



**Caracterización molecular y proteómica de hongos rizosféricos en tres especies
arbóreas plantadas en zona contaminada (Shusufindi EST_40) y no contaminada
(Ribereños) por actividades inherentes a la extracción de Petróleo en la Amazonía
ecuatoriana**

Chiriboga Segovia, Belén Alejandra

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera Agropecuaria

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera Agropecuaria

Lic. Chiriboga Novillo, Carlos Eduardo, Dr.

30 de agosto del 2023



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera Agropecuaria

Certificación:

Certifico que el trabajo de integración curricular: **Caracterización molecular y proteómica de hongos rizosféricos en tres especies arbóreas plantadas en zona contaminada (Shusufindi EST_40) y no contaminada (Ribereños) por actividades inherentes a la extracción de Petróleo en la Amazonía ecuatoriana**, fue realizado por la señorita: **Chiriboga Segovia, Belén Alejandra**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta para verificación y/o análisis de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 30 de agosto del 2023



Dr. Chiriboga Novillo, Carlos Eduardo

C. C.17064846

Resultados de la herramienta para verificación y/o análisis de similitud de contenidos



Plagiarism and AI Content Detection Report

1 Chiriboga Segovia Belén Alejandra_...

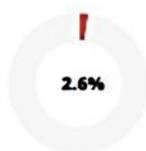
Scan details

Scan time:
August 30th, 2023 at 19:26 UTC

Total Pages:
48

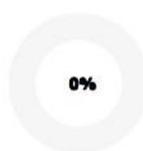
Total Words:
11992

Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
Identical	2.3%	271
Minor Changes	0.1%	17
Paraphrased	0%	0
Omitted Words	8.9%	1071

AI Content Detection



Text coverage		Words
AI text	0%	0
Human text	100%	10921

[Learn more](#)

Alerts: (1)

Cross Language: Same Document Language

Submitted language and cross-language text are the same language. No credits were used.

2/5 Severity



Firmado electrónicamente por:
CARLOS EDUARDO
CHIRIBOGA NOVILLO

Dr. Chiriboga Novillo, Carlos Eduardo

C. C. 1706484613



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera Agropecuaria

Responsabilidad de Autoría:

Yo, **Chiriboga Segovia, Belén Alejandra**, con cédula de ciudadanía No. **1752408912**, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Caracterización molecular y proteómica de hongos rizosféricos en tres especies arbóreas plantadas en zona contaminada (Shusufindi EST_40) y no contaminada (Ribereños) por actividades inherentes a la extracción de Petróleo en la Amazonía ecuatoriana**, es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 30 de agosto del 2023

.....
Chiriboga Segovia, Belén Alejandra

C.C.: 1752408912



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera Agropecuaria

Autorización de Publicación:

Yo, **Chiriboga Segovia, Belén Alejandra**, con cédula de ciudadanía No.1752408912 autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Caracterización molecular y proteómica de hongos rizosféricos en tres especies arbóreas plantadas en zona contaminada (Shusufindi EST_40) y no contaminada (Ribereños) por actividades inherentes a la extracción de Petróleo en la Amazonía ecuatoriana** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios es de mi responsabilidad.

Sangolquí, 30 de agosto del 2023

Chiriboga Segovia, Belén Alejandra

C.C.:1752408912

Dedicatoria

El presente trabajo de investigación está dedicado a mis padres, Miriam y Mauricio quienes me han apoyado a lo largo de mi carrera universitaria, siempre han creído en mí y me han motivado a ser una excelente persona y profesional.

A mi abuelito Fausto Segovia por enseñarme el valor de la familia, el trabajo duro, la perseverancia, y por su amor incondicional.

A mis hermanos Ricardo y Andrea por ser parte de mi vida.

Belén Alejandra Chiriboga Segovia

Agradecimientos

Al Dr. Carlos Chiriboga, por los conocimientos impartidos y por la confianza que ha depositado en mi a lo largo del desarrollo de este trabajo de investigación.

Al Dr. Wilmer Pozo, por su tiempo, por su apoyo y por los consejos brindados.

A Francisco Flores, PhD por estar dispuesto a compartirnos su experiencia en el ámbito de biología molecular y las herramientas que conllevo este trabajo.

A la Ing. Gaby Morales por su ayuda, perseverancia, así como los conocimientos compartidos conmigo. Por ser una excelente profesional y convertirse en una amiga para mí.

A la Ing. Ari Drouet por facilitarnos el uso del Laboratorio de Agrobiotecnología del IASA I, y por su colaboración sin límites.

Al Ing. Xavier Paredes por ser parte de este grupo de trabajo y apoyarnos siempre.

A la Dr. Silvana Granda técnico del Laboratorio de Microbiología ESPE, por su ayuda.

A mis compañeras Bertha Chicango y Jennifer Villegas por ser partícipes de este proyecto.

A mi compañero Santi Guevara por el tiempo compartido, y por apoyarnos mutuamente para lograr la culminación de esta etapa.

A Fernando Arias por llegar a mi vida, y convertirse en una parte esencial de la misma, por acompañarme siempre y no dejarme sola nunca, por compartir mis sueños y ser partícipe de ellos.

Por último, quiero agradecer a la Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA I por ser mi hogar durante estos 5 años, y por todos sus profesores que aportaron para mi formación profesional.

Belén Alejandra Chiriboga Segovia

Índice de contenidos

Carátula	1
Certificación	2
Resultados de la herramienta para verificación y/o análisis de similitud de contenidos.....	3
Responsabilidad de Autoria	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos	7
Índice de contenidos	8
Índice de tablas.....	12
Índice de figuras.....	13
Resumen	14
Abstract.....	15
CAPÍTULO I	16
INTRODUCCIÓN	16
Antecedentes	16
Justificación.....	17
Objetivos	17
Objetivo General.....	17
Objetivos Específicos.....	17
Hipótesis	18
CAPÍTULO II	19
REVISIÓN DE LITERATURA	19
Suelos Amazónicos.....	19
Hongos Rizosféricos.....	19
Hongos rizosféricos como indicadores de calidad de sitio	20

Extracción de ADN de hongos.....	20
PCR	21
Espaciador transcrito interno (ITS)	22
Secuenciación	23
Secuenciación Sanger.....	24
Diversidad biológica	25
Riqueza	25
Abundancia.....	26
Índices de equitatividad.....	26
Índices de dominancia	26
Filogenia.....	26
UPGMA	27
Espectrometría de masas (MALDI-TOF MS)	27
CAPÍTULO III.....	30
METODOLOGÍA.....	30
Ubicación del estudio	30
Zona Ribereños	30
Zona Shushufindi.....	30
Parte experimental	30
Preparación de medios de cultivo.....	31
Medio PDA.....	31
Medio líquido	31
Activación de cepas.....	31
Purificación de medios	32
Selección de muestras	32
Inoculación en medio líquido	33

Extracción de ADN	33
Determinación de la cantidad y calidad de ADN	34
Dilución del ADN extraído.....	35
Amplificación de la región ITS por PCR.....	35
Comprobación del producto amplificado.....	37
Secuenciación	37
Espectrometría de masas.....	37
Análisis Bioinformático	37
Análisis de secuencias.....	37
Alineamiento de secuencias	38
Limpieza de secuencias.....	38
Identificación de hongos	40
Análisis de la diversidad.....	40
Análisis filogenético	41
CAPÍTULO IV	42
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
Activación de cepas.....	42
Concentración y pureza de ADN	42
Amplificación del gen ITS mediante PCR	44
Identificación molecular de hongos.....	47
Filogenia.....	53
Identificación por MALDITOF	55
Evaluación de la diversidad	58
CAPÍTULO V	62
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	62
Conclusiones.....	62

Recomendaciones.....	63
Bibliografía.....	64

Índice de tablas

Tabla 1 <i>Muestras escogidas Ribereños</i>	32
Tabla 2 <i>Muestras escogidas Shushufindi</i>	32
Tabla 3 <i>Primers utilizados para la amplificación de la región ITS</i>	36
Tabla 4 <i>Ajuste del master mix de reacción para un volumen final de 50 µL</i>	36
Tabla 5 <i>Condiciones de amplificación del gen ITS</i>	36
Tabla 6 <i>Codificación de las bases degeneradas</i>	40
Tabla 7 <i>Resultados de concentración y pureza de ADN</i>	44
Tabla 8 <i>Microorganismos identificados por secuenciación del gen ITS</i>	51
Tabla 9 <i>Hongos identificados molecularmente y la especie arbórea a la que pertenecen</i>	53
Tabla 10 <i>Identificación de microorganismos mediante el análisis MALDI-TOF</i>	56
Tabla 11 <i>Comparación de identificación molecular y MALDI-TOF</i>	58
Tabla 12 <i>Resultados análisis de diversidad</i>	60

Índice de figuras

Figura 1 <i>Esquema del ciclo de PCR</i>	22
Figura 2 <i>Esquema parcial del gen ADN ribosomal y sus espaciadores internos ITS1 e ITS2</i> ...23	
Figura 3 <i>Principio de secuenciación de Sanger</i>	25
Figura 4 <i>Base instrumental de MALDI-TOF MS</i>	29
Figura 5 <i>Cromatograma obtenido de una secuencia del primer ITS 1</i>	38
Figura 6 <i>Alineamiento de secuencias para la obtención de la secuencia consenso.</i>	38
Figura 7 <i>Secuencias tras la limpieza de ruido</i>	39
Figura 8 <i>Curvas de bases diferentes al mismo nivel en el cromatograma.</i>	39
Figura 9 <i>Amplificación región ITS</i>	45
Figura 10 <i>Amplificación región ITS</i>	46
Figura 11 <i>Amplificación región ITS</i>	47
Figura 12 <i>Árbol filogenético de las secuencias del sitio no contaminado Ribereños</i>	54
Figura 13 <i>Árbol filogenético de las secuencias del sitio contaminado Shushufindi</i>	55
Figura 14 <i>Índice de Shannon</i>	61

Resumen

En la presente investigación se identificaron hongos rizosféricos de tres especies arbóreas: *Platymiscium pinnatum*, *Zygia longifolia* y *Piptadenia pteroclada*, plantadas en la zona contaminada de Shushufindi EST_40 y en la zona no contaminada de Ribereños, de la Amazonia Ecuatoriana, mediante el uso de espectrometría de masas y la secuenciación a partir de la amplificación del gen ITS. Se activaron las cepas de hongos rizosféricos pertenecientes al programa de fitoremediación de suelos afectados por extracción petrolera. Se escogieron 14 muestras, siete por localidad, seleccionando un hongo por cada género identificado morfológicamente. La amplificación se llevó a cabo con los *primers* ITS1 e ITS4 dando como resultados tamaños de amplicón de alrededor de 550 a 600 pb. Dichos productos de la PCR fueron secuenciados mediante el método Sanger, las secuencias fueron ensambladas para obtener una secuencia consenso la cual fue comparada con la base de datos *GenBank* mediante el uso de la herramienta BLAST, identificando el 85,71% de las especies. Las especies identificadas corresponden a *Trichoderma* spp., *Fusarium* sp., *Mucor irregularis*, *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus arrizus*, *Penicillium citrinum* y *Geotrichum candidum*. Mediante espectrofotometría de masas MALDI-TOF se identificó el 28,57% de las especies fúngicas. Cabe resaltar que tan solo la identidad de *Aspergillus fumigatus* coincidió con las dos técnicas de identificación utilizadas. La biodiversidad de hongos rizosféricos fue mayor en el sitio no contaminado que en el sitio contaminado.

Palabras clave: GEN ITS, HONGOS RIZOSFÉRICOS, ANÁLISIS MOLECULAR, MALDITOF.

Abstract

In the present research, rhizospheric fungi of three tree species were identified: *Platymiscium pinnatum*, *Zygia longifolia*, *Piptadenia pteroclada*, planted in the contaminated area of Shushufindi EST_40 and in the non-contaminated area of Ribereños, in the Ecuadorian Amazon, through the use of mass spectrometry and sequencing from the amplification of the ITS gene. The strains of rhizospheric fungi belonging to the phytoremediation program of soils affected by oil extraction were activated. Fourteen samples were chosen, seven per locality, selecting one fungus for each genus identified morphologically. Amplification was carried out with primers ITS1 and ITS4, resulting in amplicon sizes of about 550 to 600 bp. These PCR products were sequenced using the Sanger method, the sequences were assembled to obtain a consensus sequence which was compared with the GenBank database using the BLAST tool, identifying 85.71% of the species. The identified species correspond to *Trichoderma* spp., *Fusarium* sp., *Mucor irregularis*, *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus arrhizus*, *Penicillium citrinum* and *Geotrichum candidum*. By MALDI-TOF mass spectrophotometry, 28.57% of the fungal species were identified. It should be noted that only the identity of *Aspergillus fumigatus* coincided with the two identification techniques used. The biodiversity of rhizospheric fungi was higher in the non-contaminated site than in the contaminated site.

Keywords: ITS GENE, RHIZOSPHERIC FUNGI, MOLECULAR ANALYSIS, MALDITOF.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

La actividad petrolera en el Ecuador inició desde la década de 1970 cuando se produjo un boom petrolero tras el descubrimiento de yacimientos de petróleo en la región amazónica del Ecuador. Este acontecimiento provocaría un rápido crecimiento de la industria pues se convirtió en una de las principales fuentes de ingresos para la economía ecuatoriana y de su PBI (Díaz y Cueva, 2017). Es así que se han creado campos petroleros que ocupan grandes extensiones de terreno y conforme han pasado los años también han crecido las concesiones de áreas para esta actividad (Mateo y García, 2014).

En el Ecuador, la actividad petrolera se caracteriza por no aplicar controles ambientales pertinentes, ni realizar el mantenimiento adecuado de los pozos petroleros, además del uso de tecnología obsoleta y no llevar estadísticas del daño producido tanto en el medio ambiente como en la vida de las comunidades (Lessmann *et al.*, 2016).

Se ha reportado varios impactos producidos por esta industria y sus *actividades* inherentes para la obtención del crudo, siendo uno de estos las alteraciones en la actividad de microorganismos, su diversidad y las propiedades fisicoquímicas del suelo (Alrumman *et al.*, 2015).

El Proyecto Amazonía Viva de la empresa Petro Amazonas con el fin de disminuir estos impactos producidos en la región amazónica, ha colaborado con diversos proyectos de investigación relacionados con la fitorremediación forestal (Villacís Buenaño, 2016), y en lo que corresponde a los microorganismos del suelo durante cuatro años seguidos se ha evaluado los efectos relacionados con la diversidad, abundancia y riqueza de hongos rizosféricos en árboles inoculados y no inoculados, plantados en zonas contaminadas y no contaminadas de la Amazonía ecuatoriana (Quinsasamín Armas, 2019; Remache Arequipa, 2020; Sosa Vargas, 2018; Vega Chimarro, 2021).

Justificación

El reino Fungi es considerado uno de los más diversos, se estima que incluyen más de 1,5 millones de especies, de las cuales tan solo se han identificado aproximadamente el 10% (Hawksworth, 2001). Por este motivo la identificación de hongos a nivel de especie es de suma importancia tanto para estudios de base (ecología, taxonomía) como para estudios aplicados (genómica) (Raja *et al.*, 2017).

Los métodos clásicos de identificación de hongos, que se basan principalmente en las características morfológicas, se utilizan para la clasificación de hongos a nivel de orden o de familia, y generalmente no funcionan para identificar una especie, pues los caracteres morfológicos no brindan agrupaciones precisas dentro de un marco evolutivo, principalmente a nivel de especie (Raja *et al.*, 2017). En este sentido han surgido nuevas tecnologías mediante el uso moderno de técnicas moleculares basadas en el ADN, y proteómicas basadas en perfiles de proteínas que han demostrado ser muy útiles para explorar su identidad taxonómica (Gautam *et al.*, 2022). La amplificación y secuenciación del gen ITS es una parte primordial pues es el marcador de código de barras de ADN preferido para la identificación de taxones únicos proporcionando un gran material de referencia para la identificación (Bellemain *et al.*, 2010).

Objetivos

Objetivo General

Caracterizar molecularmente los hongos rizosféricos presentes en tres especies arbóreas plantadas en la zona contaminada de Shushufindi EST_40 y en la zona no contaminada de Ribereños en la Amazonía ecuatoriana.

Objetivos Específicos.

Activar las cepas de hongos rizosféricos pertenecientes al programa de fitoremediación de suelos afectados por procesos de extracción petrolera en las Zonas Shushufindi EST_40 y Ribereños.

Identificar a nivel específico hongos rizosféricos en suelos contaminados y no contaminados mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF MS).

Secuenciar el gen ITS para la identificación específica de hongos rizosféricos presentes en suelos contaminados y no contaminados.

Comparar la riqueza específica entre suelos contaminados y no contaminados.

Hipótesis

Hipótesis Nula

La riqueza específica de hongos rizosféricos no cambia entre suelos contaminados y no contaminados por actividades inherentes a la extracción de petróleo.

Hipótesis de Investigación

La riqueza específica de hongos rizosféricos cambia entre suelos contaminados y no contaminados por actividades inherentes a la extracción de petróleo.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

Suelos Amazónicos

La región amazónica ecuatoriana conformada por seis provincias: Sucumbíos, Orellana, Napo, Pastaza, Morona Santiago y Zamora Chinchipe, ocupa 115 613 km² lo que representa 45 % de todo el territorio (Huera-Lucero *et al.*, 2020).

Existe una gran diversidad de suelos en esta región siendo los más predominantes los que corresponden a los órdenes Andisoles, Inceptisoles, Entisoles y Oxisoles (Sánchez *et al.*, 2018).

Los suelos son de origen volcánico sin embargo se caracterizan por una baja concentración de nutrientes, baja fertilidad, además de elevados niveles de aluminio y mercurio producto de las precipitaciones, actividades agropecuarias y actividades antropogénicas como la extracción de petróleo, minería o deforestación (Vargas y Calero, 2014).

Hongos Rizosféricos

El suelo es uno de los ecosistemas más extensos, habitado por un grupo diverso de microorganismos que se encuentran en estrecha relación con las raíces y son responsables de varios procesos biológicos y fisiológicos (Pattnaik y Busi, 2019). El suelo está conformado por varias zonas, siendo la rizósfera, el suelo adyacente a las raíces de las plantas, incluyendo el microambiente 0 ~ 2 mm entre la superficie de la raíz y el suelo, siendo este un nicho único para la proliferación microbiana (Hartmann *et al.*, 2008). Los hongos que aquí habitan juegan un papel esencial en la absorción de nutrientes produciendo una simbiosis beneficiosa con la mayoría de las plantas, proporcionando nitrógeno y fósforo, además de aumentar significativamente la eficiencia en la utilización de los nutrientes del suelo (Haldar y Sengupta, 2015). Se ha reportado que los hongos rizosféricos pueden ayudar a procesos de fitoremediación en suelos contaminados con petróleo, degradando los hidrocarburos debido a la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares (Kadri *et al.*, 2017).

Hongos rizosféricos como indicadores de calidad de sitio

La calidad del suelo está fuertemente influenciada por las funciones que desarrollan los microorganismos que aquí habitan, así como también por su diversidad. Por esta razón la estructura de la comunidad microbiana tiene la capacidad de servir como un indicador temprano y altamente fiable de degradación o agotamiento del suelo (Pedraza *et al.*, 2010). La estructura y composición de la comunidad microbiana rizosférica se ve muy afectada por una serie de factores bióticos y abióticos como el contenido de MO, las características químicas de los suelos, el pH, y la cantidad de contaminantes o sales (Doula y Sarris, 2016).

El petróleo es considerado como uno de los principales contaminantes que afectan a la actividad biológica que desempeñan los hongos rizosféricos en el suelo, aumentando la toxicidad e interfiriendo en la disponibilidad y absorción de nutrientes (Pattnaik y Busi, 2019).

Extracción de ADN de hongos

El ADN de alta calidad, así como una cantidad aceptable es esencial para la realización de las técnicas moleculares como PCR y la secuenciación del genoma (Bellemare *et al.*, 2018). El fundamento de la extracción de ADN se basa en el rompimiento de las paredes celulares para su liberación, mediante la utilización de métodos físicos y químicos, seguido de la separación de las proteínas, eliminación de desechos celulares y finalmente su precipitación (Gupta, 2019).

La extracción de ADN de hongos conlleva varios inconvenientes, pues los hongos presentan una pared celular compuesta por glucanos, quitina y glicoproteínas que dificulta la lisis celular y la cantidad de ADN obtenido (Fredricks *et al.*, 2005). Los métodos de extracción convencionales emplean métodos físicos y químicos para asegurar la ruptura de la pared celular y la liberación del ADN, sin embargo los rendimientos obtenidos son bajos (Kumar y Mugunthan, 2018), por lo cual en la actualidad existen kits comerciales disponibles, que favorecen la lisis celular, cantidad de ADN aceptable y la purificación del ADN, ya que suelen

ofrecer un entorno libre de sustancias en comparación con los métodos tradicionales, pero su aplicación suele ser costosa (Black y Foarde, 2007).

PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica molecular, cuyas aplicaciones se han extendido a todas las ciencias biológicas desde que se descubrió por primera vez (Mullis, 1990). Su principio se basa en generar un gran número de copias de un gen a partir de una plantilla de ADN molde (Van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

Cada reacción de PCR requiere la presencia de: ADN polimerasa, nucleótidos (dNTP), *primers*, ADN molde, buffer e iones de magnesio.

La ADN polimerasa es la enzima que permite la replicación uniendo los nucleótidos individuales para formar el producto de la PCR. Los dNTP son los componentes que proporcionan tanto la energía como los nucleótidos necesarios que utiliza la Taq polimerasa para la síntesis de ADN (Garibyan y Avashia, 2013).

Los *primers* o cebadores son secuencias definidas cortas de ADN utilizados para dar inicio a la reacción como puntos de partida, además de definir el fragmento a amplificar; el *primer forward* reconoce de manera complementaria la secuencia del fragmento de ADN de la cadena 5'–3' objetivo, mientras que el *primer reverse*, una secuencia 3'–5' del mismo fragmento (Kadri, 2019).

El buffer de PCR asegura las condiciones óptimas de pH para que la enzima Taq polimerasa ejecute su función, finalmente los iones de magnesio actúan como cofactor de la polimerasa asegurando su máxima eficacia (Kadri, 2019).

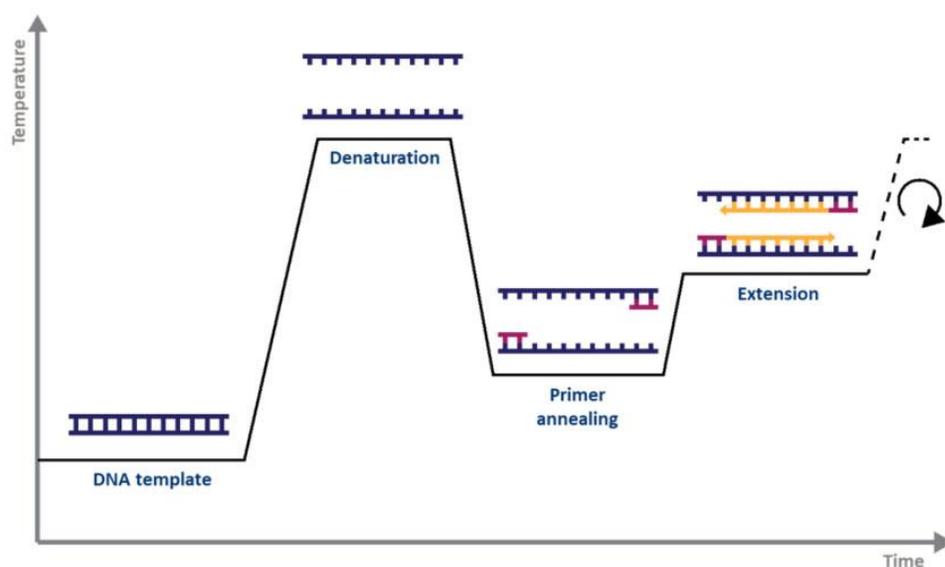
El proceso de la PCR implica ciclos térmicos de desnaturalización, hibridación y extensión. En la fase de desnaturalización el ascenso de la temperatura alrededor de 94 C° provoca que las cadenas de ADN se dividan. A continuación, la temperatura baja en un rango aproximado a 55 C°, provocando que los cebadores específicos se unan por complementariedad al ADN objetivo, proceso conocido como hibridación, finalmente la

temperatura se eleva nuevamente a 72 C° momento en el que actúa la enzima polimerasa extendiendo los cebadores y agregando nucleótidos a la cadena de ADN (Pérez de Castro, 2011).

Cada vez que se repite este proceso el número de copias de ADN se duplica (Pérez de Castro, 2011). (Figura 1).

Figura 1

Esquema del ciclo de PCR



Nota. Representación esquemática de un ciclo de amplificación por PCR. Recuperado de: (Neidler, 2017).

Espaciador transcrito interno (ITS)

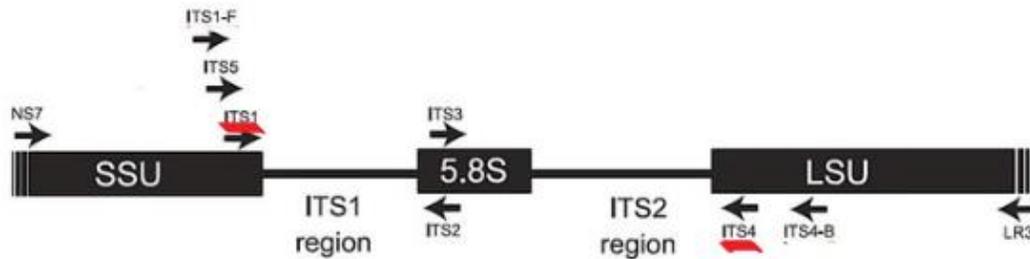
La región ITS es el código de barras genético recomendado para hongos, pues presenta características favorables como: practicidad, fiabilidad de amplificación por PCR (> 90 % de éxito), alto grado de variación incluso entre especies estrechamente relacionadas, ausencia de variación extrema de longitud, la presencia de copias únicas y baja variabilidad intraespecífica (Schoch *et al.*, 2012).

ITS hace referencia al ADN espaciador localizado entre los genes de ARNr de subunidad pequeña (ARNr 18S) y ARNr de subunidad grande (ARNr 5,8S y 28S) en el cromosoma o la región transcrita correspondiente (Sharma *et al.*, 2023).

En el reino Fungi, toda la región ITS tiene una longitud de aproximadamente 600 pb (White *et al.*, 1990). Las regiones ITS1 e ITS2 se incluyen en la región ITS, estas se encuentran separadas por el gen 5.8S (Bellemain *et al.*, 2010).

Figura 2

Esquema parcial del gen ADN ribosomal y sus espaciadores internos ITS1 e ITS2.



Nota. Representación esquemática de la región del espaciador transcrito interno (ITS) ribosomal nuclear espaciador ITS1 (entre los genes 18S y 5.8S rRNA) y el espaciador ITS2 (entre los genes 5.8S y 28S rRNA), con *primers* de uso común para amplificar dichas regiones. Subrayado los *primers* utilizados ITS1-ITS4. Adaptado de: (Ben Hassine Ben Ali, 2016).

Los genes de ARNr 18S, 5.8S y 28S debido a sus secuencias altamente conservadas permiten el diseño de "*primers* universales" (Xu, 2016). Estos *primers* permiten la amplificación de la totalidad o partes de la región ITS, dirigiéndose a diferentes sitios del gen (Martin y Rygielwicz, 2005).

Se puede hacer uso de distintos *primers* universales para la secuenciación de ADN de acuerdo al grupo de hongos en estudio, ya que el uso de un solo par de *primers* puede arrojar resultados inexactos en la determinación de especies (Asemaninejad *et al.*, 2016).

Secuenciación

Todos los organismos poseen una secuencia de ADN única, que está constituida por nucleótidos. Si se conoce dicha secuencia, se puede identificar el organismo en cuestión. La secuenciación del ADN es una técnica para precisar cómo se encuentran ubicados los nucleótidos presentes en una molécula de ADN, estableciendo sus propiedades hereditarias y bioquímicas (Shendure *et al.*, 2017).

Esta técnica es de gran importancia en la microbiología pues tiene múltiples aplicaciones siendo las más representativas la especificación, análisis filogenético y tipificación de bacterias (Salem-Bango *et al.*, 2023).

A lo largo de los años y con el avance de la tecnología, se ha logrado una revolución en la genómica fúngica pues se puede producir secuencias de cualquier microorganismo con una alta precisión, y costos bajos. Es así que el recurso genómico fúngico en la actualidad ha aumentado provocando la generación de bases de datos de secuencias de hongos públicas que se encuentran al alcance de los investigadores para nuevos estudios (Galagan *et al.*, 2005).

Secuenciación Sanger

El método de secuenciación de Sanger denominado también como método de terminación de cadena fue desarrollado en 1977 (Sanger *et al.*, 1977).

Esta técnica requiere un molde de ADN objetivo monocatenario, un cebador de ADN, ADN polimerasa, desoxirribonucleótidos (dNTP), y nucleótidos marcados con tinte fluorescente (ddNTP) (Heather y Chain, 2016).

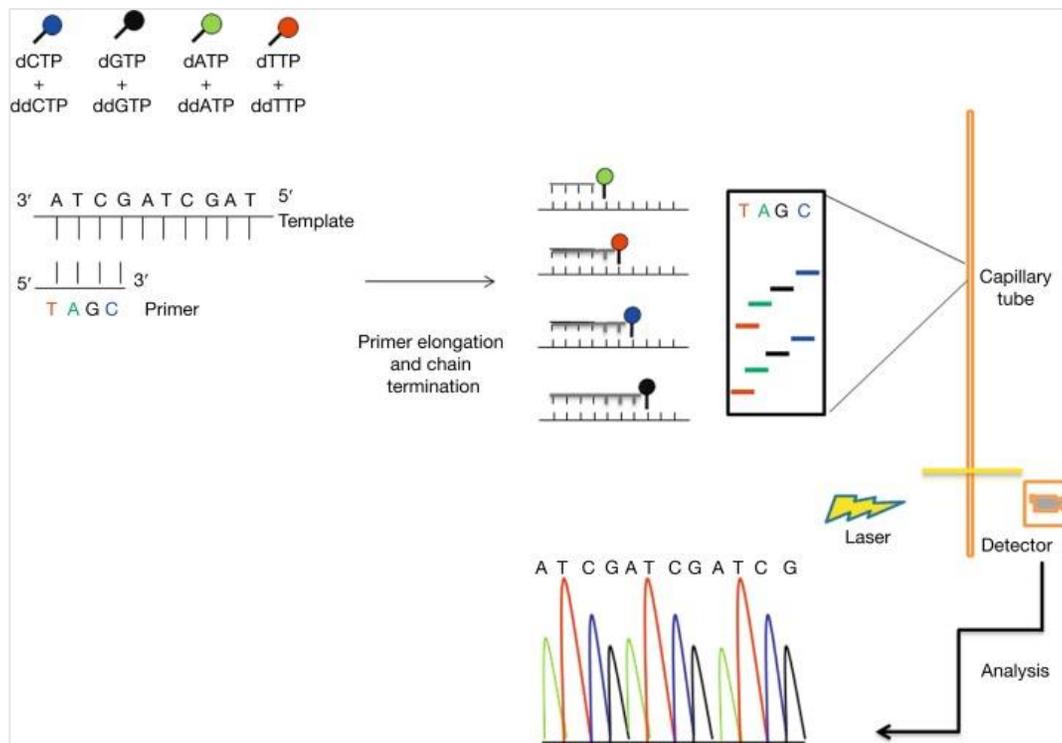
Estos ddNTPs, impiden la formación del enlace fosfodiéster, evitando la adición de más nucleótidos una vez estos se hayan incorporado (Men *et al.*, 2008).

Cuando se une un ddNTP a la secuencia de elongación, la base emitirá fluorescencia según el nucleótido asociado con una longitud de onda específica, A con fluorescencia verde, T con rojo, G con negro y C con azul (Gomes y Korf, 2018).

Las reacciones de secuenciación se ejecutan mediante una columna de electroforesis capilar en donde los fluoróforos son excitados con un láser para leer la secuencia mediante la detección de la intensidad fluorescente que se traduce en un "pico", estos picos corresponden a las bases de nucleótidos que posteriormente un software los convertirá en un electroferograma (Hagemann, 2015).

Figura 3

Principio de secuenciación de Sanger



Nota. Los ddNTP marcados con fluorescencia se añaden a los amplicones a medida que se sintetizan. La información se traduce a una secuencia en un electroferograma. Recuperado de: (Zhang *et al.*, 2014).

Diversidad biológica

La biodiversidad biológica representa la variedad y heterogeneidad de diferentes tipos de organismos que se encuentran presentes y en constante interrelación en un ecosistema, esta abarca la diversidad de especies, la diversidad genética y la diversidad de ecosistemas que aquí se encuentran (Morris *et al.*, 2014).

Se han desarrollado varios índices de diversidad utilizados, con el fin de medir los cambios en las comunidades de acuerdo a la variable a analizar (Magurran y Dornelas, 2010).

Riqueza

La riqueza se define con el número de individuos de distintos tipos de especies que se encuentran en ambiente o grupo (Morris *et al.*, 2014).

Abundancia

La abundancia absoluta se define con el número total de individuos pertenecientes a una misma especie que se encuentran en un ambiente o grupo (Morris *et al.*, 2014).

Índices de equitatividad

La equitatividad es una medida que representa el grado de similitud haciendo uso de las abundancias de diferentes especies y cómo estas se encuentran distribuidas. Dentro de los índices de equitatividad se encuentra al índice de Shannon–Wiaver (H') el cual asume que los individuos se muestrean aleatoriamente y que todas las especies están representadas en la muestra (Shannon, 1948).

Este índice muestra la heterogenidad existente tomando en cuenta la relación entre la riqueza de especies y la abundancia relativa de individuos, los valores bajos indican más diversidad, mientras que los valores más altos indican menos diversidad (Ortiz-Burgos, 2016).

Por otra parte, el índice de Pielou mide la uniformidad de las especies y cómo estas se distribuyen en una comunidad (Pielou, 1966).

Índices de dominancia

Los índices de dominancia hacen referencia a una distribución desigual, cuantificando la dominancia de una o pocas especies (especies dominantes) las cuales tienen mayor representatividad en una comunidad. Dentro de los índices de dominancia se encuentra el índice de Simpson que mide la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar de una muestra corresponden a la misma especie (Simpson, 1949).

Filogenia

Filogenia es el estudio de la comparación de similitudes genéticas y desarrollo evolutivo de los diferentes grupos de organismos (Dhama, 2023).

La filogenética molecular es la ciencia que emplea datos de secuencias de genes para inferir la historia evolutiva de los organismos mediante las relaciones filogenéticas existentes entre especies (Dhama, 2023). Esta rama de la filogenia permite analizar las diferencias en las

secuencias de ADN de los individuos que pertenecen a una misma especie, ya que comparten características en común (Bromham, 2016).

Los resultados obtenidos mediante los análisis filogenéticos moleculares están representados mediante un árbol filogenético que resume por medio de una representación gráfica las relaciones de ancestros comunes a través de la comprensión de las secuencias mismas de los organismos y su evolución (Hall, 2013).

UPGMA

El método UPGMA también conocido como método de grupo de pares no ponderados con media aritmética es considerado uno de los algoritmos más sencillos para la elaboración de un árbol filogenético (Drummond y Rodrigo, 2000).

Es un método de distancia para la predicción filogenética, pues utiliza una matriz de distancias entre pares de secuencias de los taxones estudiados, previamente realizada una alineación múltiple, su fundamento se basa en los fragmentos en los que se ha cambiado la secuencia, siendo un valor más pequeño el que indica una relación más cercana (Hua *et al.*, 2017).

En este método se asume una tasa de evolución constante denominada como hipótesis de reloj molecular que sostiene que las secuencias de ADN mutan a un tiempo constante durante el mismo periodo de tiempo (Hua *et al.*, 2017).

Espectrometría de masas (MALDI-TOF MS)

La espectrometría de masas de tiempo de vuelo de ionización por desorción láser asistida por matriz, también conocida como MALDI-TOF MS, es una técnica de identificación de microorganismos que se basa en el perfil de proteínas ribosómicas considerado como una huella única de proteínas específicas de un microorganismo y su comparación con una base de datos de espectros de masas de referencia (Drissner *et al.*, 2014).

La aplicación de esta técnica se inició con la identificación de bacterias, pero se amplió a la identificación de levaduras y hongos filamentosos importantes, siendo una técnica rápida,

de bajo costo y de fácil aplicación, convirtiéndose así es una herramienta utilizada ampliamente por los investigadores (Cassagne *et al.*, 2011).

Un espectrómetro de masas está constituido por un mecanismo de ionización “MALDI” basado en un método de ionización suave que permite ionizar las proteínas sin su ruptura durante el proceso, un analizador de masas “TOF” que diferencia los iones de acuerdo a los valores establecidos mediante la relación masa /carga y un dispositivo que logra la detección de iones separados (Croxatto *et al.*, 2012).

En el análisis en hongos es necesario un tratamiento previo con ácido fórmico para lisar las células, debido a la naturaleza compleja de las paredes celulares de estos microorganismos (Maldonado *et al.*, 2018).

Posteriormente se transfiere la muestra a la placa conductora y se añade una solución matriz de un compuesto orgánico, al secarse la matriz se cristaliza y fija junto a la muestra (Li *et al.*, 2022).

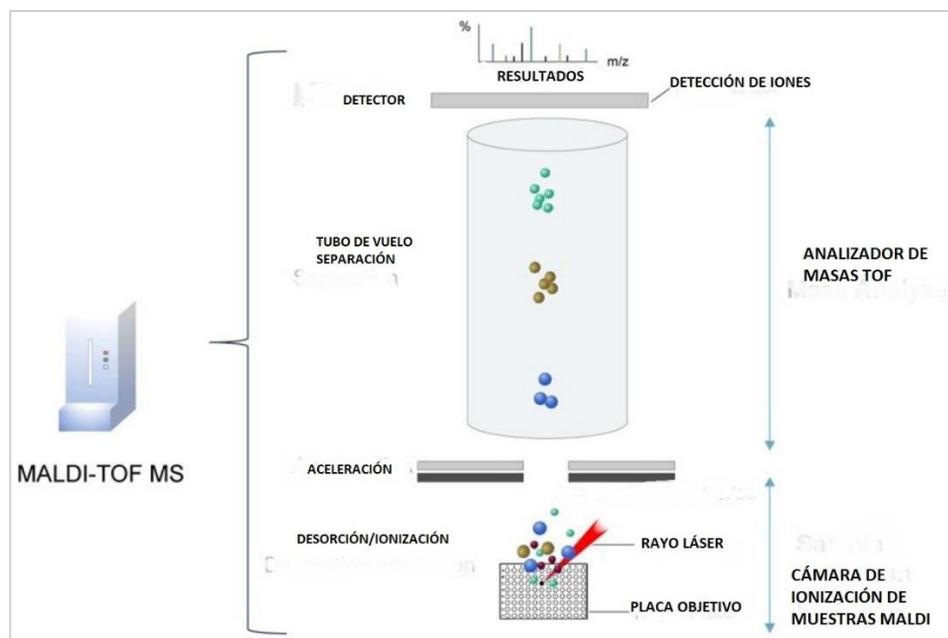
La placa se introduce en el equipo en donde la muestra se ioniza bajo la irradiación de un bombardeo con láser pulsado, las moléculas de la matriz absorben la energía del láser y la transforman en energía excitada, llevando a estado gaseoso a la muestra (Maldonado *et al.*, 2018).

Acto seguido se produce la ionización de las proteínas que se van a acelerar por un campo eléctrico a través del tubo TOF, provocando su separación entre sí de acuerdo a su relación masa/carga en relación al tiempo que tarda en recorrer la longitud del tubo de vuelo (Singhal *et al.*, 2015).

En función de la información, se genera un espectro característico denominado huella dactilar de masa peptídica (PMF) que es único para cada tipo de hongo que debe ser comparado con una base de datos para hallar similitudes (Singhal *et al.*, 2015).

Figura 4

Base instrumental de MALDI-TOF MS



Nota. Metodología para el análisis MALDI-TOF. Adaptado de: (Li *et al.*, 2022).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

Ubicación del estudio

Las muestras fueron recolectadas durante cuatro años seguidos, en las parcelas experimentales, de los campos de explotación petrolera de la empresa Petroamazonas, ubicadas en la provincia de Sucumbíos.

Zona Ribereños

La parcela del sitio Ribereños es considerada una parcela testigo, pues no ha sido afectada por los procesos de extracción de petróleo. Se encuentra ubicada en las coordenadas: (NO300491, UTM1001430) (Villacís *et al.*, 2016).

Zona Shushufindi

La parcela Shushufindi es considerada una plataforma de lodos y ripios, en donde los desechos provenientes de la perforación denominados “lodos y ripios de perforación” son mezclados con otros componentes para disminuir metales pesados y estabilizar el material. Se encuentra ubicada en las coordenadas: (M313661, UTM9981360) (Villacís *et al.*, 2016).

Parte experimental

Los cultivos de los hongos, así como los análisis de biología molecular se llevaron a cabo en el Laboratorio de Microbiología y de Agrobiotecnología de la Carrera Agropecuaria (IASA I) de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respectivamente.

La cuantificación y calidad de ADN por espectrofotometría se realizó en el Laboratorio de Docencia de biología molecular de la Carrera de Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

Los análisis correspondientes a la parte proteómica (MALDI-TOF MS) se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad Regional Amazónica IKIAM.

Los análisis de biodiversidad se realizaron en el Laboratorio de Zoología de la Carrera Agropecuaria (IASA I) de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

Preparación de medios de cultivo

Medio PDA

Se hizo uso del medio PDA de la marca BD Difco™. Se pesó 40 g del medio y se lo colocó en un matraz con 1000 mL de agua destilada, se llevó a la plancha de agitación/calentamiento y se esperó su ebullición.

La solución se trasvasó a un frasco BOECO, se adicionó una pastilla de amoxicilina de 500 mg y se autoclavó por 15 minutos a 121 °C.

El medio se dispensó en cajas Petri estériles en una cabina de flujo laminar (THERMO FORMA), finalmente se esperó su solidificación para su almacenamiento a 4 °C y posterior uso.

Medio líquido

Se pesó 20 g de dextrosa y 5 g de peptona y se disolvió en 1 000 mL de agua destilada. Esta solución se llevó a la plancha de calentamiento hasta su ebullición y se añadió una pastilla de amoxicilina de 500 mg.

Se dispensó aproximadamente 5 mL de medio en tubos de ensayo con ayuda de una pipeta Pasteur estéril, y se autoclavó por 15 minutos a 121 °C.

Una vez que estos se enfriaron fueron almacenados a 4 °C hasta su uso.

Activación de cepas

Se activaron las cepas de hongos correspondientes a los sitios Ribereños 39 cepas y Shushufindi 22 cepas, almacenadas en el Laboratorio de Microbiología del IASA I, de cuatro trabajos de titulación entre los años 2018 a 2021, que se encontraban en viales a -20 °C. Dichas cepas fueron activadas en medio sólido Papa Dextrosa Agar (PDA) con amoxicilina (500 mg).

Se colocó aproximadamente 1 mL de muestra del vial en la caja con PDA gelificado y fue esparcido con la ayuda del asa de inoculación, además se inoculó la porción de agar extraído del vial. Se incubó a 30°C durante 72 horas dentro de la incubadora.

Purificación de medios

Transcurridas las 72 horas de la inoculación, se observó las cajas Petri y se purificó las muestras contaminadas hasta obtener hongos puros.

Se tomó únicamente el hongo de interés y se lo transfirió a una nueva caja Petri con medio PDA, dejándolo incubar nuevamente a 30°C durante 72 horas.

Selección de muestras

Se seleccionaron 14 muestras de hongos puros previamente identificados morfológicamente, siete muestras correspondientes a Ribereños (Tabla 1) y siete muestras de la localidad Shushufindi (Tabla 2). Se escogió una cepa para cada género identificado morfológicamente. Esta identificación se realizó en estudios previos en donde se utilizó las claves dicotómicas *Illustrated Genera of Imperfecte Fungi* (Barnett, 1999) y *Morphologies of Cultured Fungi and key to Species* (Watanabe, 2010).

Tabla 1

Muestras escogidas Ribereños

#	Género
1	<i>Aspergillus</i>
2	<i>Rhizopus</i>
3	<i>Trichoderma</i>
4	<i>Penicilium</i>
5	<i>Trichoderma</i>
6	<i>Paecilomyces</i>
7	<i>Fusarium</i>

*Nota.*Autoría propia.

Tabla 2

Muestras escogidas Shushufindi.

#	Género
1	<i>Scopulariopsis</i>
2	<i>Geotrichum</i>
3	<i>Rhizopus</i>
4	<i>Thielaiopsis</i>
5	<i>Trichoderma</i>
6	<i>Paecilomyces</i>
7	<i>Fusarium</i>

*Nota.*Autoría propia.

Inoculación en medio líquido

A partir de los cultivos puros de las muestras seleccionadas se extrajo micelio con el asa de inoculación y se colocó en un tubo de ensayo con 5 mL de medio líquido (peptona + dextrosa + amoxicilina).

Los tubos de ensayo fueron flameados con el mechero Bunsen y sellados con ayuda de Parafilm. Para favorecer su crecimiento se los llevó a la incubadora por 72 horas a 30°C.

Extracción de ADN

Se utilizó el protocolo para la identificación molecular de microorganismo propuesta por, Flores. (2021) modificada de, Berrendero *et al.* (2008).

En tubos de 1,5 mL se colocó la muestra fúngica creciendo en medio líquido, además de 1,5 mL de medio. Se sometió a centrifugación a 1 0000 rpm durante 2 min y se descartó el sobrenadante.

Se agregó 500 µL de buffer de extracción (Tris HCl 100 Mm (Invitrogen), EDTA 20 mM (JT. Baker), CTAB 2,5 % w/v, NaCl 1.4 M (EMSURE), pH 8) y se sometió a maceración con un pistilo estéril por 1 min hasta que el micelio se hay triturado completamente.

Se homogenizó la muestra en un vórtex (DLAB) durante 5 s. Se añadió tres perlas de vidrio al tubo y se agregó 2 µL de β-mercaptoetanol, se repitió el proceso de homogenización con vórtex por 30 s hasta que el micelio del hongo se vea macerado.

Se incubó en un termo bloque (LABNET) a 60 °C por 30 min y se mezcló invirtiendo la muestra cada 10 min. Se añadió 500 µL de cloroformo frío y se homogenizó una vez más.

Las muestras se dejaron en reposo por 2 min. Para su posterior centrifugación a 14500g por 8 min.

El sobrenadante obtenido se transfirió a un nuevo microtubo de 1,5 mL y se añadió un volumen igual de etanol absoluto frío, 150 µL de acetato de sodio 3 M (pH 5,2) (Baker Analyzed) y 300 µL de etanol al 70 %.

Para favorecer la precipitación de ADN, se dejó reposar las muestras a -20 °C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugaron las muestras a 14 500 g por 14 min, se desechó el sobrenadante y cuidadosamente se lavó dos veces con 200 µL de etanol al 70 % para eliminar restos de contaminantes.

Se dejó secar por 30 min con la ayuda del flujo de aire de una cámara de flujo laminar. El pellet se resuspendió en 50 µL de solución de NaOH 8 mM en agua ultrapura, se añadió 1µL de RNAsa y se dejó incubar a 37°C por 30 min.

Las muestras fueron almacenadas a -20°C, para su posterior uso.

Determinación de la cantidad y calidad de ADN

La calidad de ADN se determinó por medio de una electroforesis horizontal en gel de agarosa (SeaKem ®) al 0,8% y TBE (108 g Tris (Invitrogen), 55 g Ácido Bórico (AMP), 40 mL EDTA 0,5 M, pH 8 (JT. Baker)) con 4 µL de SYBR safe (PROMEGA Diamond™), en cada pocillo se depositó 10 µL de ADN y 2 µL de Blue Juice. La electroforesis se corrió a 100 V por 30 min. El gel de agarosa se observó en el transiluminador (ALPHA INNOTECH) y se documentaron los resultados.

Las muestras de ADN fueron cuantificadas por medio del espectrofotómetro Multiskan Sky Thermo Scientific™.

En cada pocillo de la placa $\mu Drop$ ™, se colocó 2 μL de cada muestra, se adecuaron los parámetros del protocolo y se ejecutó el programa en el software para lectura de microplacas SkanIt™, este arrojó los resultados de la generación de longitudes de onda de 260 nm, 280 nm, 230 nm y 320 nm, las cuales se usaron para generar las relaciones de pureza 260/280, 260/230 así como también la concentración del ADN (Thermo Fisher Scientific, 2020).

La concentración de ADN $\mu g/ml$ fue obtenida mediante la siguiente fórmula:

$$C = (A_{260} - A_{320}) \times \frac{50 \mu g/ml}{\text{Dimensión celda en cm}}$$

Donde:

C= concentración de ADN $\mu g/ml$

A260= valor de absorbancia a 260 nm

A320= valor de absorbancia a 320 nm

50 $\mu g/ml$ = coeficiente estándar

dimensión celda= distancia por la que pasa la luz a través de la muestra (0,049 cm)

Dilución del ADN extraído

Tras obtener la concentración de ADN ($\mu g/mL$) se diluyeron las muestras más concentradas en agua ultra pura a una concentración final de 100 ng/ μL .

La dilución del ADN se realizó mediante la fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Amplificación de la región ITS por PCR

Las 14 muestras de ADN fueron amplificadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La región ITS fue amplificada mediante el uso de los *primers* ITS1 e ITS4, (White *et al.*, 1990). (Tabla 3).

Tabla 3

Primers utilizados para la amplificación de la región ITS

Primer	Secuencia	Tamaño amplificado (pb)
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	600
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	600

Nota. Pb =pares de bases. Recuperado de: (White *et al.*, 1990).

La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L tal como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4

Ajuste del master mix de reacción para un volumen final de 50 μ L

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen por reacción (1X)
PCR Buffer con Mg ²⁺	10X	1x	5 μ L
MgSO ₄	25 mM	1.5mM	3 μ L
<i>dNTP`s mixture</i>	10 mM	0.2 mM	1 μ L
<i>Primer forward (ITS1)</i>	10 μ M	0.5 μ M	1 μ L
<i>Primer Reverse (ITS4)</i>	10 μ M	0.5 μ M	1 μ L
Taq Polimerasa	5U/ μ L	1U	0,2 μ L
Agua ultra pura	-	-	37,8 μ L
ADN	-	100 ng	1 μ L

Nota. dNTP`s: Desoxinucleótido trifosfato. Autoría propia.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (TECHNE-TC-412) según a lo establecido por (White *et al.*, 1990) cuyo programa se encuentra en la Tabla 5.

Tabla 5

Condiciones de amplificación del gen ITS

Etapa	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Denaturalización inicial	95 °C	3 min	1
Denaturalización	95 °C	30 s	30
Hibridación	60 °C	30 s	30
Extensión	72 °C	60 s	30
Extensión final	72 °C	3 min	1

*Nota.*Recuperado de: (White *et al.*, 1990) .

Comprobación del producto amplificado

Para comprobar la amplificación de la región ITS se realizó una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1 % y TBE (108 g Tris (Invitrogen), 55 g Ácido Bórico (AMP), 40 mL EDTA 0,5 M, pH 8 (JT. Baker)) con 4 μ L de SYBR safe, (PROMEGA Diamond™), en cada pocillo se depositó 5 μ L del amplicón y 2 μ L de Blue Juice. Se utilizó 2 μ L de marcador (PROMEGA) de 100 pb en el primer pocillo para determinar el tamaño de los amplicones. La electroforesis se corrió a 90 V por 1 hora. El gel de agarosa se observó en el transiluminador (ALPHA INNOTECH) y se documentó los resultados.

Secuenciación

Se envió 45 μ L de producto de la PCR a la empresa IDgen que posteriormente realizó el envío de amplicones a MACROGEN en Korea, aquí se realizó una purificación y secuenciación con el método Sanger de las dos hebras del fragmento de ADN.

Espectrometría de masas

Se recolectó micelio del hongo a analizarse y se añadió 1 μ L de ácido fórmico al 70 % para la fijación de la muestra, posteriormente se agregó 40 mg/ml de la matriz de ionización CHCA (alpha-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid) en modo lineal para la lectura de los pocillos.

Se llevó la placa al espectrofotómetro de masas. Se adecuó los parámetros y se inició el análisis.

El software SARAMIS (System Version 4.1.0.9) fue empleado para la identificación de microorganismos presentes en la muestra.

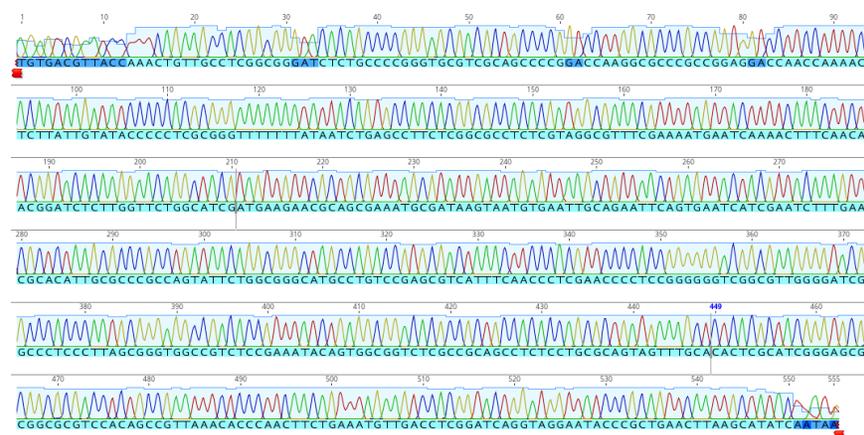
Análisis Bioinformático

Análisis de secuencias

Una vez que los resultados fueron remitidos se procedió al análisis de las secuencias. Se llevó a cabo el ensamblaje y limpieza de las bases con relación a su cromatograma tanto de la secuencia del “*primer ITS1*” como la del “*primer ITS4*” en el programa *Geneious Prime*.

Figura 5

Cromatograma obtenido de una secuencia del primer ITS 1



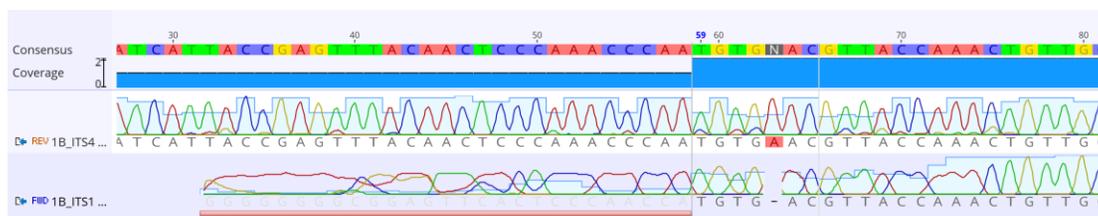
Nota. Cromatograma secuencia ITS1 definida por la intensidad de los nucleótidos mediante el método de Sanger. Autoría propia.

Alineamiento de secuencias

Se seleccionaron las secuencias tanto forward como reverse y se realizó el ensamblaje mediante la opción de *Novo Assemble*. De esta manera se obtuvo las secuencias consenso. (Figura 6).

Figura 6

Alineamiento de secuencias para la obtención de la secuencia consenso



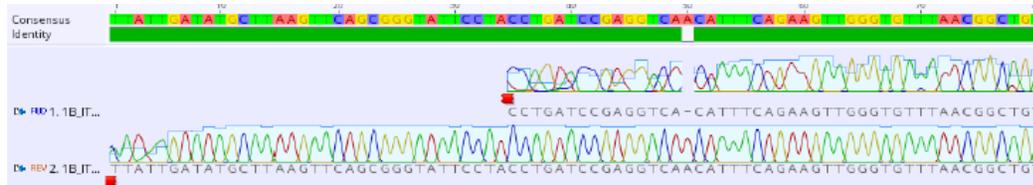
Nota. Secuencia consenso obtenida tras la alineación de la secuencia ITS1 e ITS4. Autoría propia.

Limpieza de secuencias

Una vez obtenido el archivo de ensamblaje, se realizó la limpieza de los extremos de la secuencia que se consideraron de mala calidad. (Figura 7).

Figura 7

Secuencias tras la limpieza de ruido

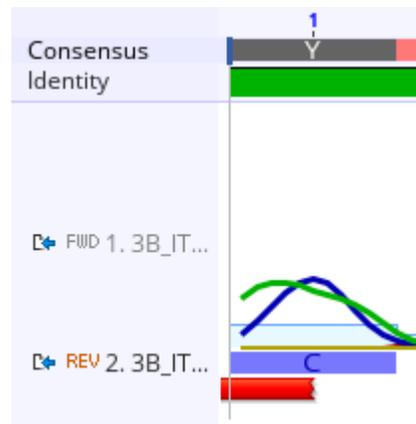


Nota. Secuencia consenso tras la limpieza de la secuencia ITS1 e ITS4. Autoria propia.

En caso de encontrar dos curvas de bases diferentes al mismo nivel en el cromatograma se identificaron bases degeneradas representadas con símbolos. Estas bases degeneradas fueron analizadas y cambiadas con las bases correspondientes, teniendo en cuenta la secuencia en donde este pico sea de buena calidad (Figura 8). De esta manera se obtuvo la secuencia consenso final.

Figura 8

Curvas de bases diferentes al mismo nivel en el cromatograma.



Nota. Representación bases degeneradas. Recuperado de: Autoria propia.

Tabla 6*Codificación de las bases degeneradas*

Símbolo	Bases representadas
R	A/G
Y	C/T
M	A/C
K	G/T
S	C/G
W	A/T
H	A/T/C
B	C/G/T
V	A/C/G
B	C/G/T
N	A/C/G/T

Nota. Representación normalizada de bases degeneradas. Recuperado de: (Morais Oliveira *et al.*, 2015).

Identificación de hongos

Las secuencias consenso obtenidas fueron comparadas con la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI-GenBank) por medio del uso de la herramienta Targeted Loci Nucleotide BLAST. Se cargó los datos de las secuencias consenso en formato fasta y se inició el análisis. Para la identificación de las secuencias se tomó en cuenta el nombre de la especie, el porcentaje de identidad, el número de accesión y la longitud de la secuencia.

Análisis de la diversidad

Con los muestreos de los años 2018, 2019, 2020 y 2021, se extrajo la Riqueza (S), abundancia (Ni), índice de diversidad Simpson (1-D), índice de Diversidad de Shannon (H') e índice de equitatividad de Pielou (J'). Las diferencias entre los índices de diversidad de Shannon, se buscaron a partir de la construcción de intervalos de confianza al 95 %, utilizando el método de Bootstrap con 10 000 iteraciones (MacGregor-Fors y Payton, 2013). Además, se evaluó la riqueza observada en cada tipo de ecosistema mediante el estimador no paramétrico

Chao 1, que es un estimador del número de especies en una comunidad a partir del número de especies raras en la muestra. El Software utilizado para estos análisis fue Past® (Hammer, 2020).

Análisis filogenético

Para la construcción del árbol filogenético, se realizó un alineamiento de las secuencias con el programa MEGA X. La historia evolutiva se evaluó mediante el método de distancia UPGMA, se utilizó la interfaz *Construct/Test/UPGMA tree* en el mismo programa, adicionalmente se utilizó el método Bootstrap con 1000 iteraciones que se muestra junto a las ramas y permite evaluar la confiabilidad del árbol (De Moraes Russo y Selvatti, 2018).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Activación de cepas

Se activaron 61 cepas de hongos pertenecientes al programa de fitoremediación de suelos afectados por procesos de extracción petrolera. De la localidad Ribereños 39 cepas y 22 cepas correspondientes a la localidad Shushufindi (Quinsasamín Armas, 2019; Remache Arequipa, 2020; Sosa Vargas, 2018; Vega Chimarro, 2021).

De acuerdo a Nakasone *et al.*, (2004) mantener y preservar los cultivos de hongos son elementos esenciales de los estudios de sistemática y biodiversidad, por tal motivo se encuentran disponibles una amplia variedad de métodos. Las condiciones de conservación de los hongos pertenecientes al programa de fitoremediación de suelos afectados por la extracción petrolera del laboratorio de Microbiología IASA fueron: micelio en viales con agua destilada, almacenado a -20 °C, y aislamiento continuo. Según Nakasone *et al.*, (2004) el almacenamiento de micelio en agua destilada, es un método barato, ya que el agua destilada suprime los cambios morfológicos de la mayoría de los hongos. Este método ha sido usado con éxito para conservar muestras de distintivos tipos de hongos por largos periodos de tiempo. Marx y Daniel, (1976) hizo uso de este método para conservar hongos provenientes de las raíces en donde no se vio afectada la viabilidad de ninguna especie, se conservaron las tasas de crecimiento iniciales y su capacidad de infectar en las raíces, luego de tres años de ser almacenados a -20°C.

Concentración y pureza de ADN

De las 14 muestras de hongos correspondientes a las localidades de Ribereños y Shushufindi se obtuvo valores de concentración de ADN altos. En la zona Ribereños estos valores oscilaron entre 120 µg/mL a 1060 µg/mL, mientras que en la zona de Shushufindi los valores se encontraron entre 30,41 µg/mL a 673 µg/ml (Tabla 7).

La concentración de ADN está influenciada directamente por el método de extracción del ADN (Fredricks *et al.*, 2005). Sin embargo, con el método utilizado se obtuvieron concentraciones adecuadas, para su posterior uso.

La muestra dos del sitio Shushufindi obtuvo la menor concentración de ADN. Según, Chen *et al.* (2002), esto puede indicar una lisis celular incompleta, o la ruptura no exitosa de la pared celular debido a sus características. También se menciona que la concentración disminuye por la mala conservación de la muestra provocando que el ADN se degrade (Matange *et al.*, 2021). La mala manipulación de los microtubos puede llegar a ser otra causa ya que produce la lixiviación de ADN afectando las lecturas espectrofotométricas (Lewis *et al.*, 2010).

Los valores de pureza de ADN de la relación A260/A280 variaron en rangos de 1,7 a 2,42. El 7,14 % de las muestras (1/14) posee una pureza aceptable. El 35,71 % (5/14) muestras poseen pureza óptima, finalmente el 57,14 % (8/13) se encuentran posiblemente contaminadas con ARN (Tabla 7).

De acuerdo a lo expuesto por Lucena-Aguilar *et al.*, (2016) las lecturas espectrofotométricas de la relación de pureza A260/A280 se ven afectados por el disolvente utilizado para resuspender el pellet de ADN, las soluciones ácidas disminuirán los valores mientras que una solución básica sobreestimarán la relación de 0,2 a 0,3 decimales en ambos casos. En este estudio se resuspendió el pellet con NaOH 8 mM considerado una solución básica por lo cual muchos de los valores obtenidos se encuentran sobre el rango considerado como pureza óptima 1,8-2,1 ya que los espectros de absorción de los nucleótidos del ADN dependen en gran medida del pH debido al grado de ionización, reduciendo así la sensibilidad a detectar la contaminación por proteínas o ARN (Wilfinger *et al.*, 2018).

En cuanto se refiere a la relación A260/A230 todos los valores muestran la presencia de contaminantes fenólicos y/u otras moléculas al encontrarse en rangos menores a dos (Tabla 7). Según, Niu *et al.*, (2008) la presencia de contaminantes puede ser efecto del proceso de

extracción manual por el exceso de manipulación durante la realización de la extracción de ADN. Dichos contaminantes son inhibidores comunes en la PCR (Lorenz, 2012). Para disminuir la concentración de estos contaminantes y la generación de lecturas quiméricas en el proceso de la secuenciación, se realiza de forma rutinaria la dilución del ADN previo a la técnica de PCR (Schrader *et al.*, 2012).

Tabla 7

Resultados de concentración y pureza de ADN

Localidad	Muestra	Concentración µg/ mL	Pureza (A260/A280)	Pureza (A260/A230)
Ribereños	1	422	2,12	1,48
	2	539,9	2,42	1,56
	3	1060	2,20	1,95
	4	120	2,28	1,09
	5	373,3	2,12	1,91
	6	58,37	1,7	0,81
	7	704,7	2,13	1,7
Shushufindi	1	673	2,24	1,56
	2	30,41	1,9	0,39
	3	145	2,23	1,27
	4	212,2	2,21	1,27
	5	236,6	2,17	1,41
	6	463,3	2,21	1,37
	7	273,4	2,25	1,79

Nota. µg/mL: microgramo/mililitro. Autoría propia.

Amplificación del gen ITS mediante PCR

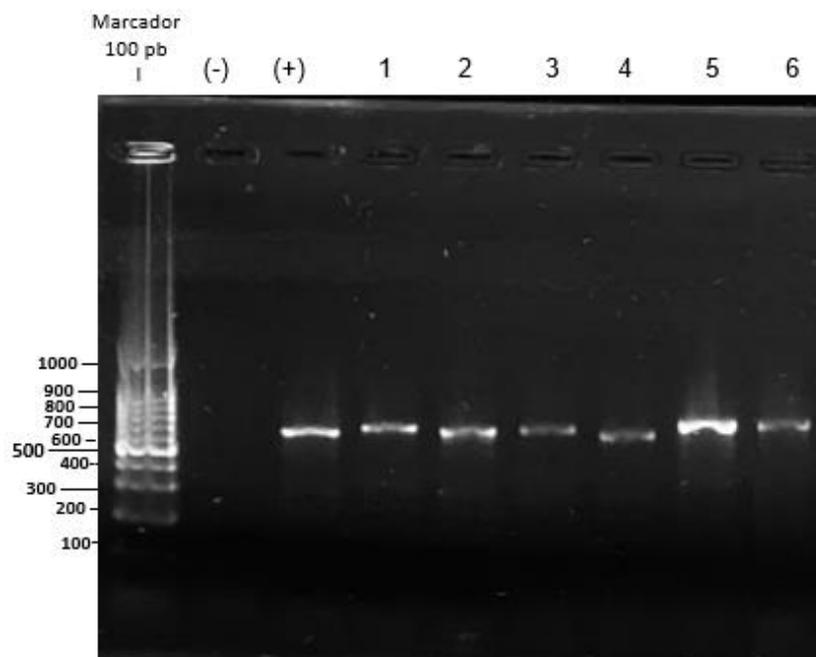
La región ITS de los 14 aislados de hongos de la localidad Ribereños y Shushufindi fueron amplificados con éxito con el uso de los *primers* ITS1 e ITS4, mediante PCR convencional.

Los tamaños de amplicón de fueron de alrededor de 550-600 pb. Esto se puede evidenciar en la Figura 9,10 y 11 respectivamente.

Estos resultados fueron similares a los obtenidos en estudios previos, Al-Dhabaan. (2021) amplificó fragmentos del gen ITS con el uso de *primers* ITS1 e ITS4 con tamaños de amplicón aproximados de 500 a 600 pb para cepas de hongos con potencial de degradar petróleo crudo en suelos contaminados.

Figura 9

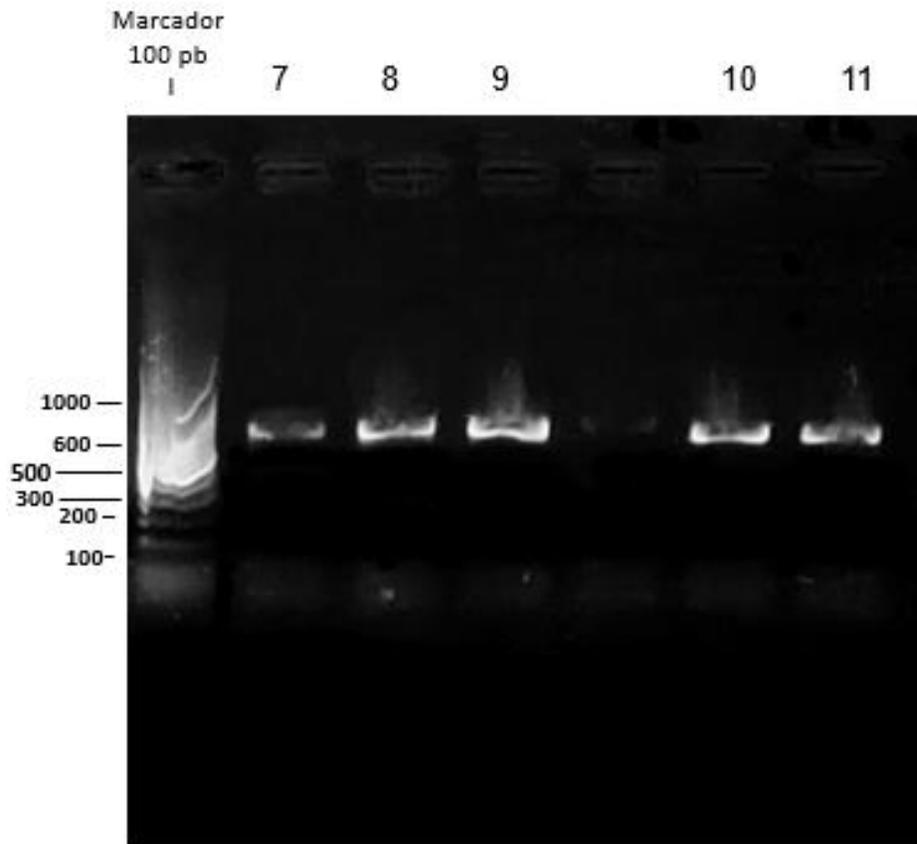
Amplificación región ITS



Nota. Amplificación por PCR de hongos rizosféricos en gel de agarosa al 1% utilizando los *primers* (ITS1/ITS4). De izquierda a derecha: Marcador molecular, (-) control negativo, (+) control positivo, 1 *Trichoderma harzianum*, 2 *Aspergillus fumigatus*, 3 *Trichoderma asperellum*, 4 *Fusarium sp*, 5 *Rhizopus arrhizus*, 6 *Geotrichum candidum*. Autoría propia.

Figura 10

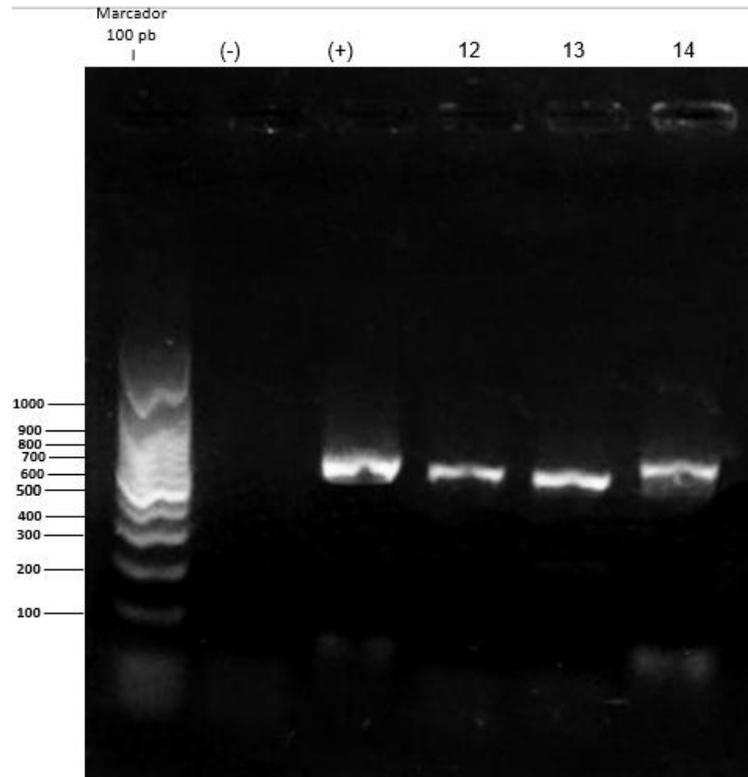
Amplificación región ITS



Nota. Amplificación por PCR de hongos rizosféricos en gel de agarosa al 1% utilizando los *primers* (ITS1/ITS4). De izquierda a derecha: Marcador molecular, 7 *Trichoderma virens*, 8 y 9 *Mucor irregularis*, 10 y 11 *Trichoderma asperellum*. Autoría propia.

Figura 11

Amplificación región ITS



Nota. Amplificación por PCR de hongos rizoféricos en gel de agarosa al 1% utilizando los *primers* (ITS1/ITS4). De izquierda a derecha: Marcador molecular, (-) control negativo, (+) control positivo, 12 *Fusarium sp.*, 13, *Penicillium citrinum*, 14 *Rhizopus arrhizus*. Autoría propia.

Identificación molecular de hongos

Se recibieron 28 secuencias, 14 secuencias del *primer forward* y 14 secuencias del *primer reverse*. De las cuales se generaron secuencias consenso de alta calidad, permitiendo identificar el género y especie del 85,71 % (12/14) especies de hongos pertenecientes a suelos contaminados y no contaminados (Tabla 8).

Las secuencias consenso generadas de la muestra siete de la localidad Ribereños y siete de la localidad Shushufindi no arrojaron secuencias específicas para la identificación a nivel de especie. Según, O'Donnell *et al.*, (2022) estos resultados se deben a que, para la

identificación molecular a nivel de especies del género *Fusarium* se hace uso de secuencias de nucleótidos de porciones de genes que codifican proteínas, siendo el factor de elongación de la traducción TEF1- α el más utilizado para estos aislamientos. Del mismo modo de acuerdo a, Zarrin *et al.*, (2016) este gen tiene un alto nivel de polimorfismo de secuencia entre las especies estrechamente asociadas de *Fusarium* a comparación del gen ITS cuya función dentro de este género está limitada y es poco fiable. Su uso en este género produce secuencias discrepantes con lo cual no se puede distinguir los límites de las especies de *Fusarium* (O'Donnell *et al.*, 2015).

Tras la identificación molecular se obtuvieron siete géneros de hongos. En el sitio no contaminado Ribereños se encontraron especies del género: *Trichoderma*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. (Tabla 8).

Mientras que en el sitio contaminado Shushufindi se encontraron especies del género *Mucor*, *Geotrichum*, *Rhizopus*, *Trichoderma* y *Fusarium*. (Tabla 8).

De las 14 muestras de hongos, cinco secuencias pertenecen al género *Trichoderma*, distribuidas en tres especies *T. asperellum*, *T. virens* y *T. harzianum*. Según, Tysekie *et al.*, (2022) el género *Trichoderma* representa a hongos filamentosos ampliamente encontrados en las raíces de varios ecosistemas del suelo. Se ha reportado el uso de *Trichoderma* como agente de control biológico, bioestimulante, y bioremediador de suelos contaminados con agroquímicos e hidrocarburos de petróleo (Yao *et al.*, 2023). Varias especies de este género poseen la capacidad para metabolizar diferentes tipos de hidrocarburos incluso en la presencia de metales pesados (Zafra y Cortés-Espinosa, 2015). En este sentido se ha evaluado la capacidad de degradación de hidrocarburos de *Trichoderma virens* siendo exitosa en un 100% en compuestos como pireno y un 74% en fenantreno. Además de degradar preferentemente hidrocarburos de cadena más larga (c20-c40) (Ainon Hamzah *et al.*, 2012). En los estudios realizados por, Zafra *et al.*, (2015) se demostró que cepas de *Trichoderma asperellum* degradaron hidrocarburos aromáticos policíclicos como: pireno fenantreno, y benzopireno de

suelos con altas cantidades de HAP gracias a la producción del hongo de enzimas hidrolíticas oxidantes como: dioxigenasa, lacasa y peroxidasa, convirtiéndolo en un gran potencial para bioremediación. Finalmente, Daccò *et al.*, (2020) reportó la eficiencia de cepas de *Trichoderma harzianum* para la reducción de la fracción BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y los tres isómeros de xileno considerados compuestos orgánicos volátiles, así como la degradación de hidrocarburos aromáticos del petróleo como el fenantreno y pireno, debido a sus mecanismos enzimáticos.

Tanto en el sitio contaminado y no contaminado se identificó el hongo *Mucor irregularis* Según Actor, (2012) el género *Mucor* se caracteriza por hongos filamentosos cosmopolitas que se encuentran comúnmente en el suelo y son considerados patógenos que causan pudrición en: frutas, flores y granos de maíz. Por otro lado Asemoloye *et al.*, (2020) evidenció que el hongo *Mucor irregularis*, posee la capacidad de producir enzimas ligninolíticas: lignino peroxidasa, ligninolíticas manganeso peroxidasa y lacasas asociadas a la degradación de hidrocarburos mostrando una actividad de degradación significativa de alcanos de cadena larga y BTEX.

Se identificaron dos secuencias de *Rhizopus arrhizus* en el suelo contaminado de la localidad Shushufindi. Según, Mohammed *et al.*, (2023) también se lo conoce como *R. oryzae* considerado un hongo oportunista pues, está asociado a la infección por mucormicosis en humanos inmunodeprimidos, no obstante, tiene aplicaciones biotecnológicas y en la industria alimentaria, lo que le ha convertido en un hongo económicamente importante. Autores han reportado su uso para la absorción de metales pesados en suelos contaminados (Tobin *et al.*, 1984). También tienen una gran capacidad para degradar el petróleo crudo e hidrocarburos de fracción ligera (Mohammed *et al.*, 2023).

Se identificaron dos secuencias del género *Fusarium* tanto en el suelo contaminado como no contaminado. Este género es considerado como un hongo saprófito y uno de los patógenos fúngicos que afectan a las producciones agrícolas (Smith, 2007). En suelos contaminados se ha estudiado varias cepas de este género y su capacidad de producción de

biosurfactantes que solubilizan contaminantes además de su actividad lacasa, capaz de eliminar la contaminación por hidrocarburos del suelo, convirtiéndolos en un recurso prometedor para ser usado en biorremediación (Al-Otibi *et al.*, 2023).

El hongo *Penicillium citrinum* se identificó en el suelo no contaminado de la localidad Ribereños, este es un hongo endófito que otorga varios beneficios como: promover la supervivencia de las plantas al mejorar la absorción de nutrientes, producir metabolitos que promueven el crecimiento y la producción de enzimas quitinasas, así como también proteasas, capaces de restringir el crecimiento de varios fitopatógenos (Hakim y Yuwati, 2020). También se han realizado estudios de su capacidad de degradación de hidrocarburos siendo esta satisfactoria al degradar 70% de contaminantes tras 72 horas (Costa *et al.*, 2022).

En la localidad Ribereños se identificó el hongo *Aspergillus fumigatus*, hongo saprotrófico que habita en el suelo, considerado uno de los principales hongos que producen infecciones humanas en pacientes cuyo sistema inmunológico está debilitado (Latgé, 1999). Pese a esto se ha estudiado *Aspergillus fumigatus* como potencial para su uso en suelos contaminados. Según Ye *et al.*, (2011) demostró que aislados de *Aspergillus fumigatus* exhiben una capacidad excepcional para degradar antraceno siendo la enzima lignino peroxidasa la que desempeñaba el papel principal en la biodegradación de este compuesto.

El hongo *Geotrichum candidum* se identificó en la localidad Shushufindi. De acuerdo a, Kamilari *et al.*, (2023) es un hongo levaduriforme con un sin fin de aplicaciones biotecnológicas ya que produce enzimas y metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana siendo utilizado en diferentes industrias. Estudios también reportan su potencial uso para degradar contaminantes de petróleo (Ezekoye *et al.*, 2018).

Los % de identidad variaron entre 99,51 % a 100 %. (Tabla 7). La identidad de secuencia se refiere a al número de bases de nucleótidos idénticas y en la misma posición tras la alineación de secuencias, entre la secuencia consultada y la secuencia obtenida (Pertsemlidis y Fondon, 2001). Según, Gostinčar. (2020) un % de identidad porcentual de ≥ 97

% es aceptable para identificar un microorganismo en género y especie, confirmando que los % de identidad obtenidos en esta investigación son aptos.

Tabla 8

Microorganismos identificados por secuenciación del gen ITS

Localidad	Muestra	Longitud	Organismo	% Identidad	N° Accesoión
Ribereños	1	535	<i>Trichoderma virens</i>	99,81	MH857855.1
	2	888	<i>Mucor irregularis</i>	100	JX076993.1
	3	614	<i>Trichoderma harzianum</i>	99,51	KF201295.1
	4	604	<i>Aspergillus fumigatus</i>	99,49	OP526905.1
	5	609	<i>Trichoderma asperellum</i>	99,61	NR_130668.1
	6	462	<i>Penicillium citrinum</i>	99,78	MF185963.1
	7	565	<i>Fusarium sp.</i>	100	KY363354.1
Shushufindi	1	907	<i>Mucor irregularis</i>	99,53	ON927081.1
	2	666	<i>Geotrichum candidum</i>	100	MH153587.1
	3	625	<i>Rhizopus arrhizus</i>	100	MW785832.1
	4	554	<i>Rhizopus arrhizus</i>	100	DQ641279.1
	5	595	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	MK210562.1
	6	608	<i>Trichoderma asperellum</i>	99,84	MK027313.1
	7	531	<i>Fusarium sp.</i>	99,81	MT549849.1

Nota. N° Accesoión: Número de acceso de GenBank para las secuencias obtenidas. Autoría propia.

De los 14 hongos identificados molecularmente tanto en la zona no contaminada Ribereños como en la contaminada Shushufindi, el 50 % (7/14) pertenecen a la especie arbórea caoba *Platymiscium pinnatum*. El 28,57 % (4/14) a la especie arbórea chíparo *Zygia longifolia*, y finalmente el 21,42 % (3/14) a la especie guarango espinudo *Piptadenia pteroclada*. (Tabla 9).

De acuerdo a Stepanova *et al.*, (2022) el suelo es uno de los ecosistemas más sensibles a la contaminación producto de las actividades inmersas a la extracción de petróleo. En estos suelos contaminados se ven alteradas las propiedades como: textura, conductividad eléctrica, cantidad de nutrientes, pH, entre otros, debido a la presencia de hidrocarburos de estructuras alifáticas (de cadena lineal) y aromáticas (cíclicas) (Daâssi y Qabil Almaghribi,

2022). Por tal motivo se resalta la aplicación de estrategias de restauración siendo la reforestación una alternativa viable debido.

Las especies arbóreas: *Platymiscium pinnatum*, *Zygia longifolia* y *Piptadenia pteroclada*. fueron seleccionadas como las más adecuadas para la recuperación de suelos contaminados en la Amazonía ecuatoriana, debido a que presentaron los mejores rendimientos durante su establecimiento en un período de cinco años (Villacís *et al.*, 2016). Asimismo Espinoza Montaluisa, (2018) destaca que estas especies favorecieron la disminución de la concentración de hidrocarburos y metales pesados. En este sentido Stepanova *et al.*, (2022) menciona que se puede tener efectos favorables en la restablecimiento de suelos contaminados gracias a la asociación planta-microorganismo, siendo los hongos quienes cumplen el papel principal en la degradación de contaminantes, gracias a la colonización de grandes volúmenes de suelo a través del crecimiento de hifas, mientras que las plantas son responsables de su crecimiento y mejorar el suelo.

Estas tres especies arbóreas pertenecen a la familia Fabaceae, varios autores han reportado el uso de plantas de esta familia para la degradación de hidrocarburos (Riskuwa-Shehu *et al.*, 2017); (Udom y Nuga, 2015). Esto se debe a que estas plantas ocupan mayor superficie de sus raíces (G. Kumar *et al.*, 2021). Sin embargo Meištinkas *et al.*, (2023) considera que esta capacidad de las leguminosas se debe a que las especies pertenecientes a esta familia son independientes del nitrógeno, fijando este elemento directamente de la atmósfera con la ayuda de las bacterias que se encuentran en sus nódulos. Siendo el nitrógeno uno de los principales nutrientes que permiten la degradación de contaminantes de petróleo debido a que actúa como aceptor de electrones provenientes de los hidrocarburos. (Liu *et al.*, 2023). Debido a este fenómeno estas especies no compiten con otras plantas por este nutriente para el proceso de remediación del suelo. De ahí que al mismo tiempo la fertilidad del suelo y el contenido de nutrientes en estos suelos aumente considerablemente (Meištinkas *et al.*, 2023). Por lo cual Espinoza Montaluisa, (2018) reportó que *Piptadenia pteroclada*, *Platymiscium*

pinnatum y *Zygia longifolia* favorecieron el aumento de los niveles de nutrientes en suelos contaminados.

Tabla 9

Hongos identificados molecularmente y la especie arbórea a la que pertenecen

Localidad	Muestra	Especie arbórea	Organismo
Ribereños	1	<i>Platymiscium pinnatum</i>	<i>Trichoderma virens</i>
	2	<i>Platymiscium pinnatum</i>	<i>Mucor irregularis</i>
	3	<i>Zygia longifolia</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>
	4	<i>Platymiscium pinnatum</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
	5	<i>Platymiscium pinnatum</i>	<i>Trichoderma asperellum</i>
	6	<i>Piptadenia pteroclada</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
	7	<i>Platymiscium pinnatum</i>	<i>Fusarium</i> sp
Shushufindi	1	<i>Platymiscium pinnatum</i>	<i>Mucor irregularis</i>
	2	<i>Zygia longifolia</i>	<i>Geotrichum candidum</i>
	3	<i>Piptadenia pteroclada</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>
	4	<i>Piptadenia pteroclada</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>
	5	<i>Zygia longifolia</i>	<i>Trichoderma asperellum</i>
	6	<i>Platymiscium pinnatum</i>	<i>Trichoderma asperellum</i>
	7	<i>Zygia longifolia</i>	<i>Fusarium</i> sp

Nota. Platymiscium pinnatum: caoba, Piptadenia pteroclada: guarango espinudo, Zygia longifolia: Chíparo. Autoría propia.

Filogenia

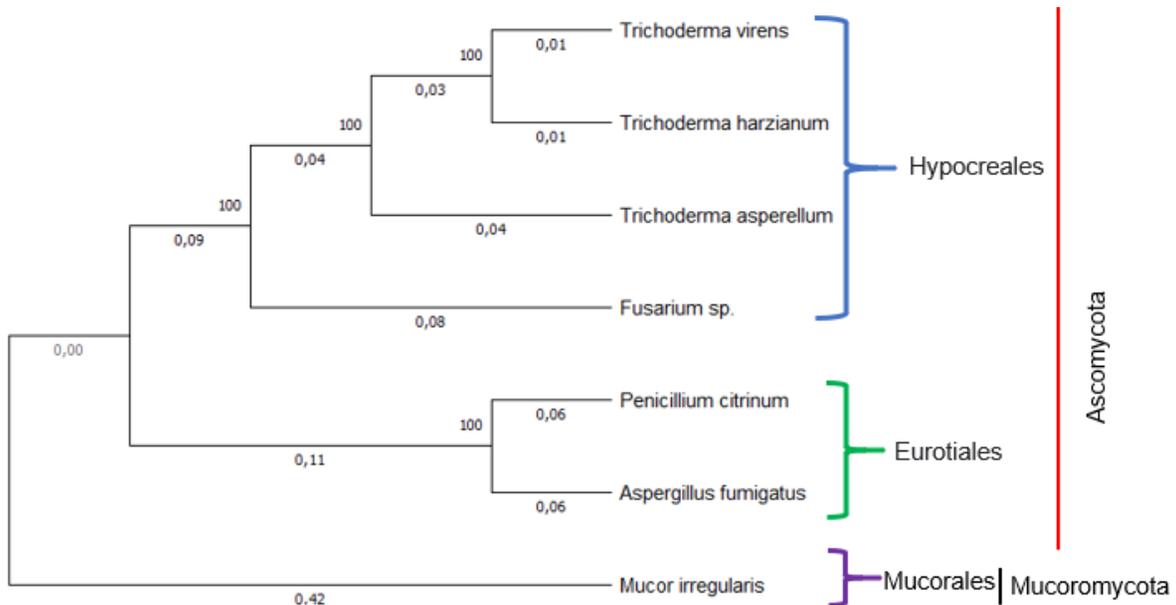
Las secuencias concenso obtenidas tras la secuenciación de la región ITS, permitieron la construcción de dos cladogramas tanto para el sitio no contaminado Ribereños como el contaminado Shushufindi que se visualizan en la Figura 12 y Figura 13 respectivamente.

De acuerdo a los resultados obtenidos de la localidad Ribereños podemos identificar la presencia de dos Phylum: Ascomycota conformado por el 85,71 % de hongos identificados (6/7) y Mucoromycota conformado por el 14,28 % de hongos identificados (1/7). Dentro del Phylum Ascomycota se encuentran dos clados: Hypocreales y Eurotiales. El orden Hypocreales está conformado por el género *Trichoderma* y *Fusarium*. Del género *Trichoderma* se identificaron las especies: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma virens* y *Trichoderma asperellum*. En lo que respecta al orden Eurotiales se encuentra el género *Penicillium* con la

especie *Penicillium citrinum*. Finalmente, el Phylum: Mucoromycota presenta el género *Mucor* con la especie *Mucor irregularis*. (Figura 12).

Figura 12

Árbol filogenético de las secuencias del sitio no contaminado Ribereños

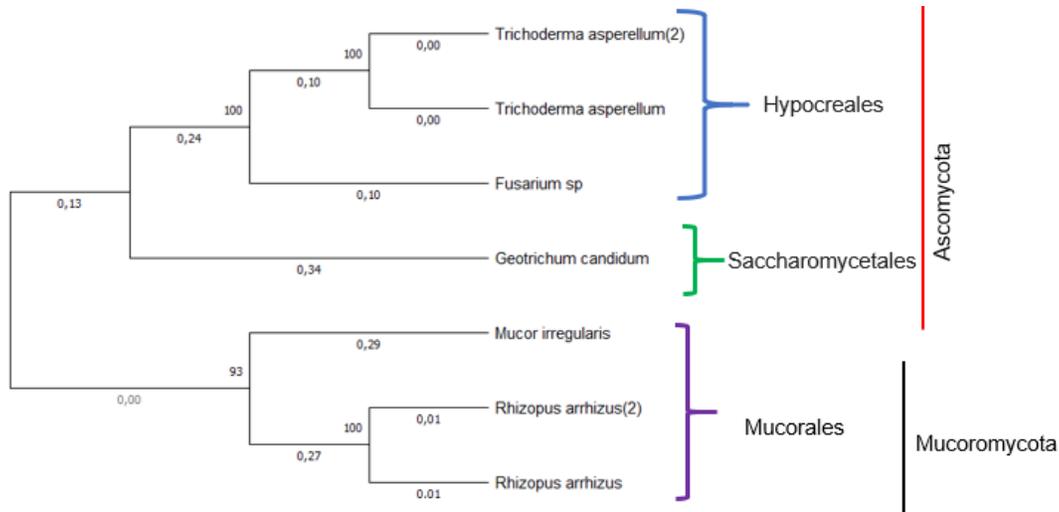


Nota. Dendrograma que representa la proximidad filogenética entre las secuencias alineadas de la región ITS. Las distancias evolutivas se dedujeron bajo el método UPGMA. Autoría propia.

De acuerdo a los resultados obtenidos de la localidad Shushufindi se identifica la presencia de dos Phylum: Ascomycota conformado por el 57,14 % de hongos identificados (4/7) y Mucoromycota conformado por el 42,85 % de hongos identificados (3/7). Dentro del Phylum Ascomycota se encuentran dos clados: Hypocreales y Saccharomycetales. El orden Hypocreales está conformado por el género *Trichoderma* y *Fusarium*. Del género *Trichoderma* se identificó la especie, *Trichoderma asperellum*. En lo que respecta al orden Saccharomycetales, se encuentra el género *Geotrichum* con la especie *Geotrichum candidum*. Finalmente, el Phylum: Mucoromycota presentó el género *Mucor* con la especie *Mucor irregularis* y el género *Rhizopus* con la especie *Rhizopus arrhizus*. (Figura 13).

Figura 13

Árbol filogenético de las secuencias del sitio contaminado Shushufindi



Nota. Dendrograma que representa la proximidad filogenética entre las secuencias alineadas de la región ITS. Las distancias evolutivas se dedujeron bajo el método UPGMA. Autoría propia.

De acuerdo a, Egidi *et al.*, (2019) los hongos pertenecientes al Phylum Ascomycota son hongos cosmopolitas y dominantes que se encuentran en todos los suelos alrededor del mundo, aislándose con más facilidad, esto puede explicar porque se identificó en mayor porcentaje la presencia de hongos pertenecientes a este Phylum.

Según, Efron *et al.*, (1996) los niveles de confianza con el método de Bootstrap en la construcción de árboles filogenéticos proporcionan evaluaciones de "confianza" para cada clado de un árbol. En esta investigación los valores se encontraron en un 100 % a excepción de un clado que obtuvo 93 %. Se considera que un clado es fiable si su valor de bootstrap es superior al 50 % (Ojha *et al.*, 2022).

Identificación por MALDITOF

Solo cuatro muestras de hongos de las catorce analizadas (28,57 %) pudieron ser identificados por medio de espectrometría de masas MALDITOF. Tres correspondientes a la localidad Ribereños y una de la localidad Shushufindi. (Tabla 10).

Esto puede deberse a que el análisis MALDI-TOF es más específico para la identificación de bacterias, existiendo más estudios y reportes de éxito en este campo (Schubert y Kostrzewa, 2017). En los últimos tiempos se ha aplicado para la identificación de hongos filamentosos, sin embargo, presenta un gran desafío debido a las complejas relaciones filogenéticas entre especies, además de que no existe de un protocolo estandarizado para la obtención de los perfiles de proteínas para lograr espectros de calidad, pues los hongos presentan paredes celulares más complejas que las bacterias, adicionalmente son limitados los estudios que proponen procedimientos de extracción de perfiles de proteínas en hongos concluyentes para mejorar así el porcentaje de identificación en estos organismos (Maldonado *et al.*, 2017).

Tabla 10

Identificación de microorganismos mediante el análisis MALDI-TOF

Localidad	Muestra	Organismo	% Identidad
Ribereños	1	No identificado	-
	2	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	86,50
	3	No identificado	-
	4	<i>Aspergillus fumigatus</i>	92,40
	5	No identificado	-
	6	<i>Trichophyton verrucoum</i>	82,40
	7	No identificado	-
Shushufindi	1	No identificado	-
	2	No identificado	-
	3	<i>Aspergillus fumigatus</i>	83
	4	No identificado	-
	5	No identificado	-
	6	No identificado	-
	7	No identificado	-

Nota. % de identificación: Corresponde al porcentaje de datos de masas moleculares identificadas en la muestra, que coinciden con la base de datos. Autoría propia.

Los resultados del análisis se compararon con los resultados obtenidos con la identificación molecular mediante secuenciación del gen ITS. Se utilizaron los siguientes criterios de clasificación: sin identificar, identificación a nivel de especie, y a nivel de género. (Tabla 11).

De las cuatro muestras que se identificaron por MALDI-TOF, tres no coincidieron a nivel de especie o género con la molecular, solo una muestra correspondiente a *Aspergillus fumigatus* en la región Ribereños coincidió por medio de identificación MALDI-TOF y molecular.

Según, Verwer *et al.*, (2014) la base de datos SARAMIS tiene la capacidad de diferenciar especies de *Aspergillus*, identificando con precisión las especies estrechamente relacionadas de *A. fumigatus*, con lo cual se obtiene una tasa de identificación particularmente alta para *Aspergillus spp.*

Trece aislamientos no pudieron ser identificados correctamente (92,85 %) debido a que los espectros de los hongos a analizar no se encontraban en la base de datos SARAMIS (System Version 4.1.0.9) por lo cual no se generó una identificación.

Según, Rychert, (2019) los resultados de la identificación por MALDI-TOF dependen en gran medida de la base de datos de los espectros de organismos con la que se va a comparar las muestras. De este modo es un aspecto clave la utilización de una biblioteca espectral del organismo que sea lo suficientemente sólida por cada especie (Kostrzewa y Maier, 2016). En este estudio se utilizó la biblioteca SARAMIS (System Version 4.1.0.9) sin embargo esta base de datos no se ha actualizado ni ampliado con una mayor cantidad de espectros correspondientes a hongos. De esta manera, McMullen *et al.*, (2016) recomienda que para el análisis de hongos filamentosos se haga uso de las bases de datos como: *Bruker Biotyper* y las bibliotecas asociadas como *Spectral Archive* y *bioMerieux 2* después de un análisis SARAMIS ya que de esta manera se incrementa el % de identificación mejorando el rendimiento del análisis. El porcentaje de identificación de hongos tanto en género como especie en el estudio

realizado por, Schulthess *et al.*, (2014) con la biblioteca Bruker Biotyper, alcanzó el 79,0 %, mientras que con la biblioteca SARAMIS fue de 32,4 %.

Tabla 11

Comparación de identificación molecular y MALDI-TOF

Localidad	Identificación molecular	Aislamientos analizados	Identificación			Identificación correcta MALDITOF
			No	Género	Especie	
Ribereños	<i>Trichoderma virens</i>	1	X			0
	<i>Mucor irregularis</i>	1	X			0
	<i>Trichoderma harzianum</i>	1	X			0
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1		X	X	1
	<i>Trichoderma asperellum</i>	1	X			0
	<i>Penicillium citrinum</i>	1	X			0
	<i>Fusarium sp.</i>	1	X			0
	Total	7	6			1
Shushufindi	<i>Mucor irregularis</i>	1	X			0
	<i>Geotrichum candidum</i>	1	X			0
	<i>Rhizopus arrhizus</i>	1	X			0
	<i>Rhizopus arrhizus</i>	1	X			0
	<i>Trichoderma asperellum</i>	1	X			0
	<i>Trichoderma asperellum</i>	1	X			0
	<i>Fusarium sp.</i>	1	X			0
	Total	7	7		0	0

Nota. Autoría propia.

Evaluación de la diversidad

En el sitio no contaminado (Ribereños) se activaron 39 cepas pertenecientes a 7 especies mientras que en el sitio contaminado (Shushufindi) se activaron 22 cepas pertenecientes a 5 especies. (Tabla 12).

Según Walz, (2011) el grado de perturbación producto de las actividades humanas que alteran y ocasionan cambios en el hábitat, tienen un impacto en la riqueza así como en la abundancia de especies, lo que explicaría que el sitio no contaminado presente mayor abundancia y riqueza que el sitio contaminado.

De acuerdo con el índice 1-Simpson tanto el sitio no contaminado Ribereños como el contaminado Shushufindi tienen una diversidad alta (0,83) y (0,79) respectivamente. (Tabla 12).

Resultados similares fueron obtenidos por Borowik *et al.*, (2017) al reportar una diversidad alta en suelos contaminados por petróleo y sus derivados. Según Bidja Abena *et al.*, (2020) esto puede deberse a que el estrés generado por los contaminantes del petróleo, sus derivados y todas las actividades inherentes a su proceso de extracción, provoca una selección natural de la comunidad de microorganismos presentes en el suelo, lo que conduce al aumento de la diversidad con poblaciones microbianas que alteren sus mecanismos metabólicos para aumentar sus posibilidades de supervivencia en su entorno, degradando o descomponiendo estos contaminantes con el fin de prosperar en esas adversas condiciones. De acuerdo a Alrumman *et al.*, (2015). estos cambios en la diversidad se producen por que los hidrocarburos presentes en estos suelos proporcionan una fuente de carbono para el crecimiento microbiano.

Los dos sitios evaluados presentan una distribución homogénea de sus poblaciones (Ribereños $J' = 0,96$; Shushufindi $J' = 0,99$). (Tabla 11). Esto demuestra que los dos ecosistemas comparados presentan similitudes en la distribución de la abundancia entre las especies, además de que dichas especies se encuentran en proporciones iguales, Pielou. (1966), esta característica podría deberse a que posiblemente el sitio no contaminado Ribereños podría contener residuos de contaminantes, producto de filtraciones de crudo, ya que de acuerdo a Antón-Pardo, (2019) dos sitios presentan una distribución homogénea cuando no son diferentes por completo.

El estimador Chao-1 indico que se registró el 100 % de las especies esperadas, encontrándose dentro de un rango aceptable que demuestra que se ha realizado un muestreo exitoso (Chao,1984). (Tabla 12).

Tabla 12*Resultados análisis de diversidad*

Índices	Ribereños	Shushufindi
Riqueza específica	7	5
Abundancia	39	22
Diversidad de Simpson (1-D)	0,83	0,79
Diversidad de Shannon (H')	1,87	1,59
Equitability de Pielou (J')	0,96	0,99
Chao-1	100 %	100 %

*Nota.*Autoria propia.

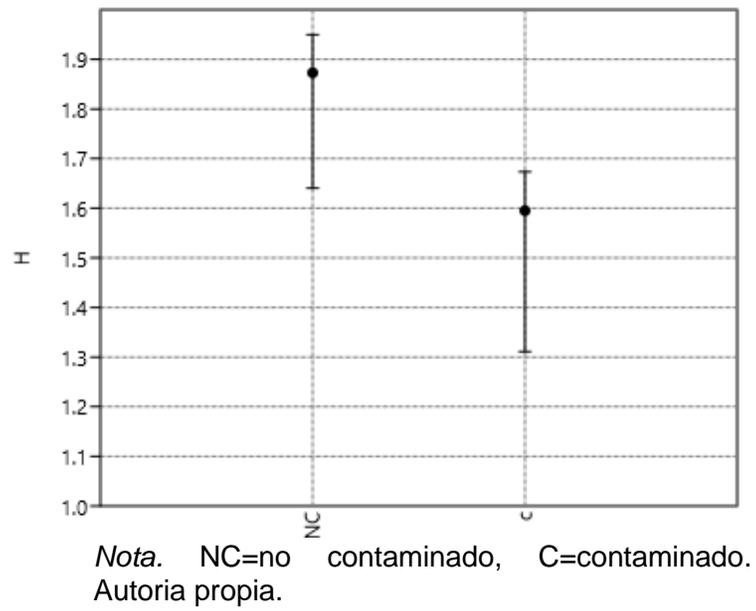
El valor más alto del Índice de Shannon se presentó en los sitios no contaminados (1,87) presentando diferencias significativas ($p \leq 0,05$) al ser comparados con este índice de los sitios contaminados (1,59). Figura (14).

Resultados similares fueron reportados por, Galitskaya *et al.*, (2021) en donde el índice de Shannon fue ligeramente mayor en los suelos no contaminados que en los suelos contaminados presentando diferencias significativas.

Esto se debe a que este índice depende de la riqueza de especies y esta puede variar por varios factores, por lo cual en sitios contaminados será menor. Según Echeverría Molinar, (2017) las comunidades de hongos están influenciadas por factores abióticos y bióticos, como las propiedades del suelo, las prácticas de manejo, pH, cantidad de nutrientes, entre otros. En este sentido Espinoza Montaluisa, (2018) reportó que los suelos correspondientes al sitio Shushufindi mostraron un incremento de pH, P y la presencia de elementos tóxicos como Ni y Cd características que pueden alterar la riqueza en este sitio y con esto presentaran valores menores en el índice de Shannon.

Figura 14

Índice de Shannon



CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- Molecularmente se identificaron el 85,71% (12/14) muestras de hongos a nivel de género y especie. En el sitio no contaminado Ribereños se identificaron las siguientes especies: *Trichoderma virens*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum*, *Mucor irregularis*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium citrinum* y *Fusarium* sp., mientras que el sitio contaminado Shushufindi se identificaron especies de los géneros: *Mucor irregularis*, *Geotrichum candidum*, *Rhizopus arrhizus*, *Trichoderma asperellum* y *Fusarium* sp. Los hongos identificados son considerados como potenciales degradadores de diferentes tipos de hidrocarburos, mediante la actividad enzimática extracelular, además de formar un complejo planta-microorganismo con las especies arbóreas: *Platymiscium pinnatum*, *Zygia longifolia* y *Piptadenia pteroclada* para la degradación de hidrocarburos.
- Se activó el 100 % (39/39) de cepas de hongos rizosféricos de la zona Shushufindi y 100 % (22/22) de la zona Ribereños, pertenecientes al programa de fitoremediación de suelos afectados por procesos de extracción petrolera.
- La identificación por espectrometría de masas MALDITOF permitió identificar el (28,57%) (4/14) de las muestras de hongos. De las cuatro muestras que se identificaron por MALDI-TOF, tres no coincidieron a nivel de especie o género con la molecular, solo una muestra correspondiente a *Aspergillus fumigatus* coincidió tanto por el método molecular y proteómico, de esta manera el análisis MALDITOF tuvo menor rendimiento al molecular.
- La estructura de la comunidad de hongos rizosféricos tanto del sitio contaminado Shushufindi como el no contaminado Ribereños, esta representada por una diversidad alta y una equitatividad homogénea. El valor más alto del Índice de Shannon se

presentó en los sitios no contaminados (1,87) presentando diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Recomendaciones

- Evaluar la capacidad de degradación de petróleo en los aislados fúngicos y su actividad enzimática, para su potencial uso biotecnológico.
- Amplificar genes que codifican proteínas pues ha demostrado ser una herramienta poderosa para la delimitación de especies estrechamente relacionadas a comparación del gen ITS.

Bibliografía

- Actor, J. K. (2012). Mycology. *Elsevier's Integrated Review Immunology and Microbiology*, 139–146. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-07447-6.00015-6>
- Ainon Hamzah, Mazni Abu Zain, Othman Omar, y Sahidan Senafi. (2012). *Optimal physical and nutrient parameters for growth of trichoderma virens UKMP-1M for heavy crude oil degradation (Pengoptimuman Parameter Fizikal dan nutrien bagi pertumbuhan trichoderma virens UKMP-1M untuk degradasi minyak mentah berat)*. <http://www.ukm.my/jsm/contents.html>
- Al-Dhabaan, F. A. (2021). Mycoremediation of crude oil contaminated soil by specific fungi isolated from Dhahran in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1), 73–77. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2020.08.033>
- Al-Otibi, F., Al-Zahrani, R. M., y Marraiki, N. (2023). Biodegradation of Selected Hydrocarbons by Fusarium Species Isolated from Contaminated Soil Samples in Riyadh, Saudi Arabia. *Journal of Fungi*, 9(2), 216. <https://doi.org/10.3390/JOF9020216/S1>
- Alrumman, S. A., Standing, D. B., y Paton, G. I. (2015). Effects of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity. *Journal of King Saud University - Science*, 27(1), 31–41. <https://doi.org/10.1016/J.JKSUS.2014.10.001>
- Antón-Pardo, M. (2019). The map of biodiversity: From local to global scales. *Metode*, 2019(9), 83–89. <https://doi.org/10.7203/METODE.9.11333>
- Asemaninejad, A., Weerasuriya, N., Gloor, G. B., Lindo, Z., y Thorn, G. (2016). New Primers for Discovering Fungal Diversity Using Nuclear Large Ribosomal DNA. *PLoS ONE*, 11(7), 159043. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0159043>
- Asemoloye, M. D., Tosi, S., Daccò, C., Wang, X., Xu, S., Marchisio, M. A., Gao, W., Jonathan, S. G., y Pecoraro, L. (2020). Hydrocarbon Degradation and Enzyme Activities of *Aspergillus oryzae* and *Mucor irregularis* Isolated from Nigerian Crude Oil-Polluted Sites. *Microorganisms*, 8(12), 1–19. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8121912>

- Barnett, H. L. (1999). *Illustrated genera of imperfect fungi*. APS Press.
- Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., y Kausserud, H. (2010). ITS as an environmental DNA barcode for fungi: An in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology*, *10*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-189/TABLES/4>
- Bellemare, A., John, T., y Marquetteau, S. (2018). Fungal genomic DNA extraction methods for rapid genotyping and genome sequencing. *Methods in Molecular Biology*, *1775*, 11–20. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7804-5_2/COVER
- Ben Hassine Ben Ali, M. (2016). Reliable protocols for DNA extraction from freeze-dried macrofungal samples used in molecular macrofungal systematics studies. *Current Research in Environmental y Applied Mycology*, *6*(1), 45–50. <https://doi.org/10.5943/CREAM/6/1/5>
- Berrendero, E., Perona, E., y Mateo, P. (2008). Genetic and morphological characterization of Rivularia and Calothrix (Nostocales, Cyanobacteria) from running water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *58*(2), 447–460. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.65273-0/CITE/REFWORKS>
- Bidja Abena, M. T., Chen, G., Chen, Z., Zheng, X., Li, S., Li, T., y Zhong, W. (2020). Microbial diversity changes and enrichment of potential petroleum hydrocarbon degraders in crude oil-, diesel-, and gasoline-contaminated soil. *3 Biotech*, *10*(2). <https://doi.org/10.1007/S13205-019-2027-7>
- Black, J. A., y Foarde, K. K. (2007). Comparison of four different methods for extraction of *Stachybotrys chartarum* spore DNA and verification by real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, *70*(1), 75–81. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2007.03.017>
- Borowik, A., Wyszowska, J., y Oszust, K. (2017). Functional diversity of fungal communities in soil contaminated with diesel oil. *Frontiers in Microbiology*, *8*(SEP), 293811. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.01862/BIBTEX>

- Bromham, L. (2016). *An introduction to molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University.
- Cassagne, C., Ranque, S., Normand, A. C., Fourquet, P., Thiebault, S., Planard, C., Hendrickx, M., y Piarroux, R. (2011). Mould Routine Identification in the Clinical Laboratory by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry. *PLOS ONE*, 6(12), e28425. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0028425>
- Chao, A. (1984). Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. *Source: Scandinavian Journal of Statistics*, 11(4), 265–270. <http://www.jstor.org/stable/4615964>
- Chen, S. C. A., Halliday, C. L., y Meyer, W. (2002). A review of nucleic acid-based diagnostic tests for systemic mycoses with an emphasis on polymerase chain reaction-based assays. *Medical Mycology*, 40(4), 333–357. <https://doi.org/10.1080/MMY.40.4.333.357>
- Costa, E. R. C., Souza, A. F. de, Rodríguez, D. M., Mendonça, R. de S., Silva, A. K. D. da, Takaki, G. M. de C., y Andrade, R. F. da S. (2022). Biodegradation of diesel oil by *Penicillium citrinum* UCP 1183 isolated from mangrove sediments. *Research, Society and Development*, 11(10), e573111033071–e573111033071. <https://doi.org/10.33448/RSD-V11I10.33071>
- Croxatto, A., Prod'hom, G., y Greub, G. (2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), 380–407. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2011.00298.X>
- Daâssi, D., y Qabil Almaghribi, F. (2022). Petroleum-contaminated soil: environmental occurrence and remediation strategies. *3 Biotech*, 12(6), 139. <https://doi.org/10.1007/S13205-022-03198-Z>
- Daccò, C., Nicola, L., Temporiti, M. E. E., Mannucci, B., Corana, F., Carpani, G., y Tosi, S. (2020). Trichoderma: Evaluation of its degrading abilities for the bioremediation of hydrocarbon complex mixtures. *Applied Sciences (Switzerland)*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/APP10093152>

- De Moraes Russo, C. A., y Selvatti, A. P. (2018). Bootstrap and Rogue Identification Tests for Phylogenetic Analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 35(9), 2327–2333.
<https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSY118>
- Dhama, K. (2023). Molecular Phylogenetics: Types and Applications. *Current Synthetic and Systems Biology*, 11(1), 1–1. <https://doi.org/10.35248/2332-0737.23.11.023>
- Díaz, J., y Cueva, S. (2017). “The History of Ecuador” in “A Monetary and Fiscal History of Latin America, 1960–2017” on Manifold at the Becker Friedman Institute for Economics. University of Minnesota. <https://manifold.bfi.uchicago.edu/read/a-monetary-and-fiscal-history-of-latin-america-1960-2017/section/a1035d73-8b3a-485b-858d-9a6d2ae81ff0>
- Doula, M. K., y Sarris, A. (2016). Soil Environment. *Environment and Development*, 213–286.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62733-9.00004-6>
- Drissner, D., Gekenidis, M. T., Schlapbach, R., y Brunisholz, R. (2014). Cuando el tiempo para resultar importa: la identificación de microbios basada en MALDI-TOF proteína y perfil péptido: aspectos resaltados de análisis Química en Suiza. *CHIMIA*, 68(6), 453.
<https://doi.org/10.2533/chimia.2013.453>
- Drummond, A., y Rodrigo, A. G. (2000). Reconstructing Genealogies of Serial Samples Under the Assumption of a Molecular Clock Using Serial-Sample UPGMA. *Molecular Biology and Evolution*, 17(12), 1807–1815.
<https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.MOLBEV.A026281>
- Echeverría Molinar, A. (2017). *Efecto de factores abióticos y bióticos sobre la estructura de la comunidad microbiana del suelo en un ambiente oligotrófico*. [Tesis de Maestría, Instituto Potosino de Investigación Científica].
<https://repositorio.ipicyt.edu.mx//handle/11627/3134>
- Efron, B., Halloran, E., y Holmes, S. (1996). Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,

- 93(23), 13429–13434. <https://doi.org/10.1073/PNAS.93.23.13429/ASSET/9196EE72-60A3-4CB1-99F1-489B67DAA752/ASSETS/GRAPHIC/PQ0060195006.JPEG>
- Egidi, E., Delgado-Baquerizo, M., Plett, J. M., Wang, J., Eldridge, D. J., Bardgett, R. D., Maestre, F. T., y Singh, B. K. (2019). A few Ascomycota taxa dominate soil fungal communities worldwide. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-019-10373-Z>
- Espinoza Montaluisa, E. G. (2018). *Relaciones entre las características edafológicas y las variables dasométricas de tres especies arbóreas plantadas en suelos perturbados por la actividad petrolera*. [Trabajo de Titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/14251>
- Ezekoye, C. C., Chikere, C. B., y Okpokwasili, G. C. (2018). Fungal diversity associated with crude oil-impacted soil undergoing in-situ bioremediation. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 10, 148–152. <https://doi.org/10.1016/J.SCP.2018.11.003>
- Flores, F. (2021). *Protocolo para la identificación molecular de microorganismos*. [Archivo PDF].
- Fredricks, D. N., Smith, C., y Meier, A. (2005). Comparison of Six DNA Extraction Methods for Recovery of Fungal DNA as Assessed by Quantitative PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(10), 5122. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.10.5122-5128.2005>
- Galagan, J. E., Henn, M. R., Ma, L. J., Cuomo, C. A., y Birren, B. (2005). Genomics of the fungal kingdom: Insights into eukaryotic biology. *Genome Research*, 15(12), 1620–1631. <https://doi.org/10.1101/GR.3767105>
- Galitskaya, P., Biktasheva, L., Blagodatsky, S., y Selivanovskaya, S. (2021). Response of bacterial and fungal communities to high petroleum pollution in different soils. *Scientific Reports 2021 11:1*, 11(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80631-4>
- Garibyan, L., y Avashia, N. (2013). Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *The Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), e6. <https://doi.org/10.1038/JID.2013.1>

- Gautam, A. K., Verma, R. K., Avasthi, S., Sushma, Bohra, Y., Devadatha, B., Niranjana, M., y Suwannarach, N. (2022). Current Insight into Traditional and Modern Methods in Fungal Diversity Estimates. *Journal of Fungi* 2022, Vol. 8, Page 226, 8(3), 226.
<https://doi.org/10.3390/JOF8030226>
- Gomes, A., y Korf, B. (2018). Genetic Testing Techniques. *Pediatric Cancer Genetics*, 47–64.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-48555-5.00005-3>
- Gostinčar, C. (2020). Towards Genomic Criteria for Delineating Fungal Species. *Journal of Fungi*, 6(4), 1–18. <https://doi.org/10.3390/JOF6040246>
- Gupta, N. (2019). DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *Journal of Cytology*, 36(2), 116. https://doi.org/10.4103/JOC.JOC_110_18
- Hagemann, I. S. (2015). Overview of Technical Aspects and Chemistries of Next-Generation Sequencing. *Clinical Genomics*, 3–19. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404748-8.00001-0>
- Hakim, S. S., y Yuwati, T. W. (2020). The Use of Fungal Endophyte *Penicillium citrinum* on Tree Seedling: Applicability and Limitation. *BIO Web of Conferences*, 20, 03005.
<https://doi.org/10.1051/BIOCONF/20202003005>
- Haldar, S., y Sengupta, S. (2015). Plant-microbe Cross-talk in the Rhizosphere: Insight and Biotechnological Potential. *The Open Microbiology Journal*, 9(1), 1.
<https://doi.org/10.2174/1874285801509010001>
- Hall, B. G. (2013). Building Phylogenetic Trees from Molecular Data with MEGA. *Molecular Biology and Evolution*, 30(5), 1229–1235. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MST012>
- Hammer. (3 de mayo 2020). *Past*. Recuperado el 5 de junio 2023 de:
<https://www.nhm.uio.no/english/research/resources/past/>
- Hartmann, A., Rothballer, M., y Schmid, M. (2008). Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and Soil*, 312(1–2), 7–14.
<https://doi.org/10.1007/S11104-007-9514-Z>

- Hawksworth, D. L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 105(12), 1422–1432.
<https://doi.org/10.1017/S0953756201004725>
- Heather, J. M., y Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1. <https://doi.org/10.1016/J.YGENO.2015.11.003>
- Henry, T., Iwen, P. C., y Hinrichs, S. H. (2000). Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(4), 1510–1515. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.4.1510-1515.2000/ASSET/4F77A69F-84C4-488B-968F-A6296580C079/ASSETS/GRAPHIC/JM0400828001.JPEG>
- Hua, G. J., Hung, C. L., Lin, C. Y., Wu, F. C., Chan, Y. W., y Tang, C. Y. (2017). MGUPGMA: A Fast UPGMA Algorithm With Multiple Graphics Processing Units Using NCCL. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 13. <https://doi.org/10.1177/1176934317734220>
- Huera-Lucero, T., Labrador-Moreno, J., Blanco-Salas, J., y Ruiz-Téllez, T. (2020). A Framework to Incorporate Biological Soil Quality Indicators into Assessing the Sustainability of Territories in the Ecuadorian Amazon. *Sustainability 2020*, Vol. 12, Page 3007, 12(7), 3007. <https://doi.org/10.3390/SU12073007>
- Kadri, K., y Kadri, K. (2019). Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*.
<https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.86491>
- Kadri, T., Rouissi, T., Kaur Brar, S., Cledon, M., Sarma, S., y Verma, M. (2017). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: A review. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 51, 52–74. <https://doi.org/10.1016/J.JES.2016.08.023>
- Kamilari, E., Stanton, C., Reen, F. J., y Ross, R. P. (2023). Uncovering the Biotechnological Importance of *Geotrichum candidum*. *Foods*, 12(6), 1124.
<https://doi.org/10.3390/FOODS12061124/S1>

- Kostrzewska, M., y Maier, T. (2016). Criteria for Development of MALDI-TOF Mass Spectral Database. *MALDI-TOF and Tandem MS for Clinical Microbiology*, 39–54.
<https://doi.org/10.1002/9781118960226.CH2>
- Kumar, G., Bhatt, P., Lal, S., Kumar, G., Bhatt, P., y Lal, S. (2021). Phytoremediation: A Synergistic Interaction between Plants and Microbes for Removal of Petroleum Hydrocarbons. *Soil Contamination - Threats and Sustainable Solutions*.
<https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.93764>
- Kumar, M., y Mugunthan, M. (2018). Evaluation of three DNA extraction methods from fungal cultures. *Medical Journal, Armed Forces India*, 74(4), 333.
<https://doi.org/10.1016/J.MJAFI.2017.07.009>
- Latgé, J. P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(2), 310. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.2.310>
- Lessmann, J., Fajardo, J., Muñoz, J., y Bonaccorso, E. (2016). Large expansion of oil industry in the Ecuadorian Amazon: biodiversity vulnerability and conservation alternatives. *Ecology and Evolution*, 6(14), 4997. <https://doi.org/10.1002/ECE3.2099>
- Lewis, L. K., Robson, M. H., Vecherkina, Y., Ji, C., y Beall, G. W. (2010). Interference with spectrophotometric analysis of nucleic acids and proteins by leaching of chemicals from plastic tubes. *BioTechniques*, 48(4), 297–302. <https://doi.org/10.2144/000113387>
- Li, D., Yi, J., Han, G., y Qiao, L. (2022). MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Analysis and Research. *ACS Measurement Science Au*, 2(5), 385–404.
https://doi.org/10.1021/ACSMEASURESCIAU.2C00019/ASSET/IMAGES/LARGE/TG2C00019_0011.JPEG
- Liu, H., Wu, M., Gao, H., Liu, Z., Gao, J., y Wang, S. J. (2023). Crude oil removal by *Meyerozyma* consortium and nitrogen supplement: Hydrocarbon transformation, nitrogen fate, and enhancement mechanism. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 11(1), 109034. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2022.109034>

- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 63(63), 3998.
<https://doi.org/10.3791/3998>
- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J. A., López-Guerrero, J. A., y Aguilar-Quesada, R. (2016). DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and Biobanking*, 14(4), 264. <https://doi.org/10.1089/BIO.2015.0064>
- MacGregor-Fors, I., y Payton, M. E. (2013). Contrasting Diversity Values: Statistical Inferences Based on Overlapping Confidence Intervals. *PLOS ONE*, 8(2), e56794.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0056794>
- Magurran, A. E., y Dornelas, M. (2010). Biological diversity in a changing world. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1558), 3593.
<https://doi.org/10.1098/RSTB.2010.0296>
- Maldonado, I., García Ramírez, D., Striebeck, P., Lafage, M., y Fernández Canigia, L. (2017). Espectrometría de masas MALDI-TOF: evaluación de la etapa preanalítica para la identificación de hongos miceliales. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(1), 7–14.
<https://doi.org/10.1016/J.RAM.2016.10.001>
- Maldonado, N., Robledo, C., y Robledo, J. (2018). La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio*, 22(1), 35–45.
<https://doi.org/10.22354/IN.V0I0.703>
- Martin, K. J., y Rygiewicz, P. T. (2005). Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology*, 5(1), 1–11.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-28/COMMENTS>
- Marx, D. H., y Daniel, W. J. (1976). Maintaining cultures of ectomycorrhizal and plant pathogenic fungi in sterile water cold storage. *Canadian Journal of Microbiology*, 22(3), 338–341. <https://doi.org/10.1139/M76-051>

- Matange, K., Tuck, J. M., y Keung, A. J. (2021). DNA stability: a central design consideration for DNA data storage systems. *Nature Communications*, 12(1).
<https://doi.org/10.1038/S41467-021-21587-5>
- Mateo, J. P., y García, S. (2014). El sector petrolero en Ecuador. 2000-2010. *Problemas Del Desarrollo. Revista Latinoamericana de Economía*, 45(177), 113–139.
[https://doi.org/10.1016/S0301-7036\(14\)70865-X](https://doi.org/10.1016/S0301-7036(14)70865-X)
- McMullen, A. R., Wallace, M. A., Pincus, D. H., Wilkey, K., y Burnham, C. A. D. (2016). Evaluation of the Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry System for Identification of Clinically Relevant Filamentous Fungi. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(8), 2068–2073. <https://doi.org/10.1128/JCM.00825-16>
- Meištininkas, R., Vaškevičienė, I., Dikšaitytė, A., Pedišius, N., y Žaltauskaitė, J. (2023). Potential of Eight Species of Legumes for Heavy Fuel Oil-Contaminated Soil Phytoremediation. *Sustainability 2023, Vol. 15, Page 4281*, 15(5), 4281.
<https://doi.org/10.3390/SU15054281>
- Men, A. E., Wilson, P., Siemering, K., y Forrest, S. (2008). Sanger DNA Sequencing. *Next Generation Genome Sequencing: Towards Personalized Medicine*, 1–11.
<https://doi.org/10.1002/9783527625130.CH1>
- Mohammed, S. A., Omar, T. J., y Hasan, A. H. (2023). *Degradation of crude oil and pure hydrocarbon fractions by some wild bacterial and fungal species. Koya*
<https://arxiv.org/abs/2301.08715v1>
- Morais Oliveira, E. M., Corrêa De Oliveira, T., Moreira De Souza, A., Ferreira, T., Santos, D., y Santos De Lima, I. (2015). Desenho de Primers Degenerados através de Bioinformática. *Prisma científico*.
http://prismacientifico.files.wordpress.com/2013/11/genetic_code.jpg

- Morris, E. K., Caruso, T., Buscot, F., Fischer, M., Hancock, C., Maier, T. S., Meiners, T., Müller, C., Obermaier, E., Prati, D., Socher, S. A., Sonnemann, I., Wäschke, N., Wubet, T., Wurst, S., y Rillig, M. C. (2014). Choosing and using diversity indices: insights for ecological applications from the German Biodiversity Exploratories. *Ecology and Evolution*, 4(18), 3514. <https://doi.org/10.1002/ECE3.1155>
- Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), 56–65. <https://doi.org/10.1038/SCIENTIFICAMERICAN0490-56>
- Neidler, S. (03 de marzo 2017). *What are the differences between PCR, RT-PCR, qPCR, ζ and RT-qPCR?* Enzo Life Sciences, Inc. Recuperado el 20 de julio 2023 de: <https://www.enzolifesciences.com/science-center/technotes/2017/march/what-are-the-differences-between-pcr-rt-pcr-qpcr-and-rt-qpcr?/>
- Nakasone, K. K., Peterson, S. W., y Jong, S.-C. (2004). Preservation and distribution of fungal cultures. *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004: Pages 37-47., 3. <https://www.fs.usda.gov/research/treesearch/7115>
- Niu, C., Kebede, H., Auld, D. L., Woodward, J. E., Burow, G., y Wright, R. J. (2008). A safe inexpensive method to isolate high quality plant and fungal DNA in an open laboratory environment. *African Journal of Biotechnology*, 7(16), 2818–2822. <https://doi.org/10.4314/AJB.V7I16.59165>
- O'Donnell, K., Ward, T. J., Robert, V. A. R. G., Crous, P. W., Geiser, D. M., y Kang, S. (2015). DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions. *Phytoparasitica*, 43(5), 583–595. <https://doi.org/10.1007/S12600-015-0484-Z/FIGURES/8>
- O'Donnell, K., Whitaker, B. K., Laraba, I., Proctor, R. H., Brown, D. W., Broders, K., Kim, H. S., McCormick, S. P., Busman, M., Aoki, T., Torres-Cruz, T. J., y Geiser, D. M. (2022). DNA Sequence-Based Identification of *Fusarium*: A Work in Progress. *Plant Disease*, 106(6),

1597–1609. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-21-2035->

SR/ASSET/IMAGES/LARGE/PDIS-09-21-2035-SRF9.JPEG

Ojha, K. K., Mishra, S., y Singh, V. K. (2022). Computational molecular phylogeny: concepts and applications. *Bioinformatics: Methods and Applications*, 67–89.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89775-4.00025-0>

Ortiz-Burgos, S. (2016). Shannon-weaver diversity index. *Encyclopedia of Earth Sciences Series*, 572–573. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8801-4_233/COVER

Pattnaik, S. S., y Busi, S. (2019). *Rhizospheric Fungi: Diversity and Potential Biotechnological Applications*. 63–84. https://doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1_2

Pedraza, R. O., Teixeira, K. R. S., Scavino, A. F., García De Salamone, I., Baca, B. E., Azcón, R., Baldani, V. L. D., y Bonilla, R. (2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Revisión. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 11(2), 155–164. https://doi.org/10.21930/rcta.vol11_num2_art:206

Pérez de Castro, A. M. (04 de noviembre 2011). *Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)*. Recuperado el 20 de mayo 2023 de <https://riunet.upv.es:443/handle/10251/10700>

Pertsemliadis, A., y Fondon, J. W. (2001). Having a BLAST with bioinformatics (and avoiding BLAST phemy). *Genome Biology*, 2(10), 1–10. <https://doi.org/10.1186/GB-2001-2-10-REVIEWS2002/FIGURES/4>

Pielou, E. C. (1966). The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology*, 13(C), 131–144. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(66\)90013-0](https://doi.org/10.1016/0022-5193(66)90013-0)

Quinsasamín Armas, J. I. (2019). *Diversidad de hongos rizosféricos de tres especies arbóreas plantadas en suelos perturbados por la actividad petrolera de la amazonía ecuatoriana*. [Trabajo de Titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE].

<http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/21015>

- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., y Oberlies, N. H. (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products*, 80(3), 756–770.
https://doi.org/10.1021/ACS.JNATPROD.6B01085/ASSET/IMAGES/LARGE/NP-2016-01085V_0007.JPEG
- Remache Arequipa, A.R. (2020). *Diversidad de hongos endorizosféricos de tres especies arbóreas plantadas sobre suelos perturbados inoculados con tierra de bosque natural*. [Trabajo de Titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE].
<http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/24805>
- Riskuwa-Shehu, M. L., Ijah, U. J. J., Manga, S. B., y Bilbis, L. S. (2017). Evaluation of the use of legumes for biodegradation of petroleum hydrocarbons in soil. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 14(10), 2205–2214.
<https://doi.org/10.1007/S13762-017-1303-5>
- Rychert, J. (2019). Benefits and Limitations of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Identification of Microorganisms. *Journal of Infectiology and Epidemiology*, 2(4), 1–5.
<https://doi.org/10.29245/2689-9981/2019/4.1142>
- Salem-Bango, Z., Price, T. K., Chan, J. L., Chandrasekaran, S., Garner, O. B., y Yang, S. (2023). Fungal Whole-Genome Sequencing for Species Identification: From Test Development to Clinical Utilization. *Journal of Fungi*, 9(2).
<https://doi.org/10.3390/JOF9020183/S1>
- Sánchez, D., Merlo, J., Haro, R., Acosta, M., y Bernal, G. (2018). *Soils from the Amazonia*. 113–137. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25319-0_4
- Sanger, F., Nicklen, S., y Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/PNAS.74.12.5463>

- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P. W., Miller, A. N., Wingfield, M. J., Aime, M. C., An, K. D., Bai, F. Y., Barreto, R. W., Begerow, D., Bergeron, M. J., Blackwell, M., ... Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(16), 6241–6246.
https://doi.org/10.1073/PNAS.1117018109/SUPPL_FILE/SD01.XLS
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., y Johne, R. (2012). PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, *113*(5), 1014–1026.
<https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2012.05384.X>
- Schubert, S., y Kostrzewa, M. (2017). MALDI-TOF MS in the Microbiology Laboratory: Current Trends. *Current Issues in Molecular Biology*, *23*, 17–20.
<https://doi.org/10.21775/CIMB.023.017>
- Schulthess, B., Ledermann, R., Mouttet, F., Zbinden, A., Bloemberg, G. V., Böttger, E. C., y Hombach, M. (2014). Use of the Bruker MALDI Biotyper for identification of molds in the clinical mycology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, *52*(8), 2797–2803.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00049-14>
- Shannon, C. E. (1948). A Mathematical Theory of Communication. *Bell System Technical Journal*, *27*(3), 379–423. <https://doi.org/10.1002/J.1538-7305.1948.TB01338.X>
- Sharma, N., Sharma, N., Sharma, S., Sharma, P., y Devi, B. (2023). Identification, morphological, biochemical, and genetic characterization of microorganisms. *Basic Biotechniques for Bioprocess and Bioentrepreneurship*, 47–84.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816109-8.00003-9>
- Shendure, J., Balasubramanian, S., Church, G. M., Gilbert, W., Rogers, J., Schloss, J. A., y Waterston, R. H. (2017). DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature* *2017* *550*:7676, *550*(7676), 345–353. <https://doi.org/10.1038/nature24286>

- Simpson, E. H. (1949). Measurement of Diversity. *Nature* 1949 163:4148, 163(4148), 688–688.
<https://doi.org/10.1038/163688a0>
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., y Viridi, J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, 6(AUG), 144398. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.00791/BIBTEX>
- Smith, S. N. (2007). An overview of ecological and habitat aspects in the genus *Fusarium* with special emphasis on the soil-borne pathogenic forms. *Plant Pathology Bulletin*, 16(3), 97–120.
- Sosa Vargas, V. S. (2018). *Diversidad de hongos presentes en raíces de tres especies arbóreas plantadas en suelos perturbados por la actividad petrolera en la amazonía ecuatoriana*. [Trabajo de Titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE].
<http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/15842>
- Stepanova, A. Y., Gladkov, E. A., Osipova, E. S., Gladkova, O. V., y Tereshonok, D. V. (2022). Bioremediation of Soil from Petroleum Contamination. *Processes* 2022, Vol. 10, Page 1224, 10(6), 1224. <https://doi.org/10.3390/PR10061224>
- Thermo Fisher Scientific. (3 de junio 2020). *Thermo Scientific Multiskan™ SkyHigh Manual del usuario*. Recuperado el 20 de junio 2023 de: www.thermofisher.com/rohsweee
- Tobin, J. M., Cooper, D. G., y Neufeld, R. J. (1984). Uptake of metal ions by *Rhizopus arrhizus* biomass. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(4), 821–824.
<https://doi.org/10.1128/AEM.47.4.821-824.1984>
- Tysekie, R., Nowak, A., Ozimek, E., y Jarozuk-ściseł, J. (2022). Trichoderma: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4).
<https://doi.org/10.3390/IJMS23042329/S1>

- Udom, B. E., y Nuga, B. O. (2015). Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in a Tropical Ultisol Using Legume Plants and Organic Manure. *Journal of Agricultural Science*, 7(4), p174. <https://doi.org/10.5539/JAS.V7N4P174>
- Van Pelt-Verkuil, E., Van Belkum, A., y Hays, J. P. (2008). Principles and technical aspects of PCR amplification. *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*, 1–325. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6241-4/COVER>
- Vargas, Y., y Calero, O. (10 de julio de 2018). *Agroforestería sostenible en la Amazonía Ecuatoriana*. Recuperado el 5 de junio 2023 de: www.iniap.gob.ec
- Vega Chimarro, M.A. (2021). *Efecto de la inoculación de suelos perturbados sobre la diversidad de hongos ectoizosféricos de tres especies arbóreas en la amazonía ecuatoriana*. [Trabajo de Titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/24876>
- Verwer, P. E. B., Van Leeuwen, W. B., Girard, V., Monnin, V., Van Belkum, A., Staab, J. F., Verbrugh, H. A., Bakker-Woudenberg, I. A. J. M., y Van De Sande, W. W. J. (2014). Discrimination of *Aspergillus lentulus* from *Aspergillus fumigatus* by Raman spectroscopy and MALDI-TOF MS. *European Journal of Clinical Microbiology*, 33(2), 245–251. <https://doi.org/10.1007/S10096-013-1951-4>
- Villacís Buenaño, J. (2016). *Evaluación de las técnicas de remediación vegetal utilizadas en plataformas petroleras mediante estudios del desempeño de especies y análisis de diversidad funcional*. [Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de Córdoba] <https://rdu.unc.edu.ar/handle/11086/3344>
- Villacís, J., Casanoves, F., Hang, S., Keesstra, S., y Armas, C. (2016). Selection of forest species for the rehabilitation of disturbed soils in oil fields in the Ecuadorian Amazon. *Science of The Total Environment*, 566–567, 761–770. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2016.05.102>

- Walz, U. (2011). Landscape structure, landscape metrics and biodiversity. *Living Reviews in Landscape Research*, 5(3). <https://doi.org/10.12942/LRLR-2011-3>
- Watanabe, T. (2010). Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species, Third Edition. *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi*.
<https://doi.org/10.1201/EBK1439804193>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., y Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. *PCR Protocols*, 315–322.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Wilfinger, W. W., Mackey, K., y Chomczynski, P. (2018). Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity.
<https://doi.org/10.2144/97223st01>, 22(3), 474–481. <https://doi.org/10.2144/97223ST01>
- Xu, J. (2016). Fungal DNA barcoding1. <https://doi.org/10.1139/Gen-2016-0046>, 59(11), 913–932. <https://doi.org/10.1139/GEN-2016-0046>
- Yao, X., Guo, H., Zhang, K., Zhao, M., Ruan, J., y Chen, J. (2023). Trichoderma and its role in biological control of plant fungal and nematode disease. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1160551. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2023.1160551/BIBTEX>
- Ye, J. S., Yin, H., Qiang, J., Peng, H., Qin, H. M., Zhang, N., y He, B. Y. (2011). Biodegradation of anthracene by *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Hazardous Materials*, 185(1), 174–181. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2010.09.015>
- Zafra, G., y Cortés-Espinosa, D. V. (2015). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Trichoderma* species: a mini review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(24), 19426–19433. <https://doi.org/10.1007/S11356-015-5602-4/METRICS>
- Zafra, G., Moreno-Montaño, A., Absalón, Á. E., y Cortés-Espinosa, D. V. (2015). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by a tolerant strain of *Trichoderma asperellum*. *Environmental Science and Pollution Research International*, 22(2), 1034–1042.
<https://doi.org/10.1007/S11356-014-3357-Y>

Zarrin, M., Ganj, F., y Faramarzi, S. (2016). Development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method for identification of the *Fusarium* genus using the transcription elongation factor-1 α gene. *Biomedical Reports*, 5(6), 705.

<https://doi.org/10.3892/BR.2016.783>

Zhang, P., Seth, A., y Fernandes, H. (2014). Other Post-PCR Detection Technologies.

Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms,

4074–4088. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.07707-8>