

Identificación molecular de microorganismos aislados en planteles mineros artesanales de Nicaragua

Molecular identification of microorganisms isolated in handmade mining plants of Nicaragua

Leandro Páramo Aguilera¹

¹ Centro de Investigación y Estudios del Medio Ambiente (CIEMA), Universidad Nacional de Ingeniería (UNI), Nicaragua

*Autor de correspondencia: lparamo99@yahoo.com

RESUMEN– La bioprospección es una investigación realizada para identificar especies, genes y productos con usos actuales o potenciales por parte de la humanidad. Por consiguiente, se desarrolló este proyecto con el propósito de identificar cepas nativas potencialmente útiles para el desarrollo ingenieril de procesos biotecnológicos, donde se aplicaron técnicas de aislamiento, además de un reconocimiento de las características morfológicas de los microorganismos mediante la observación de tinciones de Gram, cintas adhesivas y tinciones en fresco; así como, la identificación molecular por la secuenciación de las regiones 16S para bacterias e ITS y D1/D2/D3 para hongos. Concluido el trabajo se obtuvo un total de 66 aislados microbianos, a los que se les realizaron pruebas morfológicas y entre estos solo a 18 bacterias, 2 hongos filamentosos, 3 hongos levaduriformes se les realizaron las pruebas moleculares, lo que permitió identificar 6 especies bacterianas diferentes y 5 especies fúngicas, además de las identificadas hasta nivel de géneros de *Halomonas sp* y *Enterobacter sp*. Las cepas plenamente identificadas pertenecen a: bacterias como (1) *Acinetobacter calcoaceticus*, (1) *Aeromonas hydrophila*, (4) *Bacillus cereus*, (1) *Bacillus marisflavi*, (1) *Exiguobacterium aurantiacum* y (1) *Terribacillus saccharophilus* y hongos como: (1) *Cyberlindnera jadinii*, (1) *Pichia jadinii*, (1) *Trichosporon asahii*, (1) *Penicillium janthinellum* y (1) *Penicillium simplicissimum*.

Palabras clave– Bioprospección, identificación, pruebas morfológicas; pruebas moleculares; secuenciación.

ABSTRACT– Bioprospecting is an investigation conducted to identify species, genes and products with current or potential uses by mankind. Therefore, this project was developed with the purpose of identifying potentially useful native strains for the engineering development of biotechnological processes, where isolation techniques were applied, in addition to a recognition of the morphological characteristics of microorganisms by observing Gram stains, adhesive tapes and fresh stains; as well as the molecular identification by sequencing the 16S regions for bacteria and STIs and D1 / D2 / D3 for fungi. Concluded the work, a total of 66 microbial isolates were obtained, which were subjected to morphological tests and among these only 18 bacteria, 2 filamentous fungi, 3 yeast fungi were carried out molecular tests, which allowed to identify 6 different bacterial species and 5 fungal species, in addition to those identified up to genus level of *Halomonas sp* and *Enterobacter sp*. The fully identified strains belong to: bacteria such as (1) *Acinetobacter calcoaceticus*, (1) *Aeromonas hydrophila*, (4) *Bacillus cereus*, (1) *Bacillus marisflavi*, (1) *Exiguobacterium aurantiacum* and (1) *Terribacillus saccharophilus* and fungi such as: (1) *Cyberlindnera jadinii*, (1) *Pichia jadinii*, (1) *Trichosporon asahii*, (1) *Penicillium janthinellum* and (1) *Penicillium simplicissimum*.

Keywords– Bioprospecting, identification, morphological tests, molecular tests, sequencing.

1. Introducción

La biotecnología nació de manera empírica, con desconocimiento de los mecanismos de acción de los microorganismos en los procesos agrícolas, ambientales, industriales, entre otros. Actualmente la biotecnología

moderna conoce los procesos y mecanismos involucrados, que permiten utilizar y transformar productos a partir del uso de organismos, empleando diversas técnicas [1]. Con el transcurso del tiempo nace la bioprospección considerada un campo auxiliar de la

biotecnología, cuyo propósito es la búsqueda y selección del microbiota de un hábitat, la purificación del material microbiológico aislado y la identificación completa de las especies microbianas que a mediano o largo plazo pueden producir generosos beneficios [2].

Nicaragua presenta condiciones climatológicas y una posición geoestratégica única que la hace acreedora de una exuberante macro y micro biodiversidad, que representa el 7% de la diversidad biológica del mundo según el Ministerio del Ambiente y de los Recursos Naturales [3]. Una fuerte capacidad en ciencia y tecnología ya no es un lujo, sino una necesidad para ser partícipes del desarrollo biotecnológico y la economía global, por lo tanto, se debe considerar como la diversidad biológica del país le confiere ventajas para la exploración y el desarrollo en el campo de la biotecnología mediante la bioprospección microbiana.

Es posible plantear el desarrollo de la biotecnología, con estudios orientados a la bioprospección de especies de microorganismos autóctonos, que tengan la capacidad de adaptarse al medio del cual fueron extraídos y que indudablemente son más eficientes sus aplicaciones, que cualquiera que pueda encontrarse comercialmente. A pesar de las diversas dificultades como la falta de una masa crítica mínima, carencia de inversión y poco involucramiento del sector productivo local [4], la presente investigación se orientó a bioprospectar microorganismos de un ecosistema artificial, con la finalidad de encontrar cepas nativas potenciales para el posterior desarrollo ingenieril de procesos biotecnológicos.

El proceso consistió en aislar y purificar los microorganismos, diferenciar sus características fenotípicas y genotípicas a través de pruebas microbiológicas básicas y la aplicación de herramientas moleculares, para su debida identificación a nivel de género o especie. Los datos moleculares han permitido estudiar con mayor precisión los patrones de diversidad genética y su distribución; la composición, funcionamiento y dinámica de las comunidades microbianas y las relaciones filogenéticas. Con la identificación de los microorganismos, se puede iniciar la búsqueda bibliográfica para sugerir aplicaciones biotecnológicas de las cepas y puedan ser utilizadas en posteriores investigaciones en el campo de la biotecnología. Este proyecto pretende marcar un precedente que de alguna manera dé continuidad a los pequeños emprendimientos, que se realizan en el ámbito

biotecnológico del país a través del desarrollo de un plan de bioprospección.

2. Materiales y métodos

Todos los planteles mineros para la extracción de oro en La Libertad están asociadas al organismo conocido como COOPEMILICH (Cooperativa de pequeños mineros de La Libertad-Chontales), que regula la distribución de la materia prima para dicho proceso.

En este muestreo se exploraron dos planteles mineros con un alcance particular de producción de 12 g de oro promedio por cada tonelada de broza procesada

2.1 Ubicación del estudio

Ante la abundante biodiversidad que se encuentra en Nicaragua, se definió ubicar el estudio en el municipio La Libertad departamento de Chontales, que presenta condiciones medioambientales favorables para la producción ganadera, agrícola y minera, además de ser el albergue de un sin número de especies microbiana según el Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria [5]. Por otra parte, las técnicas de aislamiento, purificación, pruebas morfológicas microbianas y el análisis bioinformático del ADN de los microorganismos, se efectuaron en los laboratorios de Biotecnología y Microbiologías de Agua del Programa de Investigación, Estudios Nacionales y Servicios del Ambiente (PIENSA) de la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI). La extracción de los ADN genómicos de los microorganismos se realizó en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN) y el Centro de Biología Molecular de la Universidad Centro Americana (UCA), donde se contrató el servicio. El ADN extraído de los microorganismos fue enviado a la compañía Macrogen en la República de Corea del sur para su secuenciación.

2.2 Sitios de muestreos y recolección de la muestra

En la jornada de muestreo se trabajó con dos planteles mineros para la extracción de oro (Figura 1). El proceso de extracción inicia cuando la broza llega de la mina, la que se fragmenta con un cincel de forma manual, para finalmente ser molida en las rastras. Las rastras son alimentadas gradualmente con broza y agua de pozo, que con la adicción del azogue permite la precipitación de las partículas de oro, el lodo que se genera en las rastras es trasegado a un sistema de diques de colas.

En los planteles mineros se recolectaron muestras aplicando un sistema de muestreo aleatorio simple, que consiste en tomar una muestra (n) de la población (N), de manera tal que cada muestra tenga la misma probabilidad de ser seleccionada [6], las muestras se tomaron en puntos como suelos, subproductos, agua residual, entre otros. Las muestras sólidas se recolectaron con una pala metálica estéril y las líquidas con vasos de precipitado estéril, 5 muestras se colocaron en bolsas para muestras y en tubos cónicos estériles para ser trasladadas al laboratorio en un termo, a una temperatura aproximada a los 10 °C para preservar su naturaleza, sin alteración del número y las actividades de los microorganismos [7]. Asimismo, se realizaron recolecciones *in situ* de 28 muestras por duplicado en placas de Petri con la técnica de siembra masiva y en los medios de cultivos Agar nutritivo (AN), Agar Luria-Bertani (LB), Agar Plate-Count (PCA) y Agar Papa Detroxa (PDA), ya en el laboratorio se dejaron en incubación a una temperatura de 35°C.



Figura 1. Rastra de molienda perteneciente el segundo plantel minero muestreado.

2.3 Aislamiento, selección y purificación de los microorganismos

En el laboratorio se inició el aislamiento microbiano aplicando la técnica de siembra por inmersión, para favorecer el crecimiento separado de las colonias microbianas en las placas de cultivo, para esto se procesaron las muestras tomadas en tubos cónicos y bolsas para muestra. De las muestras solidas se tomó 5g de la muestra original y se mezcló con 5mL de agua destilada estéril y de las muestras liquidas se midieron 5mL de la muestra original, las cuales se colocaron en un tubo de ensayo para tener una solución madre. Seguidamente se tomó 1mL de la muestra madre y se

realizó una dilución seriada de 10^{-1} - 10^{-6} , de cada dilución se tomó 1mL de inóculo para sembrarlo en placas de Petri.

La siembra masiva y por inmersión generaron cultivos mixtos, de los cuales se aislaron especies morfológicamente distinta, el proceso de examinación en las placas de Petri con los medio AN, LB y PCA se realizó durante 7 días hasta que se agotó el crecimiento bacteriano y por 14 días en las placas con PDA hasta que se agotó el crecimiento de los hongos. Los cultivos mixtos se purificaron para obtener cultivos puros, en el caso de las bacterias se realizaron siembras en estría en medio LB donde se pudo determinar las diferentes morfologías de colonias y se efectuaron las resiembras necesarias de las colonias que crecieron aisladas hasta obtener un cultivo puro, para levaduras se aplicó la misma técnica usada con las bacterias a excepción que se utilizó medio PDA y los periodos de incubación fueron de 3-5 días. Las placas con medio PDA se examinaron y se seleccionaron los hongos filamentosos que presentaban diferentes aspectos en el conjunto de micelios, para el aislamiento se utilizó la técnica siembra por punción, se incubaron durante 3-7 días y se realizaron resiembras hasta obtener un cultivo puro.

2.4 Conservación de los microorganismos

Los cultivos axénicos de microorganismos se conservaron con el método de transferencia periódica, que consiste en inocular las cepas a un medio de cultivo fresco en intervalos que aseguren la viabilidad y pureza [8]. La transferencia se realizó en intervalos mensuales, se usaron placas con medio LB para bacterias y medio PDA para hongos filamentosos y levaduriformes, las técnicas para las siembras aplicadas fueron la siembra en estría y por punción en dependencia del tipo de microorganismo. Las placas inoculadas se dejaron en incubación por periodos de 24h para bacterias y un lapso de 3 a 14 días para hongos, estos subcultivos se almacenaron en refrigeración a una temperatura de 10°C, en placas de Petri selladas con PARAFILM.

2.5 Identificación microbiana

La identificación preliminar de los microorganismos se realizó por medio de pruebas morfológicas del primer nivel, que permiten puntualizar las bases para la aplicación de las pruebas moleculares, proceso por el cual los microorganismos se identificaron hasta el nivel de género y/o especie.

Pruebas morfológicas desarrolladas: Los cultivos bacterianos se sometieron a la tinción de Gram después de 24 horas de incubación, siguiendo el procedimiento descrito por López-Jácome et al. [9] Dicho procedimiento permitió observar y registrar las formas de las células bacterianas, sus tamaños y agrupaciones, así como clasificarlas en Gram positivas o negativas, además de determinar con mayor nivel de confianza la pureza del cultivo. Los hongos filamentosos inoculados en las placas de Petri con medio PDA se dejaron en esporulación a la temperatura del laboratorio ($28^{\circ}\text{C} \pm 1$) entre 2 y 5 días y se registraron sus morfologías microscópicas realizando un montaje con la técnica de cinta adhesiva que permite observar las estructuras fúngicas casi sin alteración [7]. La observación de las características al microscópicas de las levaduras se realizó a través de la tinción en fresco, con esta técnica fue posible diferenciar la forma celular de los hongos levaduriformes [10].

Identificación molecular: Se seleccionaron en base a sus características morfológicas 18 bacterias, 3 hongos levaduriformes y 2 hongos filamentosos, los cuales se identificaron molecularmente mediante el estudio del ADN. El ADN de las bacterias se extrajo por el protocolo fenol cloroformo y con el sistema comercial PROMEGA Wizar DNA purification KIT y el ADN de hongos con tres protocolos distintos. La amplificación del ADN se realizó por medio de la técnica PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) y la secuenciación por el análisis de la región 16S ADNr para bacterias con los primers 27F y 1492R (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y 5'-TACGGCTACCTTGTTACG ACTT-3'), D1/D2/D3 para hongos levaduriformes con los primers LROR y LR7 (5'-ACCCGCTAACTTAAGC-3' y 5'-TACTACCACCAAGATCT-3') y ITS (Internal Transcribed Space) para hongos filamentosos con los primers ITS1 e ITS4 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' y 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') [11; 12].

Precedido de la secuenciación se realizó el análisis bioinformático, el primer paso fue la corrección manual con el programa BioEdit v7.0.9 de los errores en los electroferogramas que se producen durante la secuenciación. La secuencia corregida se comparó a través de la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) contra secuencias similares reportadas en Gen Bank del NCBI (National Center for Biotechnology

Information) [13]. Posteriormente las secuencias fueron alineadas en el programa BioEdit, utilizando la aplicación Clustal W Multiple Alignment y luego se repitieron los pasos de comparación de la secuencia en el BLAST, donde se seleccionaron cinco nuevas secuencias que se relacionaban filogénicamente con la secuencia problema, para realizar finalmente la construcción de los árboles filogenéticos utilizando el programa MEGA 7.0.14 [14].

3. Resultados

Nicaragua, ha iniciado a dar pasos en el sentido de invertir en biotecnología, por el esfuerzo puntual de muchos desde hace varios años en materia de bioprospección, son parte de esta iniciativa los resultados de los muestreos realizado en dos planteles mineros que se presentan a continuación. Este proyecto, es un esfuerzo en ese sentido, buscando microorganismos útiles desde el punto de vista biotecnológico y que permita el desarrollo de procesos que impacten en la agricultura, la industria y el medio ambiente.

3.1 Toma de muestras en Planteles mineros

Los muestreos deben asegurar que el número y las actividades de los microorganismos no se alteren de manera no cuantificable, durante la recolección y conservación de la muestra. Las muestras deben ser representativas y no estar contaminadas con microorganismos extraños [7]. Los puntos de muestreo se seleccionaron de tal manera que el número de puntos fuese representativo y fueron tomadas según lo descrito por Arias y Piñeros [7].

En el primer plantel se seleccionaron 4 puntos de muestreos y en el segundo plantel 3 puntos (Figura 2a-2g) distribuidos en: lodo en dique de cola, agua residual, cola o lama fresca, cola o lama vieja, agua residual estancada, sedimentos de drenaje y suelo de colas.



Figura 2. Puntos de muestreo en los planteles mineros y fragmento de muestras recolectadas. (a, b y e) aguas residuales. (c, d y g) colas. (f)

materia orgánica. (h) muestras en tubos cónicos y bolsas de muestras estériles. (i) muestras en placas de Petri.

Del muestreo se obtuvo un total de 66 muestras (Figura 2h y 2i). Una vez en el laboratorio, las muestras fueron incubadas obteniéndose a las 24 horas crecimientos microbianos como los que se muestran en la Figura 2i, en los que es posible observar el crecimiento de diversos microorganismos en la misma placa de cultivo, tal y como ha sido obtenido en trabajos previos [15; 4; 7].

3.2 Cultivos axénicos obtenidos

Con la utilización de siembra en estría y por inmersión que son técnicas para el aislamiento y purificación de microorganismos, se logró aislar un total de 66 cultivos axénicos de microorganismos. Los resultados obtenidos en los muestreos se resumen en las Tabla 1, donde se detalla el número total de aislados por punto de muestreo y se definen cuantos cultivos son bacterianos y cuantos fúngicos. Sin embargo, este número no representa el total de microorganismos que subsisten en el ecosistema muestreado, sino solo aquellos que pudieron ser cultivados mediante los medios utilizados.

Tabla 1. Resumen cuantitativo de los cultivos axénicos bacterianos y fúngicos aislados de los 7 puntos muestreados en los planteles mineros, naturaleza y estado de la muestra y su respectiva codificación.

Naturaleza de la muestra	Estado	Código	No. Hongos		
			No. Bacterias	Filamentosos	Levaduriformes
Lodo en dique de cola	Líquido	MI	5	2	1
Agua residual	Líquido	MII	4		
Cola o lama fresca	Sólido	MIII	9	4	1
Cola o lama vieja	Sólido	MIV	7	5	1
Agua residual estancada	Líquido	MV	3		
Sedimentos de drenaje	Sólido	MVI	7	4	
Suelo de colas	Sólido	MVII	10	3	
		Total	45	18	3

Cuando se siembran las muestras de suelo, agua o alimentos que contienen numerosas clases de microorganismos en placas de Petri con medio sólido, se formarán colonias que serán copias exactas del microorganismo original, dichas colonias microbianas a menudo tienen un aspecto que distingue los microorganismos entre sí. La mayor parte de los trabajos bacteriológicos requieren cultivos puros y de esta manera se podrán estudiar las características macroscópicas, microscópicas, fisiológicas, etc. de un microorganismo en particular [16]. Algunos autores han realizado trabajos tendientes a la obtención de cultivos axénicos de microorganismos partiendo de diferentes ecosistemas, como: Moreno y Albarracín [10], aislaron microorganismos a partir de diferentes muestras naturales (aguas, suelo, sedimentos de ríos o lagos, etc.), Páramo-Aguilera, *et al.*, [4;15], aislaron microorganismos procedentes de reservas biológicas, ríos contaminados, queseras artesanales, minerías artesanales, biopelículas en monumentos patrimoniales, etc.

Los resultados obtenidos que se detallan en las Tabla 1, muestran que en los planteles mineros fue posible obtener un total de 45 aislados bacterianos, 18 aislados de hongos filamentosos y 3 aislados de hongos levaduriformes, siendo la cola o lama fresca y suelos de colas los puntos con mayor cantidad de aislados; solamente en los lodos en dique de cola, cola o lama fresca y cola o lama vieja se logró aislar hongos levaduriformes y en el punto de cola o lama vieja se aislaron la mayor cantidad de hongos filamentosos. Del mismo modo en Páramo-Aguilera, *et al.*, [4] y [15], obtuvieron cantidades similares de aislados de monumentos patrimoniales. Por otra parte, Moreno y Albarracín no reportan en su publicación la cantidad de aislados obtenidos. Arias y Piñero [7], trabajaron solo con muestras de suelo, de las cuales reportan un total de 64 aislados de hongos filamentosos. Todo esto soporta lo que ha sido corroborado en estas y otras investigaciones, que conducen a afirmar que la cantidad y los tipos de aislados que se obtengan de dichos procesos está en relación directa con los tipos de medios de cultivo que se empleen y las condiciones generales de trabajo de las que se disponga para el desarrollo de la investigación.

3.3 Pruebas morfológicas desarrolladas para la identificación microbiana

En su mayoría los procesos de identificación microbiana se realizan mediante métodos convencionales que se basan en las características fenotípicas macroscópicas y microscópicas observables, porque su realización y costo los hace más accesibles [13].

En la figura 3 se presenta un fragmento de las observaciones macroscópicas y microscópicas realizadas a todos los cultivos axénicos, de los cuales se seleccionaron 23 para identificación final por vía molecular, tomando en cuenta como único criterio de selección las características morfológicas observadas.

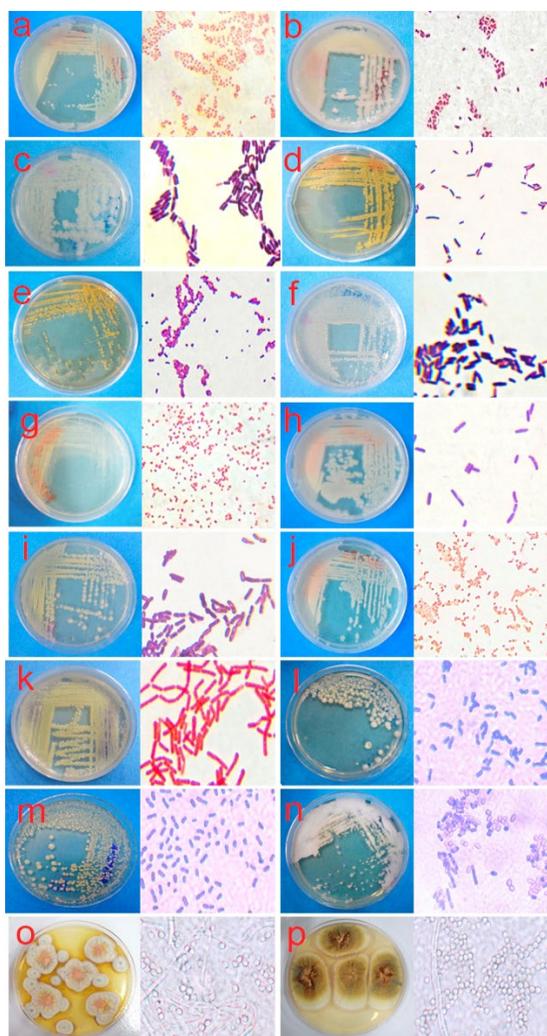


Figura 3. Fragmento de las observaciones macro y microscópica de los cultivos axénicos de bacterias, hongos levaduriformes y filamentosos. (a.) *Acinetobacter calcoaceticus*: MVIA-01. (b.) *Aeromonas hydrophila*: MVB-02. (c.) *Bacillus cereus*: MVIC-08. (d.) *Bacillus marisflavi*: MIVB-01. (e.) *Exiguobacterium aurantiacum*: MVIB-02. (f.) *Terribacillus saccharophilus*:

MIVB-02. (g.) *Acinetobacter* sp: MIIB-04. (h.) *Bacillus* sp: MVIC-09. (i.) *Enterobacter* sp: MIVC-13. (j.) *Pantoea* sp: MIIIA-03. (k.) *Pseudomonas* sp: MIIIC-07, (l.) *Cybelindnera jadinii*: MIVD-09. (m.) *Pichia jadinii*: MID-08. (n.) *Trichosporon asahii*: MIIID-11. (o.) *Penicillium janthinellum*: MVID-11. (p.) *Penicillium simplicissimum*: MVID-03.

Cada día, los estudios de biología molecular constituyen el soporte de toda investigación en el campo taxonómico y biológico, tanto de bacterias como de cualquier otro microorganismo. Sin embargo, se considera que aún estas técnicas moleculares no deben ser abordadas en forma única, sino en conjunto, con ensayos complementarios, que puedan permitir tener un conocimiento más integral con respecto a los caracteres morfológicos, fisiológicos y genotípicos de los microorganismos [18]. En esta coyuntura Páramo-Aguilera, *et al.*, [19], realizaron estudios centrados en la caracterización del microbiota fúngico cultivable de pátinas biológicas seleccionadas en los alrededores del castillo de Chapultepec en México y de la cual presentan la identificación de 34 aislados de hongos representativos, seleccionados en base a características macroscópicas diferenciales distintivas de un total de 300 hongos, se caracterizaron utilizando enfoques morfológicos y moleculares. Por otra parte, Flores y Roque [12], mediante la investigación realizada, caracterizaron microbiológica y molecularmente la diversidad microbiana cultivable de bioinsumos comerciales producidos artesanalmente en Nicaragua.

Parte de los resultados de este trabajo se muestra en la Figuras 3, donde se observa cómo se clasifican según la tinción de Gram los parte de los 18 aislados bacterianos seleccionados, de los cuales 11 son de forma bacilar; 7 Gram positivos y 4 Gram negativos y 7 son de forma cocácea; 2 Gram positivos y 5 Gram negativos. Del mismo modo, se realizó la tinción de Gram para los 25 aislados bacterianos no identificados por vía molecular, de los cuales 14 son de forma bacilar; 10 Gram positivos y 4 Gram negativos y 13 son de forma cocácea; 7 Gram positivos y 6 Gram negativos. En lo que respecta a las pruebas morfológicas desarrolladas para la identificación de hongos levaduriformes y filamentosos permitió la determinación de muchas características macro y microscópicas, como se muestran la figura 3, se registraron las características de los hongos levaduriformes (color, forma, consistencia y tamaño de las células) las cuales se asemejan a las colonias bacterianas a excepción de *Trichosporon asahii* que al contar con pseudohifas sus colonias se asemejan a las de

hongos filamentosos, siendo esta una de las características que aproximó a su identificación molecular. También, se muestran las características de los hongos filamentosos (color en placa, apariencia del micelio y forma de espora), en el caso de *Penicillium janthinellum* y *Penicillium simplicissimum* presentan semejanzas en el crecimiento en placa, además de que sus esporas se asemejan porque ambos microorganismos pertenecen al mismo género, pero se diferencian en el color en placa.

Páramo-Aguilera, *et al.*, [19], muestran como basándose en la combinación de metodologías fenotípicas y moleculares es posible diferenciar comunidades de hongos, en su trabajo revelaron la presencia de una comunidad de hongos representada principalmente por los géneros *Fusarium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Mucor*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis* y el dimorfo *Aureobasidium*, junto con la levadura *Rhodotorula*. En el trabajo de Flores y Roque [12], se utilizaron las pruebas microbiológicas como un apoyo preliminar para identificar finalmente por herramientas moleculares bacterias del género *Bacillus subtilis* y *cereus*, además de cepas fúngicas a nivel de género como *Penicillium*. En definitiva, la observación de las características macro y microscópicas constituyen herramientas valiosas para completar la identificación molecular, al conocer la morfología de las colonias, las células o las esporas que en ocasiones permite llegar a identificar bacterias y hongos a nivel de género y a veces hasta nivel de especie. Cabe destacar que a este nivel de diferenciación sobre la morfología microbiana se puede declarar de manera presuntiva que se contaba con bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* y algunos hongos como *Trichosporum*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, basado únicamente en sus características morfológicas lo que posteriormente fue confirmado mediante la identificación por vía molecular.

3.4 Identificación molecular de microorganismos seleccionados

Las bacterias y los hongos seleccionados según su característica morfológica se identificaron molecularmente por las secuenciaciones de los ADN a como se definió en el acápite 2.5 de la metodología, posteriormente se realizaron los análisis de las secuencias recibidas del servicio contratado en Macrogen y de esta

manera fue posible construir los árboles filogenéticos de los cuales se muestra una fracción en las figuras 4 y 5.

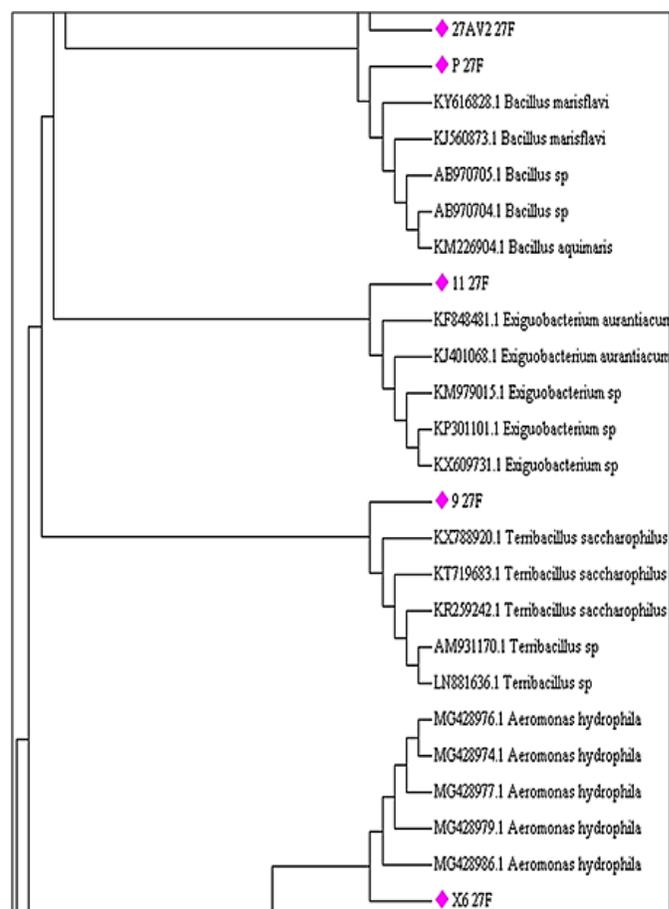


Figura 4. Fragmento del árbol de relaciones evolutivas de las bacterias, utilizando el método del vecino más cercano en programa MEGA 7. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de probabilidad máxima compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis involucró 105 secuencias de nucleótidos. Hubo un total de 393 posiciones en el conjunto de datos final.

Mediante el análisis filogenético basado en las figuras 4 y 5, se obtuvo la identificación final para los 23 aislados de microorganismos seleccionados, identidades que se resumen en las Tabla 2 y 3, donde se presentan los resultados de géneros y/o especies, vecino más cercano, máximo score y % de máxima identidad, resultante del análisis de las secuencias y por medio del análisis de los árboles filogenéticos de las bacterias y los hongos, elaborados en el programa MEGA 7 utilizando el método del vecino más cercano y la información de las secuencias del GenBank que presentaban mayor homología con cada secuencia en estudio.

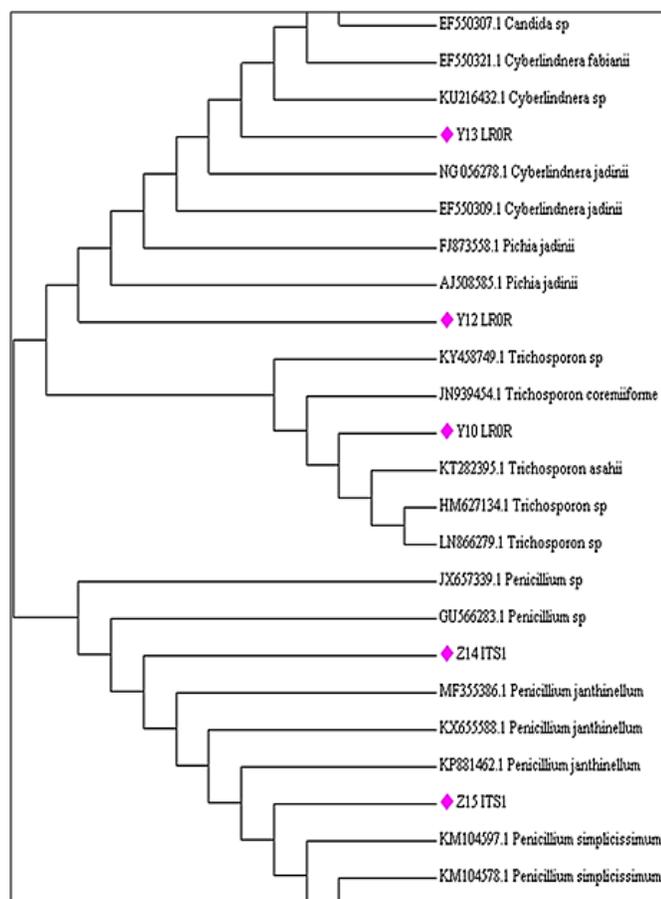


Figura 5. Árbol de relaciones evolutivas de los hongos, utilizando el método del vecino más cercano en programa MEGA 7. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de probabilidad máxima compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis involucró 30 secuencias de nucleótidos. Hubo un total de 401 posiciones en el conjunto de datos final.

Los métodos moleculares como PCR agilizan la identificación analizando regiones específicas dentro de los genes. La secuenciación del gen ADN ha servido como una importante herramienta para determinar las relaciones filogenéticas entre los microorganismos, siendo una herramienta útil para el estudio filogenético y para la identificación rutinaria de aislados microbianos [13]. Actualmente se desarrollan numerosas investigaciones dentro del marco de la identificación molecular, en la mayoría de los casos estos trabajos ofrecen resultados convincentes sobre la identidad de sus aislados como en el estudio desarrollado por Flores y Roque [12], donde obtuvieron exitosos resultados

identificando molecularmente a 15 microorganismos aislados a partir de bioinsumos. Ruiz [11], identificó 21 cepas bacterianas aisladas de restos de vegetales hortícolas sometidos a compostaje. Álvarez, *et al.*, [20], realizaron aislamientos de microorganismos de la rizosfera de plantas de vainilla en un cultivo piloto ubicado en el municipio de Sopetrán (Antioquia, Colombia) y posteriormente seleccionaron 52 morfotipos para su identificación molecular por secuenciación de las regiones ITS y 16S del ADN ribosomal para hongos y bacterias, respectivamente.

En el presente trabajo, por medio de la identificación molecular se identificaron a nivel de género y especie 18 cepas bacterianas y 5 cepas fúngicas seleccionadas. En la figura 4 y 5 se observa como algunas de las bacterias y hongos secuenciados se agrupan correctamente en clados muy bien diferenciados para cada género y su especie. De esta manera fue posible determinar claramente géneros bacterianos como *Bacillus sp*, *Exiguobacterium sp*, *Terribacillus sp* y *Aeromonas sp* y géneros fúngicos como *Cybelindnera sp*, *Pichia sp*, *Trichosporon sp* y *Penicillium sp*. Adicionalmente en la tabla 2 y 3 se detallan los resultados obtenidos de la identificación molecular donde se aprecia como en la mayoría de los casos, cada bacteria confirma su identidad con un 99% y cada hongo con un 100% en comparación con las secuencias contenidas en el Genbank.

De manera general el proceso de identificación permitió obtener una amplia gama de géneros y especies como las bacterias: (1) *Acinetobacter calcoaceticus*, (1) *Aeromonas hydrophila*, (4) *Bacillus cereus*, (1) *Bacillus marisflavi*, (1) *Exiguobacterium aurantiacum* y (1) *Terribacillus saccharophilus* y a nivel de género solo se identificaron los tipos; (2) *Acinetobacter sp*, (3) *Bacillus sp*, (1) *Enterobacter sp*, (1) *Halomonas sp* y (2) *Pseudomonas sp*. Se identificaron hongos como: (1) *Cybelindnera jadinii*, (1) *Pichia jadinii*, (1) *Trichosporon asahii*, (1) *Penicillium janthinellum* y (1) *Penicillium simplicissimum*. Todo lo antes expuesto, permito que a la fecha se cuente con 6 especies bacterianas y 5 especies fúngicas diferentes plenamente identificadas, quedando aun por precisar la identificación de las bacterias que están identificadas hasta el nivel de género.

Tabla 2. Identificación molecular de 18 cepas de bacterias cultivables procedentes de los planteles mineros

BACTERIAS IDENTIFICADAS EN LOS PLANTELES MINEROS				
Código microorganismos	Vecino más cercano (Numero de Acceso)	Max. Score	Ident. máx (%)	Identidad final
MIIIA-01	<i>Bacillus cereus</i> (KY649378.1)	2174	99	<i>Bacillus cereus</i>
MIIIA-03	<i>Halomonas sp</i> (DQ129699.1)	536	84	<i>Halomonas sp</i>
MIIB-04	<i>Acinetobacter sp</i> (KM108508.1)	1653	99	<i>Acinetobacter sp</i>
MIIC-06	<i>Bacillus cereus</i> (HE660034.1)	1879	95	<i>Bacillus cereus</i>
MIIC-07	<i>Pseudomonas sp</i> (KT321870.1)	2132	99	<i>Pseudomonas sp</i>
MIVB-01	<i>Bacillus marisflavi</i> (KY616828.1)	1916	97	<i>Bacillus marisflavi</i>
MIVB-02	<i>Terribacillus saccharophilus</i> (KX788920.1)	1855	99	<i>Terribacillus saccharophilus</i>
MIVB-11	<i>Bacillus cereus</i> (MH010164.1)	2080	100	<i>Bacillus cereus</i>
MIVC-13	<i>Enterobacter sp</i> (GQ284539.1)	2025	100	<i>Enterobacter sp</i>
MVB-02	<i>Aeromonas hydrophila</i> (MG428986.1)	2128	99	<i>Aeromonas hydrophila</i>
MVIA-01	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (KY091892.1)	2180	99	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
MVIB-02	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i> (KF848481.1)	1820	96	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>
MVIB-07	<i>Acinetobacter sp</i> (KR072554.1)	2150	99	<i>Acinetobacter sp</i>
MVIC-08	<i>Bacillus cereus</i> (KY622400.1)	2161	99	<i>Bacillus cereus</i>
MVIC-09	<i>Bacillus sp</i> (KY622516.1)	1916	100	<i>Bacillus sp</i>
MVIA-01	<i>Bacillus sp</i> (GQ340502.1)	2213	99	<i>Bacillus sp</i>
MVIIC-03	<i>Pseudomonas sp</i> (MG674361.1)	2012	99	<i>Pseudomonas sp</i>
MVIIB-08	<i>Bacillus sp</i> (KY681738.1)	1696	97	<i>Bacillus sp</i>

Tabla 3. Identificación molecular de 5 cepas de hongos cultivables procedentes de los planteles mineros

Código microorganismo	Vecino más cercano (Numero de Acceso)	Max. Score	Iden. máx (%)	Identidad final
HONGOS LEVADURIFORMES				
MID-08	<i>Pichia jadinii</i> (AJ508585.1)	660	88	<i>Pichia jadinii</i>
MIID-11	<i>Trichosporon asahii</i> (KT282395.1)	1840	99	<i>Trichosporon asahii</i>
MIVD-09	<i>Cyberlindnera jadinii</i> (NG056278.1)	1886	100	<i>Cyberlindnera jadinii</i>
HONGOS FILAMENTOSOS				
MVID-03	<i>Penicillium simplicissimum</i> (KM104597.1)	942	100	<i>Penicillium simplicissimum</i>
MVID-11	<i>Penicillium janthinellum</i> (MF355386.1)	837	99	<i>Penicillium janthinellum</i>

De todos los aislados que quedaron a nivel de género, solamente se destacan los géneros *Halomonas* y *Enterobacter*, ya que los demás géneros están contenidos entre los identificados a nivel de especie, pudiendo encontrarse alguna especie nueva entre las que están por completar hasta especie o repetirse alguna de las que ya se tiene.

En relación con la presencia de las cepas identificadas en los planteles mineros, todas las especies identificadas han sido aisladas previamente en ambientes característicos de estos procesos [11]. Las especies de *Bacillus* que en esta investigación reúnen un total de 7 cepas identificadas, tienen la capacidad para sobrevivir a las variaciones térmicas debido a su capacidad para formar endosporas, por ello, constituye uno de los

géneros bacterianos dominantes en la mayoría de los componentes ambientales, los resultados de Flores y Roque, [12], reportan que de 14 aislados bacterianos, 10 corresponden al género *Bacillus* de los tipos *cereus*, *flexus*, *pumilus*, *megaterium* y *subtilis*. Otro de los géneros con mayor incidencia es el de *Pseudomonas* de las cuales se reportan 2 cepas mediante este trabajo y que también formaron parte de los resultados obtenidos por Ruiz [11]. Álvarez, *et al.*, [20], por análisis de secuencias ITS identificaron cuatro hongos pertenecientes a las especies *Plectosphaerella cucumerina*, *Penicillium griseofulvum*, *Bionectria ochroleuca* y *Aspergillus fumigatus* y dos hongos pertenecientes a los géneros *Fusarium* y *Phoma*. Los resultados de las pruebas morfológicas corroboraron los obtenidos por vía molecular, ejemplo, para el MIIID-11 se presumía la identidad a nivel de género como *Trichosporon* (antes de su identificación) y al ser comparados se confirmó que pertenecen a las especies *Trichosporon asahii*; así mismo, sucedió para los hongos filamentosos. Este trabajo, al igual que los trabajos previamente citados, muestra que las pruebas morfológicas unidas a pruebas moleculares constituyen un vehículo adecuado para la identificación microbiana.

4. Conclusiones

Como producto del proceso de aislamiento, selección y purificación de microorganismos, se obtuvo un total de 45 bacterias, 18 hongos filamentosos y 3 hongos levaduriformes aislados en los planteles mineros, para un total de 66 aislados obtenidos en este proyecto. Las pruebas morfológicas confirmaron los resultados de la aplicación de las herramientas moleculares de los 23 aislados enviados a secuenciar. Por la vía molecular se llegó a identificar especies bacterianas y fúngicas pertenecientes a: (1) *Acinetobacter calcoaceticus*, (1) *Aeromonas hydrophila*, (4) *Bacillus cereus*, (1) *Bacillus marisflavi*, (1) *Exiguobacterium aurantiacum*, (1) *Terribacillus saccharophilus*, (1) *Cyberlindnera jadinii*, (1) *Pichia jadinii*, (1) *Trichosporon asahii*, (1) *Penicillium janthinellum* y (1) *Penicillium simplicissimum*. Además de las especies identificadas, se determinó la identidad de 9 bacterias a nivel de género pertenecientes a: (2) *Acinetobacter sp*, (3) *Bacillus sp*, (1) *Enterobacter sp*, (1) *Halomonas sp* y (2) *Pseudomonas sp*. Al final se obtuvo un total de 6 especies bacterianas y 5 especies fúngicas diferentes, que están plenamente identificadas, quedando aun por precisar la identificación

de las que están identificadas hasta el nivel de género. Los resultados obtenidos de la identificación molecular en la mayoría de los casos, para bacterias confirman su identidad con un 99 % y para hongos se confirmó su identidad con un 100% en comparación con las secuencias obtenidas del Genbank del NCBI, lo que se traduce en un proceso de identificación de calidad. Finalmente, el desarrollo de este trabajo en bioprospección microbiana aportó un buen número de microorganismos identificados y que han sido reportados en la literatura científica como útiles para el desarrollo de diversos bioprocesos, abriendo las puertas para futuras y diversas investigaciones en biotecnología que podrían mejorar al agro, el ambiente y la industria nacional.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Programa de Investigación Estudios Nacionales y Servicios Ambientales (PIENSA-UNI) bajo la dirección de las Ing. Larisa Korsak; por haber sido contraparte de este proyecto y en cuyas instalaciones se encuentra el laboratorio de biotecnología, en el cual se desarrolló este trabajo de investigación. El reconocimiento a la Universidad Nacional de Ingeniería, quien por medio de su vicerrectoría de Investigación y Desarrollo ha facilitado el aporte financiero para llevar a cabo el proyecto.

REFERENCIAS

- [1] R. González. Biotecnología, Historia y Desarrollo: Situación Actual en Nicaragua. II CONGRESO MULTIDISCIPLINARIO E INTERNACIONAL DE AGROBIOTECNOLOGÍA. Conferencia llevada a cabo en Nicaragua. 2011.
- [2] A. M. Cotes., L. S. Barrero., F. Rodríguez., M. V. Zuluaga y H Arévalo. *Bioprospección para el desarrollo del sector agropecuario de Colombia*. Bogotá, (Cundinamarca): CORPOICA. (1ª Ed.). pp.10Cap. 1, ISBN: 978-958-740-130-1, 2012.
- [3] MARENA. Ministerio del Ambiente y de los Recursos Naturales. V Informe Nacional de Biodiversidad. Managua, Nicaragua. 2014,
- [4] L. Páramo-Aguilera., E. Fonseca-Cruz., H. Delgado-Silva., C. Ríos-Guevara y K. Cabistán-calderón. La bioprospección en Nicaragua: avances en la búsqueda de aplicaciones agrícolas, industriales y ambientales. *Nexo Revista Científica*, 31(2), 89-103. ISSN: E1995-9516, 2018.
- [5] INTA, Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria. Estado, Prioridades y necesidades para el manejo sostenible del suelo en Nicaragua. Managua, Nicaragua. 2013.
- [6] J. Pacheco y A. Cabrera, Cuerpos de aguas subterráneas. En F, Bautista. (2ª Ed.), *TÉCNICAS DE MUESTREO PARA*

- MANEJADORES DE RECURSOS NATURALES. DF, México: Universidad Nacional Autónoma de México. Cap. 2, pp. 76. ISBN: 978-607-02-2127-9, 2011.
- [7] E. Arias, y P. Piñeros, *Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz verde* (Tesis de grado). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 2008.
- [8] D. Hernández, y S. Loaiza. *Selección de un método para la conservación y preservación de Actinomicetos aislados del suelo del jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira*. (Trabajo de grado). Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia, 2014.
- [9] L. López-Jácome., M. Hernández-Duran., C. Colín-Castro., S. G. Ortega-Peña, Cerón-González y R. Franco-Cendejas. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en Discapacidad Medigraphic*, 3(1), 10-18. URL:<http://medigraphic.com/rid> 2014.
- [10] J. Moreno y V. Albarracín. Aislamiento, cultivo e identificación de microorganismos ambientales a partir de muestras naturales. *Reduca (Biología). Serie Microbiología*, 5(5), 79-93. ISSN: 1989-3620, 2012.
- [11] A. Ruiz, *Producción de lipasas de interés ambiental por microorganismos aislados a partir de material vegetal sometido a compostaje* (Trabajo de grado). Escuela Politécnica Superior y Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Almería, España. 2014.
- [12] M. Flores y E. Roque, *Aislamiento y caracterización microbiana (microbiológica y molecular) en la búsqueda de Bacillus subtilis a partir de bioinsumos comerciales y pruebas de antagonismo frente a hongos fitopatógenos* (Tesis de grado). Universidad Nacional de Ingeniería. Managua, Nicaragua. 2017.
- [13] G. Bou, A. Fernández, C. García, J. Sáez, y Valdezate, S. *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601-608. doi: 10.1016/j.eimc.2011.03.012. 2011.
- [14] C. Rodríguez. *Evaluación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal en Tomate (Solanum lycopersicum) variedad Santa Clara, aislados de residuos Ligno Celulósicos de Higuierilla (Ricinus communis)*. (Trabajo de grado). Universidad Católica de Manizales, Colombia. 2013.
- [15] L. Páramo-Aguilera., J. Narváez-Zapata y E. De la Cruz. *Aislamiento e identificación de microorganismos en biopelículas provenientes del Castillo de Chapultepec, Ciudad de México. Nexa Revista Científica*, 24(2), 1-9. ISSN: L1818-6742, 2011.
- [16] G.J. Tortora., B.R. Funke, y C.L. Case. *Introducción a la Microbiología*. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana. Cap. 3, 6 y 10, pp.70, 173 y 284. ISBN: 978-950-06-0740-7. 2007.
- [17] J. Moreno y V. Albarracín. Aislamiento, cultivo e identificación de microorganismos ambientales a partir de muestras naturales. *Reduca (Biología). Serie Microbiología*, 5(5), 79-93. ISSN: 1989-3620. 2012.
- [18] M. Mendoza. Importancia de la identificación de levaduras. Importancia de la identificación de levaduras. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25(1),103-117. ISSN: 1315-2556. 2005.
- [19] L. Páramo-Aguilera. *Caracterización de comunidades microbianas con potencial biotecnológico para la prevención del deterioro estructural* (Tesis doctoral). Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica, Reynosa, Tamaulipas. 2012.
- [20] C. Álvarez, N. Osorio y M. Marín. Identificación molecular de microorganismos asociados a la rizosfera de plantas de vainilla en Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 18(2), 293-305. ISSN: 0120-548X. 2013.