



UNIVERSIDAD DEL MAR

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MICROORGANISMOS CULTIVABLES PRESENTES EN
Pericelis nazahui (PLATYHELMINTHES: POLYCLADIDA) EN LA
BAHÍA DE PUERTO ÁNGEL, OAXACA, MÉXICO

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO
DE **MAESTRA EN CIENCIAS: ECOLOGÍA MARINA**

PRESENTA

Biól. Mar. Mariela Ramos Sánchez

DIRECTOR

Dra. Ivonne Sandra Santiago Morales

Puerto Ángel, Oaxaca, México, 2023

Dedicatoria

A los sesos de conejo...

A mis padres Mariana & Martín

A mis hermanos Marisol, Ariana, Daylin, Williams, Edwin, Harol & Calet

A mis abuelos Gloria & Ciro

A la Madris

A mi madre de camino Mar Cid

A Milton ¡una plástica he!

Agradecimientos

El Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), por la beca otorgada para dar continuidad al estudio del posgrado.

A la Dra. Ivonne Sandra Santiago Morales por aceptar el proyecto de tesis, el apoyo en tiempo, espacio, conocimiento y comentarios brindados durante el desarrollo de este proyecto y de mi formación académica.

A la Dra. Amalyly Becerril Espinosa y al Dr. J. Rolando Bastida-Zavala, por formar parte fundamental del comité tutorial, y por el tiempo brindado en el proceso de tutorías y en las revisiones realizadas para mejora del documento de tesis.

A los M. en C. Yolanda Huante González y Gerardo Esteban Leyte Morales por ser parte del Comité Revisor de Tesis, por el tiempo invertido en el proceso de revisión y mejora del documento.

Al M. en C. Efraín Castillo y el Pas. Biól. Mar. Rubén Antonio, infinitas gracias por el apoyo para la recolecta de la materia prima para este trabajo.

A la Pas. Biól. Mar. Carolina Valeriano, por las enseñanzas y la ayuda brindada durante el trabajo de laboratorio y el proceso molecular; al Acuicultor Ismael y a la Pas. Biól. Mar. Elisabeth técnicos en su momento del laboratorio de Acuicultura por facilitarme el uso del material óptico para la toma del material fotográfico, a la Q.F.B. Coral Edith Mirón Enríquez por facilitarme el préstamo del material de laboratorio para el cultivo de las cepas aisladas, a la M. en C. María del Rocío Gutiérrez y a los técnicos del laboratorio de ambiental el Pas. Ing. Amb. Jorge Fernández y Frida por facilitarme el proceso de esterilización del material para el aislamiento y cultivo.

A la Dra. Ma. del Socorro García Madrigal y al Dr. J. Rolando Bastida-Zavala, no solo por la amistad, sino también por brindarme el apoyo académico, tiempo, espacio y económico... ¡agradecimientos eternos!

A la Hidrobiól. Montserrat Flores y al Biól. Mar. Walter por compartir este viaje llamado maestría, por las horas presenciales y virtuales compartidas...en el corazón siempre.

A mis compañer@s de laboratorio y de camino Fernando, Oscar, Axl, Julio, Didier, Jenifer Marisol.

Contenido

Resumen.....	1
Abstract	2
1. Introducción	3
2. Antecedentes.....	6
3. Justificación	9
4. Hipótesis.....	10
5. Objetivos.....	10
6. Área de estudio	10
7. Materiales y métodos.....	11
7.1. Obtención de muestras	11
7.2. Análisis de nutrientes.....	12
7.3. Aislamiento y purificación de los microorganismos.....	13
7.4. Identificación de los microorganismos	16
7.5. Características de crecimiento de las colonias (salinidad y temperatura).....	25
7.6. Criopreservación	26
8. Resultados.....	26
8.1. Variables físico-químicas	26
8.2. Microorganismos desarrollados y aislados	26
8.2.1. Caracterización genética, morfológica y crecimiento	28
Sección bacteria	29
Género <i>Streptomyces</i> Waksman & Henrici 1943	29
<i>Streptomyces</i> sp. 1	32
<i>Streptomyces</i> sp. 2	35
<i>Streptomyces</i> sp. 3	38
Género <i>Nocardiopsis</i> (Brocq-Rousseau 1904) Meyer 1976.....	41
<i>Nocardiopsis</i> sp. 1	41
Género <i>Paracoccus</i> Davis, 1969	46
<i>Paracoccus</i> sp. 1	46
Sección Fungi	52
Género <i>Cladosporium</i>	52
<i>Cladosporium</i> sp. 1.....	52
Género <i>Aspergillus</i> P. Micheli, 1729.....	58
<i>Aspergillus</i> sp. 1	58
Género <i>Penicillium</i> Link, 1809	65
<i>Penicillium</i> sp. 1	65

<i>Penicillium</i> sp. 2.....	72
Género <i>Simplicillium</i> Zare & Gams, 2001	76
<i>Simplicillium</i> sp. 1	78
<i>Simplicillium</i> sp. 2	80
Orden Xylariales Nannf., 1932	83
Xylariales sp. 1.....	83
9. Discusiones.....	89
9.1. Identificación molecular y caracterización morfológica de los microorganismos aislados ...	89
9.2. Características ambientales del área de estudio y de crecimiento de las colonias (salinidad y temperatura).....	103
9.3 Aspectos ecológicos	108
10. Conclusiones	112
11. Referencias.....	112
Anexo I.....	129
Anexo II	133
Anexo III.....	134
Anexo IV.....	135

Índice de figuras

FIGURA 1. Área de estudio.....	11
FIGURA 2. Diseño experimental.....	15
FIGURA 3. Esquema de la morfología colonial en placa de los microorganismos cultivados en un medio sólido.....	22
FIGURA 4. Esquema de la morfología celular representativa de algunos microorganismos: bacterias y hongos cultivados en un medio sólido.....	24
FIGURA 5. Composición y abundancia relativa de la microbiota presente en <i>Pericelis nazahui</i>	28
FIGURA 6. Árbol filogenético de cepas del género <i>Streptomyces</i>	31
FIGURA 7. <i>Streptomyces</i> sp. 1 (cepa M2P2–B1).....	34
FIGURA 8. Efecto de la temperatura en <i>Streptomyces</i> sp. 1 (cepa M2P2–B1).....	35
FIGURA 9. <i>Streptomyces</i> sp. 2 (cepa M2P2–B2).....	37
FIGURA 10. Efecto de la temperatura en <i>Streptomyces</i> sp. 2 (cepa M2P2–B2).....	38
FIGURA 11. <i>Streptomyces</i> sp. 3 (cepa M2P2–B3).....	40
FIGURA 12. Efecto de la temperatura en <i>Streptomyces</i> sp. 3 (cepa M2P2–B3).....	41
FIGURA 13. Árbol filogenético de la cepa del género <i>Nocardiosis</i>	43
FIGURA 14. <i>Nocardiosis</i> sp. 1 (cepa M2P3–B5).....	45
FIGURA 15. Efecto de la temperatura en <i>Nocardiosis</i> sp. 1 (cepa M2P3–B5).....	46
FIGURA 16. Árbol filogenético de la cepa del género <i>Paracoccus</i>	48
FIGURA 17. <i>Paracoccus</i> sp. 1 (cepa M2P2–B4).....	50
FIGURA 18. Efecto de la temperatura en <i>Paracoccus</i> sp. 1 (cepa M2P2–B4).....	51
FIGURA 19. Árbol filogenético de la cepa del género <i>Cladosporium</i>	53
FIGURA 20. <i>Cladosporium</i> sp. 1 (cepa M2P1–H3) morfología macroscópica.....	56
FIGURA 21. <i>Cladosporium</i> sp. 1 (cepa M2P1–H3) morfología microscópica.....	57
FIGURA 22. Efecto de la temperatura en <i>Cladosporium</i> sp. 1 (cepa M2P1–H3).....	58
FIGURA 23. Árbol filogenético de las cepas del género <i>Aspergillus</i>	60
FIGURA 24. <i>Aspergillus</i> sp. 1 (cepa M2P3–H5) morfología macroscópica.....	63
FIGURA 25. <i>Aspergillus</i> sp. 1 (cepa M2P3–H5) morfología microscópica.....	64
FIGURA 26. Efecto de la temperatura en <i>Aspergillus</i> sp. 1 (cepa M2P3–H5).....	65
FIGURA 27. Árbol filogenético de las cepas del género <i>Penicillium</i>	67
FIGURA 28. <i>Penicillium</i> sp. 1 (cepa M2P1–H4) morfología macroscópica.....	70
FIGURA 29. <i>Penicillium</i> sp. 1 (cepa M2P1–H4) morfología macroscópica.....	71
FIGURA 30. Efecto de la temperatura en <i>Penicillium</i> sp. 1 (cepa M2P1–H4).....	72
FIGURA 31. <i>Penicillium</i> sp. 2 (cepa M2P3–H7) morfología macroscópica.....	74
FIGURA 32. <i>Penicillium</i> sp. 2 (cepa M2P3–H7) morfología microscópica.....	75
FIGURA 33. Efecto de la temperatura en <i>Penicillium</i> sp. 2 (cepa M2P3–H7).....	76
FIGURA 34. Árbol filogenético de las cepas del género <i>Simplicillium</i>	77
FIGURA 35. <i>Simplicillium</i> sp. 1 (cepa AMP2–H1) morfología macroscópica y microscópica.....	79
FIGURA 36. Efecto de la temperatura en <i>Simplicillium</i> sp. 1 (cepa AMP2–H1).....	80
FIGURA 37. <i>Simplicillium</i> sp. 2 (cepa M2P3–H6) morfología macroscópica y microscópica.....	82
FIGURA 38. Efecto de la temperatura en <i>Simplicillium</i> sp. 2 (cepa M2P3–H6).....	83
FIGURA 39. Árbol filogenético de la cepa dentro del orden Xylariales.....	85
FIGURA 40. Xylariales sp. 1 (cepa M2P2–H2) morfología macroscópica.....	87
FIGURA 41. Xylariales sp. 1 (cepa M2P2–H2) morfología microscópica.....	88
FIGURA 42. Efecto de la temperatura en Xylariales sp. 1 (cepa M2P2–H2).....	89

Índice de tablas

Tabla 1. Número de cepas aisladas y purificadas de <i>Pericelis nazahui</i>	27
Tabla 2. Distancia genética de las especies de <i>Streptomyces</i> cercanas a las cepas M2P2-B1, M2P2-B2, M2P2-B3	32
Tabla 3. Distancia genética de especies de <i>Nocardiosis</i> cercanas a la cepa M2P3-B5.....	44
Tabla 4. Distancia genética de especies de <i>Paracoccus</i> cercanas a la cepa M2P2-B4.....	49
Tabla 5. Distancia genética de especies de <i>Cladosporium</i> cercanas a la cepa M2P1-H3.....	54
Tabla 6. Distancia genética de especies de <i>Aspergillus</i> cercanas a la cepa M2P3-H5	61
Tabla 7. Distancia genética de especies de <i>Penicillium</i> cercanas a la cepa M2P1-H4	68
Tabla 8. Distancia genética de especies de <i>Simplicillium</i> cercanas a las cepas AMP2-H1 y M2P3-H6	78
Tabla 9. Distancia genética de especies del orden Xylariales cercanas a la cepa M2P2-H2.....	86
Tabla 10. Caracteres morfológicos diferenciales de <i>Cladosporium</i> sp. 1 (cepa M2P1-H3) y las especies genéticas más cercanas	95
Tabla 11. Caracteres morfológicos diferenciales entre <i>Aspergillus</i> sp. 1 (cepa M2P3-H5) y las especies genéticas más cercanas	98
Tabla 12. Caracteres morfológicos diferenciales entre <i>Penicillium</i> sp. 1 (cepa M2P1-H4), <i>Penicillium</i> sp. 2 (cepa M2P3-H7) y las especies genéticas más cercanas	100

Resumen

Los estudios acerca de la asociación entre microorganismos y gusanos policládidos son escasos; solo se ha realizado un estudio en el Pacífico occidental, en Hong Kong, China, con base en un análisis molecular se han registrado 101 especies de bacterias asociadas a una especie aun no descrita de policládido del género *Paraplanocera*; mientras que en el Pacífico oriental tropical no se han realizado estudios acerca de la presencia de la microbiota en los policládidos. De este modo, la finalidad del trabajo fue conocer las especies de microorganismos cultivables presentes en *Pericelis nazahui*, gusano policládido que se distribuye en la costa central de Oaxaca, habitando la zona litoral y sublitoral, asociados a arrecifes coralinos. Para conocer la identidad taxonómica del microbioma presente en *P. nazahui* se emplearon métodos moleculares y tradicionales, como el aislamiento y caracterización de los microorganismos en medios de cultivos sólidos y la identificación de las jerarquías taxonómicas a partir de la herramienta molecular, basados en el gen 16S rADN para las bacterias, el gen 28S rADN y la región del ITS para los hongos. Se aislaron y purificaron 12 cepas, que molecular y morfológicamente fueron determinadas dentro de los géneros bacterianos, *Nocardiosis*, *Paracoccus* y *Streptomyces*, y los géneros fúngicos *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Simplicillium* y una cepa dentro del orden Xylariales. Los aislamientos de los microorganismos recuperados molecularmente están relacionados con sus contrapartes de microorganismos terrestres, concluyendo que la presencia de estos en el hábitat marino en el que se distribuye el gusano, puede deberse al transporte por efecto del viento, de la materia orgánica transportada por el vertido de las aguas residuales y/o continentales que se descargan a la bahía de Puerto Ángel. Los géneros *Nocardiosis*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* y *Simplicillium* son considerados patógenos oportunistas en ambientes marinos, pueden sobrevivir en el medio circundante o dentro de organismos sanos y enfermos; la patogenicidad que estos tienden a desarrollar está determinada por estresores ambientales o el enriquecimiento de nutrientes. Aunque se necesita un enfoque holístico del ecosistema microbiano y el entendimiento de los roles que establecen con *Pericelis nazahui*, este estudio considera que el gusano podría fungir como vector de microorganismos patógenos (*e.g.*, *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Penicillium*) en los arrecifes coralinos, compuestos principalmente por el género *Pocillopora*, en donde comúnmente habita este policládido.

Palabras clave: *Aspergillus*, gusanos planos, microbiota, Pacífico, *Streptomyces*.

Abstract

Studies about the association between microorganisms and polyclad flatworms are scarce; only, one study been carried out in the western Pacific, in Hong Kong, China, based on molecular analysis, 101 species of bacteria associated with an undescribed species of polyclad of the genus *Paraplanocera* have been recorded; while, in the eastern tropical Pacific, no studies have been carried out on the presence of microbiota in polyclads. Therefore, the purpose of the work was to know the species of culturable microorganisms present in *Pericelis nazahui*, a polyclad flatworm that is distributed in the central coast of Oaxaca; it inhabits the littoral and sublittoral zone, and is associated with coral reefs. To know the taxonomic identity of the microbiome present in *P. nazahui*, molecular and traditional methods were used, such as the isolation and characterization of microorganisms in solid culture media and the identification of taxonomic hierarchies from the molecular tool, based on the 16S rDNA gene for bacteria, the 28S rDNA gene, and the ITS region for fungi. Twelve strains were isolated and purified, which were molecularly and morphologically determined within the bacterial genera *Nocardiopsis*, *Paracoccus*, and *Streptomyces* and the fungal genera *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Simplicillium* and one strain within the order Xylariales. The microorganism isolates recovered molecularly are related to their terrestrial counterparts, concluding that the presence of these in the habitat in which the worm is distributed, may be due to transport by wind, the organic matter transported by wastewater discharge and/or discharge of sewage and continental waters discharged into the Puerto Ángel bay. The genera *Nocardiopsis*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, and *Simplicillium* are considered opportunistic pathogens in marine environments, they can survive in the surrounding environment or within healthy and diseased organisms; the pathogenicity they tend to develop is determined by environmental stressors or nutrient enrichment. Although a holistic approach to the microbial ecosystem and the understanding of the roles they play with *Pericelis nazahui* is needed, this study considers that the worm could serve as a vector of pathogenic microorganisms (e.g., *Aspergillus*, *Cladosporium*, and *Penicillium*) in the coral reefs, composed mainly by the genus *Pocillopora*, where this polyclad commonly inhabits.

Keywords: *Aspergillus*, polyclad flatworms, microbiota, Pacific, *Streptomyces*.

1. Introducción

Los océanos son el hábitat más grande de nuestro planeta, cubren más del 70% de la superficie terrestre, por ello, son considerados, como una gran reserva de recursos naturales; los organismos marinos y los microorganismos (arqueas, bacterias, hongos microscópicos, protozoos, virus, etc.) son sus habitantes más abundantes (Costa-Leal *et al.* 2014, Pita *et al.* 2018). Entre todos los compartimentos ambientales que están presentes en la Tierra, el ambiente marino representa un conjunto complejo de hábitats y ecosistemas extremadamente fascinantes, pero al mismo tiempo casi inexplorados (Rizzo & Giudice 2018). Entre las diferentes estrategias ecológicas de supervivencia y adaptación en este ambiente, a menudo sucede el establecimiento de relaciones entre diferentes comunidades, y representa la estrategia más atractiva utilizada por los organismos vivos para superar condiciones difíciles y estresantes (Rizzo & Giudice 2018). Durante su evolución cada grupo se ha adaptado al ambiente y a los otros organismos que los rodean, implicando capacidades metabólicas especiales o existir en íntima y continua asociación con alguna otra forma de vida (Stanier *et al.* 1996).

Los microorganismos se encuentran de forma libre en el hábitat planctónico (Hassetta *et al.* 2020), en el sedimento o en simbiosis con algas (Ramanana *et al.* 2016, Furbino *et al.* 2018), plantas y animales; en esta última forma, han desarrollado adaptaciones más especializadas, estables y específicas al microambiente creado por el organismo hospedero (Egan *et al.* 2008, Puglisi *et al.* 2014, Pita *et al.* 2018). Los microorganismos colonizan o pueden estar adheridos a la superficie corporal, a los epitelios, la capa de mucus o dentro de los tejidos u órganos de los organismos con los cuales establecen estas interacciones, en las que estos últimos pueden ser perjudicados (relaciones negativas) o beneficiados (relaciones positivas), reflejándose en la supervivencia, crecimiento y/o reproducción (Boege & del Val 2011, Rizzo & Giudice 2018).

En las relaciones negativas o antagónicas, la colonización excesiva de microorganismos puede alterar la fisiología y salud del hospedero, dando lugar a la competencia por el oxígeno disuelto (huésped-microorganismo), la alimentación y locomoción del hospedero, representando un sistema de autorregulación, que limita la densidad de la población (Luna *et al.* 2010, Reséndiz *et al.* 2019).

Las relaciones positivas favorecen la supervivencia y la adaptación a las condiciones externas desfavorables, contribuyen a la nutrición (Nicholson *et al.* 2012), defensa (Floréz *et al.* 2015), inmunidad (Eberl 2010) y desarrollo (Koropatnick *et al.* 2004) del huésped, a partir de la producción de diversas moléculas con actividad biológica, denominadas metabolitos bioactivos, que son de gran importancia para la industria farmacéutica y biotecnológica como los bactericidas, antivirales, antifúngicos y antiprotozoarios (Sánchez-Ortiz *et al.* 2015, Rizzo & Giudice 2018).

En el ambiente marino ciertas especies de microorganismos coexisten con organismos sésiles (Yarden 2014) como esponjas (Gómez-Archila *et al.* 2014, Guevara *et al.* 2016), corales (Gil-Agudelo *et al.* 2009, Bonthond *et al.* 2018) y ascidias (Menezes *et al.* 2010, Flórez *et al.* 2015); se encuentran con invertebrados con concha como los moluscos (Sánchez-Ortiz *et al.* 2015) y en organismos con cuerpos blandos como algunos anélidos (Neave *et al.* 2012), o incluso en organismos carentes de defensas duras (*e.g.*, concha, exoesqueleto o espinas) como los policládidos (Lin *et al.* 2017a-b).

Policládidos

Los policládidos, comúnmente conocidos como gusanos planos marinos, son invertebrados, que pertenecen al filo Platyhelminthes Minot, 1876, y al orden Polycladida Lang, 1884. Son eucariotas hermafroditas simultáneos con reproducción sexual por fertilización cruzada (Hyman 1951). A los policládidos se les considera organismos frágiles, por ser sensibles a disturbios ambientales (*e.g.*, cambios de salinidad, variaciones en la concentración de oxígeno, etc.) (Lin *et al.* 2017b). Es un grupo muy diverso y tiene una distribución mundial; se han registrado en zonas tropicales, templadas, polares y en aguas profundas, aunque son más abundantes y predominantes en aguas tropicales y someras (Quiroga *et al.* 2006); son organismos principalmente bénticos (Hyman 1951, Newman & Cannon 2003, Quiroga *et al.* 2004), no obstante, hay especies pelágicas (Faubel 1984a), simbiontes (Faubel *et al.* 2007), e intersticiales (Westheide 1991). Son exclusivamente marinos, a excepción de los géneros *Limnostylochus* que habita en agua dulce (Faubel 1983), y *Myoramyxa* de hábitos semiterrestres (Newman & Cannon 1997).

A los policládidos se les considera bioindicadores de la salud arrecifal y removedores de los desechos biológicos de pólipos de corales escleractinios (Quiroga *et al.* 2004, Rawlinson & Litvaitis 2008, Queiroz *et al.* 2013), son depredadores activos de moluscos de importancia comercial (Newman *et al.* 1993), de bivalvos perforadores de madera (Hyman 1944) y de balanos (Lee *et al.* 2006); por ello, Newman & Abbott (1980) consideraron que estos gusanos podrían ser utilizados para el control de estos invertebrados incrustantes (bivalvos perforadores y balanos) cuando se convierten en plagas.

En términos toxicológicos, de regeneración y farmacéuticos los policládidos son de gran interés; algunos estudios han demostrado la presencia de compuestos tóxicos en el tejido de algunas especies; compuestos citotóxicos, como la estaurosporina y la pseudocerosina presente en *Pseudoceros indicus* (Schupp *et al.* 2009); la villatamina y lepadinas encontradas en *Prostheceraeus vittatus* que previamente había sido aislado a partir de su presa preferida, la ascidia *Clavelina lepadiformis* (Kubaneck *et al.* 1995) y neurotóxicos en los policládidos *Planocera multitentaculata*, *Planocera reticulata*, *Prosthiostomum trilineatum*, Planoceridae sp. y *Stylochoplana* sp. en donde se han registrado concentraciones de tetrodotoxina (Miyazawa *et al.* 1987, Kogure *et al.* 1996, Ritson-Williams *et al.* 2006, Salvitti *et al.* 2015, Yamada *et al.* 2017, Itoi *et al.* 2018, Suo *et al.* 2021) y metabolitos secundarios bacterianos en el género *Paraplanocera* (Lin *et al.* 2017a-b) con potencial para atacar células cancerígenas, así como a protozoarios patógenos como el *Plasmodium* causante del paludismo y organismos fúngicos (Lin *et al.* 2017b).

Los policládidos presentan fototactismo negativo, tienden a vivir bajo rocas, en oquedades rocosas, coralinas o en asociaciones con esponjas, cnidarios, moluscos, equinodermos, etc. (Hyman 1951, Newman & Cannon 2003) y recientemente, con base en un análisis molecular se ha registrado la asociación con 36 géneros de bacterias (Xu *et al.* 2015, Zhang *et al.* 2016, Lin *et al.* 2017a-b); destacándose la asociación con *Deinococcus planocerae*, bacteria que muestra resistencia a la radiación ultravioleta, sugiriendo una función protectora para la supervivencia de los policládidos en ambientes someros (Lin *et al.* 2017b).

Pericelis nazahui Ramos-Sánchez, Bahía & Bastida-Zavala, 2020, es un policládido del suborden Cotylea, que se distribuye en la costa central de Oaxaca; habita en la zona litoral y sublitoral (0.5-12 m), asociados a arrecifes coralinos; se caracteriza por tener una coloración

dorsal pardo-oscuro, la región faríngea ligeramente grisácea, blancuzca o beige; pseudotentáculos, ocelos cerebrales, tentaculares y marginales; un gonoporo común; aparato reproductor masculino con una papila peneal prominente, inerme y cónica, vesícula seminal prominente; el aparato reproductor femenino con vesículas uterinas pareadas y conductos uterinos pareados engrosados (Ramos-Sánchez *et al.* 2020).

2. Antecedentes

Asociación entre microorganismos y metazoos en el ambiente marino

Las asociaciones o interacciones interespecíficas están estructuradas por redes complejas, el estudio de sus relaciones es importantes para una comprensión de la composición y función de la comunidad (Gu *et al.* 2017).

A lo largo de los años se han establecido diversos conceptos para nombrar las interacciones interespecíficas en microorganismos y metazoos; en los cuales se evidencia tanto las relaciones perjudiciales como beneficiosas; dentro de estos encontramos el trabajo de Hilje (1984) quien propone el concepto de simbiosis antagónica (amensalismo, depredación y parasitismo) para establecer un daño y simbiosis recíproca (comensalismo, protocooperación y mutualismo) para las relaciones benéficas; por su parte, Stanier *et al.* (1996) sugieren nombrarlas como relaciones negativas o positivas, a aquellas que causan un daño o beneficio al hospedero respectivamente y nombra puente dinámico a la interfase entre una relación y otra; el cual está sujeto a las condiciones ambientales y biológicas del organismo hospedero; mientras que Dimijian (2000) llama a esta interfase como disturbio y a los extremos de cada fase los denomina relaciones antagónicas (parasitismo) y protagónicas (cooperación, mutualismo y comensalismo); y finalmente, un término que surge en el área médica y de salud pública, pero que ha sido incorporado a los ambientes marinos (Egan & Gardiner 2016), es el de disbiosis que se emplea para denotar los efectos dañinos y simbiosis en el caso de los efectos positivos en el huésped, con una interfase denominada simbiosis alternada (Aprill 2017), en donde todas las relaciones e interfases se establecen de acuerdo a las condiciones ambientales y la biología de las especies que establecen estas relaciones.

Los estudios acerca de la microbiota presente en los policládidos son escasos, hasta ahora se tienen cuatro estudios realizados en la región del Pacífico occidental, donde se ha determinado la asociación de bacterias con una especie aun no descrita de policládido del género *Paraplanocera* (que posiblemente corresponda a *P. oligoglana*) en Hong Kong, China (Xu *et al.* 2015, Zhang *et al.* 2016, Lin *et al.* 2017a-b).

En estos trabajos se han establecido los primeros protocolos de extracción y aislamiento de la microbiota bacteriana en los policládidos (Xu *et al.* 2015); la descripción de nuevas especies de bacterias (*Deinococcus planocerae*, *Pseudovibrio hongkongensis* y *P. stylochi*) (Xu *et al.* 2015, Zhang *et al.* 2016, Lin *et al.* 2017a) y con ellas el registro de 101 especies de microorganismos, pertenecientes a 36 géneros (Anexo I); de las cuáles 37 especies corresponden a actinobacterias. Dada su capacidad para la síntesis de vitaminas, antibióticos y pigmentos, los autores infieren que estas bacterias, pueden estar involucradas en procesos de defensa, inmunidad y desarrollo del gusano (Lin *et al.* 2017b). Por su parte Lin *et al.* (2017a) determinaron que la bacteria *Deinococcus planocerae* presenta resistencia extrema a los rayos ultravioleta, luz, radiación *gamma* y desecación, sugiriendo una función para mejorar la supervivencia del policládido en ambientes someros (Lin *et al.* 2017b).

En el Pacífico oriental tropical, se han realizado algunos estudios acerca de la asociación microbiana (principalmente bacterias y hongos patógenos) con metazoos marinos; determinados con diferentes métodos de caracterización (cultivos en laboratorio y metagenómica), que se describen a continuación:

Bacterias

Algunos estudios han enfocado sus esfuerzos en determinar la microbiota de vertebrados como en la tortuga amarilla (*Caretta caretta*), en la cual se han caracterizado ocho géneros y 10 especies de bacterias (*Burkholderia cepacea*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. rettgeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas mailophilia* y *Vibrio fluvialis*); consideradas como patógenas oportunistas asociadas a infecciones en animales marinos (*e.g.*, tortugas, peces) (Reséndiz *et al.* 2019) y cuyo estudio se realizó en el golfo de Ulloa, Baja California Sur.

Asimismo, se han realizado estudios acerca del ensamblaje bacteriano asociado al mucus y tejidos de especies de corales del género *Pocillopora* (*P. damicornis* y *P. verrucosa*), así como del agua de mar y sedimentos circundantes a estas especies, en seis sitios del Pacífico central mexicano (Nayarit, Jalisco y Colima). Basados en un análisis metagenómico, determinaron 20 Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU), y establecieron que la especificidad de grupos bacterianos para cada especie de coral, del tejido y mucus son diferentes, concluyendo que las bacterias de la mucosidad del coral son adquiridas del agua circundante o de la re-suspensión de sedimentos bénticos; apoyando la teoría de que los corales tienen una microbiota diferente entre sus compartimentos y el entorno circundante (Hernández-Zulueta *et al.* 2017).

En la bahía de Puerto Ángel, se ha analizado las bacterias procedentes de peces y mariscos de consumo humano (estudios que no incluye un listado específico de los organismos revisados) en la localidad, en ellos se registra a *Aeromonas hydrophila* bacteria patógena en humanos (Franco-Monsreal *et al.* 2016); además, se ha registrado la presencia de coliformes fecales, totales y bacterias mesófilas aerobias en tres especies de moluscos de importancia comercial (*Myrakeena angelica*, *Striostrea prismática* y *Spondilus calcifer*) (Huante-González *et al.* 2018).

Hongos

Dentro de los estudios que describen la asociación de hongos y metazoos marinos, se encuentra el trabajo de Barrero-Canosa *et al.* (2013) quienes aislaron e identificaron algunos patógenos fúngicos que afectan a una serie de gorgonias (*Pacificorgia* cf. *eximia*, *P. irene*, *P. stenobrochis*, *Eugorgia aurantiaca* y *Carijoa riisei*) en la costa norte del Pacífico de Colombia. Los autores emplearon 26 muestras de octocorales sanos y 34 enfermos, cada muestra fue sembrada en agar glucosa-peptona (GPYA); aislaron un total de 15 géneros de hongos; nueve géneros en corales enfermos, dos en corales sanos, y los cuatro géneros (*Aspergillus*, *Chaetomium*, *Eutypella* y *Penicillium*) restantes fueron compartidos entre corales sanos y enfermos; incluyendo a *Aspergillus sydowii*; especie que ha sido previamente identificado como responsable de la mortalidad de los corales gorgonias en el Caribe, la presencia de este patógeno, coincide con el aumento de las temperaturas del agua de mar y las anomalías térmicas.

3. Justificación

Los ecosistemas marinos son extremadamente complejos, están contruidos por redes que conectan una gran diversidad de especies, desarrollando diferentes patrones de interacción en diversas escalas espaciales. La mayoría de las comunidades de microorganismos sufren perturbaciones intermitentes como escasez de alimento, alteraciones causadas por las variaciones naturales del entorno (*e.g.*, temperatura, salinidad, pH, etc.) o por la actividad humana (*e.g.*, contaminación, etc.). Estos factores ambientales estresantes y los metabolitos que liberan los microorganismos para enfrentarlas (*e.g.*, enzimas, exopolisacáridos, aminoácidos, azúcares, ácidos orgánicos, antimicrobianos, etc.), crean oportunidades para que los microorganismos se establezcan dentro de la comunidad, además de provocar una respuesta del hospedero con el cual coexisten (de la Cruz-Leyva *et al.* 2014, Rizzo & Giudice 2018).

Los estudios acerca de la diversidad de la microbiota marina están enfocados en el bacterioplancton (Curtis *et al.* 2002, Hagström *et al.* 2002) y en el sedimento (Torsvik *et al.* 1998). El conocimiento del microbioma presente en los policládidos, está centrada en el registro de la presencia de bacterias en una especie aun no descrita del género *Paraplanocera* en Hong Kong, China (Lin *et al.* 2017b). En la costa de Oaxaca, los policládidos sólo han sido estudiados en términos taxonómicos, registrándose para esta región un total de tres superfamilias, ocho familias, 19 géneros (*Bisacculosuteri*, *Bivesiculoplana*, *Boninia*, *Enchiridium*, *Euplanoida*, *Imogine*, *Latocestus*, *Lurymare*, *Notocomplana*, *Paraplanocera*, *Paraprostatum*, *Pericelis*, *Phrikoceros*, *Prosthlostomum*, *Pseudobiceros*, *Pseudoceros*, *Stylochus*, *Thysanozoon* y *Thyttshosoceros*) y 33 especies (Pineda-López & González-Bulnes 1984, Faubel *et al.* 2007, Gutiérrez-Coria 2018, Ramos-Sánchez *et al.* 2019, 2020, 2021); aunado a la importancia de éstos gusanos desde la perspectiva ecológica, económica y farmacéutica (Ritson-Williams *et al.* 2006, Lin *et al.* 2017b). Hasta el momento no se ha generado información acerca de los microorganismos presentes en los policládidos de esta región; por lo anterior, es importante realizar estudios pioneros que contribuyan al conocimiento de la diversidad de microorganismos presentes en *Pericelis nazahui* y su posible interacción.

4. Hipótesis

- Si los microorganismos son los habitantes más abundantes de los océanos y establecen asociaciones con los metazoos marinos, entonces se encontrarán presentes en *Pericelis nazahui*.

5. Objetivos

Objetivo general

- Conocer las especies de microorganismos cultivables presentes en *Pericelis nazahui* en la bahía de Puerto Ángel, Oaxaca, México.

Objetivos específicos

- 1) Aislar los microorganismos cultivables presentes en *Pericelis nazahui*.
- 2) Identificar molecularmente los microorganismos cultivables presentes en *Pericelis nazahui*.
- 3) Caracterizar morfológicamente los microorganismos cultivables presentes en *Pericelis nazahui*.
- 4) Evaluar el crecimiento de los microorganismos cultivables presentes en *Pericelis nazahui* en tres diferentes temperaturas.

6. Área de estudio

El área de estudio comprendió el sustrato rocoso en la zona submareal de playa Panteón (15°40'18"N, 96°29'45"O), Puerto Ángel, Oaxaca (Figura 1), localizado en el Pacífico mexicano, en el municipio de San Pedro Pochutla a 155 km al sur de la ciudad de Oaxaca. Según la clasificación climática de Köppen/Geiger el área de estudio pertenece a la zona Aw (tropical-seco en invierno), forma parte de la región hidrológica RH21 (costa de Oaxaca), cuenca hidrológica B, subcuenca b y de acuerdo a los datos de la estación meteorológica de Puerto Ángel (CNA clave 76885), la cantidad de precipitación pluvial, que se registra entre mayo y octubre, fluctúa entre los 550 a 1,540 mm por año, con lo que se generan arroyos intermitentes, que desembocan en la bahía (Mendoza Amézquita *et al.* 2017).

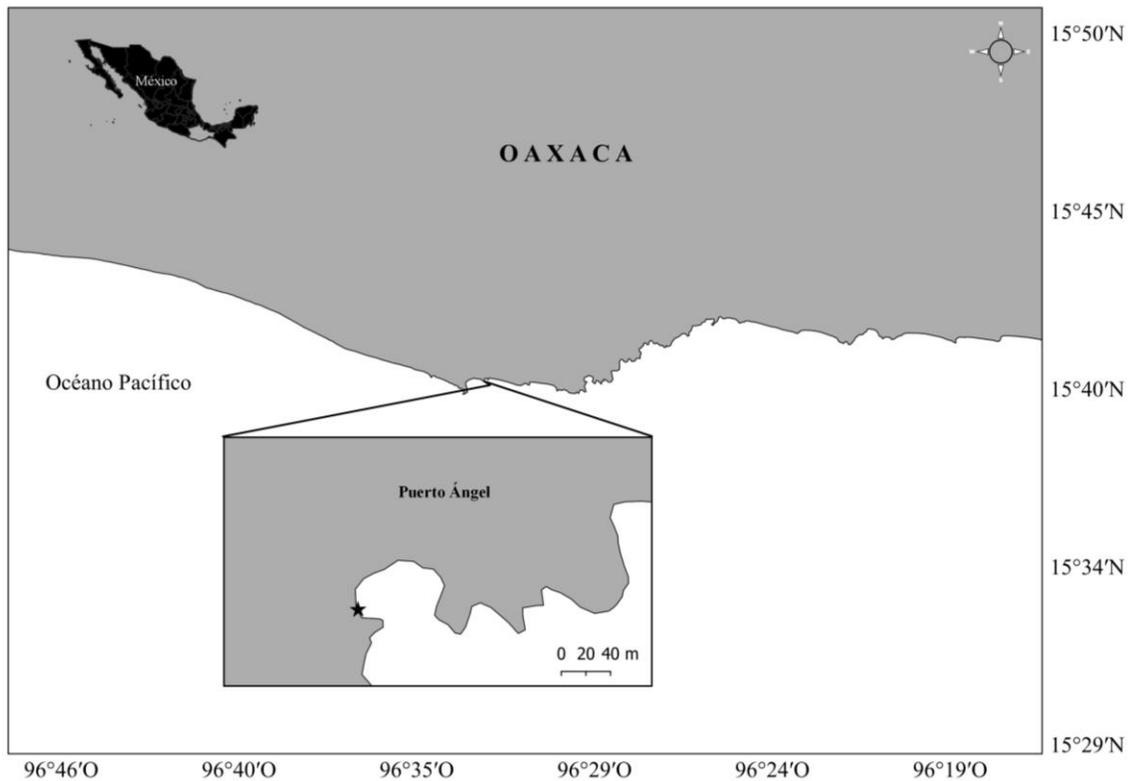


FIGURA 1. Área de estudio, bahía de Puerto Ángel, Oaxaca, y localización del sitio de muestreo.

7. Materiales y métodos

7.1. Obtención de muestras

Los ejemplares de *Pericelis nazahui* fueron procedentes de una recolecta, extraídos manualmente bajo rocas a una profundidad entre 2.5-4 m, mediante buceo libre en playa Panteón, Oaxaca; en marzo de 2020. Para la identificación del gusano, se consideraron las características de la morfología externa de los ejemplares, de acuerdo a Ramos-Sánchez *et al.* (2020).

Para el trabajo de aislamiento de la microbiota se recolectaron tres ejemplares del gusano policládido; estos fueron retirados del sustrato con ayuda de un pincel de cerdas finas; posteriormente se depositaron en bolsas plásticas estériles con agua del medio y fueron transportados al Laboratorio de Investigación de Microbiología y Genética de la Universidad del Mar, en donde se tomaron fotos *in vivo* para registrar el color y el patrón de coloración con

ayuda de un microscopio estereoscópico (Olympus SZ51) y una cámara digital (CANNON-E05). Adicionalmente, en una bitácora de campo se registró los datos de la localidad de recolecta, fecha, recolector, sustrato, patrón de coloración, fauna asociada, temperatura, salinidad, pH y se tomaron muestras de agua con la finalidad conocer el valor y concentración de los parámetros ambientales durante la recolección de los ejemplares.

7.2. Análisis de nutrientes

Para llevar a cabo este proceso se extrajo una muestra de agua por triplicado del área circundante (superficie y 5 m de profundidad) en donde se recolectaron los gusanos, utilizando botellas de plástico de 250 ml; las muestras se etiquetaron y se mantuvieron en congelación (-20°C) hasta su análisis posterior.

La concentración de amonio, fosfato, nitratos y nitritos, se determinaron utilizando un fotómetro Hanna (HI83099), empleando cada uno de los reactivos y procedimientos descritos a continuación; todos los valores fueron expresados en μM .

Previo a cada análisis, se adicionaron 10 ml de muestra en cada celda espectrofotométrica, se cerró debidamente y se realizó una primera lectura en el fotómetro, la cual se estableció como blanco (valor= "0.0"), posteriormente se continuó con cada análisis, tal como se describe a continuación:

Amonio (NH_4^+)

Basado en la adaptación del método Nessler, del *ASTM Manual of Water and Environmental Technology*, D142692; a la muestra se le adicionaron cuatro gotas del reactivo HI 93715A-0, se homogenizó manualmente y posteriormente se le adicionaron cuatro gotas de HI 93715B-0, se mezcló y se esperó 3 min y 30 segundos, procediendo luego con la lectura nuevamente; posteriormente se le adicionaron cuatro gotas de HI 937000A-0 y finalmente se adicionaron cuatro gotas del reactivo HI 93700B-0, se homogenizó y se procedió a la lectura. La reacción entre el amoníaco y los reactivos provoca un tinte amarillo en la muestra.

Fosfato (PO_4^{3-})

Basado en la adaptación de método de aminoácidos, del *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, de la 18ª edición; a la muestra contenida en una celda

espectrofotométrica, se le adicionaron 10 gotas del reactivo HI 93717A-0 molibdato, después se le añadió un sobre del reactivo HI 93717B-0 Phosphate HR B, se agitó suavemente hasta su completa disolución, se esperaron cinco minutos y se continuó con la lectura de la muestra. La reacción entre el fosfato y los reactivos provoca un tinte azul en la muestra.

Nitrato (NO_3^-)

Se empleó el método de reducción del cadmio del *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, de la 18ª edición. Usando una pipeta, se llenó la celda con 6 ml de muestra, se cerró debidamente y se realizó una primera lectura en el fotómetro que estableció como blanco (valor= "0.0"), posteriormente se añadió el contenido del reactivo HI 93728-0, se agitó la solución energéticamente en posición vertical durante 10 s y se continuó mezclando invirtiendo suavemente la celda durante 50 s, teniendo cuidado de no introducir burbujas de aire; posteriormente se esperaron 4 min con 30 s y se procedió a la lectura. La reacción entre el nitrato y el reactivo provoca un tinte ámbar en la muestra.

Nitrito (NO_2^-)

Este análisis se llevó a cabo bajo la adaptación del método de diazotización 354.1 de la *Environmental Protection Agency (EPA)* de los Estados Unidos. A la muestra se le adicionó el reactivo HI 93708-0, se agitó suavemente hasta completar su disolución, se esperaron 10 min, para posteriormente continuar con la lectura de la muestra. La reacción entre el nitrito y el reactivo provoca un tinte rosado en la muestra.

7.3. Aislamiento y purificación de los microorganismos

Preparación de medios de cultivos sólidos

Para el aislamiento de la microbiota de **crecimiento rápido** se utilizó agar marino (Xu *et al.* 2015) y para los de **crecimiento lento**, se utilizó agar M2 (Mincer *et al.* 2002).

Para preparar el agar marino (Anexo II), los reactivos se mezclaron con agua de mar filtrada (extraída previamente del área de muestreo); la mezcla fue calentada hasta alcanzar el punto de ebullición, utilizando una plancha de calentamiento y agitación (Thermolyne Cimarec® 2), posteriormente se esterilizó en una autoclave (Felisa FE-398U) durante 15 minutos a 15 lb/plg² y a 121°C. Para preparar el medio M2 (Anexo II), se disolvió el agar

cuidadosamente en agua marina estéril y se ajustó el pH (7.0–7.5 unidades), se calentó hasta ebullición durante 1 min, posteriormente la mezcla fue esterilizada en el autoclave durante 15 min a 15 lb/plg² y a 121°C; culminado el proceso anterior, se le adicionó ciclohexamida y gentamicinas previamente esterilizadas por filtración.

Una vez finalizado el proceso de esterilización, cada medio fue vertido en cajas Petri, las cuales se mantuvieron en refrigeración hasta su uso; todo el proceso fue realizado en un área estéril.

Aislamiento

Para el aislamiento de la microbiota de *Pericelis nazahui*, se consideró la presencia de **microorganismos de crecimiento rápido (MCR)** y de **crecimiento lento (MCL)**, de acuerdo al siguiente diseño experimental (Fig. 2):

Tratamiento 1: Organismos lavados

Se utilizaron dos ejemplares de *P. nazahui*, los cuáles fueron sometidos individualmente a dos lavados con agua de mar estéril a temperatura ambiente, para eliminar materia orgánica y/o sedimento presente. Posteriormente se homogenizaron con ayuda de un agitador Vortex (DRAGON LAB) en tubos Falcon que contenían 5 ml de agua de mar estéril.

Para la búsqueda de **microorganismos de crecimiento rápido (MCR)**, la muestra fue homogeneizada y sembrada por el método de estría cruzada en agar marino, empleando un asa microbiológica (Tortora *et al.* 2017). En la siembra de **microorganismos de crecimiento lento (MCL)**, la muestra líquida se colocó sobre un papel filtro dentro de cajas Petri (ambos estériles) y se dejó secar en una campana de flujo laminar durante 24 h (Mincer *et al.* 2002, Becerril-Espinosa *et al.* 2013); una vez secas, se procedió a la siembra mediante la técnica de siembra masiva, que consistió en tomar la muestra previamente seca y homogeneizada con un hisopo estéril, para ser distribuida sobre la placa de agar M2 (Tortora *et al.* 2017).

Finalmente, las cajas con las siembras fueron selladas con Parafilm® y puestas en incubación a una temperatura entre 24-28°C, hasta la aparición de las colonias de microorganismos (Hernández Márquez 2015, Xu *et al.* 2015).

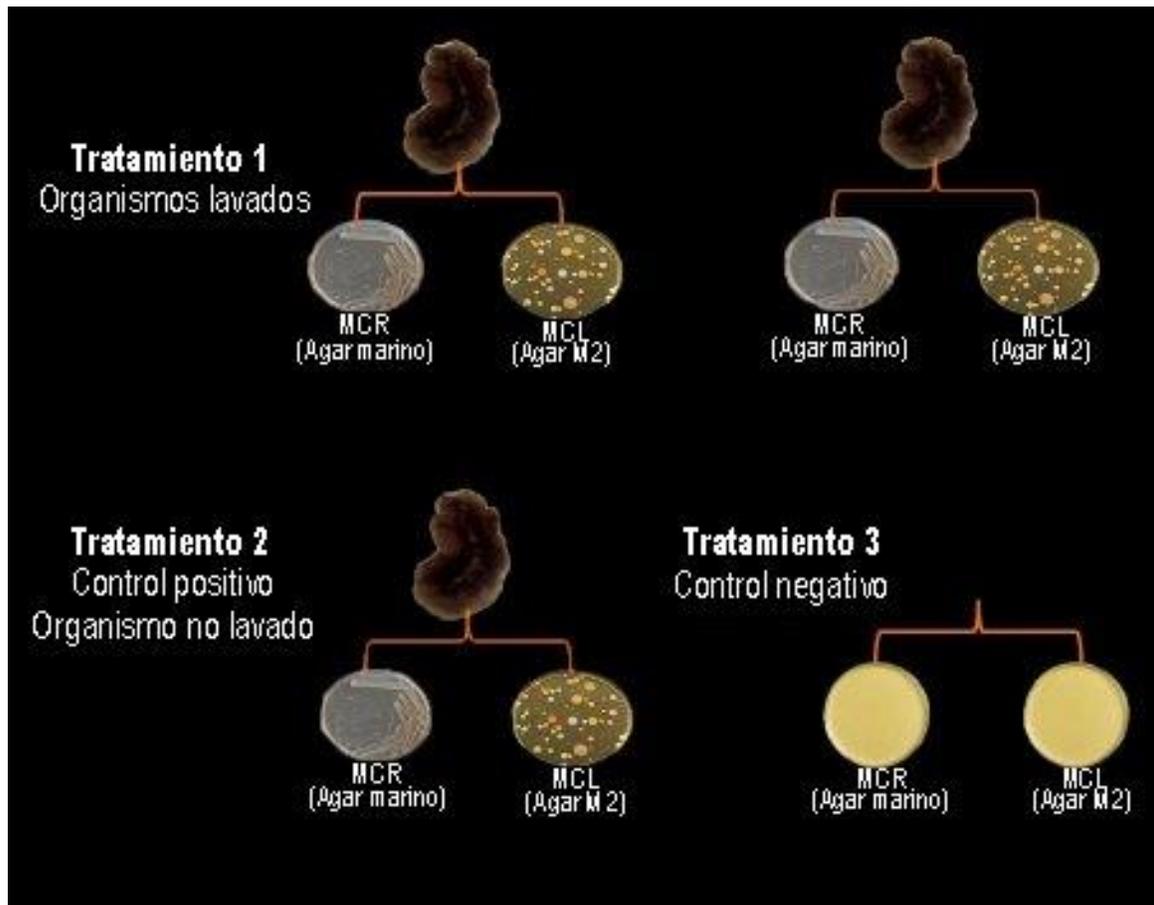


FIGURA 2. Diseño experimental para el aislamiento de los microorganismos presentes en *Pericelis nazahui* (MCR: Microorganismos de crecimiento rápido, MCL: Microorganismos de crecimiento lento) Fuente propia.

Tratamiento 2: Organismo sin lavar -Control positivo-

Para identificar los microorganismos que no se eliminaron de los policládidos durante el proceso de lavado, se homogeneizó un único ejemplar sin lavado previo; utilizando 5 ml del agua estéril del medio de donde se extrajo el ejemplar. La muestra homogeneizada fue sembrada e incubada en agar marino y agar M2, tal como se describió anteriormente.

Tratamiento 3: Sin organismo -Control negativo-

Para evaluar el efecto de contaminación por manipulación durante el procesamiento, se incubaron cajas Petri exclusivamente con el medio de cultivo empleados en el aislamiento; mismas que fueron incubadas como se describió anteriormente.

Purificación de las cepas aisladas

Los microorganismos desarrollados en los medios de cultivo fueron seleccionados por medio de las características macroscópicas externas de la colonia (Fig. 3a–d; Anexo III) tomando en cuenta el tamaño, color, forma, borde y apariencia (Vargas-Flores & Kuno-Vargas 2014).

7.4. Identificación de los microorganismos

En la identificación de los microorganismos presentes en *Pericelis nazahui* se implementó el uso de herramientas moleculares y morfológicas; de acuerdo al tipo de microorganismo se utilizaron las siguientes metodologías:

7.4.1. Análisis molecular

Obtención de biomasa

Para la obtención de la biomasa de los cultivos de bacterias, se tomó una asada de la colonia crecida en el agar A1, y se sembró en 40 ml de medio A1 líquido; luego se colocaron a 28°C en una incubadora (Gyromax) con agitación constante (150 rpm), posteriormente se realizaron dos nuevos cultivos tomando como inóculo la biomasa del tercer día; la cosecha del pellet se realizó del tercer cultivo (noveno día), para ello, se transfirió el volumen total a tubos Falcon estériles de 50 ml, posteriormente utilizando una centrifuga (Thermo Scientific Heraeus Megafuge 16R) se centrifugaron a 3803 x g, durante 10 min a 20°C; consecutivamente el sobrenadante fue desechado conservando el pellet, que fue transferido a tubos Beadbeater estériles de 2 ml.

En la obtención de la biomasa fúngica, cada cepa fue inoculada en agar A1 y puestas en incubación a temperatura ambiente (28±1), hasta el crecimiento de las colonias microbianas. Posteriormente se tomó una asada (1 cm²) de la cepa, se depositó en un tubo de Beadbeater con perlas de circonio estériles para facilitar la lisis celular de la muestra.

Extracción del Ácido Desoxirribonucleico (ADN)

Para la obtención del ADN, se utilizaron cuatro métodos descritos a continuación:

Método de acetato de potasio (ACK)

A la muestra contenida en un tubo de Beadbeater con perlas de circonio, se le adicionó 500 µl de *buffer* lisis (1M Tris-HCL (pH 8 unidades), 0.5M EDTA, 10% SDS y agua destilada) y se dejó reposar durante 10 min a temperatura ambiente, posteriormente para obtener la lisis celular, se le adicionaron 150 µl de ACK (pH 8 unidades) (150 mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 0.1mM EDTA); empleando un disruptor mecánico *Mini-Beadbeater* (Biospec: 3110BXEUR) se agitó a 4,800 x g durante 1 min; la solución fue transferida a un nuevo tubo Eppendorf estéril de 1.5 ml y se centrifugó a 1,3150 x g durante 5 min a 5°C; el sobrenadante fue trasferido a un nuevo tubo y se le agregó un volumen igual de alcohol isopropanol, la muestra fue homogeneizada manualmente e incubada durante 24 h a -70°C; finalizado el tiempo de incubación se centrifugó a 1,3150 x g por 15 min a 4°C; se desechó el sobrenadante conservando el pellet, el cual se lavó con 300 µl de etanol al 70% y la mezcla fue centrifugada a 1,3150 x g por 15 min a 4°C, el sobrenadante fue extraído y el pellet se secó a 60°C durante 6 min empleando una incubadora (Thermolyne DB28125 Dri-Bath), finalmente el ADN fue resuspendido en 30 µl de agua ultrapura y almacenado a una temperatura de -70°C (modificado de Rosero *et al.* 2010).

Método de cetil trimetil amonio (CTAB 2x)

A la muestra se le agregó 500 µl de CTAB 2x (2% CTAB, 100 mM Tris (pH 8.0 unidades), 20 mM EDTA, 1.4M NaCl) y se incubó durante 2 h a 80°C, para lograr la lisis celular la muestra fue agitada cada 10 min con un disruptor mecánico Mini-Beadbeater a 4,800 x g durante 1 min; posteriormente se transfirió a un tubo Eppendorf estéril y se adicionaron 500 µl de cloroformo-alcohol isopentanol (24:1), se homogenizó y centrifugó a 1,180 x g, durante 10 min a 20°C; el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y se le adicionó nuevamente 500 µl de cloroformo-alcohol isopentanol (24:1), fue homogenizado y centrifugado como se describe anteriormente; el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo, se le agregaron 1,000 µl de etanol al 96% y se incubó durante 1 h a -70°C, finalizado este tiempo se agregó 50 µl de acetato de sodio (3M) homogeneizando manualmente la muestra; posteriormente se centrifugó a 1,3150 x g por 10 min a 20°C; se desechó el sobrenadante conservando el pellet, que se lavó con 500 µl de etanol

al 70% y se centrifugó a 1,3000 x g durante 10 min a 20°C; el sobrenadante fue extraído y la muestra se secó a 60°C durante 6 min, finalmente el ADN fue resuspendido en 30 µl de agua ultrapura y almacenado a una temperatura de -70°C (modificado de Bonnaud *et al.* 1998).

Método de Marmur

Las muestras, fueron resuspendidas en 750 µl de *buffer* P1 (Tris-borato (TBE), EDTA, agua destilada, pH 8 unidades), 3.75 µl de RNase (0.5 mg/ml concentración final) y 1 mg/ml de lisozima, la mezcla fue homogeneizada e incubada durante 5 h a 37°C, posteriormente fue transferida a tubos Eppendorf estériles; se le adicionó 37.5 µl de SDS al 20% (1% concentración final) y 8 µl de 10 mg/ml de proteinasa K (0.1 mg/ml concentración final), se homogenizó durante 1 min empleando un agitador Vortex (DRAGON LAB) y se incubó 30 min a 37°C; la mezcla fue transferida a tubos nuevos e incubada nuevamente 30 min a 65°C; se agregó 150 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se homogenizó durante 30 s y se centrifugó a 1,3150 x g por 2 min a 20°C; posteriormente se adicionaron 200 µl de acetato de potasio saturado, se homogenizó durante 1 min empleando un agitador Vortex, se centrifugó a 1,3150 x g por 2 min a 20°C (si la capa acuosa superior era clara, se continuó con el siguiente paso, de lo contrario si la capa era brumosa se adicionó más acetato de potasio; cuando se presentó una consistencia viscosa se agregó cloroformo y se agitó durante 1 min); la capa acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se le adicionó el mismo volumen de isopropanol, se incubó durante 24 h a -70°C, finalizado el proceso, la muestra se centrifugó a 1,3150 x g por 20 min a 20°C; el sobrenadante fue desechado y se conservó el pellet, que se lavó con 300 µl de etanol al 70%, se centrifugó a 1,3150 x g durante 20 min a 20°C; el sobrenadante fue extraído y el pellet se secó a 60 °C durante 6 min, finalmente el ADN fue resuspendido en 31 µl de agua ultrapura y almacenado a una temperatura de -70°C (modificado de Marmur 1961).

Método QIAGEN (DNeasy Blood & Tissue Kit)

A las muestras contenidas en tubos de Beadbeater, se adicionaron 180 µl de *buffer* ATL y 20 µl de Proteínasa K (1 mg/ml), la muestra fue incubada durante 2 horas a 56°C y durante este periodo cada 10-20 min se homogenizaron (4800 x g durante 1 min) utilizando el disruptor

mecánico Mini-Beadbeater. Pasado este tiempo, se le adicionaron 200 µl de *buffer* AL y se homogenizó por vorteo; la solución restante fue transferida a un tubo Eppendorf de 2 ml e incubada durante 1 h a 56°C, durante este tiempo se mezcló suavemente, invirtiendo el tubo cada 10-20 min durante 1 min; finalizando este proceso se adicionó 200 µl de etanol al 100% se agitó durante 1 min y se incubó a -4°C durante 1 h; la mezcla se transfirió a la columna (2 ml) y se centrifugó a 8,000 x g por 3 min a 20°C; posteriormente se descartó el filtrado y se cambió la columna. Se añadió 500 µl de *buffer* AW1, se centrifugó a 8,000 x g durante 1 min a 20°C, la columna fue remplazada y el filtrado descartado. Se añadió 500 µl de *buffer* AW2 y se centrifugó a 1,3150 x g por 3 min a 20°C, se cambió la columna y el filtrado fue descartado nuevamente. Para la extracción de ADN se agregó 30 µl de *buffer* AE y se incubó por 5 min a temperatura ambiente, después se centrifugó a 1,3150 x g durante 1 min a 20°C, sin descartar la columna se adicionó nuevamente 30 µl de *buffer* AE y se siguieron los pasos ya descritos; finalmente el ADN extraído fue trasferido a un tubo Eppendorf de 1.5 ml estéril y almacenado a -70°C (Qiagen Inc., California).

La calidad y presencia del ADN extraído con las metodologías anteriores, fueron evaluadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (Anexo IV) (Lee *et al.* 2012). Cada muestra de ADN fue cuantificada empleando un microespectrofotómetro (Allsheng Nano-100) y las concentraciones fueron expresadas en ng/µl.

Las muestras con buen contenido de ADN fueron almacenadas a -70°C hasta la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés).

Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la identificación de las muestras con características bacterianas se utilizó el gen 16S del ADN ribosomal; la amplificación se realizó con el kit GoTaq ADN polimerasa, en un termociclador BIORAD T100, utilizando los cebadores universales para procariotas 27F (5'--AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTTG TTACGACTT-3'); bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 72°C por 2 min seguida de 30 ciclos de 95°C por 1 min; un alineamiento de 52°C por 1 min, una extensión de 72°C por 2 min y una extensión final de 72°C por 5 min (modificado de Gontang *et al.* 2007). La reacción de PCR, se realizó en un volumen de 50 µl, conteniendo: *buffer* GoTaq 5X (1X), cloruro de magnesio

(MgCl₂) (1.5mM), desoxirribosa nucleótido trifosfato (dNTP) (0.2 mM), cebadores 27F y 1492R (0.5 mM de cada uno) y Taq polimerasa (0.06 μ/ μl), ADN muestra (25 ng/μl) y agua grado biología molecular.

En las cepas con características fúngicas, se analizó el gen de la subunidad grande (LSU o 28S) de rADN, la amplificación del gen 28S del rADN fue secuenciada con los cebadores universales para eucariotas D1R (5'-ACCCGCTGAATTTAAGCA-3') y D2CR (5'-CCTTGGTCCGTG-3'). Se preparó una mezcla homogénea de 20 μl de reacción que contenía el mix de reacción: agua grado biología molecular, *buffer* 5X (1M), MgCl₂ (1.5 mM), dNTP (0.2 mM), cebadores D1R y D2CR (0.5 mM de cada uno), Taq polimerasa (0.06 μ/ μl) y ADN muestra (25 ng/μl); bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial de 94°C por 4 min, seguida de 30 ciclos de 94°C por 2 min; un alineamiento de 52°C por 2 min, una extensión de 72°C por 2 min y una extensión final de 72°C por 2 min (modificado de Sonnenberg *et al.* 2007) todo el proceso se llevó a cabo en un termociclador BIORAD T100.

Los productos de la amplificación del PCR fueron observados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se compararon con una escalera de ADN estándar de 1Kb; en las cepas donde se observó la amplificación de los productos de PCR se enviaron al servicio de secuenciación en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Medica y Ambiental (LANBAMA) del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. (IPICYT) en San Luis Potosí. Para las cepas que se analizaron con la región del Espaciador Transcrito Interno (ITS), la extracción del ADN, la amplificación de los productos de PCR con los cebadores ITS1 e ITS4 y la secuenciación se realizaron por servicio externo, de acuerdo a los protocolos establecidos por el LANBAMA.

Ensamblaje, edición de secuencias y análisis filogenético

Las secuencias obtenidas fueron analizadas y editadas en el programa BioEdit Sequence Alignment Editor y se ensamblaron en el programa ChromasPro ver. 2.1.10; posteriormente se compararon con secuencias similares en la base de datos BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI); posteriormente se creó una base de datos con las secuencias disponibles y con una similitud entre secuencias > 90%, estas fueron alineadas usando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor; el

conjunto de datos alineados se analizó en el programa MEGA ver. 5.2.2 (Tamura *et al.* 2011) y posteriormente se continuó con la construcción de los árboles filogenéticos utilizando el método estadístico de Máxima verosimilitud (MV), para determinar el soporte de las ramas se realizó un *bootstrap* de 1,000 pseudoreplicas y se emplearon los modelos de evolución de sustitución nucleotídica y el de Kimura–2 parámetros (Kimura 1980, Felsenstein 1985, Kumar *et al.* 2018).

Para conocer la magnitud de la identidad genética (similaridad) o su complemento (distancia) del material genético entre la secuencia de interés y las secuencias homologas a estas, se calcularon las distancias genéticas a partir del modelo de Kimura–2 parámetros (Kimura 1980).

7.4.2. Caracterización morfológica

Macroscópica

La caracterización macroscópica de las cepas de bacterias y hongos purificadas se realizó a contra luz y con ayuda de un microscopio-estereoscópico (Olympus SZ51) (Anexo III) (Vargas-Flores & Kuno-Vargas 2014). Para ello, las cepas aisladas se hicieron crecer en los medios A1 (bacterias y hongos), agar Czapek (CZA) y agar de dextrosa y papa (PDA) (solo hongos) (Anexo II), se tomó en cuenta las características del patrón de crecimiento de la colonia (forma, tipo de borde, elevación, superficie, apariencia, etc.) de acuerdo a lo descrito por Castañeda Briones (2004) (Fig. 3a-d).

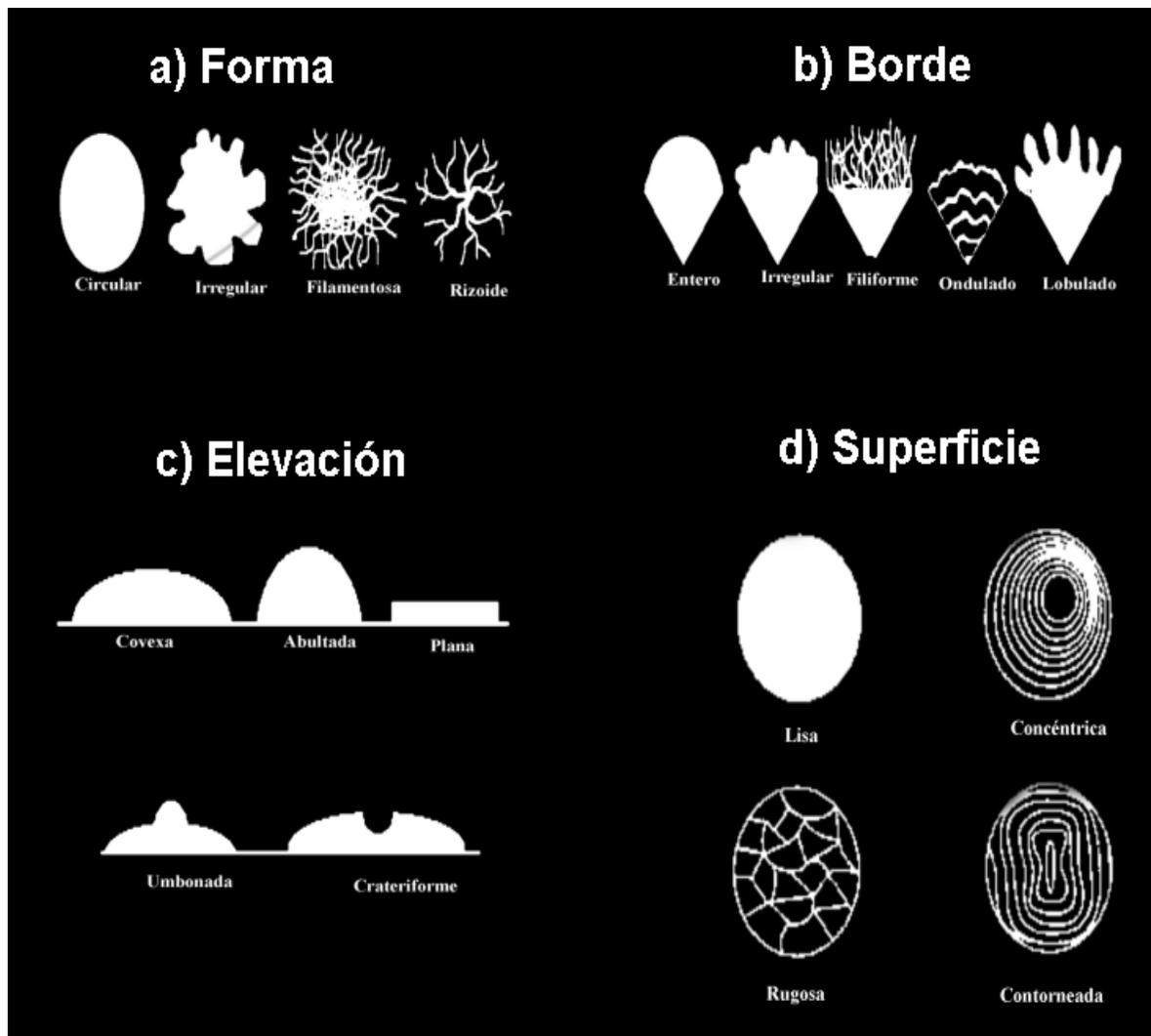


FIGURA 3. Esquema de la morfología colonial en placa de los microorganismos cultivados en un medio sólido. Caracterización morfológica con base en: a) forma, b) borde, c) elevación y d) superficie. Modificado de Castañeda Briones (2004).

Microscópica

Para la revisión microscópica se emplearon diferentes procesos, dependiendo del grupo de microorganismo:

En las bacterias, se determinó la forma, tamaño de las células (Fig. 4, Anexo III) y composición de la pared celular empleando dos técnicas; la tinción Gram o tinción diferencial de rutina y la prueba del hidróxido de potasio (KOH) (Buck 1982, Jiménez Tobón & Vélez Hoyos 2012).

En las colonias que presentaron morfología de hongos se empleó la tinción de rutina del azul de lactofenol para observar las características microscópicas (Fig. 4).

Tinción Gram o tinción diferencial de rutina: Con un asa bacteriológica se tomó una asada de la colonia; se depositó en un portaobjetos que contenía una gota de agua destilada (~7µl), se realizó un frotis para homogenizar la muestra, se dejó secar y se fijó con calor, pasando levemente el portaobjeto a la llama del mechero; posteriormente se adicionó una gota de cristal violeta (0.5%) se conservó por 1 min, después se lavó con agua destilada y se agregó una gota de lugol (1%) que se mantuvo por 1 min; para el proceso de diferenciación se adicionó alcohol/cetona (1:1) y después se lavó con agua destilada; el contraste celular se obtuvo agregando una gota de safranina (1%) dejando actuar por 1 min, en seguida se lavó con agua corriente y se dejó secar (Jiménez Tobón & Vélez Hoyos 2012) previo a su revisión mediante microscopía óptica.

Con esta tinción las bacterias Gram negativas toman una coloración rojiza, mientras que las Gram positivas son de color azul-violeta (Castañeda Briones 2004, Jiménez Tobón & Vélez Hoyos 2012).

Prueba del hidróxido de potasio (KOH): Esta prueba fue empleada para evitar falsos positivos o negativos obtenidos en la tinción Gram, y que pueden estar relacionados con la composición estructural y química de la pared celular, la edad del cultivo de la colonia, el pH (Buck 1982) o cuando la interpretación es dudosa.

Para ello, en un portaobjeto se adicionaron aproximadamente ~14 µl de KOH al 3%; posteriormente con un asa bacteriológica se tomó una asada de la colonia, que fue depositada en el portaobjetos; la muestra fue homogeneizada mediante movimientos giratorios durante 1 a 3 min; se esperó entre 30 a 60 segundos para que la muestra reaccionará.

Las bacterias Gram negativas se tornan viscosas y con pequeñas hebras blancuzcas, mientras que, las Gram positivas no sufren ningún cambio (Buck 1982).

Tinción de azul de lactofenol: Con un asa bacteriológica se tomó una asada de la colonia, que fue depositada en un portaobjetos que contenía una gota de azul de lactofenol (~7µl) y

posteriormente se colocó un cubreobjeto para ser revisada en microscopía óptica (LABOMED CX_{RII}); se observó la morfología de la hifa, del conidióforo, la presencia/ausencia de esporas, conidios, etc. (Fig. 4) (Pitt & Hocking 2009, Visagie *et al.* 2014a).

Para las láminas ilustrativas de cada cepa se fotografiaron las características macro y microscópicas, y realizadas en el software Paint Shop Pro ver. 7.

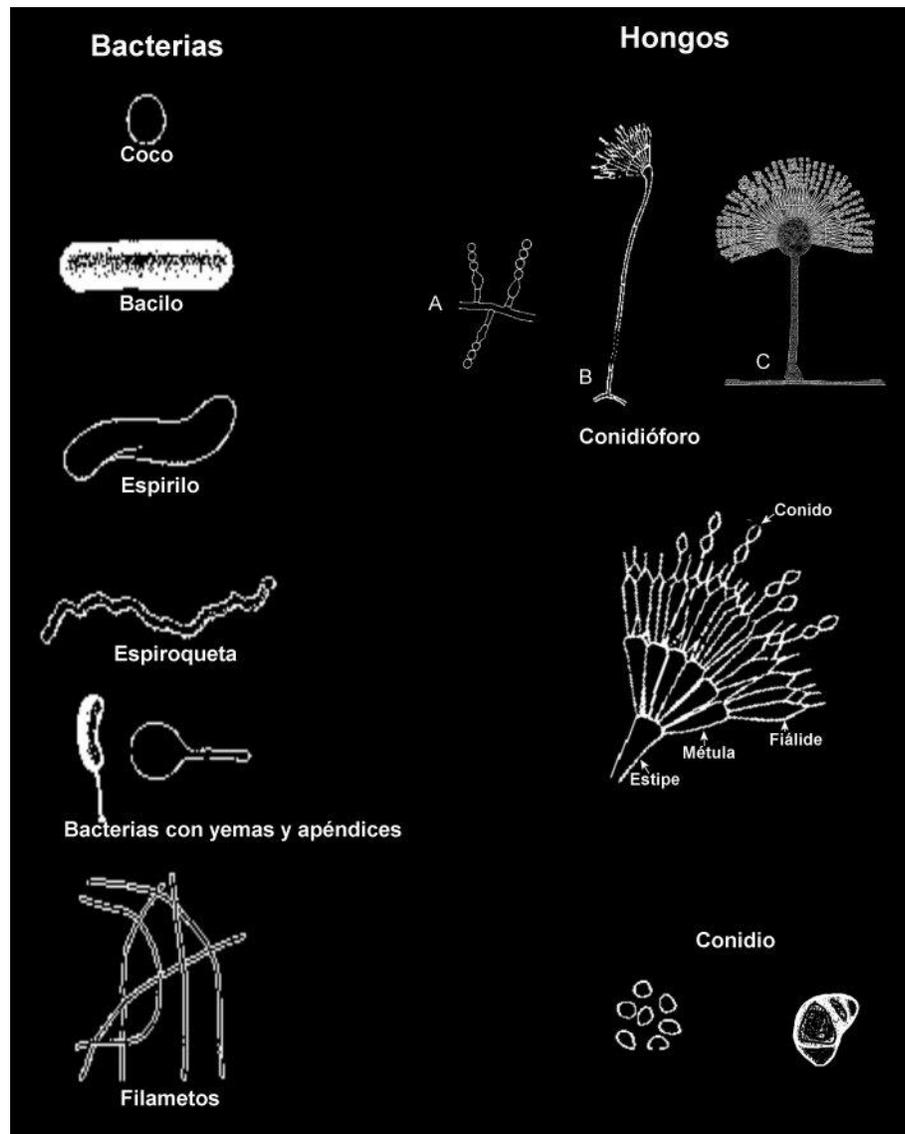


FIGURA 4. Esquema de la morfología celular representativa de algunos microorganismos: bacterias y hongos cultivados en un medio sólido. Bacterias: Ilustración tomada de Castañeda Briones (2004); Hongos: Ilustración modificada de Visagie *et al.* (2014a), Pitt & Hocking (2009). A) conidióforo simple, B, C) conidióforos complejos.

7.5. Características de crecimiento de las colonias (salinidad y temperatura)

Dado que las cepas fueron aisladas de un ambiente marino, para conocer si éstas se desarrollaban en condiciones diferentes a las aisladas (salinidad de 35 UPS, 28.5°C), las cepas fueron inoculadas en tubos con agar inclinado A1, empleando una salinidad de 35 UPS y de 0, se pusieron en incubación a temperatura ambiente (28±2 °C) y fueron revisadas diariamente hasta el desarrollo de las colonias.

Para evaluar el crecimiento de cada una de las cepas con respecto a la temperatura, se consideraron las temperaturas de 25, 28 y 30±1°C, registradas en la región del Pacífico sur mexicano (*sensus* Fiedler & Talley 2006) y en el área de estudio (Figuroa-Zavala 2007). Para llevar a cabo esta evaluación las cepas fueron inoculadas de la siguiente manera:

En las bacterias, el inóculo fue sembrado por duplicado en 40 ml de medio A1 líquido (salinidad de 35 UPS); posteriormente los matraces se mantuvieron en incubación a temperatura (25, 28 y 30±1°C) y agitación constante (150 rpm). La cosecha de la muestra se realizó hasta que la cepa presentará esporulación (para aquellas que presentan esta característica) o cuando la biomasa superará la mitad del volumen del medio establecido; una vez observada alguna de estas características de cosecha, el volumen total fue transferido a tubos Falcon estériles de 50 ml, posteriormente se centrifugaron a 4,500 x g durante 10 min a 24°C; el sobrenadante fue desechado conservando el pellet, el cual se secó utilizando una incubadora (marca Gyromax) a un temperatura constante de 50°C. Para la cuantificación del crecimiento bacteriano se utilizó el método directo gravimétrico determinado la biomasa a partir del peso seco y expresando el resultado en gramos/días. Los datos y gráficas fueron procesados empleando el software Sigmaplot ver. 11.0.

Los hongos fueron inoculados en agar CZA por duplicado, se incubaron a temperatura de 25, 28 y 30±1°C. La cuantificación del crecimiento fúngico fue determinada con base en el diámetro de la colonia, para lo cual se registraron las medidas durante 15 días, expresadas en centímetros (cm)/ día.

La tasa de crecimiento (μ_{\max}) de las cepas de hongos fue determinada a partir del modelo matemático de Gompertz (Winsor 1932), para ello se utilizó la siguiente formula: $Y = Ke^{-e^{-ax}}$

donde:

a =intervalo máximo de crecimiento,
 K =Constante (=1),
 e =Constante matemática,
 xc =Valor del punto de inflexión,

Los valores de μ_{\max} y las gráficas de las curvas de crecimiento de cada cepa fueron calculadas en el software Data Analysis and Graphing Origin ver. 6.1.

7.6. Criopreservación

Una vez que las cepas fueron purificadas, identificadas y clasificadas por morfotipos, se sembraron en medio A1 sólido y líquido, posteriormente en un tubo Eppendorf estéril, se adicionó 1 ml de una solución de glicerina al 20% con agua de mar (solución previamente esterilizada); posteriormente se tomó 1 cm³ de la cepa purificada y fue inoculada en la solución de glicerina al 20% (Hernández Márquez 2015). Cada cepa fue inoculada por triplicado, etiquetadas y almacenadas a -70°C, y depositadas en el Laboratorio de Investigación de la Universidad del Mar, campus Puerto Ángel.

8. Resultados

8.1. Variables físico-químicas

El área de estudio se caracterizó por presentar una salinidad de 35 UPS, una temperatura de 28.5°C y un valor de pH de 8.5 unidades, una concentración de 0.257 μM de amoníaco (NH_4^+), 0.013 μM de fosfato (PO_4^{-3}), 0.015 μM de nitratos (NO_3^-) y 0.0006 μM de nitritos (NO_2^-).

8.2. Microorganismos desarrollados y aislados

Se aislaron y purificaron un total de 12 cepas obtenidas de los tres ejemplares de *Pericelis nazahui* recolectados para este estudio; sólo se desarrolló una cepa en los primeros 10 días de

cultivo (**rápido crecimiento**), sembrada y purificada en agar marino; y luego de tres meses de incubación en agar M2 y purificadas en agar A1, se desarrollaron 11 cepas (**lento crecimiento**). Del organismo lavado No.1 se obtuvieron dos cepas, para el organismo lavado No. 2 seis cepas y para el organismo no lavado No. 3 cuatro cepas (Tabla 1).

Tabla 1. Número de cepas aisladas y purificadas de *Pericelis nazahui*

Número de organismo de <i>P. nazahui</i> de la cual fue aislada y purificada cada cepa		
1 (organismo lavado)	2 (organismo lavado)	3 (organismo sin lavar)
M2P1-H3	M2P2-B1	M2P3-H5
M2P1-H4	M2P2-B2	M2P3-H6
	M2P2-B3	M2P3-H7
	M2P2-B4	M2P3-B5
	AMP2-H1	
	M2P2-H2	

Clave de identificación de la cepa: Medio de aislamiento, No. De organismo del que fue aislada, dominio o reino al cual pertenece el microorganismo aislado, No. De la cepa purificada. AM: Agar marino, M2: Agar M2, B: Bacteria, H: Hongo.

De las 12 cepas obtenidas, siete colonias mostraron el 35% de la abundancia, cuya morfología fue representada por la cepa establecida como M2P3-H5, seguida por la cepa M2P2-B1 y M2P2-B2 quienes presentaron dos colonias (10%) cada una y las nueve cepas restantes sólo presentaron una colonia (5%) en cada caja de aislamiento (Fig. 5).

Composición de las cepas aisladas de *Pericelis nazahui*

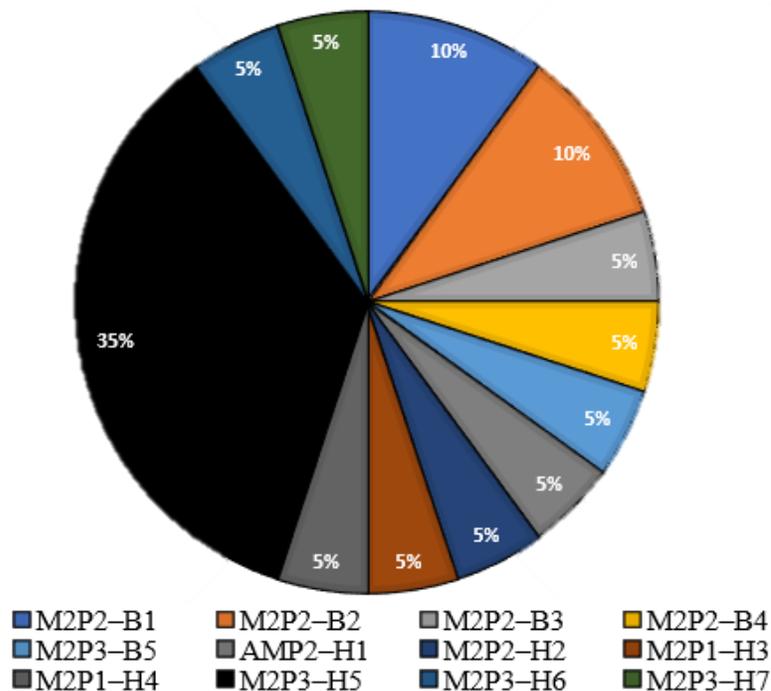


FIGURA 5. Composición y abundancia relativa de la microbiota presente en *Pericelis nazahui*

8.2.1. Caracterización genética, morfológica y crecimiento

De las 12 cepas obtenidas, a partir de características macro y microscópicas se determinaron que cinco cepas correspondieron al reino Monera del dominio Bacteria (B1 a 5) y siete al reino Fungi del dominio Eukarya (H1-7). Con la construcción de los árboles filogenéticos para las bacterias, a partir de las secuencias del gen 16S rADN, se determinó que tres cepas (M2P2-B1 a B3) pertenecieron al género *Streptomyces*, una (M2P2-B4) al género *Nocardiosis* y una (M2P2-B5) al género *Paracoccus*. Para las cepas de hongos, las secuencias obtenidas con la región 28S rADN determinaron que dos cepas (AMP2-H1, M2P3-H6) pertenecían al género *Simplicillium*, una (M2P1-H4) al género *Penicillium* y otra (M2P2-H2) fue cercana a miembros del orden Xylariales; utilizando la región del Espaciador Transcrito Interno (ITS) se determinó una cepa (M2P1-H5) en el género *Aspergillus* y otra (M2P1-H3) en el género *Cladosporium*, y

finalmente la cepa M2P3-H7 a partir de las características morfológicas se determinó dentro del género *Penicillium*.

Las características moleculares y morfológicas que presentaron las cepas correspondientes a los diferentes géneros, en el dominio Bacteria del reino Monera y en el dominio Eukarya del reino Fungi, se describen a continuación:

Sección bacteria

Reino Monera Haeckel 1986

Dominio Bacteria Woese *et al.* 1990

Filo Actinobacteria Goodfellow 2012

Clase Actinobacteria Stackebrandt *et al.* 1997

Orden Actinomycetales Buchanan 1917

Suborden Streptomycineae Rainey *et al.* 1997

Familia Streptomycetaceae Waksman & Henrici 1943

Género *Streptomyces* Waksman & Henrici 1943

***Streptomyces* spp.**

Cepa M2P2-B1, M2P2-B2, M2P2-B3

Caracterización molecular: Los resultados filogenéticos indicaron que las cepas M2P2-B1, M2P2-B2 y M2P2-B3 molecularmente forman una agrupación consistente dentro del género *Streptomyces* (Fig. 6). Este análisis se realizó con base en 1,385 pares de bases (pb) alineadas de las secuencias del gen 16S rADN; el árbol filogenético fue construido con 43 secuencias, de ellas 38 secuencias de las especies de *Streptomyces* similares a las tres cepas de interés aisladas en este estudio (identificadas mediante el análisis BLAST con un 97% de similitud), la secuencia de la especie tipo del género *Streptomyces albus* y la secuencia de *Rubrobacter radiotolerans* asignada como grupo externo (Fig. 6).

Las cepas M2P2-B1 y M2P2-B2, formaron un nodo con un porcentaje de agrupación del 57%, con un valor de distancia genética 16S rADN de 0.003 ($\sigma = 0.002$), estas fueron determinadas como ***Streptomyces* sp. 1** y ***Streptomyces* sp. 2** (respectivamente); mientras que la cepa M2P2-B3 establecida como ***Streptomyces* sp. 3** formó un nodo con un porcentaje de

agrupación del 88% con *S. daliensis* con un valor de distancia genética 16S rADN del 0.009 ($\sigma=0.004$) (Tabla 2).

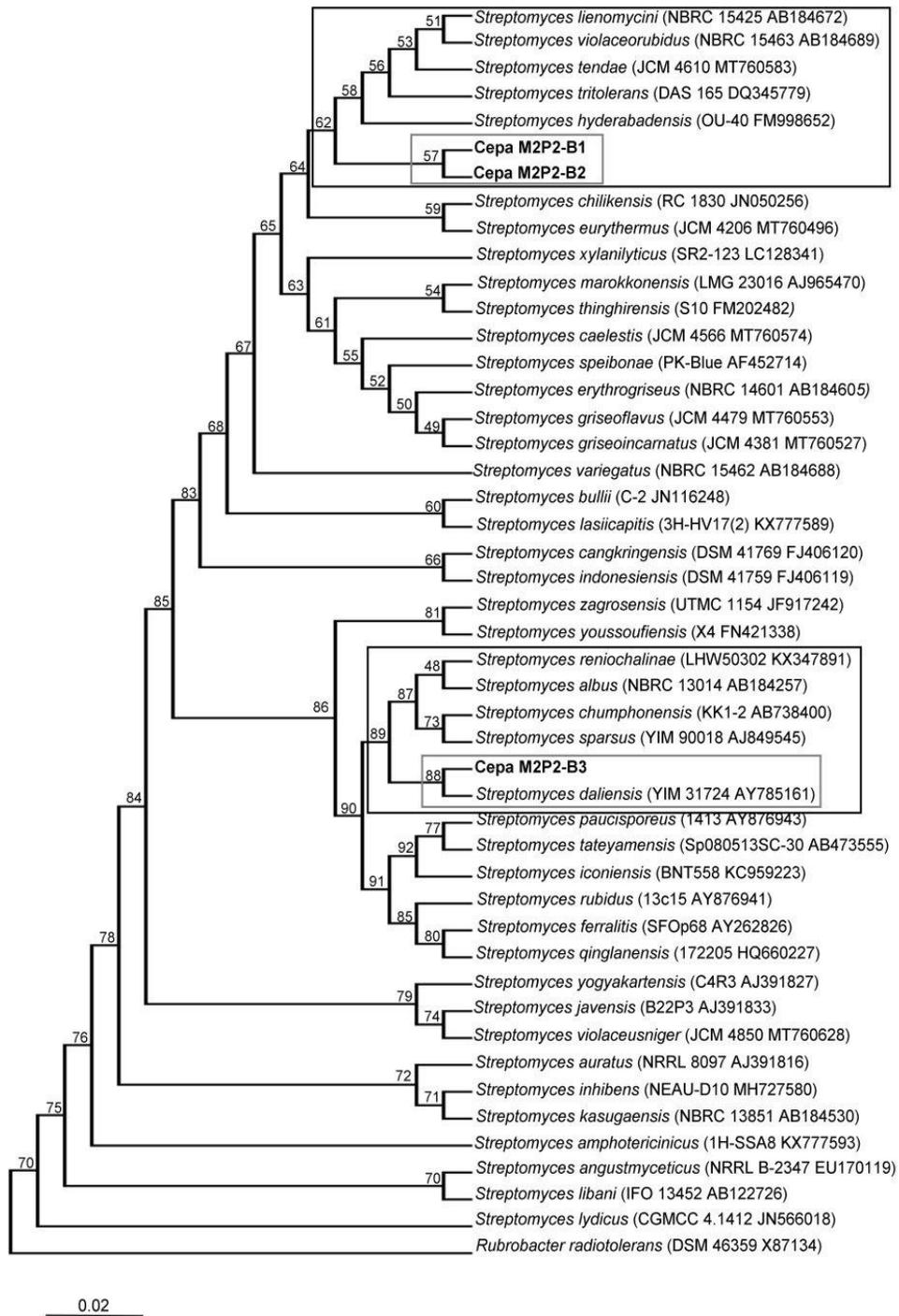


FIGURA 6. Árbol filogenético obtenido con el análisis de Máxima Verosimilitud (Felsenstein 1993) que muestra la posición taxonómica de las tres cepas aisladas M2P2-B1, M2P2-B2 y M2P2-B3 dentro del género *Streptomyces* y sus vecinos filogenéticos, basado en 1,385 pb de secuencias del gen 16S rADN. Los valores de *bootstrap* de las ramas indican el porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agruparon (1,000 réplicas). Los números de acceso en el *GenBank* de la secuencia se indican entre paréntesis. La secuencia de *Rubrobacter radiotolerans* (DSM 46359 X87134) se utilizó como grupo externo.

Tabla 2. Distancia genética por pares entre las cepas M2P2-B1, M2P2-B2, M2P2-B3 y el linaje de las especies de *Streptomyces* filogenéticamente cercanas, recalculadas con el modelo de Kimura–2 parámetros. El error estándar se muestra en letras negritas

Taxón	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. Cepa M2P2-B1		0.000	0.007	0.008	0.007	0.008	0.004	0.005	0.008	0.008	0.004	0.004	0.005
2. Cepa M2P2-B2	0.000		0.007	0.008	0.007	0.008	0.004	0.005	0.008	0.008	0.004	0.004	0.005
3. Cepa M2P2-B3	0.032	0.032		0.006	0.005	0.004	0.007	0.008	0.006	0.005	0.007	0.008	0.008
4. <i>S. albus</i> (NBRC 13014 AB184257)	0.039	0.039	0.018		0.005	0.006	0.009	0.009	0.004	0.006	0.009	0.009	0.009
5. <i>S. chumphonensis</i> (KK1 2 AB738400)	0.032	0.032	0.015	0.017		0.005	0.008	0.008	0.006	0.005	0.008	0.008	0.008
6. <i>S. daliensis</i> (YIM 31724 AY785161)	0.036	0.036	0.009	0.020	0.017		0.008	0.008	0.006	0.005	0.008	0.008	0.008
7. <i>S. hyderabadensis</i> (OU 40 FM998652)	0.009	0.009	0.032	0.043	0.034	0.037		0.005	0.009	0.008	0.004	0.004	0.004
8. <i>S. lienomycini</i> (NBRC15425 AB184672)	0.013	0.013	0.034	0.047	0.032	0.037	0.011		0.009	0.008	0.003	0.004	0.002
9. <i>S. reniochaliniae</i> (LHW50302 KX347891)	0.039	0.039	0.018	0.007	0.020	0.022	0.043	0.047		0.006	0.009	0.009	0.009
10. <i>S. sparsus</i> (YIM 90018 AJ849545)	0.036	0.036	0.015	0.022	0.013	0.017	0.037	0.037	0.022		0.008	0.008	0.008
11. <i>S. tendae</i> (JCM 4610 MT760583)	0.009	0.009	0.032	0.045	0.032	0.036	0.007	0.004	0.045	0.036		0.003	0.002
12. <i>S. triolerans</i> (DAS 165 DQ345779)	0.009	0.009	0.034	0.043	0.034	0.037	0.007	0.007	0.043	0.037	0.004		0.003
13. <i>S. violaceorubidus</i> (NBRC 15463 AB184689)	0.011	0.011	0.034	0.047	0.034	0.037	0.009	0.002	0.047	0.037	0.002	0.006	

***Streptomyces* sp. 1**

Cepa M2P2-B1

Caracterización macroscópica: Colonia circular, de 0.8 mm/día de diámetro, de borde ondulado, elevación convexa a ligeramente crateriforme, superficie lisa y consistencia grasosa (Fig. 7B). El anverso de la colonia es beige (a tres días de la inoculación) (Fig. 7A); naranja-rojizo (seis días) (Fig. 7C) y por el proceso de esporulación (12 días) la región marginal se torna blanca-grisácea (Fig. 7D); finalmente de color gris (17 días) (Fig. 7E); el reverso es beige y posteriormente rojizo. Micelios aéreos blancos y consecutivamente grisáceos (Fig. 7D).

Caracterización microscópica: Se determinó como una bacteria Gram-positiva, de acuerdo a la tinción Gram y la prueba de KOH; presenta micelios filamentosos que llegan a medir 0.15 μm de largo y células de tipo bacilo de 0.17–2.14 μm ($n=10$, $\bar{x}=1.42$ μm , $ES=0.12$) de largo y 1.07–1.42 μm ($n=10$, $\bar{x}=1.21$ μm , $ES=0.05$) de ancho (Fig. 7F).

Crecimiento en tres temperaturas: El crecimiento en salinidad de 35 UPS y en diferentes temperaturas, mostró que la mayor biomasa diaria obtenida (0.570 ± 0.006 g/día), se presentó a temperaturas de 25 y 30°C (Fig. 8). Las coloraciones y olor terroso descritos anteriormente se conservaron.

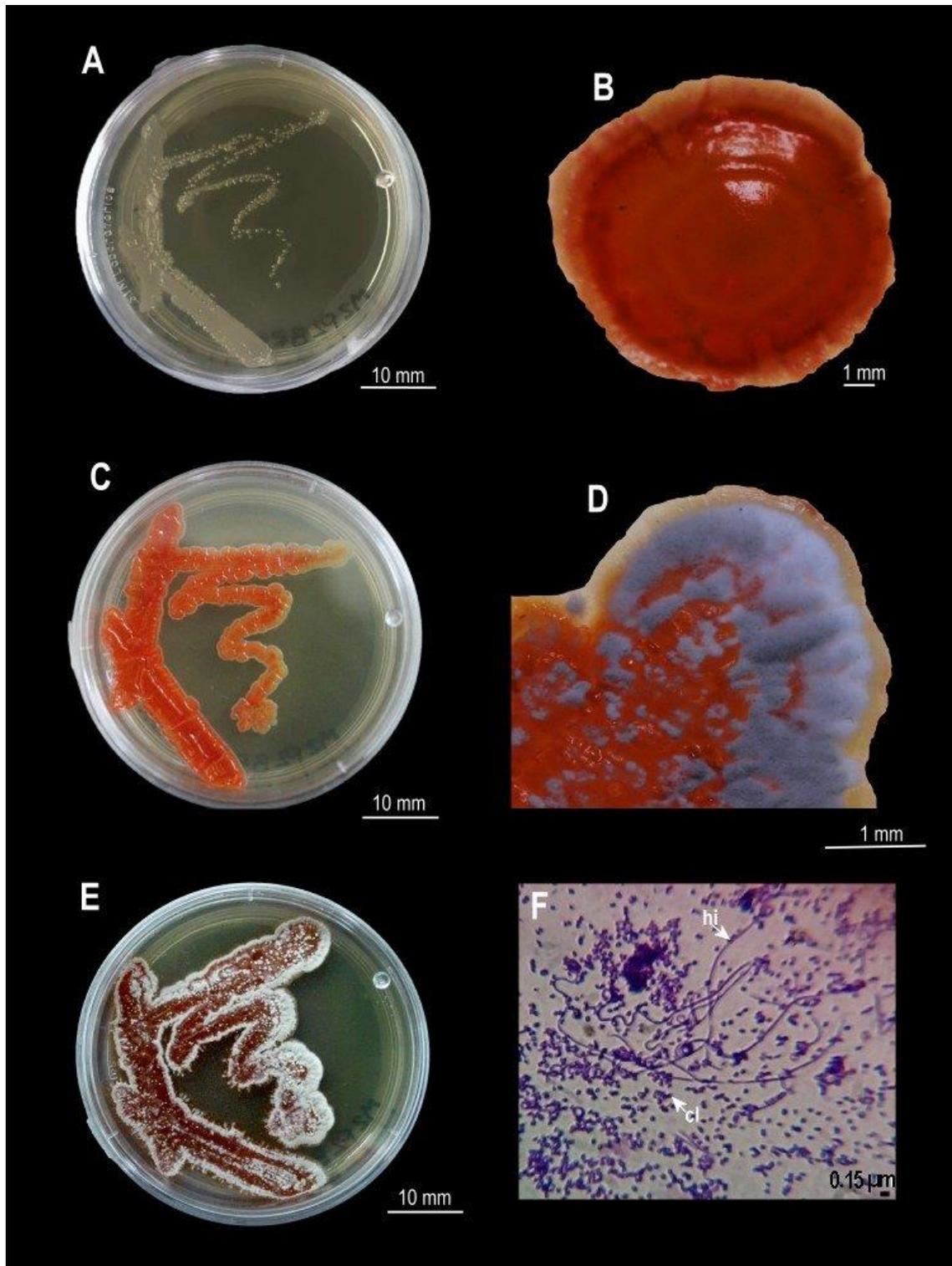


FIGURA 7. *Streptomyces sp. 1* (cepa M2P2-B1), inoculada en agar A1, cepa aislada de *Pericelis nazahui* No. 2 (organismo lavado). A–E. características macroscópicas de la colonia; A, C, E. anverso; B. morfología macroscópica de la colonia; D. región marginal de la colonia con presencia de micelios; F. características microscópicas, tinción Gram. Estructuras: cl= células, hi= hifa.

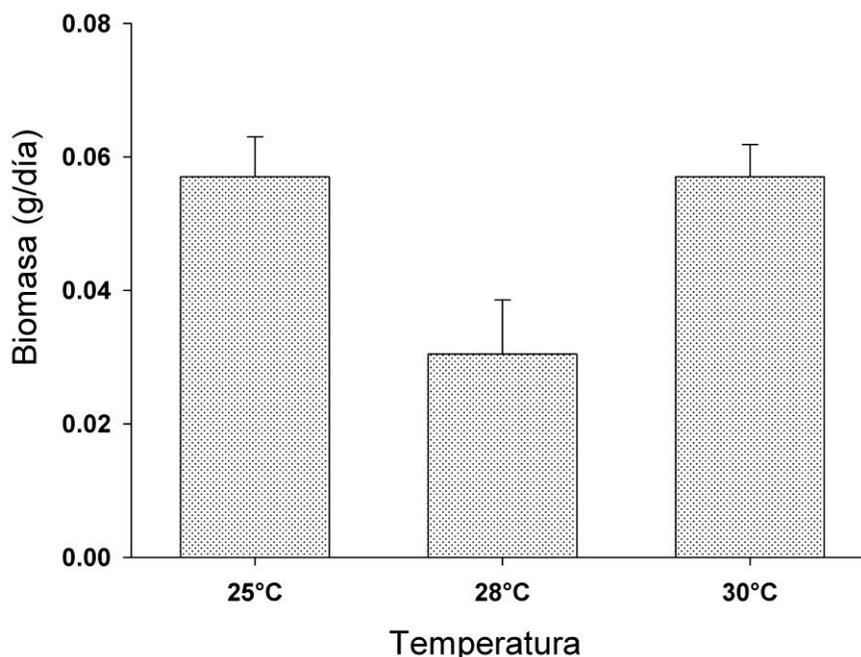


FIGURA 8. Efecto de la temperatura en la generación de biomasa (peso seco) de *Streptomyces* sp. 1 (cepa M2P2-B1), evaluada en medio líquido A1. Los valores representan el promedio \pm error estándar de la biomasa (peso seco) diaria de dos muestras.

***Streptomyces* sp. 2**

Cepa M2P2-B2

Caracterización macroscópica: Colonia circular, de 0.6 mm/día de diámetro, de borde entero, elevación umbilicada, superficie lisa y consistencia grasosa (Fig. 9B). El anverso de la colonia es amarillo (a tres días de la inoculación) (Fig. 9A) y posteriormente presenta una coloración blanca-grisácea en la región marginal por el proceso de esporulación (12 días) (Fig. 9C–D); para finalmente ser de color gris (17 días) (Fig. 9E). Reverso de la colonia inicialmente es beige y consecutivamente de color amarillo. Micelios aéreos de color blanco y después grisáceos (Fig. 9D–E).

Caracterización microscópica: Bacteria Gram-positiva; con micelios filamentosos y células de tipo coco, presentó un diámetro entre 0.79–1.79 μm ($n=10$, $\bar{X}=1.03$ μm , $ES=0.10$) (Fig. 9F).

Crecimiento en tres temperaturas: La cepa presentó la mayor biomasa diaria a 28°C (0.039 \pm 0.010 g/día), la cual decrece a temperaturas de 25 y 30°C, registrando valores de 0.024 \pm 0.004

y de 0.006 ± 0.002 g/día, respectivamente (Fig. 10). En las diferentes condiciones de crecimiento y a una salinidad de 35 UPS, la cepa conservó las coloraciones descritas y presentó olor terroso.

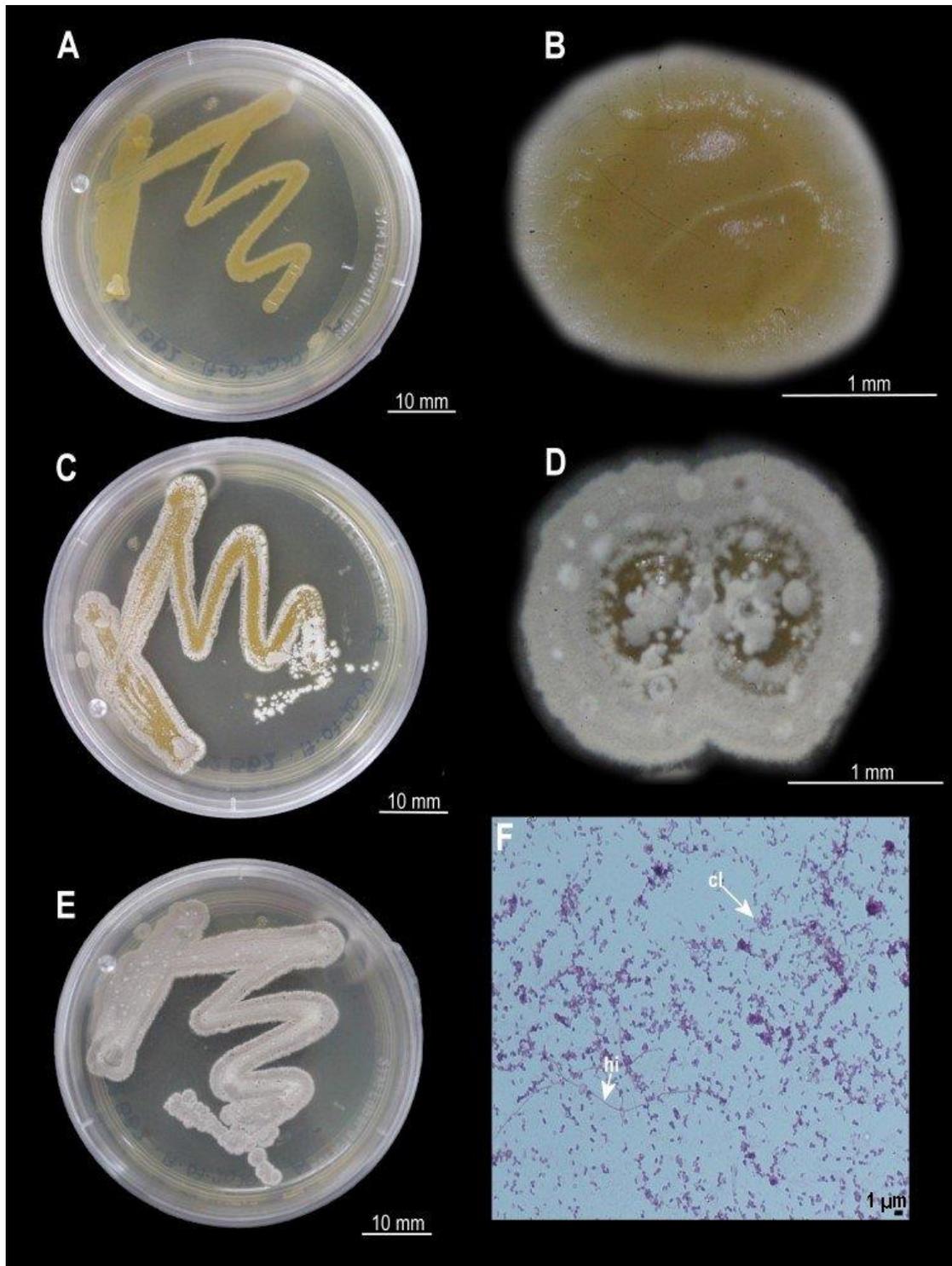


FIGURA 9. *Streptomyces* sp. 2 (cepa M2P2-B2), inoculada en agar A1, cepa aislada de *Pericelis nazahui* No. 2 (organismo lavado). A–E. características macroscópicas de la colonia; A, C, E. anverso; B. morfología macroscópica de la colonia; D. región marginal y central de la colonia con presencia de micelios; F. características microscópicas, tinción Gram. Estructuras: cl= células, hi= hifa.

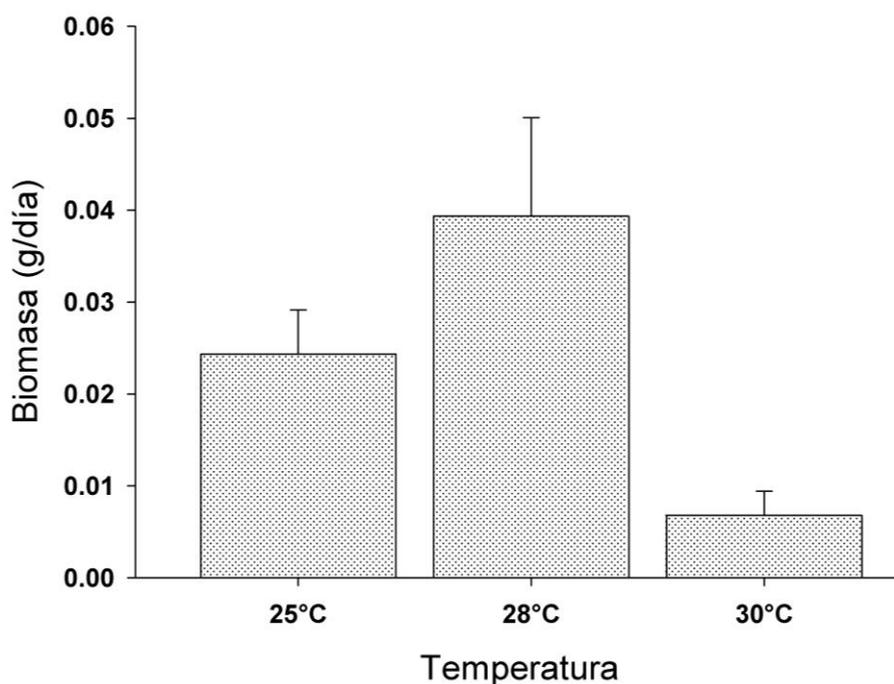


FIGURA 10. Efecto de la temperatura en la generación de biomasa (peso seco) de *Streptomyces* sp. 2 (cepa M2P2-B2), evaluada en medio líquido A1. Los valores representan el promedio \pm error estándar de la biomasa (peso seco) diaria de dos muestras.

***Streptomyces* sp. 3**

Cepa M2P2-B3

Caracterización macroscópica: Colonia puntiforme de 0.19 mm/día de diámetro, de borde entero, elevación papilada, superficie lisa y consistencia opaca-polvorienta (Fig. 11B–C). Anverso y reverso de la colonia marrón claro (a tres días de la inoculación) y posteriormente amarillo a ligeramente marrón claro (Fig. 11A–D).

Caracterización microscópica: Bacteria Gram-positiva, con células de tipo bacilo (Fig. 11E), miden 0.71–1.79 μm ($n=10$, $\bar{X}=1.32$ μm , $ES=0.10$) de largo y 1.25 μm ($n=10$, $\bar{X}=1.25$ μm , $ES=0$) de ancho.

Crecimiento en tres temperaturas: La cepa presentó diferencias en su crecimiento diario a diferentes temperaturas y salinidad de 35 UPS; el valor máximo de biomasa se registró a 25 y

30°C (0.062 ± 0.020 g/día) (Fig. 12). En las tres temperaturas la cepa conservó las coloraciones descritas y presentó olor terroso.

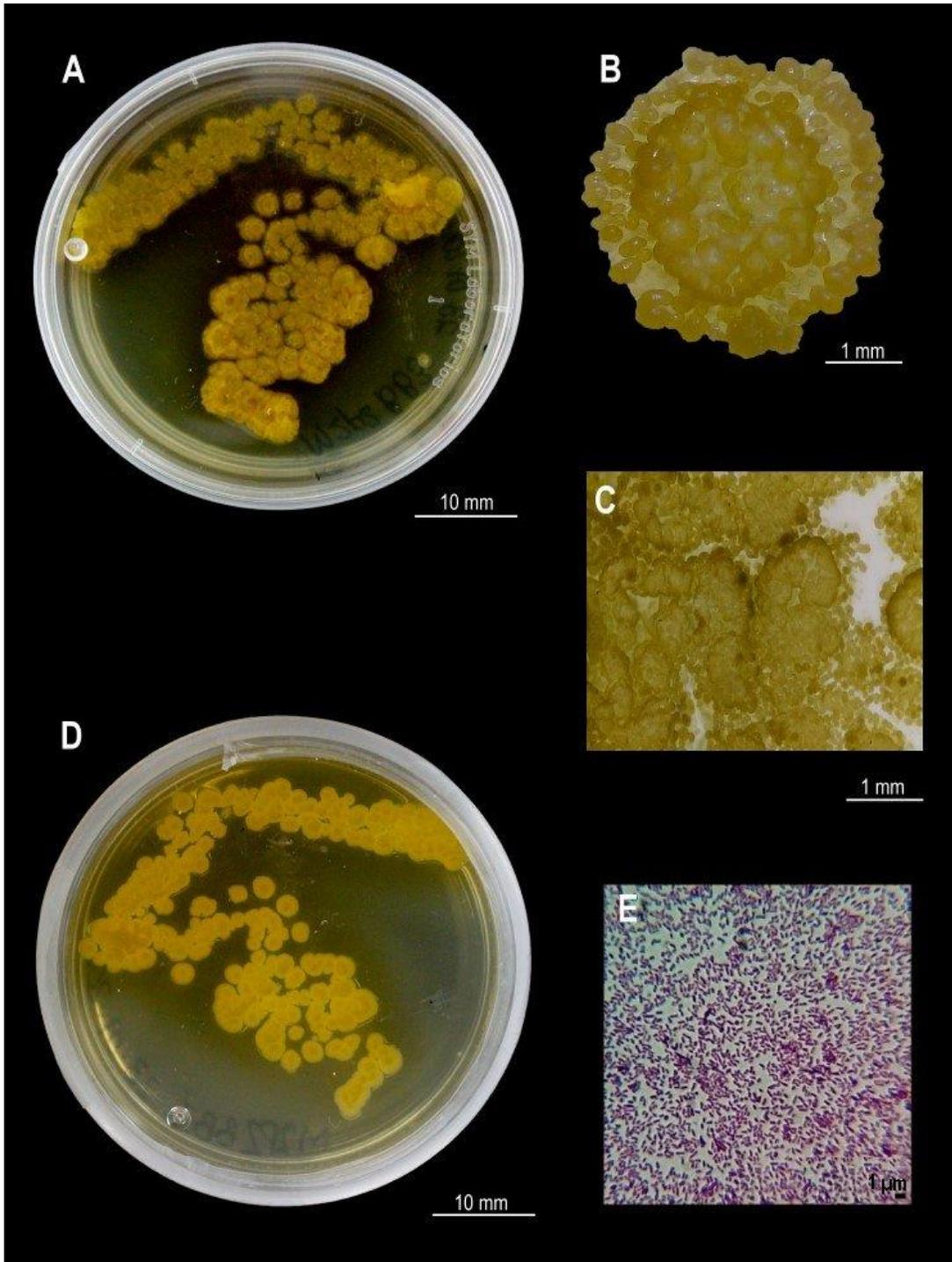


FIGURA 11. *Streptomyces* sp. 3 (cepa M2P2-B3), inoculada en agar A1, cepa aislada de *Pericelis nazahui* No. 2 (organismo lavado). A–D. características macroscópicas de la colonia; A–C. anverso; B. morfología macroscópica de la colonia; D. reverso de la colonia; E. características microscópicas, tinción Gram.

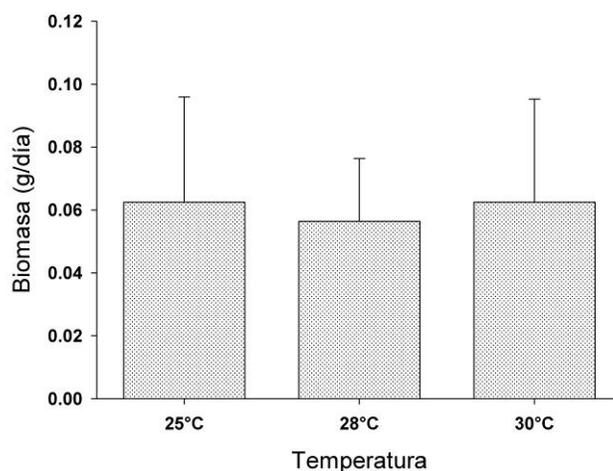


FIGURA 12. Efecto de la temperatura en la generación de biomasa (peso seco) de *Streptomyces* sp. 3 (cepa M2P2-B3), evaluada en medio A1. Los valores representan el promedio \pm error estándar de la biomasa (peso seco) diaria de dos muestras.

Reino Monera Haeckel 1986

Dominio Bacteria Woese *et al.* 1990

Filo Actinobacteria Goodfellow 2012

Clase Actinobacteria Stackebrandt *et al.* 1997

Orden Streptosporangiales Goodfellow 2015

Familia Nocardioseae Rainey, Ward-Rainey, Kroppenstedt y Stackebrandt, 1996

Género *Nocardioopsis* (Brocq-Rousseau 1904) Meyer 1976

Nocardioopsis sp. 1

Cepa M2P3-B5

Caracterización molecular: El análisis molecular indicó que la cepa M2P3-B5, molecularmente forma una agrupación consistente dentro del género *Nocardioopsis* (Fig. 13). Este análisis se realizó con base en 1,413 pb alineadas de las secuencias del gen 16S rADN; el árbol filogenético fue construido con 44 secuencias, de ellas 41 secuencias de las especies de *Nocardioopsis* similares a la cepa de interés aislada en este estudio (identificados mediante el análisis BLAST con un 94% de similitud), la secuencia de la especie tipo del género *Nocardioopsis dassonvillei* y la secuencia de *Atopobium minutum* asignada como grupo externo (Fig. 13).

Con este análisis la cepa M2P3-B5 forma un nodo con un porcentaje de agrupación del 62% con *Nocardiopsis dassonvillei* con un valor de distancia genética 16S rADN de 0.015 ($\sigma= 0.006$) (Tabla 3).

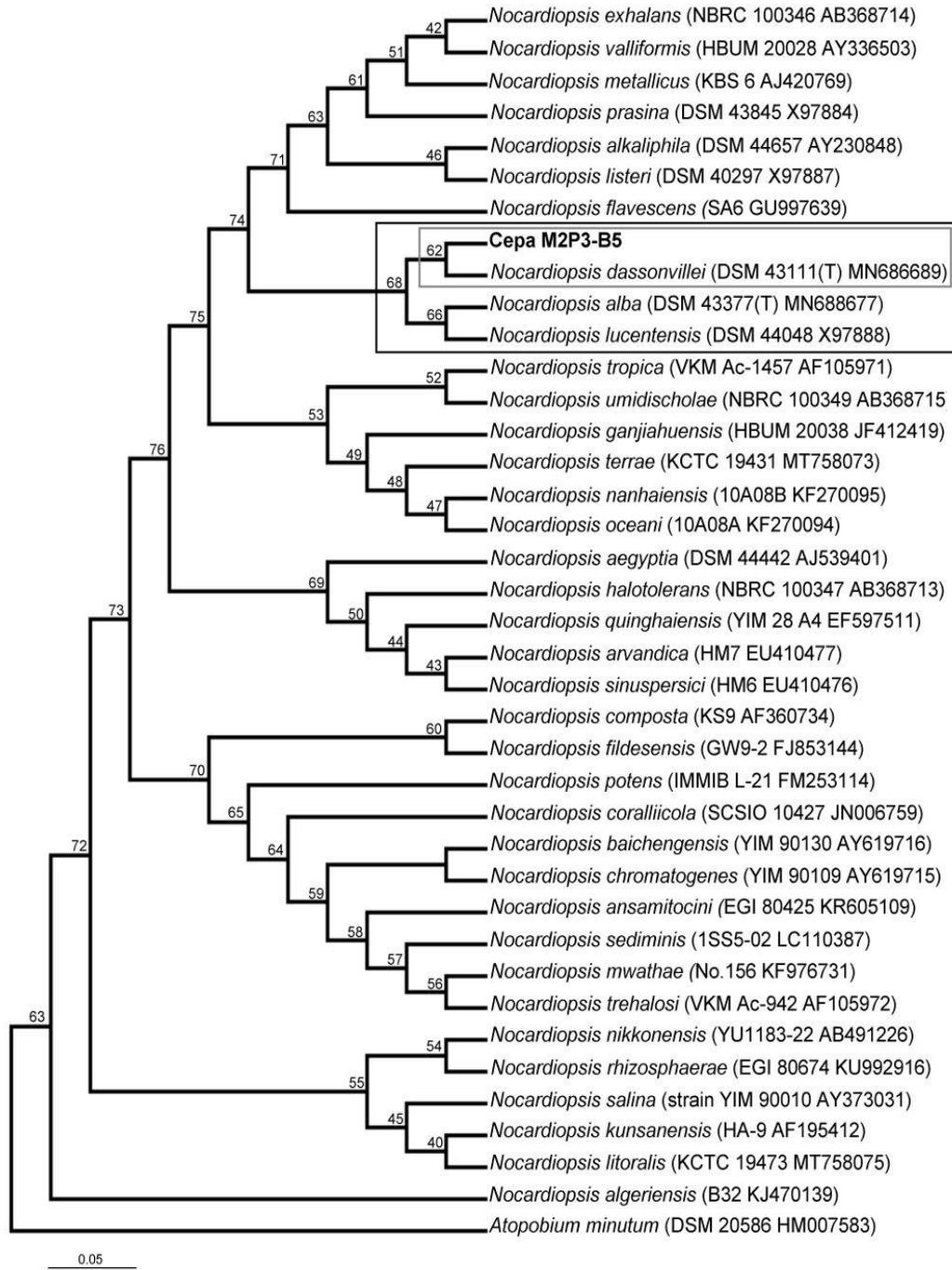


FIGURA 13. Árbol filogenético obtenido con el análisis de Máxima Verosimilitud (Felsenstein 1993) que muestra la posición taxonómica de la cepa M2P3-B5 dentro del género *Nocardioopsis* y sus vecinos filogenéticos más cercanos, basado en 1,413 pb de secuencias del gen 16S rADN. Los valores de *bootstrap* de las ramas indican el porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agruparon (1,000 réplicas). Los números de acceso en el *GenBank* de la secuencia se indican entre paréntesis. La secuencia de *Atopobium minutum* (DSM 20586 HM007583) se utilizó como grupo externo.

Tabla 3. Distancia genética por pares de la cepa M2P3-B5 y el linaje de las especies de *Nocardiopsis* filogenéticamente cercanas, recalculadas con el modelo de Kimura–2 parámetros. El error estándar se muestra en letras negritas

Taxón	1	2	3	4
1. Cepa M2P3-B5		0.008	0.006	0.006
2. <i>N. alba</i> (DSM 43377 (T) MN688677)	0.033		0.008	0.007
3. <i>N. dassonvillei</i> (DSM 43111 (T) N686689)	0.015	0.031		0.007
4. <i>N. lucentensis</i> (DSM 44048 X97888)	0.017	0.026	0.020	

Caracterización macroscópica: Colonia de forma irregular, borde entero ligeramente ondulado, crateriforme, superficie lisa y consistencia opaca-polvosa (Fig. 14B). Anverso blanco (Fig. 14A), con tonos grises y púrpura muy tenues. Reverso amarillo (Fig. 14C) (a tres días del inóculo), posteriormente es de color marrón oscuro. No presenta exudados, ni pigmentos solubles.

Caracterización microscópica: Con la tinción Gram y la prueba de KOH se determinó como una bacteria Gram-positiva, con células de tipo bacilo (Fig. 14D), miden 1.42–1.79 μm ($n=10$, $\bar{X}=1.42 \mu\text{m}$, $ES=0.08$) de largo y 0.35 μm ($n=10$, $\bar{X}=0.42 \mu\text{m}$, $ES=0.06$) de ancho.

Crecimiento en tres temperaturas: La cepa presentó diferencias en el crecimiento diario a diferentes temperaturas y salinidad de 35 UPS; la mayor biomasa se presentó a 30 y 25°C (0.16±0.0005 g/día), y la menor se obtuvo a 28°C (0.05±0.004 g/día) (Fig. 15). En las diferentes temperaturas de crecimiento la cepa conservó la coloración descrita anteriormente.

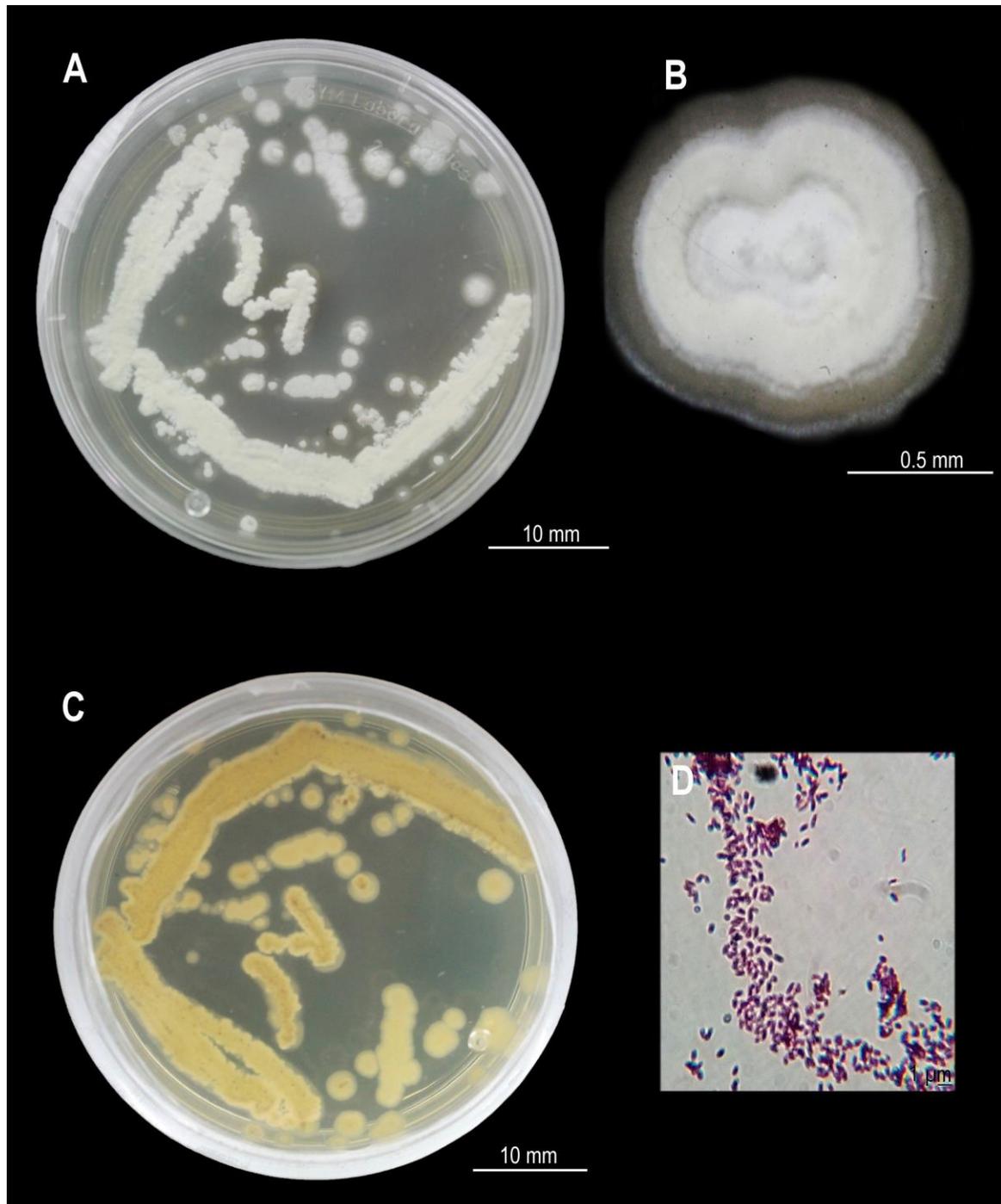


FIGURA 14. *Nocardiosis sp. 1* (cepa M2P3-B5), inoculada en agar A1, cepa aislada de *Pericelis nazahui* No. 3 (organismo sin lavado). A–C. características macroscópicas de la colonia; A. anverso; B. morfología macroscópica de la colonia; C. reverso de la colonia; D. características microscópicas, tinción Gram.

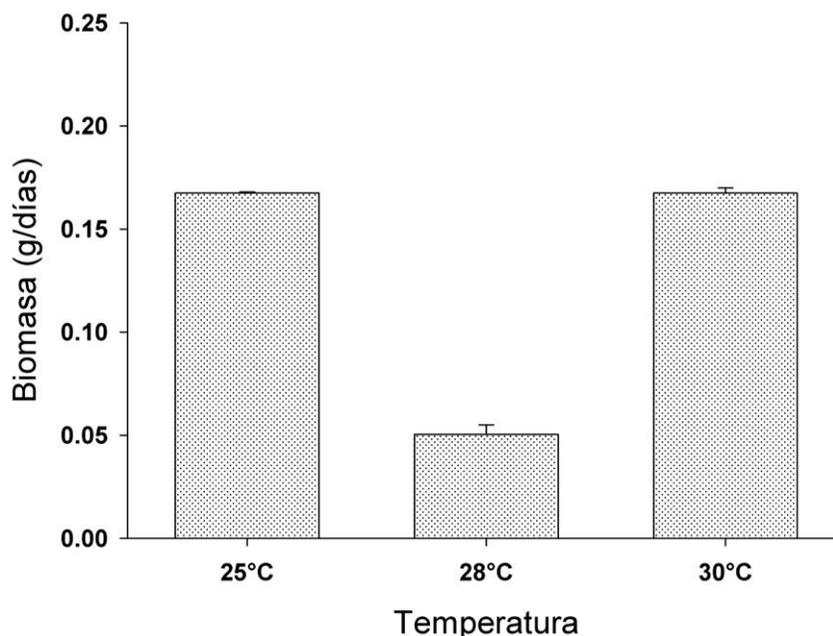


FIGURA 15. Efecto de la temperatura en la generación de biomasa (peso seco) de *Nocardiosis* sp. 1 (cepa M2P3-B5), evaluada en medio líquido A1. Los valores representan el promedio \pm error estándar de la biomasa (peso seco) diaria de dos muestras.

Reino Monera Haeckel 1986

Dominio Bacteria Woese *et al.* 1990

Filo Proteobacteria Garrity *et al.* 2005

Clase Alphaproteobacteria Garrity *et al.* 2006

Orden Rhodobacterales Garrity *et al.* 2006

Familia Rhodobacteraceae Garrity *et al.* 2006

Género *Paracoccus* Davis, 1969

***Paracoccus* sp. 1**

Cepa M2P2-B4

Caracterización molecular: Los resultados filogenéticos indicaron que la cepa M2P2-B4, molecularmente forma una agrupación consistente dentro del género *Paracoccus* (Fig. 16). Este análisis se realizó con base en 1,335 pb alineadas de las secuencias del gen 16S rADN; el árbol filogenético fue construido con 53 secuencias tipos, de ellas 51 secuencias de las especies de *Paracoccus* similares a la cepa aislada (identificados mediante el análisis BLAST con un 95%

de similitud), la secuencia de la especie tipo del género *Paracoccus denitrificans* y la secuencia de *Magnetococcus marinus* determinada como grupo externo (Fig. 16).

Con este análisis la cepa M2P2-B4 forma un nodo con un porcentaje de agrupación del 75% con *Paracoccus aerius* y con un valor de distancia genética 16S rADN del 0.003 ($\sigma=0.003$) (Tabla 4).

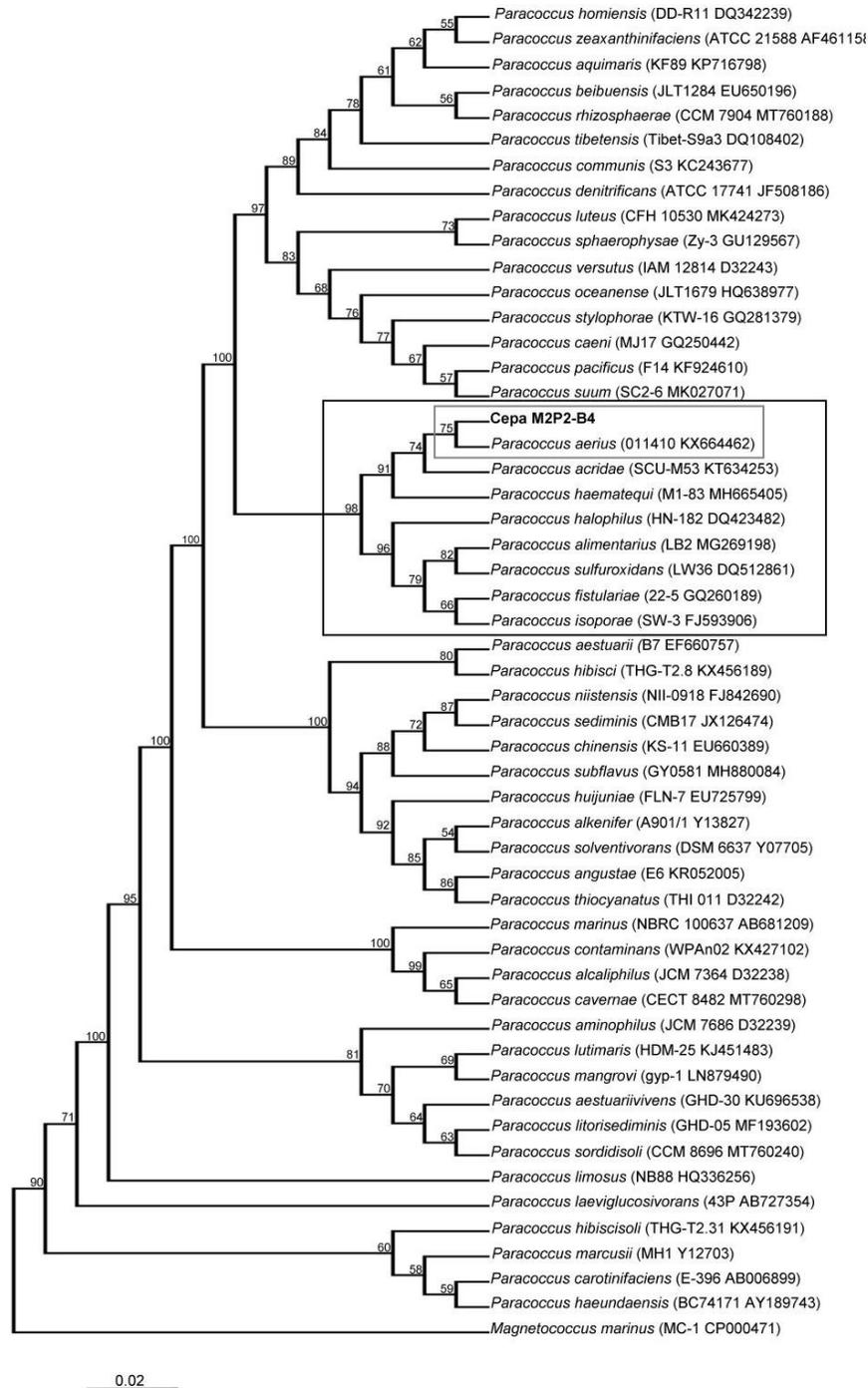


FIGURA 16. Árbol filogenético obtenido mediante el análisis de Máxima Verosimilitud (Felsenstein 1993) que muestra la posición de la cepa M2P2-B4 dentro del género *Paracoccus* y sus vecinos filogenéticos, basado en 1,335 pb de secuencias del gen 16S rADN. Los valores de *bootstrap* (1,000 réplicas) de las ramas indican el porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agruparon. Los números de acceso en el *GenBank* de la secuencia se indican entre paréntesis. La secuencia de *Magnetococcus marinus* (MC-1 CP000471) se utilizó como grupo externo.

Tabla 4. Distancia genética por pares entre linajes de especies de *Paracoccus* cercanas a la cepa M2P2-B4 recalculadas con el modelo de Kimura–2 parámetros. El error estándar se muestra en letras negrita

Taxón	1	2	3	6
1. Cepa M2P2-B4		0.004	0.002	0.004
2. <i>P. acridae</i> (SCU-M53 KT634253)	0.017		0.003	0.004
3. <i>P. aeri</i> (011410 KX664462)	0.003	0.0140		0.004
4. <i>P. haematequi</i> (M1-83 MH665405)	0.021	0.0195	0.018	

Caracterización macroscópica: Colonia plana, superficie lisa y consistencia cremosa (Fig. 17A). El anverso de la colonia es rosa tenue (a los tres días del inóculo), posteriormente se torna amarillo y ligeramente marrón claro (15 días) (Fig. 17A–B).

Caracterización microscópica: Bacteria Gram-negativa, con micelios filamentosos que mide ~ 18 μm de largo y células de tipo cocos, presentan un diámetro de 1.25 μm ($n= 10$, $\bar{x}= 1.25 \mu\text{m}$, $ES= 0$) (Fig. 17C).

Crecimiento en tres temperaturas: La cepa se desarrolló en medios de cultivos disueltos en salinidad de 35 UPS; la mayor biomasa diaria se presentó a 28°C (0.01 ± 0.0003 g/día) y la menor biomasa diaria (0.005 ± 0.0007 g/día) se obtuvo a 25 y 30°C respectivamente (Fig. 18). Se mantiene la misma coloración en las tres temperaturas evaluadas y no produce ningún olor.

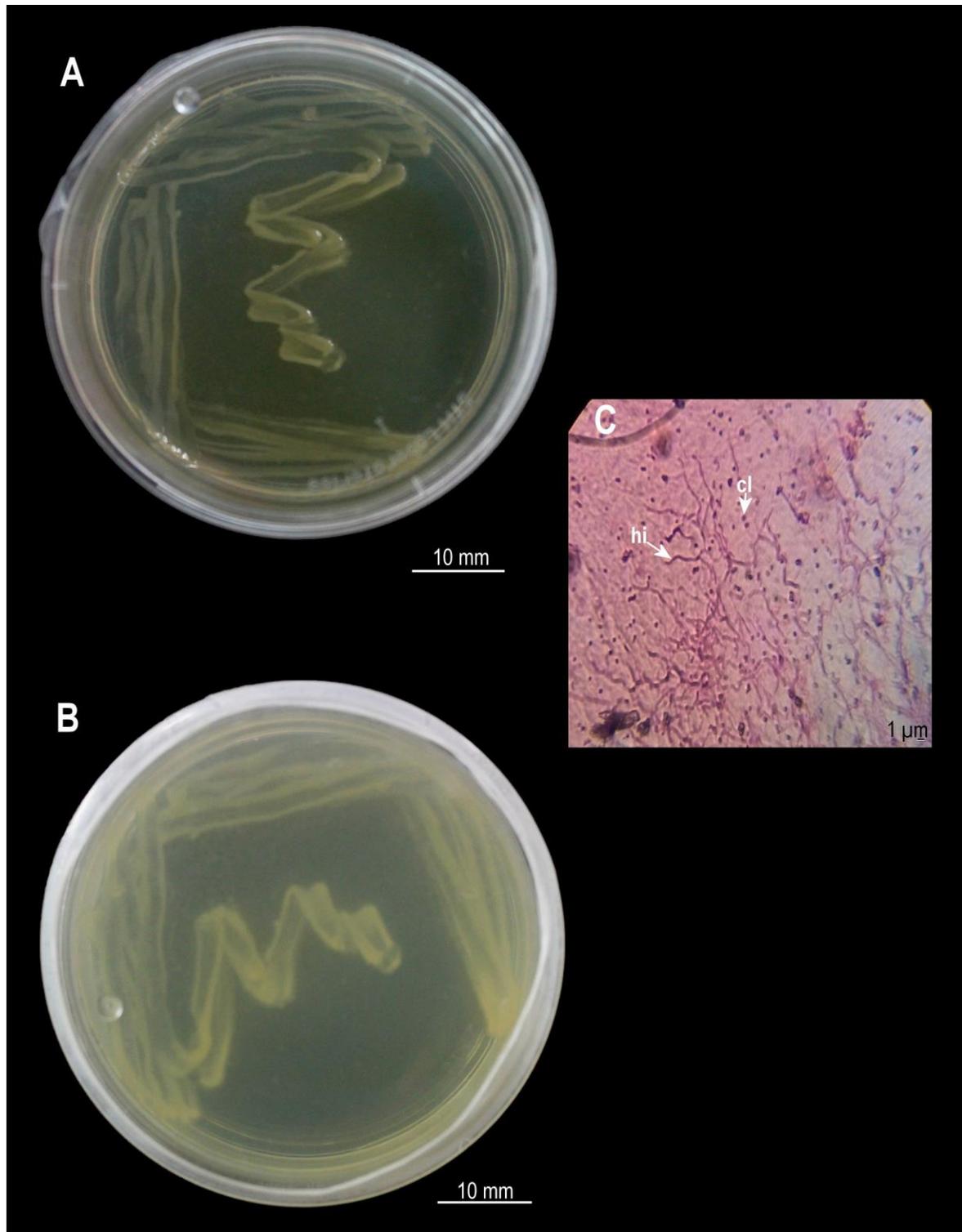


FIGURA 17. *Paracoccus* sp. 1 (cepa M2P2-B4), cepa aislada de *Pericelis nazahui* No. 2 (organismo lavado). A–B. características macroscópicas de la colonia; A. anverso; B. reverso; C. características microscópicas, tinción Gram. Estructuras: cl= células, hi= hifa.

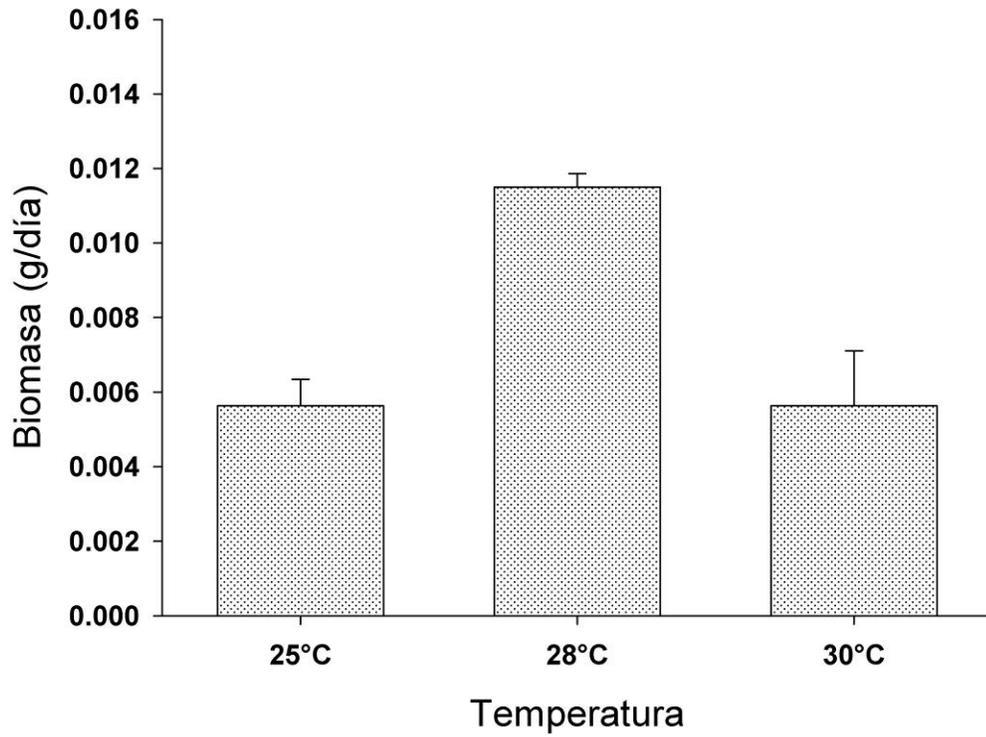


FIGURA 18. Efecto de la temperatura en la generación de biomasa (peso seco) de *Paracoccus* sp. 1 (cepa M2P2-B4), evaluada en medio líquido A1. Los valores representan el promedio \pm error estándar de la biomasa (peso seco) diaria de dos muestras.

Sección Fungi

Dominio Eukarya Margulis & Chapman 2009

Reino Fungi Whittaker, 1969

Filo (División) Ascomycota Whittaker, 1959

Orden Capnodiales Woron., 1925

Familia Cladosporiaceae Castell. & R.G. Archibald, 1915

Género *Cladosporium*

Cladosporium sp. 1

Cepa M2P1-H3

Caracterización molecular: Los resultados filogenéticos indicaron que la cepa M2P1-H3, molecularmente forma una agrupación consistente dentro del género *Cladosporium* (Fig. 19). Este análisis se realizó con base en 450 pb alineadas de las secuencias de la región de ITS; el árbol filogenético fue construido con 33 secuencias, de ellas 31 secuencias de las especies de *Cladosporium* similares a la cepa aislada (identificados mediante el análisis BLAST con un 96% de similitud), la secuencia de la especie tipo del género *Cladosporium herbarum* y la secuencia de *Aspergillus westlandensis* determinada como grupo externo (Fig. 19).

Con este análisis la cepa M2P1-H3 forma un nodo con un porcentaje de agrupación del 57% con *Cladosporium colocasiae* y con un valor de distancia genética ITS del 0.172 ($\sigma=0.022$) (Tabla 5).

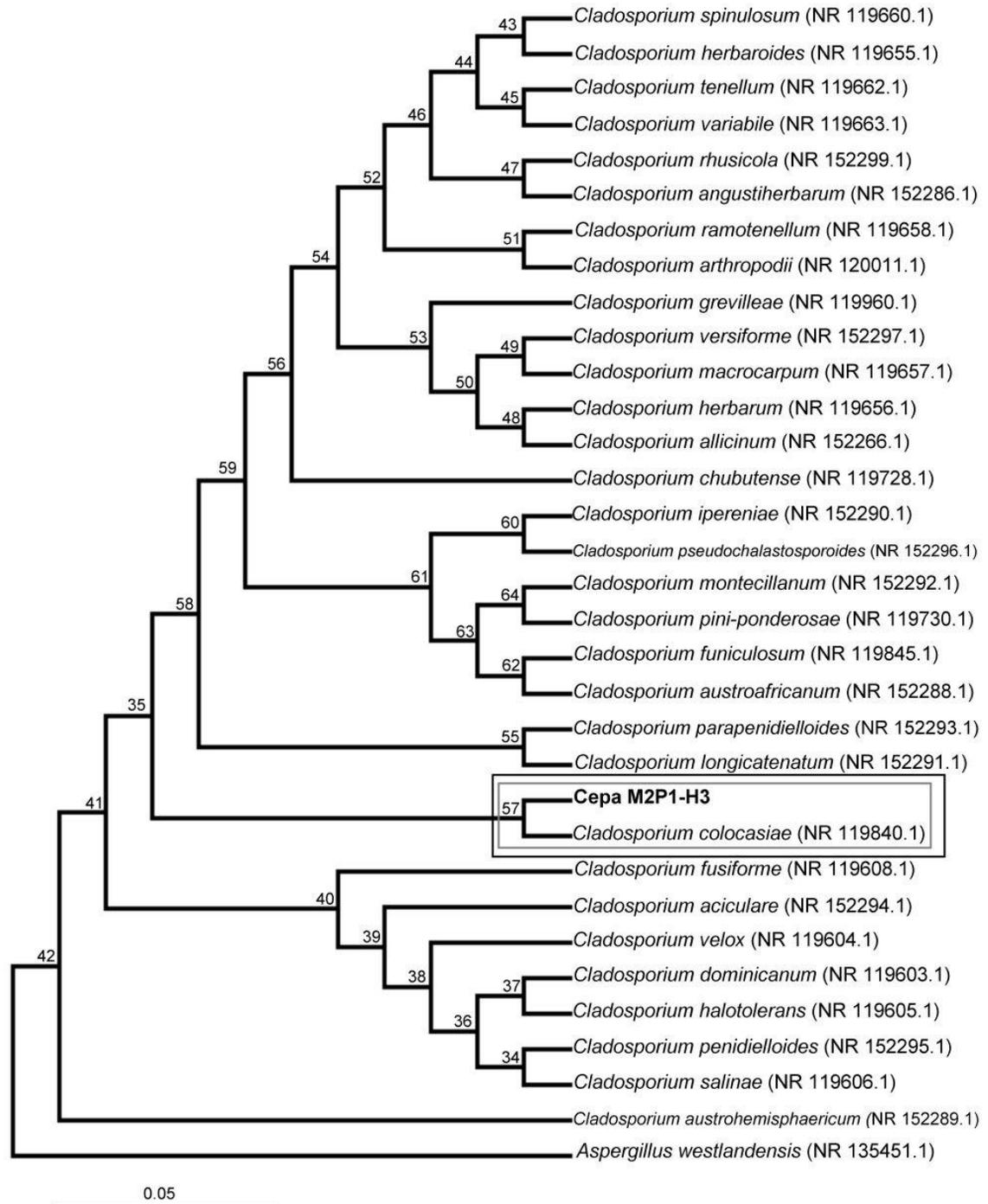


FIGURA 19. Árbol filogenético obtenido con el análisis de Máxima Verosimilitud (Felsenstein 1993) que muestra la posición taxonómica de la cepa M2P1-H3 dentro del género *Cladosporium* y sus vecinos filogenéticos más cercanos, basado en 450 pb de secuencias del ITS. Los valores de *bootstrap* de las ramas indican el porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agruparon (1,000 réplicas). Los números de acceso en el *GenBank* de la secuencia se indican entre paréntesis. La secuencia de *Aspergillus westlandensis* (NR 135451.1) se utilizó como grupo externo.

Tabla 5. Distancia genética por pares entre linajes de especies de *Cladosporium* cercanas a la cepa M2P1-H3 recalculadas con el modelo de Kimura–2 parámetros. El error estándar se muestra en letras negritas

Taxón	1	2	3	4	5	6	7	8
1. Cepa M2P1-H3		0.022	0.022	0.022	0.022	0.023	0.022	0.022
2. <i>C. angustiterminale</i> (NR 152286.1)	0.189		0.003	0.0003	0.004	0.006	0.003	0.003
3. <i>C. chubutense</i> (NR 119728.1)	0.174	0.004		0.000	0.002	0.006	0.000	0.000
4. <i>C. colocasiae</i> (NR 119840.1)	0.172	0.004	0.000		0.002	0.006	0.000	0.000
5. <i>C. funiculosum</i> (NR 119845.1)	0.177	0.007	0.002	0.002		0.005	0.002	0.002
6. <i>C. ipereniae</i> (NR 152290.1)	0.177	0.018	0.013	0.013	0.011		0.006	0.006
7. <i>C. montecillanum</i> (NR 152292.1)	0.177	0.004	0.000	0.000	0.002	0.013		0.000
8. <i>C. pini-ponderosae</i> (NR 119730.1)	0.177	0.004	0.000	0.000	0.002	0.013	0.000	

Caracterización macroscópica: La morfología de las colonias en agar A1, CZA y PDA fue circular, con bordes lisos, elevación ligeramente convexa, superficie lisa y consistencia algodonosa (Fig. 20A, C, E). En agar A1 tiene un diámetro de 0.33 cm/día, el anverso en tonos blancos a grisáceos, región central grisácea, con un gradiente de coloración hacia la periferia en tonos blancos, gris oscuro y margen blanco, que dan la apariencia de anillos (Fig. 20A). Reverso con un halo grisáceo oscuro en el centro y un halo periférico grisáceo claro (Fig. 20B) de apariencia lisa. En agar CZA la colonia presenta un anverso y reverso en tono gris a marrón (Fig. 20C–D), con un diámetro de 0.45 cm/día, mientras que en PDA presenta una coloración verde grisáceo (Fig. 20E–F) y un diámetro de 0.4 cm/día.

Micelios aéreos centrales gris oscuro y con escasos micelios de color negro; micelios periféricos color gris claro y oscuro (Fig. 20A, C). Micelio vegetativo filamentosos. Exudados de color blancos y negros en la región central, en forma de puntos (Fig. 20A).

No presentó esporulación, ni pigmentos solubles en ninguno de los medios de cultivos. Un mes después en PDA y CZA la colonia es negra.

Caracterización microscópica: Especie anamorfa de color marrón claro, hifas septadas (Fig. 21D–E, G–H), conidióforos cilíndricos septados presenta un grosor de 2.5 μm (n=10), y conidios ovales (Fig. 21B, E, H) miden 2.50–6.25 μm (n=10, \bar{x} =4.06 μm , ES=0.41) de largo y 1.88– 6.88 μm (n=10, \bar{x} =2.93 μm , ES=0.46) de ancho, solitarios o distribuidos en cadenas (Fig. 21F) de color marrón claro.

Crecimiento en tres temperaturas: En agar CZA, la cepa sólo mostró crecimiento a 28°C y salinidad de 35 UPS; con una tasa de crecimiento de $\mu_{\max} = 0.029$ cm/día; la fase de latencia dura 1 día y posterior a 15 días el inóculo se mantiene en fase exponencial (Fig. 22); este hongo no presentó crecimiento en 25 y 30° C.

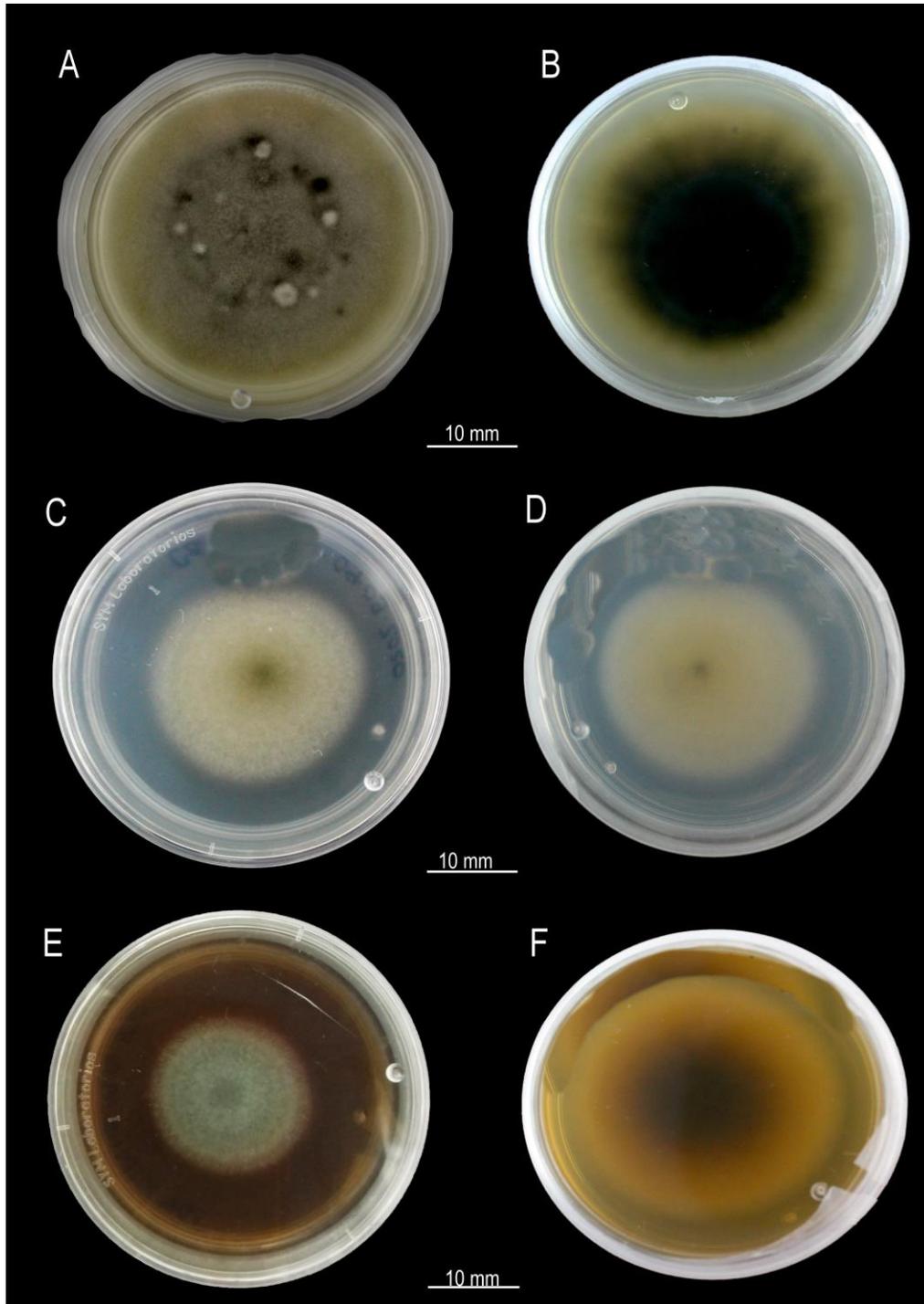


FIGURA 20. *Cladosporium* sp. 1 (cepa M2P1-H3) morfología macroscópica, cepa aislada de *Pericelis nazahui* No. 1 (organismo lavado); colonias inoculadas en agar A1 (A–B), CZA (C–D) y en PDA (E–F) donde se muestra el anverso (A, C, E) y reverso (B, D, F) de la colonia.

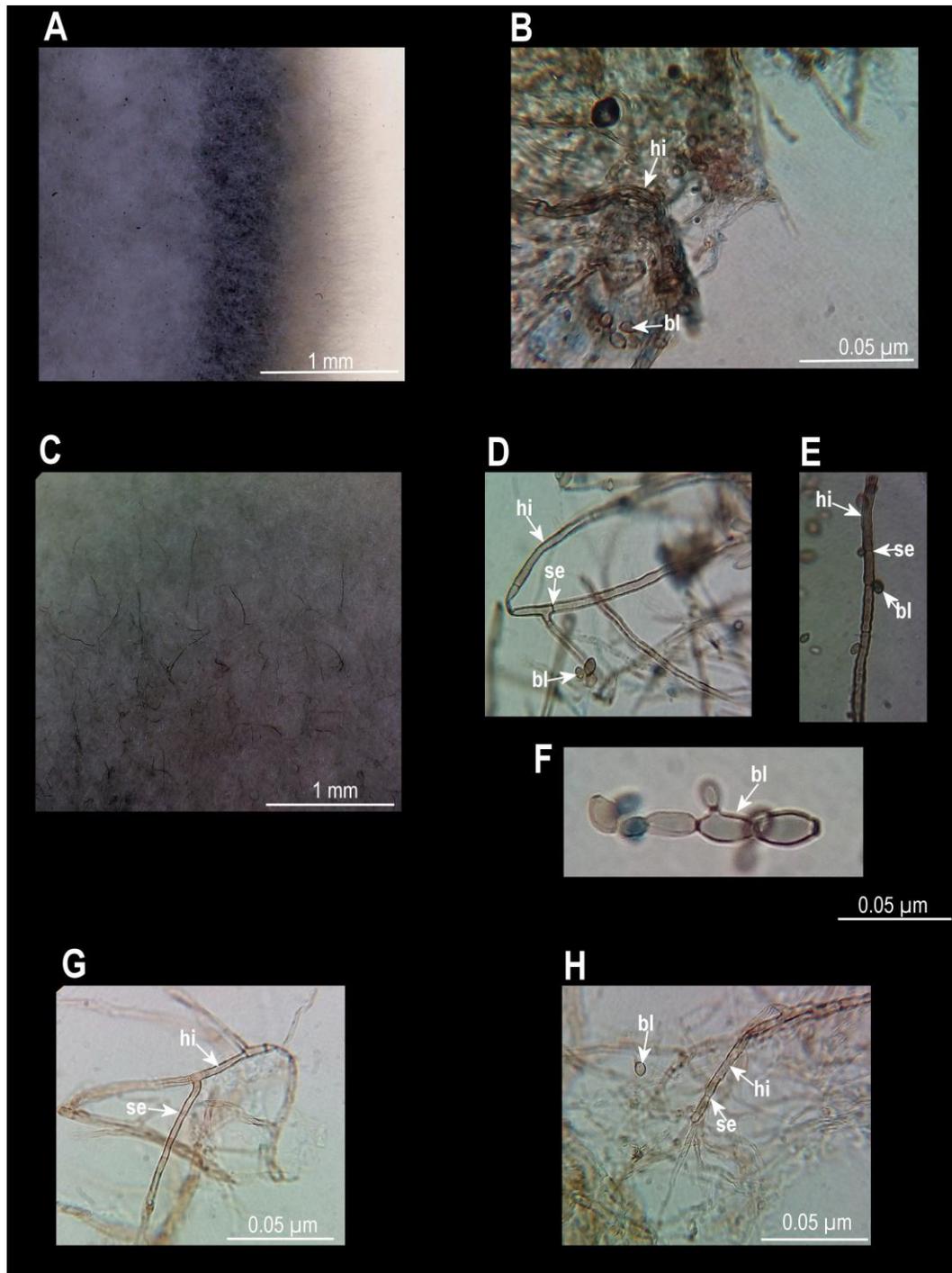


FIGURA 21. *Cladosporium sp. 1* (cepa M2P1-H3) morfología microscópica de la colonia, cepa aislada de *Pericelis nazahui* No. 1 (organismo lavado); colonias inoculadas en agar A1 (A–C), CZA (D–F) y PDA (G–H). A, C. características macroscópicas de la colonia, anverso; B, D–H. características microscópicas. Estructuras: bl= conidio, hi= hifa, se= septos.

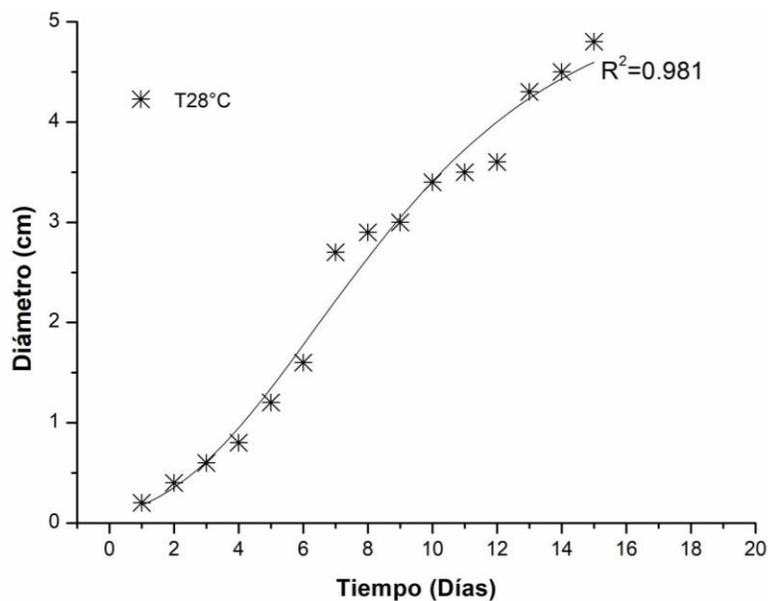


FIGURA 22. Efecto de la temperatura en el crecimiento de *Cladosporium* sp. 1 (cepa M2P1-H3), evaluada en agar CZA durante 15 días. Los valores representan el periodo de crecimiento de la cepa durante el tiempo evaluado y el valor del coeficiente de determinación (R^2).

Dominio Eukarya Margulis & Chapman 2009

Reino Fungi Whittaker, 1969

Filo (División) Ascomycota Whittaker, 1959

Orden Eurotiales G.W. Martin ex Benny & Kimbr., 1980

Familia Trichocomaceae E. Fisch., 1897

Género *Aspergillus* P. Micheli, 1729

***Aspergillus* sp. 1**

Cepa M2P3-H5

Caracterización molecular: Los resultados filogenéticos indicaron que la cepa M2P3-H5, molecularmente forma una agrupación consistente dentro del género *Aspergillus* (Fig. 23). Este análisis se realizó con base en 551 pb alineadas de las secuencias de la región de ITS; el árbol filogenético fue construido con 26 secuencias, de ellas 23 secuencias de las especies de *Aspergillus* similares a la cepa aislada (identificados mediante el análisis BLAST con un 95% de similitud), la secuencia de la especie tipo *Aspergillus glaucus* y la secuencia de *Trichoderma viride* (NR 138441.1) establecida como grupo externo (Fig. 23).

La cepa M2P3–H5 forma un nodo con un porcentaje de agrupación del 61% con *Aspergillus occultus* y con un valor de distancia genética ITS del 0.071 ($\sigma= 0.014$) (Tabla 6).

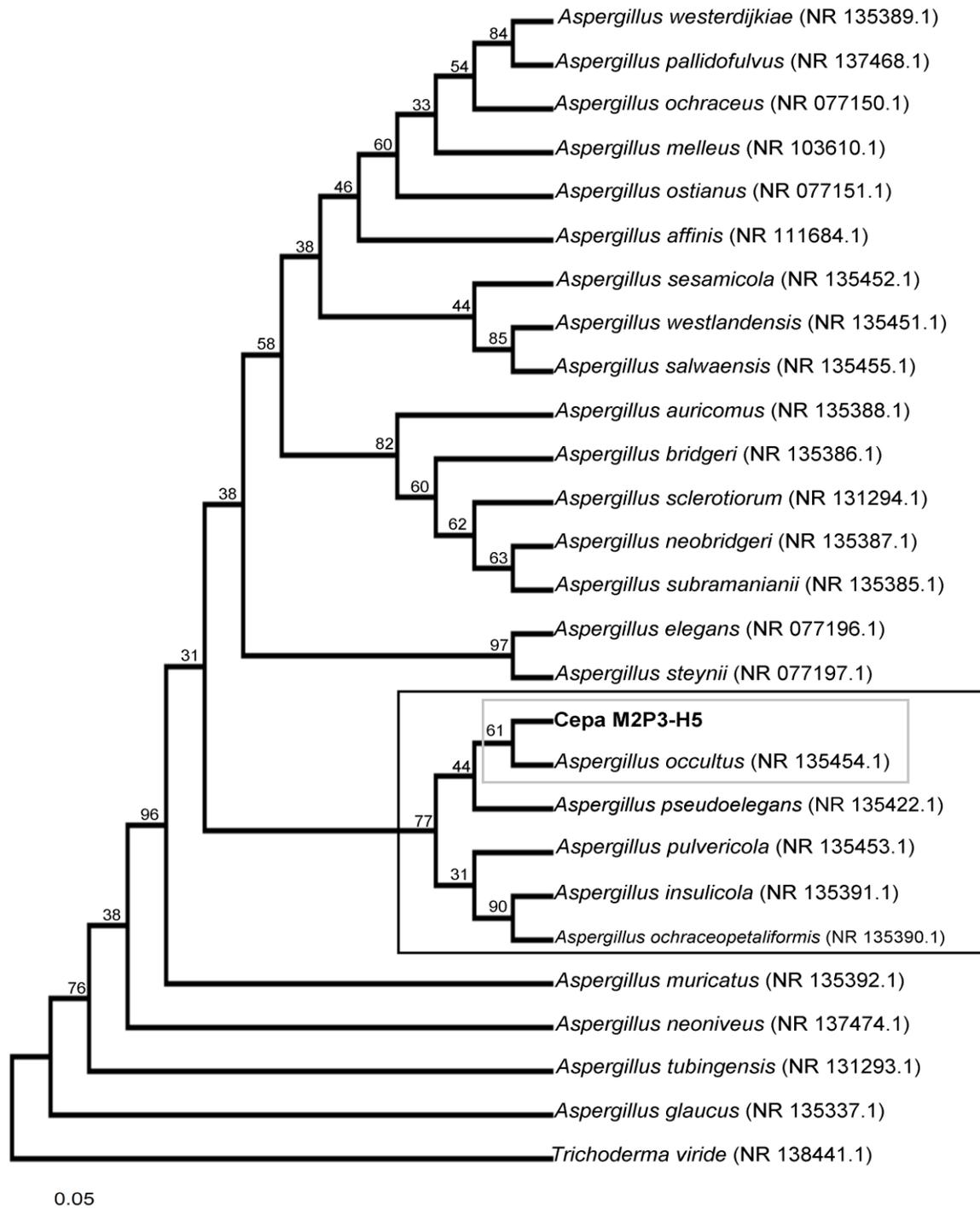


FIGURA 23. Árbol filogenético obtenido con el análisis de Máxima Verosimilitud (Felsenstein 1993) que muestra la posición taxonómica de la cepa M2P3-H5 dentro del género *Aspergillus* y sus vecinos filogenéticos más cercanos, basado en 551 pb de secuencias del ITS. Los valores de *bootstrap* de las ramas indican el porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agruparon (1,000 réplicas). Los números de acceso en el *GenBank* de la secuencia se indican entre paréntesis. La secuencia de *Trichoderma viride* (NR 138441.1) se utilizó como grupo externo.

Tabla 6. Distancia genética por pares entre linajes de especies de *Aspergillus* cercanas a la cepa M2P3-H5 recalculadas con el modelo de Kimura–2 parámetros. El error estándar se muestra en letras negritas

Taxón	1	2	3	4	5	6
1. Cepa M2P3-H5		0.013	0.014	0.013	0.014	0.013
2. <i>A. insulicola</i> (NR 135391.1)	0.065		0.006	0.002	0.010	0.005
3. <i>A. occultus</i> (NR 135454.1)	0.071	0.02		0.006	0.011	0.007
4. <i>A. ochraceopetaliformis</i> (NR 135390.1)	0.063	0.002	0.01		0.010	0.005
5. <i>A. pseudoelegans</i> (NR 135422.1)	0.076	0.04	0.05	0.04		0.009
6. <i>A. pulvericola</i> (NR 135453.1)	0.063	0.01	0.02	0.01	0.03	

Caracterización macroscópica: Las colonias en agar A1, CZA y PDA presentaron una forma circular, con borde liso (Fig. 24A–C) y apariencia algodonosa. En Agar A1 presentó un diámetro de 1.6 mm/día, anverso blanco, con una pigmentación en tonos marrón a ligeramente oscuro, blancos y amarillos, sin seguir un patrón general (Fig. 24A); superficie lisa y consistencia algodonosa (Fig. 24A). Reverso amarillo, ligeramente marrón claro y de apariencia lisa (Fig. 24B). En agar CZA (Fig. 24C–D) y en PDA (Fig. 24 E–F) presentó un diámetro de 3.3 mm/día y 5 mm/día respectivamente y la misma coloración antes mencionada.

Micelio aéreo de color blanco, a medida que la colonia se desarrolla presenta esclerocios globosos inicialmente translúcido, posteriormente de color blanco, amarillo hasta marrón claro, cuando la colonia envejece estos tienden a conglomerarse dando la apariencia de Y en color marrón con la región central blanco-amarillo (Fig. 25A, D); micelio vegetativo filamentoso.

En los medios de cultivos evaluados no se presentó esporulación, exudados, ni pigmentos solubles.

Caracterización microscópica: Especie anamorfa, hifas filamentosas aseptadas. Conidióforo de tipo simple, con cabeza radiada biseriada (Fig. 25B, E–H) de 10–98.8 μm ($n=10$, $\bar{x}=38.8$ μm , $\sigma=29.5$); presenta un estipe delgado (Fig. 25E, G, H); vesícula de tipo globosa (Fig. 25B, F) cuyo diámetro es de 16.3–25 μm ($n=10$, $\bar{x}=21.3$ μm , $ES=1.1$), con métulas planas (3.6–6.4 μm ($n=10$, $\bar{x}=4.8$ μm , $ES=0.34$)) y fiálides ampuliformes (Fig. 25C) (6.4–4.3 x 7.1–4.6 μm ($n=10$, $\bar{x}=5.8$ x 5.8 μm , $ES=0.25$)) (Fig. 25C), distribuidas alrededor de la periferia de la vesícula, micro conidios esféricos ubicados en la región apical de las fiálides.

Crecimiento en tres temperaturas: Se evaluó el crecimiento de la cepa en CZA y salinidad de 35 UPS y diferentes temperaturas (Fig. 26); la mayor tasa de crecimiento se obtuvo a 30°C

($\mu_{\max} = 0.13$ cm/día) la fase estacionaria es obtenida al segundo día posterior a la inoculación, exhibiendo un diámetro de 2.5 cm/día; a 25°C la tasa máxima de crecimiento (μ_{\max}) fue de 0.07cm/día, a los siete días la cepa alcanzó una fase estacionaria con un diámetro de 5 cm/7 días; a 28°C posterior a 15 días del inóculo, la colonia se mantiene en fase exponencial, con una $\mu_{\max} = 0.3$ cm/día.

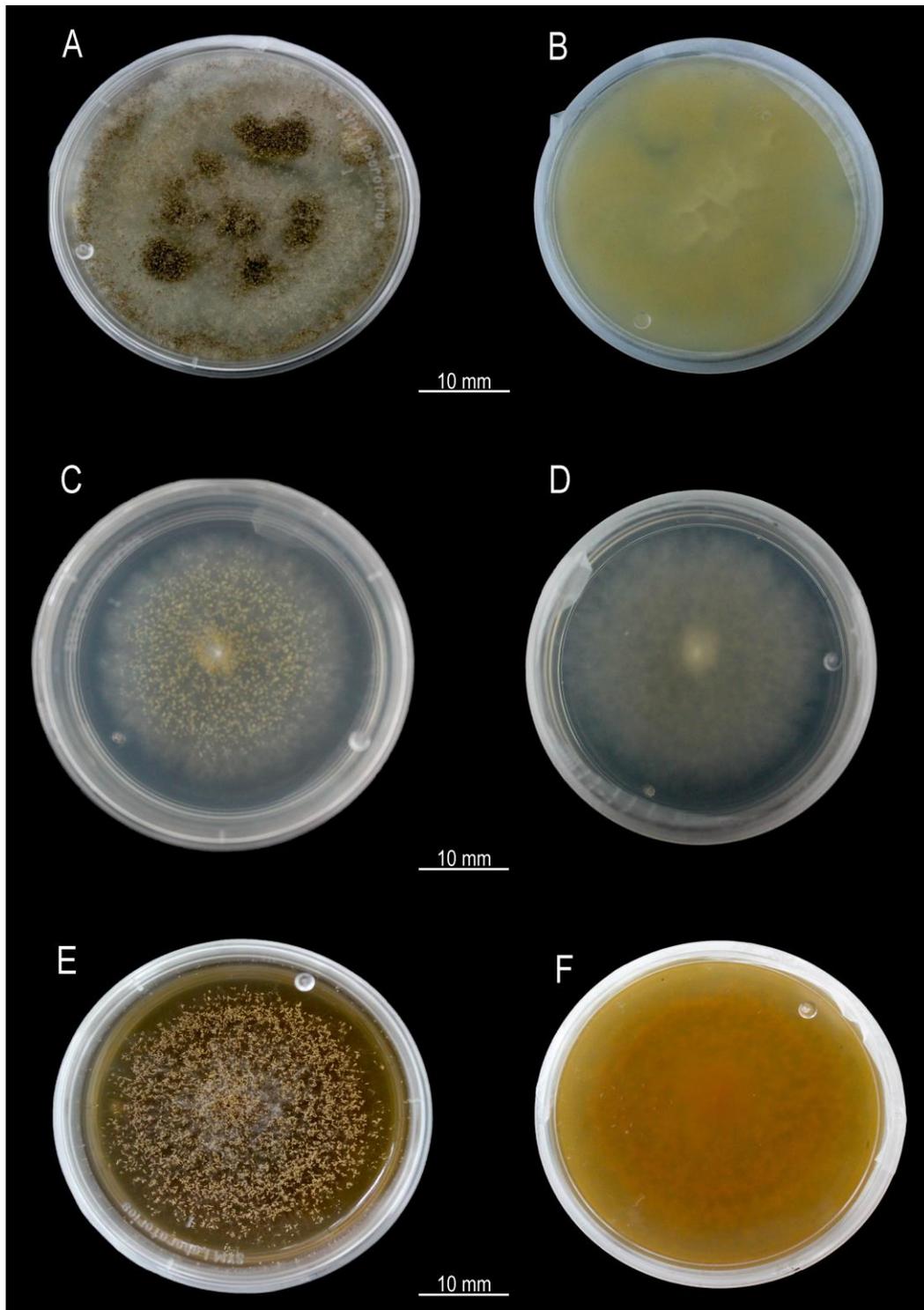


FIGURA 24. *Aspergillus* sp. 1 (cepa M2P3-H5) morfología macroscópica, cepa aislada de *Pericelis nazahui* No. 3 (organismo no lavado); colonias inoculadas en agar A1 (A–B), CZA (C–D) y PDA (E–F); A–F. características macroscópicas de la colonia; A, C, E. anverso; B, D, F. reverso.

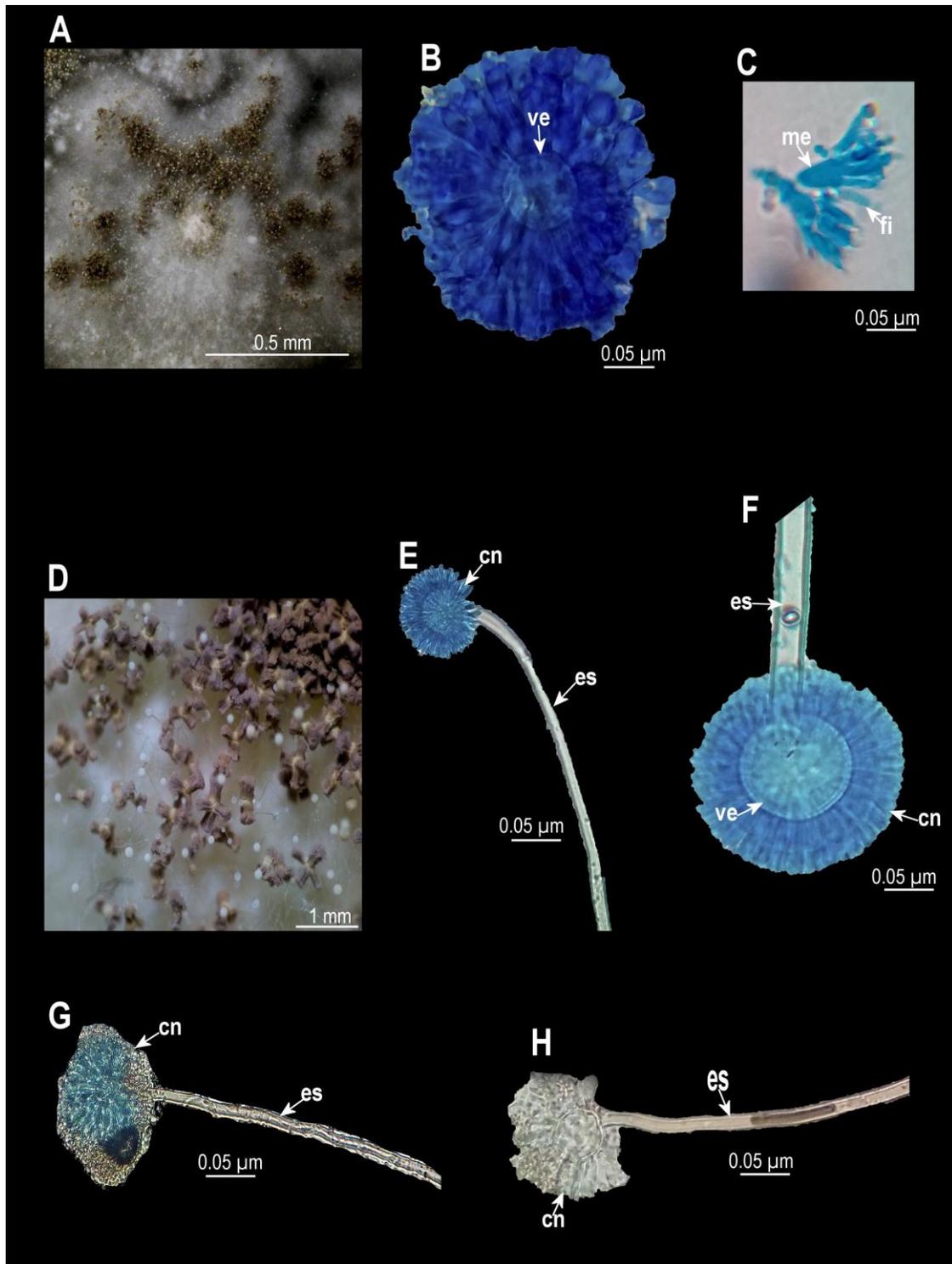


FIGURA 25. *Aspergillus* sp. 1 (cepa M2P3-H5) morfología microscópica de la colonia, cepa aislada de *Pericelis nazahui* No. 3 (organismo no lavado); colonias inoculadas en agar A1 (A–D), CZA (E–F) y PDA (G–H); A, D. características macroscópicas de la colonia, anverso, D. coloración del esclerocio; B–C, E–H. características microscópicas, tinción azul de lactofenol. Estructuras: cn= conidióforo, es= estipe, fi= fiálides, me= méculas, ve= vesícula.

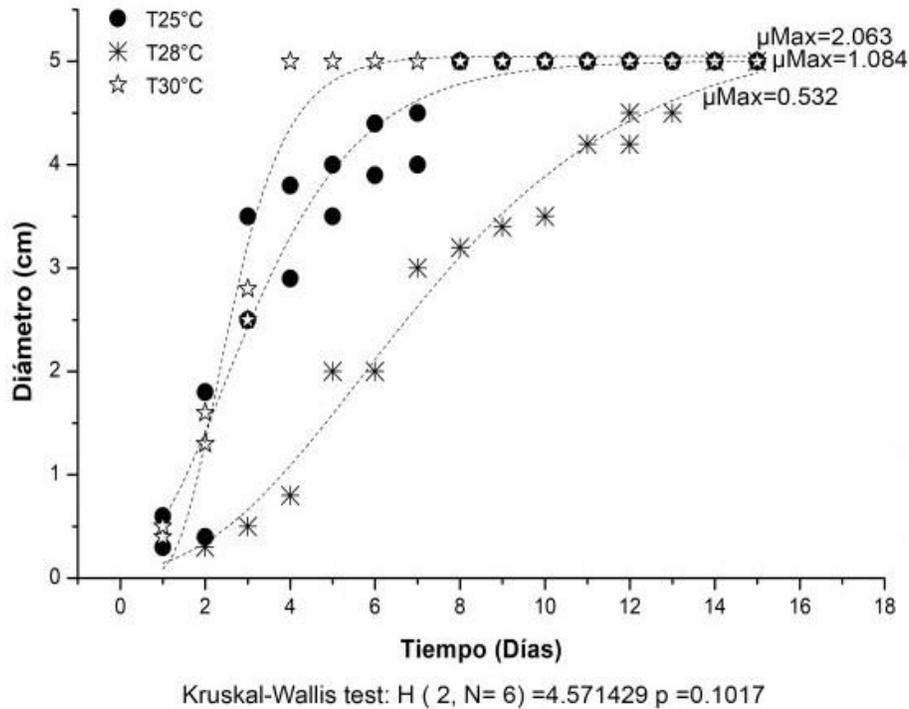


FIGURA 26. Efecto de la temperatura en el crecimiento de *Aspergillus* sp. 1 (cepa M2P3-H5), evaluada en agar CZA durante 15 días. Los valores representan el periodo de crecimiento de la cepa durante el tiempo evaluado y el valor del coeficiente de determinación (R^2).

Dominio Eukarya Margulis & Chapman 2009
Reino Fungi Whittaker, 1969
Filo (División) Ascomycota Whittaker, 1959
Orden Eurotiales G.W. Martin ex Benny & Kimbr., 1980
Familia Trichocomaceae E. Fisch., 1897

Género *Penicillium* Link, 1809

***Penicillium* sp. 1**

Cepa M2P1-H4

Caracterización molecular: Los resultados filogenéticos indicaron que la cepa M2P1-H4, molecularmente forma una agrupación consistente dentro del género *Penicillium* (Fig. 27). Este análisis se realizó con base en 602 pb alineadas de las secuencias del gen 28S rADN; el árbol filogenético fue construido con 48 secuencias, de ellas 45 secuencias de las especies de

Penicillium similares a la de la cepa de interés (identificados mediante el análisis BLAST con un 95% de similitud), la secuencia de la especie tipo *Penicillium expansum* y la secuencia de *Trichoderma hunua* determinada como grupo externo (Fig. 27).

Con este análisis la cepa M2P1-H4 forma un nodo con un porcentaje de agrupación del 67% con *Penicillium sizovae* y con un valor de distancia genética 28S rADN del 0.009 ($\sigma=0.004$) (Tabla 7).

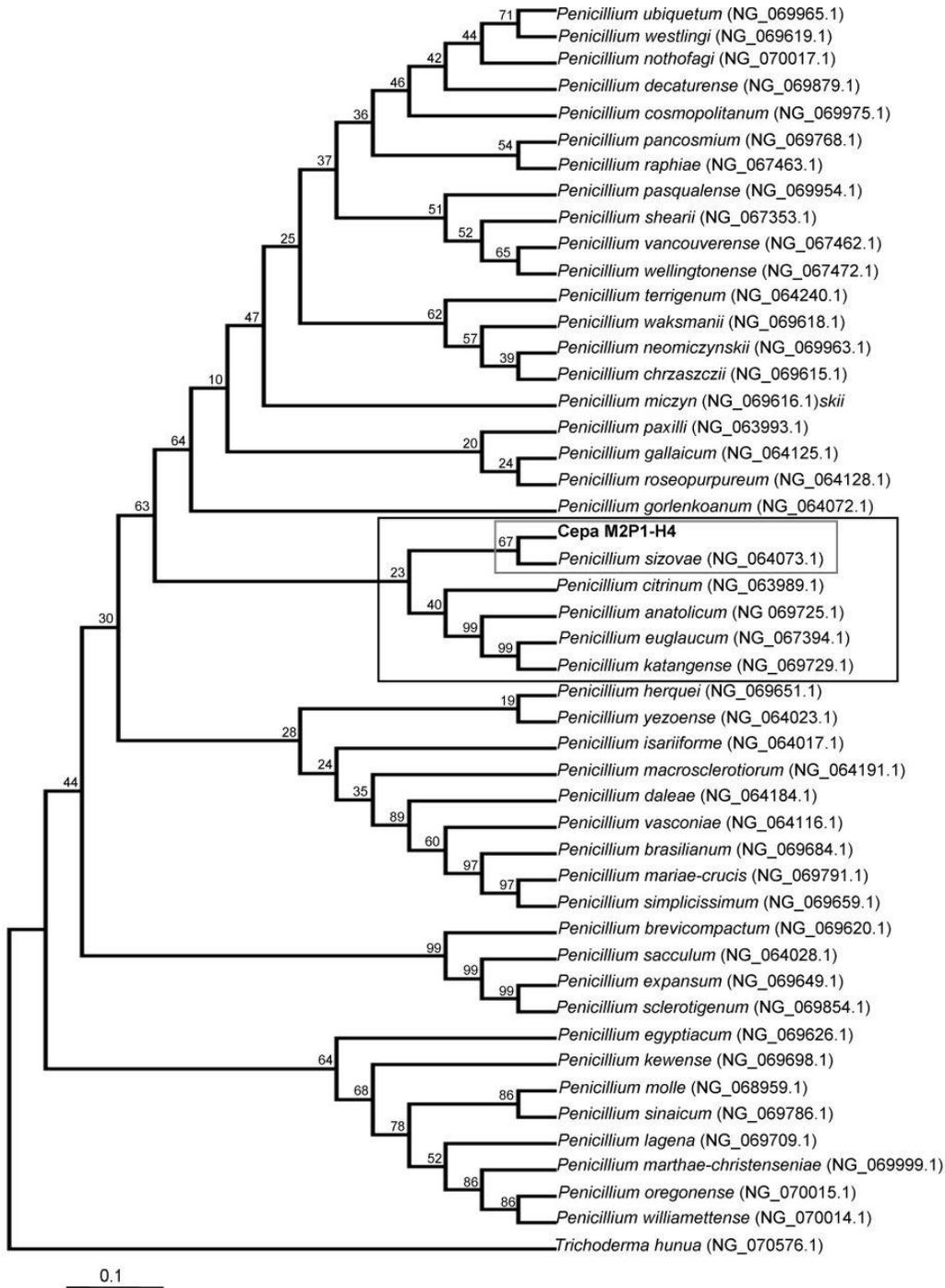


FIGURA 27. Árbol filogenético obtenido con el análisis de Máxima Verosimilitud (Felsenstein 1993) que muestra la posición de la cepa M2P1-H4 dentro del género *Penicillium* y sus vecinos filogenéticos, basado en 602 pb de las secuencias de 28S rADN. Los valores de *bootstrap* de las ramas indican el porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agruparon (1,000 réplicas). Los números de acceso en el *GenBank* de la secuencia se indican entre paréntesis. La secuencia de *Trichoderma hunua* (NG 070576.1) se utilizó como grupo externo.

Tabla 7. Distancia genética por pares entre linajes de especies de *Penicillium* cercanas a la cepa M2P1-H4 recalculadas con el modelo de Kimura–2 parámetros. El error estándar se muestra en letras negritas

Taxón	1	2	3	4	5	6
1. Cepa M2P1-H4		0.006	0.006	0.006	0.006	0.004
2. <i>P. anaticum</i> (NG 069725.1)	0.022		0.006	0.000	0.000	0.005
3. <i>P. citrinum</i> (NG 063989.1)	0.020	0.016		0.006	0.006	0.005
4. <i>P. euglaucum</i> (NG 067394.1)	0.022	0.000	0.016		0.000	0.005
5. <i>P. katangense</i> (NG 069729.1)	0.022	0.000	0.016	0.000		0.006
6. <i>P. sizovae</i> (NG 064073.1)	0.009	0.013	0.013	0.013	0.013	

Caracterización macroscópica: En agar A1, la colonia de crecimiento presentó una forma circular, consistencia aterciopelada, de borde liso, entero, plana, con una protuberancia en la región central de la colonia (Fig. 28A) con un diámetro de 0.21 cm/día. Anverso con la región apical verde-azulado, región central blanca-grisácea y la periferia con un halo blanco (Figs. 28A, 29A). Reverso marrón claro de apariencia lisa (Fig. 28B). En medio CZA se registró una coloración grisácea con una pigmentación ligera en verde olivo (Fig. 28C) y reverso de blanco a marrón claro, con un diámetro de 0.25 cm/día. En PDA, desarrolló una coloración verde-azulado y el reverso marrón claro (Fig. 28E–F) y un diámetro de 0.3 cm/día.

Micelio aéreo de coloración igual a la colonia (Fig. 29A) y micelio vegetativo filamentosos. En agar CZA y PDA se desarrolló un conidióforo monoverticilado (Fig. 29C, E).

Caracterización microscópica: Especie anamorfa, hifas filamentosas septadas (Fig. 29B). Conidióforo de tipo complejo ramificado (Fig. 29B) (12.5–113.16 μm (n= 10, \bar{x} = 55.42 μm , ES= 0.4)), mótulas (9–12 μm (n= 10, \bar{x} = 13.13 μm , ES= 0.5)) (Fig. 29C–E) y fiálides planas y alargadas (8.75–15 μm (n= 10, \bar{x} = 12.8 μm , ES= 0.7)) (Fig. 29C–E), estipe delgado (Fig. 29D–E) y conidios esféricos de 1.25 μm de diámetro (Fig. 29B).

Crecimiento en tres temperaturas: La cepa presentó diferencias en el crecimiento en medio CZA, a salinidad de 35 UPS y en diferentes temperaturas (Fig. 30); a una temperatura de 25°C presentó la mayor tasa de crecimiento (μ_{max} = 0.04 cm/día) y diámetro (0.75 cm/día), la fase estacionaria fue alcanzada ocho días posterior a la inoculación; a 28°C se registró la menor tasa de crecimiento (μ_{max} =0.02 cm/día) alcanzando la fase estacionaria después de 12 días del inóculo.

A 25°C presentó exudados translúcidos, superficie con surcos radiales, una coloración grisácea en la región central y blanca en la periferia; a 30°C se mantienen los surcos radiales, la coloración central es verde-grisácea y la periferia de color blanco y 28°C carece de surcos radiales, región central blanca-grisácea y la periferia con un halo blanco; en estas dos últimas temperaturas no se observaron exudados, ni pigmentos solubles.

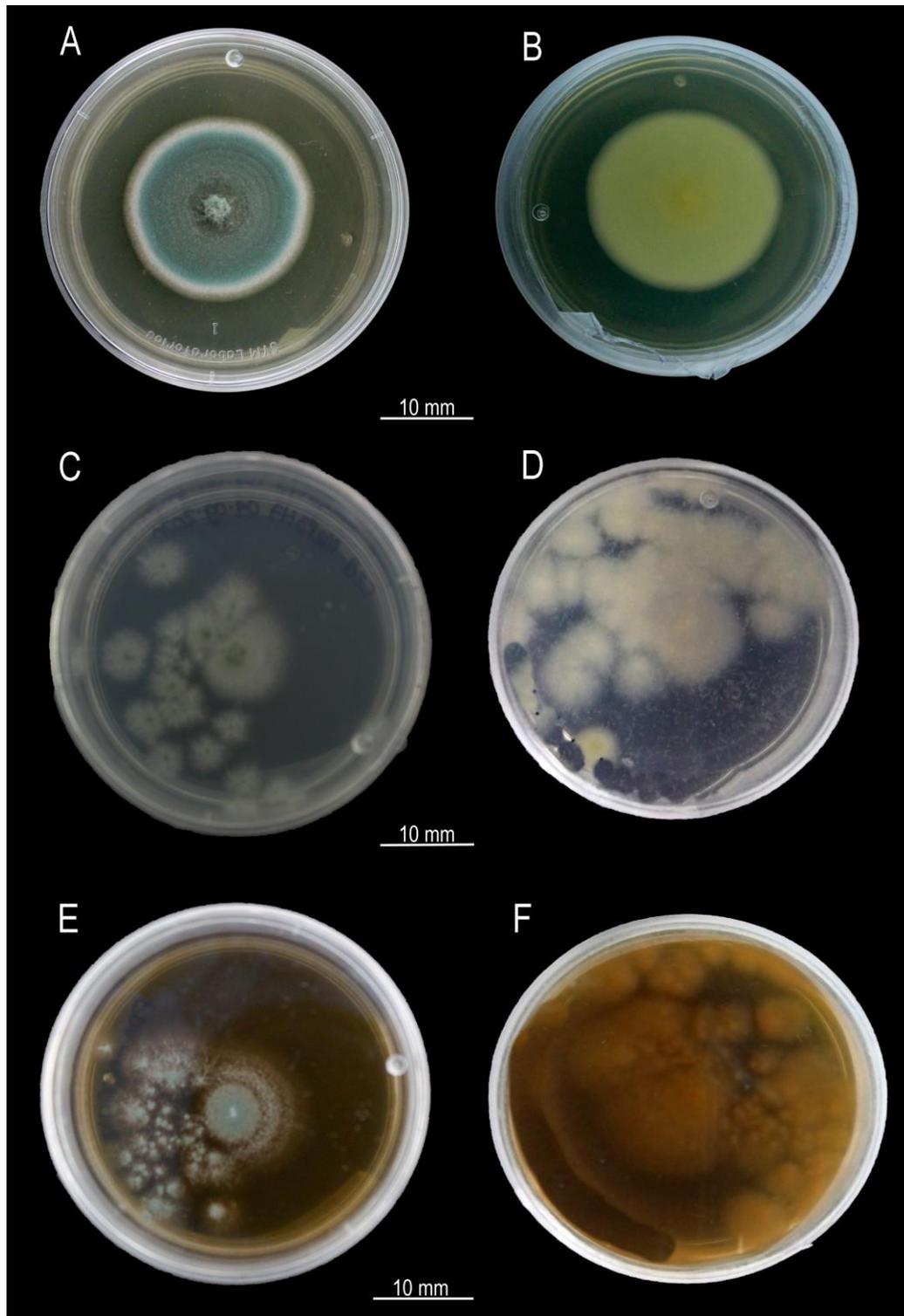


FIGURA 28. *Penicillium* sp. 1 (cepa M2P1-H4) morfología macroscópica, cepa aislada de *Pericelis nazahui* No. 1 (organismo lavado), colonias inoculadas en agar A1 (A–B), CZA (C–D) y PDA (E–F) donde se muestra el anverso (A, C, E) y reverso (B, D, F) de la colonia.

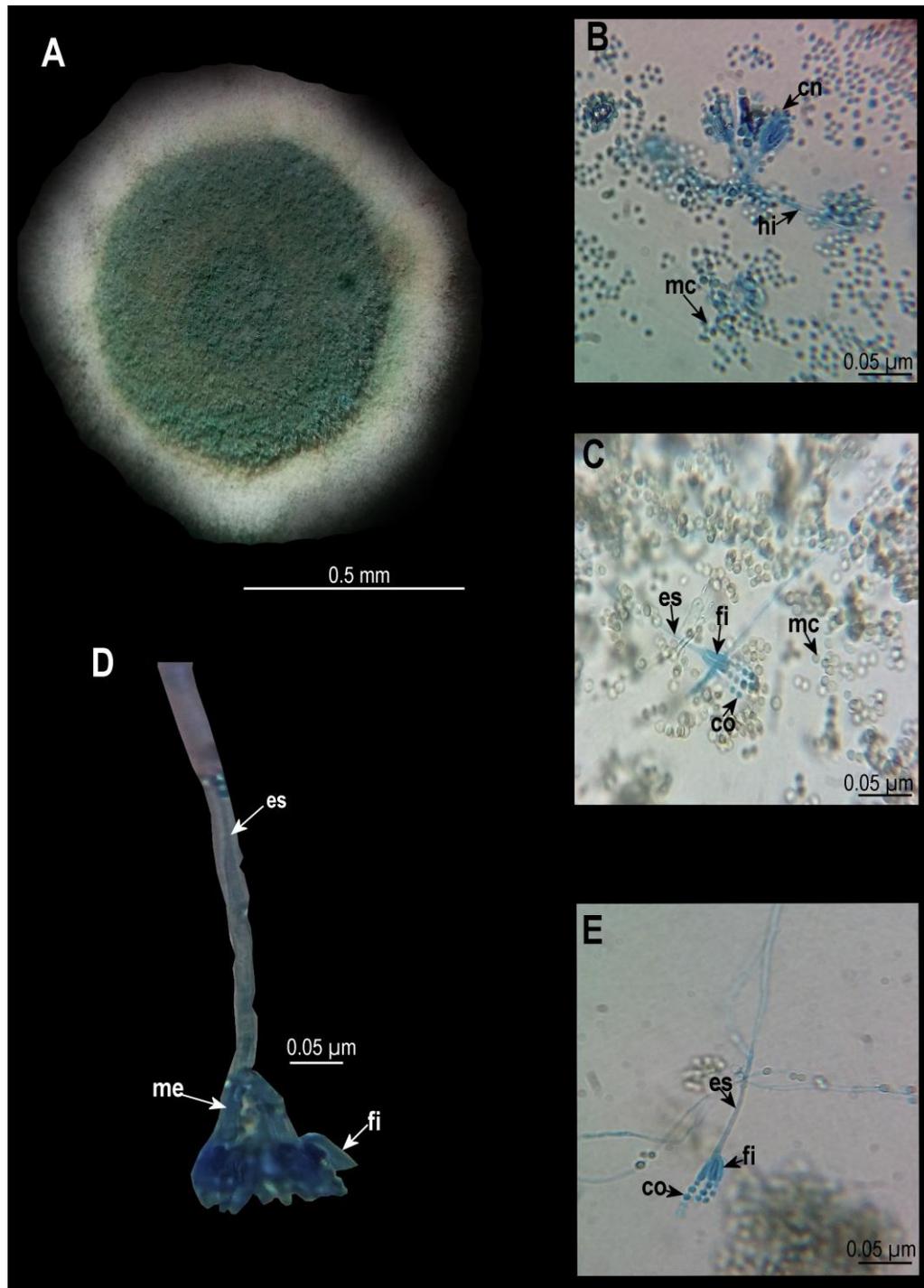


FIGURA 29. *Penicillium* sp. 1 (cepa M2P1-H4) morfología microscópica y macroscópica de la cepa aislada de *Pericelis nazahui* No. 1 (organismo lavado); colonias inoculadas en agar A1 (A–B, D), CZA (C) y PDA (E); A. características macroscópicas de la colonia, anverso; B–E. características microscópicas, tinción azul de lactofenol. Estructuras: co= conidio, cn= conidióforo, es= estipe, fi= fiálides, hi= hifa, mc= micro-conidios, me= métulas.

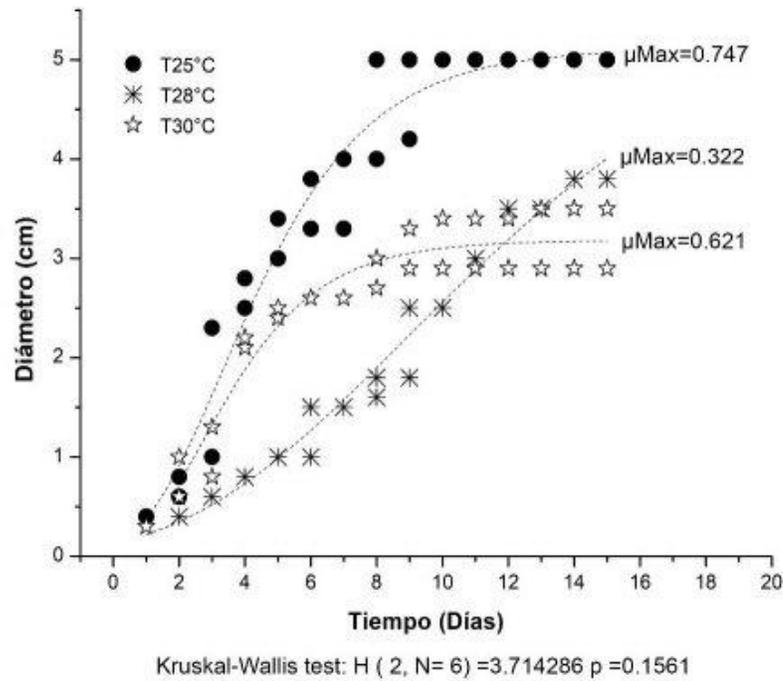


FIGURA 30. Efecto de la temperatura en el crecimiento de *Penicillium* sp. 1 (cepa M2P1-H4), evaluada en agar CZA durante 15 días. Los valores representan el periodo de crecimiento de la cepa durante el tiempo evaluado y el valor del coeficiente de determinación (R^2).

Penicillium sp. 2

Cepa M2P3-H7

Caracterización macroscópica: La morfología de las colonias en agar A1, CZA y PDA fue circular, de borde liso, plana con una protuberancia en la región central de la colonia (Fig. 31A, C, D). En agar A1 presentó un diámetro de 0.13 cm/día y anverso con la región apical verde-grisácea, región central blanca-grisácea y la periferia con un halo blanco (Fig. 32A); de superficie lisa y consistencia aterciopelada (Fig. 32A). Reverso marrón claro, de apariencia lisa (Fig. 31B, D, F). En agar CZA y PDA presentó un diámetro de 0.27 cm/día y la misma coloración descrita anteriormente.

Micelio aéreo de coloración igual a la colonia, micelio vegetativo filamentoso.

Caracterización microscópica: Especie anamorfa, hifas filamentosas septadas; micro-conidios esféricos. Conidióforo de tipo monoverticilado (Fig. 32B–D) ($12.5\text{--}110\ \mu\text{m}$ ($n= 10$, $\bar{x}= 55\ \mu\text{m}$, $ES= 9$)), con conidios esféricos ($12.5\ \mu\text{m}$ ($n= 10$, $\bar{x}= 1.25\ \mu\text{m}$, $ES= 0.3$)), fiálides ($8.75\text{--}15\ \mu\text{m}$ ($n= 10$, $\bar{x}= 12.8\ \mu\text{m}$, $ES= 0.8$)) y métulas planas y largas ($11.25\text{--}15\ \mu\text{m}$ ($n= 10$, $\bar{x}= 13.13\ \mu\text{m}$, $ES= 0.5$)), con estipe delgado y alargado (Fig. 32B).

Crecimiento en tres temperaturas: La cepa presentó diferencias en su crecimiento a diferentes temperaturas y salinidad de 35 UPS (Fig. 33); exhibe la mayor tasa de crecimiento ($\mu_{\text{max}}=0.04$ cm/día) y diámetro (0.83 cm/día) a 25°C , alcanza una fase estacionaria a los siete días posterior a la inoculación; a 28 y 30°C obtiene la menor tasa de crecimiento ($\mu_{\text{max}}= 0.02$ cm/día) y se mantiene en la fase exponencial de crecimiento.

A una temperatura de 25°C presenta una superficie con surcos radiales, una coloración marrón claro en la región central y blanca en la periferia; a 30°C se mantienen los surcos radiales, la coloración central es verde-grisácea tenue, la periferia de color blanco y a 28°C carece de surcos radiales, la región central es verde-grisácea y la periferia con un halo blanco. No presenta esporulación, exudados, ni pigmentos solubles.

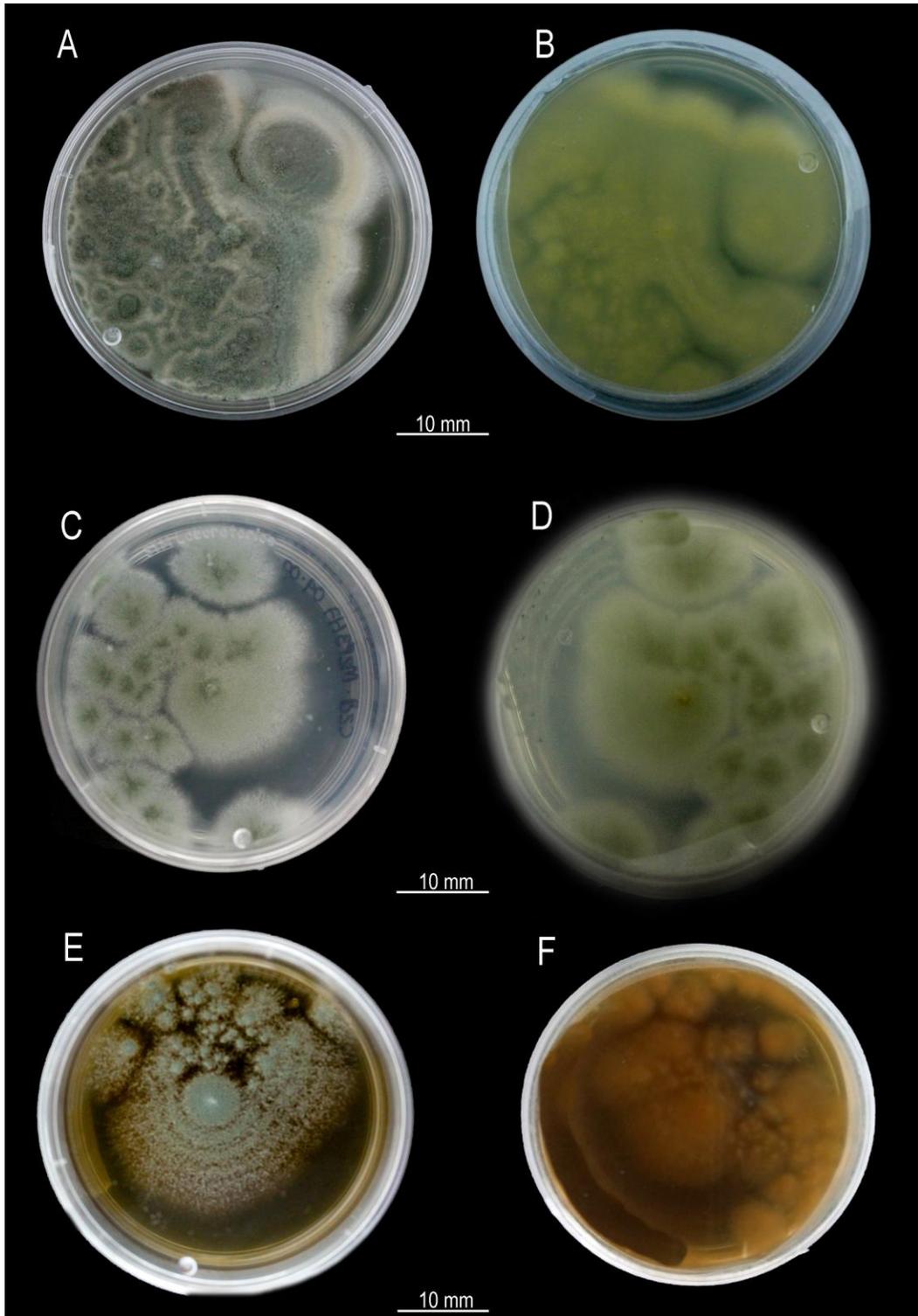


FIGURA 31. *Penicillium* sp. 2 (cepa M2P3-H7) morfología macroscópica, cepa aislada de *Pericelis nazahui* No. 3 (organismo no lavado); colonias inoculadas en agar A1 (A–B), CZA (C–D) y PDA (E–F) donde se muestra el anverso (A, C, E) y reverso (B, D, F) de la colonia.

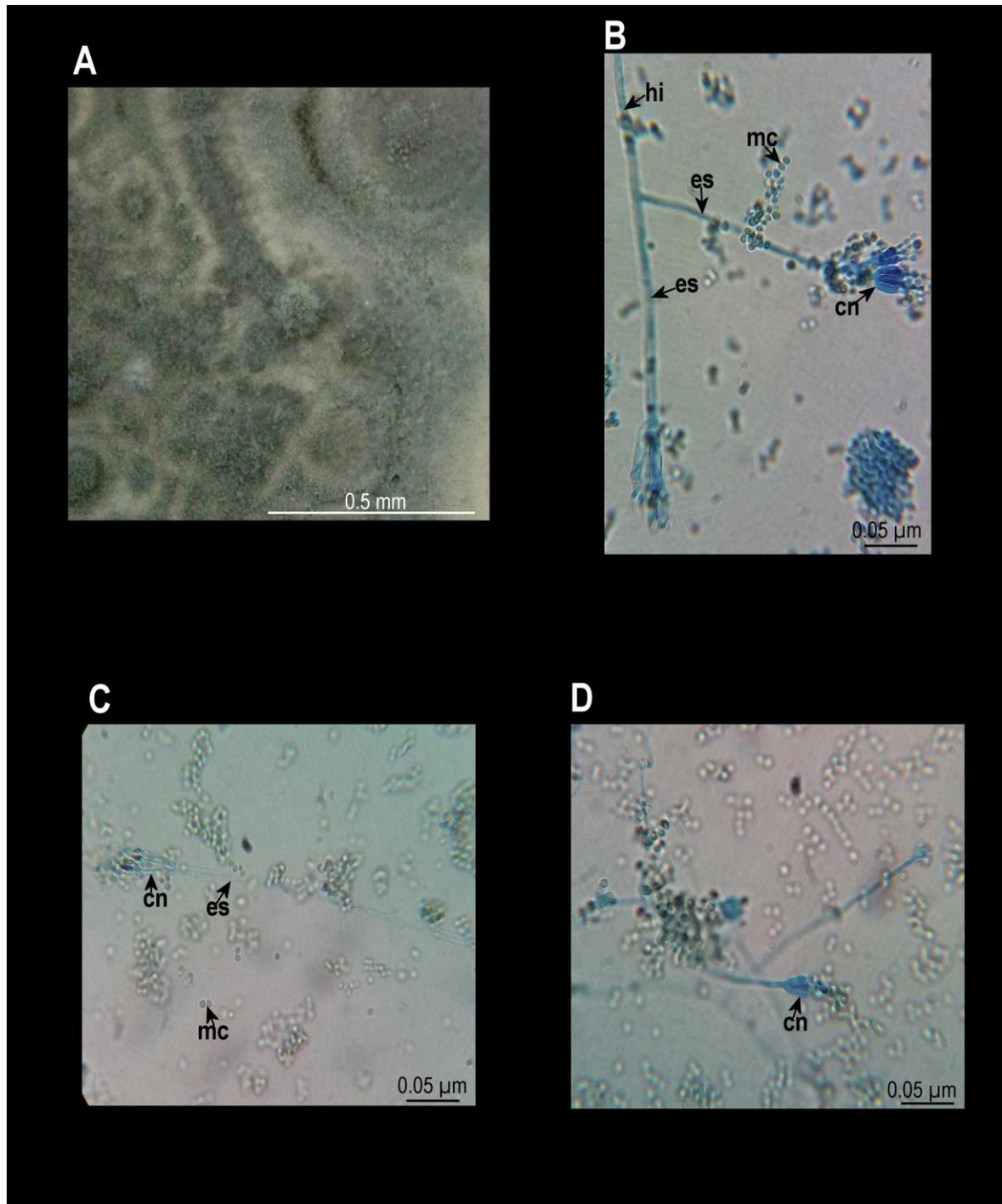
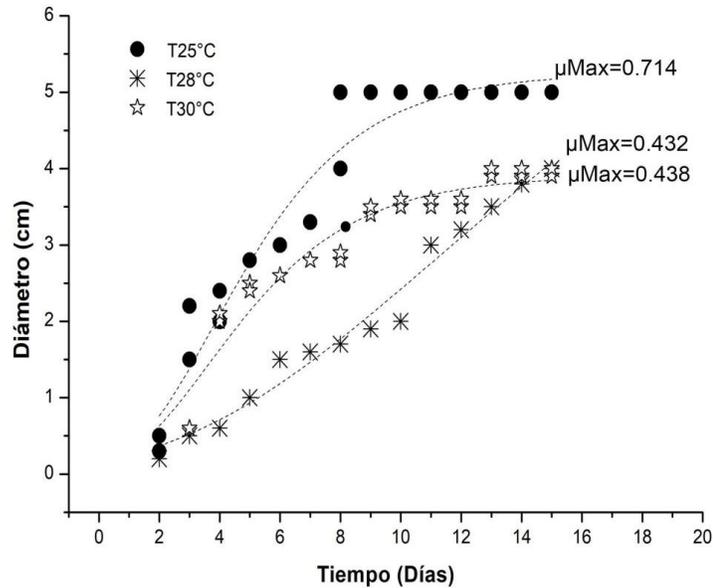


FIGURA 32. *Penicillium sp. 2* (cepa M2P3-H7) morfología microscópica, cepa aislada de *Pericelis nazahui* No. 3 (organismo no lavado); colonias inoculadas en agar A1 (A–B), CZA (C) y PDA (D); A. características macroscópicas de la colonia, anverso; B–D. características microscópicas, tinción azul de lactofenol. Estructuras: cn= conidióforo, es= estipe, hi= hifa, mc= micro-conidios.



Kruskal-Wallis test: $H(2, N=6) = 3.602941$ $p = 0.1651$

FIGURA 33. Efecto de la temperatura en el crecimiento de *Penicillium sp. 2* (cepa M2P3-H7), evaluada en agar CZA durante 15 días. Los valores representan el periodo de crecimiento de la cepa durante el tiempo evaluado y el valor del coeficiente de determinación (R^2).

Dominio Eukarya Margulis & Chapman 2009

Reino Fungi Whittaker, 1969

Filo (División) Ascomycota Whittaker, 1959

Orden Hypocreales Lindau, 1897

Familia Cordycipitaceae Kreisel ex GH Sung, JM Sung, Hywel-Jones & Spatafora, 2007

Género *Simplicillium* Zare & Gams, 2001

Simplicillium spp.

Cepa AMP2-H1, M2P3-H6

Caracterización molecular: Este análisis se realizó con base en 618 pb alineadas de las secuencias del gen 28S rADN; el árbol filogenético fue construido con 16 secuencias, de ellas 12 secuencias de las especies de *Simplicillium* similares a dos secuencias de interés aisladas en este estudio (identificados mediante el análisis BLAST con un 90% de similitud), la secuencia

de la especie tipo *Simplicillium lanosoniveum* y la secuencia de *Huntiella moniliformis* determinada como grupo externo (Fig. 34).

Las cepas AMP2-H1 y M2P3-H6 forman un nodo interno con un porcentaje de agrupación del 91%, ambas cepas forman una agrupación (90%) con *Simplicillium sympodiophorum*, con un valor de distancia genética 28S rADN de 0.016 ($\sigma=0.006$) y 0.004 ($\sigma=0.003$), respectivamente (Tabla 8).

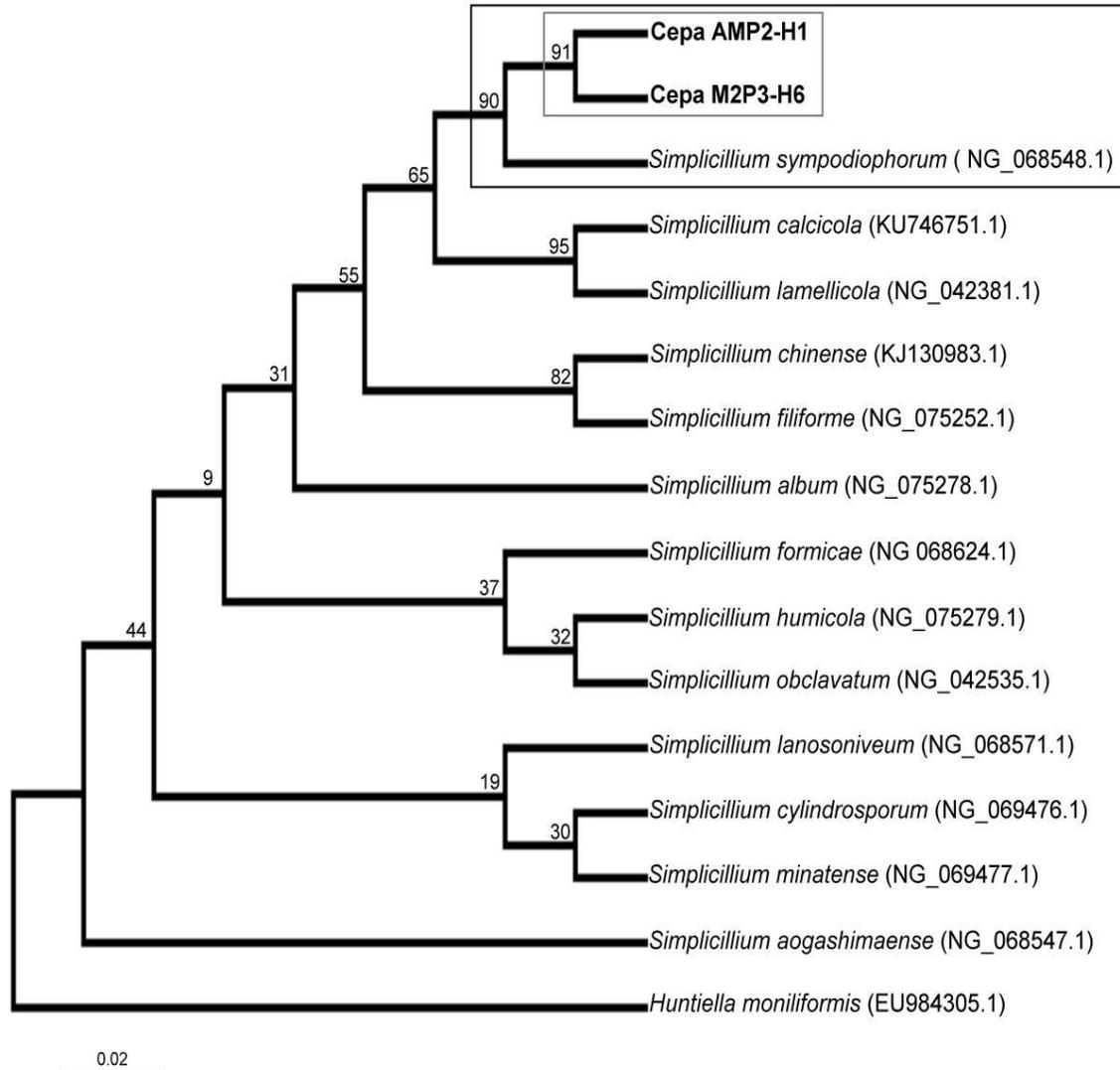


FIGURA 34. Árbol filogenético obtenido con el análisis de Máxima Verosimilitud (Felsenstein 1993) que muestra la posición de las cepas **AMP2-H1** y **M2P3-H6** dentro del género *Simplicillium* entre sus vecinos filogenéticos, basado en 618 pb de las secuencias de 28S rADN. Los valores de *bootstrap* de las ramas indican el porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agruparon (1,000 réplicas). Los números de acceso en el *GenBank* de la secuencia se indican entre paréntesis. La secuencia de *Huntiella moniliformis* (EU984305.1) se utilizó como grupo externo.

Tabla 8. Distancia genética por pares entre linajes de especies de *Simplicillium* cercanas a la cepa AMP2–H1 y cepa M2P3–H6, recalculadas con el modelo de Kimura–2 Parámetros. El error estándar se muestra en letras negritas

Taxón	1	2	3	4	5
1. Cepa AMP2–H1		0.005	0.008	0.007	0.006
2. Cepa M2P3–H6	0.012		0.006	0.005	0.003
3. <i>S. calcicola</i> (KU746751.1)	0.031	0.018		0.003	0.005
3. <i>S. lamellicola</i> (NG_042381.1)	0.026	0.014	0.004		0.004
4. <i>S. sympodiophorum</i> (NG 068548.1)	0.016	0.004	0.014	0.010	

***Simplicillium* sp. 1**

Cepa AMP2-H1

Caracterización macroscópica: La morfología de las colonias en agar AM, A1, CZA y PDA, presentó una forma circular, región central convexa, borde entero (Fig. 35A). En agar AM presentó un diámetro de 0.1 cm/día y una anverso blanco, superficie lisa y consistencia algodonosa (Fig. 35A). Reverso de apariencia costrosa; región central de color blanco, seguido por un gradiente de coloración hacia la periferia (Fig. 35B) en tonos de color marrón oscuro, marrón claro y blanco. En agar A1, presentó un diámetro de 0.16 cm/día, en CZA (Fig. 35D–E) de 0.06 cm/día y en PDA (Fig. 35G–H) es de 0.08 cm/día; en todos los medios de cultivo presentó la misma morfología macro y microscópica, color y consistencia antes mencionada, la cual no cambia con la edad de cultivo.

Micelio aéreo de color blanco, liso y filamentoso; micelio vegetativo de crecimiento rizoide de color marrón claro. No presenta exudados, ni pigmentos solubles.

Caracterización microscópica: Especie anamorfa, hifas filamentosas no septada y conidios esféricos (Fig. 35C, F, I); no se observaron los conidióforos.

Crecimiento en tres temperaturas: La cepa alcanzó un crecimiento máximo a 28°C con un valor de $\mu_{\max} = 0.026$ cm/día; a 25 y 30°C obtiene una $\mu_{\max} = 0.016$ cm/día; la fase de aclimatación de la cepa dura sólo un día e inmediatamente continúa con la fase exponencial la cual se mantiene pasado los 15 días de observación (Fig. 36). No presenta esporulación, exudados ni pigmentos solubles en ninguno de los medios de cultivos, ni en las temperaturas evaluadas.

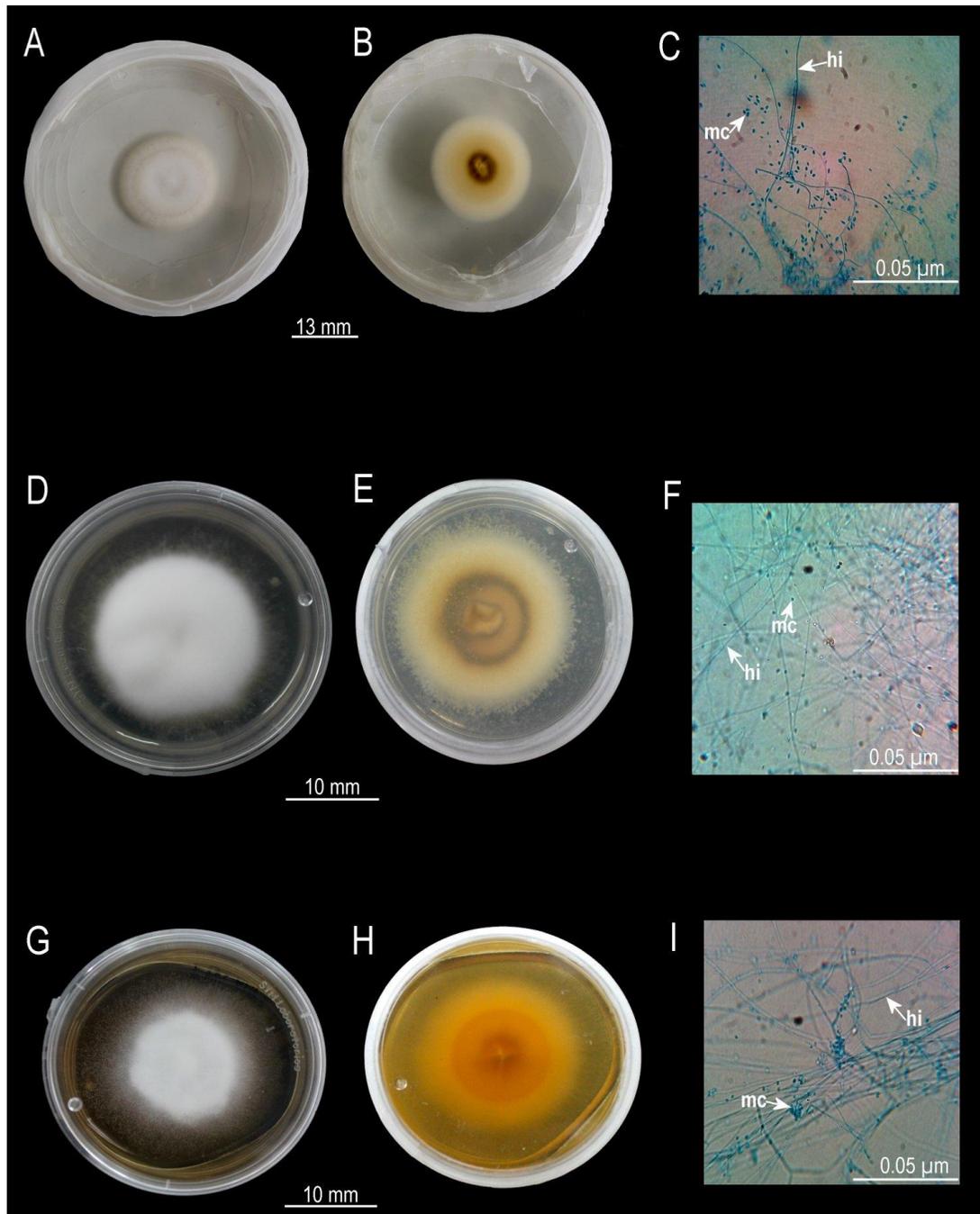
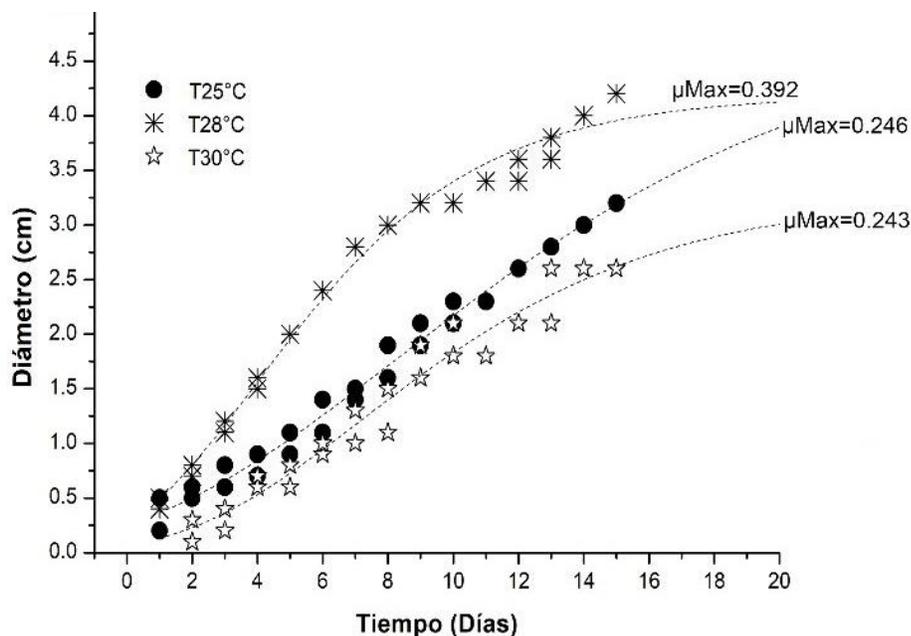


FIGURA 35. *Simplicillium* sp. 1 (cepa AMP2-H1) morfología macroscópica y microscópica, cepa aislada de *Pericelis nazahui* No. 2 (organismo lavado); colonias inoculadas en agar AM (A–C), CZA (D–F) y PDA (G–I); A–B, D–C, G–H. características macroscópicas de la colonia; A, D, G. anverso; B, C, H. reverso; C, F, I. características microscópicas, tinción azul de lactofenol. Estructuras: hi=hifa, mc=micro-conidios.



Kruskal-Wallis test: $H(2, N=6) = 3.529412$ $p = 0.1712$

FIGURA 36. Efecto de la temperatura en el crecimiento de *Simplicillium* sp. 1 (cepa AMP2-H1), evaluada en agar CZA durante 15 días. Los valores representan el periodo de crecimiento de la cepa durante el tiempo evaluado y el valor del coeficiente de determinación (R^2).

Simplicillium sp. 2

Cepa M2P3-H6

Caracterización macroscópica: En agar A1, CZA y PDA, la colonia presentó una morfología uniforme y forma circular, región central convexa, de borde entero (Fig. 37A). A1 presenta un diámetro de 0.17 cm/día, anverso blanco, de superficie lisa y consistencia algodonosa (Fig. 37A, D, G), reverso con la región central de color blanco de consistencia costrosa, seguido por un gradiente de coloración hacia la periferia marrón oscuro, marrón claro y blanco (Fig. 37B, E, H). En agar CZA y PDA presenta un diámetro de 0.08 cm/día y 0.16 cm/día respectivamente. Conserva la misma coloración y no presenta esporulación, exudados ni pigmentos solubles.

Micelio aéreo de color blanco, liso y filamentoso; micelio vegetativo de crecimiento rizoide de color marrón claro.

Caracterización microscópica: Especie telomorfa (agar A1), hifas filamentosas aseptadas, conidios esféricos (Fig. 37C, F, I) y escasa presencia de basidiósporas (Fig. 37C); no se observaron los conidióforos. En agar CZA y PDA (Fig. 37F, I), se desarrolla como una especie anamorfa, carece de basidiósporas.

Crecimiento en tres temperaturas: Presenta diferencias en el crecimiento a diferentes temperaturas y salinidad de 35 UPS. La cepa alcanzó un crecimiento máximo ($\mu_{\max} = 0.02$ cm/día) a 25°C, la fase exponencial sobrepasa los 15 días de inoculación; la menor tasa de crecimiento ($\mu_{\max} = 0.01$ cm/día) la obtiene a 30°C, alcanzando la fase estacionaria a los 10 días (Fig. 38). La morfología y coloración de la cepa se mantienen en las temperaturas evaluadas.

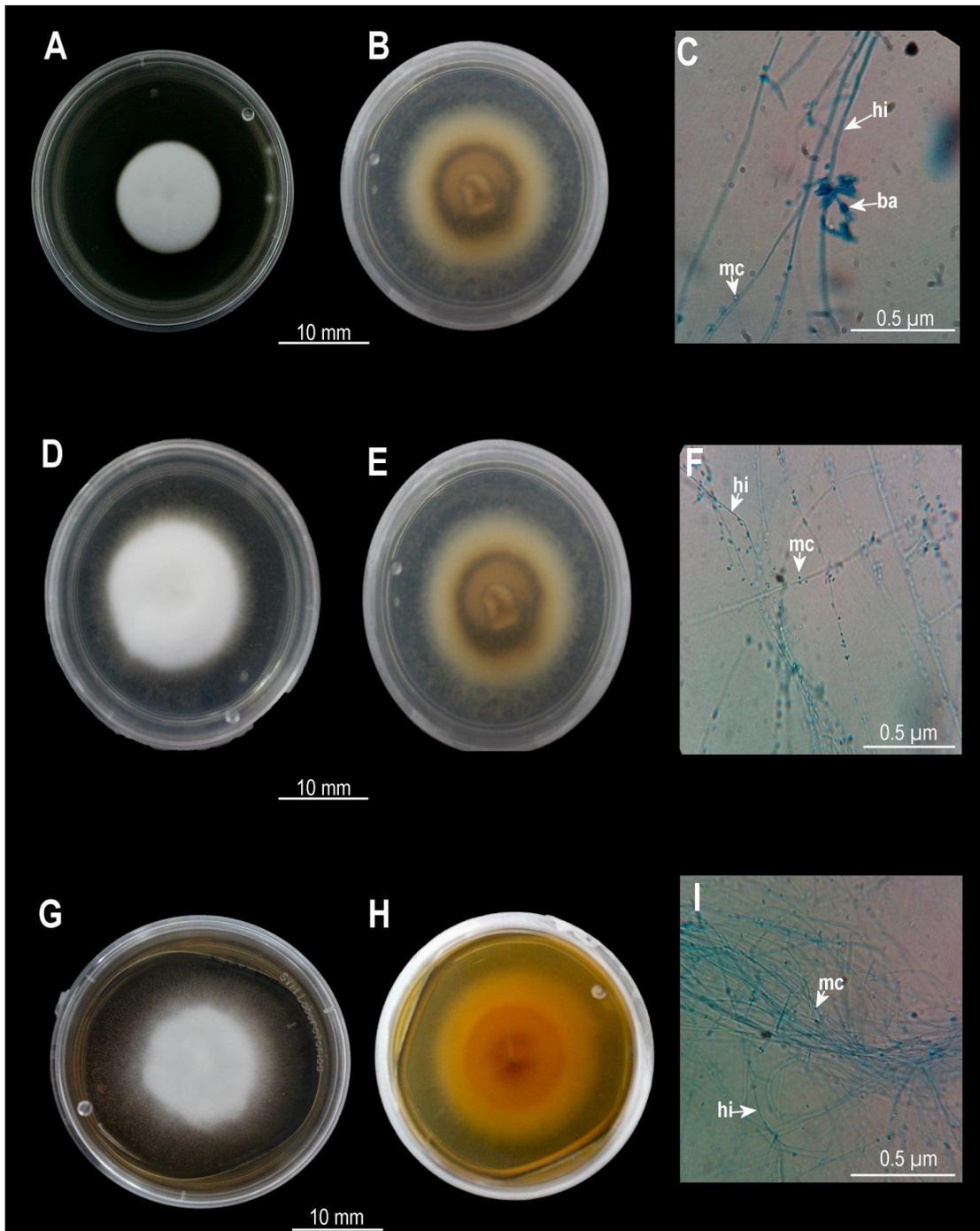


FIGURA 37. *Simplicillium* sp. 2 (cepa M2P3-H6) morfología macroscópica y microscópica, cepa aislada de *Pericelis nazahui* No. 3 (organismo no lavado); colonias inoculadas en agar A1 (A–C), CZA (D–F) y PDA (G–I) donde se muestra el anverso (A, D, G) y reverso (B, E, F) de la colonia. I. características microscópicas, tinción azul de lactofenol. Estructuras: ba= basidiosporas, hi= hifa, mc= micro-conidios.

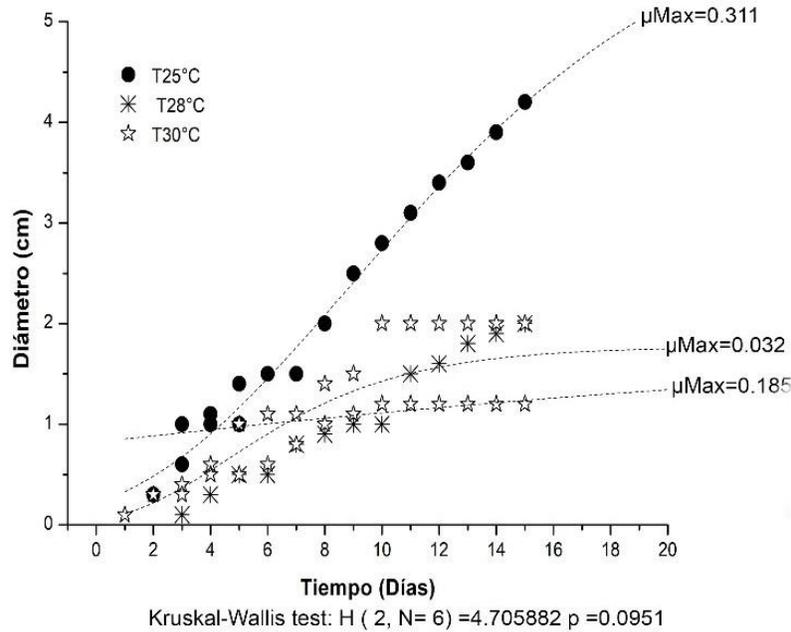


FIGURA 38. Efecto de la temperatura en el crecimiento de *Simplicillium* sp. 2 (cepa M2P3-H6), evaluada en agar CZA durante 15 días. Los valores representan el periodo de crecimiento de la cepa durante el tiempo evaluado y el valor del coeficiente de determinación (R^2).

Dominio Eukarya Margulis & Chapman 2009

Reino Fungi Whittaker, 1969

Filo (División) Ascomycota Whittaker, 1959

Orden Xylariales Nannf., 1932

Xylariales sp. 1

Cepa M2P2-H2

Caracterización molecular: Este análisis se realizó con base en 607 pb alineadas de las secuencias del gen 28S rADN; el árbol filogenético fue construido con 34 secuencias, de ellas 32 secuencias de miembros del orden Xylariales, similares a la secuencia de la cepa de interés identificadas mediante el análisis BLAST (con un porcentaje de similitud del 92%) y la secuencia de *Penicillium expansum* determinada como grupo externo (Fig. 39).

La cepa M2P2-H2 forma un nodo interno con un porcentaje de agrupación del 81% con *Atrotoquata spartii* con un valor de distancia genética 28S rADN de 0.025 ($\sigma= 0.006$) (Tabla 9).

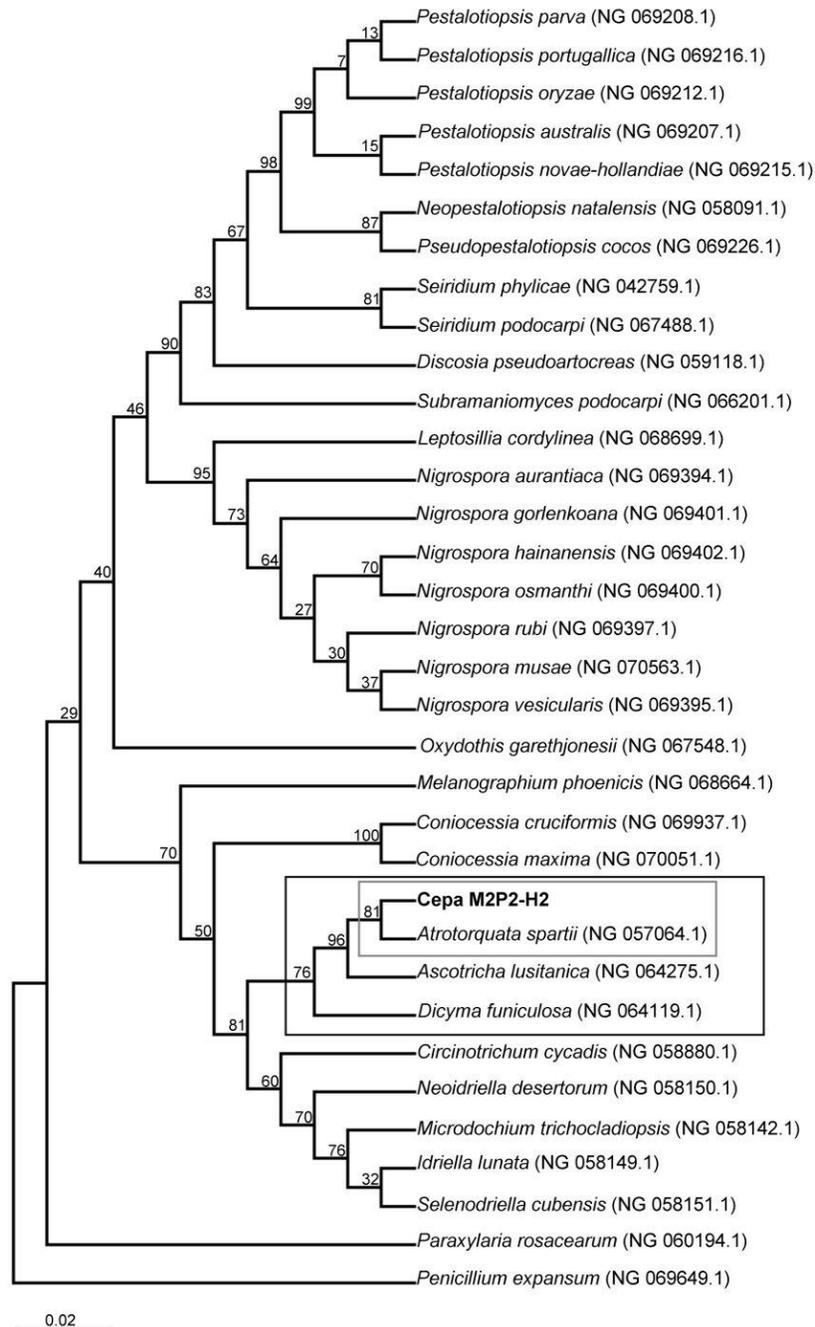


FIGURA 39. Árbol filogenético obtenido con el análisis de Máxima Verosimilitud (Felsenstein 1993) que muestra la posición de la cepa M2P2–H2 dentro del orden Xylariales y sus vecinos filogenéticos, basado en 607 pb de las secuencias de 28S rADN. Los valores de *bootstrap* de las ramas indican el porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agruparon (1,000 réplicas). Los números de acceso en el *GenBank* de la secuencia se indican entre paréntesis. La secuencia de *Penicillium expansum* (NG 069649.1) se utilizó como grupo externo.

Tabla 9. Distancia genética por pares entre linajes de especies del orden Xylariales cercanas a la cepa M2P2–H2 recalculadas con el modelo de Kimura–2 Parámetros. El error estándar se muestra en letras negritas

Taxón	1	2	3	4
1. Cepa M2P2–H2		0.007	0.006	0.012
2. <i>Ascotricha lusitanica</i> (NG 064275.1)	0.034		0.007	0.012
3. <i>Atrotorquata spartii</i> (NG 057064.1)	0.025	0.030		0.012
4. <i>Dicyma funiculososa</i> (NG 064119.1)	0.083	0.084	0.008	

Caracterización macroscópica: En agar A1, CZA y PDA, la colonia presenta una forma irregular, bordes festoneados o irregulares, elevación crateriforme (Fig. 40A, C, E), superficie rugosa, granular y de consistencia aterciopelada (Figs. 40A, 41A). En agar A1 presentó un diámetro de 0.16 cm/día, anverso con la región central en tonos marrón claro a grisácea y con un tono más claro hacia la periferia de la colonia (Fig. 40A, C, E). Reverso marrón claro a grisáceo de consistencia lisa (Fig. 40B, D, F). En CZA obtiene un diámetro de 0.1 cm/día, en este agar presentó un anverso marrón claro con una ligera pigmentación blanca en la región central (Fig. 40C–D) y consistencia membranosa; mientras que en PDA la colonia obtiene el menor desarrollo (0.08 cm/día) y un anverso grisáceo (Fig. 40F).

Micelio aéreo de color grisáceo oscuro en la región central y ligeramente claro en la periferia (Fig. 40A, E); micelio vegetativo filamentosos.

Caracterización microscópica: especie anamorfa, hifas filamentosas (Fig. 41F) y septadas. Conidióforos complejos (Fig. 41B–C) con vesículas terminales, sostenidas por un estipe delgado y septado (Fig. 41B, D, F, H), llegan a medir 0.28 μm de largo. Presentan macro-conidios fusiformes (Agar CZA) (Fig. 41G) que miden 0.09 μm de largo y clamidosporas esféricas (Fig. 41I).

Crecimiento en tres temperaturas: La mayor tasa de crecimiento ($\mu_{\text{max}} = 0.02$ cm/día) se presentó a 28°C, alcanzando un diámetro de 0.29 cm/día, la cepa se mantuvo en una fase exponencial de crecimiento; a 30°C la cepa alcanzó una fase estacionaria a los 14 días de la inoculación obteniendo una $\mu_{\text{max}} = 0.006$ cm/día y un diámetro de 0.1 cm/día (Fig. 42). No presentó desarrollo a 25°C. La morfología y coloración de la cepa se mantienen en las temperaturas evaluadas. No presentó exudados, ni pigmentos solubles.

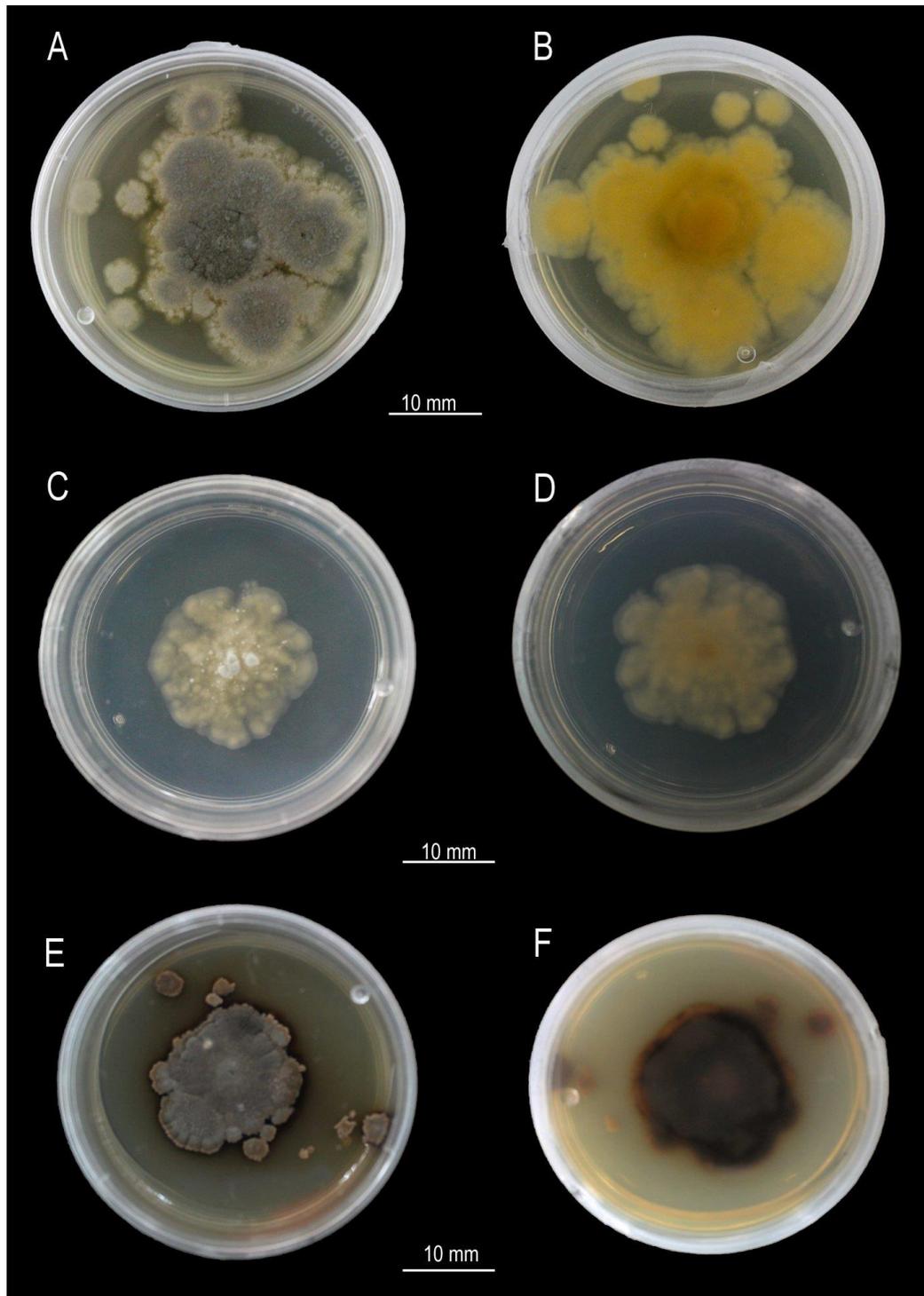


FIGURA 40. Xylariales sp. 1 (cepa M2P2-H2) morfología macroscópica, cepa aislada de *Pericelis nazahui* No. 2 (organismo lavado); colonias inoculadas en agar A1 (A–B), CZA (C–D) y PDA (E–F) donde se muestra el anverso (A, C, E) y reverso (B, D, F) de la colonia.

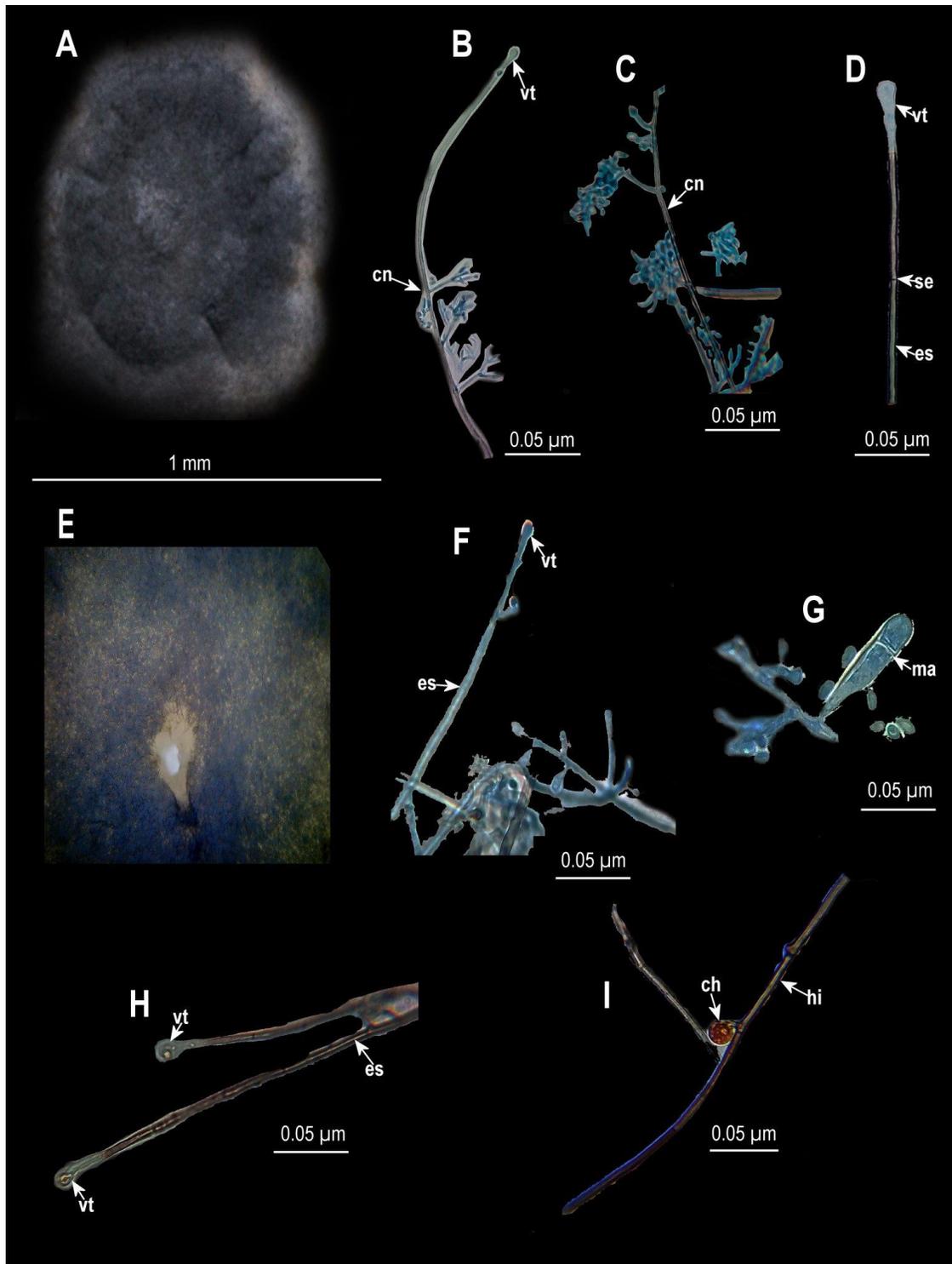
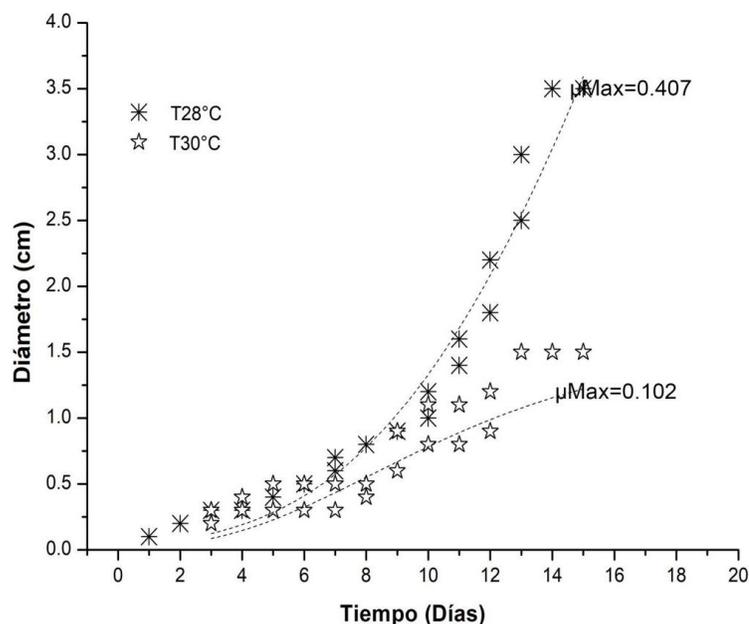


FIGURA 41. Xylariales sp. 1 (cepa M2P2-H2) morfología microscópica, cepa aislada de *Pericelis nazahui* No. 2 (organismo lavado); colonias inoculadas en agar A1 (A–E), CZA (F–G) y PDA (H–I); A, E. características macroscópicas de la colonia, anverso; B–D, F–G, H–I. características microscópicas, tinción azul de lactofenol. Estructuras: ch= clamidospora, cn= conidióforo, es= estipe, hi= hifa, ma= macro-conidio, se= septos, vt= vesícula terminal.



Kruskal-Wallis test: $H(1, N=4) = 2.400000$ $p = 0.1213$

FIGURA 42. Efecto de la temperatura en el crecimiento de *Xylariales* sp. 1 (cepa M2P2-H2), evaluada en agar CZA durante 15 días. Los valores representan el periodo de crecimiento de la cepa durante el tiempo evaluado y el valor del coeficiente de determinación (R^2).

9. Discusiones

9.1. Identificación molecular y caracterización morfológica de los microorganismos aislados

Dentro de las ciencias marinas, las investigaciones enfocadas a comprender el microbioma de los animales marinos se encuentran en constante crecimiento, y se han centrado en la identificación de los miembros “consistentes o centrales” del microbioma; para ello, se han empleado métodos tradicionales (aislamiento en medios de cultivos sólidos, líquidos, etc.) o herramientas novedosas (métodos moleculares) (April 2017), cuyo objetivo es la obtención de información sobre el papel del microbioma en la salud, fisiología, ecología y el comportamiento del hospedero.

Para conocer la microbiota presente en el policládido *Pericelis nazahui* se emplearon métodos moleculares y tradicionales; que consistieron en el aislamiento y caracterización de los microorganismos en medios de cultivos sólidos y la identificación de las jerarquías taxonómicas

a partir de la herramienta molecular, basados en los genes 16S ADN para los microorganismos bacterianos y el gen 28S ADN y la región del ITS para los organismos fúngicos. Con base en un orden sistemático las cepas aisladas en este estudio fueron determinadas molecularmente dentro de los géneros bacterianos *Streptomyces*, *Nocardiosis* y *Paracoccus*, y los géneros fúngicos *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Simplicillium* y una cepa dentro del orden Xylariales.

Las cepas aisladas se establecieron como especies no descritas, ya que en las construcciones de las relaciones filogenéticas los porcentajes de similitud se encuentran por debajo del umbral propuesto para la determinación de las especies bacterianas (>98.5 %, gen 16S rADN) (Stackebrandt & Ebers 2006, Labeda *et al.* 2012) y fúngicas (> 97%, de la región del ITS y del gen 28S rADN) (Kwiatkowski *et al.* 2012, Vu *et al.* 2019). A partir de los caracteres morfológicos disponibles se realizaron las comparaciones de las cepas aisladas con las especies afines molecularmente; aunque las características morfológicas son cruciales para la identificación de las especies microbianas (Samson *et al.* 2014b, Visagie *et al.* 2014a,b), estas no permitieron la delimitación y/o establecimiento específico de las cepas aisladas en este estudio con respecto a las especies previamente descritas, ya que fueron similares (morfología celular, morfología del conidióforo, pigmentación del micelio aéreo, etc.) o estuvieron influenciadas por las condiciones de cultivo (composición del medio, pH, temperatura, etc.), por ello, se sugiere un análisis polifásico (morfología, análisis moleculares, perfiles de compuestos extracelulares, etc.) para la determinación específica de los taxones presentes en *Pericelis nazahui*.

Género *Streptomyces*

Las actinobacterias constituyen uno de los grupos bacterianos con mayor diversidad; existen morfologías desde cocoide (*Micrococcus*) o rodo-cocoide (*Arthrobacter*) hasta hifas fragmentadas (*Nocardia*) o micelio altamente diferenciado (*Streptomyces*) (Yadav *et al.* 2018). La familia Streptomycetaceae fue establecida por Waksman & Henrici (1943) para clasificar a los actinomicetos grampositivos que desarrollan un micelio altamente ramificado; actualmente cuenta con cuatro géneros válidos: *Allostreptomyces*, *Kitasatospora*, *Streptocidiphilus* y

Streptomyces, quienes son diferenciados a partir de características quimiotaxonómicas (*e. g.*, componentes de la pared celular) y mediante el análisis filogenético basado en las secuencias del gen 16S ADN (Huang *et al.* 2017, Takahashi 2017).

La familia Streptomycetaceae es considerada como el grupo de actinobacterias más diversificado y ampliamente distribuidos en todos los ambientes (acuáticos salobres, marinos, aéreos y terrestres) (Mahasneh *et al.* 2011), habitando de forma libre o estableciendo asociaciones que resultan particularmente interesantes y están vinculadas muchas veces a la producción de metabolitos secundarios por parte de las bacterias participantes (Seipke *et al.* 2012), con aplicaciones en la agricultura, biotecnología y medicina (Espinosa-Barrera *et al.* 2021).

En el análisis BLAST las cepas M2P2–B1 y M2P2–B2 presentaron un porcentaje de identidad del 98.78% con *Streptomyces hyderabadensis* y la cepa M2P2–B3 obtuvo un 97.51% de identidad con *S. daliensis*; ambas especies fueron aisladas a partir de muestras de suelo, en la región de Hyderabad, Andhra Pradesh, al sur de la India (Reddy *et al.* 2011) y en la región sur de Dali, Yunnan, China (Xu *et al.* 2006), respectivamente.

En la construcción de las relaciones filogenéticas, M2P2–B1 y M2P2–B2 están estrechamente relacionadas (57%), mientras que M2P2–B3 formó una agrupación (88%) con *Streptomyces daliensis*; de acuerdo a Tindall *et al.* (2010), el valor de homología menor al 97% entre las secuencias de la cepa aislada y la secuencia de la especie tipo no permite asignar a las cepas como miembro de una especie; por ello, y debido al bajo valor de homología (57% y 88%) las cepas aisladas fueron determinadas como *Streptomyces* sp. 1 (M2P2–B1), *Streptomyces* sp. 2 (M2P2–B2) y *Streptomyces* sp. 3 (M2P2–B3).

En el género *Streptomyces*, los rasgos morfológicos y pigmentales de las colonias son considerados aspectos diferenciales para la delimitación de las especies de estreptomicetos relacionadas filogenéticamente (Labeda & Lyons 1991, Manfio *et al.* 2003, Xu *et al.* 2006); se ha descrito el crecimiento a 28°C y las características morfológicas de las cepas de *Streptomyces daliensis* en medios cultivo diferentes (triptona y extracto de levadura, agar de malta de levadura, agar de avena, agar inorgánico de almidón y sal, base de agar de glicerol asparagina y en agar triptona-soya) (Xu *et al.* 2006) a los utilizados en el presente estudio (medio M2 y A1),

por lo anterior, no fue posible una comparación morfológica; sin embargo, se hace mención de las características más relevantes. La cepa de *Streptomyces* sp. 3 es una colonia puntiforme, con elevación papilada, de color amarilla a ligeramente clara, mientras que *Streptomyces daliensis*, en los medios antes indicados, presenta una coloración blanca a amarillo claro (Xu *et al.* 2006).

Género *Nocardiopsis*

El género *Nocardiopsis* pertenece al orden Mycobacteriales y a la familia Nocardiaceae, fue establecido por Meyer en 1976, actualmente se compone de 46 especies válidas (Parte *et al.* 2020), sobre la base de estudios quimiotaxonómicos (Rainey *et al.* 1996), numéricos y genéticos (Grund & Kroppenstedt 1990, Beau *et al.* 1999). Son actinomicetos aerobios, grampositivos, con micelio de sustrato nocardioformo y micelio aéreo con largas cadenas de esporas (Bennur *et al.* 2015).

Rainey *et al.* (1996) mencionaron que las relaciones basadas en las comparaciones de las secuencias del gen 16S ADN de las especies de *Nocardiopsis*, han demostrado que el género es un taxón filogenéticamente poco profundo, exhibiendo niveles de similitud entre el 97.8 y el 99.7 %; por lo que sugieren que la definición a nivel específico debe ser investigada a través de un análisis de hibridación ADN-ADN, lo cual permite la detección de las relaciones a nivel de cepa y especie dentro de este género particular de actinomicetos (Fischer *et al.* 1983).

En el análisis BLAST la cepa M2P3–B5 presentó un porcentaje de identidad del 99.29% con *Nocardiopsis dassonvillei*, neotipo aislado de muestras de suelo, en París, Francia (*sensu* Sun *et al.* 2010); sin embargo, en la construcción de las relaciones filogenéticas, por el bajo valor de homología (62%) (Tindall *et al.* 2010), entre las secuencias del presente estudio y la secuencia de la especie tipo, la cepa fue determinada como *Nocardiopsis* sp. 1.

Para *Nocardiopsis dassonvillei* se han descrito algunos rasgos morfológicos y pigmentales empleando diversos medios de cultivos (agar de avena, agar extracto de malta y levadura, agar inorgánico de almidón y sal, agar Löwenstein-Jensen, agar MacConkey, Bennett y Czapek) (Meyer 1976, Shivaprakash *et al.* 2012) diferentes a los utilizados en el presente estudio (medio M2 y A1), por lo que sólo se mencionan las características morfológicas. La cepa *Nocardiopsis* sp. 1 es una colonia de apariencia polvosa, blanca con tonos grises y púrpuras

muy tenues, de borde ligeramente ondulado; mientras que *Nocardiopsis dassonvillei*, en los medios antes indicados, se desarrolla como una colonia de color blanco, marrón amarillento o verde oliva, de aspecto seco y arrugada (Meyer 1976, Shivaprakash *et al.* 2012).

Género *Paracoccus*

La familia Rhodobacteraceae comprende alrededor de 90 géneros distribuidos en cinco grupos filogenéticos (*Amaricoccus*, *Paracoccus*, *Rhodobacter*, *Rhodovulum*, *Roseobacter* y *Stappia*). *Paracoccus* es un género de bacterias gramnegativa descritas en forma de coccoides, cocobacilos o varillas cortas (Pujalte *et al.* 2014). Actualmente se reconocen 75 especies válidas (Parte *et al.* 2020).

Se ha considerado que los estudios de clasificación taxonómica y filogenéticos sustentados en el gen 16S ADN establecen un umbral >98.7 % para la definición de especies (Tindall *et al.* 2010), criterio que deben de ir siempre acompañado por una propiedad fenotípica discriminante (Yarza *et al.* 2014). Por su parte, Puri *et al.* (2021) señalaron que el género *Paracoccus* muestra una amplia gama de valores de similitud en este gen, el más bajo ha sido 91.19%, por lo cual estos autores han sugerido el uso de análisis de distancia métrica del genoma, así como la hibridación de ADN-ADN, etc., como caracteres definatorios a nivel de especie.

La cepa M2P2–B4 presentó un porcentaje de identidad del 98.15% con *Paracoccus aerius* (análisis BLAST), especie descrita a partir de muestras aisladas del aire en campo abierto, a 1.5 m del nivel del suelo en la montaña Xiangshan, Beijing, China (Xue *et al.* 2017); sin embargo, en la construcción de las relaciones filogenéticas, por el bajo valor de homología (75%), la cepa fue determinada como *Paracoccus* sp. 1.

Los rasgos pigmentales y morfológicos de las cepas de *Paracoccus aerius*, se han descrito en agar soja tripton (TSA) incubadas a 30°C; en este medio las colonias son circulares, convexas, lisas y de color naranja (Xue *et al.* 2017); en el presente estudio se emplearon los medios M2 y A1, por ello, las características no son comparables; no obstante, *Paracoccus* sp. 1 se desarrolló como una colonia de una superficie plana, lisa y de color marrón claro.

Género *Cladosporium*

Los miembros del género *Cladosporium* pertenecen a la familia Cladosporiaceae y se caracterizan por su morfo asexual; dada su amplia gama de sustratos de ambientes de interiores (*e.g.*, casas), exteriores (*e.g.*, suelos) o extremos (*e.g.*, ventilas hidrotermales, plantas nucleares) son considerados organismos ubicuos, así como saprofitos, endófitos, parásitos o hiperparásitos de otros hongos, plantas y animales (incluido el hombre); ciertas especies muestran la capacidad de producir compuestos de interés médico o son relevantes como posibles agentes de control biológico para enfermedades de las plantas; se han asignado ~ 993 nombres a *Cladosporium s. lat.* (Bensch *et al.* 2012) y actualmente la delimitación de las especies se han basado en tres marcadores genéticos (el ITS, los fragmentos parciales de actina (*act*) y los genes del factor de elongación de traducción 1- α (*tef1*)) (Iturrieta-González *et al.* 2021).

En el análisis BLAST, la secuencia de la cepa M2P1–H3 presentó un porcentaje de identidad del 98.44% con ocho especies fúngicas del género *Cladosporium* (*C. angustiterminale*, *C. chubutense*, *C. colocasiae*, *C. funiculosum*, *C. ipereniae*, *C. montecillanum*, *C. pini-ponderosae* y *C. pseudochalastosporoides*) que se agrupan en el complejo *Cladosporium cladosporioides* (Sandoval-Denis *et al.* 2016) (Tabla X), grupo que incluye especies saprofitas, cosmopolitas e invasoras secundarias en partes necróticas de plantas (Bensch *et al.* 2010), caracterizadas por presentar conidios lisos o escasamente verrugosos (Schuber *et al.* 2007); aunque, en la construcción de las relaciones filogenéticas (57%) y la distancia genética del ITS (0.172, $\sigma=0.022$), la cepa se encuentra relacionada con *Cladosporium colocasiae*, una de las ocho especies obtenidas en el análisis BLAST; aislada de la planta *Colocasia esculenta* en Taiwán (Bensch *et al.* 2012).

Kwiatkowski *et al.* (2012) y Vu *et al.* (2019) consideraron, para la definición de especies mediante el uso del marcador molecular ITS, un valor de similitud >97%; dado el bajo valor de homología (57%) entre la secuencia de este estudio y la secuencia tipo de la especie, la cepa se determinó como *Cladosporium* sp. 1.

Los rasgos morfológicos microscópicos de estas ocho especies antes mencionadas han sido descritos en agar sintético pobre en nutrientes (SNA), mientras que las características del cultivo (coloración) fueron descritos a partir de las colonias inoculadas en PDA (Bensch *et al.*

2012, 2015, Schubert *et al.* 2009); por su parte Vásquez-López *et al.* (2018) describieron la morfología microscópica (conidio, conidióforos) de una cepa de *Cladosporium colocasiae* en PDA, lo cual permitió la comparación de estas características con *Cladosporium* sp. 1; pese a ello, la comparación morfológica no proporcionó una delimitación clara a nivel específico de estos taxones, ya que, *Cladosporium* sp. 1 inoculado en PDA presentó un escaso desarrollo en los conidióforos y conidios, aunado a que macroscópicamente las especies del complejo *Cladosporium cladosporioides* y *Cladosporium* sp. 1 presentan una coloración similar (Tabla 10) que van en tonos grises a oliváceo con el margen blanco y el reverso en tonos grisáceos a negros.

El holotipo de *Cladosporium colocasiae* se ha aislado de *Colocasia esculenta*, en Taiwán (Bensch *et al.* 2012); esta especie de hongo ha sido registrada en la República Dominicana, Puerto Rico, Etiopía, Japón, Fiji (Bensch *et al.* 2012) y en San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México (Vásquez-López *et al.* 2018), todas aisladas del mismo hospedero, *Colocasia esculenta*, planta distribuida en Europa, África, Asia, Australasia y en América (Bensch *et al.* 2012).

Tabla 10. Caracteres morfológicos diferenciales de *Cladosporium* sp. 1 (cepa M2P1-H3) y las especies genéticas más cercanas; cepas inoculadas en agar PDA

Taxón	Referencia	Localidad /Sustrato	Colonia			
			Coloración		Diámetro	Morfología del conidióforo y conidio
			Anverso	Reverso		
Cepa M2P1-H3	Este estudio	Puerto Ángel Oaxaca/ <i>Pericelis nazahui</i>	Azul-grisáceo, halo blanco marginal	Negro, halo blanco periférico	4.1 cm/14 días	Conidióforos cilíndricos y conidios esféricos de color marrón claro, escasamente desarrollados
<i>C. angustiterminale</i>	Bensch <i>et al.</i> (2015)	Australia/ árbol <i>Banksia grandis</i>	Gris oliváceo-pálido, margen gris o blanco	Negro oliváceo	4.6-6.4 cm/14 días	--
<i>C. chubutense</i>	Schubert <i>et al.</i> (2009)	Languineo, Chubut, Argentina/ pino <i>Pinus ponderosa</i>	Verde/gris oscuro, margen blanco	Gris	5-6 cm/30 días	-
<i>C. colocasiae</i>	Bensch <i>et al.</i> (2012), Vásquez-López <i>et al.</i> (2018)	Taiwán/ Planta <i>Colocasia esculenta</i>	Gris-oliváceo o verde opaco, margen	Negro-oliváceo	5.6-7.6 cm/14 días	Conidióforos (650 µm) solitarios, cilíndricos-oblongos, nodulosos de color

Taxón	Referencia	Localidad /Sustrato	Colonia			
			Coloración		Diámetro	Morfología del conidióforo y conidio
			Anverso	Reverso		
			estrecho blanco			marrón oliváceo y conidios (9-18 × 5-8 µm) en cadenas ramificadas elipsoidales a cilíndricas lisas, aseptadas o de 1-2 septos (Vásquez-López <i>et al.</i> 2018)
<i>C. funiculosum</i>	Bensch <i>et al.</i> (2015)	Japón/Planta <i>Vigna umbellata</i>	Gris/negro, margen blanco-oliváceo	Gris verdoso a negro	6.5-7.8 cm/14 días	-
<i>C. ipereniae</i>	Bensch <i>et al.</i> (2015)	La Serrana, Chile/ planta del género <i>Puya</i>	Gris-negro oliváceo, margen blanco	Negro oliváceo	1-4.4 cm/14 días	-
<i>C. montecillanum</i>	Bensch <i>et al.</i> (2015)	Montecillo, Texcoco, México/ holotipo aislado de <i>Taraxacum</i> sp., asociado al pino del género <i>Pinus</i> .	Gris-oliváceo a negro, márgenes gris-oliváceo o blanco	Negro-oliváceo	6.5- 7.7 cm/14 días	-
<i>C. pini-ponderosae</i>	Schubert <i>et al.</i> (2009)	Languineo, Chubut, Argentina/ <i>Pinus ponderosa</i>	Gris-oliváceo, margen blanco	Gris a oliváceo	6.5.7.3 cm/ 30 días	--
<i>C. pseudochalastosporoides</i>	Bensch <i>et al.</i> (2015)	México, en <i>Pinus</i>	Gris-negro margen blanco	Negro-oliváceo	4.5-5.2 cm/14 días	-

Género *Aspergillus*

El género fue descrito por primera vez en 1729 por P. A. Micheli, quien comprobó que la cabeza conidial de este hongo se parecía a un "aspergillum" (instrumento utilizado para dispersar agua bendita). Es un hongo filamentoso hialino ubicuo, que se encuentran comúnmente en el aire, suelo, cuerpos de agua dulce, salada, en la vegetación en descomposición, las semillas y granos, donde prosperan como saprófitos; la taxonomía polifásica ha tenido un gran impacto en los conceptos de especies del género *Aspergillus*, misma que ha permitido que este se encuentre subdividido en 23 secciones: *Aspergillus*, *Bispori*, *Candidi*, *Cervini*, *Circumdati*, *Clavati*,

Cremeri, Flavi, Flavipedes, Fumigati, Nidulantes, Nigri, Ochraceorosei, Ornati, Penicillium, Raperi, Restricti, Silvati, Sparsi, Terrei, Usti, Warcupi y Zonati (Peterson *et al.* 2008).

En el análisis BLAST, la cepa M2P3-H5 obtuvo un porcentaje de identidad del 98.01% con *Aspergillus affinis*, aislada de la hojarasca en descomposición, del río Sacco, Lazio, Italia (Davolos *et al.* 2012); sin embargo, en la construcción de las relaciones filogenéticas, esta se encuentra relacionada con cinco especies (*A. insulicola*, *A. ochraceopetaliformis*, *A. occultus*, *A. pseudoelegans* y *A. pulvericola*) de la sección *Circumdati* y genéticamente y estrechamente afín con *Aspergillus occultus* aislada de muestras de aire, en Zwartewaal, Países Bajos (Visagie *et al.* 2014b) con un porcentaje de homología del 61%.

Los miembros de la sección *Circumdati*, son considerados especies médica y económicamente importantes, al ser fuente de enzimas proteolíticas y micotoxinas (Ocratoxina A, Xantomegnina y Viomelleína) peligrosas para los animales incluido el humano, pero también como fuente de compuestos anticancerígenos e insecticidas; está conformada por 27 especies (Visagie *et al.* 2014b). Morfológicamente presentan conidióforos con cabezas biseriadas en tonos amarillo a ocre (Visagie *et al.* 2014b). Las especies de la sección *Circumdati* se han evaluado en diversos medios de cultivos (Agar de sacarosa de extracto de levadura (YES), agar de diclorano al 18% de glicerol (DG18), agar de avena (OA), agar de creatina (CREA), agar autorizado de levadura Czapek (CYA), en CZA y en extracto de malta (MEA)) (Visagie *et al.* 2014b); para efectos comparativos de la cepa M2P3-H5 con estas especies, se tomó en cuenta los rasgos descritos a partir de cultivos en CZA (Tabla XI).

En el árbol filogenético se obtuvo una agrupación externa del 77% de homología (Fig. 23), que mostró una hipótesis similar a los resultados filogenéticos obtenidos por Visagie *et al.* (2014b: 6, Fig. 2) a partir de la secuencia del ITS. En el presente estudio la agrupación obtenida además de la cepa de interés (M2P3-H5) incluye *A. insulicola*, *A. occultus*, *A. ochraceopetaliformis*, *A. pseudoelegans* y *A. pulvericola*. Se ha señalado que la coloración, la forma y ornamentación de los conidióforos es un carácter taxonómicamente informativo (Varga *et al.* 2007, Visagie *et al.* 2014b); sin embargo, la cepa M2P3-H5 es morfológica y filogenéticamente similar a las especies antes mencionadas, las cuales se caracterizan por presentar un micelio aéreo de color blanco, esclerocios en tonos blancos, amarillos y marrón claro, una vesícula globosa y fiálides ampuliformes, aunado al tamaño de las estructuras del

conidióforo (vesícula, métulas, fiálide) (Tabla 11), lo cual concuerda con lo establecido para la mayoría de las especies de la sección *Circumdati* (Visagie *et al.* 2014b); por lo cual, la cepa M2P3–H5 se establece como *Aspergillus* sp. 1. Cabe mencionar que *A. insulicola*, *A. ochraceopetaliformis*, *A. pseudoelegans* y *A. pulvericola* producen asteltoxinas (Visagie *et al.* 2014b) que origina la parálisis en la extremidades y alteraciones respiratorias (NCBI 2022).

Tabla 11. Caracteres morfológicos diferenciales entre *Aspergillus* sp. 1 (cepa M2P3–H5) y las especies genéticas más cercanas, cepas inoculadas en agar CZA. Referencia: a. Este estudio, b. Visagie *et al.* (2014b). Morfología del conidióforo: 1. Tipo de vesícula y diámetro, 2. Métula, longitud, 3. tipo de fiálide, longitud y ancho.

Taxón	Localidad / Sustrato	Diámetro a 7 días (cm) a 30°C	Color del micelio	Coloración del esclerocio	Morfología del Conidióforo		
					1	2	3
Cepa M2P3–H5	Puerto Ángel ^a Oaxaca / <i>Pericelis nazahui</i>	17.5	Blanco	Inicialmente translúcidos, seguido de tonos blancos, amarillo hasta marrón	Globosa 16.3–25 µm (n=10, □=21.3, σ=3.7)	3.6–6.4 µm (n=10, □=4.8 µm, σ=1.1)	Ampuliforme 4.3–6.4 x 4.6–7.1 µm (n=10, □=5.8 x 5.8 µm, σ=0.9)
<i>A. affinis</i>	Lazio, Italia ^b / hojarasca en descomposición	3.2–3.3	Blanco	Blanco a amarillo	Globosa 35–70 µm	12.5–21.5 x 4.5–7 µm	Ampuliforme 9–11 x 2.5–3.5 µm
<i>A. insulicola</i>	Isla Aves, Venezuela ^b / Suelo	4.2–4.7	Blanco	Ausente	Globosa 10–30 µm	7–12 x 3.5–5 µm	Ampuliforme 7–9.5 x 3–2.5 µm
<i>A. ochraceopetaliformis</i>	Recife, Brasil ^b / Lesión del cuero cabelludo	4.5–5.5	Blanco a blanco grisáceo	Estructuras similares de color marrón rojizo	Globosa a piriforme 28–60 µm	16.5–10 x 4–7 µm	Ampuliforme 8–10.5 x 2.5–4 µm

Taxón	Localidad / Sustrato	Diámetro a 7 días (cm) a 30°C	Color del micelio	Coloración del esclerocio	Morfología del Conidióforo		
					1	2	3
<i>A. occultus</i>	Zwartewaal, Países Bajos ^b / Aire	2.3–3.0	Blanco	Amarillo pálido	Globosa 25–45 µm	10–20 x 3.5–6 µm	Ampuliforme 7.5–9 x 2–3 µm
<i>A. pseudoelegans</i>	Gauguin, Isla Taboga, Costa Rica ^b / Suelo	3.8–4.5	Blanco	Amarillo marrón	Globosa 15–30.5 µm	9–17.5 x 4–7.5 µm	Ampuliforme 7.5–9.5 x 2.5–3.5 µm
<i>A. pulvericola</i>	Isla Kosrae, Micronesia ^b / Polvo doméstico interior	3.8–4.3	Blanco a amarillo claro	Marrón	Globosa 15–53 µm	5–16.5 x 3.5–7 µm	Ampuliforme 7.5–10 x 2.5–3 µm

Género *Penicillium*

El género fue descrito por Link (1809) bajo el nombre genérico *Penicillium*, que significa 'cepillo'; son hongos comunes que se encuentran en una amplia gama de hábitats, desde el suelo hasta la vegetación, el aire, los ambientes interiores, acuáticos y varios productos alimenticios. Su principal función en la naturaleza es la descomposición de materiales orgánicos, así como la producción de una amplia gama de micotoxinas (citrinina, citreoviridina, etc.), en donde su mayor impacto y reclamo de fama es la producción de penicilina, que revolucionó los enfoques médicos para tratar enfermedades bacterianas (Houbraken *et al.* 2011, Visagie *et al.* 2014a).

En el análisis BLAST, la cepa M2P1–H4 presentó un porcentaje de identidad del 97.52% con *Penicillium sizovae*, neotipo asignado a partir de muestras de suelo en Siria (Houbraken *et al.* 2011); mientras que, en la construcción de las relaciones filogenéticas la cepa M2P1–H4 forma una agrupación (23%) con especies que se han clasificado dentro de la sección *Citrina*

(*P. anaticum*, *P. citrinum*, *P. euglaucum*, *P. katangense* y *P. sizovae*) (Houbraken & Samson 2011, Houbraken *et al.* 2020); de las cuales presenta una menor distancia genética 28S rADN con *P. sizovae* con un valor de 0.009 ($\sigma=0.004$) y forma un nodo interno con una agrupación del 67% (Tabla XII).

La cepa M2P1-H4, así como las especies de la sección *Citrina* y *Penicillium sizovae* son hongos que morfológica y fisiológicamente se caracterizan por la presencia de un conidióforo simétrico biverticilado con estipe liso, las colonias presentan una coloración verde o azul-grisáceo y la presencia de exudados (Houbraken & Samson 2011, Houbraken *et al.* 2020), caracteres que son similares y que no permitieron la delimitación clara de la cepa M2P1-H4 con estas especies (Tabla 12); aunado a que autores como Kwiatkowski *et al.* (2012) y Vu *et al.* (2019) han mencionado un umbral >97% de similitud en el gen 28S rADN para la asignación específica; y debido a la obtención con un bajo valor de homología (67%) la cepa se determinó como *Penicillium* sp. 1.

La cepa M2P3-H7 se caracterizó microscópicamente como una Especie anamorfa, con conidióforo de tipo monoverticiliado, micro-conidios esféricos, fiálides y métulas planas y largas, estipe delgado y alargado, estructuras características del género *Penicillium* (Visagie *et al.* 2014a); por ello se asigna como *Penicillium* sp. 2.

Penicillium sp. 1 y *Penicillium* sp. 2 presentan macroscópicamente, un color similar y microscópicamente puede diferenciarse por la morfología observada en el conidióforo: *Penicillium* sp. 1 presenta un conidióforo ramificado, mientras que en *Penicillium* sp. 2 es de tipo monoverticilado, carácter consistente en agar A1, CZA y PDA.

Tabla 12. Caracteres morfológicos diferenciales entre *Penicillium* sp. 1 (cepa M2P1-H4), *Penicillium* sp. 2 (cepa M2P3-H7) y las especies genéticas más cercanas, cepas inoculadas en agar CZA

Taxón	Referencia	Localidad /Sustrato	Coloración Anverso	Presencia de exudado	Forma y ornamentación del conidióforo
Cepa M2P1-H4	Este estudio	Puerto Ángel Oaxaca/ <i>Pericelis nazahui</i>	Centro verde-grisáceo y periferia blanca	Pequeñas gotitas translúcidas	Biverticilado, con estipes lisos
Cepa M2P3-H7	Este estudio	Puerto Ángel Oaxaca/ <i>Pericelis nazahui</i>	Centro blanca-grisácea, periferia con un halo blanco	No se observaron	Monoverticilado estipe delgado y alargado

<i>P. anatolicum</i>	Houbraken <i>et al.</i> (2011), Stolk (1968)	Turquía/ Suelo	Verde grisáceo	Pequeñas gotas amarillas	Biverticilado, liso con estipes lisos
<i>P. citrinum</i>	Houbraken <i>et al.</i> (2011)	?	Verde grisáceo o verde azulado ocasionalmente	Pequeñas gotas amarillo pálido	Biverticilado o, terverticilado con estipes lisos
<i>P. euglaucum</i>	Houbraken <i>et al.</i> (2011)	Argentina/ Suelo	Azul-gris-verde	Gotas grandes translúcidas o de color amarillo claro	Biverticilado, liso con estipes lisos
<i>P. katangense</i>	Stolk (1968)	Katanga, Zaire, África/ Suelo	Verde grisáceo, centro beige	?	? Biverticilado, liso con estipes lisos
<i>P. sizovae</i>	Houbraken <i>et al.</i> (2011)	Siria/ Suelo	Centro verde-grisáceo y periferia blanca	Pequeñas gotitas translúcidas	Biverticilado, liso con estipes lisos

Género *Simplicillium*

Zare & Gams (2001) establecieron el género *Simplicillium* para agrupar a hongos con presencia de conidióforos postrados. Este género tiene una amplia distribución y presenta un amplio espectro de hospederos (insectos, plantas, royas, nematodos, uñas humanas, caninos, tejidos y hongos) y sustratos (suelo, agua dulce, ambientes marinos y terrestres); aunado a que han demostrado que tiene un alto valor ecológico y económico para el biocontrol y compuestos bioactivos (xilanasas y endoglucanasas) (Wei *et al.* 2019).

En el análisis BLAST, las cepas AMP2–H1 y M2P3–H6 presentaron un porcentaje de identidad del 94.02% con *Simplicillium sympodiophorum*, especie aislada del helecho *Asplenium antiquum*, en Aogashima, isla Izu, Japón (Nonaka *et al.* 2013); en la construcción de las relaciones filogenéticas, AMP2–H1 y M2P3–H6, están estrechamente relacionadas y forman una agrupación de 91%; a su vez ambas cepas forman una agrupación (90%) con *Simplicillium sympodiophorum*. En las secuencias del gen 28S rADN para delimitar especies Kwiatkowski *et al.* (2012) y Vu *et al.* (2019) establecieron un umbral >97% de similitud; por ello y debido al bajo valor de homología (90%) entre las secuencias del presente estudio y la secuencia de la especie previamente establecida las cepas fueron determinadas como *Simplicillium* sp. 1 y *Simplicillium* sp. 2.

Morfológicamente, el arreglo y la constitución de los conidióforos, los conidios y la presencia/ausencia de cristales octaédricos han sido caracteres empleados en la delimitación en algunas de las especies de *Simplicillium* (Nonaka *et al.* 2013, Chen *et al.* 2021); las cepas de

Simplicillium sympodiophorum se han aislado en diferentes medios de cultivos (agar PDA, agar de extracto de malta, agar de papa y zanahoria), en este estudio se empleó el agar AM, M2, A1, CZA y PDA; por lo que sólo se hace mención de las características morfológicas desarrollada en PDA; *Simplicillium sympodiophorum* se desarrolla como una colonia convexa, de 0.28 cm/día de diámetro, micelio aéreo blanco y el reverso blanco-amarillento, conidióforos simpodiales con denticulos e hifas aéreas solitarias, simples y delgadas (20–34 x 0.5–13 µm), conidios ovalados a elipsoidales (2.2–3.5 x 1.0–2.0 µm) y cristales octaédricos presentes (Nonaka *et al.* 2013); *Simplicillium* sp. 1 y *Simplicillium* sp. 2 desarrollan una colonia convexa, de 0.14 cm/días de diámetro, con micelio aéreo blanco y reverso costroso con un gradiente de coloración en tono blanco y marrón, hifas filamentosas no septada (2.2–3.5 x 1.0–2.0 µm) y conidios esféricos (2.2–3.5 x 1.0–2.0 µm), en ambas cepas no se observó el arreglo particular de los conidióforos, ni cristales octaédricos. En el agar A1 *Simplicillium* sp. 1 se desarrolla como una especie anamorfa, mientras que *Simplicillium* sp. 2 se desarrolla como una especie teleomorfa con la presencia basidiósporas razón por la cual en el presente estudio se consideran como cepas diferentes.

Orden Xylariales

En el análisis BLAST, la cepa M2P2-H2 está relacionada molecularmente con miembros de siete familias del orden Xylariales (Apiosporaceae, Cainiaceae, Coniocessiaceae, Leptosilliaceae, Microdochiaceae, Sporocadaceae y Xylariaceae); a partir de este análisis (98.71%) y con la construcción de las relaciones filogenéticas (81% de homología) la cepa está relacionada con *Atrotriquata spartii* (Fig. 27).

El género *Atrotriquata* fue establecido por Kohlmeyer y Volkmann-Kohlmeyer (1993) e incluye dos especies *A. lineata* y *A. spartii*, caracterizadas por la presencia de ascomas (estado teleomorfo) (Liu *et al.* 2015); el género se incluye en la familia Cainiaceae, la cual actualmente se compone de ocho géneros (*Alishanica*, *Amphibambusa*, *Arecophila*, *Atrotriquata*, *Cainia*, *Endocalyx*, *Longiappendispora* y *Seynesia*). Konta *et al.* (2021) menciona que los géneros *Cainia* (fungi con conidióforos fusiformes y ascosporas) y *Endocalyx* (fungi con conidióforos unicelulares, elipsoides-globosos con apertura ostiolar) presentan colonias con desarrollo

anamórfico; sin embargo, de acuerdo a la definición y observaciones de Liu *et al.* (2015) la presencia de ascosporas y ostiolo corresponde a un desarrollo teleomorfo de la colonia, por lo que se sugiere una mayor revisión y caracterización de las estructuras mencionadas.

Atrotorquata spartii, se ha descrito como saprofito del arbusto *Spartium junceum*, a partir de muestras recolectadas en la provincia de Rimini, Italia y de acuerdo a Hanan Alipi *et al.* (2021) *Spartium junceum* se considera una especie exótica en México). En el hongo *A. spartii*, las características morfológicas han sido descritas a partir de su morfo sexual cultivado en PDA (presencia de peridio, ostiolo, ascosporas) y hasta la fecha se desconoce su morfo asexual (Liu *et al.* 2015). La cepa M2P2–H2 fue cultivada en agar M2, CZA y en PDA; en el cual se observaron conidióforos cilíndricos ramificados con vesículas terminales, sostenidas por un estipe delgado y en algunos casos clamidospora (estas últimas sólo observadas en PDA) que de acuerdo a Boesewinkel (1982) y Lombard *et al.* (2012) son estructuras asexuales; por ello y aunado a la poca resolución genética (debido a la escasa disponibilidad de información del gen 28S para los géneros y especies) de la familia Cainiaceae, la cepa fue establecida como Xylariales sp. 1.

Aunque en el presente estudio se emplearon métodos morfológicos y moleculares para la identificación de las especies aisladas, en su conjunto estas no permitieron la definición específica de las cepas; por lo que, se sugiere la implementación de otras herramientas (bioquímicas y fisiológicas) para la delimitación específicas de las cepas aisladas, tal como es el caso los estudios de perfiles de los metabolitos secundarios (*e.g.*, la presencia/ausencia y composición de las micotoxinas en las especies *Aspergillus*) que han sido útiles para desentrañar y delimitar especies morfológica y genéticamente similares, y con ello utilizar el concepto de especie polifásica (Visagie *et al.* 2014a).

9.2. Características ambientales del área de estudio y de crecimiento de las colonias (salinidad y temperatura)

Los resultados moleculares evidenciaron que el microbioma aislado de *Pericelis nazahui* está relacionado con contrapartes terrestres. Los microorganismos de procedencia continental pueden ser trasladados a las zonas marinas por el viento, la interacción océano-atmosfera, lluvias

y escorrentías terrestres (Mendoza-Amézquita *et al.* 2017, Alsante *et al.* 2021, Lang-Yona *et al.* 2022) y posteriormente pueden habitar la región planctónica (Hassetta *et al.* 2020), el sedimento o estar presentes en plantas, algas y/o animales (Pita *et al.* 2018). Dado que la toma de muestra se realizó en la época de secas y vientos tehuanos (Tapia-García *et al.* 2007, Chapa-Balcorta *et al.* 2015), se considera que las causas probables de transporte y diseminación de los microorganismos es el viento, la interacción aire-mar y en menor medida el aporte de pequeñas escorrentías permanentes de aguas residuales de la zona.

Los microorganismos se encuentran en el medio marino como esporas o como estructuras activas (en bacterias: células; en hongos: micelios vegetativos) (Kis-Papo *et al.* 2003) ya sea de forma libre o en simbiosis (Rizzo & Giudice 2018, Hassetta *et al.* 2020). Las esporas actúan como el medio principal de propagación y se mantienen en estado latente hasta que las condiciones ambientales sean favorables para su desarrollo (Kis-Papo *et al.* 2003, Oren & Gunde-Cimerman 2012). Las estructuras activas sintetizan osmolitos orgánicos (en bacterias: glicina, glutamato; en hongos: glicerol, manitol) para contrarrestar y como respuesta al estrés osmótico y térmico del hábitat donde se encuentran (Prasannarai & Sridhar 2001, Ferreira *et al.* 2005, Zuluaga-Montero *et al.* 2010, Tijerina-Ramírez *et al.* 2014, Yew *et al.* 2016).

La latencia, germinación y el crecimiento de los microorganismos se ha relacionado con niveles bajos de salinidad, influenciados principalmente por la entrada de agua dulce al sistema (Kis-Papo *et al.* 2003, Oren & Gunde-Cimerman 2012). Durante el muestreo (marzo, 2020) el área de estudio presentó una salinidad de 35 UPS; mientras que las salinidades inferiores (34.5 UPS) en esta zona están influenciada por la época de lluvias, donde recibe aporte de agua dulce de las descargas de lluvias (mayo-noviembre), arroyos y/o el vertido de aguas residuales predominantes en este periodo (Huante-González 1997, Tapia-García *et al.* 2007, Zuluaga-Montero *et al.* 2010, Mendoza-Amézquita *et al.* 2017).

En el sistema marino es de suma importancia considerar los efectos interactivos (aditivos, sinérgicos o antagónicos) para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos y su hospedero (Ein-Gil *et al.* 2009, Paulino *et al.* 2019), y aunque la estructura y distribución de la comunidad microbiana, es afectada por diversos factores (*e.g.*, sustrato, nutrientes, pH, calidad del agua) (Eiler *et al.* 2012), la temperatura (T°) y la salinidad (S) son las que juegan un papel central en la composición, distribución y crecimiento de las especies microbianas (Jones

et al. 2022). Durante el muestreo el área de estudio presentó una $T^{\circ}=28.5^{\circ}\text{C}$, una $S=35$ UPS y un $\text{pH}=8.5$ unidades, valores que se mantuvieron en el intervalo registrado ($T^{\circ}=20.2\text{--}31.7^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7.78\text{--}8.49$ unidades, $S=30.91\text{--}35.0$ UPS) en la bahía de Puerto Ángel y playas adyacentes a esta zona costera por Figueroa-Zavala (2007), Huante-González *et al.* (2018) y Hueytletl-Pérez *et al.* (2018).

La evaluación del crecimiento a diferentes temperaturas en condiciones de laboratorio permite observar los cambios morfológicos (*e.g.*, surcos radiales, la presencia de estructuras de resistencia, coloración), que son biológicamente importantes para la comprensión de la propagación, persistencia, la proliferación y la patogenicidad del microbioma que puede desarrollarse en ambientes con temperaturas inferiores o superiores a la temperatura óptima de crecimiento (Verant *et al.* 2012).

En este estudio la evaluación del crecimiento a diferentes temperaturas, mostró que las cepas que presentaron mayor biomasa y/o tasa de crecimiento a 28°C fueron las especies bacterianas *Paracoccus* sp. 1, *Streptomyces* sp. 2, y los hongos *Cladosporium* sp. 1, *Simplicillium* sp. 1 y Xylariales sp. 1; lo cual pudiese ser indicativo de que se encuentran adecuadas al ambiente en el que se distribuye *Pericelis nazahui* (Ramos-Sánchez *et al.* 2020). Las cepas restantes como *Nocardiopsis* sp. 1, *Streptomyces* sp. 1 y *Streptomyces* sp. 3 presentaron una mayor biomasa a 30°C ; valores que se encuentran dentro de la temperatura óptima de crecimiento establecidos por Holt *et al.* (1994) y Chen *et al.* (2008) para el género *Nocardiopsis* ($T^{\circ}=10\text{--}45^{\circ}\text{C}$), así como Phongsopitanun *et al.* (2014) y Edwards & Ball (1987) para los *Streptomyces* ($T^{\circ}=25\text{--}58^{\circ}\text{C}$).

En las tres temperaturas evaluadas, *Aspergillus* sp. 1, presentó esclerocios (agregados compactos de hifas pigmentadas) (Fig. 18D), estructuras relacionadas con la producción de aflatoxinas y ácido ciclopiazónico (Pérez Ramírez & Sánchez Espinosa 2020); de acuerdo a Smith *et al.* (2014), son estructuras fúngicas de resistencia y propagación que ayudan a la sobrevivencia del hongo en condiciones desfavorables (*e.g.*, estrés, temperaturas bajas, desecación, ataque microbiano y largos periodos sin hospedero) y que le permiten permanecer latentes durante largos períodos de tiempo. Aunque *Aspergillus* sp. 1 presentó la mayor tasa de crecimiento a 30°C , consideramos que su desarrollo óptimo podría encontrarse a temperaturas mayores.

Cladosporium, es un género considerado ubicuo, presenta una amplia tolerancia a las condiciones ambientales (Jones *et al.* 1964, Jones *et al.* 2022); sin embargo, se ha mencionado que para algunas especies el intervalo de temperatura óptima va de 20–30°C (Aihara *et al.* 2002), mientras que Kawai *et al.* (1990) establecieron 25°C como la temperatura óptima de crecimiento, el cual decae a 30–40°C; nuestro estudio difiere con este autor, ya que, *Cladosporium* sp. 1 no presentó crecimiento a 25 y 30°C, y sólo se desarrolló a una temperatura de 28°C.

Penicillium sp. 1 y *Penicillium* sp. 2, presentaron una tasa máxima de crecimiento a 25°C, exudados translúcidos (*Penicillium* sp. 1), surcos radiales a 25 y 30°C, y cambios de coloración en las tres temperaturas evaluadas; los cuales son considerados mecanismos de respuestas al estrés (Verant *et al.* 2012, Tannous *et al.* 2015), por lo que se recomienda ampliar el intervalo de esta variable para determinar la temperatura óptima de crecimiento de estos aislados.

Para el género *Simplicillium* no se tienen registros previos de la temperatura de crecimiento óptimo y tampoco para los miembros del orden Xylariales, por lo que los datos del presente estudio, son registros importantes para el conocimiento de estos taxones. *Simplicillium* sp. 1 presentó una tasa máxima de crecimiento a 28°C y *Simplicillium* sp. 2 a 25°C, tasa que decae para ambas cepas a 30°C; la cepa Xylariales sp. 1 presentó una tasa máxima de crecimiento a 28°C.

La evaluación del crecimiento de las cepas aisladas en diferente salinidad (0 y 35 UPS), sugiere que la microbiota presente en *Pericelis nazahui* es tolerante a esta variable, y que podría contar con una amplia tolerancia a las variaciones de esta (*e.g.* ciclos de mareas, estacionalidad lluvias-secas), indicativo de una adaptación al ambiente marino (Meyers & Simms 1965, Jones *et al.* 2022); sin embargo, Jones & Jennings (1964) advirtieron que una simple comparación del crecimiento de la microbiota en medios diluidos en agua destilada y agua de mar no proporciona una imagen completa del crecimiento de estos en condiciones salinas; por ello, se recomienda seguir evaluando esta variable a diferentes intervalos de salinidad.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la biomasa y el crecimiento de las cepas aisladas en este estudio no responden a una temperatura específica evaluada; sin embargo, determinar y

caracterizar el efecto de la temperatura y salinidad en la comunidades microbianas, resulta ser primordial para entender las posibles adaptaciones fisiológicas y morfológicas, que les permiten adecuarse a las condiciones imperantes en el medio en cual se desarrollan y sobre todo de aquellas especies con potencial patógeno; ya que se ha señalado que ambas variables propicia un cambio estructural (morfológico, fisiológico y sexual) y son tendientes a reducir o potencializar el crecimiento y la patogenicidad de microorganismos causantes de enfermedades (Ferreira *et al.* 2005, Jones *et al.* 2022).

Los géneros *Nocardiosis*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* y *Simplicillium* son considerados patógenos oportunistas en ambientes marinos, pueden sobrevivir en el medio circundante o dentro de organismos sanos o enfermos (Ein-Gil *et al.* 2009) y forman parte de la microbiota de *Pericelis nazahui*, que habita en ambientes coralinos (Ramos-Sánchez *et al.* 2020). La patogenicidad que estos tienden a desarrollar, se ha considerado que está determinada por estresores ambientales (anomalías térmicas, pH ácidos) o por eutrofización (aumento de la concentración de nitrógeno y fósforo) (Piontek *et al.* 2010, Shi *et al.* 2010, Krause *et al.* 2012). En el presente estudio, solo cuatro de los doce microorganismos aislados desarrollaron la presencia de esclerocios (*Aspergillus* sp. 1), surcos radiales (*Penicillium* sp. 1 y *Penicillium* sp. 2) y exudados (*Cladosporium* sp. 1, *Penicillium* sp. 1), estructuras y secreciones relacionadas en respuesta al estrés y posible producción de toxinas.

En cuanto a la presencia de nutrientes en el área de estudio, con excepción del valor de NH_4^+ (0.257 μM), los valores de PO_4^{-3} (0.013 μM), NO_3^- (0.15 μM) y NO_2^- (0.00065 μM), son menores que los registrados por Hueytletl-Pérez *et al.* (2018) [PO_4^{-3} (1.0-3.5 μM) y ($\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$) (9.5-13.5 μM)] en la misma época (secas y vientos tehuanos) para la bahía de Puerto Ángel. Considerando estos valores, el ambiente en que se encontró a *Pericelis nazahui* se clasifica como un ambiente oligotrófico (Lluch-Cota *et al.* 1997, Thunell & Kepple 2004), por lo que se piensa que los microorganismos aislados, no se encontraban en un ambiente eutrofizado y en combinación con la salinidad y la temperatura, no han desarrollado condiciones de patogenicidad; ya que la baja disponibilidad de nutrientes, la salinidad y temperatura propician un cambio biológico (morfológico, fisiológico y reproductivo), retrasan el crecimiento y reducen la patogenicidad de los microorganismos causantes de enfermedades,

pues esta energía la emplean en el mantenimiento de la turgencia celular (Ferreira *et al.* 2005, Jones *et al.* 2022).

9.3 Aspectos ecológicos

Los microorganismos en asociación con plantas y/o animales, han desarrollado adaptaciones especializadas, estables y específicas al microambiente creado por el organismo hospedero (Pita *et al.* 2018). La presencia de estos en metazoarios marinos puede darse por tres vías, por 1) adquisición horizontal del ambiente, 2) adquisición vertical por herencia parental o 3) a través de una combinación de ambos mecanismos (Webster 2014); estos viven adheridos a la superficie o dentro de los tejidos, por adhesión en las biopelículas generadas por los hospederos.

Debido a que los aislamientos recuperados de *Pericelis nazahui*, molecularmente están relacionados con contrapartes terrestres y como un primer acercamiento al entendimiento de la presencia de la microbiota en este gusano, consideramos que la presencia de estos microorganismos se da por adquisición horizontal (especialmente en las cepas de los géneros *Simplicillium* y *Penicillium*, ya que fueron recuperadas de organismos con y sin lavado previo y de *Nocardiopsis* género bacteriano asociada a la producción de TTX), ya que, consideramos que la microbiota se adhiere al moco que estos secretan; el cual en los platelmintos y en otros organismos (*e.g.*, corales, poliquetos) es esencial para procesos vitales como la captura de sus presas, el desplazamiento y la defensa contra múltiples estresores ambientales (Hyman 1951, Ritchie & Smith 2004); y que constituye un microhábitat y un recurso para el crecimiento de una comunidad diversa de microorganismos, que generalmente es benéfica pero que también puede ser patógena (Alain *et al.* 2002, Wilden *et al.* 2019).

Se ha informado que los géneros bacterianos *Nocardiopsis*, *Paracoccus* y *Streptomyces* se asocian con una gran diversidad de invertebrados marinos, incluidos poríferos, policládidos, cnidarios, moluscos, anélidos, crustáceos y equinodermos (Chen *et al.* 2011, Zhang *et al.* 2014, Bennur *et al.* 2015, Braña *et al.* 2015, Mahmoud & Kalendar 2016, Leinberger *et al.* 2021) y son organismos versátiles adaptados a hábitats acuáticos y terrestres; sin embargo, aunque se distribuyen de forma ubicua (Chen *et al.* 2011, Xue *et al.* 2017, Kim *et al.* 2018), el papel funcional de estos géneros no está del todo claro. Sus roles sugeridos van desde un simbiote

beneficioso requerido para el funcionamiento saludable del huésped, hasta un patógeno que puede causar rápidamente la muerte.

Los roles que juegan las bacterias presentes en dos especies de policládidos (incluyendo este estudio) aún están inexplorados y sólo se han evidenciado algunos aspectos de estas relaciones. Lin *et al.* (2017a,b), a partir del uso de herramientas moleculares, registraron 101 especies de bacterias en el policládido *Paraplanocera* sp. 1; dada la capacidad de estas bacterias para la síntesis de vitaminas, antibióticos y pigmentos, los autores infieren que pueden estar involucradas en procesos de defensa, inmunidad y desarrollo del gusano; asimismo consideraron que la bacteria *Deinococcus planocerae* puede presentar resistencia extrema a los rayos ultravioleta, luz, radiación *gamma* y desecación, sugiriendo una función para mejorar la supervivencia del policládido *Paraplanocera* sp. 1 que habita en ambientes someros (Lin *et al.* 2017b).

En este estudio se aisló una cepa del género *Nocardiopsis*, relacionada molecularmente con *N. dassonvillei*, especie patógena oportunista en humanos (Bennur *et al.* 2015) y productora de la neurotoxina llamada tetrodotoxina (TTX) (Wu *et al.* 2005); la bacteria se ha aislado de muestras de suelo, granos enmohecidos, material clínico de origen animal y humano (Meyer 1976), así como en esponjas marinas (Bennur *et al.* 2015) y en el ovario del pez globo *Takifugu rubripes* (Wu *et al.* 2005).

Aún se debate si la TTX y sus análogos son producidos por múltiples organismos eucariotas, bioacumulados a lo largo de la cadena alimentaria o adquiridos de simbiontes bacterianos (Ritson-Williams *et al.* 2006); en los policládidos *Planocera multitentaculata* (Miyazawa *et al.* 1987), *P. reticulata* (Tanu *et al.* 2004), *Prosthiostomum trilineatum* (Suo *et al.* 2021), *Planocera* sp. (Ritson-Williams *et al.* 2006) y *Stylochoplana* sp. (Salvitti *et al.* 2015) se han registrado altas concentraciones de TTX, y se consideran especies responsables de la transferencia de esta toxina a organismos superiores, tal como se ha demostrado en *Pleurobranchaea maculata* y *Takifugu alboplumbeus* que adquiere la toxina después de alimentarse de organismos adultos, larvas y puestas de huevos de *Planocera multitentaculata* (Yamada *et al.* 2017, Okabe *et al.* 2019; Suo *et al.* 2021).

En el presente estudio, a partir de la presencia de una cepa del género *Nocardiopsis* en *Pericelis nazahui*; se considera que la cepa podría estar involucrada en la síntesis de la TTX y que *Pericelis nazahui* pudiese utilizarla en el proceso de alimentación, como un mecanismo para capturar sus presas y en la protección de las puestas de huevos, tal como se ha documentado en *Planoceridae* sp. 1 (Ritson-Williams *et al.* 2006) y en *Planocera multitentaculata* (Suo *et al.* 2021).

Este estudio es el primer trabajo en registrar la asociación entre hongos y policládidos; los géneros fúngicos del microbioma aislado de *Pericelis nazahui* (*e.g.*, *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Penicillium*), son considerados patógenos oportunistas de corales blandos y escleractineos, causante de enfermedades como la aspergilosis (*e.g.*, *A. sydowii*) (Alker *et al.* 2001, Zuluaga-Montero *et al.* 2010, Lee *et al.* 2020), la banda marrón (*e.g.*, *Cladosporium* sp., *Penicillium citrinum*), patógenos y toxigénicos del molusco bivalvo *Modiolus modiolus* (Zvereva & Vysotskaya 2005) (*e.g.*, *Cladosporium*).

Mientras que el género *Simplicillium* se ha registrado asociado a corales blandos del género *Sinularia* (Dai *et al.* 2018); sin embargo, aún se desconoce su relación; el género de hongo es considerado parásito de mamíferos y plantas, entomopatógeno, fungicida, nematófago y micoparásito (Chen *et al.* 2021); y se ha demostrado que el género realiza un salto de hospedero entre reinos (planta-animal-hongos) de acuerdo a sus requerimientos nutricionales influidos por el ambiente (*e.g.* estrés, patógenos compatibles, similitudes fisiológicas y contacto frecuente con el organismo hospedero) (Spatafora *et al.* 2007, Chen *et al.* 2019, Thines 2019).

En el Pacífico mexicano, no hay registros de corales impactados por enfermedades microbianas, Rodríguez-Villalobos *et al.* (2014) sugirieron que las lesiones que se observan en algunos miembros del género *Pocillopora* se deben a la decoloración y pérdida de tejido inducida por depredación y sobrecrecimiento de esponjas o algas; por su parte Reyes-Bonilla *et al.* (2002) mencionaron que las comunidades coralinas de la región se recuperan rápidamente de eventos naturales como El Niño (ENSO), aún en áreas con alta mortalidad; sin embargo, autores como Galloway *et al.* (2009) han mencionado que los arrecifes coralinos del Pacífico están en una trayectoria de degradación similar a la experimentada en la región del Caribe y que la proliferación de enfermedades en arrecifes de coral es signo de una enfermedad ambiental del océano.

Aunque se necesita un enfoque holístico del ecosistema microbiano y el entendimiento de los roles que establecen con *Pericelis nazahui*, se piensa que este policládido podría fungir como vector de microorganismos patógenos (*e.g.*, *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Penicillium*) dentro de los arrecifes coralinos formados por el género *Pocillopora*, en donde comúnmente habita este gusano béntico (Ramos-Sánchez *et al.* 2020); tal como lo han señalado Ainsworth *et al.* (2020), para la fauna intersticial o béntica (*e.g.*, peces criptobénticos, caracoles, gusanos) quienes pueden fungir como reservorios o vectores de enfermedades, introduciendo nuevos agentes microbianos en el microbioma del coral, o permitir la colonización microbiana de los corales a través de las heridas; tal como lo han sugerido Sussman *et al.* (2003) con respecto al gusano de fuego *Hermodice carunculata*, que funge como un importante reservorio de *Vibrio shiloi* durante el invierno y un transmisor y vector del patógeno en la primavera, cuando las temperaturas del agua son cálidas y el gusano comienza a alimentarse del coral *Oculina patagonica*; o el caso del caracol *Cryphoma gibbosum*, quien actúa como vector de la aspergilosis en octocorales de manera directa a través de la depredación de colonias sanas y enfermas, y de forma indirecta a través de la excreción de heces que contiene de hifas y esporas de organismos fúngicos; aunada a que el caracol los utiliza como sustratos para las puestas de huevos (Rypien & Baker 2009).

Finalmente, este proyecto de investigación arroja los primeros resultados de la comunidad microbiana presente el policládido *Pericelis nazahui*, gusano bentónico asociado a comunidades coralinas del género *Pocillopora*; resultados que contribuyen al conocimiento de la comunidad bacteriana y fúngica en la costa central de Oaxaca; sientan las bases para la continuidad de futuras investigaciones enfocadas en el monitoreo de las comunidades microbianas en los sistemas arrecifales, sus posibles fuentes de entradas de la microbiota en zonas costeras, la composición de las comunidades en la temporada de secas-lluvias, la caracterización de metabolitos secundarios y la comprender las posibles funciones de estos microorganismos en el ambiente marino y las interacciones establecidas con los invertebrados marino móviles.

10. Conclusiones

- Se aislaron y purificaron un total de 12 cepas; siete cepas presentaron una morfología correspondiente al reino Fungi y cinco al dominio Bacteria.
- De los tres ejemplares de *Pericelis nazahui* empleados, se obtuvieron seis cepas para *P. nazahui* No. 2, cuatro cepas *P. nazahui* No. 3 y dos cepas para *P. nazahui* No. 1.
- Con el análisis molecular se determinaron los géneros bacterianos *Nocardiopsis*, *Paracoccus* y *Streptomyces*, y los géneros fúngicos *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Simplicillium* y un miembro del orden Xylariales.
- Con base en un análisis molecular y morfológico se determinaron 12 especies de cepas indescritas: *Nocardiopsis* sp. 1, *Paracoccus* sp. 1 y *Streptomyces* sp. 1, *Streptomyces* sp. 2 y *Streptomyces* sp. 3; y siete especies fúngicas *Aspergillus* sp. 1, *Cladosporium* sp. 1, *Penicillium* sp. 1, *Penicillium* sp. 2, *Simplicillium* sp. 1, *Simplicillium* sp. 2 y Xylariales sp. 1.
- Se confirmó la presencia de los géneros *Streptomyces* y *Paracoccus* en policládidos.
- Se registró por primera vez la presencia del género *Nocardiopsis* en policládidos.
- Este estudio es el primer trabajo en registrar la presencia de hongos en policládidos, siendo también el primer registro en invertebrados marinos de Oaxaca.
- La microbiota registrada en este estudio se desarrolló tanto en ambientes con salinidad de 35 UPS, como en nula de salinidad 0 UPS.
- Se considera que *Pericelis nazahui* podría fungir como vector de microorganismos patógenos (*e.g.*, *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Penicillium*) dentro de los arrecifes coralinos formados por el género *Pocillopora*.

11. Referencias

- Aihara, M., T. Tanaka, T. Ohta & K. Takatori. 2002. Effect of temperature and water activity on the growth of *Cladosporium sphaerospermum* and *Cladosporium cladosporioides*. *Biocontrol Science* 7(3):193–196.
- Alain, K., M. Olagnon, D. Desbruyères, A. Pagé, G. Barbier, S.K. Juniper, J. Quérellou & M-A. Cambon-Bonavita. 2002. Phylogenetic characterization of the bacterial assemblage associated with mucous secretions of the hydrothermal vent polychaete *Paralvinella palmiformis*. *FEMS Microbiology Ecology* 42(3):463–476.

- Alker, A.P., G.W. Smith & K. Kim. 2001. Characterization of *Aspergillus sydowii* (Thom et Church), a fungal pathogen of Caribbean Sea fan corals. *Hydrobiologia* 460:105–111.
- Alsante, A.N., D.C.O. Thornton & S.D. Brooks. 2021. Ocean Aerobiology. *Frontiers in Microbiology*. 12 (764178):1–21.
- Ainsworth, T.D., J.J. Renzi & B.R. Silliman. 2020. Positive interactions in the coral macro and microbiome. *Trends in Microbiology* 28(8):602–604.
- Aprill, A. 2017. Marine animal microbiomes: Toward understanding host-microbiome interactions in a changing ocean. *Frontiers in Marine Science* 4:222.
- Barrero-Canosa, J., L.F. Dueñas & J.A. Sánchez. 2013. Isolation of potential fungal pathogens in gorgonian corals at the Tropical Eastern Pacific. *Coral Reefs* 32:35–41.
- Becerril-Espinosa, A., C.K. Freel, P.R. Jensen & I.E. Soria-Mercado. 2013. Marine Actinobacteria from the Gulf of California: diversity, abundance and secondary metabolite biosynthetic potential. *Journal Microbiology Anton van Leeuwenhoek* 103:809–819.
- Beau, F., C. Bollet, T. Coton, E. Garnotel & M. Drancourt. 1999. Molecular identification of a *Nocardiosis dassonvillei* blood isolate. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (10):3366–3368.
- Bennur, T., A.R. Kumar, S. Zinjarde & V. Javdekar. 2015. *Nocardiosis* species: Incidence, ecological roles and adaptations. *Microbiological Research* 174:33–47.
- Bensch, K., U. Braun, J.Z. Groenewald & P.W. Crous. 2012. The genus *Cladosporium*. *Studies in Mycology* 72:1–40.
- Bensch, K., J.Z. Groenewald, U. Braun, J. Dijksterhuis, M.J. Yáñez-Morales & P.W. Crous. 2015. Common but different: The expanding realm of *Cladosporium*. *Studies in Mycology* 82:23–74.
- Bensch, K., J.Z. Groenewald, J. Dijksterhuis, M. Starink-Willemse, B. Andersen, M. Starink-Willemse, B. Andersen, B.A. Summerell, H.D. Shin, F.M. Dugan, H.-J. Schroers, U. Braun & P.W. Crous. 2010. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). *Studies in Mycology* 67:1–94.
- Boege, K. & E. del Val. 2011. Bichos vemos relaciones no sabemos. *Diversidad e importancia de las interacciones bióticas. Ciencias* (102):5–11.
- Boesewinkel, H.J. 1982. *Cylindrocladiella*, a new genus to accommodate *Cylindrocladium parvum* and other small pored species of *Cylindrocladium*. *National Research Council of Canada* 60 (11):2288–2294.
- Bonnaud, L., P.G. Rodhouse & R. Boucher-Rodoni. 1998. A phylogenetic study of the squid family Onychoteuthidae (Cephalopoda: Oegopsida). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 265(1407):1761–1770.
- Bonthond, G., D.G. Merselis, K.E. Dougan, T. Graff, W. Todd, J.W. Fourqurean & M. Rodriguez-Lanetty. 2018. Inter-domain microbial diversity within the coral holobiont *Siderastrea siderea* from two depth habitats. *PeerJ* 6:e4323: 1–25.

- Braña, A.F., H-P. Fiedler, H. Nava, V. González, A. Sarmiento-Vizcaíno, A. Molina, J. L. Acuña, L.A. García & G. Blanco. 2015. Two *Streptomyces* species producing antibiotic, antitumor, and anti-inflammatory compounds are widespread among intertidal macroalgae and deep-sea coral reef invertebrates from the Central Cantabrian Sea. *Environmental Microbiology* 69:512–524.
- Buck, J.D. 1982. Nonstaining (KOH) method for determination of gram reactions of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 44 (4):992–993.
- Castañeda Briones, M.T. 2004. *Microbiología aplicada manual de laboratorio. Básicas*, Universidad Autónoma Metropolitana. 240 pp.
- Chapa-Balcorta, C., J.M. Hernández-Ayón, R. Durazo, E. Beier, S.R. Alin & Andrés López-Pérez. 2015. Influence of post-Tehuano oceanographic processes in the dynamics of the CO₂ system in the Gulf of Tehuantepec, Mexico. *Journal of Geophysical Research: Oceans* 120 (12):7752–7770.
- Chen, Y-G., X-L Cui, R.M. Kroppenstedt, E. Stackebrandt, M-L Wen, L-H Xu & C-L Jiang. 2008. *Nocardioopsis quinghaiensis* sp. nov., isolated from saline soil in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58 (3):699–705.
- Chen, W-H., C. Liu, Y-F. Han, J-D. Liang, W-Y. Tian & Z-Q. Liang. 2019. Three novel insect-associated species of *Simplicillium* (Cordycipitaceae, Hypocreales) from Southwest China. *MycologyKeys* 58:83–102.
- Chen, W.H., Y.F. Han, J.D. Liang & Z.Q. Liang. 2021. Taxonomic and phylogenetic characterizations reveal four new species of *Simplicillium* (Cordycipitaceae, Hypocreales) from Guizhou, China. *Scientific Reports*. 11(15300):1–12.
- Chen, M-H., S-Y. Shue, C.A. Chen, J-T. Wang. & W-M. Chen. 2011. *Paracoccus isopora* sp. nov., isolated from the reef-building coral *Isopora palifera*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61:1138–1143.
- Lluch-Cota S.E., S. Álvarez-Borrego, E. Santamaría del Ángel, F.E. Müller Karger & S. Hernández-Vázquez. 1997. The Gulf of Tehuantepec and adjacent areas: Spatial and temporal variation of satellite-derived photosynthetic pigments. *Ciencias Marinas* 23:329–340.
- Costa Leal, M., C. Sheridan, R. Osinga, G. Dionisio, R.J. Miranda Rocha, B.R. Rosa & R. Calado. 2014. Marine microorganism-invertebrate assemblages: perspectives to solve the “supply problem” in the initial steps of drug discovery. *Marine Drugs* 12(7):3929–3952.
- Curtis, T.P., W.T. Sloan & J.W. Scannell. 2002. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:10494–10499.
- Dai, Y., Y. Lin, X. Pang, X. Luo, L. Salendra, J. Wang, X. Zhou, Y. Lu, Bin Yang & Y. Liu. 2018. Peptides from the soft coral-associated fungus *Simplicillium* sp. SCSIO41209. *Phytochemistry* 154:56–62.
- de la Cruz-Leyva, M.C., M. Zamudio-Maya, A.I. Corona-Cruz, J.U. González-de la Cruz & R.A. Rojas-Herrera. 2014. Importancia y estudios de las comunidades microbianas en

- los recursos y productos pesqueros. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 2(4):99–115.
- Davolos, D., A.M. Persiani, B. Pietrangeli, A. Ricelli & O. Maggi. 2012. *Aspergillus affinis* sp. nov., a novel ochratoxin A-producing *Aspergillus* species (section *Circumdati*) isolated from decomposing leaves. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62:1007–1015.
- Dimijian, G.G. 2000. Evolving together: the biology of symbiosis, part 1. *Baylor University Medical Center Proceedings* 13:217–226.
- Eberl, G. 2010. A new vision of immunity: homeostasis of the superorganism. *Mucosal Immunol* 3(5):450–60.
- Edwards, C. & A.S. Ball. 1987. Respiratory chain composition and activity in some thermotolerant *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Letters* 40:61–66.
- Ein-Gil, N., M. Ilan, S. Carmeli, G.S. Smith, J.R. Pawlik & O. Yarden. 2009. Presence of *Aspergillus sydowii*, a pathogen of gorgonian sea fans in the marine sponge *Spongia obscura*. *The ISME Journal* 3:752–755.
- Eiler, A., H. Friederike & S. Bertilsson. 2012. Coherent dynamics and association networks among lake bacterioplankton taxa. *International Society for Microbial Ecology* 6:330–342.
- Egan, S., T. Thomas, & S. Kjelleberg. 2008. Unlocking the diversity and biotechnological potential of marine surface associated microbial communities. *Current Opinion in Microbiology* 11:219–225.
- Egan, S. & M. Gardiner. 2016. Microbial dysbiosis: rethinking disease in marine ecosystems. *Frontiers in Microbiology* 7:991.
- Espino-Barrera, L., H. Serrano-Posada & S. Centeno-Leija. 2021. *Streptomyces*: “La vieja confiable”. *Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.* 13:36–44.
- Faubel, A. 1983. The Polycladida, Turbellaria proposal and establishment of a new system part I. The Acotylea. *Mitteilungen des hamburgischen zoologischen Museums und Instituts* 80:17–121.
- Faubel, A. 1984a. On the geographical occurrence of pelagic polyclad turbellarians. *Cahiers de Biologie Marine* 25:153–168.
- Faubel, A., R. Sluys & D G. Reid. 2007. A new genus and species of polyclad flatworm found in the mantle cavities of gastropod mollusks in the high-intertidal zone of the Pacific coast of Central America. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 87:429–434.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791.
- Ferreira, C., F. van Voorst, A. Martins, L. Neves, R. Oliveira, M.C. Kielland-Brandt, C., Lucas & A. Brandt. 2005. A member of the sugar transporter family, Stl1p is the glycerol/H⁺ symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*. 16 (4):2068–76.

- Fiedler, P.C. & L.D. Talley. 2006. Hydrography of the eastern tropical Pacific: A review. *Progress in Oceanography* 69:143–180.
- Figuroa-Zavala, B. 2007. Contaminación de origen fecal en el corredor costero Barra de Tonameca-bahía de Puerto Ángel, La Mina, Oaxaca, México. *Ciencia y Mar* 11 (33):15–28.
- Fischer, A., M.R.M. Kroppenstedt & E. Stackebrandt. 1983. Molecular-genetic and chemotaxonomic studies on *Actinomdura* and *Nocardiosis*. *Journal of General Microbiology* 129:3433–3446.
- Flórez, L.V., P.H. Biedermann, T. Engl & M. Kaltenpoth. 2015. Defensive symbioses of animals with prokaryotic and eukaryotic microorganisms. *Natural Product Reports* 32(7):904–36.
- Franco-Monsreal, F., E.B. Lara-Zaragoza, N. Villa-Ruano, L. Mota-Magaña, J.R. Hernández-Gómez & L.E.S. Serralta-Peraza. 2016. *Aeromonas hydrophila* en alimentos marinos de origen animal de establecimientos de Puerto Ángel, Oaxaca, México. *Revista salud Quintana Roo* 9 (33):4–10.
- Furbino, L.U., F.M. Pellizzari, P.C. Neto, C.A. Rosa & L.H. Rosa. 2018. Isolation of fungi associated with macroalgae from maritime Antarctica and their production of agarolytic and carrageenolytic activities. *Polar Biology* 41:527–535.
- Galloway, S.B., A.W. Bruckner & C.M. Woodley. 2009. Coral health and disease in the Pacific: Vision for Action. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 97 and CRCP 7. National Oceanic and Atmospheric Administration, Silver Spring, MD 314pp.
- Gil-Agudelo, D.L., R. Navas-Camacho, A. Rodríguez-Ramírez, M.C. Reyes-Nivia, S. Bejarano, J. Garzón-Ferreira & G.W. Smith. 2009. Enfermedades coralinas y su investigación en los arrecifes colombianos. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras* 38 (2):189–224.
- Gómez-Archila, L.G., M.T. Rugeles & W. Zapata. 2014. Actividad antiviral de compuestos aislados de esponjas marinas. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 49(3):401–412.
- Gontang, E.A., W. Fenical & P.R. Jensen. 2007. Phylogenetic diversity of Gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*:3272–3282.
- Gu, L., G. Zhi-Wen & L. Wei-Zhong. 2017. Niches and interspecific associations of dominant populations in three changed stages of natural secondary forests on loess plateau, P.R. China. *Scientific Reports* 7(6671):1–12.
- Guevara, L., M. Amaro, M. Fariñas, R. López-Bermúdez & H. D'Armas. 2016. Bioactividad de las esponjas marinas *Cliona varians* y *Cinachyrella kuekenthali* provenientes de Isla Larga, Bahía de Mochima, Estado Sucre, Venezuela. *Ciencia* 9 (20):19–28.
- Gutiérrez-Coria, A.A. 2018. Policládidos (Platyhelminthes: Polycladida) de los litorales rocosos de Guerrero y Oaxaca, México. Tesis de licenciatura. Universidad del Mar. Puerto Ángel, Oaxaca. 155 pp.

- Grund, E. & R.M. Kroppenstedt. 1990. Chemotaxonomy and numerical taxonomy of the genus *Nocardiopsis* Meyer 1976. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 40(1):5–11.
- Hagström, A., T. Pommier, F. Rohwer, K. Simu, W. Stolte, W. Svensson & U.L. Zweifel. 2002. Use of 16S ribosomal DNA for delineation of marine bacterioplankton species. *Applied and Environmental Microbiology* 68:3628–3633.
- Hanan Alipi, A.M., J. Mondragón Pichardo, H. Vibrans & P. Tenorio Lezama. 2021. Malezas de México, *Spartium junceum*. Consultado el 25 de enero de 2022: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/fabaceae/spartium-junceum/fichas/ficha.htm#2.%20Origen%20y%20distribuci%C3%B3n%20geogr%C3%A1fica>
- Hassetta, B.T., T.R. Vonnahme, X. Peng, E.B.G. Jones & C. Heuzé. 2020. Global diversity and geography of planktonic marine fungi. *Botanica Marina* 63(2):121–139.
- Hernández Márquez, B.A. 2015. Análisis de la comunidad de actinobacterias en sedimento de la reserva de la biosfera “Los Petenes”. Tesis de licenciatura, División de Ingeniería Ambiental. Tecnológico de Estudios Superiores del Oriente del Estado de México. Estado de México. 68 pp.
- Hernández-Zulueta, J, L. Díaz-Pérez, R. Araya, O. Vargas-Ponce, A.P. Rodríguez-Troncoso, E. Ríos-Jara, M. Ortiz & F.A. Rodríguez-Zaragoza. 2017. Bacterial assemblages associated with coral species of the Mexican Central Pacific. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 52(2):201–218.
- Hilje, L. 1984. Simbiosis: Consideraciones terminológicas y evolutivas. *Uniciencia* 1(1):57–60.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, H.A.S. Peter, J.T. Staley & S.T. Williams. 1994. Pp: 195–256, In Williams & Wilkins Co., *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed., Preston Street, Baltimore, U.S.A.
- Houbraken, J., J.C. Frisvad & R.A. Samson. 2011. Taxonomy of *Penicillium* section *Citrina*. *Studies in Mycology* 70:53–138.
- Houbraken, J., S. Kocsubé, C.M. Visagie, N. Yilmaz, X-C. Wang, M. Meijer, B. Kraak, V. Hubka, K. Bensch, R.A. Samson & J.C. Frisvad. 2020. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Studies in Mycology* 95:5–169.
- Houbraken, J. & R.A. Samson. 2011. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. *Studies in Mycology* 20:1–51.
- Huang, M-J., M.P. Narsing Rao, N. Salam, M. Xiao, H-Q. Huang & W-J. Li. 2017. *Allostreptomyces psammosileneae* gen. nov., sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from the roots of *Psammosilene tunicoides* and emended description of the family Streptomycetaceae [Waksman and Henrici (1943)AL] emend. Rainey *et al.* 1997, emend. Kim *et al.* 2003, emend. Zhi *et al.* 2009. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 67:288-293.

- Huante-González, G.Y. 1997. Contaminación biológica en la bahía de Puerto Ángel, Oaxaca. *Ciencia y Mar* 1(2): 39–43.
- Huante-González, Y., I.S. Santiago-Morales, M.I. Camacho-Sánchez & Y.G. García-Huante. 2018. Evaluación microbiológica del agua y ostión en las bahías: Puerto Ángel, La Mina y Tijera en la costa de Oaxaca, México. Pp:111–130. In: Pérez-Morales, A. & Álvarez-García, M.C. (ed.), *Estudios recientes en el Océano Pacífico mexicano*. Universidad de Colima.
- Hueytletl-Pérez, M., A. Olivos-Ortiz, S.I. Quijano-Scheggia, C.A. Zenteno-Palma, I.S. Santiago-Morales, S.J. Serrano-Gúzman & Y. Huante-González, G. Oviedo-Piamonte, M.A. Horta-García. 2018. Fitoplancton y su relación con la concentración de clorofila y nutrientes en la parte central de la costa de Oaxaca. Pp:131–152. In: Pérez-Morales, A. & Álvarez-García, M.C. (ed.), *Estudios recientes en el Océano Pacífico mexicano*. Universidad de Colima.
- Hyman, L.H. 1944. Marine Turbellaria from the Atlantic coast of North America. *American Museum novitates* 1266:1–15.
- Hyman, L.H. 1951. *The Invertebrates: Platyhelminthes and Rhynchozoa. The Acoelomate Bilateria*. Vol II. MCGraw-Hill, Book Company, Inc. New York U.S.A. 434 pp.
- Itoi, S., H. Ueda, R. Yamada, M. Takei, T. Sato, S. Oshikiri, Y. Wajima, R. Ogata, H. Oyama, T. Shitto, K. Okuhara, T. Tsunashima, E. Sawayama & H. Sugita. 2018. Including planoceric flatworms in the diet effectively toxifies the pufferfish, *Takifugu niphobles*. *Scientific Report* 8 (812302):1–10.
- Iturrieta-González, I., D. García & J. Gené. 2021. Novel species of *Cladosporium* from environmental sources in Spain. *MycologyKeys* 77:1–25.
- Jiménez Tobón, G.A. & A. Vélez Hoyos. 2012. Tinción de Gram de tejidos: Alcances y limitaciones. *Medicina & Laboratorios* 18 (11-12):555–570.
- Jones, E.B.G. & D.H. Jennings. 1964. The effect of salinity on the growth of marine fungi in comparison with non-marine species. *Transactions of the British Mycological Society*: 86–100.
- Jones, E.B.G., S. Ramakrishna, S. Vikineswary, D. Das, A.H. Bahkali, S.Y. Guo & K.L. Pang. 2022. How do fungi survive in the sea and respond to climate change?. *Journal of Fungi* 8(291):1–19.
- Kawai, S., K. Takatori & T. Ohtaki. 1990. Heat resistance of *Cladosporium* isolated from laboratory animal facilities. *Experimental Animals* 39(3):319–323.
- Kim, Y-O., I-S. Park, S. Park, B-H. Nam, D-G. Kim, S-M. Won & J-H. Yoon. 2018. *Paracoccus alimentarius* sp. nov., isolated from a Korean foodstuff, salted pollack. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68:1238–1243.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111–120.

- Kis-Papo, T., A. Oren, S.P. Wasser & E. Nevo. 2003. Survival of filamentous fungi in hypersaline dead sea water. *Microbial Ecology*. 45:183–190.
- Kogure, K., H.K. Do, D.S. Kim & Y. Shirayama. 1996. High concentrations of neurotoxin in free-living marine nematodes. *Marine Ecology Progress Series* 136:147–151.
- Kohlmeyer, J. & B. Volkmann-Kohlmeyer. 1993. *Atrotriquata* and *Loratospora*: New ascomycete genera on *Juncus roemerianus*. *Systema Ascomycetum* 12(1-2):7–22.
- Konta, S., K.V. Hyde, P.D. Eungwanichayapant, S.C. Karunarathna, M.C. Samarakoon, J. Xu, L.A. Dauner, S.T. Aluthwattha, S. Lumyong & S. Tibpromma. 2021. Multigene phylogeny reveals *Haploanthostomella elaeidis* gen. et. sp. nov. and familial replacement of *Endocalyx* (Xylariales, Sordariomycetes, Ascomycota). *Life* 11(6):486.
- Koropatnick, T.A., J.T. Engle, M.A. Apicella, E.V. Stabb, W.E. Goldman & M.J. Mcfall-Ngai. 2004. Microbial factor-mediated development in a host-bacterial mutualism. *Science* 306 (5699):1186–8.
- Krause, E., A. Wichels, L. Giménez, M. Lunau, M.B. Schilhabel & G. Gerdts. 2012. Small changes in pH have direct effects on marine bacterial community composition: a microcosm approach. *PLoS One* 7(10): e47035.
- Kubaneck, J., D.E. Williams, E.D. de Silva, T. Allen & R.J. Andersen. 1995. Cytotoxic alkaloids from the flatworm *Prostheceraeus villatus* and its tunicate prey *Clavelina lepadiformis*. *Tetrahedron Lett* 36:6189–6192.
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, & K. Tamura. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547–1549.
- Kwiatkowski, N.P, W.M. Babiker, W.G. Merz, K.C. Carroll & S.X. Zhang. 2012. Evaluation of nucleic acid sequencing of the d1/d2 region of the large subunit of the 28s rDNA and the Internal Transcribed Spacer Region using smartgene idns software for identification of filamentous fungi in a clinical laboratory. *The Journal of Molecular Diagnostics* 4(4):393–401.
- Labeda, D.P. & A.J. Lyons. 1991. The *Streptomyces violaceusniger* cluster is heterogeneous in DNA relatedness among strains: emendation of the descriptions of *Streptomyces violaceusniger* and *Streptomyces hygroscopicus*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41:398–401.
- Labeda, D.P, M. Goodfellow, R. Brown, A.C. Ward, B. Lanoot, M. Vannanneyt, J. Columpios, S-B. Kim, Z. Liu, J. Chun, T. Tamura, A. Oguchi, T. Kikuchi, H. Kikuchi, T. Nishii, K. Tsuji, Y. Yamaguchi, A. Tase, M. Takahashi, T. Sakane, K.I. Suzuki & K. Hatano. 2012. Phylogenetic study of the species within the family Streptomycetaceae. *Antonie van Leeuwenhoek* 101:73–104.
- Lang-Yona, N., J.M. Flores, R. Haviv, A. Alberti, J. Poulain, C. Belser, M. Trainic, D. Gat, H-J. Ruscheweyh, P. Wincker, S. Sunagawa, Y. Rudich, I. Koren & A. Vardi. 2022. Terrestrial and marine influence on atmospheric bacterial diversity over the north Atlantic and Pacific Oceans. *Communications Earth & Environ* 3(121):1–10.

- Liu, J.K., K.D. Hyde, E.B. Gareth Jones, H.A. Ariyawansa, D.J. Bhat, S. Boonmee, S.S.N. Maharachchikumbura, E.H.C. McKenzie, R. Phookamsak, C. Phukhamsakda, B.D. Shenoy, M.A. Abdel-Wahab, B. Buyck, J. Chen, K.W.T. Chethana, C. Singtripop, D. Q. Dai, Y.C. Dai, D.A. Daranagama, A.J. Dissanayake, M. Doilom, M.J. D'souza, X.L. Fan, I.D. Goonasekara, K. Hirayama, S. Hongsanan, S.C. Jayasiri, R.S. Jayawardena, S.C. Karunarathna, W.J. Li, A. Mapook, C. Norphanphoun, K.L. Pang, R.H. Perera, D. Peršoh, U. Pinruan, I.C. Senanayake, S. Somrithipol, S. Suetrong, K. Tanaka, K.M. Thambugala, Q. Tian, S. Tibpromma, D. Udayanga, N.N. Wijayawardene, D. Wanasinghe, K. Wisitrassameewong, X.Y. Zeng, F.A. Abdel-Aziz, S. Adamčík, A.H. Bahkali, N. Boonyuen, T. Bulgakov, P. Callac, P. Chomnunti, K. Greiner, A. Hashimoto, V. Hofstetter, J.C. Kang, D. Lewis, X.H. Li, X.Z. Liu, Z.Y. Liu, M. Matsumura, P.E. Mortimer, G. Rambold, E. Randrianjohany, G. Sato, V. Sri-Indrasudhi, C.M. Tian, A. Verbeken, W. von Brackel, Y. Wang, T.C. Wen, J.C. Xu, J. Y. Yan, R.L. Zhao & E. Camporesi. 2015. Fungal diversity notes 1–110: taxonomic and phylogenetic contributions to fungal species. *Fungal Diversity*. 1–197.
- Lee, K.M., M. Beal & E.L. Johnston. 2006. A new predatory flatworm (Platyhelminthes, Polycladida) from Botany Bay, New South Wales, Australia. *Journal of Natural History* 39 (47):3987–3995.
- Lee, P.Y., J. Costumbrado, C.Y. Hsu & Y.H. Kim. 2012. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments* 62 (e3923):1–5.
- Lee, S.R., H. Kang, M. J. Yoo, J.S. Yu, S. Lee, S.A. Yi, C. Beemelmans, J. Lee & K.H. Kim. 2020. Anti-adipogenic pregnane steroid from a *Hydractinia*-associated fungus, *Cladosporium sphaerospermum* SW67. *Natural Product Science* 26 (3):230–235.
- Leinberger, J., J. Holste, B. Bunk, H.M. Freese, C. Spröer, L. Dlugosch, A-C. Kück, S. Schulz & T. Brinkhoff. 2021. High potential for secondary metabolite production of *Paracoccus marcusii* CP157, isolated from the crustacean *Cancer pagurus*. *Frontiers in Microbiology* 12 (688754):1–18.
- Lin, H.N., Y. Wang, J.M. Huang, Q.L. Lai & Y. Xu. 2017a. *Deinococcus planocerae* sp. nov., isolated from a marine flatworm. *Antonie Van Leeuwenhoek* 110 (6):811–817.
- Lin, H.N., K.L. Wang, Z.H. Wu, R.M. Tian, G.Z. Liu & Y. Xu. 2017b. Biological and chemical diversity of bacteria associated with a marine flatworm. *Marine Drugs* 15 (281):1–14.
- Lombard, L., R.G. Shivas, C. To-Anun & P.W. Crous. 2012. Phylogeny and taxonomy of the genus *Cylindrocladiella*. *Mycological Progress* 11:835–868.
- Luna, G.M., L. Bongiorno, C. Gili, F. Biavasco & R. Danovaro. 2010. *Vibrio harveyi* as a causative agent of the white syndrome in tropical stony corals. *Environmental Microbiology Reports* 2(1):120–127.
- Mahasneh, I.A., R.F. Al-Thani, M.A. Abuannadi & M.A. Qandil. 2011. A complete sequence of the 16S rRNA gene of a novel *Streptomyces coelicolor* (AB588124) (QU66c–2002) isolated from the soil of Qatar. *Biotechnology* 10:167–174.
- Mahmoud, H.M. & A.A. Kalendar. 2016. Coral-associated actinobacteria: diversity, abundance, and biotechnological potentials. *Frontiers in Microbiology* 7 (204):1–13.

- Manfio, G.P., E. Atalan, J. Zakrzewska-Czerwinska, M. Mordarski, C. Rodríguez, M.D. Collins & M. Goodfellow. 2003. Classification of novel soil streptomycetes as *Streptomyces aureus* sp. nov., *Streptomyces laceyi* sp. nov. and *Streptomyces sanglieri* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek* 83(3):245–255.
- Marmur, J. 1961. A procedure for deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *Journal of Molecular Biology* 3:208–218.
- Menezes, C.B.A., R.C. Bonugli-Santos, P.B. Miqueletto, M.R.Z. Passarini, C.H.D. Silva, M. R. Justo, R.R. Leal, F. Fantinatti-Garboggini, V. M. Oliveira, R. G.S. Berlinck & L.D. Sette. 2010. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. *Microbiological Research* 165:466–482.
- Mendoza Amézquita, E., I. Ramírez Aguilar, J. Andreas Seim, R. Blanco Betancourt & V.M. Martínez Rodríguez. 2017. Calidad del agua y simulación numérica en la Bahía de Puerto Ángel, Oaxaca, México. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias* 8(19):16–32.
- Meyer, J. 1976. *Nocardiosis*, a new genus of the order Actinomycetales. *International Journal of Systematic Bacteriology* 26 (4):487–493.
- Meyers, S.P. & J. Simms. 1965. Thalassiomycetes VI. Comparative growth studies of *Lindra thalassiae* and lignicolous Ascomycete species. *Canadian Journal of Botany* 43:379–392.
- Mincer, T., P.R. Jensen, A. Christopher & W. Kauffman Fenical. 2002. Widespread and persistent populations of a major new marine Actinomycete taxon in ocean sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 68:5005–5011
- Miyazawa, K., J.K. Jeon, T. Noguchi, K. Ito & K. Hashimoto. 1987. Distribution of tetrodotoxin in the tissues of the flatworm *Planocera multitentaculata* (Platyhelminthes). *Toxicon* 25(9):975–80.
- Neave, M.J., C. Streten-Joyce, C.J. Glasby, K.A. McGuinness, D.L. Parry & K. S. Gibb. 2012. The bacterial community associated with the marine polychaete *Ophelina* sp. 1 (Annelida: Opheliidae) is altered by copper and zinc contamination in sediments. *Microbial Ecology* 63 (3):639–650.
- Newman, W.A. & D.P. Abbott. 1980. Cirripedia: the barnacles. pp. 504–535. In Morris, R.H., Abbott, D.P. & Haderlie, E.C. (ed), *Intertidal invertebrates of California*. Stanford: Stanford University Press.
- Newman, L.J. & L.R.G. Cannon. 1997. A new semi-terrestrial acotylean flatworm, *Myoramyxa pardalota* gen. et sp. nov. (Plehniiidae, Polycladida) from southeast Queensland and Australia. *Memoirs of the Queensland Museum* 42(1):311–314.
- Newman, L.J. & L.R.G. Cannon. 2003. *Marine flatworms, the world of Polyclads*. CSIRO Publishing. Australia 97 pp.
- Newman, L.J., L.R.G. Cannon & H. Govan. 1993. *Stylochus (Imogene)* n. sp. (Platyhelminthes, Polycladida): pest of cultured giant clams and pearl oysters from Solomon Islands. *Hydrobiology* 257:185–189.

- Nicholson, J.K., E. Holmes, J. Kinross, R. Burcelin, G. Gibson, W. Jia & S. Pettersson. 2012. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* 336 (6086):1262–7.
- Nonaka, K., S. Kaifuchi, S. Ōmura & R. Masuma. 2013. Five new *Simplicillium* species (Cordycipitaceae) from soils in Tokyo, Japan. *Mycoscience* 54 (1):42–53.
- Okabe, T. H. Oyama, M. Kashitani, Y. Ishimaru, R. Suo, H. Sugita & S. Itoi. 2019. Toxic flatworm egg plates serve as a possible source of tetrodotoxin for pufferfish. *Toxins* 11(402):1–8.
- Oren, A. & N. Gunde-Cimerman. 2012. Fungal Life in the dead sea. *Progress in molecular and subcellular biology* 53:115–132.
- Parte, A.C., J. Sardà Carbasse, J.P. Meier-Kolthoff, L.C. Reimer & M. Göker. 2020. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70:5607–5612.
- Paulino, G.V.B., C.R. Felix & M.F. Landell. 2019. Diversity of filamentous fungi associated with coral and sponges in coastal reefs of northeast Brazil. *Journal of Basic Microbiology* :1–9.
- Pérez Ramírez, I. & K. Sánchez Espinosa. 2020. Caracterización de esclerocios de cepas ambientales de *Aspergillus flavus* y su relación con la producción de micotoxinas. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas* 8(1):1–5.
- Peterson, S.W., J. Varga, J.C. Frisvad & R.A. Samson. 2008. Phylogeny and subgeneric taxonomy of *Aspergillus*. *Aspergillus in the Genomic Era*: 33–56.
- Phongsopitanun, W., C. Thawai, K. Suwanborirux, T. Kudo, M. Ohkuma & S. Tanasupawat. 2014. *Streptomyces chumphonensis* sp. nov., isolated from marine sediments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64:2605–2610.
- Pineda-López, R. & L. González-Bulnes. 1984. Turbelarios de México II. Descripción de un género y especie nuevo de policládidos ectocomensales de arqueogasterópodos del Pacífico mexicano. *Universidad y ciencia*. 1(1):1–9.
- Piontek, J., M. Lunau, N. Händel, C. Borchard, M. Wurst & A. Engel. 2010. Acidification increases microbial polysaccharide degradation in the ocean. *Biogeosciences* 7:1615–1624.
- Pita, L., L. Rix, B.M. Slaby, A. Franke & U. Hentschel. 2018. The sponge holobiont in a changing ocean: from microbes to ecosystems. *Microbiome* 6 (46):1–18.
- Pitt, J.I. & A.D. Hocking. 2009. Chapter 5 primary keys and miscellaneous fungi. In: *Fungi and food spoilage*. Springer, Boston, MA 91 pp.
- Prasannarai, K. & K.R. Sridhar. 2001. Diversity and abundance of higher marine fungi on wood substrates along the west coast of India. *Current Science* 81 (3):304–311.
- Puglisi, M.P., J.M. Sneed, K.H. Sharp, R. Ritson-Williams & V.J. Paul. 2014. Marine chemical ecology in benthic environments. *Natural Product Reports* 31 (11):1491–1664.

- Pujalte, M.J., T. Lucena, M.A. Ruvira, D.R. Arahal & M.C. Macián. 2014. The Family Rhodobacteraceae. Pp. 439–512. In: Rosenberg E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E. & Thompson, F. (ed), *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Puri, A., A. Bajaj, S. Lal, Y. Singh & R. Lal. 2021. Phylogenomic framework for taxonomic delineation of *Paracoccus* spp. and exploration of core-pan genome. *Journal of Microbiology* 61(2):180–194.
- Queiroz, V., L. Sales, E.G. Neves & R. Johnsson. 2013. *Pericelis cata* Marcus and Marcus. 1968 (Platyhelminthes: Polycladida): First record from northeast of Brazil. *Check List* 9 (3):628–630.
- Quiroga, Y.S., D.M. Bolaños & M.K. Litvaitis. 2004. A checklist of polyclad flatworms (Platyhelminthes: Polycladida) from the Caribbean coast of Colombia, South America. *Zootaxa* 633:1–12.
- Quiroga, Y.S., M. Bolaños & M.K. Litvaitis. 2006. First description of deep-sea polyclad flatworms from the North Pacific: *Anocellidus* n. gen. *profundus* n. sp. (Anocellidae, n. fam.) and *Oligocladus voightae* n. sp. (Euryleptidae). *Zootaxa* 1317:1–19.
- Ramanana, R., K. Byung-Hyuk, C. Dae-Hyun, O. Hee-Mock & K. Hee-Sik. 2016. Algae–bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnology Advances* 34 (1):14–29.
- Ramos-Sánchez, M., J. Bahia & J.R. Bastida-Zavala. 2019. New genus, new species and new records of marine acotyleans flatworms (Platyhelminthes: Polycladida: Acotylea) from Oaxaca, southern Mexican Pacific. *Zootaxa* 4700 (1):030–058.
- Ramos-Sánchez, M., J. Bahia & J.R. Bastida-Zavala. 2020. Five new species of cotylean flatworms (Platyhelminthes: Polycladida: Cotylea) from Oaxaca, southern Mexican Pacific. *Zootaxa* 4819 (1):049–083.
- Ramos-Sánchez, M., D.S. Carrasco-Rodríguez, M.S. García-Madrigal & J.R. Bastida-Zavala. 2021. Marine flatworms (Platyhelminthes: Polycladida) found in empty barnacle shells, including a new species, from southern Mexican Pacific. *Zootaxa* 4965 (2):301–320.
- Rawlinson, K.A. & M.K. Litvaitis. 2008. Cotylea (Polycladida): a cladistic analysis of morphology. *Invertebrate Biology* 127 (2):121–138.
- Rainey, F.A., N. Ward-Rainey, R.M. Kroppenstedt & E. Stackebrandt. 1996. The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: prodosal of *Nocardiomaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46 (4):1088–1092.
- Reddy, T.V.K., S. Mahmood, L. Paris, Y. Harish, K. Reddy, E.M.H. Wellington & M.M. Idris. 2011. *Streptomyces hyderabadensis* sp. nov., an actinomycete isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61:76–80.
- Reséndiz, E., H. Fernández Sanz, D.S. Barrientos Torres, M.M. Lara-Uc & J.M. López Vivas. 2019. Microbiología de tortugas amarillas (*Caretta caretta*) del Golfo de Ulloa, Baja California Sur, México. *Ciencia y Mar* 23 (68):3–16.

- Reyes-Bonilla, H., J. Carriquiry, G. Leyte-Morales & A. Cupul-Magaña. 2002. Effects of the El Niño-Southern Oscillation and the anti-El Niño event (1997–1999) on coral reefs of the western coast of México. *Coral Reefs* 21:368–372.
- Ritchie, K.B. & G.W. Smith. 2004. Microbial communities of coral surface mucopolysaccharide layers. Pp 259–263, In Rosenberg, E. & Loya, Y. (ed), *Coral health and disease*, Springer Verlag.
- Ritson-Williams, R., M. Yotsu-Yamashita & V.J. Paul. 2006. Ecological functions of tetrodotoxin in a deadly polyclad flatworm. *Ecology PNAS* 3(9):3176–3179.
- Rizzo, C. & A.L. Giudice. 2018. Marine invertebrates: underexplored sources of bacteria producing biologically active molecules. *Diversity* 10(52):1–32.
- Rodríguez-Villalobos, J.C., A. Rocha-Olivares, T.M. Work, L.E. Calderón-Aguilera & J.A. Cáceres-Martínez. 2014. Gross and microscopic pathology of lesions in *Pocillopora* sp. from the subtropical eastern Pacific. *Journal of Invertebrate Pathology* 120:9–17.
- Rosero, D.A., L.A. Gutiérrez, A.V. Cienfuegos, L.M. Jaramillo & M.M. Correa. 2010. Optimización de un procedimiento de extracción de ADN para mosquitos anofelinos. *Revista Colombiana de Entomología* 36 (2):260–263.
- Rypien, K.L. & D. M. Baker. 2009. Isotopic labeling and antifungal resistance as tracers of gut passage of the sea fan pathogen *Aspergillus sydowii*. *Diseases of Aquatic Organisms* 86:1–7.
- Salvitti, L.R., S.A. Wood, L. Winsor & S. Craig Cary. 2015. Intracellular immunohistochemical detection of tetrodotoxin in *Pleurobranchaea maculata* (Gastropoda) and *Stylochoplana* sp. (Turbellaria). *Marine Drugs* 13 (2):756–769.
- Samson, R.A., C.M. Visagie, J. Houbraken, S-B. Hong, V. Hubka, C.H.W. Klaassen, G. Perrone, K.A. Seifert, A. Susca, J.B. Tanney, J. Varga, S. Kocsubé, G. Szigeti, T. Yaguchi, & J.C. Frisvad. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 78:141–173.
- Sánchez-Ortiz, A.C., A. Luna-González, A.I. Campa-Córdova, R. Escamilla-Montes, M.C. Flores-Miranda & J.M. Mazón-Suástegui. 2015. Isolation and characterization of potential probiotic bacteria from pustulose ark (*Anadara tuberculosa*) suitable for shrimp farming. *Latin American Journal of Aquatic Research* 43(1):123–136.
- Sandoval-Denis, M., J. Gené, D.A. Sutton, N.P. Wiederhold, J.F. Cano-Lira & J. Guarro. 2016. New species of *Cladosporium* associated with human and animal infections. *Persoonia* 36:281–298.
- Schubert, K. A. Greslebin, J.Z. Groenewald & P.W. Crous. 2009. New foliiceous species of *Cladosporium* from South America. *Persoonia* 22:111–122.
- Schubert, K., J.Z. Groenewald, U. Braun, J. Dijksterhuis, M. Starink, C.F. Hill, P. Zalar, G.S. de Hoog & P.W. Crous. 2007. Biodiversity in the *Cladosporium herbarum* complex (Davidiellaceae, Capnodiales), with standardisation of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics. *Studies in Mycology* 58:105–156.

- Schupp, P.J., C. Kohlert-Schupp, W.Y. Yoshida & T.K. Hemscheidt. 2009. Structure of pseudocerosine, an indolic azafulvene alkaloid from the flatworm *Pseudoceros indicus*. *Organic Letters* 11:1111–1114.
- Seipke, R.F., M. Kaltenpoth & M.I. Hutchings. 2012. *Streptomyces* as symbionts: an emerging and widespread theme?. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Review* 36:862–876.
- Shi, D., Y. Xu, B.M. Hopkinson & F.M.M. Morel. 2010. Effect of ocean acidification on iron availability to marine phytoplankton. *Science* 327:676–679.
- Shivaprakash, M. R., B. Sumangala, H. Prasanna, B.M. Yenigalla, K.C.Munegowda, D. Ravi & A. Chakrabarti. 2012. Nasal vestibulitis due to *Nocardiosis dassonvillei* in a diabetic patient. *Journal of medical microbiology* 61:1168–1173.
- Smith, M., T.W. Henkel & J.A. Rollins. 2014. How many fungi make sclerotia?. *Fungal Ecology* :1–10.
- Sonnenberg, R., A.W. Nolte & D. Tautz. 2007. An evaluation of LSU rDNA D1-D2 sequences for their use in species identification. *Frontiers in Zoology* 4 (6):1–12.
- Spatafora, J.W., G.H. Sung, J.M. Sung, N.L. Hywel-Jones & J.F., Jr White. 2007. Phylogenetic evidence for an animal pathogen origin of ergot and the grass endophytes. *Molecular ecology* 16(8):1701–1711.
- Stackebrandt, E. & J. Ebers. 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today* 06:152–155.
- Stanier, R.Y., J.L. Ingraham, M.L. Wheelis & P.R. Painter. 1996. *Microbiología*. Ed. Reverte, 760 pp.
- Stolk, A.C. 1968. Studies on the genus *Eupenicillium* Ludwig. 3. Four new species of *Eupenicillium*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 34(1):37–53.
- Sun, H., A. Lapidus, M. Nolan, S. Lucas, T. Glavina Del Rio, H. Tice, J-F. Cheng, R. Tapia, C. Han, L. Goodwin, S. Pitluck, I. Pagani, N. Ivanova, K. Mavromatis, N. Mikhailova, A. Pati, A. Chen, K. Palaniappan, M. Land, L. Hauser, Y-J. Chang, C. D. Jeffries, O.D. Ngatchou Djao, M. Rohde, J. Sikorski, M. Göker, T. Woyke, J. Bristow, J.A. Eisen, V. Markowitz, P. Hugenholtz, N.C. Kyrpides & H-P. Klenk. 2010. Complete genome sequence of *Nocardiosis dassonvillei* type strain (IMRU 509T). *Standards in Genomic Sciences* 3:325–336.
- Suo, R., M. Kashitani, H. Oyama, M. Adachi, R. Nakahigashi, R. Sakakibara, T. Nishikawa, H. Sugita & S. Itoi. 2021. First detection of tetrodotoxins in the cotylean flatworm *Prothiostomum trilineatum*. *Marine Drugs* 19(40):1–10.
- Sussman, M., Y. Loya, M. Fine & E. Rosenberg. 2003. The marine fireworm *Hermodice carunculata* is a winter reservoir and spring-summer vector for the coral-bleaching pathogen *Vibrio shiloi*. *Environmental Microbiology* 5(4):250–255.
- Takahashi, Y. 2017. Genus *Kitasatospora*, taxonomic features and diversity of secondary metabolites. *The Journal of Antibiotics* 70:506–513.

- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei & S. Kumar. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetic analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution* 28(10):2731–2739.
- Tannous, J., A. Atoui, A.E. Khoury, Z. Francis, I.P. Oswald, O. Puel & R. Lteif. 2015. A study on the physicochemical parameters for *Penicillium expansum* growth and patulin production: effect of temperature, pH, and water activity. *Food Science & Nutrition*:1–13.
- Tanu, M.B., Y. Mahmud, O. Arakawa, T. Takatani, H. Kajihara, K. Kawatsu, Y. Hamano, M. Asakawa, K. Miyazawa, T. Noguchi. 2004. Immunoenzymatic visualization of tetrodotoxin (TTX) in *Cephalothrix* species (Nemertea: Anopla: Palaeonemertea: Cephalotrichidae) and *Planocera reticulata* (Platyhelminthes: Turbellaria: Polycladida: Planoceridae). *Toxicon* 41:515–520.
- Tapia-García, M., M. C. García-Abad, A. Carranza-Edwards y F. Vázquez-Gutiérrez. 2007. Environmental characterization of the continental shelf of the Gulf of Tehuantepec, Mexico. *Geofísica Internacional* 46 (4):249–260.
- Tijerina-Ramírez, N., K. Lira-Méndez, V.R. Moreno-Medina, J.M. González-Prieto & N. Mayek-Pérez. 2014. Efecto del estrés osmótico in vitro en el crecimiento, patogenicidad y producción de osmolitos en *Macrophomina phaseolina*. *Revista de Micología* 39:31–39.
- Tindall, B.J., R. Rosselló-Móra, H-J. Busse, W. Ludwig & P. Kämpfer. 2010. Notes and the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60:249–266.
- Torsvik, V., F.L., Daae, R.A., Sandaa, & L. Øvreas. 1998. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal Biotechnology* 64:53–62.
- Tortora, G.J. B.R. Funke & C. L. Case. 2017. *Introducción a la microbiología*. Médica Panamericana, Argentina. 810 pp.
- Thines, M. 2019. An evolutionary framework for host shifts-jumping ships for survival. *New Phytol* 224(2):605–617.
- Thunell, R.C. & A.B. Kepple. 2004. Glacial-Holocene $\delta^{15}\text{N}$ record from the Gulf of Tehuantepec, Mexico: Implications for denitrification in the eastern equatorial Pacific and changes in atmospheric N_2O . *Global Biogeochemical Cycles* 18:1–12.
- Varga, J., J.C. Frisvad & R.A. Samson. 2007. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Candidi* based on molecular, morphological and physiological data. *Studies in Mycology*. 59:75–88.
- Vargas-Flores, T. & A. Kuno-Vargas. 2014. Morfología bacteriana. *Revista de Actualización Clínica* 49(2): 2594–2598.
- Vásquez-López, A., R.E. Palacios-Torres, L.B. Montiel-Frausto, V.R. Medero Vega, N.B. Lima, M. Camacho-Tapia & J.M. Tovar-Pedraza. 2018. First report of *Cladosporium*

- colocasiae* causing leaf spot on taro (*Colocasia esculenta*) in Mexico. Plant Disease 102(12):1–5.
- Verant, M.L. J.G. Boyles, W. Waldrep Jr, G. Wibbelt & D.S. Blehert. 2012. Temperature-dependent growth of *Geomyces destructans*, the fungus that causes Bat White-Nose Syndrome. PLoS ONE 7(9):1–7.
- Visagie, C.M., J. Houbraken, J.C. Frisvad, S-B. Hong, C.H.W. Klaassen, G. Perrone, K.A. Seifert, J. Varga, T. Yaguchi & R.A. Samson. 2014a. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. Studies in Mycology 78:343–371.
- Visagie, C.M., J. Varga, J. Houbraken, M. Meijer, S. Kocsubé, N. Yilmaz, R. Fotedar, K.A. Seifert, J.C. Frisvad & R.A. Samson. 2014b. Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*). Studies in Mycology 78:1–61.
- Vu, D., M. Groenewald, M. de Vries, T. Gehrman, B. Stielow, U. Eberhardt, A. Al-Hatmi, J.Z. Groenewald, G. Cardinali, J. Houbraken, T. Boekhout, P.W. Crous, V. Robert & G.J.M. Verkley. 2019. Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. Studies in Mycology 92:135–154.
- Waksman, S.A. & A.T. Henrici. 1943. The nomenclature and classification of the Actinomycetes. Journal of Bacteriology 46:337–341.
- Webster, N.S. 2014. Cooperation, communication, and co-evolution: grand challenges in microbial symbiosis research. Frontiers in microbiology 5 (164):1–4.
- Westheide, W. 1991. The Meiofauna of the Galapagos. Cap. 2, Pp. 3–73, In: Matthew J. J. Galapagos marine invertebrates taxonomy, biogeography, and evolution in Darwin's Islands. Topics in Geobiology.
- Wei, D-P., D.N. Wanasinghe, K.D. Hyde, P.E. Mortimer, J-C. Xu, Y-P. Xiao, C.S. Bhunjun, C. To-anun. 2019. The genus *Simplicillium*. MycoKeys 60:69–92.
- Wilden, B., N. Majdi1, U. Kuhlicke, T. R. Neu & W. Traunspurger. 2019. Flatworm mucus as the base of a food web. BMC Ecology 19 (15):1–9.
- Winsor, C.P. 1932. The Gompertz curves as a growth curve. Proceedings of the National Academy of Sciences 18(1):1–8.
- Wu, Z., L. Xie, G. Xia, J. Zhang, Y. Nie, J. Hu, S. Wang & R. Zhang. 2005. A new tetrodotoxin-producing actinomycete, *Nocardopsis dassonvillei*, isolated from the ovaries of puffer fish *Fugu rubripes*. Toxicon 45:851–859.
- Xu, P., W.J. Li, S.K. Tang, H.Y. Gao, L.H. Xu & C.L. Jiang. 2006. *Streptomyces daliensis* sp. nov. from soil. Antonie van Leeuwenhoek 89:71–78.
- Xu, Y., Q. Li, R. Tian, Q. Lai & Y. Zhang. 2015. *Pseudovibrio hongkongensis* sp. nov., isolated from a marine flatworm. Antonie Van Leeuwenhoek 108 (1):127–32.
- Xue, H., C.-G. Piao, M-W. Guo, L-F. Wang & Y. Li. 2017. *Paracoccus aerius* sp. nov., isolated from air. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 67:2586–259.

- Yadav, A.N., V. Priyanka, S. Kumar, V. Kumar, M. Kumar, T.C.K. Sugitha, B.P. Singh, A. Kumar Saxena & H.S. Dhaliwal. 2018. Actinobacteria from Rhizosphere: molecular diversity, distributions, and potential biotechnological applications. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, chapter 2:13–41.
- Yamada, R., T. Tsunashima, M. Takei, T. Sato, Y. Wajima, M. Kawase, S. Oshikiri, Y. Kajitani, K. Kosoba, K. Ueda, K. Abe, S. Itoi & H. Sugita. 2017. Seasonal changes in the tetrodotoxin content of the flatworm *Planocera multitentaculata*. *Marine Drugs* 15 (56):1–10.
- Yarden, O. 2014. Fungal association with sessile marine invertebrates. *Frontiers in Microbiology* 5 (228):1–6.
- Yarza, P., P. Yilmaz, E. Pruesse, F.O. Glöckner, W. Ludwig, K-H. Schleifer, W. B. Whitman, J. Euzéby, R. Amann & R. Rosselló-Móra. 2014. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology* 12 (9):635–645.
- Yew, S.M., C.L. Chan, Y.F. Ngeow, Y.F. Toh, S.L. Na, K.W. Lee, C-C. Hoh, W-Y. Yee, K. P. Ng & C.S. Kuan. 2016. Insight into different environmental niches adaptation and allergenicity from the *Cladosporium sphaerospermum* genome, a common human allergy-eliciting Dothideomycetes. *Scientific Reports* 6 (27008):1–13.
- Zare, R. & W. Gams. 2001. A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. *Nova Hedwigia* 73 (1–2):1–50.
- Zhang, J., Y. Xin, X. Cao, S. Xue & W. Zhang. 2014. Purification and characterization of 2-haloacid dehalogenase from marine bacterium *Paracoccus* sp. DEH99, isolated from marine sponge *Hymeniacidon perlevis*. *Journal of Ocean University of China* 13 (1):91–96.
- Zhang, Y., Q. Li, R. Tian, Q. Lai & Y. Xu. 2016. *Pseudovibrio stylochi* sp. nov., isolated from a marine flatworm. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66(5):2025–9.
- Zuluaga-Montero, A., L. Ramírez-Camejo, J. Rauscher & P. Bayman. 2010. Marine isolates of *Aspergillus flavus*: denizens of the deep or lost at sea. *Fungal Ecology* 3(4):386–391.
- Zvereva, L.V. & M.A. Vysotskaya. 2005. Filamentous fungi associated with bivalve mollusks from polluted biotopes of Ussuriiskii Bay, Sea of Japan. *Russian Journal of Marine Biology* 31(6): 382–385.

Anexo I

Tabla I. Listado taxonómico de las especies de bacterias asociadas a una especie no descrita del género *Paraplanocera* (muy probablemente *Paraplanocera oligoglana*) tomado de Lin *et al.* (2017b)

Número 1 y símbolo?

1. Las especies en negritas corresponden a las bacterias descritas específicas en *Paraplanocera* ?Lin *et al.* (2019b), realizaron un listado de las especies de bacterias aisladas en organismos del género *Paraplanocera*, en estas especies solo indica la letra H. como género para éstos epítetos específicos, al realizar la actualización del nombre de las especies y autorías en la base de datos <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser>, se encontró que estos epítetos pueden corresponder a diversos géneros (*e.g.*, *Salicibacter*, *Arcobacter*etc).

Dominio Bacteria

Filo Actinobacteria Garrity & Holt 2001

Clase Actinobacteria Stackebrandt *et al.* 1997

Orden Corynebacteriales Goodfellow & Jones 2015 emend. Nouioui *et al.* 2018

Familia Mycobacteriaceae Chester 1897 (Approved Lists 1980) emend. Nouioui *et al.* 2018

Género *Mycolicibacterium* Gupta *et al.* 2018

M. bacteremicum (Brown-Elliott *et al.* 2012) Gupta *et al.* 2018

M. chubuense (Tsukamura *et al.* 1981) Gupta *et al.* 2018

M. iranicum (Shojaei *et al.* 2013) Gupta *et al.* 2018

M. kumamotonense (Masaki *et al.* 2007) Gupta *et al.* 2018

M. pallens (Hennessee *et al.* 2009) Gupta *et al.* 2018

M. parafortuitum (Tsukamura *et al.* 1965) Gupta *et al.* 2018

M. peregrinum (Kusunoki & Ezaki 1992) Gupta *et al.* 2018

M. poriferae (Padgitt & Moshier 1987) Gupta *et al.* 2018

Familia Tsukamurellaceae (Rainey *et al.* 1997) Zhi *et al.* 2009

Género *Tsukamurella* Collins *et al.* 1988

T. strandjordii Kattar *et al.* 2002

T. tyrosinosolvans (Yassin *et al.* 1997) Teng *et al.* 2016

Orden Micrococcales (Prevot 1940) Nouioui *et al.* 2018

Familia Brevibacteriaceae (Breed 1953) Zhi *et al.* 2009

Género *Brevibacterium* Breed 1953

Brevibacterium iodinum (ex Davis 1939) Collins *et al.* 1981

Familia Microbacteriaceae (Park *et al.* 1995) Zhi *et al.* 2009

Género *Microbacterium* (Orla-Jensen 1919) Fidalgo *et al.* 2016

M. resistens (Funke *et al.* 1998) Behrendt *et al.* 2001

M. saperdae (Lysenko 1959) Takeuchi & Hatano 1998

Familia Micrococcaceae (Pribram 1929) Zhi *et al.* 2009

Género *Glutamicibacter* Busse 2016

G. soli (Roh *et al.* 2008) Busse 2016

Género *Micrococcus* (Cohn 1872) Wieser *et al.* 2002

M. yunnanensis Zhao *et al.* 2009

Orden Micromonosporales Genilloud 2015

Familia Micromonosporaceae (Krasil'nikov 1938) Nouioui *et al.* 2018

Género *Micromonospora* (Foulerton 1905) Ørskov 1923

M. aurantiaca Sveshnikova *et al.* 1969

M. carbonacea Luedemann and Brodsky 1965

M. eburnean Thawai *et al.* 2005

M. echinospora (Luedemann & Brodsky 1964) Kasai *et al.* 2000

M. marina Tanasupawat *et al.* 2010

M. schwarzwaldensis Gurovic *et al.* 2013

M. tulbaghia Kirby & Meyers 2010

M. wenchangensis Ren *et al.* 2013

Orden Pseudonocardiales Labeda & Goodfellow 2015

Familia Pseudonocardiaceae Embley *et al.* 1989) Nouioui *et al.* 2018

Género *Pseudonocardia* (Henssen 1957) Park *et al.* 2008

P. carboxydivorans Park *et al.* 2008

Orden Streptomycetales Kämpfer 2015

Familia Streptomycetaceae (Waksman & Henrici 1943) Nouioui *et al.* 2018

Género *Streptomyces* Waksman & Henrici 1943

S. albidoflavus (Rossi Doria 1891) Waksman & Henrici 1948, Rong *et al.* 2009

S. bacillaris Pridham 1970

S. cavourensis Skarbek and Brady 1978

S. cirratus Koshiyama *et al.* 1963

S. daliensis Xu *et al.* 2012

S. libani Baldacci & Grein 1966

S. luridus Waksman 1961

S. parvulus Waksman & Gregory 1954

S. phytohabitans Bian *et al.* 2012

S. rutgersensis (Waksman & Curtis 1916) Waksman & Henrici 1948

S. samsunensis Sazak *et al.* 2011

S. sudanensis Quintana *et al.* 2008

S. tendae Ettliger *et al.* 1958

Filo Bacteroidetes Krieg *et al.* 2012

Clase Flavobacteriia Bernardet 2012

Orden Flavobacteriales Bernardet 2011

Familia Flavobacteriaceae (Reichenbach *et al.* 1992) Bernardet *et al.* 2002

Género *Aquimarina* (Nedashkovskaya *et al.* 2005) Lee *et al.* 2017

Aquimarina muelleri (Nedashkovskaya *et al.* 2005) Yu *et al.* 2013

Género *Tenacibaculum* Suzuki *et al.* 2001

Tenacibaculum aiptasiae Wang *et al.* 2008

Filo Deinococcus-Thermus? Oren *et al.* 2015

Clase Deinococci Garrity & Holt 2002

Orden Deinococcales Rainey *et al.* 1997

Familia Deinococcaceae (Brooks & Murray 1981) Rainey *et al.* 1997

Género *Deinococcus* (Brooks & Murray 1981) Rainey *et al.* 1997

*Deinococcus planocerae*¹ Lin *et al.* 2017

Filo Firmicutes Gibbons & Murray 1978

Clase Bacilli Ludwig *et al.* 2010

Orden Bacillales Prevot 1953

Familia Bacillaceae Fischer 1895

Género *Bacillus* Cohn 1872

B. aerius Shivaji *et al.* 2006

B. aerophilus Shivaji *et al.* 2006

B. aquimaris Yoon *et al.* 2003

B. aryabhatai Shivaji *et al.* 2009

B. algicola Ivánova *et al.* 2004

B. altitudinis (Shivaji *et al.* 2006) Liu *et al.* 2016

B. berkeleyi Nedashkovskaya *et al.* 2012

B. idriensis Ko *et al.* 2006

B. lehensis Ghosh *et al.* 2007

B. pumilus Meyer & Gottheil 1901

B. gibsonii Nielsen *et al.* 1995

B. flexus (ex Batchelor 1919) Priest *et al.* 1989

B. invictae Branquinho *et al.* 2014

B. marisflavi Yoon *et al.* 2003

B. megaterium de Bary 1884

B. nealsonii Venkateswaran *et al.* 2003

Grupo Bacillussubtilis

Subgrupo Bacillus amyloliquefaciens

B. amyloliquefaciens subsp. *plantarum*

Filo Proteobacteria Garrity *et al.* 2005

Clase Alphaproteobacteria Garrity *et al.* 2006

Orden Rhodobacterales Garrity *et al.* 2006

Familia Rhodobacteraceae Garrity *et al.* 2006

Género *Paracoccus* (Davis 1969) Liu *et al.* 2008

P. homiensis Kim *et al.* 2006

Clase Betaproteobacteria Garrity *et al.* 2006 emend. Boden *et al.* 2017

Orden Burkholderiales Garrity *et al.* 2006

Familia Alcaligenaceae De Ley *et al.* 1986

Género *Alcaligenes* Castellani & Chalmers 1919

A. aquatilis Van Trappen *et al.* 2005

A. aquatilis subsp. *phenolicus*

Familia Burkholderiaceae Garrity *et al.* 2006

Género *Cupriavidus* (Makkar & Casida 1987) Vandamme & Coenye 2004

Cupriavidus campinensis (Goris *et al.* 2001) Vandamme & Coenye 2004

Clase Gammaproteobacteria (Garrity *et al.* 2005) Williams & Kelly 2013

Orden Pseudomonadales Orla-Jensen 1921

Familia Pseudomonadaceae Winslow *et al.* 1917

Género *Pseudomonas* (Migula 1894) Yang *et al.* 2013

Grupo *Pseudomonas fluorescens*

P. libanensis Dabboussi *et al.* 1999

Orden Vibrionales Garrity & Holt 2001

Familia Vibrionaceae Veron 1965

Género *Vibrio* Pacini 1854

V. cyclitrophicus Hedlund & Staley 2001

V. chagasii Thompson *et al.* 2003

Género *Photobacterium* Beijerinck 1889

P. swingsii Gomez-Gil *et al.* 2011

Orden Xanthomonadales Saddler & Bradbury 2005

Familia Xanthomonadaceae Saddler & Bradbury 2005

Género *Stenotrophomonas* (Palleroni & Bradbury 1993) Ouattara *et al.* 2017

S. rhizophila Wolf *et al.* 2002

Clase Alphaproteobacteria Garrity *et al.* 2006

Orden Rhodobacterales Garrity *et al.* 2006

Familia Rhodobacteraceae Garrity *et al.* 2006

Género *Roseovarius* Labrenz *et al.* 1999

Roseovarius aestuarii Yoon *et al.* 2008

Género *Ruegeria* (Uchino *et al.* 1999) Yi *et al.* 2007

Ruegeria ar enilitoris Park & Yoon 2013

Género *Pseudovibrio* Shieh *et al.* 2004

*Pseudovibrio hongkongensis*¹ Xu *et al.* 2015

*P. stylochi*¹ Zhang *et al.* 2016

P. ascidiaceicola Fukunaga *et al.* 2006

Subdivisión delta/epsilon

Clase Epsilonproteobacteria Garrity *et al.* 2006

Orden Campylobacterales Garrity *et al.* 2006

Familia Campylobacteraceae Vandamme & De Ley 1991

Grupo Arcobacter

Género *Arcobacter* (Vandamme *et al.* 1991) Perez-Cataluna *et al.* 2018

A. nitrofigilis (McClunget *et al.* 1983) Vandamme *et al.* 1991

Familia Helicobacteraceae Garrity *et al.* 2006

Género *Helicobacter* (Goodwin *et al.* 1989) Vandamme *et al.* 1991

? *H. alkaliphilus*

? *H. locisalis*

? *H. halophilus*

? *H. trueperi*

Orden Cellvibrionales Spring *et al.* 2015

Familia Microbulbiferaceae Spring *et al.* 2015

Género *Microbulbifer* (Gonzalez *et al.* 1997) Tang *et al.* 2008

M. elongatus (Humm 1946) Yoon *et al.* 2003

M. epialgicus Nishijima *et al.* 2009

M. variabilis Nishijima *et al.* 2009

Grupo Terrabacteriagroup

Filo Firmicutes corrig. Gibbons & Murray 1978

Clase Bacilli Ludwig *et al.* 2010

Orden Bacillales Prevot 1953

Familia Bacillaceae Fischer 1895

Género *Fictibacillus* Glaeser *et al.* 2013

Fictibacillus barbaricus (Taubel *et al.* 2003) Glaeser *et al.* 2013

F. phosphorivorans Glaeser *et al.* 2013

Género *Oceanobacillus* Lu *et al.* 2002 emend. Hirota *et al.* 2013

Oceanobacillus picturae (Heyrman *et al.* 2003) Lee *et al.* 2006

Familia Paenibacillaceae De Vos *et al.* 2010

Género *Paenibacillus* Ash *et al.* 1994 emend. Huang *et al.* 2017

Paenibacillus cineris Logan *et al.* 2004

Familia Staphylococcaceae Schleifer & Bell 2010

Género *Staphylococcus* Rosenbach 1884

Staphylococcus epidermidis (Winslow & Winslow 1908) Evans 1916

Anexo II

Medios de cultivos empleados en el aislamiento, purificación y evaluación de crecimiento de las cepas aisladas en *Pericelis nazahui*

Agar marino (sensus Xu et al. 2015)

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad</i>
Peptona	5.0 g
Extracto de levadura	1.0 g
Citrato férrico	0.1 g
Cloruro de sodio	19.45 g
Cloruro de magnesio	8.8 g
Sulfato de sodio	3.24 g
Cloruro de calcio	1.8 g
Cloruro de potasio	0.55 g
Bicarbonato de sodio	0.16 g
Bromuro de potasio	0.08 g
Cloruro de estroncio	34.0 mg
Ácido bórico	22.0 mg
Silicato de sodio	4.0 mg
Fluoruro de sodio	2.4 mg
Nitrato de amonio	1.6 mg
Fosfato disódico	8.0 mg
Agar	5.0 g
pH	7.0-7.5
Agua destilada	1,000 ml

Instrucción: Mezclar cuidadosamente todos los reactivos y diluir en el agua marina, ajustar el valor de pH, calentar hasta ebullición; esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 lb/plg².

Agar M2

Medio sólido con antibiótico
(*Sensus Mincer et al. 2002*)

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad</i>
Agar	16 g
Ciclohexamida	0.1 g
Gentamicina	0.005 g
pH	7.0-7.5
Agua marina	1,000 ml

Instrucción: Disolver el agar cuidadosamente en el agua marina, ajustar el valor de pH, calentar a ebullición durante 1 minuto; esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 lb/plg². Agregar solución de ciclohexamida y gentamicina esterilizados por filtración.

Agar A1 (sensus Xu et al. 2015)

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad</i>
Agar	16 g
Almidón	10 g
Levadura	4 g
Peptona	2 g
pH	7.0-7.5
Agua marina	1,000 ml
Agar	16 g

Instrucción: Disolver cuidadosamente las sustancias en el agua marina y ajustar pH, calentar a ebullición durante 1 minuto, esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 lb/plg².

**Agar de dextrosa y papa (PDA)
(Visagie et al. 2014a)**

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad</i>
Agar de dextrosa y papa	39 g
Agua marina	1,000 ml
pH	7.3-3

Instrucción: Disolver cuidadosamente las sustancias en el agua marina y ajustar a un pH ácido (~5), calentar a ebullición durante 1 minuto, esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 lb/plg².

Agar Czapek (CZA) (Modificado de Visagie et al. 2014a)

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad</i>
Dextrosa	30
Nitrato de sodio	2
Fosfato dipotásico	1
Sulfato de magnesio	0.5
Cloruro de potasio	0.5
Sulfato de hierro	0.01
Agar	15
pH	7.3-3
Agua marina	1,000 ml

Instrucción: Disolver cuidadosamente las sustancias en el agua marina y ajustar a un pH ácido (~5), calentar a ebullición durante 1 minuto, esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 lb/plg².

Anexo III

Formato para el registro de la Información y características macro y microscópicas consideradas en el aislamiento y purificación de los microorganismos presentes en *Pericelis nazahui*

Datos de aislamiento					
Organismo/sustrato de aislamiento					
Fecha de cultivo					
Medio de cultivo					
T°					
pH					
Características de los organismos presentes					
Color					
Forma					
No. de microorganismo					
Datos de purificación					
No. de cepa					
Fecha de cultivo					
<i>Características de la colonia</i>					
Tamaño	Grande > 1 mm	Mediana Aprox = 1 mm	Pequeña < 1 mm		
Forma	Circular	Irregular	Filamentoso	Rizoide	
Borde	Entero	Irregular	Filiforme	Ondulado	Lobulado
Elevación	Convexa	Abultada	Plana		
Consistencia	Viscosa	Mantecosa	Algodonosa		
Superficie					
Apariencia	Opaca		Translúcida		
Tipo de tinción					
Tipo de célula	Oval	Bacilos	Espiral	Cocos	
Tipo de conidióforo					
Estructuras del conidióforo					
Marcador molecular					
Observaciones					

Anexo IV

Metodología para preparar *buffer* y gel de electroforesis

Tampón de electroforesis de tris-borato-EDTA (TBE) 5X

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad</i>
Tris base	54 g
Ácido bórico	27.5 g
EDTA	20 ml
Agua destilada	1000 ml

Instrucción: Disolver cuidadosamente todos los reactivos, ajustar el pH=8 y posteriormente almacene hasta su uso.

Para preparar el EDTA disuelva 18.6 g en 100 ml y ajuste el pH a 8 unidades.

TBE 1X

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad</i>
TBE 5X	50 ml
Agua destilada	450 ml
pH	8

Instrucción: Para obtener una solución 1X, disuelva 50 ml de TBE 5X en 450 ml de agua destilada y almacene hasta su uso, ajuste el pH=8 unidades.

Agarosa al 1% (modificado de Lee *et al.* 2012)

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad</i>
Agarosa	0.5g
TBE 1X	50 ml

Instrucción: Para preparar el gel, se mezcla 50 ml de TBE 1X y 0.5 g de agarosa, la mezcla es calentada en el microondas hasta ser disuelta evitando que hierva; ya disuelta, se le agrega 4 µl de bromuro de etidio para facilitar la visualización del ADN por fluorescencia; posteriormente se vierte en el soporte de la cámara de electroforesis previamente sellada y se le coloca el peine de pozos de carga, finalmente se deja solidificar.

La solución restante de TBE 1X se vierte en la cámara de electroforesis. Para cargar las muestras se mezcla 1 µl de tampón de carga (sacarosa) y 4 µl de la muestra de ADN para cada una de las cepas, posteriormente se depositan en los pozos de carga. En el proceso de lectura o corrida de las muestras cargadas, la cámara se cierra y se conecta a una fuente de corriente continua, durante 1 h 40 min, a 120 v y a 95 Amp; una vez finalizado este proceso, el gel de electroforesis es observado en un transiluminador de luz UV (modificado de Lee *et al.* 2012).

