

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**



**BIOPROSPECCIÓN MICROBIANA PARA EL DESARROLLO DE APLICACIONES
AMBIENTALES**

TRABAJO DE DIPLOMA PRESENTADO POR:

Br. Cesia Krisell Ríos Guevara

PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

INGENIERO QUÍMICO

TUTOR:

PhD. Leandro Páramo Aguilera

Managua, Nicaragua

Octubre 2019

AGRADECIMIENTO

A Dios todo poderoso ya que ha sido fiel a sus promesas escritas en las sagradas escrituras y me ha ayudado a cada instante de mi vida dándome la salud, la fuerza y el ánimo para culminar esta etapa de mi carrera profesional. Sólo a Él sea toda la gloria, la honra y la alabanza por los siglos de los siglos Amén.

A mis padres: Jorge Ríos Acosta y María Adela Guevara Guevara quienes incesantemente me brindaron su apoyo económico, moral y espiritual; por sus oraciones y por todo el esfuerzo que han hecho para que yo tuviese la oportunidad de prepararme profesionalmente.

A mis dos hermanos por ayudarme incondicionalmente siempre que lo necesité.

A mi tutor Ph.D. Leandro Páramo por darme un voto de confianza para llevar a cabo este proyecto, por su abundante paciencia, por su constante guía, por sus consejos y por haber compartido sus conocimientos con mi persona.

Al PIENSA por permitirnos el uso de sus laboratorios para el desarrollo de esta investigación, en especial al personal del Laboratorio de microbiología de las aguas y a mis compañeros del laboratorio de Biotecnología del PIENSA-UNI por facilitar el trabajo en equipo y un ambiente laboral agradable.

Cesia Krisell Ríos Guevara

DEDICATORIA

A Dios que cada día me muestra sus misericordias regalándome la salvación por medio de su hijo Jesucristo, por concederme una hermosa familia, y por permitirme coronar mi carrera profesional. Todo se lo debo a Él.

A mis padres: Jorge Ríos Guevara y María Adela Guevara Guevara por haberme inculcado el temor y la obediencia a Dios por sobre todas las cosas, por ser un ejemplo de superación en la vida y por ser las personas que más amo en este mundo.

A mis dos hermanos por estar siempre conmigo en los momentos difíciles y por ocupar un lugar muy preciado y valioso en mi corazón.

A mis abuelos que ya descansan en paz quienes siempre soñaron con verme graduada de la universidad.

Finalmente, a todos aquellos que me dieron una palabra de ánimo durante los momentos más difíciles en la elaboración de este proyecto.

Cesia Krisell Ríos Guevara

RESUMEN

La biotecnología ambiental está íntimamente relacionada con la bioprospección microbiana ya que esta se basa en el estudio y gestión de las comunidades de microorganismos para obtener productos de calidad y proporcionar servicios a la comunidad y al ambiente. De modo que la bioprospección aporta las bases científicas de muchos de los procesos que se desarrollan en la biotecnología ambiental y esta última a su vez precisa la resolución de los problemas ambientales mediante la aportación de importantes avances en procesos, nuevas especies, y métodos para los ecólogos microbianos. Mediante esta investigación se caracterizó morfológica y molecularmente la diversidad microbiana cultivable de muestras provenientes de la Reserva Natural Chocoyero-El Brujo (Ticuan-tepe-Managua) y del Río Chiquito en León en la búsqueda de cepas nativas potencialmente útiles para el desarrollo ingenieril de procesos biotecnológicos de interés ambiental.

Para dar cumplimiento a los objetivos propuestos, se aplicaron técnicas de aislamiento y purificación (siembra masiva, por extensión en placa, vertido en placa, por agotamiento de estría cruzada en placa y por punción), además se desarrolló un reconocimiento de las características morfológicas de todos los microorganismos mediante la tinción de Gram observada al microscopio con objetivo de 100x para bacterias, la observación de esporas con objetivo de 50x para hongos filamentosos y la observación de tinción simple con objetivo de 50x para levaduras. Así como pruebas moleculares (secuenciación de las regiones 16S para bacterias e ITS y D1/D2/D3 para hongos) de 29 aislados seleccionados según sus características morfológicas (19 bacterias, 8 hongos filamentosos, 2 hongos levaduriformes), con vistas a lograr su identificación final. Se realizó una revisión bibliográfica en bancos de datos internacionales para establecer las aplicaciones biotecnológicas y que estaban científicamente fundamentadas (Reportadas) para las cepas identificadas.

Al finalizar el presente trabajo, habiéndose seleccionado 9 puntos de muestreo para la Reserva Natural Chocoyero-El Brujo y 6 puntos para el Río Chiquito; se obtuvo un total de 104 aislados microbianos, que mediante las pruebas morfológicas mostraron ser 73 aislados bacterianos, 29 aislados de hongos filamentosos y 2 aislados de hongos levaduriformes. La aplicación de las técnicas morfológicas y los métodos moleculares a una fracción de lo aislado (29 aislados, entre bacterianos y fúngicos), permitió identificar finalmente 9 especies y 1 subespecie de bacterias diferentes y 7 especies fúngicas distintas, además de las identificados hasta nivel de géneros bacterianos *Bacillus sp* (3), *Enterobacter sp* (2), *Erwinia sp*, *Acinetobacter sp*, *Micrococcus sp* y hongos tipo *Aspergillus sp*, *Humicola sp* y *Lenzites sp*. Entre los identificados completamente podemos citar los siguientes: bacterias como *Alcaligenes faecalis subsp faecalis*, *Pantoea dispersa*, *Aeromonas hydrophila*, *Exiguobacterium profundum*, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus sciuri*, *Pseudomonas mendocina*, *Enterobacter cloacae* (2), *Bacillus flexus* y *Bacillus cereus*; hongos como *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Chaetomium brasiliense*, *Penicillium citrinum*, *Chaetomium aureum*, *Candida orthopsilosis* y *Pichia kudriavzevii*.

En cuanto a las aplicaciones biotecnológicas para los microorganismos identificados en este trabajo, permiten plantear para el ambiente: la remoción de metales pesados como Cd, Pb, Zn, Cr, Cu, As, y Hg mediante las bacterias *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas mendocina*, *Staphylococcus sciuri*, *Acinetobacter sp*, *Enterobacter sp*, *Micrococcus sp*; y los hongos *Penicillium citrinum*, *Chaetomium aureum*, *Lenzites sp* y *Pichia kudriavzevii*. Para la biorremediación de hidrocarburos y sus derivados: *Alcaligenes faecalis subsp faecalis*, *Bacillus cereus*, *Exiguobacterium profundum*, *Acinetobacter sp*, *Bacillus sp*, *Micrococcus sp*; y los hongos *Trichoderma longibrachiatum*, *Penicillium citrinum* y *Aspergillus sp*. Para la biodegradación de colorantes en aguas residuales se identificaron microorganismos como: *Micrococcus sp*, *Candida orthopsilosis* y *Pichia kudriavzevii*. Para la promoción del crecimiento vegetal y el biocontrol de plagas de diversos cultivos o en sus cosechas se han registrado bioprocesos con bacterias y hongos como: *Alcaligenes faecalis subsp faecalis*, *Bacillus megaterium*, *Enterobacter cloacae*, *Pantoea dispersa*, *Staphylococcus sciuri*, *Enterobacter sp*, *Bacillus cereus*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Chaetomium brasiliense*, *Penicillium citrinum*, *Chaetomium aureum* y *Candida orthopsilosis*.

Como resultados adicionales a los objetivos de esta investigación se documentaron microorganismos con aplicaciones de utilidad industrial dirigidos a la producción y biosíntesis de enzimas y síntesis biológica de nanopartículas a partir de microorganismos. Entre los microorganismos que ejercen estas funciones se pueden mencionar los siguientes: *Aeromonas hydrophila*, *Alcaligenes faecalis subsp faecalis*, *Exiguobacterium profundum*, *Pantoea dispersa*, *Bacillus sp*, *Enterobacter sp*, *Micrococcus sp*, *Aspergillus sp*, *Humicola sp*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Penicillium citrinum*, *Candida orthopsilosis* y *Pichia kudriavzevii*. En conclusión, la realización de esta investigación en bioprospección microbiana en la búsqueda de microorganismos útiles para el desarrollo de aplicaciones medio ambientales, aportó una gama de microorganismos plenamente identificados y que han sido reportados en la literatura científica como útiles para el desarrollo de diversos bioprocesos.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTO	I
DEDICATORIA	II
RESUMEN.....	III
I. INTRODUCCIÓN	12
II. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo General.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
III. MARCO TEORICO	15
3.1 Bioprospección	15
3.1.1 Bioprospección en Nicaragua	15
3.2 Microorganismos	15
3.2.1 Clasificación de los microorganismos	16
3.2.2 Bacterias	17
3.2.3 Hongos.....	21
3.3 Cultivo de microorganismos en el laboratorio.....	23
3.3.1 Requerimientos nutricionales de los microorganismos	23
3.3.2 Aislamiento de microorganismos	23
3.3.3 Siembra de microorganismos.....	24
3.3.4 Purificación o aislamiento.....	26
3.4 Identificación de microorganismos por métodos moleculares	26
3.4.1 Extracción de ADN.....	26
3.4.2 Amplificación de ADN.....	27
3.4.3 Secuenciación de ADN	27
3.4.4 Análisis Bioinformático	27
3.4.5 Análisis Filogenético	28
3.5 Biotecnología	29
3.5.1 Biotecnología Ambiental.....	30
IV. METODOLOGÍA	31
4.1 Lugar de Estudio.....	31
4.2 Descripción de los sitios de muestreo	31
6.3 Diseño Metodológico	32
6.3.1 Recolección de muestras	33
6.3.2 Aislamiento de la población microbiana cultivable	34

6.3.3	Pruebas morfológicas para la identificación microbiana	39
6.3.4	Identificación molecular.....	40
6.3.5	Conservación de los microorganismos.....	43
6.3.6	Búsqueda de aplicaciones ambientales de los microorganismos identificados	43
V.	RESULTADOS y DISCUSIÓN	44
7.1	Bioprospección microbiana	44
7.1.1	Toma de Muestra	44
7.1.2	Aislamiento y Purificación de Microorganismos	47
7.1.3	Pruebas morfológicas para la caracterización microbiana	49
7.1.4	Identificación molecular de microorganismos seleccionados	63
7.1.5	Aplicaciones biotecnológicas ambientales de cepas microbianas autóctonas identificadas.....	71
7.2	Publicaciones generales	87
VIII.	CONCLUSIONES	88
IX.	RECOMENDACIONES.....	91
X.	BIBLIOGRAFÍA	92
XI.	ANEXOS.....	112

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Árbol filogenético de los seres vivos deducido de la secuenciación comparativa del gen del RNA ribosómico	16
Figura 2. Distintas formas bacterianas observadas en el microscopio	18
Figura 3. Técnica de tinción de Gram	19
Figura 4. Estudio macroscópico de colonias bacterianas respecto a su forma, elevación y borde.....	20
Figura 5. Diferentes formas de células levaduriformes observadas en el microscopio	22
Figura 6. Diferentes formas de esporas que presentan los hongos filamentosos en el examen microscópico de los cultivos.....	22
Figura 7. Secuenciación del gen del RNA ribosómico y filogenia.	26
Figura 8. Lugar de muestreo en la Reserva Natural El Chocoyero / El brujo.....	32
Figura 9. Vista panorámica del Río Chiquito- León.	32
Figura 10. Sistema de muestreo aleatorio simple en Río Chiquito.	33
Figura 11. Preparación de medios de cultivos	35
Figura 12. Técnica de aislamiento por siembra masiva en superficie.....	36
Figura 13. Proceso de inoculación (siembra) por extensión en placa para el recuento de células viables.....	37
Figura 14. Esquema del proceso de inoculación por la técnica de vertido en placa. En este método las colonias se forman tanto en la superficie como en el interior del agar.....	37
Figura 15. Siembra por agotamiento de estría cruzada en placa.	38
Figura 16. Electroferograma de secuencia editada	41
Figura 17. Secuencia de nucleótidos en formato FASTA.	41
Figura 18. Listado de secuencias de microorganismos con mayor porcentaje de identidad respecto a la secuencia en estudio mostrado por BLAST (NCBI)	42

Figura 19. Ventana mostrada en el alineamiento múltiple usando Clustal W versión 1.4 incluido en el programa Bioedit v7.0.9	42
Figura 20. Se presenta los puntos de muestreo en la Reserva Natural El Chocoyero..	45
Figura 21. Se presenta los puntos de muestreo en Río Chiquito.....	46
Figura 22. Morfología macroscópica de bacterias y su respectiva morfología microscópica en Tinción de Gram.....	51
Figura 23. Morfología macroscópica de bacterias y su respectiva morfología microscópica en Tinción de Gram.....	52
Figura 24. Crecimiento de hongos filamentosos y la observación de esporas al microscopio.....	57
Figura 25. Crecimiento de hongos levaduriformes y la observación de células al microscopio.....	58
Figura 26. Fragmento de relaciones evolutivas de bacterias.....	64
Figura 27. Fragmento de relaciones evolutivas de hongos.....	69

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los microorganismos según su organización celular.....	17
Tabla 2. Cantidad de cultivos axénicos bacterianos y fúngicos, naturaleza, estado de la muestra y su respectiva codificación, aislados en los nueve puntos de muestreos definidos en Reserva Natural El Chocoyero.....	47
Tabla 3. Cantidad de cultivos axénicos bacterianos y fúngicos, naturaleza, estado de la muestra y su respectiva codificación, aislados en los seis puntos de muestreos definidos en el Río Chiquito.	48
Tabla 4. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de bacterias aisladas de la Reserva Natural El Chocoyero.....	53
Tabla 5. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de bacterias aisladas de Río Chiquito.	55
Tabla 6. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de Hongos filamentosos aislados de la Reserva Natural El Chocoyero.....	59
Tabla 7. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de Hongos levaduriformes aislados de Reserva Natural El Chocoyero y Río Chiquito.....	61
Tabla 8. Identificación molecular de 10 cepas de bacterias autóctonas cultivables procedentes del muestreo en la Reserva Natural El Chocoyero como resultado de la corrección de errores, análisis de secuencias y análisis de árboles filogenéticos construido con el programa MEGA 7.	65
Tabla 9. Identificación molecular de 9 cepas de bacterias autóctonas cultivables procedentes del muestreo en Río Chiquito, como resultado de la corrección de errores, análisis de secuencias y análisis de árboles filogenéticos construido con el programa MEGA 7.	66
Tabla 10. Identificación molecular de 10 cepas de Hongos autóctonos cultivables procedentes de los muestreos en Reserva Natural El Chocoyero Y Río Chiquito como resultado de la corrección de errores, análisis de secuencias y análisis de árboles filogenéticos construido con el programa MEGA 7.	70
Tabla 11. Aplicaciones biotecnológicas de interés ambiental de especies bacterianas aisladas en Reserva Natural El Chocoyero y Río Chiquito	73
Tabla 12. Aplicaciones biotecnológicas de interés ambiental de géneros bacterianos aislados en la Reserva Natural El Chocoyero y Río Chiquito	77
Tabla 13. Aplicaciones biotecnológicas de interés ambiental de especies y géneros de Hongos aislados en Reserva Natural El Chocoyero.	79
Tabla 14. Aplicaciones biotecnológicas de interés ambiental de especies de Hongos levaduriformes aislados en Reserva Natural El Chocoyero y Río Chiquito.....	83

LISTADO DE ANEXOS

Anexo 1. Descripción de la codificación de microorganismo utilizada.	112
Anexo 2. Listado en tabla del código de los cultivos puros aislados de Reserva Natural El Chocoyero.....	113
Anexo 3. Listado en tabla del código de los cultivos puros aislados de Río Chiquito.	114
Anexo 4. Se muestra la morfología macroscópica de bacterias en placa Petri y su respectiva morfología microscópica en tinción de Gram obtenidas de Reserva Natural El Chocoyero.....	115
Anexo 5. Se muestra la morfología macroscópica de bacterias en placa Petri y su respectiva morfología microscópica en tinción de Gram obtenidas de Río Chiquito	116
Anexo 6. Se muestra la morfología macroscópica de bacterias en placa Petri y su respectiva morfología microscópica en tinción de Gram obtenidas de Río Chiquito.	117
Anexo 7. Se muestra la morfología macroscópica de bacterias en placa Petri y su respectiva morfología microscópica en tinción de Gram obtenidas de Río Chiquito	118
Anexo 8. Se muestra la morfología macroscópica de bacterias en placa Petri y su respectiva morfología microscópica en tinción de Gram obtenidas de Río Chiquito	119
Anexo 9. Tabla de Caracterización macroscópicas y microscópicas de bacterias aisladas de Reserva Natural El Chocoyero.	120
Anexo 10. Tabla de Caracterización macroscópicas y microscópicas de bacterias aisladas de Río Chiquito.	122
Anexo 11. Tabla de caracterización macroscópica y microscópica de los cultivos puros de hongos filamentosos aislados de Reserva Natural El Chocoyero.....	126
Anexo 12. Se muestra el crecimiento en placa de hongos filamentosos en medio PDA y su observación de esporas obtenidos en Reserva Natural El Chocoyero .	128
Anexo 13. Tabla de caracterización macroscópica y microscópica de los cultivos puros de hongos filamentosos aislados de Río Chiquito..	129
Anexo 14. Se muestra el crecimiento en placa de hongos filamentosos en medio PDA y su observación de esporas obtenidos en Río Chiquito	131
Anexo 15. Secuencias corregidas y alineadas en formato FASTA de bacterias identificadas vía molecular.....	132
Anexo 16. Árbol filogenético de bacterias.....	139
Anexo 17. Secuencias corregidas y alineadas en formato FASTA de hongos identificadas vía molecular.....	142

Anexo 18. Árbol filogenético de hongos..... 145

I. INTRODUCCIÓN

El gran desarrollo científico y tecnológico, particularmente en el ámbito de las ciencias de la vida, que se ha dado desde los años cincuenta del siglo pasado, nos ha permitido aplicar principios científicos y de ingeniería a la transformación de materiales por acción de agentes biológicos (microorganismos, enzimas, células, etc.) con el fin de proveer a nuestra sociedad de bienes y servicios. Actualmente nos referimos al conjunto de estos tipos de actividades humanas con el término biotecnología (Blanch, 2010).

A nivel mundial, el interés por la Biotecnología Ambiental y su impacto sobre la actividad económica es creciente, dado al continuo incremento de la contaminación ambiental y la creación de nuevas normativas ambientales. En base a las normativas se han transformado los procesos productivos en procesos más económicos y menos contaminantes al medio ambiente. Respecto a lo anterior, en la mayoría de los casos la utilización de microorganismos para tratar problemas ambientales ha sustituido los métodos no biológicos. Por tal razón la biotecnología ambiental está íntimamente relacionada con la bioprospección microbiana ya que esta se basa en el estudio y gestión de las comunidades de microorganismos para obtener productos de calidad y proporcionar servicios a la comunidad y al medio ambiente. De modo que la bioprospección aporta las bases científicas de muchos de los procesos que se desarrollan en la biotecnología ambiental y esta última a su vez precisa la resolución de los problemas ambientales mediante la aportación de avances en procesos, nuevas especies, y métodos para los ecólogos microbianos (Bécares, 2014).

Sobre la base de las consideraciones anteriores, Piñero (2013) afirma que, según investigaciones realizadas en diferentes países Latinoamericanos, la Bioprospección microbiana ha resultado beneficiosa en la búsqueda de solución a problemas medio ambientales (biorrecuperación de suelos, biosaneamiento de efluentes, enzimas de restricción y microorganismos usados como fijadores de nitrógeno), así como una fuente de ingresos económicos. Como muestra de lo expuesto anteriormente, se conoce que la incineración de 1 kg de materia orgánica (seca) cuesta diez veces más que su eliminación biológica en un reactor. Además, los microorganismos son adaptables y pueden degradar una inmensa diversidad de moléculas bajo condiciones muy diferentes (Bécares, 2014).

En otros países se han elaborado numerosas investigaciones dirigidas al estudio de microorganismos que poseen aplicaciones medio ambientales. Entre ellas se destacan, Demergasso *et al.* (2003) y Martínez-Alonso y Gaju (2005) realizaron estudios en los estratos inferiores donde encontraron bacterias fototróficas anaerobias. Los resultados a los estudios de este tipo de ecosistemas microbianos sugirieron su aplicación en las prácticas de biorrecuperación, muy particularmente en aquellos afectados por los derrames de petróleo. Por otro lado, Vázquez *et al.* (2014), realizaron una investigación donde los microorganismos: *Bacillus cereus*, *Acinetobacter iwoffii*, *Lactobacillus agilis*, *Penicillium sp* y *Cladosporium sp* fueron capaces de reducir las concentraciones de cromo (VI) en lodos residuales

provenientes de curtiembres. Igualmente, Abad (2017) identificó ocho géneros de hongos filamentosos con potencial biorremediador en suelos contaminados por sustancias agroquímicas: *Penicillium sp*, *Mucor sp*, *Scytalidium sp*, *Aspergillus sp*, *Neosartorya sp*, *Eurotiomycetes sp*, *Talaromyces sp* y *Fusarium sp*.

Ante la situación planteada, se puede notar que Nicaragua es un país muy valioso en materia de bioprospección ya que su posición geográfica le otorga condiciones favorables para el desarrollo de la biodiversidad, cuenta con 68 ecosistemas lo cual representa el 60 por ciento del total del istmo centro americano (Loásiga y Cisne, 2001). Con el paso del tiempo los ecosistemas han sufrido contaminación principalmente provocada por el ser humano, creando las condiciones necesarias para el desarrollo de distintos microorganismos, los cuales muy pocas veces son estudiados y aprovechados. No obstante, en Nicaragua el desarrollo científico y de capacidades e infraestructura para la investigación ha sido subvalorado y no se ha implementado una planificación estratégica para un avance significativo y progresivo de la ciencia y la tecnología dentro de las universidades e instituciones del país. Esta situación es más crítica aún en ciencias como la biotecnología (González, 2011).

En Nicaragua son pocos los registros de investigaciones de bioprospección en los que se encuentra la investigación realizada por Roustan *et al.* (2000) desde el año 1999, el centro de biología molecular de la universidad centro americana (CBM-UCA), inicio un proyecto de investigación en Bioprospección. Dicho proyecto se basó en la búsqueda, identificación y caracterización de enzimas de restricción (ER) presentes en zonas cafetaleras y bosques de pino de Nueva Segovia y zonas azucareras y volcánicas del occidente del país.

Tomando como punto de partida la necesidad de desarrollar la biotecnología en Nicaragua aportando avances en la misma, el presente proyecto se dirigió al aislamiento y caracterización morfológica y molecular de la biodiversidad microbiana cultivable proveniente de la Reserva Natural Chocoyero-El Brujo por ser un lugar boscoso y poco intervenido por el hombre y el Río Chiquito el cual presentaba índices de contaminación ambiental. Para esto se realizó un proceso de aislamiento y purificación de los microorganismos, así como pruebas moleculares (secuenciación del ADNr 16S para bacterias, de la región ITS1 para hongos y la región D1/D2/D3 para levaduras) de aislados seleccionados para su respectiva identificación a nivel de género y/o especie, finalizando con la correlación mediante la revisión de artículos científicos entre aislados identificados y aplicaciones biotecnológicas ya definidas que los mismos puedan tener en la solución de las distintas problemáticas ambientales. Además, dicha investigación pretende incentivar o promover mediante la investigación de la biotecnología, la Bioprospección en Nicaragua.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Caracterizar morfológica y molecularmente, microorganismos aislados provenientes del Rio Chiquito de la ciudad de León y de la Reserva Natural El Chocoyero-El brujo de Ticuantepe, Managua, que muestran diferentes índices de contaminación ambiental y sitios con poca degradación como producto de las actividades humanas, para sugerir posibles aplicaciones ambientales.

2.2 Objetivos específicos

- Obtener muestras de sitios previamente seleccionados para su inoculación en medios como: Agar nutritivo, medio LB, agar PDA, y algún otro que se determine útil al cumplimiento del objetivo general.
- Identificar los aislados obtenidos por medio de métodos morfológicos y moleculares.
- Establecer una correlación mediante la revisión de bancos de datos internacionales entre las cepas autóctonas identificadas y aplicaciones biotecnológicas de interés ambiental ya reportadas en la literatura científica.

III. MARCO TEORICO

3.1 Bioprospección

La Bioprospección según la Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL, 2007) se define generalmente como la búsqueda sistemática y desarrollo de nuevos recursos biológicos los cuales pueden tener valor comercial. Esto incluye todos los organismos, genes, compuestos químicos, extractos, micro y macroorganismos y otros productos de la naturaleza. El objetivo de la Bioprospección incluye el uso sostenible de recursos biológicos a través de la biotecnología y del desarrollo científico y socioeconómico de recursos de países y comunidades locales.

3.1.1 Bioprospección en Nicaragua

En Nicaragua no se cuenta con un sistema nacional que desarrolle la bioprospección con el fin de explotar nuestros ecosistemas para la creación de productos patentables y lucrativos por las compañías farmacéuticas y biotecnológicas. Por otro lado, se sabe que existen universidades que desarrollan investigación básica y pocas veces aplicada. Sin embargo, hay laboratorios privados y científicos que de forma individual se dedican a la colecta de especies silvestres y/o domesticadas para añadirle un valor agregado y venderlos a laboratorios extranjeros los cuales no presentan registros legales del uso que se le da a esa diversidad genética.

Se puede decir que las actividades de bioprospección científica, es decir, aquellas en las que participan científicos nacionales y algunas veces extranjeros, solo son registradas en el centro de trabajo o en la institución que impulsó la gira de bioprospección, y pocas veces la información se distribuye para conocerse. La prospección en el país se ha enfocado en el conocimiento y conservación del germoplasma, por cuanto ha sido una investigación para determinar la diversidad genética existente y sus formas de conservarla. Por tal razón, es necesario proponer acciones y líneas de trabajo en función de conocer y explotar los compuestos químicos de estos recursos genéticos, en función de resolver los agudos problemas que atraviesa la población (Loáisiga y Cisne, 2001).

3.2 Microorganismos

Los microorganismos son organismos de pequeño tamaño, observables únicamente con la ayuda del microscopio que pueden ser uní o pluricelulares, eucariotas o procariotas y son estudiados específicamente por una rama de la ciencia biológica que es la microbiología (Sánchez *et al.*, 2017).

En 1978 se descubren un nuevo tipo de organismos llamado arqueobacterias que son evolutivamente distantes tanto de las bacterias como de los eucariotas. En la

década de los 80's surgió una revolución en cuanto al sistema de clasificación de los seres vivos mediante diversos análisis filogenéticos y el estudio de macromoléculas de ácido ribonucleico (ARN). Estos cambios y nuevas propuestas han sido posibles gracias al estudio y comparación de secuencias de macromoléculas conservadas en todos los seres vivos como el ARN ribosomal (especialmente el ARNr 16S) y algunas proteínas conservadas como los factores traduccionales EF-G y EF-Tu (Woese *et al.*, 1990). Mediante estos estudios se definieron tres linajes evolutivos (**Figura 1**) que en la clasificación de los seres vivos reciben el nombre de Dominios (superior a Reino). Estos tres Dominios evolutivos corresponden a: Eukarya, Arquea y Bacteria (Parra, 2015).

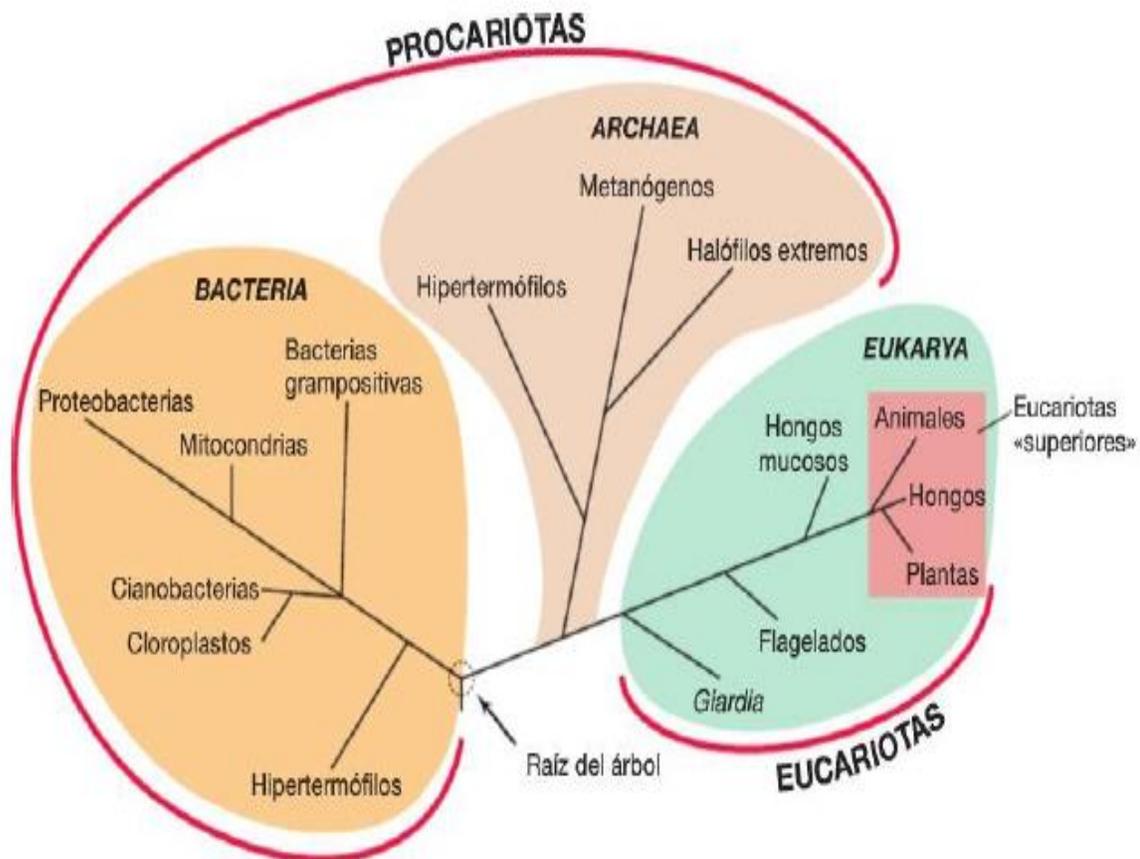


Figura 1. Árbol filogenético de los seres vivos deducido de la secuenciación comparativa del gen del RNA ribosómico (Madigan *et al.*, 2009).

3.2.1 Clasificación de los microorganismos

Hoy día se distinguen dos tipos de células, unas complejas o eucariotas y otras simples o procariotas. Los seres vivos se clasifican en función del tipo celular y, más recientemente, mediante la aplicación de técnicas de biología molecular por sus relaciones filogenéticas (Liébana y Pontón, 2002). En base a lo anterior se describe la clasificación de los microorganismos según su organización celular en la **Tabla 1**

Tabla 1. Clasificación de los microorganismos según su organización celular.

Clases de Microorganismos		
<i>Microorganismos con organización celular</i>		
<ul style="list-style-type: none"> • Poseen membrana celular • Tienen como ácidos nucleicos tanto ADN como ARN. 	Procariotas	Arqueobacterias Eubacterias
	Eucariotas	Protozoos Algas microscópicas Hongos microscópicos
<i>Microorganismos sin organización celular</i>		
<ul style="list-style-type: none"> • No poseen membranas • Nunca están presentes los dos ácidos nucleicos juntos (ADN o ARN). • Son parásitos estrictos de los que tienen organización celular, pues carecen de metabolismo. 		Virus Viroides Priones

Fuente: Tortora *et al.* (2007)

3.2.2 Bacterias

Las bacterias son organismos unicelulares que se reproducen generalmente por fisión binaria (una célula se parte y se convierte en dos células idénticas) y generalmente necesitan de un medio de crecimiento rico en proteínas y con ambiente de alta humedad relativa para su reproducción y diseminación. Bajo condiciones ambientales favorables de temperatura, humedad y nutrientes, las bacterias pueden dividirse cada 20 minutos. Sin embargo, este exagerado ritmo de crecimiento puede verse limitado por la falta de nutrientes, acumulación de desechos metabólicos y otros factores limitantes (Lastres y Soza, 2009).

Morfología microscópica bacteriana

La forma de las bacterias al microscopio está determinada por la rigidez de su pared celular. Básicamente, se diferencian según su forma en cocos (esféricas u ovaladas), bacilos (cilíndrica o de bastones; rectos o curvos) y espirilos (espiral) (**Figura 2**). Las bacterias pueden mantenerse unidas unas con otras después de la división celular, pero conservando siempre la independencia celular. Si el plano de división es único, podemos encontrar diplococos o cocos en cadena (microorganismos del género *Streptococcus*). Si los planos de división son muchos, los cocos pueden agruparse en tétradas o en racimos (*Staphylococcus*). Los bacilos pueden ser muy cortos (cocobacilos) o muy largos. Sus extremos pueden ser redondeados o rectos; pueden estar aislados, en cadenas, en filamentos o formando letras chinas (*Corynebacterium*). Los bacilos curvos pueden tener forma de coma (*Vibrio cholerae*) (Pérez y Mota, 2006).

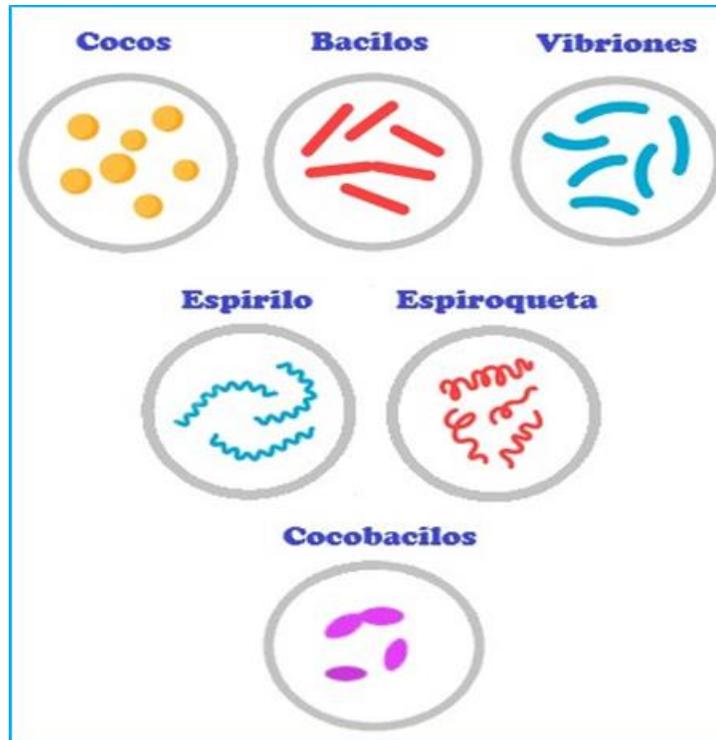


Figura 2. Distintas formas bacterianas observadas en el microscopio (Fuente propia).

Los microorganismos se pueden visualizar utilizando un microscopio óptico o un microscopio electrónico. En general, el microscopio óptico se usa para observar células intactas a relativamente bajos aumentos, mientras que el microscopio electrónico se emplea para observar estructuras internas o detalles superficiales de las células a grandes aumentos (Madigan *et al.*, 2009). El más utilizado en el laboratorio es el microscopio óptico de campo claro.

Para facilitar la observación de las bacterias se pueden utilizar colorantes para teñir las células. Los colorantes son compuestos orgánicos y cada tipo de colorante tiene afinidad por determinados componentes celulares. Muchos colorantes utilizados con frecuencia en microbiología están cargados positivamente (son básicos o catiónicos) y se combinan fuertemente con constituyentes celulares cargados negativamente, como los ácidos nucleicos y los polisacáridos ácidos. Como ejemplo de colorantes básicos se puede citar el azul de metileno, el cristal violeta y la safranina. Como las superficies celulares están por lo general cargadas negativamente, estos colorantes se combinan con estructuras de la superficie de las células y, por tanto, son excelentes colorantes de aplicación general (Madigan *et al.*, 2009).

Prueba morfológica de Tinción Gram

Las tinciones que tiñen de diferente color a células que son de diferentes tipos se llaman tinciones diferenciales. Una tinción diferencial muy importante y ampliamente usada en microbiología es la denominada tinción de Gram. Dependiendo del

resultado de esta tinción las bacterias pueden dividirse en dos grandes grupos: las grampositivas aparecen de color morado y las gramnegativas de color rosa. Esta diferencia en la respuesta a la tinción de Gram se debe a diferencias en la estructura de la pared celular de las células grampositivas y gramnegativas (Madigan *et al.*, 2009).

En la **Figura 3** encontramos un esquema basado en el procedimiento de la tinción de Gram. El procedimiento se inicia al tomar con un asa una porción de cultivo bacteriano, seguidamente se deposita una gota de agua y se extiende sobre un portaobjetos dejando secar y fijar por calor las células bacterianas (frotis). Luego, se tiñe con un colorante básico que normalmente es el cristal violeta y después de 1 minuto se lava con agua. Posteriormente, se agrega solución de yodo que a su vez forma un complejo con el cristal violeta insoluble en agua y sólo medianamente soluble en alcohol o acetona. Después de 1 minuto se lava y se procede a decolorar con alcohol-acetona dejándolo actuar por 15 segundos. Las células Gram positivas retienen el complejo colorante-yodo, por lo que las vemos de color morado-azules; y las células Gram negativas son decoloradas por el alcohol, por lo que se hacen visibles mediante la coloración de contraste con safranina dejándola reposar por 1 minuto. Por último, se lava con agua y se deja secar para observar la muestra en el microscopio (Arias *et al.*, 2012).

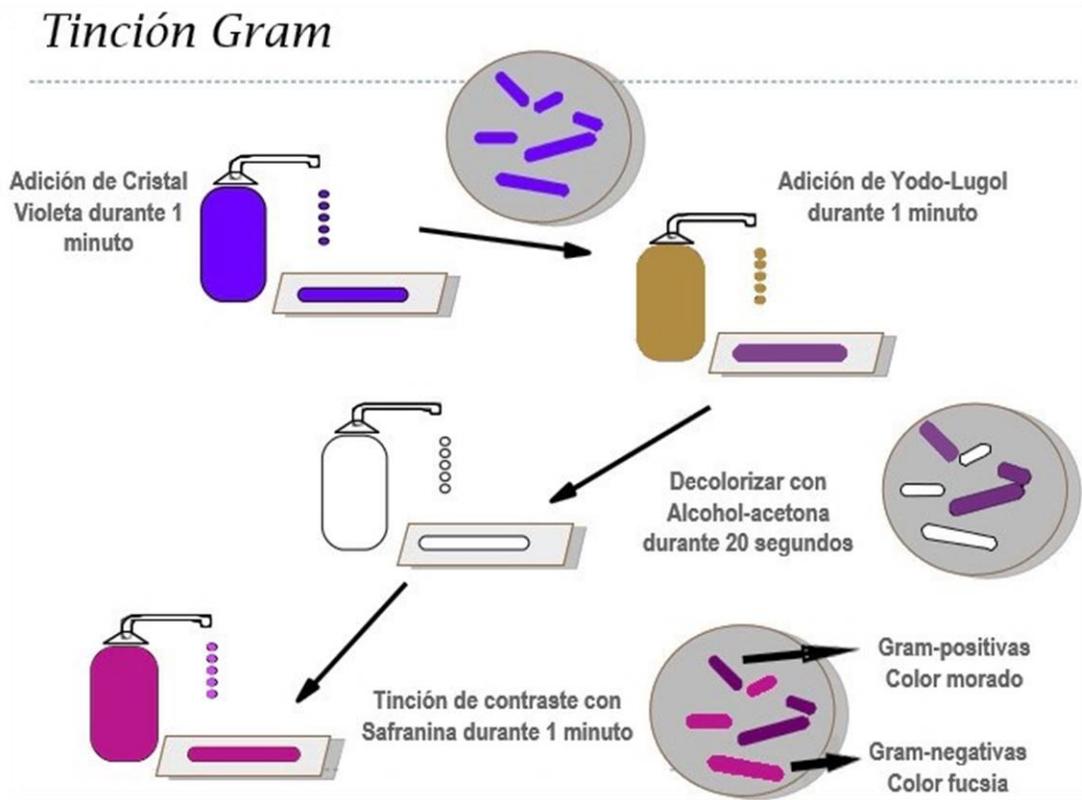


Figura 3. Técnica de tinción de Gram (Fuente propia).

Morfología macroscópica bacteriana

En la evaluación de la morfología de la colonia se consideran el tamaño, la forma, el color (pigmento), el aspecto de la superficie de la colonia y todo cambio que el desarrollo de la colonia produce en el medio de agar que la rodea (Forbes *et al.*, 2007).

Granados y Villaverde (2003) afirman que las colonias de bacterias se pueden caracterizar de la siguiente forma:

Tamaño de las colonias: mediano (1 a 2 mm de diámetro), grande (4 a 6 mm), puntiformes (aproximadamente 0.5 mm).

Forma de las colonias: espesor (planas, elevadas, semiconvexas, cóncavas, semicóncavas, semiesféricas, en meseta, etc.), bordes (lobuladas, onduladas, rizoides, dentadas, filamentosas, espiculadas, etc.).

Superficie de la colonia: lisa, rugosa, plana, pulvinada, umbilicada, etc.

Consistencia de la colonia: duras, viscosas, mucosas, secas, muy secas, cremosas, etc.

La **Figura 4** muestra la representación esquemática de la forma, borde y elevación de los diferentes tipos de bacterias.

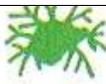
Forma	Borde	Elevación
 Puntiforme	 Entero	 Plana
 Circular	 Ondulado	 Elevada
 Filamentosa	 Lobulado	 Convexa
 Irregular	 Erosionado	 Pulvinada
 Rizoide	 Filamentoso	 Umbonada
 Fusiforme	 Rizado	

Figura 4. Estudio macroscópico de las colonias respecto a su forma, elevación y borde (Granados y Villaverde, 2003).

3.2.3 Hongos

Los hongos son organismos eucariotas unicelulares (levaduras) y pluricelulares (Hongos filamentosos o mohos), cuya pared celular no es de celulosa sino de quitina. Su nutrición es heterótrofa, es decir, que no pueden producir sus propios alimentos como lo hacen las plantas, sino que descomponen la materia orgánica por medio de enzimas, absorbiendo las sustancias nutritivas. La mayoría de los hongos son saprófitos que se desarrollan sobre materia orgánica en descomposición y otros son parásitos que producen enfermedades en el hombre y otros animales y vegetales. Su reproducción puede ser sexual o asexual (gemación, esporulación, fragmentación) (Prats, 2005).

Los hongos filamentosos (también conocidos como mohos), son microorganismos aerobios. En medios de cultivos sólidos y también sobre cualquier superficie en la que se desarrollen por ejemplo frutas u otros alimentos, producen colonias algodonosas o pulverulentas que son muy características. Al microscopio óptico, los hongos filamentosos presentan una estructura denominada "talo" y que suele estar constituida por una serie de filamentos denominados "hifas", que pueden ser ramificadas y tabicadas, formando, en su conjunto, una estructura denominada "micelio".

Los hongos que presentan crecimiento levaduriforme generalmente dan lugar a colonias lisas que recuerdan a las bacterianas en medios de cultivo sólidos y son anaerobios facultativos. Dichas colonias están formadas por agregados de células individuales (3-10 x 5-30 μm) denominadas levaduras. Los hongos levaduriformes se dividen por gemación o por fisión binaria. En algunos casos las células hijas no se separan de la célula madre, formándose cadenas cortas denominadas pseudohifas. Los hongos que presentan este tipo de crecimiento, denominado pseudomicelio, dan lugar a colonias similares a las que producen los hongos levaduriformes en medios sólidos (Pontón *et al.*, 2002).

Morfología macroscópica de Hongos

Los hongos levaduriformes dan lugar a colonias cremosas, opacas, con un diámetro de 3 a 7 mm, y en general de crecimiento relativamente rápido (24-72 horas). Los hongos filamentosos dan lugar a colonias de mayor tamaño (10-30 mm), que crecen radialmente de modo progresivo, de aspectos inconfundibles, vellosas, algodonosas o pulverulentas, de vistosos y variados colores, que deben ser observadas en el anverso y reverso de la placa Petri, donde puede verse si el pigmento difunde al medio. Su crecimiento es más lento que el de las levaduras (3-20 días), pero pueden llegar a invadir toda la superficie del medio de cultivo. El color, forma y tamaño de las colonias puede variar según el medio de cultivo utilizado (Prats, 2005).

Morfología microscópica de Hongos

El examen microscópico de los cultivos se efectúa de modo diferente según se trate de colonias pertenecientes a hongos levaduriformes o filamentosos. Las levaduras se observan efectuando una suspensión de la colonia en una gota de solución

salina o agua estéril depositada sobre un portaobjetos. Seguidamente se contrasta con azul de lactofenol o cristal violeta para observarse en fresco entre portaobjetos y cubreobjetos como una tinción simple (Moreno y Albarracín, 2012).

Una levadura típica tiene forma de ovoide pero también las hay alargadas, esféricas, de forma de pera o de limón o incluso triangulares (**Figura 5**). Cada especie tiene su forma característica, pero en un cultivo puro se puede observar que existe cierta variación en el tamaño y la forma de las células, variación que puede depender de la edad del cultivo y del medio donde se encuentren (García, 2004).

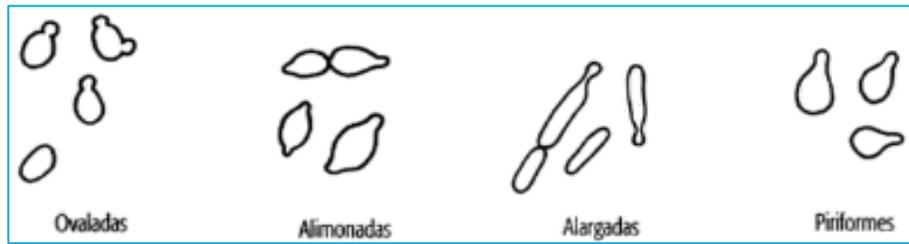


Figura 5. Diferentes formas de células levaduriformes observadas en el microscopio (García, 2004).

La identificación de los hongos filamentosos se lleva a cabo fundamentalmente por la morfología microscópica del micelio, de las esporas y de las estructuras en las que se forman, que suelen ser características de género o incluso de especie, así como se refleja en la **Figura 6**. Para esto se utiliza la técnica de cinta pegante que consiste en hacer un doblez de una tira de 4 cm, con el lado adhesivo hacia afuera sosteniendo con pinzas y presionando contra la superficie de la colonia del hongo, a estudiar. El micelio aéreo, se une a la superficie adhesiva, por lo cual, es fácilmente separado de la colonia y finalmente se transfiere a un portaobjeto (Escobar *et al.*, 2012).

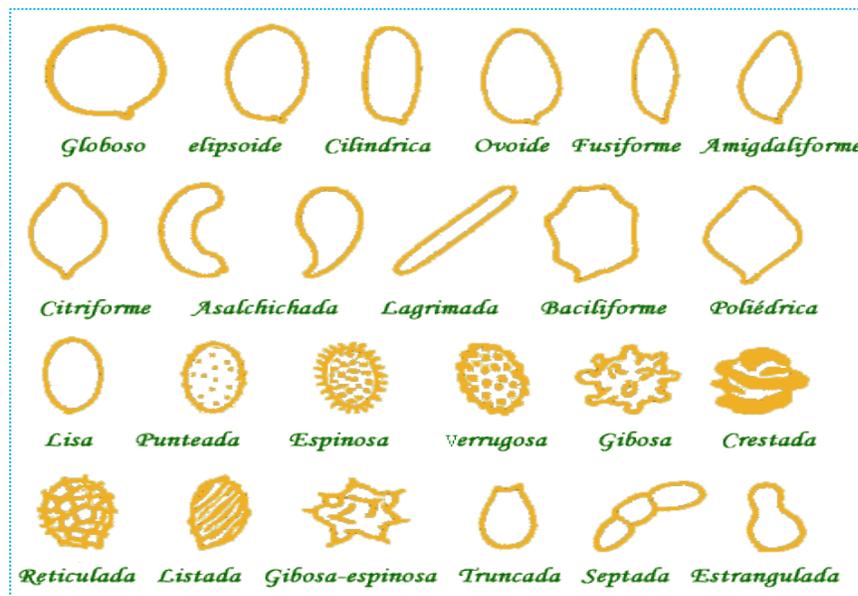


Figura 6. Diferentes formas de esporas que presentan los hongos filamentosos en el examen microscópico de los cultivos (Moreno *et al.*, 1986).

3.3 Cultivo de microorganismos en el laboratorio

El cultivo es el procedimiento mediante el cual se promueve el crecimiento de los microorganismos, al proporcionarles las condiciones ambientales adecuadas: nutrientes, pH, temperatura, aereación, humedad, presión hidrostática, presión osmótica y radiación (Junco y Rodríguez, 2001).

3.3.1 Requerimientos nutricionales de los microorganismos

Como todos los organismos vivos, los microorganismos requieren ciertos nutrientes básicos y factores físicos para el mantenimiento de su vida, estas necesidades varían según el tipo de microorganismo y es necesario conocerlas para cultivarlos en el laboratorio (Rojas, 2011). La provisión de nutrientes se lleva a cabo en el laboratorio mediante el uso de medios de cultivos artificiales, los cuales deben aportar los siguientes nutrientes a los microorganismos: fuente de carbono, fuente de nitrógeno, azufre y fósforo, elementos trazas y vitaminas. (Junco y Rodríguez, 2001). Por otra parte, para que los microorganismos crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial se debe proporcionar una serie de condiciones físicas como son: temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno adecuado, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad (Casado *et al.*, 2012).

En microbiología se emplean dos clases de medios de cultivo, los medios definidos y los medios complejos. En un medio definido se conoce la composición química exacta y los medios complejos emplean hidrolizados de productos animales o vegetales, como caseína (la proteína de la leche), carne, soja, extracto de levaduras u otras sustancias muy nutritivas, sin embargo, no están definidas químicamente. (Madigan *et al.* 2009). Por otro lado, los medios de cultivo pueden ser líquidos o sólidos si se añade al medio líquido algún agente solidificante.

3.3.2 Aislamiento de microorganismos

En la naturaleza los microorganismos se presentan como cultivos mezclados que contienen una gran variedad de géneros y especies. Para poder estudiar las especies individuales es necesario aislarlos en cultivo puro; que se define como un cultivo que contiene microorganismos de una sola especie.

La obtención de un cultivo puro, a partir de una población mixta, se lleva a cabo en dos etapas:

- ✓ Aislamiento: La muestra debe diseminarse de manera tal que los diferentes microorganismos queden lo suficientemente separados sobre la superficie de un medio de cultivo sólido, de modo que después de la incubación ellos formen colonias visibles aisladas.
- ✓ Trasplante: Luego de tener las colonias aisladas, estas deben transferirse a otras placas para ser cultivadas por separado.

Se considerará que se ha obtenido un cultivo puro, cuando al realizar este proceso, todas las colonias obtenidas presenten las mismas características. El medio de cultivo utilizado en el proceso de aislamiento dependerá, entre otros factores, de los requerimientos nutricionales de los microorganismos que se espera aislar y de la presencia de microorganismos que, por sus características y/o por la cantidad en que se encuentren en la muestra, dificulten la obtención del microorganismo objeto del aislamiento (Pedrique de Aulacio y Gutiérrez de Gamboa, 2008).

3.3.3 Siembra de microorganismos

En Microbiología se entiende como siembra al proceso mediante el cual se deposita una pequeña cantidad de microorganismos (inóculo) en un medio de cultivo estéril. El inóculo puede proceder de una muestra o de un cultivo previo. La finalidad de la siembra es permitir la multiplicación de los microorganismos, al proporcionarles las condiciones óptimas para su desarrollo (UNALM, 2013).

Las reglas fundamentales para efectuar la siembra exigen:

- ✓ Que se efectúen asépticamente.
- ✓ Que los medios de cultivo y el instrumental a utilizar estén esterilizados.
- ✓ Que se realicen solo los manipuleos indispensables.
- ✓ Que se trabaje fuera de toda corriente de aire. De ser posible utilizando un mechero o bien Flujo laminar.

Siembra de bacterias

De acuerdo con Santambrosio y Ortega (2009) existen diferentes métodos de siembra de acuerdo al medio utilizado y los requerimientos del microorganismo a estudiar. En medios sólidos podemos utilizar los siguiente:

- ✓ **Siembra de vertido en placa y extensión en placa**

En estos métodos, las suspensiones de células microbianas se diluyen antes de su siembra en placa. Se siguen estas técnicas cuando la muestra contiene tantos microorganismos, que la dilución no se puede realizar en una sola etapa. Por ejemplo, una suspensión con mil millones de células por mililitro debe ser diluida 10 veces para obtener una suspensión con un centenar de células por mililitro, Por tanto, se realizan diluciones seriadas (en varias etapas), normalmente de diez en diez.

- a. En el método de vertido en placa: las muestras diluidas se mezclan con agar fundido y se vierten en placa. Algunas colonias quedarán embebidas en el

agar y otras crecerán en la superficie. Las colonias superficiales se extenderán y serán más grandes.

- b. En el método (extensión en placa): las muestras diluidas se siembran directamente sobre la superficie del agar en la placa, extendiéndolas con ayuda de un asa de Drigalsky de cristal estéril. La suspensión se absorbe en el agar, dejando las células microbianas sobre la superficie. En ambas técnicas las placas se incuban hasta la aparición de las colonias (UNALM, 2013).

✓ **Siembra por agotamiento de estría cruzada en placa:**

Con el fin de obtener un cultivo axénico se esteriliza un asa de siembra por flameado en la llama de un mechero para luego introducirla en la suspensión bacteriana y recoger un inóculo. En seguida se siembra haciendo estrías sobre la superficie de un medio sólido en una placa Petri. A continuación, se vuelve a esterilizar el asa, y se toma cultivo de la zona de la placa ya sembrada para hacer un segundo grupo de estrías en una región nueva de la placa. Este proceso se repite una tercera y cuarta vez, hasta conseguir que los grupos de células se agoten y se separen células aisladas. Finalmente se procede a la incubación en donde se desarrollan colonias aisladas (UNALM, 2013).

✓ **Siembra en placa de Petri por la Técnica de siembra masiva.**

Este método es muy utilizado para obtener un gran número de microorganismos (incremento de inóculo), en la superficie de un agar. Esta técnica de siembra utiliza un hisopo, el cual se pasa por toda la superficie de la placa en distintas direcciones y finalmente por el borde para que el crecimiento de los microorganismos sea total en la superficie de la placa (Rojas, 2011). Cabe destacar que este método se puede utilizar tanto para bacterias como para hongos.

Siembra de Hongos

El metodo mas utilizado y común para la siembra de hongos es el siguiente:

✓ **Siembra en placa de petri por la tecnica de punción.**

Este método de siembra es utilizado para observar el crecimiento de hongos y así más adelante examinar su morfología; así también para la transferencia o subcultivo de cepas previamente almacenadas y/o conservadas. Consiste en tomar parte de micelio con un asa micológica (o asa recta), y por una punción suave en el centro de la placa se inocula el microorganismo a estudiar. Dependiendo del objetivo, pueden hacerse múltiples picaduras en el agar (varios puntos de siembra) (Rojas, 2011).

3.3.4 Purificación o aislamiento

El proceso de aislamiento o purificación consiste en disponer de la descendencia de un individuo (célula) inmovilizada sobre la superficie de un medio sólido y separada del resto de individuos presentes en el cultivo mixto. Esta célula, en las condiciones de crecimiento adecuadas dará lugar a una descendencia (clon) que resultará macroscópicamente visible y que se llama colonia. Cada colonia contiene millones o miles de millones de células idénticas y con el mismo origen y propiedades. Se puede demostrar que prácticamente cada colonia procede de una sola célula o de un grupo de células del mismo tipo si el microorganismo forma agregados. Por ello lo más correcto es hablar de unidades formadoras de colonias (UFC) al referirnos al origen de una colonia. El cultivo descendiente de una misma colonia es un cultivo puro (García *et al.*, 2009).

3.4 Identificación de microorganismos por métodos moleculares

Los métodos basados en biología molecular, se basan en el uso de procedimientos y reactivos, en los cuales se puede detectar determinadas secuencias de ADN que son propias de un determinado agente microbiano (Alejos *et al.*, 2014). Dados los problemas inherentes que presentan los sistemas de identificación fenotípicos, los métodos moleculares se han erigido como procedimientos complementarios, alternativos o incluso de referencia a los fenotípicos (SEIMC, 2010).

Las etapas de identificación molecular de microorganismos se describen a continuación en la **Figura 7**:

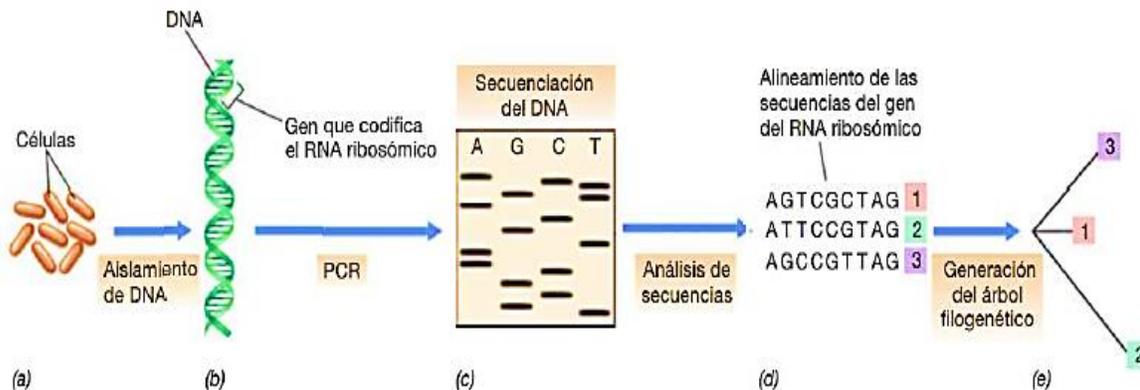


Figura 7. Secuenciación del gen del RNA ribosómico y filogenia, (a) Rotura de las células, (b) Aislamiento del gen que codifica el RNA ribosómico y producción a continuación de muchas copias por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa. (c, d) Secuenciación del gen y alineación de la secuencia obtenida con otras secuencias de rRNA (Madigan *et al.*, 2009).

3.4.1 Extracción de ADN

La aplicación de técnicas moleculares inicia con la extracción de ADN, la obtención exitosa de datos confiables y reproducibles depende, en gran medida, de la extracción de ADN íntegro y puro. La extracción consiste en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN y se basa en las características fisicoquímicas de

la molécula. Los métodos tradicionales, desarrollados, utilizan solventes orgánicos para separar a las proteínas del ADN y, una vez suspendido en la fase acuosa, aislarlo por precipitación con etanol. Estos métodos requieren preparar soluciones y la extracción puede tomar desde unas horas hasta varios días por los numerosos pasos que deben realizarse. En general, los protocolos tradicionales consisten de cinco etapas principales: homogeneización del tejido, lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación y redisolución del ADN (Alejos *et al.*, 2014).

5.4.2 Amplificación de ADN

La amplificación se realiza por la Técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (Polimerase Chaine Reaction). La PCR es un proceso de amplificación enzimática *in vitro* del DNA o RNA, iniciada por unos fragmentos cortos de DNA llamados iniciadores o cebadores (primers). Este proceso se lleva a cabo cíclicamente. Cada ciclo está dividido temporalmente en tres fases térmicas: desnaturalización de la doble cadena de DNA, acoplamiento o unión de los iniciadores y polimerización mediante la adición de dNTPs por la enzima Taq polimerasa (Acuña, 2015).

5.4.3 Secuenciación de ADN

La secuenciación del ADN es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T), así como la orientación en una molécula de ADN. El método clásico más usado para la secuenciación de ácidos nucleicos ha sido el método de Sanger. Este método se basa en el uso del ADN polimerasa para sintetizar cadenas de ADN con una terminación específica. Con este método se generan fragmentos de ADN de todos los tamaños posibles que se puedan distinguir entre sí, por el tipo de marcaje que llevan o por la incorporación de un terminador específico (Tahara *et al.*, 1990).

5.4.4 Análisis Bioinformático

La bioinformática es una disciplina científica que se interesa por todos los aspectos relacionados con la adquisición, almacenamiento, procesamiento, distribución, análisis e interpretación de información biológica, mediante la aplicación de técnicas procedentes de las matemáticas, de la biología y de la informática, con el propósito de comprender el significado biológico de una gran variedad de datos utilizando ordenadores. En el contexto de la genómica se centra en las secuencias de ADN y proteínas. El proceso de anotación de genes que son secuenciados es uno de los aspectos de la bioinformática. Las secuencias de DNA se almacenan en grandes bases de datos. Una de las más grandes bases de datos genómicas es la biblioteca internacional de secuencias de ácidos nucleicos, a menudo denominada GenBank (Prescott *et al.*, 2002).

Análisis de secuencias

El análisis de la secuencia de ADN, es el descubrimiento de similitudes funcionales y estructurales, y las diferencias entre múltiples secuencias biológicas. Esto puede hacerse comparando las nuevas (desconocidas) con las bien-estudiadas y anotadas (conocidas) secuencias (Meneses *et al.*, 2011).

Alineamiento

En Bioinformática, un alineamiento de secuencia es una manera de organizar las secuencias de DNA, RNA, o proteína para identificar regiones de similitud. En el alineamiento de secuencias se determina si una secuencia de nucleótidos o aminoácidos (un gen o una proteína) está relacionada con otra (Acuña, 2015).

En el contexto de identificación de microorganismos se opta por el alineamiento múltiple de secuencias (MSA). El MSA es un alineamiento de tres o más secuencias biológicas, generalmente proteínas, DNA o RNA. En general, se asume que el conjunto de secuencias de consulta que se ingresa como entrada (conjunto problema) tienen una relación evolutiva por la cual comparten un linaje y descienden de un ancestro común. Del MSA resultante, se puede inferir la homología, y puede llevarse a cabo el análisis filogenético para evaluar los orígenes evolutivos compartidos por las secuencias (Notredame *et al.*, 2000).

Los alineamientos múltiples de secuencias también se refieren al proceso de alinearlas como un conjunto de secuencias. Como puede ser difícil alinear a mano tres o más secuencias de longitud biológicamente relevante, y casi siempre consume mucho tiempo, se utilizan algoritmos computacionales para producir y analizar los alineamientos. Los MSA requieren metodologías más sofisticadas que los alineamientos de dos secuencias porque son computacionalmente más complejos de producir. La mayor parte de los programas de alineamiento múltiple de secuencias usan métodos heurísticos en lugar de optimización global, porque identifican el alineamiento óptimo entre todas las secuencias. Existen diferentes herramientas de alineamiento, las más usadas en bioinformática son: NCBI (Blast), ClustalW2 y la más reciente es CLC BIO (Acuña, 2015).

5.4.5 Análisis Filogenético

La finalidad de los análisis filogenéticos es estimar una filogenia (árbol filogenético) que muestre la historia evolutiva del grupo taxonómico de estudio. Es decir, el objetivo final es un árbol filogenético que sea reflejo del proceso de evolución donde las entidades biológicas son el resultado de la teoría de Darwin “descendencia con modificación” entre especies ancestrales y descendientes (Peña, 2011). Los árboles filogenéticos se pueden construir a partir de alineamientos múltiples de secuencias. En este caso estamos asumiendo que cada posición en el alineamiento es homóloga. Por lo tanto, construir un buen alineamiento es esencial para la resolución del árbol. La mayoría de los programas de alineamiento nos dan una

solución subóptima (la mejor posible utilizando pocos recursos del sistema), por lo tanto, resulta conveniente revisar los alineamientos antes de realizar los árboles.

Para la construcción de árboles filogenéticos a partir de métodos taxonómicos basados en secuencias, se requiere solamente una secuencia para identificar el organismo en términos de su tipo filogenético y además, el análisis por este método de ecosistemas microbianos es más que un ejercicio taxonómico, ya que las secuencias proporcionan herramientas experimentales (por ejemplo, sondas de hibridación molecular) que pueden ser usadas para identificar, observar y estudiar los ecosistemas microbianos (Acuña, 2015).

Entre los métodos de análisis filogenético se pueden mencionar el método Neighbor Joining. El algoritmo Neighbor Joining fue creado por Saitou and Nei (1987) y consiste en generar un único “árbol filogenético” final, el cual, según los autores, no necesariamente será el “árbol verdadero”. En el paso inicial, se unen los dos *neighbors* (secuencias) que tengan la menor distancia genética. Luego, este par inicial se considera como una sola entidad, y se busca el siguiente terminal que tenga la menor distancia genética con este. El procedimiento continúa hasta unir todos los terminales al “árbol filogenético” (Saitou and Nei, 1987).

5.5 Biotecnología

Desde la perspectiva de la ingeniería química, una aproximación más atractiva a la Biotecnología, es la explotación tecnológica de los sistemas vivos mediante los bioprocesos. En este caso se utilizan sistemas vivos completos (Células o tejidos) o sus componentes (enzimas, nucleótidos, etc.) para efectuar de una manera controlada y regulada, el cambio químico o físico deseado.

Entre los bioprocesos de interés se puede mencionar:

- Producción de masa celular (biomasa)
- Obtención de productos químicos derivados del metabolismo celular
- Bioconversiones
- Producción de alimentos
- Procesos de descontaminación de materiales
- Procesos de recuperación y concentración de minerales

Sin embargo, la Biotecnología no es solamente la producción de células con nuevas funciones por ingeniería genética o la elaboración de productos en biorreactores. Es también un importante componente en el cuidado de la salud humana y animal, alimentación, protección del medio ambiente y sistemas de energía renovables de

biomasas. Tiene por tanto una notoria incidencia en el bienestar humano (Ferrari, 1991).

5.5.1 Biotecnología Ambiental

Los ámbitos de actuación de la biotecnología ambiental se relacionan con la gestión del medio ambiente y/o con el aprovechamiento de los recursos naturales. Las distintas acciones se realizan en los sistemas biológicos con un objetivo final de prevenir, mitigar o eliminar la presencia de compuestos contaminantes en el medio ambiente.

El principio básico de actuación de los métodos biológicos se basa en una degradación de los compuestos orgánicos contaminantes en compuestos inorgánicos, que en los casos ideales resultan inocuos (por ejemplo, CO₂, H₂O, Cl⁻, etc.). Además, estos procesos biotecnológicos procuran realizarse en la medida de las posibilidades en el mismo lugar donde se ha producido el impacto contaminante y se evitan los costos asociados al desplazamiento del material contaminado a plantas de tratamiento específicas, a vertederos controlados o a otras ubicaciones. Esta característica también resulta diferencial respecto de los procedimientos físicos y/o químicos que a menudo simplemente transfieren el contaminante a una ubicación diferente con el fin de mitigar y/o controlarlo más adecuadamente.

Tradicionalmente, las actividades biotecnológicas relacionadas con el medio ambiente se han fundamentado principalmente en la capacidad degradadora de los compuestos contaminantes por parte de la actividad metabólica de los microorganismos presentes en los ecosistemas naturales. Esta necesidad de utilizar la biodegradación microbiana ha hecho que durante mucho tiempo el esfuerzo tecnológico y de investigación de la biotecnología ambiental se orientara a aislar microorganismos del medio ambiente, clasificarlos y caracterizarlos fisiológicamente, analizar las capacidades enzimáticas degradadoras para desarrollar procesos tecnológicamente aplicables a gran escala e intentar, en determinados casos, una mejora genética de los microorganismos utilizados con el fin de obtener cepas más eficientes en la degradación de compuestos orgánicos contaminantes (Blanch, 2010).

IV. METODOLOGÍA

4.1 Lugar de Estudio

El aislamiento y caracterización en la búsqueda de microorganismos útiles para el medio ambiente a partir de muestras de suelo, agua y materia orgánica se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de las Aguas del Programa de Investigación Estudios Nacionales y Servicios Ambientales (PIENSA) de la Universidad Nacional de Ingeniería, ubicado en el Recinto Universitario Simón Bolívar, en la Avenida Universitaria, Managua, Nicaragua.

Las cepas de microorganismos aislados y seleccionados fueron enviadas al Centro de Biología molecular de la Universidad Centroamericana (UCA) y al Laboratorio de Biotecnología, UNAN Managua donde se contrataron los servicios de extracción de ADN genómico. Luego se procedió a mandar el ADN extraído al laboratorio Macrogen en Corea del Sur. Una vez recibidas las secuencias se continuó con las actividades de bioinformática en el PIENSA-UNI.

4.2 Descripción de los sitios de muestreo

Para esta investigación se trabajó con muestras de suelo, agua y materia orgánica provenientes de diferentes sitios contaminados, donde se pudre materia orgánica y que hasta la fecha existe poca incidencia humana. Los muestreos se realizaron en la Reserva Natural El Chocoyero-El Brujo de Ticuantepe, como una zona preservada en la cual se podían encontrar microorganismos de gran interés para la agricultura y la industria fundamentalmente y en el Rio Chiquito de León, como una zona de gran incidencia de contaminación tanto por las industrias aledañas como por la población de los alrededores y en donde se podían encontrar posibles biodegradadores de gran valor.

Reserva Natural El Chocoyero-El Brujo de Ticuantepe

Es una reserva natural que cuenta actualmente con 184 hectáreas de zona protegida, pero con buenas posibilidades de ampliarse para dar una mayor cobertura a la abundante flora y fauna del lugar (**Figura 8**). Se ubica a unos 28 kilómetros al sur de Managua, en el Municipio de Ticuantepe departamento de Managua. La reserva es famosa por sus chocoyos verdes (Loro Verde o Perico del Pacífico), cuyos nidos están cerca de las cataratas. Estos pueden ser vistos en grandes cantidades por las mañanas, cuando alzan el vuelo y se marchan, y por las tardes cuando regresan. Durante el día se pasean por toda la reserva buscando alimento (INTUR, 2017). Conviene señalar que en esta investigación se llamará solo por el nombre Reserva Natural El Chocoyero.



Figura 8. Reserva Natural El Chocoyero / El brujo en el Municipio de Ticuantepe. Departamento de Managua. A) Área de la Cascada del Chocoyero en época seca. B) Sendero con árboles secos y en descomposición. C) Área de cascada El Brujo en época seca. D) Sendero camino a cascada El Chocoyero (Fuente: propia).

Río Chiquito de León

La ciudad de León está ubicada a una latitud $12^{\circ} 26.27'$ y longitud $86^{\circ} 52.68'$. Las empresas se ubican en la zona sur oeste, colinda con los barrios subtiava y laborío y a orillas del río chiquito. Esta ubicación hace que la contaminación del río sea notable y un tema importante ya que la población además de contaminarlo con basura y desechos hace uso de sus aguas para diversas labores, lo que conlleva a una cadena de contaminación. La subcuenca Río Chiquito (**Figura 9**) tiene una expresión municipal y gran parte de la subcuenca lo ocupa el centro urbano del municipio de León por lo que se considera una subcuenca urbana, se ubica en la región del Pacífico de Nicaragua, en el departamento de León, es tributaria de la cuenca No. 64 (Entre Volcán Cosigüina y Río Tamarindo) y drena al Océano Pacífico (Martínez-Cubillo, 2013).



Figura 9. Vista panorámica del Río Chiquito - León en la Región Central de Nicaragua (Fuente propia).

6.3 Diseño Metodológico

Las condiciones de cada sitio de muestreo, desde la recolección hasta la culminación del experimento, se deben considerar, debido a que la temperatura, la disponibilidad de oxígeno, la humedad y la duración del almacenamiento afecta enormemente la microbiota y de esta manera los procesos que en ella intervienen. Por consiguiente, los procedimientos de muestreo tienen que asegurar que el

número y las actividades de los microorganismos no se alteren, ya sea positiva o negativamente, de manera no cuantificable durante la recolección y conservación de la muestra. También tienen que asegurar que las muestras sean representativas y que no estén contaminadas con microorganismos extraños; es decir, el procedimiento seguido debe asegurar que los microorganismos solo proceden del ecosistema que se está examinando (Arias, 2008).

6.3.1 Recolección de muestras

Los muestreos se realizaron de forma aséptica utilizando técnicas asépticas, aplicando el sistema de muestreo aleatorio simple (**Figura 10**), que consiste en tomar una porción de la muestra de manera independiente con respecto al tiempo y espacio (Pacheco y Cabrera, 2011). Para evitar la contaminación cruzada, las muestras sólidas se tomaron con una espátula metálica y las muestras líquidas con vasos de precipitado estériles. Para el transporte de las muestras se utilizaron bolsas de cierre hermético para muestra de 100mL y tubos cónicos de 50mL estériles y se almacenaron en condiciones de refrigeración a 4°C en un termo portátil. Para la toma de muestras se definieron los puntos de muestreo en función de la carga microbiana existente en fuentes específicas como agua, suelo, materia orgánica, etc., que puedan generar una amplia información sobre las distintas poblaciones microbianas que se están desarrollando bajo las condiciones de cada proceso.



Figura 10. Sistema de muestreo aleatorio simple en una vertiente del Río Chiquito con agua contaminada con vísceras de animales, sangre, aguas de tenería y basura inorgánica. La muestra de agua se recolectó con un vaso de precipitado y luego se colocó en un tubo cónico de 50 mL estéril (Fuente: Propia).

Se recolectaron 9 muestras a partir de diferentes puntos asociados a la Reserva Natural El Chocoyero entre ellas muestras de suelo, agua y materia orgánica en descomposición, 2 en estado líquido y 7 en estado sólido.

- Muestra I: Agua de la cascada del Chocoyero en época seca.
- Muestra II: Suelo degradado ubicado en los alrededores de la cascada del Chocoyero.
- Muestra III: Biopelícula de color verdosa adherida a una roca.
- Muestra IV: Biopelícula de apariencia lamosa adherida a una piedra.

- Muestra V: Biopelícula de color blanca y verdosa sobre la superficie de una roca.
- Muestra VI: Tronco de un árbol degradado que se encontraba caído en el suelo.
- Muestra VII: Agua de cascada El brujo en temporada seca.
- Muestra VIII: Suelo degradado con mucha materia orgánica (Piedras muy pequeñas, hojas secas, etc.).
- Muestra IX: Tronco de un árbol que presentaba degradación.

Por otra parte, se determinaron 6 puntos de muestreo para la búsqueda microbiológica en el Río Chiquito, siendo todas muestras en estado líquido.

- Muestra I: Agua residual de uso doméstico muy contaminada con todo tipo de desechos orgánicos e inorgánicos en sus alrededores que pasa por el Puente el Bypass.
- Muestra II: Agua residual de uso doméstico contaminada con materia orgánica (animales muertos, hojas de árboles secas, excremento) que atraviesa el Puente la vía 23 de Julio.
- Muestra III: Agua residual de uso doméstico que presentaba contaminación con materia orgánica, basura inorgánica y con detergentes que desembocan en el Puente Martínez El Calvario.
- Muestra IV: Agua contaminada con todo tipo de desechos orgánicos (Vísceras de animales, sangre, etc.) y desechos inorgánicos (detergentes, plástico, etc.) proveniente de efluentes de las tenerías La Batan y Los Leones que son vertidas en el Puente Tenería Los Leones.
- Muestra V: Agua contaminada con vísceras de animales, sangre, detergente, basura inorgánica que vienen de los efluentes de tenerías y que trasiega el Puente Camino al Fortín Tenerías.
- Muestra VI: Efluentes de pilas sépticas, tenerías y agua de consumo doméstico que desembocan en el Puente pilas sépticas donde se unen todas las vertientes.

6.3.2 Aislamiento de la población microbiana cultivable

El aislamiento de los microorganismos se realizó en medios sólidos seleccionados (LB, AN, PCA y PDA), a partir de las muestras individuales tomadas en cada sitio de muestreo. Para tal fin se inoculó (sembró), aplicando las técnicas de siembra masiva, extensión en placa y siembra de vertido en placa. Posteriormente se extendieron las técnicas de aislamiento a la purificación de las colonias microbianas obtenidas, a través de la siembra por agotamiento de estría cruzada en placa para colonias bacterianas y la siembra por punción para colonias fúngicas.

Preparación de medios de cultivo

La preparación de medios de cultivo es una técnica empleada en microbiología precisamente para el cultivo y la manipulación de los microorganismos en

condiciones de esterilidad. De cada medio de cultivo (agar) elegido, se prepararon suspensiones según las especificaciones del fabricante.

- **Agar Nutritivo (AN):** se agregaron 23 g de Agar Nutritivo comercial en un litro de agua destilada.
- **Agar Luria-Bertani (LB):** se agregaron 40 g de Agar Luria-Bertani en un litro de agua destilada.
- **Agar Plate Count (PCA):** se agregaron 23.5 g de Agar Plate Count comercial en un litro de agua destilada.
- **Agar Papa Dextrosa (PDA):** se agregaron 39 g de Agar Papa Dextrosa comercial en un litro de agua destilada.

Los medios de cultivo se sometieron a calentamiento hasta hervir en el Hot Plate CORNING Mod. PC-620D. Posteriormente se procedió a esterilizar por calor húmedo en el Autoclave LLAMATO Mod. SQ810C durante 15 minutos a 121°C y una presión de 100Kpa. Finalmente se dosificaron en placas Petri dejándolos solidificar a temperatura ambiente (**Figura 11**) (Solano, 2006).



Figura 11. Preparación de medios de cultivos. A) Medios de cultivo utilizados; B) Dispensación de medios de cultivo C) Esterilización en Autoclave de los medios de cultivo por calor húmedo durante 15 minutos a 121°C y 100 Kpa; D) Medio de cultivo solidificado en placa Petri (Fuente: propia).

Inoculación de muestras

Una vez que se tomaron las muestras, se inocularon en los cinco medios de cultivos referidos en el punto anterior. La inoculación se realizó por duplicado en placas Petri desechables con Agar Nutritivo (AN), Agar Luria-Bertani (LB), Plate Count Agar (PCA), Agar Potato Dextrosa (PDA). En los medios AN, LB y PCA se pretendía observar mayormente el crecimiento de bacterias, mientras que en el medio PDA el crecimiento de hongos en general, tanto filamentosos como levaduriformes.

Siembra masiva en superficie

Las actividades de aislamiento se iniciaron en campo con la técnica de siembra masiva en superficie siguiendo el procedimiento descrito por Rojas (2011). Inicialmente se realizaron hisopados de las muestras, por duplicado sobre la superficie de la placa en todas las direcciones y finalmente por el borde. Las placas inoculadas se trasladaron bajo condiciones de refrigeración a 10°C y en la

incubadora MEMMERT No. serie: 377010 fueron puestas en incubación el mismo día en el laboratorio durante 24 horas a 35°C; una temperatura óptima para el crecimiento de un amplio número de microorganismos mesófilos. Diariamente se revisaron las placas en función del crecimiento que se observó y del tipo de microorganismos que pudiesen identificarse desde el punto de vista morfológico (**Figura 12**).



Figura 12. Técnica de aislamiento por siembra masiva en superficie. A) Hisopados de las muestras en distintas direcciones; B) Incubación de las muestras inoculadas en placas Petri a 35°C; C) Placa Petri con cultivo mixto después de 5 días de incubación (Fuente: propia).

Siembra por extensión en placa

Esta técnica explicada en la sección 5.3.3, se usó en el laboratorio con el primer muestreo para favorecer el desarrollo de las colonias de microorganismos sobre la superficie del medio de cultivo procesando las muestras enteras después de 24 horas en refrigeración a 10°C. Con esta técnica se pretendía obtener un recuento de población viable cultivable proveniente de la muestra en los diferentes medios de cultivo y el crecimiento distante entre las colonias para facilitar su posterior aislamiento.

En el procesamiento de las muestras de agua se tomaron 0.1 mL de cada muestra con micro pipetas y se pipeteó en cinco puntos sobre la superficie del agar en una placa Petri. Luego se extendió en todas las direcciones de la placa con ayuda de un asa Drigalsky previamente esterilizado con vapor seco (esterilización en horno) y con esterilización de superficie (alcohol a 70%), hasta que se secó completamente. Finalmente, todas las placas se incubaron a 35°C (durante 24 a 72 horas) según el tipo de microorganismo (**Figura 13**).

Para las muestras sólidas se prepararon filtrados, se tomó una porción de 1g de la muestra y se agregó a un tubo de ensayo que contenía 2 mL de solución Buffer estéril. Todas las muestras contenidas en sus respectivos tubos se agitaron en el agitador Vortex SCIOLOGEX Mod. MX-S para lograr una mezcla homogénea. Luego cada tubo se dejó reposar para obtener un precipitado y un sobrenadante e inmediatamente se procedió a separar el sobrenadante colocándolo en otro tubo de ensayo previamente esterilizado. Después, se midió 0.1 mL del sobrenadante y se pipeteó en cinco puntos sobre la superficie del agar en una placa Petri. Finalmente se repitieron los dos últimos pasos del procesamiento de muestras de agua

extendiendo la muestra sobre todo el agar con el asa Drigalsky y encubandose a 35°C.



Figura 13. Proceso de inoculación (siembra) por extensión en placa para el recuento de células viables (Madigan *et al.*, 2009).

Siembra de vertido en placa

Esta técnica de aislamiento mencionada en la sección 5.3.3 se aplicó en el laboratorio en el segundo muestreo para permitir el crecimiento de las colonias microbiológicas lo más alejadas posibles en los medios de cultivos realizando diluciones de las muestras enteras después de 24 horas en refrigeración a 10°C. Por tal razón, se esperaba como resultado una gran variedad de microorganismos viables cultivables en los diferentes medios de cultivo de modo que fuera más fácil aislar las diferentes colonias.

Para cada muestra líquida se tomó 1 mL de la muestra y se mezclaron en tubos de ensayo con 9 mL de solución buffer. Todas las muestras contenidas en sus respectivos tubos se agitaron en el agitador Vortex SCIOLOGEX Mod. MX-S para obtener una dilución 10^{-1} . La dilución 10^{-2} se obtuvo mezclando 1 mL de la dilución 10^{-1} con 9 mL de solución buffer. Este procedimiento se repitió hasta obtener una dilución 10^{-6} ; es decir, se realizaron seis diluciones sucesivas de la dilución 10^{-1} . Luego se pipeteó en la placa Petri 1 mL de cada muestra diluida. El medio estéril a una temperatura no mayor de 45°C se añadió sobre el inóculo y se mezcló suavemente (**Figura 14**). Finalmente, todas las placas se incubaron a 35°C.

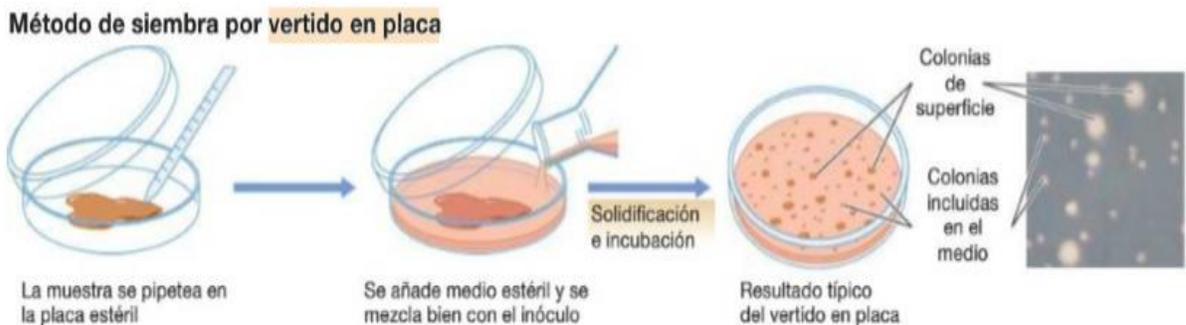


Figura 14. Esquema del proceso de inoculación por la técnica de vertido en placa. En este método las colonias se forman tanto en la superficie como en el interior del agar (Madigan *et al.*, 2009).

Selección y purificación de las colonias microbianas

La siembra masiva de las muestras dejó como resultado el crecimiento de diferentes colonias microbianas. Al tener las placas con cultivos microbiológicos mixtos se procedió al aislamiento de cada especie observada según su morfología en el crecimiento de las placas hasta determinar que se contaba con cultivos puros, tomando en cuenta si se trataba de una bacteria, de un hongo filamentoso o de una levadura en apariencia y del resultado de su observación al microscopio. Este proceso de examinación de los cultivos mixtos se realizó durante 7 días cuando se agotó el crecimiento bacteriano y 14 días en las placas PDA cuando terminaron de crecer todas las colonias fúngicas (Páramo, 2012). Las técnicas de aislamiento aplicadas para obtener los cultivos puros fueron; la siembra por agotamiento de estría cruzada en placa para las colonias bacterianas y levaduriformes y la siembra por punción para las colonias fúngicas filamentosas.

Aislamiento y purificación de bacterias

Las placas Petri con la primera inoculación de las muestras fueron retiradas de la incubadora después de 24 horas para ser examinadas y seleccionar las colonias bacterianas en función de las características morfológicas (color, borde y textura) distintas observadas en los cultivos mixtos en el Contador de colonia QUEBEC Mod. 3327. El aislamiento de las bacterias se realizó en medio agar Luria-Bertani utilizando la técnica de siembra de agotamiento por estrías (**Figura 15**). Las placas se incubaron por 24 horas a 35°C. Los repiques sucesivos o resiembras se realizaron tomando el inóculo de las colonias que crecían aisladas en las últimas estrías (Cuervo, 2010).



Figura 15. Siembra por agotamiento de estría cruzada en placa utilizada para diseminar y purificar las colonias bacterianas seleccionadas en los cultivos mixtos (Fuente: propia).

Aislamiento y purificación de hongos

Los cultivos mixtos en las placas Petri con medio PDA se examinaron a los 5, 7 y 14 días de incubación para observar el crecimiento de las colonias fúngicas tanto filamentosas como levaduriformes. Se seleccionaron las colonias que presentaban aspectos y colores diferentes del micelio. Los hongos filamentosos se aislaron tomando filamentos o fragmentos del micelio con el asa de siembra recta siguiendo la técnica de siembra por punción y los hongos levaduriformes se aislaron utilizando la técnica de siembra de agotamiento por estrías. Las placas fueron puestas en

incubación a 35°C entre 5 y 7 días dependiendo del requerimiento de tiempo para el crecimiento de cada hongo. Los repiques sucesivos fueron necesarios hasta obtener un cultivo puro.

6.3.3 Pruebas morfológicas para la identificación microbiana

La identificación de cada microorganismo o grupos de microorganismos se llevó a cabo preliminarmente por vía morfológica haciendo observaciones de las características macroscópicas y utilizando diferentes técnicas microscópicas (tinciones, gotas húmedas, entre otras) y técnicas específicas como tinción Gram. Las pruebas morfológicas definen las bases para la aplicación de las técnicas de identificación molecular. En la identificación morfológica macroscópica se registran las características visibles de las colonias microbianas y en la microscópica las características vistas al microscopio de las células y esporas con el fin de definir las condiciones específicas a las cuales se someten los microorganismos para ser identificados molecularmente.

Pruebas morfológicas para la identificación bacteriana

Los aislados bacterianos se sometieron a la técnica de tinción de Gram después de 24 horas de incubación siguiendo el procedimiento descrito por Arias *et al.*, (2012) en la sección 5.2.2. Finalmente, la muestra teñida se dejó secar y se observó en el microscopio OLYMPUS CH-2 con objetivo 100x utilizando aceite de inmersión. El procedimiento de tinción permitió observar la morfología microscópica de las bacterias (cocos, bacilos, etc.), su tamaño y agrupaciones entre sí, así como la clasificación de sus células en Gram positivas o Gram negativas, determinando con un mayor nivel de confianza la pureza de los aislados.

Pruebas morfológicas para la identificación fúngica.

Los hongos filamentosos se dejaron en esporulación a la temperatura del laboratorio (28°C ±1) en la Campana de flujo laminar, en las placas Petri con medio PDA entre 7 y 14 días. Para observar su morfología microscópica se realizó un montaje con la técnica de cinta adhesiva explicada por Escobar *et al.* (2012) en la sección 5.2.3 que permite observar las estructuras fúngicas casi sin alteración. Después que se hizo el montaje con la tira de cinta colocada sobre el portaobjetos, se procedió a observar en el microscopio OLYMPUS BH-2 con el objetivo 50 x.

La observación de las características microscópicas de las levaduras se realizó a través de la tinción simple con cristal violeta. En una gota de solución buffer estéril sobre un portaobjetos se colocó una pequeña muestra de la colonia con el asa de siembra. Posteriormente se colocó una gota de cristal violeta y se cubrió con un cubreobjetos. Finalmente se observó al microscopio con los objetivos 50x y 100x.

6.3.4 Identificación molecular

Para esta parte del trabajo experimental se contrataron los servicios profesionales de otros laboratorios. La extracción de ADN se realizó en el laboratorio de biotecnología de la UNAN Managua y en el Centro de Biología Molecular de la Universidad Centroamericana (UCA).

La amplificación por medio de la técnica PCR y las reacciones de secuenciación se realizaron a través del análisis de la región 16S ADN para bacterias con los primers 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG) y 1492R (5'-TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T), ITS (Internal Transcribed Spacer) para hongos filamentosos con los primers ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') y D1/D2/D3 para hongos levaduriformes con los primers LR0R(5'-ACCCGCTAACTTAAGC-3') y LR7(5'-TACTACCACCAAGATCT-3'); todos estos análisis fueron realizados por el laboratorio MacroGen ubicado en Seúl, República de Corea del Sur.

Análisis de Secuencias

Una vez recibidos los electroferogramas con la secuencia de bases (Adenina, Guanina, Citosina, Timina), se procedió a trabajar en la bioinformática y análisis de las secuencias para la obtención de los árboles filogenéticos siguiendo los pasos que se describirán a continuación. Esto nos permitió identificar a nivel de especie la mayoría de los microorganismos seleccionados.

Corrección de errores

Las secuencias que presentaban errores en los electroferogramas (**Figura 16**) fueron corregidas visualmente usando el programa BioEdit v7.0.9. Se observó la secuencia de bases, donde se editaron los errores producidos por el secuenciador. Posteriormente, las secuencias editadas se guardaron en formato FASTA (**Figura 17**). La observación del electroferograma constituye el primer paso del análisis de las secuencias. Algunas veces se producen errores durante la secuenciación y se reflejan en el electroferograma y la secuencia; por ejemplo, asignación de dos T existiendo 3, o posiciones ambiguas (N) (Bou *et al.*, 2011). La calidad de las secuencias está en gran medida determinada por la nitidez de los electroferogramas, por tanto, es elemental hacer una buena corrección para continuar con el análisis bioinformático y obtener resultados confiables en términos de identidad.

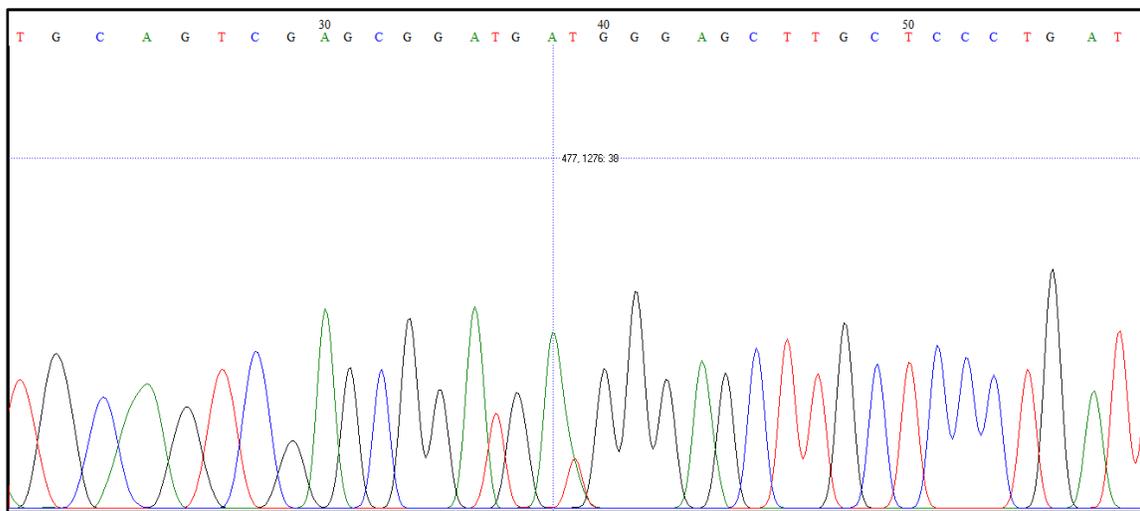


Figura 16. Electroferograma de secuencia editada con el uso de BioEdit v7.0.9 (Fuente propia).

```

>180213-R02_K05_C1_27F.ab1      1331
GGAAATGGCGGCAGCTACACATGCAGTCGAGCGGATGATGGGAGCTTGCTCCCTGATTTAGCGGGC
GACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCC TGGTAGTGGGGGATAACGTTCCGAAAGGAACGCTAAT
ACCGCGTACGTCC TACGGGAGAAAAGCAGGGGACCTTCGGGCC TTGCGCTATCAGATGAGCC TAGGT
CGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAAC TGGTCTGAGAGGATG
ATCAGTCACACTGGAAC T GAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGA
CAATGGGCGAAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACT
TTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCAC
CGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGC
GTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCTGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCA
TCCAAAATGGCGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATCGCT
AGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAA
AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGT
TGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGC
AAGGTTAAAAC TCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGTTAATTCGAA
GCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAAAAC TTTCCGGAGATGGATTGGTGGCCTT
CGGGAAC T CAGACACAGGTGCTGCATGGGC TGTCGTCAGCTCCTGTCTGGAAATGTTGGGGTTAA
GTCCCCGTAACGAAGCGCAACCC TTTGTTCTTAGTTACCAGCCCCCTCGGGGGGGGCACTCCTAA
GAAAAC TGGCGGGTGACAAAACCGGAGGAAAGGTGGGGGATGAACGTCCAAGTCATTCATGGGCC
TTTACGGGCCAGGGGTTAACCACCGTGGCTTCAAAGGGTGGGGGACCAAAGGGGTTGCCAAGCC
CCCCGAGGGGGGAAGCTTAATCCCCCTAAAAAACCGGATCGGTAAGTCCGGGGGAATCCAAAATTTG
GAAAAC TCCCA

```

Figura 17. Secuencia de nucleótidos en formato FASTA (Fuente propia).

Comparación de secuencias

Las secuencias obtenidas fueron comparadas a través de la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) contra secuencias reportadas en Gen Bank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) altamente similares, comparando cada secuencia parcial de los genes 16S, ITS y D1/D2/D3 para bacterias, hongos filamentosos y hongos levaduriformes respectivamente. (Castillo-Reyes *et al.*, 2015). Al insertar la secuencia y su comparación con otras disponibles en la base de datos con la cual se trabaja, se proporciona un informe constituido por varias secciones. En el caso del programa BLAST del GenBank, en la primera sección aparece un gráfico que indica el nivel y el tamaño de los fragmentos alineados, seguido de un listado en orden decreciente de las secuencias de microorganismos con los que se muestra la identidad (% de coincidencia) (**Figura 18**). En la siguiente sección, aparece cada alineamiento de la secuencia problema o

query frente a cada secuencia de otro microorganismo, indicando el número y porcentaje de bases idénticas (identity) (Bou *et al.*, 2011).

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Pseudomonas mendocina strain PRM6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1916	1916	89%	0.0	96%	JN544146.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas mendocina strain Y12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1905	1905	89%	0.0	96%	KP324955.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas pseudoalcaligenes strain KJ1WB 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1916	1916	93%	0.0	95%	MF470189.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas sp. E-03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1917	1917	94%	0.0	95%	KC777292.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas sp. AD55 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1929	1929	95%	0.0	95%	JQ994361.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas mendocina strain MBG57 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1921	1921	94%	0.0	95%	KJ563248.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas mendocina strain 236 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1914	1914	94%	0.0	95%	EU841538.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas pseudoalcaligenes strain 3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1923	1923	95%	0.0	94%	KF171340.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas sp. DF7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1919	1919	95%	0.0	94%	KC294058.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas sp. YX4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1917	1917	95%	0.0	94%	KP789458.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas sp. Y2-1-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1917	1917	95%	0.0	94%	AY515308.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas pseudoalcaligenes 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1908	1908	94%	0.0	94%	JX845726.1

Figura 18. Listado de secuencias de microorganismos con mayor porcentaje de identidad respecto a la secuencia en estudio mostrado por BLAST (NCBI) (Fuente: propia).

Alineamientos

Las secuencias fueron alineadas en el programa BioEdit v7.0.9, utilizando la aplicación Clustal W Multiple Alignment for version 1.4 incluida en el menú Accesory (Figura 19). La actividad consistía en hacer alineamientos múltiples de cada secuencia en estudio con cinco secuencias elegidas en el BLAST basados en los criterios típicos de selección de secuencias; identidad, frecuencia y máximo score (Rodríguez, 2013). Posteriormente se repitieron los pasos de comparación de la secuencia alineada en el BLAST y la selección de las nuevas cinco secuencias guardadas en formato FASTA para finalmente realizar la construcción de los arboles filogenéticos, el bacteriano y el fúngico.

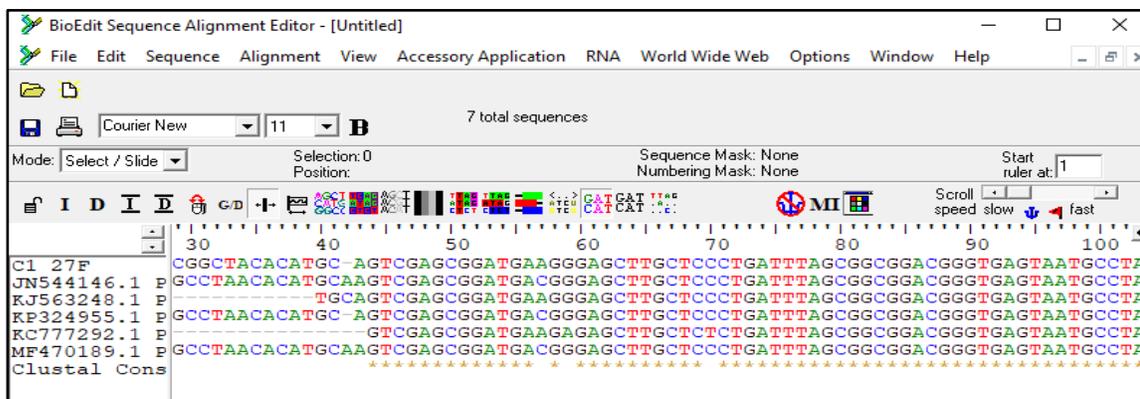


Figura 19. Ventana mostrada en el alineamiento múltiple usando Clustal W versión 1.4 incluido en el programa Bioedit v7.0.9 (Fuente: propia).

Análisis filogenético

Se utilizó el software MEGA 7.0.14 para la construcción de los árboles filogenéticos aplicando el método Neighbor-Joining las secuencias que tenían la menor distancia evolutiva considerándose este par inicial como una sola entidad. El procedimiento continuó hasta unir todos los terminales al “árbol filogenético” (Saitou and Nei, 1987). También se evaluó la confiabilidad mediante la prueba de bootstrap, usando 1000 réplicas (Cordero-Ramírez *et al.*, 2012). Se crearon dos archivos en formato FASTA que contenían las secuencias en estudio (19 para bacterias y 10 para hongos), además de las seleccionadas en el Gen Bank. Primero, se abrieron los archivos en el software MEGA y se eliminaron los gaps. Después se utilizaron las herramientas Align by clustalW y Phylogenetic analysis para alinear las secuencias y hacer el análisis filogenético. Finalmente, se elaboraron los árboles de relaciones evolutivas o filogenéticas con la herramienta Construct/Test Neighbor-Joining.

6.3.5 Conservación de los microorganismos

Los microorganismos se conservaron usando el método de transferencia periódica. Este método es el más simple y más utilizado para la conservación a corto plazo de microorganismos que consiste en transferir el cultivo a un medio de cultivo nutritivo y fresco a intervalos que aseguren la viabilidad de este (Ortiz *et al.*, 2016). La transferencia se realizó en medio Agar Luria-Bertani para bacterias y Agar Papa Dextrosa para hongos filamentosos y levaduriformes utilizando las técnicas de siembra de agotamiento por estrías y punción en dependencia del tipo de microorganismos. Los inóculos se dejaron en incubación por periodos de 24 horas para bacterias y de 3 a 7 días hasta obtener su máximo crecimiento antes de ser preservados. Los subcultivos se almacenaron en un refrigerador FRIGIDAIRE, Mod. FRT143DBLW a una temperatura de 10°C, en placas selladas con PARAFILM dentro de bolsas con cierre hermético para evitar el exceso de humedad. Los intervalos entre cada transferencia fueron de un mes.

6.3.6 Búsqueda de aplicaciones ambientales de los microorganismos identificados

Los microorganismos identificados constituyen la parte principal de este proyecto de bioprospección microbiana porque al disponer de cepas completamente identificadas en el laboratorio, se desencadenan nuevas actividades en el orden científico para aprovechar los beneficios que se derivan de esos microorganismos. En pos de sugerir las utilidades de cada cepa microbiana se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica en diferentes bases de datos internacionales: Google Académico, Scielo, Springer Link, Elsevier, Science Direct y Research Gate sobre el tema de aplicaciones microbiológicas ambientales, asociadas al desarrollo de bioprocesos fundamentalmente en los últimos 10 años. Se seleccionaron las que reunían mayor nivel de evidencia científica; publicaciones que reunían las evidencias de mayor calidad de acuerdo con la experiencia profesional y científica de los autores.

V. RESULTADOS y DISCUSIÓN

El desarrollo de esta investigación ha permitido obtener los siguientes resultados con respecto a los objetivos planteados.

7.1 Bioprospección microbiana

En Nicaragua no se cuenta con un sistema nacional que desarrolle la bioprospección con el fin de explotar nuestros ecosistemas para la creación de productos patentables y lucrativos por las compañías farmacéuticas y biotecnológicas. Por otro lado, se sabe que existen universidades que desarrollan investigación básica y pocas veces aplicada. Sin embargo, hay laboratorios privados y científicos que de forma individual se dedican a la colecta de especies silvestres y/o domesticadas para añadirle un valor agregado y venderlos a laboratorios extranjeros los cuales no presentan registros legales del uso que se le da a esa diversidad genética (Loáisiga y Cisne, 2001).

7.1.1 Toma de Muestra

Se muestreó en los dos sitios previamente establecidos en la metodología en el acápite 6.3.1 y como resultado se obtuvieron 9 puntos de muestreo en la Reserva Natural El Chocoyero / El Brujo y 6 puntos en Río Chiquito, descritos a continuación:

Puntos de Muestreo Reserva Natural El Chocoyero (Figura 20):

- Punto de Muestreo I: Agua de la cascada del Chocoyero en época seca.
- Punto de Muestreo II: Suelo degradado ubicado en los alrededores de la cascada del Chocoyero.
- Punto de Muestreo III: Biopelícula microbiana de color verdosa adherida a una roca en los alrededores de la cascada.
- Punto de Muestreo IV: Biopelícula microbiana de apariencia lamosa adherida a una piedra ubicada sobre el sendero.
- Punto de Muestreo V: Biopelícula de color blanca y verdosa sobre la superficie de una roca que se encontraba sobre el sendero.
- Punto de Muestreo VI: Tronco de un árbol degradado que se encontraba caído en el suelo.
- Punto de Muestreo VII: Agua de cascada El brujo en temporada seca.
- Punto de Muestreo VIII: Suelo degradado con mucha materia orgánica (Piedras muy pequeñas, hojas secas, etc.).
- Punto de Muestreo IX: Tronco de un árbol que presentaba degradación caído en el suelo del sendero.



Figura 20. Se presentan los puntos de muestreo de la Reserva Natural El Chocoyero. A) Cascada El Chocoyero, B) Suelo degradado, C) Roca recubierta de biopelícula blanca, D) Roca recubierta de lama, E) Roca recubierta de una flora blanca y verdosa, F) Tronco de un árbol degradado, G) Cascada El Brujo, H) Suelo degradado, I) Tronco de árbol degradado (Fuente propia).

Puntos de Muestreo Río Chiquito (Figura 21):

- Punto de Muestreo I (Puente el Bypass): Este sitio se encontraba totalmente seco a tal punto que ahora sólo existe un charco de agua muy contaminado con todo tipo de desechos orgánicos e inorgánicos en sus alrededores.
- Punto de Muestreo II (Puente la vía 23 de Julio): Contaminado con materia orgánica (animales muertos, hojas de árboles secas, excremento).
- Punto de Muestreo III (Puente Martínez El Calvario): Se observó un mayor caudal en esa zona y presentaba contaminación con materia orgánica e inorgánica y aguas residuales domésticas.
- Punto de Muestreo IV (Puente Tenería Los Leones): En este punto no hay descarga de agua, su contaminación es proveniente de efluentes de las tenerías La batan y Los Leones con todo tipo de desechos orgánicos (Vísceras de animales, sangre, etc.) y desechos inorgánicos (detergentes, plástico, etc.).
- Punto de Muestreo V (Puente Camino al Fortín Tenerías): Vertiente contaminada con vísceras de animales, sangre, detergente, basura inorgánica que vienen de los efluentes de tenerías. En este punto concluyen todas las aguas de las tenerías y se unen todas las aguas de las mismas.
- Punto de Muestreo VI (Puente pilas sépticas): Efluentes de pilas sépticas, tenerías y aguas de consumo doméstico. Unión de todas las vertientes.



Figura 21. Se presentan los puntos de muestreo en el Río Chiquito. A) Puente el Bypass, B) Puente la vía 23 de Julio, C) Puente Martínez El Calvario, D) Puente Tenería Los Leones, E) Puente Camino al Fortín Tenerías, F) Puente pilas sépticas (Fuente propia).

La detección de agentes biológicos está relacionada, a su vez, con dos procesos. El proceso de toma de muestra y el proceso analítico. Ambos procesos son esenciales, y la combinación de ambos procesos proporciona resultados analíticos fiables. Los resultados analíticos, ayudarán a la toma de decisiones por parte de los investigadores por lo que es necesario que las muestras se obtengan de forma correcta. Es decir, la realización de la toma de muestra debe incluir no sólo el proceso de toma como tal, sino aspectos como las condiciones de transporte, conservación y almacenamiento que eviten la alteración o degradación de la muestra, y aspectos relacionados con la custodia y trazabilidad de las muestras ambientales (Galán *et al.*, 2018; Mori *et al.*, 2013).

Tomando en cuenta lo antes expuesto, los puntos para la toma de muestras del presente trabajo, fueron seleccionados tratando de tener un número de puntos representativos de los diferentes ecosistemas encontrados para cada uno de los sitios muestreados (La Reserva Natural El Chocoyero y Río Chiquito) y también se tomó en cuenta el grado de contaminación de los mismos. De esta forma La Reserva Natural El Chocoyero fue muestreada en 9 puntos (**Figura 20**) con el fin de abarcar toda la reserva, pasando por los dos senderos que en los que se encuentran las diferentes cascadas El brujo y El Chocoyero. En el caso del Río Chiquito se seleccionaron 6 puntos que incluyen las diferentes vertientes donde se arrojan diferentes tipos de contaminantes que van desde desechos domésticos hasta efluentes de tenerías y pilas sépticas (**Figura 21**).

De las muestras que se tomaron en la Reserva Natural El Chocoyero se logró obtener un total de 72 muestras inoculadas en placas Petri distribuidas de manera equitativa en los medios de cultivos preestablecidos en la metodología acápite 6.3.2, 2 muestras tomadas en bolsas de cierre hermético para muestras correspondientes a los puntos I, y VII, 5 muestras tomadas en tubos cónicos estériles

correspondientes a los puntos II, V, VI, VIII y IX. Del mismo modo se llevó a cabo la toma de muestras en Río Chiquito y se obtuvo un total de 48 muestras inoculadas en placas Petri en los medios de cultivos seleccionados para el estudio y 6 muestras tomadas en tubos cónicos estériles correspondientes a los puntos I, II, III, IV, V y VI. Una vez tomadas las muestras, fueron trasladadas en condiciones asépticas al laboratorio para su procesamiento posterior.

7.1.2 Aislamiento y Purificación de Microorganismos

Con la utilización de las técnicas de aislamientos y purificación de microorganismos más comunes, siembra en estría y por profundidad, se logró coleccionar un total de 104 cultivos puros de microorganismos, entre ellos 73 bacterias, 29 Hongos filamentosos y 2 hongos levaduriformes como resultado de 133 muestras que se tomaron en los sitios de muestreos, 44 cultivos puros de Reserva Ecológica El Chocoyero y 60 cultivos puros de Río Chiquito.

Los resultados obtenidos por muestreo se resumen en las **Tablas 2 y 3** en donde se observan el número total de aislados por cada punto de muestreo y se definen cuantos cultivos axénicos son bacterianos o fúngicos (filamentosos o levaduriformes). Sin embargo, este número no representa el total de microorganismos que subsisten en los ecosistemas muestreados, sino los que pudieron ser cultivados en función de los medios utilizados. En el **Anexo 1** se presenta la descripción del código de aislamiento de los microorganismos y en **Anexos 2 y 3** se enumeran los códigos de cada cultivo puro aislado en Reserva Ecológica El Chocoyero y en Río Chiquito.

Tabla 2. *Cantidad de cultivos axénicos bacterianos y fúngicos, naturaleza, estado de la muestra y su respectiva codificación, aislados en los nueve puntos de muestreos definidos en la Reserva Natural El Chocoyero.*

Naturaleza de la muestra	Estado	Código	No. Bacterias	No. Hongos	
				Filamentosos	Levaduriformes
Agua de cascada El Chocoyero	Líquido	CI	1		
Suelo degradado	Sólido	CII		1	
Biopelícula adherida a una roca	Sólido	CIII	6	3	
Lama o biopelícula adherida a una piedra	Sólido	CIV	4	3	
Flora blanca y verdosa adherida a una roca	Sólido	CV	3	3	
Tronco de árbol degradado	Sólido	CVI			
Agua de cascada El brujo	Líquido	CVII	4		
Suelo degradado	Sólido	CVIII	1	2	
Tronco de árbol degradado	Sólido	CIX	3	9	1
Total			22	21	1

Fuente: Propia

Tabla 3. Cantidad de cultivos axénicos bacterianos y fúngicos, naturaleza, estado de la muestra y su respectiva codificación, aislados en los seis puntos de muestreos definidos en el Río Chiquito.

Naturaleza de la muestra	Estado	Código	No. Bacterias	No. Hongos	
				Filamentosos	Levaduriformes
Agua residual de uso doméstico	Líquido	RI	4	2	
Agua residual de uso doméstico	Líquido	RII	13		
Agua residual de uso doméstico	Líquido	RIII	7	2	
Agua residual de tenerías	Líquido	RIV	14		
Agua residual de tenerías	Líquido	RV	8	3	
Agua contaminada de tenerías, uso doméstico y pilas sépticas	Líquido	RVI	5	1	1
Total			51	8	1

Fuente: Propia

Los microorganismos son ubicuos y en los ambientes naturales se encuentran usualmente como poblaciones mixtas, por lo que es necesario tenerlos como cultivos puros por medio de aislamientos, con el fin de identificarlos y caracterizarlos. Para tal fin se emplean técnicas de aislamiento que conducen a la obtención de un cultivo puro para su posterior observación e identificación mediante pruebas morfológicas y moleculares (Álvarez *et al.*, 2017). Estudios similares para el aislamiento de microorganismos se han realizado referente a diversos ecosistemas (agua, suelo y materia orgánica descompuesta) así como Martínez *et al.* (2010) que aislaron bacterias resistentes a antibióticos e iones metálicos a partir de aguas y sedimentos del río Almendares contaminado por metales pesados y desechos domésticos; Ramírez y Gómez (2015) aislaron bacterias promotoras de crecimiento de plantas aisladas de zonas naturales protegidas del estado de Guanajuato donde se seleccionaron dos árboles de mezquite (*Prosopis laevigata*) y encino (*Quercus rugosa*) para la toma de muestra de suelo de la rizosfera.

El presente trabajo, muestreando ambientes boscosos y poco intervenidos por el hombre (Reserva Natural El Chocoyero) y sitios altamente contaminados (Río Chiquito), permitió obtener los resultados que se detallan en las **Tablas 2 y 3**, mostrándose que en la Reserva Natural El Chocoyero se obtuvo un total de 44 aislados microbianos desglosados en 22 aislados bacterianos, 21 aislados de hongos filamentosos y 1 aislado de hongo levaduriforme. Por otro lado, en el Río Chiquito se obtuvo un total de 60 aislados microbianos que se desglosan en 51 aislados bacterianos, 8 aislados de hongos filamentosos y 1 aislado de hongo levaduriforme. Como se puede observar se obtuvo un número mayor de aislados en Río Chiquito ya que este lugar se encuentra más contaminado por todo tipo de contaminantes provenientes de factores externos (aguas con metales pesados,

diferentes sustancias químicas, desechos orgánicos, desechos domésticos y aguas negras tratadas) donde pueden crecer más variantes de microorganismos. Mientras que en la Reserva Natural El Chocoyero existe degradación de la materia, pero es un ecosistema más conservado y limpio que el del Río Chiquito ya que el desarrollo de microorganismos está directamente relacionado con la descomposición de la materia orgánica.

Martínez *et al.* (2010) trabajaron con un ecosistema (Río Almendares) muy parecido al Río Chiquito donde lograron aislar 23 cultivos bacterianos puros provenientes de 3 puntos de muestreo, mientras que en Río Chiquito se logró aislar 51 cultivos puros bacterianos siendo una cantidad mayor a la del Río Almendares. Esto pudo haber sido por la diferencia entre el número de muestras tomadas por Martínez *et al.*, (2010) y los puntos muestreados del río chiquito, además de la diferencia entre los medios utilizados para ambos trabajos. Por otra parte, Ramírez y Gómez, (2015) reportaron 100 cepas bacterianas aisladas de muestras de suelo, lo cual difiere grandemente de lo obtenido trabajando con muestras de suelo de la Reserva Natural El Chocoyero, pudiendo deberse esta diferencia a los antes discutido para el caso del Río Chiquito y al número de muestras tomadas en la reserva.

7.1.3 Pruebas morfológicas para la caracterización microbiana

El estudio microscópico en fresco y después de la tinción revela la forma, la manera de agruparse, la estructura de las células y su tamaño. Así mismo la aplicación de tinciones diferenciales (Tinción Gram) nos permiten realizar la división de las bacterias en dos grandes grupos de acuerdo a la capacidad de tinción que presentan al ser expuestas a colorantes catiónicos como cristal violeta y safranina. Estos dos grupos de bacterias están conformados por bacterias Gram positivas, que poseen múltiples capas de peptidoglucano que se encuentra formando su pared celular permitiendo de esta manera que al finalizar el procedimiento de tinción se tiñan de color violeta y las Gram negativas, que sólo presentan una fina capa de peptidoglucano tiñéndose de un color rosado (Lucana y Huanca, 2014). En relación a lo anterior Arias *et al.* (2012) aislaron bacterias acidófilas a partir del drenaje ácido proveniente de las inmediaciones a las unidades mineras de Julcani y Recuperada, Huancavelica, a las que les efectuaron pruebas morfológicas para su identificación. Por otro lado, Ramírez y Gómez (2015) caracterizaron por Tinción de Gram diferentes aislados provenientes de muestras de suelos de la rizosfera en zonas naturales protegidas del estado de Guanajuato. Viteri *et al.* (2016), identificaron por medio de pruebas morfológicas bacterias celulolíticas de tres hábitats tropicales en Boyacá, Colombia para evaluar su capacidad para degradar celulosa e identificar las de mayor capacidad.

Las pruebas morfológicas para la identificación de los microorganismos se realizaron mediante observación visual de las características macroscópicas de las colonias en medio sólido LB y PDA, el primero para bacterias y el segundo para hongos, fundamentadas en el acápite 5.2.2 del marco teórico y mediante la observación de las células al microscopio, planteado en el acápite 6.3.3 de la metodología, para verificar si se trataba de bacterias, hongos filamentosos u hongos

levaduriformes, de acuerdo con la morfología observada. Para conocer la morfología microscópica de las bacterias se observó la forma y tamaño de la célula (para diferenciarlas de las levaduras), además de su comportamiento ante la tinción de Gram. En el caso de los hongos se distinguían en filamentosos o levaduriformes, primero por las características macroscópicas de las colonias, como la apariencia, algodonosa en los primeros y mucosa o cremosa (parecida a la de las bacterias) en los segundos. Posteriormente se realizó la observación de esporas para hongos filamentosos y tinción simple para observar las células de los hongos levaduriformes.

En las **Figuras 22 y 23** se presenta una muestra representativa de las observaciones macroscópicas y microscópicas realizadas a 19 cultivos puros de bacterias, colectados en la Reserva Natural El Chocoyero y el Río Chiquito, los cuales fueron seleccionados de un total de 73 bacterias que se aislaron de ambos muestreos, teniendo en cuenta como parámetro de selección sus características morfológicas, para su posterior identificación molecular. En los **Anexos 4, 5, 6, 7 y 8** se puede observar el resto de los cultivos puros y su respectiva tinción de Gram.

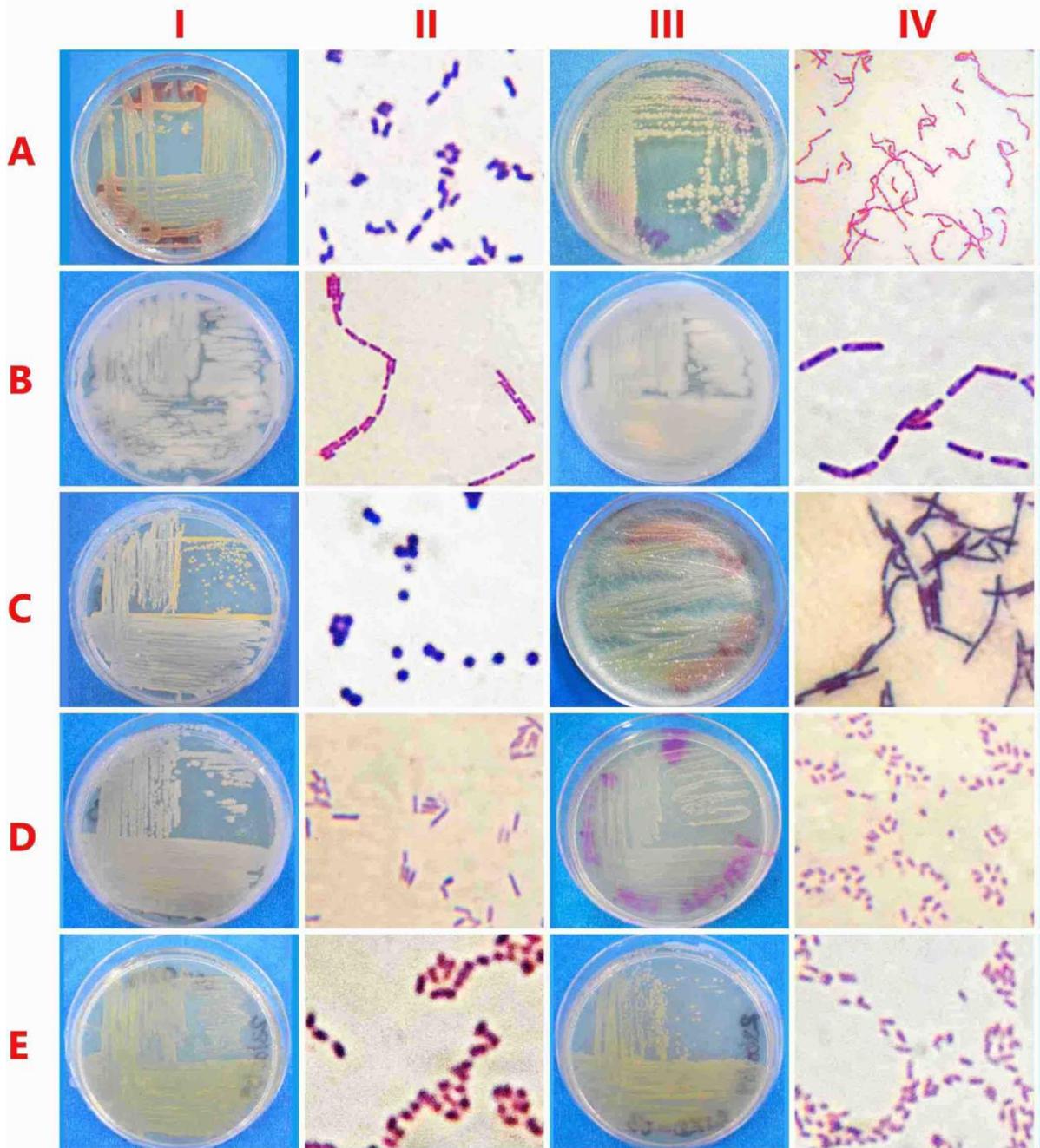


Figura 22. Se muestra la morfología macroscópica de bacterias en placa Petri y su respectiva morfología microscópica en tinción Gram observada al objetivo 100x, obtenidas en la Reserva Natural El Chocoyero. AI-AII: *Exiguobacterium profundum*-Gram positivos, AIII-AIV: *Bacillus megaterium*-Gram positivos, BI-BII y BIII-BIV: *Bacillus sp* -Gram positivos, CI-CII: *Staphylococcus sciuri* – Gram positivos, CIII-CIV: *Bacillus sp*-Gram positivos, DI-DII: *Aeromonas hydrophila* – Gram negativos, DIII-DIV: *Alcaligenes faecalis subsp faecalis*-Gram negativos y EI-EII: *Erwinia sp* -Gram negativos, EIII-EIV: *Pantoea dispersa*-Gram negativos (Fuente: propia).

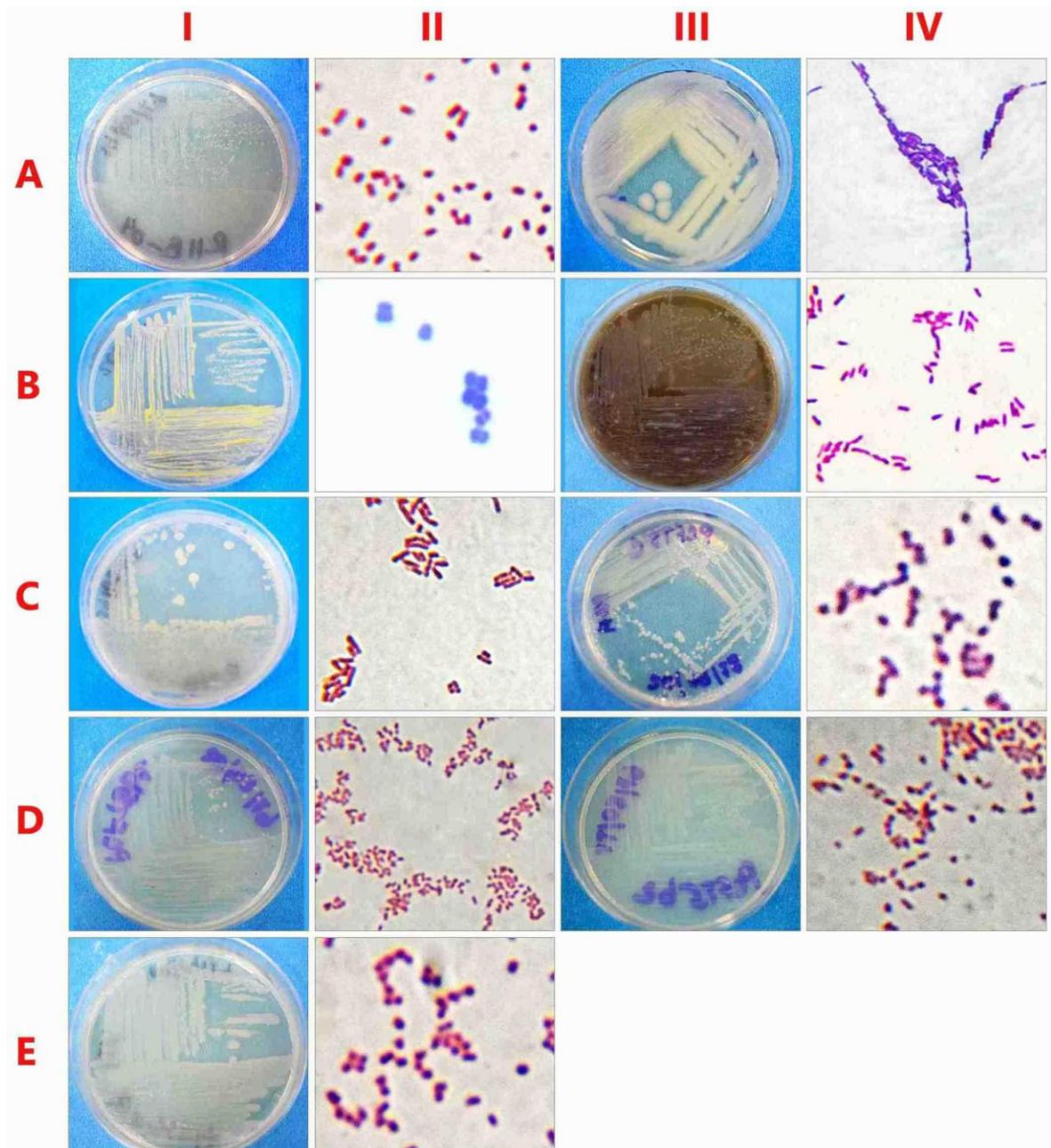


Figura 23. Se muestra la morfología macroscópica de bacterias en placa Petri y su respectiva morfología microscópica en tinción de Gram observada a objetivo 100x, obtenidas en el Río Chiquito. AI-AII: *Acinetobacter sp*-Gram negativos, AIII-AIV: *Bacillus cereus*-Gram positivos, BI-BII: *Micrococcus sp*-Gram positivos y BIII-BIV: *Pseudomonas mendocina*-Gram negativos, CI-CII: *Bacillus flexus*-Gram negativos, CIII-CIV: *Enterobacter sp*-Gram negativos, DI-DII: *Enterobacter cloacae*-Gram negativos, DIII-DIV: *Enterobacter sp*-Gram negativos y EI-EII: *Enterobacter cloacae*-Gram negativos (Fuente: propia).

En las **Tablas 4 y 5** se describen las características morfológicas macroscópicas y microscópicas más comunes observadas en cada una de las 19 bacterias que se identificaron. Ver los **Anexos 9 y 10** donde se describen las características macroscópicas y microscópicas de los 54 cultivos puros de bacterias restantes del total y aún por identificar.

Tabla 4. *Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de bacterias aisladas de la Reserva Natural El Chocoyero.*

Características morfológicas de bacterias		
Código	Observación macroscópica	Observación microscópica
	Apariencia de la colonia	Resultado de tinción Gram
<i>Muestra I: Agua de cascada del Chocoyero</i>		
CIC-01	Colonia pequeña, puntiforme, convexa, color amarillo naranja, borde entero, húmeda y lisa.	Bacilos cortos Gram positivos
<i>Muestra III: Biopelícula adherida a una roca</i>		
CIIIA-02	Colonia de tamaño mediano, color crema, forma circular, convexa, superficie lisa, borde entero, consistencia cremosa y opaca.	Bacilos largos Gram negativos en cadenas.
CIIB-04	Colonia grande, cremosa, borde irregular, color crema, plana, rugosa, borde entero y opaca.	Bacilos largos ligeramente anchos Gram positivos que forman cadenas.
CIIC-06	Colonia grande, cremosa, borde irregular, color crema, plana, rugosa, borde entero y opaca.	Bacilos largos ligeramente anchos Gram positivos que forman cadenas.
<i>Muestra IV: Lama o película microbiana adherida a una piedra</i>		
CIVC-03	Colonia pequeña, color amarillo naranja, mucoide, borde entero, lisa, elevada, circular, translúcida y brillante.	Cocos bien redondos Gram positivos, dispersos y tienden a formar diplococos.
<i>Muestra V: Biopelícula blanca y verdosa adherida a una roca</i>		
CVB-01	Colonia grande, color crema, seca, plana, filamentosa, se extiende en gran parte de la placa y es opaca.	Bacilos largos Gram positivos, formadoras de cadenas.
<i>Muestra VII: Agua de cascada del brujo</i>		
CVIIC-03	Colonia mediana, translúcida de color marrón, borde entero, convexa, circular, húmeda y brillante.	Bacilos cortos delgados Gram negativos dispersos.

Continuación **Tabla 4**

CVIID-04	Colonia pequeña, circular, elevada, lisa, borde entero, color crema, translúcida, brillante y cremosa.	Cocobacilos pequeños Gram negativos y dispersos.
----------	--	--

Muestra IX: Tronco de árbol degradado

CIXD-02	Colonia de tamaño pequeña, amarilla translúcida, colonias puntiformes, elevada, mucoide, brillante, lisa, entero.	Cocobacilos Gram negativos cortos que tienden a agruparse.
CIXD-03	Colonia pequeña, color amarillo tenue, translúcida, puntiforme, borde entero, lisa, convexa, mucoide y brillante.	Cocobacilos Gram negativos cortos que tienden a agruparse.

Fuente: Propia

Tabla 5. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de bacterias aisladas de Río Chiquito.

Características morfológicas de bacterias			
Código	Observación macroscópica	Observación microscópica	
	Apariencia de la colonia	Resultado de tinción Gram	
<i>Muestra II: Agua residual de uso doméstico</i>			
RIIB-04	Colonia pequeña, color crema, húmeda, borde entero, lisa, elevada, puntiforme, traslúcida y brillante.	Cocobacilos negativos	Gram que tienden a agruparse.
RIIB-07	Colonias grandes, de consistencia seca, rugosa, borde entero, forma irregular, color crema, plana y opaca.	Bacilos largos y angostos	Gram positivos que forman cadenas grandes.
<i>Muestra IV: Agua residual de tenerías</i>			
RIVB-06	Colonias mediana, crecimiento lento hasta de 48 horas de incubación, produce un pigmento amarillo, convexa, mate, circular, borde entero, cremosa y lisa.	Cocos bien definidos	Gram positivos que tienden a formar diplococos.
RIVB-08	Colonia pequeña, color marrón, pigmentación difusible en el medio de color café, viscosa, circular, lisa, elevada, brillante, borde entero y olor característico a frutas	Bacilos cortos muy delgados pequeños	Gram negativos.
RIVB-11	Colonia grande, color crema, opaca, forma irregular, mucoide, plana, lisa y borde ondulado.	Bacilos pequeños anchos	Gram negativos.
<i>Muestra V: Agua residual de tenerías</i>			
RVD-03	Colonia pequeña, color crema, traslúcida, brillante, puntiforme, borde entero, lisa, elevada, mucoide.	Cocobacilos	Gram negativos pequeños.
RVB-04	Colonia mediana, color crema, circular, traslúcida, brillante, borde entero, elevada, lisa, y húmeda.	Cocobacilos	Gram negativos pequeños.
RVB-05	Colonia mediana, color crema, circular, traslúcida, brillante, borde entero, elevada, lisa, y húmeda.	Cocobacilos	Gram negativos pequeños.

Continuación **Tabla 5**

Muestra VI: Agua contaminada de tenerías, uso doméstico y pilas sépticas

RVID-01	Colonia pequeña, color crema, Cocobacilos pequeños traslúcida, brillante, puntiforme, borde Gram negativos. entero, lisa, convexa y húmeda.
---------	---

Fuente: Propia

Los resultados de las pruebas morfológicas efectuadas en este trabajo que se presentaron en las **Figuras 22 y 23** muestran que, de los 19 aislados bacterianos seleccionados, 17 son de forma bacilar; 5 Gram positivos y 12 Gram negativos y 2 son de forma cocal y Gram positivos. Del mismo modo para aislados bacterianos no identificados aún (54 en total) que se muestran en los **Anexos 4 al 8**, 37 son de forma bacilar; 19 Gram positivos y 18 Gram negativos y 17 de forma cocal; 5 Gram positivos y 12 Gram negativos. En las **Tablas 4 y 5** se describen los resultados de las pruebas morfológicas presentados en las **Figuras 22 y 23** donde se determinó una variedad de características macroscópicas como apariencia de la colonia (color, forma, consistencia y textura) y características microscópicas (respuesta a la Tinción Gram, si se trata de cocos, bacilos o cocobacilos). En los **Anexos 9 y 10** se pueden ver las características antes explicadas para los aislados bacterianos aún no identificados.

Arias *et al.* (2012), lograron caracterizar morfológicamente mediante tinción Gram y observación microscópica especies bacterianas como: *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans* de drenajes contaminados con metales pesados provenientes de minas. Ramírez y Gómez (2015), aislaron bacterias provenientes de zonas naturales protegidas del estado de Guanajuato en las que utilizaron pruebas morfológicas en 21 cepas bacterianas que presentaron actividad ACC (1-acido carboxílico, -1- aminociclopropano) desaminasa como apoyo preliminar de manera que pudieron realizar pruebas de antagonismo, pero no llegaron a una identificación concreta. Viteri *et al.* (2016) llegaron a aislar de bosques tropicales en Boyacá, Colombia e identificar con base en sus características morfológicas y bioquímicas géneros bacterianos como: *Bacillus sp*, *Erwinia sp* y *Pseudomonas sp*. Esta investigación al igual que las anteriores se apoyó de pruebas morfológicas para llegar a una identificación presuntiva de las bacterias obtenidas con el fin de evaluar la necesidad de una posterior identificación molecular mediante herramientas moleculares.

Esto confirma que es de vital importancia conocer la morfología de las colonias y las células bacterianas para su identificación y la diferenciación de los microorganismos en general. Es necesario recalcar que a este nivel de identificación morfológica (macroscópica y microscópica) se pudo conjeturar que se contaba con bacterias pertenecientes a géneros *Micrococcus* y *Bacillus*, lo que se confirmó posteriormente a través de la identificación por métodos moleculares.

Con respecto a los hongos, en las **Figuras 24** y **25** se presenta una muestra representativa de las observaciones macroscópicas y microscópicas realizadas a 8 cultivos puros de Hongos filamentosos y 1 Hongo levaduriforme colectados en la Reserva Natural El Chocoyero y 1 cultivo puro de Hongo levaduriforme colectado en Río Chiquito, los cuales fueron seleccionados en base a sus características de un total de 31 Hongos que se obtuvieron, para su posterior identificación molecular.

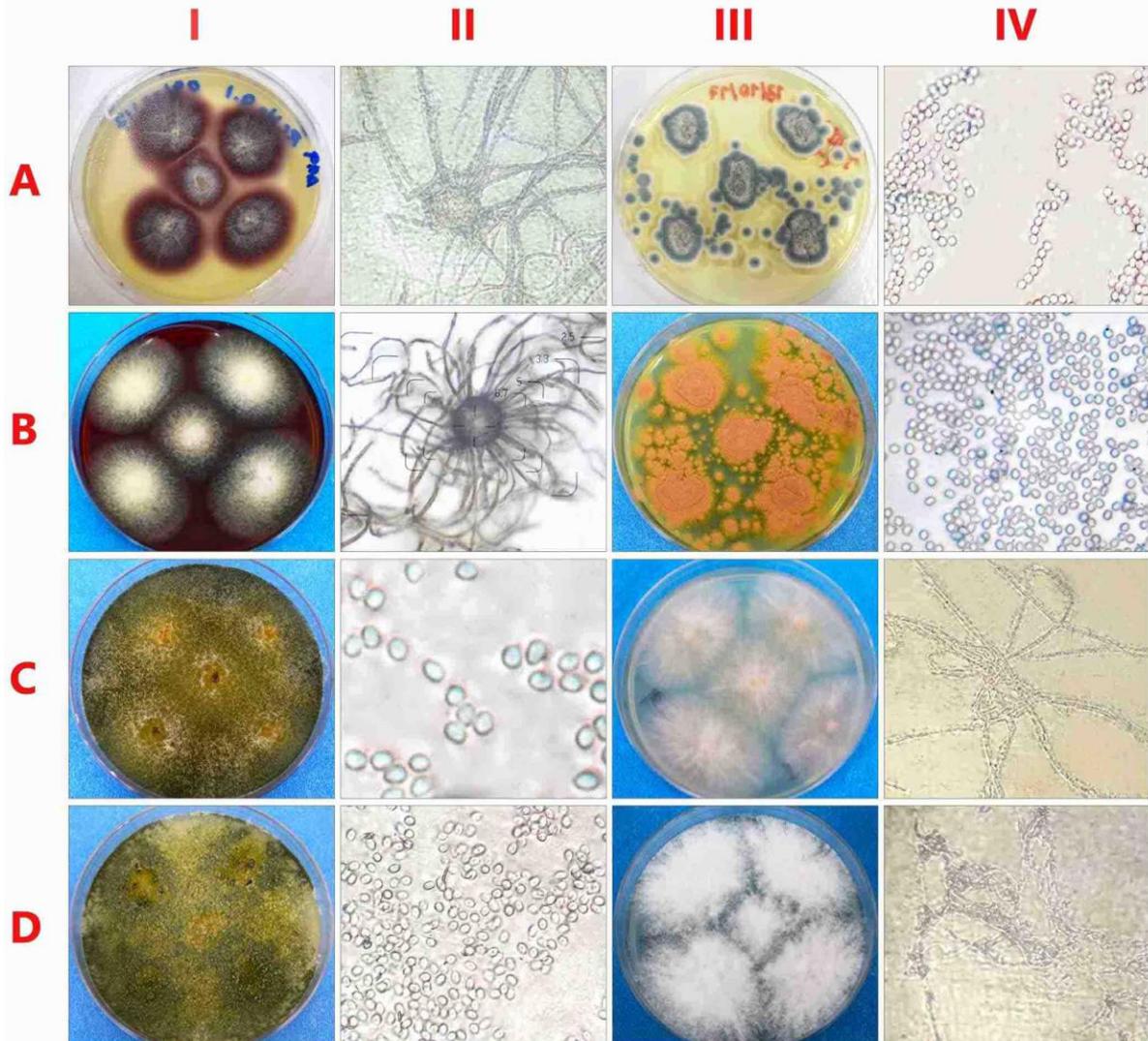


Figura 24. Se muestra el crecimiento en placa de hongos filamentosos medio PDA y su observación de esporas al microscopio con un objetivo de 50x, representación de 8 hongos filamentosos de un total de 31 obtenidos en la Reserva Natural El Chocoyero. AI-AII: *Chaetomium brasiliense* y estructura sin esporas, AIII-AIV: *Penicillium citrinum* y esporas en forma globosa, BI-BII: *Chaetomium aureum* y su estructura típica de este género, BIII-BIV: *Aspergillus sp* y esporas en forma cilíndrica, CI-CII: *Trichoderma harzianum* y esporas en forma globosa o elipsoidal, CIII-CIV: *Humicola sp* y su estructura sin esporas, DI-DII: *Trichoderma longibrachiatum* y sus esporas globosas o elipsoidal, DIII-DIV: *Lenzites sp* y su estructura sin esporas (Fuente: propia).

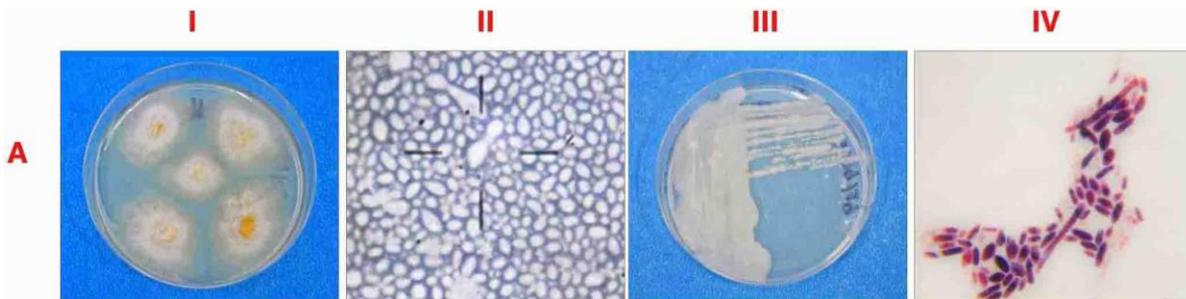


Figura 25. Se muestra el crecimiento en placa de hongos levaduriformes en medio PDA y su observación de células al microscopio con un objetivo de 50x, de los cuales se obtuvo 1 en cada sitio de muestreo para un total de 2. AI-All: *Candida orthopsilosis* y células en forma ovalada, AIII-AIV: *Pichia kudriavzevii* y células en forma alargada (Fuente: propia).

La identificación tradicional de hongos con fines de estudios taxonómicos se realiza a través de varios caracteres morfológicos que destacan aspectos presentes en los distintos especímenes como tamaño, forma y estructura, a estos se han añadido nuevos aspectos clasificatorios como caracteres bioquímicos y fisiológicos para determinar una caracterización para cada especie (Avilés y Granja, 2014). Muchas investigaciones se han realizado a la fecha, relacionada con la identificación de hongos filamentosos y levaduriformes. Escobar *et al.* (2012) identificaron géneros y posibles especies de hongos filamentosos en compost de residuos orgánicos de fincas cafeteras de Cundinamarca teniendo en cuenta las características macro y microscópicas observadas, dentro de esta última la observación de esporas. Mambuscay *et al.* (2013) obtuvieron levaduras de los zumos de las frutas de mora, piña y uva colectadas en Colombia, las cuales se caracterizaron morfológica y fisiológicamente para luego ser identificadas mediante técnicas moleculares. Pacasa-Quisbert *et al.* (2017) realizaron estudios centrados en caracterización de la microbiota fúngica cultivable de muestras de suelo tomadas en el agroecosistema de K'iphak'iphani, comunidad Choquenaira-Viacha, departamento de La Paz, Bolivia. Estos últimos autores presentan la identificación de 44 hongos filamentosos representativos, seleccionados en base a características macroscópicas distintivas de un total de 110 hongos, se caracterizaron usando enfoques morfológicos. Flores y Roque (2017), mediante la investigación realizada, caracterizaron microbiológica y molecularmente la diversidad microbiana cultivable de bioinsumos comerciales producidos artesanalmente en Nicaragua, específicamente realizaron pruebas morfológicas para bacterias y hongos.

Las características macroscópicas y microscópicas de hongos filamentosos y levaduriformes que se analizan en esta investigación, se resumen en las **Tablas 6 y 7** dadas a continuación.

Tabla 6. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de Hongos filamentosos aislados de la Reserva Natural El Chocoyero.

Características morfológicas de Hongos de filamentosos				
Código	Observación macroscópica			Observación microscópica
	Color de colonia		Apariencia del micelio	Forma de esporas
	Anverso	Reverso		
CIID-07	Morado con centro blanco con pigmentación de color morado difusible en el medio alrededor de las colonias.	Morado con pigmentación de color morado oscuro difusible en el medio.	Colonia aterciopelada, consistencia dura, deflecado, crecimiento limitado en los puntos de siembra, plana, y de crecimiento lento.	Se Observó la estructura del género <i>Chaetomium</i> pero no se observó esporas.
CIID-09	Verde con gris y blanco.	Crema con centro más intenso	Colonia algodonosa, forma circular, elevada, extendida, margen deflecado, crecimiento limitado en los puntos de siembra, producción de exudado y consistencia blanda y mucoide.	Globosas o esféricas a subesferoidales y de paredes lisas.
CIVD-05	Café rojizo con blanco y centro amarillo con pigmento de color rojo cobrizo difusible en el medio.	Color café rojizo con bordes blancos y pigmento de color rojo cobrizo difusible en el medio.	Colonia aterciopelada, crecimiento extendido, borde filamentoso, forma circular, consistencia dura y plana.	Se Observó la estructura característica de un hongo género <i>Chaetomium</i> pero no se observó esporas.
CVD-05	Café claro con bordes blanquecinos y	Color amarillo con mostaza, con bordes	Colonia pulverulenta, crecimiento invasivo en la superficie del medio, con surcos radiados en el	Globosas, lisas, de color verdosas y con bordes gruesos.

Continuación **Tabla 6**

	pigmentación amarillenta difusible en el medio.	blanquecinos y pigmentación amarilla difusible en el medio.	Centro no tan pronunciados, bordes filamentosos blanquecinos brillantes al exponerse a la luz.	
CVD-06	Verde con blanco y centro verde claro.	Crema	Colonia pulverulenta y aterciopelada, extendida, plana, sin margen, crecimiento invasivo en la superficie del medio y consistencia mucoide.	Esporas en forma globosa o elipsoidal, color verdecito y de paredes lisas.
CVIIID-02	Blanco con un punto anaranjado en el centro.	Blanco con un punto anaranjado en el centro.	Colonia vellosa, circular, extendida, borde filamentoso, elevada, consistencia dura en el centro, de crecimiento lento y después de varios días de haberse sembrado produce un pigmento anaranjado.	No se pudo observar esporas.
CIXD-11	Verde oscuro y pigmento verde tenue difusible en el medio.	Color verde amarillento y pigmento difusible en el medio de color verde claro.	Colonia pulverulenta, plana, extendida, sin margen, crecimiento invasivo en la superficie del medio y consistencia mucoide.	Esporas en forma globosas o de elipsoides y de paredes lisas.
CIXD-12	Blanco	Blanco con puntos de color amarillo claro en el centro.	Colonia algodonosa, extendida, de forma irregular, ligeramente elevada de consistencia suave y de crecimiento lento	No se pudo observar esporas.

Fuente: Propia

Tabla 7. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de Hongos levaduriformes aislados de Reserva Natural El Chocoyero y Río Chiquito.

Características Morfológicas de Hongos levaduriformes		
Código	Observación macroscópica Apariencia de la colonia	Observación microscópica Resultado de tinción simple
<i>Reserva Natural El Chocoyero</i>		
CIXD-06	Hongo dimórfico, colonia irregular, forma de cráter, tiene 3 capas, encima tiene una estructura mucoide de color crema y observa una ligera elevación, debajo presenta una estructura pulverulenta de color blanco, con borde filamentoso de color crema.	Célula en forma ovalada, sin observación de núcleo y de diferentes tamaños.
<i>Río Chiquito</i>		
RVID-07	Color blanco, Forma circular, borde filamentoso, superficie convexa, opaca, y consistencia cremosa.	Células alargadas, sin observación de núcleo y de diferentes tamaños.

Fuente: Propia

Las pruebas morfológicas desarrolladas para la identificación de hongos levaduriformes y filamentosos permitió la determinación de muchas características macro y microscópicas. En la **Figura 24** se muestra las características de los hongos filamentosos (Color de la colonia en placa, apariencia del micelio, pigmentación difusible en el medio si es el caso y forma de espora). En el caso de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum* se puede observar semejanzas en el crecimiento invasivo y el color de la colonia en placa, además de que sus esporas se asemejan un poco porque ambos microorganismos pertenecen al mismo género. El *Penicillium citrinum* presentó una colonia de tipo algodonosa y de margen deflecado característico de su género. En cambio, hubo 4 hongos a los que no se logró observar sus esporas, pero si sus estructuras siendo estos: *Chaetomium aureum*, *Chaetomium brasiliense*, *Humicola sp* y *Lenzites sp*. Sin embargo, *Chaetomium aureum* permitió la apreciación de la estructura típica del género *Chaetomium* la cual representa el cuerpo fructífero llamado ascoma y se diferencia entre las especies por el tipo de cabellos laterales (liso, enganchado, espiral, enrollado, etc.). A su vez, en la **Figura 25** se muestran las características de los hongos levaduriformes (color, forma, consistencia y tamaño de las células) donde las colonias de *Pichia kudriavzevii* son muy similares a las colonias bacterianas en su forma elipsoide, mientras que *Candida orthopsilosis* se comporta como un hongo dimórfico ya que presenta dos formas anatómicas: una forma micelial y otra levaduriforme.

Por otra parte, en las **Tablas 6 y 7** se describen las características macro y microscópicas de los aislados fúngicos identificados. En el caso de los hongos filamentosos se observó la forma de las esporas siendo la más común la de forma globosa, además de la variación de tamaño. En los **Anexos 12 y 14** se puede observar que los aislados CVD-04, CIXD-04, RID-06 y RIID-09 presentan colonias muy parecidas a las del género *Aspergillus*. También en el **Anexo 12** se puede observar colonias similares al género *Trichoderma* en los aislados CIXD-07 y CIXD-08. En los hongos levaduriformes se observaron formas de células elipsoide, ovaladas y alargadas de diferentes tamaños de acuerdo al microorganismo que se analizó. Una visión más completa de las características más comunes observadas es posible mediante el análisis de las tablas en los **Anexo 11 y 13** para los aislados no identificados.

Escobar *et al.* (2012), mediante técnicas de microscopía y macroscopía identificaron hongos filamentosos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Acremonium*, *Alternaria* y *Fusarium*. Mambuscay *et al.* (2013), muestran como basándose en la combinación de metodologías fenotípicas y moleculares es posible diferenciar comunidades de hongos levaduriformes lo que permitió identificar géneros *Wickerhamomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Meyerozyma*, *Hanseniaspora*, *Issatchenkia*. Pacasa-Quisbert *et al.* (2017), identificaron hongos filamentosos, siendo la población fúngica de mayor incidencia encontrada los géneros *Penicillium*, *Alternaria*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Fusarium* y *Trichoderma*. Flores y Roque (2017), mediante la investigación para los hongos lograron la identificación de un hongo a nivel de género (*Penicillium*). En este trabajo de igual manera que las investigaciones antes citadas, se logró sugerir la identidad a nivel de género de

algunos microorganismos como son los casos de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Pichia*. De la misma forma, este trabajo se asemeja a la investigación de Pacasa-Quisbert *et al.* (2017) con respecto a que ellos no pudieron observar estructuras de hongos filamentosos a 29 cepas aisladas debido a muchos factores que afectan el crecimiento y esporulación del hongo en el laboratorio entre los que se señalan que muchos hongos imperfectos requieren ciertas condiciones como: luz, humedad, temperatura, pH, nutrientes y vitaminas para sobrevivir, crecer y reproducirse. Estos factores, quizás deberán analizarse con mayor detenimiento con el propósito de llegar a observar las estructuras de los hongos que en esta ocasión no fue posible obtenerlas.

7.1.4 Identificación molecular de microorganismos seleccionados

El costo que conlleva la secuenciación de un microorganismo para su identificación por vía molecular es considerablemente alto, por esta razón al principio del proyecto se había propuesto identificar solamente 20 microorganismos, pero al final se logró identificar 29 microorganismos de un total de 104 que se aislaron, quedando pendiente la identificación de 75 aislados (54 aislados bacterianos y 21 aislados fúngicos filamentosos). El potencial biotecnológico que queda plasmado en este banco de aislados aun por identificar, se espera que se explote con el desarrollo de investigaciones aplicadas en diferentes áreas como, la agrícola e industrial (entre otras) en Nicaragua. La bioprospección microbiana en los dos sitios de muestreo, Reserva Natural El Chocoyero y Río Chiquito, dejó como resultado un banco de microorganismos identificados constituido por, 11 cepas identificadas hasta nivel de género donde se obtuvieron 8 géneros diferentes, 1 cepa identificada hasta nivel de subespecie y 17 cepas identificadas hasta nivel de especie de las cuales se obtuvo 16 especies diferentes.

Identificación molecular de bacterias

La comparación de las secuencias de los ARNr 16S (o de los genes que los codifican) permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariontes. Este hecho ha tenido una enorme repercusión en taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias (Rodicio y Mendoza, 2004). Actualmente se desarrollan numerosas investigaciones dentro del marco de la identificación microbiana aplicando las herramientas moleculares para tal fin, en la mayoría de los casos estos trabajos ofrecen resultados convincentes sobre la identidad de sus aislados como es el estudio desarrollado por Sun *et al.* (2010), donde obtuvieron exitosos resultados aislando e identificando 32 cepas bacterianas endofíticas a partir de plantas tolerantes al cobre (*Elsholtzia splendens* y *Commelina communis*) colectadas de la tierra de desechos de la mina de cobre Tangshan ubicada en Nanjing, China. Flores y Roque (2017) identificaron 15 microorganismos a partir de bioinsumos comerciales producidos artesanalmente.

Se enviaron a secuenciar un total de 19 bacterias a la compañía Macrogen en Corea del Sur, 10 de estas bacterias fueron aisladas en la Reserva Natural El

Chocoyero y 9 en Río Chiquito, los cultivos enviados a secuenciar se seleccionaron de acuerdo a sus características morfológicas con el objeto de tener una distribución variable. La compañía Macrogen envió como resultado de sus análisis las secuencias de las bacterias en archivo FASTA y electroferogramas cuyas secuencias fueron analizadas (Corregidas y alineadas) como se planteó en el acápite 6.3.4 para elaborar el árbol filogenético cuyo fragmento se presenta en la **Figura 26**. Las secuencias corregidas y alineadas en formato FASTA se presentan en el **Anexo 15** y el árbol filogenético completo en el **Anexo 16**.

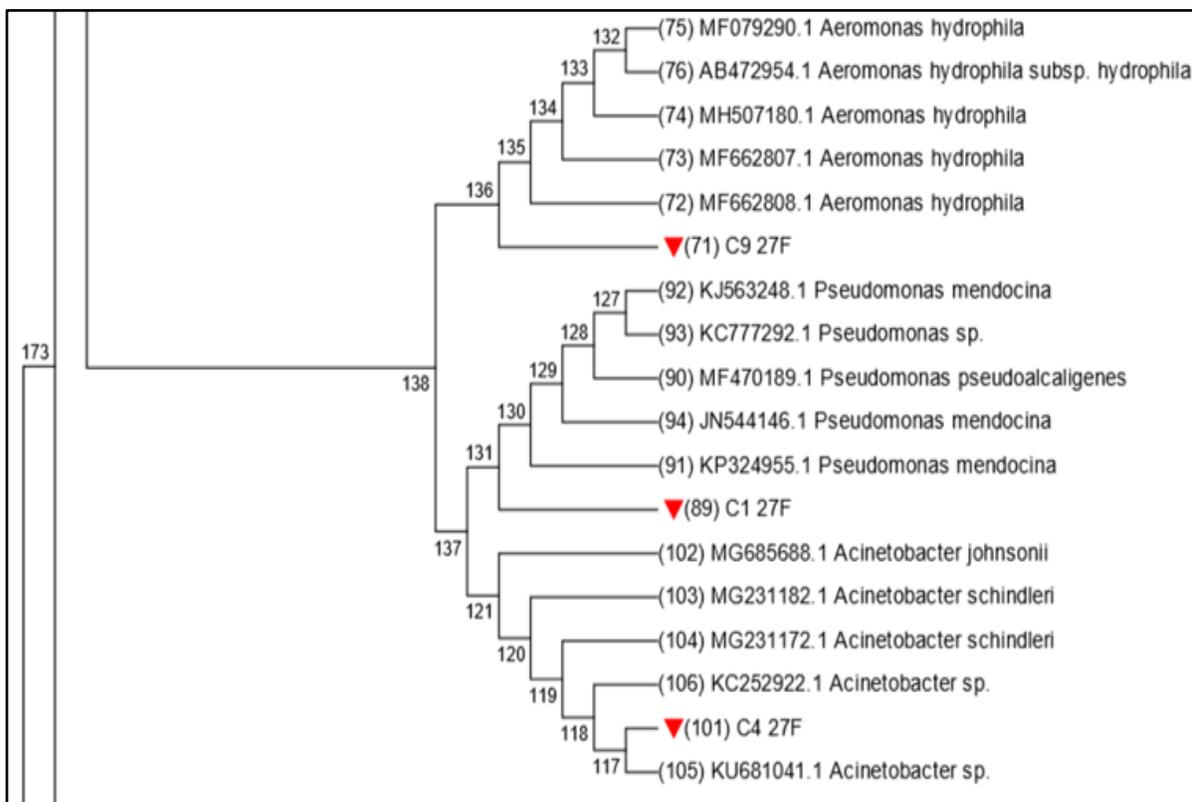


Figura 26. Fragmento de relaciones evolutivas de bacterias. La historia evolutiva se infirió utilizando el método del vecino más cercano. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de rama = 2.23365539. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de probabilidad máxima compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis involucró 111 secuencias de nucleótidos. Todas las posiciones que contienen vacíos y datos faltantes fueron eliminadas. Hubo un total de 626 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 (Fuente: propia).

El análisis del árbol filogenético representado en parte en la **Figura 26** y complementado en el **Anexo 16**, permitió la identificación microbiana final, tal y como se muestra en las **Tablas 8 y 9** dadas a continuación.

Tabla 8. Identificación molecular de 10 cepas de bacterias autóctonas cultivables procedentes del muestreo en la Reserva Ecológica El Chocoyero como resultado de la corrección de errores, análisis de secuencias y análisis de árboles filogenéticos construido con el programa MEGA 7.

BACTERIAS IDENTIFICADAS EN LA RESERVA NATURAL EL CHOCOYERO						
Código Secuencia	Código Microorganismos	Muestra	Vecino más Cercano (Número de Acceso)	Max. Score	Ident. Max (%)	Identidad Final
D	CVIID-04	Agua de cascada	<i>Alcaligenes faecalis subsp faecalis</i> (GQ495222.1)	1147	99	<i>Alcaligenes faecalis subsp faecalis</i>
C6	CIXD-03	Tronco de árbol degradado	<i>Pantoea dispersa</i> (MH605572.1)	1797	100	<i>Pantoea dispersa</i>
C7	CIIB-04	Roca con biopelícula microbiana	<i>Bacillus sp</i> (MH819519.1)	1498	100	<i>Bacillus sp</i>
C8	CIIC-06	Roca con biopelícula microbiana	<i>Bacillus sp</i> (MH817412.1)	1511	99	<i>Bacillus sp</i>
C9	CVIIC-03	Agua de cascada El Brujo	<i>Aeromonas hydrophila</i> (MF662808.1)	1700	100	<i>Aeromonas hydrophila</i>
C10	CIXD-02	Tronco de árbol degradado	<i>Erwinia sp</i> (KT427917.1)	1694	100	<i>Erwinia sp</i>
C11	CVB-01	Roca con biopelícula microbiana	<i>Bacillus sp</i> (KM596515.1)	1988	99	<i>Bacillus sp</i>
C17	CIC-01	Agua de cascada	<i>Exiguobacterium profundum</i> (MG705821.1)	1384	100	<i>Exiguobacterium profundum</i>
C18	CIIA-01	Roca con biopelícula microbiana	<i>Bacillus megaterium</i> (MH138038.1)	1958	99	<i>Bacillus megaterium</i>
C23	CIVC-03	Roca cubierta de lama	<i>Staphylococcus sciuri</i> (KR476410.1)	2080	99	<i>Staphylococcus sciuri</i>

Fuente: propia

Tabla 9. Identificación molecular de 9 cepas de bacterias autóctonas cultivables procedentes del muestreo en Río Chiquito, como resultado de la corrección de errores, análisis de secuencias y análisis de árboles filogenéticos construido con el programa MEGA 7.

BACTERIAS IDENTIFICADAS EN EL RIO CHIQUITO						
Código Secuencia	Código Microorganismos	Muestra	Vecino más Cercano (Número de Acceso)	Max. Score	Ident. Max (%)	Identidad Final
C1	RIVB-08	Agua de Tenerías	<i>Pseudomonas mendocina</i> (KP324955.1)	1993	97	<i>Pseudomonas mendocina</i>
C2	RVB-04	Agua de Tenerías con mat. Inorgánica	<i>Enterobacter cloacae</i> (HM755579.1)	2025	99	<i>Enterobacter cloacae</i>
C3	RIVB-11	Agua de Tenerías	<i>Bacillus flexus</i> (MG738217.1)	2012	99	<i>Bacillus flexus</i>
C4	RIIB-04	Agua residual doméstica	<i>Acinetobacter sp</i> (KU681041.1)	1905	97	<i>Acinetobacter sp</i>
C5	RIIB-07	Agua residual doméstica	<i>Bacillus cereus</i> (KY820937)	2069	99	<i>Bacillus cereus</i>
C19	RVD-03	Agua de Tenerías	<i>Enterobacter sp</i> (EU260136.1)	2025	99	<i>Enterobacter sp</i>
C21	RVB-05	Agua de Tenerías	<i>Enterobacter sp</i> (EF025346.1)	2122	99	<i>Enterobacter sp</i>
C22	RVID-01	Agua de pilas sépticas	<i>Enterobacter cloacae</i> (HM755579.1)	2025	99	<i>Enterobacter cloacae</i>
C24	RIVB-06	Agua de Tenerías	<i>Micrococcus sp</i> (KU497553.1)	1975	99	<i>Micrococcus sp</i>

Fuente: propia

En la **Figura 26** se observa como algunas de las bacterias secuenciadas se agrupan correctamente en clados muy bien diferenciados para cada género y su especie. De esta manera fue posible determinar claramente géneros como *Aeromonas sp*, *Pseudomonas sp* y *Acinetobacter sp*. En la figura del **Anexo 16**, se pueden apreciar las afinidades filogenéticas de todas las bacterias con su género y especie. Los resultados de la identificación de los 19 aislados bacterianos se enlistan en las **Tablas 8 y 9** con indicación del género y la especie, su clasificación taxonómica su máximo score, porcentaje de homología de la secuencia con la correspondiente en el Genbank del NCBI y el número de acceso de la misma.

Según Tindall *et al.*, (2010) las cepas cuyas secuencias tienen una homología (% Identidad) inferior al 95% con respecto a la depositada en el Genbank del NCBI pueden ser catalogadas solo a nivel de género. En el presente trabajo, cada aislado bacteriano confirma su identidad con el 97 al 99% en comparación con las secuencias contenidas en el Genbank. Por tanto, todas las secuencias de bacterias superaron dicho límite lo que confiere a estos resultados, una mayor fiabilidad a los resultados obtenidos.

El Max score se refiere a la puntuación de alineación más alta o cantidad de bases (Adenina, Timina, Citosina y Guanina) de la secuencia problema que coinciden en la misma posición con las bases de las secuencias contenidas en el Genbank. De manera general el proceso de identificación permitió obtener una variedad de géneros y especies relacionadas a continuación: *Alcaligenes faecalis subsp faecalis*, *Pantoea dispersa*, *Bacillus sp* (3), *Aeromonas hydrophila*, *Erwinia sp*, *Exiguobacterium profundum*, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus sciuri*, *Pseudomonas mendocina*, *Enterobacter cloacae* (2), *Bacillus flexus*, *Acinetobacter sp*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter sp* (2), *Micrococcus sp*. Estos resultados significan que a la fecha se cuenta con 9 especies y 1 subespecie bacterianas diferentes y que están plenamente identificadas, quedando pendiente afinar la identificación de bacterias a nivel de género.

En relación con la presencia de las cepas identificadas en la Reserva Natural El Chocoyero y el Río Chiquito, todos los géneros identificadas han sido aislados previamente en ambientes similares a estos y han usado los mismos primers de secuenciación para llevar a cabo su identificación molecular. Sun *et al.* (2010), identificaron bacterias pertenecientes a los géneros *Acinetobacter*, *Bacillus* y *Micrococcus* a partir de plantas tolerantes al cobre colectadas de la tierra de desechos de la mina de cobre, los cuales coinciden con los encontrados en esta investigación ya que fueron aislados de ambientes similares al del Río Chiquito contaminado con metales pesados provenientes de efluentes de tenerías. Flores y Roque (2017) reportan que de 14 aislados bacterianos, 10 corresponden al género *Bacillus* de los tipos *cereus*, *flexus*, *pumilus*, *megaterium* y *subtilis* (Algunos de estos aislados en Río Chiquito y la Reserva Natural El Chocoyero).

Identificación molecular de Hongos

Dentro del ADN ribosómico existen determinadas secuencias que sirven para clarificar los límites y la identidad de las especies en hongos. En la actualidad, las secuencias de los espaciadores internos transcritos ribosomales (ITS por sus siglas en inglés) y los genes 18S, 5.8S, y 28S son las regiones del ADNr más utilizados para la identificación de hongos microscópicos. (Schoch *et al.*, 2012). Hasta la fecha se han elaborado una gran cantidad de investigaciones que implican la identificación molecular de hongos filamentosos y levaduriformes. Sandhu *et al.* (2012), aislaron 12 cepas fúngicas a partir de residuos de cáscaras de Kinnow mandarina (*Citrus reticulata*) logrando identificar molecularmente 2 cepas, un hongo y una levadura por secuenciación de las regiones 26S e ITS respectivamente. Chen *et al.* (2012), mediante métodos morfológicos y moleculares identificaron 7 géneros de hongos (entre ellos hongos filamentosos y levaduriformes) los cuales se aislaron a partir de 120 segmentos de raíz y tallo de *Aegiceras comiculatum* colectadas en la Zona de Conservación del Bosque de Manglares en Dong Zhai Gang, China. Flores y Roque (2017), a través de la investigación realizada, identificaron molecularmente la diversidad microbiana (incluyendo hongos) cultivables de bioinsumos comerciales producidos artesanalmente en Nicaragua.

Para verificar los resultados de la identificación morfológica de acuerdo al tipo de espora de los hongos filamentosos y células de hongos levaduriformes, se identificaron molecularmente por la contratación del servicio de la compañía Macrogen, a través de la secuenciación de la región ITS (Internal Transcribed Spacer) del ADNr con los primers ITS1-ITS4 para hongos filamentosos y región D1/D2/D3 con los primers LROR- LR7 para hongos levaduriformes. De los resultados del análisis de las secuencias se elaboró el árbol filogenético cuyo fragmento es mostrado en la **Figura 27**. Las secuencias corregidas y alineadas en formato FASTA se presentan en el **Anexo 17** y el árbol filogenético completo en el **Anexo 18**.

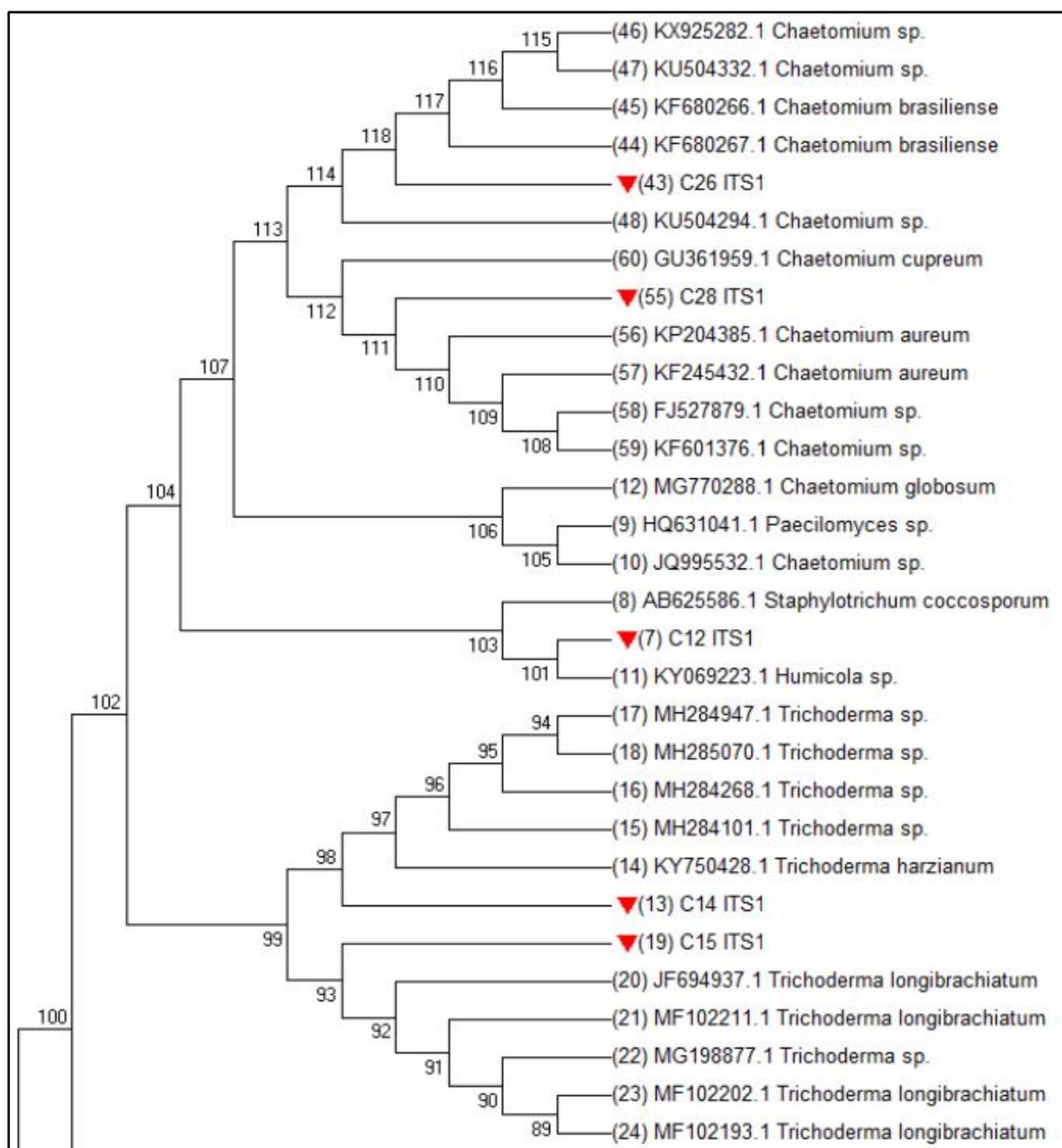


Figura 27. Fragmento de relaciones evolutivas de hongos. La historia evolutiva se infirió utilizando el método del vecino más cercano. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de rama = 2.59454765. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de probabilidad máxima compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis involucró 60 secuencias de nucleótidos. Todas las posiciones que contienen vacíos y datos faltantes fueron eliminadas. Hubo un total de 307 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 (Fuente: propia).

El análisis de la **Figura 27** y que se complementa en el **Anexo 18**, permitió la identificación final de los hongos aislados en la presente investigación y se resumen en la **Tabla 10** mostrada a continuación.

Tabla 10. Identificación molecular de 10 cepas de Hongos autóctonos cultivables procedentes de los muestreos en Reserva Natural El Chocoyero y Río Chiquito como resultado de la corrección de errores, análisis de secuencias y análisis de árboles filogenéticos construido con el programa MEGA 7.

HONGOS IDENTIFICADOS EN RESERVA NATURAL EL CHOCOYERO Y RIO CHIQUITO						
Código Secuencia	Código Microorganismos	Muestra	Vecino más Cercano (Numero de Acceso)	Max. Score	Ident. Max (%)	Identidad Final
HONGOS FILAMENTOSOS						
111	CVD-05	Roca con biopelícula	<i>Aspergillus sp</i> (MG738218.1)	460	98	<i>Aspergillus sp</i>
C12	CVIID-02	Suelo degradado	<i>Humicola sp</i> (KY069223.1)	846	100	<i>Humicola sp</i>
C14	CVD-06	Roca con biopelícula	<i>Trichoderma harzianum</i> (KY750428.1)	1033	99	<i>Trichoderma harzianum</i>
C15	CIXD-11	Tronco de árbol degradado	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (JF694937.1)	1064	99	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
C25	CIXD-12	Tronco de árbol degradado	<i>Lenzites sp</i> (KT210101.1)	1062	100	<i>Lenzites sp</i>
C26	CIID-07	Roca con biopelícula	<i>Chaetomium brasiliense</i> (KF680267.1)	939	100	<i>Chaetomium brasiliense</i>
C27	CIID-09	Roca con biopelícula	<i>Penicillium citrinum</i> (MF379645.1)	926	100	<i>Penicillium citrinum</i>
C28	CIVD-05	Roca con biopelícula	<i>Chaetomium aureum</i> (KP204385.1)	900	100	<i>Chaetomium aureum</i>
HONGOS LEVADURIFORMES						
C16	CIXD-06	Tronco de árbol degradado	<i>Candida orthopsilosis</i> (LC389305.1)	808	99	<i>Candida orthopsilosis</i>
C29	RVID-07	Agua de pilas sépticas	<i>Pichia kudriavzevii</i> (MH488970.1)	1170	100	<i>Pichia kudriavzevii</i>

Fuente: propia

En el presente trabajo, por medio de técnicas moleculares se identificaron a nivel de género y especie las 10 cepas fúngicas seleccionadas. En el fragmento del árbol filogenético que se presenta en la **Figura 27** se observa la presencia de clados bien definidos para cada uno de los géneros haciendo más sencilla la identificación a nivel de especies de 2 levaduras (*Candida orthopsilosis* y *Pichia kudriavzevii*) y 5 hongos filamentosos (*Trichoderma harzianum*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Chaetomium brasiliense*, *Penicillium citrinum* y *Chaetomium aureum*), mientras que el análisis bioinformático y la correlación filogenética no permitió la determinación de la especie de los 3 hongos identificados como miembros de los géneros *Aspergillus sp*, *Humicola sp* y *Lenzites sp*. Adicionalmente, en la **Tabla 10** se detallan los resultados obtenidos de la identificación molecular (vecino más cercano, max score, y % de identidad máxima) donde se aprecia como en la mayoría de los casos, cada hongo confirma su identidad con un 98 a 100% en comparación con las secuencias obtenidas en el Genbank.

Las únicas dos cepas que identificaron molecularmente Sandhu *et al.* (2012) en los residuos de cáscaras de Kinnow mandarina (*Citrus reticulata*) fueron *Aspergillus oryzae* y la levadura *Pichia kudriavzevii*. Chen *et al.* (2012), mediante la secuenciación de las regiones ITS1-ITS4, LROR-LR7 y EF1-983F-EF1-2218R y la construcción del árbol filogenético identificaron a nivel de especie a los hongos *Hortaea werneckii*, *Hortaea acidophila* y *Hortaea thailandica* y a nivel de género *Cladosporium*, *Pestalotiopsis*, *Massarina*, *Cochliobolus*, *Aureobasidium* y *Fusarium*. Flores y Roque (2017), por el análisis de secuencias ITS identificaron 2 hongos pertenecientes a las especies *Alternaria alternata*, *Fusarium equiseti* y dos hongos pertenecientes a los géneros *Fusarium*. De acuerdo a los trabajos citados previamente, se puede constatar que la identificación molecular por la técnica PCR para las regiones ITS y D1/D2/D3 constituyen una herramienta eficiente por la cual se puede obtener secuencias de cepas fúngicas de diversos ecosistemas que al ser analizadas y comparadas con las secuencias que se encuentran en el Genbank del NCBI, permiten a través de la elaboración de árboles filogenéticos identificar hongos aislados de diversos ecosistemas. Esta investigación al igual que las investigaciones referidas anteriormente, demuestra que las pruebas morfológicas combinadas con las pruebas moleculares establecen una identificación más fiable y precisa de los microorganismos.

7.1.5 Aplicaciones biotecnológicas ambientales de cepas microbianas autóctonas identificadas.

La biotecnología microbiana es el ámbito de la microbiología orientado a la producción de elementos de interés industrial mediante procesos en los cuales intervenga, en algún paso, un microorganismo (González 2012). Actualmente se han realizado diversas investigaciones que se basan en la búsqueda o revisión a cerca de las aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos en diversos ámbitos. Barrios (2011), efectuó una revisión bibliográfica sobre biorremediación como una herramienta para el saneamiento de ecosistemas marinos contaminados con hidrocarburos. Cortazar-Martínez *et al.* (2012), revisaron diversos estudios

acerca de la degradación de colorantes de la industria textil por medio de microorganismos. Beltrán-Pineda y Gómez-Rodríguez (2016), en su revisión abordan algunos microorganismos y plantas que cuentan con diferentes mecanismos bioquímicos para contrarrestar la toxicidad de los metales pesados por medio de Biorremediación. Vega-Celedón *et al.* (2016), centraron su revisión en la biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. Singh *et al.* (2016), centraron su trabajo en la revisión sobre los avances recientes en la síntesis biológica de nanopartículas a partir de microorganismos y plantas, describiendo las perspectivas de su futuro desarrollo y aplicaciones.

A partir de la identificación molecular se definieron las identidades de algunos de los microorganismos aislados en la Reserva Natural El Chocoyero y Río Chiquito, con el objetivo de establecer una correlación mediante la revisión de bancos de datos internacionales entre las cepas autóctonas identificadas y las aplicaciones biotecnológicas de enfoque ambiental (enfaticando en estas) ya definidas. Como objetivo final de esta investigación se elaboraron las **Tablas 11, 12, 13 y 14** donde se enumeran las aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos secuenciados que se resumen en 10 especies de bacterias diferentes, 5 géneros de bacterias, 2 especies de levadura, 5 especies de hongos filamentosos diferentes y de 3 géneros de hongos filamentosos. Es importante destacar que estas aplicaciones son relevantes y de carácter científico, encontrado hasta el momento de la búsqueda y fundamentado con su cita, lo cual se realizó para cada microorganismo de manera sistemática e individual.

Tabla 11. *Aplicaciones biotecnológicas de especies bacterianas aisladas en la Reserva Natural El Chocoyero y Río Chiquito.*

Microorganismos	Aplicaciones	Referencias
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<p>Remoción de plomo a concentraciones de 20 y 100 ppm en aguas residuales sintéticas.</p> <p>Produce grandes cantidades de quitinasa a 37°C y pH 8.0 después de 24–48 h de incubación utilizando quitina coloidal como sustrato, almidón (1%) como fuente de carbono y extracto de malta y levadura (1%) como fuente de nitrógeno.</p> <p>Produce energía en celdas de combustible microbianas y reduce el cromo hexavalente, Cr (VI).</p>	<p>Ramírez <i>et al.</i> (2016)</p> <p>Saima and Roohi (2013)</p> <p>Mora y Bravo (2017)</p>
<i>Alcaligenes faecalis subsp faecalis</i>	<p>Producción de las enzimas lipasa, proteasa y endoglucanasa a partir de bacterias endófitas asociadas con plantas de ecosistema de manglar brasileño.</p> <p>Ejerce actividad de biocontrol contra patógenos del ciclamen y produce hidroxilamina como un compuesto de control biológico (Biopesticida).</p> <p>Biorremediación de lodos petroquímicos ricos en hidrocarburos aromáticos y saturados mediante el uso de bacterias del género <i>Alcaligenes</i> y <i>Pseudomonas</i>.</p> <p>Biosorción de cadmio alcanzando concentraciones superiores a 168 mg /L y potencial biotecnológico para la promoción del crecimiento y desarrollo de plantas en sitios con alto grado de contaminación por Elementos potencialmente tóxicos.</p>	<p>Castro <i>et al.</i> (2014)</p> <p>Yokoyama <i>et al.</i> (2013)</p> <p>Chirinos <i>et al.</i> (2010)</p> <p>Noguez-Iniesta <i>et al.</i> (2017)</p>
<i>Bacillus cereus</i>	<p>Biorremediación de metales pesados como plomo (II), cobre (II), níquel (II) o zinc (II), plata (I), cromo (VI) o cadmio (II).</p> <p>Degradación del petróleo Diesel-2 debido a la interacción de</p>	<p>Muñoz-Silva <i>et al.</i> (2019)</p> <p>Mendoza y Guerrero</p>

Continuación **Tabla 11**

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> y el consorcio microbiano propio del ambiente marino (<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Bacillus cereus</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i>).	(2015)
	Biorremediación de sitios contaminados con Cr (VI) con capacidad de tolerar hasta 8000 ppm y remover el 100% del contaminante.	Ramírez y Benítez (2013)
	Potencial de electrogenicidad y generación de bioelectricidad.	Ajunwa <i>et al.</i> , (2018)
	Biosorción de estroncio (II) a partir de soluciones acuosas.	Long <i>et al.</i> (2017)
	Producción de dos polihidroxicarboxilatos, ácido poli metil-3-hidroxitetradecanoico (P-3HTD) y ácido metil-3-hidroxi octadecanoico (P3-HOD), de <i>Bacillus cereus</i> para la obtención de bioplásticos.	Zribi-Maaloul <i>et al.</i> (2013)
	Biosorción de mercurio Hg de un medio acuoso a partir de las células inmovilizadas de <i>Bacillus cereus</i> .	Sinha <i>et al.</i> (2012)
<i>Bacillus flexus</i>	Biodegradación mejorada de 3-nitrobenzoato por medio de células inmovilizadas de <i>Bacillus flexus</i> con espuma de poliuretano.	Mulla <i>et al.</i> (2012)
	Biodegradación del polímero poliácridamida (PAM) y sus derivados.	Joshi <i>et al.</i> (2017)
	Biomineralización del carbonato de calcio por la cepa bacteriana <i>Bacillus flexus</i> y su aplicación en remediación de grietas de concreto.	Jagadeesha <i>et al.</i> (2013)
<i>Bacillus megaterium</i>	Producción de ácido indol acético (AIA) y promoción del crecimiento en plantas.	Grunenvaldt <i>et al.</i> (2018)
	Promotor de crecimiento vegetal.	Zou <i>et al.</i> , (2010)
	Biosorbente de metales pesados como cadmio y cinc.	Carballo <i>et al.</i> (2012)
	Producción de polihidroxicarboxilato tolerando altas concentraciones de NaCl.	Salgaonkar <i>et al.</i> (2013)
<i>Enterobacter cloacae</i>	Producción biotecnológica de acetoina a partir de los recursos lignocelulósicos de la cepa <i>Enterobacter cloacae</i> manipulada	Zhang <i>et al.</i> (2015)

Continuación **Tabla 11**

	metabólicamente.	
	Biorremediación de metales pesados (Pb, Cd y Ni), producción de floculante y expresión de proteínas en presencia de estos metales.	Banerjee <i>et al.</i> (2015)
	Degrada el glifosato a componentes no tóxicos (sarcosina y glicina), promueve el crecimiento de las plantas y es prometedor para su uso como bioinoculante en la fitorremediación de suelos contaminados con compuestos organofosforados difíciles de hidrolizar.	Kryuchkova <i>et al.</i> (2014)
	Reduce efectivamente el selenito a Se ⁰ usando fumarato reductasa y forma SeNPs; esta capacidad se puede emplear para desarrollar un biorreactor para tratar la contaminación por Se y para la biosíntesis de los SeNPs en el futuro.	Song <i>et al.</i> (2017)
<i>Exiguobacterium profundum</i>	Producción de proteasa alcalina con gran estabilidad en presencia de agentes oxidantes, surfactantes y disolventes orgánicos.	Anbu <i>et al.</i> (2013)
	Produce un metabolito color anaranjado que posee el antimicrobiano y la propiedad antioxidante: el metabolito se puede tomar como antibiótico en campos médicos.	Preethi <i>et al.</i> (2015)
	Biosorción y biotransformación de As, ambos en forma de cultivos planctónicos y biopelículas.	Sabri <i>et al.</i> (2018)
	Biodegradación de hidrocarburos de petróleo por su capacidad metabólica y adaptativa de crecimiento.	Lustosa <i>et al.</i> (2018)
	Biorremediación de efluentes de industrias que manipulan metales pesados.	Pandit <i>et al.</i> (2013)
<i>Pantoea dispersa</i>	Biodegradación de nicotina.	Lei <i>et al.</i> (2014)
	Productora de la enzima celulasa: Producción, purificación y caracterización de celulosa a partir del aislado local de <i>Pantoea dispersa</i> .	Atala <i>et al.</i> (2015)

Continuación **Tabla 11**

	Producción de las enzimas proteasa y endoglucanasa a partir de bacterias endófitas asociadas con plantas de ecosistema de manglar brasileño.	Castro <i>et al.</i> (2014)
	Bacteria promotora de crecimiento de plantas en sorgo dulce. Actúa como Diazótrofo y produce ácido indol-3-acético.	Mareque <i>et al.</i> (2015)
<i>Pseudomonas mendocina</i>	Biosorbente de metales pesados como cadmio y cinc hasta alcanzar niveles de 22,56 mg x g ⁻¹ y de 25,36 mg x g ⁻¹ , respectivamente.	Carballo <i>et al.</i> (2012)
	Sistema de biorremediación aceptable y rentable utilizando <i>Pseudomonas mendocina</i> como inóculo en suelos contaminados con furano.	LIN <i>et al.</i> (2017)
	Biotratamiento de efluentes contaminados con As, Cr y Pb.	Mendoza <i>et al.</i> (2010)
<i>Staphylococcus sciuri</i>	Potencial biorremediador: reducción de Cr (VI) en plantas de arroz cultivadas en macetas.	Dutta <i>et al.</i> (2017)
	Biofertilización: solubilización sustancial de fosfato, producción de ácido indol-3-acético, presenta actividad de la desaminasa del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico y es tolerante a altas concentraciones de sal lo que le confiere propiedades que promueven el crecimiento de las plantas.	Akram <i>et al.</i> (2016)

Fuente: propia

Tabla 12. Aplicaciones biotecnológicas de géneros bacterianos aislados de la Reserva Natural El Chocoyero y del Río Chiquito.

Microorganismos	Aplicaciones	Referencias
<i>Acinetobacter sp</i>	Biodegradación de fenol: capaz de eliminar fenol / L en medio líquido y metabolizar el fenol en concentraciones en el tratamiento de aguas residuales que contienen fenol.	Wang <i>et al.</i> (2007)
	Biodegradación y biorremediación: posee una excelente resistencia al frío, es capaz de eliminar amonio, nitrito y nitrato y eliminación eficiente de DQO y TN de las aguas residuales sintéticas.	Yao <i>et al.</i> (2013)
	Biodegradación de n- alcanos con longitudes de cadena que van desde el decano (C ₁₀ H ₂₂) al del tetracontano (C ₄₀ H ₈₂).	Throne <i>et al.</i> (2007)
	Remoción de Pb a concentraciones de 20 y 100 ppm en aguas residuales sintéticas.	Ramírez <i>et al.</i> (2016)
<i>Bacillus sp</i>	Producción de celulasa.	Nandimath <i>et al.</i> (2016)
	Tratamientos de residuos radioactivos y Biorremediación.	Li <i>et al.</i> (2014)
	Biosíntesis de α-amilasa: utilizando la metodología de superficie de respuesta.	Tanyildizi <i>et al.</i> (2005)
	Biodegradación de hidrocarburos de petróleo por su capacidad metabólica y adaptativa de crecimiento.	Lustosa <i>et al.</i> (2018)
<i>Enterobacter sp</i>	Capaz de absorber los metales pesados Cd, Cu, Co, Zn y Pb a 2,69, 1,87, 3,56, 4,3 y 5,6 mg / g de peso seco, respectivamente.	El-Shanshoury <i>et al.</i> (2013)
	Potencial para promover el crecimiento de las plantas de la bacteria <i>Enterobacter sp</i> aislada de la rizosfera de palmeras de cocos (<i>Cocos nucifera</i> L.).	George <i>et al.</i> (2013)
	Producción de exopolisacáridos.	Priyanka <i>et al.</i> (2015)

Continuación **Tabla 12**

	Biodegradación de nicotina.	Lei <i>et al.</i> (2014)
	Producción de las enzimas proteasa y endoglucanasa a partir de bacterias endófitas asociadas con plantas de ecosistema de manglar brasileño.	Castro <i>et al.</i> (2014)
	Producción de biosurfactante que tiene actividad antifúngica y también inhibe la germinación de esporas de hongos. Esto puede ser útil para aplicaciones en las industrias farmacéutica y alimentaria.	Jadhav <i>et al.</i> (2011)
	Biorremediación de efluentes de fábricas de pulpa y papel por la bacteria degradadora de ácido tánico <i>Enterobacter sp.</i>	Singh <i>et al.</i> (2011)
	Generación de electricidad por <i>Enterobacter sp</i> usando celdas de combustible microbianas de una sola cámara a diferentes temperaturas.	Tkach <i>et al.</i> (2016)
<i>Erwinia sp</i>	Inmovilización de glucosiltransferasa a partir de <i>Erwinia sp</i> para la conversión de sacarosa en isomaltulosa.	Contesini <i>et al.</i> (2012)
	Capaces de solubilizar fosfato: aislados de <i>Erwinia sp</i> mostraron una alta tolerancia a la excreción de ácidos orgánicos en el medio, lo que los hace posibles bioinoculantes candidatos para suelos ácidos.	Muleta <i>et al.</i> (2013)
<i>Micrococcus sp</i>	Biodegradación del colorante verde malaquita.	Du <i>et al.</i> (2013)
	Biorremediación de sitios contaminados con petróleo crudo.	Kumar <i>et al.</i> (2013)
	Optimización de la producción de naringinasa y su purificación.	Amena <i>et al.</i> (2015)
	Producción y purificación de una proteasa alcalina.	HOU <i>et al.</i> (2017)
	Producción de celulasa.	Nisha <i>et al.</i> (2014)
	Agente de biorremediación en tecnología de tratamiento de efluentes tóxicos de curtiembre: Degradación de Cr, Cd y Pb.	Marzan <i>et al.</i> (2017)

Fuente: propia

Tabla 13. Aplicaciones biotecnológicas de especies y géneros de Hongos aislados de la Reserva Natural El Chocoyero.

Microorganismos	Aplicaciones	Referencias
<i>Aspergillus sp</i>	Biodegradación de polietileno de baja densidad.	Paul and Kumar (2014)
	Producción de cutinasa por optimización de parámetros medios usando la metodología de superficie de respuesta (RSM) para mejorar su producción.	Kumari <i>et al.</i> (2016)
	Potencial para la biosíntesis extracelular de nanopartículas de plata.	Mohmed <i>et al.</i> (2017)
	Biogénesis de nanocristales de PbS.	Kaur <i>et al.</i> (2014)
	Biorremediación de petróleo.	Thatheyus <i>et al.</i> (2014)
<i>Humicola sp</i>	Reducción del tamaño de la alúmina a granel para la producción en masa de nano-alúmina fluorescente.	Moeez <i>et al.</i> (2017)
	Síntesis biológica de nanopartículas de plata que no son tóxicas para el cáncer y las células normales hasta concentraciones de 50 µg / ml.	Syed <i>et al.</i> (2013)
	Producción de endo y exo glucanasa optimizando las condiciones culturales para mejorar la producción de enzimas.	Santosh <i>et al.</i> (2014)
<i>Lenzites sp</i>	Biosorción de ciertos metales pesados (Cu y Zn) de los efluentes de industrias de galvanoplastia.	Divia <i>et al.</i> (2015)
<i>Trichoderma harzianum</i>	Biocontrolador contra el marchitamiento del tomate causado por <i>Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici</i> .	Sundaramoorthy and Balabaskar (2013)
	Producción de la enzima lacasa (utilizando salvado de trigo en fermentación en estado sólido) la cual se aplica en la decoloración de tintes sintéticos.	Bagewadi <i>et al.</i> (2017)
	Potencial para estudios de biorremediación, ya que fue capaz de biodegradarse no solo Pentaclorofenol a 20 mgL ⁻¹ , sino también sus	Vacondio <i>et al.</i> (2015)

Continuación **Tabla 13**

	principales metabolitos Pentacloroanisol y 2,3,4,6-TeCA.	
	Biosíntesis de nanopartículas de oro (AuNPs) para la detección colorimétrica de iones de mercurio (II).	Tripathi <i>et al.</i> (2014)
	Biorrecuperación de suelos agrícolas altamente salinos a través de la adición de compost de viñedos complementado con <i>Trichoderma harzianum</i> .	Mbarki <i>et al.</i> (2016)
	Agente potencial de control biológico contra <i>Fusarium graminearum</i> , un agente causal de la pudrición del tallo del maíz.	Saravanakumar <i>et al.</i> (2017)
	Síntesis verde de nanopartículas de plata que exhiben actividad antibacteriana contra <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	Ahluwalia <i>et al.</i> (2014)
	Producción de celulasa en bruto y xilanasa para su aplicación en el destintado de residuos de papeles de fotocopiadoras.	Pathak <i>et al.</i> (2014)
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Biocontrolador contra el marchitamiento del tomate causado por <i>Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici</i> .	Sundaramoorthy and Balabaskar (2013)
	Biosíntesis de xilanasa, pectinasa, celulasa y α -amilasa por medio de diferentes desechos agrícolas de bajo costo, las cuales mostraron una alta eficacia en el desencolado de tejidos del tamaño de almidón, en el lavado biológico de tejidos celulósicos grises y en el biopulido de tejidos celulósicos.	Mostafa <i>et al.</i> (2018)
	Biotransformación de saponinas en <i>Panax notoginseng</i> implicando una factibilidad prospectiva para configurar diferentes técnicas de procesamiento para mejorar la calidad de <i>P. notoginseng</i> .	Ge <i>et al.</i> (2016)
	Potencial hidrocarbonoclastico: candidato ideal para los protocolos de bioaumentación del suelo en procedimientos de biorremediación a gran escala que tratan con sitios contaminados con combustible diésel.	Andreolli <i>et al.</i> (2016)
	Biosíntesis de nanopartículas de plata (Ag).	Devi <i>et al.</i> (2013)
	Producción de celulasa utilizando desechos celulósicos como fuentes de carbono de bajo costo.	Leghlimi <i>et al.</i> (2013)

Continuación **Tabla 13**

	Biocontrolador en función de su capacidad para producir las enzimas hidrolíticas N-acetilglucosaminidasa (NAGasa), endoquitinasa, glucanasa, β -1,3-glucanasa y xilanasa que atacan los hongos patógenos de las plantas.	Guigon-López <i>et al.</i> (2014)
<i>Chaetomium brasiliense</i>	Inhibidora de <i>Phytophthora palmivora</i> que causa la enfermedad de pudrición de la raíz de Durian var Montong a partir de las nanopartículas derivadas de <i>Chaetomium brasiliense</i> .	Tongon <i>et al.</i> (2018)
	Inhibidora de <i>Pythium spp</i> que causa la enfermedad de la pudrición de la raíz de la mandarina utilizando bi - cultivo, <i>extractos</i> crudos y pruebas de nanopartículas de <i>Chaetomium brasiliense</i> .	Udompongsuk <i>et al.</i> (2018)
	Biodegradación de la paja de arroz y el bagazo de caña de azúcar utilizando un consorcio entre hongos ligninolíticos y celulolíticos (<i>Chaetomium brasiliense</i> , <i>Inonotus tropicalis</i> y <i>Cerrena unicolor</i>).	Ramarajan and Manohar (2017)
<i>Penicillium citrinum</i>	Síntesis verde de nanopartículas de plata inducidas por el hongo <i>Penicillium citrinum</i> .	Honary <i>et al.</i> (2013)
	Producción de xilanasa a partir de <i>Penicillium citrinum</i> en un biorreactor de tanque agitado de 5 L a escala de laboratorio.	Ghoshal <i>et al.</i> (2014)
	Biodegradación del petróleo crudo, reduciendo el contenido total de petróleo crudo en un 77% y la fracción de n-alcano individual en un promedio de 95.37%, lo que indica que es un candidato potencial para su desarrollo en un agente de biorremediación.	Barnes <i>et al.</i> (2018)
	Biosorción de iones Pb (II) y Cu (II) usando biomasa muerta de las cepas <i>Penicillium citrinum</i> y <i>Fusarium equiseti</i> con la ayuda de grupos carbonilo, hidroxilo y amida.	Akinkunmi <i>et al.</i> (2016)
	Biosíntesis de Nanoprismas de Oro Coloidal utilizando <i>Penicillium citrinum</i> .	Goswami and Ghosh (2013)

Continuación **Tabla 13**

	Biocontrol en la enfermedad por moho gris de Botrytis (BGM) y promueve el crecimiento de las plantas en el garbanzo.	Gopalakrishnan <i>et al.</i> (2015)
Chaetomium aureum	Biorremediación de sitios contaminados por metales como el Pb.	Da Silva Júnior <i>et al.</i> (2018)
	Los extractos de pigmento metanólico de <i>Chaetomium aureum</i> exhiben un excelente efecto inhibidor contra bacterias patógenas humanas convirtiéndolo en potencial en la aplicación médica y en la industria farmacéutica.	Padmapriya <i>et al.</i> (2014)
	Producción de compuestos con propiedades antitumorales.	Calderani <i>et al.</i> (2016)
	Biocontrolador: potencial fungicida contra la explosión del arroz y los patógenos del tizón de la vaina.	Wang <i>et al.</i> (2013)

Fuente: propia

Tabla 14. Aplicaciones biotecnológicas de especies de Hongos levaduriformes aislados en Reserva Natural El Chocoyero y Río Chiquito.

Microorganismos	Aplicaciones	Referencias
<i>Pichia kudriavzevii</i>	Biorremediación in situ de ambientes contaminados con el herbicida atrazina.	Abigail <i>et al.</i> (2013)
	Biodegradación y detoxificación del colorante azo reactivo anaranjado 16 utilizado en la industria textil.	Rosu <i>et al.</i> (2018)
	Producción de etanol a altas concentraciones de azúcar.	Díaz-Nava <i>et al.</i> (2017)
	Biorremoción de Zn en ambientes complejos.	Li <i>et al.</i> (2016)
	Biorremediación de ambientes contaminados por colorantes azoicos: degrada el rojo ácido B halotolerante alcanzando una tasa de degradación de 94.29%.	Feng <i>et al.</i> (2014)
	Decoloración, biodegradación y desintoxicación del colorante C.I. Azul básico 41.	Roşu <i>et al.</i> (2019)
	Resistencia y absorción de metales (Pb, Cu, As y Cd) de aguas residuales industriales en el ambiente.	Ilyas and Rehman (2018)
	Potencial de electrogenicidad y generación de bioelectricidad.	Ajunwa <i>et al.</i> (2018)
	Biosíntesis de nanopartículas de ZnO que presentan actividad bactericida.	Moghaddam <i>et al.</i> (2017)
	Desacidificación del vino: Esta cepa mostró ser capaz de degradar el ácido L-málico en microvinificaciones, produjo niveles importantes de glicerol y cantidades aceptables de ácido acético y mejoró los atributos sensoriales del vino incrementando su aroma afrutado.	Del Mónaco <i>et al.</i> (2014)

Continuación **Tabla 14**

Candida orthopsilosis

Biodegradación del colorante reactivo verde y el efluente textil de manera efectiva en compuestos no tóxicos. Sinha *et al.* (2018)

Biolixiviación de Ag en placas de circuito impreso de teléfonos móviles de *Candida orthopsilosis* en consorcio con *Sphingomonas sp.* Díaz-Martínez *et al.* (2019)

Producción de ácido indol-3-acético. Limtong *et al.* (2014)

Producción de las enzimas: Fosfatasa alcalina, Esterasa, lipasa, leucina arilamidasa, valina arilamidasa, Cistina arilamidasa, Fosfatasa acídica, Naftil-AS-BI fosfohidrolasa y α -glucosidasa. Carvalho *et al.* (2013)

Fuente: propia

Dentro del marco de la búsqueda de aplicaciones biotecnológicas en el sector ambiental que tiene cada uno de los microorganismos identificados, se reportan en las **Tablas 11, 12, 13 y 14** un total de 108 citas de artículos científicos consultados, de los que se desprende un amplio desarrollo de bioprocesos que involucran a estos microorganismos, ya sea de una cepa microbiana en particular o de la formación de consorcios microbianos. Entre estos bioprocesos se puede mencionar el desarrollo de biotecnologías en biosorción, biodegradación, biorremediación, biorremoción, biosíntesis de enzimas y nanopartículas, etc.

Una de las aplicaciones más destacadas de esta investigación es la Remoción de metales pesados como Cd, Pb, Zn, Cr, Cu, As, y Hg del medio ambiente a través de biosorción, biorremoción y biorremediación (Dutta *et al.*, 2017; Divia *et al.*, 2015; Ilyas and Rehman, 2018), un resultado que efectivamente cumple de manera directa al tercer objetivo planteado en esta investigación; Se trata del desarrollo de bioprocesos en el sector ambiental. Entre las bacterias identificadas por medio de este estudio y que realizan estas funciones, se encuentran las especies *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas mendocina*, *Staphylococcus sciuri*; géneros como *Acinetobacter sp*, *Enterobacter sp*, *Micrococcus sp* y entre los hongos filamentosos *Penicillium citrinum*, *Chaetomium aureum*, *Lenzites sp* y la levadura *Pichia kudriavzevii*.

En la revisión de Beltrán-Pineda y Gómez-Rodríguez (2016) se abordan microorganismos destacados aplicables para la biorremediación de metales pesados (Cd, Cr y Hg) siendo algunos de ellos las bacterias *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus carnosus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Deinococcus radiodurans*, *Thermus thermophilus*, *Acidiphilium angustum*, *Flavobacterium aquatile*, *Flavobacterium hibernum*, *Vibrio harveyi*, *Enterobacter cloacae*, *Rhodobium marinum*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Pseudochrobactrum saccharolyticum*, *Pseudomonas sp*, *Micrococcus sp*, *Bacillus sp*, *Achromobacter sp*, *Microbacterium sp*, *Arthrobacter sp*, *Corynebacterium sp*, *Vogesella indigofera*, *Pseudomonas ambigua*, *Escherichia coli*, *Cupriavidus metallidurans*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria sp*, *Alcaligenes eutrophus*, *Pseudomonas putida*, *Aeromonas sp*, *Lactobacillus sp*, *Bacillus megaterium*, *Acinetobacter sp*, *Geobacillus thermodenitrificans* y *Shewanella oneidensis* y los hongos *Cunninghamella echinulata*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei*, *Glomus sp*, *Gigaspora sp* y *Acaulospora sp*. Por otro lado, en este estudio se reportan bacterias que coinciden con las mencionadas por estos autores que son capaces de remover el Cd y Cr mientras que en lo que se refiere al metal Hg sólo se encontró una especie bacteriana *Bacillus cereus* con la capacidad de remover dicho metal.

Al igual que para metales pesados, así mismo se enuncian los diferentes microorganismos identificados que ejercen una de las actividades más importantes en la biotecnología ambiental, lo cual se le atribuye a la biorremediación de hidrocarburos y sus derivados. Barrios (2011), reportó los géneros bacterianos *Acinetobacter sp*, *Alcaligenes sp*, *Alcanivorax sp*, *Aquaspirillum sp*, *Arthrobacter sp*, *Azospirillum sp*, *Bacillus sp*, *Beggiatoa sp*, *Cycloclasticus sp*, *Corynebacterium sp*, *Desulfotalea sp*, *Desulfovibrio sp*, *Erythrobacter sp*, *Flavobacterium sp*, *Geobacillus*

sp, *Geobacter sp*, *Halochromatium sp*, *Halomonas sp*; *Lucila sp*, *Metylophaga sp*, *Micrococcus sp*, *Microscilla sp*, *Mycobacterium sp*, *Neisseria sp*, *Nocardia sp*, *Novospingobium sp*, *Oleiphilus sp*, *Planococcus sp*, *Pseudomonas sp*, *Sphingomonas sp*, *Staphylococcus sp*, *Sulfitobacter sp*, *Xanthomonas sp* y *Marinobacter sp*; los hongos filamentosos *Alternaria sp*, *Aspergillus sp*, *Chaetomium sp*, *Cladosporium sp*, *Fusarium sp*, *Penicillium sp*, *Phanaerocheate sp*, *Pleurotus sp*, y *Rhizopus sp* y las levaduras *Candida sp* y *Saccharomyces sp*, que biodegradan hidrocarburos. El desarrollo de esta investigación permitió obtener algunos microorganismos identificados y que intervienen en la biorremediación de hidrocarburos como las bacterias *Acinetobacter sp*, *Bacillus sp*, *Micrococcus sp*, *Alcaligenes faecalis subsp faecalis*, *Bacillus cereus*, *Exiguobacterium profundum* y los hongos *Aspergillus sp*, *Trichoderma longibrachiatum* y *Penicillium citrinum*.

La presencia de colorantes en las aguas residuales representa un problema ambiental, ya que este tipo de compuestos no puede eliminarse con los métodos de tratamiento convencionales. Existe un gran número de microorganismos con la capacidad de eliminar el color de las aguas residuales mediante mecanismos como: la biosorción, la biodegradación aeróbica o anaeróbica y la producción de enzimas que catalizan la decoloración. Una manera de llevar a cabo la biodegradación es mediante microorganismos aislados que son capaces de degradar los colorantes. Cortazar-Martínez *et al.* (2012), mencionan el potencial encontrado en las bacterias *Citrobacter sp*, *Proteus mirabilis*, *Streptomyces sp*, *Streptomyces chromofuscus*, *Shewanella decolorationis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas mendocina*, *Bacillus subtilis*, *Aeromonas sp*, *Proetus mirabilis* y *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas putida*, y en los hongos *Funalia trogii*, *Aspergillus niger*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Irpex lacteus*. En este trabajo se determinó que la bacteria *Micrococcus sp* y las levaduras *Candida orthopsilosis* y *Pichia kudriavzevii* tienen potencial para degradar colorantes que contaminan el ambiente (Du *et al.*, 2013; Sinha *et al.*, 2018; Rosu *et al.*, 2018).

Otra de las aplicaciones de índole ambiental que se registran entre las cepas identificadas en esta investigación es la promoción del crecimiento vegetal y el biocontrol de plagas de diversos cultivos o en sus cosechas (Grunenvaldt *et al.*, 2018; Mareque *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2013). Vega-Celedón *et al.* (2016) reportaron como promotoras del crecimiento vegetal géneros de bacterias como *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Dexia*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* y *Zoogloea* y especies como *Azospirillum brasilense*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Burkholderia phytofirmans*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia xenovorans*, *Pseudomonas putida*, *Pantoea agglomerans*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Paenibacillus polymyxa* y *Bacillus megaterium*. En el presente estudio se identificaron microorganismos promotores del crecimiento vegetal como las bacterias *Alcaligenes faecalis subsp faecalis*, *Bacillus megaterium*, *Enterobacter cloacae*, *Pantoea dispersa*, *Staphylococcus sciuri*, *Enterobacter sp*, *Bacillus cereus*; los hongos *Trichoderma harzianum*,

Trichoderma longibrachiatum, *Chaetomium brasiliense*, *Penicillium citrinum* y *Chaetomium aureum*; y la levadura *Candida orthopsilosis*.

Por otra parte y como resultado de este estudio, se cuenta con varias especies y géneros de bacterias *Aeromonas hydrophila*, *Alcaligenes faecalis subsp faecalis*, *Exiguobacterium profundum*, *Pantoea dispersa*, *Bacillus sp*, *Enterobacter sp*, *Micrococcus sp*; géneros y especies de hongos *Aspergillus sp*, *Humicola sp*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Penicillium citrinum* y la levadura *Candida orthopsilosis* que actúan en producción y biosíntesis de enzimas como lipasa, proteasa, celulasa, xilanasas, etc. Cabe señalar que esta aportación industrial es parte del resultado de un proyecto de bioprospección microbiana de mayor envergadura del cual se dividió el presente trabajo para su mejor desarrollo.

7.2 Publicaciones generales

Como resultado adicional de la presente investigación hasta el día de hoy se han publicado 2 artículos y 1 artículo científico *in fieri* referidos a continuación:

1. BIOPROSPECCIÓN MICROBIANA PARA EL DESARROLLO DE APLICACIONES AMBIENTALES, publicado en el **3er foro de Proyectos De Investigación, Desarrollo, Innovación, Posgrado Y Extensión de la Universidad Nacional de Ingeniería** (Ríos-Guevara *et al.*, 2018)
2. LA BIOPROSPECCIÓN EN NICARAGUA: AVANCES EN LA BÚSQUEDA DE APLICACIONES AGRÍCOLAS, INDUSTRIALES Y AMBIENTALES, publicado en la **Revista Científica Nexo** (Páramo-Aguilera *et al.*, 2018).
3. BIOPROSPECCIÓN MICROBIANA PARA EL DESARROLLO DE APLICACIONES AMBIENTALES EN NICARAGUA (PRODUCCIÓN DE METANO, BIORREMEDIACIÓN, etc), artículo en proceso de publicación en la **Revista Congreso Universidad** la cual es una publicación científica reconocida por el Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente de la República de Cuba con ISSN-e 2306-918X e indexada en Latindex.

VIII. CONCLUSIONES

La realización del presente trabajo y el análisis de los resultados alcanzados, permiten llegar a las siguientes conclusiones considerando los objetivos que se propusieron al inicio del mismo:

1. Conservando una representación de los diferentes ecosistemas encontrados en cada uno de los sitios muestreados (La Reserva Natural El Chocoyero y Río Chiquito) y tomando en cuenta el grado de contaminación de los mismos, se tomaron 9 puntos de muestreo en la Reserva Natural El Chocoyero y 6 puntos en el Río Chiquito.
2. Como resultado del proceso de aislamiento de microorganismos se obtuvo 44 cultivos puros procedentes de ambientes boscosos y poco intervenidos por el hombre (Reserva Natural Chocoyero-El Brujo) y 60 cultivos puros de sitios altamente contaminados (Río Chiquito), para un total de 104 aislados obtenidos en este proyecto.
3. La cantidad y los tipos de aislados obtenidos en cada sitio muestreado, está en relación directa con el grado de contaminación existente, los tipos de contaminantes, los tipos de medios de cultivo empleados y de las condiciones generales de trabajo de las que se dispuso para desarrollarlo.
4. Como producto de la aplicación de métodos morfológicos y moleculares al presente proyecto, a la fecha se cuenta en el laboratorio de biotecnología del PIENSA-UNI:
 - ✓ Con un total de 104 aislados microbianos, de los cuales 73 son aislados bacterianos que mediante las pruebas morfológicas mostraron ser: 54 de forma bacilar (24 Gram positivos y 30 Gram negativos) y 19 de forma coccal (7 Gram positivos y 12 Gram negativos). Además, se cuenta con 29 aislados de hongos filamentosos y 2 aislados de hongos levaduriformes.
 - ✓ Con 9 especies y 1 subespecie bacterianas diferentes y que están plenamente identificadas, además de 5 géneros bacterianos diferentes y que son el resultado de lo identificado en este trabajo.
 - ✓ Con 7 especies fúngicas diferentes y que están plenamente identificadas y 3 géneros de hongos diferentes como fruto de esta investigación.
5. Las especies bacterianas y fúngicas plenamente identificadas pertenecen a:
 - ✓ **Bacterianas:** *Alcaligenes faecalis subsp faecalis*, *Pantoea dispersa*, *Aeromonas hydrophila*, *Exiguobacterium profundum*, *Bacillus*

megaterium, *Staphylococcus sciuri*, *Pseudomonas mendocina*, *Enterobacter cloacae* (2), *Bacillus flexus* y *Bacillus cereus*.

- ✓ **Fúngicas:** *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Chaetomium brasiliense*, *Penicillium citrinum*, *Chaetomium aureum*, *Candida orthopsilosis* y *Pichia kudriavzevii*.

6. Los géneros bacterianos y fúngicos identificados pertenecen a:

- ✓ **Bacterianos:** *Bacillus sp* (3), *Enterobacter sp* (2), *Erwinia sp*, *Acinetobacter sp*, *Micrococcus sp*.
- ✓ **Fúngicos:** *Aspergillus sp*, *Humicola sp* y *Lenzites sp*.

7. Trabajos científicos previamente desarrollados y que han sido documentados en esta investigación, confirman que los aislados obtenidos e identificados en este trabajo, coinciden con los obtenidos por los mismos en condiciones y ambientes similares.

8. Los resultados obtenidos de la identificación molecular en la mayoría de los casos, para bacterias confirma su identidad con un 97-100 % y para hongos confirma su identidad con un 98-100% en comparación con las secuencias obtenidas del Genbank del NCBI. Lo anterior se traduce en un proceso de identificación de calidad.

9. Las aplicaciones biotecnológicas para los microorganismos identificados en este trabajo que fueron obtenidas de bancos de datos internacionales, para el ambiente, además de la industria sugieren lo siguiente:

- ✓ Para la remoción de metales pesados como Cd, Pb, Zn, Cr, Cu, As, y Hg del ambiente a través de biosorción, biorremoción y biorremediación se han identificado microorganismos como: *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas mendocina*, *Staphylococcus sciuri*, *Acinetobacter sp*, *Enterobacter sp*, *Micrococcus sp*, *Penicillium citrinum*, *Chaetomium aureum*, *Lenzites sp* y *Pichia kudriavzevii*, que forman parte de la base identificada en esta investigación.
- ✓ Para la biorremediación de hidrocarburos y sus derivados se han identificado por este medio, microorganismos como: *Alcaligenes faecalis subsp faecalis*, *Bacillus cereus*, *Exiguobacterium profundum*, *Acinetobacter sp*, *Bacillus sp*, *Micrococcus sp*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Penicillium citrinum* y *Aspergillus sp* y que forman parte de las bases del PIENSA.
- ✓ Para la degradación de colorantes en aguas residuales mediante los mecanismos de biosorción, biodegradación o biorremediación se

identificaron microorganismos como: *Micrococcus sp*, *Candida orthopsilosis* y *Pichia kudriavzevii*.

- ✓ Para la promoción del crecimiento vegetal y el biocontrol de plagas de diversos cultivos o en sus cosechas se han registrado bioprocesos con bacterias y hongos como: *Alcaligenes faecalis subsp faecalis*, *Bacillus megaterium*, *Enterobacter cloacae*, *Pantoea dispersa*, *Staphylococcus sciuri*, *Enterobacter sp*, *Bacillus cereus*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Chaetomium brasiliense*, *Penicillium citrinum*, *Chaetomium aureum* y *Candida orthopsilosis*. Los cuales hoy son parte de la base del PIENSA.
- ✓ Para las industrias de producción y biosíntesis de enzimas se encontraron los siguientes microorganismos: *Aeromonas hydrophila*, *Alcaligenes faecalis subsp faecalis*, *Exiguobacterium profundum*, *Pantoea dispersa*, *Bacillus sp*, *Enterobacter sp*, *Micrococcus sp*, *Aspergillus sp*, *Humicola sp*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Penicillium citrinum*, *Candida orthopsilosis*, con los cuales se puede contar en las bases del PIENSA.

10. Para finalizar, el desarrollo de estos trabajos en bioprospección microbiana en la búsqueda de microorganismos útiles para el desarrollo de bioprocesos aplicables al ambiente, aportó una gama de microorganismos plenamente identificados (faltando aún un buen grupo por identificar) y que han sido reportados en la literatura científica como útiles para el desarrollo de diversos bioprocesos. Lo anterior, abre paso a la realización de diversas investigaciones que podrían contribuir a la preservación y cuidado del ambiente por medio de la biotecnología ambiental.

IX. RECOMENDACIONES

Al llegar al final de este trabajo y habiéndose obtenido una buena cantidad de resultados, nuevas puertas han sido abiertas para la continuidad de esta investigación y por ello surgen las siguientes recomendaciones:

1. La elaboración de futuros trabajos en materia de bioprospección, deberá contar con otros medios de cultivos además de los utilizados en este trabajo, que contengan otros tipos de nutrientes o composición con el fin de aislar otros microorganismos, que se desarrollan y crecen sólo en esos medios.
2. Considerar los cambios de temperatura, de pH, y la presencia de luz al trabajar con cepas fúngicas ya que existen muchos hongos imperfectos a como los llama la literatura, que no crecen ni esporulan en todo tipo de condiciones y en el caso de las bacterias para poder obtener una mayor variedad de microorganismos.
3. En cuanto a la conservación de microorganismos, los aislados que se obtengan de proyectos de bioprospección, lo más recomendable es preservarlos con métodos que permitan su subsistencia a largo plazo hasta su aplicación biotecnológica para asegurar su pureza y viabilidad.
4. Formular proyectos que permitan la obtención de recursos y así realizar una futura (no muy lejana) identificación de los aislados aún no identificados para aumentar los recursos biológicos en el banco de microorganismos que se ha establecido en este proyecto.
5. Promover la formulación de proyectos que permitan la obtención de recursos económicos y así facilitar el desarrollo de los bioprocesos documentados en esta investigación, aplicando las cepas microbianas autóctonas identificadas.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Abad, Y. E. (2017). *Caracterización, Identificación y Evaluación de Microorganismos Autóctonos Biorremediadores de suelos contaminados por agroquímicos en la provincia de Loja* (Tesis de Maestría). Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador.
- Abigail, E. A., Salam, J. A., and Das, N. (2013). Atrazine degradation in liquid culture and soil by a novel yeast *Pichia kudriavzevii* strain Atz-EN-01 and its potential application for bioremediation. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(6), 35-43. DOI:10.7324/JAPS.2013.3606
- Acuña, J.G. (2015). *Caracterización por métodos fenotípicos y genéticos de una cepa de Rhodococcus aislada de una red de distribución de agua* (Tesis de doctorado). Universidad Católica de Murcia, Murcia, España.
- Ahluwalia, V., Kumar, J., Sisodia, R., Shakil, N. A., and Walia, S. (2014). Green synthesis of silver nanoparticles by *Trichoderma harzianum* and their bio-efficacy evaluation against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumonia*. *Industrial Crops and Products*, 55, 202-206. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.01.026
- Ajunwa, O. M., Odeniyi, O. A., Garuba, E. O., and Onilude, A. A. (2018). Functional Screening of Electrogenicity and Bioelectricity Generation Potentials among WaterBorne Microbial Isolates. *Annual Research & Review in Biology*, 28(5), 1-15. DOI:10.9734/ARRB/2018/42247
- Akinkunmi, W. A., Husaini, A. A., Zulkharnain, A., Guan, T. M., and Roslan, H. A. (2016). Mechanism of Biosorption of Pb (II) and Cu (II) ions using Dead Biomass of *Fusarium equiseti* strain UMAS and *Penicillium citrinum* strain UMAS B2. *Journal of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology*, 4(2), 1-6. ISSN: 2289-5779
- Akram, M. S., Shahid, M., Tariq, M., Azeem, M., Javed, M. T., Saleem, S., and Riaz, S. (2016). Deciphering *Staphylococcus sciuri* SAT-17 Mediated Anti-oxidative Defense Mechanisms and Growth Modulations in Salt Stressed Maize (*Zea mays* L.). *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-14. doi:10.3389/fmicb.2016.00867
- Alejos, L., Aragón, M., y Cornejo, A. (2014). Extracción y purificación de ADN. En A. Cornejo, A. Serrato, B. Rendón, & M. Rocha, *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos* (págs. 1-26). México, D.F.
- Álvarez, M. M., Blandón, L. J., Ceballos, V., Mejía, M., and Buriticá, H. M. (2017). Aislamiento de Microorganismos en diferentes ambientes (Suelo, Agua y

- Aire). *Mente Joven*, 6, 9-20. DOI: 10.18041/2323-0312/mente_joven.0.2017.3666
- Amena, S., Kumar, M., and Kumar, A. (2015). Optimization of naringinase production and its purification from *Micrococcus sp.* *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(2), 269-272. ISSN- 0975-1491
- Anbu, P., Hur, B. K., and Lee, C. G. (2013). Isolation and characterization of a novel oxidant- and surfactant-stable extracellular alkaline protease from *Exiguobacterium profundum* BK-P23. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 60(2), 155-161. DOI:10.1002/bab.1059
- Andreolli, M., Lampis, S., Brignoli, P., and Vallini, G. (2016). *Trichoderma longibrachiatum* Evx1 is a fungal biocatalyst suitable for the remediation of soils contaminated with diesel fuel and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(9), 9134–9143. doi:10.1007/s11356-016-6167-6
- Arias, E. y Piñeros P. (2008). *Aislamiento e Identificación de Hongos Filamentosos de Muestras de Suelo de los Paramos de guasca y cruz verde* (Trabajo de grado). Pontificia Universidad Javeriana de Cali. Bogotá, Colombia.
- Arias, V., Rodríguez, C., Ramírez, P., Nonones, E., Salazar, D., Gil, J., ...Jamanca, G. (2012). Aislamiento de bacterias acidófilas a partir del drenaje ácido proveniente de las inmediaciones a las unidades mineras de Julcani y Recuperada, Huancavelica. *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica*, 15(30), 59-66. ISSN: 1682-3087.
- Atala, M. L., Jasim, H. J., and Ibrahim, K. M. (2015). Production, Purification and Characterization of Cellulose from Local Isolate of *Pantoea spp.* *Iraqi Journal of Science*, 56(2B), 1324-1330. ISSN:0067-2904
- Avilés, M. C., y Granja, G. F. (2014). *Identificación morfológica y molecular de hongos microscópicos obtenidos en cultivos comerciales enfermos, en la región interandina centro- norte del ecuador en el período 2011-2012* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Bagewadi, Z. K., Mulla, S. I., and Ninnekar, H. Z. (2017). Purification and immobilization of laccase from *Trichoderma harzianum* strain HZN10 and its application in dye decolorization. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 139-150. DOI: 10.1016/j.jgeb.2017.01.007
- Banerjee, G., Pandey, S., Kumar, A., and Kumar, R. (2015). Bioremediation of Heavy Metals by a Novel Bacterial Strain *Enterobacter cloacae* and Its Antioxidant Enzyme Activity, Flocculant Production, and Protein Expression in

- Presence of Lead, Cadmium, and Nickel. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226, 91. DOI: 10.1007/s11270-015-2359-9
- Barnes, N. M., Khodse, V. B., Lotlikar, N. P., Meena, R. M., and Damare, S. R. (2018). Bioremediation potential of hydrocarbon-utilizing fungi from select marine niches of India. *3 Biotech*, 8, 21. ISSN:2190-5738
- Barrios, Y. (2011). Biorremediación: una herramienta para el saneamiento de ecosistemas marinos contaminados con petróleo. *Biotecnología Aplicada*, 28(2), 60-68. ISSN 1027-2852
- Bécares, E. (2014). Biotecnología Ambiental, ¿la cenicienta de la Biotecnología? *Ambiociencias*, (12), 81-94. ISSN: 1988-3021
- Beltrán-Pineda, M. E., y Gómez-Rodríguez, A. M. (2016). Biorremediación de metales pesados cadmio (Cd), cromo (Cr) y mercurio (Hg) mecanismos bioquímicos e ingeniería genética: una revisión. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 12(2), 172-197. DOI: 10.18359/rfcb.2027
- Blanch, A. R. (2010). Biotecnología ambiental. Aplicaciones biotecnológicas en la mejora del medio ambiente. *Revista de economía catalana y de sector público*. ISSN: 2013-8709
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. y Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clín*, 29(8), 601-608. ISSN: 0213-005X
- Calderani, F., Orlandelli, R., y Pamphile, J. A. (2016). Bioactive compounds with antitumor properties produced by endophytic fungi. *UNINGÁ Review*, 25(2), 79-86. ISSN: 2178-2571
- Carballo, M. E., Martínez, A., Salgado, I., Maldener, I., Álvarez, M., Boza, A., ...Cruz, M. (2012). Capacidad de captura de cadmio y cinc por bacterias, microalgas y levaduras. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 1(1), 34-43. ISSN: 2307-695X
- Carvalho, F. P, De Souza, A. C., Teixeira, K., Ribeiro, D., Ferreira, C., and Freitas, R. (2013). Yeasts diversity in Brazilian Cerrado soils: Study of the enzymatic activities. *African Journal of Microbiology Research*, 7(32), 4176-4190. DOI: 10.5897/AJMR2013.5752
- Casado, C. M., Torrico, G., Medina, M. (2012). *Medios de cultivo en un laboratorio de microbiología*. Recuperado de: <https://libroslaboratorio.files.wordpress.com>.

- Castillo-Reyes, F., Hernández-Castillo, F., Gallegos-Morales, G., Flores-Olivas, A., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. (2015). Efectividad in vitro de *Bacillus* y polifenoles de plantas nativas de México sobre *Rhizoctonia-Solani*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(3), 549-562. ISSN: 2007-0934.
- Castro, R. A., Quecine, M. C., Lacava, P. T., Batista, B. D., Luvizotto, D. M., Marcon, J., Ferreira, A., Melo, I. S., and Azevedo, J. L. (2014). Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. *SpringerPlus*, 3(1), 382. DOI: 10.1186/2193-1801-3-382
- Chen, J., Xing, X. K., Zhang, L. C., Xing, Y. M., and Guo, S. X. (2012). Identification of *Hortaea werneckii* Isolated from Mangrove Plant *Aegiceras comiculatum* Based on Morphology and rDNA Sequences. *Mycopathologia*, 174, 457–466. DOI 10.1007/s11046-012-9568-1
- Chirinos, I., Larreal, M., y Díaz, J. (2010). Biorremediación de lodos petroquímicos mediante el uso de la biota microbiana autóctona en un oxisol del municipio Lagunillas del estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica UDO Agrícola*, 10(1), 133-140. ISSN:1317-9152
- Comisión Económica para América Latina y el Caribe. (2007). *Status and potential of commercial bioprospecting activities in Latin America and the Caribbean* (132). ISSN: 1680-8886
- Contesini, F. J., Iburguren, C., Grosso, C. R., Carvalho, P., and Sato H. H. (2012). Immobilization of glucosyltransferase from *Erwinia* sp using two different techniques. *Journal of Biotechnology*, 158(3), 137-143. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.01.012
- Cordero-Ramírez, J. D., López-Rivera, R., Calderón-Vázquez, C. L., Figueroa-López, A. M., Martínez-Álvarez, J. C., Leyva-Madrigal, K. Y., ...Maldonado-Mendoza, I. E. (2012). Microorganismos asociados a la rizosfera de jitomate en un agroecosistema del valle de Guasave, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 83, 712-730. DOI:10.7550/rmb.17897
- Cortazar-Martínez, A., González-Ramírez, C. A., Coronel-Olivares, C., Escalante-Lozada, J. A., Castro-Rosas, J., Villagómez-Ibarra, J. R. (2012). *Biología Aplicada a la Degradación de Colorantes de la Industria Textil*. *Universidad y ciencia*, 28(2), 187-199. ISSN: 0186-2979
- Cuervo, J. (2010). *Aislamiento y caracterización de Bacillus spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales* (Trabajo de Grado). Pontifica Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Básicas, Bogotá Colombia.

- Da Silva Júnior, F. M., Volcão, L. M., Coutelle, L., and Pereira, S. V. (2018). Growth of the fungus *Chaetomium aureum* in the presence of lead: implications in bioremediation. *Environmental Earth Sciences*, 77, 275. doi: <https://doi.org/10.1007/s12665-018-7447-x>
- Del Mónaco, S. M., Barda, N.B., Rubio, N.C., and Caballero, A.C. (2014). Selection and characterization of a Patagonian *Pichia kudriavzevii* for wine deacidification. *Journal of Applied Microbiology*, 117(2), 451-464. doi:10.1111/jam.12547
- Devi, P. T., Kulanthaivel, S., Kamil, D., Borah J. L., Prabhakaran, N., and Srinivasa, N. (2013). Biosynthesis of silver nanoparticles from *Trichoderma* species. *Indian journal of experimental biology*, 51(7), 543-547. ISSN: 0975-1009
- Demergaso, C., Chong, G., Galleguillos, P., Escudero, L., Esteve, I., y Martínez-Alonso, M. (2003). Tapetes Microbianos del Salar de Lllamará, Norte de Chile. *Revista Chilena de historia natural*, 76(3), 485-499. ISSN: 0716-078X
- Díaz-Martínez, M. E., Argumedo-Delira, R., Sánchez-Viveros, G., Alarcón, A., and Mendoza-López, M. R. (2019). Microbial Bioleaching of Ag, Au and Cu from Printed Circuit Boards of Mobile Phones. *Current Microbiology*, 76(5), 536–544. doi: <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01646-3>
- Díaz-Nava, L. E., Montes-García, N., Domínguez, J.M., and Aguilar-Uscanga, M. G. (2017). Effect of carbon sources on the growth and ethanol production of native yeast *Pichia kudriavzevii* ITV-S42 isolated from sweet sorghum juice. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(1), 1069-1077. DOI:10.1007/s00449-017-1769-z
- Divia, J. M., Priyanka, M., Rajenderan, G., and Priyadharshini, A. (2015). Isolation and optimization of white rot fungi and its application in electroplating industries effluent. *Journal of Global Biosciences*, 4(3), 1673-1683. ISSN:2320-1355
- Du, N. L., Zhao, M., Li, G., Xu, F., Chen, W., and Zhao, Y. (2013). Biodegradation of malachite green by *Micrococcus* sp strain BD15: Biodegradation pathway and enzyme analysis. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 78, 108-116. ISSN:0964-8305
- Dutta, A., Ghosh, S., Choudhury, J. D., Mahansaria, R., Roy, M., Ghosh, A. K., ...Mukherjee, J. (2017). Isolation of indigenous *Staphylococcus sciuri* from chromium-contaminated paddy field and its application for reduction of Cr(VI) in rice plants cultivated in pots. *Bioremediation Journal*, 21(1), 30-37. DOI:10.1080/10889868.2017.1282935

- El-Shanshoury, A. R., Elsilk, S. E., and Ateya, P. S. (2013). Uptake of some heavy metals by metal resistant *Enterobacter sp* isolate from Egypt. *African Journal of Microbiology Research*, 7(23), 2875-2884. DOI:10.5897/AJMR12.1352
- Escobar, N., Mora, J., y Romero, N. J. (2012). Identificación de poblaciones microbianas en compost de residuos orgánicos de fincas cafeteras de Cundinamarca. *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, 16(1), 75-88. ISSN 0123-3068
- Feng, C., Fang-yan, C., and Yu-bin, T. (2014). Isolation, Identification of a Halotolerant Acid Red B Degrading Strain and Its Decolorization Performance. *APCBEE Procedia*, 9, 131-139. doi: 10.1016/j.apcbee.2014.01.02
- Ferrari, D. (1991). "Biotecnología e ingeniería química," *RIQUIM - Repositorio Institucional de la Facultad de Química - UdelaR*, <http://riquim.fq.edu.uy/items/show/1730>.
- Flores, M. y Roque, E. (2017). *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.
- Forbes, B., Sahm, D., y Weissfeld, A. (2007). *Bailey & Scott Diagnóstico Microbiológico*. (12va ed., pp. 108-109). Buenos Aires, Argentina: Médica panamericana. ISBN: 978-950-06-8243-5
- Galán, M. D., Díaz, L. G., Sánchez, F. J., Aguayo, B. S., Lucena, M. A., Fernández, P., Ruíz, F. J. (2018). *Metodología para la Toma de Muestra de Microorganismos Altamente Patógenos en Las Matrices Ambientales Aire, Agua y Suelo/Sedimento*. Madrid; Instituto de Salud Carlos III, Centro Nacional de Sanidad ambiental. ISSN: 1989-7790
- García, E., Domenech, A., López, A., Oliver, A., y Ramírez, A. (2009). *Prácticas de Microbiología*. Recuperado de <http://www.uib.cat/depart/dba/microbiologia/micro2/practicas.pdf>
- García, V. (2004). *Introducción a la Microbiología*. (Cap. V, pp. 108-109). Costa Rica: EUNED. ISBN: 9977-31-358-0
- Ge, F., Huang, Z., Yu, H., Wang, Y., and Liu, D. (2016). Transformation of *Panax notoginseng* saponins by steaming and *Trichoderma longibrachiatum*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(1), 165-172. DOI:10.1080/13102818.2015.1102611

- George, P., Gupta, A., Gopal, M., Thomas, L., and Thomas, G. V. (2013). Multifarious beneficial traits and plant growth promoting potential of *Serratia marcescens* KiSII and *Enterobacter* sp. RNF 267 isolated from the rhizosphere of coconut palms (*Cocos nucifera* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(1), :109-117. DOI: 10.1007/s11274-012-1163-6
- Ghoshal, G., Banerjee, U. C., and Shivhare, U. S. (2014). Xylanase Production by *Penicillium citrinum* in Laboratory-scale Stirred Tank Reactor. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. 28(3), 399-408. doi: 10.15255/CABEQ.2013.1885
- González, R. A. (25 de noviembre de 2011). Biotecnología, Historia y Desarrollo: Situación Actual en Nicaragua. En D. Mercenario (Presidencia), *Recursos fitogenéticos y Agricultura Sostenible-Seguridad Alimentaria para el Futuro*. Conferencia llevada a cabo en el II Congreso Multidisciplinario e Internacional de Agrobiotecnología, Managua, Nicaragua.
- González, T. (2012). Presentación del número extraordinario: Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana. *SEM@FORO*, 53, 29-60. ISSN: 2254-4399
- Gopalakrishnan, S., Sreevidyaab, M., Melø, T. M., Simic, N., Bruheim, P., Sharmaa, M., ... Alekhya, G. (2015). Biological control of *Botrytis cinerea* and plant growth-promotion potential by *Penicillium citrinum* in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Biocontrol Science and Technology*, 25(7), 739-755. doi:10.1080/09583157.2015.1010483
- Goswami, A. M., and Ghosh, S. (2013). Biological Synthesis of Colloidal Gold Nanoprisms Using *Penicillium citrinum* MTCC9999. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 4(2A), 20-27. doi:10.4236/jbnb.2013.42A003
- Granados, R. y Villaverde, M. (2003). *Microbiología*. (1era ed., pp. 251-254). Madrid, España: Paraninfo. ISBN: 84-9732-123-5
- Grunenvaldt., R. L., Degenhardt-Goldbach, J., De Cássia Tomasi, J., Dos Santos, G. D., Vicente, V. A., and Deschamps, C. (2018). *Bacillus megaterium*: an endophytic bacteria from callus of *Ilex paraguariensis* with growth promotion activities. *Biotecnología Vegetal*, 18(1), 3-13. ISSN 2074-8647
- Guigón-López, C., Guerrero-Prieto, V., Lanzuise, S., and Lorito, M. (2014). Enzyme activity of extracellular protein induced in *Trichoderma asperellum* and *T. longibrachiatum* by substrates based on *Agaricus bisporus* and *Phymatotrichopsis omnívora*. *Fungal Biology*, 118(2), 211-221. DOI: 10.1016/j.funbio.2013.11.012

- Honary, S., Barabadi, H., Gharaei-Fathabad, E., and Naghibi, F. (2013). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Induced by the Fungus *Penicillium citrinum*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(1), 7-11. DOI:10.4314/tjpr.v12i1.2
- HOU, E., XIA, T., ZHANG, Z., and MAO, X. (2017). Purification and Characterization of an Alkaline Protease from *Micrococcus sp* Isolated from the South China Sea. *Journal of Ocean University of China*, 16(2), 319-325. DOI:10.1007/s11802-017-3207-x
- Ilyas, S., and Rehman, A. (2018). Metal resistance and uptake by *Trichosporon asahii* and *Pichia kudriavzevii* isolated from industrial effluents. *Archives of Environmental Protection*, 44(3), 77-84. DOI:10.24425/122291
- Instituto Nicaragüense del Turismo. INTUR. 2017. La Reserva Natural Refugio de Vida Silvestre El Chocoyero-El Brujo, celebra VII Festival del Chocoyo. Recuperado de: <https://www.intur.gob.ni/2017/06/la-reserva-natural-refugio-vida-silvestre-chocoyerobrujo-celebra-vii-festival-del-chocoyo/>
- Jadhav, M., Kagalkar, A., Jadhav, S., and Govindwar, S. (2011). Isolation, characterization, and antifungal application of a biosurfactant produced by *Enterobacter sp* MS16. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(11), 1347–1356. DOI:10.1002/ejlt.201100023
- Jagadeesha, B. G., Prabhakara, R., and Pushpa, H. (2013). Biomineralisation of calcium carbonate by different bacterial strains and their application in concrete crack remediation. *International Journal of Advances in Engineering & Technology*, 6(1), 202-213. ISSN: 2231-1963
- Jiménez, D. (2007). *Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de Azotobacter spp. mediante el análisis de restricción del DNA ribosomal 16S* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Joshi, S.J., and Abed, R.M.M. (2017). Biodegradation of Polyacrylamide and Its Derivatives. *Environmental Processes*, 4(2), 463–476. DOI:10.1007/s40710-017-0224-0
- Kaur, P., Jain, P., Kumar, A., and Thakur, R. (2014). Biogenesis of PbS Nanocrystals by Using Rhizosphere Fungus i.e., *Aspergillus sp*. Isolated from the Rhizosphere of Chickpea. *BioNanoScience*, 4(2), 189–194. DOI 10.1007/s12668-014-0135-8.
- Kryuchkova, Y. V., Burygin, G. L., Gogoleva, N. E., Gogolev, Y. V., Chernyshova, M. P., Makarov, O. E., ...Turkovskaya, O.V. (2014). Isolation and characterization of a glyphosate-degrading rhizosphere strain, *Enterobacter cloacae* K7. *Microbiological Research*, 169(1), 99-105. ISSN: 0944-5013

- Kumar, K. S., Dhanarani, T. S., and Thamaraiselvi, K. (2013). Utilization of petroleum hydrocarbons by *Micrococcus* and *Streptococcus* sps isolated from contaminated site. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 3(1), 71-78. ISSN:2231 –3168
- Kumari, V., Kumar, V., Chauhan, R., Asif, M., and Chand Bhalla, T. (2016). Optimization of medium parameters by response surface methodology (RSM) for enhanced production of cutinase from *Aspergillus* sp RL2Ct. *3 Biotech*, 6(2), 149. DOI 10.1007/s13205-016-0460-4
- Lastres, L., y Soza, F. (Septiembre de 2009). En *Manual de Sanidad Vegetal. Programa para la Agricultura Sostenible en Laderas de América Central. Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria* (pp. 30-53). Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, Honduras.
- Leghlimi, H., Meraihi, Z., Boukhalifa-Lezzar, H., Copinet, E., and Duchiron, F. (2013). Production and characterization of cellulolytic activities produced by *Trichoderma longibrachiatum* (GHL). *African Journal of Biotechnology*, 12(5), 465-475. DOI:10.5897/AJB12.917
- Lei, L., Xia, Z., Liu, X., and Wei, H. (2014). Occurrence and variability of tobacco rhizosphere and phyllosphere bacterial communities associated with nicotine biodegradation. *Annals of Microbiology*, 65(1), 163-73. DOI:10.1007/s13213-014-0847-6
- Li, C., Yu, J., Wang, D., Li, L., Yang, X., Ma, H., Xu, Y. (2016). Efficient removal of zinc by multi-stress-tolerant yeast *Pichia kudriavzevii* A16. *Bioresource Technology*, 206, 43-49. ISSN:0960-8524
- Li, X., Ding, C., Liao, J., Lan, T., Li, F., Zhang, D., Yang, J., Yang, Y., ...Liu, N. (2014). Biosorption of uranium on *Bacillus* sp. dwc-2: preliminary investigation on mechanism. *Journal of Environmental Radioactivity*, 135, 6-12. doi: 10.1016/j.jenvrad.2014.03.017
- Liébana, J., y Pontón, J. (2002). Concepto y contenidos de la microbiología oral. clasificación de los seres vivos. En J. Liébana. (2da Ed.), *Microbiología Oral* (pp. 3-7). Madrid, España: McGraw-Hill.
- Limtong, S., Kaewwichian, R., Yongmanitchai, W., and Kawasaki, H. (2014). Diversity of culturable yeasts in phylloplane of sugarcane in Thailand and their capability to produce indole-3-acetic acid. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(6), 1785–1796. DOI: 10.1007/s11274-014-1602-7
- LIN, J. L., CHEN, S. C., SUNG, W. P., CHEN, T. Y., SURAMPALLI, R. Y., and KAO, C. M. (2017). Bioremediation of OCDF-contaminated soils by novel bacterial

- strain. *Applied Ecology and Environmental Research*, 15(3), 713-723. DOI:10.15666/aeer/1503_713723
- Llop, A., Valdés-Dapena, M. M., y Zuazo, J. L. (2001). Cultivo y crecimiento de los microorganismos. En R. Junco y C. M. Rodríguez. *Microbiología y Parasitología Médicas* (pp. 45-54). La Habana, Cuba: Editorial Ciencias Médicas.
- Loásiga, C. y Cisne, J. (2001). *Recursos genéticos y biotecnología en Nicaragua* (1st ed., pp. 18-19). Managua: MARENA.
- Long, J., Li, H., Jiang, D., Luo, D., Chen, Y., Xiab, J., and Chen, D. (2017). Biosorption of strontium(II) from aqueous solutions by *Bacillus cereus* isolated from strontium hyperaccumulator *Andropogon gayanus*. *Process Safety and Environmental Protection*, 111, 23-30. DOI: 10.1016/j.psep.2017.06.010
- Lucana, M. R., y Huanca, R. M. (2014). Estructura Bacteriana. *Revista de Actualización Clínica*, 49, 2589- 2593. ISSN 2304-3768
- Lustosa, M. A., López, J. A., Santos, K. C., Padilha, F. F., Hernández-Macedo, M. L., and Cabrera-Padilla, R. Y. (2018). Petroleum hydrocarbon degradation by isolated mangrove bacteria. *Revista peruana de biología*, 25(4), 453-456. doi:10.15381/rpb.v25i4.15537
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., y Clark, D. P. (2009). *Biología de los microorganismos*. (12th ed., pp. 30-121). Madrid, España: PEARSON EDUCACIÓN, S.A.
- Mambuscay, L. A., López, W. A., Cuervo, R. A., Argote, F. E., y Osorio, E. (2013). Identificación de las levaduras nativas presentes en zumos de piña, mora y uva. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 2, 136-144. ISSN 1692-3561.
- Mareque, C., Taulé, C., Beracochea, M., and Battistoni, F. (2015). Isolation, characterization and plant growth promotion effects of putative bacterial endophytes associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). *Annals of Microbiology*, 65(2), 1057-1067. doi:10.1007/s13213-014-0951-7
- Martínez, A., Cruz, M., Veranes, O., Carballo, M. E., Salgado, I., Olivares, S., ... Rodríguez, D. (2010). Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almendares. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 41, 1-10. ISSN: 0253-5688
- Martínez-Alonso, M. & Gaju, N. (2005). El papel de los tapetes microbianos en la biorrecuperación de zonas litorales sometidas a la contaminación por vertidos

- de petróleo. *Revista Científica Y Técnica de Ecología Y Medio Ambiente*, (1), 79-85. ISSN: 1697-2473
- Martínez-Cubillo, F.J. 2013. *Identificación de contaminantes, prevención y aprovechamiento de desechos orgánicos en la producción de biogás y biodiesel, en curtidoras y mataderos de la ciudad de León, ubicadas en la ladera del Río Chiquito* (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León.
- Marzan, L. W., Hossain, M., Mina, S. A., Akter, Y., Masudul, and Chowdhury, M.A. (2017). Isolation and biochemical characterization of heavy-metal resistant bacteria from tannery effluent in Chittagong city, Bangladesh: Bioremediation viewpoint. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 43(1), 65-74. ISSN:1687-4285
- Mbarki, S., Cerdà, A., Brestic, M., Mahendra, R., Abdelly, C., and Pascual, J. A. (2016). Vineyard Compost Supplemented with *Trichoderma Harzianum* T78 Improve Saline Soil Quality. *Land Degradation and Development*, 28(3), 1028-1037. DOI:10.1002/ldr.2554
- Mendoza, J. C., Perea, Y. S., Pretelin, C., Silveti, A., Martínez, M. A., Pérez, G., ... Arriola, J. (2010). Biosorción de Cromo, Arsénico y Plomo de soluciones acuosas por cultivos bacterianos en suspensión. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias*, 1(2), 67-73. ISSN:2007-512X
- Mendoza-Avalos, A., y Guerrero-Padilla, A. (2015). Biodegradación de petróleo diesel-2 en agua de mar por *Pseudomonas aeruginosa* en un biorreactor aireado y agitado. *SCIÉENDO*, 18(1), 23-37. ISSN: 1681-7230
- Meneses, C. A., Rozo, L. V., y Franco, J. (Diciembre de 2011). Tecnologías bioinformáticas para el análisis de secuencias de ADN. *Scientia et Technica*, 3(49), 116-121. ISSN: 0122-1701
- Moez, S., Siddiqui, E. A., Khan, S., and Ahmad, A. (2017). Size Reduction of Bulk Alumina for Mass Production of Fluorescent Nanoalumina by Fungus *Humicola* sp. *Journal of Cluster Science*, 28(1), 1981–1993. DOI:10.1007/s10876-017-1195-z
- Moghaddam, A. B., Moniri, M., Azizi, S., Rahim, R. A., Ariff, A. B., Saad, W. Z., ...Mohamad, R. (2017). Biosynthesis of ZnO Nanoparticles by a New *Pichia kudriavzevii* Yeast Strain and Evaluation of Their Antimicrobial and Antioxidant Activities. *Molecules*, 22(6), 872. doi:10.3390/molecules22060872
- Mohmed, A. A., Hassan, S. E., Fouda, A., Elgamal, M. S., and Salem, S.S. (2017). Extracellular Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using *Aspergillus* sp. and

- Evaluation of their Antibacterial and Cytotoxicity. *Journal of Applied Life Sciences International*, 11(2), 1-12. DOI: 10.9734/JALSI/2017/33491
- Mora, A., y Bravo, E. (2017). Aislamiento de microorganismos electrogénicos con potencial para reducir cromo hexavalente. *ACTA BIOLÓGICA COLOMBIANA*, 22(1), 27-36. DOI: 10.15446/abc.v22n1.57189
- Moreno, G., García, J. L., y Zugaza, A. (1986). *La guía de INCAFO de los hongos de la Península Ibérica*. Madrid, España: INCAFO.
- Moreno, J. y Albarracín, V. (2012). Aislamiento, cultivo e identificación de microorganismos ambientales a partir de muestras naturales. *Reduca (Biología)*. *Serie Microbiología*, 5(5), 79-93. ISSN: 1989-3620
- Mori, T., Ruiz, E., García, M., Bardales, J., Tresierra-Ayala, A., Bendayán, M., ... Arévalo, L. (2013). Efecto antimicrobiano de *Myrciaria dubia* (camu camu) y *Cyperus luzulae* (piri piri) sobre microorganismos patógenos. *Conocimiento Amazónico*, 4(1), 49-57. ISSN: 2221-3376
- Mostafa, F. A., Saleh, S. A., Eid, B. M., Ibrahim, N. A., and Abd El Aty, A. A. (2018). Thermodynamics characterization and potential textile applications of *Trichoderma longibrachiatum* KT693225 xylanase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14, 129-137. DOI: 10.1016/j.bcab.2018.02.011
- Muleta, D., Assefa, F., Börjesson, E., and Granhall, U. (2013). Phosphate-solubilising rhizobacteria associated with *Coffea arabica* L. in natural coffee forests of southwestern Ethiopia. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 12(1), 73-84. ISSN: 1658-077X
- Mulla, S. I., Talwar, M. P., Hoskeri, R. S., and Ninnekar, H. Z. (2012). Enhanced Degradation of 3-Nitrobenzoate by Immobilized Cells of *Bacillus flexus* Strain XJU-4. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17(6), 1294-1299. DOI: 10.1007/s12257-012-0211-2
- Muñoz-Silva, L., Olivera-Gonzales, P., SantillánTorres, M., y Tamariz-Angeles, C. (2019). Microorganismos tolerantes a metales pesados del pasivo minero Santa Rosa, Jangas (Perú). *Revista peruana de biología*, 26(1), 109-118. doi:10.15381/rpb.v26i1.15914
- Nandimath, A. P., Kharat, K. R., Gupta, S. G., and Kharat, A. S. (2016). Optimization of cellulase production for *Bacillus sp.* and *Pseudomonas sp.* soil isolates. *African Journal of Microbiology Research*, 10(13), 410-419. DOI: 10.5897/AJMR2016.7954

- Nisha, P., Anitmol D., and Saritha, K.V. (2014). Production of Cellulase from *Micrococcus sp* and effect of growth parameters. *International Journal of Pharma Research and Health Sciences*, 2(3), 236-240. ISSN: 2348-6465
- Noguez-Iniesta, J. A., González-Chávez, M. C., Martínez-Gómez, M. A., y Mendoza-Hernández, J. C. (2017). Caracterización de bacterias promotoras de crecimiento de plantas y su tolerancia a elementos potencialmente tóxicos. *Agro productividad*, 10(4), 41-47. ISSN: 2594-0252
- Notredame, C., Higgins, D. G., and Heringa, J. (2000). T-Coffee: A Novel Method for Fast and Accurate Multiple Sequence Alignment. *Journal of Molecular Biology*, 302(1), 205-217. doi:10.1006/jmbi.2000.4042.
- Ortiz, T., Ocampo, V., Prada, L. D., y Franco-Correa, M. (2016). Métodos de conservación para actinobacterias con actividad solubilizadora de fósforo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(2), 32-39. DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.47683.
- Pacasa-Quisbert, F., Loza-Murguía M. G., Bonifacio-Flores, A., Vino-Nina, L., y Serrano-Canaviri, T. (2017). Comunidad de hongos filamentosos en suelos del Agroecosistema de K'iphak'iphani, Comunidad Choquenaira-Viacha. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 8(1), 2-25. ISSN: 2072-9294
- Pacheco, J. y Cabrera, A. (2011). 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
- Padmapriya, C., Murugesan, R., and Gunasekaran, S. (2014). In Vitro Antioxidant and Antibacterial Studies of Fungal Pigment Extracts from Parambikulam Tiger Reserve. *Trends in Biosciences*, 7(13), 1522-1557. ISSN 0976-2485
- Pandit, R.J., Patel, B., Kunjadia, P.D., and Nagee, A. (2013). Isolation, characterization and molecular identification of heavy metal resistant bacteria from industrial effluents, Amala-khadi- Ankleshwar, Gujarat. *International Journal of Environmental Sciences*, 3(5), 1689-1698. DOI:10.6088/ijes.2013030500037
- Páramo, L. (2012). *Caracterización de comunidades microbianas con potencial biotecnológico para la prevención del deterioro estructural* (Tesis doctoral). Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica, Reynosa, Tamaulipas.
- Parra, H. (2015). *Los microorganismos un mundo por descubrir, una estrategia de aula para desarrollar habilidades científicas para estudiantes de ciclo dos* (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

- Pathak, P., Bhardwaj, N. K., and Singh, A. K. (2014). Production of Crude Cellulase and Xylanase From *Trichoderma harzianum* PPDDN10 NFCCI-2925 and Its Application in Photocopier Waste Paper Recycling. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(8), 3776-3797. DOI:10.1007/s12010-014-0758-9
- Paul, D. M., and Kumar, S. (2014). Microbial Deterioration of Low Density Polyethylene by *Aspergillus* and *Fusarium* sp. *International Journal of ChemTech Research*, 6(1), 299-305. ISSN: 0974-4290
- Pedrique de Aulacio, M., Gutiérrez de Gamboa, S. (2008). *Obtención de cultivos puros*. Recuperado de: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Obtenci%C3%B3n_de_cultivos_puros.pdf
- Peña, C. (2011). Métodos de inferencia filogenética. *Revista Peruana de Biología*, 18(2): 265 – 267. doi: 10.15381/rpb.v18i2.243
- Piñero, J. (2013). Importancia biotecnológica de la biodiversidad. Los nuevos cazadores de microbios. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 4(2), 284-317. ISSN: 2218-4384
- Pírez, M., y Mota, M. (2006). Morfología y estructura bacteriana. En UdelaR. (2da Ed.), *Temas de Bacteriología y Virología Médica* (pp. 23-26). Montevideo, Uruguay: Oficina del Libro FEFMUR. ISBN 9974-31-194-2
- Prats, G. (2005). *Microbiología clínica*. (1ra Ed., pp. 83-97). Madrid, España: Médica Panamericana S.A. ISBN: 978-84-7903-971-4.
- Preethi, K., Keerthana, G., and Manon, M. V. (2015). Evaluation of antioxidant potential of bioactive colored metabolite isolated from *Exiguobacterium profundum* BC2-11 and it's bioactivities. *International Journal of Recent Scientific Research*, 6(4), 3612-3617. ISSN: 0976-3031
- Prescott, L., Harley, J., y Klein, D. (2002). *Microbiología*. (5th Ed., p. 375). Madrid, España: McGraw hill. ISBN: 84-486-0525-X
- Priyanka, P., Arun, A. B., Young, C. C., and Rekha, P. D. (2015). Prospecting Exopolysaccharides Produced by Selected Bacteria Associated with Marine Organisms for Biotechnological Applications. *Chinese Journal of Polymer Science*, 33(2). 236-244. doi:10.1007/s10118-015-1581-7
- Pontón, J., Moragues, M. D., Gené, J., Guarro, J., y Quindós, G. (2002). El reino de los hongos. *Revista Iberoamericana de Micología*. 1, 2-3. ISSN: 1130-1406
- Ramarajan, R., and Manohar, C. S. (2017). Biological pretreatment and bioconversion of agricultural wastes, using ligninolytic and cellulolytic fungal

consortia. *Bioremediation Journal*, 21(2), 89-99. DOI: 10.1080/10889868.2017.1282937

- Ramírez, A., y Benítez-Campo, N. (2013). Tolerancia y reducción de cromo (VI) por *Bacillus cereus* B₁, aislado de aguas residuales de una curtiembre. *Revista de Ciencias*, 17(2), 51-63. DOI: <https://doi.org/10.25100/rc.v17i2.486>
- Ramírez, C. M., y Gómez, B. E. (2015). Estudio de bacterias promotoras de crecimiento de plantas aisladas de zonas naturales protegidas del estado de Guanajuato (visión de conservación). *Jóvenes en la Ciencia*, 1(2), 365-368. ISSN: 2395-9797
- Ramírez, L. J., Guerra, S. P., y Reinoso, G. A. (2016). Evaluación in vitro de la capacidad bacteriana para remover plomo en aguas residuales sintéticas. *FIGEMPA: Investigación y Desarrollo*, 1(6), 107-114. ISSN 1390-7042
- Rodicio, M. R., y Mendoza, M. C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(4), 238-245. ISSN: 0213-005X.
- Rodríguez, C. (2013). *Evaluación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal en Tomate (Solanum lycopersicum) variedad Santa Clara, aislados de residuos Ligno Celulósicos de Higuera (Ricinus communis)*. (Trabajo de grado), Universidad Católica de Manizales, Colombia.
- Rojas, A. (2011). Práctica 3. Preparación de medios de cultivo, medios selectivos y diferenciales. En *Conceptos y práctica de microbiología general* (pp. 32-38). Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.
- Rosu, C. M., Avadanei, M., Gherghel, D., Mihasan, M., Mihai, C., Trifan, A., ...Vochita, G. (2018). Biodegradation and Detoxification Efficiency of Azo-Dye Reactive Orange 16 by *Pichia kudriavzevii* CR-Y103. *Water Air and Soil Pollution*, 229(1), 15. DOI: 10.1007/s11270-017-3668-y
- Roşu, C. M., Vochiţa, G., Mihăşan, M., Avădanei, M., Mihai, C. T., and Gherghel, D. (2019). Performances of *Pichia kudriavzevii* in decolorization, biodegradation, and detoxification of C.I. Basic Blue 41 under optimized cultural conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(1), 431-445. DOI:10.1007/s11356-018-3651-1
- Roustan, I., Guerrero, D., Flores, E., y Huete, J. (2000). Enzimas de restricción de bacterias nativas de Nicaragua. *Encuentro: Revista Académica de la Universidad Centroamericana*, (52), 10-18. ISSN: 0424 – 9674

- Sabri, A. N., Li, Y., Rehman, Y., Ahmed, M., Meyer, R.L., and Saba, A. R. (2018). Prospective role of indigenous *Exiguobacterium profundum* PT2 in arsenic biotransformation and biosorption by planktonic cultures and biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 124(2), 431-443. doi:10.1111/jam.13636
- Saima, M. K., and Roohi, L. Z. (2013). Isolation of novel chitinolytic bacteria and production optimization of extracellular chitinase. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 11(1), 39-46. ISSN: 1687-157X
- Saitou N. & M. Nei. (1987). The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4): 406–425.
- Salgaonkar, B.B., Mani, K., and Braganca, J. M. (2013). Characterization of polyhydroxyalkanoates accumulated by a moderately halophilic salt pan isolate *Bacillus megaterium* strain H16. *Journal of Applied Microbiology*, 114(5), 1347-1356. doi:10.1111/jam.12135
- Sánchez, M. A., González, T., Ayora, T. R., Evangelista, Z., Pacheco, N. A. (abril-junio de 2017). ¿Qué son los microbios? *Ciencia*. 68(2), 10-11. ISSN:1405-6550
- Sandhu, S. K., Oberoi, H. S., Dhaliwal, S. S., Babbar, N., Kaur, U., Nanda, D., Kumar, D. (2012). Ethanol production from Kinnow mandarin (*Citrus reticulata*) peels via simultaneous saccharification and fermentation using crude enzyme produced by *Aspergillus oryzae* and the thermotolerant *Pichia kudriavzevii* strain. *Annals of Microbiology*, 62(2), 655–666. DOI: 10.1007/s13213-011-0302-x
- Santambrosio, E., y Ortega, M. (2009). *Siembra y recuento de microorganismos*. Cátedra de Biotecnología, Universidad Tecnológica Nacional.
- Santosh, K. S., Sujatha, E., and Krishna, P. S. (2014). Optimization and Characterization of Thermostable Endo and Exocellulases by *Humicola* sp. SKESMBKU03. *Science, Technology and Arts Research Journal*, 3(4), 107-115. ISSN:2305-3372
- Saravanakumar, K., Li, Y., Chuanjin, Y., Wang, Q., Wang, M., Sun, J., ...Chen, J. (2017). Effect of *Trichoderma harzianum* on maize rhizosphere microbiome and biocontrol of *Fusarium* Stalk rot. *Scientific Reports*, 7, 1-13. DOI:10.1038/s41598-017-01680-w
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., ...Fungal Barcoding Consortium. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for

- Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241-6246. DOI: 10.1073/pnas.1117018109
- Singh, P., Kim, Y. J., Zhang, D., and Yang, D. C. (2016). Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 34(7), 588-599. DOI: 10.1016/j.tibtech.2016.02.006
- Singh, Y. P., Dhall, P., Mathur, R. M., Jain, R. K., Thakur, V., Kumar, V., ...Kumar, A. (2011). Bioremediation of Pulp and Paper Mill Effluent by Tannic Acid Degrading *Enterobacter* sp. *Water Air and Soil Pollution*, 218(1), 693–701. DOI 10.1007/s11270-010-0678-4
- Sinha, A., Lulu, S., V. S., Banerjee, S., Acharjee, S., and Osborne, W. J. (2018). Degradation of reactive green dye and textile effluent by *Candida* sp VITJASS isolated from wetland paddy rhizosphere soil. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(4), 5150-5159. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.08.004>
- Sinha, A., Pant, K. K., and Khare, S. K. (2012). Studies on Mercury Bioremediation by Alginate Immobilized Mercury Tolerant *Bacillus cereus* Cells. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 71, 1-8. doi: 10.1016/j.ibiod.2011.12.014
- Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. (2010). *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. (37). ISBN-978-84-614-7932-0
- Solano, C. (2006). Microbiología de Alimentos: *Prácticas de microbiología de alimentos*. Instituto de Agrobiotecnología y Recursos Naturales, Universidad Pública de Navarra, España.
- Song, D., Li, X., Cheng, Y., Xiao, X., Lu, Z., Wang, Y., and Wang, F. (2017). Aerobic biogenesis of selenium nanoparticles by *Enterobacter cloacae* Z0206 as a consequence of fumarate reductase mediated selenite reduction. *Scientific Reports*, 7(3239), 1-10. DOI:10.1038/s41598-017-03558-3
- Sundaramoorthy, S., and Balabaskar, P. (2013). Biocontrol efficacy of *Trichoderma* spp against wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 1(3), 36-40. DOI:10.7324/JABB.2013.1306
- Sun, L. N., Zhang, Y. F., He, L. Y., Chen, Z. J., Wang, Q. Y., Qian, M., and Sheng, X, F. (2010). Genetic diversity and characterization of heavy metal-resistant-endophytic bacteria from two copper-tolerant plant species on copper mine wasteland. *Bioresource Technology*, 101(2), 501-509. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.08.011

- Syed, A., Saraswati, S., Kundu, G. C., and Ahmad, A. (2013). Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Humicola sp* and evaluation of their cytotoxicity using normal and cancer cell lines. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 114, 144-147. ISSN:1386-1425
- Tahara, T., Kraus, J., and Rosember L. (1990) Direct DNA sequencing of PCR Amplified genomic DNA by the Maxam-Gilbert method. *BioTechniques*, 8(4): 366-367.
- Tanyildizi, M., Özer, D. y Elibol, M. (2005). Optimization of α -amylase production by *Bacillus sp.* using response surface methodology. *Process Biochemistry*, 40, 2291-2296. doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.06.018>
- Tindall, B., Busse, H., Ludwig, W., Rosselló-Móra, R. and Kämpfer, P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(1), 249-266. doi: 10.1099/ijs.0.016949-0
- Tkach, O., Liu, L., and Wang, A. (2016). Electricity Generation by *Enterobacter sp* of Single-Chamber Microbial Fuel Cells at Different Temperatures. *Journal of Clean Energy Technologies*, 4(1), 36-42. DOI: 10.7763/JOCET.2016.V4.250
- Thatheyus, A. J., Vanishree, M., and Ramya, D. (2014). Biodegradation of Petrol using *Aspergillus sp.* *Annual Research & Review in Biology*, 4(6), 914-923. DOI: 10.9734/ARRB/2014/5630
- Throne, M., Wentzel, A., Ellingsen, T., Kotlar, H. y Zotchev, S. (2007). Identification of Novel Genes Involved in Long-Chain n-Alkane Degradation by *Acinetobacter sp.* Strain DSM 17874. *Applied and environmental microbiology*, 73 (10) 3327–3332. doi: 10.1128 / AEM.00064-07
- Tongon, R., Soyong, K., Kanokmedhakul, S., and Kanokmedhakul, K. (2018). Nano-particles from *Chaetomium brasiliense* to control Phytophthora palmivora caused root rot disease in durian var Montong. *International Journal of Agricultural Technology*, 14(7), 2163-2170. ISSN: 2630-0192
- Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología*. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana S.A.
- Tripathi, R. M., Gupta, R. K., Singh, P., Bhadwal, A. S., Shrivastav, A., Kumar, N., and Shrivastav, B. R. (2014). Ultra-sensitive detection of mercury(II) ions in water sample using gold nanoparticles synthesized by *Trichoderma harzianum* and their mechanistic approach. *Sensors and Actuators B Chemical*, 204, 637-646. DOI: 10.1016/j.snb.2014.08.015

- Udompongsuk, M., Soyong, K., Kanokmedhakul, S., and Kanokmedhakul, K. (2018). *In vitro* efficacy of *Chaetomium brasiliense* against *Pythium spp* causing root rot disease of tangerine. *International Journal of Agricultural Technology*, 14(7), 2181-2190. ISSN: 2630-0192
- Universidad Nacional Agraria - La Molina. (2013). *Técnicas de Cultivo de Microorganismos*. (7). <https://www.scribd.com/doc/186726490/Tecnica-de-cultivo-de-microorganismos-7-pdf>.
- Vacondio, B., Birolli, W. G., Ferreira, I. M., Selegim, M. H., Gonçalves, S., Vasconcellos, S. P., and Porto, A. L. (2015). Biodegradation of pentachlorophenol by marine-derived fungus *Trichoderma harzianum* CBMAI 1677 isolated from ascidian *Didemnum ligulum*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(2), 266-275. DOI: 10.1016/j.bcab.2015.03.005
- Vásquez, Y. M., Villamil, J. C., Sánchez, L. C., y Lancharos, A. G. (2014). Evaluación de un sistema de medio fijo como soporte para una película microbiana capaz de reducir Cr (VI) de lodos residuales de curtiembres. *Nova*, 12(21), 57-66. ISSN: 1794-2470
- Vega-Celedón, P., Martínez, H. C., González, M., y Seeger, M. (2016). Revisión bibliográfica: BIOSÍNTESIS DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO Y PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO DE PLANTAS POR BACTERIAS. *Cultivos Tropicales*, 37, 33-39. DOI: 10.13140/RG.2.1.5158.3609
- Viteri, P. A., Castillo, D. A., y Viteri, S. E. (2016). Capacidad y diversidad de bacterias celulolíticas aisladas de tres hábitats tropicales en Boyacá, Colombia. *Acta Agronómica*, 65(4), 362-367. doi: 10.15446/acag.v65n4.50181
- Wang, Y., Tian, Y., Han, B., Zhao, H., Bi, J. y Cai, B. (2007). Biodegradation of phenol by free and immobilized *Acinetobacter sp.* strain PD12. *Journal of Environmental Sciences*, 19, 222-225. doi: [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(07\)60036-9](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(07)60036-9)
- Wang, Y.L., Liu, S.Y., Mao, X.Q., Zhang, Z., Jiang, H., Chai, R.Y., ...and Sun, G.C. (2013). Identification and characterization of rhizosphere fungal strain MF-91 antagonistic to rice blast and sheath blight pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 114(5), 1480-1490. doi:10.1111/jam.12153
- Woese, C. R., Kandler, O., and Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, 4576-4579. DOI:10.1073/pnas.87.12.4576

- Yao, S., Ni, J., Ma, T. and Li, C. (2013). Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature by a newly isolated bacterium, *Acinetobacter* sp. HA2. *Bioresource Technology*, 139, 80-86. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.189>
- Yokoyama, S., Adachi, Y., Asakura, S., and Kohyama, E. (2013). Characterization of *Alcaligenes faecalis* strain AD15 indicating biocontrol activity against plant pathogens. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 59(2), 89–95. DOI:10.2323/jgam.59.089
- Zhang, L., Liu, Q., Ge, Y., Li, L., Gao, C., Xu, P., and Ma, C. (2015). Biotechnological production of acetoin, a bio-based platform chemical, from lignocellulosic resource by metabolically engineered *Enterobacter cloacae*. *Green Chemistry*, 18(6), 1560-1570. DOI:10.1039/C5GC01638J
- Zou, C., Li, Z., and Yu, D. (2010). *Bacillus megaterium* Strain XTBG34 Promotes Plant Growth by Producing 2-Pentylfuran. *The Journal of Microbiology*, 48(4), 460-466. DOI: 10.1007/s12275-010-0068-z
- Zribi-Maaloul, E., Trabelsi, I., Elleuch, L., Chouayekh, H., and Salah, R. B. (2013). Purification and characterization of two polyhydroxyalcanoates from *Bacillus cereus*. *International journal of biological macromolecules*, 61, 82-88. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.06.043

XI. ANEXOS

Anexo 1. Descripción de la codificación de microorganismo utilizada en el proyecto de bioprospección microbiana para el desarrollo de aplicaciones ambientales.

- Letra mayúscula (C y R) para denotar el lugar donde se efectuó el muestreo, C: Reserva Ecológica El Chocoyero y R: Río Chiquito.
- Número romano (I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX) para denotar el punto de muestreo.
- Las letras en mayúscula para denotar el medio en el que fue inoculado la primera muestra; A: Agar Nutritivo (AN), B: Agar Luria-Bertani (LB), C: Plate Count Agar (PCA) y D: Agar Papa Dextrosa (PDA).
- Un guion (-) entre la letra que indica el medio de siembra y el número de aislado.
- Número ordinario para denotar el número de aislado consecutivo en cada punto, compuesto por dos cifras (Por ej.02).

Anexo 2. Listado en tabla del código de los cultivos puros aislados por técnicas de siembra en estrías y siembra por placa vertida en los puntos de muestro de Reserva Natural El Chocoyero.

Microorganismos aislados en Reserva Ecológica El Chocoyero									
Puntos de Muestreo	Agua de cascada	Suelo degradado	Roca cubierta con biopelícula	Roca cubierta con lama	Roca con biopelícula	Tronco de árbol degradado	Agua de Cascada	Suelo degradado	Tronco de árbol degradado
Códigos de los cultivos puro	CIC-01	CIID-01	CIIIA-01	CIVC-01	CVB-01		CVIIA-01	CVIIIC-01	CIXB-01
			CIIIA-02	CIVC-02	CVC-02		CVIIC-02	CVIIID-02	CIXD-02
			CIIIA-03	CIVC-03	CVD-03		CVIIC-03	CVIIID-03	CIXD-03
			CIIIB-04	CIVD-04	CVD-04		CVIID-04		CIXD-04
			CIIIB-05	CIVD-05	CVD-05				CIXD-05
			CIIC-06	CIVD-06	CVD-06				CIXD-06
			CIID-07	CIVD-07					CIXD-07
			CIID-08						CIXD-08
			CIID-09						CIXD-09
									CIXD-10
									CIXD-11
									CIXD-12
									CIXD-13

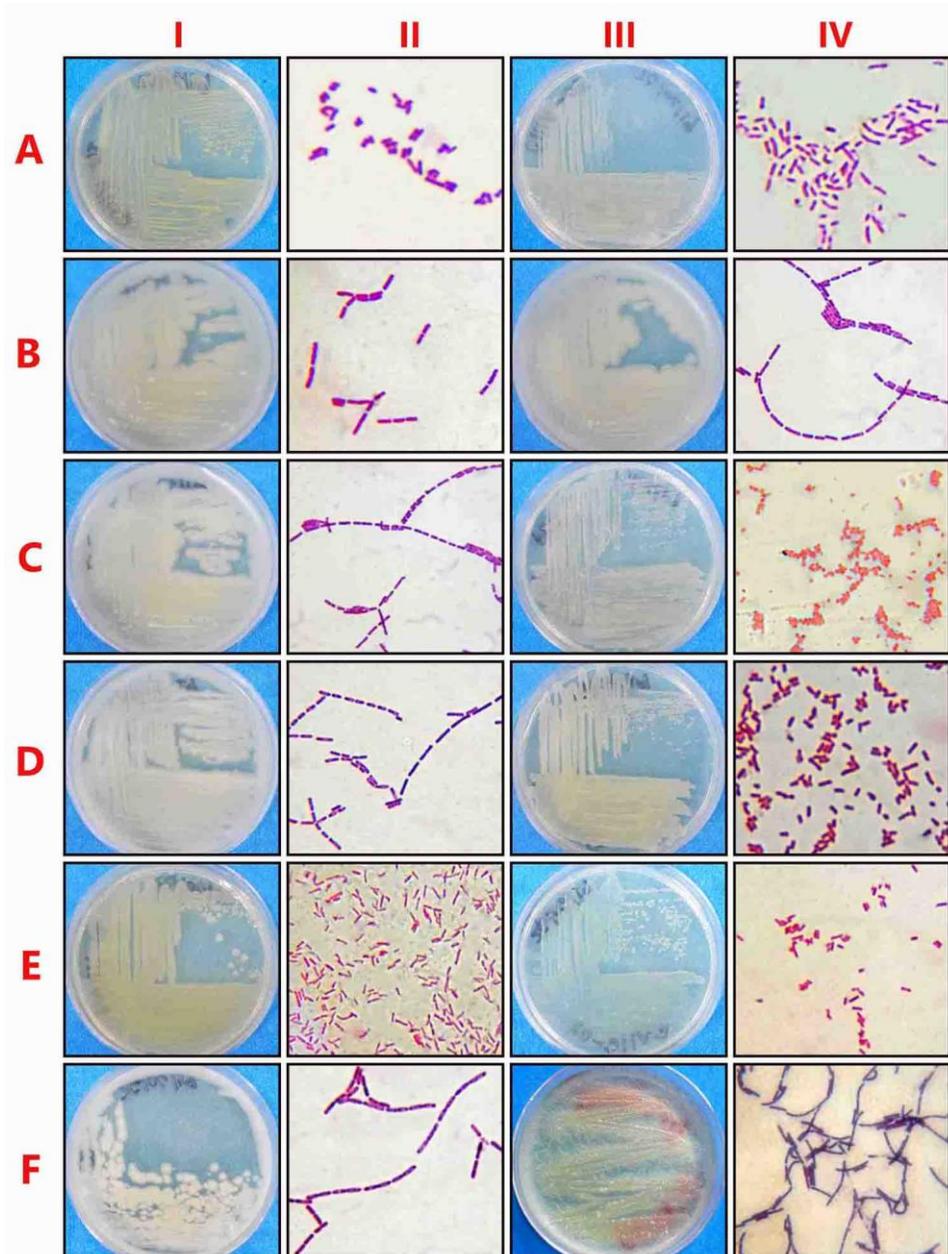
Fuente: Propia

Anexo 3. Listado en tabla del código de los cultivos puros aislados por técnicas de siembra en estrías y siembra por placa vertida en los puntos de muestro de Río Chiquito.

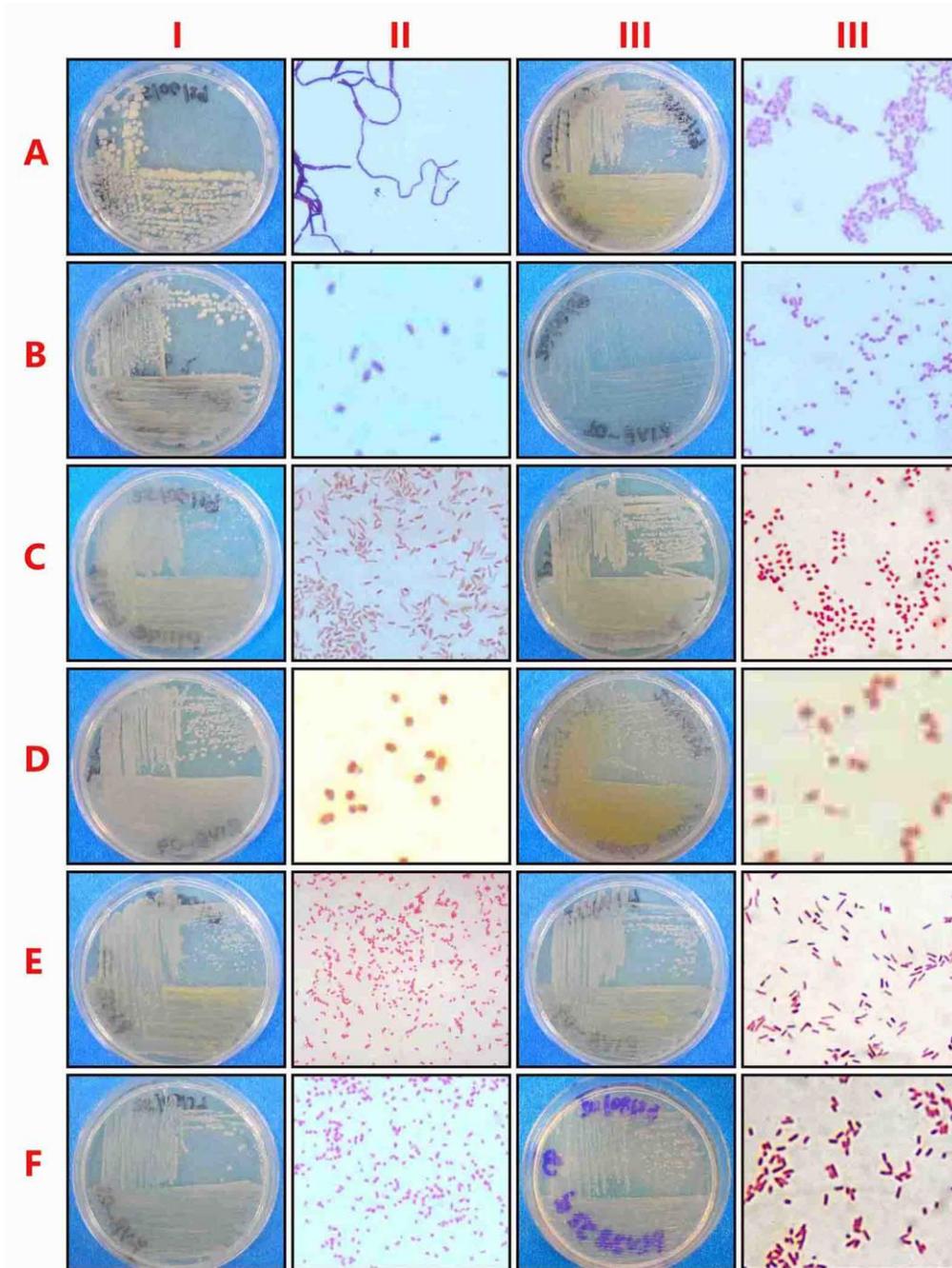
Microorganismos aisladas en Rio Chiquito						
Punto de muestreo	Agua residual de uso doméstico	Agua residual de uso doméstico	Agua residual de uso doméstico	Agua residual de tenerías	Agua residual de tenerías	Agua de pilas sépticas
Códigos de los cultivos puro	RIB-01	RIIB-01	RIIIB-01	RIVB-01	RVB-01	RVID-01
	RIB-02	RIIB-02	RIIIB-02	RIVB-02	RVA-02	RVIB-02
	RIB-03	RIIB-03	RIIIC-03	RIVB-03	RVD-03	RVIB-03
	RIB-04	RIIB-04	RIIIB-04	RIVB-04	RVB-04	RVIC-04
	RID-05	RIIB-05	RIIIB-05	RIVB-05	RVB-05	RVID-05
	RID-06	RIIB-06	RIIIB-06	RIVB-06	RVD-06	RVID-06
		RIIB-07	RIIIC-07	RIVB-07	RVD-07	RVID-07
		RIIB-08	RIIID-08	RIVB-08	RVA-08	
		RIIA-09	RIIID-09	RIVB-09	RVD-09	
		RIIC-10		RIVB-10	RVD-10	
		RIIA-11		RIVB-11	RVD-11	
		RIIC-12		RIVB-12		
		RIIB-13		RIVB-13		
				RIVB-14		

Fuente: Propia

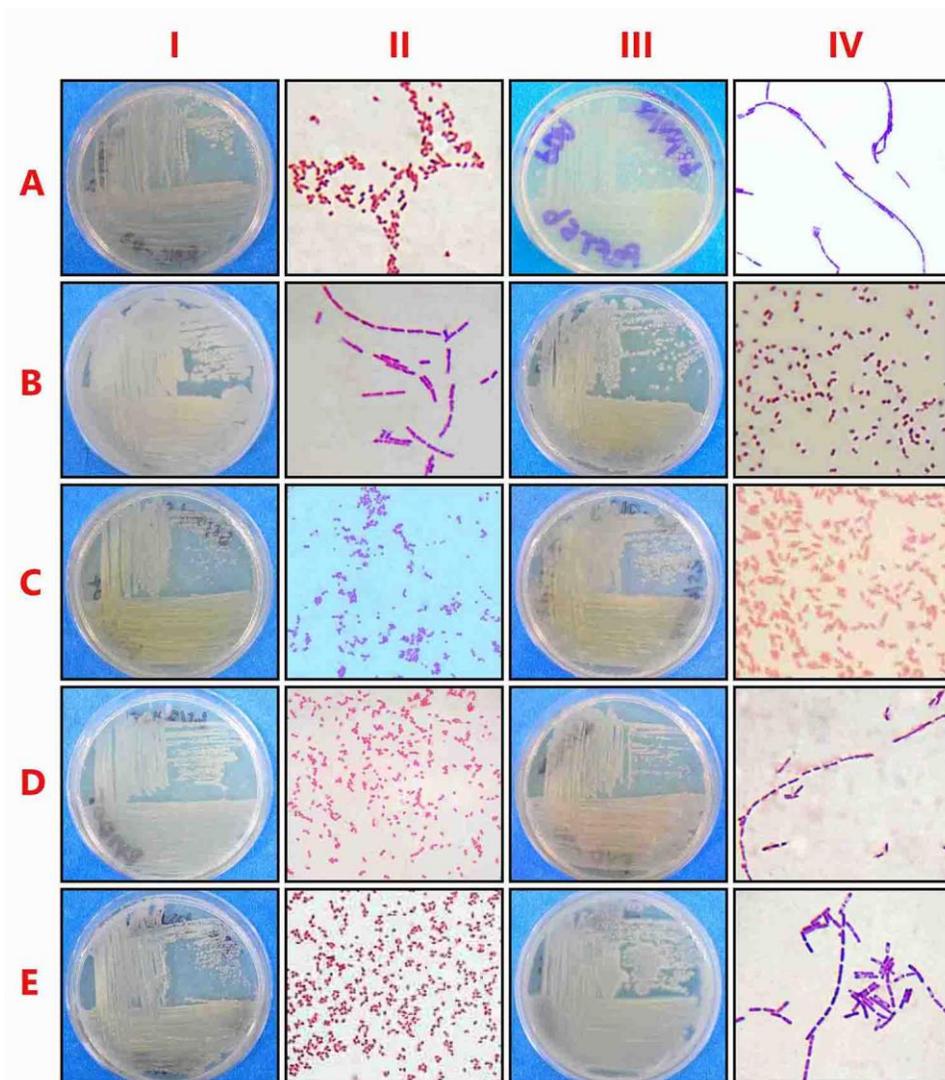
Anexo 4. Se muestra la morfología macroscópica de bacterias en placa Petri y su respectiva morfología microscópica en tinción de Gram observada a objetivo 100x, obtenidas de Reserva Natural El Chocoyero. AI-AII: CIIIA-01, AIII-AIV: CIIIA-03, BI-BII: CIIIB-05, BIII-BIV: CIVC-01, CI-CII: CIVC-02, CIII-CIV: CIVD-04, DI-DII: CVC-02, DIII-DIV: CVD-03, EI-EII: CVIIA-01, EIII-EIV: CVIIC-02, FI-FII: CVIIIC-01, FIII-FIV: CIXB-01 (Fuente: propia).



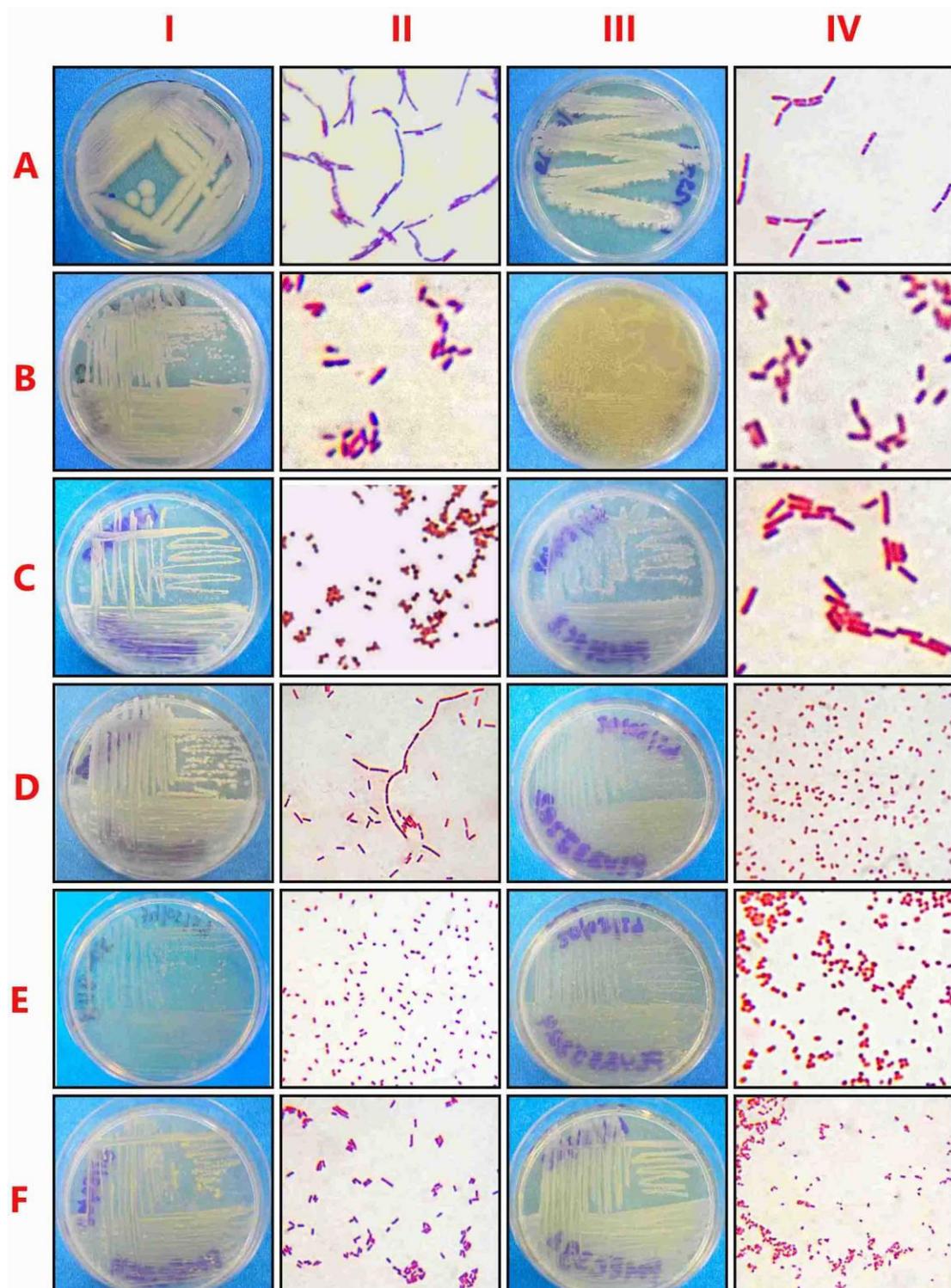
Anexo 5. Se muestra la morfología macroscópica de bacterias en placa Petri y su respectiva morfología microscópica en tinción de Gram observada a objetivo 100x, obtenidas de Río Chiquito. AI-AII: RIIB-01, AIII-AIV: RIIB-01, BI-BII: RIIB-02, BIII-BIV: RIVB-01, CI-CII: RIVB-02, CIII-CIV: RIVB-03, DI-DII: RIVB-04, DIII-DIV: RIVB-05, EI-EII: RIVB-07, EIII-EIV: RIVB-09, FI-FII: RVB-01, FIII-FIV: RIIB-02 (Fuente: propia).



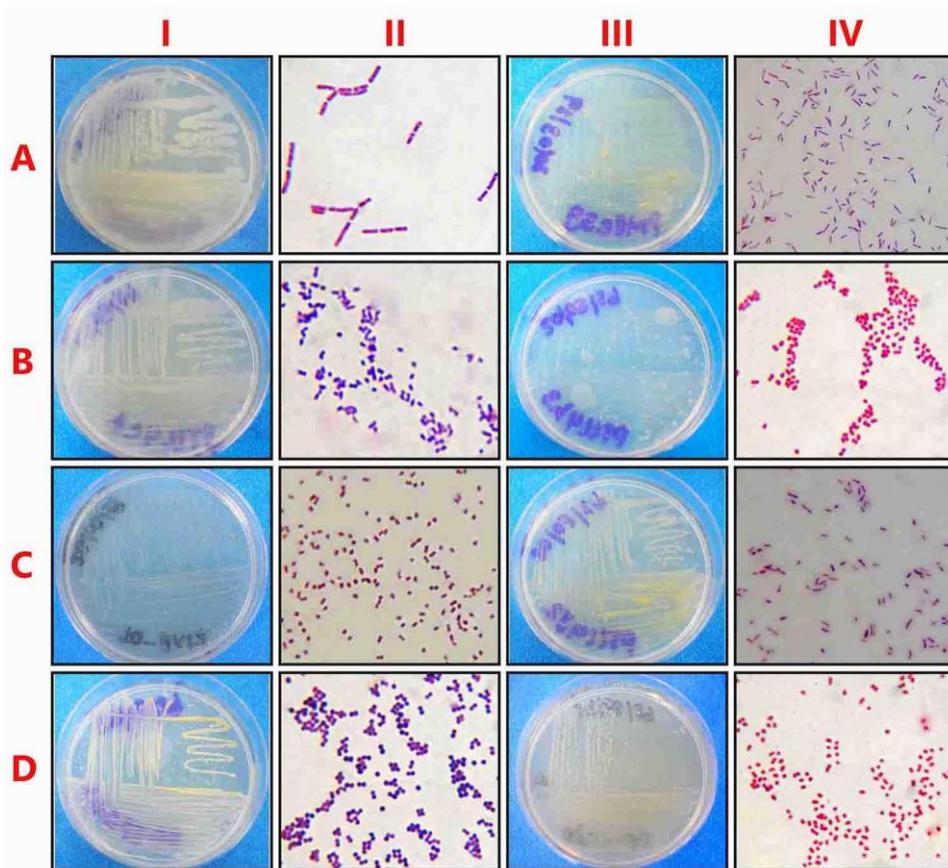
Anexo 6. Se muestra la morfología macroscópica de bacterias en placa Petri y su respectiva morfología microscópica en tinción de Gram observada a objetivo 100x, obtenidas de Río Chiquito. AI-AII: RIIC-03, AIII-AIV: RVA-02, BI-BII: RIIA-09, BIII-BIV: RIIC-10, CI-CII: RIIC-07, CIII-CIV: RVIC-04, DI-DII: RVID-05, DIII-DIV: RVD-06, EI-EII: RVD-07, EIII-EIV: RVA-08 (Fuente propia).



Anexo 7. Se muestra la morfología macroscópica de bacterias en placa Petri y su respectiva morfología microscópica en tinción de Gram observada a objetivo 100x, obtenidas de Río Chiquito. AI-AII: RIIA-11, AIII-AIV: RIIC-12, BI-BII: RIIB-13, BIII-BIV: RIB-01, CI-CII: RIB-02, CIII-CIV: RIB-03, DI-DII: RIB-04, DIII-DIV: RIIB-03, EI-EII: RIIB-05, EIII-EIV: RIIB-06, FI-FII: RIIB-04, FIII-FIV: RIIB-05 (Fuente: propia).



Anexo 8. Se muestra la morfología macroscópica de bacterias en placa Petri y su respectiva morfología microscópica en tinción de Gram observada a objetivo 100x, obtenidas de Río Chiquito. AI-AII: RIIB-08, AIII-AIV: RIIB-06, BI-BII: RIVB10, BIII-BIV: RIVB12, CI-CII: RIVB-13, CIII-CIV: RIVB-14, DI-DII: RVIB-02, DIII-DIV: RVIB-03 (Fuente: propia).



Anexo 9. Tabla de Caracterización macroscópicas y microscópicas de bacterias aisladas de Reserva Natural El Chocoyero.

Características Morfológicas de Bacterias		
Código	Observación Macroscópica Apariencia de la colonia	Observación Microscópica Resultado de Tinción Gram
Muestra III: Biopelícula adherida a una roca		
CIIIA-01	colonia pequeña, color amarillo bajo, puntiforme, elevada, lisa, borde entero, húmeda y brillante.	Bacilos Gram negativos muy pequeños de anchura mediana.
CIIIA-03	Colonia pequeña, color crema translúcida, puntiforme, elevada, lisa, borde entero, húmeda y brillante	Bacilos Gram negativos delgados y pequeños.
CIIIB-05	Colonia grande, cremosa, borde irregular, color crema, plana, rugosa, borde entero y opaca	Bacilos Gram positivos medianos y de anchura media que forman cadenas largas.
Muestra IV: Lama o película microbiana adherida a una piedra		
CIVC-01	Colonias grandes, de consistencia seca, rugosa, borde entero, forma irregular, color crema, plana, opaca.	Bacilos Gram positivos medianos y de anchura media que forman cadenas largas.
CIVC-02	Colonias grandes, consistencia seca, rugosa, borde entero, forma irregular, color crema, plana, opaca.	Bacilos Gram positivos medianos y anchos que forman cadenas largas.
CIVD-04	Colonia pequeña, puntiforme, color crema, cremosa, umbonada, borde erosionado, translúcida, cremosa y brillante.	Cocos Gram negativos pequeños.
Muestra V: Biopelícula blanca y verdosa adherida a una roca		
CVC-02	Colonia grande, cremosa, borde irregular, color crema, plana, rugosa, borde entero y opaca	Bacilos Gram positivos medianos y delgados que forman cadenas largas.
CVD-03	Colonia pequeña, puntiforme, color amarillo, translúcida, elevada, lisa, mucoide, borde entero y brillante.	Cocobacilos Gram negativos pequeños que se asocian en racimos.
Muestra VII: Agua de cascada del brujo		
CVIIA-01	amarillo oscuro, translúcida, colonia mediana, elevada, forma irregular, entero, brillante y crece en abundancia, húmeda.	Bacilos Gram negativos delgados y alargados.

Continuación **Anexo 9**

CVIIC-02	Colonia pequeña, puntiforme, elevada, color blanco translucida, entero, cremosa, brillante.	Bacilos Gram negativos muy chiquitos que se asocian en grupos.
Muestra VIII: Suelo degradado		
CVIIIC-01	Colonias grandes, de consistencia seca, rugosa, borde entero, forma irregular, color crema, plana, opaca.	Bacilos Gram positivos largos y anchos que forman cadenas no tan largas.
Muestra IX: Tronco de árbol degradado		
CIXB-01	Colonia grande, color crema, seca, plana, filamentosa, se extiende en gran parte de la placa y es opaca.	Bacilos Gram positivos largos, delgados y que tienden a formar cadenas largas.

Fuente: propia

Anexo 10. Tabla de Caracterización macroscópicas y microscópicas de bacterias aisladas de Río Chiquito.

Características Morfológicas de Bacterias		
Código	Observación Macroscópica Apariencia de la colonia	Observación Microscópica Resultado de Tinción Gram
Muestra I: Agua residual de uso doméstico		
RIB-01	Color amarillo, translúcida, brillante, se riega por toda la placa, mucoide, rugosa.	Cocobacilos Gram negativos pequeños que se tienden a agruparse.
RIB-02	Colonia pequeña, color amarillo naranja, húmeda, borde entero, lisa, elevada y puntiforme.	Cocos Gram negativos bien definidos
RIB-03	Colonia mediana, color crema, translúcida, brillante, seca, rugosa, plana, forma irregular y borde erosionado.	Bacilos Gram negativos delgados y de longitud mediana
RIB-04	Colonia mediana, color crema, translúcida, brillante, seca, rugosa, plana, forma irregular y borde erosionado.	Bacilos Gram negativos delgados y largos que forman cadenas largas.
Muestra II: Agua residual de uso doméstico		
RIIB-01	Tamaño mediano, color crema, circular, convexa, lisa, borde entero, consistencia cremosa y opaca.	Bacilos Gram positivos, delgados y largos que tienden a formar grandes cadenas.
RIIB-02	Colonia pequeña, color crema, puntiforme, elevada, translúcida, brillante, lisa, borde entero y dura.	Cocobacilos Gram negativos que tienden a agruparse.
RIIB-03	Colonia pequeña, color crema, húmeda, borde entero, lisa, elevada, puntiforme, translúcida y brillante.	Cocos Gram negativos dispersos.
RIIB-05	Colonia pequeña, color crema, húmeda, borde entero, lisa, elevada, puntiforme, translúcida y brillante.	Cocos Gram positivos dispersos
RIIB-06	Colonia pequeña, color crema, húmeda, borde entero, lisa, elevada, puntiforme, translúcida y brillante.	Cocos Gram negativos bien definidos que se asocian en racimos.
RIIB-08	Colonia mediana, color crema, translúcida, brillante, seca, rugosa, plana, forma irregular y borde erosionado.	Bacilos Gram negativos medianos.
RIIA-09	Colonia grande, cremosa, borde irregular, color crema, plana, rugosa, borde entero y	Bacilos Gram positivos, largos y

Continuación **Anexo 10**

	opaca	delgados que forman cadenas grandes.
RIIC-10	Colonia mediana, color crema, brillante, cremosa, lisa, borde entero, elevada y húmeda.	Cocos Gram positivos pequeños que tienden a formar diplococos.
RIIA-11	Colonias grandes, consistencia seca, rugosa, borde entero, forma irregular, color crema, plana, opaca.	Bacilos Gram positivos medianos y delgados que forman cadenas largas.
RIIC-12	Colonia mediana, color crema, translúcida, brillante, seca, rugosa, plana, forma irregular y borde erosionado.	Bacilos Gram negativos medianos.
RIIB-13	Colonia pequeña, color crema, brillante, convexa, borde entero, lisa, húmeda y forma circular.	Bacilos Gram negativos pequeños y anchos que se asocian en grupos.
Muestra III: Agua residual de uso doméstico		
RIIB-01	Colonia pequeña, color crema, translúcida, brillante, forma circular, húmeda, borde entero, lisa y elevada.	Cocobacilos Gram positivos pequeños.
RIIB-02	Colonia grande, color crema con borde translucido entero, elevada, viscosa, lisa, circular y brillante.	Cocobacilos Gram positivos pequeños y dispersos.
RIIC-03	Colonia mediana, color crema, translúcida, brillante, húmeda, lisa, elevada, circular y borde entero.	Cocobacilos Gram negativos pequeños.
RIIB-04	Colonias grandes, color amarillo intenso, mucoide, lisa, borde entero, forma irregular, elevada y brillante.	Bacilos Gram positivos muy pequeños y delgados.
RIIB-05	Colonia mediana, color crema, translúcida, brillante, húmeda, lisa, convexa, circular y borde entero.	Cocos Gram negativos muy pequeños que se asocian en racimos.
RIIB-06	Colonia pequeña, amarillo tenue, translúcida, brillante, elevada, circular, borde entero, lisa y mucoide.	Bacilos Gram positivos largos y delgados.
RIIC-07	Colonia pequeña, color crema, brillante, pulvinada, borde entero, lisa, viscosa, circular y translúcida.	Cocos Gram positivos muy pequeños que se asocian en racimos.
Muestra IV: Agua residual de tenerías		
RIVB-01	Colonias muy pequeñas, color crema, puntiforme, translúcida, plana, seca, lisa, borde entero y brillante.	Cocobacilos Gram positivos pequeños.
RIVB-02	Colonia pequeña, color crema, translúcida, brillante, elevada, circular, borde entero,	Bacilos Gram negativos delgados y

Continuación **Anexo 10**

	lisa y mucoide.	de longitud corta.
RIVB-03	Colonia mediana, color crema, brillante, cremosa, borde entero, lisa, convexa, forma circular.	Cocos Gram negativos bien definidos.
RIVB-04	Colonia mediana, color crema, brillante, translúcida, borde entero, lisa, elevada, circular y húmeda.	Cocos Gram negativos que se agrupan en diplococos.
RIVB-05	Colonia mediana, color crema, translúcida, brillante, borde entero, lisa, semiconvexa, mucoide y circular.	Cocos Gram negativos bien definidos.
RIVB-07	Colonia pequeña, amarilla, translúcida, brillante, borde entero, rugosa, elevada, puntiforme y mucoide.	Cocobacilos Gram negativos.
RIVB-09	Color crema, colonia pequeña, translúcida, lisa, convexa, borde entero, mucoide, circular y brillante.	Bacilos Gram negativos medianos y delgados.
RIVB-10	Colonia mediana, color crema, borde entero, lisa, semiconvexa, circular, viscosa, translúcida y brillante.	Cocobacilos Gram positivos muy pequeños.
RIVB-12	Colonias pequeñas, color crema, brillante, translúcida, puntiforme, borde entero, lisa, elevada y seca.	Cocos Gram negativos bien definidos que se agrupan en racimos.
RIVB-13	Color amarillo intenso, borde irregular, elevada, rugosa, mucoide, brillante y translúcida.	Bacilos Gram negativos largos, delgados y rectos.
RIVB-14	Colonia pequeña, color amarillo, translúcida, brillante, borde entero, lisa, circular, mucoide y convexa.	Bacilos Gram positivos pequeños y delgados.
Muestra V: Agua residual de tenerías		
RVB-01	Colonia pequeña, color crema, translúcida, cremosa, viscosa, brillante, plana, circular, borde lobulado y lisa.	Cocos Gram negativos bien definidos.
RVA-02	Colonia pequeña, color crema, translúcida, brillante, puntiforme, elevada, borde entero, lisa y mucoide.	Bacilos Gram positivos, largos y delgados.
RVD-06	Colonia pequeña, color crema, translúcida, brillante, circular, elevada, borde entero, lisa, mucoide.	Bacilos Gram positivos medianos y delgados que forman cadenas.
RVD-07	Colonia pequeña, color amarillo, brillante, rugosa, puntiforme, elevada, borde entero, mucoide.	Cocos Gram negativos pequeños.
RVA-08	Colonia grande, cremosa, borde irregular, color crema, plana, rugosa, borde entero y opaca	Bacilos Gram positivos anchos y de longitud mediana.

Continuación **Anexo 10**

Muestra VI: Agua contaminada de tenerías, uso doméstico y pilas sépticas

RVIB-02	Colonia pequeña, color amarillo naranja, húmeda, borde entero, lisa, elevada y puntiforme.	Cocos Gram positivos bien definidos que se agrupan en racimos.
RVIB-03	Colonia pequeña, color crema, translúcida, brillante, borde entero, lisa, convexa, húmeda y circular.	Cocos Gram negativos bien definidos.
RVIC-04	Colonia mediana, amarillo, translúcida, brillante, borde entero, lisa, convexa, mucóide y borde circular.	Bacilos Gram negativos muy pequeños.
RVID-05	Colonia pequeña, color crema, brillante, translúcida, forma circular, borde entero, lisa, elevada y húmeda.	Cocos Gram positivos muy pequeños que se asocian en racimos.

Fuente: propia

Anexo 11. Tabla de caracterización macroscópica y microscópica de los cultivos puros de hongos filamentosos aislados de Reserva Natural El Chocoyero.

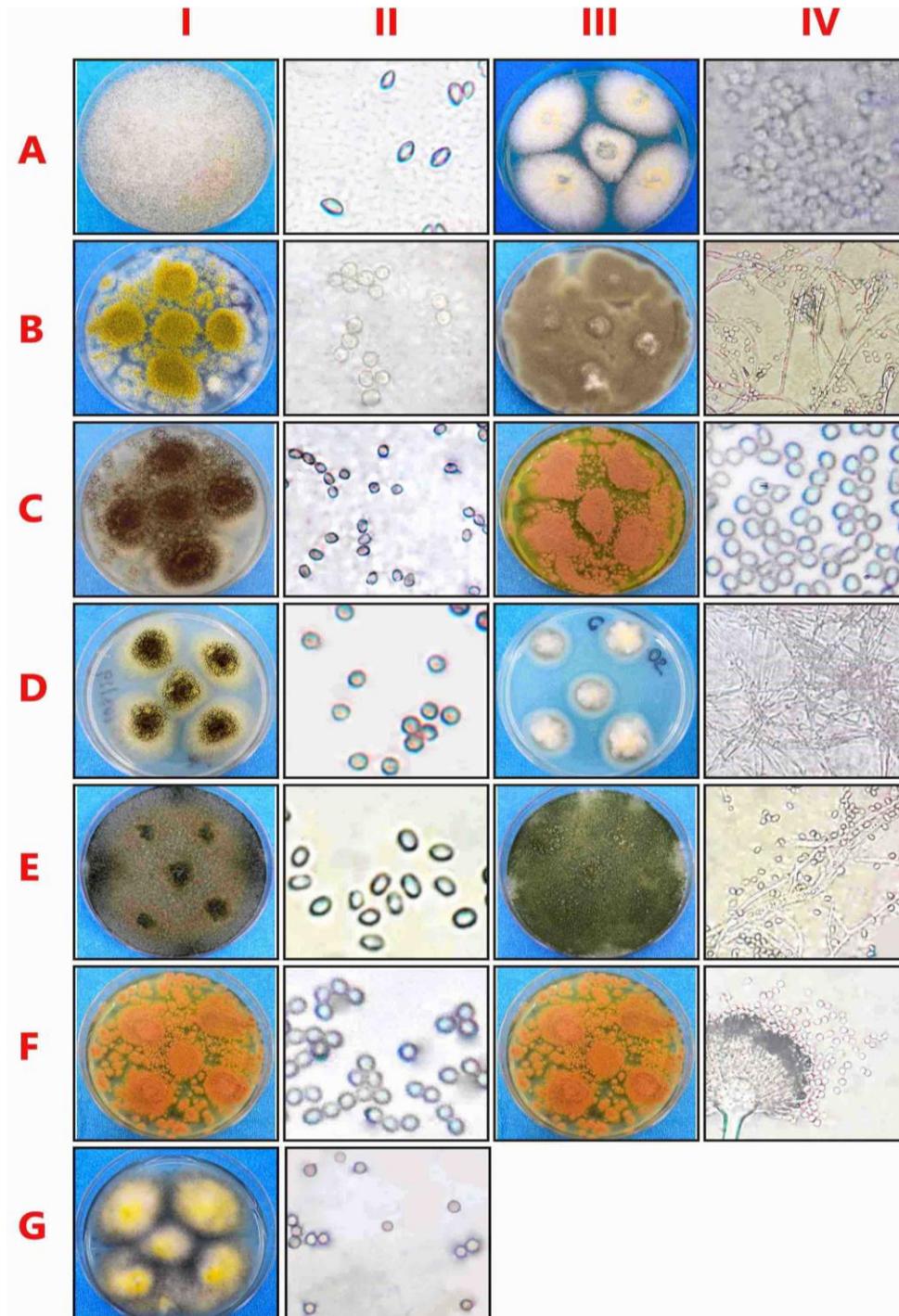
Características morfológicas de Hongos Filamentosos				
Código	Observación macroscópica			Observación microscópica
	Color de la colonia		Apariencia del micelio	Forma de esporas
	Anverso	Reverso		
CIID-01	Blanco con superficie negra	Crema con centro más oscuro.	Colonia lanosa, forma filamentosa, elevada, sin margen, superficie con surcos radiados, crecimiento invasivo en toda la placa y consistencia blanda.	Forma ovalada y rugosa
CIID-08	Blanco	Crema y contornos más claros	Colonia algodonosa, forma circular, plana, extendida, margen deflecado, superficie plegada en el centro, crecimiento limitado a los puntos de siembra y consistencia blanda.	Forma redonda, lisa y contorno fino
CIVD-06	Verde	Crema con centro más oscuro	Colonia pulverulenta, forma irregular, elevada, extendida, margen rizoide, superficie cerebriforme, crecimiento no solo en los puntos de siembra y consistencia seca.	Forma redonda y lisa
CIVD-07	Blanco con verde musgo.	Crema	Colonia algodonosa, forma circular, elevada, extendida, sin margen, crecimiento invasivo en la superficie del medio y consistencia blanda.	Septadas y fusiforme con bordes finos.
CVD-04	Café y bordes crema	Crema	Colonia polvosa, forma filamentosa, elevada, extendida, margen deflecado, superficie cerebriforme, crecimiento no solo en los puntos de siembra y consistencia blanda.	Globosas de color café y contorno grueso.
CVIIID-03	Marrón pálido con borde amarillo fluorescente.	Café claro con pigmentación amarillenta difusible en el medio.	Colonia pulverulenta, forma irregular, elevada con surcos radiados, margen lobulado, crecimiento no solo en los puntos de siembra y consistencia blanca.	Redonda y contorno grueso
CIXD-04	Negra-verdosas con	Crema con centro más	Colonia pulverulenta, forma filamentosa,	Globosas de color café,

Continuación **Anexo 11**

	contorno blanco.	oscuro.		elevada, extendida, margen deflecado, superficie cerebriforme, crecimiento no solo en los puntos de siembra y consistencia blanda.	ornamentados con espinas o pelitos irregulares.
CIXD-05	Amarilla con blanco y gris.	Gris oscuro		Colonia vellosa, forma circular, umbilicada, extendida, margen entero, crecimiento no solo en los puntos de siembra, superficie desflecada y consistencia dura.	No se observó esporas
CIXD-07	Verde oscuro con blanco	Crema con negros	puntos	Colonia aterciopelada, forma circular, plana, extendida, sin margen, crecimiento invasivo en la superficie del medio y consistencia seca y mucoide.	Forma ovalada y lisa.
CIXD-08	Verde oscuro con blanco	Pigmentación amarilla difusible en el medio		Colonia aterciopelada, forma circular, plana, extendida, sin margen, crecimiento invasivo en la superficie del medio y consistencia seca y mucoide.	Forma ovalada y lisa
CIXD-09	Marrón pálido con borde fluorescente.	Café claro con pigmentación amarillenta difusible en el medio.		Colonia pulverulenta, forma irregular, elevada con surcos radiados, margen lobulado, crecimiento no solo en los puntos de siembra y consistencia blanca.	Forma redonda y contorno grueso
CIXD-10	Marrón pálido con borde fluorescente.	Café claro con pigmentación amarillenta difusible en el medio		Colonia pulverulenta, forma irregular, elevada con surcos radiados, margen lobulado, crecimiento no solo en los puntos de siembra y consistencia blanca.	Forma redonda y contorno grueso
CIXD-13	Amarilla con blanco y gris.	Gris oscuro		Colonia vellosa, forma circular, umbilicada, extendida, margen entero, crecimiento no solo en los puntos de siembra, superficie desflecada y consistencia dura.	Redonda de color café y lisas.

Fuente: propia

Anexo 12. Se muestra el crecimiento en placa de hongos filamentosos en medio PDA y su observación de esporas al microscopio con un objetivo de 50x, representación de 13 hongos filamentosos de un total 21 obtenidos en Reserva Natural El Chocoyero. AI-AII: CIID-01, AIII-AIV: CIID-08, BI-BII: CIVD-06, BIII-BIV: CIVD-07, CI-CII: CVD-04, CIII-CIV: CVIID-03, DI-DII: CIXD-04, DIII-DIV: CIXD-05, EI-EII: CIXD-07, EIII-EIV: CIXD-08, FI-FII: CIXD-09, FIII-FIV: CIXD-10, GI-GII: CIXD-13 (Fuente: propia).



Anexo 13. Tabla de caracterización macroscópica y microscópica de los cultivos puros de hongos filamentosos aislados de Río Chiquito.

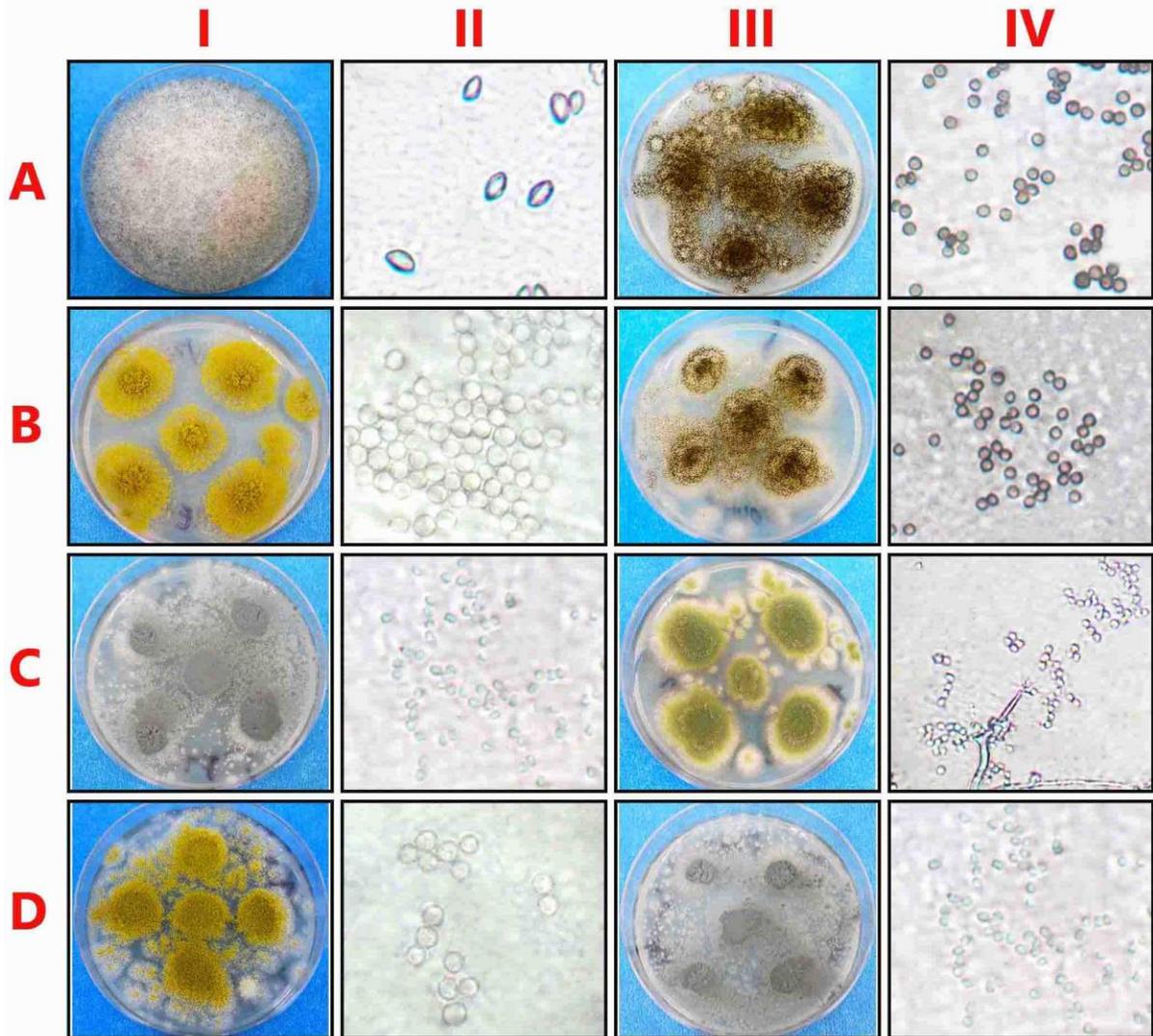
Características morfológicas de Hongos Filamentosos							
Código	Observación macroscópica						Observación microscópica
	Color de la colonia			Apariencia del micelio	Forma de esporas		
	Anverso	Reverso					
RID-05	Blanco con superficie negra	Crema con centro más oscuro.		Colonia lanosa, forma filamentosa, elevada, sin margen, superficie con surcos radiados, crecimiento invasivo en toda la placa y consistencia blanda.	Forma ovalada y rugosa		
RID-06	Negra, contorno crema y fondo verde fluorescente.	Crema con centro más oscuro.		Colonia pulverulenta, forma filamentosa, elevada, extendida, margen deflecado, superficie cerebriforme, crecimiento no solo en los puntos de siembra y consistencia blanda.	Forma redonda, con pelitos y contorno grueso		
RIID-08	Verde-amarillo	Crema		Colonia pulverulenta, forma circular, plana y extendida, con surcos radiados, margen rizoide, crecimiento no sólo en los puntos de siembra y consistencia blanda.	Ovalada y Septadas con un fondo fluorescente y de paredes gruesas.		
RIID-09	Negra, contorno crema y fondo verde fluorescente	Crema con centro más oscuro.		Colonia pulverulenta, forma filamentosa, elevada, extendida, margen deflecado, superficie cerebriforme, crecimiento no solo en los puntos de siembra y consistencia blanda.	Forma redonda, con pelitos y contorno grueso		
RVD-09	Plomo	Plomo con centros cremas		Colonia polvosa , forma irregular, plana, extendida, margen lobulado, superficie plegada crecimiento no solo en los puntos de siembra y consistencia blanda.	Forma redonda, lisa y contorno fino		

Continuación **Anexo 13**

RVD-10	Plomo	Plomo con centros cremas	Colonia pulverulenta, forma irregular, plana y extendida, margen lobulado, superficie plegada crecimiento no solo en los puntos de siembra y consistencia blanda.	Redondas, lisa y contorno fino
RVD-11	Verde claro con bordes blancos	Amarillo claro	Colonia pulverulenta, forma circular, plana y extendida, con surcos radiados, crecimiento no solo en los puntos de siembra, margen filamentosos y de consistencia blanda.	Elipsoide y Septadas con un fondo fluorescente y de pared gruesa.
RVID-06	Verde claro	Crema	Colonia pulverulenta, forma circular, plana y extendida, crecimiento invasivo, sin margen, y consistencia blanda.	Ovalada y Septadas con un fondo fluorescente y de paredes gruesas.

Fuente: propia

Anexo 14. Se muestra el crecimiento en placa de hongos filamentosos en medio PDA y su observación de esporas al microscopio con un objetivo de 50x, representación de 8 hongos filamentosos de un total 8 obtenidos en Río Chiquito. AI-AII: RID-05, AIII-AIV: RID-06, BI-BII: RIIID-08, BIII-BIV: RIIID-09, CI-CII: RVD-09, CIII-CIV: RVD-11, DI-DII: RVID-06, DIII-DIV: RVD-10 (Fuente: propia).



Anexo 15. Secuencias corregidas y alineadas en formato FASTA de bacterias identificadas vía molecular.

>D_27F: **Secuencia 1. Cepa CVIID-04 (*Alcaligenes faecalis* subsp *faecalis*)**

```
CGGGCGCAGAGAGTAAGAGTCTATTGCTCTCTATTTTAGTAAGGGAAGTACGTAAGTTCGATCGG
CACGCAGTAGACAGCTTGCTCTCTTGGCGGCGAGGGGGGTAAGGGAGAAGTATATATCGGAAC
GTGCCAGTAGCGGGGGATAACTACTCGAAAGAGTGGCTAATACCGCATAACGCCCTACGGGGG
AAAGGGGGGGATCGCAAGACCTCTCACTATTGGAGCGGCCGATATCGGATTAGCTAGTTGGTG
GGGTAAAGGCTCACCAAGGCAACGATCCGTAGCTGGTTTGGAGAGGACGACCAGCCACACTGGG
ACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGGGAAA
CCCTGATCCAGCCATCCCGCGTGTATGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTTGGCAGAG
AAGAAAAGGTATCCCCTAATACGGGATACTGCTGACGGTATCTGCCGAATAAGCACCGGCTAAC
TACGTGCCATCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA
GCGTGTGTAGGCGGGTTCGGAAGAAAGATGTAAAATCCCAGGGCTCAACCTTGGAACTGCGT
TTTTAACTGCCCGAGCTAGAGTATGTACAGGGGGTAGAATCCCCTCATGTAGCAGTGACATCGG
TAATGTGTGGAGGAATACCGGTAGGCAAACGCAGCTCCCTCCGAAAATATTGAGTCTTAAACA
CAA
```

>C1_27F: **Secuencia 2. Cepa RIVB-08 (*Pseudomonas mendocina*)**

```
GAAATGGGGGCGGCTACACATGCAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGCTCCCTGATTTAGCG
GCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTCCGAAAGGAAC
GCTAATACCGCATAACGCTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATG
AGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGT
CTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTACGAGACCGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGTCT
TCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGT
TACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAG
CGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTCGTTAAGTTGATGTGAAAGCC
CCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAAGTGGCGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAA
ATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACC
TGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTGTGGCGCAGCTAAC
GCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAGTCAAATGAATTGACGGGGG
CCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGCCTTG
ACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCAT
GGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGCTGGAGATGTTGGGGTAAAGTCCCCGTAACGAAGCGCAACCC
TTGGTTCCTTAGTTACCAGCACCTCGGGGTGGGCACTCTTAAGGAAACTGGCAGGTGGACAAAC
CCGAAGGAAAGGGGGGGGAAGAAAGTCCAAGTCTTCATGGCCCTTACAAGGGCCAGGGGGTTA
ACCACCGTGGCTACCAAAGGGTCCGGGACAAAAGGGGTTGCCCAAGCCCCCGAGGGGGGGA
GCTTAATCCCCCTAAAAACCCGAATGTTAATTTCCGGGAATCCAAAATTTGGGAAATCCAA
```

>C2_27F: **Secuencia 3. Cepa RVB-04 (*Enterobacter cloacae*)**

```
ACACATGCAGTCGACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGA
GTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCAT
AACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGA
TTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGA
CCAGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG
CACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGAAA
GTACTTTTACGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGAGAA
GAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGA
ATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAA
CCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGATAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTG
TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAG
ACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC
```

GTAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGT
CGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA
GCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGA
GAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTG
AGCTCGTGTGAAATGTTGGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCC
AGCGGTTAGGCCGGGAACCTCAAAGGAGAC

>C3_27F: **Secuencia 4. Cepa RIVB-11 (*Bacillus flexus*)**

TTTTTGGGGCCAAAATGCAGTCGAGCGAACTGGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGG
CGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGA
GCTAATACCGGATAACATTTTCTCTTGCATAAGAGAAAATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTA
CAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCAT
AGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAT
GAAGGCTTTCCGGTTCGTAATAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACAAGAGTAACCTGCTTGAC
CTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG
GTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATG
TGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGA
AAAGCGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAG
GCGGCTTTTTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGC
TGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGA
ATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAACCT
TACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCTAGAGATAGAGCGTTCCTTCCGGGGACAGAGTG
ACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGAAATGTTGGGGTTAAGTCCCCGCAAC
GAAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTCCTAAAGGTGACTG
CCGGTGA

>C4_27F: **Secuencia 5. Cepa RIB-04 (*Acinetobacter* sp)**

GGGAATTTGGGGCGGCTTACACATGCAGTCGAGCGGGGAAGGTTACCTTCGGGTAACCTGACC
TAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATTCGAAAG
GAATGCTAATACCGCATACGCCCTACGGGGGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGCTAATA
GATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAG
CGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGGAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGA
AGGCCTTTGGTTGTAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTCCTTTAGTTAATACCTAAAGAGAG
TGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGG
GTGCGAGCGTTAATCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGCGGCTTTTTAAGTCGGATGT
GAAATCCCTGAGCTTAACCTTAGGAATTCATTGATAGACTGGAAGCTAGAGTATGGGAGAGGAT
GGTAGAATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGACTCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGC
AGCCATCTGGCCTAATACTGACGCTGAGGTACGAAAGCATGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC
CTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGTGGCGCA
GCTAACGCGATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTAAAACCTCAAATGAATTGAC
GGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCCGAAGAACCTTACCT
GGGCCTTGACATACTAAGGAACTTTCCAGAGAATGGATTGGTGGCCTTCGGGAACTTAGAATAC
AGGTGCTGCATGGGCTGTCGTGAGCCTCCGTGTCGTGGAGATGTTGGGGTTAAGTCCCCGCAA
CCGAGCGCAACCCTTTTTCTTAATTTGCCAAGCGGGTTCATGCCCGGGAACCTTAAGGATAA
CCTGCCAGTGGACAACTTGGGAAGGAAGGGGGGGGAACGAACGTTCCAGTCTTTCCAGGG
GCCCTTACGGGCCAGGGGTTAACACCCGTGGCTTACAAAGGGGTCCGGGTAATAAAGGGGTT
GGTACCCCCCGGAAAGGGAAGGCTTAATTCCTCAAAAAAAGC

>C5_27F: **Secuencia 6. Cepa RIB-07 (*Bacillus cereus*)**

TTGTTGGGCCTGCCTATACATGCAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTTATGAAGTTAGC
GGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG
GGGCTAATACCGGATAACATTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCA

CTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATG
CGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACG
GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT
GATGAAGGCTTTCCGGTTCGTA AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCT
GGCACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGA
AGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGG
CGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTA ACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT
TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTTCCGCCCTTT
AGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAA
GGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAA
CCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGT
GACAGGTGGTGCATGGTTGTCGT CAGCTCCTGTCTGAGATGTTGGGGTTAAGTCCCCAACA
AGCGCAACCCTTGATCTTATTTGCCATCATTAAATTGGCCCCCTAAGGGGACTGCCGGTGACA
AACCCAGGAAAGGGGGGAGGAAGGCCAATAATCATGGCCCCCTTTAACCGGGGTAAAACC
CTGTTCAATGGGAGGGGCCAAAAAATGTCAAACCCCAAGGGGGAGGTAATTTTTTAAAAACC
GTTTTCCCTTTCCAATTGAGG

>C6_27F: **Secuencia 7. Cepa CIXD-03 (*Pantoea dispersa*)**

GTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCCGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACG
GTAGCTAATACCGCATAACGTTCGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCACACCATCGG
ATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCT
GGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGA ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG
CAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGG
CCTTCGGGTTGTAAAGTACTTT CAGCGGGGAGGAAGGCGGTGAGGTTAATAACCTTGCCGATTG
ACGTTACCCGCGAGAAGAAGCACCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTG
CAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTAAAGTCAGATGTGAA
ATCCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGG
TAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGG
CCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCCGTA AACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGA
GCTAACGCGTTAAGTCGACCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGAC
GGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGTTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTG
GCCTTGACATCCAGAGA ACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCTTCCGGAACTCTGAGACAGGTGC
TGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTG

>C7_27F: **Secuencia 8. Cepa CIIIB-04 (*Bacillus* sp)**

AGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGAC
TGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTTCGAAATT
GAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA
CGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGA
GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG
ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCCGGTTCGTA AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAA
CAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGC
GCGCAGGTGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAA
CTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAG
ATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTA ACTGACACTGAGGCGCGAAA
GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGATGAGTGCTAAGT
GTTAGAGGGTTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCC

>C8_27F: **Secuencia 9. Cepa CIIIC-06 (*Bacillus* sp)**

GCGGCGGACGGGTTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAA
CCGGGGCTAATACCGGATAACATTTGAACTGCATGGTTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCT
GTCATTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAAC

GATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTG
AGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTA AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAG
CTGGCACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
TACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAG
TCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCA
GAAGAGGAAAGTGGAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTG
GCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTA ACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA
TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTT
TAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTC

>C9_27F: **Secuencia 10. Cepa CVIIC-03 (*Aeromonas hydrophila*)**

TGCAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAAGTAGCTTGCTACTTTTTGCCGGCAGCGGGCAGCGGGTGA
GTAATGCCTGGGAAATTGCCAGTCGAGGGGATAACAGTTGAAACGACTGCTAATACCGCAT
ACGCCCTACGGGGAAAAGCAGGGGACCTTCGGGCTTGC GCGATTGGATATGCCAGGTGGG
ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGA
TCAGCCACACTGGA ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG
CACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAA
GCACTTTCAGCGAGGAGGAAAGGTTGATGCCTAATACGTATCAACTGTGACGTTACTCGCAGAA
GAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGC AAGCGTTAATCGGA
ATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTGGATAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAA
CCTGGGAATTGCATTTAAA ACTGTCCAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATCCAGGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTCGGACAAAGA
CTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
TAAACGATGTCGATTTGGAGGCTGTGTCCTTGAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAATC
GACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAA ACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAG
CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGA

>C10_27F: **Secuencia 11. Cepa CIXD-02 (*Erwinia* sp)**

TGCAGTCGAACGGCAGCACAGAAGAGCTTGCTCTTTGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGTA
ATGCTGGGAAACTGCCCGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAAC
GTCGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCTCACACCATCGGATGTGCCAGATGGGATTA
GCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCA
GCCACACTGGA ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCAC
AATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTA
CTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGGTGAGGTTAATAACCTTGCCGATTGACGTTACCCGCAGAAGA
AGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGC AAGCGTTAATCGGAAT
TACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCT
GGAACTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTAGTCTCTG TAGAGGGGGGTAGAATCCAGGTGTAG
CGGTGAAATCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTCGGACGAAGACT
GACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
AACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCG
ACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAA ACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGC
GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCG

>C11_27F: **Secuencia 12. Cepa CVB-01 (*Bacillus* sp)**

ATGCAGTCGAGCGAATGGATTGGAGAGCTTGCTCTCATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTA
ACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATA
ACATTTTGA ACTGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCG
CGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAG
AGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG
GAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGG
GTCGTA AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTA
CCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCG
TTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCA
CGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTG CAGAAGAGGAAAGTGGAAT

TCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTG
GTCTGTAAGTACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
CCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACG
CATTAAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGC
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGA
CATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGG
TTGTCGTACAGCTCCTGTCCTGAGATGTTGGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGATCT
TAGTTGCCATC

>C17_27F: **Secuencia 13. Cepa CIC-01 (*Exiguobacterium profundum*)**

ACGGTGGAAATGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAAGAACCTGCCCATAGGTCTGGGATA
ACCACGAGAAATCGGGGCTAATACCGGATGTGTCATCGGACCGCATGGTCCGCTGATGAAAGG
CGCTCCGGCGTCGCCCATGGATGGCTTTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCCA
CCAAGGCGACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGC
AACGCCGCGTGAACGATGAAGGCTTTCCGGTTCGTAAGTTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTGC
CGCAGGCAATGGCGGCACCTTGACGGTACCTTGCGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC
AGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGG
CGGCCTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGCCATTGAAACTGGGA
GGCTTGAGTATAGGAGAGAAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGG
AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTTTGGCCTATAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGG
GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAGG

>C18_27F: **Secuencia 14. Cepa CIIIA-01 (*Bacillus megaterium*)**

CTATACATGCAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTG
AGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGG
ATAGGATCTTCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCCGGCTATCACTTACAGATGGGCC
CGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTG
AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA
GGAAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTC
GGTTCGTA AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACGAGAGTAACTGCTTGTACCTTGACGGT
ACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGC
GTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC
ACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAA
TTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTT
TGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCACGCCGTA AACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAA
CGCATTAAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCCGAAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG
GCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTT
GACATCCTCTGACA ACTCTAGAGATAGAGCGTTCCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTG
CATGGTTGTCGTACGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGGTTAAGTCCCAGCA

>C19_27F: **Secuencia 15. Cepa RVD-03 (*Enterobacter sp*)**

TGCAGTCGAACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAAT
GTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGT
CGCAAGACCAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGC
TAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGC
CACTGGA ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAA
TGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTT
TCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCGAGAAGAAGC
ACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAC
TGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGG
GAACTGCATTGCAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCG
GTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGA
CGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
CGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGAC

CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGG
TGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACT
TTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTC
GTGTTGTGAAATGTTGGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCG
GTCCGGCCGGG

>C21_27F: **Secuencia 16. Cepa RVB-05 (*Enterobacter sp*)**

TGCAGTCGAACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAAT
GTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGT
CGCAAGACCAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGC
TAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGC
CACTGGAAGTGAACGACCGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAA
TGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTT
TCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC
ACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAC
TGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGG
GAACTGCATTTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCG
GTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGA
CGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAA
CGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGAC
CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGG
TGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACT
TTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTC
GTGTTGTGAAATGTTGGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGG
TTAGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAAGGTGGGGATGACGTCA
AGTCATCATGGCCCTTACGA

>C22_27F: **Secuencia 17. Cepa RVID-01 (*Enterobacter cloacae*)**

GGAAAATGGGGGGCCGCTACACATGCAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTCGCT
GACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGG
AAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTTCGCAAGACCAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCC
ATCGGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCC
CTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACGACCGTCCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGA
AGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTACGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTCG
TCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGG
AGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGA
TGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAG
GGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAA
GGCGGCCCTTCGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG
ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTT
CCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGA
ATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCT
TACCTGGTCTTGACATCCACGGAAGTTTTTCAGAGATGAGAATGTGCCTTCGGGAACCGTGAGAC
AGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTAAGTGGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC
GCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGGTCCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAA
ACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAATCCAATTTTTCTTGGGGCCTTTTTAAACAAGGGGGG
AA

>C23_27F: **Secuencia 18. Cepa CIVC-03 (*Staphylococcus sciuri*)**

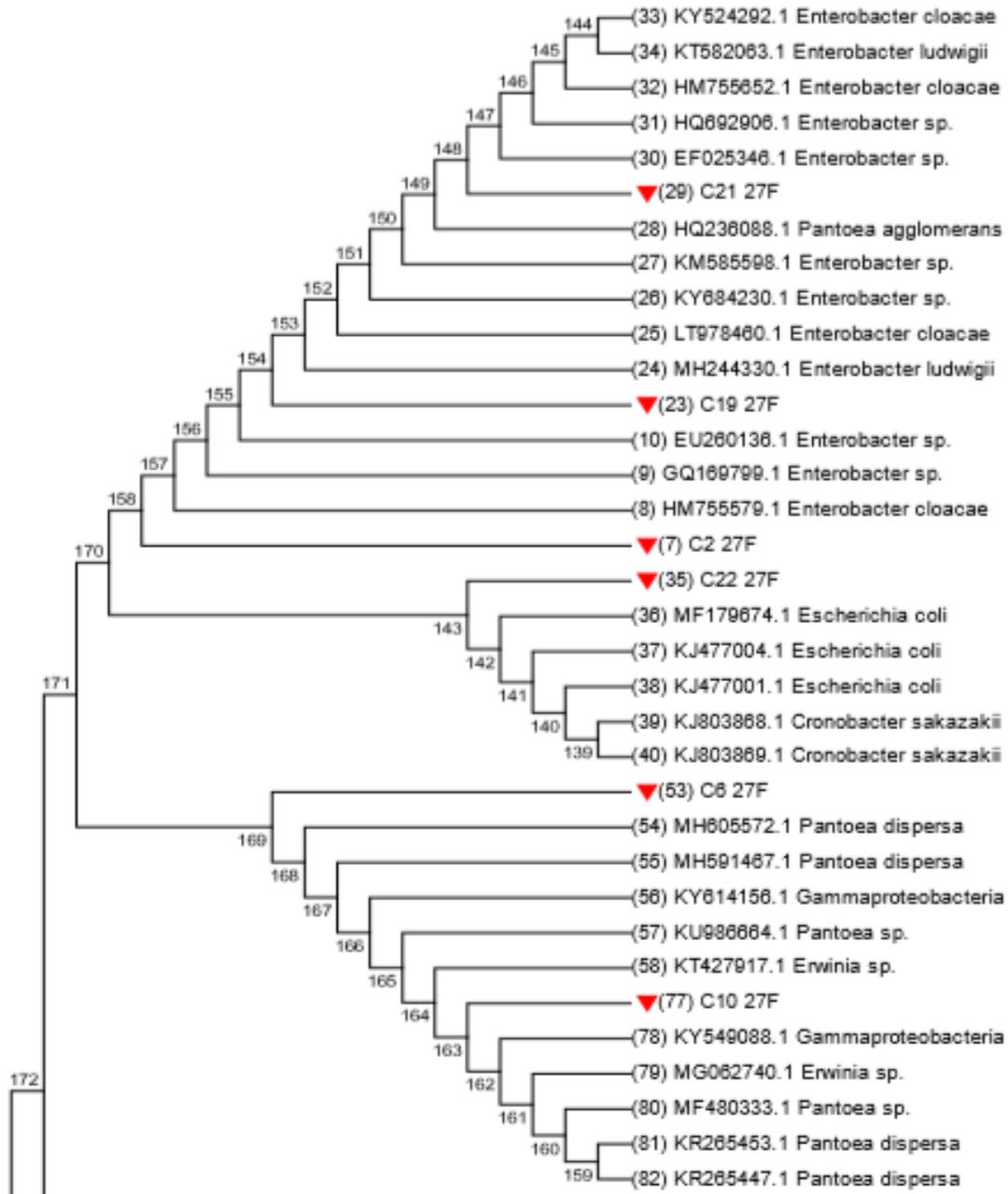
GCAGTCGAGCGAACAGATGAGAAGCTTGCTTCTCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACA
CGTGGGTAACTACCTATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAATAT
TTTGAACCGCATGGTTCAATAGTGAAAGACGGTTTTCGGCTGTCACCTATAGATGGACCCGCGCC
GTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGT
GATCGGCCCACTGGAAGTGAACGACCGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT
TCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTA

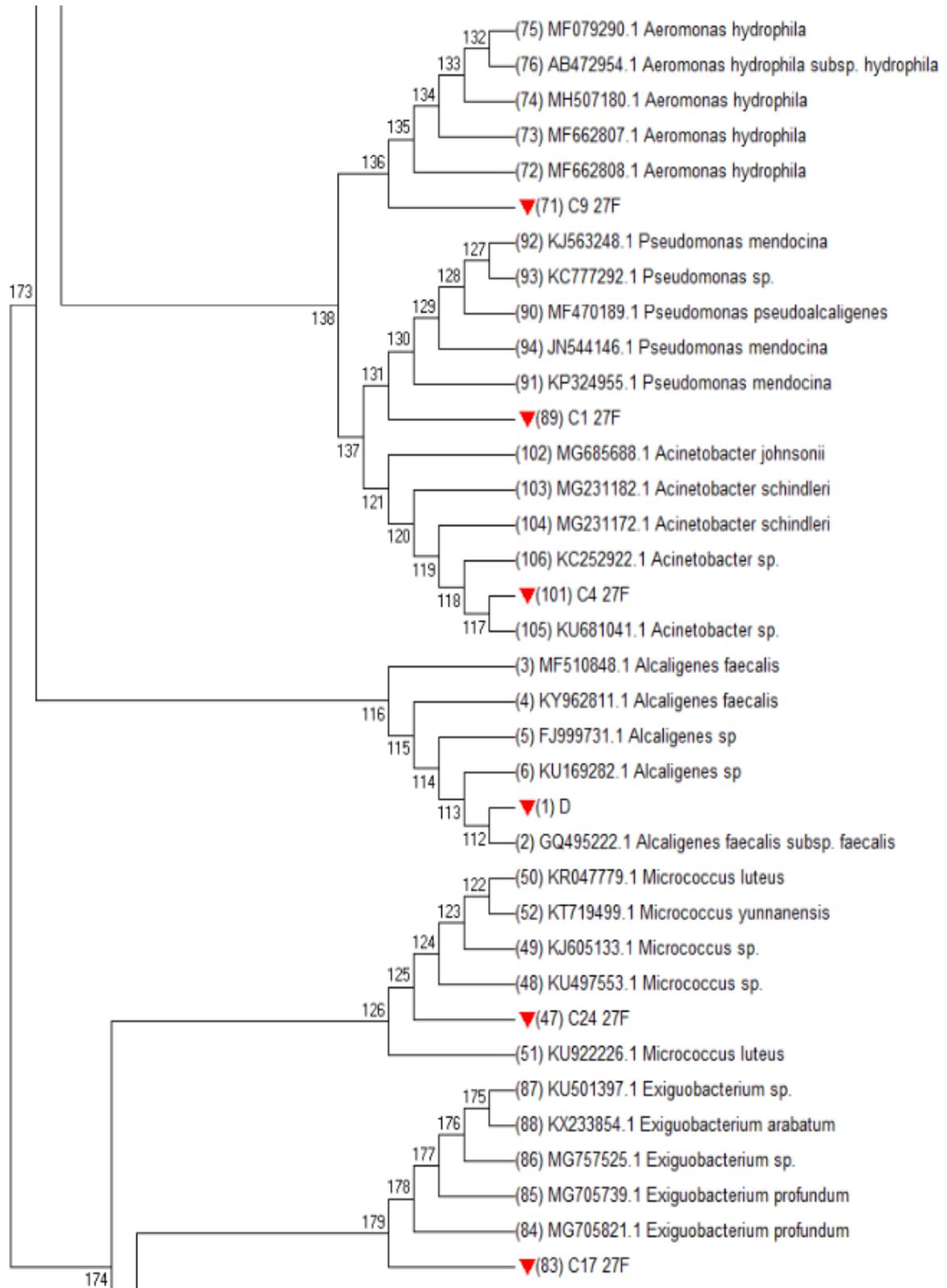
AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAATTTGTTAGTAACTGAACAAGTCTTGACGGTACCTAACCA
GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGG
AATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAA
CCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTG
TAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTA
ACTGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC
GTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAG
CACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACA
AGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTT
GACCGCTCTAGAGATAGAGTCTTCCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTC
GTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAAGCTTAGTT
GCCATCATTAAGTTGGGGCACTCTAGGTTGACTGGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG

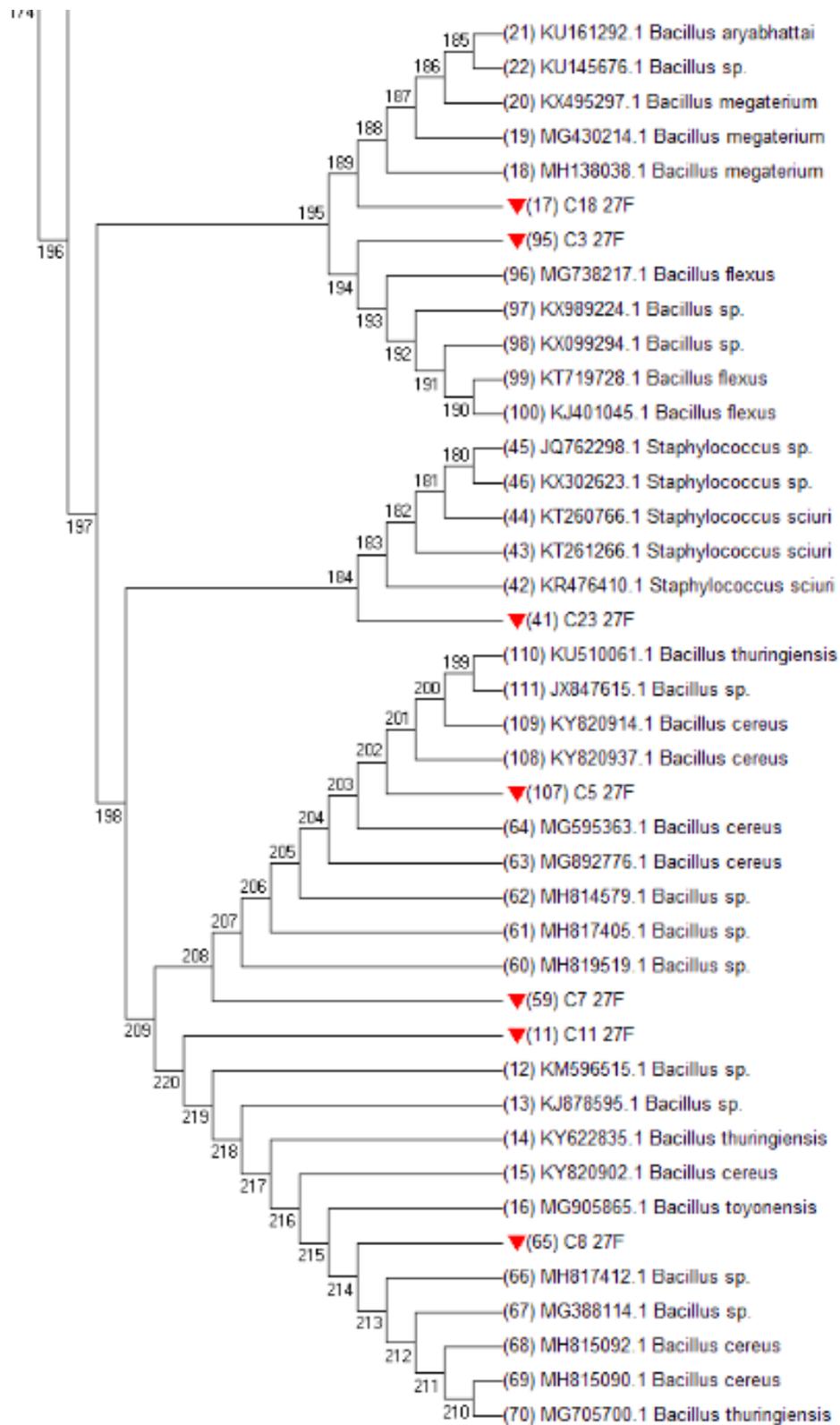
>C24_27F: **Secuencia 19. Cepa RIVB-06 (*Micrococcus* sp)**

GCAGTCGACGATGAAGCCCAGCTTGCTGGGTGGATTAGTGCCGAACGGGTGAGTAACACGTGA
GTAACCTGCCCTTAACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGAGCGCCT
ACCGCATGGTGGGTGTTGGAAAGATTTATCGGTTTTGGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGTT
GGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACA
CTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGG
CGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCA
GTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCG
GTTTGTGCGCTCTGTCGTGAAAGTCCGGGGCTTAACCCCGGATCTGCGGTGGGTACGGGCAGA
CTAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAG
GAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGG
GAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGA
CCATTCCACGGTTTTCCGCGCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGC
AAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTC
GATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTTCTCGATCGCCGTAGAGATACGGTTTC
CCTTTTGGGGGCGGGTTCACAGGTGGTGCATGGTTGTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGG
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCCATGTTGCCAGCACCGTCATGGTGGGGGAC
TCATGGGGAGACTGCCGGG

Anexo 16. Árbol filogenético de bacterias se infirió utilizando el método del vecino más cercano. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de rama = 2.23365539. 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 111 secuencias de nucleótidos. Todas las posiciones que contienen vacíos y datos faltantes fueron eliminadas. Hubo un total de 626 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7. El código de acceso al GenBank se especifica al inicio del nombre del microorganismo y las secuencias en estudios se marcan con una viñeta de color rojo (Fuente: propia).







Anexo 17. Secuencias corregidas y alineadas en formato FASTA de hongos identificadas vía molecular.

>111_ITS1: **Secuencia 1. Cepa CVD-05 (*Aspergillus sp*)**

```
CCCCCGGTGAACTATCGTACCTTGTGCTTCGGCGGGCAAACACTCCCCCTTTAAAAAAGGC
GCAGAATTCCCCTGGAACGGAGGGCCCCCAATAAACAAAGGAAACCCTGTTCTGAAAGCTTGC
AGTCTGAGTGTGATTCTTTGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATC
GATGAACAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAAAATTCAGTGAATCATCGAGTCT
TTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGCGGGGGCATGCCTGTCCGAACGTCATTGCTGCC
CTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGCAAACAATCCCCCTCACACCGGCAAGCTTTCAAACAGGGT
TATTGTTGGGGGTCTCCGGCGGGCAGGGGCCGGGGGCAATCCCCCCTTTTTTTTTTTTTTCG
CCCGGCCGACCCCAAAAGCACAAGGTCCCATGGTGAAGGGTGGGGAGTTC
```

>C12_ITS1: **Secuencia 2. Cepa CVIID-02 (*Humicola sp*)**

```
AAAAAAGAAAGAAAACTCGCTTACCACCTCGTGTACAGACCCCGAAACAGTTGCTTCGGCGG
GAGGCAGTCCCCCCTTACCGGGGGCGGCCGCGACGCCCGCGGAGGTACCCAAACT
CTTTGTTTTATAGGCCTCTCTGAGTCTTTGTAAGTCAAAACTTTCAACAACGGATCTCT
TGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT
GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCGGTATTCCGGCGGGCATGCCTGTTGAG
CGTCAATTTCAACCATCAAGCCCCCGGGCTTGCCTGGGGACCTGCGGCTGCGCGCAGGCCCGG
AAAACCAGTGGCGGGCTCGCCGACACACCGAGCGTAGTAGTTTACACCTCGCTTAGGTGCTCG
CGGCGGGCGCTGGCCGTTAAACCCCCCATCTCACAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAA
TACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGGCGGGAGGAAGAAAACACACGCAAGACATTGGATC
CA
```

>C14_ITS1: **Secuencia 3. Cepa CVD-06 (*Trichoderma harzianum*)**

```
TGTGACGTTACCAAATGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCCGGAC
CAAGGCGCCCGCCGGAGGACCAACCAAACTCTTTTTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTATAAT
CTGAGCCTTCTCGGCGCTCTCGTAGGCGTTTTGAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCT
CTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAG
GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCG
AGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTCCGGCGTTGGGGATCGGCCCTGCCTCTGG
CGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCA
CACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCGTTAAACACCCAATTCTGAAATGTTGACCT
CGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCCGGAGGAATATCTGTTAGC
T
```

>C15_ITS1: **Secuencia 4. Cepa CIXD-11 (*Trichoderma longibrachiatum*)**

```
TGTGAACGTTACCAATCTGTTGCCTCGGCGGGATTCTCTTCCCCGGGCGCGTCCGAGCCCCG
GATCCCATGGCGCCCGCCGGAGGACCAACTCCAACTCTTTTTTCTCTCCGTCGCGGCTCCCCG
TCGCGGCTCTGTTTTATTTTTGCTCTGAGCCTTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTCGAAAAT
GAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG
ATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCA
GTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTCCGG
CGTTGGGGATCGGCCCTCACCGGGCCGCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCT
CTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCACCGGGAGCGCGGCGCGGCCACAGCCGTAACACACC
CCAACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAAA
ACCCGGAAGGAA
```

>C16_ITS1: **Secuencia 5. Cepa CIXD-06 (*Candida orthopsilosis*)**

TGTGTTTTTCTTTTTTTTTGAAAACCTTTGCTTTGGTGGGCCCATGGCCTGCCAGAGATTAACCTCA
ACCAAATTTTATTTAAGTCAACTGATTAATAAGTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTC
TCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATATGAATTGCAAATATTCGTGAATCAT
CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTT
CTCCCTCAAACCTTCGGGTTTGGTGTGAGCGATACGCTGGGTTTGGTTGAAAGAAAGGCGGAG
TATAACTAATGGATAGTTTTTTTCCACTCATTGGTACAACTCCAAAATTTCCAAATTCGAC
CTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCCGGAGGAAAAGATCATT
AAGAAGGAAAGTGCTTAAGTGCATTTTTTTACACGTGTGT

>C25_ITS1: **Secuencia 6. Cepa CIXD-12 (*Lenzites sp*)**

GGCCTTACGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTTACTGTAGGTTT
GGCGTGGGCTTCGGGGGCCCTTCGCGGGCTTTGAGGCATTCTGCCTGCCTATGTACTACTACA
AACACTATAAAGTAACAGAAATGTAATCGCGTCTAACGCATCTTAATACAACCTTCAGCAACGGATC
TCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA
GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGA
GTGTCATGGTATTCTCAACCCACACATCCTTGTGATGTTTCGTAGGGCTTGGACTTGGAGGCTTG
CTGGCCGTCGCGGTGCGCTCCTTGAATGCATTAGCTTGGTTTCTTGCAGGATCGGCTCTCAGT
GTGATAATTGTCTACGCTGTGACCGTGAAGCGTTTGGCGAGCTTCTAACCGTCCGCTAGGGAC
AACTTACTTGCATCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATC

>C26_ITS1: **Secuencia 7. Cepa CIID-07 (*Chaetomium brasiliense*)**

TCCTAACCAATTGTGACCTACCTTCAACCGTTGCTTCGGCGGGTTGGCACCGGGTCTCCCGGCGC
CCCCGGCCCCCTCGCGGGGCGGCCCGCCGGAGGTACCTAACTCTTGAACATTGTATGGCCTCT
CTGAGTCTTCTGACTGAATAAGTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATG
AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGA
ACGCACATTGCGCCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCATCAA
GCCCCGGGCTTGTGTTGGGGACCTGCGGCTGCCGAGGCCCTGAAATGCAGTGGCGGGCTCG
CTGTACACCCGAGCGTAGTAGCATTATCTCGCTCTGGGCGTGTGCTGCTGCCGCGTAAAC
GACCTTACACCCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAGACCCGCTGAACTTAAGCATATC

>C27_ITS1: **Secuencia 8. Cepa CIID-09 (*Penicillium citrinum*)**

CACCTCCCACCCGTGTTGCCGAACCTATGTTGCCTCGGCGGGCCCCGCGCCCCGCGGACGGC
CCCCCTGAACGCTGTCTGAAGTTGCAGTCTGAGACCTATAACGAAATTAGTTAAAACCTTTCAACA
ACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGC
AGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGCATG
CCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCCCCCCGCC
GGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTT
CGTACCCGCTCTAGTAGGCCCGGCCGGCGCCAGCCGACCCCAACCTTTAATTATCTCAGGTT
GACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGACGGAGGAAACCGAG
TGTGGGGCCCTCG

>C28_ITS1: **Secuencia 9. Cepa CIVD-05 (*Chaetomium aureum*)**

GTGGACGCTACCTTTTAAACGTTGCTTCGGCGGGCGGCCCGCTCCCCTGGAAAGCCCCTGTGGC
CGCCCCGGGGCTGCGAGCCCCCGGCCCCCTCGCGGGGGCGCCCCGCGGAGGATACCCAAC
TCTTGATTATTTTAGGCCTCTCTGAGTCTTCTGTACTGAATAAGTCAAACTTTCAACAACGGATC
TCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA
GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCG
AGCGTCATTTCAACCATCAAGCCCCAGGCTTGTGTTGGGGACCTGCGGCTGCCGAGGCCCTG
AAATCCAGTGGCGGGTTTCGCTGTACCCCCGAGCGTAGTAGCAATATCTCGCTCAGGGCGTGCT
GCGGGCGCCGGCCGTTAAAAGCTGCCTTCTGGCAACACCCAAGGTTGACCTCGGATCAAGTAG
GAAGACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCCGGAGGAAAA

>C29_LR0R: **Secuencia 10. Cepa RVID-07 (*Pichia kudriavzevii*)**

GCCTCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTTGAAATCGTGCTTTGCGGCACGAG
TTGTAGATTGCAGGTTGGAGTCTGTGTGGAAGGCGGTGTCCAAGTCCCTTGGAACAGGGCGCC
CAGGAGGGTGAGAGCCCCGTGGGATGCCGGCGGAAGCAGTGAGGCCCTTCTGACGAGTCGAG
TTGTTTGGGAATGCAGCTCCAAGCGGGTGGTAAATTCCATCTAAGGCTAAATACTGGCGAGAGA
CCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCA
CGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTGCGCCCCGACATGGGGATTGCGCACCGCTGCCTCTC
GTGGGCGGCGCTCTGGGCTTTCCCTGGGCCAGCATCGGTTCTTGCTGCAGGAGAAGGGGTTCT
GGAACGTGGCTCTTCGGAGTGTTATAGCCAGGGCCAGATGCTGCGTGCGGGGACCGAGGACT
GCGGCCGTGTAGGTCACGGATGCTGGCAGAACGGCGCAACACCGCCCGTCTTGAAACATGGAC
CAAGGAGTCTAACGTCTATGCGAGTGTGGGTG

Anexo 18. Árbol filogenético de hongos se infirió utilizando el método del vecino más cercano. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de rama = 2.59454765. 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 60 secuencias de nucleótidos. Todas las posiciones que contienen vacíos y datos faltantes fueron eliminadas. Hubo un total de 307 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7. El código de acceso al GenBank se especifica al inicio del nombre del microorganismo y las secuencias en estudios se marcan con una viñeta de color rojo (Fuente: propia).

