



IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE QUESERA ARTESANAL UBICADA EN LA LIBERTAD-CHONTALES, NICARAGUA

MOLECULAR IDENTIFICATION OF ISOLATED MICROORGANISMS OF ARTISANAL CHEESE MAKING SHOP LOCATED IN LA LIBERTAD-CHONTALES, NICARAGUA

Heysell Dodanig Delgado Silva¹
Leandro Alberto Páramo Aguilera²

(Recibido/received: 9-octubre-2020; aceptado/accepted: 30-noviembre-2020)

RESUMEN: En la producción quesera artesanal de Nicaragua coexisten un sin número de microorganismos que no han sido estudiados, y muchas veces no se considera como intervienen en la producción del queso. Por tal razón, en este trabajo se aislaron microorganismos de una quesera artesanal en medios de cultivos básicos AN, LB, PCA, PDA y AM con el objeto de aislar una amplia cantidad de microorganismos. Una vez aislados y purificados los cultivos se obtuvieron 82 bacterias, 3 hongos levaduriformes y 12 hongos filamentosos. Mediante el análisis morfológico de las características macro y microscópicas se seleccionaron 16 morfotipos que incluían bacterias y hongos, para la identificación molecular mediante la extracción del ADN, la amplificación por la PCR y la secuenciación de las regiones 16S para bacterias, ITS para hongos filamentosos y los dominios D1/D2/D3 para las levaduras. Se logró identificar 20 aislados a nivel de especie: *Bacillus cereus* (1), *Enterobacter cloacae* (1), *Escherichia coli* (1), *Klebsiella pneumoniae* (2), *Planococcus maritimus* (1), *Proteus vulgaris* (1), *Pseudomonas aeruginosa* (2), *Psychrobacter alimentarius* (1), *Serratia marcescens* (3), *Staphylococcus aureus* (1), *Cybelindnera jadinii* (2), *Rhodotorula mucilaginosa* (1), *Candida pararugosa* (1), *Aspergillus hiratsukae* (1) y *Trichoderma orientale* (1). Además, se identificaron 7 bacterias a nivel de género: *Enterobacter sp* (4), *Escherichia sp* (1), *Klebsiella pneumoniae* (1) y *Pseudomonas sp* (1). La presente investigación contribuirá al avance del conocimiento de los microorganismos presentes en el proceso de producción de una quesera artesanal, permitiendo la selección y utilización de estos para su aplicación en procesos biotecnológicos.

PALABRAS CLAVES: quesera artesanal, aislamiento, identificación fenotípica, identificación genotípica, biotecnología

¹ Encargada del laboratorio Biotecnología. Programa de Investigación, Estudios Nacionales y Servicios del Ambiente (PIENSA-UNI). Managua, Nicaragua. dodanig94@yahoo.es

² Investigador principal en Biotecnología, Programa de Investigación, Estudios Nacionales y Servicios del Ambiente (PIENSA-UNI). Managua, Nicaragua. lparamo2014@gmail.com.

ABSTRACT: In the artisanal cheese production of Nicaragua, a number of microorganisms coexist that have not been studied, and many times it is not considered how they intervene in the production of cheese. For this reason, in this work microorganisms were isolated from an artisan cheese making shop in basic culture media AN, LB, PCA, PDA and AM in order to isolate a large number of microorganisms. Once the cultures were isolated and purified, 82 bacteria were obtained, 3 yeast fungi and 12 filamentous fungi. By means of the morphological analysis of the macro and microscopic characteristics, 16 morphotypes that included bacteria and fungi were selected for molecular identification by means of DNA extraction, PCR amplification and sequencing of the 16S regions for bacteria, ITS for filamentous fungi and the D1 / D2 / D3 domains for yeast. 20 isolates were identified at the species level: *Bacillus cereus* (1), *Enterobacter cloacae* (1), *Escherichia coli* (1), *Klebsiella pneumoniae* (2), *Planococcus maritimus* (1), *Proteus vulgaris* (1), *Pseudomonas aeruginosa* (2), *Psychrobacter Alimentarius* (1), *Serratia marcescens* (3), *Staphylococcus aureus* (1), *Cybelindnera jadinii* (2), *Rhodotorula mucilaginosa* (1), *Candida paraugosa* (1), *Aspergillus hiratsukae* (1) and *Trichoderma orientale* (1) . In addition, 7 bacteria are identified at the genus level: *Enterobacter* sp (4), *Escherichia* sp (1), *Klebsiella pneumoniae* (1) and *Pseudomonas* sp (1). This research contributes to the advancement of the knowledge of the microorganisms present in the production process of an artisan cheese maker, allowing the selection and use of these for their application in biotechnological processes.

KEYWORDS: artisan cheese making shop, isolation, phenotypic identification, genotypic identification, biotechnology.

ABREVIATURAS

ARNr: ácido ribonucleico ribosómico o ribosomal.

ARN: ácido ribonucleico.

ITS: Espacio transcrito interno.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNr: ácido desoxirribonucleico ribosómico

Blast: Herramienta básica de búsqueda de alineación local

INTRODUCCIÓN

La producción de leche y sus derivados en Nicaragua no es algo nuevo, pero en los últimos años se ha venido desarrollando hasta el punto de ser uno de los rubros de mayor exportación y competitividad a nivel internacional. La micro y pequeña empresa quesera artesanal de tipo familiar incluyendo la producción en fincas, absorbe aproximadamente 84% de la producción de leche; son alrededor de 3,000 en todo el país y abastecen los mercados vecinos, cabeceras departamentales incluyendo la capital. El proceso de producción en queseras artesanales inicia con la recepción de la leche, pasa al descremado, la coagulación, desuerado, salado, prensado, y finalmente el secado (González, *et al.*, 2009). Cabe destacar que existe un sin número de microorganismos asociados a la producción de quesos artesanales, sin la presencia de algunos sería prácticamente imposible obtener algunos quesos y otros productos fermentados. Estos

especímenes también son responsables de gran parte de los defectos encontrados en la leche y sus derivados.

El uso de microorganismos es una constante en la biotecnología, ciencia de carácter interdisciplinario y que por la aplicación de métodos permite la obtención de productos a partir de materias primas, incidiendo sus aplicaciones sobre alimentos, industria agroalimentaria, medicina, producción industrial, medio ambiente y producción de energía (Lozano, 2001). En la actualidad se realizan investigaciones que se basan en la búsqueda o revisión a cerca de las aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos en diversos ámbitos, pero para ello es necesario contar con cepas plenamente identificadas, mediante métodos tradicionales que incluyen la identificación fenotípica y la identificación molecular.

Actualmente, la identificación fenotípica se realiza por medio de métodos simples basados en las características fenotípicas, debido a que su realización y costos los hacen más accesibles, consiste en la observación de características macroscópicas como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas y la observación de las características microscópicas. La discordancia entre las características fenotípicas del aislamiento en estudio y las correspondientes a la(s) cepa(s) de la especie tipo, hacen que los métodos fenotípicos realicen la identificación más probable, pero no definitiva. Para solventar los problemas inherentes presentados por los sistemas de identificación fenotípica se han desarrollado los métodos genotípicos como procedimientos complementarios o alternativos. Una amplia variedad de genes ha sido utilizada como dianas moleculares en el estudio filogenético de los distintos géneros y especies de microorganismos. Los genes descritos con mayor frecuencia con utilidad en taxonomía son el ARNr 16S para bacterias y la región ITS para hongos (Flores y Roque, 2017; Páramo-Aguilera, *et al.*, 2011).

Es posible plantear el desarrollo de la biotecnología, con estudios orientados a la bioprospección de especies de microorganismos autóctonos, que tengan la capacidad de adaptarse al medio del cual fueron extraídos y que indudablemente son más eficientes sus aplicaciones, que cualquiera que pueda encontrarse comercialmente. En Nicaragua, es casi nula o no existe la información respecto a la microbiota que habita en las queseras artesanales (objeto de este estudio), por tal razón, en esta investigación se realizó el aislamiento (previo muestreo) de la micro biota en diferentes áreas del procesamiento de la leche (leche fluida, leche descremada, suero, superficies y aguas residuales), con el fin de identificar molecularmente las cepas nativas que son potencialmente útiles e interactúan en dicho proceso. Para este estudio, se tomó en cuenta que las características de la leche que se procesa, está directamente asociada al proceso artesanal y los resultados obtenidos, son un adelanto en el desarrolló biotecnológico del país, ya que al contar con un banco de cepas plenamente identificadas se pretende que se realicen futuras investigaciones en el ámbito biotecnológico y se promueva la aplicación de la biotecnología en áreas como la agricultura, el ambiente y la industria del país.

METODOLOGÍA

Ubicación del estudio

El muestreo para el desarrollo de la investigación se realizó en una quesera artesanal de propietario anónimo ubicada el municipio La Libertad, Chontales. El procesamiento de las muestras se efectuó en los laboratorios de Biotecnología y Microbiologías de Agua del Programa de Investigación, Estudios Nacionales y Servicios del Ambiente (PIENSA) de la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI), donde se aplicaron las técnicas para los aislamientos, la purificación de cultivos mixtos, las pruebas morfológicas microbianas y el análisis bioinformático del ADN de los microorganismos. La identificación molecular se ejecutó en dos etapas, primero se contrató el servicio ofrecido por los laboratorios de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN) y el Centro de Biología Molecular de la Universidad Centro Americana (UCA) que cuenta con el personal capacitado y las instalaciones para realizar la extracción de los ADN de los microorganismos, finalmente para la secuenciación los ADN_r se enviaron a la compañía Macrogen en Corea del sur.

Recolección de muestras

La recolección de las muestras se realizó utilizando un sistema de muestro aleatorio simple, que consiste en tomar una muestra (n) de la población (N), de manera tal que cada muestra tenga la misma probabilidad de ser seleccionada (Pacheco y Cabrera, 2011). Las muestras se tomaron de 6 puntos (Tabla 1), los cuales corresponden a: 1 a la materia prima, 3 a subproductos y 2 a residuos sólidos y líquidos. Las muestras líquidas se tomaron en 5 puntos, la cuales se guardaron en bolsas para muestras de 100 mL y en tubos cónicos estériles de 50 mL. *In situ* se realizaron en total 60 recolecciones de muestras en placas de Petri con la técnica de siembra masiva y en los medios de cultivos Agar nutritivo (AN), Agar Luria-Bertani (LB), Agar Plate-Count (PCA), Agar Papa Detroxa (PDA) y Agar milk (AM). Todas las muestras se trasladaron al laboratorio en condiciones adecuadas, utilizándose un termo a temperatura de 10 °C aproximadamente para preservar la naturaleza de la muestra, sin alteración del número y las actividades de los microorganismos hasta ser procesadas (Carrillo, 2018). En el laboratorio las 60 muestras en placas de Petri se dejaron en incubación a una temperatura de 35 °C.

Tabla 1. Puntos de muestreo y abreviatura de codificación de la muestra

Puntos de muestreo	Tipo de muestra	Código
Leche fresca	Líquido	QI
Leche descremada	Líquido	QII
Lacto suero fermentado	Líquido	QIII
Lacto suero salado	Líquido	QIV
Sedimentos de drenaje	Sólido	QV
Desechos residuales	Líquido	QVI

Aislamiento y purificación de cultivos mixtos

El aislamiento se inició en el laboratorio trabajando las muestras líquidas, que se procesaron con la técnica de siembra por inmersión, con el objeto de presenciar el crecimiento separado de las colonias microbianas en el cultivo mixto. El proceso consistió en medir 5 mL de la muestra original, colocarlos en un tubo de ensayo para tener una solución madre, seguidamente se agito en vórtex la muestra y se tomó 1 mL para empezar la dilución seriada de 10^{-1} - 10^{-6} , de las diluciones finales se tomó 1 mL para inocularlas en placas de Petri con medio LB y PDA.

Transcurrido el tiempo de incubación, la siembra masiva y por inmersión generaron cultivos mixtos, los medios AN, LB, PCA y AM propicios para el crecimiento bacteriano fueron examinados durante 7 días y por 14 días las placas con medio PDA, para seleccionar las colonias de interés y aislarlas, en el caso de las bacterias se utilizó la técnica de siembra en estría en medio LB donde se determinó si había diferentes morfologías y se sembraron las colonias que crecieron aisladas hasta obtener un cultivo puro, para las levaduras se aplicó la misma técnica usada con las bacterias, pero con diferentes tiempos de incubación y la utilización del medio PDA. Las placas con medio PDA se examinaron y se seleccionaron los hongos filamentosos que presentaban diferentes aspectos en el conjunto de micelios, para el aislamiento se utilizó la técnica de siembra por punción y se sembró en un nuevo medio PDA, la placas de Petri se incubaron entre 3 a 7 días en dependencia del hongo y se realizaron las resiembras necesarias para obtener un cultivo puro (Moreno y Albarracín, 2012; Páramo-Aguilera, *et al.*, 2011).

Preservación de los cultivos axénicos

La transferencia periódica se utilizó para conservar los cultivos puros de microorganismos, se tomó el material celular y se transfirió a un medio fresco en intervalos mensuales, usando para las bacterias placas de Petri con medio LB y para los hongos filamentosos y levaduriformes medio PDA. Las técnicas para las resiembras aplicadas fueron la siembra en estría y por punción respectivamente. Los subcultivos se dejaron en incubación por 24 h para las bacterias y un lapso de 3-14 días para los hongos, luego se sellaron las placas con PARAFILM y se almacenaron en refrigeración a una temperatura de 8°C (Flores y Roque, 2017).

Identificación microbiana

El objetivo principal de la identificación microbiana es desarrollar una visión clara de la microflora de un hábitat, aplicando técnicas morfológicas y moleculares, que en conjunto superan los problemas de la caracterización fenotípica. Por tal razón, se realizó una identificación basada en ambas técnicas que son complementarias para identificar hasta el nivel de género y/o especie a los microorganismos cultivables.

Análisis morfológico: Los aislados obtenidos se caracterizaron macroscópicamente y se registraron las características morfológicas de sus colonias o conjuntos de micelios como el tamaño, consistencia, forma, borde, etc. para diferenciarlos entre bacteria y hongos. La tinción

de Gram se realizó a los subcultivos de bacterias después de 24 h de incubación observándose microscópicamente y registrándose características de las células, así como la clasificación en Gram positivas o negativas de importancia taxonómica, además de determinar con mayor nivel de confianza la pureza del cultivo. Los hongos filamentosos se subcultivaron en placas de Petri con medio PDA y se dejaron desarrollar en incubación entre 2 y 5 días a la temperatura del laboratorio ($28^{\circ}\text{C} \pm 1$), para luego registrar sus características microscópicas mediante la observación de un montaje al microscopio con la técnica de cinta adhesiva que permite observar las estructuras fúngicas casi sin alteración. Las características microscópicas de las levaduras se observaron con la realización de tinciones simples, donde fue posible diferenciar su forma celular (López, *et al.*, 2014; Moreno y Albarracín, 2012).

Análisis molecular: La extracción del ADN para la identificación molecular se realizó a diferentes muestras que incluían 22 bacterias, 3 hongos levaduriformes y 2 hongos filamentosos seleccionados en base al análisis morfológico. El ADN de las bacterias se extrajo por el protocolo fenol cloroformo y con el sistema comercial PROMEGA Wizar DNA purification KIT y el ADN de los hongos con tres protocolos. La amplificación del ADN se realizó por medio de la técnica PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) y la secuenciación por el análisis de las regiones 16S ADNr para bacterias con los primers 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTACG ACTT-3'), los dominios D1/D2/D3 para los hongos levaduriformes con los primers LROR (5'-ACCCGCTAACTTAAGC-3') y LR7 (5'-TACTACCACCAAGATCT-3') y el ITS (Internal Transcribed Space) para hongos filamentosos con los primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Flores y Roque, 2017; Ruiz, 2014).

A las secuencias recibidas de Macrogen, se les realizó el análisis bioinformático para establecer las relaciones filogenéticas de los productos secuenciados. El primer paso fue la corrección manual de los errores en los electroferogramas producidos durante la secuenciación usando el programa BioEdit v7.0.9. Las secuencias corregidas fueron comparadas con cepas de referencias disponibles en el GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information), que actualmente es la base de datos que presenta mayor número de consultas por su mayor versatilidad en organismos, orígenes, genes y tipo y número de secuencias depositadas, la comparación se realizó mediante la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Posteriormente las secuencias fueron alineadas en el programa BioEdit, utilizando la aplicación Clustal W Multiple Alignment y luego se repitieron los pasos de comparación de las secuencias en el BLAST donde se seleccionaron cinco nuevas secuencias taxonómicamente relacionadas con la secuencia en estudio, para realizar finalmente la construcción de los árboles filogenéticos por el método Neighbor-Joining utilizando el programa MEGA 7.0.14 (Rodríguez, 2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Nicaragua ha empezado a dirigir sus pasos de investigación al desarrollo biotecnológico con la utilización de los recursos biológicos que dispone, por tal razón esta investigación se orientó al aislamiento de microorganismos nativos de una quesera artesanal para la posterior identificación molecular, con el propósito final de tener un banco de cepas con potencial para desarrollo de

aplicaciones biotecnológicas que impacten en la agricultura, la industria y el medio ambiente del país. La investigación generó los resultados que se presentan a continuación:

Microorganismos aislados

La toma de muestra se realizó en 6 puntos (tabla 1), un número de puntos representativos para el proceso de producción de queso artesanal. Debido a la naturaleza de las muestras, estas se encontraban bajo la influencia de diversas variables ambientales como la humedad, la luz y la temperatura, contaminaciones de origen animal, contaminación humana, hasta la adquirida por mal manejo de la leche y utensilios de transporte de la misma (Lozano, 2001).

Con el proceso de muestreo se obtuvieron un total de 70 muestras (60 placas de Petri inoculadas *in situ* y 10 muestras líquidas). El trabajo de aislamiento mediante el procesamiento de las 10 muestras líquidas por la técnica de siembra por inmersión, dejó como resultado 40 muestras más inoculadas *ex situ* en placas de Petri, llegando así al proceso de aislamiento con un total de 100 placas con cultivos mixtos. Estos resultados no difieren de trabajos previos de aislamientos realizados para otros ecosistemas (Páramo Aguilera, *et al.*, 2011).

El proceso de aislamiento mediante la observación macroscópica de los cultivos mixtos y la purificación de cultivos, permitió visualizar una alta gama microbiana asociada a la producción de una quesera artesanal, de tal manera que se lograron aislar un total de 97 microorganismos que se resumen en la tabla 2, donde se detalla el número total de aislados por punto de muestreo. Sin embargo, este número no representa el total de microorganismos que subsisten en el ecosistema muestreado, ya que se ha observado que la amplia gama microbiana encontrada en la naturaleza solo puede ser parcialmente aislada mediante una gran diversidad de medios de cultivo y condiciones asociadas al desarrollo del cultivo.

Tabla 2. Resumen cuantitativo de los cultivos axénicos bacterianos y fúngicos aislados de los 6 puntos muestreados en la quesera artesanal.

Puntos de muestreo	No. de Bacterias	No. de Hongos	
		Filamentosos	Levaduriformes
Leche fresca	11	2	3
Leche descremada	12	4	-
Lactosuero fermentado	15	-	-
Lactosuero salado	11	2	-
Sedimentos de drenaje	19	2	-
Desechos residuales	14	2	-
Total	82	12	3

La presencia de hongos en la producción de queso no fue significativa (12 aislados de filamentosos y 3 aislados de levaduriformes) similar a las reportado en el trabajo realizado por López, *et al.*, (2010) que aislaron 6 géneros hongos de 9 muestras de queso Paipa y la leche utilizada como materia prima. A pesar de las diferencias entre una quesera artesanal y la rizosfera

de las plantas de vainillas, además de los medios de cultivos utilizados para el aislamiento, se logró aislar una cantidad similar de microorganismos a los obtenidos por diversos autores como Flores y Roque, (2017), quienes lograron aislar un total de 30 microorganismos entre ellos 23 bacterias, 6 hongos filamentosos y 1 hongo levaduriforme, mediante la utilización de tres medios de cultivos enriquecidos (PDA, AN y PCA), medios de cultivos similares a los utilizados en esta investigación. La cantidad de aislados difiere debido a que solamente trabajaron con cuatro muestras de bioinsumos, además, la quesera artesanal representa un ambiente enriquecido para el desarrollo de un sin número de microorganismos. Todo lo anterior conduce a aseverar, que la cantidad de aislados y los tipos de aislados que se obtengan de un proceso, está en relación directa con los medios de cultivo que se empleen y las condiciones de trabajo de las que se disponga para el desarrollo de la investigación.

Identificación morfológica de los microorganismos

La identificación preliminar de los 97 aislados microbianos de la quesera artesanal se realizó a través de la observación macroscópica y microscópica de todos los cultivos puros. En la Figura 1 se ilustran las observaciones macroscópicas y microscópicas realizadas a 13 bacterias, 3 hongos levaduriformes y 2 hongos filamentosos, de 27 aislados sometidos al proceso de identificación molecular que fueron seleccionados en base a sus características morfológicas y puntos de muestreos. La caracterización macroscópica indicó que para las bacterias habían 27 morfotipos (11 morfotipos se seleccionaron para la identificación molecular), 3 morfotipos de levaduras y 10 morfotipos de hongos filamentosos (2 seleccionados) (Datos no mostrados).

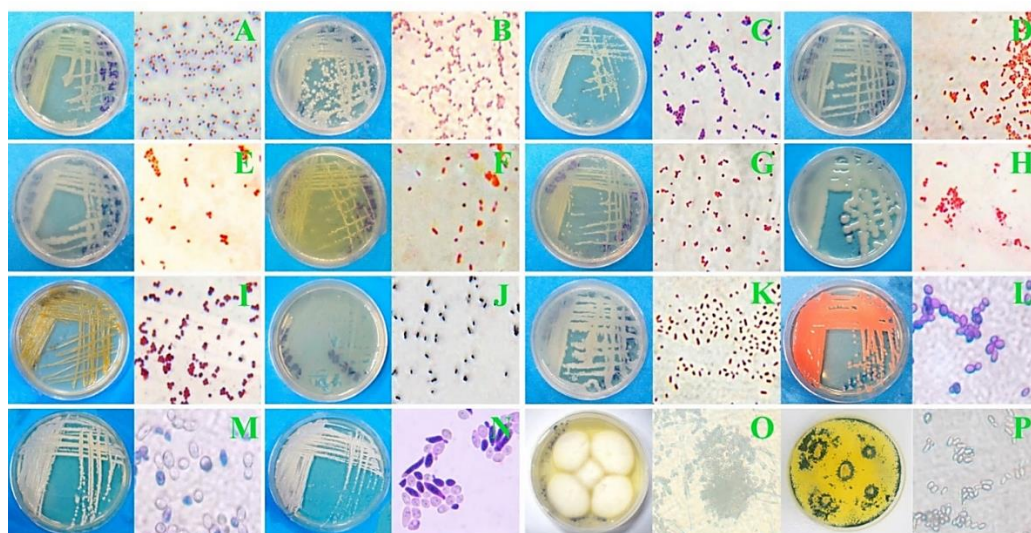


Figura 1. Fragmento de las observaciones macro y microscópica de los cultivos de bacterias, hongos levaduriformes y filamentosos. (a.) *Pseudomonas aeruginosa*: QIA-13. (b) *Serratia marcescens*: QIE-08. (c) *Staphylococcus aureus*: QIIIB-10. (d) *Escherichia coli*: QIIIE-12. (e) *Klebsiella pneumoniae*: QIIIE-16. (f) *Proteus vulgaris*: QIVB-10. (g) *Enterobacter* sp: QIVC-05. (h) *Enterobacter cloacae*: QIVE-08. (i) *Planococcus maritimus*: QVB-02. (j) *Psychrobacter alimentarius*: QVE-06. (k). *Bacillus cereus*: QVIE-17. (l) *Rhodotorula mucilaginosa*: QID-09. (m) *Cybelindnera jadinii*: QID-15. (n) *Candida pararugosa*: QID-16. (o). *Aspergillus hiratsukae*: QID-17 y (p) *Trichoderma orientale*: QIVD-12.

La caracterización fenotípica se fundamenta en las características observables macroscópicas y microscópicas y se realiza por métodos convencionales, utilizados frecuentemente para la identificación microbiana puesto que su realización y costos son accesibles. Las tinciones de bacterias se usan para observar su morfología, su agrupación, la presencia de esporas y la existencia de otros tipos celulares (López, *et al.*, 2014). De las 22 bacterias seleccionadas para la identificación molecular, las observaciones microscópicas de la coloración de Gram (Figura 1), además de lo anterior, indicó que 1 es bacilo Gram positivo (QVIE-17), 14 bacilos Gram negativos (QIA-02, QIE-08, QIE-11, QIA-13, QIIE-10, QIIC-13, QIIIB-09, QIIIE-12, QIIIE-16, QIVE-08, QIVB-10, QVIB-08, QVIE-11 y QVIA-12), 1 coco Gram positivo (QIIIB-10) y 6 cocos Gram negativos (QIIE-11, QIVC-05, QVB-02, QVE-06, QVD-21 y QVD-20). Del total de los aislados el 12% son bacilos Gram positivos, 31% bacilos Gram, 1 % cocos Gram positivos y 56% cocos Gram negativos (datos no mostrados).

Las observaciones microscópicas realizadas a los hongos levaduriformes no fueron concluyentes, pero permitieron apreciar la forma ovalada de las células para cada morfotipo, apreciación de núcleo para las cepas QID-15 Y QID-16 y reproducción por gemación para todas, características que fueron necesarias para la aseveración de la identidad final. La caracterización microscópica de los hongos filamentosos permitió apreciar las formas de las hifas, esporas y las estructuras fructíferas características de algunos géneros que si fueron concluyentes.

Las colonias microbianas a menudo tienen un aspecto que distingue los microorganismos entre sí, las observaciones de sus características macroscópicas y microscópicas permiten confirmar las identidades filogenéticas, así como en los trabajos desarrollados por Páramo-Aguilera, *et al.*, (2011), que muestra como basándose en la combinación de metodologías fenotípicas y moleculares es posible diferenciar comunidades de hongos. En el trabajo de Flores y Roque, (2017), se utilizaron las pruebas microbiológicas como un apoyo preliminar para identificar finalmente por herramientas moleculares bacterias como *Bacillus subtilis* y *cereus*, además de cepas fúngicas a nivel de género como *Penicillium*. En definitiva, la observación de las características macro y microscópicas constituyen herramientas valiosas para completar la identificación molecular, al conocer la morfología de las colonias, las células o las esporas en ocasiones permite llegar a identificar bacterias y hongos a nivel de género y a veces hasta nivel de especie.

Como ejemplos de lo antes señalado, cabe destacar que basados en los análisis de las características morfológicas macro y microscópica de los microorganismos aislados como los mostrados en la Figura 1, se presumió que se contaba con bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* para los aislados QIA-02, QIA-13 y QIIC-13 agrupados en el morfotipo I con características de las colonias como borde ondulado, opacas ante la luz, mucoides, un pigmento verdoso y un aroma afrutado muchas veces destacado del género, observadas como bacilos Gram negativos descrito por Ruiz, (2007) , lo cual se pudo confirmar posteriormente mediante la biología molecular. Por otro lado para las levaduras se determinó que se contaba con el género *Rhodotorula* para el aislado QID-09, ya que en el cultivo de PDA las colonias presentaban un color naranja-rosada, brillantes a la luz, de forma circular y consistencia mucosida característica

del género, presentadas en el trabajo realizado por Páramo-Aguilera, *et al.*, (2011) , una levadura ubicua que se ha encontrado en la leche y quesos (Wirth y Goldani, 2012) y en el trabajo previo realizado por Carrero y López-Molinello, (2012) que aislaron hongos de muestras de leche y queso, reportando entre sus aislados el género *Rhodotorula* identificado en base a las características macroscópica y microscópicas.

En los hongos filamentosos se identificó el género *Trichoderma* para el aislado QIVD-12, que al ser observado macroscópicamente su crecimiento en PDA mostró primeramente la formación de un micelio blanco con esporulación verde, pigmentación amarilla en el medio y la apreciación microscópica de un esporangio con forma de botella característico del género como se describe y se muestra en los estudios morfológicos de Acurio y España, (2016).

Identificación molecular de los microorganismos

Muchos de los taxones estudiados presentaban características morfológicas que no eran concluyentes, por ello fue imprescindible realizar la identificación final de los mismos y establecer las relaciones filogenéticas con la caracterización molecular, la cual fue realizada con las amplificaciones por la PCR, las secuenciaciones de marcadores genéticos (16S ADNr, D1/D2/D3 e ITS) y las comparaciones de secuencias con cepas de referencias disponibles en el NCBI. El proceso de identificación molecular solo se llevó a cabo para 27 microorganismos seleccionados que incluían 16 morfotipos quedando pendiente la identificación de 11 morfotipos que se atribuyen a 70 aislados (60 bacterias y 10 hongos filamentosos).

La bioprospección microbiana en la quesera artesanal dejó como resultado una gama de microorganismos completamente identificados constituidos por, 7 aislados identificados a nivel de género y 20 aislados identificados a nivel de especie, entre las cuales se distinguen 15 especies diferentes. Los resultados de la identificación molecular de los 27 aislados enviados a secuenciación, se muestran en la figura 2 y 3 donde se presentan los arboles filogenéticos para bacterias y hongos respectivamente, construidos con el programa Bioedit, en los cual se incluyeron las 27 secuencias en estudios y 152 secuencias de bacterias y hongos depositadas en el GenBank que fueron seleccionadas por presentar altos niveles de identidad y frecuencia con las obtenidas en esta investigación.

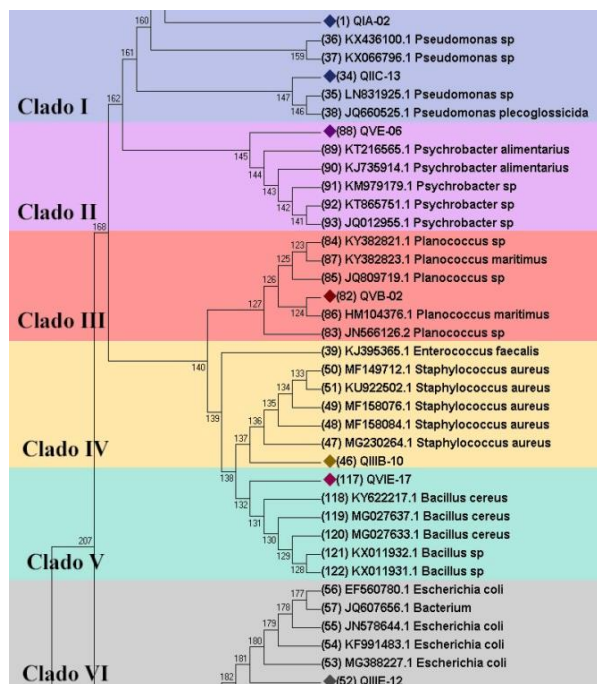


Figura 2. Árbol filogenético obtenido a partir de secuencias de la región 16S del ADNr de 22 bacterias nativas de la quesera artesanal y cepas de referencia del GenBank.

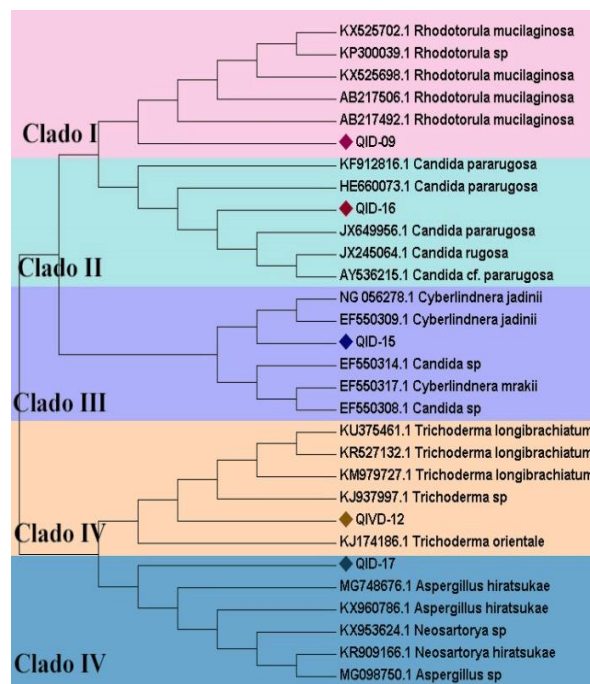


Figura 3. Árbol filogenético obtenido a partir de secuencias de la región ITS del ADNr de 5 hongos nativos de la quesera artesanal y cepas de referencia del GenBank.

Los resultados de la identificación de las 27 cepas basados en los análisis filogenéticos de los árboles se detallan en la tabla 3, donde se indica la especie, su código de laboratorio, el número de pares de bases comparadas, porcentaje de homología de la secuencia con la correspondiente en el Genbank del NCBI y el número de acceso de la misma.

Tabla 3. Identificación de los microorganismos asociados a una producción quesera artesanal en Nicaragua.

Id general	Identidad	pb	% de identidad	No. Acceso
BACTERIAS				
QVIE-17	<i>Bacillus cereus</i>	1,065	99	KY622217.1
QVB-02	<i>Planococcus maritimus</i>	1,116	99	HM104376.1
QIIIB-10	<i>Staphylococcus aureus</i>	919	99	MG230264.1
QIA-02	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,231	98	JX286672.1
QIA-13	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,283	99	HM439966.1
QIIC-13	<i>Pseudomonas sp</i>	1,175	99	LN831925.1
QVE-06	<i>Psychrobacter alimentarius</i>	1,101	99	KT216565.1
QIIIB-09	<i>Escherichia sp</i>	1,147	99	MF429390.1
QIIIE-12	<i>Escherichia coli</i>	1,251	99	MG388227.1
QIIE-11	<i>Enterobacter sp</i>	1,245	90	KX226332.1

Id general	Identidad	pb	% de identidad	No. Acceso
QIVC-05	<i>Enterobacter sp</i>	875	89	KP240978.1
QIVE-08	<i>Enterobacter cloacae</i>	1,022	99	KX036862.1
QVD-20	<i>Enterobacter sp</i>	1,072	99	MF428594.1
QVD-21	<i>Enterobacter sp</i>	1,046	99	KF021237.1
QIE-08	<i>Serratia marcescens</i>	1,142	99	MF801351.1
QIE-11	<i>Serratia marcescens</i>	1,092	99	MF9921750.1
QIIE-10	<i>Serratia marcescens</i>	1,095	99	KY379045.1
QVIA-12	<i>Serratia marcescens</i>	1,363	98	MF716676.1
QIVB-10	<i>Proteus vulgaris</i>	2,022	99	KT887953.1
QIIIE-16	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,276	97	JQ838151.1
QVIB-08	<i>Klebsiella sp</i>	1,176	99	MF429119.1
QVIE-11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,157	96	KY347730.1
HONGOS LEVADURIFORMES				
QID-09	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1,096	100	AB217492.1
QID-15	<i>Cybelindnera jadinii</i>	1,210	99	EF550309.1
QID-16	<i>Candida pararugosa</i>	1,000	100	JX649956.1
HONGOS FILAMENTOSOS				
QID-17	<i>Aspergillus hiratsukae</i>	519	100	MG748676.1
QIVD-12	<i>Trichoderma orientale</i>	545	99	KJ174186.1

El análisis filogenético de la Figura 2, se realizó para la región 16S de 22 bacterias con buenos resultados de secuenciación, con una banda promedio de 1,176 pb y un promedio de homología del 98%, el dendograma resultante presentó 10 clados bien definidos (I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX y X). El clado I constituido por la familia *Pseudomonaceae*, el II por la familia *Moraxellaceae*, el III por la familia *Planococcaceae*, el IV por la familia *Staphylococcaceae*, el V por la familia *Bacillaceae* y del VI al X por la familia *Enterobacteriaceae*.

En la tabla 3 se puede constatar, que de las 2 bacterias Gram positivas seleccionadas para el estudio 1 se asoció al género *Bacillus*, siendo identificada filogenéticamente a nivel de especie como *Bacillus cereus* (QVIE-17) y la otra al género *Staphylococcus* y a nivel de especie como *Staphylococcus aureus* (QIIIB-10); de las 20 bacterias Gram negativas 1 se asoció al género *Planococcus*, siendo identificada filogenéticamente a nivel de especie como *Planococcus maritimus* (QVB-02), 3 al género *Pseudomonas* (QIIC-13), siendo identificadas filogenéticamente 2 hasta nivel de especie como *Pseudomonas aeruginosa* (QIA-02 y QIA-13), 1 al género *Psychrobacter*, siendo identificada filogenéticamente a nivel de especie como *Psychrobacter alimentarius* (QVE-06), 2 al género *Escherichia* (QIIIB-09), siendo identificada 1 filogenéticamente hasta nivel de especie como *Escherichia coli* (QIIIE-12), 5 al género *Enterobacter* (QIIE-11, QIVC-05, QVD-20, QVD-21), siendo identificadas filogenéticamente 1 hasta nivel de especie como *Enterobacter cloacae* (QIVE-08), 4 al género *Serratia*, siendo identificadas filogenéticamente hasta nivel de especie como *Serratia marcescens* (QIE-08, QIE-11, QIIE-10 y QVIA-12), 1 al género *Proteus*, siendo identificada filogenéticamente hasta nivel de especie como *Proteus*

vulgaris (QIVB-10) y finalmente 3 al género *Klebsiella* (QVIB-08), siendo identificadas filogenéticamente 2 hasta nivel de especie como *Klebsiella pneumoniae* (QIIIE-16 y QVIE-11).

El análisis filogenético de la figura 3 se realizó para el dominio D1/D2/D3 y la región ITS de 3 hongos levaduriformes y 2 hongos filamentosos con buenos resultados de secuenciación, con una banda promedio de 1,102 pb y 532 pb respectivamente y un promedio de homología del 100%, el dendograma resultante presentó 5 clados bien definidos (I, II, III, IV y V), el clado I ocupado por la familia *Sporidiobolaceae*, el II por la familia *Saccharomycetetales*, el III por la familia *Saccharomycetetales*, el IV por la familia *Hypocreaceae* y el V por la familia *Aspergillaceae*. De las 5 cepas se logró identificar y determinar que en el proceso de producción de un queso artesanal coexistían hongos levaduriformes de las especies *Candida pararugosa* (QID-16), *Cybelindnera jadinii* (QID-15) y *Rhodotorula mucilaginosa* (QID-09) y hongos filamentosos de la especie *Trichoderma orientale* (QIVD-12) y *Aspergillus hiratsukae* (QID-17).

Las cepas identificadas en el proceso de producción de la quesera artesanal fueron aisladas previamente en ambientes con características similares a los analizados por Bokulich y Mills, (2013). Entre los microorganismos identificados, se tienen las bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Staphylococcus* y la familia Enterobacteriaceae, que fueron reportadas por los autores antes citados y que identificaron molecularmente las cepas de muestras tomadas en dos queseras artesanales en los Estados Unidos, en dicho proceso la leche se pasteurizaba antes de hacer el queso, las bacterias del género *Pseudomonas* y las Enterobacteriaceae se encontraron principalmente en leche, *Staphylococcus* se encontró principalmente en el lavado y *Psychrobacter* en el lavado, lo que no difiere de los resultados obtenidos en esta investigación. En otra investigación realizada por Cardona, *et al.*, (2013), que aislaron bacterias productoras de polihidroxicanoatos de dos ambientes, que incluye el sustrato de lactosuero donde identificaron molecularmente bacterias pertenecientes a los géneros *Lactococcus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Enterococcus*, tres de los cuales también se reportan en este estudio. Cabe recalcar como la familia Enterobacteriaceae (*Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens* y *Klebsiella pneumoniae*) y el género *Pseudomonas* son las bacterias de mayor incidencia reportadas en este y otro estudio (Ercolini, *et al.*, 2009), bacterias consideradas como fuente de contaminación, que generalmente se encuentra asociadas a los lácteos.

Bacillus cereus, tiene la capacidad para sobrevivir a las variaciones térmicas debido a su capacidad para formar endosporas, por ello, constituye uno de los géneros bacterianos dominantes en la mayoría de los componentes ambientales, especie que fue reportado por Ivy, *et al.*, (2012), su trabajo tuvo por objeto identificar grupos filogenéticos prominentes de formadores de esporas aeróbicas asociadas con lácteos. Las levaduras *Candida pararugosa* y *Cybelindnera jadinii* han sido reportadas en la investigación realizada por Garrido, (2018), que estudió la población de levaduras de quesos de pasta blanda en un ambiente con características que se relacionan a las de este estudio, además de estas especies también reportaron la presencia de 11 especies más, donde se incluye el género *Rhodotorula*. El género *Candida* se ha aislado en gran variedad de quesos, las especies patógenas de este género también han sido aislados de la leche obtenida de animales afectados por mastitis, así como quesos artesanales,

acompañados de géneros emergentes como la levadura *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Geotrichum*, *Sporobolomyces* entre otros (Wanderley, et al., 2013). El género *Aspergillus* es un hongo ubicuo que se ha reportado en la producción de queso, distribuido en la naturaleza en la vegetación en descomposición y en una amplia variedad de materia orgánica (Koneman y Allen, 2006) y se reportó su identificación entre los aislados de otras investigaciones (Páramo Aguilera, et al., 2011).

CONCLUSIONES

Esta investigación representa un adelanto más, orientado al aprovechamiento de la biodiversidad del país, además, es un avance en el reconocimiento de la microbiota asociada a la producción quesera artesanal de Nicaragua. A partir de 70 muestras tomadas *in situ*, se logró obtener un total de 97 microorganismos, 82 bacterias, 12 hongos filamentosos y 3 hongos levaduriformes. Este número no representa el total de microorganismos que subsisten en el ecosistema muestreado, ya que se ha observado que la amplia gama microbiana encontrada en la naturaleza solo puede ser parcialmente aislada. Se puede asegurar que la cantidad y los tipos de aislados obtenidos, está en relación directa con los tipos de medios de cultivos empleados y de las condiciones generales para el desarrollo del trabajo. Las observaciones macroscópicas y microscópicas de todos los cultivos puros indicaron que, para las bacterias habían 27 morfotipos, para los hongos levaduriformes 3 morfotipos de levaduras y 10 morfotipos de hongos filamentosos. Además de lo anterior las observaciones microscópicas de la coloración de Gram, indicó que el 12% de los aislados bacterianos son bacilos Gram positivos, 31% bacilos Gram negativos, 1% cocos Gram positivos y 56% cocos Gram negativos.

Los resultados obtenidos de la identificación molecular en la mayoría de los casos, para bacterias confirman su identidad con un 99 % y para hongo confirma su identidad con un 100% en comparación con las secuencias obtenidas del Genbank del NCBI, lo que se traduce en un proceso de identificación de calidad. De esta manera fue posible obtener una gama de microorganismos completamente identificados constituidos por, 7 aislados identificados a nivel de género y 20 aislados identificados a nivel de especie, entre los cuales se distinguen 15 especies diferentes: *Bacillus cereus* (1), *Enterobacter cloacae* (1), *Escherichia coli* (1), *Klebsiella pneumoniae* (2), *Planococcus maritimus* (1), *Proteus vulgaris* (1), *Pseudomonas aeruginosa* (2), *Psychrobacter alimentarius* (1), *Serratia marcescens* (3), *Staphylococcus aureus* (1), *Cybelindnera jadinii* (2), *Rhodotorula mucilaginosa* (1), *Candida pararugosa* (1), *Aspergillus hiratsukae* (1) y *Trichoderma orientale* (1). Además de las especies identificadas, se determinó la identidad de 7 bacterias a nivel de género pertenecientes a: *Enterobacter sp* (4), *Escherichia sp* (1), *Klebsiella pneumoniae* (1) y *Pseudomonas sp* (1). Trabajos científicos previamente desarrollados que han sido documentados en este trabajo, confirman que los aislados obtenidos e identificados en esta investigación coinciden con los obtenidos por los mismos en condiciones y ambientes similares.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su gratitud al Programa de Investigación Estudios Nacionales y Servicios Ambientales (PIENSA-UNI) bajo la dirección de la MSc. Larisa Korsak; por haber sido contraparte de este proyecto y en cuyas instalaciones se encuentra el laboratorio de biotecnología, en el cual se desarrolló este trabajo de investigación. Al mismo tiempo desean agradecer a la Universidad Nacional de Ingeniería, quien por medio de su vicerrectoría de Investigación y Desarrollo ha facilitado el aporte financiero para llevar a cabo el proyecto.

REFERENCIAS

- Acurio, R. D. y España, C. K. 2016. Aislamiento, caracterización y evaluación de trichoderma spp. como promotor de crecimiento vegetal en pasturas de raygrass (*lolium perenne*) y trébol blanco (*trifolium repens*). *La Granja. Revista de ciencias de las vida* 25(1),61.
- Bokulich, N. y Mills, D. 2013. Facility-specific “house” microbiome drives microbial landscapes of artisan cheesemaking plants. *Applied and Environmental Microbiology* 79(17),5214-5223.
- Cardona, A. C., Mora, A. L. y Marín, M. 2013. Identificación Molecular de Bacterias Productoras de Polihidroxicanoatos en Subproductos de Lácteos y Caña de Azúcar Molecular. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 66(2),7129-40.
- Carrero, M. B. y López-Molinello, a. 2012. Aislamiento e identificación preliminar de hongos contaminantes en queso paipa del municipio de Paipa, Boyacá. *VITAE* 19(1),114-116.
- Carrillo, L. 2018. *Evaluación de la calidad físico – químico, micro-biológica y parasitológica del agua utilizada en las queseras ubicada en la parroquia de quimiag en el cantón rio Bamba perteneciente a la provincia de Chimborazo* (Tesis de grado). Escuela superior politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- Ercolini, D., Russo, F., Ferrocino, L. y Villani, F. 2009. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow’s milk. *Food Microbiology* 26(2),228-231.
- Flores, M. y Roque, E. 2017. *Aislamiento y caracterización microbiana (microbiológica y molecular) en la búsqueda de bacillus subtilis a partir de bioinsumos comerciales y pruebas de antagonismo frente a hongos fitopatógenos* (Tesis de grado). Universidad Nacional de Ingeniería, Managua, Nicaragua.
- Garrido, S. C. 2018. *Estudio de la población de levaduras en queso de pasta blanda estremadura* (Tesis de grado). Universidad de Extremadura, Badajoz, España.
- González, J. D., Mena, E. A. y Rugama, Y. R. 2009. Elaboración de un manual de buenas prácticas de manufactura para la quesería San José en Matiguas Matagalpa durante el período del 20 de marzo al 25 de septiembre del año 2009 (Tesis de grado). Universidad Autónoma de Nicaragua, León, Nicaragua.
- Ivy, R. A., Ranieri, M. L., Martin, N. H., den Bakker, H. C., Xavier, B. M., Wiedmann, M. y Boor, K. J. 2012. Identification and characterization of psychrotolerant sporeformers associated with fluid milk production and processing. *Applied and Environmental Microbiology* 78(6),1853-1864.

- Koneman, Elmer W., y Stephen Allen. 2006. *Diagnostico Microbiológico* (Cap. 21). Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
- López, D., Jiménez, M. y López, A. 2010. Identificación de hongos beneficios que participan en el proceso de obtención del queso Paipa en lacteos lbel, municipio de Belén (Boyacá). *Revista Alimentos Hoy* 19(21), 85-108.
- López, L. E., Hernández, M., Colín, C. A., Ortega, S., Cerón, G. y Franco, R. 2014. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en Discapacidad* 3(1),10-18.
- Lozano, P. R. 2001. Diseño y verificación de un sistema de diagnóstico de las condiciones sanitarias en el sector quesero artesanal de Honduras. Zamorano.
- Moreno, J. R., y Albarracín, V. H. 2012. Aislamiento, cultivo e identificación de microorganismos ambientales a partir de muestras naturales. *Reduca (Biología)* 5(5),79-93.
- Pacheco, J., y Cabrera, A. 2011. Cuerpos de agua subterráneos. P. 76 en *Técnicas de muestreo para manejadores de recursos naturales*, editado por F. Bautista. México.
- Páramo Aguilera, L., Narváez Zapata, J. y De la Cruz, E.2011. Aislamiento e identificación de microorganismos en biopelículas provenientes del Castillo de Chapultepec, Ciudad de México. *Nexo Revista Científica* 24(2), 83-91.
- Rodríguez, Cristian Alonso. 2013. *Evaluación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal en tomate (solanum lycopersicum) variedad santa clara, aislados de residuos lignocelulósicos de higuera (Ricinus communis)* (Tesis de grado) . Universidad Católica de Manizales, Colombia.
- Ruiz, Andrés. 2014. *Producción de lipasas de interés ambiental por microorganismos aislados a partir de material vegetal sometido a compostaje* (Tesis de Grado). Universidad de Almería.
- Ruiz, Lúcia. 2007. *Pseudomonas aeruginosa: aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos* (Tesis doctoral). Universidad de Barcelona, Barcelona, España.
- Wanderley, L., Bianchin, A., Teo, C. R y Fuentefria, A. 2013. Occurrence and pathogenicity of *Candida* spp. in unpasteurized cheese. *Brazilian Journal of Biosciences* 11(2),145-148.
- Wirth, F., y Goldani., L.Z. 2012. Epidemiology of *Rhodotorula*: An Emerging Pathogen. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* 2012. Doi: 10.1155/2012/465717

SEMBLANZA DE LOS AUTORES



Heysell D. Delgado-Silva: Graduada como Ingeniera Química en la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI), actualmente es responsable del Laboratorio de Biotecnología del Programa de Investigación Estudios Nacionales y Servicios del Ambiente (PIENSA-UNI). Desarrolló proyecto de investigación con interés en el área de biotecnología para el desarrollo de procesos industriales y agrícolas. Graduada del Instituto Nacional Técnico para la Administración y Economía como Técnico General de Contabilidad. Ha participado en varios congresos nacionales y latinoamericano en diversas áreas; XXII Congreso Latinoamericano de Estudiantes de Ingeniería y 2^{do} y 3^{er} foro de proyectos de investigación, desarrollo, innovación, posgrado y extensión de la UNI.



Leandro Alberto Páramo Aguilera, Graduado como Ingeniero Químico con maestría en Ingeniería Química y énfasis en procesos biotecnológicos, en el Instituto Superior Politécnico “José Antonio Echeverría”, ISPJAE, de la Ciudad de la Habana, Cuba, en el año 1990. En 1997 se gradúa como Master en Microbiología y énfasis en bacteriología en la Universidad de Costa Rica, UCR. En junio del 2012, se gradúa como Doctor en Ciencias en el área de Biotecnología en el Centro de Biotecnología Genómica (CBG) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) de México. Amplia experiencia en el desarrollo de procesos biotecnológicos (biofertilizantes, bebidas alcohólicas, fermentados lácteos, bioprospección, compostaje, etc).