

Métodos de identificación polifásica aplicados a la búsqueda de microorganismos con potencial industrial

Carmen Salvador Pinos¹, Nicolás Herrera Naranjo¹, Stephanie Michelena Tupiza¹, Humberto González Gavilanez², Miguel Gualoto Oñate³, Erenio González Suárez⁴, Leyanis Mesa Garriga⁵, Maira Rojas Carrillo³

¹ Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Central del Ecuador.

² Facultad de Ingeniería Química, Universidad Central del Ecuador

³ Universidad de las Américas, Quito, Ecuador.

⁴ Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Química y Farmacia, Universidad Central "Marta Abreu" Cuba.

⁵ Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia), Centro de Investigación Tibaitatá Bogotá, Cundinamarca, Colombia.

Correspondencia: Carmen Salvador Pinos; casalvador@uce.edu.ec

Recibido: 01 octubre 2019; **Aceptado:** 06 noviembre 2019

Resumen

Introducción: La bioprospección de metabolitos de interés antropogénico emplea métodos de recolección de microorganismos en ecosistemas extremófilos o endémicos. La microbiota aislada en estos lugares puede o no incluir microorganismos patógenos. Es imprescindible un enfoque interdisciplinario que permita abordar la búsqueda de las especies de interés mientras se preserva la buena salud de los investigadores.

Objetivo: Identificar molecular, bioquímica y morfológicamente microorganismos patógenos humanos en cepas celulolíticas de importancia industrial almacenadas en el banco de cepas del Laboratorio de Investigación de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Central del Ecuador, procedentes del Yasuní, la Antártida y Balzapamba.

Métodos: Se realizó un estudio de bioprospección de bacterias celulolíticas empleando técnicas de microbiología ambiental. Se evaluaron las características morfológicas mediante tinciones, como por ejemplo Gram. Además, se realizaron pruebas bioquímicas y antibiogramas para bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Las pruebas moleculares utilizaron extracción de ADN bacteriano para la secuenciación Sanger del gen 16S.

Resultados: Se encontraron las especies *Klebsiella pneumoniae* (Y2 y Y3r) y *Nocardia asteroides* (Y1 y Y3p) en las muestras de material lignocelulósico recolectadas en Yasuní, mientras que las especies aisladas en la Antártida y en Balzapamba corresponden a *Bacillus subtilis*.

Conclusiones: Se identificaron cepas pertenecientes a diferentes géneros bacterianos. Las bacterias del género *Klebsiella*, en las muestras colectadas en Yasuní, podrían tener un potencial patógeno. Eso se puede corroborar con técnicas de genotipificación. Por lo tanto, puede existir riesgo para los seres humanos que realizan bioprospección en ese ecosistema y se deben tomar medidas de bioseguridad.

Palabras clave: Microorganismos patógenos, microorganismos Antártida, identificación molecular, 16S, bioprospección.

Polyphasic identification methods applied in searching for microorganisms with industrial potential

Abstract

Background: The bioprospection of metabolites of anthropogenic interests employs methods of collecting microorganisms in extremophile or endemic ecosystems. The microbiota isolated in these places may or may not include pathogenic microorganisms. Therefore, an interdisciplinary approach is essential to address the search of the species of interest while the good health of the researchers is preserved.

Objective: To identify in molecular, biochemical and morphologically ways some human pathogenic microorganisms in cellulolytic strains of industrial importance stored in the strain bank of the Research Laboratory of the Faculty of Chemical Engineering at the Central University of Ecuador, from Yasuní, Antarctic and Balzapamba.

Methods: IA bioprospecting study of cellulolytic bacteria was performed using environmental microbiology techniques. Morphological characteristics were assessed by Gram staining. In addition, biochemical tests and antibiograms were performed for Gram-negative and Gram-positive bacteria. The molecular tests used extraction of bacterial ADN for 16S gene Sanger sequencing.

Results: The species *Klebsiella pneumoniae* (Y2 and Y3r) and *Nocardia asteroides* (Y1 and Y3p) were found in samples of lignocellulosic material collected in Yasuni, while the isolated species in Antarctica and Balzapamba correspond to *Bacillus subtilis*.

Conclusions: Strains belonging to different bacterial genera were identified. The bacteria of the genus *Klebsiella* from the samples collected in Yasuní could have a potential pathogen. This can be corroborated with genotyping techniques. Therefore, there could be a risk to humans who perform bioprospecting in that ecosystem and biosecurity measures should be taken.

Keywords: Pathogenic microorganisms, Antarctic microorganisms, molecular identification, 16S, bioprospecting.

Citación: Salvador Pinos C, Herrera Naranjo N, Michelena Tupiza S, González Gavilanez H, Gualoto Oñate M, González Suárez E, Mesa Garriga L, Rojas Carrillo M. Métodos de identificación polifásica aplicados a bacterias celulolíticas provenientes de la Antártida, Yasuní y Balzapamba, para la búsqueda de microorganismos inocuos. Rev Fac Cien Med (Quito) 2019; 44 (2): 10-23.



Introducción

Los estudios de bioprospección en áreas megadiversas o con especies extremófilas aíslan microorganismos inocuos y patógenos, los mismos que son empleados en diferentes proyectos en las ciencias puras y aplicadas. Estos microorganismos no son identificados a priori y podrían ser potenciales agentes infecciosos [1].

La búsqueda de microorganismos con potencialidad en la expresión de enzimas celulolíticas lleva a los investigadores a sitios con alta diversidad o con condiciones ambientales extremas, factores que favorecen la constitución de un genotipo microbiano que permite la expresión del fenotipo buscado para la adaptación [2]. El presente estudio se interesa en el aspecto de la salud humana de la recolección de muestras biológicas, considerando el riesgo para los investigadores de encontrarse con cepas patógenas.

Las muestras almacenadas en el banco de cepas proceden de tres lugares: Parque Nacional Yasuní, Balzapamba, y una playa de la Antártida. El Parque Nacional Yasuní está calificado científicamente como Refugio del Pleistoceno (Napo-Ucayali), debido a su gran tamaño y abundante biodiversidad, dispersión de seres vivos y altísimo endemismo. Está ubicado en la Amazonía baja (300-100 msnm), con abundancia de zonas de sistemas fluviales y lacustres permanentes y estacionales, en el área oriental de la provincia de Orellana, llegando a la frontera con Perú [3].

Balzapamba está ubicada entre las provincias de Los Ríos y Bolívar a 32 km de Babahoyo y 68 km de la ciudad de Guaranda. Es punto de confluencia climática y corredor biológico entre la Sierra y la Costa. Cuenta con diversidad de flora y fauna y una exuberante producción agrícola [4].

La Antártida es uno de los lugares más extremos del planeta por el intenso frío que sufre durante la mayor parte del año y por las escasas precipitaciones, por lo que es escenario

de intensas investigaciones por parte de muchos países. Muchas de ellas intentan hacer viables asentamientos permanentes con fines de explotación minera. El Ecuador considera de importancia estratégica futura mantener una presencia activa en el continente blanco, mediante la investigación científica [5].

El interés bioprospectivo en los lugares mencionados viene del hecho de que los lugares con alta diversidad (Balzapamba, Yasuní) y endemismo (Yasuní) representan un reto para la evolución de los organismos que viven en ellos, así como para los que viven en climas extremos (Antártida). Presentan estrategias evolutivas adaptadas al medio como la síntesis de enzimas con mayor actividad específica que las de microorganismos de zonas templadas o con menos presión o competencia evolutiva, siendo así interesantes por su potencial aplicación en la industria biotecnológica [6].

La identificación de la microbiota en el estudio fue realizada mediante estudios microbiológicos, bioquímicos y moleculares. Aunque en los últimos años existe un crecimiento importante en la oferta de métodos genotípicos aplicados al diagnóstico microbiológico, la mayor parte de los procesos de identificación siguen utilizando métodos fenotípicos, puesto que su realización, lectura y costo los hacen más asequibles [7]. Además, uno de los factores clave para identificar a las bacterias como agentes patógenos depende de su aislamiento en cultivo puro. Una colonia en cultivo puro está compuesta por un solo tipo de microorganismo y procede de una sola célula original. Incluso, en genética molecular clásica bacteriana, las pruebas de identificación se deben realizar a partir de cultivos puros [7]. Sin embargo, se calcula que en la actualidad se identifica menos del 10% de los microorganismos patógenos que provocan enfermedades por la imposibilidad de cultivar o analizar estos organismos con sondas moleculares [8]. Cada microorganismo tiene su propia habilidad para mutar y crear un modo efectivo de infección para su “bienestar”. Muchos organismos son difíciles de cultivar y en estos casos son útiles

las técnicas que revelan su afinidad midiendo la hibridación entre ácidos nucleicos o analizando la secuencia del ADN [8].

Por todo lo anterior, el objetivo principal de la investigación fue identificar molecular, bioquímica y morfológicamente microorganismos patógenos humanos en cepas celulolíticas de importancia industrial recolectadas en puntos específicos de la Antártida, Yasuní y Balzapamba, las mismas que se encuentran depositadas en el banco de cepas celulolíticas en el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Central del Ecuador.

Métodos

Diseño del estudio

Se empleó un estudio observacional, en el que se aplicó un diseño descriptivo. El universo correspondió al banco de cepas celulolíticas de los tres lugares mencionados (Yasuní, Balzapamba y Antártida), de los que se desconoce sus características bioquímicas y moleculares. Se desea identificar la especie a la que pertenecen para que, en caso de existir cepas patógenas, éstas sean descartadas, y se considere la elaboración de protocolos de bioseguridad para futuras bioprospecciones.

Población microbiana en estudio

El banco de cepas está compuesto por 15 individuos bacterianos de los que se desconocían sus características bioquímicas y moleculares. Éstas fueron purificadas y almacenadas en el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Central del Ecuador. A partir de éstas se han realizado algunos estudios enzimáticos para establecer un banco de cepas celulolíticas y obtener de glucosa y etanol, que son productos de importancia industrial [1,6].

Recolección de las muestras

En Yasuní (en las coordenadas 0°43'37.3"S 75°32'56.0"O), el personal del "Programa de

Viveros y Reforestación" de producción, en coordinación con Petroamazonas, recolectó dos libras de hojarasca en descomposición que estaban en el suelo de un bosque primario cercano al área de explotación del pozo petrolero. Para la estimación de que el punto de colección era "bosque primario" (es decir, no afectado por explotación maderera, agrícola o minera, resultado final de etapas ecológicas sucesivas, poseedor de su biodiversidad original completa con poca o ninguna foránea, dominado por una cubierta continua de árboles de dosel, y agua y suelo no contaminados) [9], se confía en el conocimiento del lugar de los técnicos del vivero, que manejan a diario los indicadores para los diferentes estados de alteración de la selva local. Ambas entidades autorizaron el permiso para la recolección de semillas y material lignocelulósico nativo en el Bloque 43, dentro del marco del proyecto "Desarrollo Responsable del Bloque" [10].

En Balzapamba (coordenadas 1°45'47.8"S 79°10'56.8"O), el personal que laboraba en la molienda de caña en la hacienda "La Industria" realizó la recolección de bagazo de caña de azúcar (proveniente de la variedad de caña piojota negra) guardado apilado, para la generación de calor. Se recolectaron dos libras de bagazo de caña de azúcar. Las muestras fueron lavadas con agua peptonada estéril.

En la Antártida, en la Estación Pedro Vicente Maldonado (coordenadas 62°26'56.2"S 59°44'28.0"O; altitud cinco msnm), investigadores del Comité Asesor científico DIGEIM-FUNDEMAR eligieron un transecto de 200 m de la zona de playa de la Ensenada Guayaquil, frente a la Estación Maldonado, y recolectaron 120 g de algas en descomposición de la especie *Callophyllis atosanguinea*, arrastrada por el oleaje y mareas a la playa, separándola de los residuos de otras algas abundantes en la zona costera. El material colectado se lavó con suero salino [6, 11].

La metodología de lavado empleada consistió en seleccionar 60 g de la muestra, tomados al azar de diferentes puntos del sustrato,

los que fueron colocados en las soluciones de agua peptonada y salina respectivamente. Las mezclas fueron agitadas, por separado, a 450 rpm en una plancha de agitación, durante 10 h, hasta que el material se disgregó, considerándose una solución madre. un ml de la solución madre fue llevada a nueve ml de agua peptonada. Se sembraron las tres últimas diluciones en medio PCA (Plate Count Agar) y PDA (Potato Dextrose Agar) a $\pm 37^{\circ}\text{C}$ para bacterias y a $\pm 25^{\circ}\text{C}$ para hongos.

Purificación de los microorganismos

La purificación de los microorganismos se llevó a cabo resemebrando las muestras aisladas en agar nutritivo PCA varias veces mediante la técnica de agotamiento de estría hasta obtener colonias de un solo tipo morfológico. Adicionalmente, se sembró cada cepa pura en caldo nutritivo para estudios posteriores [6].

Pruebas de esporulación

Se aislaron 108 colonias de bacterias, 60 de levaduras y 70 hongos, que mostraron diferencias morfológicas macroscópicas y fueron sometidas a una prueba de esporulación, que consistió en someter al microorganismo en cinco ml de agua peptonada, durante 10 min a 80°C , para después sembrarlo nuevamente y observar las que sobrevivieron.

Identificación fenotípica

La identificación de las cepas almacenadas en criotubos, y recuperadas en caldo tioglucolato se realizó por métodos convencionales

basados en las características fenotípicas. El esquema tradicional permitió observar tanto la morfología como el desarrollo y propiedades bioquímicas y metabólicas. El cultivo en agar sangre diferenció el tipo de hemólisis que producían las cepas en estudio; el cultivo en agar MacConkey diferenció a los Gram-negativos, en aquellos que utilizan la lactosa (lac+) de los que no la utilizan (lac-).

La metodología de siembra en agar sangre fue realizada por la técnica de estricación por agotamiento, este proceso es similar al seguido en aislamiento y purificación [12], utilizando una temperatura de incubación de 37°C por 24 horas.

En el proceso de identificación bacteriana tradicional, para la identificación de género y especie se utilizó una batería de pruebas tradicionales y comerciales (API Biomeriux) de manera secuencial y simultánea, en función de la observación realizada en agar sangre y MacConkey. Finalmente se identificó el microorganismo a nivel de género y especie.

Cepas Seleccionadas

De las 15 cepas en estudio, se seleccionaron las de alto interés industrial, por presentar una alta producción de glucosa, de acuerdo a estudios enzimáticos realizados [1]. Éstas corresponden a las accesiones Bal3, Y1, Y3r, Ant12N5, Y2 y Y3p (**Tabla 1**).

El posible género de las cepas a identificar, de acuerdo a un estudio exploratorio realizado al inicio de este trabajo en la Facultad de Ingeniería Química, arrojó el dato de que las cepas de in-

Tabla 1. Posibles géneros de las cepas de acuerdo a las características morfológicas en agar Maconkey

Código	Género y especie
Y1	<i>Nocardia</i>
Y2	<i>Klebsiella</i>
Y3r	<i>Klebsiella</i>
Y3p	<i>Nocardia</i>
Ant12N5	<i>Bacillus</i>
Bal3	<i>Bacillus</i>

terés industrial podían corresponder a los géneros *Nocardia* sp., *Klebsiella* sp. y *Bacillus* sp. Se emplearon medios de cultivo McConkey y Lac-trimel, para determinar el género y determinar las técnicas a emplear y el manejo de bioseguridad.

Identificación polifásica (análisis morfológicos, bioquímicos y moleculares)

Para realizar los análisis que permitan identificar los organismos patógenos se propuso el empleo de los métodos fenotípicos (morfológico y bioquímico) y moleculares.

En los métodos fenotípicos se evaluaron las características de tinción de la membrana celular y el crecimiento en sustratos específicos para determinar clases de microorganismos de acuerdo a Bergey, tomo dos. En los métodos moleculares se estudiaron secuencias genéticas bacterianas amplificadas de la región V3 y V4 del gen 16S del ARNr y se las comparó con la base de datos NCBI, para llegar a la identificación final del microorganismo [13].

Métodos fenotípicos

Se partió de la observación morfológica de una muestra previamente fijada al calor y sometida a la tinción Gram [14]. También se preparó una placa para realizar la tinción de Ziehl-Neelsen [8] en búsqueda de bacterias ácido-alcohol resistentes (BAAR).

Las características macroscópicas: morfología y hemólisis, se definieron mediante cultivo en agar sangre y MacConkey. La diferenciación bacteriana se realizó mediante pruebas preliminares convencionales rápidas (catalasa y oxidasa), pruebas con lectura de 18-48h (OF, rojo de metilo, TSI, citrato, urea, Voges-Proskauer, sim), y sistemas comerciales multipuebas (API 20E y 20NE).

Estudios para cepas Gram-negativas

Se aplicaron pruebas API 20E y API 20NE para bacterias Gram-negativas (oxidasa- y oxidasa+) [15].

Prueba de susceptibilidad de cepas Gram-negativas

A cada cepa Gram-negativa se le realizó una prueba de susceptibilidad antimicrobiana, para observar su comportamiento contra varios antibióticos y conocer si existe resistencia o sensibilidad a ellos [12].

Los discos utilizados para enterobacterias fueron:

Ampicilina sulbactam (AMP), Amikacina (AK), Ciprofloxacina (CIP), Gentamicina (CN), Trimetoprim sulfametoxazol (SXT), Cefalotin (KF), Meropenem (MEM), Ampicilina (AMP), Ceftriaxona (CRO). Según el M100-S25 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement se obtuvieron los valores de referencia para en antibiograma mediante la técnica de difusión de disco.

Estudios para cepas Gram-positivas

A cada cepa Gram-positiva se le realizó la prueba de catalasa. Dependiendo del resultado, se eligió la prueba con la que se continuaría el estudio, de acuerdo a los métodos encontrados en el Manual de Técnicas en Microbiología Clínica de la Asociación Española de Farmacéuticos Analistas [16].

Además, se realizaron pruebas de movilidad, hidrólisis de gelatina, sensibilidad a penicilina recomendadas por el mismo autor para confirmar o descartar el género *Bacillus*.

Las pruebas de Voges-Proskauer y movilidad a 15-20°C también se realizaron para confirmar o descartar los géneros *Listeria* y *Corynebacterium* ya que resultados positivos en ambas pruebas corresponden a *Listeria* sp. y ambas pruebas negativas a *Corynebacterium* sp.

Extracción de ADN bacteriano

Una vez obtenidas las colonias puras de las muestras estudiadas se sembraron cada una

de las cepas en caldo nutritivo Difco para posteriormente extraer el ADN.

Se colocaron tubos con 10 mL de caldo nutritivo y en cada tubo se inoculó la cepa pura a identificar.

El ADN fue extraído aproximadamente de 2E9 UFC. En el caso de las bacterias Gram-positivas se modificó ligeramente el protocolo aumentando la cantidad de Proteinasa K y el tiempo y la temperatura de incubación para obtener buenos resultados de extracción. Se empleó un kit de purificación Pure Link Genomic ADN (Invitrogen) para todos los productos de extracción de ADN.

PCR

El volumen final de 50 μ L por reacción fue amplificado en un termociclador Thermal cycler Multigene Gradient (Labnet International, Inc.). Por reacción se tuvo 10 μ L de ADN a una concentración de cinco ng/ μ L, 100 μ M de cada cebador, 2.5 nM de dNTPs, de 50 nM de MgCl₂ y cinco U Taq Polimerasa (Invitrogen). Los cebadores empleados para la secuenciación de la región 16S RNAr fueron el 8 Forward AGA-GTTTGATCCTGGCTCAG y el 1492 Reverse (s) GGTTACCTTGTTACGACT. Se purificó la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) con el Pure Link PCR Purification Kit (Invitrogen).

Amplificación del gen 16S

Se variaron las condiciones de temperatura y duración de los ciclos [6] hasta obtener el siguiente ciclo de amplificación: La desnaturalización fue llevada a cabo en un ciclo de 45 segundos a 95°C seguido de 25 ciclos de 94°C por 15 segundos (continuación de la desnaturalización). Luego otro ciclo de 56°C por 30 segundos (annealing) y la etapa final de 72°C para la fase de extensión.

Cuantificación de ADN

Los fragmentos de amplificación fueron verificados por electroforesis en geles de agarosa

al uno por ciento. Se empleó un marcador de peso molecular de un Kb para determinar el tamaño de los amplicones obtenidos en la PCR. Se corrió el gel a 100 V, 500 mA y 45 min. Se verificó la concentración por fluorimetría empleando el Qubit® 3.0 Fluorometer y el NanoDrop de Thermo Fisher Scientific (Thermo Scientific™ NanoDrop 2000), debido a que algunas muestras sobrepasaron la linealidad del fluorómetro.

Purificación PCR

El producto de la PCR se purificó mediante un kit comercial de Invitrogen con el objeto de eliminar subproductos, cebadores y dNTPs contaminantes que impidan la secuenciación [17]. Secuenciación Sanger del gen 16 S ARNr.

Para realizar la amplificación Sanger los primers se diluyeron a una concentración de 15 pmol/ μ L. Se limpiaron y ensamblaron las secuencias obtenidas con un programa bioinformático y se compararon las secuencias ensambladas con la base de datos GenBank [17]. Las secuencias en pares de bases (bp) Forward y Reverse fueron alineadas empleando el Database GenBank usando el Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del National Center for Biotechnology Information [18].

Bioseguridad para el manejo de las cepas

El manejo para las cepas identificadas se lo realizó de acuerdo al Manual de Bioseguridad en Laboratorios de la OMS, por lo tanto, las cepas inocuas estaban dentro del grupo de riesgo I, mientras que las patógenas están dentro del grupo de riesgo II [19].

Estandarización de los datos

Los datos fenotípicos (morfológicos y bioquímicos) fueron recolectados realizando cuatro veces la medición u observación.

Para el análisis molecular específicamente para la secuenciación del gen 16S, se empleó un control positivo, el cual correspondió a la bacteria *Bacillus subtilis*. Esto ayudó a

mejorar la exactitud y precisión de los datos que se obtuvieron.

Análisis estadístico

Análisis molecular

El estudio molecular fue realizado únicamente para la cepa inocua, en vista de que ésta sería la recomendada para la manipulación en una industria que produciría 500 HL de etanol [20]. Se realizó un análisis de identidad o similitud al 99%, fue empleada la plataforma BLAST del NCBI. Se calcularon los coeficientes de distancia, correlación y asociación. Estos coeficientes nos permiten medir las diferencias y coincidencias entre los sujetos estudiados y encontrar su identidad al compararla con una base de datos mundial.

Análisis de datos morfológicos y bioquímicos

Se calculó la moda (frecuencia), para encontrar el dato (cepa patógena) que tiene mayor frecuencia dentro de la distribución de la población del banco de cepas. Una vez recogida la información, fue ingresada en una hoja de cálculo de la aplicación Excel 2017.

Consideraciones éticas

Esta investigación fundamenta su ámbito bioético en los principios de beneficencia y no maleficencia promovidos por organismos internacionales como la UNESCO, en vista de que se busca descartar cepas patógenas que puedan generar problemas de salud a los investigadores que las manipulan con intereses biotecnológicos.

En relación a la recolección de las muestras biológicas en Balzapamba y Antártida, la actividad ha sido realizada a través del permiso de acceso a los Recursos Genéticos con fines de Investigación Científica, emitido por el Ministerio del Ambiente de Ecuador. En el caso de las muestras colectadas en las áreas de intervención de Petroproducción en la Amazonía, la entidad posee sistemas de gestión ambien-

tal que cumplen con el Reglamento Ambiental de Operaciones Hidrocarburíferas. En este caso se aplicaron los Artículos. 13 y 14.

Además, el desarrollo de este trabajo se sustentó sobre la base de las leyes establecidas en la Constitución de la República del Ecuador, en los artículos 350, 357, 358 y 385, que impulsan y aseguran la adquisición de conocimientos nuevos, así como el desarrollo y difusión de éstos.

Resultados

Purificación y crecimiento de los microorganismos

Las cepas provenientes de Yasuní y Balzapamba, tras la primera purificación, mostraron la aparición de UFC entre las 24 y 48 horas posteriores a su siembra, mientras que las bacterias provenientes de la Antártida, a excepción de Ant12N5, crecieron entre los 15 a 19 días de incubación. En la **Tabla 2** se observan las cepas purificadas por primera vez, segunda vez, las veces que se repitió su siembra y el tiempo de generación del microorganismo en días.

Estudio morfológico de las cepas esporulantes de importancia antropogénica

Se encontró que nueve muestras corresponden a bacilos Gram-positivos. También se encontraron tres muestras correspondientes a cocos Gram-positivos y dos muestras son bacilos Gram-negativos de tipo enterobacterias.

Pruebas bioquímicas e identificación preliminar de las cepas

Se observaron patrones de crecimiento de microorganismos aerobios y anaerobios facultativos en el caldo tioglicolato. Las muestras Bal3, Y1, Y3p y Ant12N5 fueron compatibles con aerobios estrictos y las cepas Y2 y Y3r tuvieron características para ser consideradas anaerobios facultativos.

Tabla 2. Crecimiento de las cepas purificadas

Cepa	Primer tiempo de generación (días)	Segundo tiempo de generación (días)	Nº de repeticiones
Ant12N1	15	2	3
Ant12N3	15	2	3
Ant12N5	16	2	3
Ant5N1	17	2	3
Ant5N2	15	2	3
Ant5N4	19	7-15	2
Ant5N5	15	2	3
Ant5N6	15	2	3
Ant5N7	18	2	3
Ant5N8	17	2	3
Bal3	1	1	4
Y1	1	1	4
Y2	1	1	4
Y3r	2	2	5
Y3p	2	2	5

Las muestras Y3p, Bal3 y Ant12N5, fueron resembradas a partir del caldo tioglicolato, crecieron en agar sangre mostrando beta hemólisis muy marcada, las muestras Y2 y Y3r crecieron en agar sangre y también en agar McConkey, ya que éstas eran Gram-negativas. Las cepas Y1 y Bal3 tuvieron un crecimiento en superficie, lo que sugiere un microorganismo aerobio. Las cepas Y2 y Y3p tuvieron crecimiento denso en el caldo, por lo que se sospecha de un microorganismo anaerobio facultativo. Finalmente, la cepa Ant12N5 tuvo formación de película en la superficie, lo cual también sugiere un microorganismo aerobio.

Pruebas bioquímicas para Gram-negativas

Al realizar las pruebas en agar Kligler, citrato de Simmons, RMVP, lisina, SIM y malonato se obtuvo el perfil bioquímico de cada cepa Gram-negativa en el que se encontró que ambas cepas eran *Klebsiella pneumoniae*.

Al comparar los resultados de las baterías bioquímicas aplicadas a Y2 y Y3r con los resultados de las pruebas API 20e aplicadas a las

mismas, se encontró que las pruebas bioquímicas API 20e para enterobacterias muestran un perfil bioquímico que confirma el resultado de *Klebsiella pneumoniae* en un 97.7%.

Se valoraron los resultados de cada prueba Api 20e y se obtuvo la clave 5215773 en cada cepa, esta clave fue comparada con la base de datos Api Biomeriux, confirmando así que cada cepa corresponde a una *Klebsiella pneumoniae* en un 97.7%

Antibiogramas de cepas Gram-negativas

Se realizaron antibiogramas a todas las Gram-negativas para conocer el comportamiento de las cepas frente a los antibióticos. La cepa Y2 fue sensible a todos los discos; en cambio, la cepa Y3r fue resistente a la ampicilina sulbactam (SAM) y a la cefalotina (KF), lo que indica que son dos cepas diferentes de *Klebsiella pneumoniae*.

Pruebas bioquímicas para Gram-positivos

En la prueba de catalasa se observó que la reacción fue positiva en todas las cepas.

Al ser todos catalasa positivos, podrían tratarse de los géneros: *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp., *Listeria* sp., *Nocardia* sp. o *Streptomyces* sp., para lo cual se procedió con más pruebas bioquímicas.

En resumen, el 13% correspondió a cepas Gram-negativas y 87% a Gram-positivas.

Resultados de los ensayos para la determinación del género *Bacillus*

Las muestras Bal3 y Ant12N5 fueron positivas para la prueba de hidrólisis de gelatina. También tuvieron movilidad positiva, algo común en la mayoría de especies del género *Bacillus* sp. Además, fueron sensible a la penicilina. Este resultado se relaciona con la forma de la colonia, que era propia del género *Bacillus* sp., y el resultado de la tinción Gram.

En el metabolismo de azúcares se observa que degradan fácilmente el sorbitol y la arabinosa y en menor proporción la sacarosa y la amigdalina, características metabólicas propias del género *Bacillus* sp.

Resultados de los ensayos para la determinación del género *Corynebacterium* y *Listeria*.

Al realizar las pruebas del metabolismo de glucosa, Voges Proskauer y movilidad a 25°C, se encontró que ninguna cepa poseía el perfil bioquímico de los géneros *Corynebacterium* y *Listeria*.

Resultados de los ensayos para la determinación del género *Nocardia* y *Streptomyces*

A las cepas se les realizó una tinción de Ziehl-Neelsen para detectar bacilos ácido-alcohol resistentes, compatibles con el género *Nocardia*.

Las cepas Y1 y Y3p fueron positivas para la tinción. Además, la forma característica de su colonia confirmó que era una cepa de *Nocardia* asteroides.

Identificación molecular de las cepas de interés

Se obtuvo una cantidad de ADN mayor a 5 ng/dL (**Figura 1**). Inicialmente, no se amplificó el gen 16S. Sin embargo, después de aplicar la purificación del producto PCR, se obtuvo un fragmento de 1200 pb, que era el esperado para la secuenciación.

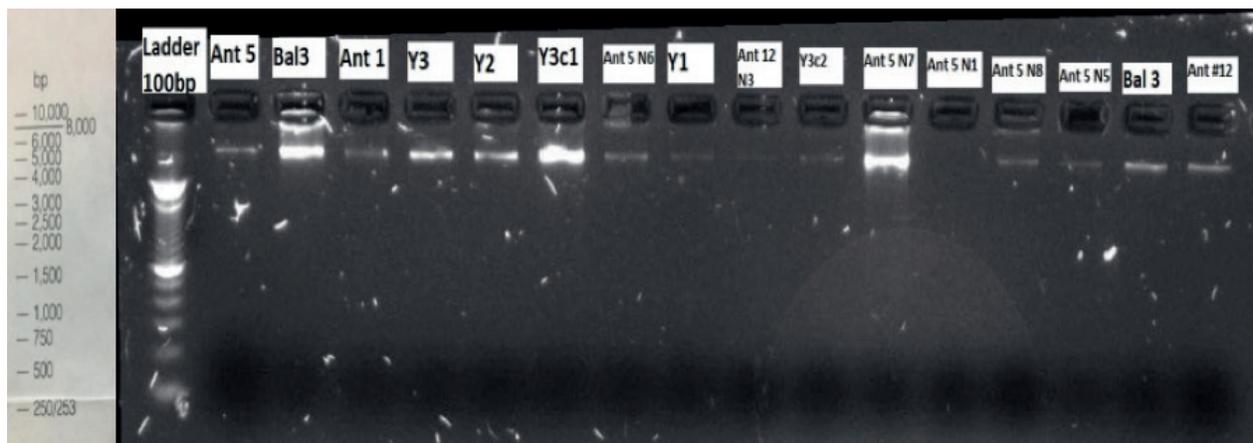


Figura 1. Evaluación de la calidad del ADN extraído de cada cepa.

La secuenciación Sanger permitió obtener secuencias de calidad superiores a 90% (**Figura 2**). Se realizó el análisis mediante BLAST de las muestras Ant12N5 y Bal3. Las dos muestras, correspondientes a Ant12N5 y Bal3, presentaron un porcentaje de identidad del 99% y 100% respectivamente con la especie *Bacillus subtilis* (**Tabla 3**).

De las seis cepas identificadas, el 67% tiene un potencial patógeno, que se puede confirmar aplicando técnicas de genotipificación. Solo dos cepas que representan el 33% fueron inocuas (**Tabla 4**).

Empleando técnicas moleculares como el Multilocus Sequence Typing (MLST) o a mayor pro-

fundidad el Whole Genome Sequencing (WGS), estas bacterias y establecer su valor en proyectos biotecnológicos.

Tabla 3. Resultados de secuenciación Sanger para Bal3 y Ant12N5

Muestra	Longitud Secuencia	Calidad Secuencia	Organismo	Fragmento	% Identidad
Ant12N5	1435	95.4	Bacillus subtilis	16S	99
Bal3	1415	96.3	Bacillus subtilis	16S	100

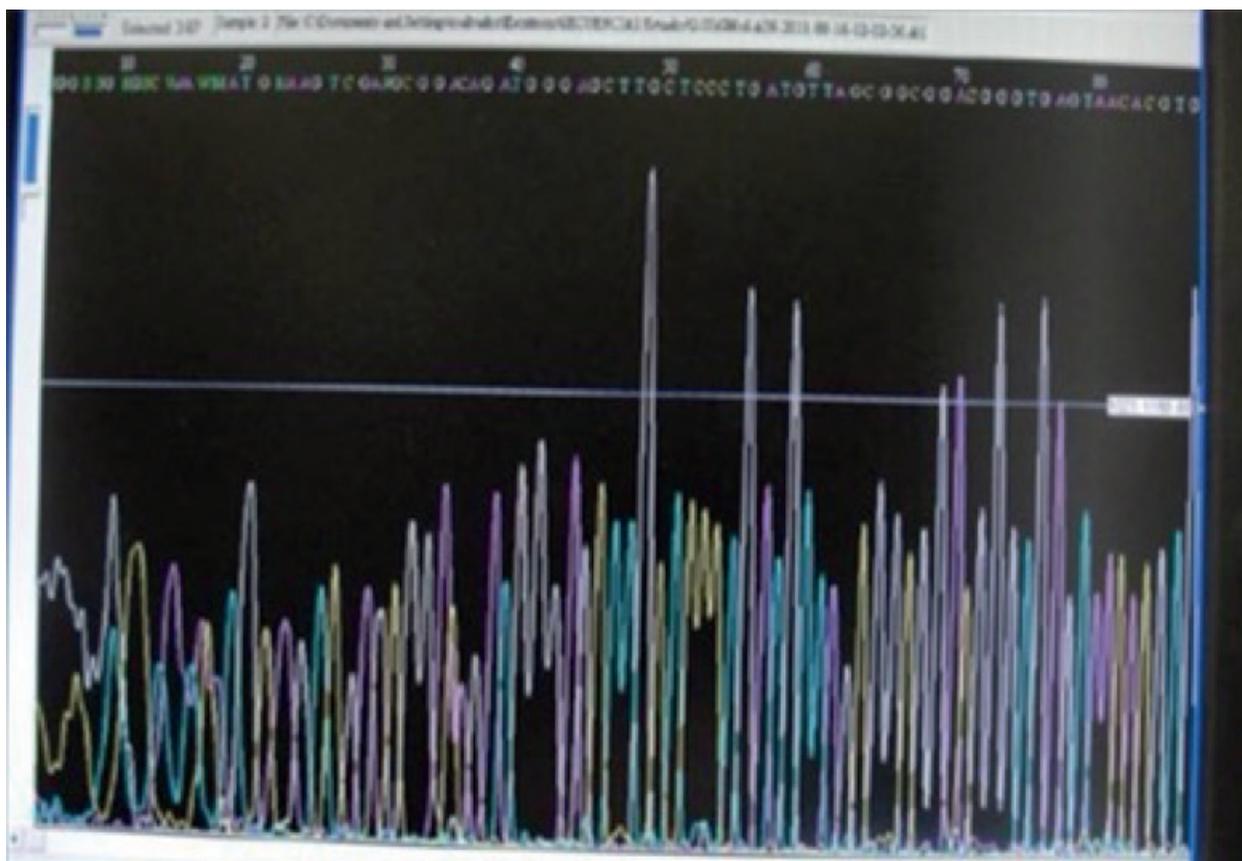


Figura 2. Secuencias de nucleótidos alineadas en el en el BLAST Bal3

Tabla 4. Cepas identificadas

Código	Género y especie	Patogenicidad
Y1	<i>Nocardia asteroides</i>	Patógena
Y2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Patógena
Y3r	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Patógena
Y3p	<i>Nocardia asteroides</i>	Patógena
Ant12N5	<i>Bacillus subtilis</i>	Inocua
Bal3	<i>Bacillus subtilis</i>	Inocua

Discusión

Los análisis morfológico, molecular y bioquímico mostraron que las bacterias inocuas pertenecen a la especie *Bacillus subtilis*. Estos bacilos son universales debido a su capacidad de formar esporas, pueden vivir en el ambiente durante varios años y son ampliamente empleados en la industria [1,7]. La mayoría de *Bacillus* no provocan enfermedades en el ser humano. Sin embargo, existen algunas especies que generan enfermedades importantes, como el carbunco causado por el *Bacillus anthracis*, que constituye un arma biológica importante [21]. En resumen, el 13% de las cepas estudiadas correspondió a cepas Gram-negativas y 87% a Gram-positivas.

Las muestras Bal3, Y1, Y3p y Ant12N5 fueron compatibles con aerobios estrictos y las cepas Y2 y Y3r tuvieron características para ser consideradas anaerobios facultativos. Muchos microorganismos son aerobios estrictos, es decir, necesitan del oxígeno como aceptor de hidrógeno. Algunos anaerobios son facultativos, por lo tanto, tienen la capacidad de vivir de forma aerobia y anaerobia. Finalmente, otros microorganismos son anaerobios obligados pues requieren de una sustancia diferente como aceptor de hidrógeno [11]. Al respecto, este dato es importante en relación al estudio del balance de masas y de energía de la cantidad de gas O₂ que debe ser inyectado en el biorreactor [22]. Los productos secundarios naturales del metabolismo aerobio son compuestos reactivos de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y superóxido. Muchos microorganismos anaerobios y anaerobios tolerantes al aire se protegen de estos productos por la presencia de superóxido dismutasa y por la presencia de una catalasa, lo que debe ser tomado en cuenta al reproducir los microorganismos a gran escala.

Por otro lado, las bacterias Gram-negativas halladas, que pertenecen al género *Klebsiella*, también muestran un aspecto mucoso, cápsulas de polisacárido de gran tamaño y falta de motilidad, y por lo general producen pruebas positivas para lisina descarboxilasa y citrato.

La mayor parte del género *Enterobacter* produce pruebas positivas para motilidad, citrato y descarboxilasa de ornitina, y produce gas a partir de glucosa. *Enterobacter aerogenes* tiene cápsulas pequeñas. *Serratia* produce ADNasa, lipasa y gelatinasa. *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia* por lo general producen reacciones de Voges-Proskauer positivas [12].

Dentro de las resistencias intrínsecas de las enterobacterias, se observó como las cepas de *Klebsiella pneumoniae* tuvieron resistencia natural a la ampicilina además de ser sensibles a las cefalosporinas y a los carbapenémicos, tal como se cita en la literatura [8]. *Klebsiella pneumoniae* está presente en la microbiota de animales tales como los humanos, otros mamíferos e inclusive en aves. Las cepas humanas de esta especie también se constituyen como patógenos oportunistas que son capaces de causar infecciones sistémicas en los humanos. En la actualidad se observan cepas humanas que han adquirido resistencia hasta el punto de la pandrog-resistencia, se puede sospechar que la cepa hallada es una cepa salvaje que no ha tenido grandes eventos de transferencia horizontal de genes o de selección de mutantes resistentes por su exposición a antibióticos.

En relación a la especie patógena *Nocardia asteroides*, ésta se observó como un bacilo Gram-positivo filamentosamente ramificado, aerobio, inmóvil, con catalasa positiva, lo que concuerda con lo expuesto por otros autores [13, 23].

Las cepas colectadas inocuas correspondientes a Bal3 y Ant12N5 colectadas en Balzapamba y Yasuní mostraron un crecimiento opuesto, en vista de que Bal3 tarda entre un día a dos días en formar colonias, mientras que Ant12N5 entre siete y 15 días. Esto tiene implicaciones en el dimensionamiento de los equipos, en el campo de la biotecnología industrial [24].

El lento desarrollo que sufren las cepas de bacterias traídas de Antártida, puede ser debido que la mayoría de cepas de bacterias recolectadas son psicrófilas, es decir que crecen óptimamente a temperaturas <15°C. Las bacterias

psicrófilas más frecuentes en aguas profundas o en zonas polares son Gram-negativas de las clases: Alfa, Beta, Delta y Gamma proteobacteria (*Shewanella sp.* y *Moritella sp.*), y el Phylum Bacteroidetes con los géneros: Cytophaga, Flavobacterium y Bacteriodes [25].

De las seis cepas identificadas, el 67% fueron patógenas y solo dos cepas que representan el 33% fueron inocuas. Las cepas inocuas que se identificaron requirieron un nivel de contención mínimo, ya que no causan enfermedades a trabajadores del laboratorio o a animales, bajo los procesos que se señalan para la producción de etanol [26]. Mientras que todas las cepas patógenas están dentro del nivel de riesgo dos, por lo tanto, representan un riesgo limitado a pesar de ser patógenas. Las cepas patógenas pueden ser empleadas en la industria.

Como conclusión, se establece el hallazgo de la cepa *Klebsiella pneumoniae* en el material orgánico obtenido en Yasuní, que puede tener importancia clínica. Ésta es una cepa patógena, no obstante, por el hábitat en el que se encuentra, puede no estar relacionada con seres humanos, lo cual podría ser corroborado empleando técnicas de genotipificación. Es importante que en los estudios de bioprospección, inicialmente se identifiquen los microorganismos que se están aislando para precautelar la salud de los investigadores y proveer información para una correcta determinación e interpretación de las pruebas de sensibilidad de estos microorganismos. Por otro lado, las bacterias productoras de celulasa colectadas en la fábrica artesanal de panela en Balzapamba y en la microbiota adherida a la especie *Calliophyllis atosanguinea* en la Antártida no son de importancia clínica.

Las técnicas empleadas para la identificación taxonómica de la microbiota proveniente de los diferentes sitios y muestras, las mismas que son interdisciplinarias, consideradas en los estudios polifásicos, constituyen una estrategia para identificar la microbiota ambiental de importancia clínica.

Se corroboró la importancia del estudio poli-

fásico aplicado a la identificación taxonómica de cepas inocuas y patógenas, sobre la cual algunos autores han investigado ampliamente [27]. Este método permite abordar el tema de la clasificación taxonómica de manera técnica y económicamente apropiada.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no hay conflicto de intereses.

Contribución de los autores.

Las distintas fases de la investigación fueron realizadas por todos los autores, quienes contribuyeron de igual forma en todo el proceso. El autor correspondiente representa al colectivo de autores.

Financiamiento

Beca de Doctorado SENESCYT.

Agradecimientos

A la Magíster María Lucrecia Pabón. Al estudiante Johnson Montero por su ayuda en la parte experimental, en el laboratorio. A Petroproducción por las muestras colectadas en el Campo Yasuní. A la SENESCYT por la contribución económica para que este estudio sea efectuado. Al Lcdo. José Laquidáin por la corrección de estilo en este trabajo.

Disponibilidad de datos

Todos los autores aceptan que los datos vayan a estar disponibles para otros investigadores bajo petición directa al autor corresponsal.

Referencias

1. Salvador C, González E, Mesa L, Rojas M, Battallas F, Pérez A, Concepción D. Empleo de biocatalizadores en la degradación de material lignocelulósico: principales impactos. FIGEM-PA. 2018;1(1):41-46.
2. Oliart-Ros RA, Manresa-Presas A, Sánchez-Otero MG. Utilización de microorganismos

- mos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. *CienciaUAT* [Internet]. 2016 [citado 2020 Mayo 18];11(1): 79-90. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-78582016000200079
3. Ministerio del Ambiente. Informe sobre la viabilidad ambiental de la explotación de los campos petroleros en el Parque Nacional Yasuní para efectos de solicitar fundamentamente a la Asamblea Nacional para que autorice la explotación petrolera en el Parque Nacional Yasuní. [Internet]. Quito; 2013. Disponible en: <http://www.geoyasuni.org/wp-content/uploads/2013/09/All1MAE.pdf>
 4. Gaibor Olalla JL. Infraestructura turística y afluencia de visitantes en el Complejo “La Chorrera” en la Parroquia Balsapamba. Documento probatorio (dimensión escrita) del examen complejo de grado previo a la obtención del título de Licenciada en Ciencias de la Educación: Mención Hotelería y Turismo. Babahoyo: Universidad de Babahoyo; 2019. Disponible en: <http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/handle/49000/7064/E-UTB-FCJSE-HTURIS-000092.pdf>
 5. Instituto Antártico Ecuatoriano. [Internet]. Ecuador 2017. Disponible en: <http://www.inae.gob.ec/>
 6. Salvador C, Destain J, Rojas M, Vásquez E, Paz-y-Miño C. Producción de actividades enzimáticas por bacterias del intestino de *Eisenia foetida*. *Rev Ciencia*. 2011;14:191-198.
 7. Zaragoza R, Gimeno C, Pemán J, Salavert M. *Microbiología aplicada al paciente crítico*. 1a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2008.
 8. Brooks G, Carroll K, Butel S, Morse S, Mietzner T. *Microbiología Médica*. 25a ed. México, D.F.: McGraw-Hill; 2011
 9. Kormos C, Mackey B, Dellasala D, Kumpe N, Jaeger T, Mittermeier RA et al. Primary Forests: Definition, status and sFuture prospects for global conservation. En *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*: Elsevier; 2017. p.1-11. Doi: 10.1016/B978-0-12-409548-9.09711-6.
 10. Petroamazonas EP. Desarrollo responsable del Bloque 43 ITT. [Internet]. Ecuador 2017. Disponible en: <https://www.petroamazonas.gob.ec/?p=162>
 11. Bou G, Fernandez A, Garcia C, Sáenz-Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(8):601-608.
 12. Gutiérrez A, Arellano B, Gutiérrez C, Escalera E, Romero G, Saucedo J, et al. Sistema de gestión de la calidad de los laboratorios de docencia. *Manual de Laboratorio Microbiología General I*. FES Zaragoza UNAM, 2017. Disponible en: https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/manuales/19Manual_Microbiologia_General1.pdf
 13. Brenner, DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM, Bergey DH. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 25a ed. New York: Springer; 2005.
 14. Heritage J, Evans E, Killington R. *Introductory Microbiology*. 1ra ed. New York: Cambridge University Press; 1996.
 15. Biomerieux. *Api & Id 32 Identification Data base* [Internet]. Francia: Biomerieux S.A; 2017. Disponible en: <https://www.biomerieux-diagnostics.com/sites/clinic/files/9308960-002-gb-b-apiweb-booklet.pdf>
 16. Álvarez M, de Fez I, Boquet E. *Manual de técnicas en microbiología clínica*. 2da ed. Madrid: Asociación Española de Farmacéuticos Analistas; 1990.
 17. Desjardins P, Conklin D. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *J Vis Exp*. 2010;22(45):e2565, doi:10.3791/2565.
 18. National Center for Biotechnology. BLAST [Internet]. National Library of Medicine. Disponible en: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
 19. Organización Mundial de la Salud. *Manual de Bioseguridad para Laboratorios*. 3ra ed. Ginebra: Organización Mundial de la salud; 2005.
 20. Salvador Pinos CA, González Suárez E, Concepción Toledo DN. Evaluar sustituir enzimas comerciales por nativas desde la Universidad: un intangible para el desarrollo local. *Univ y Soc*. [Internet]. 2018;10(4):69-74.
 21. Brooks GF, Butel JS, Ornston LN, Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. 15ta ed. México D.F.: El Manual Moderno; 1996.
 22. Robalino LA. Determinación de la velocidad máxima de transferencia de oxígeno y la velocidad específica máxima de consumo de oxígeno en cultivos por lote de la bacteria (*Bacillus subtilis* DS23) en un biorreactor [Tesis]. Ambato: Universidad Técnica de Ambato.
 23. Gonzalez P, Cona E. *Nocardia asteroides*. *Rev Chil infectología*. 2006;23(3):359.
 24. Castro E, González E. Aspecto técnico-económico de los estudios previos inversionistas para la producción de etanol de la caña de azúcar. España: Universidad de Jaén. Servicio de Publicaciones; 2012.

25. Hirsch PR, Mauchline TH, Clark IM. Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. *Soil Biol Biochem.* 2010;42(6):878-887.
26. Batallas Merino F, Salvador Pinos CA, Villavicencio Montoya J, González Gavilánez H, González Suárez E. Hydrolysis of sugarcane bagasse to obtain ethanol using native and commercial enzymes. *Cent Az.* 2018;45(4):90-10.
27. Montes López MJ. Estudio taxonómico polifásico de bacterias procedentes de ambientes antárticos: descripción de cuatro nuevas especies [Tesis]. Barcelona: Universitat de Barcelona; 2005.