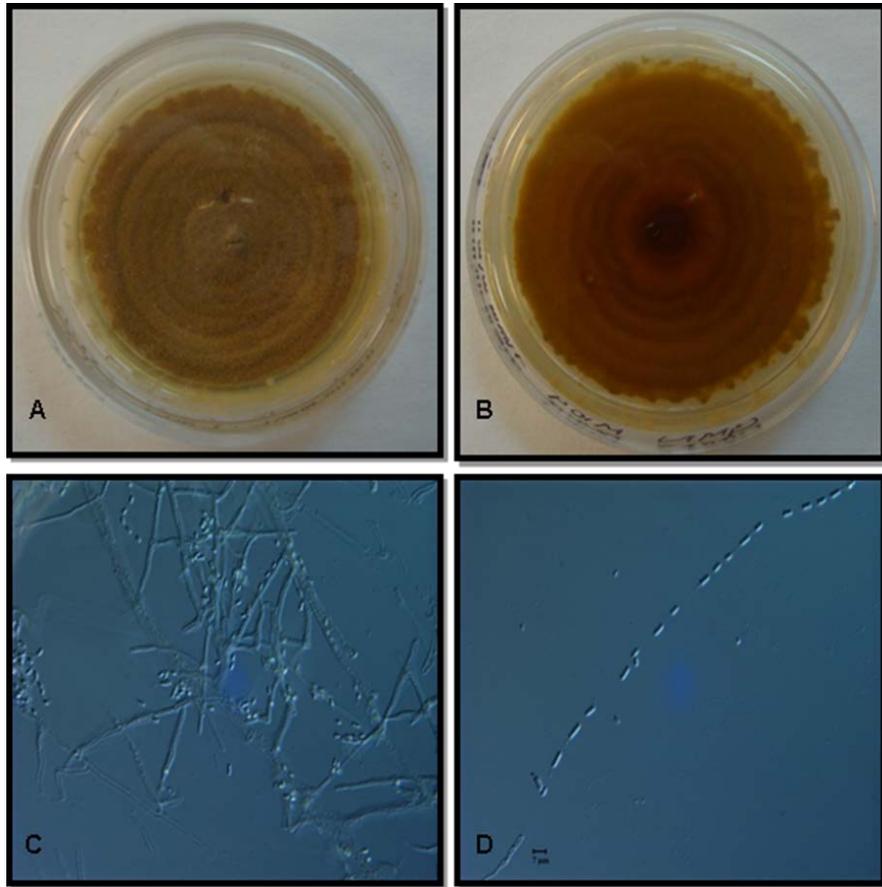


Figura 10. Características morfológicas de *Geotrichum candidum*. Colonia en SDA anverso (A), reverso de la colonia (B), micelio y conidias (artrosporas) en Nomarski 40X (C), artrosporas formadas por segmentación de hifa en Nomarski 40X (D).

***Geotrichum spp.* (Link: Fr.)**

Figuras 11. – Colonias en medio de SDA. La colonia en la parte anverso es amarillo con borde y micelio aéreo blanco, y el reverso es color anaranjado. El micelio es hialino, septado, carente de conidióforos, las artrosporas son hialinas, cilíndricas con terminales truncados formadas por segmentación de la hifa. Las artrosporas son de un tamaño de 5-6um

***Cladosporium cladosporioides* (Fresen., 1952)**

Figuras 12. – Colonias en SDA. La pigmentación de la colonia en el anverso es verde olivo, su reverso negro olivo. Cuenta con conidióforo largo, ramificado en ápice, las conidias varían en forma globosas, ovoides hasta en forma de limón, producidas en cadenas formadas por gemación y su tamaño varía entre 3-5um.

***Cladosporium sphaerospermum* (Penz., 1882)**

Figuras 13. – Colonias en SDA. La pigmentación de la colonia en el anverso es verde oscuro – marrón, su reverso negro olivo. Produce un conidióforo largo de color marrón, sus conidias cuentan con un tamaño entre 3.4-4um y tienen forma esférica y elíptica.

***Penicillium corylophilum* (Dierckx, 1901)**

Figura 14. – Colonia en CYA con crecimiento de 2-4mm. El color del anverso de la colonia es verde claro, amarilloso, con el borde blanco y la parte reverso es color blanco. Esta colonia presenta exudado amarilloso y genera pigmento soluble en el medio. El tamaño de sus conidias es 2.4-3.6 um

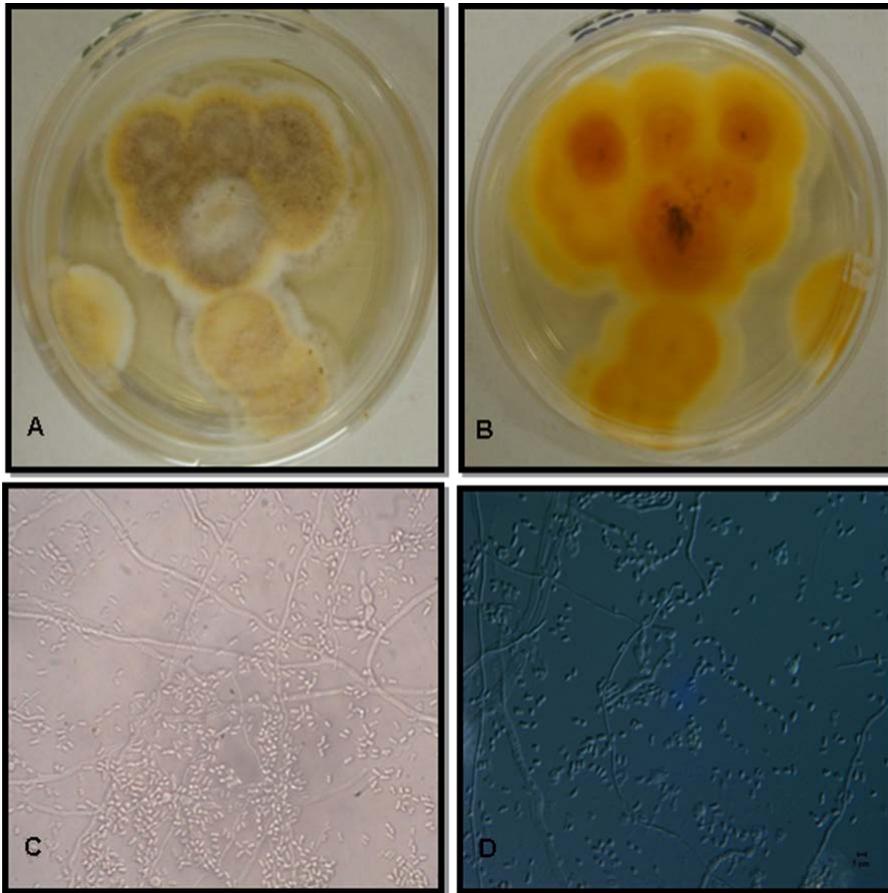


Figura 11. Características morfológicas de *Geothichum sp.* Colonia en SDA anverso (A), reverso de la colonia (B), micelio y artrosporas en microscopio de luz 60X (C), artrosporas formadas por segmentación de hifa en Nomarski 40X (D).

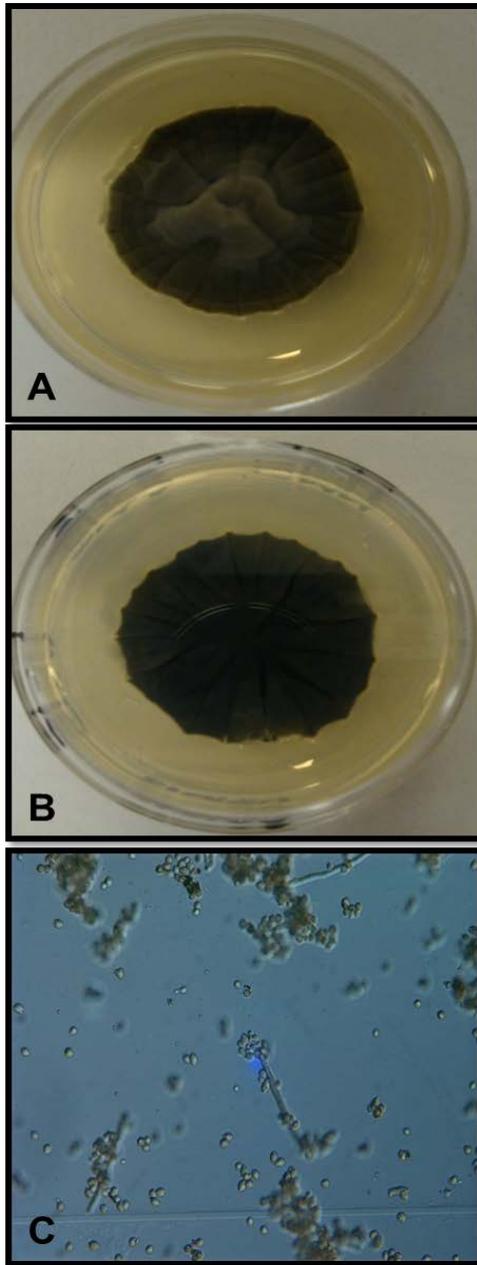


Figura 12. Características morfológicas de *Cladosporium cladosporioides*. Colonia en SDA anverso (A), reverso de la colonia (B), conidióforo y conidias en Nomarski 40X (C).

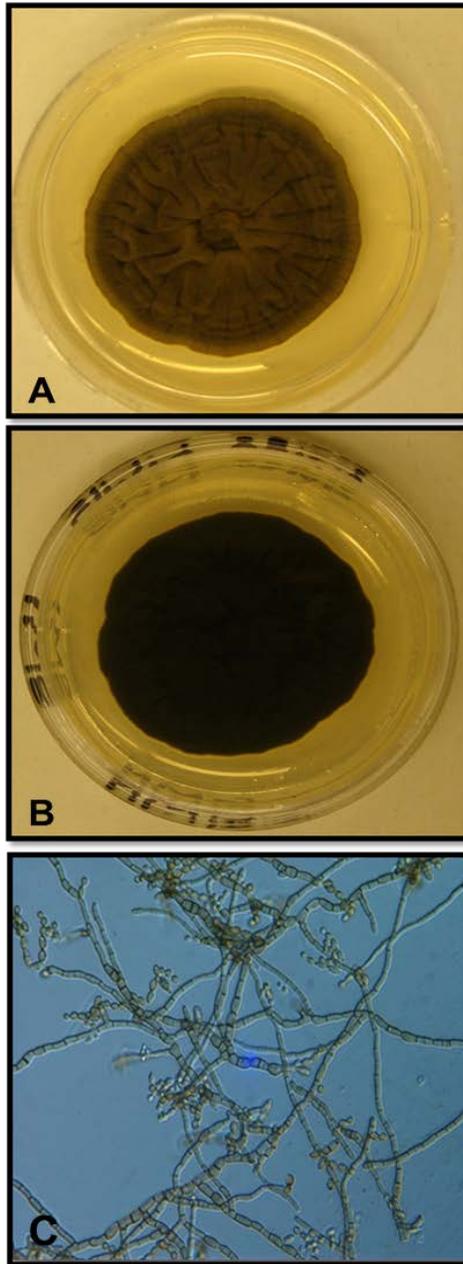


Figura 13. Características morfológicas de *Cladosporium sphaerospermum*. Colonia en SDA anverso (A), reverso de la colonia (B), conidióforo y conidias en microscopio Nomarski 40X (C).

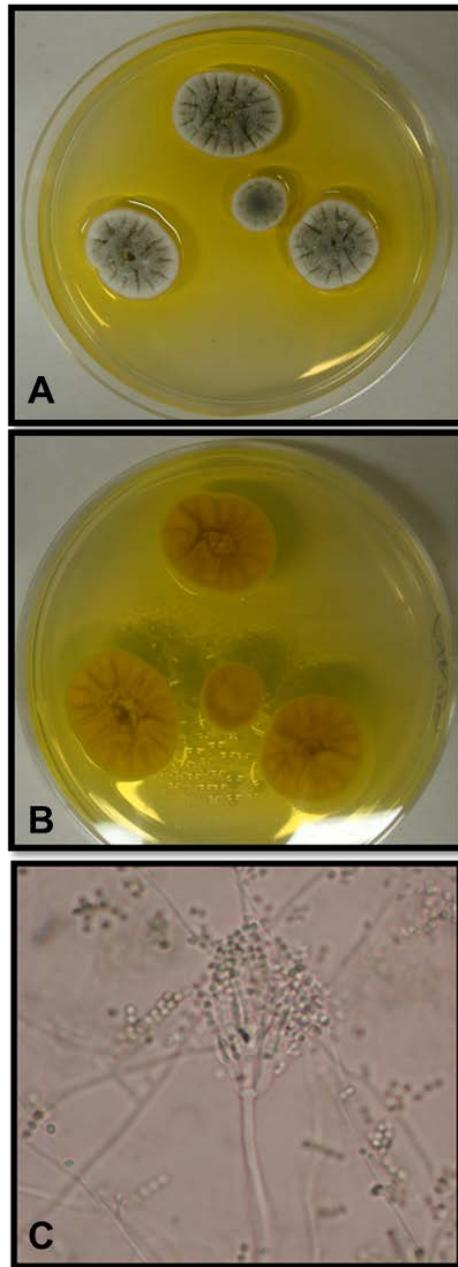


Figura 14. Características morfológicas de *Penicillium corylophilum*. Colonia en CYA anverso (A), reverso de la colonia (B), conidióforo y conidias en microscopio de luz 60X (C).

3.3 COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA DEL SUELO ENRIQUECIDO CON GUANO MEDIANTE EXTRACCIÓN DE ADN DE CULTIVOS PURO

De los géneros identificados, se seleccionaron 40 colonias representativas y se procesaron con el *FastDNA®SPIN for Soil Kit* para la extracción de ADN y corroborar la identificación basada en claves taxonómicas. Para corroborar la extracción efectiva de ADN de los hongos seleccionados se corrió una electroforesis en gel de agarosa, en la cual se podía observar una banda de gran peso, 10,000 pares de bases aproximadamente (Figura 14).

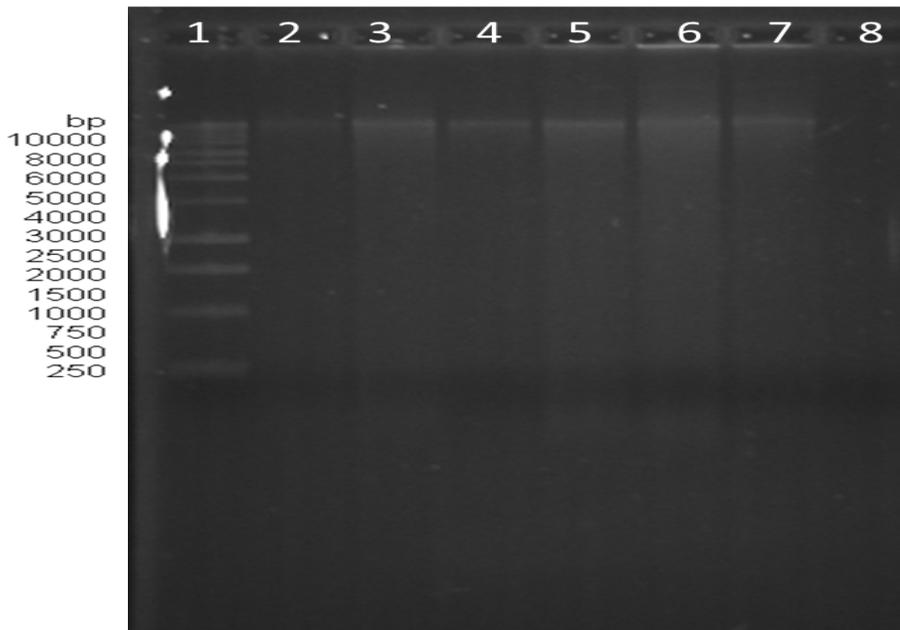


Figura 15. Gel de extracción ADN de cultivos puros: 1) Marcador 1 Kb , 2) *Aspergillus fumigatus*, 3) *Aspergillus parasiticus*, 4) *Penicillium euglaucum* 5) *Aspergillus tamarii*, 6) *Geotrichum* spp., 7) *Cladosporium cladosporoides*, y 8) *Aspergillus caelatus*

Luego de extraer el ADN se amplificó mediante PCR la región ITS₁-5.8S-ITS₂ (Figura 3), la cual tiene un tamaño de aproximadamente 500-550 pares de bases (Figura 16). Entre los resultados de la secuenciación, se pueden observar los cromatogramas, en la Figura 17, los

cuales se utilizaron para editar las secuencias. Estas secuencias editadas fueron comparadas en *GeneBank* para identificarlas y realizar los análisis filogenéticos correspondientes.

La filogenia se preparó utilizando el análisis por comparación de pares. El análisis sugiere que especies de *Aspergillus* (Figura 18) como *A. caelatus* comparten la ramificación con organismos de su misma especie y representantes de *A. tamaritii*. En la ramificación de *A. fumigatus* agrupó individuos similares, mientras que *A. sojae*, *A. parasiticus* y *A. tamaritii* se agruparon en ramificaciones lejanas a secuencias seleccionadas del *GenBank* dentro de su misma especie. *A. parasiticus* y *A. tamaritii* comparten ramificación, sugiriendo, al utilizar el método *Maximum Composite Likelihood*, para construir el árbol filogenético, que estas dos especies comparten un taxón evolutivo.

Tanto en la filogenia generada para los morfotipos representativo de *Fusarium cf. oxysporium*, *Geotrichum* spp., *Geotrichum candidum*, *Oidiodendron* spp., *Paecilomyces* spp. *Penicillium euglaucum*, *Penicillium corylophilum* y *Rhodotorula mucilaginosa* (Figura 19) y *Cladosporium cladosporioides*, *C. oxysporum* y *C. sphaerospermum* (Figura 20) se observa que comparten ramificaciones con organismos de su misma especie.

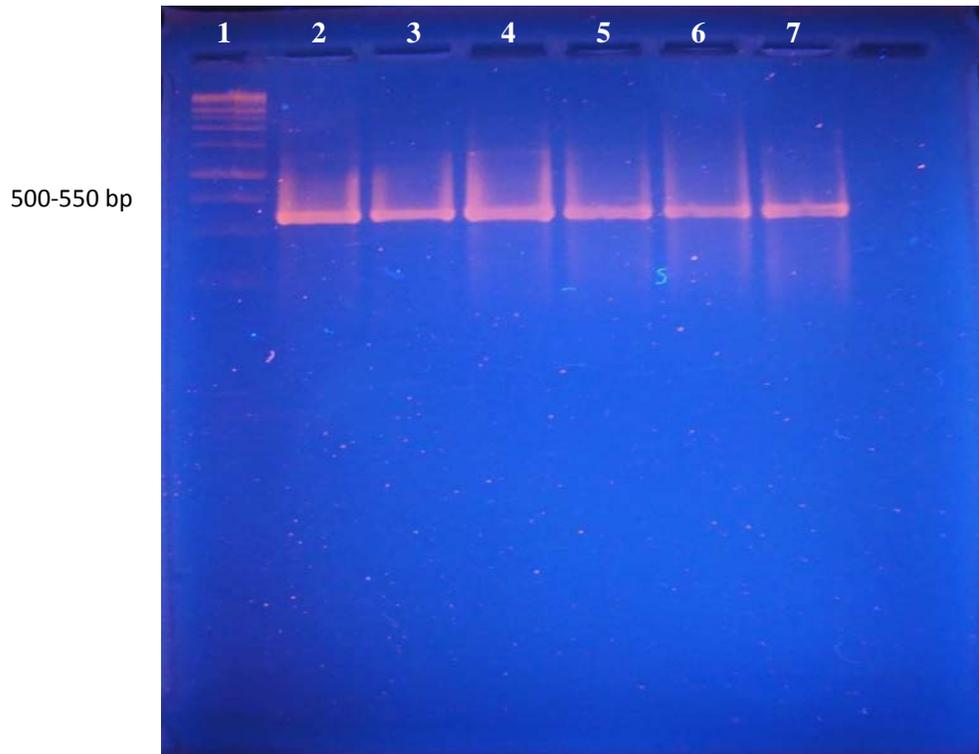


Figura 16. Gel de PCR de muestras de ADN extraído de cultivos puros. 1) Marcador 1 Kb ,2) *Aspergillus fumigatus*, 3) *Aspergillus parasiticus*, 4) *Penicillium euglaucum* 5) *Aspergillus tamarai*, 6) *Geotrichum* spp., 7) *Cladosporium cladosporoides*.

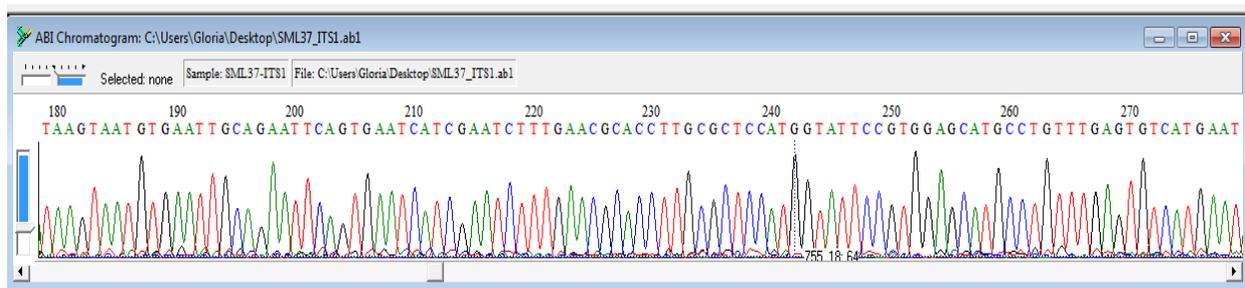


Figura 17. Cromatograma de secuencia de ADN de la levadura *Rhodotorula mucilaginosa*.

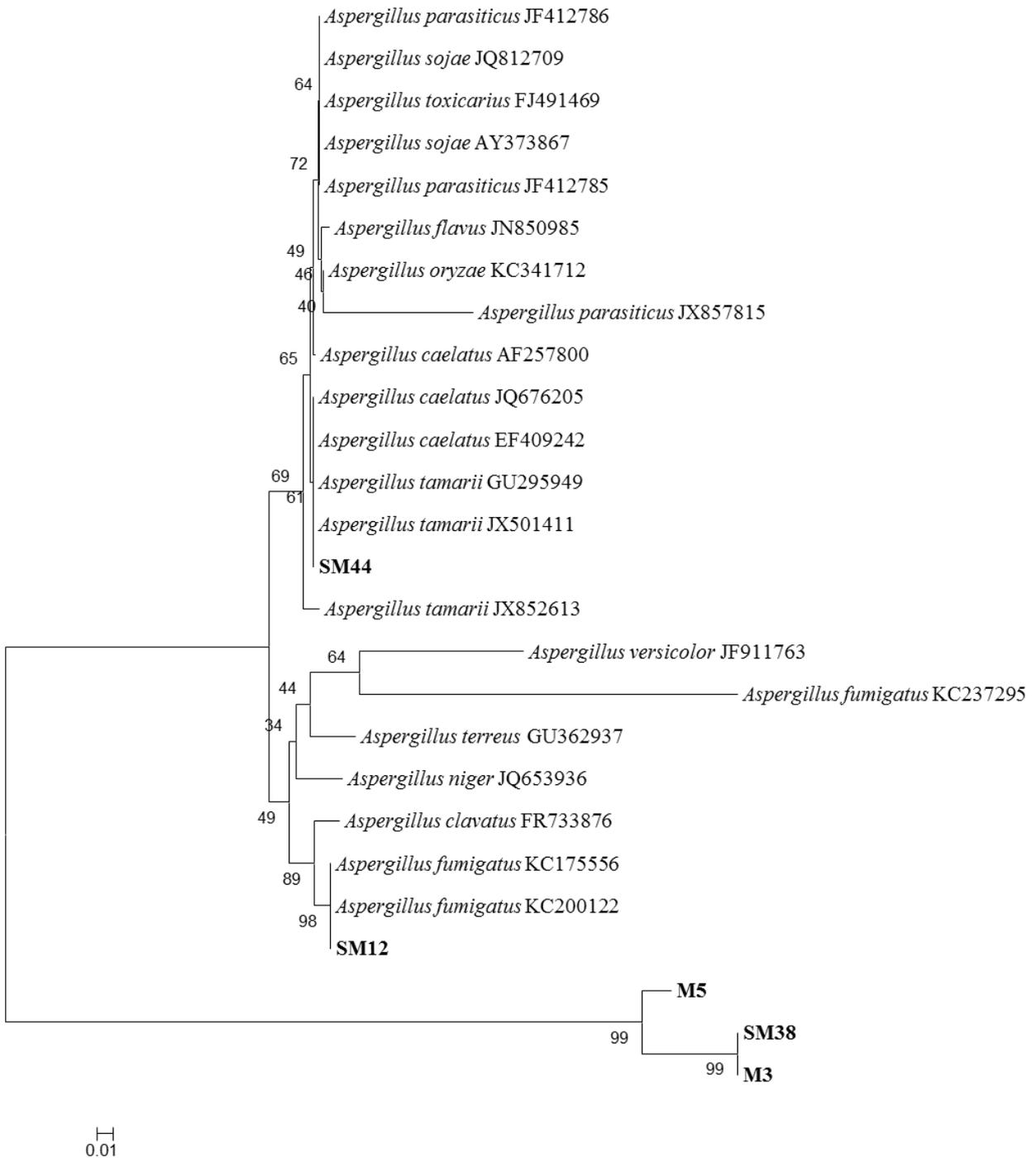


Figura 18. Arbol filogenético basado en el *Neighbour-joining* en la región rDNA-ITS de las especies del género *Aspergillus*. Los aislados en esta investigación son : M3, SM 38, M5, SM12, SM44.

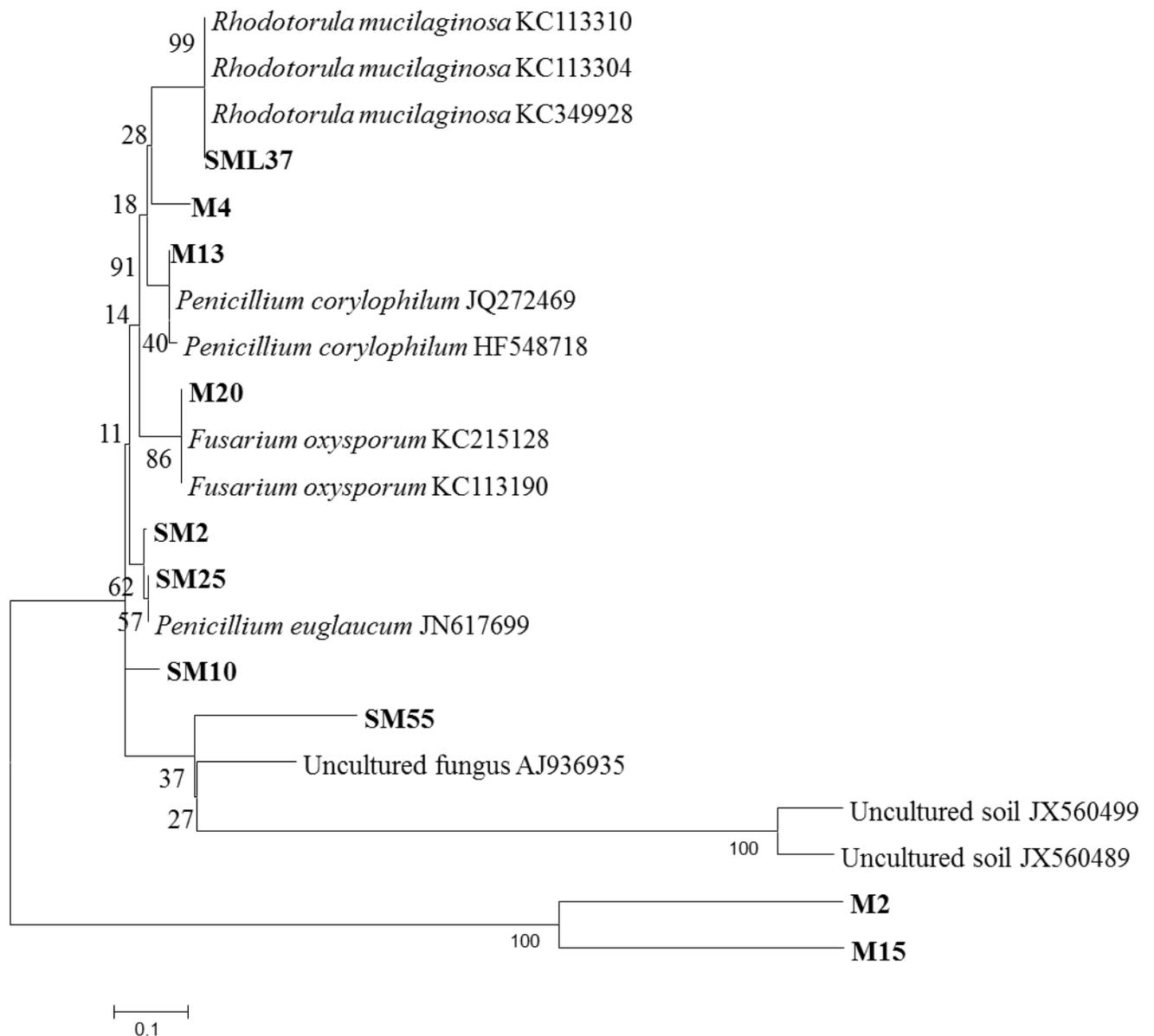


Figura 19. Arbol filogenético basado en el *Neighbour-joining* en la región rDNA-ITS de especies de *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhodotorula*, *Oidiodendron*, *Unciniocarpus*, *Paecilomyces* y *Geotrichum*. Los aislados en esta investigación son : M2, M15, SM55, SM10, SM25, SM2, M20, M13, M4, y SML37.

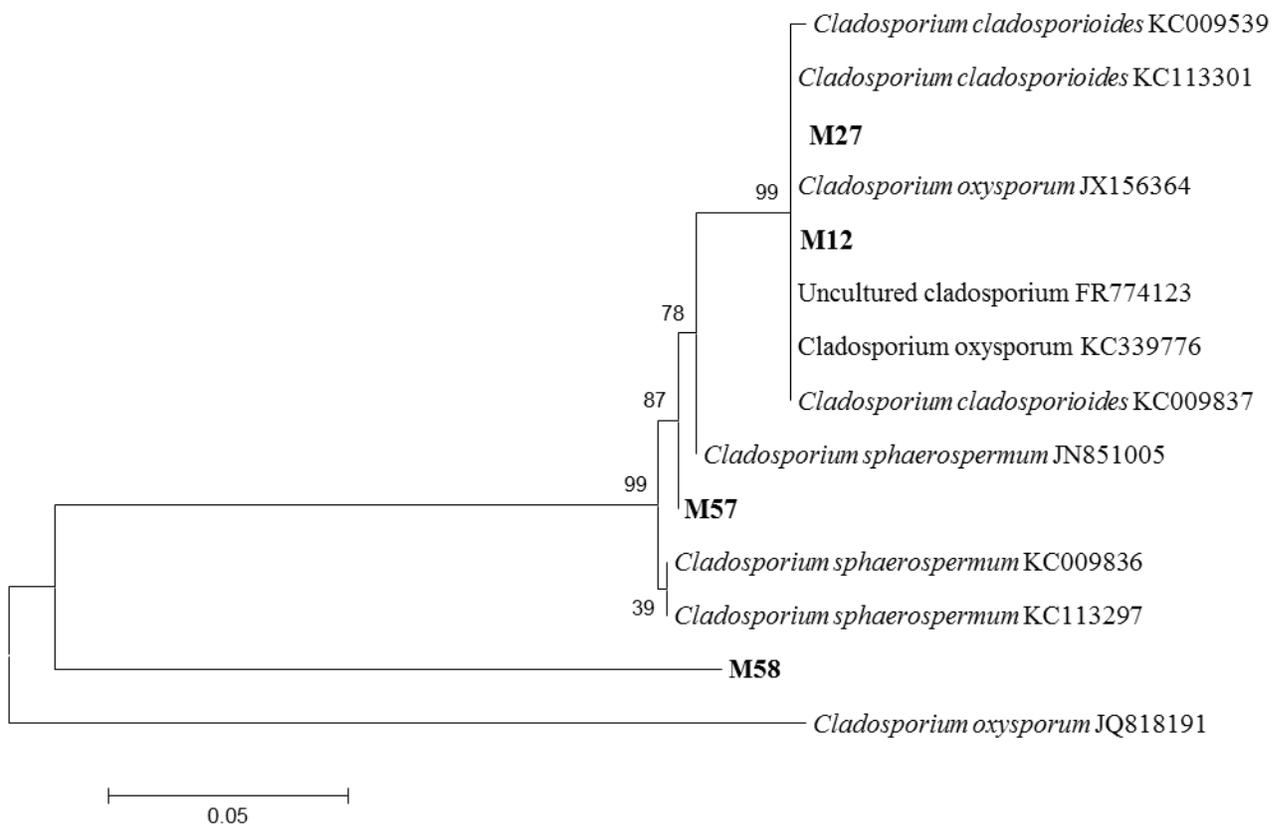


Figura 20. Arbol filogenético basado en el *Neighbour-joining* en la región rDNA-ITS de las especies del género *Cladosporium*. Los aislados en esta investigación son M58, M57, M12 y M27.

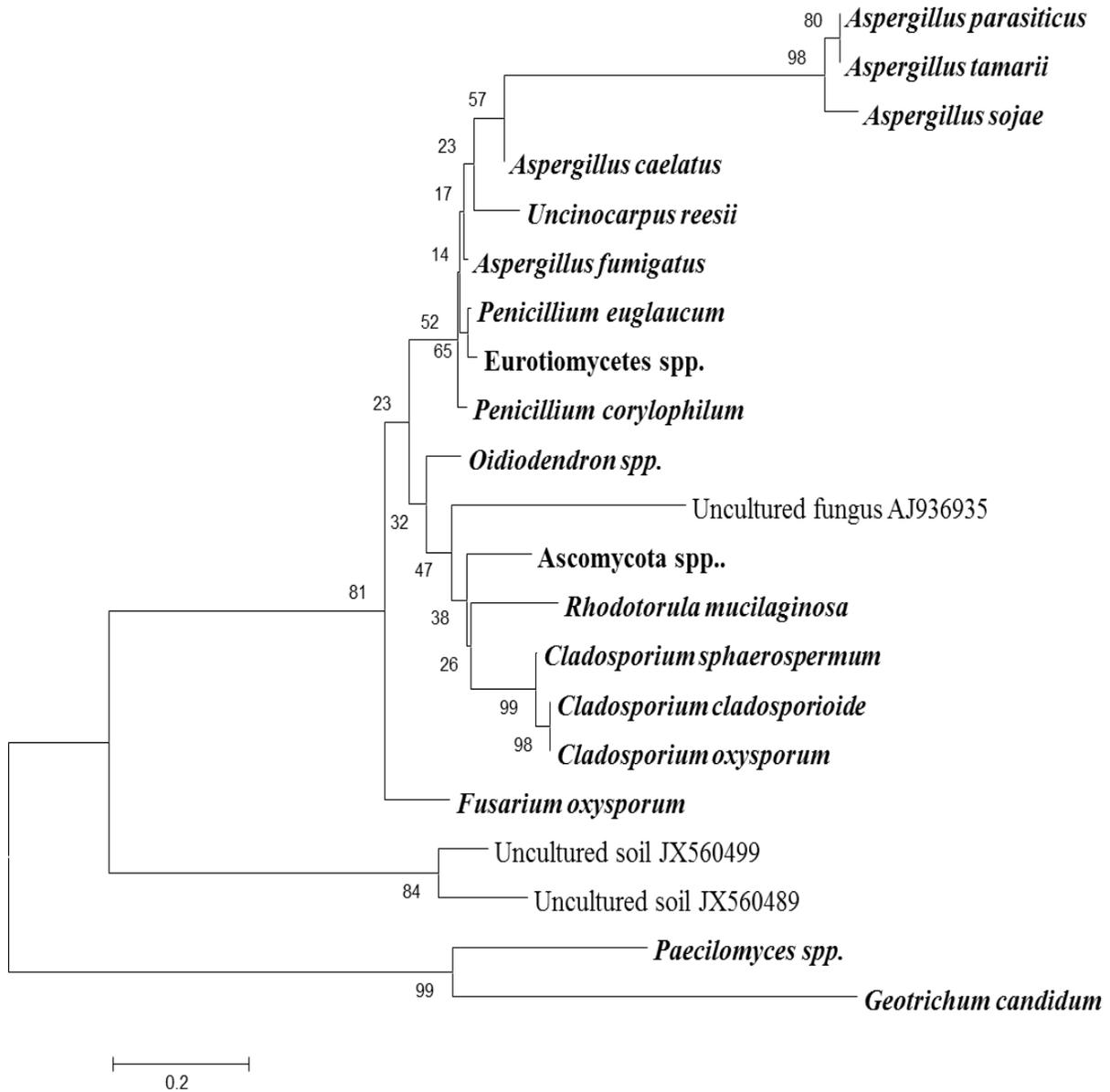


Figura 21. Arbol filogenético basado en el *Neighbour-joining* en la región rDNA-ITS de los 19 microorganismos identificados en los muestreos a la cueva de Los Culebrones en la Reserva Mata de Plátano en Arecibo, Puerto Rico (en negrillas).

3.4 COMPOSICIÓN DE MICOFLORA: ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Al llevar a cabo el agrupamiento por similitud con el índice de Jaccard (Figura 22), para observar cuales organismos crecieron por zona de la cueva, tomando en consideración los 19 microorganismos identificados, se observa que *Fusarium cf. oxysporium* (11) y *Geotrichum candidum* (13) se aislaron de las zonas de entrada y medio de la cueva. *Aspergillus tamarisii* (5) y *Aspergillus sojae* (6) se aislaron de muestras de las zonas de entrada y final, mientras que *Aspergillus fumigatus* (3), *Aspergillus parasiticus* (4) y *Rhodotorula mucilaginosa* (18) se aislaron de todas las zonas muestreadas. Los hongos que sólo se aislaron de la entrada de la cueva fueron: *Cladosporium cladosporioides* (7), *C. oxysporum* (8), *Oidiodendron* spp. (14) y *Paecilomyces* spp. (15). En adición, en el dendrograma se puede observar que los hongos solo identificados como Ascomycota (1), *Cladosporium sphaerospermum* (9), *Geotrichum* spp. (12), *Penicillium corylophilum* (17) y *Uncinocarpus reesii* (19) se aislaron sólo de la zona media aislados de *Aspergillus caelatus* (2) y *Penicillium euglaucum* (16), crecieron sólo en la zona media y final de la cueva, mientras que representantes de los *Eurotiomycetes* (10), solamente se aislaron de la zona final.

De acuerdo con los resultados del agrupamiento con el índice de Jaccard (Figura 22), para los hongos aislados por zona de muestreo, temperatura de incubación y la muestra de la que se pudo aislar el hongo, podemos observar con más detalle la procedencia del espécimen. Siendo *Rhodotorula mucilaginosa* (Sp18) quien se logro aislar de todas las zonas, muestras y temperaturas proporcionadas para que crecimientos de los hongos. Al igual que el Sp3, *Aspergillus fumigatus*, el cual se observar crecimiento en la mayoría de las muestras excluyendo

solo las segundas muestras extraídas del medio de la cueva. En adición, *Aspergillus parasiticus*, Sp4, también se pudo identificar en las tres zonas y en las tres temperaturas en varias muestras.

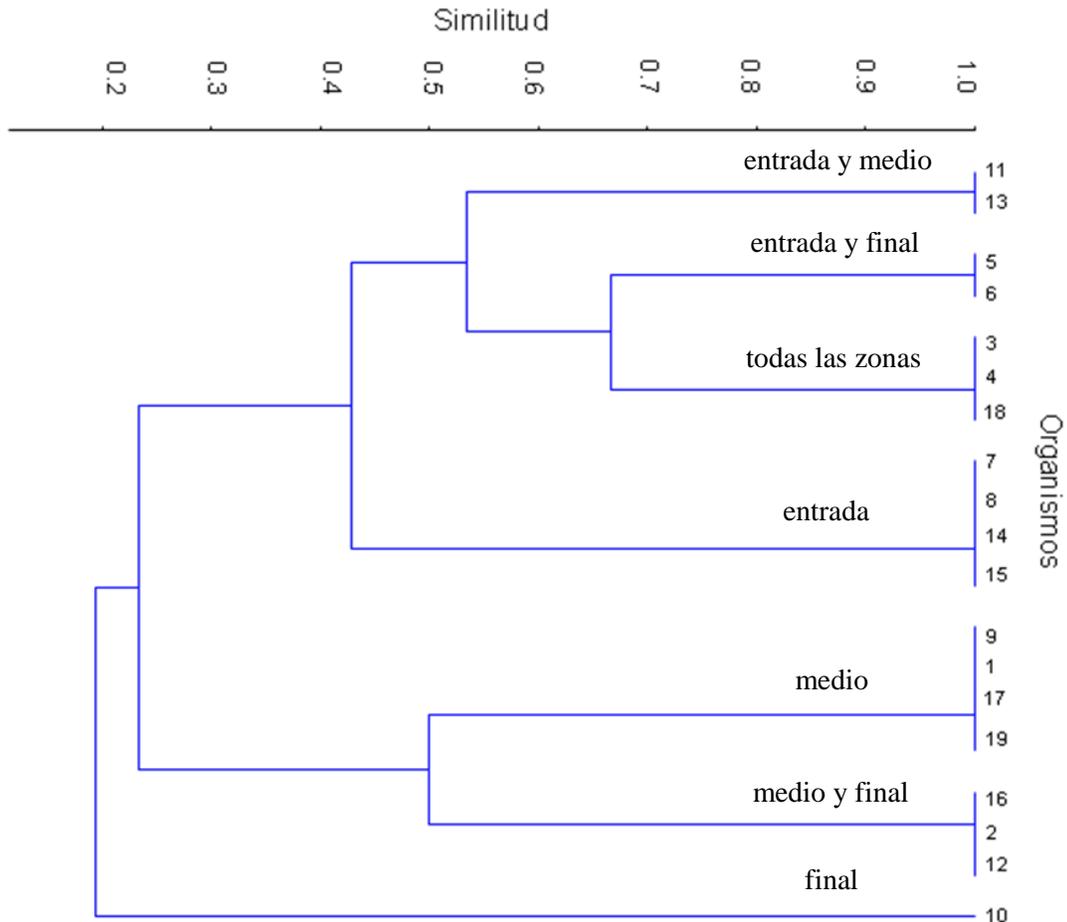


Figura 22. Dendrograma de agrupamiento basado en ausencia/presencia de las especies identificadas por zona, utilizando el índice de Jaccard. Organismos: 1) Ascomycota., 2) *Aspergillus caelatus*, 3) *Aspergillus fumigatus*, 4) *Aspergillus parasiticus*, 5) *Aspergillus tamarisii*, 6) *Aspergillus sojae*, 7) *Cladosporium cladosporioides*, 8) *Cladosporium oxysporum*, 9) *Cladosporium sphaerospermum*, 10) Eurotiomycetes 11) *Fusarium cf. oxysporum*, 12) *Geotrichum* spp., 13) *Geotrichum candidum*, 14) *Oidiodendron* spp., 15) *Paecilomyces* spp, 16) *Penicillium euglaucum*, 17) *Penicillium corylophilum*, 18) *Rhodotorula mucilaginosa* y 19) *Uncinocarpus reesii*.

Los valores de abundancia relativa, por género, de los hongos identificados de muestras del medio de la cueva, sugieren que los especímenes más abundantes pertenecen al género *Aspergillus* en todas las zonas de la cueva para ambos muestreos. El segundo género más abundante en las tres zonas muestreadas y en ambos muestreos estuvo representado por *Rhodotorula*, una levadura cosmopolita.

Tabla 3. Identificación de la micobiota de la Cueva de los Culebrones, en la Reserva Mata de Plátano, Arecibo Puerto Rico utilizando NCBI Blast*.

Hongo Identificado*	Secuencia de pareo	% de identidad	Área de recolección ¹	Temperatura de incubación ²	Morfotipos de hongo aislado
<i>Ascomycota spp.</i>	HQ607792	99	2	2	M58
<i>Aspergillus caelatus</i>	EF661550	100	2,3	2	SM40, SM44,SM46
<i>Aspergillus fumigatus</i>	GU594751	100	1,2,3	1,2,3	M7, M23, M56, SM12, SM47, SM61
<i>Aspergillus parasiticus</i>	HQ285604	100	1,2,3	1,2,3	M10, M40, M62, SM23, SM30, SM50, SM70
<i>Aspergillus tamarii</i>	JF901808	100	1,3	2,3	M3, M26, M51, SM63
<i>Aspergillus sojae</i>	JQ812709	100	1,3	1,2	M5, SM38, SM39
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	HQ660443	99	1	1,2	M12, SM1,SM6
<i>Cladosporium oxysporum</i>	JX156364	100	1	1,2	M27, M42, SM22
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	AB572902	99	2	1,2	M35, M57, SM4, SM13, SM42
<i>Eurotiomycetes spp</i>	JX174144	100	3	1	SM2
<i>Fusarium cf. oxysporium</i>	JX847749	98	1	2	M20
<i>Geotrichum spp.</i>	JQ736794	97	2	3	M39, M48, SM55,SM66
<i>Geotrichum candidum</i>			1,2	1	M15, SM35
<i>Oidiodendron spp.</i>	JX270606	99	1	1	SM10
<i>Paecilomyces spp</i>	AB725396	100	1	1	M2
<i>Penicillium euglaucum</i>	JN617699	99	2,3	1	SM25
<i>Penicillium corylophilum</i>	JN585947	100	2	1	M13
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	EF174513	100	1,2,3	1,2,3	ML25,ML37, ML40, SML25,SML37,S ML40
<i>Uncinocarpus reesii</i>	AB361647	99	2	1	M4,M17

1. Área de recolección: 1= entrada, 2= medio, 3= final; Temperatura: 1= 25°C, 2= 37°C, 3= 40°C

* <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

4 DISCUSIÓN

El enfoque principal de esta investigación consistió en aislar los hongos miceliales del suelo enriquecido con guano de la Cueva de Los Culebrones de la Reserva Mata de Plátano en Arecibo. Este estudio es el primero en combinar técnicas dependientes de cultivo con el uso de técnicas moleculares para documentar la composición de hongos asociados al suelo enriquecido con guano de una cueva en Puerto Rico. Se obtuvieron un total de 199 morfotipos de hongos guanofílicos aislados provenientes de tres temperaturas 25, 37 y 40 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ proporcionadas para simular las condiciones físicas de la cueva de ambos muestreos realizados. La identificación de estos hongos se basó en las características macroscópicas en cultivo puro, la caracterización microscópica mediante técnicas de microscopia de luz y Nomarsky y el análisis comparativo de secuencias de ADN correspondiente a la región ITS y 5.8S del rRNA. Los 199 morfotipos representaron 16 hongos miceliales y 3 levaduras. Estos 19 hongos están clasificados bajo nueve géneros distintos, algunos con más de una especie representada: *Aspergillus caelatus*, *A. fumigatus*, *A. parasiticus*, *A. tamarii*, *A. sojae*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. oxysporum*, *C. sphaerospermum*, *Fusarium oxysporium*, *Geotrichum* spp., *G. candidum*, *Oidiodendron* spp., *Paecilomyces* spp, *Penicillium euglaucum*, *P. corylophilum*, *Rhodotorula mucilaginosa* y *Uncinocarpus reesii*. En adición, se asociaron mediante análisis del ADN al morfotipo M58 bajo el filo Ascomycota y el morfotipo SM2 dentro de la clase Eurotiomycetes.

Aspergillus fumigatus, *A. parasiticus* y la levadura *Rhodotorula mucilaginosa*., fueron aislados de ambos muestreos, en las tres áreas de muestreo de la cueva y a 25, 37 y 40 $\pm 2^{\circ}\text{C}$. En la temperatura de 40 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ se pudo aislar los hongos miceliales *Aspergillus fumigatus*, *A. parasiticus*, *A. tamarii*, las levaduras *Geotrichum* spp. y *Rhodotorula mucilaginosa*. A 37 $\pm 2^{\circ}\text{C}$

se pudieron identificar los hongos y levaduras: *A. caelatus*, *A. parasiticus*, *A. fumigatus*, *A. tamarri*, *A. sojae*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. oxysporum*, *C. sphaerospermum*, *Fusarium oxysporium* y *Rhodotorula mucilaginosa*. A temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) se identificaron hongos cosmopolitas que son frecuentemente aislados de ambientes externos que incluyen a *A. fumigatus*, *A. sojae*, *C. cladosporioides*, *C. oxysporum*, *C. sphaerospermum*, Eurotiomycetes spp., *Geotrichum candidum*, *Oidiodendron* spp., *Paecilomyces* spp., *Penicillium euglaucum*, *P. corylophilum*, *Rhodotorula mucilaginosa*, excepto *Uncinocarpus reesii*, del cual se tiene poca información sobre su distribución y ocurrencia. La recuperación de estos hongos miceliales y levaduras a temperaturas de $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ y $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ sugiere que el suelo enriquecido con guano en la cueva sirve como reservorio de estructuras fúngicas, las cuales podrían representar un riesgo para la salud de personas que gustan de visitar la cueva.

Aspergillus fumigatus, no es la especie del género *Aspergillus* más prevalente en el mundo, pero sí es una de las más ubicuas (Mullins *et al.*, 1976). Este hongo esporula abundantemente, produciendo miles de conidias en cada conidióforo (Latgé, 1999). La inhalación de sus conidias por personas inmunocompetentes rara vez causa algún efecto adverso, ya que las conidias son eliminadas eficientemente por el mecanismo de inmunidad innata (Dixon y Walsh, 1992). Sin embargo, *A. fumigatus* se describe como un patógeno débil responsable de enfermedades alérgicas y aspergilomas (Kwon-Chung y Bennett, 1992). Otras especies del género *Aspergillus* que se describen como agentes comúnmente invasivos, oportunistas o que generan enfermedades micóticas sistemáticas incluyen a *A. flavus*, *A. terreus*, *A. nidulans*, *A. parasiticus* y *A. niger* (Summerbell, 1998). En adición, la mayoría de las especies de *Aspergillus* están asociadas a la producción de micotoxinas como fumitremorgina, gliotoxina y

verrucolígeno (*A. fumigatus*), aflatoxinas (*A. parasiticus* y *A. tamarii*) (Reijula y Tuomi, 2003). Las fumonisinas, otras micotoxinas muy potentes, se asocian comúnmente a especies del género *Fusarium* (Abarca *et al.*, 2000). Las micotoxinas son metabolitos secundarios fúngicos capaces de desencadenar diversas alteraciones y cuadros patológicos en hombre y animales. Las toxinas de *Aspergillus* tienen un importante rol en causar efectos directos al tracto respiratorio, que incluyen daño al epitelio y membranas mucosas, degenerando en desórdenes pulmonares. Por otro lado, aunque la especie *A. sojae* se entiende que es una cepa domesticada de *A. parasiticus*, no produce aflatoxinas (Chang, 2004).

Rhodotorula mucilaginosa, una levadura que se caracteriza por su color rojo coral, anteriormente se consideraba un saprófito no virulento (Galán-Sánchez *et al.*, 1999). Sin embargo, en investigaciones anteriores se demostró que en pacientes inmunodeficientes o bajo un tratamiento prolongado de inmunosupresión, esta levadura puede causar una serie de infecciones incluyendo fungemia (Rusthoven *et al.*, 1984), dacriocistitis crónica (Muralidhar y Sulthana, 1995), endooftalmitis crónica (Gregory y Haller, 1992), queratitis (Guerra *et al.*, 1992), peritonitis en diálisis peritoneal (Pennington *et al.*, 1995), esofagitis (Young *et al.*, 1993), endocarditis (Louria *et al.*, 1967), meningitis (Pore y Chen, 1976) y pneumonia (Kennedy, 1990).

Por otro lado, varias especies del género de *Cladosporium* también tienen sus efectos patogénicos en los humanos. Se conoce que causa faeohifomicosis cerebral y cutánea (de Hoog *et al.*, 1995) y es un aero alérgeno fuerte que causa alergias severas en el tracto respiratorio, en adición a lesiones intrabronquiales (Tasic y Miladinovic-Tasic, 2007).

Es de suma importancia tener conocimiento de los micobiotas presente en ambientes extremos como lo son las cuevas, ya que la exposición excesiva a las estructuras de reproducción

de algunos hongos y levaduras puede causar daño a la salud (Abarca *et al.*, 2000, Chang, 2004, Reijula y Tuomi, 2003). La peculiaridad de Cueva de los Culebrones, en la reserva Mata de Plátano en Arecibo es el aumento en temperatura y humedad desde la entrada hasta el final de la cueva. Para la zona de muestreo en la entrada de la cueva se registraron temperaturas promedio de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, en el centro la temperatura promedio los $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y en la zona final la temperatura promedio los $39 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Para otras cuevas, este patrón de aumento en temperatura no se ha documentado (Ditmmar *et al.*, 2011). La microbiota formada mayormente por los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Geotrichum*, *Cladosporium*, *Rhodotorula* de Cueva de los Culebrones coincide con resultados de investigaciones realizadas en seis cuevas del sureste de la India (Koilaraj *et al.*, 1999), donde se aislaron treinta y cinco especies de hongos esporuladores mesofílicos y siete tipos de hongos no esporuladores de muestras de suelo en tres áreas de las cuevas. En la investigación de Koilarj *et al.*, 1999 los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* fueron los mas frecuentes en todas las tres zonas. En la entrada de las cueva, se aislaron diez especies y entre ellos se identificó a *Fusarium* spp y *Geotrichum candidum*. En el artículo de revisión de Vanderwolf *et al.*, 2013 donde hace referencia a 225 artículos científicos, se concluye que los diez géneros más frecuentemente reportados incluyen *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Paecilomyces*, *Acremonium* y *Chrysosporium*. Resultados similares a esta investigación en los cuales se obtuvieron morfotipos de los generos *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium* y *Paecilomyces*.

Investigaciones en la cueva Lascaux, Montignac en Francia (Dupont *et al.*, 2007) se recuperaron representantes de seis géneros: *Chrysosporium*, *Gliocladium*, *Gliomastix*, *Paecilomyces*, *Trichoderma* y *Verticillium* de los cuales solo el género *Paecilomyces* fue

recuperado en este estudio. Estudios en la Cueva Mogao Grottoes en Dunhuang, China documentó los géneros *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus* y *Penicillium* como los más predominantes, al estudiar la dinámica de las esporas de hongos en el aire por época (Wang *et al.*, 2010). Trabajos en la cueva Lechuguilla en México (Cunningham *et al.*, 1995), en el Sistema de Cueva Dominica (Nováková, 2009b) y en diversas cuevas en Puerto Rico (Nieves-Rivera, 2003 & Nieves-Rivera *et al.*, 2009), también obtuvieron similares resultados a los obtenidos en la presente investigación, con la dominancia de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium* y *Paecilomyces* en estos ambientes.

Estudios comparativos de la micobiota en el exterior y el interior de cuevas por Dickson y Kirk (1976) en cuevas del estado de Virginia, Volz y Yao (1991) en cuevas del estado de Michigan y Hsu and Agoramoorthy (2001) en una cueva en Taiwan encontraron una gran cantidad de especies saprofitas en suelo fuera de la cueva en comparación con el interior de la misma. Resultados similares observaron Koilraj *et al.*, (1999) al recuperar una mayor abundancia de géneros de hongos en el sedimento en la entrada de la cueva en comparación con el interior (por ejemplo, *Aspergillus* y *Penicillium*), mientras que otros géneros fueron más prevalentes en el interior de la cueva (por ejemplo, *Absidia*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Chaetomium* y *Sepedonium*). Estos datos son muy similares a los de este estudio, ya que se pudo aislar una mayor cantidad de géneros en la entrada de la cueva que en el interior. En el primer muestreo se aisló *Aspergillus* (48%), *Cladosporium* (19%), *Fusarium* (3%), *Paecilomyces* (5%), *Geotrichum* (14%), *Rhodotorula* (11%), y en comparación con el interior de la cueva donde se identificaron los géneros *Aspergillus* (71%), *Penicillium* (17%) y *Rhodotorula* (12%). En el segundo muestreo también se recuperó a *Aspergillus* (40%), *Cladosporium* (26%), *Geotrichum* (14%), *Oidiodendron* (9%) y *Rhodotorula* (11%) y en el interior de la cueva se recuperaron los géneros

Aspergillus (38%), *Penicillium* (31%) y *Rhodotorula* (23%). Estos resultados también son comparables con resultados obtenidos en la investigación aerobiológica de Fernández-Cortés *et al.*, 2011 donde encontraron que las esporas de *Cladosporium* fueron más abundantes en el aire en la entrada de la cueva en comparación con el interior, mientras que *Penicillium* mostró un patrón opuesto.

Los resultados obtenidos en esta investigación representan la base para futuros estudios micológicos en el área del karso y cuevas de Puerto Rico. La documentación de que existe una amplia variedad de hongos miceliales cultivables en la Cueva de los Culebrones que pudieran representar un peligro potencial a la salud humana provee información importante que nos ayudará a visitarlas y a la debida toma de precauciones.

Además, se documenta por primera vez la presencia de *Uncinocarpus resii* en cuevas de Puerto Rico. Esta información es bien relevante sobretodo al tomar en consideración que este hongo se ha relacionado evolutivamente a *Coccidioides immitis*, un patógeno atípico que habitan en el suelo, hongo filamentoso, causal de una enfermedad respiratoria humana conocida como coccidioidomicosis o fiebre del Valle de San Joaquin (Shuchong, *et al.*, 1994).

5 CONCLUSIÓN Y TRABAJOS FUTUROS

- Esta investigación representa el primer inventario de hongos asociados a suelo enriquecido con guano en Cueva de los Culebrones en la Reserva Mata de Plátano (Arecibo, Puerto Rico), combinando técnicas dependientes de cultivo y técnicas moleculares.
- Se identificaron un total de dieciséis hongos miceliales y tres levaduras del suelo enriquecido con guano de la cueva. Estos se clasifican dentro de nueve géneros: *Aspergillus caelatus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus sojae*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium oxysporum*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Fusarium oxysporium*, *Geotrichum* spp., *Geotrichum candidum*, *Oidiodendron* spp., *Paecilomyces* spp, *Penicillium euglaucum*, *Penicillium corylophilum*, *Rhodotorula mucilaginosa* y *Uncinocarpus reesii*. En adición, el morfotipo M58 identificado molecularmente como Ascomycota spp. y el morfotipo SM2 como Eurotiomycetes spp.
- *Aspergillus fumigatus*, *A. parasiticus* y *Rhodotorulla mucilaginosa* se pudieron aislar de muestras recolectadas de las tres zonas de la cueva incubadas a las tres temperaturas representativas de cada zona de muestra.
- *Aspergillus fumigatus*, *A. parasiticus*, *A. tamarii*, *Geotrichum* spp y *Rhodotorula mucilaginos* podrían clasificarse como hongos termófilos, debido a que pudieron crecer a $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$. *A. caelatus*, *A. parasiticus*, *A. fumigatus*, *A. tamarii*, *A. sojae*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. oxusporum*, *C. sphaerospermum*, *Fusarium oxysporium* y

Rhodotorula mucilaginosa mostraron crecimiento a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$, mientras que a temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) se identificaron representantes de *A. fumigatus*, *A. parasiticus*, *A. sojae*, *C. cladosporioides*, *C. oxysporum*, *C. sphaerospermum*, Eurotiomycetes ., *Geotrichum candidum*, *Oidiodendron* spp., *Paecilomyces* spp., *Penicillium euglaucum*, *P. corylophilum*, *Rhodotorula mucilaginosa* y *Uncinocarpus reesii*.

- *Aspergillus sojae*, *Fusarium oxysporium*, *Paecilomyces* spp., Eurotiomycetes . y Ascomycota . solo se recuperaron en el primer muestreo (10 de enero) y *Oidiodendron* spp., *A. caelatus* y *Uncinocarpus reesii* sólo se recuperaron de muestras correspondientes al segundo muestreo (21 de noviembre 2009).
- Debido a que se documentó la presencia de *A. fumigatus*, *A. parasiticus* y *Rhodotorula mucilaginosa* en todas las zonas muestreadas en la cueva, se recomienda que al entrar a la cueva se lleve el equipo de protección pertinente tales como: mascarilla para particulado fino para evitar la inhalación excesiva de estructuras fúngicas de estos hongos, que han sido reportados anteriormente como hongos oportunistas. En adición, la vestimenta encubridora y zapatos cerrados podrían impedir que ocurra alguna laceración y que las conidias y células levaduriformes se introduzcan al sistema sanguíneo y se genere alguna afección sistémica (Galán-Sánchez *et al.*, 1999).
- Aunque mediante técnicas dependientes de cultivo se logró recuperar un número aceptable de hongos miceliales y levaduras asociados a suelo enriquecido con guano, se entiende que es una población mínima comparada con la que se podría recuperar al trabajar técnicas independientes de cultivo. Por tal razón, se recomienda que en trabajos futuros se logre la optimización de técnicas moleculares para hacer posible la extracción

de ADN total del suelo enriquecido por guano, hacer el inventario independiente de cultivo y así comparar la variedad de géneros y especies de hongos en este ambiente.

- Algunos de los cultivos de estos hongos presentan exudado, los cuales son un posible potencial para generar una investigación de metabolitos secundarios que presenten características de inhibición de crecimientos a bacterias.
- Se sugiere monitorear la flora micótica asociada a la población de murciélagos residentes en Cueva de los Culebrones, para así relacionar su influencia a la composición de hongos dentro del entorno de la cueva.
- Se podrían llevar a cabo investigaciones que relacionen la temporada del año con la cantidad de hongos aislados y visualizar si la variación de temperatura en la cueva se ve afectada por ésta.
- Por otro lado, se conoce que la variación de tiempo de incubación puede inferir en la cantidad de hongos que se puedan identificar, ya que existen hongos que su tasa de crecimiento es lento. Por tal razón, se podría llevar un estudio similar al que aquí se presentó, en donde se varíe el tiempo de incubación para determinar si la diversidad de hongos recuperados aumente conforme al tiempo de incubación.

REFERENCIAS

- Abarca, L., M. Bragulat, G. Castellá, F. Accensi y F.J. Cabañes. 2000. Hongos productores de micotoxinas emergentes. *Revista Iberoamericana de Micología*. 17: S63-S68.
- Anderson, I.C. y J.W.G Cairney. 2004. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology*. 6(8): 769-779.
- Akkermans, A.D.L., S.M. Mirza, J.M. Harmsen, H.J. Blok, P.R. Herron, A. Sessitsch y W.M. Akkermans. 1994. Molecular ecology of microbe: a review of promises, pitfalls and true progress. *FEMS Microbiology Reviews* 15: 185-194.
- Apinis, A.E., C.G.C. Chesters y H.K. Toligoola. 1972. Microfungi colonizing submerged standing culms of phragmites communis trin. *Nova Hedwigia*. 23(2-3): 473-480.
- Bastian, F., C. Alabouvette y C. Saiz-Jiménez. 2009. The impact of arthropods on fungal community structure in Lascaux cave. *Journal of Applied Microbiology*. 106: 1456-1462.
- Bastian F., V. Jurado, A. Novakova, C. Alabouvette y C. Saiz-Jimenez. 2010. The microbiology of Lascaux Cave. *Microbiology*. 156: 644-652.
- Barton, H.A. 2006. Introduction to cave microbiology: A review for the non-specialist. *Journal of Cave and Karst Studies*. 68(2); 43-54.
- Barton, H.A. y V. Jurado. 2007. What's up down there? Microbial diversity in caves. *Microbe*. 2 (3): 132-138.
- Barron, G.L. 1968. The genera of hypomycetes from soil. Williams and Wilkins Co., Baltimore, Maryland. 354pp.
- Beck, B.F., M. Fram, y J.R. Carvajal-Zamora. 1976. The Aguas Buenas Caves, Puerto Rico: geology, hydrology and ecology with special reference to the histoplasmosis fungus: *National Speleological Society Bulletin*. 38: 1-16.

Betancourt, C., O. Pérez, D. Seguí y I. Emmanuelli. 1988. Evaluación micológica de la Cueva Ensueño, Hatillo, Puerto Rico [Unpubl. report]: Mayagüez, Puerto Rico, Estudio Técnico para la Compañía Lebrón & Associates, 14pp.

Bride, P.D. y D.K. Arora. 1998. Interpretation of PCR methods for species definition. En: Bridge PD, Arora DK, Reddy, CA y Elander, RP editores. Application of PCR in Mycology. CAB International, Wallingford, 63-84.

Carvajal-Zamora J.R., 1977. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil in the Aguas Buenas Caves, Aguas Buenas, Puerto Rico. I. An ecological approach. Mycopathologia. 60: 157-161.

Chang, P.K. 2004. Lack of interaction between AFLP and AFLJ contributes to nonaflatoxicity of *Aspergillus sojae*. Journal of Biotechnology. 107(3): 245-253.

Cunningham, K.I., D.E. Northrup, R.M. Pollastro, W.G. Wright, y E.J. Larock. 1995. Bacteria, fungi, and biokarst in Lechuguilla Cave, Carlsbad Caverns National Park. Environmental Geology. 25:2-8.

de Hoog, G.S., E. Gueho, F. Masclaux, A.H. Gerrits van den Ende, K.J. Know-Chung y M.R. McGinnis. 1995. Nutritional physiology and taxonomy of human-pathogenic *Cladosporium*-*Xylohyphes* species. Journal of Medical Veterinary Mycology. 33: 339-347.

Díaz-Martínez, R. 1972. Histoplasmosis aguda-epidemia en San Germán. Boletín de la Asociación Médica de Puerto Rico, 64: 291-294.

Díaz-Muñoz, G.M. 2006. Fungal diversity present at hypersaline environment in Cabo Rojo, Puerto Rico determined by characterization of isolates and analysis of environmental rRNA genes clones libraries. University of Puerto Rico, Mayaguez Campus. Master Sciences Thesis. 140 pp.

Dickson G.W. y P.W. Jr. Kirk. 1976. Distribution of heterotrophic microorganisms in relation to detritivores in Virginia caves (with supplemental bibliography on cave mycology and microbiology). En: Parker BC, Roane MK, editores. The distributional history of the biota of the

Southern Appalachians. Part IV. Algae and fungi. Charlottesville,VA: University Press of Virginia, 205-226.

Dittmar, K. y J.R. Mayberry. 2010. Bat activity in large roots drives diurnal cave microclimates variation. *Speleobiology Notes*. 2:12-14.

Dittmar, K, S. Morse, M. Gruwell, J. Mayberry y E. DiBlasi. 2011. Spatial and temporal complexities of reproductive behavior and sex ratios: A case from parasitic insects. *PLoS ONE*. 6(5): e19438.

Dixon, D. D., y T. J. Walsh. 1992. Human pathogenesis. In J. W. Bennett and M. A. Klich (ed.), *Aspergillus, biology and industrial application*. Butterworth-Heinemann, Boston, Mass. 249–267.

Dupont, J., C. Jacquet, B. Denetiere, S. Lacoste, F. Bousta, G. Oriol, C. Cruaud, A. Couloux y M. F. Roquebert. 2007. Invasion of the French Paleolithic painted cave of Lascaux by members of the *Fusarium solani* species complex. *Mycologia*. 99: 526–533.

Engel, A. 2007. Observations on the biodiversity of sulfidic karst habitats. *Journal of Cave and Karst Studies*, 69: 187–206.

Ewel, J.J. y J.L. Whitmore. 1973. The ecological life zones of Puerto Rico and the U.S. Virgin Islands. Forest Service Research Paper ITF, 18. U.S. Department of Agriculture Forest Service, Institute of Tropical Forestry, Río Piedras, Puerto Rico. 72 pp., 1 map.

Fernández-Cortés A., S. Cuezva, S. Sanchez-Moral, J.C. Cañaveras, E. Porca, V. Jurado, P.M. Martín-Sánchez y C. Saiz-Jimenez. 2011. Detection of human-induced environmental disturbances in a show cave. *Environmental Science and Pollution Research*, 18: 1037-1045.

Gadd G. 2004. Mycotransformation of organic and inorganic substrates. *Mycologist*. 18: 60-70.

Galán-Sánchez, F., P. García-Martos, C. Rodríguez-Ramos, P. Marín-Casanova y J. Mira-Gutiérrez. 1999. Microbiological characteristic and susceptibility patterns of strains of

rhodotorula isolated from clinical samples. *Mycopathologia*. 145: 109–112.

Garret, S.D. 1963. *Soil Fungi and Soil Fertility*. Pergamon Press, Oxford, 165pp.

Gillieson, D. 1996. *Caves. Processes, development and management*: Cambridge, Massachusetts: Blackwell Publishers, 324pp.

Gilman, J.C. 1957. *A manual of soil fungi*. 2nd Ed. The Iowa State College Press, Iowa, USA. 450pp.

Gregory, J.K. y J. A. Haller. 1992. Chronic postoperative *Rhodotorula* endophthalmitis. *Archives of Ophthalmology*. 110: 1686–1687.

Guerra, R., G.M. Cavallini, L. Longanesi, C. Casolari, G. Bertoli, F. Rivasi y U. Fabio. 1992. *Rhodotorula* glutinis keratitis. *International Ophthalmology*. 16: 187–190.

Hammer, Ø., D.A.T. Harper y P.D. Ryan. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*. 4(1): 9.

Harris, R.F., G. Chesters, O.N. Allen, y O.J. Attoe. 1964. Mechanisms involved in soil aggregate stabilization by fungi and bacteria. *Soil Science Society of America Journal*. 28: 529-532.

Hawksworth, D.L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*. 95:641-655.

Hill, C.A. y P. Forti. 1997. *Cave minerals of the world*, 2nd Ed. National Speleological Society, Huntsville, AL: 463pp.

Hofreiter, M., J.I. Mead, P. Martin, y H.N. Poinar. 2003. Molecular caving. *Magazine Current Biology*. 13(18): 693-695.

Hsu, M.J. y G. Agoramoorthy. 2001. Occurrence and diversity of thermophilous soil microfungi in forest and cave ecosystems of Taiwan. *Fungal Diversity*. 7:27-33.

- Jones B y A. Motyka. 1987. Biogenic structures and micrite in stalactites from Grand Cayman Island, British West Indies. *Canadian Journal of Earth Sciences*. 24:1402–1411
- Jurado, V., E. Porca, S. Cuezva, A. Fernández-Cortes, S. Sánchez-Moral y C. Saiz-Jiménez. 2010. Fungal outbreak in show cave. *Science of the Total Environment*. 408: 3632-3638.
- Karkun, A., K.L. Tiwari y S.K. Jadav. 2012. Fungal Diversity of Mandeepkhol Cave in Chhattisgarh, India. *Advance in Bioresearch*. 3 (2): 119-123.
- Kennedy M. 1990. Pseudoepidemic of *Rhodotorula rubra* in patients undergoing fiberoptic bronchoscopy. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 11: 334.
- Koilraj, A. J., G. Marimuthu, K. Natarajan, S. Saravanan, P. Maran, y M. J. Hsu. 1999. Fungal diversity inside caves of Southern India. *Current Science*. 77: 1081–1084.
- Kwon-Chung, K. J. y J. E. Bennett. 1992. *Medical mycology*. Lea & Febiger, Philadelphia, Pennsylvania, USA. 733 pp.
- Lachance, M.A. y W. Starmer. 1998. Ecology and yeast. En: *The Yeast a Taxonomic Study* 4th ed., CP. Kurtzman and J.W. Fell (eds). Elsevier, Amsterdam. 21-30.
- Landolt J.C., S.L. Stephenson y M.E., Slay. 2006. Dictyostelid cellular slime molds from caves. *Journal of Cave and Karst Studies*, 68:22-26.
- Latgé, J.P. 1999. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(2): 310-350.
- Louria, D.B., A. Blevins, D. Armstrong, R. Burdick y P. Liberman. 1967. Fungemia caused by 'nonpathogenic' yeast. *Archives of Internal Medicine*. 119: 247–252.
- Lynch, J.M. y E. Bragg, 1985. Microorganisms and soil aggregate stability. In: B.A. Stewart (Editor) *Advances in soil science*. Springer-Verlag. New York, pp. 135-171.
- McCune, B. y M.J. Mefford. 2011. PC-ORD. *Multivariate Analysis of Ecological Data*. Version 6.0 MjM Software, Gleneden Beach, Oregon, USA.

- Mishra, R.C. y R.S. Dwivedi. 1983. Seasonal variation in the phylloplane mycoflora of hydrophytes in a sub-tropical lake. *Acta Botanica Indica*. 11(1):28-31.
- Molope, M.B. y E.R. Page. 1986. The contributions of fungi, bacteria and physical processes in the development of aggregate stability of a cultivated soil. En: J.M. Lopez-Real and R.D. Hodges (Editores), *The Role of Microorganisms in sustainable Agriculture*. A.B. Academic Publishers, Berkhamstead, UK.
- Molope, M.B., I.C. Grieve y E.R. Page. 1987. Contributions of fungi and bacteria to aggregate stability of cultivated soils. *Journal of Soil Science*. 38: 71-77.
- Mullins, J., R. Harvey y A. Seaton. 1976. Sources and incidence of airborne *Aspergillus fumigatus* (Fres). *Clinical & Experimental Allergy*. 6:209-217.
- Muralidhar, S. y C.M. Sulthana. 1995. *Rhodotorula* causing chronic dacryocystitis: a case report. *Indian Journal of Ophthalmology*. 43: 196-198.
- Nieves-Rivera Á.M. y C. Betancourt-López, 1994. *Saprolegnia ferax* (Gruith.) Thuret (Oomycetes), new record for Puerto Rico. *Caribbean Journal of Science*, 30: 288-290.
- Nieves-Rivera, A.M. 2003. Mycological survey of Rio Camuy Caves Park, Puerto Rico. *Journal of Cave and Karst Studies*. 65 (1): 23-28.
- Nieves-Rivera, A.M., C.J. Santos-Flores, F.M. Dugan y T.E. Miller. 2009. Guanophilic fungi in three caves of southwestern Puerto Rico. *International Journal of Speleology*. 38(1): 61-70.
- Northup D.E., K. Lavoie y L. Mallory. 1997. Microbes in caves. *National Speleological Society News* 55:11.
- Northup, D.E. y K.H. Lavoie. 2001. Geomicrobiology of caves: a review. *Geomicrobiology Journal*. 18: 199-222.
- Nováková, A. 2009a. *Pidoplitchloviella terricola*-an interesting fungus from the Dominica Cave (Slovakia). *International Journal of Speleology*. 38(2): 23-26

- Nováková, A. 2009b. Microscopic fungi isolated from the Dominica Cave system (Slovak Karst National Park, Slovakia). A review. *International Journal of Speleology*. 38(2): 71-82.
- Paul, E.Q. y F.E. Clark. 1989. *Soil microbiology and biochemistry*. Academic Press, London. 273 pp.
- Pedro E.G. y V.L. Ramos-Bononi. 2007. Cave fungi of the karst region of the State Touristic Park of the Upper Ribeira Valley (Petar) in the State of Sao Paulo in Brazil. *Focus*, 5: 65-78.
- Phaff, J.H., W.M. Miller y M.E. Mrak. 1966. *The life of yeast*. Harvard University Press, Cambridge. 186pp.
- Pennington, J.C.III, K. Hauer y W. Miller. 1995. *Rhodotorula rubra* peritonitis in an HIV + patient on CAPD. *Delaware Medical Journal*. 67: 184.
- Pore R.S. y J. Chen. 1976. Meningitis caused by *Rhodotorula*. *Medical Mycology*. 14: 331–335.
- Puente-Rolón A. R. y F.J. Bird-Picó. 2004. Foraging behavior, home range, movements and activity patterns of *Epicrates inornatus* (Boidae) at Mata de Plátano Reserve in Arecibo, Puerto Rico. *Caribbean Journal of Science*. 40 (3): 343–352.
- Pugh, G.J.F. y J.L. Mulder. 1971. Mycoflora associated with *Typha latifolia*. *Transactions of the British Mycological Society*. 57:273-282.
- Reijula, K. y T. Tuomi. 2003. Mycotoxins of Aspergilli, exposure and health effects. *Frontiers in Bioscience*. 8:232-235.
- Riddell, R.W. 1950. Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. *Mycologia*. 42:265-270.
- Ritz, K. y I.M. Young. 2004. Interactions between soil structure and fungi. *Mycologist*. 18(2): 52-59.
- Rodríguez, G. y D. A. Reagan. 1984. Bat predation by the Puerto Rican boa, *Epicrates inornatus*. *Copeia*. 1: 219-220.

- Rodriguez-Minguela, C.M, J.H.A. Apajalahti, B Chai, J.R. Colen y J.M. Tiedje. 2009. Worldwide Prevalence of Class 2 Integrase outside the Clinical Setting Is Associated with Human Impact. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(15): 5100–5110.
- Rutherford J.M. y L.H. Huang. 1994. A Study of Fungi of Remote Sediments in West Virginia Caves and a Comparison with Reported Species in the Literature. *NSS Bulletin*. 56 (1): 38-45.
- Rusthoven JJ, R. Feld y P.J. Tuffuell. 1984. Systemic infection by *Rhodotorula* spp. in the immunocompromised host. *Journal of Infection*. 8: 241–246.
- Santos-Flores, C.J. y C. Betancourt-López. 1997. Aquatic and water-borne hyphomycetes (Deuteromycotina) in streams of Puerto Rico (including records from other neotropical locations): *Caribbean Journal of Science Special Publication* 2.
- Santos-Flores C.J. y Á.M. Nieves-Rivera. 2007. Mycological observations from subterranean and exposed portions of a subterranean stream. *Focus*. 4: 130.
- Semilolenny, A.A. 1997. In *Proceedings of 12th International Congress on Speleology, Switzerland*. 3: 293-296.
- Shuchong, P., L. Singler y G.T. Cole. 1994. Evidence for phylogenetic connection between *Coccidioides immitis* and *Uncinocarpus reesii* (Onygenaceae). *Microbiology*. 140: 1481-1494.
- Summerbell, R.C. 1998. Taxonomy and Ecology of *Aspergillus* species associated with colonizing infections of the respiratory tract. *Immunology and Allergy Clinics of North America*. 18(3): 549-573.
- Sustr V., D. Elhottova, V. Kristufek , A. Lukesova, A. Novakova, K. Tajovsky y J. Triska. 2005. Ecophysiology of the cave isopod *Mesoniscus graniger* (Frivaldszky 1865) (Crustacea: Isopoda). *European Journal of Soil Biology*. 41: 69-75.
- Tasic, S, y N. Miladinovic-Tasic. 2007. *Cladosporium* sp. cause of opportunistic mycoses. *Acta Facultatis Medicae Naissensis*. 24(1):15-19.

- Torres-Blasini, G. y J.A. Carrasco-Canales. 1966. Soil studies in Puerto Rico. *Mycophatologia*. 28: 329-332.
- Torres-Blasini, G., E.R. Figueras y J.E. Sifontes. 1960. Histoplasmosis in Puerto Rico. *Boletín de la Asociación Médica de Puerto Rico*, 52: 136-142.
- Ulloa, M., P. Lappe, S. Aguilar, H. Park, A. Perez-Mejia, C. Toriello y M.L. Taylor. 2006. Contribution to the study of the mycobiota present in the natural habitats of *Histoplasma capsulatum*: an integrative study in Guerrero, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 77:153-168.
- Vanderwolf K., D. Malloch, D. F. McAlpine y G.J. Forbes. 2013. A world review on fungi, yeasts, and slime molds in caves. *International Journal of Speleology*. 42 (1), 77-96.
- Vaughan, M. J., R. M. Maier y B. M. Pryor. 2011. Fungal communities on speleothem surfaces in Kartchner Cavers, Arizona, USA. *International Journal of Speleology*. 40(1): 65-77.
- Viaud M., A. Pasquier y Y. Brygoo. 2000. Diversity of soil fungi studied by PCR-RFLP of ITS. *Mycological Research*. 104(9):1027-1032.
- Volz P. y J. Yao. 1991. Micro-fungi of the Hendrie River Water Cave, Mackinac County, Michigan. *National Speleological Society Bulletin*. 53 (2): 104-106.
- Walochnik J. y J. Mulec. 2009. Free-living amoebae in carbonate precipitating microhabitats of karst caves and a new vahlkampfii amoeba, *Allovahlkampfia spelaea* gen. nov., sp. nov. *Acta Protozoologica*. 48: 25-33.
- Wang, W., X. Ma, Y. Ma, L. Mao, F. Wu, X. Ma, L. An y H. Feng. 2010. Seasonal dynamics of airborne fungi in different caves of the Mogao Grottoes, Dunhuang, China. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 64: 461-466.
- White, T., T. Burns, S. Lee, y J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of

fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, 315-322 pp. En: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (ed), PCR protocols. A guide to methods and applications. Academic Press, Inc. San Diego, California, USA

Young, C., M.H. Chang, J.M. Chen. 1993. Fungal esophagitis in children. *Acta Paediatrica Sinica*. 34: 436-442.

APÉNDICE A. SECUENCIAS ADN DE CULTIVOS PUROS

RECIBIDAS DEL LABORATORIO *NEVADA GENOMIC CENTER*

Aspergillus sojae

TGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGTCCC
CTCTCCGGGGGGGACGGGGCCCCAAAGGCAGCGGGCCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCG
CTCTGTAGGCCCGCGCGCTTGCCGAACGCAAAACAACCATTTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATA
CCCGCTGAACTTAATGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGT
TGGGTCGTCGTCCCCTCTCCGGGGGGGACGGGGCCCCAAAGGCAGCGGGCCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGG
GGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGCGCGCTTGCCGAACGCAAAACAACCATTTTTTTCCAGGTTGACCTCGG
ATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAA

Aspergillus parasiticus

ATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGATCGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGTCCCCTCT
TCCGGGGGGGACGGGGCCCCAAAGGCTTGTGCGGCACCGCGTCCGATCCTCCAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCT
GTATGCCCGGTTGGCGCTTGCCGAACGCAAAACAACCATTTTTTTCTAAGTTGACCTCTAATCAGATGAAGATACCCG
CTGAACTTAATGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGATCGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGG
TCGTCGTCCCCTCTTCCGGGGGGGACGGGGCCCCAAAGGCTTGTGCGGCACCGCGTCCGATCCTCCAGCGTATGGGGCT
TTGTCACCCGCTCTGTATGCCCGGTTGGCGCTTGCCGAACGCAAAACAACCATTTTTTTCTAAGTTGACCTCTAATCA
GATGAAGATACCCGCTGAACTTAA

Aspergillus tamaritii

TGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGATCGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGTCCC
CTCTTCCGGGGGGGACGGGGCCCCAAAGGCTTGTGCGGCACCGCGTCCGATCCTCCAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCG
CTCTGTATGCCCGGTTGGCGCTTGCCGAACGCAAAACAACCATTTTTTTCTAAGTTGACCTCTAATCAGATGAAGATA
CCCGCTGAACTTAATGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGATCGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGT
TGGGTCGTCGTCCCCTCTTCCGGGGGGGACGGGGCCCCAAAGGCTTGTGCGGCACCGCGTCCGATCCTCCAGCGTATGG
GGCTTTGTCACCCGCTCTGTATGCCCGGTTGGCGCTTGCCGAACGCAAAACAACCATTTTTTTCTAAGTTGACCTCTA
ATCAGATGAAGATACCCGCTGAACTTAA

Aspergillus fumigatus

TTCGACGGCCGCCGGGGAGGCCTTGCGCCCCGGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACCCCAACATGAACGCTGTTCTGAAA
GTATGCAGTCTGAGTTGATTATCGTAATCAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGA
ACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTGAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCC
CTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCGTCCC
CCTCTCCCGGGGGGACGGGGCCGAAAGGCAGCGGGCCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCTG
CTCTGTAGGCCCGCGCGCCAGCCGACACCCAACCTTTATTTTTTTCTAAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACC
CGCTGAACTTAAGCATATCAATAGCGGAGG

Aspergillus caelatus

CCGCCGTTTACGGCCGCCGGGGGGGCATCAGCCCCGGGGCCCGCGCCCGCGGAGACACCACGAACTCTGTCTGATCT
AGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAG
AACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCC

CCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGTC
CCCTCTTCGGGGGGGACGGGGCCCCAAAGGCAGCGGGCCACCAGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACC
CGCTCTGTAGGCCCGCGCGCTTGCCGAACGCAAAACAACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAAGGA
TACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGGCGGA

Cladosporium cladosporioide

AGGCTGGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTTTGCGTAACTTTGCAGTCTGAGTAACTTAATTAATAAATTA
CTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAA
TTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATT
TCACCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGGTCCGCCGCGTGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTC
CCCTAAGCGTTGTGAAACTATTGCTAAAGGGTGTTCGGGAGGCTACGCCGTA AAAACAACCCCATTTCTAAGGTTG
ACCTCGGATCAGGTAGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAGCGGA

Cladosporium oxysporum

CCTCCGGGGCGACCCTGCCTTCGGGCGGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTTTGCGTAACTTTGCAGTCTGAGCT
AAACTTAATTAATAAACTTAAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACCAGAAATGCGATA
AGTAATGTGAATTGCAGAATTGAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTATTCCGGGGGGCATGC
CTGTTGAGCGTCATTTACCACTCAAGCCTCGCTGTGGTATTGGGCAACGCGGTCCGCCGCGTCTCAAATCACCG
GCTGGGTCTTCTGTCTCCCTAAGCGTTGTGAAACTATTGCTAAAGGTTTGTTCGGGAGGCTACGCCGTA AAAACA
ACCCATTTCTAAGGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAG

Cladosporium sphaerospermum

CCGGGGCGACCCTGCCTCCGGGCGGGGCCCCGGGTGGACACTTCAAACCTTTGCGTAACTTTGCAGTCTGAGTAA
TTTAATTAATAAATTA AAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA
AGTAATGTGAATTGCAGAATTGAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCA
TGCCTGTTGAGCGTCATTTACCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCGACGCGGTCCGCCGCGCGCCTCAAATCG
ACCGGCTGGGTCTTCCGTCGCCCTCAGCGTTGTGAAACTATTGCTAAAGGTTGCCGCGGGAGGTCACGCCGAAAA
CAACCCCATTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAAGC

Ascomycota spp.

GGCGGGTCTTTGAACCTGCCGGCGGCAACTTTCAAACCTTTGCAGTAGTATCTAATTCTTCTGATTCAAATATCAA
ATTATTACAACCTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTG
AATTGCAGAATTGAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTT
GAGCGTCATTTACACCCTCAAGCTTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTGTCTATGGACTCGCCCCAAAGGATTGGCAGC
GGTCTGCCAGGCCTTCTAATTGCGCAGCACTGTTGCGGCTACTTGGAGCCTGTTTGCAGGATTGAGCATCCATCA
AGTCCTTCTTTAACTTGACCTCGAATCAGGTAGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAG

Penicillium euglaucum

TCGGCGGGCCCGCTTACGGCCCGGGGGGACCCGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCTGTGAACGCTG
TCTGAAGTTGAGTCTGAGACAACCTAGCTAAATTAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGAT
GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAATTAATGTGAATTGAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGC
GCCCTCTGGTATTCCGGAGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCACC
GTCCCCCGCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGGCGGACCCGCTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTCTGTC
ACCCGCTCTTGTAGGCCCGCGCGCCAGCCGACCCCTCAACCAAACCTTCTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAG
GGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAGAC

Penicillium corylophilum

CTGGCCCGCGCCCGCGAAGACACCATTGAACACTGTCTGAAGATTGCAGTCTGAGCAATTAGCTAAATAAGTTAAA
ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAA
ATTGAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAT
TGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCTCCTTCCCGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCA
CCGCGTCCGGTCTCAAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTTGTAGGCCCGGGCCGGCGCTTGCCAACAACCATCA
ATCTTTTTTTCAGGTTGACCTC

Eurotiomycetes spp.

TGCAGTCTGAGAACTAGCTAAATTAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGC
AGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATCAGTGAATATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGTA
TTCCGGAGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCGCCCCCCCCG
GCTGGGGGGGGCGGGCCCGAAAGGGAGCGGGGACCGCGTCCGGTCTCCAGCGTATGGCTTCTCACCCGCTCTTG
GAGGGCCGGGCGGCGCCAGCCGACCCCTCAATCTATTTTTTTCAGGGTGACCTCGGATCAGGGAGGGATACCCGCT
GAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACCGGATTGCCCTAATAACGGCGAGTGAAGCGGCAAGA
GCTC

Fusarium oxysporum

TGTGAGATAACCACTTGTTCCTCGGCGGATCAGCCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCCCAGAGGACCCCTAAA
CTCTGTTTTCTATATGTAACCTTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA
TCGATGAAGAACGCAAAACCCCTTGGGAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAAT
CTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCTCATTTCAACCCTCAATCACAGCT
TGGTGTGGGACTCGCGTTAATTTCGCGTTCCTAAAATTGATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAATAA
CACCTCGTTACTGGTAATCGCCGCGGCCACGCCGTTAACCCCAACTAGTCTGATTATGTTGACCTCGGATCAGGTA
GGAAACCCGCTGAACTTAAGCAATTTCCGG

Paecilomyces spp.

CCAACCCGACTCGGGAGGTAGTGACAATAAATACTGATACAGGGCCCTTTCCGGCCTTGTAAATTGGAATGACAATTT
AAATCCCTGGGGGTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGC
GTATATTAAGTTGTTGTGGTTAAAAGAAATTTTCTCGTAGTTGAACCTTGGGCCTGGCTGGCCGGTCCGCCTCAC
CGCGTGCCTGGTCCGGCCGGGCTTTTCTCTGTGGAACCCCATACCTTCACTGGGCGTGGCGGGGAAACAGGACAT
TTACTTTGAAAAATTAGAGTGCTCCAGGGGCCTATGCTCGAATACATTAGCATGGAATAATAAAATAGGACGCGCGG
TTCTATTTTGTGGTTTATAGACCGCCGTAATGAGGACAGTCGGGGGCATCAGTATTCAACTGTGAGTTTTCCCG
GTGAAATTTCTGGATCAGT

Oidiodendron spp.

CAGTTCCGTAGGTGACCTGGGAGGGATCATTACAGAGTTCTCGCCCTTACGGGTAGACCTCCCACCCACTGTGCTTG
TTACCGTCTGTTGCTTTGGCGGGCCGCTGGGCTCCTGCCCCACCGGCCAGGCTGGTGGCCCCCAGAGGCTCCGCA
AACTCTGGATGTCTACGACGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTTCAACAACGCTCTTGGTTCTGGCATCGAT
GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGCGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC
GCCCTGTGGTATTCCGAGGGCATGCCTGTTTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCCGCTGGTGTGGGCTTC
CCGCCGGCCGGCCCCAAAGACAGTGGCGGCGCCGCTGCTGCTCTAAGCGTAGTACAACCTCTCGCTCTGGAGCCCGCG
TGTCCGGGGCCAGAACCCCAAACCTTCTAAAATGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCGCTGAACTTAAGCATAT
CAATA

Geotrichum candidum

AGTGCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGAAATCCCATGCATGTCTAAGTATAAGCATTATACAGTGAAACTGCGAA
TGGCCTCATTAAATCAGTTATCGTTTTATTTGATAAATTGGTTACACTACTTGGATAACCGTGGTAATTTCTAGAG
CTAATACATGCTAAAACTTTTTTGTTTTCCGGCTGGTATTTAAATTTGGTCCGATAAAAAACCAATGCCCTCGGGCTC
TATGGTGAATCATAATAACTTGTGCAATCGCATGGCCTTGTGCCGGCGATGAATCGATGTTTCATTCAAATTTCTGCC
CTAATCAACTTTTCGATGGTAGGACAGAGGCCTACCATGGTTTTAACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGA
GAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATAAAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGG
TAGTGACAATAAATAACGATACGGGGGTTATTAGGTCTCGTAATTGGAATGAGAACAATTTAAATACCTTAACGAGG
AACAATTAGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCTGATAGTATATATATAAAGTTGTTGCAGT
TAAAAAGCT

Rhodotorula mucilaginosa

CTATTCACCTTATAAACACAAAAGTCTATGAATGTATTAAATTTTATAACAAAATAAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTT
GGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCT
TTGAACGCACCTTGGCGCTCCATGGTATTCCGTGGAGCATGCCTGTTTGAAGTGTGCATGAATACTTCAACCCTCCTCTT
TCTTAATGATTGAAGAGGTGTTTGGTTTTCTGAGCGCTGCTGGCCTTTAGGGTCTAGCTCGTTCGTAATGCATTAGCA
TCCGCAATCGAACTTCGGATTGACTTGGCGTAATAGACTATTGCTGAGGAATTCTAGTCTTCGGACTAGAGCCGGG
TTGGGTTAAAGGAAGCTTCTAATCAGAATGTCTACATTTTAAAGATTAGATCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGA
ACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA

Uncinocarpus reesii

TGACCGTTTTGTTGCTTTGGCGGGCCCCGCGCAAGGCCGCGGGGGCACTCGCCCCGGGCCCCGCGCCCCGAGAGGTA
CACTAGAACTCTTTTTGTGAAGTGGCCGTCTGAGGATGATATTGAATCATACAAAAACCTTTCAACAATGGATCTCTTG
GTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCGGTGAATCATCGAATCTT
TGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCAACCCTCAAGCGCGGCTTG
TGTGTTGGGTCTCGTCCCCCGTGGACGGGCCCCGAAAGGCAGTGGCGGCGTCCCGACATGGTGCCCGAGCGTATGGGA
ACTCTCTTCCGCTCGAACAGGCCCGGTGGCGCTGGTGAACCCTCTAATTTTTTACCAGTTGACCTCGGATCAGGT
AGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGAC