



PRIMER ESTUDIO DE DOS ESPECIES DE *ASPERGILLUS* AISLADAS DE BOSQUES DE MANGLAR EN ECUADOR

FIRST REPORT OF TWO *ASPERGILLUS* SPECIES ISOLATED FROM MANGROVE FOREST IN ECUADOR

Katheryn Sacheri-Viteri¹, Juan Fernández-Cadena², Natalia
Molina-Moreira¹ y Derly Andrade-Molina*²

¹Facultad de Ingeniería, Universidad Espíritu Santo, Avenida Samborondón, Km 2.5, vía a Samborondón, Ecuador.

²Laboratorio de Ciencias Omicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Espíritu Santo, Avenida Samborondón, Km 2.5, vía a Samborondón, Ecuador.

*Autor para correspondencia: dmandrademolina@uees.edu.ec

Manuscrito recibido el 14 de enero de 2020. Aceptado, tras revisión, el 8 de marzo de 2021.

Resumen

Los bosques de manglar están distribuidos en las zonas costeras de las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, siendo especies tolerantes a altas temperaturas, humedad, mareas y las fluctuaciones salinas. Por lo tanto, se ven expuestos a múltiples fluctuaciones y condiciones ambientales extremas. El ecosistema de manglar no solo es hábitat de vida silvestre, sino que también es colonizado por diversas comunidades de microorganismos, como los hongos. Varios de estos hongos tienen múltiples funciones ecológicas, ya sea saprófitos o patógenos oportunistas. Actualmente el interés de estudiar estos microorganismos radica en su potencial biotecnológico dada su capacidad para tolerar ambientes hostiles. Ejemplo de ello son algunas especies del género *Aspergillus*, las cuales son utilizadas en biomedicina, industrial y la bioremediación. En el presente estudio se aislaron e identificaron de acuerdo con sus características morfológicas y moleculares especies de hongos del género *Aspergillus*. En este estudio se reportan los primeros aislados de *Aspergillus niger* y *Aspergillus aculeatus* de manglares en Ecuador. Investigaciones como ésta resaltan la importancia de determinar el rol de los hongos en el ecosistema de manglar.

Palabras clave: Manglar, *Aspergillus niger*, *Aspergillus aculeatus*, caracterización. molecular.

Abstract

Mangroves forests are located in tropical and subtropical regions. The adaptation and distribution in coastal regions is influenced by temperature, humidity, tidal and saline fluctuations; therefore, there are exposed to multiple environmental fluctuations. Mangroves are inhabited by wildlife but also is supported by a diverse community of microorganisms, including fungi. Several fungi in mangroves have multiple ecological roles as saprotrophs or as an

opportunistic pathogen, many of them are also used in the industry, as the genus *Aspergillus*, that are important in biomedicine, industrial and environmental applications. In this study, we isolated species of fungi from mangrove stems and propagules. They were identified by both morphological and by its molecular characteristics. Here, we report the first isolated of *Aspergillus niger* and *Aspergillus aculeatus* from mangroves in Ecuador. Research such as these highlights the importance to determine the role of fungi in the mangrove ecosystem.

Keywords: Mangrove, *Aspergillus niger*, *Aspergillus aculeatus*, molecular characterization.

IDs Orcid:

Katheryn Sacheri-Viteri: <http://orcid.org/0000-0002-2650-7438>

Juan Fernández-Cadena: <http://orcid.org/0000-0002-0398-8371>

Natalia Molina-Moreira: <http://orcid.org/0000-0002-8197-1137>

Derly Andrade-Molina: <http://orcid.org/0000-0002-2651-5884>

Accepted version

1 Introducción

Los bosques de manglar son estuarios situados en regiones tropicales y subtropicales; este ecosistema se caracteriza por su alta tolerancia a la salinidad (Gopal y Chauhan, 2006). La distribución de manglares está fuertemente influenciada por la temperatura, la humedad, las corrientes de agua y las variaciones en el flujo de mareas y vientos; y junto con la alta abundancia y variedad de microorganismos se convierte en un importante ecotono dinámico entre el medio ambiente terrestre y marino (Sridhar, Roy y Sudeheep, 2011). Teniendo en cuenta los microorganismos, los hongos descomponen significativamente la materia orgánica y desempeñan un papel fundamental en la productividad y biodiversidad de este ecosistema (Friggens, Taylor y Koukol, 2017). Los hongos que habitan en los bosques de manglar son saprofitos, simbioses o parásitos, tanto en filamentos como en levadura (Rodríguez y col., 2013). Estos hongos pueden colonizar raíces, tallos y ramas sumergidas en el agua o se pueden encontrar en la superficie del agua (Li y col., 2016). La diversidad de hongos depende del metabolismo ya que en los estratos se asocia con cambios diarios en la salinidad, e inundaciones intermitentes debido a la marea, exposición a la niebla de sal y disponibilidad de sustratos (Hrudayanath, Bikash y Rashmi, 2013).

Las actividades humanas constituyen el principal problema para los manglares; entre las principales actividades humanas están la destrucción de hábitats, la contaminación y la sobreexplotación de los recursos (Díaz, 2011). Muchas ciudades se han asentado cerca de los manglares, por lo que están constantemente expuestos a la contaminación que está formada por actividades antropogénicas y a una variedad de productos químicos, incluyendo metales pesados que se consideran un grave problema para el ecosistema de manglares, ya que se acumulan en la superficie de los sedimentos, aumentando su concentración en la zona (Fernández y col., 2014).

Los géneros más comunes de hongos aislados de los manglares *Rhizophora spp.* son *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Cylindrocephalum*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Myrothecium*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Pestalotia*, *Phyllosticta*, *Trichoderma* y *Verticillium* (Sarma, 2012). Sin embargo, pocos es-

tudios describen el papel de estos hongos en el ecosistema de manglares. La mayoría de los hongos identificados en los ecosistemas de manglares son endófitos; estos hongos son muy importantes ya que han sido capaces de producir metabolitos bioactivos para modificar los mecanismos de defensa de su huésped, permitiendo que ambos subsistan en el medio ambiente (Sánchez y col., 2013). Varios hongos (por ejemplo, *Aspergillus*, *Absidia*, *Cunninghamella*, *Mucor* y *Rhizopus*) son capaces de acumular metales pesados en sus compartimentos celulares, ofreciendo una alternativa en biorremediación de áreas contaminadas a bajo costo, en comparación con los métodos tradicionales de descontaminación (Cardoso y col., 2010).

En muchos casos, los bosques de manglares están formados por monocultivos naturales de alta densidad, donde los árboles están constantemente expuestos a patógenos (Ramírez, Serrano y Sandoval, 2006). Sin embargo, los registros fitopatógenos en los ecosistemas de manglares son escasos (Pan y col., 2018). La mayoría de los hongos que colonizan los manglares pertenecen al grupo Ascomycota, y varias especies parasitarias pertenecientes a este grupo pueden producir la muerte de las plantas (Pan y col., 2018). Aunque la relación entre la diversidad fúngica y los manglares no está clara, se sabe que los hongos marinos son responsables de la descomposición de la madera de manglar en las especies más comunes, incluyendo *Rhizophora* y han sido descritos como una biomasa digerible más eficiente que las bacterias (Steinke y Jones, 1993; Kathiresan y col., 2011). El género *Fungus Trichoderma* y *Traustreochystrids* son saprofitas eficientes debido a la actividad enzimática, y es un microorganismo potencial a la celulosa degradada, almidón, lípidos, proteínas y lignina; mientras que *Thichosporon*, *Fusarium* y *Aspergillus* presentaron la actividad máxima de celulasa y proteasa en las hojas de manglares (Kathiresan y col., 2011).

El *Aspergillus* está ampliamente distribuido en la naturaleza debido a la fácil dispersión de sus conidios y su pequeño tamaño; esto les permite permanecer en el medio ambiente durante un largo tiempo (Abarca, 2000). El género *Aspergillus* es muy interesante pues es muy completo, abarca desde fábricas de células industriales, organismos modelo y patógenos humanos, pues tiene una producción prolífica de metabolitos secundarios bioactivos

(Kjærboelling y col., 2018). Estos hongos son importantes en la descomposición de la materia orgánica y en la defensa del huésped contra microorganismos altamente patógenos (Ramírez, Serrano y Sandoval, 2006). Las aplicaciones de estos hongos son necesarias para mejorar los futuros estudios llevados a cabo en ómicos (Shu-Lei y col., 2020). Este estudio constituye el primer reporte de dos especies de *Aspergillus* aisladas de manglares en Ecuador e identifica sus características moleculares y morfológicas.

2 Materiales y Métodos

2.1 Área de muestreo y recolección

El Parque Histórico de Guayaquil - PHG (Parque Histórico de Guayaquil) es un remanente de bosque de manglares ubicado en la ciudad de Samborondón, Ecuador. Se identificaron lesiones con síntomas asociados con la presencia de hongos en las ramas, posteriormente se recolectaron y se almacenaron en bolsas herméticas para su posterior análisis.

2.2 Caracterización morfológica de las muestras de hongos

La caracterización morfológica se realizó en cultivos con evidente estructura reproductiva o en cepas con más de 20 días de tiempo de cultivo. El micelio se separó usando cinta adhesiva y se colocó en una lámina con una gota de lactofenol, y luego se selló con un cubreobjetos. La visualización de las estructuras se realizó en un microscopio óptico Nikon Eclipse E100 con una cámara digital integrada. Para determinar la afiliación taxonómica, se utilizaron tanto la base de datos del micobanco (<http://mycobank.org>) como las claves taxonómicas (Hoog y col., 2001).

2.3 Aislamiento y purificación de los hongos

El material vegetal se desinfectó con un 1% de hipoclorito de sodio con lavados repetidos usando agua estéril. Posteriormente se cortaron fragmentos con un bisturí estéril y se depositaron en medios de cultivo ASD (Sabouraud Dextrosa Agar, OXOID), complementados con 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cloranfenicol para el

aislamiento y la diferenciación de los hongos. Las placas de cultivo se incubaron a temperatura ambiente y en completa oscuridad hasta que se observó el crecimiento micelar. Este proceso se repitió hasta que se obtuvieron aislados puros. Las muestras previamente aisladas fueron inoculadas en 150 ml de medio de cultivo líquido PW (peptona agua, CRITERIO y caldo nutritivo) complementadas con 15 ng/ml de cloranfenicol e incubadas durante 15 a 20 días hasta que apareció la biomasa. El micelio se filtró utilizando unidades de filtración estériles, y la biomasa se secó a 42 °C durante dos días y se almacenó a -80 °C hasta su posterior análisis.

2.4 Extracción de ADN

El material fúngico fue incubado con lisozima (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a 37 °C durante dos horas. La extracción de ADN se realizó utilizando los kits de aislamiento de ADN del suelo (QIAGEN, Carlsbad, EE.UU.) con las siguientes modificaciones: Los hongos se secaron previamente y congelaron a -80 °C y luego se transfirieron a los tubos de Powerbead, este material fue mezclado por vórtice durante tres minutos. Posteriormente, se añadieron 60 μL de tampón C1 y se realizó un vórtice durante otros tres minutos, luego se añadieron 20 μL de proteinasa K y se mezclaron con vórtice durante 1 minuto. La mezcla se centrifugó a 8.000 rpm 1 minuto, el sobrenadante se rescató en un nuevo tubo de eppendorf y se añadieron 250 μL de tampón C2, luego se mezcló nuevamente durante 5 segundos y se incubó a -20 °C durante 5 minutos. Las muestras se centrifugaron a temperatura ambiente a 8.000 rpm durante 1 minuto y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, posteriormente, se añadieron 200 μL de solución C3, se agitaron durante 1 minuto e incubaron a -20 °C durante 5 minutos.

Para el aislamiento del ADN, las muestras se centrifugaron a 8.000 rpm durante 1 minuto y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo con 1 ml de solución C4. La mezcla se centrifugó a 8.000 rpm durante 1 minuto, luego se añadieron 500 μL de solución C5 y se centrifugaron a 8.000 rpm durante 1 minuto. Para eluir el DBA, se añadieron 100 μL de agua ultrapura al centro de la columna, se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto y se almacenó a -20 °C hasta su posterior uso. La integridad del ADN se evaluó mediante electroforesis de gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1X (Tris, Acetato,

EDTA) complementado con un núcleo verde SyBR (Invitrogen), comparando la intensidad y la banda del peso molecular del ADN con 100 bp (Tracklit - Invitrogen). Las condiciones de electroforesis se realizaron a 100 voltios y 35 miliamperios.

2.5 Amplificación de las regiones ITS-1 e ITS-2 por reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Después de la extracción del ADN, se identificaron los hongos a nivel de género o especie a partir de la amplificación de las regiones intergénicas de rADN utilizando ITS-1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) y primers universales ITS-4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White y col., 1990). Las condiciones de PCR se realizaron en un volumen final de 30 μ L con una concentración final de 2.5 mM MgCl₂; 2 μ M primers; 2 U taq pol y tampón 1X PCR. El programa incluye desnaturalización a 95 °C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 59 segundos, 50 °C por segundos y extensión a 72 °C durante 1 minuto, con una extensión final de 72 °C durante 10 minutos.

2.6 Análisis de secuencias

Los amplificadores purificados se secuenciaron en MacroGen (Corea del Sur) y se editaron en Geneious Prime Software (versión 2019.1), con el fin de obtener una secuencia. La afiliación taxonómica se llevó a cabo usando el algoritmo de alineación BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). De igual forma, el análisis filogenético se reforzó utilizando el algoritmo Clustal W y Geneious Prime Software. Se generó un árbol por Neighbor Join (Saitou y Nei, 1987) y se utilizó el modelo a distancia de Kimura (Kimura, 1983) usando el software MEGA 7, con un bootstrap de 1000 repeticiones y eliminando información faltante. Los resultados se muestran usando iTOL (Letunic y Bork, 2016). Las secuencias ITS relacionadas con *Aspergillus* y registradas en la base de datos NCBI, utilizada en esta investigación, se presentan en la Tabla complementaria 1A. El teleomorfo de *Aspergillus* sp. utilizado en este estudio fue *Emiricella nidulans* (HQ026740.1), la resolución de los árboles se optimizó usando *Aspergillus elegans* (NR077196.1 y MH992144.1), y el grupo alternativo

fue *Saccharomyces cerevisiae* (MG775707.1).

3 Resultados

Dentro de los sustratos recogidos en el presente estudio se analizaron lesiones supuestamente causadas por hongos (Figura 1). De esta planta, se aislaron y se purificaron desde las ramas cinco cepas de hongos y una cepa aislada de los propágulos (Tabla 1), y en el momento de crecer en el medio de cultivo sólido, se formó un micelio blanco y más tarde se volvió negro o gris, con un micelio hundido (Figura 2 a-f). Al observar las características microscópicas, se determinó que estos aislados tienen una hifa lisa, con vesículas esféricas cubiertas por filias y conidios esféricos (Figura 2 h-l). Teniendo en cuenta las características macro y microscópicas, la clasificación clásica se realizó mediante el uso de claves taxonómicas (Hoog y col., 2001) y la base de datos Mycobank (<http://mycobank.org>). Como resultado, estos hongos pertenecen al género *Aspergillus* pero por el análisis ITS, los KCR3.2, KCR4.1sp y KCR15.1 corresponden a *Aspergillus niger*, mientras que los KCR4.1.1., KCR7.2.1. y KCR14 están relacionados con *Aspergillus aculeatus*.

De todas las 90 secuencias de nucleótidos, se utilizaron 438 posiciones en la región ITS en el análisis filogenético. A primera vista, todas las especies analizadas en este estudio pertenecen a la sección Nigri (Gams y col., 1986). El análisis es compatible con un Bootstrap con 1000 repeticiones y por el algoritmo "Neighbor Joining". El árbol muestra clados bien diferenciados y desarrollados entre especies de hongos en los grupos *A. niger* y *A. tubingensis* y entre *A. aculeatus* y *A. japonicus* (Figura 3). El dendrograma muestra que tanto *A. niger* como *A. tubingensis* serían la misma especie, esto también se observa entre *A. aculeatus* y *A. japonicus*.

Como se muestra en la Tabla 2, *A. niger* y *A. tubingensis* son similares en 89.6% en la alineación más grande con el tamaño 3 626 085 bp, y la similitud entre *A. aculeatus* y *A. japonicus* es de 90.9% con la alineación más grande de 3 727 362 bp. Esto demuestra que están muy cerca el uno del otro, pero también difieren con los miembros de otros clados (es decir, *A. niger* y *A. japonicus* son similares en un 78.3%).



Figura 1. Lesiones asociadas con la presencia de hongos en tallos de manglares.

Tabla 1. Caracterización molecular del hongo aislado de ramas y propágulos de manglares

Muestra	Cepa	Caracterización Molecular					
		Descripción	Máx. Total	Total	Covertura búsqueda (%)	Per. Ident (%)	Valor E
Tallos	KCR3.2	<i>Aspergillus niger</i>	1064	1224	100	99.83	0.0
	KCR4.1sp	<i>Aspergillus niger</i>	1048	1208	100	99.82	0.0
	KCR15.1	<i>Aspergillus niger</i>	1027	1178	100	99.82	0.0
	KCR4.1.1	<i>Aspergillus aculeatus</i>	874	874	100	100	0.0
	KCR14	<i>Aspergillus aculeatus</i>	946	946	83	99.81	0.0
Propágulo	KCR7.2.1	<i>Aspergillus aculeatus</i>	1031	1031	100	100	0.0

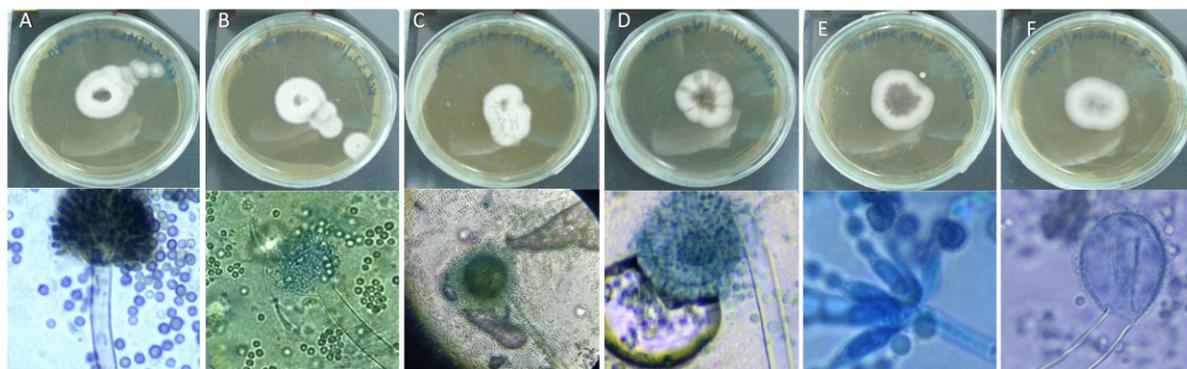


Figura 2. Características morfológicas de cepas fúngicas aisladas de manglares. (A-F) las mejores imágenes muestran el crecimiento micelar en el medio de cultivo sólido. A (KCR aislado 15.1); B (asylum KCR 3.2); C (KCR aislado 4.1 SP); D (KCR aislado 4.1.1); E (KCR 14 aislado); F (KCR aislado 7.2.1); en la imagen inferior se muestran las estructuras microscópicas de aislados de hongos de manglares.

A primera vista, se puede ver filogenéticamente que la región ITS no funciona bien en la resolución de grupos de hongos. Para obtener resultados satisfactorios, es necesario complementar estos análisis con la identificación morfológica y, en este caso, realizar una comparación entre genomas.

4 Discusión

En Ecuador, este estudio resulta de gran importancia pues sirve como una base del enfoque de microbioma en la identificación de hongos en los manglares. Se identificaron y purificaron dos especies de *Aspergillus*, *A. niger* y *A. aculeatus*, que habían

sido reportadas en otros bosques de manglares en Malasia, México, China e Indonesia (Sathiya y col., 2009; Deng y col., 2013; Li y col., 2017; Lumbreras-Martínez y col., 2018; Prihanto, Caisariyo y Pradarameswari, 2019). A pesar de que los hongos están ampliamente distribuidos en los árboles de los manglares, algunos de ellos cumplen con funciones ecológicas y fisiológicas para aumentar la tolerancia a las condiciones de estrés biótico y abiótico (Shu-Lei y col., 2020). Los estudios sobre la diversidad de hongos en manglares se centran principalmente en

hongos cultivables, pero son muy escasos los que estudian los hongos nativos no cultivables.

Tradicionalmente, la identificación, taxonomía y clasificación de *Aspergillus* se había concentrado a las características morfológicas (Patki, Singh y Meh-ta, 2015). Sin embargo, la clasificación taxonómica basada en la caracterización molecular se convirtió en herramienta esencial, pues permite distinguir las características filogenéticas (Samson y col., 2014).

Tabla 2. Comparación del genoma utilizando el algoritmo LASTZ: Los valores porcentuales son la identidad emparejada entre dos conjuntos de genomas, el valor numérico es la secuencia más grande que se compara en dos grupos de genomas.

	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	<i>A. aculeatus</i>	<i>A. japonicus</i>
<i>A. niger</i>	xxx	89.6%	78.3%	78.3%
<i>A. tubingensis</i>	3 626 085	xxx	78.2%	78.4%
<i>A. aculeatus</i>	3 727 362	4 803 603	xxx	90.9%
<i>A. japonicus</i>	1 444 553	4 803 603	3 727 362	xxx

Un trabajo publicado anteriormente sobre la relación filogenética de *Aspergillus* indicó que, aunque la amplificación de las regiones ITS fue aceptada como código de ADN para hongos en general (Conrad y col., 2012), el análisis filogenético no fue resolutivo para distinguir los clados uniseriados en la sección Nigri, especialmente al agregar las secuencias de *A. niger*, lo que podría conducir a una identificación errónea de las especies (Abarca, 2000; Perrone y col., 2008). Nuestros resultados son consistentes con muchas de las investigaciones. Las especies *A. aculeatus* y *A. japonicus* fueron filogenéticamente similares, al igual que *A. niger* y *A. tubingensis*. Esto también explica las pequeñas diferencias entre algunas especies pertenecientes a la sección Nigri, la especie *A. niger sensu stricto*, *A. tubingensis*, *A. foetidus*, y *A. brasiliensis* son morfológicamente idénticas y en conjunto se han llamado *A. niger* (Muniqué y col., 2009). Esto también coincide con lo reportado por Yokoyama y col. (2001) quienes describen que la mayoría de las especies de la sección Nigri son morfológicamente similares y la identificación molecular por mtADN y rADN ha sido confusa.

Las técnicas moleculares resueltas básicas como RFLP, AFLP, PFGE o la secuenciación de próxima generación - NGS mejorarían significativamente

el conocimiento y la comprensión de este hongo (Leong y col., 2006; Perrone y col., 2008; Quainoo y col., 2017). De igual forma, la comparación del genoma ofrece la mejor resolución para determinar los porcentajes de similitud entre las secuencias (Quainoo y col., 2017). En este estudio realizamos la comparación de similitud genética para determinar la diversidad genética entre *A. niger*, *A. fumigatus* y entre *A. aculeatus* y *A. japonicus*. Los resultados mostraron una alta similitud con una identidad media de nucleótidos (ANI) de aproximadamente el 90% de la especie analizada (Tabla 2). Estos resultados se pueden utilizar para explicar muchos aspectos, como el linaje de fondo de la cepa que muestra que este enfoque es altamente útil para los nuevos genetistas fúngicos.

Se ha demostrado que *Aspergillus* sp. está ampliamente distribuido en el medio ambiente, y es considerado como uno de los fitopatógenos más frecuentes, ya que su capacidad para producir toxinas altera el metabolismo de las plantas (Pavón y col., 2012). Algunos de estos hongos colonizan las raíces, facilitando su crecimiento y mejorando la calidad del pasto. Otras características son la solubilización del fósforo, la tolerancia del halo, y la acentuación del estrés salino a las plantas (Li y col., 2017).

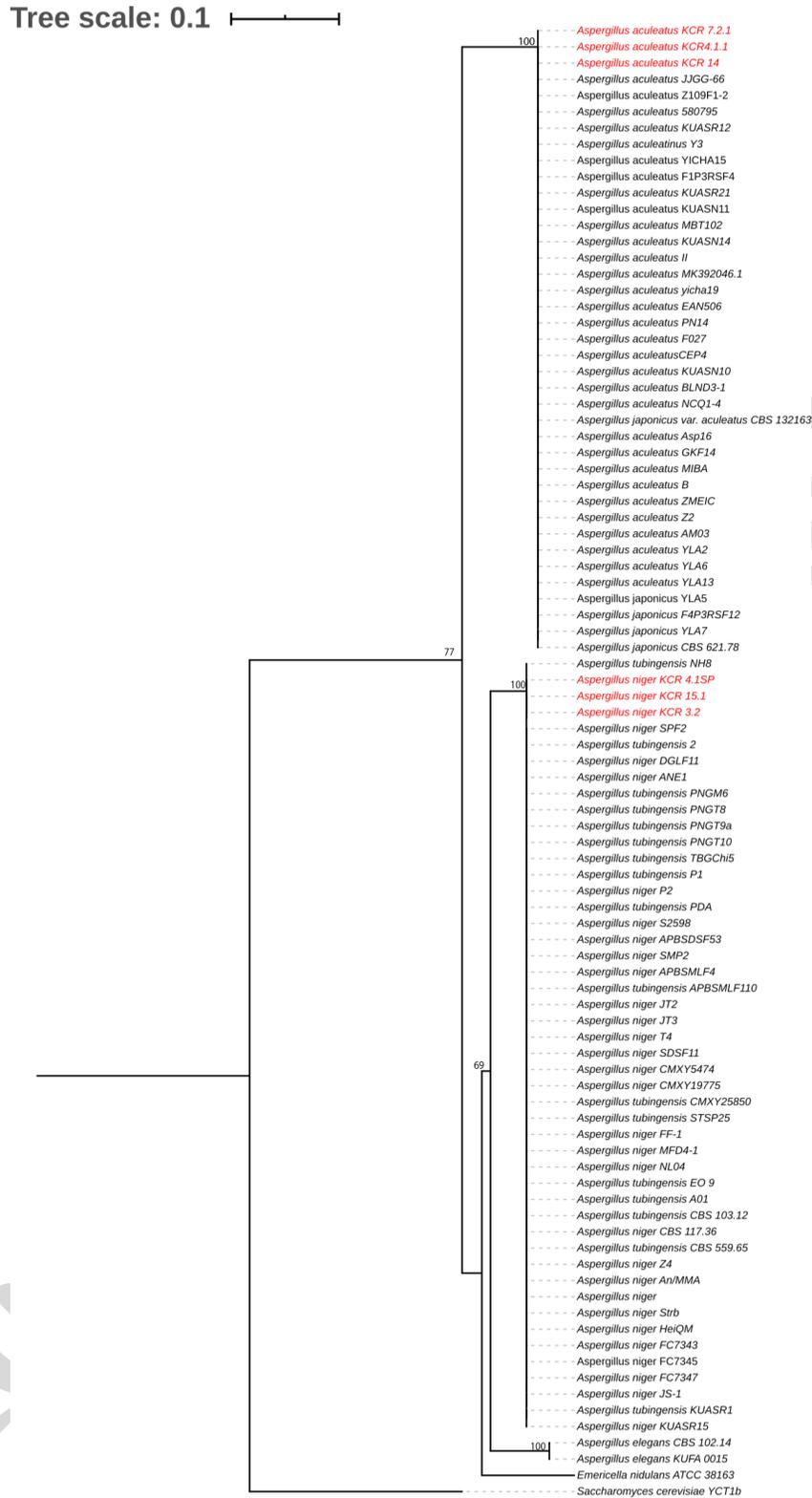


Figura 3. Análisis filogenético de hongos del género *Aspergillus* aislado del material vegetal de manglares. Las secuencias se alinearon por Clustal W. El análisis se realizó con un soporte de iteraciones Bootstrap 1000 y utilizando el algoritmo “neighbor joining” con el método 2-parámetros de Kimura. El teleomorfo de *Aspergillus* corresponde a *Emicella nidulans* (HQ026740.1) al alternativo *Saccharomyces cerevisiae* (MG775707.1) y a las dos especies de *Aspergillus elegans* (NR 077196.1, MH992144.1).

Aspergillus se caracteriza por producir micotoxinas y metabolitos secundarios que son importantes en la degradación de la materia orgánica y sirven como mecanismos de defensa hacia otros microorganismos (Pavón y col., 2012).

La importancia de este estudio también se basa en la capacidad biotecnológica que puede ofrecer el ecosistema de manglares y su componente microbiano. Una de estas se refiere a las características fisiológicas que los hongos presentan con la producción de proteínas específicas, por ejemplo, los metabolitos para inhibir el crecimiento celular de otros microorganismos en un entorno de alta salinidad (Nicoletti, Salvatore y Andolfi, 2018). También se ha demostrado que algunos *Aspergillus* sp. ayudan en los procesos de biorremediación de entornos contaminados por metales pesados, degradación de la celulosa extracelular y hemicelulosa (Marretero, Amores y Coto, 2012; Huachi, Macas y Méndez, 2014; Araujo y col., 2016).

A. niger se ha utilizado ampliamente para obtener enzimas tales como: α -amilasa, catalasa, celulasas, hemicelulasas, lipasa y ácidos orgánicos que podrían ser una alternativa para reemplazar los petroquímicos (Patki, Singh y Mehta, 2015; Ameen y col., 2016; Wang y col., 2016; Morthensen y col., 2017; Wang y col., 2019; Nascimento y col., 2019; Hossain y col., 2016). También se utiliza para los procesos de producción de ácido cítrico que se llevan a cabo por estado sólido, fermentación sumergida y superficial (López y col., 2006). *A. niger*, que se empezó a usar en la industria de la fermentación bioquímica y en la biotecnología industrial, produce una amplia gama de proteínas, enzimas y segundos metabolitos (Cairns, Nai y Meyer, 2018).

La importancia de *A. niger* para el medio ambiente se basa en su capacidad para bioacumular metales tóxicos (plomo, cadmio, cobre y cromo) (Rivera y col., 2015). Varios estudios han demostrado que *A. niger* tiene mayor capacidad para eliminar compuestos fenólicos, aceite de suelos contaminados y metales pesados, que el carbón activo granular, utilizado en varios ciclos de biosorción (Araujo y col., 2016; Marzan y col., 2017; Villalba, Cruz y Azuara, 2018). (Ghyadh, Al e Ibrahim, 2019) señaló que el hongo *Aspergillus niger* mostró en un 100% la mayor eficiencia en la reducción de las concentraciones de elementos pesados.

Aspergillus aculeatus mostró una alta resistencia a la toxicidad del cadmio (CD), protegió el fotosistema II contra el estrés de CD y aumentó la eficiencia del proceso de fotosíntesis en el césped inglés perenne. Estos resultados sugieren que *A. aculeatus* podría ser útil para pretratar suelos contaminados con CD (Han y col., 2018). También tiene un efecto importante en la atenuación del estrés salino ya que produce ácido indole-3-acético y sideróforos que confieren tolerancia de estrés salino a las plantas (Li y col., 2017).

La investigación sobre la capacidad metabólica de *A. niger* y *A. aculeatus* y su interacción con iones metálicos son limitadas (Emri y col., 2018). Aunque existen estudios sobre diferentes especies de *Aspergillus* en manglares, los informes sobre *niger* y *aculeatus* son escasos o nulos. Además, la mayoría de los estudios se centran en el potencial biotecnológico y biorremedial. Las especies de *Aspergillus* reducen las altas concentraciones de metales pesados, pero también producen un gran número de micotoxinas y metabolismo secundario, y pueden ser capaces de producir una gran parte de compuestos bioactivos que se utilizan en la industria farmacéutica (Frisvad y col., 2018; Shu-Lei y col., 2020). Se necesitan llevar a cabo más investigaciones sobre las especies de *Aspergillus* y sus aplicaciones para producir diferentes metabolitos secundarios bioactivos.

Los estudios exploratorios como los realizados en este trabajo permiten obtener nueva información sobre la participación de hongos en los ecosistemas de manglares, además de evaluar sus posibles roles como protectores para sus huéspedes o determinar si se trata de hongos patógenos que causan deterioro y descomposición de la madera en los manglares. Brevemente, este estudio se centró en el hongo endofítico, convirtiéndolo en un candidato potencial para futuras investigaciones. Por lo tanto, la diversidad de hongos en los ecosistemas de manglares es necesaria a partir de la secuenciación de genomas, ya que puede representar una estrategia útil para encontrar nuevas vías metabólicas y, posteriormente, nuevos compuestos y enzimas bioactivas.

5 Conclusiones

En este estudio reportamos la caracterización molecular y morfológica del hongo aislado de manglares pertenecientes al clado Nigri, el *Aspergillus niger* y el *Aspergillus aculeatus*. Este trabajo es un esfuerzo para entender la distribución de especies de hongos y destacar la importancia de determinar el papel del hongo en el ecosistema de manglares.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero brindado por el Centro de Investigaciones (CIN), Universidad Espíritu Santo, a los proyectos registrados bajo el número 2018MED001 y 2018ART006.

Referencias

- Abarca, M. (2000). «Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial». En: *Rev Iberoam Micol* 17.3, S79-S84. Online: <https://bit.ly/34C1Uyz>.
- Ameen, F. y col. (2016). «Biodegradation of diesel fuel hydrocarbons by mangrove fungi from Red Sea Coast of Saudi Arabia». En: *Saudi journal of biological sciences* 23.2, 211-218. Online: <https://bit.ly/3uJAAZT>.
- Araujo, J. y col. (2016). «Microanálisis de una cepa de *Aspergillus niger* biocatalizadora de hidrocarburos policíclicos aromáticos HPA». En: *Acta Microscopica* 25.2, 98-110. Online: <https://bit.ly/3uFJRcb>.
- Cairns, T., C. Nai y V. Meyer (2018). «How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research». En: *Fungal biology and biotechnology* 5.1, 1-14. Online: <https://bit.ly/3pdzowx>.
- Cardoso, A. y col. (2010). «Microorganisms in Industry and Environment». En: *Scientific e Industrial Research to Consumer Products*. Cap. Influence of the heavy metals on chitosan production by *Absidia corymbifera* UCP 0134, 176-180. Online: <https://bit.ly/2TBgTGQ>.
- Conrad, S. y col. (2012). «Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.16, págs. 6241-6246.
- Deng, C. M. y col. (2013). «Secondary metabolites of a mangrove endophytic fungus *Aspergillus terreus* (No. GX7-3B) from the South China Sea». En: *Marine Drugs* 7.11, 2616-2624. Online: <https://bit.ly/3izeia1>.
- Díaz, M. (2011). «Una revisión sobre los manglares: características, problemáticas y su marco jurídico. Importancia de los manglares, el daño de los efectos antropogénicos y su marco jurídico: caso sistema lagunar de Topolobampo». En: *Ra Ximhai: revista científica de sociedad, cultura y desarrollo sostenible* 7.3, 355-369. Online: <https://bit.ly/3wVdrFv>.
- Emri, T. y col. (2018). «Duplications and losses of genes encoding known elements of the stress defence system of the *Aspergilli* contribute to the evolution of these filamentous fungi but do not directly influence their environmental stress tolerance». En: *Studies in mycology* 91, 23-36. Online: <https://bit.ly/3fUMric>.
- Fernández, J. y col. (2014). «Heavy metal concentration in mangrove surface sediments from the north-west coast of South America». En: *Marine pollution bulletin* 82.1-2, 221-226. Online: <https://bit.ly/3fGWcSj>.
- Friggens, N., J. Taylor y O. Koukol (2017). «Diversity and community composition of aquatic ascomycetes varies between freshwater, estuarine and marine habitats in western Scotland». En: *Mycosphere* 8.9, 1267-1287. Online: <https://bit.ly/3pa1FnM>.
- Frisvad, J. y col. (2018). «Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*». En: *Applied Microbiology and Biotechnology* 102.22, 9481-9515. Online: <https://bit.ly/3fEbnvF>.
- Gams, W. y col. (1986). «Advances in Penicillium and Aspergillus systematics». En: Plenum Press. Cap. Infrageneric taxa of *Aspergillus*, 55-62. Online: <https://bit.ly/3yNZXwO>.
- Ghyadh, B., A. Al y Z. Ibrahim (2019). «Biotechnology of wastewater treatment with fungi (*Aspergillus niger* and *Rhizopus oligosporium*)». En: *Plant Archives* 19.2, 1546-1549. Online: <https://bit.ly/2RfcM2o>.
- Gopal, B. y M. Chauhan (2006). «Biodiversity and its conservation in the Sundarban Mangrove Ecosystem». En: *Aquatic Sciences* 68.3, 338-354. Online: <https://bit.ly/3A20EmU>.

- Han, S. y col. (2018). «Cadmium tolerance of perennial ryegrass induced by *Aspergillus aculeatus*». En: *Frontiers in microbiology* 9, 1579. Online: <https://bit.ly/3g3RrRW>.
- Hoog, G. de y col. (2001). *Atlas of clinical fungi*. Central bureau voor Schimmelcultures.
- Hossain, A. y col. (2016). «Rewiring a secondary metabolite pathway towards itaconic acid production in *Aspergillus niger*». En: *Microbial cell factories* 15.1, 1-15. Online: <https://bit.ly/3g5YUzV>.
- Hrudayanath, T., C. B. Bikash y R. M. Rashmi (2013). «Ecological role and biotechnological potential of mangrove fungi: a review». En: *Mycology* 4, págs. 54-71.
- Huachi, L., A. Macas y G. Méndez (2014). «Biodegradación de los fenoles presentes en el extracto de guarango (*Caesalpinia spinosa*) y en los colorantes indigo carmín, naranja II y rojo fenol a través de *Trametes versicolor* y *Aspergillus niger*». En: *La Granja* 20.2, 29-35. Online: <https://bit.ly/2RToFvj>.
- Kathiresan, K. y col. (2011). «Microbial enzyme activity in decomposing leaves of mangroves». En: *International Journal of Advanced Biotechnology and Research* 2.3, 382-389. Online: <https://bit.ly/3zX1Fg9>.
- Kimura, M. (1983). *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press.
- Kjærboelling, I. y col. (2018). «Linking secondary metabolites to gene clusters through genome sequencing of six diverse *Aspergillus* species». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115.4, E753-E761. Online: <https://bit.ly/3p8GwdO>.
- Leong, K. y col. (2006). «The use of text messaging to improve attendance in primary care: a randomized controlled trial». En: *Family practice* 23.6, 699-705. Online: <https://bit.ly/3cymxjN>.
- Letunic, I. y P. Bork (2016). «Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees». En: *Nucleic acids research* 44.W1, W242-W245. Online: <https://bit.ly/3wVSVEq>.
- Li, J. y col. (2016). «Community structure of endophytic fungi of four mangrove species in Southern China». En: *Mycology* 7.4, 180-190. Online: <https://bit.ly/3ieRHQF>.
- Li, X. y col. (2017). «The fungus *Aspergillus aculeatus* enhances salt-stress tolerance, metabolite accumulation, and improves forage quality in perennial ryegrass». En: *Frontiers in microbiology* 8, 1664. Online: <https://bit.ly/3g8VP1P>.
- López, C. y col. (2006). «Producción de ácido cítrico con *Aspergillus niger* NRRL 2270 a partir de suero de leche». En: *Dyna* 73.150, 39-57. Online: <https://bit.ly/34CxQ5R>.
- Lumbreras-Martínez, H. y col. (2018). «Bioprospecting of fungi with antiproliferative activity from the mangrove sediment of the Tampamachoco coastal lagoon, Veracruz, Mexico». En: *Scientia fungorum* 48, págs. 53-60.
- Marrero, J., I. Amores y O. Coto (2012). «Fitorremediación, una tecnología que involucra a plantas y microorganismos en el saneamiento ambiental». En: *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar* 46.3, 52-61. Online: <https://bit.ly/3g61uGa>.
- Marzan, L. y col. (2017). «Isolation and biochemical characterization of heavy-metal resistant bacteria from tannery effluent in Chittagong city, Bangladesh: Bioremediation viewpoint». En: *The Egyptian Journal of Aquatic Research* 43.1, 65-74. Online: <https://bit.ly/3icuG0M>.
- Morthensen, S. y col. (2017). «Significance of membrane bioreactor design on the biocatalytic performance of glucose oxidase and catalase: Free vs. immobilized enzyme systems». En: *Biochemical Engineering Journal* 117, 41-47. Online: <https://bit.ly/3g5xFoZ>.
- Munique, L. y col. (2009). «Genetic relationships among strains of the *Aspergillus niger* aggregate». En: *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52.52(sep), 241-248. Online: <https://bit.ly/3fZmuyd>.
- Nascimento, P. A. y col. (2019). «Effects of cholinium-based ionic liquids on aspergillus niger lipase: stabilizers or inhibitors». En: *Biotechnology Progress* 5.35, e2838.
- Nicoletti, R., M. Salvatore y A. Andolfi (2018). «Secondary metabolites of mangrove-associated strains of *Talaromyces*». En: *Marine Drugs* 16.1, 12. Online: <https://bit.ly/3vR0RXF>.
- Pan, M. y col. (2018). «*Cytospora piceae* sp. nov. associated with canker disease of *Picea crassifolia* in China». En: *Phytotaxa* 383.2, 181-196. Online: <https://bit.ly/2UKXaFn>.
- Patki, J., S. Singh y S. Mehta (2015). «Partial purification and characterization of phytase from bacteria inhabiting the mangroves of the western coast of India». En: *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 4.9, 156-169. Online: <https://bit.ly/2TEfglu>.

- Pavón, M. y col. (2012). «Importancia del género *Alternaria* como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas». En: *Nutrición Hospitalaria* 27.6, 1772-1781. Online: <https://bit.ly/3xTvf48>.
- Perrone, G. y col. (2008). «Aspergillus in the genomic era». En: Wageningen Academic Publishers. Cap. Aspergilli in the biotechnology and agriculture, págs. 179-2013.
- Prihanto, A. A., I. O. Caisariyo y K. A. Pradarameswari (2019). «*Aspergillus sp.* as a potential producer for L-Asparaginase from mangrove (*Avicennia germinans*)». En: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 230.1, pág. 012101.
- Quainoo, S. y col. (2017). «Whole-genome sequencing of bacterial pathogens: the future of nosocomial outbreak analysis». En: *Clinical microbiology reviews* 30.4, 1015. Online: <https://bit.ly/3pmmun5c>.
- Ramírez, Ninfa, José Antonio Serrano y Horacio Sandoval (2006). «Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México». En: *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 37.3, págs. 56-71.
- Rivera, E. y col. (2015). «Remoción de Cromo (VI) por una Cepa de *Aspergillus niger* Resistente a Cromato». En: *Información tecnológica* 26.4, 13-20. Online: <https://bit.ly/3jlMtmH>.
- Rodríguez, M. y col. (2013). *Manglares de México/Extensión, distribución y monitoreo*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Online: <https://bit.ly/3fLwo7M>.
- Saitou, N. y M. Nei (1987). «The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.» En: *Molecular biology and evolution* 4.4, 406-425. Online: <https://bit.ly/3zZs6S9>.
- Samson, R. y col. (2014). «Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*». En: *Studies in mycology* 78, 141-173. Online: <https://bit.ly/3fOKCoa>.
- Sánchez, R. y col. (2013). «Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina». En: *TIP Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 16.2, 132-146. Online: <https://bit.ly/2Rlsedf>.
- Sarma, V. (2012). «Diversity and distribution of marine fungi on *Rhizophora spp.* in mangroves». En: *Biology of Marine Fungi*, 243-275. Online: <https://bit.ly/3g6LljM>.
- Sathiya, P. y col. (2009). «Optimization of friction welding parameters using evolutionary computational techniques». En: *Journal of materials processing technology* 209.5, 2576-2584. Online: <https://bit.ly/2Rp2QU6>.
- Shu-Lei, J. y col. (2020). «Fungi in mangrove ecosystems and their potential applications». En: *Critical Reviews in Biotechnology* 40.6, 852-864. Online: <https://bit.ly/3g6VvAX>.
- Sridhar, K., S. Roy y N. Sudeheep (2011). «Assemblage and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in mangrove plant species of the southwest coast of India». En: *Mangroves ecology, biology and taxonomy*, 257-274. Online: <https://bit.ly/3i8UHOm>.
- Steinke, T. y E. Jones (1993). «Marine and mangrove fungi from the Indian Ocean coast of South Africa». En: *South African Journal of Botany* 59.4, 385-390. Online: <https://bit.ly/3A0tUKI>.
- Villalba, A., M. Cruz y G. Azuara (2018). «*Aspergillus niger* Tiegh., isolated in Sonora, Mexico: metal tolerance evaluation». En: *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente* 24.2, 131-146. Online: <https://bit.ly/3xTDVaM>.
- Wang, J. y col. (2019). «Delignification overmatches hemicellulose removal for improving hydrolysis of wheat straw using the enzyme cocktail from *Aspergillus niger*». En: *Bioresource technology* 274, 459-467. Online: <https://bit.ly/34HVjTo>.
- Wang, S. y col. (2016). «Characterization of a starch-hydrolyzing α -amylase produced by *Aspergillus niger* WLB42 mutated by ethyl methanesulfonate treatment». En: *International journal of biochemistry and molecular biology* 7.1, 1. Online: <https://bit.ly/3yai2nV>.
- White, T.J. y col. (1990). «PCR Protocols: a guide to methods and applications». En: ed. por M.A. Innis y col. New York, USA: Academic Press. Cap. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, 315-322.
- Yokoyama, K. y col. (2001). «Identification, classification and phylogeny of the *Aspergillus* section Nigri inferred from mitochondrial cytochrome b gene». En: *FEMS Microbiology Letters* 200.2, 241-246. Online: <https://bit.ly/3h7y3nF>.

Apéndice

Tabla 1. A: Lista del número de especies de acceso de GenBank utilizadas en el presente estudio.

Especies	<i>Aspergillus aculeatus</i>	<i>Aspergillus japonicus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus tubingensis</i>
Secuencia ITS por número de ascensión	MK644143.1	LC496497.1	KY082744.1	MN589663.1
	MG548756.1	MK035987.1	KY400582.1	MN239975.1
	MK371746.1	LC496498.1	KY566164.1	KY593521.1
	MN187297.1	MH861173.1	MF379661.1	KY593522.1
	MF564097.1		MG575468.1	KY593523.1
	MK271293.1		MG669185.1	KY593524.1
	MK035984.1		MG675233.1	MF143083.1
	MN187365.1		MG733652.1	MF379660.1
	MN187971.1		MG734750.1	MG279093.1
	MK886612.1		MG734751.1	MG733758.1
	MN187974.1		MG833314.1	MG991653.1
	MK911714.1		MG840739.1	MH045586.1
	MK392046.1		MG991588.1	MH398047.1
	MK418753.1		MG991627.1	MH540151.1
	MK518394.1		MH064151.1	MH854604.1
	MK559536.1		MH109325.1	MH858714.1
	MN088378.1		MH181162.1	MN187071.1
	MN173148.1		MH855726.1	
	MN186997.1		MH892847.1	
	MN396714.1		MK028957.1	
	MN509058.1		MK256745.1	
	MH865976.1		MK372989.1	
	MH656795.1		MK577432.1	
	MK713418.1		MK693450.1	
	MK733917.1		MK693453.1	
	MK788185.1		MK949087.1	
	MH892843.1		MN187307.1	
	MH892845.1			
	MK811100.1			
	LC496490.			
	LC496491.1			
	LC496492.1			