

Hongos psicrófilos superficiales cultivables asociados a murciélagos en áreas de Jalisco y San Luis Potosí, México

Culturable superficial psychrophilic fungi associated with bats in areas of Jalisco and San Luis Potosí, México

Judith Castellanos-Moguel ¹, Ángel Rodríguez-Moreno ², Arturo García Ortiz ¹, Arturo Miranda-Calixto ¹, Omar Reyes Hernández ¹, Gabriel Gutiérrez-Granados ³, Víctor Sánchez-Cordero ²

¹ Departamento el Hombre y su Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Villa Quietud, Coyoacán, C.P. 04960, Ciudad de México, México.

² Departamento de Zoología, Pabellón Nacional de la Biodiversidad-Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Centro Cultural, Ciudad Universitaria, Coyoacán, C.P. 04510, Ciudad de México, México.

³ Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México. Batalla 5 de Mayo s/n esquina Fuerte de Loreto, Ejército de Oriente, Iztapalapa, C.P. 09320, Ciudad de México, México.

RESUMEN

Antecedentes: el síndrome de nariz blanca causado por *Pseudogymnoascus destructans* ha disminuido drásticamente las poblaciones de murciélagos en Canadá y Estados Unidos de América; no se ha detectado en México.

Objetivo: caracterizar la micobiota en los murciélagos que comparten la distribución con las especies susceptibles de ser parasitados por *P. destructans*.

Métodos: se realizaron muestreos de murciélagos en San Luis Potosí y Jalisco. Se tomaron muestras de rostro y alas, que se sembraron en agar rosa Bengala cloranfenicol. Se purificaron en papa dextrosa agar e identificaron a nivel de género, cuando fue posible a especie con base en la morfología y micromorfología. Los murciélagos se identificaron hasta especie.

Resultados y conclusiones: los resultados mostraron una alta diversidad fúngica identificándose 32 géneros, donde *Acremonium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* y *Scopulariopsis*, se observaron en las 17 especies de murciélagos. Se documentó la presencia de *Pseudogymnoascus pannorum*, pero no de *P. destructans*.

Palabras clave: *Aspergillus*, carga fúngica, microhongos cultivables, murciélagos, *Penicillium*

ABSTRACT

Background: White-nose syndrome caused by *Pseudogymnoascus destructans* has dramatically decreased bat populations in Canada and the United States of America; it has not been detected in México.

Objective: Characterize the mycobiota in bats that share distribution with organisms susceptible to being parasitized by *P. destructans*.

Methods: Bat sampling was carried out in San Luis Potosí and Jalisco. Samples were taken from snout and wings, and cultivated on Rose-Bengal chloramphenicol agar. Samples were purified on potato dextrose agar and identified at the genus level and, when possible, at the species level based on morphology and micromorphology. Bats were identified at the species level.

Results and conclusions: The results showed a high fungal diversity, where 32 fungi genera were identified. *Acremonium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, and *Scopulariopsis* were detected in the 17 bat species. *Pseudogymnoascus pannorum* was documented, but not *P. destructans*.

Keywords: *Aspergillus*, bats, culturable microfungi, fungal load, *Penicillium*

ARTICLE HISTORY

Received: 30 October 2023
Accepted: 27 August 2024
On line: 9 September 2024

CORRESPONDING AUTHOR

✉ Judith Castellanos-Moguel, e-mail: mjmoguel@correo.xoc.uam.mx
Orcid: 0000-0003-1449-4139

El síndrome de nariz blanca (SNB) es una enfermedad emergente causada por *Pseudogymnoascus* (= *Geomyces*) *destructans* (Blehert & Gargas) Minnis & D.L. Lindner, que ha tenido un fuerte impacto en las poblaciones de murciélagos sobre todo miótidos de zonas frías en América del Norte. Este hongo se ha reportado como psicrófilo. *Pseudogymnoascus* es dispersado por aire, agua y se ha aislado de plumas, pelo, artrópodos, y diversos fómites como los equipos de excursionismo (Hayes 2012). En general, se conoce poco acerca de los hongos patógenos asociados a los murciélagos, con excepción de los de importancia médica como *Histoplasma capsulatum* Darling. Se han estudiado los hongos superficiales en murciélagos en Estados Unidos de América (EUA) (Chaturvedi *et al.* 2010, Johnson *et al.* 2013, Carpenter *et al.* 2016), Canadá (Vanderwolf *et al.* 2013, 2015), Brasil (Shapiro *et al.* 2015), así como levaduras en murciélagos y colibríes en Costa Rica (Belisle *et al.* 2014). En México, los estudios aún son limitados.

Se ha demostrado que los murciélagos son vectores fúngicos (Vanderwolf *et al.* 2013, 2015) y existen especies migratorias en el norte del país (Medellín *et al.* 2009), algunas de las cuales se distribuyen en zonas con brotes del SNB. Este escenario constituye un riesgo, ya que en México existen las condiciones ambientales como los espectros de temperaturas bajas para que se manifieste la infección. Debido a estas características ambientales y que los organismos comparten sitios de alimentación y descanso, podría esperarse que exista un contacto entre individuos infectados de EUA y no infectados de México, a través de las especies que comparten su distribución, 13 especies de *Myotis* y *Eptesicus fuscus*, aumentando así el rango de dispersión del síndrome.

Es importante conocer la microbiota superficial cultivable ya que, si bien en México no existe un reporte oficial de la presencia del SNB, es necesario caracterizar la microbiota fúngica de los murciélagos que comparten distribución con las zonas donde se ha observado el SNB, lo que sugiere que pueden ser susceptibles de ser parasitados por *P. destructans*. Por tanto, es relevante contar con información básica en caso de que llegase a producirse un brote de dicho agente infeccioso, ya que existen alertas en la zona sureste de EUA y en cuevas de Puerto Rico, de acuerdo con las condiciones adecuadas como la temperatura para el desarrollo de *P. destructans* en murciélagos

(<http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>).

El enfoque de este estudio es hacia hongos cultivables, ya que pueden observarse esporas de patógenos en diversos sustratos incluidos los animales, que dependen de encontrar las condiciones adecuadas de humedad y temperatura. En caso de corroborarse la presencia de *P. destructans* entre los aislados, debe ser definido en un contexto ambiental dependiente de un huésped potencial que reúna las condiciones para presentar la infección.

Se colectaron murciélagos en la Cueva del Salitre, Xilitla, San Luis Potosí y en cuatro sitios de Jalisco, tres en la localidad de La Huerta: Puente San Nicolás, Puente Purificación, Boca de Iguanas, así como en Cihuatlán (Tabla 1). Las muestras se tomaron de rostro y alas de los murciélagos con hisopos. El manejo de los animales se realizó siguiendo el protocolo de descontaminación para SNB, emitido por la North America's Response to the Devastating Bat Disease (<http://whitensesyndrome.org/>) y las directrices de la Sociedad Americana de Mastozoología para el uso de mamíferos silvestres en investigación (Sikes y Gannon 2011). Los hisopos se humedecieron con tween 80 al 0.05 % estéril y se sembraron por triplicado con tres réplicas en agar rosa de Bengala (Bioxón, México), adicionado con cloranfenicol (500 mg/L) (BD, México).

Se incubaron a 16 ± 2 °C, en oscuridad, durante 60 días para permitir el desarrollo de los propágulos fúngicos, ya que se buscaba el aislamiento de hongos psicrófilos con énfasis en *Pseudogymnoascus*. Este tiempo de incubación se decidió porque se trabajó previamente en ensayos con la cepa de referencia de ATCC MYA4855 y fue el tiempo que tardó en desarrollarse a 16 °C. Desde el día 11 de incubación, se revisó la aparición de crecimiento. Las colonias obtenidas se purificaron en agar papa-dextrosa (Condolab, México) y se identificaron con base en la morfología colonial y microscópica, comparándolas con claves taxonómicas (Barron 1968, Barnett y Hunter 1972, Von Arx 1981, Watanabe 2002). También se prepararon microcultivos de Ridell para la observación al microscopio de las estructuras reproductivas de los hongos. Los cultivos axénicos se pasaron a tubos de polipropileno con agar papa dextrosa inclinado para su conservación en aceite mineral, los cuales están depositados en el Cepario del Laboratorio de Micología de la UAM-X (Tabla 2).

Se colectaron un total de 43 murciélagos pertenecientes a 17 especies, identificadas con guías de campo (Medellín et al. 2008). Se obtuvieron un total de 10,236 colonias de hongos, las cuales se cuantificaron e identificaron en base a su morfología colonial disímil por cada caja de Petri, que correspondieron a 32 géneros y 10 especies (Tabla 2). La especie de

murciélago mencionada en la Tabla 2, corresponde al organismo en el cual se obtuvo el primer aislamiento para el registro. Sin embargo, existen géneros que crecieron en todas las muestras de murciélagos, los cuales fueron *Acremonium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* y *Scopulariopsis*.

Tabla 1. Localidades de muestreo en Jalisco y San Luis Potosí, México

Localidad	Municipio	Estado	LN	LO
1. Boca de Iguanas	La Huerta	Jalisco	19°18'29.94"	104°49'11.39"
2. Puente Purificación	La Huerta	Jalisco	19°21'07.69"	104°53'20.11"
3. San Nicolás	La Huerta	Jalisco	19°39'16.09"	05°10'44.10"
4. Cihuatlán	Cihuatlán	Jalisco	19°13'38.52"	104°32'06.24"
5. Cueva de Salitre	Xilitla	San Luis Potosí	21°23'14"	098°58'53"

Tabla 2. Géneros y especies fúngicas asociados con especies de murciélagos en localidades de Jalisco y San Luis Potosí, México

Especie de murciélago	Localidad*	Estado
<i>Artibeus jamaicensis</i>	1	<i>Aspergillus ochraceus</i> (PSNB-8)**
	4	<i>Fusarium</i> sp. (PSNB-25)
	5	<i>Absidia</i> sp. (PSNB-1), <i>Acremonium</i> sp. (PSNB-3), <i>Alternaria</i> sp. (PSNB-7), <i>Aspergillus</i> sp. (PSNB-15), <i>Aspergillus flavus</i> (PSNB-14), <i>A. niger</i> (PSNB-18), <i>A. terreus</i> (PSNB-17), <i>Aureobasidium</i> sp. (PSNB-19), <i>Cordyceps</i> sp. (PSNB-29), <i>Cunninghamella</i> sp. (PSNB-24), <i>Fusarium</i> sp. (PSNB-26), <i>Geotrichum</i> sp. (PSNB-28), <i>Monilia</i> sp. (PSNB-30), <i>Mortierella</i> sp. (PSNB-31), <i>Mucor</i> sp. (PSNB-34), <i>Penicillium</i> sp. (PSNB-40), <i>Phialophora</i> sp. (PSNB-43), <i>Trichoderma</i> sp. (PSNB-50), <i>Trichothecium</i> sp. (PSNB-51), <i>Ulocladium</i> sp. (PSNB-52)
<i>Artibeus lituratus</i>	1	<i>Aspergillus</i> sp. (PSNB-9), <i>Penicillium</i> sp. (PSNB-38)
<i>Choeroniscus godmani</i>	2	<i>Penicillium</i> sp. (PSNB-41)
<i>Dermanura phaeotis</i>	2	<i>Alternaria</i> sp. (PSNB-5)
<i>Eptesicus fuscus</i>	5	<i>Basipetospora</i> sp. (PSNB-20), <i>Pseudogymnoascus pannorum</i> (PSNB-27)
<i>Glossophaga soricina</i>	2	<i>Aspergillus versicolor</i> (PSNB-13)
	4	<i>Penicillium</i> sp. (PSNB-42), <i>Scopulariopsis</i> sp. (PSNB-47)
<i>Hylonycteris underwoodi</i>	3	<i>Acremonium</i> sp. (PSNB-2)

<i>Molossus sinaloae</i>	2	<i>Aspergillus parasiticus</i> (PSNB-11)
<i>Myotis californicus</i>	4	<i>Alternaria</i> sp. (PSNB-6), <i>Aspergillus</i> sp. (PSNB-16), <i>Mucor</i> sp. (PSNB-32)
<i>Myotis fortidens</i>	2	<i>Cladosporium</i> sp. (PSNB-23), <i>Scopulariopsis</i> sp. (PSNB-48)
	3	<i>Penicillium</i> sp. (PSNB-39), <i>Scopulariopsis</i> sp. (PSNB-46)
<i>Myotis nigricansz</i>	1	<i>Cladosporium</i> sp. (PSNB-21)
<i>Noctilio leporinus</i>	2	<i>Scopulariopsis</i> sp. (PSNB-49)
<i>Pteronotus davyi</i>	3	<i>Alternaria</i> sp. (PSNB-4)
<i>Pteronotus personatus</i>	3	<i>Simplicillium</i> sp. (PSNB-45)
<i>Saccopteryx bilineata</i>	2	<i>Paecilomyces</i> sp. (PSNB-36)
<i>Sturnira parvidens</i>	2	<i>Aspergillus</i> sp. (PSNB-12), <i>Aspergillus sclerotium</i> (PSNB-10)
	4	<i>Mucor circinelloides</i> (PSNB-33), <i>M. racemosus</i> (PSNB-35)
	5	<i>Cladosporium</i> sp. (PSNB-22), <i>Papulaspora</i> sp. (PSNB-37), <i>Phoma</i> sp. (PSNB-44)

* Localidad con base en Tabla 1. ** Cepa depositada en el Laboratorio de Micología UAM-X.

La especie de murciélago que presentó un mayor número de géneros fúngicos fue *Artibeus jamaicensis* con 26, mientras que con los menores aislamientos *Choeroniscus godmani* y *Saccopteryx bilineata* con cinco cada uno. Esta última presentó hongos identificados en otros murciélagos de la misma localidad. Se lograron determinar siete especies de *Aspergillus* (Samson *et al.* 2014, Houbraken *et al.* 2020). Los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* desarrollaron el mayor número de unidades formadoras de colonias, así como los más frecuentemente aislados de piel de murciélagos (Chaturvedi *et al.* 2010). Esto debido, probablemente, a sus hábitos alimenticios y lugares donde se distribuyen. Se consideran asociados a otros ambientes e incluso se ha sugerido que llegan a los sitios con murciélagos por aerotransporte de los conidios (Zhang *et al.* 2020). Se aislaron también géneros asociados a la vegetación como *Alternaria*, *Epicoccum*, *Fusarium* y *Phoma*, lo que coincide con los géneros aislados por Lorch *et al.* (2013), en sitios del este de EUA. Además, se aisló *Cordyceps* (= *Isaria*) *fumosorosea* (Wise) Kepler, B. Shrestha & Spatafora, hongo entomopatógeno que podría estar asociado a los hábitos de alimentación de los murciélagos. *Pseudogymnoascus pannorum* (Link) Minnis & D.L. Lindner *sensu lato* se aisló a partir

de *Eptesicus fuscus*, especie migratoria presente en sitios donde se ha reportado *P. destructans*. Sin embargo, *P. pannorum* está reportado como guanofílico y psicrófilo, común en cuevas (Kravchenko *et al.* 2015, Misra *et al.* 2020). Otros géneros observados en este estudio, aislados de guano son *Alternaria*, *Cladosporium* y *Mucor* (Hayes 2012, Misra *et al.* 2020). *Mortierella* y *Mucor* son Mucoromycetes, aislados comúnmente de suelo en cuevas (Zhang *et al.* 2020). La gran mayoría de los géneros aislados son organismos que están asociados a suelo y vegetación. Sin embargo, pueden permanecer viables largo tiempo y es importante considerar que al ser transportados por los animales, algunos patógenos oportunistas como *Aspergillus* (Karunarathna *et al.* 2023) pueden encontrarse en condiciones favorables para invadir a los individuos susceptibles. Esto sería consistente con el modo de dispersión de un patógeno introducido. Los resultados del presente estudio mostraron que existe un ensamble diverso de hongos en la nariz y alas de los murciélagos, la mayoría de ellos asociados a la vegetación y suelo. Este estudio no detectó la presencia de *P. destructans* en las especies de murciélagos colectados. Sin embargo, es necesario realizar análisis moleculares para confirmar todos los géneros aislados.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue financiado por la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO, Proyecto ME008).

LITERATURA CITADA

- Barnett HL, Hunter BB. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. 4 ed. New York, Macmillan Pub. Co.
- Barron GL. 1968. The genera of Hyphomycetes from Soil. Baltimore, Waverly Press Inc.
- Belisle M, Mendenhall CD, Oviedo F, Fukami T. 2014. Temporal variation in fungal communities associated with tropical hummingbirds and nectarivorous bats. *Fungal Ecology* 12, 44-51. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.02.007>
- Carpenter GM, Willcox EV, Bernard RF, Stiver WH. 2016. Detection of *Pseudogymnoascus destructans* on free-flying male bats captured during summer in the southeastern USA. *Journal of Wildlife Diseases* 52, 922-926. <https://doi.org/10.7589/2016-02-041>
- Chaturvedi V, Springer DJ, Behr MJ, Ramani R, Li X, Peck MK, Ren P, Bopp DJ, Wood D, Samsonoff WA, Butchkoski CM, Hicks AC, Stone WB, Rudd RJ, Chaturvedi S. 2010. Morphological and molecular characterization of psychrophilic fungus *Geomyces destructans* from New York bats with whitenose-syndrome (WNS). *PLoS One* 5, e10783. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010783>
- Hayes MA. 2012. The *Geomyces* fungi: ecology and distribution. *BioScience* 62, 819-823. <https://doi.org/10.1525/bio.2012.62.9.7>
- Houbraken J, Kocsubé S, Visiagie CM, Yilmaz N, Wang XC, Meijer M, Kraak B, Hubka V, Bensch K, Samson RA, Frisvad JC. 2020. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Studies in Mycology* 95, 5-169. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.05.002>
- Johnson L JAN, Miller AN, M.C. Cleery RA, McClanahan R, Kath JA, Lueschow S, Porrás-Alfaro A. 2013. Psychrophilic and psychrotolerant fungi on bats and the presence of *Geomyces* sp. on bat wings prior to the arrival of the white-nose syndrome. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 5465-5471. <https://doi.org/10.1128/AEM.01429-13>
- Karunaratna SC, Haelewaters D, Lionakis MS, Tibpromma S, Jianchu X, Huges AC. 2023. Assessing the threat of bat-associated fungal pathogens. *One Health* 16, 100553. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2023.100553>
- Kravchenko KA, Vlashchenko AS, Prilutskii OV, Prilutskaya AS. 2015. A search for *Geomyces destructans*, a dangerous pathogen of bats, in caves of Eastern Europe. *Russian Journal of Ecology* 46, 490-493. <https://link.springer.com/article/10.1134/S1067413615050124>
- Lorch JM, Linder DL, Gargas A, Muller LK, Minnis AM, Blehert DS. 2013. A culture-based survey of fungi in soil from bat hibernacula in the eastern United States and its implications for detection of *Geomyces destructans*, the causal agent of bat white-nose syndrome. *Mycologia* 105, 237-252. <https://doi.org/10.3852/12-207>
- Medellín RA, Arita HT, Sánchez O. 2008. Identificación de los murciélagos de México. clave de campo. 4 Ed. Ciudad de México, México, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Medellín RA, Abreu-Grubois A, Arizmendi MC, Mellink E, Ruelas E, Santana E, Urbán J. 2009. Conservación de especies migratorias y poblaciones transfronterizas. In: CONABIO (eds.), Capital natural de México. México D.F. Pp. 459-515.
- Misra PK, Gautam NK, Elangovan V. 2020. Morphological and molecular characterizations of guanoophilic fungi of bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* 90, 595-604. <https://link.springer.com/article/10.1007/s40011-019-01129-2>
- Shapiro JT, Rocha dos Santos TM, Rossato-Marchetti C, Pedroso Lorenz-Lemke C, Delarmelina E, Bordignon MO. 2015. Characterization of fungi associated with the nasal hairs of molossid bats. *Fungal Ecology* 18, 126-129. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.06.005>
- Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong S-B, Hubka V, Klaassen CHW, Perrone G, Seifert KA, Susca A, Tanney JB, Varga J, Kocsubé S, Szigeti G, Yaguchi T, Frisvad JC. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 78, 141-173. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>
- Sikes RS, Gannon WL. 2011. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *Journal of Mammalogy* 92, 235-253. <http://doi.org/10.1644/10-MAMM-F-355.1>
- Vanderwolf KJ, McAlpine DF, Malloch D, Forbes G. 2013. Ectomycota associated with hibernating bats in eastern Canadian caves prior to the emergence of white-nose syndrome. *Northeastern Naturalist* 20, 115-120. <https://doi.org/10.1656/045.020.0109>
- Vanderwolf KJ, Malloch D, McAlpine DF. 2015. Fungi on white-nose infected bats (*Myotis* spp.) in Eastern Canada show no decline in diversity associated with *Pseudogymnoascus destructans* (Ascomycota: Pseudeurotiaceae). *International Journal of Speleology* 45, 43-50. <https://doi.org/10.5038/1827-806X-45-1-1946>
- Von Arx JA. 1981. The genera of fungi sporulating in pure culture. Berlin, Gartner Verlag.
- Watanabe T. 2002. Pictorial atlas of soil and seed fungi: Morphologies of cultured fungi and key to species. 2 ed. Boca Raton, CRC Press. <http://doi.org/10.1201/9781420040821>
- Zhang Z-F, Zhou S-Y, Eurwilaichitr L, Ingsriswang S, Raza M, Chen Q, Zhao P, Liu F, Cai L. 2020. Culturable mycobiota from karst caves in China II, with descriptions of 33 new species. *Fungal Diversity* 106, 29-131. <https://doi.org/10.1007/s13225-020-00453-7>