



UN MICROCOSMOS POR DESCUBRIR:

Microorganismos en procesos ambientales y salud desde una mirada científica ilustrativa

Roldán Torres
Silvia Llerena
Yeimy Rojas de Hidalgo
Karla Verdugo
Carolina Castro
Evelyn Oña
Luz Villafuerte

Betzabeth Imaicela
Ariel Parra
Jessica Quiñonez
Lina Iturralde
Josselyn Tipán
Daniela Chávez
Silvana Morocho



Revisión Técnica:
Editorial CEDIA

Diseño y diagramación:
Paz Cordero González

Corrección de Estilo:
Editorial CEDIA

Coordinación:
Laura Malache S. - Editorial CEDIA

Una publicación de la Editorial CEDIA,
arbitrada por pares académicos de doble ciego.

cedia

CEDIA

Gonzalo Cordero 2-111 y
J. Fajardo
Cuenca – Ecuador
cedia.edu.ec

Ikiam
Universidad Regional Amazónica

**UNIVERSIDAD REGIONAL
AMAZÓNICA**

Parroquia Muyuna, kilómetro 7 vía
a Alto Tena
Tena - Ecuador
ikiam.edu.ec

Primera edición

ISBN: 978-9942-8795-8-5

DOI: <https://doi.org/10.48661/VK2A-RG31>

Tena, Ecuador
Noviembre de 2024

Citación:

Torres Gutiérrez, R., Llerena Gordillo, S., Rojas de Hidalgo, Y., Verdugo, K., Castro-Cevallos, C., Oña, E., Villafuerte, L., Imaicela, B., Parra A., Quiñonez, J., Iturralde, L., Tipán, J., Chávez, D., Morocho, S. (2024). Un Microcosmos por Descubrir: Microorganismos en procesos ambientales y salud desde una mirada científica ilustrativa. CEDIA & Universidad Regional Amazónica, Ikiam. <https://doi.org/10.48661/VK2A-RG31>



This book is licensed by Creative Commons,
Attribution-NonCommercial 4.0 International
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Un microcosmos por descubrir:

Microorganismos en procesos ambientales
y salud desde una mirada científica ilustrativa

Autores principales:

Ph.D. Torres Gutiérrez Roldán
Docente/Investigador.

Est. Imaicela Valero Betzabeth Mishel
Tesisista.

Ph.D. Llerena Gordillo Silvia Alejandra
Docente/Investigador.

Est. Parra Ruiz Ariel Alejandro
Tesisista.

M.Sc. Rojas de Hidalgo Yeimy Marlene
Docente/Investigador.

Est. Quiñonez Pachacama Jessica Lisbeth
Tesisista.

M.Sc. Verdugo Castro Karla Beatriz
Docente/Investigador.

Est. Iturralde Barahona Lina Anabell
Tesisista.

M.Sc. Castro Cevallos Andrea Carolina
Técnico de Laboratorio.

Ing. Tipán Anaguano Josselyn Vanessa
Tesisista.

Ing. Oña Lugmaña Evelyn Andrea
Técnico de Laboratorio.

Ing. Chávez Carranza Daniela Alejandra
Tesisista.

Est. Villafuerte Ordoñez Luz Clara
Tesisista.

Ing. Silvana del Carmen Morocho Masa
Tesisista.

Colaboradores:

Ing. Guarango Veletanga Johanna Estefanía
Técnico de Investigación.

Ing. Sebastian Mateo Valencia Ramos
Técnico de Investigación.

Est. Hernández Hurtado Arnoldo Rodrigo
Ayudante de Investigación.

Financiamiento

Este proyecto fue financiado por la Convocatoria Territorio Ikiam 2023.

Agradecimientos Especiales

Queremos expresar nuestro agradecimiento a las comunidades locales de la Amazonía (Tazayacu y Yutzupino) por su participación y colaboración en las actividades de campo, así como a las instituciones y organizaciones que apoyaron en la recolección de muestras para este estudio.

Índice

	Prólogo	6
1	Capítulo 1. Introducción	09
2	Capítulo 2. Localización del área de intervención	13
3	Capítulo 3. Aislamiento e identificación morfológica y molecular	
	3.1 Metodología aplicada para el aislamiento e identificación morfológica y molecular de microorganismos de suelo y agua con potencial biorremediador.	17
	3.2 Aislamiento e identificación morfológica de hongos entomopatógenos.	22
	3.3 Metodología aplicada para el aislamiento e identificación morfológica de microorganismos de suelo y agua con interés en salud.	24
	3.4 Identificación Molecular.	30
	3.5 Criopreservación de microorganismos	32
4	Capítulo 4. Ilustraciones MicroImpact: microorganismos identificados	
	4.1 Biorremediación	35
	4.2 Biocontrol	49
	4.3 Salud	54

Prólogo

En un mundo cada vez más consciente de la relevancia de la sostenibilidad y la protección medioambiental, la ciencia y la tecnología desempeñan un papel crucial en la búsqueda de soluciones innovadoras para los desafíos ambientales. Desde la concepción de “Una sola salud (One Health)”, la salud de personas, animales, plantas y ecosistemas brinda un enfoque integral para la armonización del equilibrio biológico global. Es por ello que, desde la Universidad Regional Amazónica Ikiam, ha surgido la necesidad de desarrollar proyectos de investigación innovadores que integren alternativas de mitigación para intervenir en procesos biológicos y químicos fundamentales para la sostenibilidad ambiental y el bienestar. El proyecto “MicroImpact: un microcosmos por descubrir. Impacto de microorganismos en procesos ambientales y en la salud de comunidades de Tena” se constituye como una respuesta concreta para dilucidar microorganismos que intervienen en procesos resilientes para la contaminación de aguas, degradación de ecosistemas e influyen en la salud y el bienestar humano en la región amazónica ecuatoriana.

El equipo multidisciplinario detrás de MicroImpact, está conformado por expertos en biología, química, ingeniería ambiental, bioprocesos y ciencias sociales. A través de un enfoque integral, estos profesionales trabajan en la identificación, evaluación y desarrollo de estrategias para la reducción de contaminantes y la recuperación de la calidad del agua, suelos y mejoramiento de la salud humana y ambiental. Las metodologías empleadas para la implementación del proyecto abarcan desde el análisis microbiológico básico, hasta la aplicación de tecnologías de identificación molecular, tratamiento de aguas y la promoción de prácticas sostenibles en comunidades amazónicas.

Los resultados y avances obtenidos a través de MicroImpact están destinados a beneficiar directamente a la región amazónica, pero estos son extrapolables a diversos ecosistemas y sirven como modelo replicable en otras partes del mundo que enfrentan desafíos similares. El lector podrá nutrirse de aspectos relevantes de la aplicación de microorganismos, tales como la biorremediación,

un proceso mediante el cual organismos vivos, principalmente bacterias y hongos, se utilizan para descontaminar suelos y aguas afectadas por sustancias tóxicas. Estos microorganismos tienen la capacidad de degradar compuestos químicos nocivos, transformándolos en sustancias menos peligrosas o incluso en productos inofensivos. Así mismo, el importante rol que juegan los microorganismos, que actúan como agentes controladores de plagas y enfermedades para inhibir su crecimiento, competir con ellos por recursos o incluso producir sustancias que logran erradicarlos. La identificación y aplicación de estos agentes biocontroladores reduce la dependencia de pesticidas químicos, lo que no solo protege los cultivos y los suelos, sino que también minimiza el riesgo de efectos secundarios negativos para el medio ambiente y la salud humana. Además de aspectos relacionados a la salud de aguas, suelos y ecosistemas, este libro impacta determinantemente sobre la salud humana, tanto en términos de prevención de enfermedades como en el tratamiento de trastornos.

Este libro representa un esfuerzo colectivo de docentes, técnicos y estudiantes, cuyo trabajo y dedicación han sido esenciales para el desarrollo de una obra ilustrativa que genera conocimientos básicos y aplicativos. Agradecemos a todas las instituciones y personas que han contribuido a materializar esta iniciativa.



Introducción

La región Amazónica, conocida por su vasta extensión y rica biodiversidad, no solo es un ecosistema caracterizado por su flora y fauna, así como por una increíble variedad de microorganismos (Fierer et al., 2011). La diversidad microbiana en la Amazonía es una parte integral de sus sistemas ecológicos, contribuyendo a la salud de los bosques, al ciclo de nutrientes, a la estabilidad del clima y la salud global (Finck et al., 2024).

El conocimiento sobre la diversidad microbiana y las posibles aplicaciones beneficiosas de los microorganismos en actividades con impacto en la salud ambiental, humana y animal ha tenido un avance limitado (Lobo et al., 2024; Li et al., 2023). Los beneficios económicos, ambientales y sociales que ofrecen áreas como la biorremediación, el biocontrol y la salud son innumerables. Sin embargo, son prácticamente nulos los estudios llevados a cabo en región Amazónica, específicamente en comunidades rurales que se ven inmersas en serios problemas de contaminación de aguas y suelos, así como de incidencia de plagas y enfermedades que atentan contra sus cultivos y la salud humana. Esta región se enfrenta a procesos extractivos

como la minería, dejando pasivos ambientales que ponen en riesgo la salud de sus habitantes y los ecosistemas donde habitan (Jepson et al., 2020).

A pesar del aporte de la vida microbiana a los ecosistemas terrestres y acuáticos, es paradójico que aún siguen siendo escasas las investigaciones encaminadas a determinar la diversidad microbiana en biomas globales, pero con mayor relevancia en regiones amazónicas (Peay et al., 2010). Con el afán de contribuir a dilucidar la diversidad microbiana en la Amazonía ecuatoriana y su potencial uso en procesos resilientes, se crea el proyecto “MicroImpact: un microcosmos por descubrir. Impacto de microorganismos en procesos ambientales y en la salud de comunidades de Tena”. Este proyecto surge como una respuesta concreta a desafíos imperantes para descubrir la biodiversidad microbiana y sus aplicaciones en ambiente y salud.

Es por ello que este libro persigue dar a conocer de una forma científica ilustrativa las técnicas empleadas para el muestreo, manipulación, aislamiento e identificación de microorganismos asociados a biorremediación, biocontrol y salud, lo que representa

un notable resultado para descubrir y dar a conocer la diversidad microbiana con que cuenta la región amazónica y su potencial uso en bioprocesos y salud. Esta obra es una guía práctica, detallada e ilustrada, con aplicación en esta y otras regiones para contribuir a la mitigación de los efectos nocivos de los procesos extractivos y la reducción del uso de agroquímicos, beneficiando así al medio ambiente y a la salud humana y animal.

El enfoque integral para la determinación de la vida microbiana, asociado con diferentes procesos, tales como la contaminación de suelos, aguas y ecosistemas de forma general, ponen de manifiesto el concepto de una Sola Salud (*One Health*), reconociendo la interconexión entre la salud humana, animal y ambiental, y está implícito a lo largo de esta publicación, partiendo desde el aislamiento e identificación de la diversidad microbiana que pueden ser insumo de bioprospección para mejorar la calidad del medio ambiente o tomar medidas preventivas contra patógenos de salud que reduzcan los riesgos de enfermedades emergentes. Este enfoque integrado y holístico de la salud pública es esencial para enfrentar los desafíos complejos y multifacéticos de todas las regiones.

El lector podrá disfrutar en cada capítulo de la integración de conceptos metodológicos e ilustraciones que describen el desarrollo del proyecto y sus resultados. Se inicia con un conjunto de definiciones, fundamentos y metodologías que permiten enmarcar la búsqueda de microorganismos en la región amazónica, para posteriormente abordar los procesos de caracterización e identificación de los aislados obtenidos. La guía ilustrativa no brinda solamente imágenes para el reconocimiento de la amplia diversidad de microorganismos identificados, sino que da a conocer el rol de estos en los ecosistemas y sus potenciales aplicaciones.

Anhelamos que esta contribución al conocimiento pueda calar en estudiantes, docentes, investigadores y habitantes de comunidades, para de conjunto, la comunidad científica y la sociedad civil, podamos hacer uso de la vida microbiana en aras de reducir los impactos negativos de procesos contaminantes en ecosistemas y potenciar su aplicación en contextos ambientales y de salud.

A landscape photograph showing a rocky riverbed with a small pool of water. The sky is filled with large, dramatic, grey and white clouds. The foreground shows a shallow pool of water reflecting the sky, with many smooth, grey and brown stones visible beneath the surface. The middle ground shows a continuation of the rocky riverbed, with some green grass and shrubs growing along the banks. The background shows a distant, hilly landscape under the same cloudy sky.

Capítulo 2. Localización del área de intervención

Localización del área de intervención

En el cantón Tena, la población tiene acceso frecuente al consumo de agua potable en sitios de recreación pública. Adicionalmente, encontramos problemas en el manejo de residuos de la minería y en el amplio uso de pesticidas. Estas tres actividades impactan en el ambiente y en la salud de la población, por lo que se han seleccionado distintas áreas de muestreo representativas bajo estas tres condiciones. Así, de tres puntos del Río Jatunyacu (-1,059722, -77,812639) con contaminación minera, se aislaron microorganismos con potencial uso en procesos de biorremediación (Fig. 2). El Bosque de la Ciencia de Ikiam y la comunidad de Tazayaku (-0,949711, -77,865606 y -0,968489 -77,850342) fueron seleccionados para aislar microorganismos

entomopatógenos asociados a procesos de biocontrol (Fig. 3). Finalmente, seis puntos de recolección de agua potable y plantas de tratamiento de aguas residuales (Fig. 4) se seleccionaron para aislar microorganismos con posible impacto en la salud humana y animal (-1,003944; -77,811333, -0,993653, -77,811947; -0,991480, -77,816690; -0,984250, -77,819440; -0,990030, -77,826080; -0,991530, -77,814780; -1,000940, -77,812610; -0,949720, -77,863380).

La recolección de muestras se realizó bajo el Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos N° MAATE-DBI-CM-2023-0308 y se representa el área en la Figura 1.

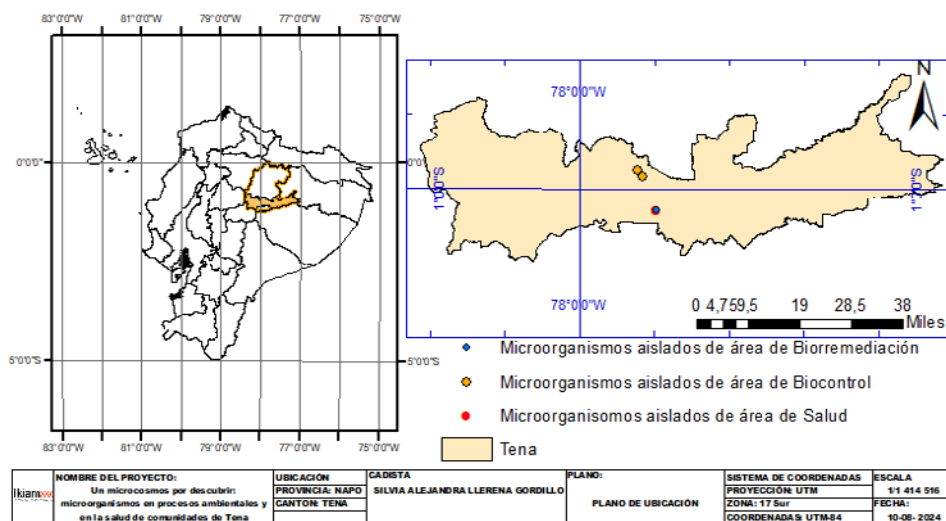


Figura 1. Áreas de muestreo del cantón Tena para el aislamiento de microorganismos de interés en biocontrol, biorremediación y salud.

La minería es una actividad extractivista que impacta los diversos ecosistemas amazónicos. En el Río Jatunyacu, la concentración de los metales pesados Cd, Pb, Zn y Cr, generados por esta actividad, superan los estándares de calidad del agua (Capparelli et

al., 2021; Galarza et al., 2023). Conocer la diversidad de microorganismos y relacionarla con su potencial uso en procesos de biorremediación contribuye a la mitigación de los efectos nocivos del impacto minero de forma sostenible con el medio ambiente.



Figura 2. Tesistas de Ikiam en sitio contaminado por minería en el Río Jatunyacu.

El insecto plaga, por su alta capacidad de adaptación y reproducción, puede convertirse en una amenaza para los sistemas productivos de la agricultura, lo que conlleva a lamentables consecuencias económicas. El uso de agroquímicos es la práctica habitual aplicada para controlar estas plagas; genera efectos adversos en la salud humana y en el medio ambiente (FAO, 2022, Jepson et al., 2020; Fanzo et al., 2022) (Jepson

et al., 2014). Por lo tanto, una alternativa ecológicamente sostenible es el empleo de hongos entomopatógenos como biocontroladores de insectos. En la región amazónica, no se ha desarrollado esta línea de investigación, pues los estudios se han centrado en promover sistemas agroforestales para mejoramiento de cultivos (Corporación de Asociaciones de la Chakra Amazónica, 2022; Torres et al., 2015).



Figura 3. Tesista de Ikiam recolectando hongos entomopatógenos.

En las fuentes hídricas, existen microorganismos que, en condiciones determinadas, pueden causar enfermedades en diversas especies de animales, incluyendo los humanos, especialmente si su sistema inmune está inmunodeprimido. Algunos de estos patógenos, pueden sobrevivir a los procesos

de cloración en el tratamiento de aguas (Yijun et al., 2024), generando un problema en el área de salud. Es indispensable identificar a microorganismos oportunistas para establecer medidas de prevención y control en los sistemas de distribución de agua potable (Gebert et al., 2018).

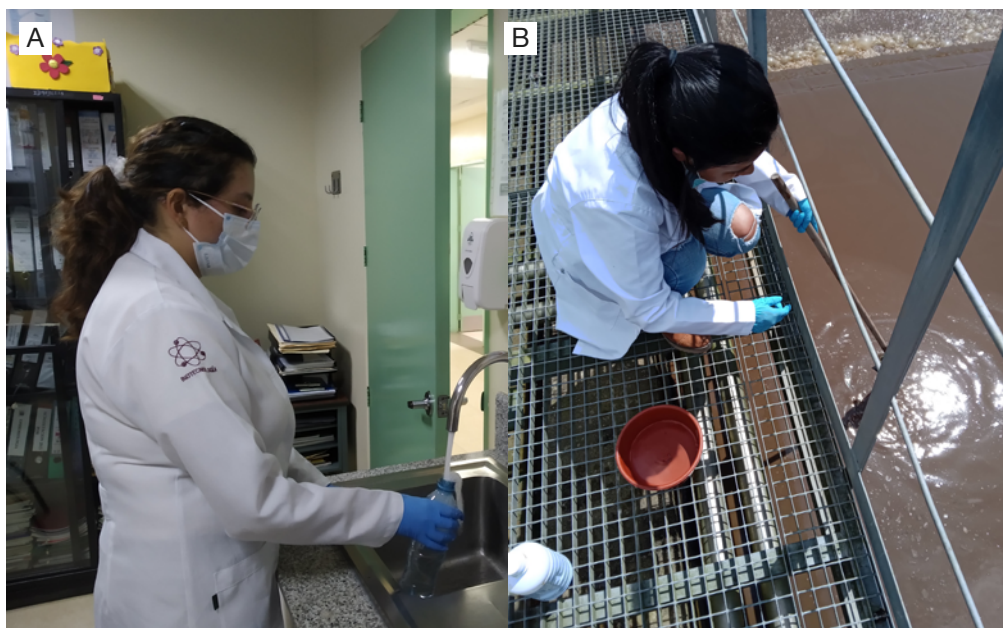


Figura 4. A) Recolección de muestras de aguas potable. B) Recolección de aguas residuales tratadas.



Aislamiento e identificación morfológica y molecular

3.1 Metodología aplicada para el aislamiento e identificación morfológica y molecular de microorganismos de suelo y agua con potencial biorremediador

Preparación de medios de cultivo

Para el aislamiento de microorganismos, se emplearon dos tipos de medios de cultivo: Agar Rosa de Bengala (agar bacteriológico 15g, Cloranfenicol 0.1g, MgSO_4 0.5g, Rosa de Bengala 0.05g, peptona bacteriológica 5g, dextrosa 10g, K_2HPO_4 1g, pH 7.2), un medio selectivo que favorece el desarrollo

de hongos, y agar nutritivo (peptona 5g, extracto de levadura 3g, NaCl 5g, agar-agar 15g, pH 6.8), un medio general para el crecimiento de una amplia variedad de bacterias. Las concentraciones exactas de cada medio se ajustaron según las especificaciones del fabricante (Fig. 5).

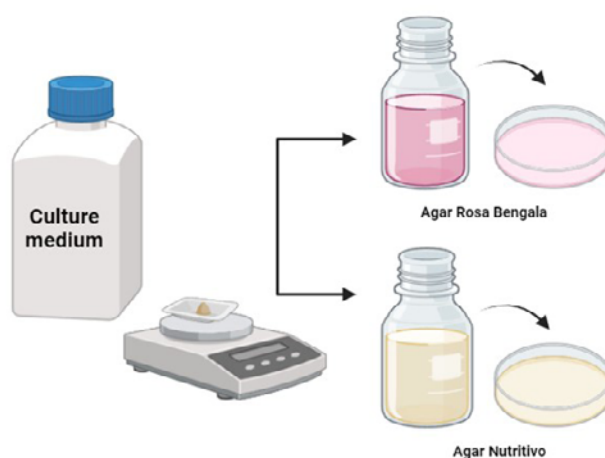


Figura 5. Preparación de medios de cultivo, agar nutritivo y Agar Rosa de Bengala para el aislamiento de microorganismos.



Diluciones seriadas

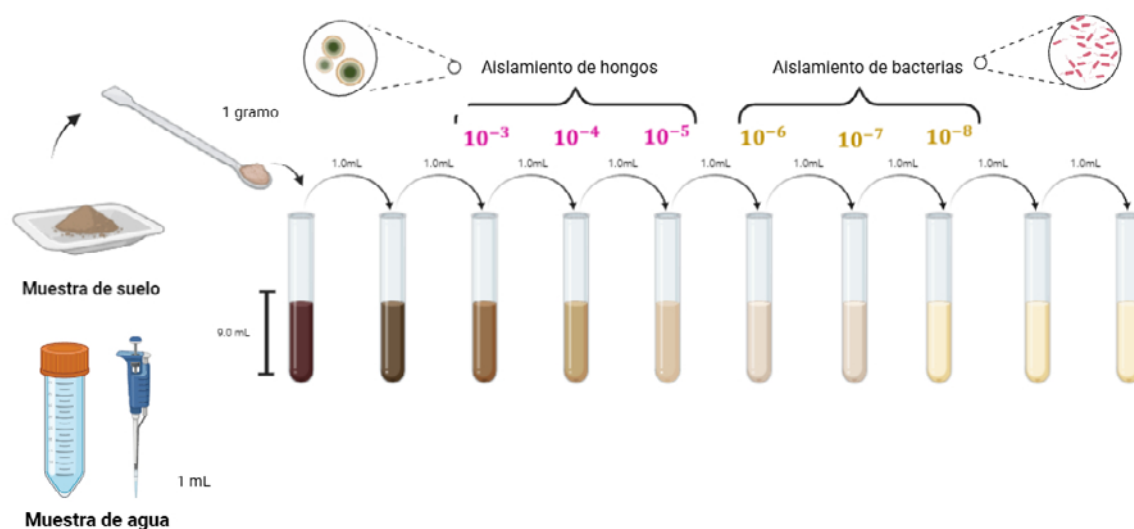


Figura 6. Preparación de diluciones seriadas para el aislamiento de hongos y bacterias con base en el factor de dilución respectivamente.

Se prepararon diluciones seriadas con base 10 (Fig. 6), tanto para suelo como muestras de aguas. Cada tubo contenía 9 ml de agua peptonada a la cual se adicionó un gramo (1g) de suelo o de agua según el caso, generando así la primera dilución. De esta primera dilución se transfirió 1 ml al siguiente tubo que contenía 9 ml de agua peptonada generando el factor de dilución. Este procedimiento se repitió

sucesivamente hasta alcanzar el factor de dilución con cada muestra de suelo o agua respectivamente. Basado en literatura, se consideró los factores de diluciones de hasta , para el crecimiento de hongos; mientras que para el aislamiento de bacterias se utilizaron las diluciones de hasta (Ahmad et al., 2021; Serna Toro et al., 2024).

Aislamiento de Microorganismos

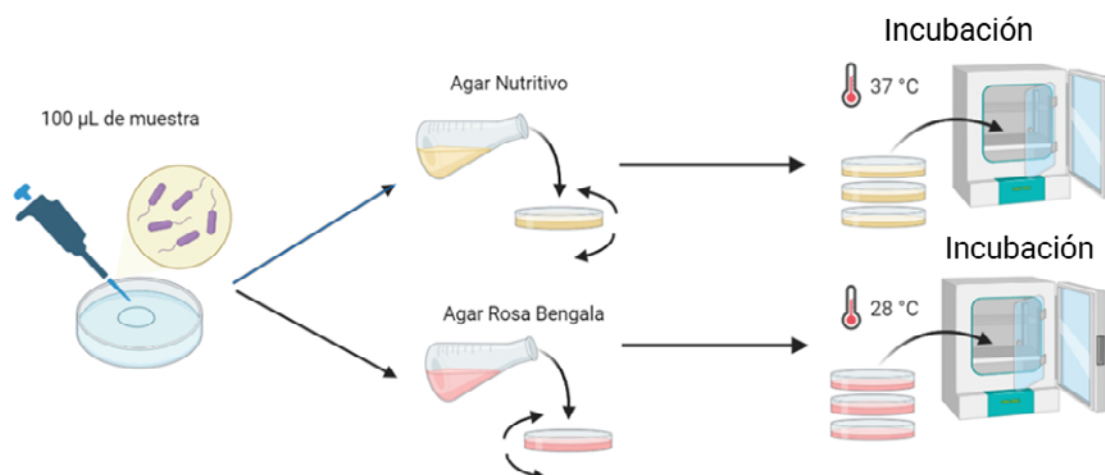


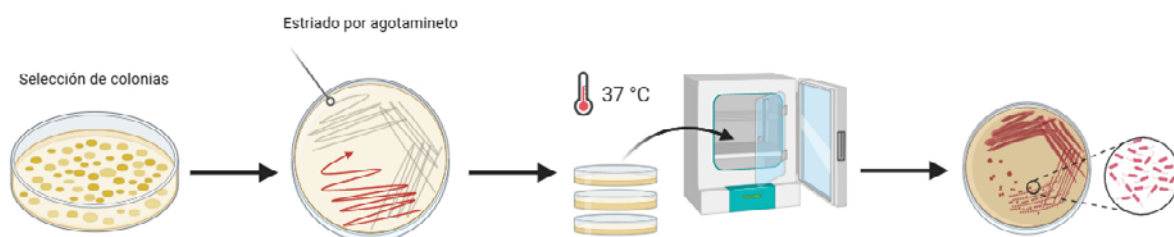
Figura 7. Proceso de inoculación de microorganismos mediante el uso de la técnica de fondo de placa para el aislamiento de hongos y bacterias, respectivamente.

Para el aislamiento de microorganismos se aplicó la técnica de siembra por fondo de placa (Fig. 7). Esta técnica es ampliamente utilizada para cuantificar bacterias en múltiples muestras, y consiste en inocular alícuotas de las diluciones seriadas en placas y verter el medio de cultivo hasta gelificar (Corral-Lugo et al., 2012). Para el aislamiento de hongos y bacterias, se sembraron 100 µl de mues-

tra en el centro de la placa, utilizando sus diluciones correspondientes para cada microorganismo. Posterior a la inoculación, se dispuso el medio de cultivo previamente estéril para el crecimiento de los microorganismos. Las placas se incubaron de modo invertido a temperaturas de 28 °C durante 7 días para el cultivo de hongos y 37°C durante 3 días para el cultivo de bacterias (Corral-Lugo et al., 2012).

Cultivos Axénicos

Bacterias



Hongos

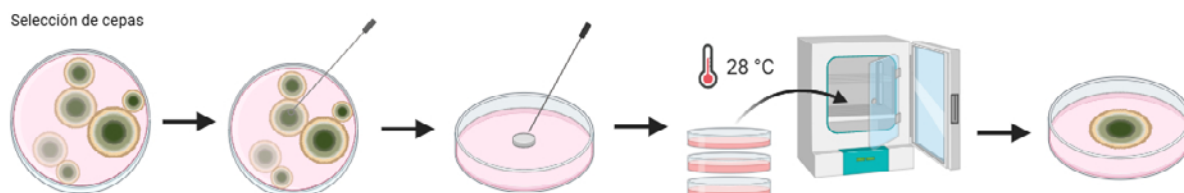


Figura 8. Procedimiento para la obtención de cultivos axénicos de bacterias y hongos mediante técnicas específicas de aislamiento.

Para obtener cultivos axénicos de bacterias se realizó la técnica de estriado en placas Petri (Fig. 8). Esto implica la distribución uniforme de una muestra bacteriana sobre la superficie de un medio de cultivo sólido, utilizando un asa bacteriológica esterilizada para obtener colonias individuales (Sanders, 2012). En el caso de obtención de micelio puro del hongo, se seleccionó cuidadosamente una colonia de hongo en etapa temprana de desarrollo para transferir la hifa del hongo a un medio de cultivo estéril e incubar a 28°C durante 2 semanas, proporcionando las condiciones necesarias para su posterior crecimiento y desarrollo (Reynoso, 2018).

Técnicas de identificación de microorganismos aislados

Tinción Gram para bacterias

Para la tinción de los aislados bacterianos se realizó la técnica diferencial de tinción de Gram (Fig. 9). La preparación del frotis consistió en tomar una muestra de las colonias bacterianas, las cuales fueron extendidas sobre un portaobjetos estéril. La muestra se extiende en una capa delgada y uniforme, y luego se fija al portaobjetos mediante pases continuos a distancia de la llama del mechero. Primero,

al frotis se le adiciona cristal violeta hasta cubrir la preparación. Luego de esperar aproximadamente 1 min., se lava el colorante cristal violeta con agua destilada estéril. Posteriormente, se utiliza Lugol o yodo durante 1 min. Para que actúe como mordiente, formando un complejo insoluble con el cristal violeta dentro de las células bacterianas. La decoloración de las células se llevó a cabo utilizando

copiosamente un agente decolorante, como etanol, para eliminar el colorante de las bacterias Gram-negativas, dejando solo las bacterias Gram-positivas teñidas de color púrpura. Finalmente, se añadió safranina como segundo colorante. Luego de esperar aproximadamente 1 min. Las células bacterias Gram-negativas, decoloradas previamente, tomaron color rojo o rosado (Tripathi & Sapra, 2020).

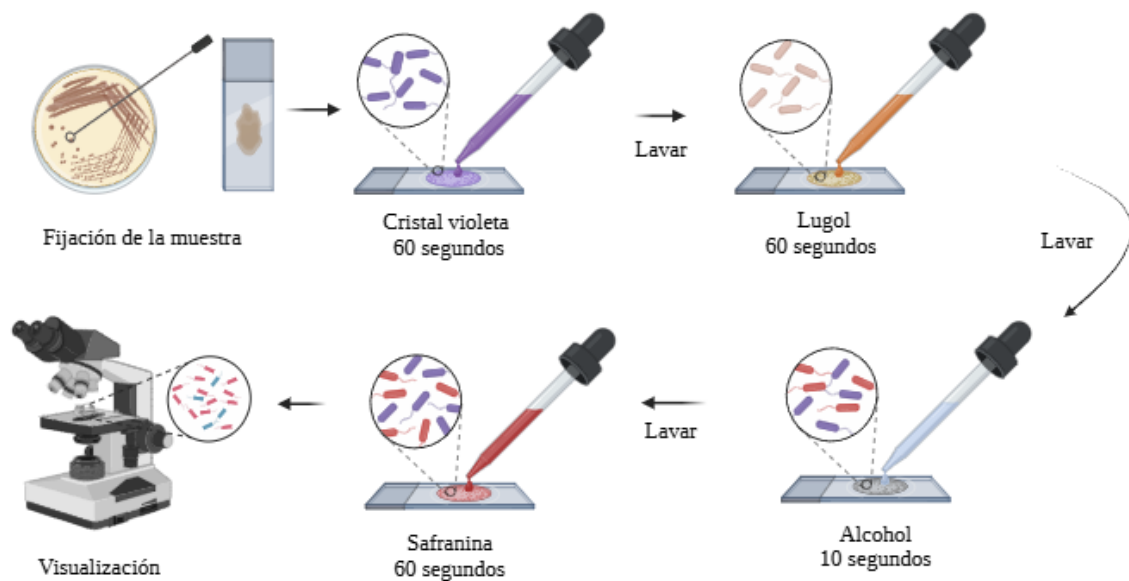


Figura 9. Proceso de tinción de Gram para análisis microscópico de bacterias.

Tinción compuesta con azul de metileno para identificación de hongos

Para el proceso de tinción de hongos, se adhirió sobre el micelio aéreo de las colonias, el lado engomado de un trozo de cinta adhesiva (*scotch tape*) (Fig. 10). Posteriormente, se añadió una gota de azul de metile-

no sobre el portaobjetos para finalmente visualizar las estructuras somáticas y reproductivas de los diferentes aislados en el microscopio óptico (López, 2014).

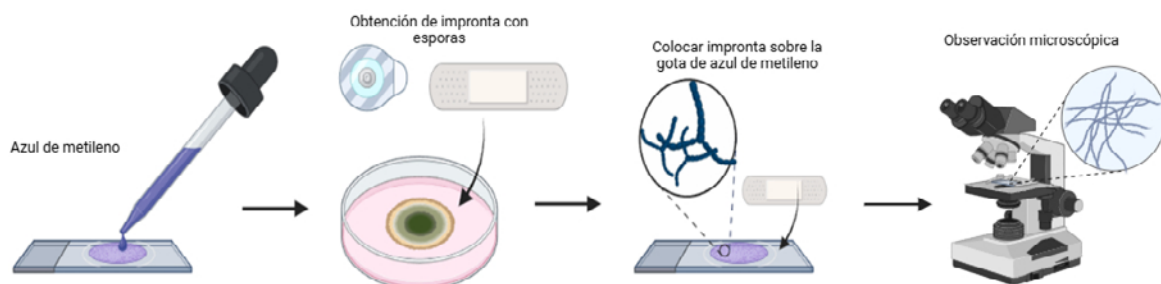


Figura 10. Tinción compuesta para hongos.

3.2 Aislamiento e identificación morfológica de hongos entomopatógenos.

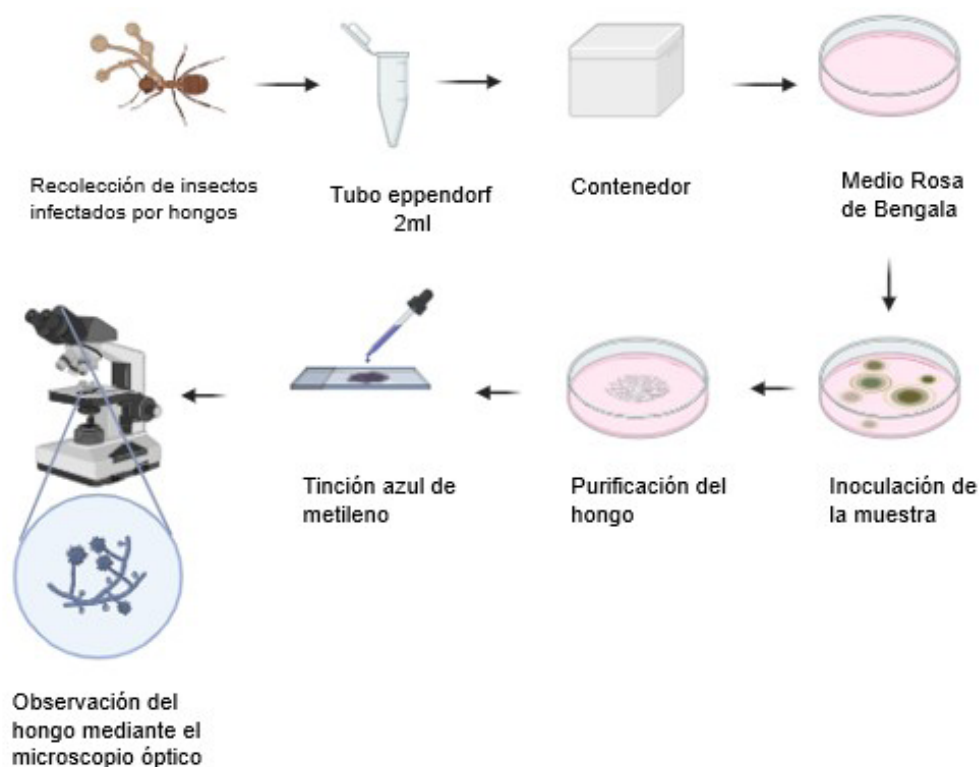


Figura 11. Aislamiento de hongos entomopatógenos a partir de insectos micosados y su identificación morfológica macroscópica y microscópica.

Se recolectaron insectos muertos, de las órdenes Lepidoptera e Hymenoptera, con características iniciales o avanzadas de estar infectados por hongos. Estos fueron extraídos del envés de las hojas con una pinza entomológica previamente desinfectada y se colocaron en tubos eppendorf de 2 ml para su transporte al laboratorio (Tineo, 2019).

La figura 11 muestra el flujograma para el aislamiento de hongos entomopatógenos a partir de insectos con presencia de hifas de hongos, el cual se detalla a continuación. Insectos muertos con característi-

cas de estar infectados por hongos entomopatógenos se recolectaron y colocaron en tubos eppendorf de 1.5 ml (Flores et al., 2019). Cada muestra fue dividida en secciones, las cuales se sembraron en medio cultivo de Agar Rosa de Bengala. Para obtener los aislados fúngicos, se purificaron las colonias crecidas mediante resiembra por cuadrantes hasta obtener cultivos axénicos. Las placas Petri fueron incubadas a una temperatura de 27.5 °C durante 8 días (Dufau et al., 2021). Los aislamientos fueron observados en el microscopio óptico mediante la técnica de tinción de azul de metileno (Mata, 2019).

Técnicas de identificación molecular. Extracción de ADN, PCR y electroforesis de hongos entomopatógenos

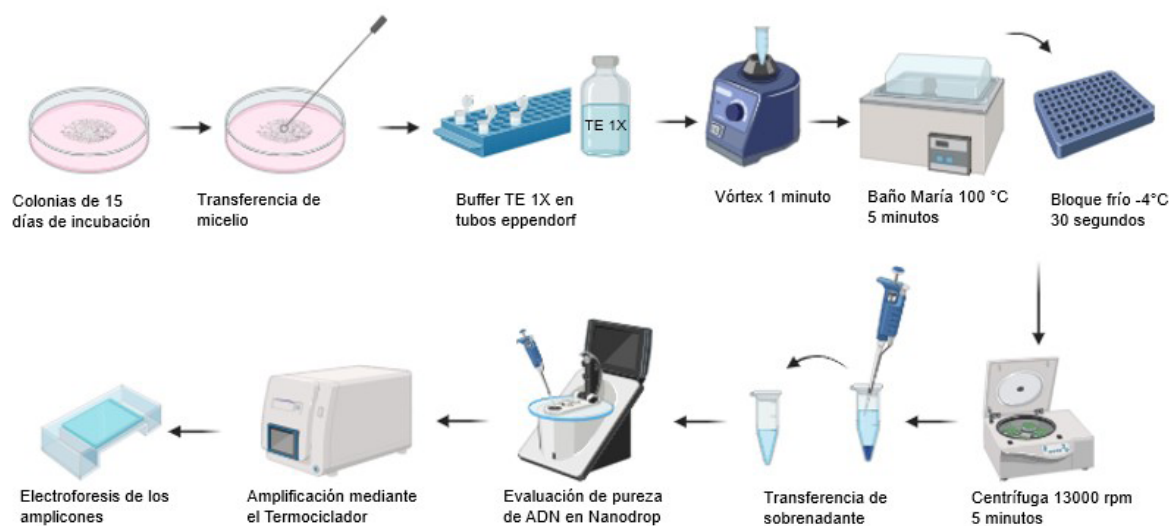


Figura 12. Proceso de identificación molecular de los hongos aislados mediante extracción de ADN, amplificación y electroforesis.

El crecimiento de las colonias de hongos se llevó a cabo mediante incubación de cultivos líquidos durante 15 días a 27.5 °C. Para ello, como se muestra en la Fig. 12, cada aislado de hongo se inoculó en 500 µl de tampón TE 1X y se transfirió el micelio con el asa bacteriológica a un tubo (20 raspadas) y se homogeneizó mediante vortex durante 1 minuto (Ledesema et al. 2022). Luego de ello, se depositaron en Baño María a 100 °C durante 5 min. e inmediatamente se colocaron en bloque frío (4 °C) por 30 segundos. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 min., se transfirieron 200 µl de sobrenadante a otro tubo estéril y se realizó la primera evaluación de pureza de ADN mediante Nanodrop con la relación A260/A280 ≥ 1.8 (Koentjoro et al., 2021).

Para la PCR, las alícuotas de ADN fueron diluidas hasta llegar a una concentración de 50 ng/µl y se realizó un master mix de 25 µl de GoTaq® Flexi

(Promega), y los cebadores utilizados fueron ITS2-2043 reverse (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') y ITS5-173 forward (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAA-GG-3'). La amplificación se llevó a cabo durante 35 ciclos, desnaturalización inicial a 94 °C en 5 minutos, desnaturalización final a 94 °C en 30 segundos, *annealing* a 55 °C en 30 segundos, elongación a 72 °C en un minuto, seguidamente una elongación final a 72 °C en 5 minutos y finalmente 4 °C. Se realizó electroforesis en gel de agarosa a 1% por 45 minutos y luego se aplicó Diamond por otros 30 minutos.

Las amplificaciones fueron llevadas al servicio de secuenciación de la Universidad de las Américas (Quito, Ecuador), donde realizaron secuenciación por método Sanger.

3.3 Metodología aplicada para el aislamiento e identificación morfológica de microorganismos de suelo y agua con interés en salud.

Preparación de medios de cultivo

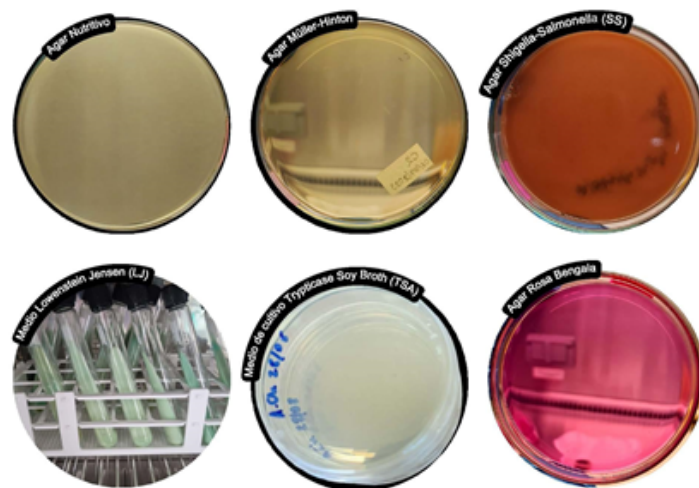
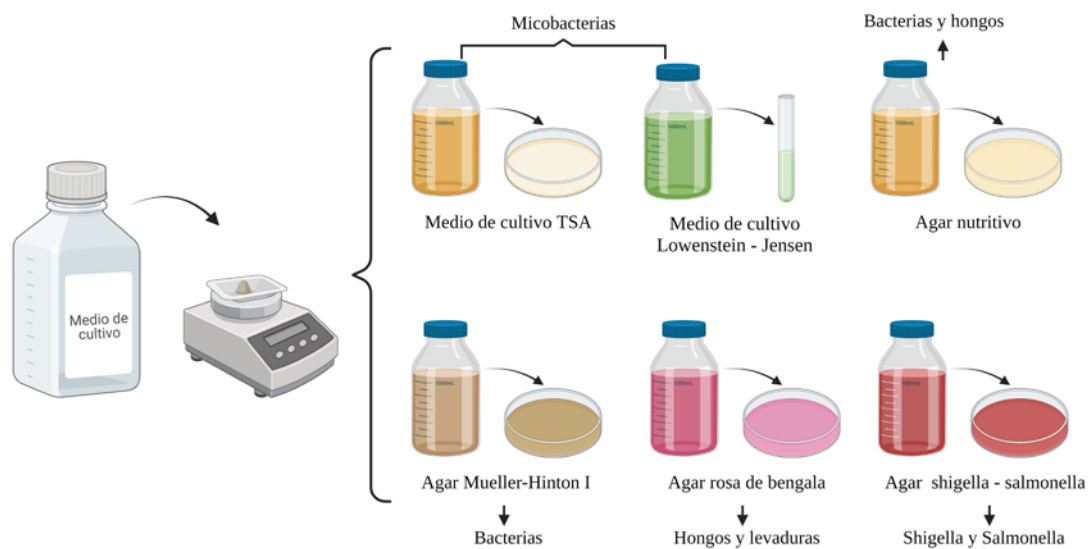


Figura 13. Preparación de medios de cultivo empleados para el crecimiento de bacterias.

Los medios de cultivo proporcionan nutrientes esenciales para el crecimiento, aislamiento y estudio de bacterias, hongos y levaduras, en un entorno controlado (Fig. 13). En el área de salud, para aislar mi-

croorganismos específicos, se requieren medios de cultivos selectivos, ya que facilitan la identificación de los mismos e inhiben el crecimiento de microorganismos no deseados (Chauhan et al., 2020).

Aislamiento de bacterias a partir de muestras de agua

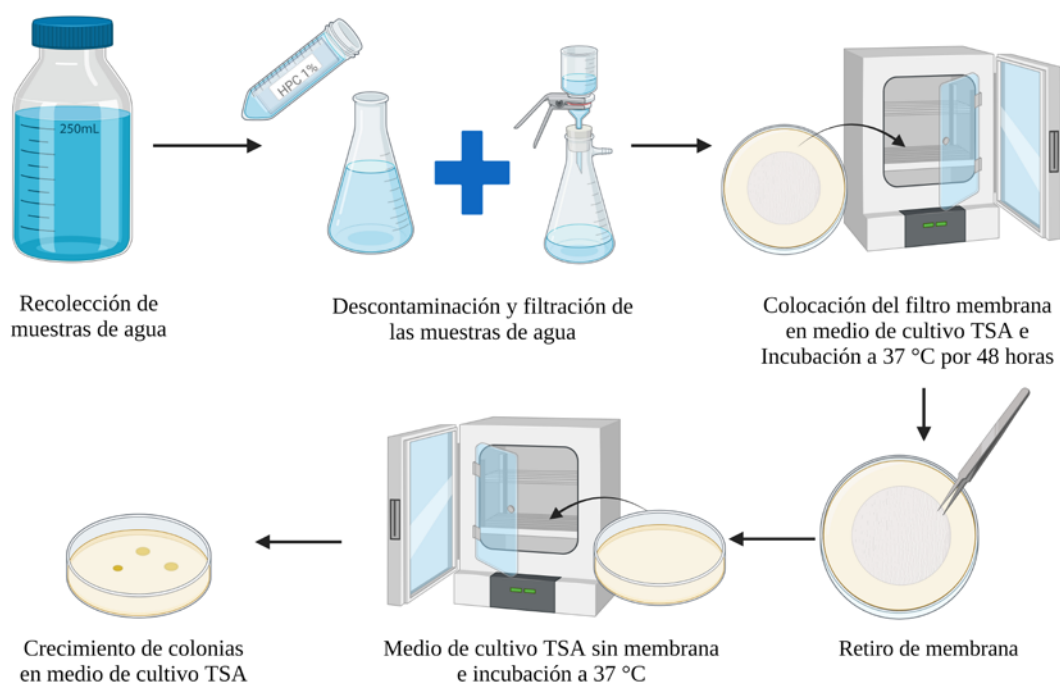


Figura 14. Aislamiento de bacterias mediante la técnica de filtración de membrana con un filtro de nitrocelulosa de 0,45 μm .

Para la detección de micobacterias en cada muestra de agua se procedió a la descontaminación con cloruro de hexadecilpiridinio (HPC) durante 20 minutos, luego se empleó la técnica de filtración de membrana con un filtro de nitrocelulosa de 0,45 μm . Las membranas se lavaron con agua destilada para eliminar la sustancia empleada como descontaminante. Posteriormente, cada membrana se inoculó en el medio de cultivo TSA (triptona 15g, peptona

de soja 5g, cloruro sódico 5g, agar-agar 15g, pH 7.3) y se incubó a 37°C durante 48 horas (Fig.14). Transcurrido ese tiempo, se retiró la membrana y se continuó con la incubación a 37°C durante 8 semanas, hasta observar el crecimiento de colonias. Después del crecimiento, se analizó la morfología de las colonias y se identificaron bacilos ácidos resistentes mediante la tinción de Ziehl-Neelsen (Castellano Realpe et al., 2020; Khosravi et al., 2016).

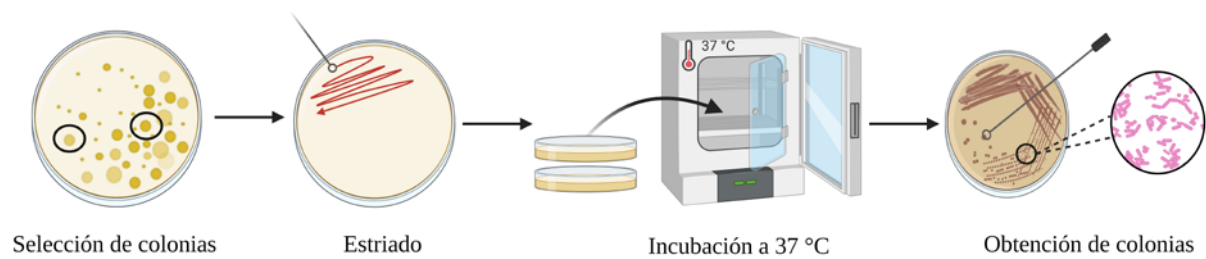


Figura 15. Cultivo axénico para la obtención de colonias puras de micobacterias provenientes del cultivo madre.

Los cultivos axénicos de micobacterias no tuberculosas se obtuvieron a partir de las colonias obtenidas en el medio de cultivo TSA, se seleccionaron aquellas con características morfológicas distintas, luego se inocularon en placas Petri con medio de cultivo TSA

y se incubaron a 37° C para su crecimiento (Fig. 15). Este tipo de cultivo es esencial para eliminar cualquier microorganismo no deseado que pueda interferir en el desarrollo de estudios posteriores como son las técnicas moleculares (Wallace et al., 2021).

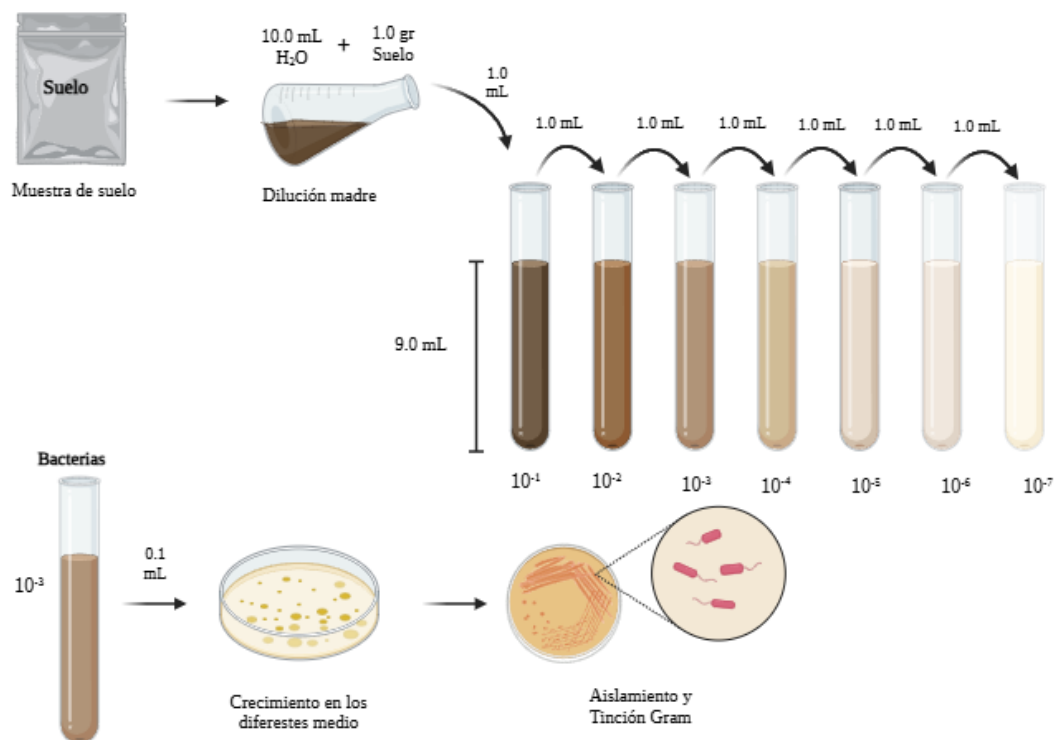


Figura 16. Aislamiento de microorganismos a partir de muestras de suelo.

Se realizó con una muestra de suelo de 30g, la cual fue procesada siguiendo el protocolo descrito por Iwu & Okoh, (2020). Un gramo de suelo fue homogenizado con 10 ml de agua destilada estéril y etiquetada como dilución madre. A partir de la dilución madre se realizaron tres diluciones seriadas de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} (Figura 16). Luego, se dispensó 0.1 ml de cada dilución, específicamente 10^{-3} , en placas con medios selectivos como: agar Listeria (peptona de carne 23g, almidón de maíz 1g, NaCl 5g, esculina 1g, citrato férrico amónico 0,5g, LiCl 15g, agar-agar

14g, pH 7), agar *Salmonella-Shigella* (peptonas 10g, lactosa 10g, bilis de buey 8,5g, citrato sódico 10g, tiosulfato sódico 8,5g, citrato de amonio férrico 1g; verde brillante 0,0003g; rojo neutro 0,025g, agar-agar 12g, pH 7.2), Agar Rosa de Bengala y medio TSB (triptona 15g, peptona de soja 5g, cloruro sódico 5g, pH 7.3) con antibiótico. Después de la incubación (37°C por 24h), los aislamientos objetivo se identificaron en función de sus características morfológicas, confirmando la presencia de bacilos Gram-negativos mediante la tinción Gram (Iwu & Okoh, 2020).

Identificación de Bacterias: pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas son un conjunto de técnicas de laboratorio que se utilizan para identificar microorganismos en función de sus capacidades metabólicas (Murray et al., 2007a). Dentro de estas tenemos la prueba de la catalasa, una prueba rápida y sencilla en la cual se emplea peróxido de hidrógeno para diferenciar entre bacterias catalasa positivas y

bacterias catalasa negativas (Fig.17). También está el uso del Agar Kligler Hierro, mediante el cual se evalúan varias características metabólicas de una bacteria en un solo tubo. Con este medio se puede determinar si la bacteria fermenta la glucosa y/o la lactosa y tiene la capacidad de producir CO_2 y H_2S a partir del tiosulfato de sodio (Thermo Scientific, 2024).

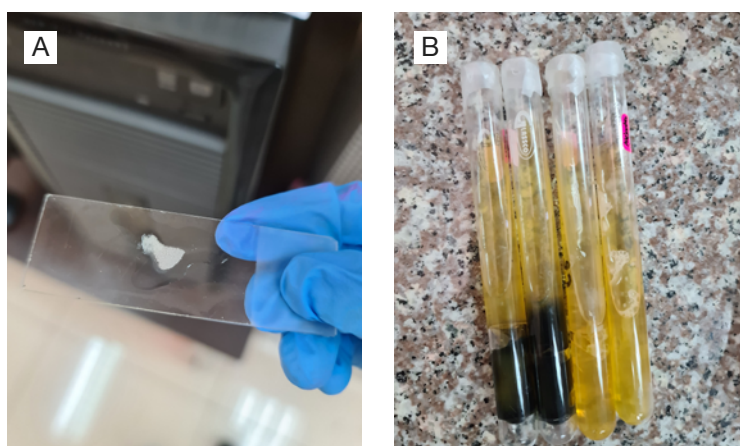


Figura 17. Pruebas bioquímicas realizadas a cultivos axénicos de bacterias de interés en salud humana y animal:
a) test de catalasa, b) prueba de Kligler.

El crecimiento de las colonias se puede observar dependiendo si son colonias de crecimiento rápido (7 días) o de crecimiento lento (hasta 8 semanas). Estas colonias pueden presentar distintas características morfológicas. La superficie varía entre lisa con textura cremosa o rugosa con textura seca. De acuerdo con cada especie, la pigmentación suele ser distinta,

debido a que algunas colonias poseen pigmentos, mientras que otras no. En la Figura 18 se puede observar que las colonias poseen una superficie rugosa y textura seca, con bordes irregulares que se extienden en el medio de cultivo y la distribución en la placa es heterogénea, debido a que presenta mayor agrupación en algunas áreas (Valdés & Cid, 2004).

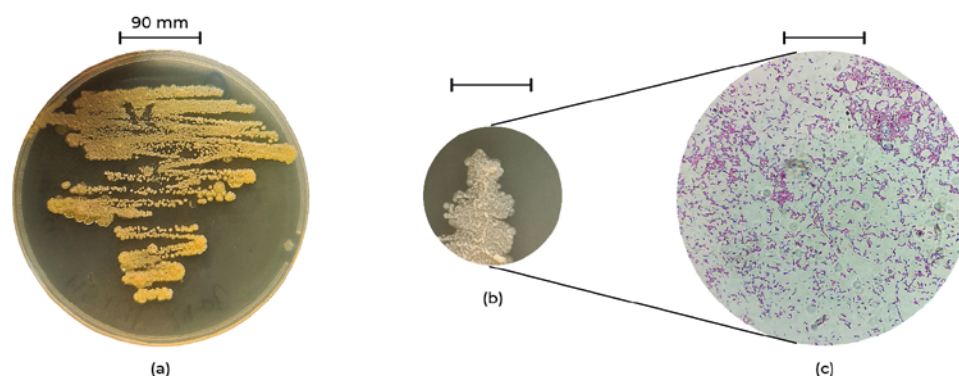


Figura 18. Identificación macroscópica de crecimiento de colonias en el medio de cultivo TSA. (a). Morfología de la colonia en medio TSA con antibióticos; (b) una sola colonia puede contener más de 107 millones de células individuales; (c) tinción de Ziehl-Neelsen.

La tinción de Ziehl-Neelsen (Fig. 19) es un método especializado en microbiología utilizado para detectar bacterias ácido-alcohol resistentes, como las micobacterias. Esta técnica se emplea en este tipo de bacterias, debido a que poseen una capa lipídica, la cual las hace permeables, ya que al te-

ner contacto con el calor permite el ingreso de un colorante específico, y resisten al ser tratadas con un decolorante ácido, lo que las distingue de otros tipos de bacterias. Esta tinción es fundamental para el diagnóstico de bacilos ácidos alcohol-resistentes (BAAR) (Graterol et al., 2016).

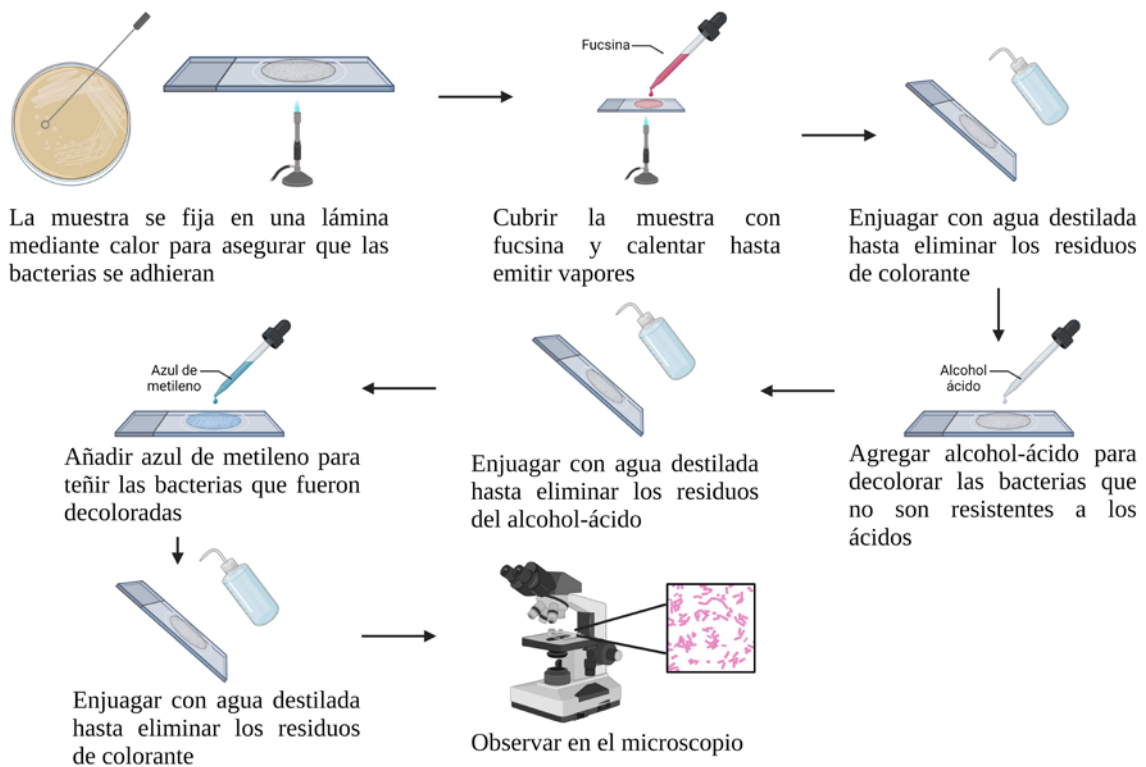


Figura 19. Procedimiento de tinción de Ziehl-Neelsen.

El proceso de tinción de Ziehl-Neelsen inicia con la aplicación del colorante fucsina sobre una muestra previamente fijada en un portaobjetos. La muestra es sometida a calor para que la membrana rica en ácidos micólicos permita el ingreso y retención de este colorante. Seguidamente, se aplica el decolorante alcohol-ácido que elimina el colorante de los microorganismos que no son resistentes al ácido, mientras que las bacterias resistentes permanecen teñidas de rojo. Finalmente, se aplica el colorante de contraste azul de metileno; este permite la visualización de bacterias que no retuvieron la fucsina y así generan un contraste con las bacterias resistentes (Arteta et al., 2022; Cabello-Vílchez & Núñez-Ato, 2018).

Al realizar la tinción de Ziehl-Neelsen, se observa la placa en el microscopio con el lente objetivo 100x (Fig. 20), el cual nos permite visualizar bacilos ácido-alcohol resistentes teñidos de color rosa intenso provenientes de colonias de micobacterias obtenidas durante el crecimiento en el medio de cultivo TSA. Estos bacilos son muy característicos en esta clase de bacterias; además, la agrupación bacilar depende de cada especie, debido a que pueden presentar un patrón de bacilos no agrupados como formación de cadenas cortas (Jaimes et al., 2018).

3.4 Identificación molecular

El método de extracción de ADN por ebullición o “boiling” se empleó para obtener material genético tanto de bacterias como de hongos. Esta técnica es particularmente efectiva para microorganismos con paredes celulares complejas, como las micobacterias ricas en lípidos y los hongos con paredes quitinosas. El choque térmico aplicado durante el

proceso rompe eficientemente estas estructuras celulares resistentes, liberando así el ADN. Este procedimiento, además de ser sencillo y económico, proporciona ADN de calidad adecuada para su uso en PCR, siendo ideal para estudios moleculares de diversos microorganismos. Los pasos de este método se visualizan en las Figuras 21, 22 y 23.

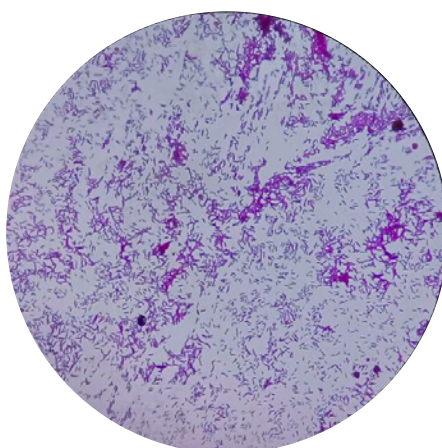


Figura 20. Visualización microscópica mediante tinción de Ziehl-Neelsen en bacterias.

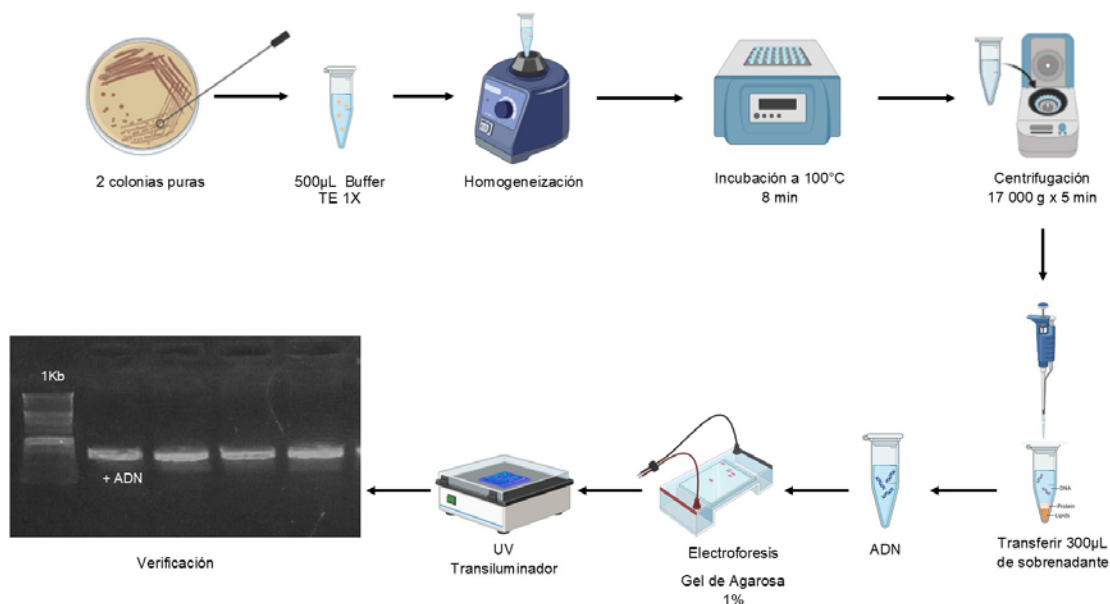


Figura 21. Pasos a seguir para la extracción de ADN mediante boiling.

3.5 Criopreservación de microorganismos

Para criopreservar los microorganismos se preparó una solución de caldo de papa dextrosa (PDB) al 70% y glicerol al 30% y se mezcló completamente para asegurar una distribución homogénea del crioprotector. Posteriormente se inocularon los aislados de

hongos y bacterias en sus respectivos medios de cultivo con glicerol y se colocaron 2 ml en tubos de criopreservación. Finalmente, los tubos se etiquetaron correctamente con la identificación del microorganismo en cuestión y la fecha de criopreservación (Fig. 24).

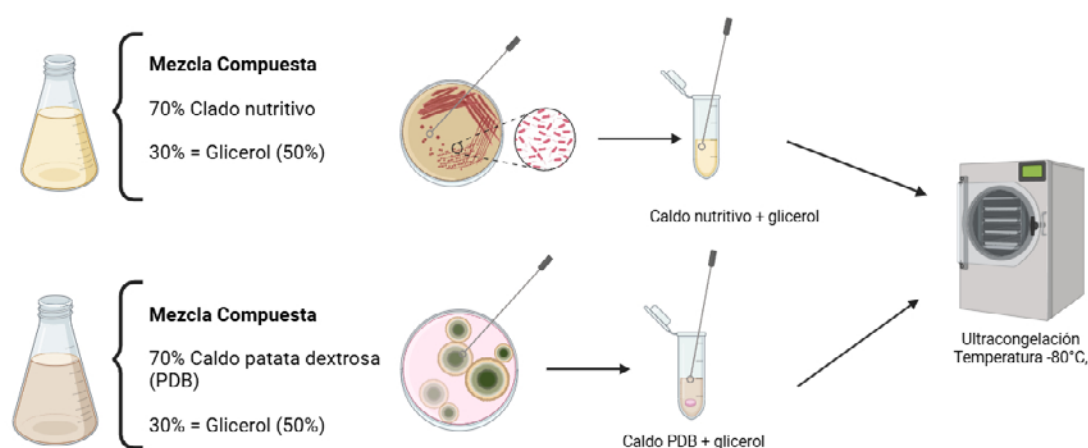


Figura 24. Criopreservación de bacterias y hongos.

Otra técnica para criopreservar hongos, la cual no fue utilizada en nuestro proyecto, es mediante semillas (Fig. 25), la cual consiste en colocar semillas estériles sobre un medio de cultivo con el hongo de 7 días de crecimiento e incubar a temperatura

ambiente (25°C) de 4 a 7 días. Posteriormente se trasladan las semillas colonizadas por el hongo a un nuevo envase estéril y se almacena en refrigeración a -80°C (Smith, Ryan, & Jermini, 2017).

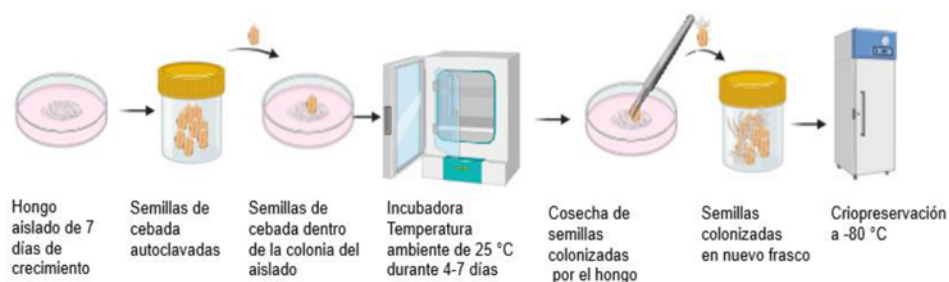
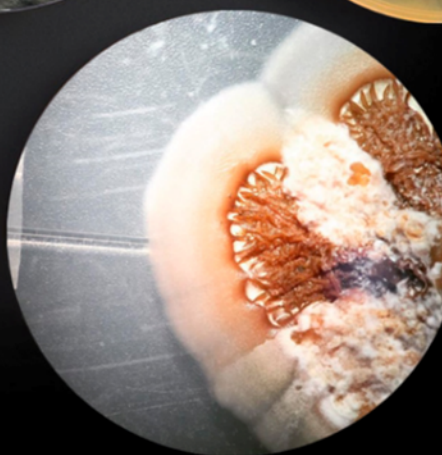
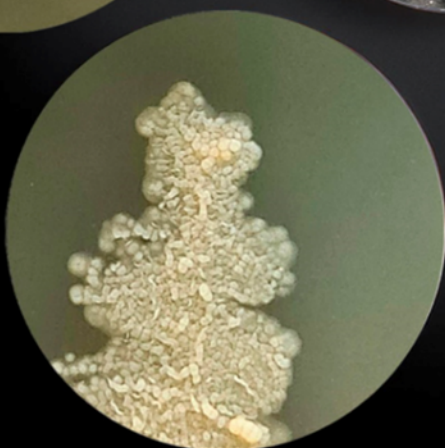
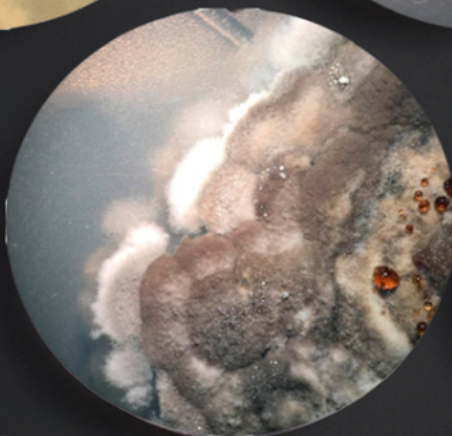
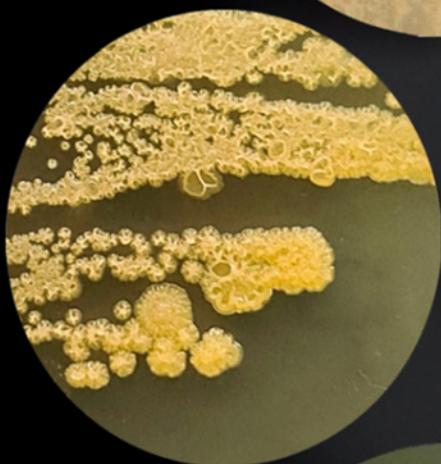
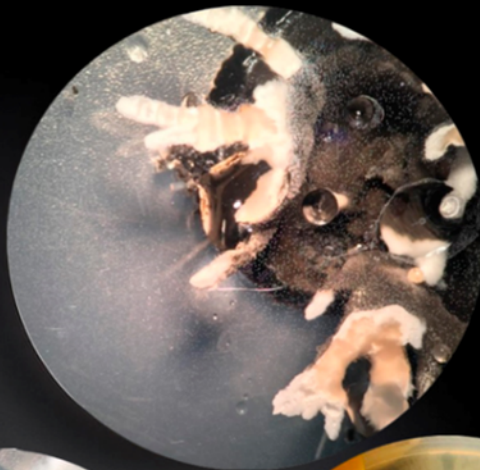
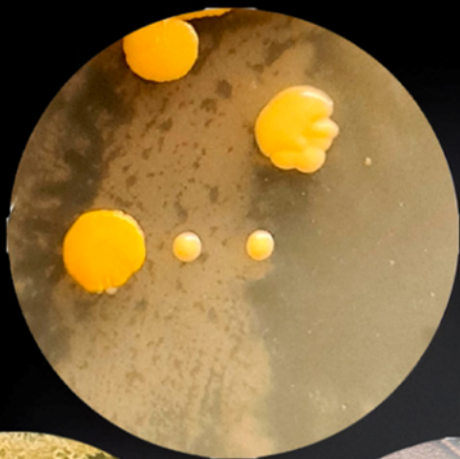


Figura 25. Criopreservación de hongos filamentosos mediante semillas de cebada.



Ilustraciones MicroImpact: Microorganismos identificados

4.1 Biorremediación

Microorganismos identificados en muestras de
agua Río Jatunyacu - Comunidad Yutzupino

Nombre científico: *Fusarium chlamydosporum*.

Número de acceso NCBI: OP456398.1

A)



Fusarium chlamydosporum es un hongo perteneciente al género *Fusarium*, que se caracteriza por la formación de esporas asexuales llamadas clamidosporas. Estas estructuras son esenciales para la resistencia y propagación del hongo, permitiendo su supervivencia en condiciones adversas.

Aplicación en el área de biorremediación:

Este hongo ha demostrado ser efectivo en la reducción de contaminantes en aguas residuales de curtiduría. Reduce significativamente varios parámetros de contaminación, incluyendo la demanda química de oxígeno, color, cromo hexavalente, sólidos suspendi-

dos totales, turbidez, iones de sodio, cloruro y nitrato, con reducciones que van desde el 11,69% hasta el 100% en el caso del cromo hexavalente, lo que su-

giere que este hongo es una herramienta prometedora para la biorremediación (Sharma & Malaviya, 2014).

B)

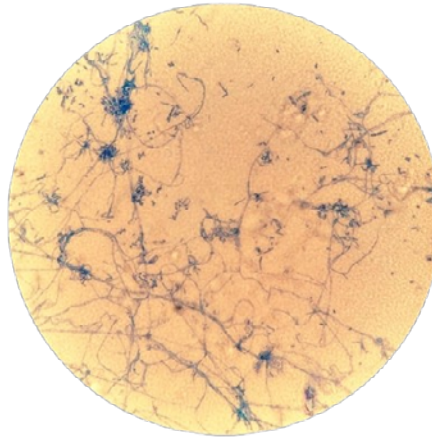


Figura 26. *Fusarium chlamydosporum* aislado en Agar Rosa de Bengala. A) Imagen macroscópica de *Fusarium chlamydosporum*, B) Imagen microscópica de *Fusarium chlamydosporum*.

Nombre científico: *Trichoderma longibrachiatum*.

Número de acceso NCBI: MH810086.1

Trichoderma longibrachiatum es un hongo filamentos conocido por su papel en la biorremediación y la protección de plantas. Es una especie dentro del género *Trichoderma*, que es famoso por su amplia variedad de aplicaciones beneficiosas en la agricultura y el medio ambiente.

Estructura Micelial: *Trichoderma* es un hongo que se distingue morfológicamente por sus hifas septadas, conidióforos ramificados, conidios esféricos o elípticos, y la producción de clamidoconidios en algunas especies. Su micelio denso y su color verde en cultivo son características morfológicas prominentes.

A)



Aplicación en el área de biorremediación

Trichoderma longibrachiatum Evx1 es un biocatalizador adecuado para remediar suelos contaminados con combustible diésel e hidrocarburos aromáticos policíclicos, aumentando la biodegradación en un 54,2% respecto a suelos no inoculados. Los hallaz-

gos indican que *T. longibrachiatum* Evx1 puede ser un inóculo adecuado en protocolos de biorremediación para la recuperación de suelos contaminados por mezclas complejas de hidrocarburos (Ng et al., 2016).

B)

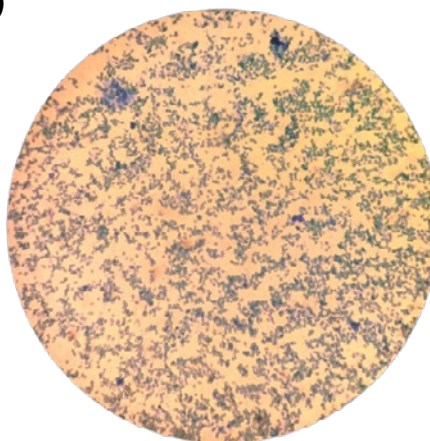


Figura 27. *Trichoderma longibrachiatum*. A) Imagen macroscópica, muestra textura polvorienta. B) Imagen microscópica.

Nombre científico: *Penicillium chrysogenum*.

Número de acceso NCBI: OR905646.1

Penicillium chrysogenum es un hongo filamentoso conocido principalmente por su capacidad para producir penicilina. Fue el primer antibiótico utilizado en medicina. Este hongo se presenta como un moho verde azulado que crece en ambientes húmedos y, esporádicamente, en desechos orgánicos. Sus esporas son esféricas y se encuentran en estructuras de-

nominadas conidiosporas, que son responsables de su propagación. *P. chrysogenum* es notable no solo por su aplicación en la industria farmacéutica, sino también por su capacidad para sintetizar una amplia gama de metabolitos secundarios, con propiedades biológicas diversas, que incluyen antibióticos y otros compuestos bioactivos (Deng et al., 2013).

A)



Aplicación en el área de biorremediación

Este hongo es capaz de eliminar metales pesados a través del mecanismo de biolixiviación en suelos contaminados con escoria de fundición. La biorremediación aplicando *P. chrysogenum* ha demostra-

do con eficiencia la eliminación de metales pesados. La biolixiviación, aplicando este hongo, es más factible que los métodos químicos (Deng et al., 2013).

B)

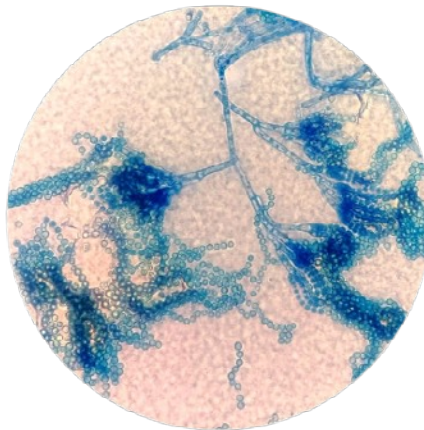


Figura 28. *Penicillium chrysogenum*. A) Imagen macroscópica, morfológicamente muestra textura polvorienta. B) Imagen microscópica de la especie.

Nombre científico: *Fusarium oxysporum*.

Número de acceso NCBI: PP464829.1

Fusarium oxysporum es un hongo filamentoso notable por sus características morfológicas distintivas. En cultivo, forma un micelio denso con hifas septadas que pueden ser hialinas o pigmentadas. Produce conidios en forma de huso, dispuestos en cadenas y varía en color, desde blanco hasta tonos de rosa o naranja, dependiendo de la cepa. Los conidios se desarrollan sobre conidióforos delgados

y largos, lo que facilita su dispersión. Aunque es conocido principalmente por su papel como patógeno, *Fusarium oxysporum* también se utiliza en estudios de genética y biotecnología debido a su capacidad para producir metabolitos secundarios y sus aplicaciones en la investigación sobre control biológico y resistencia a enfermedades.

A)



Aplicación en el área de biorremediación

Un reciente avance científico ha llevado al desarrollo de un compuesto híbrido revolucionario, conocido como [*F. oxysporum* /PSCO 11 Cu7]BNC, que combina nanopartículas de cobre con el hongo *Fusarium oxysporum*. Esta innovadora sustancia tiene la capacidad de eliminar simultáneamente contaminantes peligrosos, como metales pesados y pató-

genos microbianos, del agua residual. También ha demostrado ser capaz de eliminar metales pesados como plomo, cromo, zinc, cadmio y níquel del agua residual, lo que lo hace muy prometedor para su uso en la limpieza de aguas residuales y aplicaciones médicas (Shalaby et al., 2023).

B)

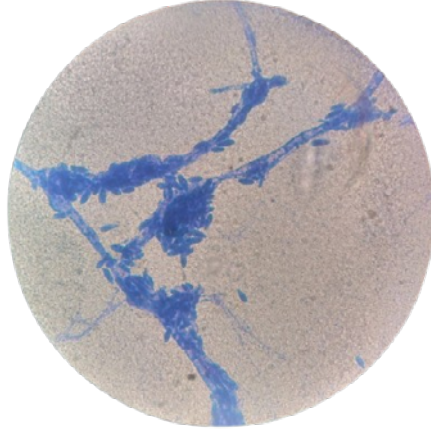


Figura 29. *Fusarium oxysporum*. A) Imagen macroscópica de *Fusarium oxysporum*. B) Imagen microscópica de *Fusarium oxysporum*.

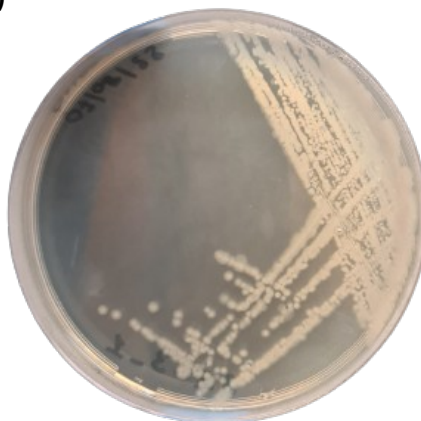
Nombre científico: *Pseudomonas fluorescens*.

Número de acceso NCBI: KF740573.1

Pseudomonas fluorescens es una bacteria importante en el campo de la biorremediación, debido a sus capacidades metabólicas versátiles y su habi-

lidad para degradar una amplia variedad de contaminantes ambientales (Khan, 2023).

A)



Aplicación en el área de biorremediación

Pseudomonas fluorescens puede degradar compuestos orgánicos complejos como hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), fenoles, pesticidas, e incluso compuestos sintéticos, como los PCBs (bifenilos policlorados). Esta capacidad la hace útil para limpiar suelos y aguas contaminadas con estos compuestos (Khan, 2023).

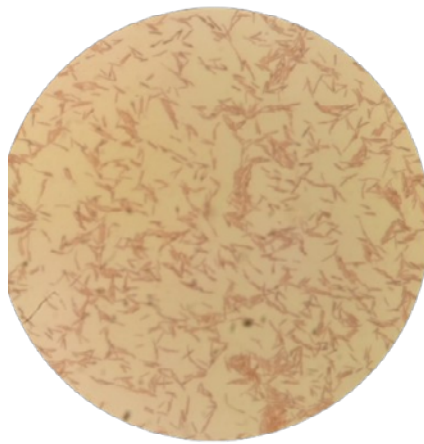


Figura 30. *Pseudomonas fluorescens*. A) Imagen macroscópica de *Pseudomonas fluorescens*. B) Imagen de tinción, los bacilos (bastones) son visibles y tienen una forma recta o ligeramente curvada.

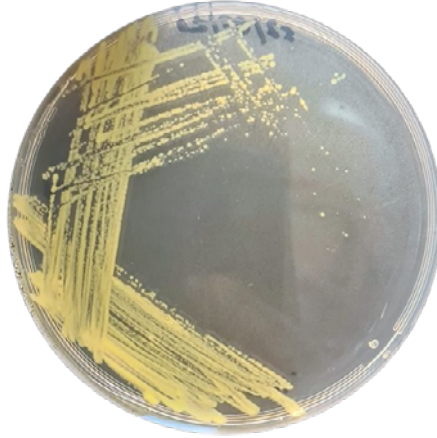
Nombre científico: *Micrococcus luteus*.

Número de acceso NCBI: FJ229461.1

Es una bacteria aeróbica estricta, lo que significa que requiere oxígeno para su crecimiento. Además, muestra una notable tolerancia a condiciones ambientales adversas, como variaciones en tempe-

ratura y salinidad, y tiene la capacidad de formar biopelículas, comunidades bacterianas adheridas a superficies que están rodeadas por una matriz extracelular (Letnik et al., 2017).

A)



Aplicación en el área de biorremediación

Micrococcus luteus puede tolerar cobre y tiene una capacidad de adsorción de hasta 59 mg de Cu^{2+} por gramo de células secas a pH 6. El cobre se acumula en la superficie y dentro de las células. Las células

encapsuladas en polímeros electrospun absorben más cobre, alcanzando 76 mg por gramo de células secas (Letnik et al., 2017).

B)



Figura 31. *Micrococcus luteus*. A) Imagen macroscópica de *Micrococcus luteus*. B) Imagen de tinción, bacteria Gram-positiva.

Microorganismos identificados en muestras de suelo Río Jatunyaku - Comunidad Yutzupino

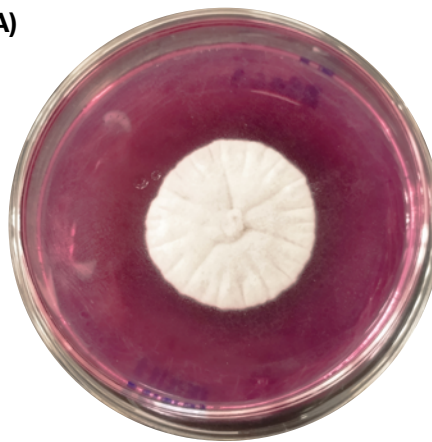
Nombre científico: *Aspergillus hiratsukae*.

Número de acceso: NCBI: MN347034.1

Aspergillus hiratsukae, también conocido como *Neosartorya hiratsukae*, fue descubierto en 1991 por Udagawa, Tsubouchi & Y. Horie (Schoch et

al., 2020). Estudios recientes demostraron que *A. hiratsukae* presenta una notable tolerancia a altas concentraciones de cobre (Palanivel et al., 2023).

A)



Esta capacidad de acumular cobre y responder de manera adaptativa a la contaminación lo convierte en un candidato prometedor para el desarrollo de

tecnologías de biorremediación de suelos contaminados por actividades mineras.

B)

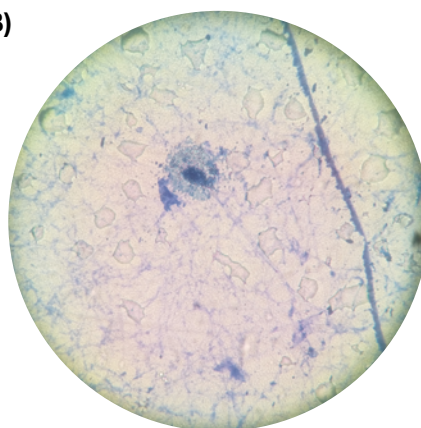


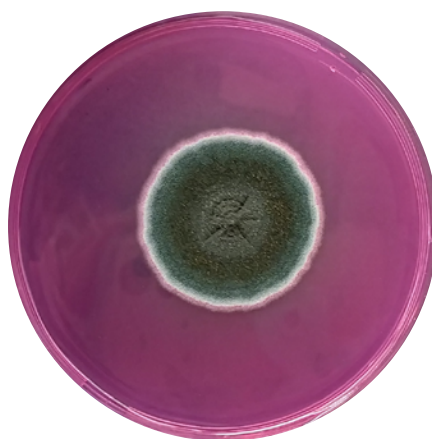
Figura 32. *Aspergillus hiratsukae* aislado de suelo minero y cultivado en medio Agar Rosa de Bengala. A) Macroscópicamente: Detalla una colonia circular de textura aterciopelada inicialmente blanca. B) Microscópicamente: Presencia de un conidióforo, vesícula y conidio.

Nombre científico: *Aspergillus sydowii*.
Número de acceso NCBI: MN250030.1

El hongo ascomiceto *Aspergillus sydowii* se destaca por su notable versatilidad ecológica y su potencial biotecnológico. A pesar de ser un predominantemente saprófito, ha demostrado una notable tole-

rancia a condiciones extremas, como altas salinidades, lo que le permite colonizar hábitats marinos (Alvarenga et al., 2014; Soler-Hurtado et al., 2016)

A)



Sus capacidades de degradación de compuestos orgánicos complejos, incluyendo pesticidas como el metil paratión y su tolerancia a metales pesados, como

el cadmio (Cd), lo posicionan como un microorganismo de gran interés en el campo de la biorremediación de suelos y aguas contaminadas (Teng et al., 2024).

B)

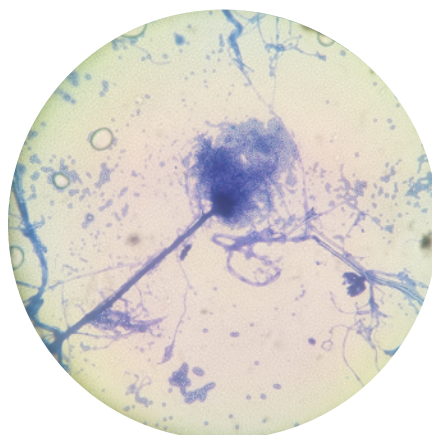


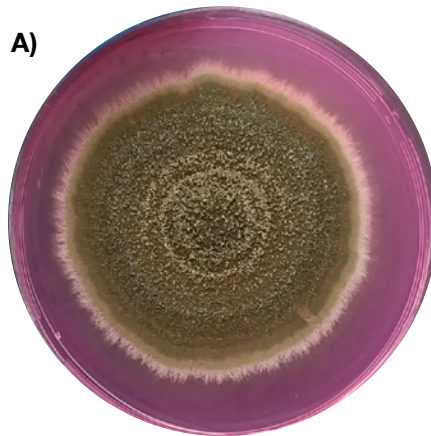
Figura 33. *Aspergillus sydowii* aislado de suelo minero y cultivado en medio de Agar Rosa de Bengala. A) Macroscópicamente: Detalla colonia de textura algodonosa, micelio de color verde oscuro y un halo externo de color blanco. B) Microscópicamente: Presencia de cadenas de conidios.

Nombre científico: *Aspergillus nidulans*.

Número de acceso NCBI: MT316339.1

Aspergillus nidulans es un hongo filamentoso que se reproduce de manera sexual y asexual formando conidios. *A. nidulans* se ha convertido en un orga-

nismo modelo en la investigación micológica (Li et al., 2024; Son & Park, 2024).



Además, *A. nidulans* ha demostrado una notable tolerancia a diversos metales pesados, como cromo (Cr^{6+}), plomo (Pb^{2+}), zinc (Zn^{2+}) y cobre (Cu^{2+}). Esta característica lo convierte en un candidato prome-

tedor para aplicaciones biotecnológicas, como la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados (Villalba-Villalba et al., 2022).

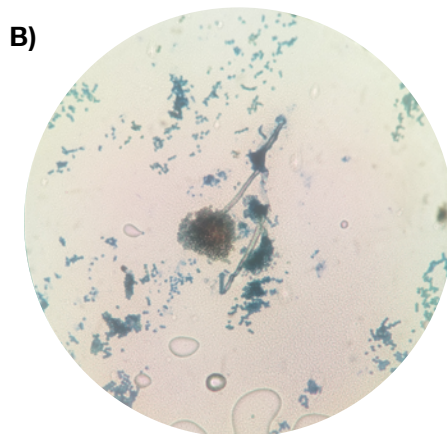


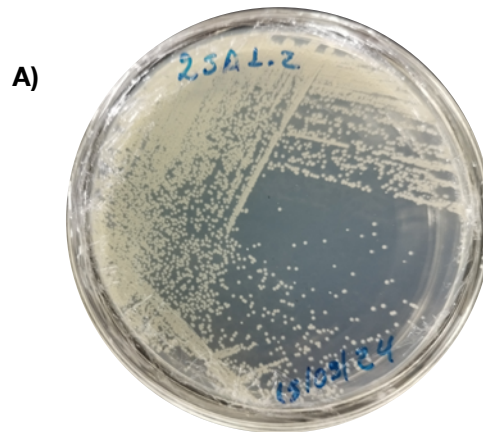
Figura 34. *Aspergillus nidulans* aislado de suelo minero y cultivado en medio de Agar Rosa de Bengala. A) Macroscópicamente: Micelio con textura filamentosa y bordes irregulares, apariencia verde-amarillenta y halo externo color crema. B) Microscópicamente: Presencia de un conidióforo corto, vesícula esférica parcialmente cubierta por conidios.

Nombre científico: *Streptomyces tendae*.

Número de acceso NCBI: MT071712.1

Streptomyces tendae es una actinobacteria Gram-positiva conocida por su amplia gama de aplicaciones biotecnológicas. No obstante, a pesar de

su importancia, la información genómica sobre esta especie es limitada (Eftekhariavash & Hamed, 2020).



Estudios previos han demostrado que ciertas especies de *Streptomyces* poseen una alta resistencia a metales pesados, como el níquel, y son capaces de biorremediar suelos contaminados con compuestos orgánicos persistentes, como el Lindano, y metales

pesados, como el cromo hexavalente, (Schmidt et al., 2009; Simón Solá et al., 2015). Estos hallazgos sugieren que *S. tendae* podría tener un gran potencial para aplicaciones en biotecnología y biorremediación.

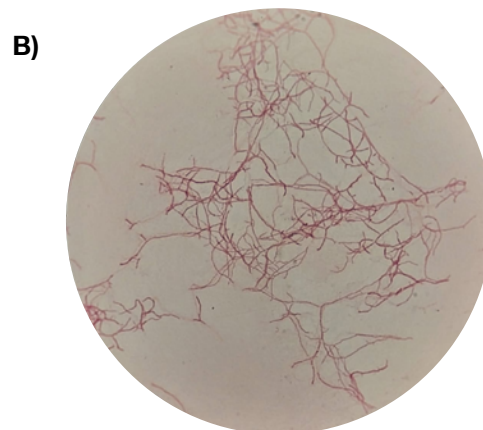


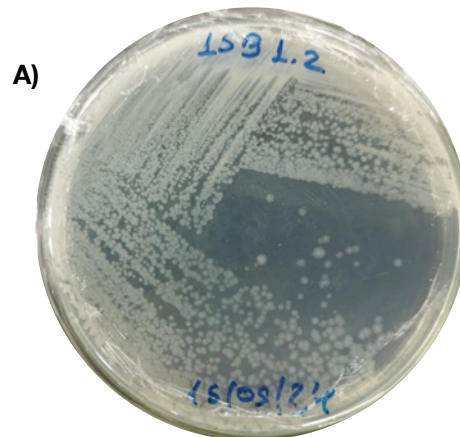
Figura 35. *Streptomyces tendae* aislado de suelo minero y cultivado en medio de agar nutritivo. A) Macroscópicamente: Colonias puntiformes de pigmentación cremosa. B) Microscópicamente: Presencia de hifas aéreas en forma de filamentos largos.

Nombre científico: *Peribacillus frigoritolerans*.

Número de acceso NCBI: MT605504.1

Peribacillus frigoritolerans es una bacteria Gram-positiva aislada de suelos y conocida por su capacidad de degradar plásticos como el PBAT (polibutileno

adipato-co-tereftalato), representa una herramienta biotecnológica versátil.



Si bien los estudios se han centrado principalmente en su capacidad para degradar plásticos (Wufuer et al., 2022), su capacidad para biorremediar otros contaminantes, como metales pesados, aún es desconocida. Dada su capacidad de adaptarse a dife-

rentes condiciones ambientales, *P. frigoritolerans* podría ofrecer una solución prometedora para abordar los desafíos ambientales actuales, incluyendo la contaminación por metales pesados.

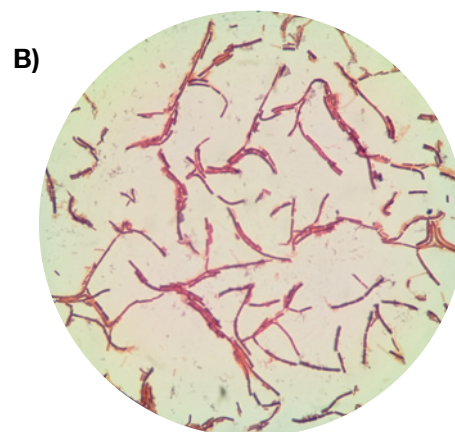


Figura 36. *Peribacillus frigoritolerans* aislado de suelo minero y cultivado en medio de agar nutritivo. A) Macroscópicamente: Colonias opacas de forma circular, color blanco cremoso. B) Microscópicamente: Presencia de bacilos Gram-positivos.



4.2 Biocontrol

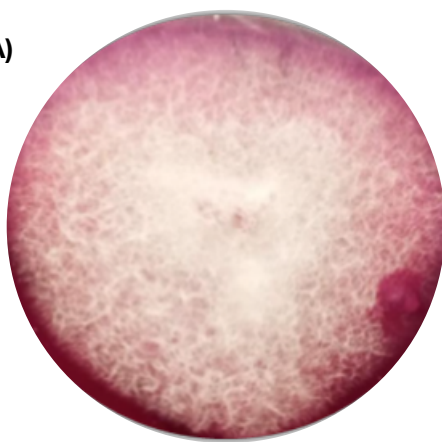
Nombre científico: *Fusarium pseudoanthophilum*.

Número de acceso NCBI: NR_163682.1

Fusarium pseudoanthophilum es un hongo que pertenece al género *Fusarium*. Entre los hongos entomopatógenos, *Fusarium* puede parasitar especies de muchos órdenes de insectos importantes, como

Coleoptera, Lepidoptera, Hemiptera y otros. Hay especies de *Fusarium* que pueden sintetizar metabolitos secundarios con acción insecticida, lo que ayuda al hongo a controlar su plaga objetivo.

A)



La beauvericina es un metabolito común en los entomopatógenos, con toxicidad para los insectos. Aunque los efectos potenciales de las especies entomopatógenas de *Fusarium* no se han estudiado a fondo todavía, el hecho de que los aislados de *Fusarium*

pueden causar una alta mortalidad de insectos es indiscutible. Además, existen ventajas de estos hongos en la especificidad del huésped y la seguridad hacia las plantas, ya que la capacidad de parasitar requiere adaptaciones específicas (Mantzoukas, 2022).

B)

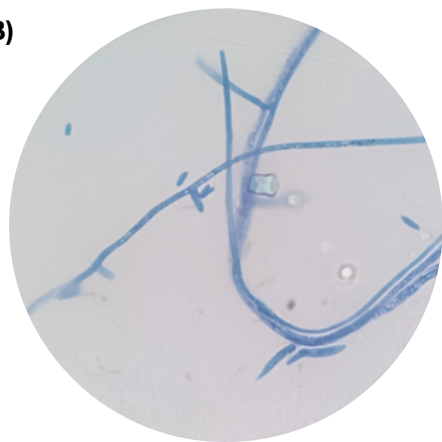


Figura 37. *Fusarium pseudoanthophilum* aislado de un insecto Lepidóptero. A) Macroscópicamente: Micelio de forma convexa con borde eroso de color blanquecino. B) Microscópicamente: hifas septadas, conidióforos con forma de microconidios.

Nombre científico: *Mucor irregularis*.

Número de acceso NCBI: MG751192.1

Mucor irregularis es un hongo que pertenece al género *Mucor*, este hongo ha sido encontrado en campos de petróleo crudo contaminados y también se

han reportado eficiencias de remoción de diversos tipos de hidrocarburos (Manchego Madueño, 2021).

A)



M. irregularis puede biodegradar hidrocarburos complejos, como el aceite de motor, en un por-

centaje de 56,67% a 66.70% (Enríquez Condori & Grimaldo Illanes, 2022).

B)

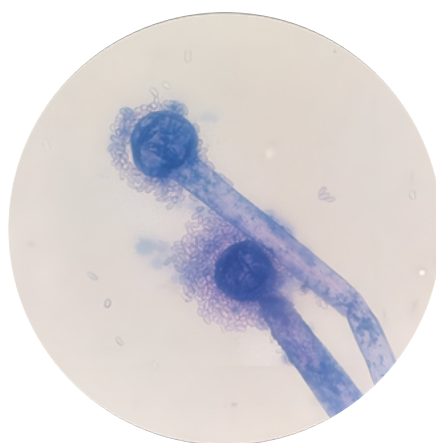


Figura 38. *Mucor irregularis* aislado de un Hemíptero. A) Macroscópicamente: Abundante micelio aéreo, de color blanco, con margen entero, algodonoso. B) Microscópicamente: conidióforo con vesícula y conidios ovalados.

Nombre científico: *Fusarium bambusarum*.

Número de acceso NCBI: NR_176146.1

Fusarium bambusarum es un hongo cuya especie pertenece al complejo de *Fusarium concolor* (Rana & Singh, 2023). En el complejo de *Fusarium con-*

color se han encontrado especies con cualidades insectívoras (O'Donnell et al., 2012), lo que lo hace un candidato como entomopatógeno.



Estos organismos se caracterizan por tener colonias blancas en PDA, con micelio aéreo denso; monofiálides aéreas, que dan lugar a microconidios en cabezas falsas, ovoides a fusoide-elipsoide, aseptadas; esporodoquios de color gris anaranjado

en agar hoja de clavel, con monofiálides que dan lugar a macroconidios falcados, ligeramente doblados con lados paralelos. Presentan clamidosporas terminales, globosas, que se vuelven rugosas y de paredes gruesas (Wang et al., 2022).

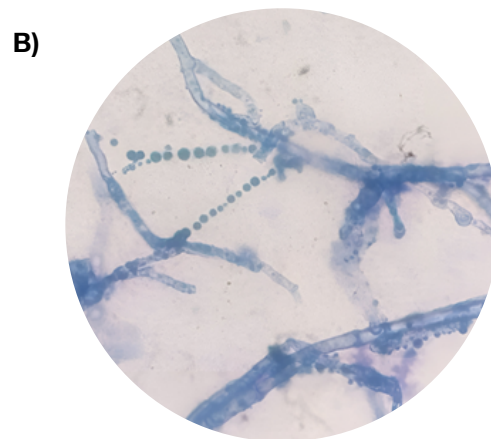


Figura 39. *Fusarium bambusarum* aislado de un Himenóptero. A) Macroscópicamente: micelio color blanco, elevado con margen entero, esponjoso. B) Microscópicamente) hifas septadas, clamidosporas.

Nombre científico: *Fusarium concolor*.
Número de acceso NCBI: MN193015.1

Fusarium concolor es una especie del hongo del género *Fusarium*, que se ha aislado de diversos hospedadores; en general, en insectos que pertenecen

al género Lepidópteros. También se han encontrado en Hemípteros y Nemata (O'Donnell et al., 2012).

A)



Aunque no se ha informado de que ningún miembro del complejo cause epidemias de enfermedades en cultivos o problemas de contaminación por micotoxinas, algunas cepas pueden producir

eniatinas, moniliforminas y micotoxinas, cuyos efectos sobre la salud humana y animal son poco conocidos (Geiser et al., 2021).

B)



Figura 40. *Fusarium concolor* aislado de un Himenóptero. A) Macroscópicamente: micelio bajo con borde cóncavo y algodonoso, borde fimbriado, de color blanquecino. B) Microscópicamente: Hifas septadas, conidios ovalados, clamidospora.



4.3 Salud

Nombre científico: *Mycobacteroides abscessus*

Número de acceso NCBI: KX982779.1

Microorganismo de rápido crecimiento, presenta una morfología de colonias rugosas o lisas y es clasificado en el grupo IV no cromógeno, de acuerdo a Runnyon. Es una de las especies de

micobacteria no tuberculosa (MNT) más frecuentemente identificadas en muestras ambientales y muestras clínicas (Johansen et al., 2020).

A)



Esta MNT es causante de enfermedades pulmonares graves, particularmente en pacientes con fibrosis quística e infecciones cutáneas, tejidos blandos que se asocian a procedimientos quirúrgicos (Victoria et al., 2021). Es conocida por ser una de las más resistentes a antibióticos; asimismo se carac-

teriza por formar biopelículas y su alta tolerancia a los desinfectantes comunes (Cristancho-Rojas et al., 2023a). Esta especie tuvo 100.00% de identidad y cobertura al ser comparada con la plataforma BLAST. Cuenta con 649pb.

B)

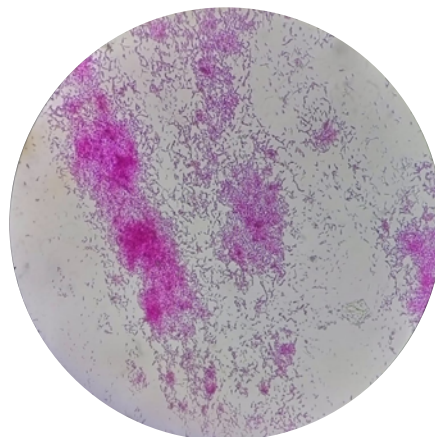


Figura 41. *Mycobacterium abscessus* aislada de muestras de agua de uso hospitalario. (A). Visualización macroscópica de la especie: colonias lisas y cremosas; no poseen pigmentación. (B) Visualización microscópica de la especie: bacilos ácido alcohol resistentes alargados.

Nombre científico: *Mycobacterium porcinum*-
Número de acceso NCBI: MK514296.1

Microbacteria que pertenece al complejo *Mycobacterium fortuitum*. Fue aislada por primera vez en 1973 de los ganglios linfáticos de cerdos con infección similar a la tuberculosis, y se la reconoció como cau-

sante de infección humana en 2004. Actualmente se ha encontrado en el medio ambiente, como en grifos de agua, el suelo y en pacientes inmunodeprimidos no graves (Cristancho-Rojas et al., 2023b).

A)



M. porcinum está asociado a infecciones clínicas con catéteres intravasculares, osteomielitis, celulitis, neumonitis, abscesos localizados e infección pulmonar y enfermedades cutáneas localizadas, y se han identificado infecciones sistémicas disemi-

nadas (Brown-Elliott et al., 2011; Paul et al., 2020). El porcentaje de identidad fue 99.82%, con una cobertura de 100% comparada en la plataforma BIAST con 994 pd.

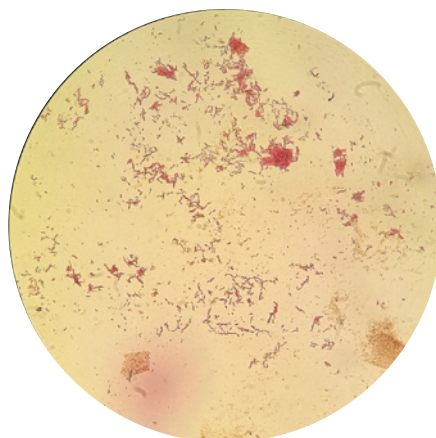


Figura 42. *Mycobacterium porcinum* aislada de muestras de agua de uso hospitalario. A) Visualización macroscópica de la especie: colonias rugosas con textura seca, no poseen pigmentación. B) Visualización microscópica de la especie: presencia de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR).

Nombre científico: *Mycobacterium fortuitum*

Número de acceso: MN559537.1

Micobacteria no tuberculosa perteneciente al grupo de crecimiento rápido. Posee la capacidad de proliferar en un periodo de 3 a 5 días en medios de cultivo, lo cual es relativamente rápido en comparación con otras micobacterias. *M. fortuitum* es un patógeno oportunista. Puede causar enfermedades

en individuos con sistemas inmunológicos debilitados, pacientes que presenten heridas expuestas a causa de traumatismos, cirugías plásticas, abscesos por iatrogenia, celulitis, peritonitis y bacteriemia relacionada con catéteres (Guerrero et al., 2015).

A)



Por otro lado, los sistemas de agua potable, que incluyen tuberías, grifos y sistemas de calefacción, pueden proporcionar un ambiente adecuado para que esta bacteria prolifere rápidamente (Khosravi et

al., 2016). Esta especie, al ser identificada y comparada con la plataforma bioinformática BLAST, obtuvo el 100% de identidad, mientras que el porcentaje de cobertura presentó una variación de 99-100%.

B)

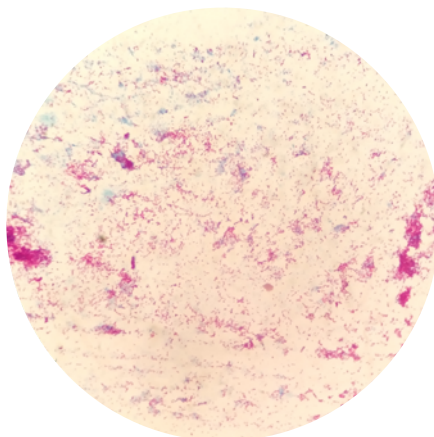


Figura 43. *Mycobacterium fortuitum* aislada de muestras de agua de uso hospitalario. A) Visualización macroscópica de la especie: colonias rugosas con textura seca. Los bordes son irregulares y no poseen pigmentación. B) Visualización microscópica de la especie: presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR).

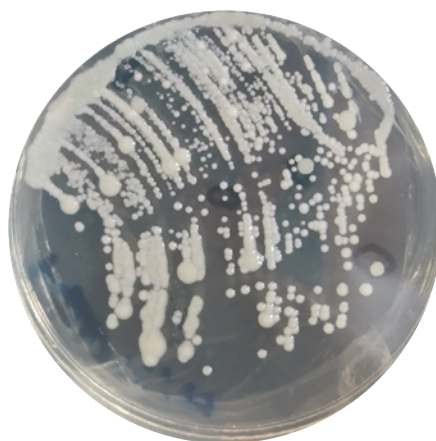
Nombre científico: *Mycobacterium chelonae*.

Número de acceso: QQ600714.1

Se caracteriza por formar colonias lisas y de textura cremosa. Se encuentra ampliamente distribuida en el medio ambiente, incluyendo el agua, el suelo y los sistemas de distribución de agua (García et al., 2002). Las infecciones causadas por esta bacteria pueden afectar la piel, los tejidos blandos y los huesos.

Además, los pacientes inmunocomprometidos que son sometidos a diversos procedimientos médicos como cirugías, hemodiálisis o que tienen dispositivos implantados, son particularmente vulnerables a las infecciones nosocomiales causadas por *M. chelonae* (Castro et al., 2007; Khosravi et al., 2016).

A)



La presencia de *Mycobacterium chelonae* en el agua es un problema, debido a su resistencia a desinfectantes y su capacidad para formar biopelículas, lo que permite que persista en grifos, duchas y otros equipos que utilizan agua (Dávalos et al.,

2021). Esta especie identificada fue comparada con las especies que se encuentran en la plataforma bioinformática BLAST y se obtuvo el 100% de porcentaje de identidad y cobertura; además cuenta con 673 pb en la secuencia.

B)

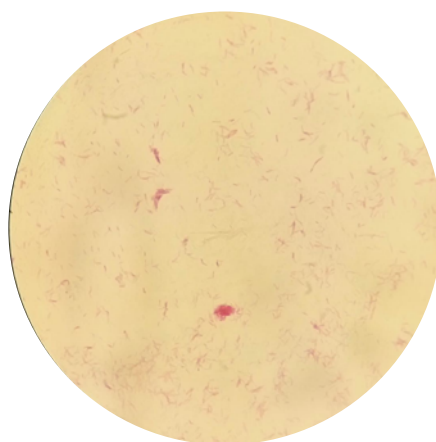


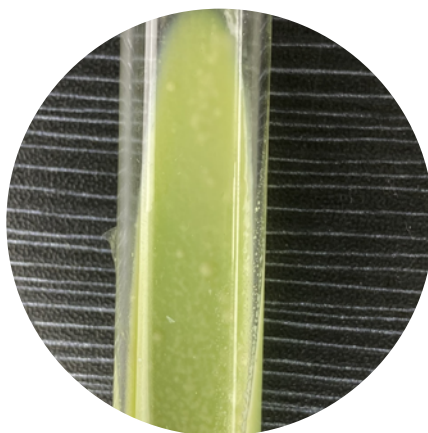
Figura 44. *Mycobacterium chelonae* aislada de muestras de agua de uso hospitalario. A) Visualización macroscópica de la especie: colonias lisas con textura cremosa; no poseen pigmentación y la distribución de las colonias en la placa es heterogénea. B) Visualización microscópica de la especie: presencia de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR).

Nombre científico: *Mycobacterium immunogenum*.
Número de acceso: MZ901369.1

Esta especie es de crecimiento relativamente rápido, no produce pigmentos, sus colonias suelen ser lisas, brillantes, de color blanco o crema (Wilson et al., 2001). *M. immunogenum* se ha aislado con frecuencia en ambientes hospitalarios en los sistemas de distribución de agua y se la ha asociado con la contaminación de equipos médicos, soluciones y el aire en unidades de cuidados intensivos (Baker et al., 2024).

Esta MNT produce una variedad de infecciones en humanos, incluyendo infecciones pulmonares, de piel y tejidos blandos (White, Kesterson y Wilkerson, 2018). Existen numerosos casos de infecciones relacionadas con catéteres intravenosos, especialmente en pacientes críticos, donde producen síntomas como inflamación de la vena en el sitio de la infusión, abscesos y/o sepsis (Shenoy et al., 2018).

A)



Esta especie, al ser identificada y comparada con la plataforma bioinformática BLAST, obtuvo el 100%

de identidad y de cobertura, además de contar con 1026 pb en la secuencia.

B)

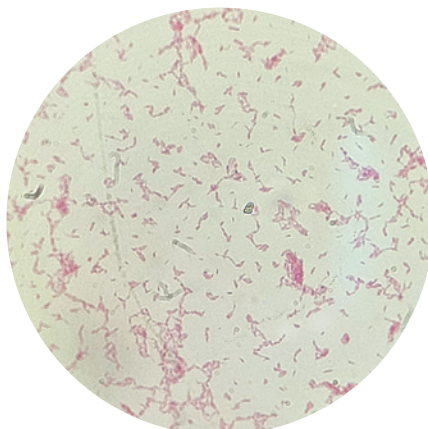


Figura 45. *Mycobacterium immunogenum* aislada de muestras de agua residual tratada. A) Visualización macroscópica de la especie: colonias lisas con textura cremosa. No poseen pigmentación y la distribución de las colonias en la placa es heterogénea. B) Visualización microscópica de la especie: presencia de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR).

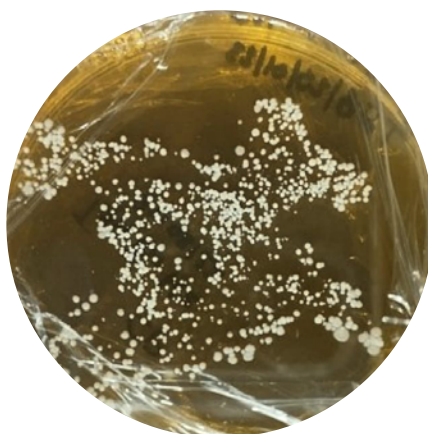
Nombre científico: *Mycobacterium mucogenicum*.

Número de acceso: KU686939.1

Este tipo de micobacteria se encuentra comúnmente en el agua potable y es parte del grupo de crecimiento rápido predominante en las infecciones humanas. Ha sido relacionada con brotes de infecciones en hospitales, especialmente en pacientes sometidos a diálisis, así como con infecciones originadas por catéteres intravenosos, infecciones del

sistema nervioso central, respiratorias o de piel y tejidos blandos, así como con bacteriemia e infecciones que se extienden por el cuerpo (García-Martos & García-Agudo, 2012). Las especies del grupo *M. mucogenicum* generalmente responden bien a la amikacina, claritromicina, cefoxitina, quinolonas, imipenem y linezolid (Adékambi, 2009).

A)



Esta especie, al ser identificada y comparada con la plataforma bioinformática BLAST, obtuvo el 99.81 %

de identidad, mientras que el porcentaje de cobertura presentó una variación de 100%.

B)

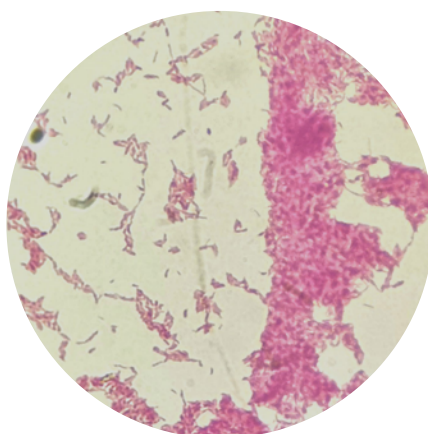


Figura 46. *Mycobacterium mucogenicum* aislada de muestras de agua residual tratada. A) Visualización macroscópica de la especie: colonias lisas de coloración blanca. No poseen pigmentación y la distribución de las colonias en la placa es heterogénea. B) Visualización microscópica de la especie: presencia de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR).



Conclusiones

Esta obra ha logrado compilar y presentar, de manera exhaustiva, una serie de metodologías innovadoras utilizadas en el proyecto “MicroImpact: Un microcosmos por descubrir”. Estas metodologías abarcan desde el aislamiento hasta la identificación de microorganismos con potencial uso en biorremediación, biocontrol y salud. Los resultados obtenidos son de gran importancia para contribuir con el entendimiento y manejo de la diversidad microbiana en la región amazónica y áreas de alto impacto ambiental.

El enfoque integral y multidisciplinario, que se ha llevado a cabo, resalta el valor de los estudios realizados para la mitigación de problemas ambientales y la mejora de la salud pública, especialmente bajo el concepto de “Una Sola Salud” (One Health). Este enfoque reconoce la interconexión entre la salud humana, animal y ambiental, reforzando la necesidad de abordar estos desafíos de manera conjunta.

El conocimiento generado y las técnicas detalladas en este libro son de singular importancia, no solo para la región amazónica, sino también como un modelo replicable en otros ecosistemas globales

que enfrentan desafíos similares. La Amazonía, con su biodiversidad única, es un escenario ideal para la implementación y evaluación de estas metodologías que conllevan a identificar microorganismos con gran potencial en bioprocesos y en la salud, lo que refuerza la relevancia de este trabajo en la protección de uno de los ecosistemas más críticos del planeta.

Es pertinente encaminar a las futuras investigaciones para continuar desarrollando y perfeccionando metodologías emergentes, adaptándolas a diferentes contextos geográficos y ambientales, tal como puede llevarse a cabo con tecnologías promisorias como Mini Ion implementadas en ecosistemas *in situ*. Asimismo, se sugiere la creación de manuales y guías prácticas basadas en las técnicas presentadas en este libro, con el fin de facilitar su implementación por parte de investigadores y profesionales en diversas disciplinas. Al hacerlo, se podrá ampliar el impacto positivo en la salud pública y la sostenibilidad ambiental a nivel global.



Glosario y descripción de términos

1.Absorbancia: Medida de la cantidad de luz que es absorbida por una muestra, utilizada en biología molecular y bioquímica para determinar la concentración de ADN, ARN, proteínas y otros compuestos en una solución.

2.Agar Listeria: Medio de cultivo selectivo, diseñado para el aislamiento y crecimiento de bacterias del género *Listeria*, comúnmente utilizado en estudios de microbiología para identificar patógenos en muestras ambientales y alimentarias.

3.Agar MacConkey: Medio de cultivo diferencial y selectivo que se usa para el aislamiento de bacterias Gram-negativas, particularmente de la familia *Enterobacteriaceae*. Permite diferenciar entre bacterias fermentadoras y no fermentadoras de lactosa.

4.Agar Rosa de Bengala: Medio de cultivo utilizado principalmente para el aislamiento de hongos. Este medio es selectivo debido a la presencia de Rosa de Bengala, que inhibe el crecimiento de bacterias y favorece el desarrollo de hongos.

5.Agua Potable: Agua que ha sido tratada y purificada para ser segura para el consumo humano. Es esencial para la salud pública y su calidad es regulada por estándares internacionales.

6.Aguas Residuales: Aguas que han sido utilizadas en actividades domésticas, industriales o comerciales y que contienen contaminantes. Estas aguas requieren tratamiento antes de ser vertidas en el medio ambiente para evitar la contaminación.

7.Aislamiento de Microorganismos: Proceso que consiste en separar y cultivar microorganismos específicos de una mezcla compleja, utilizando técnicas y medios de cultivo adecuados para su crecimiento y análisis.

8.Análisis Molecular: Conjunto de técnicas que permiten estudiar las características genéticas de los microorganismos, como la secuenciación de ADN, para identificar y clasificar especies a nivel molecular.

9.Aspergillus: Género de hongos filamentosos, algunos de los cuales son importantes en la industria por su capacidad para producir enzimas y metabolitos útiles, mientras que otros son conocidos patógenos o se utilizan en biorremediación.

10.Bacilos Ácido-Alcohol Resistentes (BAAR): Tipo de bacterias que retienen la tinción de fucsina básica incluso después de la decoloración con ácido-alcohol. Son características de micobacterias, incluyendo *Mycobacterium tuberculosis* y otras especies no tuberculosas.

11.Biocontrol: Estrategia que utiliza organismos vivos, como hongos entomopatógenos y bacterias, para controlar plagas y enfermedades en la agricultura, reduciendo el uso de pesticidas químicos y protegiendo el medio ambiente.

12.Biorremediación: Proceso biotecnológico en el cual se utilizan organismos vivos, principalmente microorganismos, para degradar o transformar contaminantes ambientales en productos menos tóxicos o inofensivos.

13.Biorremediador: Microorganismo o conjunto de microorganismos utilizados en procesos de biorremediación para degradar o transformar contaminantes presentes en suelos, aguas o atmósfera, contribuyendo a la limpieza ambiental.

14.Capacidades Metabólicas: Habilidades que poseen los microorganismos para llevar a cabo procesos bioquímicos que les permiten obtener energía y sintetizar compuestos esenciales a partir de diversos sustratos.

15.Cloruro de Hexadecilpiridinio (HPC): Agente desinfectante y descontaminante utilizado en microbiología para tratar muestras antes de su análisis, eliminando contaminantes no deseados mientras preserva los microorganismos objetivos.

16.Colonias Bacterianas: Agrupaciones visibles de bacterias que crecen en medios de cultivo sólidos, cada una originada a partir de una célula individual. Las características morfológicas de las colonias, como color, forma y textura, son importantes para la identificación de especies.

17.Cultivo Axénico: Cultivo de un solo tipo de microorganismo sin la presencia de otros organismos, asegurando que el microorganismo en estudio esté aislado y no contaminado por otros microorganismos.

18.Criopreservación: Técnica de almacenamiento a largo plazo de microorganismos, tejidos o células a temperaturas extremadamente bajas, utilizando agentes crioprotectores como el glicerol para prevenir la formación de cristales de hielo que puedan dañar las células.

19.Diluciones Seriadas: Método utilizado para disminuir la concentración de microorganismos en una muestra, facilitando su conteo y aislamiento en medios de cultivo. Se realizan mediante la adición secuencial de una muestra en una serie de diluyentes.

20.Electroforesis en Gel de Agarosa: Técnica utilizada en biología molecular para separar fragmentos de ADN según su tamaño, permitiendo su análisis después de la amplificación mediante PCR.

21.Filtración de Membrana: Técnica de laboratorio que emplea membranas porosas para atrapar microorganismos presentes en una muestra líquida. Este método se utiliza para concentrar los microorganismos antes de su cultivo o análisis.

22.Fusarium: Género de hongos que incluye especies con aplicaciones en agricultura y biotecnología. Algunos son patógenos de plantas, mientras que otros tienen potencial en biocontrol y biorremediación.

23.Hifa: Filamento que forma parte del micelio de los hongos. Las hifas son esenciales para la absorción de nutrientes y el crecimiento del hongo en su entorno.

24.Medio de Cultivo: Sustancia que proporciona los nutrientes necesarios para el crecimiento y multiplicación de microorganismos en un entorno controlado. Los medios de cultivo pueden ser líquidos, sólidos o semisólidos y pueden ser selectivos o diferenciales dependiendo de su composición.

25.Micelio: Red de hifas que constituye la estructura vegetativa de los hongos. Es crucial para la absorción de nutrientes y el crecimiento del hongo en diferentes entornos.

26.Micobacterias: Género de bacterias que incluye especies patógenas como *Mycobacterium tuberculosis* y otras especies no tuberculosas que pueden causar infecciones en humanos y animales, especialmente en individuos inmunocomprometidos.

27.Método Sanger: Técnica de secuenciación de ADN que permite determinar el orden exacto de los nucleótidos en un fragmento de ADN. Es uno de los métodos más utilizados para secuenciar genes y genomas completos.

28.Nitrocelulosa: Material utilizado en membranas de filtración para capturar microorganismos de muestras líquidas, permitiendo su análisis posterior. Es ampliamente utilizado en microbiología y biotecnología.

29.PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa): Técnica de biología molecular que permite la amplificación de fragmentos específicos de ADN, facilitando la identificación y estudio de microorganismos a nivel genético.

30.Plantas de Tratamiento: Instalaciones diseñadas para limpiar y purificar aguas residuales antes de su vertido en el medio ambiente. Estas plantas utilizan procesos físicos, químicos y biológicos para eliminar contaminantes.

31.Pruebas Bioquímicas: Conjunto de pruebas de laboratorio utilizadas para identificar microorganismos basándose en sus capacidades metabólicas, como la producción de enzimas o la fermentación de azúcares.

32.Primer (Cebador): Secuencia corta de ADN o ARN que se utiliza como punto de inicio para la síntesis de una nueva cadena de ADN en la PCR o en otras técnicas de secuenciación.

33.Secuenciación: Proceso mediante el cual se determina la secuencia de nucleótidos en un fragmento de ADN o ARN. Es fundamental para identificar la estructura genética de un organismo y estudiar sus características genéticas.

34.Similitud de Identidad: Medida utilizada en bioinformática para comparar secuencias genéticas, indicando el porcentaje de coincidencia entre la secuencia de un organismo y una secuencia de referencia en bases de datos genéticos.

35.Tinción de Gram: Técnica de tinción diferencial utilizada en microbiología para clasificar bacterias en Gram-positivas y Gram-negativas, basándose en las características de su pared celular.

36.Tinción de Ziehl-Neelsen: Técnica especializada para detectar bacterias ácido-alcohol resistentes, como las micobacterias, mediante la aplicación de calor y colorantes específicos que permiten diferenciar estas bacterias de otras especies.

37.Trichoderma: Género de hongos conocido por su capacidad como agente biocontrolador en la agricultura, compitiendo con otros hongos patógenos y promoviendo la salud de las plantas.

38.TSA (Tryptic Soy Agar): Medio de cultivo general utilizado para el cultivo de una amplia variedad de microorganismos, proporcionando un entorno nutritivo adecuado para su crecimiento.

39.Una Sola Salud (One Health): Enfoque integrador que reconoce la interconexión entre la salud humana, animal y ambiental, promoviendo estrategias colaborativas para mejorar la salud pública global.



90mm

Bibliografía

- Ahmad, W., Alharthy, R. D., Zubair, M., Ahmed, M., Hameed, A., & Rafique, S. (2021). Toxic and heavy metals contamination assessment in soil and water to evaluate human health risk. *Scientific Reports* 2021 11:1, 11 (1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94616-4>.
- Adékambi T. (2009). *Mycobacterium mucogenicum* group infections: a review. Clin Microbiol Infect.15:911-8.
- Adékambi, T., Colson, P., & Drancourt, M. (2006). rpoB-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3), 826-829. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.3.826-829.2006>
- Alvarenga, N., Birolli, W. G., Seleglim, M. H. R., & Porto, A. L. M. (2014). Biodegradation of methyl parathion by whole cells of marine-derived fungi *Aspergillus sydowii* and *Penicillium decaturense*. *Chemosphere*, 117, 47-52.
- Arteta, A. A., Arias, L. F., & Cadavid, C. E. (2022). Ziehl-Neelsen stain in the pathology laboratory: Performance and diagnostic aid for mycobacteria in bronchoalveolar lavage. *Biomédica*, 42 (3), 460-469.
- Baker, A. W., Nick, S. E., Jia, F., Graves, A. M., Warren, B. G., Zavala, S., Stout, J. E., Lee, M. J., Alexander, B. D., Davidson, R. M., & Anderson, D. J. (2024). *Mycobacterium immunogenum* acquisition from hospital tap water: a genomic and epidemiologic analysis. *Journal of clinical microbiology*, 62 (6), e0014924. <https://doi.org/10.1128/jcm.00149-24>
- Brown-Elliott, B. A., Wallace Jr, R. J., Tichindelean, C., Sarria, J. C., McNulty, S., Vasireddy, R., Bridge, L., Mayhall, C. G., Turenne, C., & Loeffelholz, M. (2011). Five-year outbreak of community-and hospital-acquired *Mycobacterium porcinum* infections related to public water supplies. *Journal of Clinical Microbiology*, 49 (12), 4231-4238.
- Cabello-Vílchez, A. M., & Núñez-Ato, R. G. (2018). Aislamiento y caracterización molecular de micobacterias no tuberculosas en el sistema de distribución de agua en un hospital de Lima (Perú). *Biosalud*, 17 (2), 7-24.
- Capparelli, M. V., Cabrera, M., Rico, A., Lucas-Solis, O., Alvear-S, D., Vasco, S., Galarza, E., Shiguango, Lady, Pinos-Velez, V., Pérez-González, A., Espinosa, R., & Moulatlet, G. M. (2021). An integrative approach to assess the environmental impacts of gold mining contamination in the amazon. *Toxics*, 9 (7), 149. <https://doi.org/10.3390/TOXICS9070149/S1>
- Castellano Realpe, O. J., Gutiérrez, J. C., Sierra, D. A., Pazmino Martinez, L. A., Prado Palacios, Y. Y., Echeverría, G., & de Waard, J. H. (2020). Dental Unit Waterlines in Quito and Caracas contaminated with Nontuberculous Mycobacteria: A potential health risk in dental practice. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17 (7), 2348.
- Castro, C. M., Puerto, G., García, L. M., Orjuela, D. L., Polo, C. L., Garzón, M. C., & Ribón, W. (2007). Identificación molecular de micobacterias no tuberculosas mediante el análisis de los patrones de restricción, Colombia 1995-2005. *Biomédica*, 27 (3), 439-446.

- Chauhan, A., Jindal, T., Chauhan, A., & Jindal, T. (2020). Microbiological culture media: types, role and composition. *Microbiological Methods for Environment, Food and Pharmaceutical Analysis*, 23–66.
- Corporación de Asociaciones de la Chakra Amazónica. (2022). *La Chakra Amazónica, un sistema agroforestal tradicional gestionado por comunidades indígenas en la provincia de Napo - Ecuador*.
- Corral-Lugo, A., Morales-García, Y. E., Pazos-Rojas, L. A., Ramírez-Valverde, A., Martínez-Contreras, R. D., & Muñoz-Rojas, J. (2012). Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de "Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo". *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14 (2), 147-156.
- Cristancho-Rojas, C., Varley, C. D., Lara, S. C., Kherabi, Y., Henkle, E., & Winthrop, K. L. (2023a). Epidemiology of *Mycobacterium abscessus*. *Clinical Microbiology and Infection*.
- Cristancho-Rojas, C., Varley, C. D., Lara, S. C., Kherabi, Y., Henkle, E., & Winthrop, K. L. (2023b). Epidemiology of *Mycobacterium abscessus*. *Clinical Microbiology and Infection*.
- Dávalos, A. F., García, P. K., Montoya-Pachongo, C., Rengifo, A., Guerrero, D., Díaz-Ordoñez, L., Díaz, G., & Ferro, B. E. (2021). Identification of nontuberculous mycobacteria in drinking water in Cali, Colombia. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18 (16), 8451.
- de los Santos-Villalobos, S., Guzmán-Ortiz, D. A., Gómez-Lim, M. A., Délano-Frier, J. P., de Folter, S., Sánchez-García, P., & Peña-Cabriales, J. J. (2013). Potential use of *Trichoderma asperellum* (Samuels, Liechfeldt et Nirenberg) T8a as a biological control agent against anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.). *Biological Control*, 64 (1), 37-44.
- Domenech, A., Jiménez, M. A., Gallego, M., Ferrer, M. D., & Fernández, T. (2007). *Mycobacterium chelonae* infections after breast implant surgery. *Journal of Hospital Infection*, 66(4), 399-401. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2007.06.016>
- Dufau, G. I. G., Monzón, A., Guerra, J. S., Santo, U., Caballero, S., Castrejon, K., & Sanjur, M. (2021). Caracterización morfofisiológica y molecular de hongos entomopatógenos asociados a *Hypothenemus hampei* en áreas cafetaleras de la comarca Ngäbe-Buglé. *La Calera*, 21 (36).
- Eftekhariavash, L., & Hamed, J. (2020). Genome sequence and annotation of *Streptomyces tendae* UTM 3329, acid and alkaline tolerant actinobacterium. *Iranian Journal of Microbiology*, 12 (4), 343.
- Enríquez Condori, F. de M., & Grimaldo Illanes, A. Á. (2022). *Revisión sistemática: biorremediación de aguas residuales industriales contaminadas con hidrocarburos*.
- Finck, J., Lange, D. F., Quesada, B., Portela, B. T. T., Ferreira, S. J. F., Andreote, F. D., Kothe, E., and Gleixner, G. (2024). Seasonal drought reduces microbial diversity and functional richness in the Amazon, EGU General Assembly 2024, Vienna, Austria, 14-19 Apr 2024, EGU24-11089, <https://doi.org/10.5194/egusphere-egu24-11089>.

- Flores, T., Santos Triunfo, M., & Espinoza, L. (2019). *Actividad biológica de hongos entomopatógenos sobre Gorgojo de los Andes (coleoptera: Curculionidae) bajo condiciones Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas. Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias. Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma. Tesis para obtener el título profesional de Ingeniero Agrónomo.*
- Fierer, N., Bradford, M. A., & Jackson, R. B. (2011). "Toward an ecological classification of soil bacteria." *Ecology*, 92 (2), 260-272.
- Galarza, E., Moulatlet, G. M., Rico, A., Cabrera, M., Pinos-Velez, V., Pérez-González, A., & Capparelli, M. V. (2023). Human health risk assessment of metals and metalloids in mining areas of the Northeast Andean foothills of the Ecuadorian Amazon. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 19 (3), 706-716. <https://doi.org/10.1002/IEAM.4698>.
- García-Martos, P., & García-Agudo, L. (2012). Infecciones por micobacterias de crecimiento rápido. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30 (4), 192-200.
- Gebert, M. J., Delgado-Baquerizo, M., Oliverio, A. M., Webster, T. M., Nichols, L. M., Honda, J. R., Chan, E. D., Adjemian, J., Dunn, R. R., & Fierer, N. (2018). Ecological analyses of mycobacteria in showerhead biofilms and their relevance to human health. *MBio*, 9(5), 10–1128.
- Geiser D. M., Al-Hatmi A., Aoki. (2021). Phylogenomic analysis of a 55.1 kb 19-gene dataset resolves a monophyletic *Fusarium* that includes the *Fusarium solani* Species Complex. *Phytopathology*, 111: 1064-1079.
- Gira, A. K., Reisenauer, A. H., Hammock, L., & Nadi-minti, H. (2004). Furunculosis due to *Mycobacterium mageritense* associated with footbaths at a nail salon. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (4), 1813-1815. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.4.1813-1815.2004>
- Graterol, O. A., Barreto, M. E., Ramos, N. A., Fernández, S., Da Mata, O. J., & Angulo, J. A. (2016). Diseño del Kit de Tinción Ziehl Neelsen del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. *Revista Del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 47 (1-2), 18-26.
- Hidalgo Mata, D. A. (2019). *Desarrollo de una metodología de peletización para Beauveria bassiana con insumos peruanos.*
- Iwu, C. D., & Okoh, A. I. (2020). Characterization of antibiogram fingerprints in *Listeria monocytogenes* recovered from irrigation water and agricultural soil samples. *PLoS One*, 15 (2), e0228956.
- Jaimes, J. R., Giraldo-Chavez, J., Huyhua-Flores, Y., & Caceres-Nakiche, T. (2018). *Mycobacteria* identification in solid culture by inverted phase microscopy and Ziehl-Neelsen stain. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 35 (2), 279–284.
- Jepson, P. C., Guzy, M., Blaustein, K., Sow, M., Sarr, M., Mineau, P., & Kegley, S. (2014). Measuring pesticide ecological and health risks in West African agriculture to establish an enabling environment for sustainable intensification. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369 (1639). <https://doi.org/10.1098/RSTB.2013.0491>

- Johansen, M. D., Herrmann, J.-L., & Kremer, L. (2020). Non-tuberculous mycobacteria and the rise of *Mycobacterium abscessus*. *Nature Reviews Microbiology*, 18 (7), 392-407.
- Khan, M. W. A. (2023). Bioremediation potential of *Pseudomonas fluorescens* strain isolated from the Ha region of Saudi Arabia. *Bioinformation*, 19 (9), 901-907. <https://doi.org/10.6026/97320630019901>.
- Khosravi, A. D., Hashemi Shahraki, A., Hashemzadeh, M., Sheini Mehrabzadeh, R., & Teimoori, A. (2016). Prevalence of non-tuberculous mycobacteria in hospital waters of major cities of Khuzestan Province, Iran. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6, 42.
- Koentjoro, M. P., Donastin, A., & Prasetyo, E. N. (2021). A simple method of DNA extraction of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum cultures for sequencing analysis. *African Journal of Infectious Diseases*, 15 (2), 19-22.
- León-Landa, CA., & Aguillón-García, EA.. (2017). Micobacteriosis pulmonar por *Mycobacterium abscessus*. *Medicina interna de México*, 33(6), 835-840. <https://doi.org/10.24245/mim.v33i6.1420>
- Letnik, I., Avrahami, R., Port, R., Greiner, A., Zussman, E., Rokem, J. S., & Greenblatt, C. (2017b). Biosorption of copper from aqueous environments by *Micrococcus luteus* in cell suspension and when encapsulated. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 116, 64-72. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.09.029>
- Li, Q., Fu, A., Dong, J., Xiao, Y., Dai, B., Wei, M., Huang, Z., Liu, J., Chen, C., & Zhu, H. (2024). Three new Furano-lactones from the endophytic fungus *Aspergillus nidulans*. *Fitoterapia*, 173, 105790.
- Li, C., Cui, C., Zhang, J., Shen, J., Boayan, H., Long, Y. & Ye, J. (2023). Biodegradation of petroleum hydrocarbons-based pollutants in contaminated soil by exogenous effective microorganisms and indigenous microbiome. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 253: 114673. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114673>.
- Lobo, C. B., Molina, R. D., Mochi, P., Vargas J. M., Jure M. A. & Juárez M. S. (2024). Safety attributes of *Pseudomonas* sp. P26, an environmental microorganism with potential application in contaminated environments. *Environmental Pollution*, 348. 123818. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123818>.
- Manchego Madueño, H. D. (2021). *Bacteria Bacillus safensis en la degradación sobre hidrocarburos (gasolina) en laboratorio Arequipa 2021*.
- Moore, M., y Frerichs, J. B. (1953). An unusual acid-fast infection of the knee with subcutaneous, abscess-like lesions of the gluteal region; report of a case with a study of the organism, *Mycobacterium abscessus*, n. sp. *The Journal of investigative dermatology*, 20(2), 133–169. <https://doi.org/10.1038/jid.1953.18>
- Nessar, R., Cambau, E., Reytrat, J. M., Murray, A., y Gicquel, B. (2012). *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(4), 810–818. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr578>
- O'Donnell, K., Humber, R. A., Geiser, D. M., Kang, S., Park, B., Robert, V. A. R. G., Crous, P. W., Johnston, P. R., Aoki, T., & Rooney, A. P. (2012). Phylogenetic diversity of insecticolous fusaria inferred from multilocus

- DNA sequence data and their molecular identification via FUSARIUM-ID and *Fusarium* MLST. *Mycologia*, **104** (2), 427-445.
- Palanivel, T. M., Pracejus, B., & Novo, L. A. B. (2023). Bioremediation of copper using indigenous fungi *Aspergillus* species isolated from an abandoned copper mine soil. *Chemosphere*, **314**, 137688.
- Paul, G. R., Leber, A., Nemastil, C. J., Novak, K. J., Brady, M., Stack-Simone, S., Greninger, A. L., & Antonara, S. (2020). Identification of *Mycobacterium porcinum* in patients with cystic fibrosis: pathogen or contaminant? *Journal of Cystic Fibrosis*, **19** (4), 580-586.
- Peay, K. G., Schubert, M. G., & Miller, S. L. (2010). "Groundbreaking methods: Microbial ecology in the Amazon." *Frontiers in Microbiology*, **1**, 1-7.
- Rana, S., & Singh, S. K. (2023). Insights into the genomic architecture of a newly discovered endophytic *Fusarium* species belonging to the *Fusarium* concolor complex from India. *Frontiers in Microbiology*, **14**, 1266620.
- Sanders, E. R. (2012). Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, **63**, e3064. <https://doi.org/10.3791/3064>
- Schmidt, A., Haferburg, G., Schmidt, A., Lischke, U., Merten, D., Ghergel, F., Büchel, G., & Kothe, E. (2009). Heavy metal resistance to the extreme: *Streptomyces* strains from a former uranium mining area. *Geochemistry*, **69**, 35-44.
- Schoch, C. L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., McVeigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: A comprehensive update on curation, resources and tools. *Database*, **2020**. <https://doi.org/10.1093/DATABASE/BAAA062>.
- Shenoy, A., El-Nahal, W., Walker, M., Chopra, T., Townsend, G., Heysell, S., & Eby, J. (2018). Management of a *Mycobacterium immunogenum* infection of a peritoneal dialysis catheter site. *Infection*, **46**(6), 875-880. <https://doi.org/10.1007/s15010-018-1199-0>.
- Simón Solá, M. Z., Aparicio, J. D., & Polti, M. A. (2015). *Aplicación de Streptomyces sp. M7 para la remediación de suelos: Influencia de parámetros físicos, químicos y biológicos en la remoción de Cr (VI) y lindano*. Editorial Académica Española.
- Smith, D., Ryan, M. J., & Jermini, M. (2017). *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols* (3rd ed.). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6964-7_6.
- Soler-Hurtado, M. M., Sandoval-Sierra, J. V., Machordom, A., & Diéguez-Urbeondo, J. (2016). *Aspergillus sydowii* and other potential fungal pathogens in gorgonian octocorals of the Ecuadorian Pacific. *PLoS One*, **11** (11), e0165992.
- Son, Y.-E., & Park, H.-S. (2024). Coordination of two regulators SscA and VosA in *Aspergillus nidulans* conidia. *Fungal Genetics and Biology*, **171**, 103877.
- Teng, Y., Yang, Y., Wang, Z., Guan, W., Liu, Y., Yu, H., & Zou, L. (2024). The cadmium tolerance enhancement through regulating glutathione conferred by vacuolar compartmentalization in *Aspergillus sydowii*. *Chemosphere*, **352**, 141500.

- Torres, B., Maza, O. J., Aguirre, P., Hinojosa, L., & Günter, S. (2015). The Contribution of Traditional Agroforestry to Climate Change Adaptation in the Ecuadorian Amazon: The Chakra System. In W. Leal Filho (Ed.), *Handbook of Climate Change Adaptation* (pp. 1973–1994). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38670-1_102
- Tripathi, N., & Sapra, A. (2020). Gram Staining. *StatPearls*. <http://europepmc.org/books/NBK562156>
- Valdés, F., & Cid, A. (2004). Micobacterias atípicas. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 95(6), 331–357.
- Victoria, L., Gupta, A., Gómez, J. L., & Robledo, J. (2021). *Mycobacterium abscessus* complex: a review of recent developments in an emerging pathogen. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 659997.
- Villalba-Villalba, A. G., Chan-Chan, L. H., & Maldonado-Arce, A. (2022). Toxic metal tolerance of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus nidulans* isolated from tailings. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 28 (2), 189-205.
- Wallace, E., Hendrickson, D., Tolli, N., Mehaffy, C., Peña, M., Nick, J. A., Knabenbaur, P., Watkins, J., Simpson, A., & Amin, A. G. (2021). Culturing mycobacteria. *Mycobacteria Protocols*, 1–58.
- Wang, M. M., Crous P. W., Sandoval-Denis M., Han S. L., Liu F., Liang J. M., Duan W. J., Cai L. (2022). *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 48, 1:53. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2022.48.01>.
- White, S. M., Kesterson, K. N., y Wilkerson, M. G. (2018). Persistent Cutaneous Infection Due to *Mycobacterium Immunogenum*, a Relatively Novel Species. *SKIN The Journal of Cutaneous Medicine*, 2 (1), 69-74.
- Wilson, R. W., Steingrube, V. A., Böttger, E. C., Springer, B., Brown-Elliott, B. A., Vincent, V., Jost, K. C., Zhang, Y., Garcia, M. J., Chiu, S. H., Onyi, G. O., Rossmore, H., Nash, D. R., y Wallace, R. J. (2001). *Mycobacterium immunogenum* sp. nov., a novel species related to *Mycobacterium abscessus* and associated with clinical disease, pseudo-outbreaks and contaminated metalworking fluids: an international cooperative study on mycobacterial taxonomy. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(Pt 5), 1751–1764. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-5-1751>
- Wufuer, R., Li, W., Wang, S., & Duo, J. (2022). Isolation and degradation characteristics of PBAT film degrading bacteria. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(24), 17087.
- Yiju, W., Wu, H., Zhang, X., Liang, Y., Shi, D., Wang, L., Li H., Yu H., Yang, D., Zhou, S., Chen, T., Yang, Z., Li, J., Min, J. (2024). Comparative analysis of chlorine-resistant bacteria after chlorination and chloramination in drinking water treatment plants. *Journal of Hazardous Materials* 469. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.134075>.



El sello editorial de la Corporación Ecuatoriana para el Desarrollo de la Investigación y la Academia - CEDIA, nace con la finalidad de apoyar a la creación y la publicación de resultados, investigaciones y procesos académicos, que fomenten el desarrollo de la ciencia y la innovación a nivel nacional e internacional.



ikiam.edu.ec

La Amazonía no solo asombra por su exuberante flora y fauna, sino también por la vasta e inexplorada diversidad de microorganismos que alberga. Esta riqueza microbiana es fundamental para el equilibrio de los ecosistemas, desempeñando un papel clave en el ciclo de nutrientes, la regulación climática, la salud de los bosques y, por ende, en el bienestar global.

Sin embargo, la investigación sobre la diversidad microbiana sigue siendo limitada, especialmente en biomas críticos como los de la región amazónica. En respuesta a esta brecha de conocimiento, el proyecto “MicroImpact: Un Microcosmos por Descubrir. Impacto de Microorganismos en Procesos Ambientales y en la Salud de Comunidades de Tena” busca revelar el vasto potencial de estos organismos en aplicaciones resilientes vinculadas al ambiente y la salud.

Este libro, concebido como una herramienta científica y visual, presenta de manera accesible las metodologías empleadas para el muestreo, manejo, aislamiento e identificación de microorganismos en la Amazonía ecuatoriana. Además, incluye una guía ilustrativa que facilita el reconocimiento de las especies identificadas, destacando su papel ecológico y su potencial en campos como la biorremediación, el biocontrol y la salud.



cedia
cedia.edu.ec

ISBN: 978-9942-8795-8-5



9 789942 879585