

Identificación Molecular de hongos Hidrocarbonoclastas del Banco de Cepas (Complejo Experimental Campos Elíseos-UFPS)

Morphological characterization of fungi Hydrocarbonoclast from the Bank of Strains, Campos Elíseos Experimental Complex, UFPS.

Liliana Yanet Suárez-Contreras¹, Erika Yaraima Bautista- Rincón², María Luisa Colobon-Prete³

¹ Magister en Biología, énfasis Genética, lilianayanethsc@ufps.edu.co,

<http://orcid.org/0000-0001-8020-502X>, Universidad Francisco de Paula Santander.

² ingeniero Biotecnológica, erikayaraimabr@ufps.edu.co, <https://orcid.org/0000-0001-5662-7249>

³ ingeniero Biotecnológica, marialuisacp@ufps.edu.co, <https://orcid.org/0000-0003-1275-9383>

Cite this article as: L. Suárez-Contreras, E. Bautista- Rincón y M. Colobon-Prete

“Identificación Molecular de hongos Hidrocarbonoclastas del Banco de Cepas (Complejo Experimental Campos Elíseos-UFPS)”, *Prospectiva*, Vol. 22 N° 1 2024.

Recibido: 01/03/2023 / Aceptado: 27/10/2023

<http://doi.org/10.15665/rp.v22i1.3239>

RESUMEN

En el proyecto realizado, se identificaron molecularmente diez cepas de hongos con capacidad hidrocarbonoclasta conservadas en el Banco de Cepas de la Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente en el Complejo Experimental Campos Eliseos de la Universidad Francisco de Paula Santander, los hongos estaban identificados únicamente macroscópicamente y microscópicamente solo por género sin conocer su especie y correspondían a los géneros: *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Paecilomyces* sp., y *Aspergillus* sp., previamente aislados de muestras de suelos provenientes de residuos petroleros biorremediados en la empresa de Aseo Urbano S.A.S. E.S.P.

Para la identificación molecular, se llevó a cabo un proceso de extracción de ADN genómico y amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región ITS. Los amplicones obtenidos fueron secuenciados y sometidos a un análisis BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) en la base de datos GenBank de la NCBI (National Center for Biotechnology Information), obteniendo como resultado identificaciones con porcentajes comprendidos entre el 98% y 100%; Donde los hongos: *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger* obtuvieron la identidad en un 100%. Las otras secuencias identificadas correspondieron a: *Aspergillus tamarii*, *Lichtheimia ramosa*, *Paecilomyces formosus*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium oxalicum* y *Geotrichum candidum*, con estas secuencias se logró obtener un árbol filogenético donde los géneros *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus tamarii*, *Paecilomyces formosus*, *Penicillium oxalicum* y *Penicillium citrinum* presentan cercanías, son altamente similares y las tres cepas de *Geotrichum candidum* también son muy cercanas entre sí, mientras que *Lichtheimia ramosa* representa lejanía de los demás grupos de cepas.

Palabras clave: hongos hidrocarbonoclastas, ITS, *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Paecilomyces* sp., y *Aspergillus* sp.

ABSTRACT

In the project carried out, ten strains of fungi with hydrocarbonoclastic capacity conserved in the Strain Bank of the Faculty of Agricultural and Environmental Sciences at the Campos Eliseos Experimental Complex of the Francisco de Paula Santander University were molecularly identified, the fungi were identified only macroscopically and microscopically only by genus without knowing their species and corresponded to the following genera: *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Paecilomyces* sp., and *Aspergillus* sp., previously isolated from soil samples from oil residues bioremediated at the Aseo Urbano S.A.S. E.S.P. company.

For molecular identification, genomic DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR) amplification of the ITS region was performed. The amplicons obtained were sequenced and subjected to BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) analysis in the GenBank database of the NCBI (National Center for Biotechnology Information), resulting in identifications with percentages between 98% and 100%; where the fungi: *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* obtained 100% identity. The other sequences identified corresponded to: *Aspergillus tamarii*, *Lichtheimia ramosa*, *Paecilomyces formosus*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium oxalicum* and *Geotrichum candidum*. With these sequences it was possible to obtain a phylogenetic tree in which the genera *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus tamarii*, *Paecilomyces formosus*, *Penicillium oxalicum* and *Penicillium citrinum* are very similar and the three strains of *Geotrichum candidum* are also very close to each other; while *Lichtheimia ramosa* represents the remoteness of the other groups of strains.

Keywords: hydrocarbonoclastic fungi, ITS, *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Paecilomyces* sp., and *Aspergillus* sp.

1. INTRODUCCIÓN

Teniendo en cuenta que los suelos son los más afectados por la contaminación con hidrocarburos, y que este tipo de contaminación ocurre con frecuencia [1], debido a que los hidrocarburos son sustancias de alto peso molecular e insoluble en agua, difíciles de degradar resultando ser muy tóxicos para los organismos vivos [2]. Y que por su durabilidad durante un largo período de tiempo y a los cambios adversos que se producen con el contacto con la flora, la fauna y el ser humano; el petróleo y sus derivados son contaminantes muy peligrosos [3]. Es por esta razón que la biorremediación se ha convertido en una herramienta muy útil para solucionar este problema, permitiendo restaurar suelos o aguas contaminadas, siendo esta técnica una alternativa biotecnológica muy eficaz, con bajo costo y nulo impacto negativo [4].

Es importante resaltar que las estrategias actuales de biorremediación se han centrado en el uso de bacterias, algas y hongos [5]; a inicios del siglo XXI se acuñó un nuevo término: micorremediación, que es la transformación enzimática metabólica de los hidrocarburos y otros xenobióticos por hongos en sustancias inocuas o menos tóxicas [6]. Por lo tanto, los hongos involucrados en la degradación de los HAPs (hidrocarburos aromáticos policíclicos) son tan diversos que se han convertido en un área intensiva de investigación; actualmente se encuentran disponibles secuencias genómicas completas de microorganismos cultivables que tienen actividad catabólica potencial para degradarlos. Proponiendo diferentes técnicas moleculares para tal fin, destacando el código de barras genético como una alternativa de solución. Para el caso de los hongos, el marcador aceptado es la región de los espaciadores transcritos ribosomales (ITS) [7]; además su aprobada capacidad para el estudio de la variación inter- e intraespecífica lo convierte en una herramienta muy poderosa [8].

Según lo anterior, esta investigación se realizó en el Banco de cepas y el laboratorio de biotecnología molecular de la Universidad Francisco de Paula Santander del Complejo Experimental Campos Eliseos, por poseer una diversidad de microorganismos como los hongos hidrocarbonoclastas que han sido recolectados de diversos trabajos de investigación, de los cuales solo se había logrado identificar únicamente el género y no la especie, según su clasificación macroscópica y microscópica, por este motivo, este proyecto se centró en la identificación molecular de diez hongos aislados de residuos petroleros biorremediados en el relleno sanitario “guayabal” y conservados en el Banco de cepas, donde utilizando un protocolo de extracción de ADN muy eficiente se amplificaron segmentos de ADN asistido por cebadores como los espaciadores internos de transcrito (ITS), y bases de datos, confirmando su género y su especie, para emplearlos en un futuro con confiabilidad en investigación, como una alternativa teniendo en cuenta que realizan un papel muy importante como degradador de petróleo, para una posible solución en suelos contaminados con hidrocarburos en Norte de Santander.

2. METODOLOGÍA

Los aislamientos de los hongos conservados fueron caracterizados y procesados en los laboratorios: Banco de Cepas y Biotecnología Molecular de la Universidad Francisco de Paula Santander perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente, ubicado en la sede Complejo Experimental Campos Eliseos, Patios, Norte de Santander.

Inicialmente se realizó la reactivación y purificación de las 10 cepas, posteriormente se procedió a realizar la extracción de ADN genómico, se verificó la calidad de ADN obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa y su cantidad y pureza de ADN se determinó por espectrofotometría utilizando el Nanodrop Thermo Scientific 2000 con una relación de absorbancias A260/280 que considero un ADN de pureza óptima con un valor entre 1.8-2 para cada cepa, teniendo en cuenta los parámetros de calidad y pureza, se seleccionaron las mejores extracciones de cada cepa fúngica y se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa con el protocolo propuesto por (Suárez, 2016). Los amplicones generados por PCR fueron enviados a los laboratorios de MACROGEN Corea para ser secuenciados, cada aislamiento se confrontó utilizando BLAST; que comparó la secuencia problema con las existentes en la base de datos, indicando el género y la especie correspondiente. Luego, Geneious Prime 2019, fue el programa informático empleado para alineamiento de secuencias y obtención del árbol filogenético.

Reactivación y Purificación de Cepas

Las 10 cepas con capacidad hidrocarbonoclasta fueron aisladas a partir de muestras de suelo provenientes de los residuos petroleros biorremediados ex situ en el relleno sanitario regional “guayabal” de la ciudad de San José de Cúcuta de un proyecto de investigación y se encontraban conservadas en cajas Petri con agar PDA y tubos con agar y petróleo estéril para conservar su actividad hidrocarbonoclasta, en el Banco de Cepas de la UFPS, Sede experimental Campos Eliseos.

La reactivación y purificación de las cepas pertenecientes a los géneros de *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Paecilomyces* sp., y *Aspergillus* sp., se inició con una reactivación de su capacidad hidrocarbonoclasta realizando siembras en medio de cultivo mineral basal y petróleo crudo estéril [9], para su purificación, se realizaron siembras y repiques sucesivos en cajas Petri con agar Sabouraud por componentes y preparado comercial (SA) al 40%, pH 5.6 y una temperatura a 28°C hasta obtener cepas puras, [9] determinando sus características macroscópicas y microscópicas correspondientes a cada cepa fúngica.

Caracterización microscópica de los aislamientos de *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Paecilomyces* sp., y *Aspergillus* sp.

La observación microscopía se realizó mediante el montaje en cámara húmeda, esta técnica consistió en colocar en el interior de una caja de Petri estéril, un soporte en forma de “v” y sobre este una lámina de portaobjetos [10,11]. El soporte evito que la lámina portaobjetos haga contacto con el fondo de la caja de Petri. Luego se colocó un fragmento de 1cm del medio de cultivo solido (PDA, SA, ETC), estéril; una vez realizado el montaje, con un asa previamente estéril se sembró el hongo a analizar en la mitad del cultivo (punción), se flameó rápidamente un cubreobjetos (para la fijación de la laminilla al agar), y se cubrió con este. Luego, se humedeció el papel con 3 ml de agua estéril, y se llevó a incubación a 28°C/8 días. Después de notar crecimiento, la cepa se cubrió con azul de lactofenol y se observó al microscopio [10].

Caracterización macroscópica de los aislamientos de *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Paecilomyces* sp., y *Aspergillus* sp.

Se realizó la siembra de los hongos en cajas Petri con agar Sabouraud por componentes y preparado comercialmente (SA), se realizó su respectiva caracterización macroscópica, teniendo en cuenta su textura, color, superficie y borde, corroborando que si correspondían con las características macroscópicas a la hoja de vida de cada cepa fúngica que se encontraba en el banco de cepas.

Extracción y visualización del ADN fúngico

Se llevó a cabo el protocolo propuesto por Suárez, 2016 [12,13]. Inicialmente se tomó el micelio del hongo con la ayuda de un asa microbiológica y se depositó en una caja de Petri; luego se cortó en segmentos pequeños con una cuchilla estéril, se utilizó un baja lenguas para sostener el micelio, luego se traspasó a un microtubo de 2ml hasta $\pm 0.25-0.5$ ml; es decir, tres partes del tubo. Después se adicionaron 500 μ l de Buffer de extracción (50Mm Tris-Hcl pH-7.5; 50mM EDTA; 2% de SDS y 1% de Na_2SO_3), con el rotor y pistilo, se maceró hasta romper completamente el micelio. Luego se realizó agitación en vórtex durante 1 minuto y se centrifugó a 6000 rpm por 10 minutos. Posteriormente se tomó el sobrenadante con una micropipeta, tomando de 100 μ l hasta tomarlo todo, evitando tomar el precipitado, se depositó en un microtubo de 1.5 μ l. A continuación, se incubó a 70°C por 15 minutos en baño seco y después se adicionó un volumen de fenol- cloroformo (1:1); la misma cantidad de sobrenadante recuperado para luego realizar inmersión y se centrifugó a 10.000 rpm por 10 minutos; luego se transfirió la primera fase a otro microtubo de 1.5 μ l y se adicionó un volumen, de isopropanol (1:1). Inmediatamente se dejó en congelación por 10 minutos y se volvió a centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos. Después se descartó el sobrenadante por inmersión y se agregaron 500 μ l de etanol al 70%, se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos. Finalmente, se dejó secar el tubo a temperatura ambiente. El ADN se resuspendió en 50 μ l de buffer TE (130 mg de tris, 37,22mg de EDTA, en 100 ml de agua destilada), luego se adicionaron 2 μ l RNAsas y se incubo a 37°C durante 1 hora, y se conservó a 4°C.

Posteriormente se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 0.7% con tampón TBE 1X, 100v por 30 minutos y con el fotodocumentador ChemiDoc de Bio-Rad, se visualizó el ADN, y luego se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop de Thermo Scientific.

Obtención de amplicones

Se amplificó la región ITS mediante iniciadores universales ITS4 e ITS5, se utilizó el protocolo propuesto por Suárez, 2016 [12,14]. Para la obtención de los fragmentos amplificados por medio de la PCR se utilizaron los cebadores ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') que amplificaron la región ITS en sentido y anti-sentido respectivamente [14].

La reacción de PCR, se realizó en tubos de 0,5 ml con un volumen final de 25 µl que contenían: 1 µl de ADN; 16,65 µl de agua destilada estéril; 0,75 µl de MgCl₂ (1,5 mM); 2,5 µl de Buffer (1X), 1,25 µl de ITS4 (0.5 mM); 1,25 µl de ITS 5(0.5 mM); 0.1 µl de Taq polimerasa, 0,5 µl de DNTP's (0.2 mM). La reacción se llevó a cabo en un termociclador (TERMOCICLADOR MULTIGENE™ OPTIMAX,) utilizando el siguiente programa: 94°C por 5 minutos para la desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos de 30 segundos 94 °C para la desnaturalización, 58 °C por 1 minuto para el anillamiento y 72 °C por 1 minuto para la extensión; finalizando con una elongación de 72°C por 10 minutos. Las amplificaciones fueron verificadas en un gel de agarosa al 1.5% w/v (1xTAE buffer) teñidas con GelRed (0.5 µg/ml) y visualizados bajo luz UV en el ChemiDoc (BioRad). Los tamaños de los fragmentos fueron determinados identificando las bandas obtenidas por comparación con un marcador de 1 Kb (Promega®)

Secuenciación y Análisis Filogenético

Los amplicones generados mediante los iniciadores ITS 4 e ITS 5 por PCR fueron enviados a los laboratorios de MACROGEN Corea para ser secuenciados, cada aislamiento se confrontó utilizando BLAST; que compara la secuencia problema con las existentes en su base de datos, indicando el género y la especie perteneciente y Geneious Prime 2019 programa informático para alineamiento de secuencias utilizándola como matrices de datos para la obtención del árbol filogenético. Con el fin de obtener estimadores filogenéticos basados en un modelo explícito de la evolución de nucleótidos para estimar parámetros evolutivos tales como longitudes de rama y topología del árbol. Los árboles filogenéticos son generados para analizar las relaciones evolutivas observadas y obtener información a partir de ellas, de manera que facilite encontrar la divergencia de linajes, o la relación entre ellos [19].

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Obtención de cultivos puros de *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Paecilomyces* sp., y *Aspergillus* sp., con sus respectivos códigos.

Tabla 1. Códigos y Géneros designados a los hongos aislados
Table 1. Codes and Genera designated to the isolated fungi

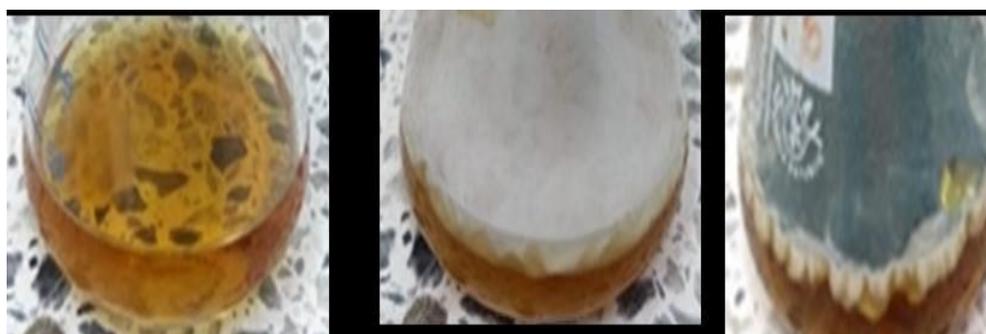
CÓDIGO	NOMBRE
M1H1	<i>Rhizopus</i> sp.
M1H2	<i>Aspergillus</i> sp.
M4H1.1	<i>Aspergillus</i> sp.
M5H3	<i>Aspergillus</i> sp.
M4H3	<i>Paecilomyces</i> sp.
M4H2	<i>Aspergillus</i> sp.

M5H2	<i>Aspergillus</i> sp.
M5H4	<i>Penicillium</i> sp.
M3H2	<i>Aspergillus</i> sp.
M6H1	<i>Penicillium</i> sp.

Extracción del ADN de *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Paecilomyces* sp., y *Aspergillus* sp., en caldo Sabouraud.

Se sembró cada hongo en caldo Sabouraud, para obtener el micelio (Figura 1). Transcurrido el tiempo de incubación, se obtuvo el micelio de cada uno de los hongos y se procedió a la extracción del ADN.

Figura 1. Crecimiento micelial listo para realizar extracción
Figure 1. Mycelial growth ready for extraction

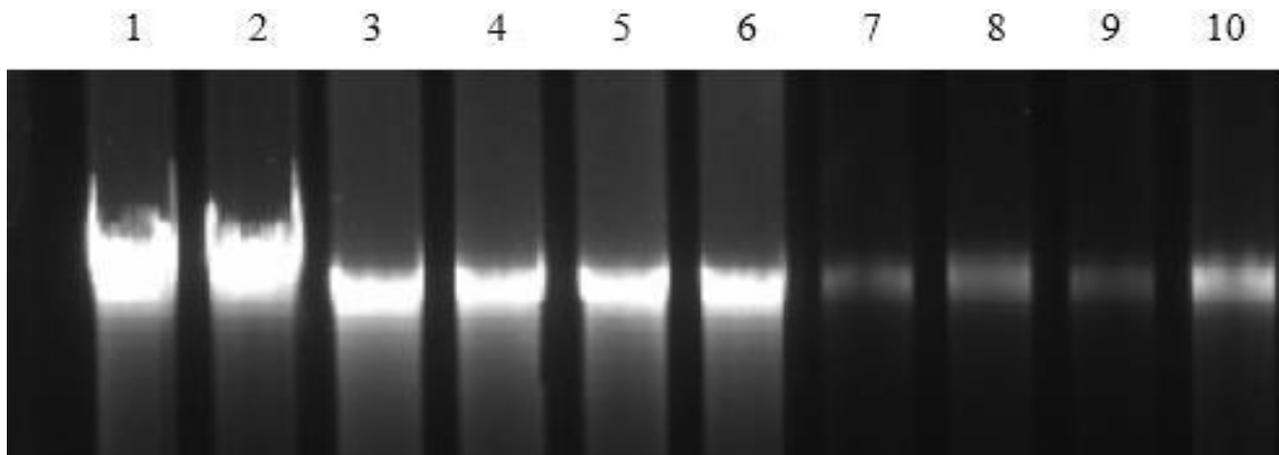


Verificación del ADN extraído de: *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Paecilomyces* sp., y *Aspergillus* sp.

La verificación de la extracción del ADN se realizó seleccionando las cepas con mejor calidad y cantidad de ADN obtenido mediante la electroforesis en un gel de agarosa 0,7%, como se puede observar en la figura 2, y la cuantificación de ADN de cada cepa que se determinó por espectrofotometría utilizando el Nanodrop Thermo Scientific 2000.

Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 0.7 % (w/v), empleada para verificar la calidad del ADN de las extracciones. Carril 1: M1H1. Carril 2: M4H3. Carril 3: M6H1. Carril 4: M3H2. Carril 5: M5H3. Carril 6: M1H2. Carril 7: M5H2. Carril 8: M5H4. Carril 9: M4H2. Carril 10: M4H1.1.

Figure 2. 0.7% (w/v) agarose gel electrophoresis, used to verify DNA quality of extractions. Carril 1: M1H1. Carril 2: M4H3. Carril 3: M6H1. Carril 4: M3H2. Carril 5: M5H3. Carril 6: M1H2. Carril 7: M5H2. Carril 8: M5H4. Carril 9: M4H2. Carril 10: M4H1.1.



Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

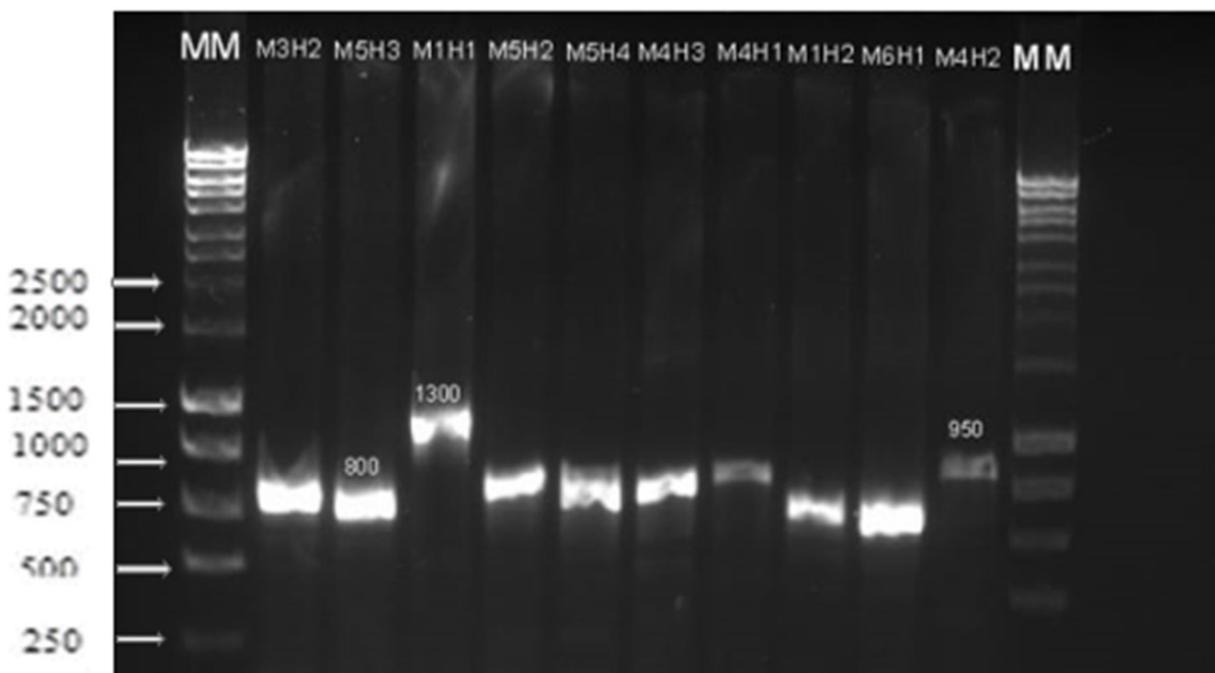
Con este protocolo se lograron obtener amplicones para las cepas: M3H2, M5H2, M1H1, M5H2 y M5H4.

Teniendo en cuenta estos resultados, se realizaron cambios en las temperaturas y tiempos en los ciclos del termociclador para la PCR de acuerdo al protocolo de(15,16), primer ciclo desnaturalización a 94°C por cinco minutos, 35 ciclos de 94°C por un minuto, el anillamiento 55°C por un minuto, la extensión 72 °C por 1 minuto y un ciclo final de 72°C por 10 minutos, en el que se obtuvieron amplicones para las cepas: M1H2, M4H2 y M4H1.1, posteriormente se modificó el protocolo utilizando la temperatura de anillamiento de 58°C propuesta por (16,17),obteniendo los amplicones para las cepas M4H3 y M6H1.

Las amplificaciones fueron verificadas en un gel de agarosa al 1.5% w/v (1xTAE buffer) teñidas con Gel Red (0.5 µg/ml) como se observa en la figura 3, y visualizados bajo luz UV en el ChemiDoc (BioRad). Los fragmentos fueron determinados identificando las bandas obtenidas por comparación con un marcador de 1 Kb (Promega®). Posteriormente se realizó la cuantificación de ADN por espectrofotometría utilizando el Nanodrop Thermo Scientific 2000. Una vez obtenidas las concentraciones de los amplicones, se seleccionó la de mayor concentración de ADN de cada muestra, para ser secuenciadas.

Figura 3. Separación de fragmentos amplificados en gel de agarosa al 1.5% (w/v) para las regiones ITS 4 y 5 de ADN ribosomal. Carril 1y 12: Marcador de peso molecular de 1kb.Carril 2:M3H2 (850pb). Carril 3: M5H3 (800pb). Carril 4: M1H1 (1300 pb). Carril 5:M5H2 (900pb). Carril 6: M5H4 (900pb). Carril 7: M4H3(850pb). Carril 8: M4H1.1 (950pb). Carril 9: M1H2(800pb). Carril 10:M6H1 (800pb). Carril 11:M4H2 (950pb).

Figure 3. Separation of amplified fragments on 1.5% (w/v) agarose gel for ITS 4 and 5 regions of ribosomal DNA. Carril 1y 12: Marcador de peso molecular de 1kb.Carril 2:M3H2 (850pb). Carril 3: M5H3 (800pb). Carril 4: M1H1 (1300 pb). Carril 5:M5H2 (900pb). Carril 6: M5H4 (900pb). Carril 7: M4H3(850pb). Carril 8: M4H1 (950pb). Carril 9: M1H2(800pb). Carril 10:M6H1 (800pb). Carril 11:M4H2 (950pb).



Secuenciación de los fragmentos ITS y comparación de secuencias en BLAST

Los resultados de las secuencias obtenidas arrojaron los géneros y especies correspondientes a la amplificación realizada en la región del espaciador transcrito interno mediante los cebadores ITS4 e ITS5 de los hongos; obteniendo resultados que indican valores entre el 98% y 100%. según las especificaciones de NCBI el porcentaje de identidad

debe estar en un rango superior del 98.7%, lo que indica la confirmación de la especie (18). En la tabla 2, se observa el código inicial con el que fue rotulado el microorganismo en el banco de cepas, su caracterización molecular, el porcentaje de identidad, el E-value y el código de acceso al BLAST.

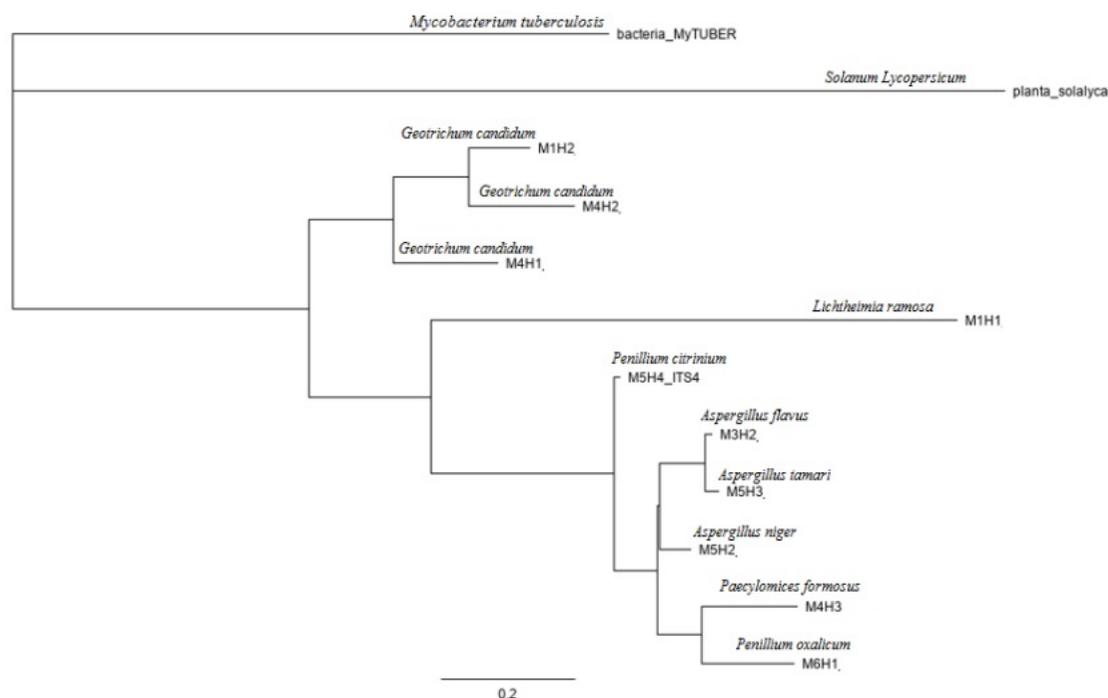
Tabla 2. Identificación Molecular de los Hongos Hidrocarbonoclastas
Table 2. Molecular Identification of Hydrocarbonoclastic Fungi

CÓDIGO	GENERO	ESPECIE	IDENTIDAD	E VALUE	CODIGO DE ACCESO
M1H1	<i>Lichtheimia</i>	<i>ramosa</i>	99%	0.0	LC413237.1
M1H2	<i>Geotrichum</i>	<i>candidum</i>	99%	0.0	MF782775.1
M3H2	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	100%	0.0	MF120213.1
M4H1	<i>Geotrichum</i>	<i>candidum</i>	98%	0.0	KC143428.1
M4H2	<i>Geotrichum</i>	<i>candium</i>	99%	0.0	MF782775.1
M4H3	<i>Paecylomices</i>	<i>formosus</i>	99%	0.0	KC157764.1
M5H2	<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>	100%	0.0	MK108384.1
M5H3	<i>Aspergillus</i>	<i>tamari</i>	99%	0.0	MH864331.1
M5H4	<i>Penicillium</i>	<i>citrinum</i>	99%	0.0	MG575519.1
M6H1	<i>Penicillium</i>	<i>oxalicum</i>	98%	0.0	FJ537112.1

El alineamiento multiplex de secuencias se realizó mediante el programa Geneious Prime 2019, permitiendo construir el árbol filogenético en el cual las secuencias con mayor similitud estarán apareadas o por el contrario, las que más difieren estarán a mayor distancia genética de las secuencias utilizadas (10).

Figura 4. Árbol filogenético en relación con los 10 aislados mediante el programa Geneious.

Figure 4. Phylogenetic tree in relation to the 10 isolates using the Geneious program



En la figura 4, se muestra la estructura del árbol filogenético, que consta de 12 hojas que representan las distancias y cercanías de las secuencias analizadas denominadas taxones, para demostrar las diferencias genéticas entre los taxones se tomó como referencia las secuencias de una planta y una bacteria.

se puede observar en su estructura, se encontraron tres diferencias en estos microorganismos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus tamaritii*, *Paecilomyces formosus*, *Penicillium oxalicum* y *Penicillium citrinum* presentan cercanías, puesto que tienen en común, pertenecer a la familia Trichocomaceae. Las tres cepas de *Geotrichum candidum* también son muy cercanas entre sí por pertenecer a la familia Mucoraceae, mientras que *Lichtheimia ramosa* está alejada de los demás grupos de cepas, por pertenecer a la familia Mucoraceae.

4. CONCLUSIONES

Se lograron identificar molecularmente cuatro géneros de hongos filamentosos como: *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. *Paecilomyces* sp. con su respectiva especie. Importantes no solo como hidrocarbonoclastas, sino como posibles biocontroladores y con otras futuras aplicaciones, teniendo en cuenta su importancia en biotecnología.

El género y especie de M1H2, M4H1.1 y M4H2 arrojado por el BLAST, no tiene correlación con las características macroscópicas, microscópicas, puesto que el género *Geotrichum* sp., es un hongo levaduriforme, las características de este género son diferentes al aislamiento realizado. Es posible afirmar que durante la aplicación de los protocolos de extracción y de PCR no fue la correcta o la adecuada.

Recomendaciones

En el momento de realizar la siembra a caldo Sabouraud para realizar extracción de ADN, se recomienda usar un cultivo joven y dejarlo en agitación durante 24 horas con el fin de facilitar y aumentar el crecimiento micelial de la cepa; No se debe exceder el tiempo de incubación más de 7 para obtener buenas calidades de ADN.

Para la siembra de hongos en caja con agar, se observan mejores resultados en cuanto a crecimiento de la cepa, utilizando el método por punción de fragmentos cortados de la cepa fúngica.

Para la manipulación de microorganismos correspondientes a los géneros *Lichtheimia* sp., y *Aspergillus* sp., se deben trabajar en Cabina de Bioseguridad nivel II debido a que son hongos patógenos humanos, causantes de infecciones pulmonares cutáneas entre otras.

Los microorganismos después de ser identificados molecularmente, deben ser conservados inmediatamente dependiendo del protocolo de conservación asignado o usado en el laboratorio del Banco de cepas de la UFPS de la Facultad de Ciencias Agrarias y del Medio ambiente, como prevención para evitar posibles mutaciones

Agradecimientos

Al FINU (proyectos del Fondo de Investigación Universitaria), quien financió los materiales y reactivos para este proyecto.

5. REFERENCIAS

- [1] Valenzuela, I., Galindo, L., Mantilla, D., Moncada, D. S., Orjuela, E., Romano, K., & Rincón, J. (2021). TÉCNICAS DE BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBUROS CON FINES DE USO EN EL MUNICIPIO DE TIBÚ, NORTE DE SANTANDER. *Suelos Ecuatoriales*, 51(1), 107-118.
- [2] Cevallos, T., y García, T. (2018). Evaluación de la biodegradación de suelos contaminados con hidrocarburos utilizando *Aspergillus niger*, *Pleurotus ostreatus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Tesis pregrado). Universidad Politécnica Salesiana, Quito
- [3] Rodríguez-Gonzales, Apolonia, Zárate-Villarroe, Sandra Giovana, & Bastida-Codina, Agatha. (2022). Biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos para realizar biorremediación. *Revista de Ciencias Ambientales*, 56(1), 178-208. <https://dx.doi.org/10.15359/rca.56/1.9>.
- [4] Vázquez, A., Rodríguez, T. Mondragón, C. Leal, E. y García F. (2017) caracterización de hongos hidrocbonoclastas aislados de un suelo contaminado, *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, Vol. 4(1): 58-64.
- [5] Raowska, J. Remediation of diesel-contaminated soil enhanced with firefighting foam application. *Sci Rep* 10, 8824 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65660-3>.
- [6] Padilla-Garfias, F., Sánchez, N. S., Calahorra, M., & Peña, A. (2022). Levaduras degradadoras de hidrocarburos aromáticos policíclicos. *Revista de Educación Bioquímica*, 40(4), 178-188.
- [7] Maldonado-Bonilla, L. D., Machorro-Sámamo, S., Villarruel-Ordaz, J. L., Garibay-Orijel, R., Álvarez-Manjarrez, J., Sánchez-Espinosa, A. C., ... & Valera-Venegas, G. (2021). Macromicetos de la selva baja caducifolia en la región de la costa de Oaxaca, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 92, 1-14.
- [8] Pérez-Martínez, C., Rojas-Martinez, R. I., Alatorre-Rosas, R., Hernández-Rosas, F., & Otero-Colina, G. (2013). Intraspecific variation analysis of *Conidiobolus coronatus* using RAPD and ITS sequencing. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(6), 357-362.
- [9] Duarte, A. (2017). Aislamiento, Identificación y Evaluación de Hongos Hidrocarbonoclastas, a partir de Residuos Petroleros Biorremediados en la empresa de Aseo Urbano S.A.S. E.S.P. (Tesis de pregrado). Universidad Francisco de Paula Santander, Cúcuta.
- [10] Espitia, A. (2018). Identificación molecular mediante ITS de los fitopatogenos *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp., *Curvularia* sp., pertenecientes al Banco de Cepas de la Universidad Francisco de Paula Santander, Sede Campos Elíseos (tesis de pregrado). Universidad Francisco de Paula Santander, Cúcuta.
- [11] Rojas Triviño, Alberto. (2011). Conceptos y práctica de Microbiología general. Manual. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. Recuperado de: 49 <http://www.bdigital.unal.edu.co/4999/1/albertorojastrivino.2011.pdf>.
- [12] Suárez Contreras, L. Y. (2016). Identificación molecular de aislamientos de *Moniliophthora roreri* en huertos de cacao de Norte de Santander, Colombia. *Acta Agronómica*, 65(1), 51–57. <https://doi.org/10.15446/acag.v65n1.47994>

- [13] Suárez, L. Y., & Manzano, J. B. (2021). Caracterización Molecular Del Fitopatógeno *Moniliophthora Roreri*, Utilizando Marcadores Issr, En Norte De Santander, Colombia. *Prospectiva*, 19(1), 8.
- [14] Suárez Contreras, L. Y., & Peñaranda Figueredo, F. A.. (2021). Identificación molecular de hongos filamentosos y su potencial biotecnológico. *Biotechnología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, 20(1), 194–206. <https://doi.org/10.18684/rbsaa.v20.n1.2022.1914>.
- [15]. Martín Blanco, L. (2013). Caracterización molecular, fenotípica, patogénica y medios de control de *Phaeoacremonium aleophilum* y otros hongos asociados a los decaimientos de la vid en Castilla y León (Tesis Doctoral). UNIVERSIDAD DE LEON.
- [16]. Peña W. L. y Suarez, L. Y. (2015). Caracterización molecular mediante ITS del biocontrolador *Paecilomyces* sp. Del Banco de Cepas de la Universidad Francisco de Paula Santander, Sede Campos Eliseos – los patios. (Semana internacional). UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER, CUCUTA DE NORTE DE SANTANDER
- [17] Perdomo Ziems, H. M (2011). Caracterización fenotípica y molecular de hongos filamentosos oportunistas: *scedosporium*, *acremonium*, *phialemonium*, *lecythophora* y *paecilomyces* (Tesis Doctoral). Universidad Rovira i Virgili. España.
- [18] Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, D. R., da Costa, M. S., ... & Trujillo, M. E. (2018). Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 68(1), 461-466.
- [19] Karla Alejandra, M, V (2017). Uso de herramientas para alineación de secuencias y creación de árboles filogenéticos para la determinación de especies. *Revista Tecnología en Marcha*, 30(Suppl. 1), 30-34. <https://dx.doi.org/10.18845/tm.v30i5.3218>.