



MINISTERIO DE DEFENSA NACIONAL
INSTITUTO ANTARTICO ECUATORIANO
GUAYAQUIL

**INFORME DE TRABAJO DE CAMPO EN LA EXPEDICION A
LA ANTARTIDA**

Expedición: XVI Expedición

Nombre del Proyecto: "Aislamiento e identificación de microorganismos marinos y terrestres de la Antártida y establecimiento de un Banco de Cepas para evaluar su potencialidad biotecnológica"

Lugar: Isla Greenwich, Antártida

Participante: Msc. Abel Rosado Ruiz-Apodaca. ESPOL-CIBE

05 de Marzo de 2012

FUENTE : DVD 1
EXPEDICION XVI
ENTREGADO POR : José Olmedo

NOMBRE DEL PROYECTO: Aislamiento e identificación de microorganismos marinos y terrestres de la Antártida y establecimiento de un Banco de Cepas para evaluar su potencialidad biotecnológica

INVESTIGADOR: Msc. Abel Rosado Ruiz-Apodaca. ESPOL-CIBE

1. ANTECEDENTES DEL PROYECTO/COMPONENTE.

Uno de los abordajes para la obtención de nuevas biomoléculas de aplicación industrial y biotecnológica es su búsqueda en ecosistemas que presenten características especiales como las encontradas en el continente Antártico. Allí se soportan temperaturas muy bajas, niveles de irradiación elevados, alto contenido de oxígeno y de vapor de agua en el aire, además de una luminosidad característica.

La adaptación de los microorganismos a condiciones ambientales extremas los obliga a desarrollar componentes celulares y estrategias bioquímicas apropiadas. En este sentido se acepta que estos microorganismos constituyen un importante reservorio de moléculas de interés industrial y con aplicaciones biotecnológicas novedosas. Por ejemplo los microorganismos adaptados al frío producen lipasas con elevadas velocidades de catálisis a bajas temperaturas en comparación con las lipasas de mesófilos o termófilos.

La actividad en frío de estas lipasas puede ser la clave del éxito en algunas de sus aplicaciones a nivel industrial, por ejemplo como catalizadores en: síntesis orgánicas de compuestos termolábiles, detergentes (lavado en frío), manufactura de quesos, cerveza, vino y de suplementos alimenticios de animales, ablandamiento de carne y biorremediación ambiental (degradación de aceite y xenobióticos).

Estudios desarrollados en bacterias psicrófilas de origen marino provenientes de la Antártida han demostrado que una alta proporción de sus ácidos grasos son PUFA's y que estas bacterias poseen la propiedad de síntesis de ácido eicosapentaenoico (20:5 ω 3; EPA) o ácido docosahexaenoico (22:6 ω 3; DHA) como estrategia de adaptación a las condiciones extremas de dicho ecosistema.

El bajo punto de fusión de estos ácidos grasos insaturados combinado con su estructura molecular le confieren a la membrana de la célula ventajas particulares frente a las bajas temperaturas. Actualmente existe un interés creciente por la producción de estos compuestos por sus propiedades benéficas para la salud humana (reducción del colesterol LDL y triglicéridos en sangre, su influencia en el desarrollo del sistema nervioso, en funciones digestivas y en procesos inflamatorios, entre otros) ya que dichos ácidos no pueden ser sintetizados por el organismo humano, lo que ha impulsado la búsqueda de fuentes diversas para su obtención.

En la actualidad las fuentes de ácidos grasos polinsaturados están acotadas a ciertos peces y plantas, encontrándose los mismos como mezclas heterogéneas que requieren costosas etapas de purificación, y al krill antártico, que es hoy la fuente fundamental. El encontrar vías alternativas de su producción significaría disminuir la explotación de este recurso que es la base de la cadena trófica en los mares del sur.

Las enzimas microbianas procedentes de microorganismos de ambientes acuáticos incluyen amilasas, glucamilasas, glucosaisomerasas, proteasas, pectinasas (Stanley & Stanley, 1986) y otros como agarasas, quitinasas, alginasas, lipasas, Dnasas y esterases (Fenical y Jensen, 1993). La mayoría de estas enzimas tienen aplicación biotecnológica. (Stanley y Stanley, 1986). Las enzimas proteolíticas y lipolíticas actúan sobre diversos sustratos naturales y sintéticos y son principalmente utilizadas en la industria como detergentes, en tanto las amilasas, gelatinasas, caseinasas y agarasas se emplean como aditivos en la industria alimentaria (Barzana y López-Munguía, 1995).

Las bacterias marinas recolectadas del agua de mar, el hielo marino y el fango abisal también se prestan a usos comerciales. Por ejemplo, de la bacteria *Pseudoalteromonas haloplanktis*, recolectada en mares antárticos, se han extraído enzimas que pueden funcionar a temperaturas extremadamente bajas y podrían ser útiles como instrumentos novedosos para la biotecnología. Los exopolisacáridos abundan en el medio marino antártico (por ejemplo, en el hielo marino y en partículas oceánicas), donde pueden ayudar a las comunidades microbianas a soportar condiciones extremas de temperatura, salinidad y disponibilidad de nutrientes. Varios exopolisacáridos producidos por microbios de estos ambientes extremos son prometedores para la biotecnología.

De las bacterias psicrófilas HK-47, recolectadas de los mares que rodean la Antártida, se ha extraído una forma termolábil nueva de la enzima fosfatasa alcalina, que es útil como instrumento de investigación, particularmente para el marcado radiactivo de ácidos nucleicos. En general, la biodiversidad microbiana de los ecosistemas antárticos permanece relativamente inexplorada; por consiguiente, estos ecosistemas pueden considerarse como reservorios de biodiversidad microbiana que en gran medida no han sido explotados.

En ambientes marinos, la búsqueda y aislamiento de cepas de bacterias nativas productoras de sustancias bioactivas se ha realizado a partir de diversas muestras. Entre estas sustancias destacan las "Enzimas Extracelulares" (EEC), cuyo desarrollo en el sector industrial se ha producido en forma explosiva en los últimos años. El presente estudio tiene como objetivo central seleccionar cepas antárticas de microorganismos marinos hiperproductores de EEC. Para ello, se realizaron 19 colectas de muestras de sedimentos marinos en el continente antártico, Se obtuvieron 15 muestras de agua oceánica para posteriores análisis y se llevo a cabo la colecta de hongos lignolíticos con paneles de madera como sustrato.

2. OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO/CUMPLIMIENTO

- Estudiar las poblaciones microbiológicas de muestras recolectadas durante el verano antártico, para identificar los géneros y especies de bacterias aisladas y determinar el potencial biotecnológico: caracterización de metabolitos y actividad antimicrobiana.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS DEL PROYECTO /CUMPLIMIENTOS

- Determinar las estaciones de muestreo en la Antártida así como su ubicación geográfica exacta.
- Identificar los géneros y especies de microorganismos aislados previamente mediante la descripción morfológica en diferentes medios de cultivo y la determinación de sus propiedades bioquímicas.
- Caracterizar la actividad metabólica de microorganismos aislados e identificados y establecer su potencial biotecnológico.

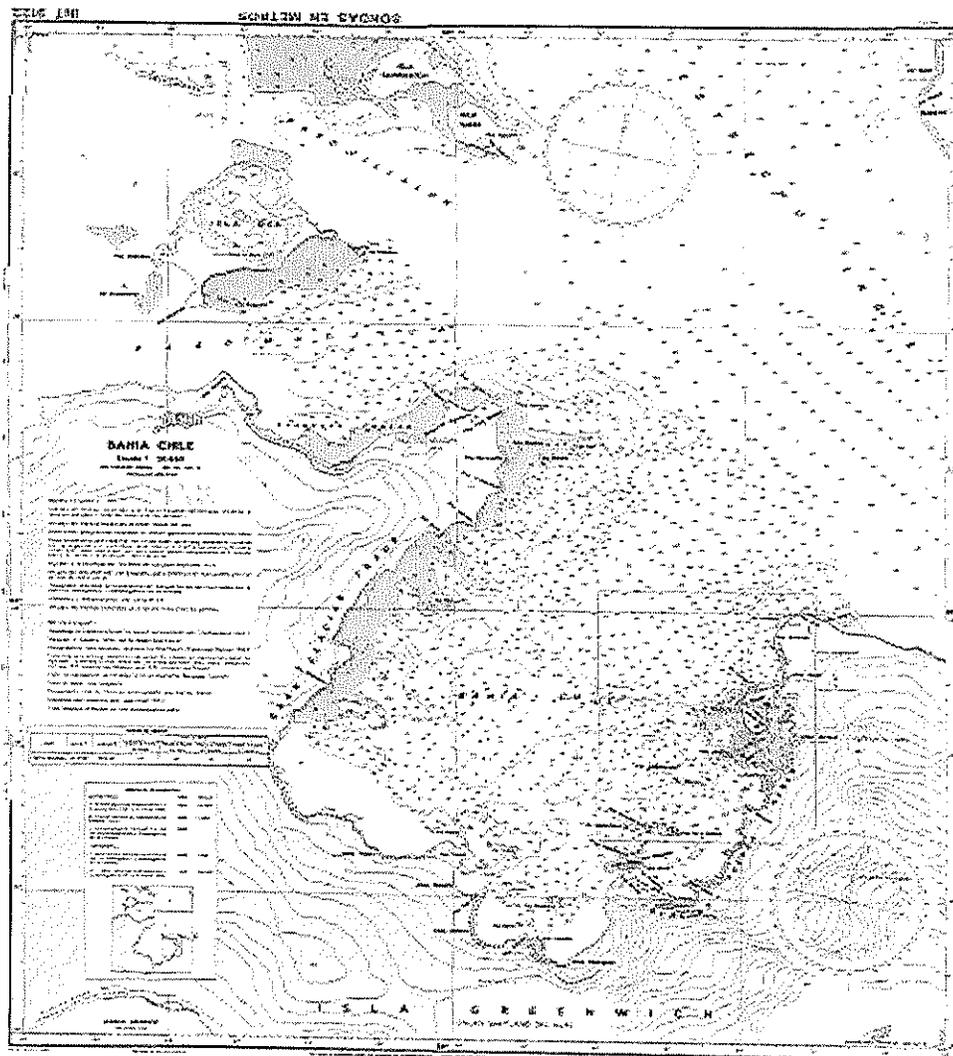
- Determinar las condiciones para el establecimiento de un banco de las cepas marinas aisladas del continente Antártico, mediante el análisis de diversas técnicas de conservación.

4. HIPÓTESIS DEL PROYECTO/COMPONENTE.-

H_A : Mediante el desarrollo de métodos de muestreos, aislamientos e identificación de microorganismos marinos del continente Antártico, es posible establecer un banco de cepas.

H_0 : Mediante el desarrollo de métodos de muestreos, aislamientos e identificación de microorganismos marinos del continente Antártico, no es posible establecer un banco de cepas.

5. ÁREA DE ESTUDIO.



6. CRONOGRAMA DEL TRABAJO DE CAMPO EFECTUADO

FECHA	ACTIVIDADES	OBSERVACIONES
23 Febrero 2012	<p>Colecta de Muestras en la Estación Barrientos</p> <p>(M 19.20.21.22.23.24.25)</p>	<p>Se colectaron 7 muestras, 4 muestras de sedimentos marinos, 2 muestras de suelo y una de agua, cada muestra de sedimento y suelo se envaso en una funda plástica con un peso de 120g. Las muestras de agua se las conservaron en tubos de 14ml</p>
24 Febrero 2012	<p>Colecta de Muestras en la Estación Isla Torres</p> <p>(Muestras 39.40a.40s.41.42a.42s.43.44a.44s.45)</p>	<p>Se colectaron 10 muestras, 4 muestras de sedimentos marinos, 2 muestras de suelo y 4 de agua, cada muestra de sedimento y suelo se envaso en una funda plástica con un peso de 120g. Las muestras de agua se las conservaron en tubos de 14ml</p>
	<p>Colecta de Muestras en la Estación Isla Roberts</p> <p>(Muestras 105,106,107)</p>	<p>Se colectaron 3 muestras, 1 muestras de deshielo, 1 muestras de suelo y 1 de arena de mar</p>

25 Febrero 2012	Procesamiento de Muestras en el Laboratorio y Reconocimiento de Puntos de Muestreo Sector A	Se realizan las Primeras Siembras en medios selectivos
26 Febrero 2012	Procesamiento de Muestras en el Laboratorio y Reconocimiento de Puntos de Muestreo Sector B	Se continua con los pases de Siembras en medios selectivos
	Colecta de Muestras en la Estación Isla Dee (Muestras 51.52a.52s.53a.53s)	Se colectaron 5 muestras, 2 muestras de sedimentos marinos, 1 muestras de suelo y 2 de agua, cada muestra de sedimento y suelo se envaso en una funda plástica con un peso de 120g. Las muestras de agua se las conservaron en tubos de 14ml
27 Febrero 2012	Colecta de Muestras en la Estación Punta Ambato (Muestras 46a.46s.47a.47s.48.49a.49s.50)	Se colectaron 8 muestras, 3 muestras de sedimentos marinos, 1 muestras de suelo y 4 de agua, cada muestra de sedimento y suelo se envaso en una funda plástica con un peso de 120g. Las muestras de agua se las conservaron en tubos de 14ml

28 Febrero 2012	<p>Recogida de los Colectores Marinos y Procesamiento de los mismos en el laboratorio</p>	<p>Se realizaron los raspados de Superficie y a Profundidad de los mismos y se procedió a la siembra en medios selectivos con clorotetraciclina</p>
29 Febrero 2012	<p>RANCHERO DE LA ESTACIÓN</p>	
01 Marzo 2012	<p>Colecta de Muestras en la Estación Transepto Glacial Quito-Punta Ambato</p> <p>(Muestras 33. 34a.34s. 35a.35s. 36a.36s. 37a.37s. 38a.38s)</p>	<p>Se colectaron 11 muestras, 6 muestras de sedimentos marinos, y 5 de agua, cada muestra de sedimento y suelo se envaso en una funda plástica con un peso de 120g. Las muestras de agua se las conservaron en tubos de 14ml</p>
02 Marzo 2012	<p>Laboratorio</p>	<p>Se realizaron los aislamientos primarios e interpretación de resultados</p>
03 Marzo 2012	<p>Colecta de Muestras en Glaciar Quito y Río Culebra</p> <p>Estac. Muestreo (7. 8)</p>	<p>Se realizaron 2 Estaciones de muestreo, las muestras se conservaron en tubos de 14ml y el resto (500ml) se filtro a 45 µm</p>

7. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO DE CAMPO / METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE LOS DATOS.

Toma de muestras de suelos, sedimento y agua.

La metodología de muestreo de suelo y sedimento implicará la toma de 4 muestras por área (a, b, c, d). En la recolección de cada una de ellas, se tomarán 4 réplicas, de una profundidad de 20 cm, dentro de un área de 1 m². Dichas réplicas serán mezcladas y tamizadas con un ojo de malla de 2 mm, para retirar piedras grandes. Entre 100-120 g del suelo obtenido se conservarán a bajas temperaturas (4 °C) en fundas plásticas correctamente etiquetadas, con el punto georeferenciado de donde fueron tomadas.

En el caso de áreas que presenten vegetación (musgos, líquenes y plantas vasculares) se extraerá además parte de la rizósfera, tomando muestras combinadas con vegetación y suelo.

Para muestras de agua, en cada uno de los diferentes puntos de muestreo para cada uno de los cuerpos de agua se tomaron 1000 ml. De los cuales alrededor de 500 ml se colaron con un filtro estéril de 0,45 um por dos ocasiones para asegurarnos que todas las partículas microbiológicas presentes han sido eficientemente filtradas. Esta tarea se repetirá con otros 500 ml de agua. Adicionalmente, se guardarán los últimos 14 ml de la muestra de agua en un envase estéril para la realización de estudios microbiológicos que comprenden el cultivo de la comunidad microbiana.

Aislamiento de bacterias marinas

Las muestras colectadas serán procesadas en el laboratorio realizando diluciones seriadas al décimo (10^{-1} , 10^{-2} ... 10^{-5}) y utilizando como diluyente agua de mar filtrada y esterilizada. El aislamiento y los recuentos de bacterias marinas se realizarán según la metodología indicada por León et al. (2000), sembrando alícuotas de 0,1 mL de las diluciones en Agar Marino (AM) 2216 (Difco), a pH 8,0, e incubados por 5 días.

Aislamiento de hongos marinos.

Se aislarán selectivamente los hongos marinos (Lignícolas, empleando paneles de madera.

Los mismos que serán esterilizados y colocados dentro de redes de nylon, y posteriormente fijadas a un anclaje en tierra y expuestas al agua de mar durante un período variable de tiempo (2-12 meses). Los paneles, serán almacenados a -20°C, y, finalmente, enviados a los laboratorios.

Los paneles serán examinados mediante un estereomicroscopio en busca de estructuras reproductivas (tanto de origen sexual como asexual). Una vez localizadas, dichas estructuras se transferirán a un medio de montaje apropiado (agua, ácido láctico, reactivo de Melzer y azul de metileno 0.1 %) empleando agujas de disección. Otra metodología para preparaciones permanentes es colocar un cubreobjetos (de 22 mm x 22 mm) sobre un portaobjetos (de 26 mm x 76 mm) y hacer que este se adhiera al portaobjetos añadiendo gotas de agua destilada a ambos lados del cubreobjetos.

Seguidamente, colocar una gota grande de agua destilada en el centro del cubre, y en ella el material. Después, cubrir con un cubreobjetos más pequeño (de 18 mm x 18 mm) e inmediatamente, hacer las observaciones microscópicas del material vivo para asegurarnos que se encuentra la estructura que deseamos conservar. Luego de las observaciones, adicionar una gota de glicerina al agua por uno de los lados y guardar el cubreobjetos en una atmósfera seca para que el agua se evapore. Limpiar los residuos y sellar la preparación por los bordes con esmalte de uñas. Separar el cubreobjetos grande del portaobjetos y colocar una gota grande de Bálsamo de Canadá sobre el cubreobjetos pequeño. Virar la preparación sobre la gota de montaje y colocar sobre el portaobjetos.

La gota de Bálsamo de Canadá sale hacia los bordes y rodea las terminaciones del cubreobjetos pequeño y de esta forma, se cubre permanentemente el anillo de esmalte de uñas. Después de rotuladas convenientemente las preparaciones con los datos de la especie, sustrato, lugar de colecta y fecha, se guardan en cajas apropiadas.

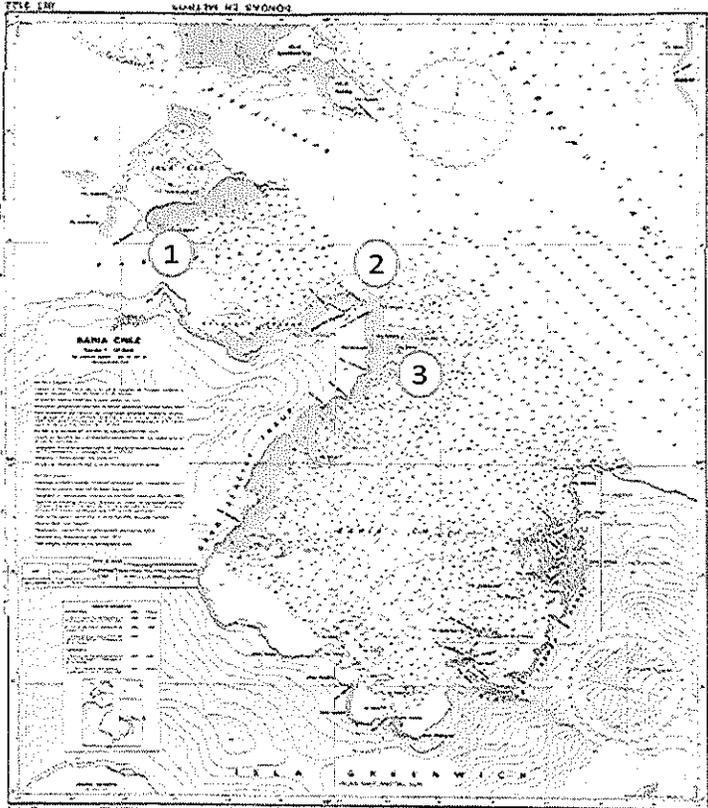
8.- DATOS OBTENIDOS (Incluir una tabla con los datos/parámetros medidos y/o muestras recopiladas con las respectivas georeferencias)

Estación de Muestreo	Muestras	GPS	Coordenadas		Características
			S	W	
Isla Dee	M51	GPS 160	62° 25' 20,3"	59° 47' 03,1"	Musgo y Mat Org
	M52A	GPS 161	62° 25' 22,8"	59° 47' 01,5"	Laguna de Deshielo
	M52S	GPS 161	62° 25' 22,8"	59° 47' 01,5"	Sedimento
	M53A	GPS 162	62° 25' 24,3"	59° 47' 34,1"	Río Deshielo
	M53S	GPS 162	62° 25' 24,3"	59° 47' 34,1"	Sedimento
Barrientos	M19	GPS 135	62° 24' 25,5"	59° 44' 40,1"	Sedimento de Playa
	M20	GPS 138	62° 24' 22,2"	59° 44' 47,0"	Musgo y Mat Org
	M21	GPS 140	62° 24' 26,3"	59° 44' 30,3"	Sedimento Algas
	M22	GPS 141	62° 24' 26,5"	59° 45' 48,2"	Sedimento Playa
	M23	GPS 142	62° 24' 34,3"	59° 45' 32,2"	Sedimento Playa
	M24S	GPS 143	62° 24' 19,7"	59° 44' 31,8"	Sedimento Playa
	M25A	GPS 143	62° 24' 19,7"	59° 44' 31,8"	Agua Superficie Cost

Isla Torres	M39	GPS 145	62° 24' 39,2"	59° 43' 48,4"	Musgo y Mat Org
	M40A	GPS 146	62° 24' 46,5"	59° 43' 48,0"	Laguna Deshielo
	M40S	GPS 146	62° 24' 46,5"	59° 43' 48,0"	Sedimento
	M41	GPS 147	62° 24' 48,9"	59° 43' 41,6"	Musgo y Mat Org
	M42A	GPS 148	62° 24' 52,3"	59° 43' 21,6"	Laguna Deshielo
	M42S	GPS 148	62° 24' 52,3"	59° 43' 21,6"	Sedimento
	M43	GPS 149	62° 24' 39,2"	59° 43' 56,5"	Sedimento
	M44A	GPS 150	62° 24' 44,1"	59° 44' 06,8"	Laguna Deshielo
	M44S	GPS 150	62° 24' 44,1"	59° 44' 06,8"	Sedimento Morrena
	M45A	GPS 151	62° 24' 44,7"	59° 44' 09,0"	Agua Playa litoral
Punta Ambato	M46A	GPS 153	62° 26' 32,3"	59° 47' 27,7"	Agua Laguna
	M46S	GPS 153	62° 26' 32,3"	59° 47' 27,7"	Sedimento
	M47A	GPS 154	62° 26' 32,2"	59° 47' 30,2"	Agua Playa
	M47S	GPS 154	62° 26' 32,2"	59° 47' 30,2"	Sedimento
	M48	GPS 155	62° 26' 36,1"	59° 47' 14,3"	Musgo y Mat Org
	M49A	GPS 156	62° 26' 35,8"	59° 47' 15,3"	Agua Laguna
	M49S	GPS 156	62° 26' 35,8"	59° 47' 15,3"	Biofilm
	M50A	GPS 157	62° 26' 40,0"	59° 47' 06,2"	Río Deshielo
Río Culebra	M54A	GPS 165	62° 26' 59,8"	59° 43' 32,3"	Biofilm
	M54S	GPS 165	62° 26' 59,8"	59° 43' 32,3"	Sedimento

Transecto Glacial Quito/ Punta Orión	M33	GPS 114	62° 27' 03,2"	59° 45' 35,5"	Sedimento
	M34A	GPS 115	62° 27' 04,0"	59° 45' 30,2"	Agua Playa
	M34S	GPS 115	62° 27' 04,0"	59° 45' 30,2"	Sedimento
	M35A	GPS 125	62° 26' 52,4"	59° 44' 34,3"	Agua Playa
	M35S	GPS 125	62° 26' 52,4"	59° 44' 34,3"	Sedimento
	M36A	GPS 127	62° 26' 51,6"	59° 44' 32,9"	Agua Playa
	M36S	GPS 127	62° 26' 51,6"	59° 44' 32,9"	Sedimento
	M37A	GPS 130	62° 26' 50,9"	59° 44' 30,7"	Agua Playa
	M37S	GPS 130	62° 26' 50,9"	59° 44' 30,7"	Sedimento
	M38A	GPS 175	62° 26' 42,8"	59° 44' 02,3"	Agua Playa
	M38S	GPS 175	62° 26' 42,8"	59° 44' 02,3"	Sedimento

Muestreo Ensenada de Guayaquil/ Bahía Chile



EST.	COORDENADAS		PROF.	P.H	SALINIDAD	TEMP.
#	lat	log	Mtrs		ups	°C
1	59°47'00"	62°26'13"	8	7,7	33	3,3
2	59°45'00"	62°26'07"	2	8,0	34	3,3
3	59°43'00"	62°26'00"	2	8,0	34,2	1,7

9.- TRABAJOS PENDIENTES RELACIONADOS CON EL PROYECTO (Describir los trabajos que son necesarios efectuar luego de terminada la expedición, incluyendo fechas, para terminar el análisis de los muestreos efectuados y posterior publicación de resultados)

N°	Actividad	Fecha Inicio	Fecha Fin	Recursos Humanos
1	Establecimiento de las estaciones de muestreo	Octubre - 2011	Diciembre-2011	2
2	Colecta de muestras y traslado de microorganismos del continente Antártico	Febrero 2012	Marzo-2012	1
3	Aislamiento y cultivo de microorganismos marinos y terrestres del continente Antártico	Marzo -2012	Mayo -2012	2
4	Evaluación taxonómica y pruebas biotecnológicas de los microorganismos aislados del continente Antártico	Junio-2012	Octubre-2012	4

5	Establecimiento de un banco de cepas del continente Antártico	Octubre -2012	Diciembre - 2012	4
---	---	---------------	------------------	---

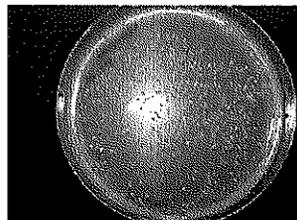
10.- CONCLUSIONES

- Se establecieron 9 zonas de muestreo, cada una con varias estaciones.

Zona de Muestreo

1. Isla Greenwich
2. Isla Barrientos
3. Isla Torres
4. Isla Dee
5. Punta Ambato
6. Puyango
7. Río Culebra
8. Ensenada de Guayaquil
9. Bahía Chile

- Se tomaron un total de 60 muestras, que serán transportadas en refrigeración y de forma segura hasta los laboratorios centrales del CIBE ESPOL. Ecuador
- Se obtuvieron los aislamientos primarios obtenidos de muestras antárticas sembrados previamente en medios selectivos



11. RECOMENDACIONES

Que en los trajes de trabajo para el campo (Jardinera y Parca) existan más bolsillos para la disponibilidad de guardar materiales de muestreo de forma rápida y cómoda.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Aisyah, S. 2008. Biodiversity of Soil Microfungi in Polar Ecosystem. Institute of Biological Sciences - University Malaya.
2. Bárzana, E. y López-Murguía. 1995. La Tecnología Enzimática. En: Biotecnología Alimentaria, pp. 103-123. Limusa, México D.F.
3. Drake H, Daniel S, Küsel K, Matthies C, Kuhner C, Braus-Stromeyer S. (1997). Acetogenic bacteria: what are the in situ consequences of their diverse metabolic versatilities? *Biofactors*. Vol. 6. (1): 13 - 24. PMID 9233536
4. Feller, G.; E. Narinx, J. A. Arpingny, M. Haleb, E. Baise, S. Genicot and Ch. Gerday. 1996. Enzymes from psychrophilic organism. *FEMS Microbiol. Rev.* 18: 189-202.
5. Feller, G. and Gerday, C. (2003). Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nat. Rev. Microbiol.*, Vol. 1, p. 200.
6. Fenical, W. and PR. Jensen. 1993. Marine microorganisms: a new biomedical resource. In: *Marine Biotechnology. Pharmaceutical and Bioactive Natural Products*. Ed. D. H. Attaway, O.R. Zaborsky. New York Plenum Press, 1:419-457.
7. Kostadinova, N. et al., 2009. Isolation and Identification of filamentous fungi from Island Livingston, Antártica. The Stephan Angeloff Institute of Microbiology - Bulgarian Academy of Sciences. Bulgaria.
8. León, J.; F. Pellón, V. Unda, J. David, C. Anaya, y V. Mendoza. 2000. Producción de enzimas extracelulares por bacterias aisladas de invertebrados marinos. *Rev. Peru. Biol.* 7(2): 202-210.
9. Moss, S. 2000. *The Biology of Marine Fungi*. Cambridge University.
10. Nies D. (2000). Heavy metal – resistant bacteria as extremophiles: molecular physiology and Biotechnology use of *Ralstonia* sp. CH4. *Extremophiles* 4: 77 – 82.

11. Schmidt, H. 1981. Avances en ciencias y tecnología de los alimentos. Alfabetica Impresora, Santiago de Chile.
12. Sonjak, S. & Gunde-Cimerman, N. 2006. Fungal biodiversity in Antarctic environment. Microbes Workshop - Abstracts.
13. Stanley, I. T. & P. M. Stanley. 1986. Potential commercial applications in aquatic microbiology. Microb. Ecol., 12: 79-100.
14. Stchigel, A. 2007. Nuevos reportes de hongos de origen marino para la Antártida. Unitat de Microbiologia - Facultat de Medicina i Ciències de la Salut - Universitat Rovira i Virgili – Sant Lloren.
15. Valderrama, B. ef *al.*, 2006. Biodiversidad de hongos acuáticos en México: Un enfoque metagenómico. Instituto de Biotecnología - UNAM - México.

13. Fecha: 5 de Marzo de 2012

