

Informe final* del Proyecto ME008

Síndrome de nariz blanca: Una zoonosis emergente que amenaza los quirópteros de México*

Responsable:	Dr. Víctor Sánchez Cordero Dávila
Institución:	Universidad Nacional Autónoma de México
Correo electrónico:	victor@ib.unam.mx
Teléfono/Fax:	55-5622-9147
Fecha de inicio:	29-Enero-2016
Fecha de término:	1-Noviembre-2021
Principales resultados:	Base de datos, informe final, Fichas.
Forma de citar** el informe final y otros resultados:	Sánchez-Cordero, V. Rodríguez-Moreno, A., Gutiérrez- Granados, G. y Castellanos Moguel, J. 2021. Caracterización de hongos asociados a murciélagos. en: Síndrome de nariz blanca: Una zoonosis emergente que amenaza los quirópteros de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología. Informe final SNIB-CONABIO. Proyecto No. ME008. Ciudad de México.

Resumen:

El síndrome de la nariz blanca (SNB) provocado por el hongo (*Pseudogymnoascus destructans* antes en género *Geomyces*) es una enfermedad con altas mortalidades que afecta murciélagos insectívoros que hibernan. Es llamado así por su manifestación física alrededor, principalmente, de la nariz de diversas especies de murciélagos. El contagio del SNB es por contacto directo entre murciélagos, aunque el hombre es un vector potencial ya que transporta las esporas del hongo de cueva en cueva. En México no existe ninguna información sobre este síndrome. Sin embargo, es altamente probable que ingrese al país dado que existen las condiciones ambientales para que se dé la infección. El presente proyecto plantea la creación de modelos de nicho ecológico para determinar los sitios donde potencialmente existan en México las condiciones ambientales para el desarrollo del hongo. Además, propone una caracterización de las cuevas seleccionadas a través del modelado de nicho ecológico y de la comunidad de murciélagos que habitan estas. Adicionalmente se modelarán las especies *M. albescens* y *M. carteri* incluidas en la NOM-059-SEMARNAT-2010.

-
- * El presente documento no necesariamente contiene los principales resultados del proyecto correspondiente o la descripción de los mismos. Los proyectos apoyados por la CONABIO así como información adicional sobre ellos, pueden consultarse en www.conabio.gob.mx
 - ** El usuario tiene la obligación, de conformidad con el artículo 57 de la LFDA, de citar a los autores de obras individuales, así como a los compiladores. De manera que deberán citarse todos los responsables de los proyectos, que proveyeron datos, así como a la CONABIO como depositaria, compiladora y proveedora de la información. En su caso, el usuario deberá obtener del proveedor la información complementaria sobre la autoría específica de los datos.

Síndrome de Nariz Blanca: Una zoonosis emergente que amenaza los quirópteros de México

Caracterización de hongos asociados a murciélagos

Introducción

El síndrome de la Nariz Blanca es una zoonosis emergente causada por *Pseudogymnoascus* (= *Geomyces*) *destructans* Blehert et Gargas, que ha tenido un fuerte impacto en las poblaciones de murciélagos de zonas frías en el Continente Americano. Este hongo ha sido reportado como psicrófilo, lo que le permite vivir en sitios donde el agua es escasa, como por ejemplo el interior de cuevas; sin embargo, especies relacionadas han sido encontradas en suelos templados y ambientes marinos, además de ser queratinofílico y halotolerante, se ha aislado a partir de materia vegetal en descomposición, principalmente celulosa, así como de guano de pingüino, gaviota y petrel así como de zonas donde hay actividad animal, sin embargo esto no es exclusivo, ya que también ha sido detectado en sitios donde la actividad de mamíferos o aves es baja (Hayes, 2012).

El género *Geomyces* es dispersado por aire, agua, y se ha obtenido de plumas, pelo, artrópodos, y diversos fomites, entre los que se encuentran los equipos de excursionismo.

En México no hay un reporte oficial de síndrome de nariz blanca, sin embargo, es necesario caracterizar la microbiota fúngica presente en los murciélagos de los géneros que pueden ser susceptibles de ser parasitados por *Geomyces destructans*, para establecer antecedentes en caso de que llegase a producirse un brote de dicho agente infeccioso.

Además, es necesario conocer si éste hongo es capaz de crecer o permanecer latente en temperaturas como las que se encuentran en México, así como determinar si presenta factores de patogenicidad tales como las enzimas proteolíticas y queratinolíticas o dimorfismo, lo que le daría una ventaja para la colonización de hábitat cálidos.

Metodología

Aislados y su conservación

Se utilizó la cepa de *Geomyces destructans* (Blehert et Gargas) ATCC MYA-4855 como referente de macro y micromorfología así como para pruebas de crecimiento radial, termotolerancia y capacidad de producción de proteasas en medios sólidos.

Los aislados obtenidos a partir de la superficie de los especímenes de murciélagos se purificaron, sembraron en papa-dextrosa agar (PDA) y se depositaron en el Cepario del Laboratorio de Micología del Departamento El Hombre y su Ambiente de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

Preparación de inóculos de *G. destructans*

Se utilizaron discos de micelio de 4 mm obtenidos a partir de colonias de 40 días de incubación a 5°C.

En el caso de los ensayos de Índice de Crecimiento y Desarrollo Fúngico, se utilizó una suspensión de conidios en Tween 80 al 0.05%, la cual se preparó al adicionar cinco discos de 4 mm obtenidos a partir de colonias de 40 días de incubación a 5°C.

Curva de crecimiento

Se hizo una curva de crecimiento, al sembrar discos de la cepa de referencia en medio PDA, realizando mediciones diarias del diámetro mayor y diámetro menor de colonias de *G. destructans* durante 45 días a 5 °C. Se registró la macro y micromorfología para tener idea de los tipos de crecimiento que puede presentar el hongo durante el tiempo que tarda en esporular.

Ensayos enzimáticos

Debido a que *G. destructans* es un hongo reportado como queratinofílico y proteolítico (Caven et al., 2012), se indujo la producción tanto de proteasas como de queratinasas y lipasas *in vitro*, hasta este momento se ha realizado con la cepa de referencia y se está trabajando con los aislados de los murciélagos para corroborar que efectivamente presentan estas actividades enzimática relacionada directamente con la virulencia. Para tal fin, se hicieron estudios en placa con medio de leche descremada para inducir las proteasas totales. Las proteasas son excretadas al medio para la degradación de proteínas, la caseína es la proteína de la leche que le confiere el color blanco, por lo que es muy útil para detectar proteasas de origen microbiano, en el caso de los hongos, cuando la caseína es hidrolizada desaparece el color blanco alrededor del crecimiento fúngico, o bien se forma un precipitado más oscuro, dependiendo del tipo de proteasa que se esté expresando. Para inducir la actividad de las proteasas estas enzimas, se empleó el medio de cultivo Agar leche descremada en regulador de fosfatos 1M adicionado con agar al 1.6%. Como una prueba, se utilizó también medio basal con leche descremada (Castellanos-Moguel 2002), debido a que se ha reportado que este hongo tolera bien las concentraciones bajas de nutrimentos. En todos los casos, la actividad se observará como un halo de clareo alrededor de la colonia fúngica y se registrará durante 40 días.

Una vez que se tenga la actividad enzimática de todos los aislados de los murciélagos, se montarán las técnicas para las enzimas antes mencionadas y en todos los casos, se calculará el índice enzimático que relaciona el tamaño del halo y de la colonia, mientras más lejano de 1 sea, será mayor la capacidad degradadora de los organismos (Solís-Hernández y Castellanos-Moguel, 2013). Es necesario mencionar que por cuestiones de medición, los

aislados se midieron en tres lotes de nueve cajas cada uno y los experimentos se realizaron en días diferentes.

Adicionalmente, se está realizando en el momento del presente informe, la prueba del índice de crecimiento y desarrollo fúngico (ICDF) modificado con la cepa de referencia de *G. destructans*, este ensayo consiste en sembrar directamente el hongo sobre fragmentos de plumas de pavo y observar microscópicamente el desarrollo del mismo, de acuerdo con la siguiente escala (Castellanos-Moguel et al., 2013).

- 0.0 Fragmento de sustrato rodeado de conidios no germinados.
- 0.5 Germinación de conidios con uno o dos tubos germinales en el área cercana al sustrato.
- 1.0 Crecimiento de tubos germinales y presencia de hifas.
- 1.5 Crecimiento inicial del hongo orientado hacia el sustrato queratinoso y primer contacto de las hifas con él.
- 2.0 Crecimiento micelial en la superficie del sustrato.
- 2.5 Inicio de la esporulación, conidios que cubren el sustrato.
- 3.0 Esporulación completa, sustrato cubierto de micelio y conidios.

Termotolerancia y supervivencia de *G. destructans*

Se realizó una prueba de termotolerancia con la cepa de referencia, la cual consistió en colocar discos de micelio de *G. destructans* obtenidos como se mencionó previamente, en el centro de cajas de Petri con PDA. Se incubaron a 5, 17, 20, 28 y 36°C durante 30 días.

En el caso de los aislados incubados entre 17 y 36 °C, se regresaron a 5°C durante 60 días, para corroborar que si bien el hongo tiene un crecimiento mínimo o nulo en dichas temperaturas, permanece viable si las condiciones son adecuadas y tiene la capacidad de desarrollarse al encontrarse en condiciones frías nuevamente.

Toma de muestras

Para la detección de los hongos presentes en la superficie de murciélagos, con énfasis en *Geomyces destructans* se tomaron muestras frotando un hisopo estéril alrededor de la nariz, en la superficie de las alas y en el abdomen de los individuos. Una vez hecho el frotado de

los especímenes, el hisopo se depositó en un tubo de transporte estéril y se mantuvo a baja temperatura (5°C) para su posterior procesamiento en el laboratorio.

Todos los individuos incluidos en este informe, fueron obtenidos a partir de redes colocadas fuera de cuevas, por lo que no se muestreó suelo o aire, ni se realizaron aislamientos en campo.

Con fines de montaje de técnicas, se realizó un muestreo preliminar en Chiapas, que constó de 10 especímenes, posteriormente se realizaron dos muestreos: uno en Puebla y el otro en Jalisco, del primero ya se tienen resultados y se está procesando el último y uno más realizado en Coahuila.

Aislamiento e identificación de hongos

Una vez que llegaron al laboratorio, los hisopos se lavaron con 10 mL de Tween 80 al 0.05% y se trazó una estría en agar Rosa Bengala (BD, Francia) adicionado con Cloramfenicol (Sigma, Toluca México). El procedimiento se realizó por triplicado.

Se dejaron incubar a una temperatura de 3°C +/- 2°C durante 40 días ya que es el tiempo que tardan en desarrollarse las colonias de *Geomyces*. Debido a que se obtuvo muy poco o nulo crecimiento, las mismas cajas se colocaron a 28 °C de 7 a 11 días. En esta temperatura sí se observó desarrollo de colonias fúngicas, las cuales fueron transferidas a PDA para su purificación y posterior conservación.

Una vez obtenidos los cultivos axénicos de los hongos, se realizaron preparaciones en fresco con azul de lactofenol para su observación al microscopio para la identificación (Puechemaille et al., 2010). Cuando fue necesario, se prepararon microcultivos de Ridell para observar la micromorfología del hongo.

Para los microcultivos, se preparó medio extracto de malta en cajas cultivo estériles hasta alcanzar un espesor de 2 mm aproximadamente; una vez que el medio solidificó, se cortaron con una hoja de bisturí estéril bloques de medio de cultivo de aproximadamente 1 cm², y se depositaron sobre un portaobjetos estéril e inocularon con un asa estéril pequeñas fracciones del hongo en los costados del cuadrado de medio de cultivo y se cubrió el microcultivo con un cubreobjetos estéril. Posteriormente, se colocó el microcultivo dentro de una caja de Petri estéril, sobre una varilla de vidrio doblada, y se agregó suficiente agua glicerinada al 20%, sin cubrir el portaobjetos e incubó a 28°C durante 5 días. Se observó al microscopio cerca de un mechero, tomando el cubreobjetos del microcultivo con una pinza flameada de alcohol de 70% y colocándolo sobre una gota de azul de lactofenol en un portaobjetos. Se observó la micromorfología de cada uno de los hongos incluyendo las estructuras reproductoras en un microscopio óptico con los objetivos 40x y 100x (Mier et al., 2013). La identificación de los géneros fúngicos se realizó con base en Barron (1968),

Barnett y Hunter (1972) y Von Arx (1981). Se integró un registro fotográfico de los hongos aislados.

Resultados

Curva de crecimiento

A las colonias sembradas en PDA, se les realizaron mediciones diarias durante 45 días, esto se realizó a tres lotes de nueve cajas cada uno, y se obtuvo un crecimiento bajo pero sostenido durante ese tiempo, con una tasa de crecimiento de 0.02 mm al día (figura 1). La macromorfología se registro, presentando al principio colonias blancas de crecimiento ralo, que se fueron compactando con el tiempo, y se observó un cambio de color, primero a gris claro, aproximadamente a los 25 a 30 días, que fue oscureciendo con el tiempo y posteriormente se observó una coloración café. Se notó la presencia de metabolitos en la superficie de la colonia, conforme pasaba el tiempo. A los 45 días, las colonias ya habían esporulado y alcanzado el máximo tamaño, de 3.8 cm.

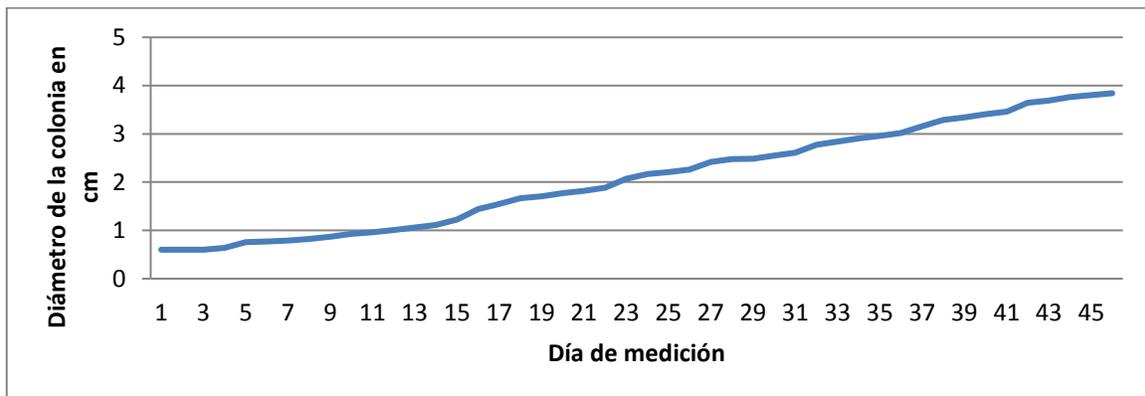


Fig. 1 Curva de crecimiento de *G. destructans* durante 45 días en medio PDA.

Ensayos enzimáticos

La cepa de referencia de *G. destructans* procedente de la ATCC, mostró actividad tanto de proteasas como de lipasas en medio sólido, ambas enzimas son consideradas como

mecanismo de patogenicidad, ya que permiten al hongo utilizar compuestos presentes en los tejidos del hospedante. En el caso del medio con regulador y leche descremada, la caseína induce la producción de prácticamente cualquier proteasa, por lo que podrían estarse detectando más de una enzima con esta prueba. El aspecto de los halos de hidrólisis de caseína fue transparente en la cercanía de la colonia y opaco en el borde exterior, lo que sugiere la presencia de una coagulasa, la cual precipita la caseína y posteriormente es degradada en su totalidad por otra proteasa. Este mismo aspecto de halos fue observado en la prueba con medio basal.

En cuanto al índice enzimático (ie), que es una medida semicuantitativa que establece la relación entre el diámetro de la colonia y el diámetro del halo de degradación, se observó que hubo una gran producción de enzimas extracelulares, ya que mientras más lejano sea de 1, señala que la colonia es pequeña pero produce enzimas que le permiten aprovechar el medio de cultivo. En el caso de la cepa de referencia, se observó un ie de 2 al segundo día de medición, posteriormente, el índice se mantuvo cercano a 1, luego el día 14, 22 y 26 mostraron un ie de 4.5, 5.2 y 5.8 respectivamente (Figura 2), lo que sugiere que el modo de acción del hongo es liberar enzimas, obtener nutrientes y degradarlos prácticamente a la par del crecimiento, cuando éstos se agotaron (días cercanos al 13, 22 y 26), libera gran cantidad de enzimas nuevamente para obtener más nutrientes y regresar a la cantidad mínima de enzimas para mantener un crecimiento sostenido. Este comportamiento sugiere que las enzimas son inducibles.

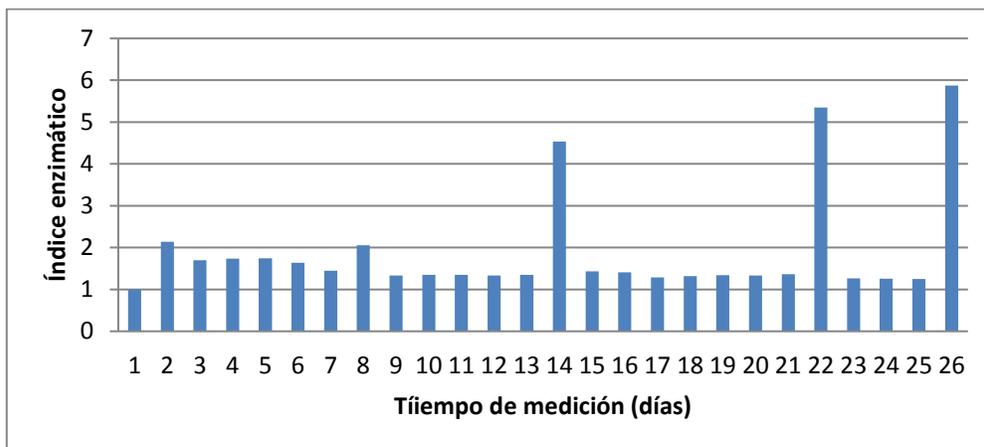


Fig 2. Índice enzimático de proteasas de *G. destructans* en agar de regulador de fosfatos adicionado con caseína al 1%.

Se probó un medio basal de sales, adicionado con caseína al 1%, en este caso se observó un mayor aprovechamiento de la caseína, ya que la tendencia general del índice fue a aumentar (Figura 3), por lo que se decidió que las mediciones se detuvieran al día 15 de la siembra. Esta tendencia sugiere que este hongo al encontrarse en ambientes relativamente bajos en nutrientes como la superficie de los murciélagos hibernando, puede utilizar las proteínas que encuentra en los mismos, es necesario hacer mas pruebas, para tener evidencia que sugiera que tiene capacidad de penetrar un hospedante sano o solamente se encuentra aprovechando las células epiteliales que se están desprendiendo del animal.

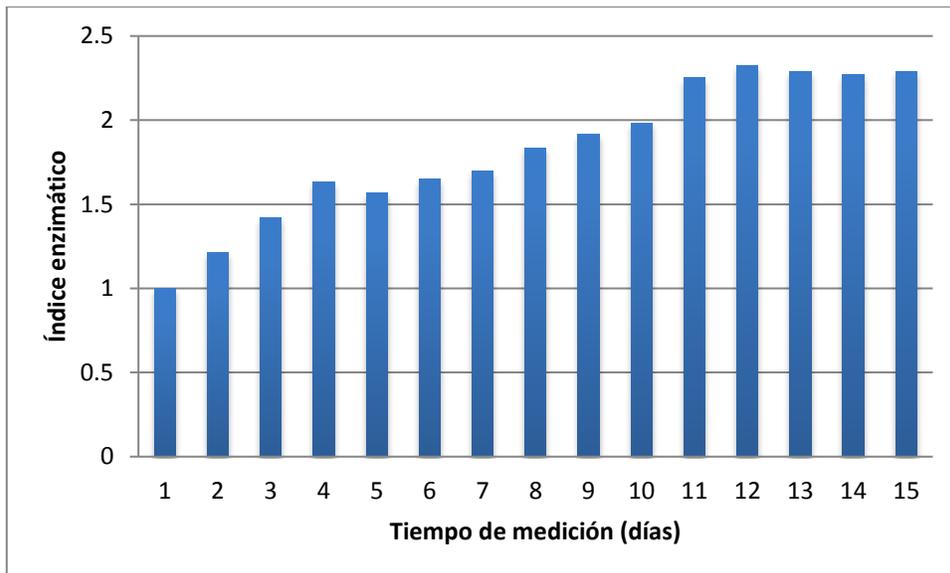


Fig 3. Índice enzimático de proteasas de *G. destructans* en agar mínimo de sales adicionado con caseína al 1%.

Se montó la prueba de lipasas en medio mínimo de sales adicionado con Tween 80 al 0.05%, y se observó una tendencia parecida a la mencionada anteriormente con las proteasas, ya que el ie aumentó conforme pasó el tiempo (Figura 4), lo que sugiere que este hongo puede producir diversas enzimas en condiciones relativamente bajas de nutrimentos. En cuanto a los halos, éstos fueron totalmente transparentes.

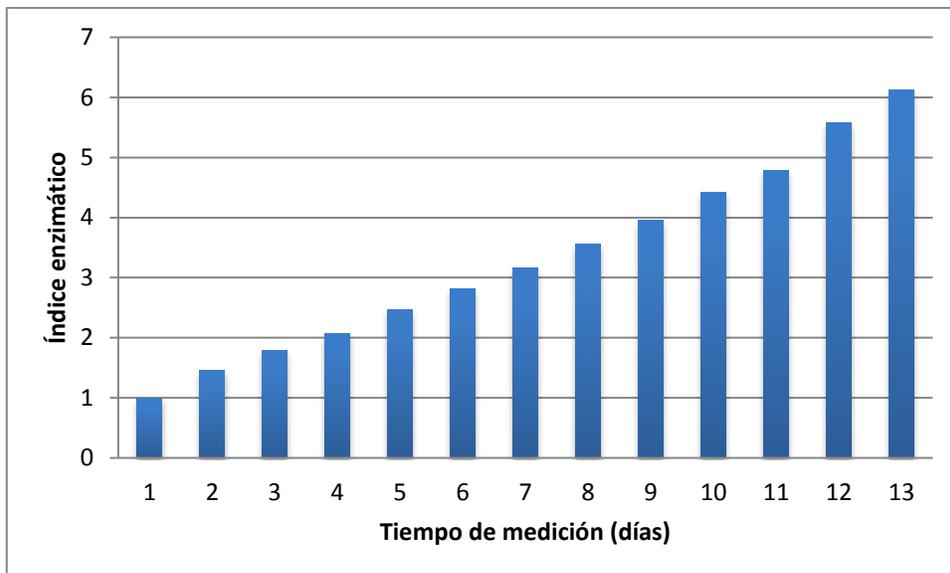


Fig 4. Índice enzimático de lipasas de *G. destructans* en agar mínimo de sales adicionado con tween 80 al 0.5%.

Como complemento, se montó la prueba del ICDF modificado, de la cual se tienen resultados preliminares, pero pudo observarse a *G. destructans* creciendo sobre plumas de pavo, como única fuente de nutrientes, lo que señala que pueden utilizar la queratina como sustrato para crecer (Figura 5b).

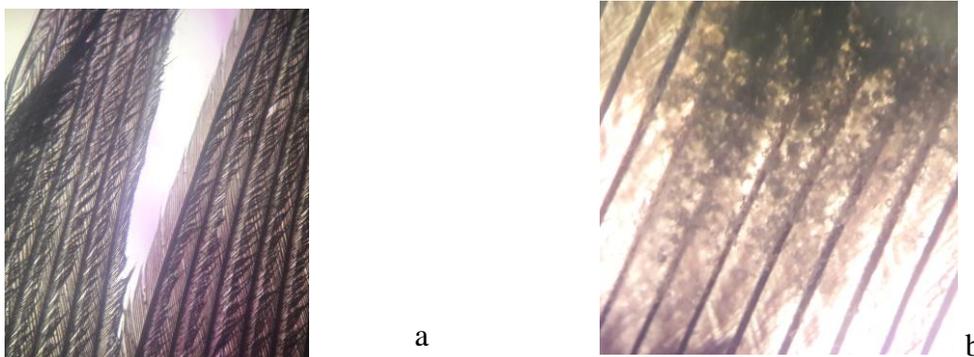


Fig 5: a) Pluma sin sembrar, b) Pluma sembrada con *G. destructans* después de 40 días de incubación, los manchones oscuros indican la presencia del hongo

Termotolerancia y supervivencia del hongo

Se hicieron pruebas de termotolerancia, colocando al hongo a 5, 17, 20, 28 y 36 °C durante 25 días (Figura 6). A 5°C, se observó crecimiento exponencial, mientras que a 17 el crecimiento fue lento, a partir de los 20°C, el crecimiento fue prácticamente nulo, lo que señala que el crecimiento vegetativo del hongo se presenta solamente a bajas temperaturas,

sin embargo, cuando las cajas incubadas a 17, 20, 28 y 36 °C después de 30 días, se colocaron a 5 °C nuevamente, se observó que el hongo presentó crecimiento (Figura 7), lo que sugiere que puede permanecer latente en condiciones de temperatura mas altas, y cuando se acerca a su óptimo, se reactiva el crecimiento vegetativo, esto podría dilucidar la manera en que se mantiene viable y se transportaría a otros sitios si la humedad es adecuada, ya que las cajas fueron sembradas con discos de micelio y conidios.

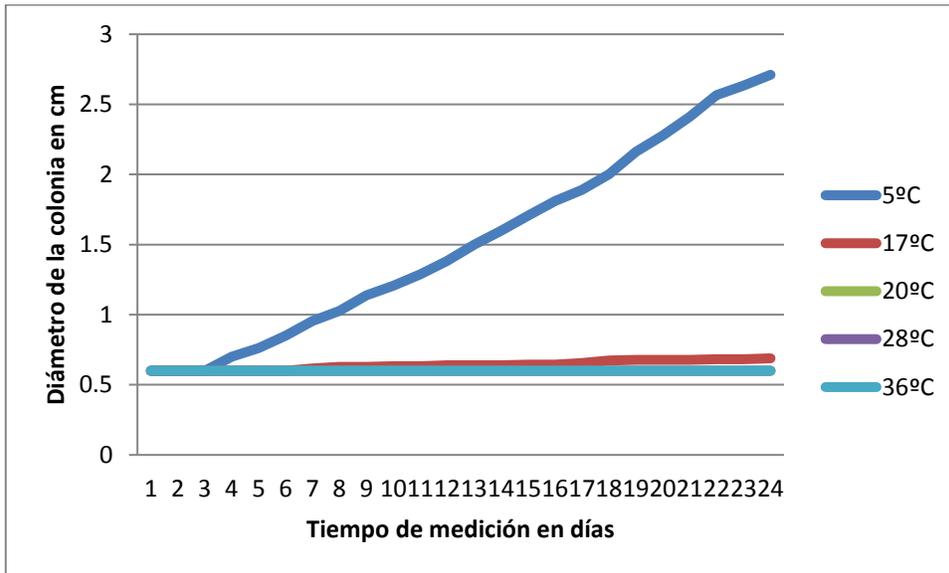


Fig 6. Curvas de termotolerancia de *G. destructans* a 5, 17, 20, 28 y 36 °C, obsérvese cómo solamente a 5 y 17 °C presentó crecimiento.

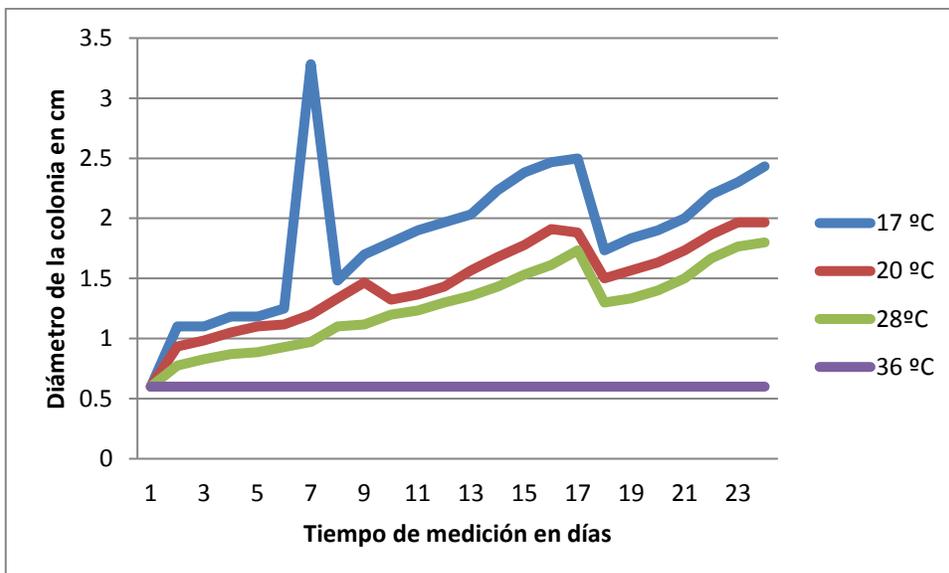


Fig 7. Curvas de supervivencia de *G. destructans* a 5 °C después de 30 días mantenido a 17, 20, 28 y 36 °C.

Aislamiento de hongos a partir de murciélagos

Montaje de técnicas

Una vez obtenidas las muestras a partir de murciélagos en Palenque y Tres Lagunas Chiapas, se transportaron al laboratorio y se sembraron en medio Rosa de Bengala adicionado con Cloranfenicol. Primero se colocaron durante 30 días a 5 °C, donde no se observó ningún crecimiento, posteriormente, se trasladaron a una incubadora de 28°C, donde se observó la aparición de colonias de diferentes hongos.

Se tomaron 10 muestras, a partir de las cuales se obtuvieron 135 unidades formadoras de colonias (UFC) de 11 géneros, donde los más abundantes fueron *Aspergillus* (Figura 8) y *Penicillium* (Figura 9) también se obtuvo gran cantidad de levaduras (44 UFC) y algunas colonias de micelio estéril, que al carecer de estructuras reproductivas, fue imposible identificar. Es importante mencionar que se encontró un género (*Torpedospora*, Figura 10) que está asociado a cuerpos de agua, lo que está sugiriendo los hábitos de alimentación del espécimen de donde se aisló.

Géneros	UFC
<i>Aspergillus</i>	55
<i>Aureobasidium</i>	1
<i>Eurotium</i>	3
<i>Levadura</i>	44
<i>Micelio estéril</i>	10
<i>Penicillum</i>	10
<i>Pseudobeltrania</i>	1
<i>Rhizopus</i>	5
<i>Trichoderma</i>	2
<i>Scopulariopsis</i>	1
<i>Mucor</i>	1
<i>Torpedospora</i>	1
<i>Paecilomyces</i>	1
Total	135

Tabla 1. Géneros encontrados durante el montaje de la técnica a partir de muestras obtenidas en las localidades de Palenque y Tres Lagunas, Chiapas.



Figura 8. Hongo del género *Aspergillus* (40X) aislado a partir de espécimen de la localidad de Palenque, Chiapas.



Figura 9. Hongo del género *Penicillium* aislado a partir de espécimen de la localidad de Palenque, Chiapas. Aumento: 40X



Figura 10. Conidios de *Torpedospora* aislados de espécimen de la localidad de Tres Lagunas, Chiapas. Nótese los apéndices para la permitir la flotación del conidio en la columna de agua. Aumento: 40X

Una vez montadas las técnicas, se procedió a hacer un muestreo en Puebla, en el cual se obtuvieron 16 especímenes (Tabla 2), a partir de los cuales se aislaron 91 UFC en agar Rosa Bengala, en este muestreo se utilizó también medio Czapek, de donde se obtuvieron 74 UFC. El uso de este medio resultó eficiente para aislar otros géneros además de los obtenidos en Rosa Bengala.

	Familia	Genero	Especie	Sexo	Zona de recolecta	Método
1	Vespertilionidae	<i>Myotis</i>	<i>auriculus</i>	Macho	Estanque	Red de niebla
2	Natalidae	<i>Natalus</i>	<i>lanatus</i>	Hembra	Estanque	Red de niebla
3	Vespertilionidae	<i>Corynorhinus</i>	<i>townsendii</i>	Hembra	Cabaña	Red de golpeo
4	Vespertilionidae	<i>Myotis</i>	<i>melanonines</i>	Hembra	Cabaña	Red de golpeo
5	Vespertilionidae	<i>Pipistrellus</i>	<i>hesperus</i>	Macho	Cabaña	Red de golpeo
6	Vespertilionidae	<i>Pipistrellus</i>	<i>hesperus</i>	Macho	Cabaña	Red de golpeo
7	Vespertilionidae	<i>Myotis</i>	<i>auriculus</i>	Macho	Estanque	Red de niebla
8	Vespertilionidae	<i>Lasiurus</i>	<i>ega</i>	Macho	Estanque	Red de niebla
9	Vespertilionidae	<i>Lasiurus</i>	<i>ega</i>	Macho	Estanque	Red de niebla
10	Vespertilionidae	<i>Myotis</i>	<i>velifer</i>	Macho	Estanque	Red de niebla
11	Vespertilionidae	<i>Myotis</i>	<i>velifer</i>	Macho	Estanque	Red de niebla
12	Vespertilionidae	<i>Myotis</i>	<i>volans</i>	Macho	Cabaña	Red de golpeo
13	Vespertilionidae	<i>Pipistrellus</i>	<i>hesperus</i>	Macho	Cabaña	Red de golpeo
14	Vespertilionidae	<i>Eptesicus</i>	<i>fuscus</i>	Hembra	Estanque	Red de niebla
15	Vespertilionidae	<i>Eptesicus</i>	<i>fuscus</i>	Macho	Estanque	Red de niebla
16	Vespertilionidae	<i>Myotis</i>	<i>velifer</i>	Hembra	Cabaña	Red de golpeo

Tabla 2. Organismos a partir de los cuales se obtuvieron colonias fúngicas.

Los géneros obtenidos en Rosa Bengala, se muestran en la tabla 3. Los mas abundantes fueron *Aspergillus*, *Penicillium* y *Cladosporium* (figura 11), este último ha sido reportado como propio del pelo de los mamíferos. También se observó gran cantidad de micelio estéril.

Determinación de hongos por muestra colectada					
Agar rosa de bengala					
Muestra	Área de la muestra	Repetición	Aislado	Familia	Género
AM1	Ala	1	1	Trichomaceae	<i>Aspergillus</i>
CM1	Cuerpo	1	1	***	Estéril
CM1	Cuerpo	1	2	***	Estéril
CM1	Cuerpo	1	3	Stachybotryaceae	<i>Stachybotrys</i>
AM2	Ala	1	1	***	Estéril
AM2	Ala	1	3	***	Estéril
AM2	Ala	2	1	Trichomaceae	<i>Aspergillus</i>
AM2	Ala	3	1	***	Estéril
AM2	Ala	3	2	Trichomaceae	<i>Aspergillus</i>
CM2	Cuerpo	2	2	***	Estéril
CM2	Cuerpo	2	3	Trichomaceae	<i>Penicillium</i>
CM3	Cuerpo	3	2	***	Estéril
AM3	Ala	1	1	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
AM3	Ala	1	2	Trichomaceae	<i>Aspergillus</i>
AM3	Ala	1	3	Davidiellaceae	<i>Cladosporium</i>
AM3	Ala	2	1	Trichomaceae	<i>Aspergillus</i>
AM3	Ala	2	2	Trichomaceae	<i>Aspergillus</i>
AM3	Ala	2	3	Trichomaceae	<i>Aspergillus</i>
AM3	Ala	2	4	Davidiellaceae	<i>Cladosporium</i>
AM4	Ala	1	1	***	Estéril
AM4	Ala	1	2	***	Estéril
AM4	Ala	1	3	***	Estéril
AM4	Ala	1	4	***	Estéril
AM4	Ala	1	5	***	Estéril
AM4	Ala	1	6	***	Estéril
AM4	Ala	2	2	***	Estéril
AM4	Ala	2	3	***	Estéril
AM4	Ala	2	4	***	Estéril
AM4	Ala	3	1	***	Estéril
AM4	Ala	3	2	***	Estéril
AM4	Ala	3	3	***	Estéril
AM4	Ala	3	4	***	Estéril
CM4	Cuerpo	1	1	Trichomaceae	<i>Aspergillus</i>
CM4	Cuerpo	1	2	Trichomaceae	<i>Penicillium</i>
CM4	Cuerpo	3	1	Trichomaceae	<i>Aspergillus</i>
AM5	Ala	2	1	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>

AM5	Ala	2	2	Hypocreaceae	<i>Acremonium</i>
AM5	Ala	3	1	***	Estéril
AM5	Ala	3	2	***	Estéril
CM5	Cuerpo	1	1	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i>
CM5	Cuerpo	3	1	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i>
CM5	Cuerpo	3	2	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i>
CM5	Cuerpo	3	3	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
CM5	Cuerpo	3	4	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i>
AM6	Ala	1	1	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
CM6	Cuerpo	1	1	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i>
CM6	Cuerpo	2	2	Davidiellaceae	<i>Cladosporium</i>
CM6	Cuerpo	2	5	Trichocomaceae	<i>Penicillium</i>
CM6	Cuerpo	3	1	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i>
AM7	Ala	1	1	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
AM7	Ala	2	1	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i>
AM7	Ala	3	1	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
AM7	Ala	3	2	Trichocomaceae	<i>Penicillium</i>
CAM8	Cuerpo y Ala	1	1	Trichocomaceae	<i>Penicillium</i>
CAM8	Cuerpo y Ala	2	1	Trichocomaceae	<i>Penicillium</i>
CAM9	Cuerpo y Ala	2	1	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
CAM9	Cuerpo y Ala	2	2	Trichocomaceae	<i>Penicillium</i>
CAM9	Cuerpo y Ala	3	1	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
M10	***	1a	1	***	Estéril
M10	***	1b	2	***	Estéril
M10	***	2a	1	***	Estéril
M10	***	2b	1	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
M10	***	2b	2	***	Estéril
M10	***	2b	3	Trichocomaceae	<i>Penicillium</i>
M10	***	1c	1	Stachybotryaceae	<i>Stachybotrys</i>
M10	***	1c	2	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i>
M10	***	1c	3	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i>
M10	***	2c	1	Hypocreaceae	<i>Trichoderma</i>
M10	***	2c	2	***	Estéril
M11	***	1a	1	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>
M11	***	1a	2	Trichocomaceae	<i>Penicillium</i>
M11	***	2a	1	***	Estéril
M11	***	2a	3	***	Estéril
M11	***	2a	4	***	Estéril
M11	***	2b	1	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>
M11	***	2b	2	***	Estéril
M11	***	2b	3	***	Estéril
M11	***	2b	4	***	Estéril
M11	***	2b	5	***	Estéril
M11	***	2c	1	***	Estéril

M11	***	2c	2	***	Estéril
M11	***	2c	3	***	Estéril
M11	***	2c	4	***	Estéril
M11	***	2c	5	***	Estéril
CAM15	Cuerpo y Ala	1	1	Davidiellaceae	<i>Cladosporium</i>
CAM15	Cuerpo y Ala	1	3	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i>
CAM15	Cuerpo y Ala	1	4	***	Estéril
CAM15	Cuerpo y Ala	3	1	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i>
c1	ambiente	***	1	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
c1	ambiente	***	2	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i>
c2	ambiente	***	1	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>

Tabla 3. Géneros obtenidos en Rosa de Bengala a partir de los especímenes capturados en Puebla.



Fig 11. Conidios del hongo del género *Cladosporium* a 40X.

La tabla 4 muestra los hongos obtenidos en Agar Czapek, en este caso se pudo aislar *Alternaria* (Figura 12) y el género mas abundante fue *Scopulariopsis* (Figura 13).

Determinación de hongos por muestra colectada					
Agar Czapek					
Muestra	Área de la muestra	Repetición	Aislado	Familia	Genero
AM1	Ala	2	1	Hypocreaceae	<i>Acremonium</i>
CM1	Cuerpo	1	1	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
CM1	Cuerpo	1	2	Pleosporaceae	<i>Alternaria</i>
CM1	Cuerpo	1	3	***	Estéril
CM1	Cuerpo	1	4	***	Estéril

CM1	Cuerpo	2	1	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i>
CM1	Cuerpo	2	2	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
CM1	Cuerpo	2	3	Pleosporaceae	<i>Alternaria</i>
CM1	Cuerpo	2	4	***	Estéril
CM1	Cuerpo	2	5	***	Estéril
CM1	Cuerpo	2	6	***	Estéril
CM1	Cuerpo	2	7	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
AM2	Ala	1	1	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
AM2	Ala	2	1	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
CM2	Cuerpo	1	1	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
AM3	Ala	1	1	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
AM3	Ala	2	1	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
CM3	Cuerpo	1	1	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
CM3	Cuerpo	2	1	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
AM4	Ala	1	1	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
AM4	Ala	1	2	Pleosporaceae	<i>Alternaria</i>
AM4	Ala	2	1	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
AM4	Ala	2	2	Pleosporaceae	<i>Alternaria</i>
AM4	Ala	2	3	***	Estéril
CM4	Cuerpo	1	1	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
CM4	Cuerpo	2	1	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
AM5	Ala	1	1	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
AM5	Ala	2	1	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
CM5	Cuerpo	1	1	Trichocomaceae	<i>Penicillium</i>
CM5	Cuerpo	1	2	Davidiellaceae	<i>Cladosporium</i>
CM5	Cuerpo	2	1	Trichocomaceae	<i>Penicillium</i>
CM5	Cuerpo	2	2	Davidiellaceae	<i>Cladosporium</i>
AM6	Ala	1	1	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
AM6	Ala	1	2	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
AM6	Ala	2	1	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
AM6	Ala	2	2	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
CM6	Cuerpo	1	1	Pleosporaceae	<i>Alternaria</i>
CM6	Cuerpo	1	2	Hypocreaceae	<i>Acremonium</i>
CM6	Cuerpo	1	3	Hypocreaceae	<i>Acremonium</i>
CM6	Cuerpo	2	1	Hypocreaceae	<i>Acremonium</i>
CM6	Cuerpo	2	2	Pleosporaceae	<i>Alternaria</i>
AM7	Ala	1	1	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i>
AM7	Ala	1	2	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
AM7	Ala	2	1	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
CAM8	Cuerpo y Ala	1	1	Trichocomaceae	<i>Penicillium</i>
CAM8	Cuerpo y Ala	1	2	Pleosporaceae	<i>Alternaria</i>
CAM8	Cuerpo y Ala	2	1	Trichocomaceae	<i>Penicillium</i>
CAM8	Cuerpo y Ala	2	2	Pleosporaceae	<i>Alternaria</i>
CAM9	Cuerpo y Ala	1	1	***	Estéril

CAM9	Cuerpo y Ala	1	2	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
CAM9	Cuerpo y Ala	2	1	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
CAM9	Cuerpo y Ala	2	2	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>
CAM9	Cuerpo y Ala	2	3	***	Estéril
M10	***	1a	1	***	Estéril
M10	***	1a	2	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
M10	***	1b	1	***	Estéril
M10	***	2a	1	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
M10	***	2a	2	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
M10	***	2a	3	Pleosporaceae	<i>Alternaria</i>
M10	***	2b	1	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
M11	***	1a	1	Pleosporaceae	<i>Alternaria</i>
M11	***	1b	1	***	Estéril
M11	***	1b	2	Pleosporaceae	<i>Alternaria</i>
M11	***	2a	1	Pleosporaceae	<i>Alternaria</i>
M11	***	2a	2	***	Estéril
M11	***	2a	3	***	Estéril
M11	***	2b	1	***	Estéril
M11	***	2b	2	Pleosporaceae	<i>Alternaria</i>
CAM15	Cuerpo y Ala	1	1	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
CAM15	Cuerpo y Ala	1	2	***	Estéril
CAM15	Cuerpo y Ala	1	3	Pleosporaceae	<i>Alternaria</i>
CAM15	Cuerpo y Ala	2	1	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>
CAM15	Cuerpo y Ala	2	2	***	Estéril
CAM15	Cuerpo y Ala	2	3	Pleosporaceae	<i>Alternaria</i>



Figura 12. Conidios muriformes de *Alternaria* a 40X



Fig 13. Conidios de *Scopulariopsis* a 40X.

Al momento de elaborar este informe, se están procesando las muestras que se obtuvieron de Jalisco, de donde se han aislado 749 UFC, la determinación de géneros fúngicos se está llevando a cabo aun.

Bibliografía

Barnett, H. L y B. B. Hunter. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi 4 ed. Mc Millan, New York, 218 p.

Barron, G.L., 1968. The genera of Hyphomycetes from soil. Robert Krieger Publish. Co. Florida, 364 p.

Castellanos-Moguel, M.J. 2002. Relación entre los niveles de proteasa y quitinasa en aislados de *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown y Smith y su patogenicidad hacia la mosquita blanca. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias Químico-Biológicas. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN. 102p.

Castellanos-Moguel J, Mier T, Reyes-Montes MR, Navarro Barranco H, Zepeda Rodríguez A, Pérez-Torres A, Toriello C. 2013. Fungal growth development index and ultrastructural study of whiteflies infected by three *Isaria fumosorosea* isolates of different pathogenicity. Revista Mexicana de Micología 38:23-33

Caven, A., M. T. Mengak, k.V. Miller. 2012. White nose syndrome in the United States. Wildlife Management Publication Series. Warnell. 1-6 p.

Hayes, M. A. (2012). The *Geomyces* fungi: ecology and distribution. *BioScience*, 62(9), 819-823.

Mier, T., C. Toriello, M. Ulloa. 2002. Hongos microscópicos saprobios y parásitos: Métodos de laboratorio. Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F. 90 p.

Mier T., F Rivera-Becerril, M.A. Ayala-Zermeño, C. Toriello, S. Aguilar, M. Ulloa. 2013. Métodos experimentales para el estudio de hongos microscópicos. Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F. 103 p.

Puechmaille, S.J., P. Veyderoux, H. Fuller, M.A. Gouilh, M. Bekaert, E.C. Teeling. 2010. White-Nose síndrome fungus (*Geomyces destructans*) in Bat, France. *Emerging Infect. Diseases*. 16: 290-293.

Solís-Hernández A.P., J. Castellanos-Moguel. 2013. Proteolytic activity comparison among entomopathogenic fungi *Isaria fumosoreosea* isolates from Mexico. X Congreso Nacional de Biología Molecular y Celular de Hongos. Oaxaca, Oax. Octubre 27 – 31