



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Ambientales - Programa de Doctorado en Ciencias
Ambientales con mención en Sistemas Acuáticos Continentales

Degradación de antibióticos utilizados en la salmonicultura mediante el uso de hongos marinos

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Ambientales con
Mención en Sistemas Acuáticos Continentales

RAMÓN ESTEBAN AHUMADA RUDOLPH
CONCEPCIÓN-CHILE
2016

Profesor Guía: Dr. José Becerra Allende
Dpto. de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía: Dr. Miguel Marínez Poblete
Dpto de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

La Tesis de Doctorado en Ciencias Ambientales con Mención en Sistemas Acuáticos continentales, titulada “Degradación de antibióticos utilizados en la salmonicultura mediante el uso de hongos marinos”, del Sr. Ramón Ahumada Rudolph, fue realizada en la Facultad de Ciencias Ambientales, Universidad de Concepción y ha sido aprobada por la siguiente Comisión de Evaluación:

Dr. José Becerra Allende
Profesor Guía
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

Dr. Miguel Martínez Poblete
Profesor Co-Guía
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Ricardo Barra Rios
Miembro Comité de Tesis
Facultad de Ciencias Ambientales
Universidad de Concepción

Dr. Cristian Torres Diaz
Evaluador Externo
Facultad de Ciencias
Universidad del Bío-Bío



Concepción – Chile
2016



A mi familia.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco al Dr. José Becerra, profesor guía de ésta tesis, por su dedicación, ayuda y sabios consejos. Por haber confiado y creído en mí desde 2007 cuando me abrió las puertas del laboratorio y me aceptó como tesista de pregrado. Ha sido un largo camino y sin duda sin sus palabras de aliento, su visión, organización, contribuciones y enseñanzas, tanto personales como académicas, no lo habría logrado.

Agradézco al Dr. Miguel Martínez del Departamento de Microbiología, profesor co-guía, por su aporte en la investigación, desarrollo de la tesis y revisión de manuscritos.

A la Dra. Katia Sáez del Departamento de Estadística, por sus valiosos consejos, tiempo y ayuda en los análisis estadísticos realizados.

A Dr. Cristian Torres por el apoyo en la extracción de PCR y secuenciación de las cepas de hongos.

A mi familia, a mis padres y hermanos, ya que sentí su apoyo en todo el proceso.

A mi compañero y amigo del doctorado Dr. Octavio Rojas, por nuestros días de charla y ánimo mutuo, lo que sin duda fue fundamental durante este periodo.

A los integrantes del Laboratorio de productos naturales de la Universidad de Concepción Dr. Mario Silva, Sr. Zenon Rozas, Sr. Fabian Rozas, Sr. Eduardo Muñoz, Dr. Victor Hernández, Sra. Claudia Ott, Rodrigo Reinoso y Daniel Cajas, por su apoyo, solidaridad y estar conmigo en este proceso.

A la Dirección de Investigación de la Universidad de Concepción, a las entidades y proyectos financiadores del proyecto: Programa PAI-CONICYT 7813110001 “Tesis de Doctorado en la industria” de la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología CONICYT del Gobierno de Chile. A la Empresa Blumar Salmones SA. y un especial reconocimiento al Sr. Nicos Nicolaidis por su ayuda en la presentación de este proyecto.

A todos los que me brindaron sus conocimientos y enseñanzas, mi eterno agradecimiento.

Tabla de contenidos

AGRADECIMIENTOS.....	IV
Índice de Contenidos	V
Índice de Figuras	VI
Reseña Currículum Vitae.....	X
Resumen	XIII
Abstract.....	XV
1.- INTRODUCCIÓN	1
2.-HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	10
2.1 Hipótesis.....	10
2.2 Objetivo general.....	10
2.3 Objetivos específicos	10
3.-MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
4.-RESULTADOS.....	14
4.1- Capítulo 1. Hongos aislados desde sedimentos marinos: Posibles degradadores de oxitetraciclina?	14
4.2- Capítulo 2. Hongos marinos aislados desde fiordos chilenos pueden degradar oxitetraciclina.	33
4.3- Capítulo 3. Degradación intracelular de oxitetraciclina por hongos aislados desde sedimentos de fiordos marinos.....	44
4.4- Capítulo 4. Variación de esteroides y ácidos grasos como respuesta adaptativa a cambios de temperatura, salinidad y pH de un hongo marino <i>Epicoccum nigrum</i> aislado desde los fiordos patagónicos.....	53
4.5- Capítulo 5. Respuesta morfológica a salinidad, temperatura y pH hongo marino <i>Epicoccum nigrum</i>	67
5.- DISCUSIÓN GENERAL	88
6.- CONCLUSIONES	94
7.- REFERENCIAS GENERALES	96

Índice de Figuras

Figura 1. Enfermedades que requerirían el uso de antimicrobianos en la industria de la salmonicultura en el año 2013 (SERNAPESCA, 2014).	: 2
Figura 2. Cantidad de antimicrobianos (ton), consumo (%) de antimicrobianos y biomasa promedio mensual (miles ton), durante el período 2007-2013.	: 3
Figura 3. Antimicrobianos utilizados en Chile por la industria de la salmonicultura, año 2013 (SERNAPESCA, 2014).	: 4
Figura 4. Esquema de la problemática ambiental generada por el uso de antibióticos en los centros de cultivo.	: 9
Cap 1. Figura 1. Sitio de muestreo. Estación “Centro de cultivo Victoria 1”, campaña de invierno 2013. Ubicación vecina a las concesiones marítimas para el cultivo de salmones (según SERNAPESCA, 2014).	: 29
Cap 1. Figura 2. Fotografía de microscopía electrónica de barrido de cepas aisladas e identificadas desde sedimentos marinos, con capacidad para degradar OTC: A) <i>P. commune</i> , B) <i>A. terreus</i> , C) <i>B. bassiana</i> , D) <i>T. harzianum</i> , E) <i>E. nigrum</i> y F) <i>E. alkalina</i> .	: 30
Cap 1. Figura 3. El comportamiento de degradación de OTC de cada cepa, en los tiempos de medición: 0, 2, 6, 10, 15 y 18 días. (*) Medias con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).	: 31
Cap 1. Figura 4. Degradación de OTC de las diferentes cepas aisladas desde sedimentos, determinados por HPLC-DAD. Las barras representan el error estándar (e.e.)	: 32
Cap 2. Figure 1. Study area in which the sampling areas are indicated.	: 36
Cap 2. Figure 2. Photographs obtained from SEM of the fungi: A) <i>Trichoderma harzianum</i> , B) <i>Talaromyces atrovirens</i> , C) <i>Penicillium crustosum</i> , D) <i>Trichoderma deliquescens</i> and E) <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> .	: 38

Cap 2. Figure 3. Degradation curves of the antibiotic oxytetracycline using the fungi strains isolated from fjords in Southern Chile.	: 39
Cap 2. Figure 4. The degradative behavior of OTC of each strain, in the measured times: 0, 2, 6, 10, 15 and 21 days.	: 40
Cap 3. Figura 1. Determinación de oxitetraciclina segun tiempo de exposición de las cepas en estudio.	: 50
Cap 3. Figura 2. Determinacion de oxitetraciclina en micelio de cepas en estudio.	: 51
Cap 3. Figura 3. Determinacion de oxitetraciclina en medio liquido de las cepas en estudio.	: 52
Cap 4. Figure 1. Oceanographic location of station 39 C12-F that sample was recollected during CIMAR 12 Fjords cruise, where we obtained samples of sediment from which the strain <i>E. nigrum</i> was isolated.	: 56
Cap 4. Figure 2. <i>E. nigrum</i> in solid and liquid cultured media YMG, with sterile distilled water (MD) and sterile filtered seawater (MM) in both cases pH was tested at 10, 7 and 4. Solid medium at pH < 5 does not coagulate agar.	: 58
Cap 4. Figure 3. Fatty acid content in the <i>E. nigrum</i> biomass cultured at pH 7, in freshwater and seawater media at temperatures of 6 and 25°C.	: 59
Cap 4. Figure 4. Fatty acid content of <i>E. nigrum</i> biomass cultured with pH 10 in freshwater and seawater media at temperatures of 6 and 25°C.	: 59
Cap 4. Figure 5. Fatty acid content of <i>E. nigrum</i> biomass cultured with pH 4 in freshwater and seawater media at temperatures of 6 and 25°C.	: 60
Cap 4. Figure 6. Graphical representation of the proportions of saturated and unsaturated fatty acids of <i>E. nigrum</i> biomass cultured at different salinity, pH and temperature.	: 61

Cap 4. Figure 7. Characteristics of the main 10 sterols identified by GC-Mass spectrometry (GC-MS) in the biomass of <i>E. nigrum</i> . Indicated: IUPAC name, formula, molecular weight (MW), respectively.	: 63
Cap 5. Figure 1. Oceanographic location of the station 39 C12-F where the sediment sample was collected and the <i>E. nigrum</i> strain was isolated during the CIMAR 12 Fjords oceanographic cruise.	: 82
Cap 5. Figure 2. Scanning Electron Microscopy photographs of <i>E. nigrum</i> in a solid culture media, in freshwater at pH 6-7 (a, b, c and d); and in seawater at basic pH (> 8) and Optics 500X (f).	: 83
Cap 5. Figure 3. Image samples of <i>E. nigrum</i> hyphae presenting thin cell wall < 0.2 μm (a,b,c) and thick cell wall > 0.2 μm (d,e,f).	: 84
Cap 5. Figure 4. Percentage of the <i>E. nigrum</i> cells presenting thin cell walls (< 0,2 μm) and thick (> 0,2 μm) under different culture media, detected through transmission electron microscopy (TEM).	: 84
Cap 5. Figure 5. Transmission electron microscopy at cross and longitudinal sections of <i>E. nigrum</i> hyphae, the outer rough wall was defined as the cells: a, b and c, and the outer smooth cells: d, e and f.	: 85
Cap 5. Figure 6. Percentage of cells in the <i>E. nigrum</i> fungal presenting smooth and rough cell walls (EPS) under culture media (<i>i.e.</i> , freshwater and seawater), temperature and pH.	: 85
Cap 5. Figure 7. Shows longitudinal sections images of <i>E. nigrum</i> hyphae at an acid pH in a marine and freshwater media at 5-25°C. Smooth cell walls (A,B,C) and rough cell walls (e).	: 86
Cap 5. Figure 8. Shows sections of the transmission electron microscopy images of cultivate hyphae at pH 7 in a marine and freshwater media, at 5 and 25°C.	: 86

Cap 5. Figure 9. Transmission electron microscopy images of cross and longitudinal sections of *E. nigrum* hyphae at pH 10, culture media (*i.e.* freshwater and seawater), temperature (*i.e.* 5-25 °C). Smooth cells (A) and rough (B,C,D). : 87

Discusión. Figura 1. Ejemplificación del proceso de degradación intracelular del antibiótico. Modificado de Harm *et al.*, (2011) para este estudio. : 94



Reseña Currículum Vitae

Ramón Ahumada Rudolph

- 2004 - 2008: Licenciatura en Ciencias. Título profesional: Químico Marino, Universidad Católica de la Santísima Concepción.
- 2009 - 2012: Magister en Ciencias con mención en Oceanografía. Universidad de Concepción.
- 2011 - 2016: Doctorado en Ciencias Ambientales con mención en Sistemas Acuáticos Continentales, Universidad de Concepción.

PUBLICACIONES ISI

1. Ahumada, R., A. Rudolph, E. González, G. Fones, G. Saldías, and **R. Ahumada-Rudolph**. **2011**. Dissolved trace metals in the water column of Reloncaví Estuary (41°38'22''S; 72°22'40'' W). *Latin American Journal of Aquatic Research* 39: 567- 574.
2. Pozo K., T. Harner, A. Rudolph, G. Oyola, V. H. Estellano, **R. Ahumada-Rudolph**, M. Garrido, K. Pozo, R. Mabilia and S. Focardi. **2012**. Survey of Persistent Organic Pollutants (POPs) and Polychlorinated Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the atmosphere of rural, urban and industrial areas of Concepcion, Chile, using passive air samplers. *Atmospheric Pollution Research* 3: 426 - 434
3. Ahumada R, **Ahumada-Rudolph R**, González E. **2015**. Metals content (Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn) in benthic organisms of pristine areas: Southern ice fi elds (48° - 50° S), Chile. *Gayana* 79(2): 128 - 136.
4. **R. Ahumada-Rudolph**, D. Cajas-Madriaga, A. Rudolph, R Reinoso, C. Torres, M. Silva and J. Becerra. **2014**. Variation of sterols and fatty acids as an adaptive response to changes in temperature, salinity and pH of a marine fungus *Epicoccum nigrum* isolated from the Patagonian Fjords. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 49 (2): 293 – 305.
5. **Ramón Ahumada-Rudolph**, V. Novoa, K. Sáez, A. Rudolph, M. Martínez, C. Torres-Díaz, J. Becerra. 2016. Marine fungi isolated from Chilean fjord sediments can degrade oxytetracycline. *Environmental Monitoring and Assessment*. 188:468 DOI: 10.1007/s10661-016-5475-0

SOMETIDAS A COMITÉ EDITOR DE REVISTAS ISI.

- 1- **R. Ahumada-Rudolph**, A. Rudolph, V. Novoa and J. Becerra. Morphological response to salinity, temperature and pH changes by marine fungus *Epicoccum nigrum* (Sometido a Comité Editor de Mycoscience).
- 2- **R. Ahumada-Rudolph**, V. Novoa, A. Rudolph, M. Martínez, C. Torres-Díaz, J. Becerra. Hongos aislados desde sedimentos marinos: Posibles degradadores de oxitetraciclina? (Aceptada para su publicación en la Revista de Biología Marina y Oceanografía).

ÁREAS DE INVESTIGACIÓN

Principal: Ciencias Ambientales

Secundaria: Biorremediación, química ambiental, contaminación, acuicultura, innovación y desarrollo.

BECAS Y RECONOCIMIENTOS

1. Concurso Beca Proyecto de Titulación 2008, Comité Oceanográfico Nacional (CONA).
2. Premio “Facultad de Ciencias” a la Excelencia Académica 2009, Primer Químico Marino egresado de la promoción 2004.
3. Beca para Estudios de Magister en Chile año académico 2009 - 2011, CONICYT. Para estudios de Magister en Ciencias con Mención en Oceanografía.
4. Concurso Nacional de Tesis de Doctorado en la Empresa 2013 – 2015. Proyecto PAI – Conicyt 783110001. Participación de hongos en la biotransformación de antibióticos utilizados en la salmonicultura. Instituciones patrocinantes: Universidad de Concepción y Blumar Salmones S.A.

EXPERIENCIA DOCENTE

Profesor encargado de las cátedras.

1. **2013. CONTAMINACIÓN E IMPACTO AMBIENTAL.** Facultad de Ingeniería y Negocios, Código EIN830. Universidad de las Américas. Segundo semestre 2013.
2. **2014. SISTEMAS DE GESTIÓN INTEGRADO** Código EIN955.. Facultad de Ingeniería y Negocios, Universidad de las Américas. Segundo Semestre 2014.
3. **2014 – 2016. SUSTENTABILIDAD** Código EIN501 (NRC – 4718). Facultad de Ingeniería y Negocios, Universidad de las Américas. Primer y Segundo Semestre 2014, Segundo Semestre 2015 y Primer Semestre 2016.
4. **2015 - 2016. GESTIÓN DE LA CALIDAD** Código EIN810. Facultad de Ingeniería y Negocios, Universidad de las Américas. Primer y Segundo Semestre 2015 y Primer Semestre 2016.
5. **2016. EVALUACIÓN Y GESTIÓN DE RECURSOS NATURALES** Código 600901. Departamento de Geografía, Facultad de Arquitectura, Urbanismo y Geografía. Universidad de Concepción. Primer Semestre 2016.

Ayudantías.

1. Ayudante de la **CÁTEDRA: CIENCIAS INTEGRADAS IV.** Universidad de Concepción, Prof. Encargado: Dr. José Becerra. Segundo semestre 2010 Segundo semestre, 2011 y segundo Semestre 2012.
2. Ayudante de la **CATEDRA: PROCESOS PRODUCTIVOS Y AMBIENTALES** Universidad de Concepción, Código 999036, Prof. Encargado: Dra. Patricia Gonzalez. Segundo Semestre 2011 y Primer Semestre 2012.
3. Ayudante de la **CÁTEDRA: SISTEMAS TERRITORIALES I.** Prof. Encargado: INDICAR Universidad de Concepción, Código 999024 Prof. Encargado: Dra. María Mardones. Primer y Segundo Semestre 2012.
4. Ayudante de la **CÁTEDRA: SUSTANCIAS TÓXICAS PERSISTENTES.** Prof. Encargado: Dr. Ricardo Barra. Universidad de Concepción, Código 999017 Primer Semestre 2011 y Primer Semestre 2014. Campus Concepción.

RESUMEN

El sector pesca y acuicultura en nuestro país genera una importante actividad productiva, con un PIB cercano al 3,5 %. La existencia de enfermedades bacterianas es considerada el componente más perjudicial de la producción acuícola. En Chile la oxitetraciclina (OTC) es uno de los antibióticos mayormente utilizados por la industria de la salmonicultura (*i.e.*, 157 toneladas en el 2013). Los hongos terrestres han demostrado capacidad ecológica y bioquímica para degradar residuos de productos químicos, ya sea por modificación química o influyendo en su biodisponibilidad, a través de un sistema enzimático extracelular e intracelular no específico. Dada esta especial capacidad de los hongos terrestres, el objetivo de este trabajo fue aislar, identificar y determinar la capacidad de cepas nativas de hongos para biotransformar antibióticos como la oxitetraciclina, desde muestras de sedimentos recolectadas en zonas de fiordos. El muestreo de sedimentos (28 muestras) se realizó mediante un box corer, en Julio 2014, en los centros de cultivo de salmones: Victoria 1 y Victoria 2, Provincia de Aysén, con el apoyo y coordinación de la empresa Blumar Salmones S.A., a través del proyecto PAI-CONICYT 7813110001. Las muestras fueron guardadas en frío, hasta su traslado al laboratorio de Productos Naturales en la Universidad de Concepción. En este estudio se aisló un total de 38 cepas, 22 de ellas fueron identificadas mediante microscopía electrónica de barrido y análisis de PCR en base al DNA. Se probó que 12 de ellas presentaban capacidad para degradar OTC. Las cepas aisladas e identificadas (Código Genbank®) se encuentran almacenadas en el Cepario del Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Universidad de Concepción. En un primer estudio, en 18 días de exposición a OTC, seis cepas de Filum Ascomycetes, *Penicillium commune*, *Aspergillus terreus*, *Beauveria bassiana*, *Trichoderma harzianum*, *Epicoccum nigrum* y *Emericellopsis alkalina* demostraron ser capaces de degradar entre un 75 y 91,7 % de la OTC presente en el cultivo. Posteriormente, en 21 días de experimentación, las cepas de hongos *i.e.*, *Trichoderma deliquescens*, *Trichoderma harzianum*, *Taralomyces atroroseus* y *Penicillium crustosum* demostraron ser capaces de degradar entre 73 a un 93 % OTC y la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* de degradar un 74,2 % de la OTC presente en una solución.

El análisis de la concentración intracelular de oxitetraciclina en 5 hongos, *i.e.*, *Penicillium spinulosum*, *Epicoccum nigrum*, *Penicillium solitum*, *Beauveria bassiana* y RA201 demostraron un incremento intracelularmente en la concentración de OTC *i.e.*, 115 mg/50 mg de micelio, para posteriormente disminuir *i.e.*, 20 mg/50 mg de micelio. En el medio la concentración de OTC disminuyó desde 250 mg/L hasta 60 mg/L en el periodo en estudio. Paralelamente, no se detectó compuestos distintos de los observados en el medio control. El análisis del comportamiento de *E. nigrum* frente a estresores ambientales *i.e.*, T°, pH y salinidad demostró que el hongo fue capaz de modificar su membrana celular *i.e.*, contenido de ácidos grasos y esteroides; y a nivel de ultraestructura aumentar el grosor de su pared celular frente al aumento de la salinidad; además, de producir sustancias poliméricas extracelulares, frente a cambios en el pH y T° del medio. Se concluye que, la cepa *E. nigrum* sería la adecuada para continuar estudios que permitan el diseño de procesos biotecnológicos de remediación de OTC en sedimentos. Además, demostró ser capaz cohabitar bajo distintas condiciones de salinidad, temperatura y pH, mantener su condición heterótrofa y biodegradar OTC. Presentó un rápido crecimiento y capacidad para adaptarse a las condiciones de estrés en terreno, *i.e.*, poca luz, salinidad y presencia de antibióticos.

ABSTRACT

Fishing and aquaculture comprise an important productive sector, generating around 3.5% of Chile's GDP. Bacterial diseases are considered one of the biggest threats to aquaculture production. In Chile, oxytetracycline (OTC) is one of the most used antibiotics used by the fish farming industry (157 tons in 2013). Terrestrial fungi have demonstrated the ecological and biochemical capacity to degrade chemical product wastes, albeit by chemical modification or by influencing its bioavailability through an extracellular and intracellular non-specific system. Given this special capacity of terrestrial fungi, the object of this study was to isolate, identify and determine the capacity of native fungi strains to biotransform antibiotics such as oxytetracycline from sediments collected from fjord areas. Sampling of sediments was carried out with a box corer in July 2014, in the salmon culture centers Victoria 1 and Victoria 2, Aysén Province, with the support of Blumar Salmones S.A. and the grant PAI-CONICYT 7813110001. Samples were cold stored until arriving at the Natural Product Laboratory at the Universidad de Concepción. In this study, a total of 38 strains were isolated, 22 of which were identified by scanning electron microscopy and PCR-based DNA analysis. It was concluded that 12 of these strains had the capacity to degrade OTC. The isolated and identified strains by Genbank[®], were stored in the strain bank at the Natural Product Laboratory at the Universidad de Concepción. In the first study, in 18 days of exposure to OTC, 6 strains from the phylum Ascomycetes, *Penicillium commune*, *Aspergillus terreus*, *Beauveria bassiana*, *Trichoderma harzianum*, *Epicoccum nigrum* and *Emericellopsis alkaline* were capable of degrading between 75 and 91.7% of the OTC present in the culture. Subsequently, at 21 days, the fungal strains *Trichoderma deliquescens*, *Trichoderma harzianum*, *Taralomyces atroroseus* and *Penicillium crustosum* were capable of degrading between 73 and 93% of the OTC; and the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* degraded 74.2% of the OTC present in the experimental solution. Intracellular concentration analysis of OTC in 5 fungi, *Penicillium spinulosum*, *Epicoccum nigrum*, *Penicillium solitum*, *Beauveria bassiana* and RA201 showed an intercellular increase in the concentration of OTC (115 mg/50 mg of mycelium), later decreasing (20 mg/50 mg of mycelium). In the medium, the concentration of OTC decreased from 250 mg/L to 60mg/L in the study period. In parallel, no compounds were

found different from those found in the control medium. The behavioral analysis of *E. nigrum* was tested against environmental stressors such as T°, pH and salinity, showing that the fungus was able to modify its cell membrane. These modifications included fatty acid content, and on an ultrastructural level to increase the thickness of its cell wall in raised salinity. Also, it was able to produce extracellular polymeric substances against changes in pH and T°. Results indicate that *E. nigrum* would be adequate for continued studies about the design of biotechnical remediation processes for OTC in sediments. Furthermore, this fungus was able to coinhabit under different conditions of salinity, temperature and pH; maintain its heterotrophic condition and biodegrade OTC. *E. nigrum* presented fast growth and the capacity to adapt to stressors such as low light, salinity and the presence of antibiotics.



1. INTRODUCCIÓN

Los salmónidos son especies introducidas en los sistemas acuáticos chilenos. Su incorporación se remonta a principios del siglo veinte, con el cultivo de truchas en la localidad de Río Blanco en la V Región (Soto *et al.*, 2001). Una de las primeras iniciativas privadas, con fines netamente comerciales, se remonta al año 1974 con el cultivo de trucha arco iris. Posteriormente, el crecimiento de la industria salmonera se acelera al comienzo de la década de los ochenta, con una producción 80 toneladas, el que se incrementa a más de 500 ton. a fines del 1984. Hacia 1985, existían operando en nuestro país 36 centros de cultivo y la producción total superaba las 1.200 toneladas. A finales de los ochentas, la producción alcanzó las 5.500 toneladas (Naylor *et al.*, 2000). A partir de los noventa la industria se consolida. Alcanzando las 247.970 ton de producción en 1997 y 304.000 ton en el año 2000.

La participación de los embarques de salmón y trucha en las exportaciones nacionales ha alcanzado un promedio 657.000 ton, con una generación de 2.335 MM US\$ para el 2008, la que en el 2011 se incrementó en 22,4 % generando 2.858 MM US\$ (DIRECOM, 2012), esto la ubica como el cuarto sector exportador a nivel nacional, después de los envíos minero, forestale y frutícola (Donoso, 2010).

Actualmente, Noruega y Chile lideran la actividad salmonicultora produciendo más del 50 % de la demanda de salmónidos del mundo (Costa-Pierce, 2010; Millanao *et al.*, 2011). En la actualidad la industria salmonera nacional genera ventas por US \$ 4.363 millones, con una producción de 850 mil toneladas, aportando cerca del 3,5 % del PIB (SUBPESCA, 2014).

Los centros de producción de acuerdo con la normativa vigente, se ubican en áreas concesionadas separadas unas de otras aproximadamente por 1,5 millas náuticas. La producción de estos centros puede variar entre 1.500 y 2.550 ton. En ellos, los peces en cultivo son alimentados con “pellets” elaborados con una importante proporción de harinas y aceites de pescado, aunque existen investigaciones para reemplazarlos por elementos vegetales (Tacón 2004). Los avances tecnológicos aplicados a la industria

salmonera permiten, en la actualidad, que se requiera de 1,2 Kg de concentrado para producir un 1 Kg de salmón, lo que equivale a pescar entre 3 y 4 Kg de peces. Sin embargo, esta relación puede aumentar hasta 10 si se considera que el elemento limitante es el aceite y no la harina de pescado (Buschmann & Fortt, 2005)

La salmonicultura presenta como una importante externalidad negativa, el uso de antibióticos como la oxitetraciclina (OTC) y el florfenicol para el tratamientos de enfermedades bacterianas (Buschmann *et al.*, 2012). Estos antibióticos son administrados en conjunto con la dieta alimentaria, tanto en la fase de alevinaje en agua dulce, como en el proceso de engorda de salmones en sectores marinos.

Entre las principales enfermedades tratadas con florfenicol y oxitetraciclina está el síndrome rickettsial del salmón (SRS), que continúa siendo la principal patología diagnosticada que requeriría el 92 % de los antimicrobianos administrados por la industria (Fig. 1). La enfermedad bacteriana del riñón (BKD) es otra condición infecciosa crónica, causada por *Renibacterium salmoninarum*, sumado a la necrosis pancreática infecciosa (INP), enfermedad viral, producida por un virus perteneciente al género Aquabirnavirus de la familia *Birnaviridae* (Sarmah *et al.*, 2006, Dietze *et al.*, 2005).

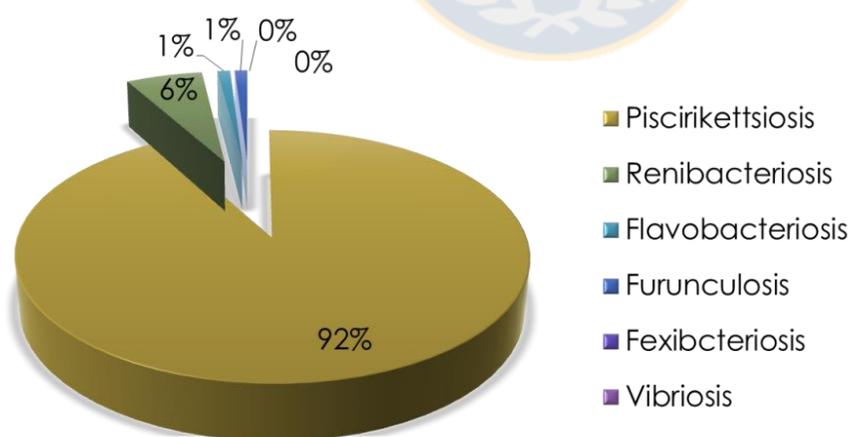


Figura 1. Enfermedades que requerirían el uso de antimicrobianos en la industria de la salmonicultura en el año 2013 (SERNAPESCA, 2014).

En general, en Chile se utilizan varios fármacos autorizados por el Ministerio de Agricultura y Ganadería (Tabla 1). Su utilización es proporcional a la producción. Por ejemplo, en el 2007 se utilizaron 385 ton de antibióticos, pero a consecuencia de la crisis del virus del ISA, la producción bajó drásticamente y con ello también el consumo de antibióticos entre los años 2009 – 2011.

Tabla 1. Fármacos autorizados por el SAG para ser utilizados en la industria de la salmonicultura en Chile (Bravo *et al.*, 2005).

Antibióticos	Antiparasitarios	Analgésicos
Acido oxolánico	Bronopol Pyceze	Benzocaina
Flumequina	Cloramina –T Daclor	Iso-eugenol (Aquí-S®)
Oxitetraciclina	Formalina	Tricaina (MS-222®)
Eritromicina	Emamectina Slice	
Florfenicol	Aquamectin	
Amoxicilina	Calbiofarm	
Sulfadoxina-Trimetropim	Ivermectina* Crack	
Emamectina	Cipermetrina	
Bronopol	Diclorvos Nuvan	
Cloramina –T	Azametifos	

Desde el 2012 con la recuperación de la producción de salmónidos, la aplicación de antibióticos ha ido aumento (Fig. 2).

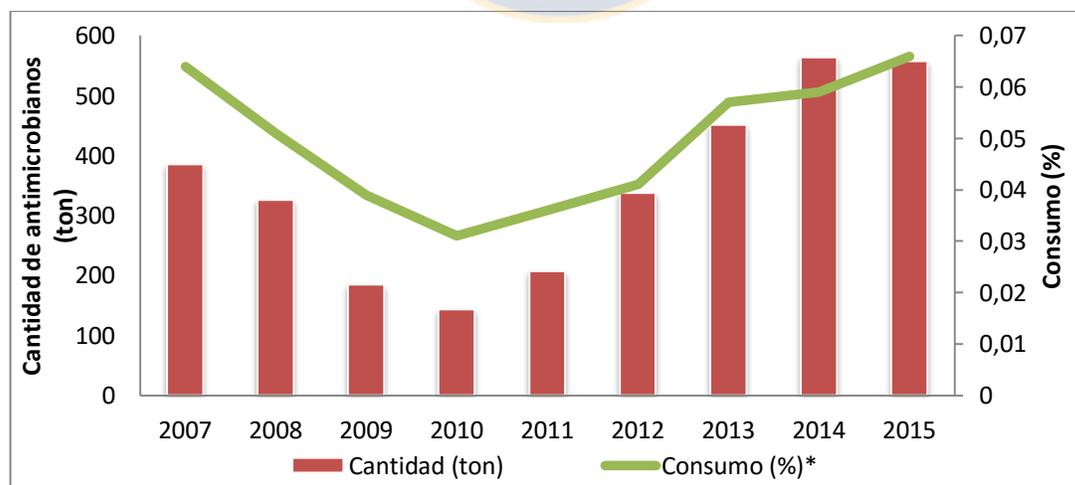


Figura 2. Cantidad de antimicrobianos (ton), consumo (%) de antimicrobianos y biomasa promedio mensual (miles ton), durante el período 2007-2013.

En el 2013 se estima que se aplicaron cerca de 157 ton de OTC (SERNAPESCA, 2014). La OTC es uno de los antibióticos más utilizado (Bravo & Midtlyng, 2007), muy superior a los 0,972 ton utilizados en Noruega en el mismo año (SERNAPESCA, 2014; Sakshaug et al., 2014) (Fig. 3)

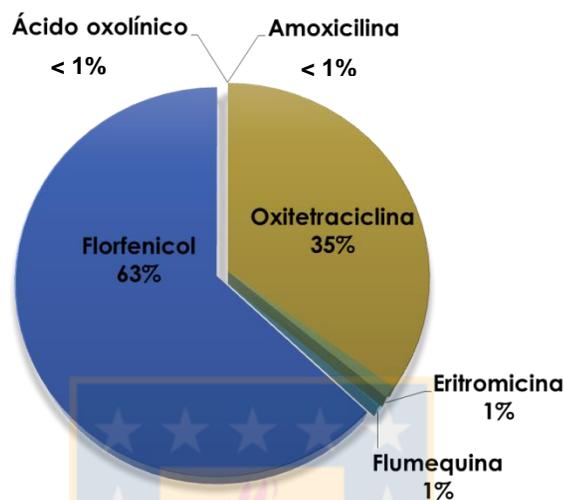


Figura 3. Antimicrobianos utilizados en Chile por la industria de la salmonicultura, año 2013 (SERNAPESCA, 2014).

La OTC es un producto de bajo costo y efectivo para el tratamiento de infecciones bacterianas comunes, debido a que interfiere en la síntesis de proteínas bacterianas (Vidaver, 2002). Presenta alta solubilidad en agua y es poco absorbida en el intestino del animal (Alcock *et al.* 1999). Se estima que un 90 % de la dosis administrada, podría ser eliminada por la orina y heces de los animales en la fase de engorda (Hektoen *et al.* 1995). Los residuos de la aplicación de antibióticos en la acuicultura, podrían generar consecuencias negativas para la salud humana, animal y alterar el medio marino (Samuelsen *et al.*, 1992; Hektoen *et al.*, 1995; Wolf, 2004; Heuer *et al.*, 2009; Cabello, 2004; 2006; Cabello *et al.*, 2013; Buschmann *et al.*, 2006; 2012; Marshall & Levy, 2011).

El impacto de la aplicación de OTC en el medio, tiene directa relación con la dosis, concentración y tiempo de aplicación (Cabello 2004, 2006, Buschmann *et al.* 2006, 2012). Su efecto abarca un amplio espectro de bacterias, no sólo las patógenas. Además, se ha documentado la presencia de poblaciones bacterianas resistentes a la oxitetraciclina

en la microflora de granjas salmoneras (Cabello *et al.* 2013), las cuales serían reservorios de bacterias portadoras de determinantes genéticos transferibles de resistencia a antibióticos, lo que constituye un riesgo para la salud (Miranda & Zemelman 2002, Heuer *et al.* 2009, Marshall & Levy 2011).

Los residuos generados por la industria salmonera, corresponden a un importante volumen de lodo que se acumula en los fondos de las jaulas, los que pueden contener antibióticos y/o pesticidas, una alta concentración de materia orgánica, nitrógeno y fósforo, los que debieran ser retirados para mitigar los procesos de eutrofización en agua dulce y en sistemas marinos, donde éstos últimos no son removidos (Buschmann *et al.* 2009).

Es por ello, que se requiere de un manejo de desechos cada vez más eficiente. Una alternativa sería disponer de microorganismos para el tratamiento de los lodos *i.e.* bacterias y/o hongos, con propiedades catabólicas que permitan degradar compuestos contaminantes como antibióticos y/o pesticidas y permitir con ello la utilización de estos lodos (residuos) como fertilizantes de suelos de uso silvo-agropecuario (Rodarte-Morales *et al.* 2011).

La utilización de lodos como fertilizantes, se enmarca dentro del Marco Político y Legal del Gobierno de Chile, cuyo lineamiento principal establece que la aplicación de lodos en el suelo debe preservar y mejorar las características físicas, químicas o agrícolas del suelo, evitando su deterioro y daños a la salud, vida, integridad o desarrollo de los vegetales o animales” (San Martín *et al.* 2010). Dado que, los microorganismos son la fuerza motriz de los ciclos biogeoquímicos y el puente que une los procesos entre los ecosistemas (Kong *et al.* 2011), el mantenimiento de la actividad biológica es clave para garantizar el correcto funcionamiento de los ecosistemas (Liu *et al.* 2012).

El estudio de los océanos tiene que ver con el análisis de procesos, pero también, requiere que sean investigados los componentes y forzantes de estos procesos. Esto tiene mayor validez respecto a los hongos que están involucrados en la transformación de los complejos químicos producto de los ciclos del océano. En la década de los 70’, el hombre

a través de nuevas tecnologías y conocimiento reconoció el rol de las bacterias en el “microbial loop” y en los 90’ de las arqueas (He *et al.*, 2016). Recientemente a los hongos se les reconoce un rol activo en los ciclos biogeoquímicos (Clipson, 2006), tanto en los ambientes terrestres como marinos, pero aún es escaso el conocimiento que se tiene de ellos en el océano y sólo se puede especular su importancia ecológica. La condición heterótrofa de los hongos, sus condiciones de adaptabilidad a la variabilidad ambiental y su resistencia específica, constituyen un modelo para el estudio de los hongos en el océano y su influencia en procesos de remoción de contaminantes introducidos por el uso intensivo de sectores costeros, por ejemplo en granjas de cultivos de salmónidos.

Un hongo marino es aquel capaz de crecer y esporular en ambientes marinos o estuarinos, es decir, es capaz de desarrollarse a una cierta concentración de sales y de nutrientes en agua de mar (Johnson & Sparrow 1961, Tubaki 1969). Los hongos son organismos eucariotas heterótrofos capaces de mineralizar y degradar compuestos de origen vegetal como celulosa y ligninas, y en menor medida actúan sobre tejidos animales liberando los nutrientes al ecosistema (Bugni & Ireland, 2004; Saleem *et al.*, 2007). Se informa que los hongos son capaces de osmoregular, en respuesta al estrés ambiental generado por cambios en la concentración de sales del medio, debido principalmente a su capacidad de modificar la composición de esteroides y ácidos grasos en sus paredes celulares (Horvath *et al.*, 1998).

Se estima en 1500 las especies conocidas de hongos marinos (Kirk *et al.*, 2008). Se pueden desarrollar como parásitos de algas, animales, saprobios de la madera, pastos marinos, quistes de protozoarios y corales, además se encuentran en la columna de agua, espuma de mar y sedimentos. Se conoce entre 27-36 especies capaces de desarrollarse en ecosistemas especiales como marismas, manglares y salares, siendo exclusivos para estos ecosistemas (Kirk *et al.*, 2008). Hasta hace poco, dentro del reino de los hongos no existía ningún representante halófilo. Sin embargo, recientemente se ha sugerido que los órdenes: Dothideales, Eurotiales (Filo: Ascomycota) y Wallemiales (Filo: Basidiomycota) incluyen a especies adaptadas a condiciones hipersalinas. Un ejemplo es la especie *Wallemia ichthyophaga* capaz de sobrevivir a altas concentraciones de salinidad (Gunde-Cimerman 2000, Butinar *et al.*, 2005; Zalar *et al.*, 2005).

Del mismo modo, se ha aislado hongos capaces de degradar exoesqueletos de quitina *i.e.* del filo Ascomycete la especie *Abyssomyces hydrozoicus*; en los Mixomicetos productores de enzimas líticas como la especie *Physarum polycephalum*, capaces de producir complejos extracelulares de quitinasas, lo que involucraría un importante rol de éstos organismos en los sistemas marinos ricos en quitina (Carlile *et al.*, 2001).

El phylum Chytridiomycota (quitridios) es el único que produce zoosporas y requiere agua para su dispersión. Vive principalmente en la tierra o en agua dulce, aunque algunos se encuentran en ambientes marinos, en que cumplen un importante participación en la descomposición de la materia orgánica. Pertenecen a un antiguo grupo de organismos y se cree que han evolucionado poco desde que se separaron de su último ancestro común dentro de los Eucariotas (Kavanagh, 2011).

Dado que los hongos juegan un papel en la descomposición de la materia orgánica y producen una gama muy diversa de metabolitos secundarios con propiedades herbicidas y agentes utilizados en biorremediación, poseerían potencial para ser utilizados como indicadores de contaminación (Kirk *et al.*, 2008).

Los hongos marinos no han sido suficientemente estudiados como degradadores de xenobióticos (Williams *et al.* 2007). se estima que la micorremediación sería menos costosa que los métodos físico-químicos equivalentes. Por ejemplo, la micorremediación no requiere de realizar excavaciones para tratar el suelo y agua en el subsuelo, con ello se reduce el impacto sobre los sistemas naturales, por lo que requeriría menor energía para su implementación (Magan *et al.* 2010). Como antecedentes el hongo terrestre *Phanerochaete chrysosporium* a sido utilizado en la biodegradación de antibióticos como la tetraciclina y la OTC, demostrando que bajo condiciones controladas de laboratorio el 72,5 % de 50 mg/L de la tetraciclina y 84,3 % de 50 mg/L de oxitetraciclina fueron degradados cuando se añadieron 40 U/L de MnP (Rodarte-Morales *et al.*, 2011). Del mismo modo, Gemma *et al.*, en 2011 encontraron que el hongo ligninolítico *Bjerkandera adusta*, bajo condiciones controladas de laboratorio por medio de su enzima extracelular peroxidasa versátil (VP), fue capaz de degradar en 5,25 minutos, diclofenaco y estrógenos y un 80% naproxeno y sulfametoxazol. En tratamientos en fase sólida con el hongo

Trametes versicolor se demostró la eliminación de 13 productos farmacéuticos desde los lodos de una planta depuradora de biosólidos. Además, se ha constatado que después del tratamiento con hongos, los fármacos fenazona, bezafibrato, fenofibrato, cimetidina, claritromicina, sulfametazina y atenolol fueron completamente degradados, constituyéndose en el primer tratamiento por hongos para la eliminación de productos químicos con esta naturaleza (Xianghua *et al.*, 2010).

Los fiordos del Sur de Chile por sus condiciones de aislamiento geográfico y baja intervención, son sistemas poco alterados, cuyos canales están siendo rápidamente concesionados para el cultivo de salmónidos, donde cabe esperar una alta diversidad de organismos, entre ellos de hongos. Los resultados descritos sugieren que el proceso de restaurar matrices naturales (micorremediación), utilizando hongos marinos podría constituir una estrategia adecuada para reducir la concentración de contaminantes tóxicos como los residuos del antibiótico oxitetraciclina introducida para combatir infecciones bacterianas en los centros de cultivo de salmonidos.

La hipótesis del presente estudio fue que los hongos marinos por su condición heterótrofa, su adaptabilidad a la variabilidad ambiental y su resistencia específica a diferentes estresores serían una opción a analizar para ser empleados como degradadores de antibióticos en sedimentos marinos. La figura 4 ilustra la problemática ambiental generada en los centros de cultivos y su posible solución con la utilización de hongos marinos.

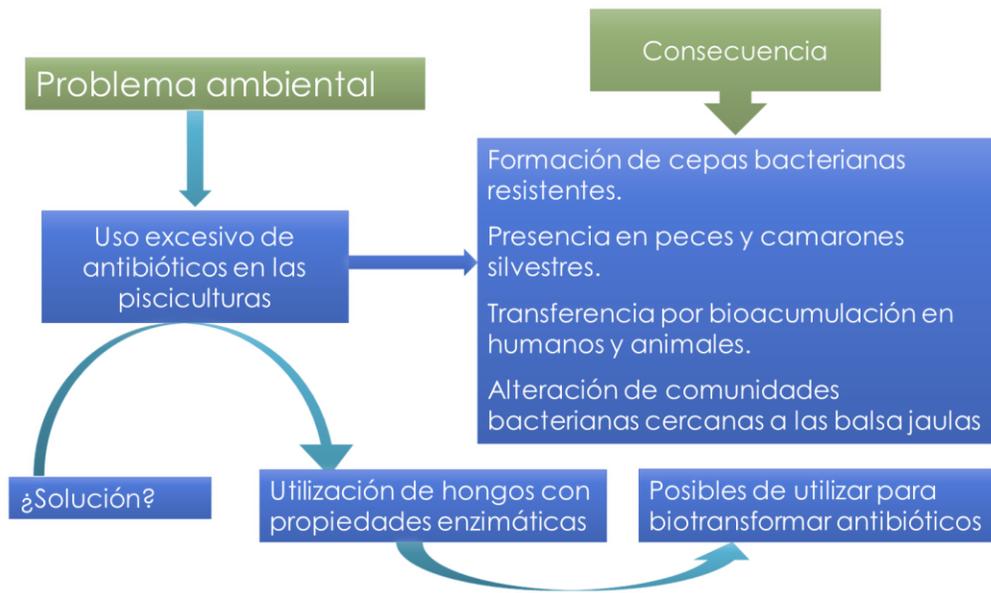


Figura 4. Esquema de la problemática ambiental generada por el uso de antibióticos en los centros de cultivo.



2.-HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

Los sedimentos de los fiordos están expuestos a los residuos de antibióticos que sedimentan después de ser utilizados en la salmicultura, por lo tanto, los hongos que se aíslan de éstos sedimentos, no sólo estarían adaptados a estas condiciones, sino que tendrían la capacidad de transformarlos y/o degradarlos.

2.2 Objetivo general

- El objetivo de este estudio fue determinar la capacidad de hongos aislados desde sedimentos en el área de fiordos del Sur de Chile, para biotransformar el antibiótico oxitetraciclina.

2.3 Objetivos específicos

- Identificar y caracterizar cepas de hongos aislados desde sedimentos de fiordos del Sur de Chile en que se realizan cultivos de salmónidos.
- Evaluar la capacidad de cepas de hongos aislados desde los sedimentos en centros de cultivo de salmónidos para degradar el antibiótico oxitetraciclina.
- Determinar la capacidad de las cepas de hongos aislados desde centros de cultivo de salmónidos para degradar y/o transformar el antibiótico oxitetraciclina utilizado en la industria de la salmicultura.

3.-MATERIALES Y MÉTODOS

Recolecta de sedimentos.

Los sedimentos fueron recolectados en julio de 2013, desde fiordos de la provincia de Aysén (45°12'35,33''S 74°04'25''W) (Fig. 1). Para ello se utilizó una embarcación menor y una draga Van Veen de acero inoxidable de 1.800 cm³ de capacidad. Se recolectaron 16 muestras (con tres réplicas cada una) desde los primeros 5 cm de sedimento, en puntos equidistantes en torno a las balsas de cultivo, a una distancia aproximada de 5 metros. Cada muestra y sus réplicas fueron almacenadas en tubos Falcon esterilizados a -18°C, para luego ser trasladadas refrigeradas hasta el laboratorio.

Cuantificación de OTC en sedimento

De cada muestra se tomó 3 g de sedimento húmedo, los cuales fueron mezclados y homogeneizados en 30 ml de ácido oxálico 0,01 M en metanol. Se aplicó ultrasonido con un equipo Branson modelo 291 de 40 kHz por 15 min y centrifugó a 4.000 x g por 20 minutos. El sobrenadante fue recuperado, trasvasiado y secado a presión reducida a 50 °C. Se reconstituyó la muestra en 3 mL de una mezcla agua : acetonitrilo en proporción 3:1 y filtró con PVDF 0,22 µm para luego inyectar en HPLC-DAD. Se preparó una curva de calibrado entre 0 a 100 µg g⁻¹, con sedimento enriquecido con OTC para la cuantificación.

Aislamiento e identificación de las cepas

De cada muestra se tomó 3 g de sedimento y se diluyó en agua de mar estéril, homogeneizó y se dejó decantar por 15 min. Se realizó una dilución seriada con agua de mar esterilizada, agregando 1 ml en 9 ml de agua de mar, con 2 repeticiones. Se tomó una alícuota de 100 µL que fue sembrada por diseminación en la superficie de una placa con agar YMG (levadura, malta y glucosa), con adición de estreptomina para evitar el desarrollo de bacterias (200 mg L⁻¹) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 días para luego aislar las cepas.

La determinación y caracterización morfológica de las cepas, se realizó utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM marca ETEC Autoscan) con la Técnica de

Inclusión en Araldita (DURCUPAN ACM). Para la validación de las especies, se utilizó técnicas de PCR. Para ello se amplificó la región ITS (que incluye el gen 5.8S) y las subunidades nucleares ribosomales de rRNA (LSU) utilizando ITS-1/ITS-4 (Tedersoo *et al.* 2009). Se extrajo el ADN del micelio utilizando el EZNA ADN fúngico MiniKit (Omega-Biotek). Las reacciones de PCR se realizaron con ITS4 (5'- tctctcgcgttattgatatgc-3') como partidores forward y ITS1 (5'-tccgtaggtgaacctgcgg-3') como partidores reverse. Para cada reacción se utilizó 15 μ L de solución que contenía 30 - 50 ng de ADN, 1X de tampón de PCR, 2 mM $MgCl_2$, 0,1 mM de cada dNTP, 0,5 mM de los partidores directos e inverso, y 1 U de Taq ADN polimerasa. Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo con una desnaturalización inicial de 4 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 60 s a 50 °C, 60 s a 72 °C y un paso final de 5 min a 72 °C. El producto de PCR se purificó y secuenció en ambos sentidos. Secuenciadas las cepas fueron editadas utilizando Genious software v5.4 (Drummond *et al.* 2011). La secuencia se analizó con BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para la determinación del porcentaje de identidad máxima se utilizó las secuencias de la base mundial de datos. Las secuencias obtenidas fueron depositadas en la GenBank[®]. Cada una de las cepas aisladas en este trabajo, fueron almacenadas en el Cepario del Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Universidad de Concepción.

Evaluación de degradación de OTC

Se cultivó las esporas de cada cepa por 4 días en 125 ml YMG líquido. Se tomó 5 g de micelio de cada cepa los que fueron cultivados en matraz Erlenmeyer de 250 ml con 125 ml de solución con 250 mg L^{-1} de oxitetraciclina. Cada cepa y sus respectivos controles fueron trabajados en triplicado, a temperatura ambiente, oscuridad y agitador orbital (120 x g). Como control negativo se utilizó solución de oxitetraciclina a una concentración de 250 mg L^{-1} . Los ensayos fueron controlados a los 0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18 días de cultivo. Para ello, una alícuota de 1 mL de cada ensayo y controles fue filtrada en filtros PVDF de 0,23 μ m de poro e inyectada en HPLC-DAD, para evaluar su actividad degradadora de oxitetraciclina. A partir de un estándar de clorhidrato de oxitetraciclina al 98,9% pureza, CAT# 500105 Calbiochem, se preparó una curva de calibración con 7, 15, 30, 100, 175 y 250 mg L^{-1} . Características de la curva: $y = 25,89x - 115,1$; R^2 de 0,998; error típico de

1,59 mg L⁻¹; con límites de detección y cuantificación de 6,03 y 6,46 mgL⁻¹, respectivamente.

Análisis estadísticos

Se realizó un análisis de varianza de medidas repetidas, que consideró 2 factores: Tipo de cepa y tiempo de exposición en días. Además, se aplicó la prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha = 0,05$) para lo cual se utilizó el programa Statistica v. 8.0, y el procedimiento Proc Mixed del programa SAS/STAT(R) 9.2.



4.-RESULTADOS

4.1- Capítulo 1. Hongos aislados desde sedimentos marinos: Posibles degradadores de oxitetraciclina?

Ramón Ahumada-Rudolph, Vanessa Novoa, Anny Rudolph, Miguel Martínez, Cristian Torres-Díaz, José Becerra.

Resumen

Los hongos marinos por su condición heterótrofa, su adaptabilidad a la variabilidad ambiental y su resistencia específica a diferentes estresores, son una opción para ser empleados como restauradores de sectores contaminados con antibióticos. Con esta hipótesis se realizó esta investigación en los fiordos del sur de Chile una zona de cultivo de salmones. Se aisló e identificó 38 cepas de hongos endémicos del sedimento cercano a los centros de cultivo. Seis cepas del Filum Ascomycetes *i.e.*, *Penicillium commune*, *Aspergillus terreus*, *Beauveria bassiana*, *Trichoderma harzianum*, *Epicoccum nigrum* y *Emericellopsis alkalina*, demostraron ser capaces de degradar sobre el 78 % de la oxitetraciclina (OTC) presente en cultivos. En el área de estudio se detectó cantidades medibles de OTC, en el sector Este a la balsa jaula y en los sedimentos de mayor profundidad (Z = 100 m) *i.e.*, $4,62 \pm 0,12$ hasta $24,1 \pm 1,03 \mu\text{g g}^{-1}$. Los resultados representan un primer paso en la implementación de procesos que permitan la biorremediación de residuos de OTC desde los sedimentos.

Palabras clave: degradación, hongos marinos, acuicultura, restauración

Nota: Trabajo aceptado para su publicación en la Revista de Biología Marina y Oceanografía en Diciembre de 2016. Se adjunta certificado.

Viña del Mar, Chile, 08 de agosto de 2016

Dr (c).

Ramón Ahumada Rudolph

Laboratorio de Química de Productos Naturales
Departamento de Botánica
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción
Concepción, Chile

Estimado Sr. Ahumada:

Certificamos que su Artículo "**Hongos aislados desde sedimentos marinos: Posibles degradadores de oxitetraciclina?**" de los autores Ramón Ahumada-Rudolph, Vanessa Novoa, Anny Rudolph, Miguel Martínez, Cristian Torres-Díaz, José Becerra, con fecha 29 de junio de 2016 ha sido aceptado con cambios menores y será publicada en el volumen 51(3) de diciembre 2016 de la Revista de Biología Marina y Oceanografía.

Por tanto, le informamos que pronto recibirá las observaciones finales de su artículo para que nos envíe la versión definitiva y comenzar la etapa de prediagramación.

Agradeciendo su preferencia y esperando seguir contando con sus aportes científicos, se despide cordialmente,



Dr. Claudia A. Bustos

Editor en Jefe
Revista de Biología Marina y Oceanografía

Hongos aislados desde sedimentos marinos: Posibles degradadores de oxitetraciclina?.

Oxytetracycline degrading fungi isolated from Chilean fjord sediments.

R. Ahumada-Rudolph^{1,2,6*}, V. Novoa^{1,2}, M. Martínez³, A. Rudolph⁴, C. Torres-Díaz⁵, J. Becerra⁶

¹ Departamento de Geografía, Facultad de Arquitectura, Urbanismo y Geografía. Víctor Lamas 1290, PO Box 160-C. Universidad de Concepción, Chile. e-mail: ramonahumada@udec.cl Phone number: +56993695155

² Estudiantes de Doctorado en Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias Ambientales. Víctor Lamas 1290, PO Box 160-C. Universidad de Concepción, Chile.

³ Laboratorio de Microbiología Básica y Bioremediación, Facultad de Ciencias Biológicas. Víctor Lamas 1290, PO Box 160-C. Universidad de Concepción, Chile.

⁴ Facultad de Ciencias, Universidad Católica de la Santísima Concepción, Alonso de Ribera 2850 PO Box 297, Concepción, Chile

⁵ Laboratorio de Genómica & Biodiversidad (LGB), Departamento de Ciencias Naturales, Universidad del Bío-Bío, Dieciocho de Septiembre 580 PO Box 447, Chillán, Chile.

⁶ Laboratorio de Química de Productos Naturales, Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas. Víctor Lamas 1290, PO Box 160-C. Universidad de Concepción, Chile.

Abstract. It is proposed that marine fungi are a good alternative for remediation of areas contaminated with antibiotics due to their heterotrophic condition, adaptability to environmental changes, and specific resistance to stressors. With this assumption we investigated the fjords of Southern Chile, which are characterized by salmon farming. We evaluated the concentration of oxytetracycline (OTC) in sediments from different areas surrounding salmon cages. In addition we isolated fungi species to assess their ability to degrade OTC. Measurable amounts of OTC were detected in deeper sediments located at the eastern sector of cages and rafts (Z= 100 m; 4.62 ± 0.12 to 24.1 ± 1.03 $\mu\text{g g}^{-1}$). Thirty-eight strains of endemic fungi were isolated and identified in the sediments near the farming center. Among these strains we detected species from the Phylum Ascomycetes, including *Penicillium commune*, *Aspergillus terreus*, *Beauveria bassiana*, *Trichoderma harzianum*, *Epicoccum nigrum* and *Emericellopsis alkaline*.

These strains fungi were capable of degrading about 76% to 92% of the OTC present in the culture media. The results of this study constitute a first step into implementing processes that could favor waste bioremediation from marine sediments.

Key words: Degradation, marine fungi, Ascomycota, oxytetracycline, bioremediation

Resumen.- Los hongos marinos por su condición heterótrofa, su adaptabilidad a la variabilidad ambiental y su resistencia específica a diferentes estresores, son una opción para ser empleados como restauradores de sectores contaminados con antibióticos. Con esta hipótesis se realizó la investigación en una zona de cultivo de salmones en el sur de Chile. Para ello se evaluó la concentración de oxitetraciclina (OTC) de sedimentos de diferentes zonas cercanas a jaulas de cultivo de salmón. Así como también se aisló de sedimentos cepas de hongos para evaluar su capacidad de degradar OTC. Los resultados obtenidos mostraron en el área de estudio concentraciones de OTC que fluctuaron entre $4,62 \pm 0,12$ a $24,1 \pm 1,03 \mu\text{g g}^{-1}$, en el sector Este a la balsa jaula y en los sedimentos de 100 m de profundidad. Además, de éstos sedimentos se aisló 38 cepas de hongos y se identificó y trabajó con seis cepas del Filum Ascomycetes: *Penicillium commune*, *Aspergillus terreus*, *Beauveria bassiana*, *Trichoderma harzianum*, *Epicoccum nigrum* y *Emericellopsis alkalina*. Las pruebas de biodegradación demostraron que las cepas fueron capaces de degradar OTC en porcentajes que fluctuaron entre 76 y 92%. Los resultados representan un primer paso en la implementación de procesos que permitan la biorremediación de residuos de OTC desde los sedimentos.

Palabras clave: Degradación, hongo marino, Ascomycota, oxitetraciclina, biorremediación.

Introducción

La oxitetraciclina (OTC) es un antibiótico de amplio espectro incluido en el grupo de las tetraciclina y uno de los dos antibióticos (junto a la estreptomycin) registrados por la EPA para uso veterinario, como tratamiento profiláctico. La OTC es de bajo costo y alta eficiencia, debido a que interfiere en la síntesis de proteínas bacterianas (Vidaver 2002). Se utiliza en una amplia variedad de actividades, acuicultura, ingeniería genética,

experimentos de investigación, crianza de juveniles y producción de cultivos (Dietze *et al.* 2005).

En la salmonicultura antibióticos como OTC son administrados en conjunto con la dieta alimentaria, tanto en la fase de alevinaje en agua dulce, como en el proceso de engorda de salmónes en sectores marinos. El año 2013 se estima se aplicó alrededor de 157 toneladas de OTC a los sistemas de cultivo; el 92% de su uso se justificó por la enfermedad de piscirickettsiosis (SERNAPESCA 2014). La OTC presenta alta solubilidad en agua y es poco absorbida en el intestino del animal (Alcock *et al.* 1999). La literatura indica que un 90% de la dosis administrada de OTC, podría ser eliminada por la orina y heces de los animales en la fase de engorda (Hektoen *et al.* 1995).

El impacto de la aplicación de OTC tiene directa relación con la dosis, concentración y tiempo de aplicación (Cabello 2004, 2006; Buschmann *et al.* 2006, 2012; 2016). Su efecto abarca un amplio espectro de bacterias, no sólo las patógenas. Además, se ha identificado presencia de poblaciones de bacterias resistentes a oxitetraciclina en la microflora de granjas salmoneras (Cabello *et al.* 2013), las cuales serían reservorios de bacterias portadoras de determinantes genéticos transferibles de resistencia a antibióticos, lo que constituye un riesgo para la salud (Miranda & Zemelman 2002, Heuer *et al.* 2009, Marshall & Levy 2011; Bannister *et al.* 2014; Andrade *et al.* 2015).

En la Región de Aysén, existen alrededor de 635 concesiones para cultivos de salmónidos, siendo ésta la principal actividad económica en el *área*. En el año 2014 se reportó una producción de 850 mil toneladas (SUBPESCA 2014; Buschmann & Muñoz 2016)¹. La salmonicultura es una actividad que genera problemas ambientales en el borde costero por el ingreso de antibióticos, altos contenidos de materia orgánica, nutrientes, disminución en el contenido de oxígeno disuelto, acidificación del sedimento y alteraciones ecológicas (Rudolph *et al.* 2009, 2011). En la actualidad los planes de mitigación de los centros de cultivo aún consisten en sólo su relocalización (SUBPESCA 2015)², en espera que con el transcurso del tiempo mejore la calidad de los sedimentos en las áreas intervenidas ambientalmente.

¹ SUBPESCA. 2014. Informe sectorial de pesca y acuicultura. Subsecretaría de Pesca y Acuicultura. Valparaíso, Chile <http://www.subpesca.cl/publicaciones/606/articles-86801_documento.pdf>

² SUBPESCA. 2015. Subsecretaría de Pesca y Acuicultura. Valparaíso, Chile <<http://www.subpesca.cl/prensa/601/w3-article-88821.html>>

Los hongos marinos no han sido suficientemente estudiados como degradadores de xenobióticos (Williams *et al.* 2007). En relación a los costos de la micorremediación para remover contaminantes, se estima que es menos costosa que los métodos físico químicos equivalentes. Por ejemplo, la micorremediación no requiere de realizar excavaciones para tratar el suelo y agua en el subsuelo, permitiendo conservar la estructura del sustrato en que se aplica, reduciendo el impacto sobre los sistemas naturales (Magan *et al.* 2010).

En este estudio la hipótesis de trabajo es que los hongos marinos por su condición heterótrofa, su adaptabilidad a la variabilidad ambiental y su resistencia específica a diferentes estresores, son una opción a analizar para ser empleados como degradadores de antibióticos. El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar cepas de hongos endémicos, desde sedimentos cercanos a balsas jaulas de cultivo de salmónidos y determinar su capacidad para degradar el antibiótico OTC.

Materiales y métodos.

Recolección de sedimentos

Los sedimentos fueron recolectados en julio de 2013, desde fiordos de la provincia de Aysén (45°12'35,33''S 74°04'25''W) (Fig. 1). Para ello se utilizó una embarcación menor y una draga de acero inoxidable de 1.800 cm³ de capacidad. Se recolectaron 16 muestras (con tres réplicas cada una) desde los primeros 5 cm de sedimento, en puntos equidistantes en torno a las balsas de cultivo, a una distancia aproximada de 5 metros. Cada muestra y sus réplicas fueron almacenadas en tubos Falcon esterilizados a -18°C, para luego ser trasladadas refrigeradas hasta el laboratorio.

Cuantificación de OTC en sedimento

De cada muestra se tomó 3 g de sedimento húmedo, los cuales fueron mezclados y homogeneizados en 30 ml de ácido oxálico 0,01 M en metanol. Se aplicó ultrasonido con un equipo Branson modelo 291 de 40 kHz por 15 min y centrifugó a 4.000 x g por 20 minutos. El sobrenadante fue recuperado, trasvasiado y secado a presión reducida a 50 °C. Se reconstituyó la muestra en 3 mL con agua : acetonitrilo en proporción 75:25 y filtró con PVDF 0,22 µm para luego inyectar en HPLC-DAD. Se preparó una curva de

calibrado entre 0 a 100 $\mu\text{g g}^{-1}$, con sedimento enriquecido con OTC para la cuantificación.

Aislamiento e identificación de las cepas

De cada muestra se tomó 3 g de sedimento y se diluyó en agua de mar estéril, homogeneizó y se dejó decantar por 15 min. Se realizó una dilución seriada con agua de mar esterilizada, agregando 1 ml en 9 ml de agua de mar, con 2 repeticiones. Se tomó una alícuota de 100 μL que fue diseminada en la superficie de una placa con agar YMG (levadura, malta y glucosa), con adición de estreptomina para evitar el desarrollo de bacterias (200 mg L^{-1}) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 días para luego aislar las cepas.

La determinación y caracterización morfológica de las cepas, se realizó utilizando microscopía electrónica de barrido. Para la validación de las especies, se utilizaron técnicas de PCR. Para ello se amplificó la región ITS (que incluye el gen 5.8S) y las subunidades nucleares ribosomales de rRNA (LSU) utilizando ITS-1/ITS-4 (Tedersoo *et al.* 2009). Se extrajo el ADN del micelio utilizando el EZNA ADN fúngico MiniKit (Omega-Biotek). Las reacciones de PCR se realizaron con ITS4 (5'- tctccgcttattgatatgc-3') como primers directos y ITS1 (5'-tccgtaggtgaacctgcgg-3') como primers inversos. Para cada reacción se utilizó 15 μL de solución que contenía 30 - 50 ng de ADN, 1X de tampón de PCR, 2 mM MgCl_2 , 0,1 mM de cada dNTP, 0,5 mM de los cebadores directos e inverso, y 1 U de Taq ADN polimerasa. Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo con una desnaturalización inicial de 4 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 60 s a 50°C, 60 s a 72°C y un paso final de 5 min a 72°C. El producto de PCR se purificó y secuenció en ambos sentidos. Secuenciadas las cepas fueron editadas utilizando Genious software v5.4 (Drummond *et al.* 2011). La secuencia se analizó con BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para la determinación del porcentaje de identidad máxima se utilizaron las secuencias de la base mundial de datos. Las secuencias obtenidas fueron depositadas en la GenBank®. Cada una de las cepas aisladas en este trabajo, fueron almacenadas en el Cepario del Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Universidad de Concepción.

Evaluación de degradación de OTC

Se cultivó las esporas de cada cepa por 4 días en 125 ml YMG líquido. Se tomó 5 g de micelio de cada cepa los que fueron cultivados en matraz Erlenmeyer de 250 ml con 125 ml de solución con 250 mg L⁻¹ de oxitetraciclina. Cada cepa y sus respectivos controles fueron trabajados en triplicado, a temperatura ambiente, oscuridad y agitación constante (120 x g). Como control negativo se utilizó solución de oxitetraciclina a una concentración de 250 mgL⁻¹. Los ensayos fueron controlados a los 0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18 días de cultivo. Para ello, una alícuota de 1 mL de cada ensayo y controles fue filtrada en filtros de 0,23 µm de poro e inyectada en HPLC-DAD, para evaluar su actividad degradadora de oxitetraciclina. A partir de un estándar de oxytetracycline hydrochloride al 98,9% pureza, CAT# 500105 Calbiochem, se preparó una curva de calibración con 7, 15, 30, 100, 175 y 250 mgL⁻¹. Características de la curva: $y = 25,89x - 115,1$; R^2 de 0,998; error típico de 1,59 mg L⁻¹; con límites de detección y cuantificación de 6,03 y 6,46 mgL⁻¹, respectivamente.

Análisis estadísticos

Se realizó un análisis de varianza de medidas repetidas, que consideró 2 factores: Tipo de cepa y tiempo de exposición en días. Además, se aplicó la prueba *a posteriori* de Tukey se utilizó el programa Statistica v. 8.0.

Resultados

En el análisis de sedimentos en sectores aledaños a las balsas de engorda de salmónidos, se detectó cantidades medibles de OTC en 3 de las 16 muestras. Específicamente en el sector Este a la balsa y en los sedimentos con profundidades de: 5 m ($4,62 \pm 0,12 \mu\text{g g}^{-1}$), 15 m ($5,3 \pm 0,10 \mu\text{g g}^{-1}$) y 100 m ($24,1 \pm 1,03 \mu\text{g g}^{-1}$) de profundidad.

De las 38 cepas aisladas desde los sedimentos del área de fiordos de la provincia de Aysén, en éste segundo estudio se seleccionaron 6 cepas para medir su capacidad para degradar OTC. En la Tabla 1 se indican las cepas estudiadas, filo, orden y código Genbank®. En la figura 2 se muestran aspectos morfológicos obtenidos por microscopía electrónica de barrido los que fueron utilizados, en una primera aproximación, para su identificación.

Se observó que la interacción cepa y tiempo de exposición presentaron diferencias significativas ($F_{24,56} = 51,23$; $P = 0,0001$). Análisis de contrastes mostró que todos los factores analizados fueron significativos ($P < 0,0001$) (Fig. 3).

La figura 4 muestra que las cepas de hongos analizadas presentan diferencias significativas en la capacidad de degradar OTC. Al finalizar el tiempo de exposición las cepas con mayor eficiencia fueron: *Epicoccum nigrum* 92% (20,6 mgL⁻¹); *Trichoderma harzianum* 91% (21,3 mgL⁻¹) y *Beauveria bassiana* 90% (26,1 mgL⁻¹); seguido de *Emericellopsis alkaline* 81% (46,7 mgL⁻¹). Menores eficiencias se observó en: *Aspergillus terreus* 78% (53,9 mgL⁻¹) y *Penicillium commune* 76% (60,5 mgL⁻¹) (Fig. 3). Del mismo modo, el control (cultivos sin micelio y con OTC) presentó un 41% de degradación (147 mgL⁻¹), correspondiente a la degradación natural de OTC en condiciones de laboratorio.

Discusión

La rápida expansión de la salmonicultura *i.e.*, 635 concesiones, sólo en la Región de Aysén (Fig. 1) y la necesidad de mitigar el efecto adverso de la incorporación de antibióticos en el ambiente, nos incentivó a la búsqueda de organismos capaces de aumentar la velocidad de degradación de antibióticos, como la OTC, comúnmente usado en los centros de cultivo. Antecedentes bibliográficos plantean que la velocidad de degradación de la OTC en condiciones naturales en los sedimentos marinos es baja (Samuelsen *et al.* 1994) y que su vida media sería función de la tasa de reingreso de la oxitetraciclina hacia la columna de agua (Smith & Samuelsen 1996).

En este estudio, la mayor concentración medida de OTC en los sedimentos en torno a la balsa jaula, fue de $24,1 \pm 1,03 \mu\text{gg}^{-1}$, mayor al rango de concentraciones informada para 13 centros de salmónidos, *i.e.* 0,1 y $11 \mu\text{gg}^{-1}$ (Bjorklund *et al.* 1991; Coyne *et al.* 1994; Kerry *et al.* 1995), pero inferior a $285 \mu\text{gg}^{-1}$ informada por Samuelsen *et al.* (1992).

Para la determinación de la capacidad de adsorción de xenobióticos a una matriz ambiental, se trabaja con la constante de adsorción (kd), que relaciona la concentración del compuesto en la fase de adsorción y el agua con que se encuentra en equilibrio. En

sedimentos orgánicos marinos se informa K_d para la OTC de 2.590 (Lkg^{-1}), superior al informado para sustratos como fango arenosos de sistemas agrícolas, con alrededor de 670 (Lkg^{-1}) (WingChing-Jones 2008), lo que podría explicar las altas concentraciones de OTC en sedimentos marinos respecto de suelos agrícolas. Por otra parte, la concentración de OTC en los sedimentos en el área de la balsa monitoreada, fueron mayores en el sector Este y a mayor profundidad *i.e.*, 100 m, lo que indicaría una relación entre las corrientes, el transporte de sedimento y la concentración de OTC (Smith 1996). Además, Hektoen *et al.* (1995), plantearon que a mayor profundidad de la columna de agua y mayores contenido de materia orgánica, el tiempo de vida media de la OTC sería mayor de 100 días, lo que generaría acumulación de OTC en sedimentos de mayor profundidad en directa relación con el contenido de materia orgánica del sedimento.

Los microorganismos son los que movilizan, modifican y reciclan los nutrientes de los ciclos biogeoquímicos y el puente que une los procesos entre los ecosistemas (Kong *et al.* 2011). El mantenimiento de la actividad biológica es clave para garantizar el funcionamiento de los ecosistemas, debido a ello, la acumulación de antibióticos es una amenaza potencial a las funciones y estructura de las comunidades bacterianas (Liu *et al.* 2012, Seo *et al.* 2009) pero, no para comunidades de hongos, siendo esta una clara ventaja para su utilización en la micoremediación de antibióticos. Ejemplos exitosos de la utilización de hongos en matrices complejas, es la aplicación de basidiomicetos, especialmente sub Filo Agaricomycetes, en la degradación y tratamiento de emisarios; de hongos asociados a la degradación de la madera como: *Pleurotus ostreatus*, *Irpex lacteus*, *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, y *Bjerkandera adusta*; y los que crecen en bosques de coníferas como: *Lentinula edodes*, *Agaricus bisporus* y *Lactarius piperatus*, capaces de degradar compuestos refractarios como celulosa, lignina, residuos de la fabricación de papel, plásticos, hidrocarburos, colorantes, pesticidas, productos farmacéuticos (Anastasi *et al.* 2013, Kulshreshtha *et al.* 2014).

Kristanti & Hadibarata (2015) plantean la potencialidad de lograr mayores eficiencias si se trabajaba aislando hongos endémicos (por Ej. filo Ascomycota), de sitios contaminados con las sustancias que se desea degradar. Esto se prueba en este estudio, ya que, se observó que las seis cepas aisladas desde los sedimentos y expuestas

a OTC, mostraron capacidad para degradar este antibiótico (76 a 92%) y ser capaces de sobrevivir y crecer en presencia de una cantidad muy superior del antibiótico en condiciones de laboratorio ($250 \mu\text{gL}^{-1}$), respecto a la concentración mas alta en que vivían en el sustrato del que fueron aisladas ($24,1 \pm 1,03 \mu\text{g g}^{-1}$). Otras ventajas de utilizar hongos en procesos de biorremediación es que los hongos son capaces de formar extensas redes de micelio, llegando a ser la biomasa dominante y además, no necesitan como pre-condición el enriquecimiento del sustrato, como sucede con muchas bacterias (Maloney 2001, Magan *et al.* 2010, Harms *et al.* 2011).

En estudios previos, trabajando en 21 días, se observó baja capacidad degradativa de OTC de la levadura *R. mucilaginosa* y resultados promisorias con 4 cepas de ascomicetes aisladas sede sedimentos marinos; sus capacidades degradativas que fluctuaron entre 72 y 92% (Ahumada-Rudolph *et al.* 2016). En este estudio una de las cepas con mayor eficiencia para degradar OTC fue *E. nigrum* (91,7% de eficiencia). En estudios previos con esta cepa se habían demostrado en sus paredes celulares diferencias significativas en la composición de esteroides y ácidos grasos, característica que podrían ser responsables de su capacidad adaptativa para co-habitar en sustratos marinos y terrestres, siendo por ello un excelente candidato para tratamientos de micorremediación en los centros de reproducción y crecimiento (smolt) en agua dulce, como en centros marinos de engorda (Ahumada-Rudolph *et al.* 2014).

Los hongos marinos por su condición heterótrofa, su condición de adaptarse a la variabilidad ambiental y su resistencia específica a diferentes estresores, pueden ser potenciales candidatos para ser empleados como restauradores de sectores contaminados con antibióticos como la OTC.

Agradecimientos

Agradecimientos. Los autores agradecen el soporte financiero al proyecto “CONICYT + PAI Concurso Nacional Tesis de Doctorado en la Industria, Convocatoria 2013 Folio 783110001, a la empresa asociada al Proyecto Blumar Salmones S.A. y a la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Concepción. Al Sr. Nicos Nicolaidis por el apoyo a esta investigación.

Literatura citada

- Ahumada-Rudolph R, D Cajas-Madriaga, A Rudolph, R Reinoso, C Torres, M Silva & J Becerra. 2014.** Variation of sterols and fatty acids as an adaptive response to changes in temperature, salinity and pH of a marine fungus *Epicoccum nigrum* isolated from the Patagonian Fjords. *Revista Biología Marina y Oceanografía* 49(2): 293-305.
- Ahumada-Rudolph R, V Novoa, K Sáez, M Martínez, A Rudolph, C Torres-Diaz, J Becerra. 2016.** Marine fungi isolated from Chilean fjord sediments can degrade oxytetracycline. *Environmental Monitoring and Assessment*. DOI:10.1007/s10661-016-5475-0
- Alcock RE, A Sweetman & KC Jones. 1999.** Assessment of organic contaminant fate in wastewater treatment plants I. Selected compounds and physiochemical properties. *Chemosphere* 38: 2247-2262.
- Anastasi A, V Tigini & GC Varese. 2013.** The bioremediation potencial of different ecophysiological group of fungi. In: Goltapeh EM, YR Danesh & A Varma (eds). *Fungi as bioremediators*, pp. 479-489. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Andrade VdaC, BdelB Zampieri, ER Ballesteros, AB Pinto, AJ de Oliveira. 2015.** Densities and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from marine waters and beach sands. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187:342 doi: 10.1007/s10661-015-4573-8.
- Bannister, RJ, T.Valdemarsen, PK Hansen, M Holmer, A Ervik. 2014.** Changes in benthic sediment conditions under an Atlantic salmon farm at a deep, well-flushed coastal site. *Aquaculture Environment Interactions*, 5:29-47
- Bjorklund HV, CMI Rlbergh & G Bylund. 1991.** Residues of oxolinic acid and oxytetracycline in fish and sediments from fish farms. *Aquaculture* 97: 85-96.
- Buschmann AH, A Tomova, A López, MA Maldonado & LA Henríquez. 2012.** Salmon aquaculture and antimicrobial resistance in the marine environment. *PLoS ONE* 7(8): e42724. doi: 10.1371/journal.pone.0042724.
- Buschmann AH, VA Riquelme, M Hernández-González, CD Varela, JE Jiménez, LA Henríquez, PA Vergara, R Guíñez & L Filún. 2006.** A review of the impacts of salmon farming on marine coastal ecosystems in the southeast Pacific. *ICES Journal of Marine Science* 63: 1338-1345.

- Buschmann, AH & JLP Muñoz. 2016.** Salmon faring. Reference Module in Earth Systems and environmental sciences, Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-409548-9.09580-4.
- Cabello FC. 2004.** Antibióticos y acuicultura en Chile: consecuencias para la salud humana y animal. *Revista Médica de Chile* 132(8): 1001-1006.
- Cabello FC. 2006.** Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology* 8(7): 1137–1144.
- Cabello FC, HP Godfrey, A Tomova, L Ivanova, H Dölz, A Millanao & AH Buschmann. 2013.** Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environmental Microbiology* 15(7): 1917-1942.
- Coyne R, M Hiney, B O'Connor, D Cazabon & P Smith. 1994.** Concentration and persistence of oxytetracycline in sediments under a marine salmon farm. *Aquaculture* 123: 31-42.
- Dietze JE, EA Scribner, MT Meyer, & DW Kolpin. 2005.** Occurrence of antibiotics in water from 13 fish hatcheries, 2001-2003: *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 85(15): 1141-1152.
- Drummond AJ, B Ashton, S Burton, M Cheung, A Cooper, J Heled, R Moir, S Stones-Havas, S Sturrock & T Thierer. 2011.** Geneious v5.4. Biomatters, Auckland. <http://www.geneious.com/>
- Harms H, D Schlosser & LY Wick. 2011.** Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nature Reviews Microbiology* 9: 177-191.
- Heuer OE, H Kruse, K Grave, P Collignon & I Karunasagar. 2009.** Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clinical Infectious Diseases* 49: 1248-1253.
- Hektoen H, JA Berge, V Hormazábal, & M Yndestad. 1995.** Persistence of antibacterial agents in marine sediments. *Aquaculture* 133: 175-184.
- Kerry J, M Hiney, R Coyne, S NicGabhainn, D Gilroy, D Cazabon & P Smith, 1995.** Fish feed as a source of oxytetracycline-resistant bacteria in the sediments under fish farms. *Aquaculture* 131: 101-113.

- Kristanti RA & T Hadibarata. 2015.** Biodegradation and identification of transformation products of fluorene by ascomycete fungi. *Water, Air, and Soil Pollution*. 226(12): 406.
- Kong AYY, KM Scow, AL Córdova-Kreylos, WE Holmes & J Six. 2011.** Microbial community composition and carbon cycling within soil microenvironments of conventional, low-input, and organic cropping systems. *Soil Biology and Biochemistry* 43:20-30.
- Kulshreshtha S, Mathur N & P Bhatnagar. 2014.** Mushroom as a product and their role in mycoremediation. *AMB Express* 4: 29. doi:10.1186/s13568-014-0029-8.
- Liu W, N Pan, W Chen, W Jiao & M Wang. 2012.** Effect of veterinary oxytetracycline on functional diversity of soil microbial community. *Plant Soil Environment* 58: 295-301.
- Magan N, S Fragoeiro & C Bastos. 2010.** Environmental factors and bioremediation of xenobiotics using white rot fungi. *Mycobiology* 38: 238-248.
- Maloney SE. 2001.** Pesticide degradation. In: Gadd GM (ed). *Fungi in bioremediation*, pp. 188-223. Cambridge University Press, Cambridge.
- Marshall BM & SB Levy. 2011.** Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clinical Microbiology Reviews* 24: 718-733.
- Miranda C & R Zemelman. 2002.** Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. *Aquaculture* 212: 31-47.
- Rudolph A, P Medina, C Urrutia & R Ahumada. 2009.** Ecotoxicological sediment evaluations in marine aquaculture areas of Chile. *Environmental Monitoring and Assessment* 155: 419-429.
- Rudolph A, P Medina, R Ahumada & V Novoa. 2011.** Ecotoxicological quality of sediments in fiords in Southern Chile (44 - 46.5° LS). *Revista Biología Marina y Oceanografía* 46: 79-84.
- Samuelson OB, BT Lunestad, A Ervik & S Fjelde. 1994.** Stability of antimicrobial agents in artificial marine sediment studied under laboratory conditions. *Aquaculture* 126: 283-290.
- Samuelson OB, V Torsvik & A Etvik. 1992.** Long-range changes in oxytetracycline concentration and bacterial resistance towards oxytetracycline in a fish farm sediment after medication. *Science of the Total Environment* 114: 25-36.

- Seo JS, YS Keum & QX Li. 2009.** Bacterial degradation of aromatic compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 6: 278-309
- Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA) (2014)** Informe sobre uso de antimicrobianos en la salmonicultura nacional 2013. Unidad de salud animal. Ministerio de Economía, Fomento y Turismo. Valparaíso, Chile. 19 pp.
- Smith P. 1996.** Is sediment deposition the dominant fate of oxytetracycline used in marine salmonid farms: a review of available evidence. *Aquaculture* 146: 157-169.
- Smith P & OB Samuelson. 1996.** Estimates of the significance of out-washing of oxytetracycline from sediments under Atlantic salmon sea-cages. *Aquaculture* 144: 17-26.
- Tedersoo L, T Suvi, T Jairus & H Kõljalg. 2009.** Forest microsite effects on community composition of ectomycorrhizal fungi on seedlings of *Picea abies* and *Betula pendula*. *Environmental Microbiology* 10: 1189-1201.
- Vidaver A. 2002.** Uses of antimicrobials in plant agriculture. *Clinical Infectious Disease* 34(3): 107-110.
- WingChing-Jones R. 2008.** Residualidad de sustancias xenobióticas en el suelo empleadas en la producción pecuaria. *Agronomía Mesoamericana* 19(1): 99-114.
- Williams AJ, J Deck, JP Freeman, MP Chiarelli, MD Adjei TM, Heinze & JB Sutherland. 2007.** Biotransformation of flumequine by the fungus *Cunninghamella elegans*, *Chemosphere* 67: 240-243.

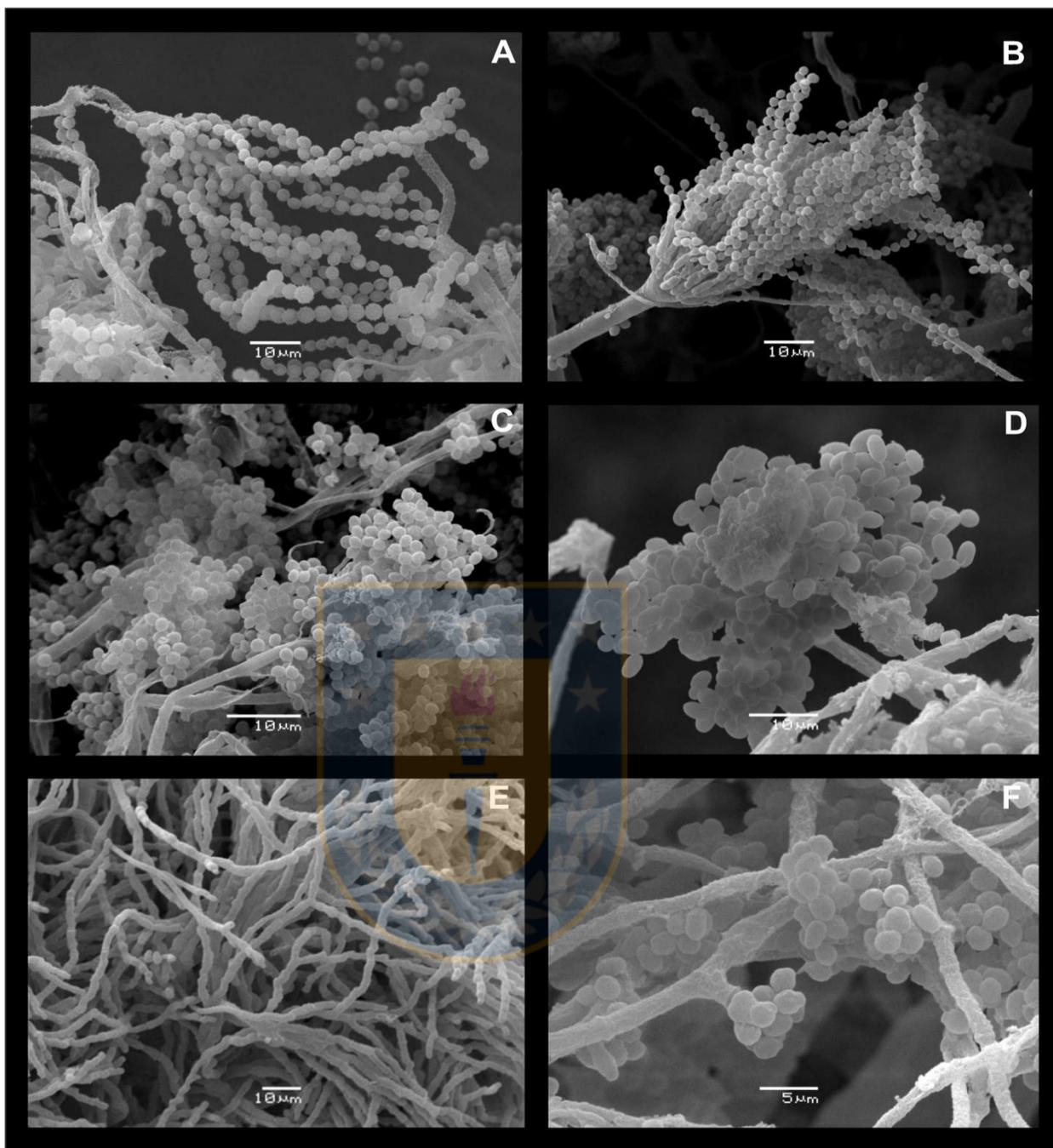


Figura 2. Fotografía de microscopía electrónica de barrido de cepas aisladas e identificadas desde sedimentos marinos, con capacidad para degradar OTC: A) *P. commune*, B) *A. terreus*, C) *B. bassiana*, D) *T. harzianum*, E) *E. nigrum* y F) *E. alkalina*.

Figure 2. Photographs of strains with the ability to degrade OTC isolated and typified from marine sediments: A) *P. commune* B) *A. terreus* C) *B. bassiana* D) *T. harzianum* E) *E. nigrum* and F) *E. alkaline*. Images obtained by scanning electron microscopy.

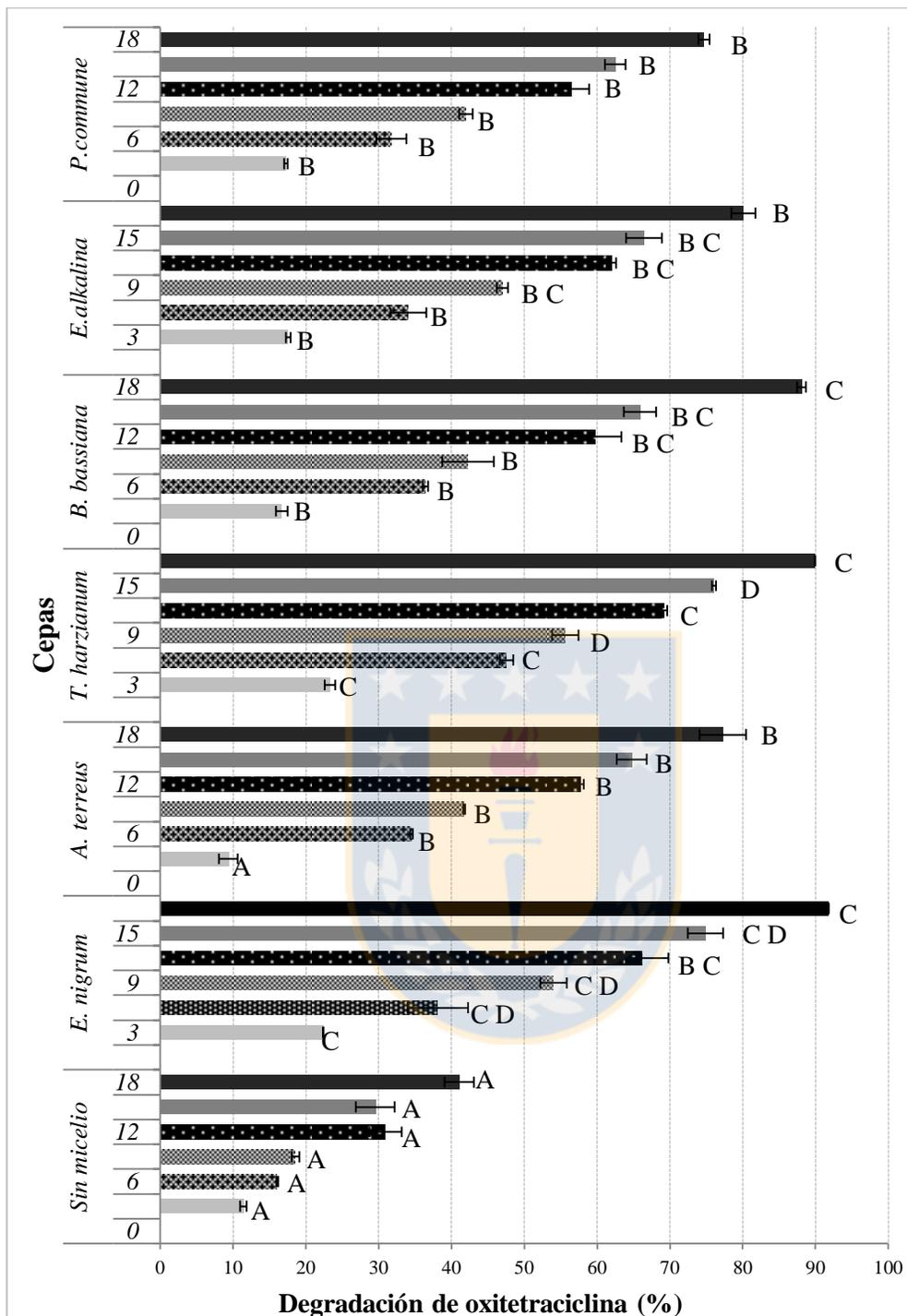


Figura 3. El comportamiento de degradación de OTC de cada cepa, en los tiempos de medición: 0, 2, 6, 10, 15 y 18 días. (*) Medias con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Figure 3. The degradative behavior of OTC of each strain, in the measured times: 0, 3, 6, 10, 15 and 18 days. (*) Measurements with the same letter are not significantly different ($p > 0.05$).

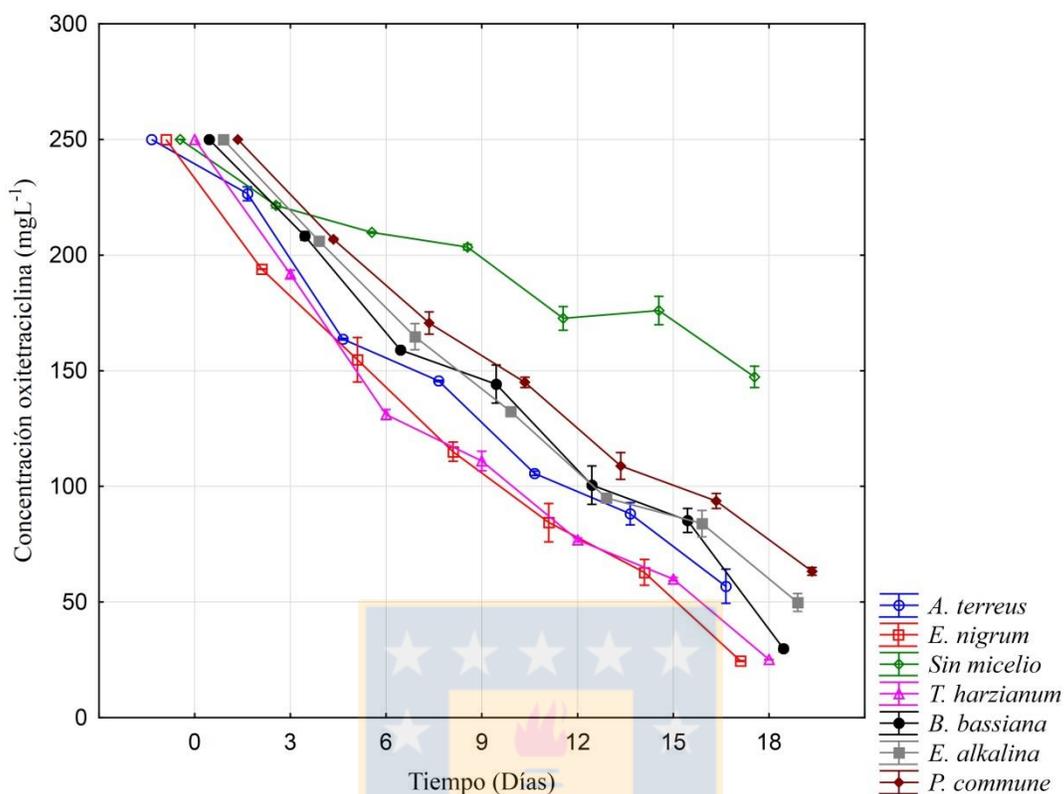


Figura 4. Degradación de OTC de las diferentes cepas aisladas desde sedimentos, determinados por HPLC-DAD. Las barras representan el error estandar (e.e).

Figure 4. Effects of OTC concentration ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$) on culture media for different marine strains and times of exposure as determined by HPLC –DAD. The bars represent the standard error (s.e).

4.2- Capítulo 2. Hongos marinos aislados desde Fiordos Chilenos pueden degradar oxitetraciclina.

Ramón Ahumada-Rudolph, Vanessa Novoa, Anny Rudolph, Miguel Martínez, Cristian Torres-Díaz & José Becerra

Resumen

El cultivo de salmón es la principal actividad económica de la zona fiordos del sur de Chile. Esta actividad requiere el uso de antibióticos, tales como oxitetraciclina, para el control y prevención de enfermedades, que tiene un impacto negativo en el medio ambiente. Se analizó la capacidad de los hongos marinos endémicos en biodegradarse oxitetraciclina, un antibiótico utilizado ampliamente en la piscicultura. Se aislaron cepas de hongos marinos de muestras de sedimento obtenidas a partir de un área de actividad de la cría de peces. Las cinco cepas aisladas mostraron actividad en la oxitetraciclina y fueron identificados como *Trichoderma harzianum*, *deliquescens* *Trichoderma*, *Penicillium crustosum*, *Rhodotorula mucilaginosa* y *atroroseus* *Talaromyces* por microscopía electrónica de barrido, y se caracterizaron mediante técnicas moleculares. Los resultados mostraron una degradación significativa en la concentración de oxitetraciclina en los primeros 2 días de tratamiento para todas las cepas analizadas. A los 21 días de tratamiento, la concentración de oxitetraciclina se redujo 92% en *T. harzianum*, 85% en *T. deliquescens*, 83% en *P. Crustosum*, 73% en *R. mucilaginosa* y 72% en *T. atroroseus*, todos que fueron significativamente mayores que los controles. Teniendo en cuenta estos resultados, proponemos que las cepas fúngicas aisladas de sedimentos marinos pueden ser herramientas útiles para la biodegradación de los antibióticos como oxitetraciclina, en la industria del salmón.

Palabras clave: degradation, marine fungi, acuicultura, restauración

Nota: Publicado en la revista Environmental, Monitoring and Assessment. Agosto 2016 vol 188:468

Marine fungi isolated from Chilean fjord sediments can degrade oxytetracycline

R. Ahumada-Rudolph · V. Novoa · K. Sáez ·
M. Martínez · A. Rudolph · C. Torres-Díaz · J. Becerra

Received: 13 January 2016 / Accepted: 5 July 2016
© Springer International Publishing Switzerland 2016

Abstract Salmon farming is the main economic activity in the fjords area of Southern Chile. This activity requires

R. Ahumada-Rudolph · V. Novoa
Departamento de Geografía, Facultad de Arquitectura, Urbanismo y Geografía, Universidad de Concepción, Víctor Lamas 1290, PO Box 160-C, Concepción, Chile

R. Ahumada-Rudolph · V. Novoa
Estudiantes de Doctorado en Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias Ambientales, Universidad de Concepción, Víctor Lamas 1290, PO Box 160-C, Concepción, Chile

R. Ahumada-Rudolph (✉) · J. Becerra
Laboratorio de Química de Productos Naturales, Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Víctor Lamas 1290, PO Box 160-C, Concepción, Chile
e-mail: ramonahumada@udec.cl

K. Sáez
Departamento de Estadística, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Concepción, Víctor Lamas 1290, PO Box 160-C, Concepción, Chile

M. Martínez
Laboratorio de Microbiología Básica y Bioremediación, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Víctor Lamas 1290, PO Box 160-C, Concepción, Chile

A. Rudolph
Facultad de Ciencias, Universidad Católica de la Santísima Concepción, Alonso de Ribera 2850, PO Box 297, Concepción, Chile

C. Torres-Díaz
Laboratorio de Genómica & Biodiversidad (LGB), Departamento de Ciencias Naturales, Universidad del Bío-Bío, Dieciocho de Septiembre 580, PO Box 447, Chillán, Chile

the use of antibiotics, such as oxytetracycline, for the control and prevention of diseases, which have a negative impact on the environment. We analyzed the abilities of endemic marine fungi to biodegrade oxytetracycline, an antibiotic used extensively in fish farming. We isolated marine fungi strains from sediment samples obtained from an area of fish farming activity. The five isolated strains showed an activity on oxytetracycline and were identified as *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma deliquescens*, *Penicillium crustosum*, *Rhodotorula mucilaginosa*, and *Talaromyces atrovirens* by a scanning electron microscopy and characterized by molecular techniques. Results showed significant degradation in the concentration of oxytetracycline at the first 2 days of treatment for all strains analyzed. At 21 days of treatment, the concentration of oxytetracycline was decreased 92 % by *T. harzianum*, 85 % by *T. deliquescens*, 83 % by *P. crustosum*, 73 % by *R. mucilaginosa*, and 72 % by *T. atrovirens*, all of which were significantly higher than the controls. Given these results, we propose that fungal strains isolated from marine sediments may be useful tools for biodegradation of antibiotics, such as oxytetracycline, in the salmon industry.

Keywords Antibiotics · Aquaculture · Degradation · Marine fungi · Incorporated and restoration

Introduction

Norway and Chile currently lead the world's salmon farming activity, producing more than 50 % of the

worldwide demand for salmon (Costa-Pierce 2010; Buschmann and Muñoz 2016). In Chile, the salmon industry generates sales of almost \$4.4 billion, producing 850,000 t per year (SUBPESCA 2014). However, this activity goes hand in hand with a negative externality, which is the use of antibiotics to combat bacterial diseases (Buschmann et al. 2012). Oxytetracycline (OTC) is one of the most utilized antibiotics in Chile, and in 2013, around 157 t were used; it is expected that its use will increase during the next few years (SERNAPESCA 2014).

OTC is a wide spectrum antibiotic, included in the tetracycline group, interfering with the synthesis of bacterial proteins. OTC is one of the two antibiotics used for prophylactic treatment (along with streptomycin) registered by the EPA for the use in aquaculture (Vidaver 2002). It is cheap and effective against common bacterial infections such as *piscirickettsiosis*, *flavobacterium*, and *renibacterium* (Sarmah et al. 2006).

In salmon fishing, antibiotics such as OTC are administered within the diet, both in the freshwater spawning phase and in the salmon fattening process in marine areas (Vidaver 2002; Buschmann and Muñoz 2016). Excessive use of antibiotics in aquaculture generates negative consequences in ecosystems, danger to marine communities and to human health (Samuelsen et al. 1989; Hektoen et al. 1995; Heuer et al. 2009; Cabello 2004, 2006; Cabello et al. 2013; Buschmann et al. 2006, 2012; Marshall and Levy 2011; Andrade Vda C 2015). The environmental impact of OTC is accentuated by inefficient absorption in animal intestines. It is estimated that for water-soluble antibiotics such as OTC, up to 90 % of the administered dose is excreted through urine and feces (Alcock et al. 1999; Halling-Sørensen 2001). Samuelsen (1989) and Hektoen et al. (1995) reported that 80 % of the antibiotics used in aquaculture stay in the water and sediments, persist under certain oxygenation conditions, and have a half-life that exceeds 100 days, as is the case for OTC.

In ecosystems, OTC selects bacteria that are resistant to the antimicrobial agents (Schmitt et al. 2005; Kümmerer 2009). This means that OTC is able to influence biodiversity, not only through the selection of resistant bacteria but also by horizontally transferring genes, albeit through plasma interchange or by lysogenic conversion (Coyne et al. 2001; Sørum 2006). Exchange has been registered between marine and terrestrial ecosystems that share and transfer genes with antimicrobial resistance of bacterial origin (Rhodes et al. 2000; Burrige et al. 2010; Kümmerer 2009; Cabello et al. 2013). Thus, salmon

farming regions in Southern Chile where antibiotics are used could play an important role as reservoirs of carrier bacteria with genes that are resistant to OTC, with a potential public health risk (Miranda and Zemelman 2002; Burrige et al. 2010; Millanao et al. 2011).

Also, apart from environmental impacts in aquaculture zones, traces of tetracycline and quinolones have been found in wild fish that inhabit distant coastal ecosystems (Fortt et al. 2007). Organic enrichment of shallow-water benthic systems due to fish farming (<50 m deep) modifies the biogeochemical processes in soft sediment habitats (Holmer 2010; Bannister et al. 2014). Remineralization of the highly labile organic waste (i.e., fish feed and feces) results in increased sediment oxygen demand and altered metabolic pathways, and a shift from aerobic to anaerobic microbial degradation (i.e., sulfate reduction and methanogenesis) is frequently observed (Valdemarsen et al. 2009). Excessive organic enrichment due to fish farming can modify sediment conditions (Keeley et al. 2013), which may change the composition and total biomass of benthic fauna communities (Kutti et al. 2007; Hargrave et al. 2008).

Currently, the Regional Commission of Seaboard Use (CRUBC in Spanish) in Aysén, Chile, has approved 41 new sites as "Aquaculture-apt areas" with the objective of facilitating the concession relocation process. These new sites are approximately 600 ha, the same area as the existing concessions, which makes the restoration process urgent for areas that have already been environmentally altered (SUBPESCA 2015).

Fungi possess the capacity to metabolize organic compounds through a non-specified, extra-enzymatic, inter-cellular system, as well as an enormous potential to transform and/or degrade xenobiotics (Harm et al. 2011). However, these studies are rare for the marine environment (Ahumada-Rudolph et al. 2014). In this context, and given the importance of aquaculture activity in Chile, the objective of this study is to evaluate the capacity of autochthonous fungi (isolated from sediments close by fish farming centers) to biodegrade OTC, highlighting their potential use in bioremediation processes.

Materials and methods

Study sites

The Aysén Province is one of the least populated regions of Chile, with only 0.95 residents per square kilometer,

with low temperatures and high precipitation levels. The fjord area of this province has zones that are protected from the inclemency of the climate, with easy navigable access. Currently, it has the highest percentage of marine products, mostly salmon, with 78 % of the country's production (INE 2014). The eco-toxicological quality of sediments in the center of the canals and fjords indicates that, in general, these systems still behave as unaltered (Rudolph et al. 2011), with oxygen saturation in the superficial layer and absence of anoxia in the deep layer (Silva and Guzmán 2006). However, there have been reports of important alterations on the seaboard, which is mainly used for salmon fattening. These alterations include high contents of organic material, low oxygen concentration, acidification of sediments, and ecological disturbances (Rudolph et al. 2009).

Sediment collection

Sampling was done in the winter season, July 2013, in the Aysén Province (45° 12' 35.33" S, 74° 04' 25" W) (Fig. 1). A small watercraft was used with an 1800-cm² capacity stainless steel drag. Sixteen sediment samples were collected in sterilized Falcon tubes. Later, these

samples were transported to the laboratory in darkness and at -18 °C.

Strain isolation

Three grams of sediment were diluted in sterile seawater, homogenized, and left to decant. The supernatant was diluted in series with sterilized seawater 01:10 with two repetitions 01:10⁻³. An aliquot of 100 µL was transferred to yeast extract, malt extract, and glucose (YMG) agar with streptomycin (200 mg L⁻¹) and disseminated onto the surface using a sterile glass wand, where the slides were incubated at room temperature for 5 days.

Strain identification

Morphological determination and characterization of the strains were carried out using a scanning electron microscopy. To validate the species, PCR techniques were used, amplifying the internal transcribed spacer (ITS) region (that included the gene 5.8S) and the nuclear ribosomal subunits of rRNA (LSU) using ITS-1/ITS-4 (Tedessoo et al. 2009). DNA from the mycelium was extracted using the EZNA DNA fungus Mini Kit

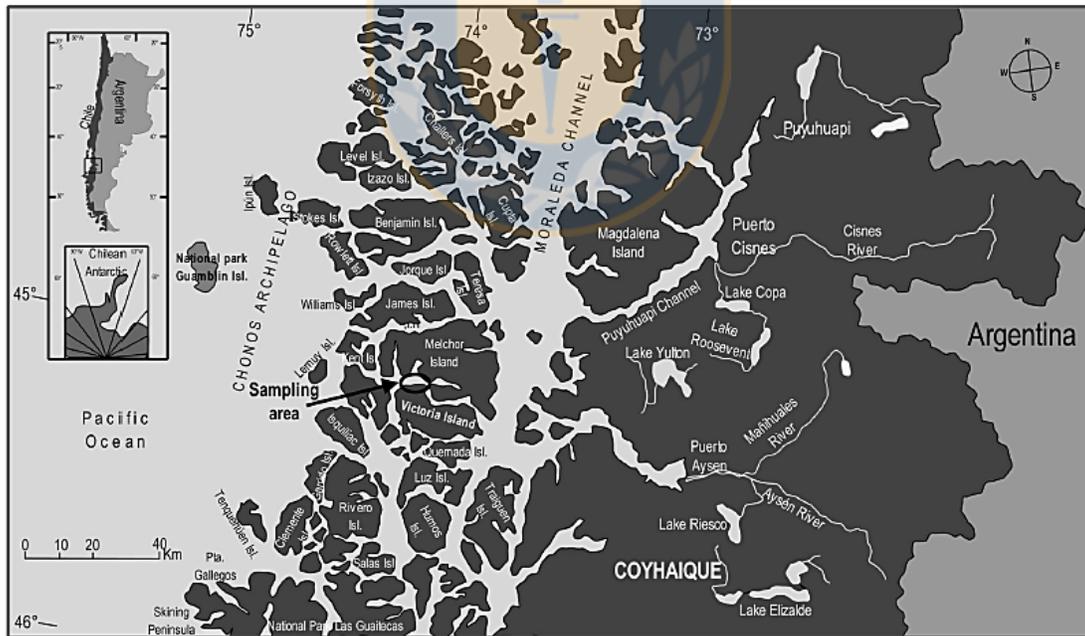


Fig. 1 Study area in which the sampling areas are indicated

(Omega Bio-tek). The PCR reactions were carried out with ITS-4 (5'-tctcctcgattgatgc-3') as direct primers and ITS-1 (5'-tccgtaggtgaacctgcgg-3') as inverse primers. Each reaction was done in 15 μ L of solution that contained 30–50 ng of DNA, 1 \times de TAMPON PCR, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM of each dNTP, 0.5 mM of the direct and inverse primers, and 1 U of Taq DNA polymerase. Amplification by PCR was performed with an initial denaturalization of 4 min at 94 °C, followed by 35 cycles of 30 s at 94 °C, 60 s at 50 °C, 60 s at 72 °C, and a final 5-min pass at 72 °C. Test electrophoresis was carried out, and the gel was photographed. The PCR product was purified and sequenced in both directions. Once sequenced, the strains were edited using the Geneious software v5.4 (Drummond et al. 2011). The sequences were analyzed with BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). To determine the maximum identity, sequences from world database records were used and deposited in GenBank[®]. Each one of the isolated strains was preserved and stored in the Strain Bank at the Natural Product Chemistry Laboratory at the Universidad de Concepción, Chile.

Biodegradation assays

Spores of each strain were left to grow for 4 days in YMG. Five grams of mycelium were used along with 250 mg L⁻¹ solutions of OTC. Each strain and control were worked in triplicate ($n = 21$) at room temperature, darkness, and agitation (120 rpm). As a negative control, the 250 mg L⁻¹ solutions of OTC were used, and as a positive control, a solution of OTC and 5 g of autoclaved mycelium of the strains were used for this study. The assays were controlled at 0, 2, 6, 10, 15, and 21 days. At each control, an aliquot of each assay and from the controls was filtered in 0.23 μ m and injected in HPLC-DAD.

Evaluation of the biodegradation capacity of oxytetracycline

A calibration curve was prepared with 7, 15, 30, 100, 175, and 250 mg L⁻¹ from one standard deviation of OTC hydrochloride at 98.9 % purity CAT# 500105 Calbiochem (Table 1).

HPLC was used with a YL 9111S binary pump, YL 9160 PDA detector with manual injection, and 20- μ L loop; Kromasil 100-5-C18 column, 250 \times 4.6 mm \varnothing . As

Table 1 Summary of the parameters used for the quantitative determination of oxytetracycline

Parameter	Value
Slope equation	$Y = 25.89 \times -115.1$
R^2	0.998
Standard error	1.59 mg L ⁻¹
Detection limit (DL)	6.03 mg L ⁻¹
Quantification limit (QL)	6.46 mg L ⁻¹

a mobile phase, 0.1 % formic acid was used in H₂O Milli-Q and acetonitrile (80:20), at isocratic pressure at milliliter per minute and 365 nm wavelength.

Statistical analysis

We performed repeated ANOVA measures, considering the following factors: strain type and exposure time, using the SAS proc. Mixed program.

Results

Strain identification

The identification codes from the fungi strains isolated from the fjord area of the Aysén Province, which were analyzed for their capacity to degrade OTC, are indicated in Table 2. Of the five analyzed strains in this study, four were from the division Ascomycota, with mycelian growth. These structures are detectable via a microscope and represent terrestrial environments, although all collected species have several registers of isolated strains from marine environments. In the case of *Rhodotorula mucilaginosa*, which belongs to the division Basidiomycota, the red-pigmented yeast genus, this fungus is very common in marine environments.

Figure 2 shows photographs obtained from SEM of the five fungi strains isolated from sediments in the fjord areas demonstrating the capacity to degrade OTC.

Oxytetracycline degradation

We observed that the strain-exposure time interaction presented significant differences ($F_{24,56} = 30.66$, $p < 0.0001$) wherein the contrasts analysis showed that the analyzed factors are significant ($p < 0.0001$) (Fig. 4).

Table 2 Scientific names and access codes at GenBank® of the isolated strains from the Aysén fjords, which were analyzed for their capacity to degrade oxytetracycline

Strain	Division	Scientific name	Code GenBank®
RA114	Ascomycota	<i>Trichoderma deliquescens</i>	KU214239
RA115	Ascomycota	<i>Trichoderma harzianum</i>	KU198601
RA223A	Ascomycota	<i>Talaromyces atrovireus</i>	KU198600
RA118	Ascomycota	<i>Penicillium crustosum</i>	KU198599
RA101	Basidiomycota	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	KU298469

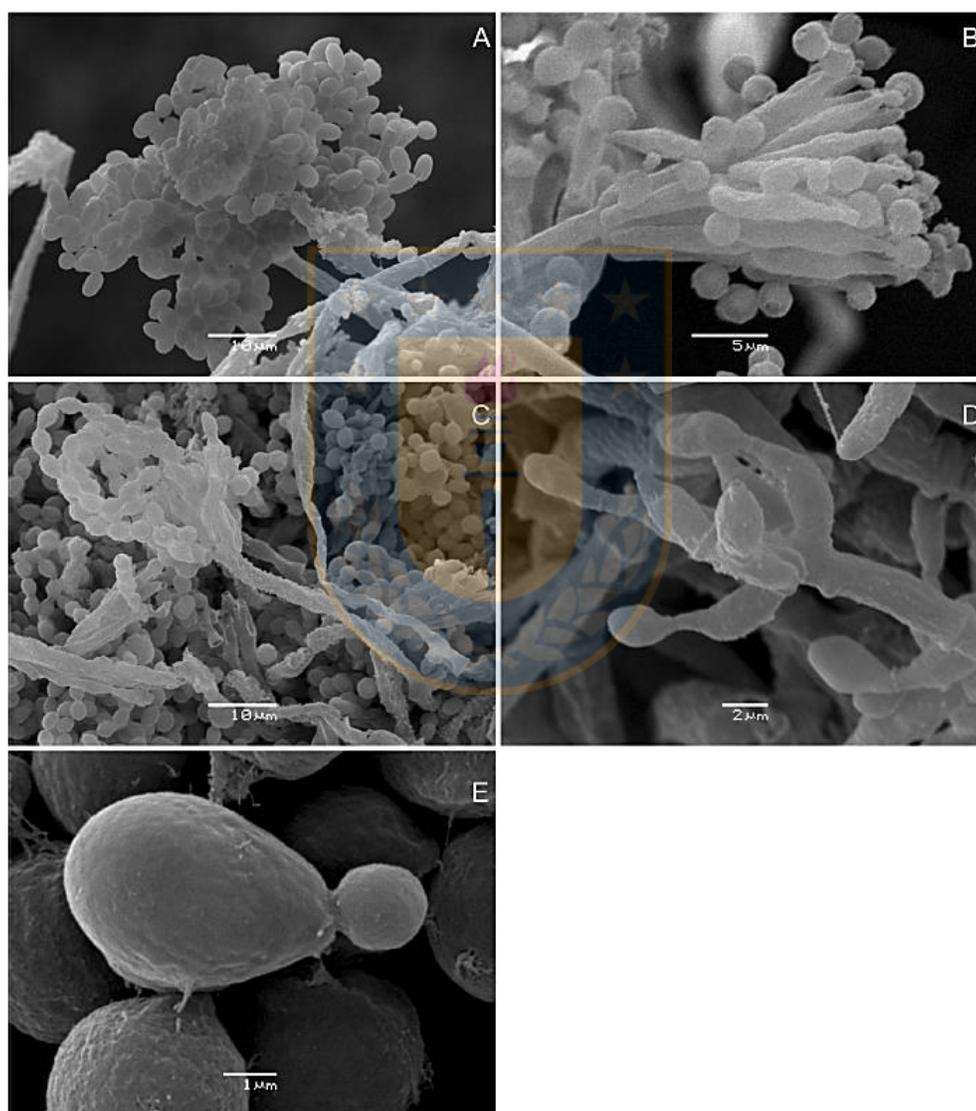


Fig. 2 Photographs obtained from SEM of the fungi: a *Trichoderma harzianum*, b *Talaromyces atrovireus*, c *Penicillium crustosum*, d *Trichoderma deliquescens*, and e *Rhodotorula mucilaginosa*

Fig. 3 Degradation curves of the antibiotic oxytetracycline using the fungi strains isolated from fjords in Southern Chile

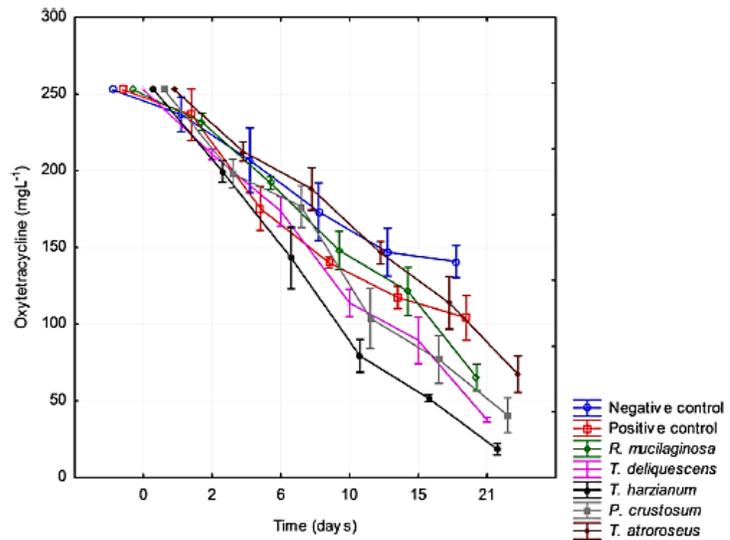


Figure 3 shows that in the first days of cultivation, significant differences could be observed in the antibiotic concentration of the strains, with respect to the controls. The least efficient was *R. mucilaginosa* with 8.3 %. The strains *Trichoderma harzianum* and *Penicillium crustosum* showed the best response levels, with respective degradation percentages of 21.1 and 21.7 %. In the negative and positive controls, the degradation was estimated at 6.4 and 6.5 %, respectively, corresponding to the natural degradation of OTC in laboratory conditions.

In the period of 6–10 days, an increase of the degradative capacity was observed, with significant differences between the strains and controls. Two groups were identified in the following: the less efficient strains *R. mucilaginosa* and *Talaromyces atrovirens* (Fig. 4) and the more efficient strains, which showed degradation of more than 50 % of the initial OTC quantity, *Trichoderma deliquescens* and *P. crustosum*, with 55 and 59 %, respectively. The strain *T. harzianum* showed the best degradative capacity with 68.6 % (Figs. 3 and 4).

At 21 days of exposure, we observed that the degradative capacities of the positive and negative controls were significantly lower. On the other hand, the degradative capacity of the strains *T. atrovirens* and *R. mucilaginosa* could be considered “high” with 73 and 74.2 %, respectively. Similarly, the degradative capacity of *P. crustosum* and *T. deliquescens* could be considered as “very high” with 83.9 and 85.1 %, respectively, whereas *T. harzianum* had an “extremely high” degradative capacity with a 93 % effectiveness.

Regarding the general degradation of the antibiotic OTC, explained by the degradation slopes, three behavioral groups could be recognized. The controls, which represented normal degradation of the OTC in laboratory conditions, showed 24.67 % for the negative control and 32.5 % for the positive control. A second group includes the strains *T. atrovirens* and *R. mucilaginosa* with 36.16 and 27.52 %, respectively, and finally, a third group, which could be classified as efficient degradation agents, includes the strains *P. crustosum*, *T. deliquescens*, and *T. harzianum* with 42.79, 42.85, and 48.1 %, respectively. The degradation speed of the negative control was estimated at 5.41 mg L⁻¹ OTC/day, differing substantially from *T. harzianum*, which degraded OTC at double the speed, or 10.93 mg L⁻¹/day.

Discussion

Knowledge about fungi in marine ecosystems is limited (Williams et al. 2007). Studies on the molecular diversity of the micro-eukaryotic community have shown that fungi occupy a central position in a large number of marine habitats (Manohar and Raghukumar 2013). Fungi have the ability to adapt to different physicochemical and environmental plasticity conditions, allowing them to colonize different habitats. Ahumada-Rudolph et al. (2014) demonstrate that *Epicoccum nigrum* is capable of changing its composition of sterols and fatty acids; salinity generates changes in the lipid composition, and pH has a significant effect on the composition of fatty acids and sterols.

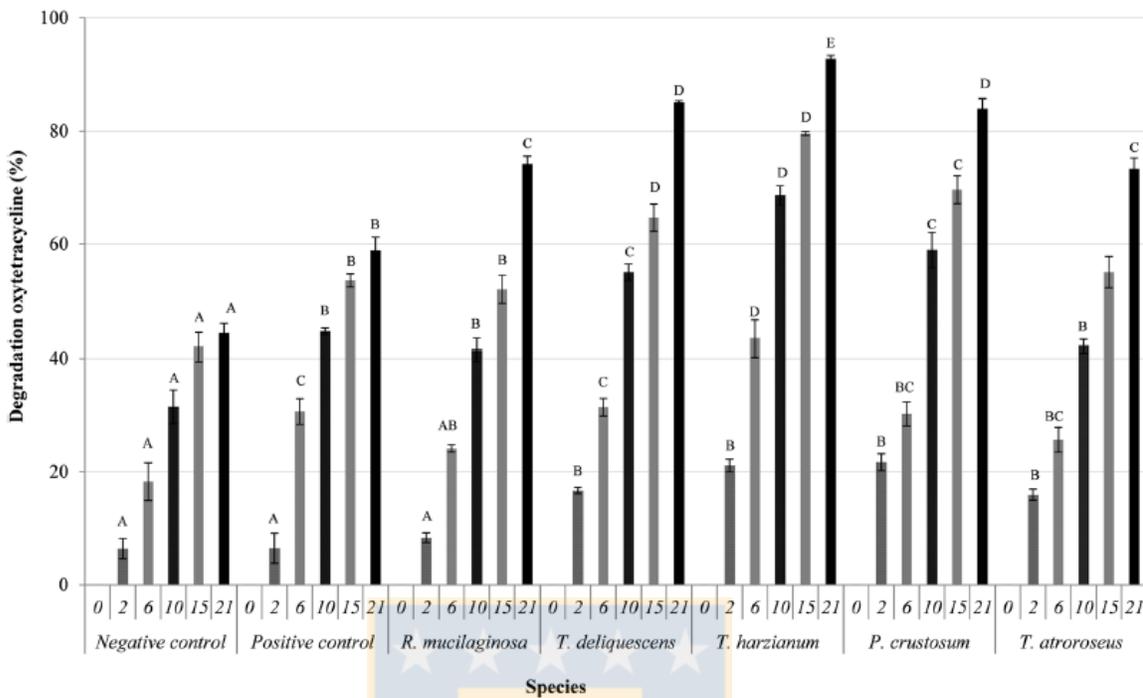


Fig. 4 The degradative behavior of OTC of each strain, in the measured times: 0, 2, 6, 10, 15, and 21 days. Measurements with the same letter are not significantly different ($p > 0.05$)

Sowmya et al. (2014) demonstrate that *T. harzianum* is a potent fungus that degrades polyethylene from the soil of dumpsite areas and can act as a solution for bioremediation of plastics. Fungi have a vital role not only in recycling biomass but also in biogeochemical transformations such as bioweathering, interactions with metals, and the transformation of rocks and minerals relevant to mycoremediation (Baldrian 2003; Gadd 2007; Chen et al. 2012). They have a significant biochemical potential and ability to degrade highly refractory organic compounds (Bugni and Ireland 2004; Harms et al. 2011). In aquatic environments, it has been shown that the use of fungi that form vesicular-arbuscular mycorrhiza is capable of promoting the degradation of organic pollutants (Fester 2012).

OTC is one of the most used antibiotics in salmon farming (Sarmah et al. 2006). In Chile, the world's second largest salmon producer, an estimated 157 t of OTC were used in 2013 (SERNAPESCA 2014). Due to its solubility in water and low absorption in fish, a high percentage of OTC is likely to be released into the environment. Samulesen (1989) estimated the half-life of OTC to exceed 100 days. Hektoen et al. (1995) estimated 150 days of OTC half-life in interstitial waters of superficial sediments and 300 days in depths between 5 and 7 cm in the

sediment. The half-lives estimated for OTC mean that large quantities are entering sediments in and around the areas used for aquaculture. Fungi and bacteria can degrade and transform organic substances, but there exist environmental characteristics or circumstances that make fungi more adequate for application in environmental biotechnology (Nnenna et al. 2011).

The problem of degrading compounds in low concentrations in the environment is generated by a range of chemical products of different structural syntheses that have high biological activity such as human and veterinary hormones and antibiotics. These new chemical products, along with other massively consumed compounds, have been found in the environmental matrix, given that they were not retained or degraded naturally by conventional treatment systems (Baćmaga et al. 2015; Guzmán-Dávalos and Álvarez 2014; Harms et al. 2011). Krause et al. (2013) suggest that under realistic levels of ocean acidification, marine fungi will reach greater importance in marine biogeochemical cycles.

Mitigating the effects of salmon farming is a difficult task, and its expansion is currently growing. In Chile, the actual mitigation effort consists in relocating the aquaculture centers to new areas,

abandoning the intervened sites (SUBPESCA 2015). Our research group founded its work on the principle that endemic fungi inhabiting sediments beneath cultivation centers are adapted to these conditions (i.e., temperatures, light, dissolved oxygen content, organic material, nutrients, residues, among others), making them potential valuable agents for mycoremediation of contaminated marine sectors.

Knowledge is scarce regarding fungi that inhabit marine ecosystems, such as the fjords of Southern Chile (Ahumada-Rudolph et al. 2014). However, this line of research is important to develop, given that fungi possess a wide biodiversity of species, genetic variability, and secondary metabolites that are of medical and industrial interest. The intervention of its organisms in pristine sites, such as the fjords, modifies ecosystems. In this study, of the 38 isolated strains, we concluded that five showed significant results in the degradative capacity of OTC, with respect to the controls, in the 21-day study period. The best results were given by *T. harzianum*, capable of degrading more than 90 % of the OTC in the solution, and the strains *P. crustosum* and *T. deliquescens* over 80 % (Fig. 4). With these results and the heterotrophic condition of the fungi, along with their environmental variability and adaptability given their resistance to different stressors, fungi show a viable route to consider for the restoration of altered ecosystems in processes of bioremediation.

Conclusions

This study concludes that endemic fungi have been proven to degrade OTC in short periods of time. Three of the tested strains showed OTC degradation capacity of over 80 % and could be used for bioremediation during the rest and recuperation of sites utilized for fish farming.

Acknowledgments We thank financial support of the “CONICYT + PAI (Comisión nacional de Investigación Científica y Tecnológica + Programa de Atracción e Inserción) Concurso Nacional Tesis de Doctorado en la Industria, Convocatoria 2013 + Folio 783110001” and the project partner Blumar Salmones S.A and Project FONDECYT 1151028. Special thanks to Sr. Nicos Nicolaidis for his help in presenting the project.

References

- Ahumada-Rudolph, R., Cajas-Madriaga, D., Rudolph, A., Reinoso, R., Torres, C., Silva, M., & Becerra, J. (2014). Variation of sterols and fatty acids as an adaptive response to changes in temperature, salinity and pH of a marine fungus *Epicoecium nigrum* isolated from the Patagonian fjords. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, *49*, 293–305.
- Andrade, V. da C., Zampieri, B. del B., Ballesteros, E. R., Pinto A. B., de Oliveira, A. J. (2015) Densities and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from marine waters and beach sands. *Environmental Monitoring and Assessment*, *187*:342 doi: 10.1007/s10661-015-4573-8.
- Alcock, R. E., Sweetman, A., & Jones, K. C. (1999). Assessment of organic contaminant fate in wastewater treatment plants I. Selected compounds and physicochemical properties. *Chemosphere*, *38*, 2247–2262.
- Baćmaga, M., Kucharski, J., & Wyszowska, J. (2015). Microbial and enzymatic activity of soil contaminated with azoxystrobin. *Environmental Monitoring and Assessment*. doi:10.1007/s10661-015-4827-5.
- Bannister, R. J., Valdemarsen, T., Hansen, P. K., Holmer, M., & Ervik, A. (2014). Changes in benthic sediment conditions under an Atlantic salmon farm at a deep, well-flushed coastal site. *Aquaculture Environment Interactions*, *5*, 29–47.
- Baldrian, P. (2003). Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, *32*, 78–91.
- Bugni, T. S., & Ireland, C. M. (2004). Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Natural Product Reports*, *21*, 143–163.
- Burrige, L., Weis, J. S., Cabello, F., Pizarro, J., & Bostick, K. (2010). Chemical use in salmon aquaculture: a review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture*, *306*, 7–23.
- Buschmann, A. H., Riquelme, V. A., Hernández-González, M. C., Varela, D., Jiménez, J. E., Henríquez, L. A., Vergara, P. A., Guíñez, R., & Filún, L. (2006). A review of the impacts of salmon farming on marine coastal ecosystems in the Southeast Pacific. *ICES Journal of Marine Science*, *63*, 1338–1345.
- Buschmann, A. H., Tomova, A., López, A., Maldonado, M. A., & Henríquez, L. A. (2012). Salmon aquaculture and antimicrobial resistance in the marine environment. *PLoS One*, *7*, e42724. doi:10.1371/journal.pone.0042724.
- Buschmann, A. H. & Muñoz J. L. P. 2016. Salmon farming. *Reference module in Earth systems and environmental sciences*. Amsterdam, Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-409548-9.09580-4.
- Cabello, F. C., Godfrey, H. P., Tomova, A., Ivanova, L., Dölz, H., Millanao, A., & Buschmann, A. H. (2013). Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environmental Microbiology*, *15*, 1917–1942.
- Cabello, F. C. (2004). Antibióticos y acuicultura en Chile: consecuencias para la salud humana y animal. *Revista Médica Chile*, *132*, 1001–1006.
- Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health

- and for the environment. *Environmental Microbiology*, 8, 1137–1144.
- Chen, G., Fan, J., Liu, R., Zeng, G., Chen, A., & Zou, Z. (2012). Removal of Cd(II), Cu(II) and Zn(II) from aqueous solutions by live *Phanerochaete chrysosporium*. *Environmental Technology*, 33, 2653–2659.
- Costa-Pierce, B. A. (2010). Sustainable ecological aquaculture systems: the need for a new social contract for aquaculture development. *Marine Technology Society*, 44, 88–112.
- Coyne, R., Smith, P., & Moriarty, C. (2001). The fate of oxytetracycline in the marine environment of a salmon cage farm. *Marine Environment and Health Series*, 3, 1–24.
- Drummond, A. J., Ashton, B., Burton, S., Cheung, M., Cooper, A., Heled, J., Moir, R., Stones-Havas, S., Sturrock, S., & Thierer, T. (2011). Geneious v5.4. Biomatters, Auckland. <http://www.geneious.com/>. Accessed 30 Oct 2015
- Fester, T. (2012). Arbuscular mycorrhizal fungi in a wetland constructed for benzene-, methyl tert-butyl ether- and ammonia-contaminated groundwater bioremediation. *Microbial Biotechnology*, 6, 80–84.
- Fortt, Z. A., Cabello, F., & Buschmann, A. (2007). Residuos de tetraciclina y quinolonas en peces silvestres en una zona costera donde se desarrolla la acuicultura del salmón en Chile. *Revista Chilena de Infectología*, 24, 14–18.
- Gadd, G. M. (2007). Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research*, 111, 3–49.
- Guzmán-Dávalos, L., & Álvarez-Barajas, I. (2014). Hongos y líquenes como bioindicadores y micorremediación. In C. A. González, A. Vallarino, J. C. Pérez, & A. M. Low (Eds.), *Bioindicadores: guardianes de nuestro futuro ambiental* (pp. 579–603). México: El Colegio de la Frontera Sur e Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático.
- Halling-Sørensen, B. (2001). Inhibition of aerobic growth and nitrification of bacteria in sewage sludge by antibacterial agents. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 40, 451–460.
- Hargrave, B. T., Holmer, M., & Newcombe, C. P. (2008). Towards a classification of organic enrichment in marine sediments based on biogeochemical indicators. *Marine Pollution Bulletin*, 56:810–824
- Harms, H., Schlosser, D., & Wick, L. Y. (2011). Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nature Reviews Microbiology*, 9, 177–191.
- Hektoen, H., Berge, J. A., Hormazábal, V., & Yndestad, M. (1995). Persistence of antibacterial agents in marine sediments. *Aquaculture*, 133, 175–184.
- Heuer, O. E., Kruse, H., Grave, K., Collignon, P., & Karunasagar, I. (2009). Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clinical Infectious Diseases*, 49, 1248–1253.
- Holmer, M. (2010). Environmental issues of fish farming in off-shore waters: perspectives, concerns and research needs. *Aquaculture Environment Interactions*, 1, 57–70.
- Instituto Nacional de Estadísticas (INE). 2014. *Compendio estadístico 2014*. http://www.inec.cl/canales/menu/publicaciones/calendario_de_publicaciones/pdf/compendio_2014.pdf. Accessed 27 Dec 2015.
- Keeley, N. B., Cromey, C. J., Goodwin, E. O., Gibbs, M. T., & Macleod, C. M. (2013). Predictive depositional modelling (DEPO-MOD) of the interactive effect of current flow and resuspension on ecological impacts beneath salmon farms. *Aquaculture Environment Interactions*, 3, 275–291.
- Krause, E., Wichels, A., Giménez, L., & Gerdt, G. (2013). Marine fungi may benefit from ocean acidification. *Aquatic Microbial Ecology*, 69, 59–67.
- Kutti, T., Hansen, K. P., Ervik, A., Høisæter, T., & Johannessen, P. (2007). Effects of organic effluents from a salmon farm on a fjord system. II. Temporal and spatial patterns in infauna community composition. *Aquaculture*, 262, 355–366.
- Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic—a review—part I. *Chemosphere*, 75, 417–434.
- Manohar, C. S., & Raghukumar, C. (2013). Fungal diversity from various marine habitats deduced through culture-independent studies. *FEMS Microbiology Letters*, 341, 69–78.
- Marshall, B. M., & Levy, S. B. (2011). Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clinical Microbiology Reviews*, 24, 718–733.
- Millanao, B. A., Barrientos, H. M., Gomez, C. C., Tomova, A., & Buschmann, A. (2011). Uso inadecuado y excesivo de antibióticos: salud pública y salmonicultura en Chile. *Revista Médica Chile*, 139, 107–118.
- Miranda, C., & Zemelman, R. (2002). Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. *Aquaculture*, 212, 31–47.
- Nnenna, F. P., Lekiah, P., & Obemeata, O. (2011). Degradation of antibiotics by bacteria and fungi from the aquatic environment. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 3, 275–285.
- Rhodes, G., Huys, G., Swings, J., McGann, P., & Hiney, M. (2000). Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3883–3890.
- Rudolph, A., Medina, P., Urribe, C., & Ahumada, R. (2009). Ecotoxicological sediment evaluations in marine aquaculture areas of Chile. *Environmental Monitoring and Assessment*, 155, 419–429.
- Rudolph, A., Medina, P., Ahumada, R., & Novoa, V. (2011). Ecotoxicological quality of sediments in fiords in Southern Chile (44–46.5° LS). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 46, 79–84.
- Samuelsen, O. B. (1989). Degradation of oxytetracycline in seawater at two different temperatures and light intensities, and the persistence of oxytetracycline in the sediment from a fish farm. *Aquaculture*, 83, 7–16.
- Sarmah, A. K., Meyer, M. T., & Boxall, A. B. A. (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 65, 725–759.
- Schmitt, H., Haapakangas, H., & Van Beelen, P. (2005). Effects of antibiotics on soil microorganisms; time and nutrients influence pollution-induced community tolerance. *Soil Biology and Biochemistry*, 37, 1882–1892.
- Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA) (2014) *Informe sobre uso de antimicrobianos en la salmonicultura nacional 2013*. Unidad de salud animal. Ministerio de Economía, Fomento y Turismo. Valparaíso, Chile. 19 pp.

- Silva, N., & Guzmán, D. (2006). Condiciones oceanográficas físicas y químicas, entre boca del Guafo y fiordo Aysén (Crucero Cimar 7 Fiordos). *Ciencia Tecnología del Mar*, 29, 25–44.
- Sowmya, H. V., Ramalingappa, B., Nayanashree, G., Thippeswamy, B., & Krishnappa, M. (2014). Degradation of polyethylene by *Trichoderma harzianum*—SEM, FTIR, and NMR analyses. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(10), 6577–6586.
- Sorum, H. (2006). Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. In F. M. Aarestrup (Ed.), *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin* (pp. 213–238). Washington: ASM Press.
- Subsecretaría de Pesca y Acuicultura (SUBPESCA) (2014). *Informe sectorial de pesca y acuicultura*. Valparaíso, Chile p 19.
- Subsecretaría de Pesca y Acuicultura (SUBPESCA) (2015). *Subsecretaría de Pesca y Acuicultura*. Valparaíso, Chile <http://www.subpesca.cl/prensa/601/w3-article-88821.html>. Accessed 27 Dec 2015.
- Tedersoo, L., Suvi, T., Jairus, T., & Kõljalg, H. (2009). Forest microsite effects on community composition of ectomycorrhizal fungi on seedlings of *Picea abies* and *Betula pendula*. *Environmental Microbiology*, 10, 1189–1201.
- Valdemarsen, T., Kristensen, E., & Holmer, M. (2009). Metabolic threshold and sulfide-buffering in diffusion controlled marine sediments impacted by continuous organic enrichment. *Biogeochemistry*, 95, 335–353.
- Vidaver, A. (2002). Uses of antimicrobials in plant agriculture. *Clinical Infectious Diseases*, 34, 107–110.
- Williams, A. J., Deck, J., Freeman, J. P., Chiarelli, M. P., Adjei, M. D., Heinze, T. M., & Sutherland, J. D. (2007). Biotransformation of flumequine by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Chemosphere*, 67, 240–243.



4.3- Capítulo 3. Degradación intracelular de oxitetraciclina por hongos aislados desde sedimentos de fiordos marinos

Resultados preliminares de degradación intracelular de oxitetraciclina.

Introducción

En Chile ha desarrollado fuertemente la producción de salmónidos que se consume en el mundo (Costa-Pierce, 2010; Millanao *et al.*, 2011). Esta actividad ha tenido una rápida expansión alcanzando aproximadamente de 2000 km² de costa, en no más de 30 años de historia. En el 2015, la salmonicultura generó ventas por US\$ 3.507 millones, con una producción de 834.168 mil ton, generando un PIB cercano al 3,5 % (SUBPESCA, 2016).

Sin embargo, esta actividad presenta como externalidad negativa, el uso de antibióticos, en tratamientos de enfermedades bacterianas (Buschmann *et al.*, 2012). La oxitetraciclina (OTC) es uno de los antibióticos más utilizado; en el 2013 se aplicó alrededor de 157 ton (SERNAPESCA, 2014).

La OTC es un antibiótico de amplio espectro, incluido en el grupo de las tetraciclinas. Actúa interfiriendo la síntesis de proteínas bacterianas. Es uno de los dos antibióticos (junto a la estreptomycin) registrados por la EPA para su uso en la agricultura como un tratamiento profiláctico (Vidaver, 2002). Es un producto de bajo costo y eficiencia relativa, en la lucha contra infecciones bacterianas comunes (Sarmah *et al.*, 2006).

El uso excesivo de antibióticos en la acuicultura, genera consecuencias negativas para la salud humana, animal y altera el medio marino (Samuelsen *et al.*, 1992; Hektoen *et al.*, 1995; Wolf, 2004; Heuer *et al.*, 2009; Cabello, 2004; 2006; Cabello *et al.*, 2013; Buschmann *et al.*, 2006; 2012; Marshall & Levy, 2011). El impacto ambiental se ve acrecentado por la ineficiente absorción en el intestino del animal, se estima se excretaría entre el 30 y el 90 % de la dosis administrada. Como la mayoría de los antibióticos son solubles en agua, hasta un 90 % de una dosis podría ser eliminada a través de la orina y en las heces (Alcock *et al.*, 1999; Halling-Sørensen, 2001).

Samuelsen (1989) y Hektoen *et al.*, (1995) reportaron que el 80 % de los antibióticos empleados en un cultivo se queda en el ambiente y sedimentos, debido que sus residuos son persistentes bajo ciertas condiciones de oxigenación, con una vida media que excedería los cien días en el caso de oxitetraciclina (Espinosa & Bermúdez, 2012).

Se ha descrito que la oxitetraciclina genera bacterias resistentes a antimicrobianos (Schmitt *et al.*, 2005; Kümmerer, 2009), pudiendo influir en la diversidad microbiana, no sólo mediante la selección de bacterias susceptibles, sino actuando también sobre microalgas (Coyne *et al.*, 2001; Sørum, 2006). Además, generara desequilibrios en el medio, alterando los balances de degradación de la materia orgánica contenida en el sedimento (Kümmerer, 2009; Cabello *et al.*, 2013). Se ha registrado que los ecosistemas marinos y terrestres pueden compartir y traspasar genes de resistencia antimicrobiana de origen bacteriano (Rhodes *et al.*, 2000; Burridge *et al.*, 2010).

Además, se ha evidenciado impactos ambientales más allá de las áreas utilizadas en cultivos de las salmoneras chilenas, ya que se han encontrado trazas de residuos de tetraciclina y quinolonas en peces silvestres que habitan zonas costeras alejadas (Fortt *et al.*, 2007). Por lo tanto, las zonas de cultivos del sur de Chile podrían desempeñar un papel importante como reservorios de bacterias portadoras de determinantes genéticos de resistencia a la oxitetraciclina de alto nivel, lo que podría constituir un riesgo para la salud pública y la de los trabajadores involucrados en su cultivo y procesamiento (Miranda & Zemelman 2002; Burridge *et al.*, 2010; Millanao *et al.*, 2011).

En la actualidad la Comisión Regional de Uso del Borde Costero (CRUBC) de Aysén, Chile; aprobó 41 nuevos sitios como nuevas “Áreas aptas para la acuicultura”, con el objeto de facilitar el proceso de relocalización de concesiones. Estos sitios tienen una extensión de alrededor de 600 hectáreas, la misma superficie por la que serían reemplazadas las concesiones existentes, lo que hace urgente evaluar la restauración de áreas ya intervenidas ambientalmente (SUBPESCA, 2015).

Como los hongos tienen la capacidad de metabolizar compuestos orgánicos a través de un sistema enzimático extracelular e intracelular no específico y con alto potencial para transformar y/o degradar xenobióticos (Harm *et al.*, 2011). En éste

contexto, y dada la importancia de la actividad acuícola para nuestro país, se evaluó capacidad de hongos autóctonos, aislados desde los sedimentos del área de fiordos patagónicos del Sur de Chile, para biodegradar la oxitetraciclina, un antibiótico utilizado en la acuicultura chilena, con el objetivo de evaluar la capacidad para ser usados en procesos de bioremediación en programas de restauración de estos ecosistemas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio. La provincia de Aysén es una de las regiones menos poblada del país, con sólo 0,95 habitantes por km², con una población de 102.632 habitantes según censo 2012 (INE, 2014). Registra bajas temperaturas y elevada tasa de precipitación. El área de fiordos en ésta provincia, presenta zonas protegidas de la inclemencia del tiempo y fácil acceso a la navegación, por lo que paulatinamente está siendo intervenida para la explotación de sus recursos naturales. Actualmente, presenta el mayor porcentaje de exportación de productos marinos, asociado a la producción de salmones con un 78 % (INE, 2014). La calidad ecotoxicológica de los sedimentos, en el centro de los canales y fiordos, indica que éstos sistemas en general se comportan aún como sistemas poco alterados (Rudolph *et al.*, 2007; 2011), con saturación de oxígeno en la capa superficial y ausencia de anoxia en la capa profunda (Silva & Guzmán, 2006). Sin embargo, se informa de graves alteraciones en el borde costero que está siendo utilizado para la engorda de salmones, *i.e.*, altos contenidos de materia orgánica, baja concentración de oxígeno, acidificación del sedimento y alteraciones ecológicas (Rudolph *et al.*, 2009).

Recolecta de sedimentos. La toma de muestras de sedimentos se realizó en la temporada de invierno, julio de 2013, en la Provincia de Aysén (45°12'35,33"S 74°04'25" W) (Fig 1). Para ello se utilizó una embarcación menor y una draga de acero inoxidable de 1800 cm³ de capacidad. Se recolectaron 16 muestras de sedimento en tubos Falcon, previamente esterilizados. Luego de rotulados fueron trasladadas en frío y oscuridad, y congelados a -18°C.

Aislación de las cepas. Las cepas se aislaron a partir de 3 g de sedimento, que se diluyó en 10 ml de agua destilada estéril y se deja decantar durante 15 min para eliminar el exceso de material particulado. El sobrenadante se diluye seriadamente con agua de mar esterilizada 01:10 con 2 repeticiones 01:10⁻³, una parte alícuota de 100 µl fue transferido a los medios de cultivo YMG agar con estreptomicina (200 mg L⁻¹) y se extendió sobre la superficie usando una varilla de vidrio estéril. El crecimiento de colonias de hongos se evaluó después de 5 días de crecimiento a temperatura ambiente y cepas puras se obtuvieron a partir de estas placas.

Identificación de las cepas. La determinación y caracterización morfológica de las cepas, se realizó utilizando técnicas de microscopía óptica de barrido. Para la identificación de la especie, se utilizó caracteres taxonómicos como tipo, tamaño y formas de las esporas, conidiosporas, ascosporas y estructura de los micelios. Para la validación y confirmación de la identificación morfológica, se aplicó técnicas de PCR, se amplificó la región ITS (que incluye el gen 5.8S) y las subunidades nucleares ribosomales de rRNA (LSU) utilizando ITS-1/ITS-4 (Tedersoo et al. 2009). Se extrajo ADN del micelio utilizando el EZNA ADN fúngico MiniKit (Omega-Biotek). Las reacciones de PCR se realizaron con ITS4 (5'- tctccgcttattgatatgc-3') como partidores directos y ITS1 (5'-tccgtaggtgaacctgcgg-3') como partidores inversos. Cada reacción se llevó a cabo en 15 µL de solución que contenía de 30 - 50 ng de ADN, 1X de tampón de PCR, 2 mM MgCl₂, 0,1 mM de cada dNTP, 0,5 mM de los cebadores directos e inverso, y 1 U de Taq ADN polimerasa. Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo con una desnaturalización inicial de 4 min a 94 ° C, seguido de 35 ciclos de 30 seg a 94 ° C, 60 seg a 50 ° C, 60 seg a 72 °C y un paso final de 5 min a 72 ° C. Se realizó electroforesis de prueba y fotografías del gel. El producto de PCR se purificó y secuenció en ambos sentidos. Una vez secuenciado las cepas fueron editadas utilizando Genious software v5.4 (Drummond *et al.*, 2011). La secuencia se analizó con BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para la determinación del porcentaje de identidad máxima se utilizó las secuencias de la base mundial de datos. Finalmente, las secuencias obtenidas fueron depositadas en GenBank (Ahumada-Rudolph *et al.*, 2014).

Preparación de las cepas para los ensayos de biodegradación. Se utilizó medios de cultivo líquido con nutrientes: levadura, malta y glucosa (YMG), dejando crecer las esporas por 4 días. Luego, los micelios de cada cepa fueron depositados en matraces que contenían 250 mgL^{-1} de oxitetraciclina. En paralelo, se preparó los controles negativo y positivo. El control negativo contenía sólo la solución del antibiótico y el control positivo la solución de oxitetraciclina y micelio autoclavado de las cepas en estudio. Se trabajó cada cepa y controles en triplicado, ($n = 21$). Los matraces se mantuvieron a temperatura ambiente, en oscuridad y constante agitación (120 rpm). Se tomó alícuotas de 1 ml de solución a cada ensayo a los días 0, 2, 6, 10,15 y 21. Cada alícuota fue filtrada en $0,23 \mu\text{m}$ e inyectada en HPLC-DAD.

Evaluación de la capacidad biodegradativa de oxitetraciclina. Para la determinación de oxitetraciclina en los cultivos, se utilizó una curva de calibración preparada con un estándar de clorhidrato de oxitetraciclina al 98,9 % pureza, CAT#500105 Calbiochem. Se trabajó con concentraciones crecientes de 7, 15, 30, 100, 175 y 250 mgL^{-1} . El límite de detección y de cuantificación fue determinado de acuerdo a las siguientes relaciones: $LD = Y_{bl} + 3 * S_{bl} / m$. Dónde, LD: límite de detección; Y_{bl} : señal entregada por el blanco; S_{bl} : desviación estándar del blanco y m : pendiente de la recta y $LQ = Y_{bl} + 10 * S_{bl} / m$. Dónde, LQ: límite de cuantificación Y_{bl} : señal entregada por el blanco y S_{bl} : desviación estándar del blanco y m : pendiente de la recta. La incertidumbre de las mediciones fue determinada por el error típico, el que se obtuvo mediante la herramienta de análisis de datos (Tabla 1).

Se utilizó un HPLC con una bomba YL 9111S Binary pump y detector YL 9160 PDA con inyección manual y loop de $20 \mu\text{L}$. La columna utilizada fue una Kromasil 100 5 C18; $250 \times 4,6 \text{ mm } \varnothing$. La fase móvil utilizada fue ácido fórmico 0,1 % en H_2O milli Q y acetonitrilo (80 : 20) isocrático, a un flujo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. La longitud de onda de trabajo utilizada 365 nm .

Análisis estadísticos. Para la evaluación de la capacidad de degradación del antibiótico oxitetraciclina por las cepas de hongos analizadas, se realizó un análisis de varianza de medidas repetidas, que consideró 2 factores: el tiempo de exposición (2, 6 10 ,15 y 21 días) y las 5 cepas en estudio con sus respectivos controles (negativo y positivo). Además, se aplicó la prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha = 0,05$). Se utilizó el procedimiento proc Mixed de SAS.

Resultados

Degradación intracelular de antibióticos, medición medio líquido

Existen diferencias significativas entre las cepas en estudio, según su capacidad de degradación (ANOVA $F_{(6,146)} = 51,23$; $P = 0,0001$), donde el test a posteriori de Tukey evidencia que la menor capacidad de degradación se observa en el cultivo sin micelio ($197,29 \pm 3,5 \text{ mgL}^{-1}$), las cepas (117) *C. antarcticum* y *A. terreus* (106) su capacidad de degradación es similar ($148,34 \pm 3,4 \text{ mgL}^{-1}$) y ($148,07 \pm 3,3 \text{ mgL}^{-1}$), la cepa *H. lixii* (111) y *B. bassiana* (129) se agrupan ($140,30 \pm 3,8$ y $139 \pm 3,7$), luego *E. nigrum* ($126,48 \pm 3,48$), siendo la cepa con mayor capacidad de degradación la *P. solitum* (115) ($120,82 \pm 3,4$). Existe homogeneidad de varianza según test de cochrane (0,1250) *d.f.* 41 y $P = 0,00001$.

En relación al tiempo las cepas muestran, que existen diferencias significativas en capacidad de degradación de las cepas en estudio y el tiempo de exposición, (ANOVA $F_{(6,146)} = 37,63$; $P = 0,0001$), sin embargo el tiempo 12 y 15 la respuesta fue similar, según test a posteriori de Tukey.

Al 3 día de cultivo se observaron diferencias significativas en la concentración del antibiótico, de acuerdo a las cepas y medios de cultivo (ANOVA $F_{(6,20)} = 67,08$; $P = 0,0001$). Las cepa con menores degradaciones correspondieron a *A. terreus* (106) y sin micelio con un 9 % y 11 %, respectivamente; las cepas *B. bassiana* (129), *C. antarcticum* (117) y *H. lixii* (111) se comportaron similar estadísticamente degradando un 17 %, 17% y 18%; las cepas con mayor porcentaje de degradación correspondieron a *E. nigrum* y *P. solitum* (115) (22 % y 23 %), según prueba a posteriori de Tukey (Fig. 2).

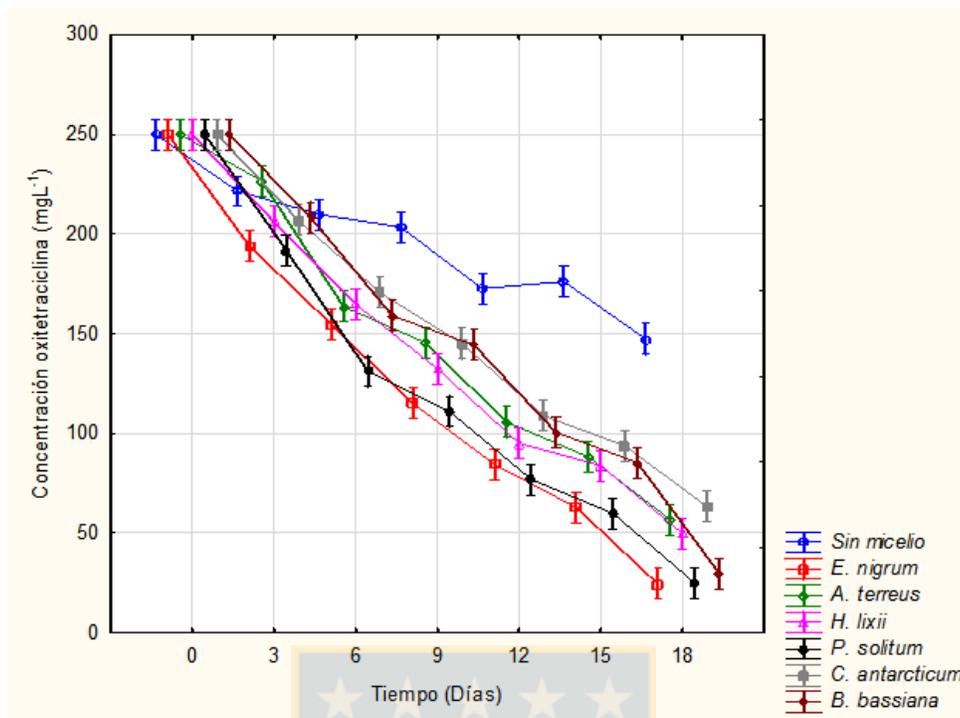


Figura 1. Determinación de oxitetraciclina según tiempo de exposición de las cepas en estudio.

A los **6 días de cultivo**, se observaron diferencias significativas en la concentración del antibiótico oxitetraciclina de acuerdo a las cepas y medios de cultivo (ANOVA $F_{(6,20)} = 25,40$; $P = 0,0001$). Donde se evidencia que el cultivo sin micelio es que registra un menor porcentaje de degradación (16 %) y el cultivo con mayor degradación corresponde a la cepa *P. solitum* (115) con un 48 %, según prueba a posteriori de Tukey (Fig. 2).

Al tiempo de 9 días, se observan diferencias significativas en la capacidad de degradación de las cepas en estudio, (ANOVA $F_{(6,20)} = 58,42$; $P = 0,0001$), donde el cultivo sin micelio es el que registra el menor porcentaje de degradación (19 %) y la cepa *E. nigrum* y *P. solitum* 115 la mayor capacidad de degradación (54 y 56 %), según prueba a posteriori de Tukey (Fig. 2).

El tiempo 12 y 15, se observan diferencias significativas en la capacidad de degradación del antibiótico de las cepas (ANOVA $F_{(6,20)} = 34,53$; $P = 0,0003$), donde el cultivo sin micelio es el que registra el menor porcentaje de degradación (31 %) y la cepa *P. solitum* (115) la mayor capacidad de degradación (69 %) (Fig. 2).

Al tiempo final se observaron diferencias significativas en la capacidad de degradación del antibiótico, (ANOVA $F_{(6,20)} = 135,04$; $P = 0,0002$), donde el cultivo sin micelio es el con menor porcentaje de degradación (41 %), luego la cepa *C. antarcticum* (117) con 75 % , *A. terreus* (106) con 77 % , *H. lixii* (111) con 80 % se comportaron similar estadísticamente, y las cepas con mayores capacidad de degradación corresponde a la *B. bassiana* (129) con 88 % , *P. solitum* (115) con 90 % y *E. nigrum* 90 %, según prueba a posteriori de Tukey (Fig. 2).

Determinación de oxitetraciclina en el micelio

La tendencia de los hongosmarinos, existen diferencias significativas en la cantidad o concentración de oxitetraciclina en el micelio de las cepas en estudio ($F_{(4,74)} = 4,05$; $P = 0,0045$), Siendo la cepa *B. bassiana* y *P. solitum* las registradas con mayor cantidad de concentración promedio del antibiótico en el micelio ($40,45 \pm 3,02$ y $38,65 \pm 3,3$) respectivamente; la cepa *E. nigrum* es significativamente menor su concentración de antibiótico contenido en el micelio ($26,11 \pm 3,1$) (Fig. 3).

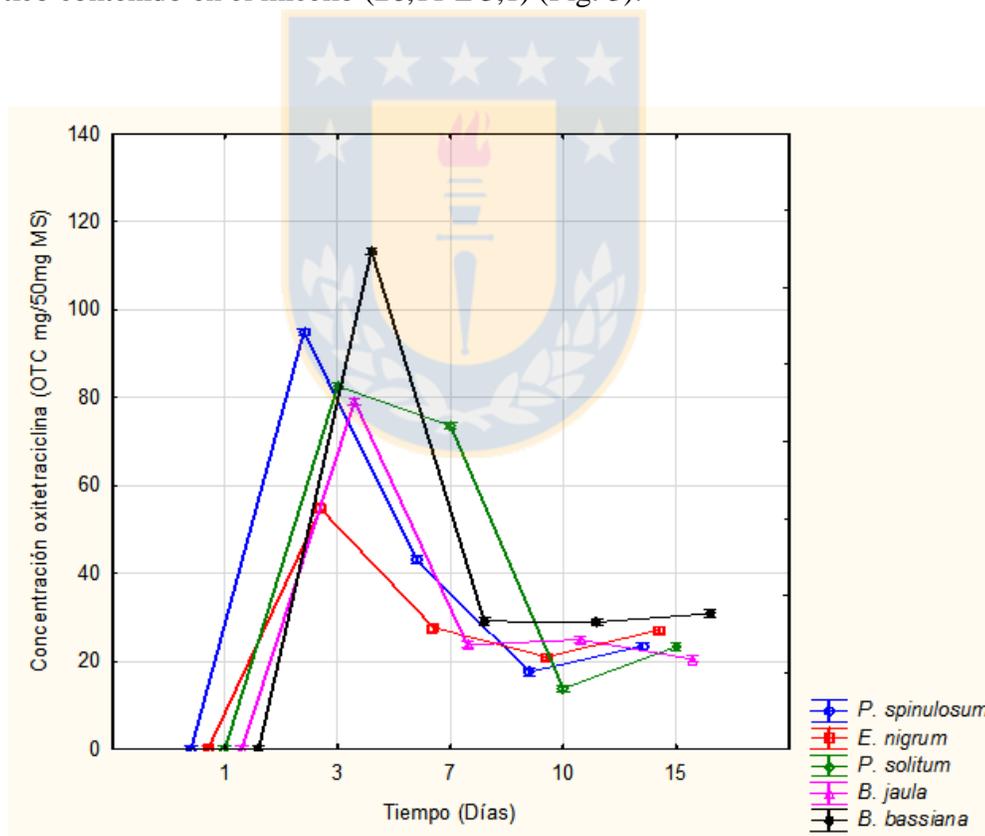


Figura 2. Determinación de oxitetraciclina en micelio de cepas en estudio.

En relación a la tendencia al tiempo de exposición existen diferencias significativas en el contenido de antibiótico en el micelio de los hongos en estudio

($F_{(4,74)} = 110,5$; $P = 0,0001$), donde el tiempo 3 la tendencia de los hongos es registrar mayores concentraciones de oxitetraciclina ($84,94 \pm 3,1$), luego el tiempo 7 registra una disminucion en las concentraciones en el micelio con respecto al tiempo anterior ($39,46 \pm 3,0$), sin embargo tiempo 10 y 15 obtienen similar respuesta ($25,05 \pm 3,3 - 21,25 \pm 3,0$) (Fig. 3).

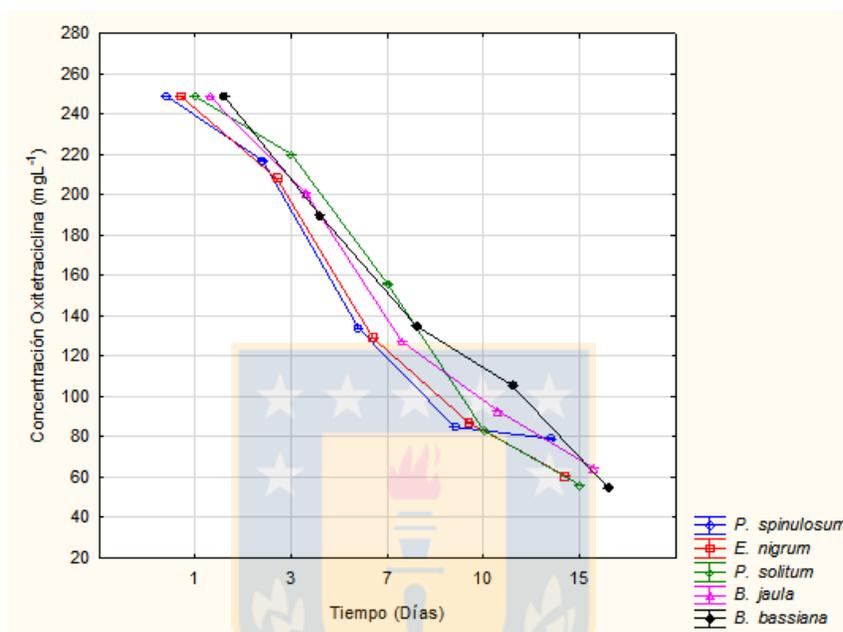


Figura 3. Determinación de oxitetraciclina en medio líquido de las cepas en estudio.

La figura 3 muestra la determinación de oxitetraciclina en el medio líquido de las cepas en estudio, donde existen diferencias significativas entre las cepas y el tiempo de exposición, ANOVA $F_{(4,50)} = 24210$; $P = 0,0001$ siendo la cepa *P. spinulosum* la que tiene una mayor media de oxitetraciclina ($152,8 \pm 2,3 \text{ mgL}^{-1}$) siendo la cepa con menor capacidad de degradación en comparación a las demás cepas.

4.4- Capítulo 4. Variación de esteroides y ácidos grasos como respuesta adaptativa a cambios de temperatura, salinidad y pH de un hongo marino *Epicoccum nigrum* aislado desde los fiordos patagónicos

Ramón Ahumada-Rudolph, Daniel Cajas-Madriaga, Anny Rudolph, Rodrigo Reinoso, Cristian Torres, Mario Silva and José Becerra.

Resumen

Se aisló e identificó una cepa hongo marino a partir de muestras de sedimentos obtenidas a partir de un sector de los fiordos patagónicos. La cepa LQRA39-P fue identificado como *Epicoccum nigrum* utilizando técnicas de microscopía y corroborada mediante técnicas moleculares. Se espera demostrar que las respuestas de variación metabólicas permiten hongos ubicuos desarrollen en diferentes ambientes como marinos, de agua dulce y ambientes terrestres. Se analizaron las variaciones en el contenido de ácidos grasos y esteroides, en una batería de medios de cultivo a diferentes temperaturas, salinidad y pH. Se analizó el contenido de ácidos grasos y esteroides, usando la cromatografía de gas es acoplada a cromatografía de masas (GC-MS). Los cambios de temperatura no indujeron un efecto cambios significativos en el contenido de ácidos grasos; sin embargo, respecto del contenido de esteroides fue un factor determinante a pH 4 cuando fue crecido en agua dulce a 25 °C, obteniéndose una mayor diversidad de esteroides no observados en otras condiciones. La salinidad generó cambios en la composición lipídica (*i.e.*, C16:0; C16:1; C18:2 y C18:3). En cuanto al pH, este factor tiene un efecto significativo sobre la composición de ácidos grasos y esteroides. Se demuestra que *E. nigrum* es capaz de cambiar su composición de esteroides y ácidos grasos como respuesta adaptativa para co-habitar sustratos marinos y dulceacuícolas.

Palabras clave: Ecología de hongos, hongos extremófilos, hongo marino, metabolitos secundarios

Nota: Publicado en la revista Revista de Biología Marina y Oceanografía. Agosto 2014 vol 49 N°2: 293:305.

ARTICLE

Variation of sterols and fatty acids as an adaptive response to changes in temperature, salinity and pH of a marine fungus *Epicoccum nigrum* isolated from the Patagonian Fjords

Variación de esteroides y ácidos grasos como respuesta adaptativa a cambios de temperatura, salinidad y pH de un hongo marino *Epicoccum nigrum* aislado desde los fiordos patagónicos

Ramón Ahumada-Rudolph^{1,4,5}, Daniel Cajas-Madriaga¹, Anny Rudolph²,
Rodrigo Reinoso¹, Cristian Torres³, Mario Silva¹ and José Becerra¹

¹Laboratorio de Química de Productos Naturales, Departamento Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Concepción, Casilla 160-C, Chile. ramonahumada@udec.cl

²Facultad de Ciencias, Universidad Católica de la Santísima Concepción, Alonso de Ribera 2850, Concepción, Chile

³Laboratorio de Genómica & Biodiversidad (LGB), Departamento de Ciencias Naturales, Universidad del Bío-Bío, Dieciocho de Septiembre 580, Chillán, Chile

⁴EULA-Chile Environmental Sciences Centre, Universidad de Concepción, Chile

⁵Programa de Postgrados en Oceanografía, Departamento de Oceanografía, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Chile

Resumen.- Se aisló e identificó una cepa hongo marino a partir de muestras de sedimentos obtenidas a partir de un sector de los fiordos patagónicos. La cepa LQRA39-P fue identificado como *Epicoccum nigrum* utilizando técnicas de microscopía y corroborada mediante técnicas moleculares. Se espera demostrar que las respuestas de variación metabólicas permiten hongos ubicuos desarrollen en diferentes ambientes como marinos, de agua dulce y ambientes terrestres. Se analizaron las variaciones en el contenido de ácidos grasos y esteroides, en una batería de medios de cultivo a diferentes temperaturas, salinidad y pH. Se analizó el contenido de ácidos grasos y esteroides, usando la cromatografía de gases acoplada a cromatografía de masas (GC-MS). Los cambios de temperatura no indujeron un efecto cambios significativos en el contenido de ácidos grasos; sin embargo, respecto del contenido de esteroides fue un factor determinante a pH 4 cuando fue crecido en agua dulce a 25°C, obteniéndose una mayor diversidad de esteroides no observados en otras condiciones. La salinidad generó cambios en la composición lipídica (i.e., C16:0; C16:1; C18:2 y C18:3). En cuanto al pH, este factor tiene un efecto significativo sobre la composición de ácidos grasos y esteroides. Se demuestra que *E. nigrum* es capaz de cambiar su composición de esteroides y ácidos grasos como respuesta adaptativa para co-habitar sustratos marinos y dulceacuícolas.

Palabras clave: Ecología de hongos, hongos extremófilos, hongo marino, metabolitos secundarios

Abstract.- We isolated and identified a marine fungus strain from samples of sediments obtained from a sector of the Patagonian fjords. The LQRA39-P strain was identified as *Epicoccum nigrum* using microscopy techniques and corroborated using molecular techniques. We expect to prove that metabolic variation responses allow ubiquitous fungi to develop in marine, freshwater, and terrestrial environments. We analyzed variations in the content of fatty acids and sterols, in a battery of culture media at different temperatures, salinity and pH. The content of fatty acids and sterols was analysed using gas chromatography coupled to mass chromatography (GC-MS). Changes in temperature showed no significant changes in the fatty acid content; nevertheless, sterol content was significantly affected by this factor at just pH 4, increasing diversity of sterols in freshwater at 25°C. Salinity generated changes in the lipid composition (i.e., C16:0; C16:1; C18:2 and C18:3). As for pH, this factor has a significant effect on the composition of fatty acids and sterols. We demonstrate that *E. nigrum* is capable of changing its composition of sterols and fatty acids as an adaptive response that may enable co-inhabiting marine and terrestrial substrates.

Key words: Fungal ecology, extremophile fungus, marine fungus, secondary metabolites

INTRODUCTION

Epicoccum nigrum Link (Pleosporales, Ascomycetes) is a ubiquitous fungus, characterized by a colored mycelium which varies from yellow to dark red, produces conidia multi-septate with brown to black pigmentation with short conidiophores located in sporodochia (Mims & Richardson 2005). The biogeographical records show a wide distribution in all 5 continents. In Latin America, according to GenBank® records, it has been studied in Perú, Puerto Rico, Ecuador, Colombia and Chile (Fávaro *et al.* 2011). The substrates that it colonizes are several. Its presence has been reported in terrestrial environments with substrates such as soil and plant tissue, saprobe or parasitizing crops, *e.g.*, soybean (Larran *et al.* 2002, Pitt & Hocking 2009), as well as degrading wood of conifers in the south of Chile (Butin & Peredo 1986). In addition, its adaptive ability has allowed it to colonize marine environments, where it has been isolated from sponges (Hai-Hong *et al.* 2011) and algae of the genus *Fucus* and *Spartina* (Kohlmeyer 1974, Abdel-Lateff *et al.* 2003).

The *E. nigrum* strain studied in this work was isolated from sediments collected in the area of the Moraleda Channel, Aysén region of Chile, where the transport of organic matter is mainly of marine origin (*i.e.*, 74% autochthonous planktonic organisms) (Silva *et al.* 2011). In these Patagonian fjords, freshwater entry from the river to the head of the fjord forms a surface plume of low-density that connects to the open sea and results in layers of different densities (Silva & Guzmán 2006). The head of the fjord is associated to glaciers with detachments of ice and low temperatures, constituting a unique system that is directly disrupted by terrestrial, climatic and tidal influences (Armstrong *et al.* 1985).

In the area, knowledge pertaining to the metabolic changes of fungi as an adaptive response in transition environments is scarce (Gunde-Cimerman *et al.* 2009). It is proposed that the basis of these changes relates mainly with the ability of the fungi to modify structures of the cell membrane, which acts as a selective barrier (Horvath *et al.* 1998, Bowman & Free 2006, Kavanagh 2011). Membrane proteins are essential elements involved in functions such as the maintenance of cell shape, adhesion processes, cellular protection of toxic substances, molecule absorption, signal transmissions to the cytoplasm, and synthesizing or remodelling the components of the wall (Bowman & Free 2006). Sterols are essential components of eukaryotic cell membranes, and therefore cells tightly regulate sterol levels and sterol metabolism. Alteration of sterol levels can have an effect

on the susceptibility of fungal cells, including osmotic and oxidative pressures (Zavrel *et al.* 2013). It is proposed that the ability to adapt and increase the chances of surviving and reproducing in marine conditions, is based mainly on the ability to regulate osmosis through modification of the sterol composition of the structural components of their cell membrane, and to variations in the synthesis of fatty acids, *i.e.*, increasing the content of unsaturated molecules at low temperatures (Nordström & Laakso 1992, Mysyakina & Funtikova 2007), that manages to keep the fluidity of the membrane and proper cellular function (Swan & Watson 1997).

Salinity and pH are factors that limit the growth of fungus species that generally grow and proliferate under optimum conditions. The fungal cell wall is the first line of defense against environmental stress, providing the capacity to protect against external physiochemical changes. As such, cell wall adaptation is expected to play one of the most important roles in the proliferation of the fungus. The capacity of the cell wall to resist both the water loss and salt toxicity in a minimum of water activity (a_w) and fluctuations in alkalinity (Kapteyn *et al.* 1999, Mager & Siderius 2002), makes it essential for maintaining the osmotic homeostasis of cells due its ability to protect against mechanical damage and keeping the level of turgor pressure required for intracellular cytoplasm (Bowman & Free 2006).

Our objective was to analyze changes in the content of sterols and fatty acids of the ubiquitous fungus *E. nigrum* isolated from Patagonian fjords area, as adaptive responses to changes in the conditions of temperature, pH and salinity.

MATERIALS AND METHODS

The marine strain *Epicoccum nigrum* LQRA39P (Fig. 2), was isolated from sediment (93% clay, 3-5% total organic matter) collected from Patagonian fjords region of the Moraleda Channel. The sampling point corresponds to station 39 C12-F (44°39'42"S - 73°30'06"W) at 300m depth (Fig. 1). The sediment samples were collected from 3 cm using a box corer and stored at -18°C (Silva *et al.* 2011).

The strain was isolated from 10 g of sediment, which was diluted in 20 mL sterile seawater and left to decant for 15 min to eliminate the excess particulate material. The supernatant was subsequently diluted 1:10 with sterilized seawater, an aliquot of 100 µL was transferred to agar YMG seawater media with streptomycin (200 mg L⁻¹) and spread over the surface using a sterile glass rod. The

growth of fungal colonies was evaluated after 5 days of growth at room temperature and pure strains were obtained from these agar plates (Webster & Weber 2007).

In order to validate the morphological identification of *E. nigrum* strain, we amplified the ITS (which include 5.8S gene) and the nuclear ribosomal large subunit rRNA (LSU) regions using ITS-5 (White *et al.* 1990) and LR6 (Vilgalys & Hester 1990) primers. DNA was extracted from fruit bodies using the E.Z.N.A. fungal DNA MiniKit (Omega-Biotek). PCR reactions were performed using ITS5 (5'-ggaagtaaaagtctgaacaagg-3') as forward primer and

LR06 (5'-cgccagttctgttacc-3') as reverse primer. Each reaction was conducted in a 15 µl volume containing 30-50 ng of DNA, 1x of PCR buffer, 2 mM MgCl₂, 0.1 µM of each dNTP, 0.5 µM of forward and reverse primers, and 1 U of Taq DNA polymerase. PCR amplification was carried out with an initial denaturation step of 4 min at 94°C, and then 35 cycles of 30 s at 94°C, 60 s at 50°C and 60 s at 72°C s, followed by a final step of 5 min at 72°C. PCR product was sequenced in both senses at Macrogen^o Inc. (Seoul, Korea).

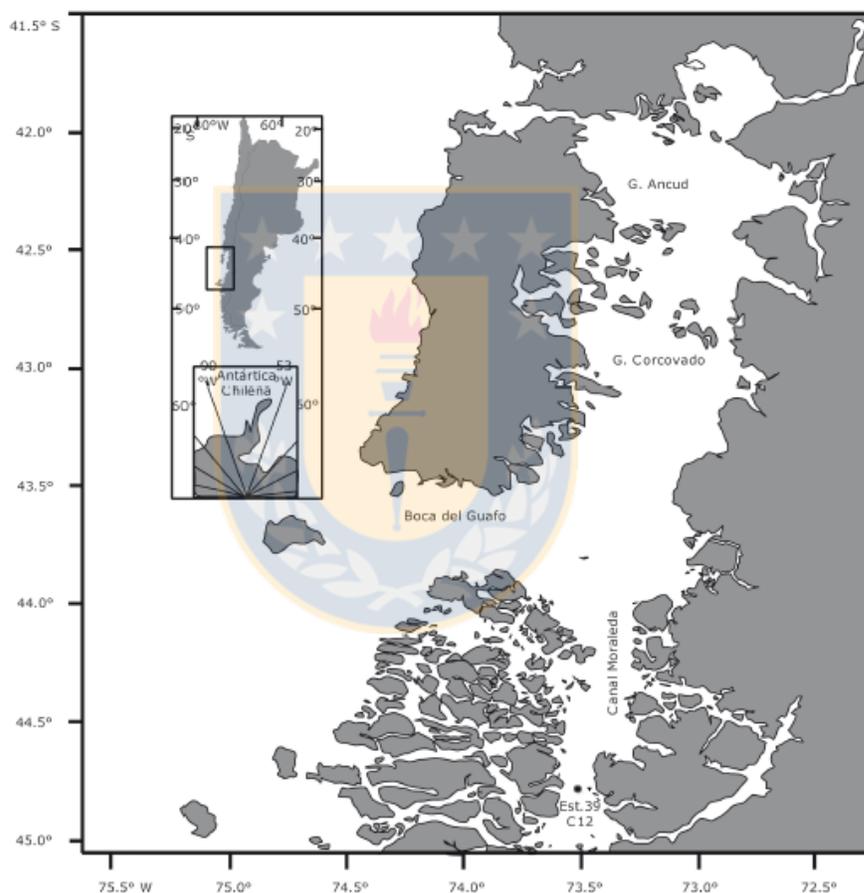


Figure 1. Oceanographic location of station 39 C12-F that sample was recollected during CIMAR 12 Fjords cruise, where we obtained samples of sediment from which the strain *E. nigrum* was isolated / Ubicación oceanográfica de la estación 39 C12-F donde fue recolectada la muestra de sedimento en la que se aisló la cepa *E. nigrum* durante el Crucero CIMAR 12 Fjords

Forward and reverse sequences were edited using Genious v5.4 software (Drummond *et al.* 2011). The sequence of our *E. nigrum* strain was analyzed with BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, database nucleotide collection nr/nt)¹ using Megablast to determine the percentage of maximal identity with the sequences of that global database. Specifically, we performed a neighbor-joining distance tree based on ITS and LSU regions to determine the phylogenetic affinity of our isolated. Finally, the sequence obtained in the present study was deposited in GenBank® (CODE: KC164754).

Liquid cultures of the strain were carried out in 125 ml of YMG medium, with sterile distilled water (pH 4, 7 and 10) and sterile filtered seawater (pH 4, 7 and 10). Both distilled water and seawater mediums were modified with HCl acid and NaOH alkaline. Incubation was carried out at 6 and 25°C under constant agitation at 120 rpm for 21 days until the glucose was consumed. The cultures were subsequently filtered and the mycelium was washed with sterile distilled water 3 times to remove all traces of the culture medium.

The extraction of sterols was performed from 5 g of mycelium to which 25 mL solution methanol-water (1:1) with NaOH granules, resulting in a concentration of 2N. The mixture was heated for 30 min at 100°C, filtered and the supernatant extracted 3 times with a solution of diethyl ether-hexane (1:1), and finally concentrated on a rotary agitator (120 rpm) at 40°C.

The first steps in fatty acid extraction were similar to those of sterol extraction. However, after the mixture was heated for 30 min at 100°C, it was cooled to room temperature. Subsequently, a solution of HCl 2N was added until pH 2 was obtained. The mixture was then filtered and the supernatant was extracted 3 times with a solution of diethyl ether-hexane (1:1), and finally concentrated on a rotary agitator (120 rpm) at 40°C. All extracts were stored at 4°C for subsequent analysis (Stahl & Klug 1996).

The analysis of fatty acid and sterols were carried out by GC-Mass spectrometry (GC-MS) and recorded on a Shimadzu GC-17A/MS QP5050AGC-MS system (electron ionization mode 70 eV, source temperature 270°C, scanned mass ranged m/z 43-350). The operating conditions were as follows: 30 m HP-5MS (5%-diphenil-95%-dimethylsiloxane) capillary column; 0.25 mm id, thickness:

0.25 µm, helium as the carrier gas, flow rate of 1 mL min⁻¹ and with split ratio of 1:30, temperature was programmed as follows: from 100°C (5 min) to 260°C at 10°C min⁻¹. The identification of the components of the sterol and fatty acid composition was accomplished by matching their mass spectra with those recorded in the NIST 05 (NIST / EPA/NIH MASS 2005 spectral Library). Spectra were considered coincident if the similarity index was higher than 95%.

The Shapiro-Wilk test was used for testing normality of the data and Cochran's test for homogeneity of variances. The effect of cultivation conditions; salinity (*i.e.*, freshwater and seawater); pH (*i.e.*, pH 4, pH 6-7 and pH 10) and temperature (*i.e.*, 6-25°C), were compared using the parametric test one-way ANOVA in accordance with its respective response variable in fatty acids and sterols. All statistical calculations were performed using the software package STATISTICA version 6.0 (StatSoft Inc. 2005).

RESULTS

Of the fungus extracted from the Patagonia region, over 100 strains were isolated and identified in the laboratory. Of these strains, the *E. nigrum* demonstrated changes in growth and pigmentation under different conditions of cultivation (pH, salinity) in both solid and liquid mediums (Fig. 2). In the figure, the 250 ml flasks show the intense red pigmentation in a culture with a basic pH level, in both seawater and freshwater. The pigmentation is a clear yellow color in an acidic culture. In the figure, it is observed that 2 of the solid marine mediums at pH 7 and 6°C, had similar types of growth (Fig. 2).

A 1517 bp PCR fragment was amplified that fit with the expected PCR product size (~1600 bp). This fragment, covered ITS1, 5.8S, ITS2 and 28S region (partial sequence). MegaBLAST analysis confirmed the identity of our isolated (GenBank® accession number: KC164754) was grouped with others *E. nigrum* accessions such as (GenBank accession number: GU183122, ITS region, Lee *et al.* 2007) and (GenBank® accession number: JN938882, LSU region, Schoch *et al.* 2012), showing high scores (1519 and 1104 bits, respectively) and high similitude percentages (100 and 99%, respectively).

¹<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

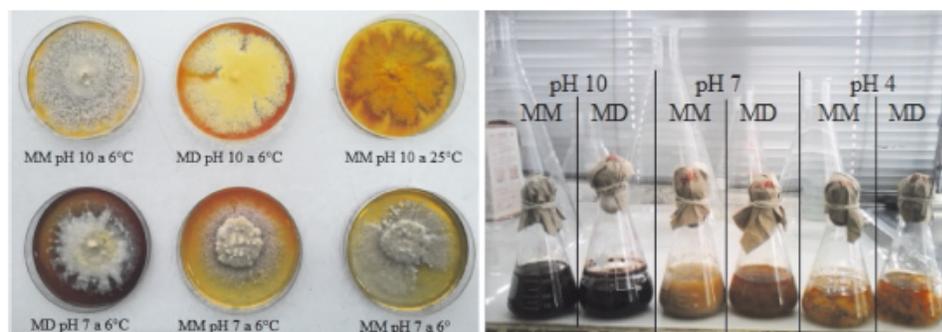


Figure 2. *E. nigrum* in solid and liquid cultured media YMG, with sterile distilled water (MD) and sterile filtered seawater (MM) in both cases pH was tested at 10, 7 and 4. Solid medium at pH < 5 does not coagulate agar / Medios de cultivos sólidos y líquidos de *E. nigrum* en medio YMG, con agua destilada estéril (MD) y agua de mar filtrada estéril (MM), en ambos casos se evaluó el efecto del pH (10, 7 y 4). El medio sólido, a pH < 5, no coagulan el agar

E. nigrum biomass cultivated in freshwater as well as seawater medium showed different proportions of fatty acids, with a carbon chain length of 14-18 carbon atoms. In relation to salinity, *i.e.*, cultures in freshwater and seawater medium, significant differences were observed in fatty acid content with: C16:0 ($F_{(18,00)} = 0.001$) (Tukey's *a posteriori* $P < 0.05$); C16:1 ($F_{(6,6)} = 0.027$) (Tukey's *a posteriori* $P < 0.05$); C18:2 ($F_{(9,01)} = 0.013$) (Tukey's *a posteriori* $P < 0.05$); C18:3 ($F_{(8,25)} = 0.01$) (Tukey's *a posteriori* $P < 0.05$). In regard to pH, this variable exerted a significant effect on the composition of fatty acids, observing differences in the fatty acids with: C16:0 ($F_{(34,2)} = 0.0006$) (Tukey's *a posteriori* $P < 0.05$); C16:1 ($F_{(5,7)} = 0.024$) (Tukey's *a posteriori* $P < 0.05$); C18:2 ($F_{(16,45)} = 0.009$, $P < 0.05$); C18:3 ($F_{(11,44)} = 0.0003$) (Tukey's *a posteriori* $P < 0.05$).

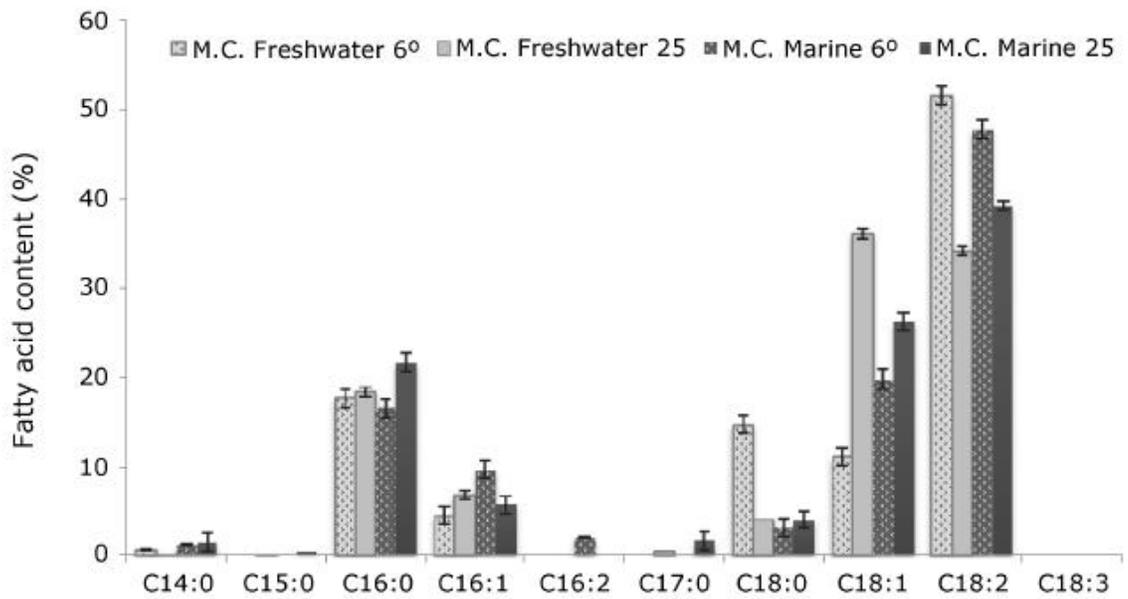
At the pH 6 of freshwater, we observed that the fatty acid composition varied with temperature. At 25°C unsaturated molecules C18:1 and linoleic acid C18:2 predominated in equal proportions. However, at 6°C fatty acid 18:2 predominated (Fig. 3).

At the normal pH of seawater medium (pH 7), at 6 and 25°C we observed no changes in fatty acid composition in contrast to what was observed in freshwater ($F_{(24,08)} = 0.127$, $P < 0.05$). In general, in normal pH, 60% of the observed fatty acid was with C18 unsaturated (*i.e.*, 18:2 and 18:1). In contrast, C16 fatty acid is predominantly saturated *i.e.*, 16:0 > C16:1 > C16:2. Fatty acid 16:2 was detected only at 6°C (low temperature) and in seawater medium (Fig. 3).

At the basic pH (pH 10) the biomass of *E. nigrum*, both in freshwater and seawater medium, displayed a great diversity of fatty acids of chain lengths C14, C15, C16, C17 and C18 with their respective unsaturation (*i.e.*, 16:1, 16:2, 18:1, 18:2 and 18:3). The contents of 18:1 and 18:2 were prominent at 53 and 74%, respectively (Fig. 4). In seawater medium, at a low temperature of 6°C, the percentage of unsaturated molecules C18 reached 68% and at a higher temperature of 25°C a higher percentage of 74% was reached, in contrast to observed in freshwater, where at a low temperature only 54 and 55% were respectively reached (Fig. 4)

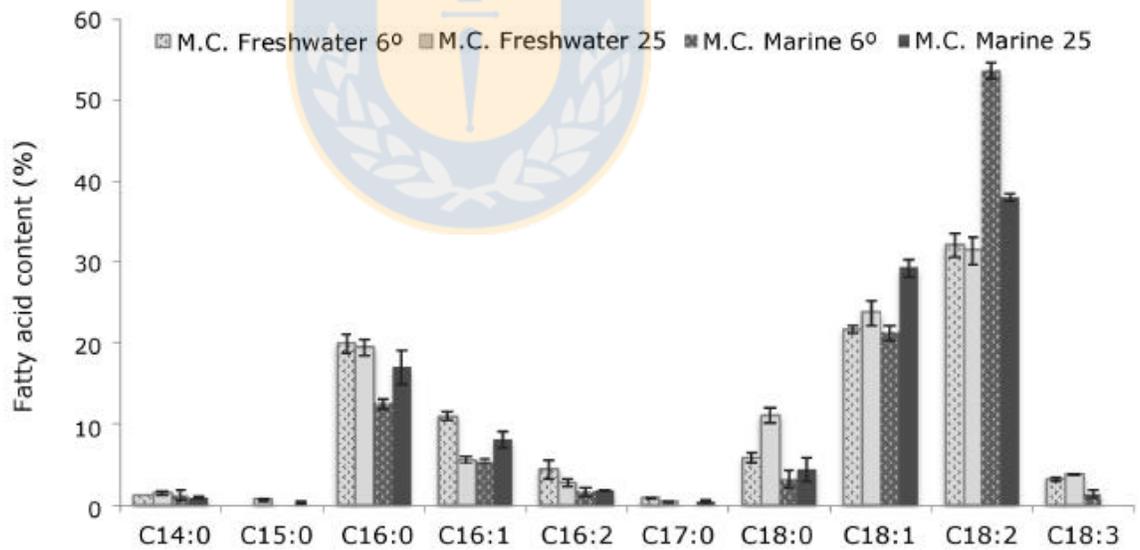
The C16 fatty acids in both salinities showed a higher proportion of saturation. In contrast, the proportion of unsaturated molecules C16 was greater at low temperatures in freshwater and the reverse in seawater cultures ($F_{(112,36)} = 0.059$) (Tukey's *a posteriori* $P < 0.05$) (Fig. 4). However, differences in the percentages between the fatty acid molecules were not significant; a similar tendency was observed at basic pH between the different culture media and temperature.

Fatty acids extracted from mycelium cultured in freshwater at pH 4, contained higher levels of unsaturated C18:1 and C18:2, with proportions of 64 and 77% at high and low temperatures, respectively. This is in contrast to what was observed in seawater medium where proportions of 24% were reached at low temperatures and 27% at high temperatures (Fig. 5). Unlike the previous cultures, the proportion of saturated fatty acid C16 with 66% at high temperature and 60% at low temperature was greater in



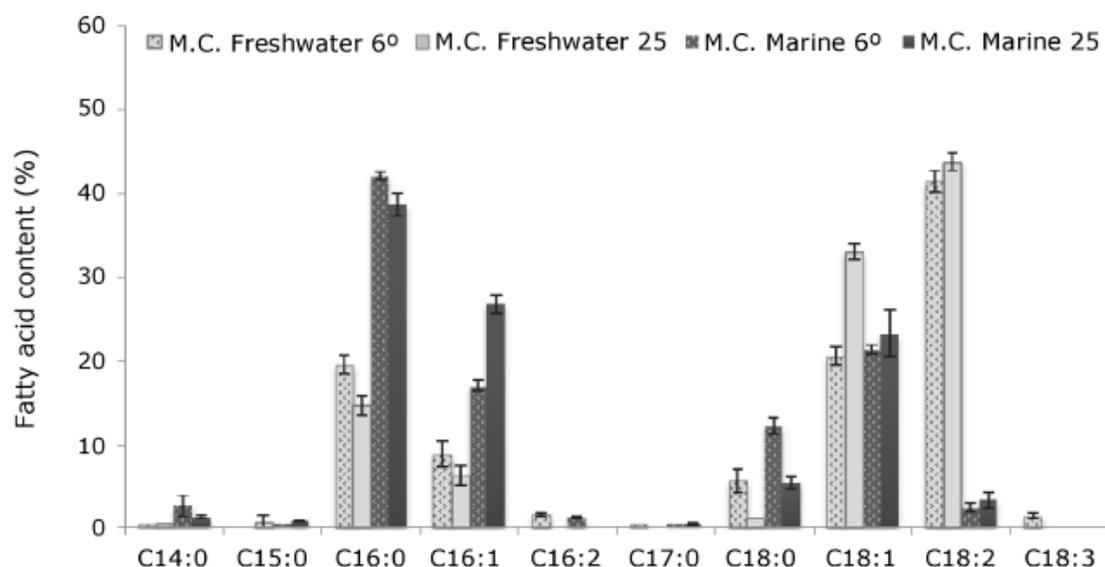
Fatty acid at normal pH

Figure 3. Fatty acid content in the *E. nigrum* biomass cultured at pH 7, in freshwater and seawater media at temperatures of 6 and 25°C (± s.d.) / Contenido de ácidos grasos en la biomasa de *E. nigrum* cultivado a pH 7, en medio con agua dulce y agua de mar, a temperaturas de 6 y 25°C (± d.e.)



Fatty acid at basic pH

Figure 4. Fatty acid content of *E. nigrum* biomass cultured with pH 10 in freshwater and seawater media at temperatures of 6 and 25°C (± s.d.) / Contenido de ácidos grasos en la biomasa de *E. nigrum* cultivado a pH 10, en medio con agua dulce y agua de mar, a temperaturas de 6 y 25°C (± d.e.)



Fatty acid at acidic pH

Figure 5. Fatty acid content of *E. nigrum* biomass cultured with pH 4 in freshwater and seawater media at temperatures of 6 and 25°C (\pm s.d.) / Contenido de ácidos grasos en la biomasa de *E. nigrum* cultivado a pH 4, en medio con agua dulce y agua de mar, a temperaturas de 6 y 25°C (\pm d.e.)

seawater medium. Additionally, the proportion of molecules was less for C18:2, with percentages of only 2 and 3% at low and high temperatures respectively (Fig. 5). The differences observed in the production of fatty acid cultures with freshwater and seawater mediums to acidic pH, was statistically significant, differences that would be given by the ratio of fatty acids C18:2 ($P = 0.012$, d.f.= 1 and C16:0, $P = 0.0016$, d.f.= 1).

The fatty acids C14:0, C15:0, C17:0 and C18:3 were present in low percentages (0.16 to 3.69%). C15:0 was found in percentages between 0.16 and 0.73%, only at 25°C in both salinities and pH, and was also found at 6°C only in culture seawater medium and in low proportion. Unsaturated fatty acid C16:2 was detected in slightly higher proportions (which ranged between 1.25 and 4.4%) at pH 10 in both temperatures. However, at pH 7 and pH 4 it was only detected at 4°C. Thus, the proportion of this fatty acid is significantly different depending on the temperatures ($P < 0.01$, d.f.= 2). C14:0 was found under all conditions of cultivation in trace amounts. C16:2 was only observed in low percentages from 0.16 to 2.65%. C17:0 was also found in trace amounts (0.16 to 1.5%) under all culture conditions except freshwater pH 7 at 6°C, freshwater pH 4 at 25°C and

seawater medium pH 10 at 6°C. Finally, C18:3 was found in freshwater pH 10 at both 6 and 25°C (3.15 and 3.69%), in freshwater pH 4 at 6°C (1.41%) and seawater pH 10 at 6°C (1.39%) (Figs. 3, 4 and 5).

The graphical representation of the proportions of fatty acids in the 12 culture media (*i.e.*, salinity, temperature and pH) of *E. nigrum*, show that in general the proportion of unsaturated fatty acids was greater ($F_{(8,97)} = 0.007$) (Tukey's *a posteriori* $P > 0.05$) with percentages between 67 to 83%. The exception was observed in 2 seawater media at pH 4 (Fig. 6). *E. nigrum* cultivated at two temperatures 6 and 25°C, did not present significant differences in the total percentages of saturated and unsaturated fatty acids ($F_{(6,1)} = 0.124$) (Tukey's *a posteriori* $P > 0.05$).

The *E. nigrum* cultures, in both freshwater and seawater medium, show to contain as main sterols 9(11)-dehydroergosterol and ergosterol, both characteristic components of the fungi, as well as the content of 8 other minor sterols (Table 1, Fig. 7). The strain showed significant differences in the quantity of sterols, depending on the salinity of the culture medium, sterols

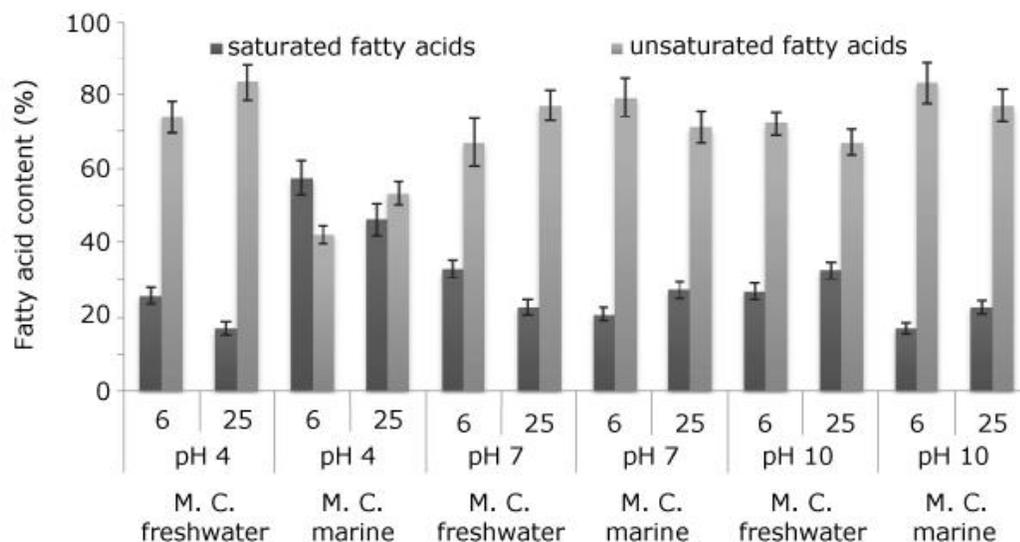


Figure 6. Graphical representation of the proportions of saturated and unsaturated fatty acids of *E. nigrum* biomass cultured at different salinity, pH and temperature (\pm s.d.) / Representación gráfica de la proporción de ácidos grasos saturados e insaturados en la biomasa *E. nigrum* cultivado a diferentes salinidades, pH y temperatura (\pm d.e.)

Table 1. Percentages of extracted sterols from the biomass of *E. nigrum* cultivated in culture media at different salinity, pH and temperature / Porcentajes de esteroides extraídos desde la biomasa de *E. nigrum* cultivados en medios de cultivo con diferentes salinidad, pH y temperatura

Culture Mediums	T (°C)	Percentages of sterols (Fig. 7)										
		a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	
pH 4	M. C. freshwater	6	100	N.D.								
		25	18.1	65.1	2.4	1	3.8	2.2	2.6	4	N.D.	N.D.
	M. C. seawater	6	38.8	N.D.	61.2							
		25	N.D.									
pH 7	M. C. freshwater	6	56.9	43.1	N.D.							
		25	100	N.D.								
	M. C. seawater	6	65.5	34.5	N.D.							
		25	100	N.D.								
pH 10	M. C. freshwater	6	43.7	37.3	7.9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	11.1
		25	32.8	52.1	5.3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	9.8
	M. C. seawater	6	100	N.D.								
		25	100	N.D.								

in freshwater culture medium being more diverse *i.e.*, 8 different types of sterols were detected, as opposed to what was observed in the seawater medium, where only up to 3 different types of sterols were observed ($F_{(10,66)} = 0.01$, $P > 0.05$). Similarly, the pH generated significant differences in the content and diversity of the sterols ($F_{(01,77)} = 0.016$, $P > 0.05$).

In freshwater, normal pH at 25°C, the presence of the sterols 9(11)-dehydroergosterol (57%) and ergosterol (43%) were principally detected. This proportion was repeated in the seawater cultures with normal pH at 25°C, with a slight proportional increase of 9(11)-dehydroergosterol. After lowering temperature (6°C) in the cultures with both salinities, 9(11)-dehydroergosterol was only detected (Table 1).

At the basic pH (pH 10) no differences were observed between the cultures at the different temperatures (6 and 25°C), however, differences were observed between the cultures prepared in freshwater and seawater medium. In freshwater medium, at both temperatures the sterols observed were: 9(11)-dehydroergosterol; ergosterol; ergosta-5,7,22-trien-3-ol, acetate (3 β ,22E) and pregn-1,4,6-triene-3,20-dione,6,16-dimethyl. The 9(11)-dehydroergosterol remains predominant at 25°C and the ergosterol is predominant at 6°C. In contrast, in seawater medium at the same pH, in the cultures at 6 and 25°C, only 9(11)-dehydroergosterol (Table 1) was detected.

In the biomass cultivated at pH acidic (pH 4), a different behavior in the proportion of sterols in relation to the change in temperature and salinity was observed. In seawater at 6°C no sterols were detected, and at 25°C the presence of 39% of 9(11)-dehydroergosterol and 61% of the stigmast-4-en-3-one were detected. The latter not detected in any other culture medium. In freshwater at 6°C only the 9(11)-dehydroergosterol was detected, in contrast to 25°C the proportions of sterols was different with ergosterol (65%) predominating, followed by proportions of 9(11)-dehydroergosterol and in smaller amounts ergosta-5,7,22-trien-3-ol,acetate (3 β ,22E). In addition, other sterols undetected the previous cultures were found, such as: anthiaergostan-5,7,9,16,22-penten; 3 β ,5-cyclo-5 β -ergosta-6,8(14),22t-triene; neoergosterol; (3 β ,22E) ergosta-7,22-dien-3-ol and ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one (Table 1).

In the *E. nigrum* cultures the temperature was the determining factor in the production of sterols. Significant differences were observed at higher temperature ($F_{(02,23)} = 0.007$ $P > 0.05$), where the following were detected: anthiaergostan-5,7,9,16,22-penten; 3 β ,5-Cyclo-5 β -

ergosta-6,8(14), 22t-triene; neoergosterol; (3 β ,22E) ergosta-7,22-dien-3-ol, and ergosta-4,6,8(14), 22-tetraen-3-one and stigmast-4-en-3-one (Fig. 7).

DISCUSSION

In the present study, we observed variations in the composition of fatty acids and sterols of *E. nigrum* biomass cultivated under different conditions of salinity, temperature and pH. *E. nigrum* was shown to grow under the different conditions to which it was exposed, demonstrating adequate cell function (Fig. 2). In this study, the most abundant fatty acids were 16:0, 16:1, 18:0, 18:1 and 18:2 which represent approximately 88% of the total fatty acid content. These results are similar to the findings by Stahl & Klug (1996), who determined that the aforementioned fatty acids were the most common and abundant, constituting 95% of the total after analyzing 100 strains of filamentous fungi, including Oomycetes, Zygomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes and Mycelium Esterilia. He also found a higher proportion of linoleic acid (18:2), followed by oleic acid (C18:1), with both of these unsaturated fatty acids accounting for approximately 54% of the total amount of fatty acids when normal conditions were used. However, we observed that after changing the culture conditions, the growth and development of *E. nigrum* was significantly altered, resulting in a modified fatty acid composition, which has not been previously reported.

The different culture treatments showed that the proportion of unsaturated fatty acids was significantly greater than saturated (Fig. 6), with percentages ranging between 67 to 83%, except in the seawater medium with pH 4, in which the proportion of saturated fatty acids corresponded to 57% at low temperature (6°C) and 47% at high temperature (25°C). This is explained by the condition of stress to maintain the osmotic conditions of the cell. Experimentally, it was observed that cultures in acid medium showed a reduced mycelial growth. This variation is attributable to increased synthesis of saturated fatty acids (*i.e.*, 16C:0 and 18C:0) that increase the rigidity of the cell membrane and make it less fluid, in order to maintain proper cell function during conditions of stress (Lösel 1990).

With respect to salinity, biomass cultured in fresh and sea water had significant differences in the content of fatty acids C16:0; C18:2; C18:3. Therefore, it is possible to assume that a single species of fungus can produce different fatty acids depending on the salinity of the

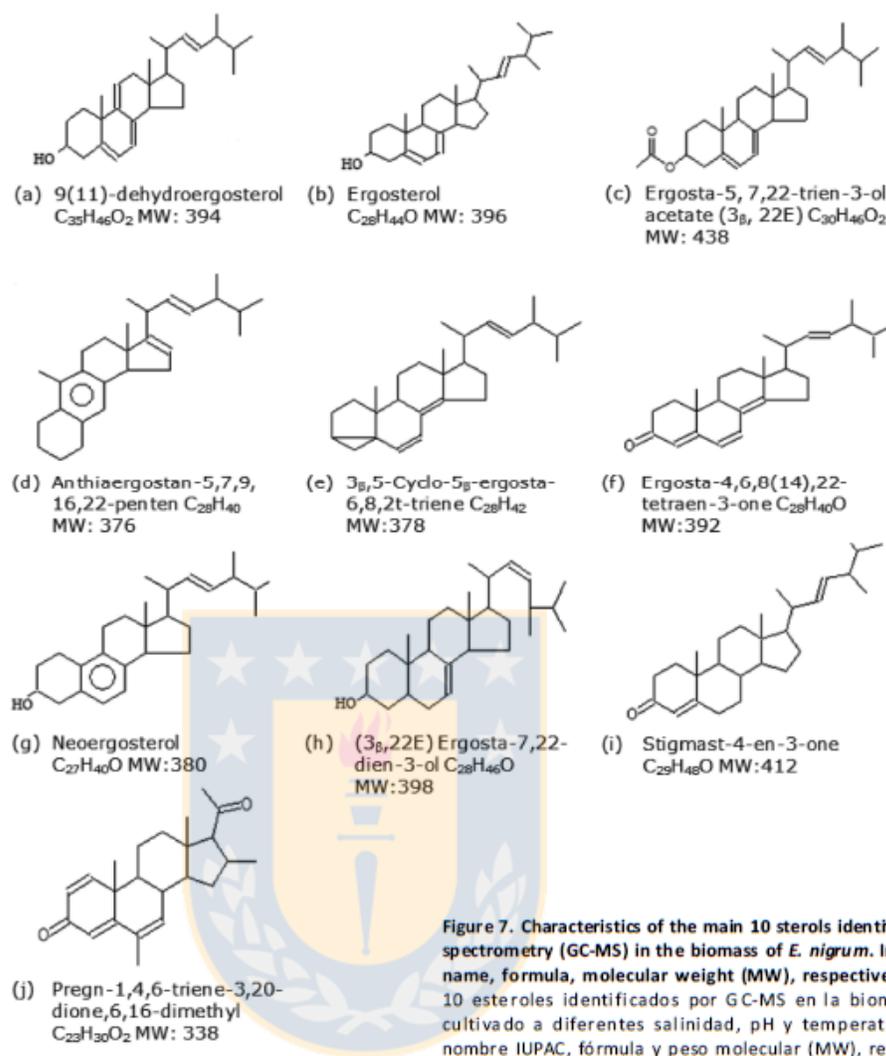


Figure 7. Characteristics of the main 10 sterols identified by GC-Mass spectrometry (GC-MS) in the biomass of *E. nigrum*. Indicated: IUPAC name, formula, molecular weight (MW), respectively / Principales 10 esteroides identificados por GC-MS en la biomasa *E. nigrum* cultivada a diferentes salinidad, pH y temperatura. Se indica: nombre IUPAC, fórmula y peso molecular (MW), respectivamente

medium, based on the adaptability to change its cell membrane. These results are consistent with the arguments raised by Swan & Watson (1997) in relation to the response of filamentous fungi to changes in the salinity of the medium, and to what was proposed by Turk *et al.* (2004) for halotolerance yeasts. In both cases, an increase in salinity to of medium involves an enrichment in C18:2. These alterations in the composition of fatty acids allow the plasma membrane to maintain its fluidity in a broad range of salinities, which is essential for normal cell function, since the physical properties of the lipid matrix of the membrane depends on the

composition of the fatty acids involved (Quinn 1981, Mysyakina *et al.* 2012). These studies were conducted under normal pH conditions in which a noticeable increase in C18:2 was observed in relation to the increase in salinity. However, increasing or decreasing the pH dramatically resulted in a decrease of C18:2 and an increase in C16:0 and C16:1, which does not coincide with work performed with yeast halotolerants in relation to an increase in the salinity (Hosono 1992) and leaves open questions pertaining to the metabolic response of these microorganisms under extreme changes in the pH of the medium.

In relation to pH, this variable has a significant effect on the composition of the fatty acids differences that were found in C16:0, C16:1, C18:2; C18:3. Therefore, in the same species of fungus, different fatty acids could be produced in response to environmental stress generated by a change in pH levels (Figs. 3, 4 and 5). A different response was obtained when the fatty acids increased for C16:0 and C16:1, and the decline of C18:2, in the cultures grown at pH 4. This may be related to alterations in the composition of the cell membrane that allows it to maintain a normal and stable cell function in culture medium conditions (Hazel & Williams 1990). Another explanation raised by Rolling (2003) where changes can occur in the enzymatic synthesis of filamentous fungi, is through the regulation of gene expression (gen *pac1*, among others) of these enzymes via variations in extracellular pH.

Authors have documented that temperature has a direct effect on the composition of fatty acids, with the majority of fungi showing increases in the synthesis of unsaturated molecules at low temperatures (Mysyakina *et al.* 2012). In this study no significant differences were observed between saturated and unsaturated fatty acids from the analysis of the total percentage of these molecules in the cultures of *E. nigrum* conducted at 6°C and 25°C. However, the temperature was a determining factor in the production of sterols since significant differences were observed at a higher temperature, noting the presence of sterols: anthiaergostan-5,7,9,16,22-penten; 3 β ,5-cyclo-5 β -ergosta-6,8(14),22t-triene; neoergosterol; (3 β ,22E) ergosta-7,22-dien-3-ol, ergosta-4,6,8(14), 22-tetraen-3-one and stigmast-4-en-3-one (Table 1). This is important when it is required to produce a special type of sterol.

In relation to the steroidal composition, according to Parks (1978) the content of sterols in fungi depends on cultivation conditions. It was observed that the strain *E. nigrum* presented significant differences in the amount of sterols depending on the salinity of the culture medium. Sterols were the most diverse in freshwater, where 10 different types of sterols were detected in contrast to what was observed in the seawater medium where up to 3 different types of sterols were observed (Table 1).

Similarly, the pH generated significant differences in both the content and diversity of sterols (Table 2). This concurs with the arguments raised by Horvath *et al.* (1998), who proposed that the microorganisms would be capable of osmoregulation by modifying the structure of their cell membrane by altering the sterol composition.

The conditions of slower growth of mycelia of the *E. nigrum* strain was determined by the acidic pH, which in addition to the diversity of sterols observed in cultures of acid medium it could also be a protective function. These changes in the composition of sterols in the membrane allow for maintaining the high fluidity of the plasma membrane in a wide range of environmental stressors, which is essential for the normal functions of the cell (Hazel & Williams 1990).

It can be concluded that the strain of *E. nigrum* isolated from the Patagonian fjords is an appropriate model of research in the analysis of the fluctuations of the steroid and lipid synthesis resulting from the changes produced by the different culture conditions; considering this study as a starting point to understand the adaptive response of fungi that survive appropriately to continuous environmental changes in transition zones between terrestrial and marine environments.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the financial support of the FONDECYT Project N°1120924; the first author was supported by a CONICYT/PCHA Scholarship for Master's Degree studies, the Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo of the University of Concepción and the C16F 10-15 CONA Project.

LITERATURE CITED

- Abdel-Lateff A, KM Fisch, AD Wright & GM König. 2003.** A new antioxidant isobenzo furanone derivative from the algicolous marine fungus *Epicoccum* sp. *Planta Medica* 69: 831-834.
- Armstrong W, EJ Wright, S Lythe & TJ Gaynard. 1985.** Plant zonation and the effects of the spring-neap tidal cycle on soil aeration in a Humber saltmarsh. *Journal of Ecology* 73: 323-339.
- Bowman SM & SJ Free. 2006.** The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays* 28: 799-808.
- Butin H & HL Peredo. 1986.** Hongos parásitos en coníferas de América del sur con especial referencia a Chile, 100 pp. Biblioteca Mycologica, J. Cramer, Concepción.
- Drummond AJ, B Ashton, S Burton, M Cheung, A Cooper, J Heled, R Moir, S Stones-Havas, S Sturrock & T Thierer. 2011.** Geneious v5.4. Biomatters, Auckland. <<http://www.geneious.com/>>
- Fávaro LC, FL de Melo, CI Aguilar-Vildoso & WL Araújo. 2011.** Polyphasic analysis of intraspecific diversity in *Epicoccum nigrum* warrants reclassification into separate species. *PLoS ONE* 6: e14828, <doi:10.1371/journal.pone.0014828>

- Gunde-Cimerman N, J Ramos & A Plemenitaš. 2009.** Halotolerant and halophilic fungi. *Mycological Research* 113: 1231-1241.
- Hai-Hong S, M Wen-Jun, J Jie-Ying, X Jia-Chao, L Hong-Yan, C Yin, Q Xiao-Hui, C Yan-Li, X Jian, Z Chun-Qi, H Yu-Jiao & Y Yu-Pin. 2011.** Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by the marine fungus *Epicoccum nigrum* JJY-40 and their antioxidant activities. *Journal of Marine Biotechnology* 13: 1048-1055.
- Hazel JR & EE Williams. 1990.** The role of alterations in membrane lipid-composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical-environment. *Progress in Lipid Research* 29(3): 167-227.
- Horvath I, A Glatz, V Varvasovszki, Z Torok, T Pali, G Balogh, E Kovacs, L Nadasdi, S Benko, F Joo & L Vigh. 1998.** Membrane physical state controls the signaling mechanism of the heat shock response in *Synechocystis* PCC 6803: identification of hsp17 as a 'fluidity gene'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 3513-3518.
- Hosono K. 1992.** Effect of salt stress on lipid composition and membrane fluidity of the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Journal of General Microbiology* 138: 91-96.
- Kapteyn JC, H Van den Ende & FM Klis. 1999.** The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochimica et Biophysica Acta* 1426: 373-383.
- Kavanagh K. 2011.** *Fungi: Biology and applications*, 366 pp. John Wiley & Sons, Chichester.
- Kohlmeyer J. 1974.** Higher Fungi as parasites and symbionts of algae. *Veröffentlichungen des Instituts für Meeresforschung in Bremerhaven, Suppl. 5*: 339-356.
- Larran S, C Rollán, H Bruno, H Alippi & M Urrutia. 2002.** Endophytic fungi in healthy soybean leaves. *Investigación Agraria, España* 17: 173-178.
- Lee NH, JB Gloer & DT Wicklow. 2007.** Isolation of chromanone and isobenzofuran derivatives from a fungicolous isolate of *Epicoccum purpurascens*. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 28: 877-879.
- Lösel DM. 1990.** Lipids in the structure and function of fungal membranes. In: Kuhn PJ, APJ Trinci, MJ Jung, MW Goosey & LG Copping (eds). *Biochemistry of the cell walls and membranes in fungi*, pp. 119-133. Springer-Verlag, Berlin.
- Mager WH & M Siderius. 2002.** Novel insights into the osmotic stress response of yeast. *FEMS Yeast Research* 2: 251-257.
- Mims CW & EA Richardson. 2005.** Ultrastructure of sporodochium and conidium development in the anamorphic fungus *Epicoccum nigrum*. *Canadian Journal of Botany* 83: 1354-1363.
- Mysyakina IS & NS Funtikova. 2007.** The role of sterols in morphogenetic processes and dimorphism in Fungi. *Microbiology* 76: 1-13.
- Mysyakina IS, YE Sergeeva, AA Ivashchkin & EP Feofilova. 2012.** Lipid composition of the mycelium of the fungus *Mucor hiemalis* cultivated with trehalose, triacylglycerols, and itraconazole. *Microbiology* 81: 669-675.
- Parks LW. 1978.** Metabolism of sterols in yeast. *Critical Reviews in Microbiology* 6: 300-341.
- Pitt J & A Hocking. 2009.** *Fungi and food spoilage. Primary keys and miscellaneous Fungi*. Chapter 5: 88-89. Springer Dordrecht Heidelberg, London.
- Quinn PJ. 1981.** The fluidity of cell membranes and its regulation. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 38: 1-104.
- Rolling JA. 2003.** The *Sclerotinia sclerotiorum pac1* gene is required for sclerotial development and virulence. *Molecular Plant-microbe Interactions* 16: 785-795.
- Schoch CL, KA Seifert, S Huhndorf, V Robert, JL Spouge, CA Levesque, W Chen & Fungal Barcoding Consortium. 2012.** Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America* 109: 6241-6246.
- Silva N & D Guzmán. 2006.** Condiciones oceanográficas físicas y químicas, entre boca del Guafo y fiordo Aysén (Crucero Cimar 7 Fiordos). *Ciencia y Tecnología del Mar* 29: 25-44.
- Silva N, C Vargas & R Prego. 2011.** Land-ocean distribution of allochthonous organic matter in surface sediments of the Chiloé and Aysén interior seas (Chilean Northern Patagonia). *Continental Shelf Research* 31: 330-339.
- Stahl P & M Klug. 1996.** Characterization and differentiation of filamentous Fungi based on fatty acid composition. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 4136-4146.
- Swan T & K Watson. 1997.** Membrane fatty acids composition and membrane fluidity as parameters of stress tolerance in yeast. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 70-77.
- Tedersoo L, T Suvi, T Jairus & H Kõljalg. 2009.** Forest microsite effects on community composition of ectomycorrhizal fungi on seedlings of *Picea abies* and *Betula pendula*. *Environmental Microbiology* 10: 1189-1201.
- Turk M, L Méjanelle, M Šentjurc, JO Grimalt, N Gunde-Cimerman & A Plemenitaš. 2004.** Salt-induced changes in lipid composition and membrane fluidity of halophilic yeast-like melanized fungi. *Extremophiles* 8: 53-61.
- Vilgalys R & M Hester. 1990.** Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172: 4239-4246.

Webster J & R Weber. 2007. Introduction to Fungi, 841 pp. Cambridge University Press, Cambridge.

White TJ, T Bruns, S Lee & J Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, DH Gelfand, JJ Sninsky & TJ White (eds). PCR protocols: A guide to methods and applications, pp. 315-322. Academic Press, New York.

Zavrel M, S Hoot & T White. 2013. Comparison of sterol import under aerobic and anaerobic conditions in three fungal species, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryotic Cell 12: 725-738.

Received 21 November 2013 and accepted 11 June 2014

Editor: Claudia Bustos D.



4.5- Capítulo 5. Respuesta morfológica a salinidad, temperatura y pH por el hongo marino *Epicoccum nigrum*

Ramón Ahumada-Rudolph, Vanessa Novoa, Anny Rudolph, Miguel Martínez, José Becerra

Resumen

Epicoccum nigrum (Cepa LQRA39-P) se aisló a partir de sedimentos recolectados en fiordos de la Patagonia Chilena y se identificó utilizando microscopía y técnicas moleculares. Analizamos las respuestas adaptativas de la morfología de la pared celular a la salinidad, la temperatura y el pH, con el fin de explicar la capacidad de *E. nigrum* para co-habitar en ambos ambientes *i.e.* marinos y de agua dulce. Para este propósito, *E. nigrum* se cultivó en una serie de medios de cultivo (YMG) con las variaciones en la salinidad (agua dulce y salada), pH (ácido, neutro y básico), y la temperatura (5 - 25 °C). Los cambios se observaron a través de microscopía electrónica de transmisión. Se observó una correlación directa entre el aumento de la salinidad y engrosamiento de la pared celular ($> 0,2 \mu\text{m}$), junto con una relación importante entre el pH y la presencia de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) en el exterior de la pared celular. Se concluyó que el hongo *E. nigrum* en condiciones de agua dulce, produce cambios morfológicos podrían confirmar, que requiere respuestas adaptativas para co-habitar ambientes marino, dulceacuícolas y sustratos terrestres

Keywords: Hongo Marino, ecología, extremófilos, metabolismo, Sustancias poliméricas extracelulares (EPS).

Nota: Manuscrito enviado a la revista Mycoscience.

Manuscript Number:

Title: Morphological response to salinity, temperature and pH changes by marine fungus *Epicoccum nigrum*

Article Type: Full Paper

Corresponding Author: Dr. José Becerra, Dr.

Corresponding Author's Institution: Universidad de Concepción

First Author: Ramón Esteban Ahumada-Rudolph, M.Sc

Order of Authors: Ramón Esteban Ahumada-Rudolph, M.Sc; Vanessa Novoa, Dr.; Miguel Martínez, Dr.; José Becerra, Dr.

Abstract: *Epicoccum nigrum* (strain LQRA39-P) was isolated from sediments collected in Chilean Patagonian fjords using microscopy and molecular techniques. We analyze adaptive responses of cell wall morphology to salinity, temperature, and pH, in order to explain the ability of *E. nigrum* to co-inhabit both marine and freshwater environments. For this purpose, *E. nigrum* was cultured in a series of media with variations in salinity (freshwater and seawater), pH (acid, neutral, and basic), and temperature (5 to 25°C). Changes were observed through transmission electron microscopy. A direct correlation between salinity increase and cell wall thickening (> 0.2 μm) was observed, along with an important relation between pH and the presence of extracellular polymeric substances (EPS) on the outside of the cell wall. Observed morphological changes could confirm that a ubiquitous fungus such as *E. nigrum* requires adaptive responses to co-inhabit freshwater, marine and terrestrial substrates.

Suggested Reviewers:

Full Paper

Morphological response to salinity, temperature and pH changes by marine fungus

Epicoccum nigrum

Ramón Ahumada-Rudolph^{1,2,5}, Vanessa Novoa^{2,5}, Anny Rudolph³, Miguel Martínez⁴, José Becerra¹

¹ Laboratorio de Química de Productos Naturales, Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas. Víctor Lamas 1290, PO Box 160-C. Universidad de Concepción, Chile. e-mail: jbecerra@udec.cl Phone number: +56412204302

² Departamento de Geografía, Facultad de Arquitectura, Urbanismo y Geografía. Víctor Lamas 1290, PO Box 160-C. Universidad de Concepción, Chile.

³ Facultad de Ciencias, Universidad Católica de la Santísima Concepción, Alonso de Ribera 2850 PO Box 297, Concepción, Chile

⁴ Laboratorio de Microbiología Básica y Bioremediación, Facultad de Ciencias Biológicas. Víctor Lamas 1290, PO Box 160-C. Universidad de Concepción, Chile.

⁵ Estudiantes de Doctorado en Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias Ambientales. Víctor Lamas 1290, PO Box 160-C. Universidad de Concepción, Chile.

16 text pages and 9 figures

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
--

ABSTRACT

Epicoccum nigrum (strain LQRA39-P) was isolated from sediments collected in Chilean Patagonian fjords using microscopy and molecular techniques. We analyze adaptive responses of cell wall morphology to salinity, temperature, and pH, in order to explain the ability of *E. nigrum* to co-inhabit both marine and freshwater environments. For this purpose, *E. nigrum* was cultured in a series of media with variations in salinity (freshwater and seawater), pH (acid, neutral, and basic), and temperature (5 to 25°C). Changes were observed through transmission electron microscopy. A direct correlation between salinity increase and cell wall thickening ($> 0.2 \mu\text{m}$) was observed, along with an important relation between pH and the presence of extracellular polymeric substances (EPS) on the outside of the cell wall. Observed morphological changes could confirm that a ubiquitous fungus such as *E. nigrum* requires adaptive responses to co-inhabit freshwater, marine and terrestrial substrates.

Keywords: Fungal ecology, extremophile fungi, metabolism, extracellular polymeric substance (EPS), cell wall.



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63

1. Introduction

Chilean Patagonian fjords are environmentally extreme areas with geographical isolation. An important amount of their organic matter is delivered by the surrounding Humid Temperate Forest. Due to low human intervention, a wide variety of microorganisms such as fungi is found in the water column and sediments (Ahumada-Rudolph et al. 2016).

Knowledge about fungi in marine ecosystems is limited. Study of the molecular diversity of the micro-eukaryotic community has shown that fungi occupy a central position in a large number of marine habitats (Manohar and Raghukumar 2013). Fungi have the ability to adapt to different physicochemical and environmental plasticity conditions, allowing them to colonize different habitats. Therefore, they are considered to have an important biochemical potential and ability to degrade highly refractory organic compounds (Bugni and Ireland 2004; Harms et al. 2011; Ahumada-Rudolph et al. 2016).

It has been suggested that transition zones between terrestrial and marine environments host numerous fungal species with deep branching that have not yet been classified, which would reflect an old transition from marine to terrestrial environments, and vice versa (Le Calvez et al. 2009). Recent estimations regarding molecular diversity have shown that fungi inhabit an important ecological niche in the marine environment (Richards et al. 2012). There is increasing evidence to show the active participation of fungi in marine habitats and in biogeochemical processes (Edgcomb et al. 2011).

Aimed at increasing the knowledge of marine fungi, this study focuses on the LQRA39-P strain, which was isolated from sediment samples of Patagonian fjords (44°39'42''S- 73°30'06''W). The strain was identified as *Epicoccum nigrum* using molecular microscopy techniques (Ahumada-Rudolph et al. 2014).

Biogeographical records of *E. nigrum* show a wide distribution. In Latin America, it has been described in Peru, Puerto Rico, Ecuador, Colombia and Chile (Fávaro et al. 2011). The substrates that it colonizes are quite diverse. *E. nigrum* has been found in terrestrial environments, inhabiting soil and plant tissue, feeding on crops (as saprobes) or parasitizing them, e.g., soybean (Pitt and Hocking 2009), as well as degrading conifer wood in the south of Chile (Butin and Peredo 1986) and were isolated

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64

from organs of *F. crenata* in Japan (Hosoya et al. 2010; Tatenoa et al. 2015). In marine environments it has been isolated from sponges (Hai-Hong et al. 2011), algae of the genus *Fucus* and sea plants such as *Spartina* (Abdel-Lateff et al. 2003).

The microorganisms that co-inhabit both freshwater and saline environments require several adaptations (Masuma et al. 2001; Hohmann 2002). Several yeasts have been studied, in particular the *Hortaea werneckii* organism (Gunde-Cimerman et al. 2000, 2009). Regarding yeasts, a growth morphology with changes in cell wall structure and pigmentation has been described (Kogej et al. 2006). Schmid et al. (2006) describes the cell wall of *E. nigrum* as composed of ¹⁴C-epiglucan linked to secondary residues of (1 → 6)-β-glucosyl, which would simultaneously integrate along the glucan chain (De Groot et al. 2005).

This study analyzes adaptive responses of the cell wall morphology of *E. nigrum* to salinity (freshwater and marine), pH (acid, neutral, and basic), and temperature (5 to 25°C) variations in order to explain the ubiquitous ability of *E. nigrum* to co-inhabit freshwater and marine environments.

2. Materials and methods

2.1. Sediment collection and strain Isolation

The marine strain *Epicoccum nigrum* (GenBank[®] accession number: KC164754) (Ahumada-Rudolph et al. 2014), was isolated from sediment (93% clay, 3-5% total organic matter) collected from Patagonian fjords region of the Moraleda Channel. The sampling point corresponds to station 39 C12-F (44°39'42''S - 73°30'06''O) at a depth of 300 m (Fig. 1). Surface samples were collected from 3 cm using a box corer and stored at -18°C.

The strain was isolated from 10 g of sediment, which was diluted in 20 mL sterile distilled water and left to decant for 15 min to eliminate the excess particulate material. The supernatant was subsequently diluted 1:10 with sterilized seawater, an aliquot of 100 μL was transferred to agar YMG seawater media with streptomycin (200 mg L⁻¹) and spread over the surface using a sterile glass rod. Growth of fungal colonies was evaluated after 5 days of growth at room temperature, and pure strains were obtained from these agar plates (Ahumada-Rudolph et al. 2014).

2.2. Strain identification

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
--

In order to validate the morphological identification of *E. nigrum* strain (Pitt & Hocking 2009), we amplified the ITS (which included 5.8S gene) and the nuclear ribosomal large subunit rRNA (LSU) regions using ITS-5/Lr6 (Tedersoo et al. 2009). DNA was extracted from fruit bodies using the E.Z.N.A. fungal DNA MiniKit (Omega-Biotek). PCR reactions were performed using ITS5 (5'-ggaagtaaaagtcgtaacaagg-3') as forward primer and LR06 (5'-cgccagtctgcttacc-3') as reverse primer. Each reaction was conducted in a 15 µl volume containing 30-50 ng of DNA, 1X of PCR buffer, 2 mM MgCl₂, 0.1 µM of each dNTP, 0.5 µM of forward and reverse primers, and 1 U of Taq DNA polymerase. PCR amplification was carried out with an initial denaturation of 4 min at 94°C, and then 35 cycles of 30 s at 94°C, 60 s at 50°C and 60 s at 72°C s, followed by a final step of 5 min at 72°C. PCR product was sequenced in both senses by Macrogen (Seoul, Korea).

Forward and reverse sequences were edited using Genious v5.4 software (Drummond et al. 2011). The sequence of *E. nigrum* strain was analyzed with BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)¹ to determine the percentage of maximal identity with the sequences of that global database. The sequence obtained in the present study was deposited in GeneBank. Finally, the strain of *E. nigrum* was deposited in the fungus strain bank at the Universidad de Concepción in the Natural Product Chemistry Laboratory.

2.3. Series of cultures to salinity, temperature and pH changes.

A series of cultures in YMG medium (yeast, malt and glucose) was developed, containing 6 to 14 pH units, prepared using freshwater and filtered sea water, with 3 replicates for each (n=54). It was not possible to work with pH between 1 to 5 since the agar did not gel.

Strain cultures were put in a set of 24 flasks with 125 ml of YMG medium. The conditions were: sterile distilled water (pH 4, 7 and 10) and sterile filtered seawater (pH 4, 7 and 10). The pH in both distilled water and seawater media was modified with HCl acid and NaOH alkaline. Incubation was carried out at 5° and 25°C under constant agitation at 120 rpm for 21 days until the glucose was consumed. Cultures were then filtered and the mycelium was washed 3 times in order to remove all traces of the culture medium.

¹<<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>

1 Mycelia (n = 24) were fixed in glutaraldehyde at 4 %. The morphological analysis was
2 carried out through transmission electron microscopy using the embedding technique
3 on Araldite (Durcupan Acm). Multiple cross and longitudinal sections were observed
4 and 102 images were selected. The analyzed variables were: a) cell wall thickness and
5 b) rough or smooth cell wall appearance. Cell wall thickness was then classified as
6 follows: > 0.2 μm for thick cell walls and < 0.2 μm for thin cell walls.
7
8
9

10 11 12 2.4. Statistical analysis

13 The Shapiro-Wilk test was used to verify normality of the data and Cochran's test for
14 homogeneity of variances. The effect of culture conditions, *i.e.* salinity (freshwater and
15 seawater); pH (pH 4, pH 7 and pH 10) and temperature (5° and 25°C), was compared
16 using the parametric test of One-Way ANOVA where the response variable on the cell
17 wall is thickness and presence of extracellular polymeric substances (EPS). All
18 statistical calculations were performed using the software package STATISTICA
19 version 6.0 (StatSoft Inc.2005).
20
21
22
23
24
25
26

27 3. Results

28 3.1. General Characteristics

29 *E. nigrum* in solid culture medium, under normal YMG conditions at pH 6 - 7, in both
30 freshwater and marine media, presented a mycelium without formation of asci or spores
31 (Fig. 2. a, b, c and d). However, at basic pH (pH > 8), in both freshwater and marine
32 media, spores were observed as black spots over a reddish-yellow mycelium. This
33 condition was confirmed by optical microscopy and scanning electron microscopy (Fig.
34 2 e and f).
35
36
37
38
39
40
41

42 3.2. Thin and thick characteristic of the cell wall.

43 Longitudinal and cross sections of hyphae of the *E. nigrum* showed differences in cell
44 wall thickness depending on the salinity of the culture, *i.e.* freshwater and marine
45 media. Nonetheless, no significant differences were noted in regard to pH (4, 7 and 10),
46 temperature (5° and 25 °C) ($p > 0.05$) according to the Tukey's a posteriori test.
47 Transmission electron microscopy images of the *E. nigrum*'s hypha presenting thin cell
48 wall < 0.2 μm (a, b and c) and thick cell wall > 0.2 μm (d, e and f) (Fig 3).
49
50
51
52
53

54 Figure 4 summarizes thin and thick cell wall characteristics depending on the culture
55 medium conditions (*i.e.* temperature, pH and salinity). In freshwater, a greater
56 percentage of cells presented thin walls (*i.e.* 80 %), unlike in saline medium where a
57 greater percentage of cells showed thick walls (*i.e.* 88 %). Only at basic pH (pH 10) and
58
59
60
61
62

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63

at 5 °C, both in freshwater and marine media, some hyphae with double cell wall (Fig. 3 e) were identified, which was counted as thick wall (Fig. 4).

3.3. Rough and smooth characteristic of the cell wall.

Longitudinal and cross sections of hyphae of the *E. nigrum* showed differences in the cell wall, due to the presence of extracellular polymeric substances (EPS). Consequently, cell walls with presence of EPS (Fig. 5 a, b and c) were classified as rough cell walls and those with no EPS (Fig. 5 d, e and f) were classified as smooth cell walls.

Culture conditions used for the fungus, *i.e.* culture medium (freshwater and seawater); temperature (5° and 25°C); and pH (pH 4, acid; pH 6 - 7, neutral; and pH 10, basic) according to the classification between rough or smooth showed significant differences ($p = 0.03$; $P < 0.05$ ANOVA). Significant differences were also observed in the Tukey's a posteriori test regarding pH ($P < 0.05$).

Figure 6 summarizes the results of the series of cultures, regarding rough or smooth characteristics of the cell wall.

At acid pH (pH 4) and freshwater at 5 °C the *E. nigrum* cultures presented only rough cells, and at 25 °C only smooth cells. In seawater at same pH (pH 4) and at both temperatures only smooth cell walls were observed (Fig. 6).

Figure 7 shows images of longitudinal sections of hyphae cultured at acid pH in marine and freshwater media at 5 ° and 25 °C. Differences are observed in smooth cell walls (a, b and c) and rough cell walls with EPS (e).

At neutral pH (pH = 7), both in freshwater and seawater culture media, 100 % of rough cell walls was observed. Nevertheless, in seawater medium at 25 °C the fungus showed only 70 % of rough cell walls (Fig. 6).

Figure 8 shows images of cross and longitudinal sections of hyphae in marine and freshwater media, at neutral pH and 5 ° and 25 °C. All cell walls present EPS (a, b, c and d).

At basic pH (pH 10), temperature was an important factor. In freshwater at 25°C, only rough cell walls were observed. In contrast, in seawater at 5 °C, 50 % of cells presented rough walls (Fig. 6).

Figure 9 shows images of sections of hyphae at basic pH in marine and freshwater media, at 5 ° and 25 °C. Differences between smooth cells (a) and rough cells with EPS (b, c and e) are observed.

4. Discussion

The *E. nigrum* strain used for this study was obtained from sediments collected in an area of the Fjords from the south of Chile (Fig.1), where the physicochemical conditions are variable and dynamic, as they depend on the terrestrial environment (temperate rainforest), weather conditions (rainy) and the action of tides. Therefore, it is a major challenge to understand the fungal adaptive mechanisms that enable them to adapt to these changes.

4.1. Regarding cell wall thickness.

In the series of cultures, a direct relationship between salinity and cell wall thickness was observed. (Fig. 3). In freshwater 80 % of cells presented thin walls (< 2 μm) and in seawater medium 88 % presented thick cell walls (> 2 μm). Neither the pH variable (*i.e.* 4, 7 and 10) nor the temperature variable (5 ° and 25 °C) showed significant differences (Fig. 4).

A similar behavior was observed by Kralj-Kunčič et al. (2010) when analyzing the salinity effect on the cell wall for the following species; *W. Ichthyophaga*, *W. Muriae* and *W. sebi*, in culture media with 15 and 25 % of NaCl, *i.e.* at low salinity, cell walls were thinner, whereas at greater salinity they were thicker. In addition, Kelavakar et al. (1993) when working with *Aspergillus repens*, a halotolerant species in a medium with 12 % of NaCl, observed significant differences in the thickness of the mycelium, its branches and septa. In the genus *Trimmatostroma*, isolated from marine habitats, salinity changes cause an increase in cell thickness as well as increasing concentrations of melanins (Kogej et al. 2006).

The *Epicoccum* cell wall structure is composed of ¹⁴C-epiglucan linked to secondary (1 → 6)- β -linked glucosyl (Schmid et al. 2006), which would simultaneously integrate along the glucan chain, and would allow considerable stretching to the fungus in response to changes in the osmotic pressure (de Groot et al. 2005). However, the mechanisms involved in wall thickening have not yet been described.

Nilsson and Adler (1990) propose in fungi that the increase of ions in the medium could be mitigated *in vivo* with a rising in glycoproteins production, a higher degree of polysaccharides branching, an increase of the β -1, 3-glucan (Lesage and Bussey 2006), the incorporation of proteins in the cell wall, as a result of modified glucan synthesis (Smits et al. 2001), or greater levels of chitin (Lesage and Bussey 2006, Pessoni et al. 2005). In the plasma membrane of *E. nigrum* a change in the fatty

1 acids and sterols content was observed in response to salinity variations (Ahumada-
2 Rudolph et al. 2014).

3
4 *4.2.Regarding the cell wall rough or smooth characteristic.*
5
6

7 The pH in the series of culture media showed significant responses ($p < 0.05$) regarding
8 the presence of EPS in hyphae (Fig. 5). There was a greater presence of EPS in neutral
9 and basic media (Fig. 6). At pH 7 100 % of the sections of hyphae cultured in
10 freshwater presented rough cell walls. In contrast, at pH 4, 100 % of the sections of
11 hyphae cultured in seawater presented smooth walls (Fig. 6). These observations are
12 important given the fact that the reactions, in the interstitial water of the sediments, take
13 place at microsystem level (Libes 2009).
14
15
16
17
18
19
20

21 The rough appearance provided to the cell wall by the granules located in the
22 outer wall could match to the results for the cell walls of the following species: *W.*
23 *Ichthyophaga*, *W. Muriae* and *W. sebi* by Kralj-Kunčič et al. (2010). Where it postulates
24 a clearly visible fibrous layer that was wide and well defined and composed of EPS.
25 The EPS would probably decrease the cell wall permeability by reducing the pores sizes
26 (Kogej et al. 2007).
27
28
29
30
31

32 The results of this study show that the observed morphological changes in cell
33 wall thickness and rough or smooth appearance of the outer cell wall, due to the
34 presence of extracellular polymeric substances, would confirm that a ubiquitous fungus
35 such as the *E. nigrum* requires adaptive responses in order to co-inhabit both terrestrial
36 and marines environments, which represents an advantage for this type of fungi.
37
38
39
40
41
42

43 **Acknowledgments**

44 We thank financial support of the “CONICYT + PAI Concurso Nacional Tesis de
45 Doctorado en la Industria, Convocatoria 2013 + Folio 783110001” and the project
46 partner Blumar Salmones S.A.; and the Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo of
47 the University of Concepción. The authors would like to express their gratitude to Mr.
48 Estay and Alarcón the Laboratory Transmission electron microscopy (TEM) and
49 researchers Dr. Reinoso and Cajas for his contribution to the study of fungus.
50
51
52
53
54
55
56

57 **REFERENCES**
58
59
60
61
62
63

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62

Abdel-Lateff A, Fisch KM, Wright AD, König GM, 2003. A new antioxidant isobenzofuranone derivative from the algicolous marine fungus *Epicoccum sp.* *Planta Medica* 69:831–834.

Ahumada-Rudolph R, Cajas-Madriaga D, Rudolph A, Reinoso R, Torres C, Silva M, Becerra J, 2014. Variation of sterols and fatty acids as an adaptive response to changes in temperature, salinity and pH of a marine fungus *Epicoccum nigrum* isolated from the Patagonian Fjords. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 49(2): 293-305.

Ahumada-Rudolph R, Novoa V, Sáez K, Martínez M, Rudolph A, Torres-Diaz C, Becerra J, 2016. Marine fungi isolated from Chilean fjord sediments can degrade oxytetracycline. *Environmental Monitoring and Assessment*. DOI:10.1007/s10661-016-5475-0

Bugni TS, Ireland CM, 2004. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Journal of Natural Products* 21:143–63

Butin H, Peredo HL, 1986. *Hongos parásitos en coníferas de América del Sur con especial referencia a Chile*. Biblioteca mycologica. J. Cramer. Concepción, Chile.

De Groot PW, Ram AF, Klis FM, 2005. Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal Genetics and Biology* 42: 657-675.

Drummond AJ, Ashton B, Burton S, Cheung S, Cooper A, Heled J, Moir J, Stones-Havas S, Sturrock S, Thierer T, 2011. Geneious v5.4. Biomatters, Auckland. <<http://www.geneious.com/>>.

Gunde-Cimerman N, Zalar P, de Hoog S, Plemenitaš A, 2000. Hypersaline waters in salterns: natural ecological niches for halophytic black yeasts. *FEMS Microbiology Ecology* 32:235-240.

Gunde-Cimerman N, Ramos J, Plemenitaš A, 2009. Halotolerant and halophilic fungi. *Mycological Research* 113:1231–1241.

Edgcomb VP, Beaudoin D, Gast R, Biddle JF, Teske A, 2011. Marine subsurface eukaryotes: the fungal majority. *Environmental Microbiology* 13:172–183.

Fávaro LC, de Melo FL, Aguilar-Vildoso CI, Araújo WL, 2011. Polyphasic analysis of intraspecific diversity in *Epicoccum nigrum* warrants reclassification into separate species. *PLoS ONE* 6: e14828. doi:10.1371/journal.pone.0014828.

Harms H, Schlosser D, Wick LY, 2011. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nature Reviews Microbiology* 9: 177-191.

1 Hai-Hong S, Wen-Jun M, Jie-Ying J, Jia-Chao X, Hong-Yan L, Yin C, Xiao-Hui Q,
2 Yan-Li C, Jian X, Chun-Qi Z, Yu-Jiao H, Yu-Pin Y, 2011. Structural characterization of
3 extracellular polysaccharides produced by the marine fungus *Epicoccum nigrum* JJY-40
4 and their antioxidant activities. *Marine Biotechnology* 13:1048–1055.
5
6 Hohmann S, 2002. Osmotic adaptation in yeast: control of the yeast osmolyte system.
7 *International Review of Cytology* 215:149-187.
8
9 Hosoya T, Hirose D, Fujisaki M, Osono T, Kubono T, Tokumasu S, Kakishima M,
10 2010. Internal transcribed spacer haplotype diversity and their geographical distribution
11 in *Dasyscyphella longistipitata* (Hyaloscyphaceae, Helotiales) occurring on *Fagus*
12 *crenata* cupules in Japan. *Mycoscience*, 51:116–122.
13
14 Kelavakar U, Rao KS, Chhatpar HS, 1993. Sodium chloride stress induced
15 morphological and ultrastructural changes in *Aspergillus repens*. *Indian Journal of*
16 *Experimental Biology* 31: 511-515.
17
18 Kogej T, Gorbushina AA, Gunde-Cimerman N, 2006. Hypersaline conditions induce
19 changes in cell-wall melanization and colony structure in a halophilic and a xerophilic
20 black yeast species of the genus *Trimmatostroma*. *Mycological Research* 110: 713-724.
21
22 Kogej T, Stein M, Volkmann M, Gorbushina AA, Galinski EA, Gunde-Cimerman N,
23 2007. Osmotic adaptation of the halophilic fungus *Hortaea werneckii*: Role of
24 osmolytes and melanisation. *Microbiology* 153: 4261–4273.
25
26 Kralj-Kunčič M, Kogej T, Drobne D, Gunde-Cimerman N, 2010. Morphological
27 Response of the Halophilic Fungal Genus *Wallemia* to High Salinity. *Applied and*
28 *Environmental Microbiology* 76(1): 329–337.
29
30 Le Calvez T, Burgaud G, Mahé S, Barbier G, Vandenkoornhuysen P, 2009. Fungal
31 diversity in deep-sea hydrothermal ecosystems. *Applied and Environmental*
32 *Microbiology* 75: 6415–6421.
33
34 Lesage G, Bussey H, 2006. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*.
35 *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70:317-343
36
37 Libes S, 2009. *Introduction to Marine Biogeochemistry, 2nd edn*. Academic Press
38 Elsevier. New York, USA.
39
40 Manohar CS, Raghukumar C, 2013. Fungal diversity from various marine habitats
41 deduced through culture-independent studies. *FEMS Microbiology Letters* 341: 69–78.
42
43 Masuma R, Yamaguchi Y, Noumi M, Omura S, Namikoshi M, 2001. Effect of sea
44 water concentration on hyphal growth and antimicrobial metabolite production in
45 marine fungi. *Mycoscience*. 42(5): 455-459
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63

- 1
2
3
4 Nilsson A, Adler L, 1990. Purification and characterisation of glycerol-3-phosphate
5 dehydrogenase (NADp) in the salt tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Biochimica et*
6 *Biophysica Acta* 1034: 180–185.
- 7
8 Pessoni RA, Freshour G, Figueiredo-Ribeiro RC, Hanh MG, Braga MR, 2005. Cell-
9 wall structure and composition of *Penicillium janczewskii* as affected by inulin.
10 *Mycologia* 97: 304-311.
- 11
12 Pitt J, Hocking A, 2009. Fungi and Food Spoilage, In: Pitt J, Hocking A (eds), *Primary*
13 *Keys and Miscellaneous Fungi*, 3rd edn. Springer Dordrecht Heidelberg, London, pp
14 88-89.
- 15
16 Richards TA, Jones MD, Leonard G, Bass D, 2012. Marine fungi: Their ecology and
17 molecular diversity. *Annual Review of Marine Science* 4: 495-522.
- 18
19 Schmid F, Stone B, Brownlee RT, McDougall BM, Seviour RJ, 2006. Structure and
20 assembly of epiglucan, the extracellular (1→3;1→6)-β-glucan produced by the fungus
21 *Epicoccum nigrum* strain F19. *Carbohydrate Research* 341: 365–373.
- 22
23 Smits GJ, van den Ende H, Klis FM, 2001. Differential regulation of cell wall
24 biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology*. 147: 781-794.
- 25
26 Tatenoa O, Hiroseb D, Osonoc T, Takedad H, 2015. Beech cupules share endophytic
27 fungi with leaves and twigs. *Mycoscience*. 56(3):252–256.
- 28
29 Doi:10.1016/j.myc.2014.07.005
- 30
31 Tedersoo L, Suvi T, Jairus T, Kõljalg H, 2009. Forest microsite effects on community
32 composition of ectomycorrhizal fungi on seedlings of *Picea abies* and *Betula pendula*.
33 *Environmental Microbiology*. 10: 1189-1201.
- 34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45 List of Figures

- 46
47 Figure 1. Oceanographic location of the station 39 C12-F where the sediment sample
48 was collected and the *E. nigrum* strain was isolated.
- 49
50 Figure 2. Scanning electron micrographs of *E. nigrum* in a solid culture media, in
51 freshwater at pH 6-7 (a, b, c and d); and in seawater at basic pH (e) and Optics 500X (f).
- 52
53 Figure 3. Image samples of *E. nigrum* hyphae presenting thin cell wall <0.2 μm (a,b,c)
54 and thick cell wall >0.2 μm (d,e,f)
- 55
56 Figure 4. Percentage of the *E. nigrum* cells presenting thin cell walls (< 0,2 μm) and
57 thick (> 0,2 μm) under different culture media, detected through transmission electron
58 microscopy (TEM).
- 59
60
61
62
63

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63

Figure 5. Transmission electron micrographs at cross and longitudinal sections of *E. nigrum* hyphae, the outer rough wall was defined as the cells: a, b and c, and the outer smooth cells: d, e and f.

Figure 6. Percentage of cells in the *E. nigrum* fungal presenting smooth and rough cell walls (EPS) under culture media (i.e. freshwater and seawater), temperature and pH.

Figure 7. Transmission electron micrographs of longitudinal sections of *E. nigrum* hyphae at pH 4, culture media (i.e. freshwater and seawater), temperature (i.e. 5 - 25 °C). Classification; Smooth cell walls (a), (b) and (c) and rough cell walls (e)

Figure 8. Transmission electron micrographs of cross and longitudinal sections of *E. nigrum* hyphae at pH 7, culture media (i.e. freshwater and seawater), temperature (i.e. 5 - 25 °C). Classification; rough cell walls (a), (b), (c) and (e)

Figure 9. Transmission electron micrographs of cross and longitudinal sections of *E. nigrum* hyphae at pH 10, culture media (i.e. freshwater and seawater), temperature (i.e. 5 - 25 °C). Classification; Smooth cells walls (a) and rough cell walls (b), (c) and (d).



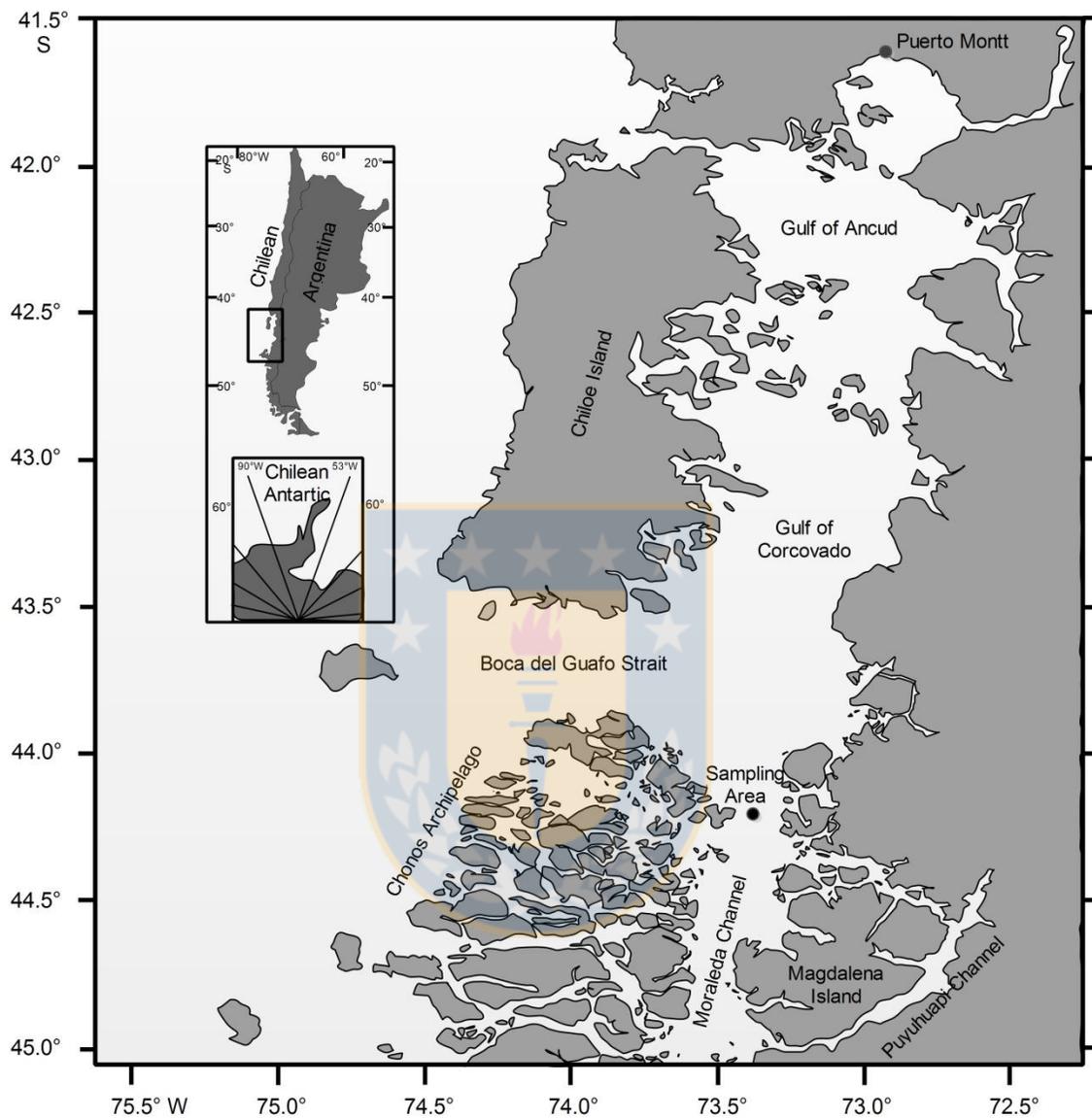


Figure 1. Oceanographic location of the station 39 C12-F where the sediment sample was collected and the *E. nigrum* strain was isolated during the CIMAR 12 Fiords oceanographic cruise.

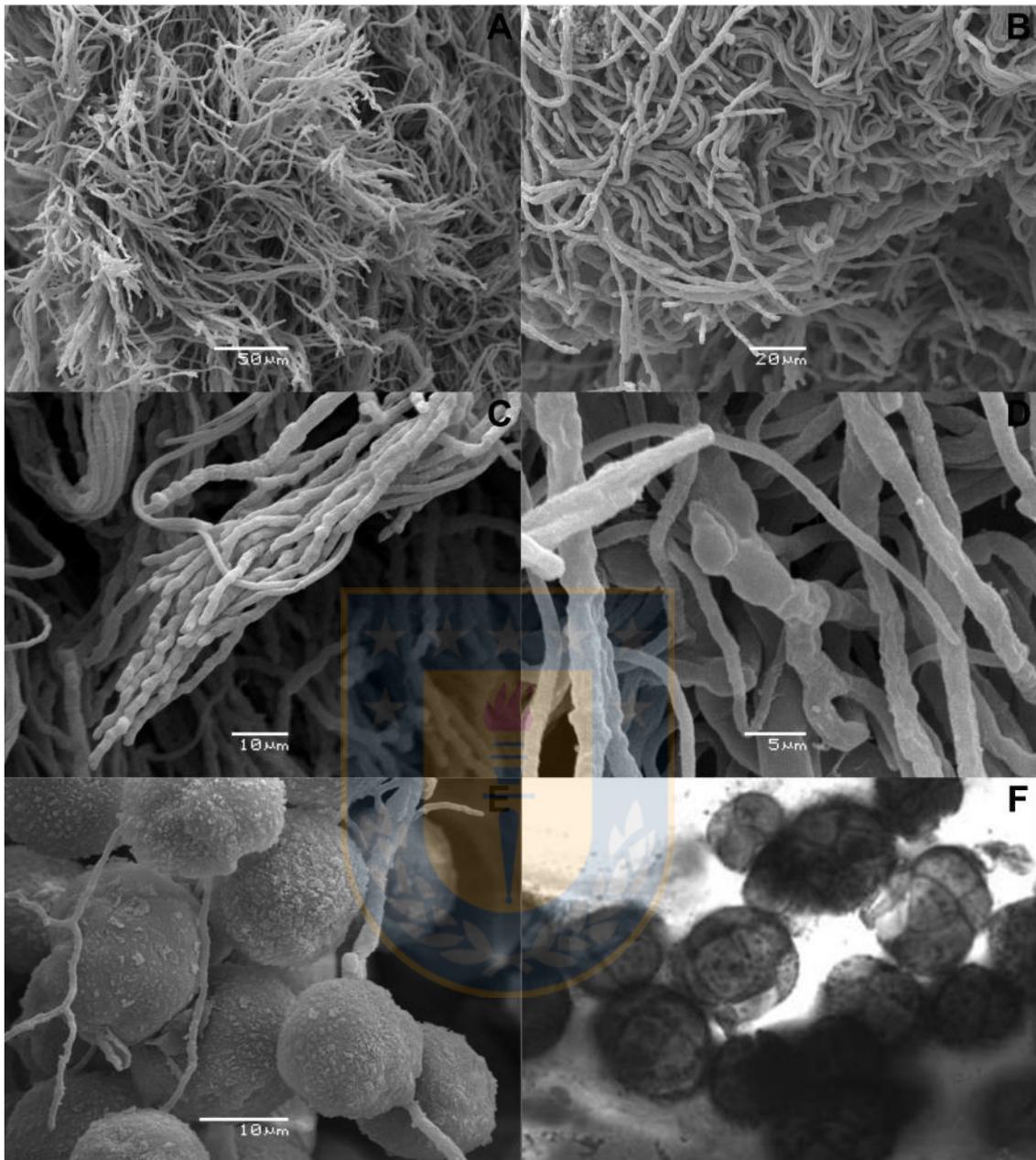


Figure 2. Scanning Electron Microscopy photographs of *E. nigrum* in a solid culture media, in freshwater at pH 6-7 (a,b,c and d); and in seawater at basic pH (>8) and Optics 500X (f).

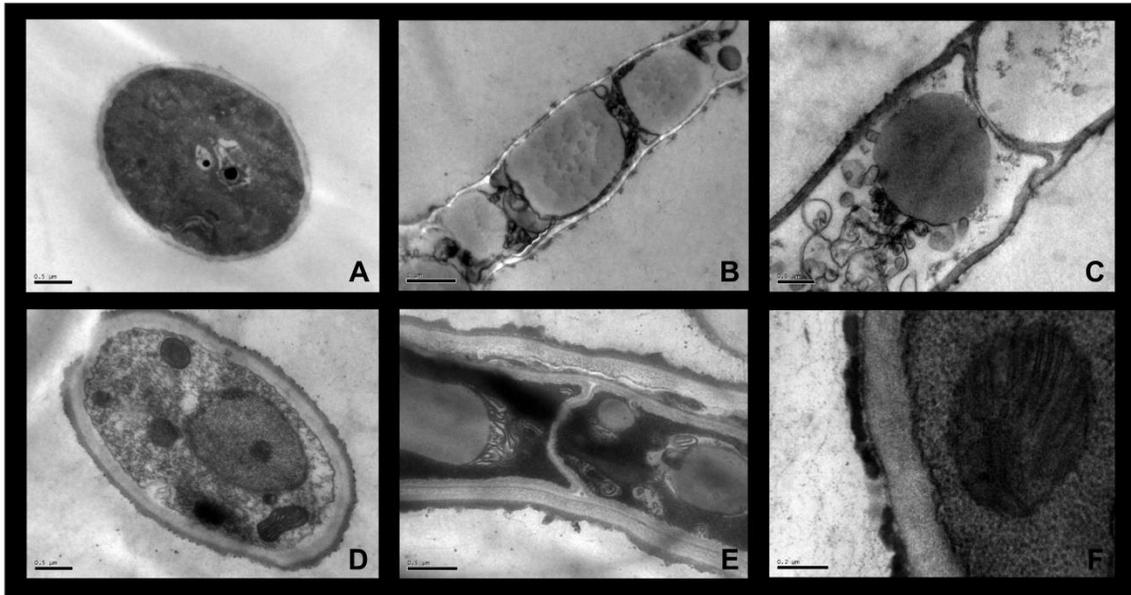


Figure 3. Image samples of *E. nigrum* hyphae presenting thin cell wall $< 0.2 \mu\text{m}$ (a,b,c) and thick cell wall $> 0.2 \mu\text{m}$ (d,e,f)

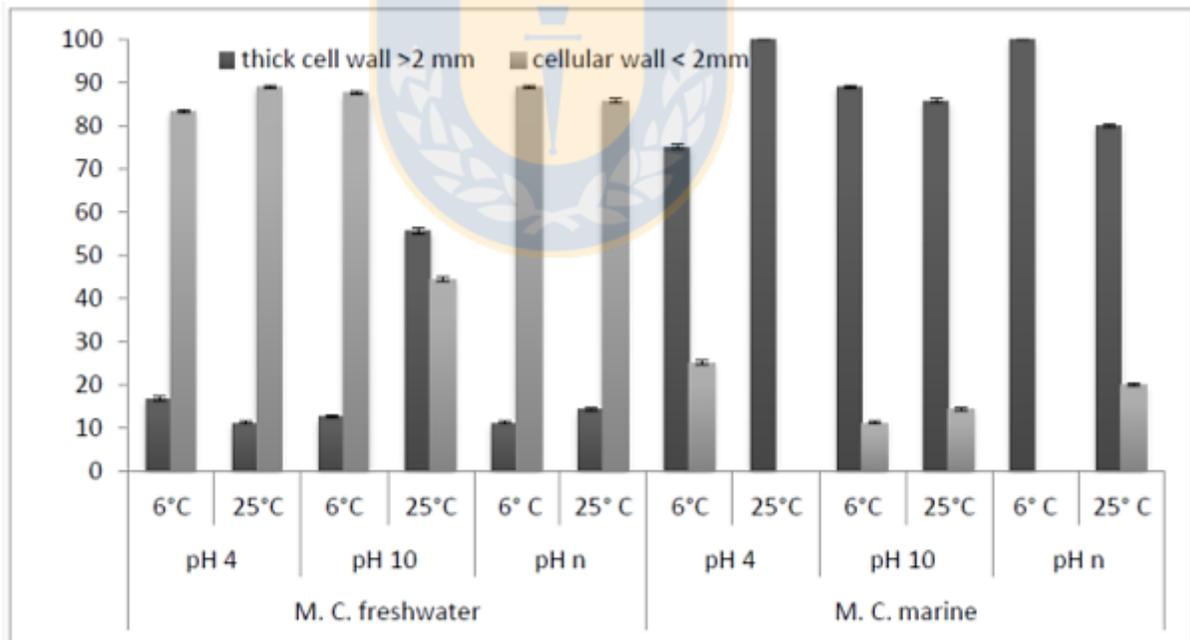


Figure 4. Percentage of the *E. nigrum* cells presenting thin cell walls ($< 0.2 \mu\text{m}$) and thick ($> 0.2 \mu\text{m}$) under different culture media, detected through transmission electron microscopy (TEM).

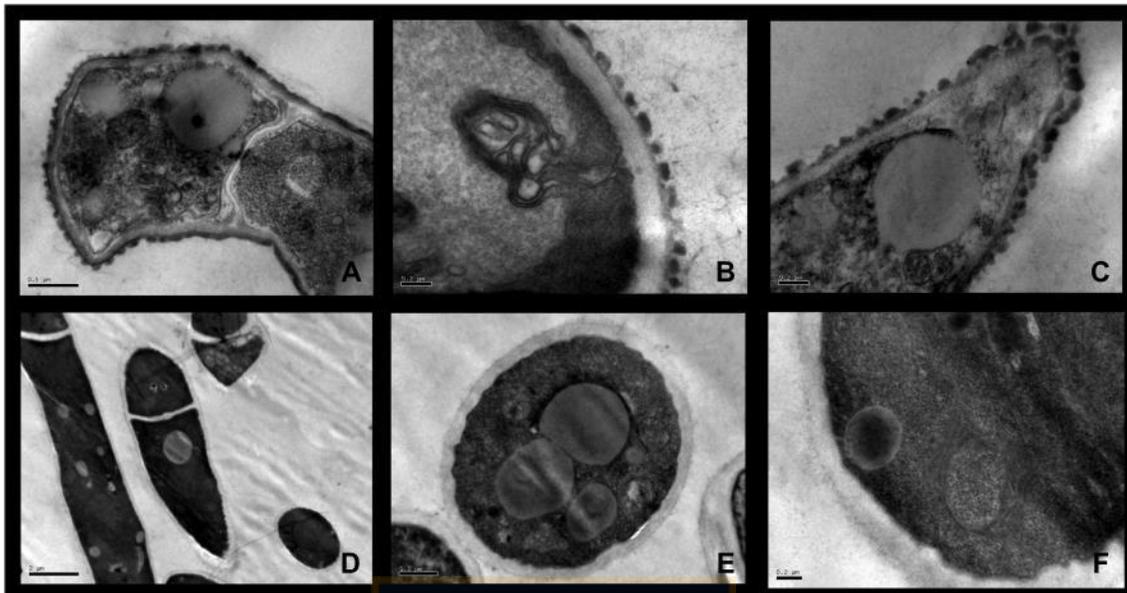


Figure 5. Transmission Electron Microscopy at cross and longitudinal sections of *E. nigrum* hyphae, the outer rough wall was defined as the cells: a, b and c, and the outer smooth cells: d, e and f.

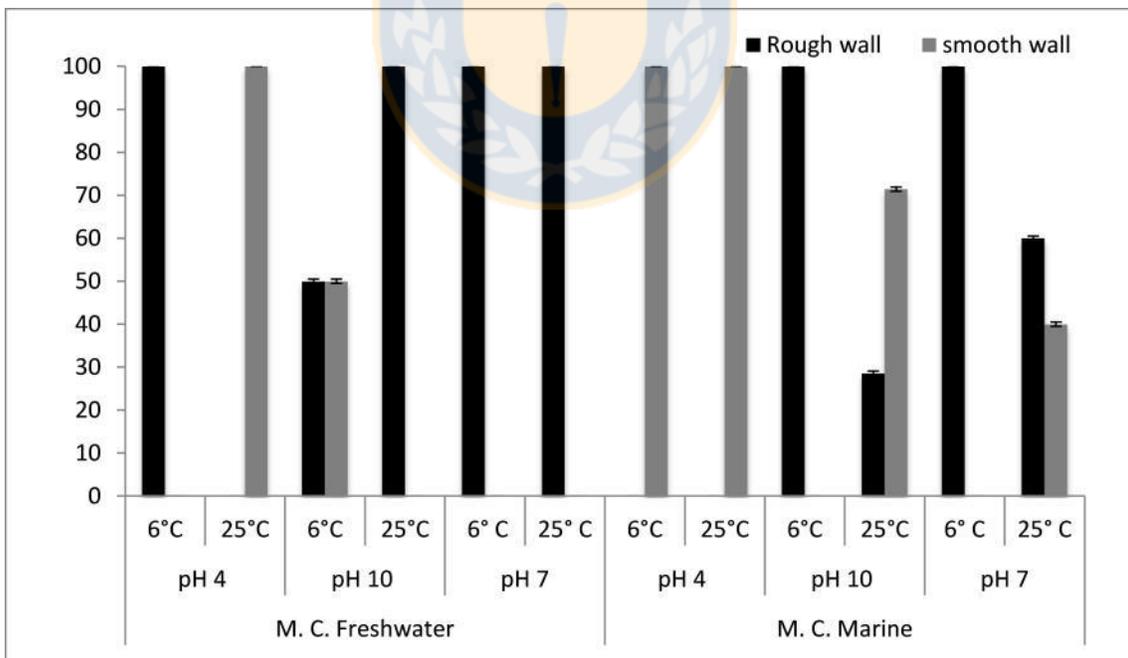


Figure 6. Percentage of cells in the *E. nigrum* fungal presenting smooth and rough cell walls (EPS) under culture media (i.e. freshwater and seawater), temperature and pH.



Figure 7. Shows longitudinal sections images of *E. nigrum* hyphae at an acid pH in a marine and freshwater media at 5-25°C. Smooth cell walls (a,b,c) and rough cell walls (e)

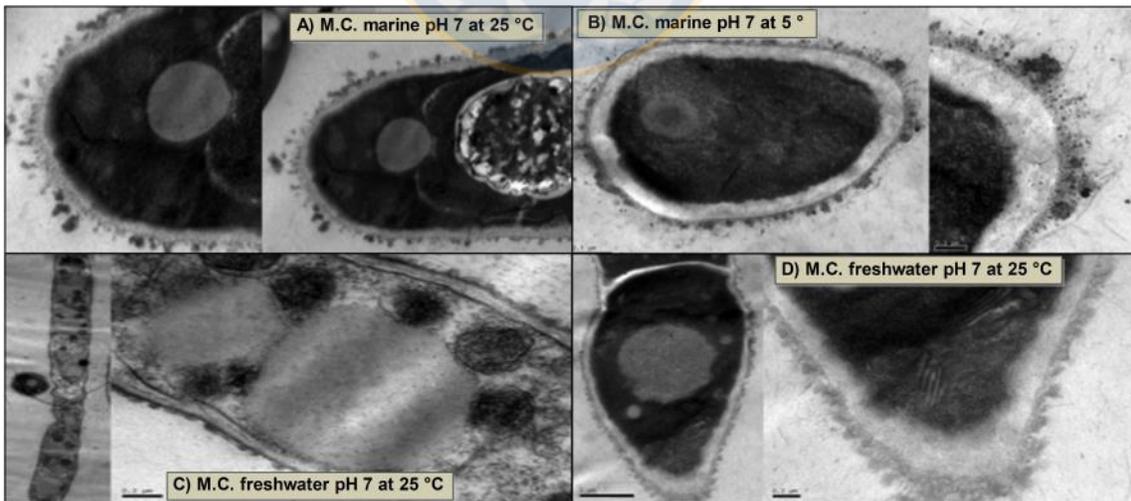


Figure 8. Shows sections of the Transmission Electron Microscopy images of cultivate hyphae at pH 7 in a marine and freshwater media, at 5 and 25°C.

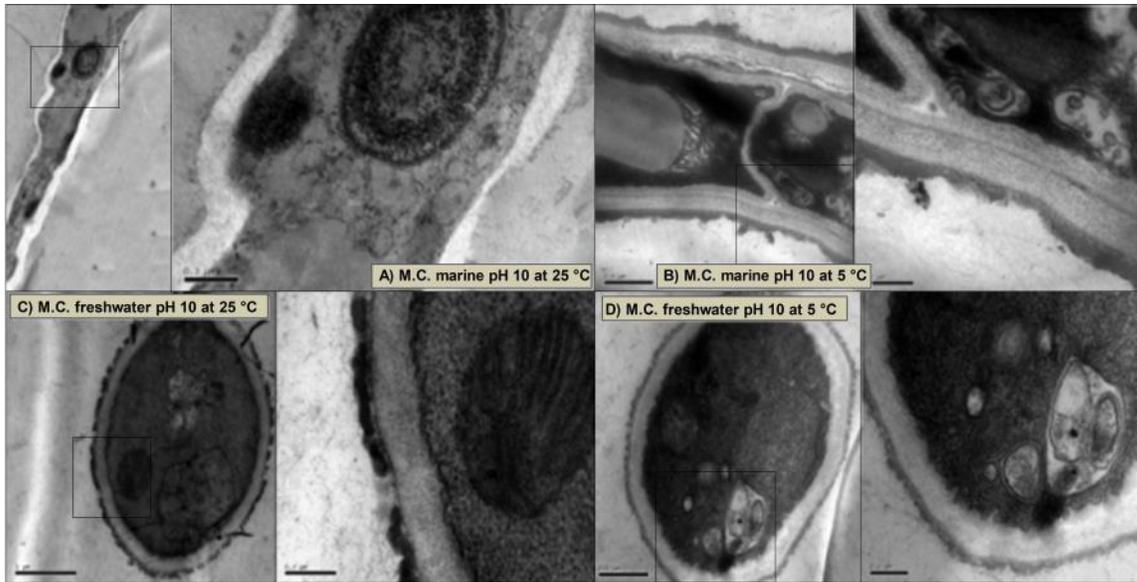


Figure 9. Transmission Electron Microscopy images of cross and longitudinal sections of *E. nigrum* hyphae at pH 10, culture media (i.e. freshwater and seawater), temperature (i.e. 5-25 °C). Smooth Cells (a) and rough (b,c,d).



5.- DISCUSIÓN GENERAL

El Estado de Chile se ha puesto como objetivo, por su condición de país ribereno, llegar a convertirse en una potencia alimentaria en productos marinos. Posee en extenso territorio desde los 19° a 56°S, con 4.337 Km de costa lineal, 83.350 Km de costa total y 200 millas náuticas de soberanía económica, con numerosos ríos, lagos y una extensa zona de fiordos y canales. Sus aguas son de extraordinaria calidad, lo que hace de este país una región con ventajas comparativas para el cultivo de truchas, salmónidos y de otras especies. A esto se suma que, en gran parte de la costa se producen eventos de surgencia de aguas profundas ricas en nutrientes, que generan una alta productividad primaria, capaz a su vez, de sustentar una alta producción de peces y mariscos.

Sin embargo, el logro de este objetivo no está exento de complejidades, ya que la mayor parte de las exportaciones tiene como destino países donde se exige una producción sustentable y además, que cuente con altos estándares sanitarios y ambientales. La FDA (Agencia de Fármacos y Alimentos de Estados Unidos), es la que regula el ingreso de salmónes frescos, congelados y/o procesados que son exportados a EEUU. El salmón chileno no contiene químicos detectables en su carne, aunque puntualmente en el 2013, se detectó en las exportaciones de una empresa la presencia del químico conocido como cristal violeta, utilizado como antifúngico, prohibido en Chile, EEUU y la UE, por lo que el control en la utilización de fármacos y el tratamiento de sus residuos, *i.e.*, antibacterianos y antifúngicos debe ser riguroso.

Las presiones internacionales exigen seguridad alimentaria y certificaciones de las exportaciones, como: ISO 22000 Sistemas de Gestión de Seguridad Alimentaria, certificación de la Iniciativa Mundial de Seguridad Alimentaria (GFSI), Estándar global BRC (British Retail Consortium) de seguridad alimentaria, FSSC 22000 (Certificación del Sistema de Seguridad Alimentaria), Global GAP (Buenas prácticas agrícolas), IFS Food (estándar internacional por características), SQF (alimentos de calidad segura) entre otros.

Respecto de la sustentabilidad de los cultivos en Chile, las concesiones marinas para la acuicultura son reguladas por el artículo 80 Bis “Ley General de Pesca y

Acuicultura” siendo el RAMA (Reglamento Ambiental para la Acuicultura) el encargado de los procesos de zonificación costera. En dicho reglamento no se especifica las cantidades máximas de fármacos, como antibióticos, a utilizar en los centros de cultivo. Para el “Manejo sanitario en una salmonicultura” se utiliza como herramienta sólo el registro de fármacos y su control en las plantas productoras de alimentos. En ambos casos, la acción y facultades de fiscalización son del SERNAPESCA (Servicio Nacional Pesca y Acuicultura) y el SAG (Servicio Agrícola y Ganadero, 2009).

En éste estudio, la mayor concentración de OTC *i.e.*, $24,1 \pm 1,03 \text{ ug g}^{-1}$ fue medida en sedimentos del entorno de balsas de cultivos (Capítulo 1). Mayor al rango de concentraciones informada para 13 centros de salmónidos *i.e.*, 0,1 y 11 ug g^{-1} (Björklund *et al.* 1991; Coyne *et al.* 1994; Kerry *et al.* 1995), pero inferior a los 285 ug g^{-1} informada por Samuelsen *et al.*, (1992). Respecto de la concentración medida en suelos agrícolas es mayor a la informada en Austria *i.e.*, $3,4 \text{ ug g}^{-1}$ (Martínez-Carballo *et al.* 2007) y en Estados Unidos *i.e.* $0,30 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ (Thiele-Bruhn & Beck 2005), información importante de considerar respecto de la concentración que pudiera estarse acumulando de OTC en centros de alevinaje de salmónidos.

Para entender esta información se debe considerar que, para la determinación de la capacidad de adsorción de compuestos orgánicos tóxicos a una matriz ambiental, se utiliza la constante de adsorción (k_d), que relaciona la concentración del compuesto en la fase de adsorción y el agua con que se encuentra en equilibrio. En sedimentos orgánicos marinos se informa una k_d para la OTC de $2.590 \text{ (L kg}^{-1}\text{)}$, superior al informado para sustratos arenosos de sistemas agrícolas *i.e.*, $670 \text{ (L kg}^{-1}\text{)}$ (WingChing-Jones 2008), lo que podría explicar las mayores concentraciones de OTC en sedimentos marinos, con altas concentraciones de materia orgánica y bajas concentraciones de oxígeno (Rudolph *et al.*, 2011), respecto de suelos agrícolas. Por otra parte, en este estudio se observó que la concentración de OTC en los sedimentos en el área de la balsa monitoreada fueron mayores en el sector Este y a mayor profundidad *i.e.*, 100 m, lo que indicaría una relación entre las corrientes, el transporte de sedimento y la concentración aplicada en el Centro de cultivo (Smith 1996) (Capítulo 1). Además, Hektoen *et al.* (1995) plantearon que a mayor profundidad de la columna de agua y mayores contenidos

de materia orgánica, el tiempo de vida media de la OTC sería mayor de 100 días, lo que estaría generando acumulación de OTC en sedimentos de mayor profundidad con mayor contenido de materia orgánica.

El esfuerzo por un manejo sustentable de las sustancias farmacológicas en los centros de cultivos chilenos pareciera no ser el adecuado, ya que se observa un aumento progresivo en el uso de fármacos. En la salmonicultura, antibióticos como la OTC y el florfenicol son administrados en conjunto con la dieta alimentaria, tanto en la fase de alevinaje en agua dulce, como en el proceso de engorda de salmones en sectores marinos. Se estima que en el 2013 se aplicó alrededor de 157 toneladas de OTC y 284 toneladas de florfenicol, siendo el 92 % de su uso justificado por la enfermedad de piscirickettsiosis (SERNAPESCA, 2014).

En este estudio, desde sedimentos cercanos a balsas de cultivo de salmónidos se aisló 38 cepas de hongos, 22 de ellas fueron identificadas y de éstas se probó que 12 presentaban capacidad para degradar el antibiótico OTC (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas de hongos aisladas e identificadas por técnicas moleculares desde sedimentos de fiordos del sur de Chile. Se indica como positivo las cepas con capacidad para degradar oxitetraciclina.

N°	Strain	Scientific Name	Code Genbank®	Degradar OTC (+)
1	RA114	<i>Trichoderma deliquescens</i>	KU214239	+
2	RA115	<i>Trichoderma harzianum</i>	KU198599	+
3	RA223A	<i>Talaromyces atrovirens</i>	KU198600	+
4	RA118	<i>Penicillium crustosum</i>	KU198601	+
5	RA101	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	KU298469	+
6	RA103	<i>Idem RA115</i>	KU214240	+
7	RA105	<i>Penicillium chrysogenum</i>	KU214239	+
8	RA117	<i>Penicillium commune</i>	KU214242	+
9	RA106	<i>Aspergillus terreus</i>	KU214241	+
10	RA129	<i>Beauveria bassiana</i>	KU198598	+
11	RA39P	<i>Epicoccum nigrum</i>	KC164754	+
12	RA2P	<i>Emericellopsis alkalina</i>	KU298468	+
13	RA107	<i>Penicillium solitum</i>	JN642222	-
14	RA108	<i>Aspergillus terreus</i>	KF723007	-
15	RA110	<i>Penicillium sp.</i>	KJ443120	-
16	RA111	<i>Hypocrea lixii</i>	HM466680	-
17	RA119	<i>Chordomyces antarcticum</i>	KJ443146	-

18	RA125	<i>Curreya pityophila</i>	JX681087	-
19	RA126	<i>Paraphaeosphaeria minitans</i>	EU754174	-
20	RA127	<i>Penicillium sp.</i>	KJ443120	-
21	RA128	<i>Eupenicillium ochrosalmoneum</i>	EF626957	-
22	RA130	<i>Beauveria sp.</i>	AY283555	-

En un primer estudio, en 18 días de exposición, seis cepas de Filum Ascomicetes, *Penicillium commune*, *Aspergillus terreus*, *Beauveria bassiana*, *Trichoderma harzianum*, *Epicoccum nigrum* y *Emericellopsis alkalina* demostraron ser capaces de degradar entre un 75 y 91,7 % de la OTC presente en el cultivo (Fig. 3, capítulo 1). Posteriormente, en 21 días de experimentación, las cepas de hongos *i.e.*, *Trichoderma deliquescens*, *Trichoderma harzianum*, *Taralomyces atroroseus*, *Penicilium crustosum* demostraron ser capaces de degradar entre 73 a un 93 % OTC y la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* de degradar un 74,2 % de la OTC presente en una solución (Fig. 4, Capítulo 2).

Además, el análisis de la concentración intracelular de oxitetraciclina en 5 hongos sometidos a una concentración de 250 mg/L, *i.e.*, *Penicillium spinulosum*, *Epicoccum nigrum*, *Penicillium solitum*, *Beauveria bassiana* y RA201 demostró un enriquecimiento intracelular en la concentración de OTC *i.e.*, 115 mg/50 mg de micelio (en tres días de experimentación), para posteriormente disminuir hasta aprox. 20 mg/50 mg de micelio en 15 días. Mientras que en el medio, la concentración de OTC disminuyó hasta 60 mg/L en el periodo en estudio. Paralelamente, no se detectó compuestos distintos de los observados en el medio control, confirmando que los hongos realizarían la degradación de OTC intracelularmente, sin la aparición de nuevos compuestos conjugados *i.e.*, sin efecto por la generación de otras sustancias contaminantes (Manuscrito en preparación, Capítulo 3).

Comprobada la capacidad de hongos marinos para degradar OTC, sin generar productos secundarios, el objetivo de estudio fue probar su capacidad para sobrevivir en diferentes condiciones del medio y de ésta forma, agregar antecedentes a tener en consideración para su implementación en sistemas de cultivos, tanto marinos como

terrestres. Para ello, se analizó el comportamiento de *E. nigrum*, una de las cepas con mayor eficiencia en la degradación de OTC *i.e.*, 91,7 % en 18 días de exposición (Fig. 3, Capítulo 1). La evaluación frente a cambios en la temperatura, pH y salinidad, demostró que *E. nigrum* fue capaz de modificar su membrana celular, respecto de sus contenidos de ácidos grasos y esteroides, como respuesta adaptativa de sobrevivencia (Capítulo 4). Además, el análisis de ultraestructura demostró que *E. nigrum* fue capaz de aumentar el grosor de su pared celular frente al aumento de la salinidad (Fig. 4, Capítulo 5) y de producir sustancias poliméricas extracelulares, esto es, disminuir la porosidad de su pared celular, frente a cambios en el pH del medio (Fig. 6, Capítulo 5).

Cabe destacar que, las mayores eficiencias en la degradación de OTC se obtuvo con hongos endémicos del Filum Ascomycota, aislados desde sitios contaminados con residuos de OTC, zona de fiordos del Sur de Chile (Tabla 1), *i.e.*, $24,1 \pm 1,03 \mu\text{g g}^{-1}$ los que fueron capaces de degradar casi completamente ($> 90 \%$ de $250 \mu\text{g L}^{-1}$ de OTC en cultivos). Esto es coherente con lo planteado por Kristanti & Hadibarata (2015) en su trabajo de bioremediación de contaminantes; y por Migliore *et al.*, (2012) quienes utilizando el hongo *Pleurotus ostreatus* probaron su capacidad para degradar oxitetraciclina en un proceso mediado por la absorción y biotransformación intracelular de OTC en el micelio.

El impacto de la aplicación de OTC en el medio, tiene directa relación con la dosis, concentración y tiempo de aplicación (Cabello 2004, 2006; Buschmann *et al.*, 2006, 2012). Su efecto abarca un amplio espectro de bacterias, desafortunadamente no sólo las patógenas. Además, se ha identificado presencia de poblaciones de bacterias resistentes a OTC en la microflora de granjas salmoneras (Cabello *et al.*, 2013), las cuales serían reservorios de bacterias portadoras de determinantes genéticos transferibles de resistencia a antibióticos, lo que constituye un riesgo para la salud (Miranda & Zemelman 2002, Heuer *et al.*, 2009, Marshall & Levy 2011).

La rápida expansión de la salmonicultura es preocupante, debido a que sólo en la región de Aysén existen alrededor de 635 concesiones (Fig. 1, Capítulo 1). Por la utilización que realizan del agua como recurso, la importancia de las comunidades biológicas y su dinámica física, los sectores costeros y cuerpos de agua, como lagos,

utilizados para cultivos son sistemas de alta fragilidad ambiental, cuestión que debe ser abordada con estudio, regulación y remediación de los insumos utilizados. Esto se suma a que, los planes de mitigación en los centros de cultivo consisten aún, en su relocalización temporal (SUBPESCA, 2015), en espera que con el transcurso del tiempo mejore la calidad de los sedimentos en las áreas intervenidas ambientalmente *i.e.*, residuos de fármacos como antibióticos, altos contenidos de materia orgánica, nutrientes, baja concentración de oxígeno disuelto, acidificación del sedimento y alteraciones ecológicas (Rudolph *et al.* 2009, 2011).

La necesidad de mitigar el efecto de la incorporación de antibióticos en el ambiente, nos incentivó a la búsqueda de organismos capaces de aumentar la velocidad de degradación de antibióticos, como la OTC. Se plantea que la velocidad de degradación de los residuos de la OTC en los sedimentos marinos es insignificante (Samuelsen *et al.* 1994) y que su vida media es función principalmente de las tasas de re-ingreso de los residuos de OTC hacia la columna de agua (Smith & Samuelsen 1996).

Del trabajo realizado se desprende que el hongo *E. nigrum* sería la cepa adecuada, para continuar con estudios que permitan el diseño de un proceso biotecnológico de remediación de los residuos de OTC en sedimentos. Algunas ventajas a destacar de los trabajos de micorremediación son que la colonización de un sustrato por otros microorganismos requiere de condiciones especiales, a diferencia de los hongos que son capaces de formar extensas redes de micelio hasta llegar a ser la biomasa dominante y de esta forma ser eficientes. Además, los hongos como degradadores, no necesitan como pre-condición el enriquecimiento del sustrato, como sucede con muchas bacterias (Maloney 2001, Magan *et al.*, 2010, Harms *et al.*, 2011), lo que hace de la micorremediación un sistema menos costoso y que requiere de menos intervención.

En la figura 1 con fines didácticos, se esquematiza el proceso de degradación intracelular del antibiótico que realizaría *E. nigrum*

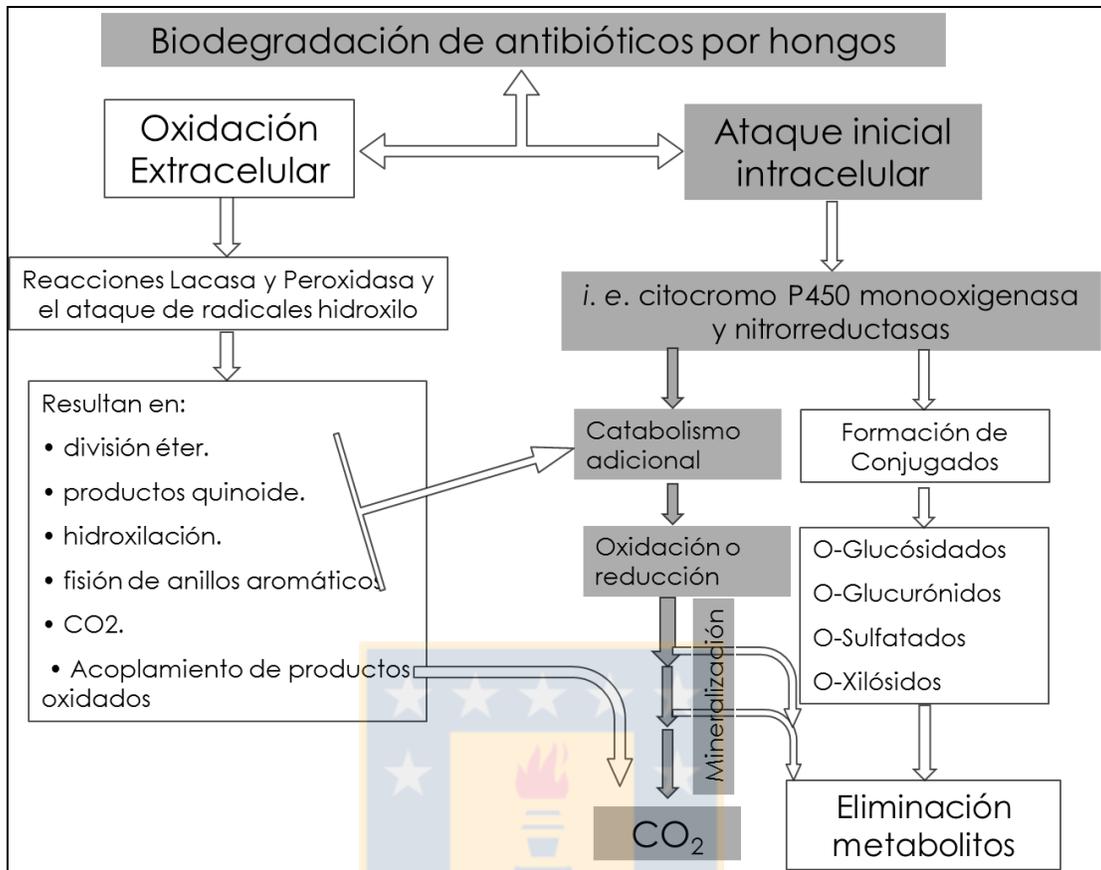


Figura 1. Ejemplificación del proceso de degradación intracelular del antibiótico. Modificado de Harm *et al.*, (2011) para este estudio.

6.- CONCLUSIONES

Los fiordos del sur de Chile por sus condiciones de aislamiento geográfico, en general presentan baja intervención antropogénica, salvo en sectores costeros en que se desarrollan actividades de cultivos, a través de sistemas de concesiones marinas. Una de las problemáticas de esta actividad es la aplicación de antibióticos, como la OTC. El estudio realizado en muestras de sedimentos recolectadas en torno a las balsas jaula permitió determinar concentraciones máximas de OTC de $24,1 \pm 1,03 \mu\text{g g}^{-1}$ de sedimento y concluir que en los sedimentos existen una alta diversidad de hongos.

Las 38 cepas aisladas desde los sedimentos correspondieron principalmente a ascomicetos, basidiomicetos y levaduras, una parte de ellos *i.e.*, 22 cepas, fueron

analizadas con herramientas moleculares y demostraron una alta capacidad para degradar OTC. La actividad degradativa observada por las cepas en estudio estuvieron en un rango entre 73 a 93 % de la OTC presente en una solución, siendo *B. bassiana*, *T. harzianun* y *E. nigrum* las que presentaron las mayores eficiencias, *i.e.*, sobre un 90 % en 18 días.

El análisis de la concentración intracelular de oxitetraciclina en 5 cepas *i.e.*, *Penicillium spinulosum*, *Epicoccum nigrum*, *Penicillium solitum*, *Beauveria bassiana* y RA201 demostraron un incremento intracelularmente en la concentración de OTC *i.e.*, 115 mg/50 mg de micelio, para posteriormente disminuir *i.e.*, 20 mg/50 mg de micelio. En el medio la concentración de OTC disminuyó desde 250 mg/L hasta 60 mg/L en el periodo en estudio, lo que permitió comprobar su eficiencia degradativa. Además, se pudo comprobar que la degradación de la molécula de OTC, no generó compuestos distintos de los observados en el medio control.

El análisis del comportamiento de *E. nigrum*, una de las cepas con mayor eficiencia para degradar OTC, frente a estresores ambientales como T°, pH y salinidad demostró ser capaz de modificar su membrana celular *i.e.*, contenido de ácidos grasos y esteroides; y a nivel de ultraestructura aumentar el grosor de su pared celular frente al aumento de la salinidad; además, de producir sustancias poliméricas extracelulares, frente a cambios en el pH y T° del medio, comprobándose su capacidad de adaptarse a condiciones de estrés.

La condición heterótrofa de *E. nigrum*, su habilidad para adaptarse a condiciones en terreno (*i.e.*, poca luz, salinidad y presencia de antibióticos), permite concluir que es el mejor candidato para continuar con estudios que permitan el diseño de un proceso biotecnológico de remediación de los residuos de OTC en sedimentos. Por lo que, se acepta la hipótesis de trabajo.

Finalmente, la proyección de este trabajo se basa en que es factible aumentar la velocidad de degradación de residuos de antibióticos, como la OTC, que se acumulan en los sedimentos en los sistemas de cultivos tanto dulceacuícola como marinos. Además, los sedimentos generados en el continente (residuos de los sistemas de cultivos

dulceacúcolas), según decreto D.S. 609, por su contenido de antibióticos deben ser enviados a sistemas de tratamiento de RISES, pero si fueran tratados con hongos para disminuir los contaminantes, por su composición de N y P, podrían ser utilizados en la agricultura.

7.- REFERENCIAS GENERALES

Ahumada-Rudolph R, D Cajas-Madriaga, A Rudolph, R Reinoso, C Torres, M Silva & J Becerra. 2014. Variation of sterols and fatty acids as an adaptive response to changes in temperature, salinity and pH of a marine fungus *Epicoccum nigrum* isolated from the Patagonian Fjords. *Revista Biología Marina y Oceanografía* 49(2): 293-305.

Alcock RE, A Sweetman & KC Jones. 1999. Assessment of organic contaminant fate in wastewater treatment plants I. Selected compounds and physiochemical properties. *Chemosphere* 38: 2247-2262.

Anastasi A, V Tigini & GC Varese. 2013. The bioremediation potencial of different ecophysiological group of fungi. In: Goltapeh EM, YR Danesh & A Varma (eds). *Fungi as bioremediators*, pp. 479-489. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Bjorklund HV, CMI Rlbergh & G Bylund. 1991. Residues of oxolinic acid and oxytetracycline in fish and sediments from fish farms. *Aquaculture* 97: 85-96.

Bravo S, H Dölz, MT Silva, C Lagos, A Millanao & M Urbina. 2005. Diagnóstico del uso de fármacos y otros productos químicos en la acuicultura. Facultad de Pesquerías y Oceanografía. Instituto de Acuicultura. Proyecto N° 2003 – 2. Universidad Austral de Chile. Puerto Montt - Chile. pp. 256.

Bugni TS & CM Ireland. 2004. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Natural Product Reports* 21: 143–63.

Buschmann AH & A Fortt. 2005. Efectos ambientales de la acuicultura intensiva y alternativas para un desarrollo sustentable. *Revista Ambiente y Desarrollo* 21(3): 58-64.

Buschmann AH, VA Riquelme, M Hernández-González, CD Varela, JE Jiménez, LA Henríquez, PA Vergara, R Guíñez & L Filún. 2006. A review of the impacts of salmon farming on marine coastal ecosystems in the southeast Pacific. *ICES Journal of Marine Science* 63: 1338-1345.

Buschmann H, F Cabello, K Young, J Carvajal, D Varela & L Henríquez. 2009. Salmon aquaculture and coastal ecosystem health in Chile: Analysis of regulations, environmental impacts and bioremediation systems. *Ocean & Coastal Management* 52: 243–249.

Buschmann AH, A Tomova, A López, MA Maldonado & LA Henríquez. 2012. Salmon aquaculture and antimicrobial resistance in the marine environment. *PLoS ONE* 7(8): e42724. doi: 10.1371/journal.pone.0042724.

Butinar L, Zalar P, Frisvad JC, Gunde-Cimerman N. 2005. The genus *Eurotium* members of indigenous fungal community in hypersaline waters of salterns. *FEMS Microbiology Ecology* 51: 155-166.

Cabello FC, HP Godfrey, A Tomova, L Ivanova, H Dölz, A Millanao & AH Buschmann. 2013. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environmental Microbiology* 15(7): 1917-1942.

Cabello FC. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology* 8(7): 1137–1144.

Cabello FC. 2004. Antibióticos y acuicultura en Chile: consecuencias para la salud humana y animal. *Revista Médica de Chile* 132(8): 1001-1006.

Carlile M, S Watkinson & G Gooday. 2001. *The Fungi* 2nd ed. Academy Press. 584 pp.

Clipson N, M Otte & E Landy. 2006. Biogeochemical roles of fungi in marine and estuarine habitats. In. *Fungi in Biogeochemical Cycles*. Gadd GM (ed). Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Costa-Pierce BA. 2010. Sustainable ecological aquaculture systems: the need for a new social contract for aquaculture development. *Marine Technology Society Journal* 44: 88–112.

Coyne R, M Hiney, B O'Connor, D Cazabon & P Smith. 1994. Concentration and persistence of oxytetracycline in sediments under a marine salmon farm. *Aquaculture* 123: 31-42.

Dietze JE, EA Scribner, MT Meyer & DW Kolpin. 2005. Occurrence of antibiotics in water from 13 fish hatcheries, 2001-2003: *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 85(15): 1141-1152.

Drummond AJ, B Ashton, S Burton, M Cheung, A Cooper, J Heled, R Moir, S Stones-Havas, S Sturrock & T Thierer. 2011. Geneious v5.4. Biomatters, Auckland. <http://www.geneious.com/>

Gemma M, G Debernardi, G Feijoo, MT Moreira & JM Lema. 2011. Oxidation of pharmaceutically active compounds by a ligninolytic fungal peroxidase. *Biodegradation* 22: 539-550.

Gunde-Cimerman N, P Zalar, GS Hoog & A Plemenitaš. 2000. Hypersaline waters in salterns: natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiology Ecology* 32: 235-340.

Harms H, D Schlosser & LY Wick. 2011. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nature Reviews Microbiology* 9: 177-191.

He Y, M Li, V Perumal, X Feng, J Fang, J Xie, S M Sievert & F Wang. 2016. Genomic and enzymatic evidence for acetogenesis among multiple lineages of the archaeal phylum Bathyarchaeota widespread in marine sediments, *Nature Microbiology*, Number 16035. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.35.

Heuer OE, H Kruse, K Grave, P Collignon & I Karunasagar. 2009. Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clinical Infectious Diseases* 49: 1248–1253.

Hektoen H, JA Berge, V Hormazábal, & M Yndestad. 1995. Persistence of antibacterial agents in marine sediments. *Aquaculture* 133: 175-184.

Horvath I, A Glatz, V Varvasovszki, Z Torok, T Pali, G Balogh, E Kovacs, L Nadasdi, S Benko, F Joo & L Vigh (1998). Membrane physical state controls the signaling mechanism of the heat shock response in *Synechocystis* PCC 6803: identification of hsp17 as a “fluidity gene”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 3513-3518.

Johnson TW & FK Sparrow. 1961. *Fungi in Oceans and Estuaries*. Cramer, Weinheim Alemania 24: 668.

Kavanagh K. 2011. *Fungi: Biology and Applications*. John Wiley & Sons. Chichester, England 2nd ed. 366 pp

Kerry J, M Hiney, R Coyne, S NicGabhainn, D Gilroy, D Cazabon & P Smith, 1995. Fish feed as a source of oxytetracycline-resistant bacteria in the sediments under fish farms. *Aquaculture* 131: 101-113.

Kirk PM, PF Cannon, DW Minter & JA Stalpers. 2008. *Dictionary of the fungi*. CABI Europe - UK 10th ed. 771 pp

Kristanti RA & T Hadibarata. 2015. Biodegradation and identification of transformation products of fluorene by ascomycete fungi water air and soil pollution 226(12): 406.

Kong AYY, KM Scow, AL Córdova-Kreylos, WE Holmes & J Six. 2011. Microbial community composition and carbon cycling within soil microenvironments of conventional, low-input, and organic cropping systems. *Soil Biology and Biochemistry* 43: 20-30.

Kulshreshtha S, Mathur N & P Bhatnagar. 2014. Mushroom as a product and their role in mycoremediation. *AMB Express* 4:29. doi:10.1186/s13568-014-0029-8.

Liu W, N Pan, W Chen, W Jiao & M Wang. 2012. Effect of veterinary oxytetracycline on functional diversity of soil microbial community. *Plant Soil Environment* 58: 295-301.

Magan N, S Fragoeiro & C Bastos. 2010. Environmental factors and bioremediation of xenobiotics using white rot fungi. *Mycobiology* 38: 238-248.

Maloney SE. 2001. Pesticide degradation. In: Gadd GM (ed). *Fungi in bioremediation*, pp. 188-223. Cambridge University Press, Cambridge.

Marshall BM & SB Levy. 2011. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clinical Microbiology Reviews* 24: 718-733.

Martínez-Carballo E, C González-Barreiro, S Scharf & O Gans. 2007. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *Environmental Pollution* 148(2): 570-579.

Migliore L, M Fiori, A Spadoni & E Galli. 2012. Biodegradation of oxytetracycline by *Pleurotus ostreatus* mycelium: a mycoremediation technique. *Journal Hazardous Material* 216: 227–232.

Millanao BA, Barrientos HM, Gomez CC, Tomova A, Buschmann A. 2011. Uso inadecuado y excesivo de antibióticos: salud pública y salmonicultura en Chile. *Revista Medica de Chile* 139: 107–118.

Miranda C & R Zemelman. 2002. Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. *Aquaculture* 212: 31-47.

Naylor RL, RJ Goldberg, JH Primavera, N Kautsky & M Troell. 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 45: 1017-1029.

Rodarte-Morales GF, MT Moreira & JM Lema. 2011. Degradation of selected pharmaceutical and personal care products (PPCPs) by white-rot fungi. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 27: 1839–1846

Rudolph A, P Medina, C Urrutia & R Ahumada. 2009. Ecotoxicological sediment evaluations in marine aquaculture areas of Chile. *Environmental Monitoring and Assessment* 155: 419-429.

Rudolph A, P Medina, R Ahumada & V Novoa. 2011. Ecotoxicological quality of sediments in fiords in Southern Chile (44 - 46.5° LS). *Revista Biología Marina y Oceanografía* 46: 79-84.

SAG. 2009. Guía de aplicación de lodos de Piscicultura en suelos. Servicio Agrícola y Ganadero. ECOING LTDA. 21 p.

San Martín B, R Yatabe, A Gallardo & P Medina. 2010. Manual de buenas prácticas en el uso de antibióticos y antiparasitarios en la salmonicultura chilena Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA). 43 p.

Samuelsen OB, BT Lunestad, A Ervik & S Fjelde. 1994. Stability of antimicrobial agents in artificial marine sediment studied under laboratory conditions. *Aquaculture* 126: 283-290.

Samuelsen OB, V Torsvik & A Etvik. 1992. Long-range changes in oxytetracycline concentration and bacterial resistance towards oxytetracycline in a fish farm sediment after medication. *Science of the Total Environment* 114: 25-36.

Saleem M, MS Ali, S Hussain, A Jabbar, M Ashraf & YS Lee. 2007. Marine natural products of fungal origin. *Natural Product Reports* 24: 1142–52.

Sarmah AK, MT Meyer & ABA Boxall. 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* 65: 725–759.

Seo JS, YS Keum & QX Li. 2009. Bacterial degradation of aromatic compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 6: 278-309.

SERNAPESCA. 2014. Informe sobre uso de antimicrobianos en la salmonicultura nacional 2013. Departamento de Salud Animal. Ministerio de Economía, Fomento y Turismo. Valparaíso, Chile. 19 pp.

SERNAPESCA. 2015. Informe sobre uso de antimicrobianos en la salmonicultura nacional 2014. Departamento de Salud Animal. Ministerio de Economía, Fomento y Turismo. Valparaíso, Chile. 21 pp.

Smith P. 1996. Is sediment deposition the dominant fate of oxytetracycline used in marine salmonid farms: a review of available evidence. *Aquaculture* 146: 157-169.

Smith P & OB Samuelsen. 1996. Estimates of the significance of out-washing of oxytetracycline from sediments under Atlantic salmon sea-cages. *Aquaculture* 144: 17-26.

Soto D, F Jara & CA Moreno. 2001. Escaped salmon in the inner seas, southern. Subsecretaría de Pesca y Acuicultura (SUBPESCA) (2014). Informe sectorial de pesca y acuicultura. Valparaíso, Chile. 19 pp.

Subsecretaría de Pesca y Acuicultura (SUBPESCA). 2015. Subsecretaría de Pesca Chile: facing ecological and social conflicts. *Ecological Applications* 11: 1750-1762. Acuicultura. Valparaíso, Chile <http://www.subpesca.cl/prensa/601/w3-article-88821.html> (accessed 27 Dic 2015)

Tacón AGJ. 2004. Use of fish meal and fish oil in aquaculture: a global perspective. *Aquatic Resources, Culture and Development* 1: 3-14.

Tedersoo L, T Suvi, T Jairus & H Kõljalg. 2009. Forest microsite effects on community composition of ectomycorrhizal fungi on seedlings of *Picea abies* and *Betula pendula*. *Environmental Microbiology* 10: 1189-1201.

Thiele-Bruhn S & IC Beck. 2005. Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass. *Chemosphere* 59(4): 457-65.

Tubaki K. 1969. Studies on the Japanese marine fungi, lignicolous group (III), algicolous group and a general consideration. Annual Report of the Institute Fermentation, Osaka 4: 12-41.

Vidaver A. 2002. Uses of antimicrobials in plant agriculture. *Clinical Infectious Disease* 34(3): 107-110.

Williams AJ, J Deck, JP Freeman, MP Chiarelli, MD Adjei, TM Heinze & JD Sutherland. 2007. Biotransformation of flumequine by the fungus *Cunninghamella Elegans*. *Chemosphere* 67: 240-243.

WingChing-Jones R. 2008. Residualidad de sustancias xenobióticas en el suelo empleadas en la producción pecuaria. *Agronomía Mesoamericana* 19(1): 99-114.

Wolf M. 2004. Uso y abuso de antibióticos. Momento de su evaluación, más allá del ser humano. *Revista Médica de Chile* 132: 909-911.

Xianghua W, J Yannan & L Jiayi. 2010. Enzymatic degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude manganese peroxidase prepared from *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Hazardous Materials* 177: 924-928.

Zalar P, GS Hoog, HJ Schroers, JM Frank & N Gunde-Cimerman. 2005. Taxonomy and phylogeny of the xerophilic genus *Wallemia* (*Wallemiomycetes* and *Wallemiales*, cl. et ord. nov.). *Antonie van Leeuwenhoek* 87: 311-328.

