



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS - ESPE**  
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA**  
**CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

**Comparación de perfiles taxonómicos de hongos presentes en raíces de plantas de sitios contaminados y no contaminados con compuestos derivados de municiones**

Autora: Navarrete Socasi, Johana Paulina

Director: Duchicela Escobar, Jéssica Ivonne Ph.D.

Sangolquí, 8 de marzo 2024



# Contenido



Introducción



Objetivos



Materiales y métodos



Resultados y discusión



Conclusiones



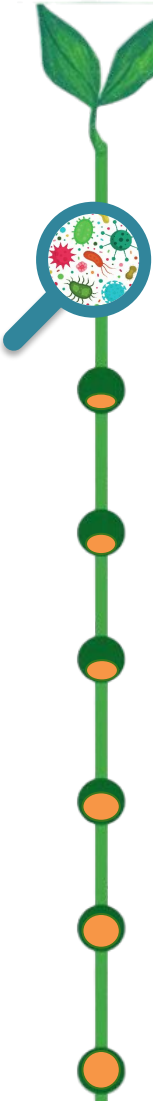
Recomendaciones



Agradecimientos



# Contenido



- Introducción
- Objetivos
- Materiales y métodos
- Resultados y discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones
- Agradecimientos



# Introducción

- Contaminación de suelos por compuestos derivados de municiones

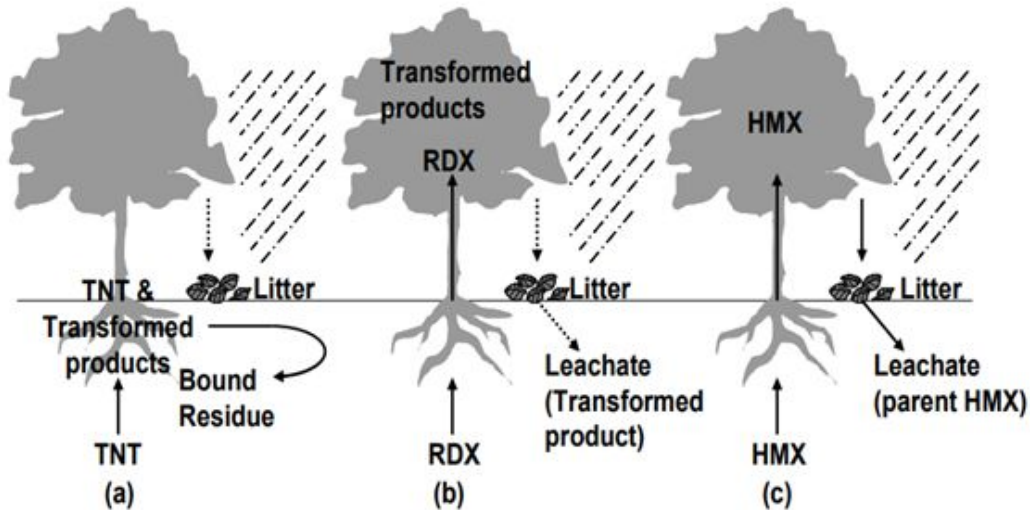
**Abundantes** en suelos de entrenamiento militar. Sitios donde eliminan explosivos y municiones

Compuestos **principales** en la fabricación de municiones:

TNT  
HMX  
RDX

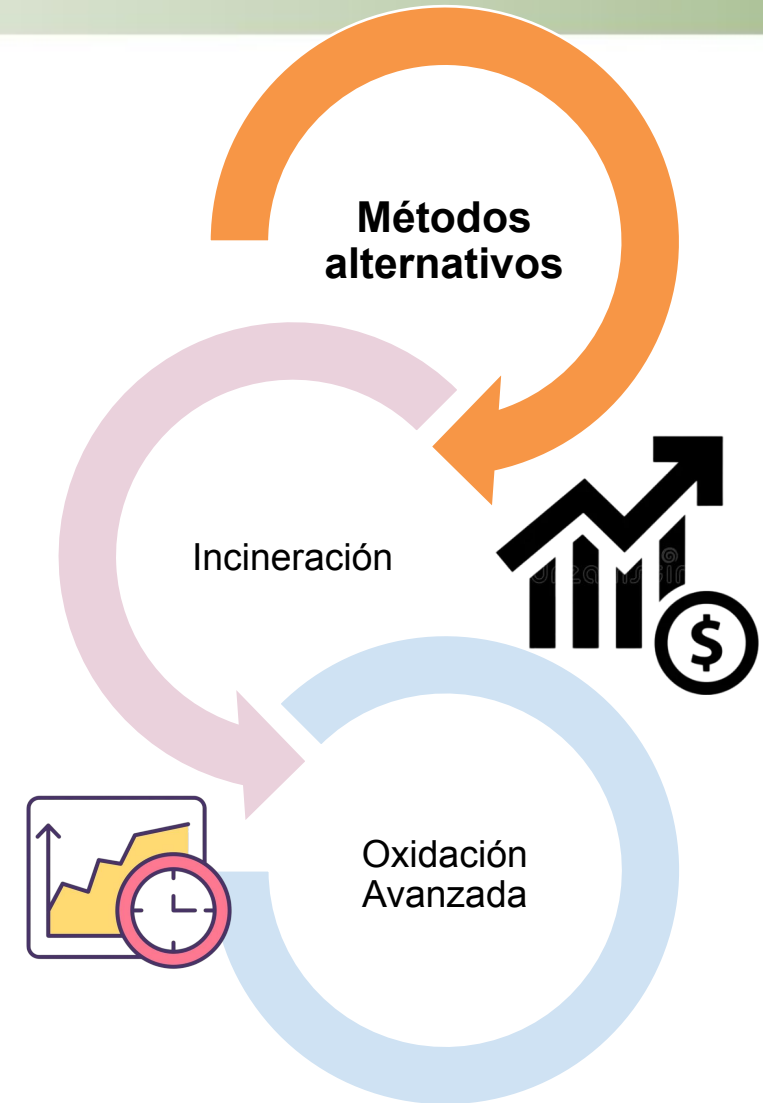
Son contaminantes **persistentes**:

- Estabilidad química
- Resistencia a la volatilización
- Baja tasa de degradación



TNT: Trinitrotolueno, HMX: ciclotetrametilentetranitramina RDX: ciclotrimetilentrinitramina

(Via y Zinnert., 2016; Schonnor et al., 2006; Broomandi et al., 2020)



# Introducción

- Hongos

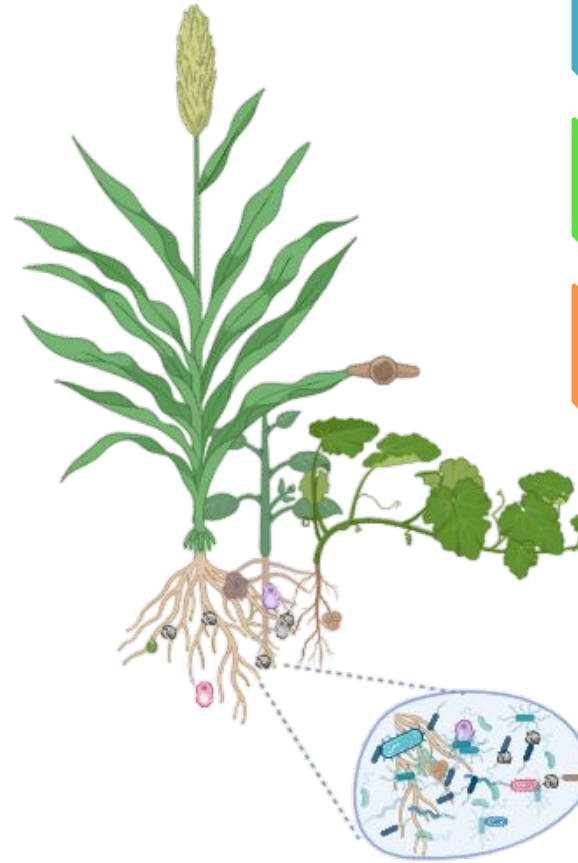


Capacidad metabólica diversa

Producción de enzimas especializadas

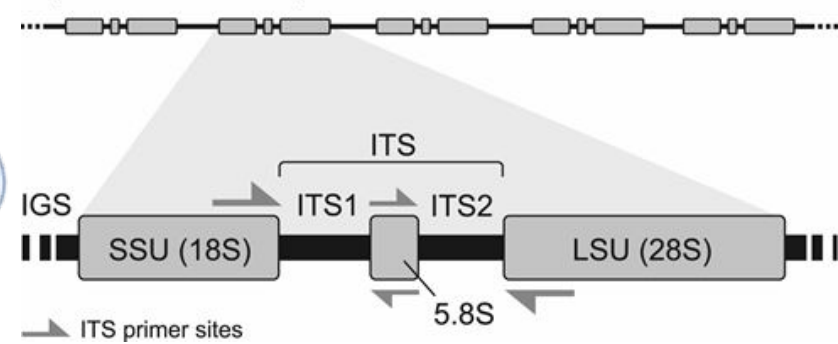
Tolerancia a condiciones adversas

- Metabarcoding



- Búsqueda de potenciales microorganismos
- Tecnologías avanzadas
- Secuenciación basada en amplificación de genes

copies of the rDNA operon



# Contenido



Introducción



**Objetivos**



Materiales y métodos



Resultados y discusión



Conclusiones



Recomendaciones



Agradecimientos



# Objetivos

## Objetivo General

---

Comparar perfiles taxonómicos de hongos presentes en raíces de plantas de sitios contaminados y no contaminados con compuestos derivados de municiones.

---

## Objetivos Específicos

---

Obtener ADN total de raíces de plantas de sitios contaminados y no contaminados con compuestos derivados de municiones, obtenidas del Depósito Conjunto de Municiones “El Corazón”.

---

Secuenciar masivamente amplicones de la región del espaciador transcrito interno (ITS), a partir del ADN total obtenido.

---

Identificar las variantes de secuenciación de los amplicones de la región ITS, obtenida en las lecturas de secuenciación a partir de la secuenciación de alto rendimiento utilizando herramientas bioinformáticas.

---

Analizar comparativamente las variantes de secuencias de amplicón de la región ITS generados a partir de la secuenciación de alto rendimiento utilizando herramientas bioinformáticas

---

# Contenido





# Materiales y métodos

- Muestreo

Lugar

Depósito Conjunto de Municiones el “Corazón”, ubicado en el cantón Mejía, provincia de Pichincha

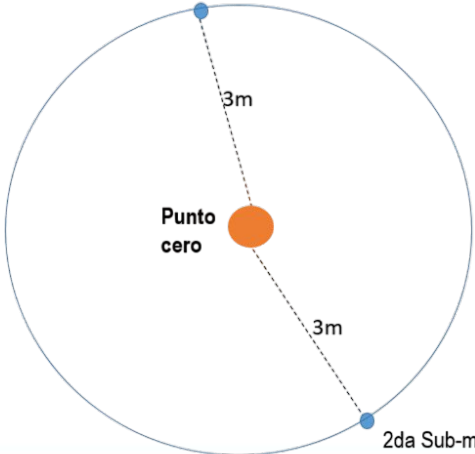


Remanente

Muestras pivote

Predetonación

1ra Sub-muestra



2da Sub-muestra

Deflagración

Se tomó una submuestra de cada pozo

- Nomenclatura

Zona de muestreo	Dígito	Nomenclatura	Réplica
Remanente o Control	1	MR( Muestra de raíces)	1
			2
			3
Deflagración o Fosa	2		1
			2
			3
Predetonación o Cielo Abierto	3	1	
		2	
		3	

Ejemplo: 1MR1

# Materiales y métodos

- Extracción de ADN y evaluación de calidad

a) Extracción de ADN de raíces de las plantas



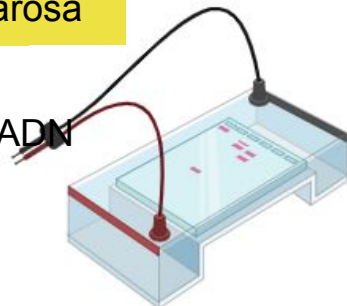
- Secuenciación de alto rendimiento



Marcador	Primer	Secuencia
ITS	ITS86F	GTGAATCATCGAA TCTTTGAA
	ITS4	TCCTCCGCTTATT GATATGC

b) Evaluación de calidad

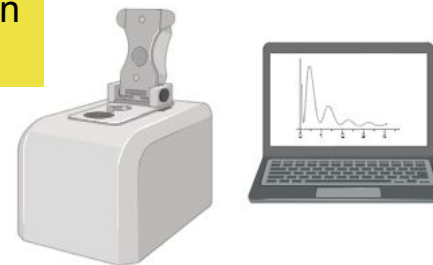
Electroforesis en gel de agarosa



Integridad del ADN

Cuantificación en NanoDrop

- Concentración del ADN (ng/uL)
- Pureza (A260 / A280) (A 260 / 230)



# Materiales y métodos

## • Pipeline Bioinformático

### Análisis de Calidad

1. Inspección de perfiles de calidad de lecturas
2. Filtrar y recortar
3. Desreplicación
4. Inferencia de muestra
5. Fusión de lecturas Reverse y Forward
6. Construcción de tabla de secuencia (ASVs)
7. Eliminación quimeras

### Asignación taxonómica

1. Asignación taxonómica con la comparación de bases de datos

**unite**  
community

*a non-profit association*

### Análisis de diferencial de los ASVs

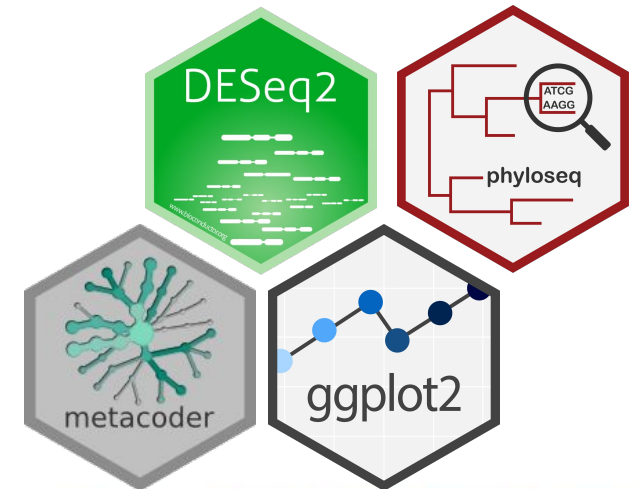
1. Generación de árboles filogenéticos
2. Análisis exploratorio de microbioma

### Análisis de diversidad

1. Evaluación de diversidad Alfa
2. Evaluación de diversidad Beta

### Análisis Estadístico

1. Análisis PERMANOVA
  - UniFrac
  - Bray-Curtis



# Contenido

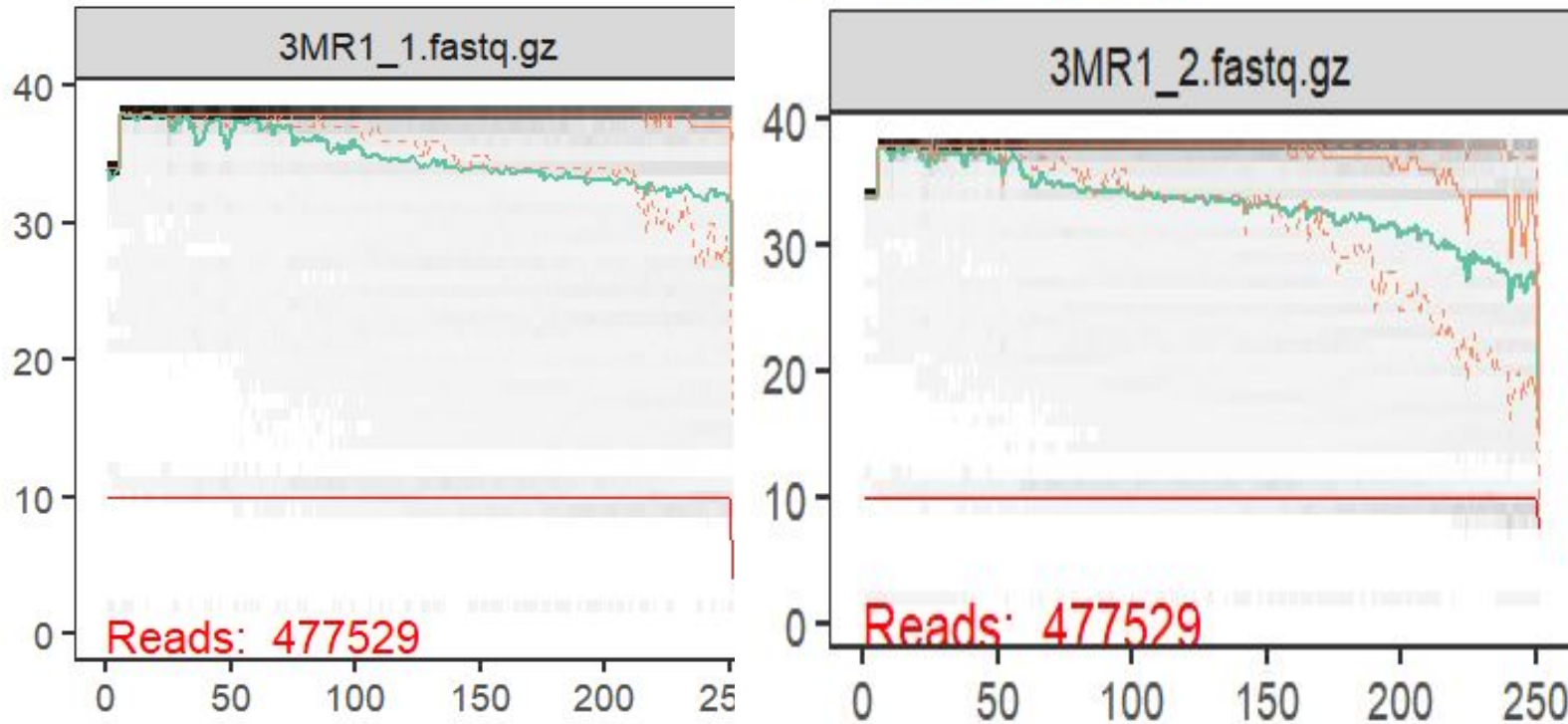


- Introducción
- Objetivos
- Materiales y métodos
- Resultados y discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones
- Agradecimientos



# Resultados y discusión

- Perfiles de calidad (DADA2)



Disminución en la calidad a partir de 220pb para las secuencias Forward; Secuencias Reverse a partir de 180 pb

- Resumen de procesamiento de lecturas

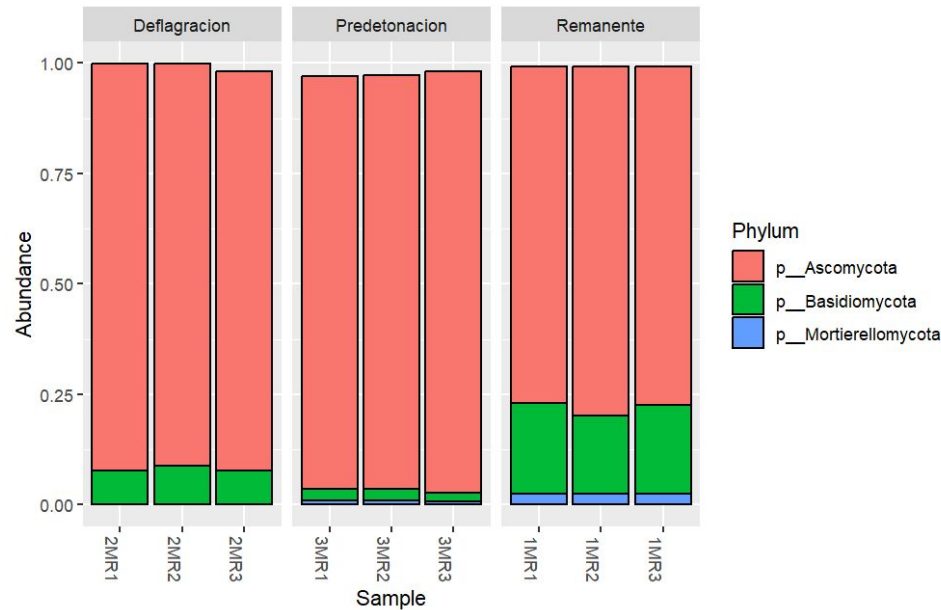
Nº Lecturas	Región ITS
Lecturas crudas	4060335
Filtradas y recortadas	2667026
Eliminación de ruido (SF)	2662383
Eliminación de ruido (SR)	2662470
Secuencias combinadas	2477340
Sin quimeras	2662470

Recuperación del 65%

# Resultados y discusión

- Asignación taxonómica

a) Análisis taxonómico de hongos a nivel de **filo** en función de la abundancia relativa



Ascomycota -	91.1	94.2	77.4
Basidiomycota -	8	2.5	19.4
Mortierellomycota -	0.1	0.8	2.4
Fungi_phy_Incertae_sedis -	0	2.3	0.3
Chytridiomycota -	0.6	0.1	0.1
Glomeromycota -	0.1	0	0.2
Mucoromycota -	0	0	0.1
k_Fungi_ASV_330 -	0	0	0
k_Fungi_ASV_396 -	0	0	0
k_Fungi_ASV_458 -	0	0	0
	Deflagracion -	Predetonacion -	Remanente -

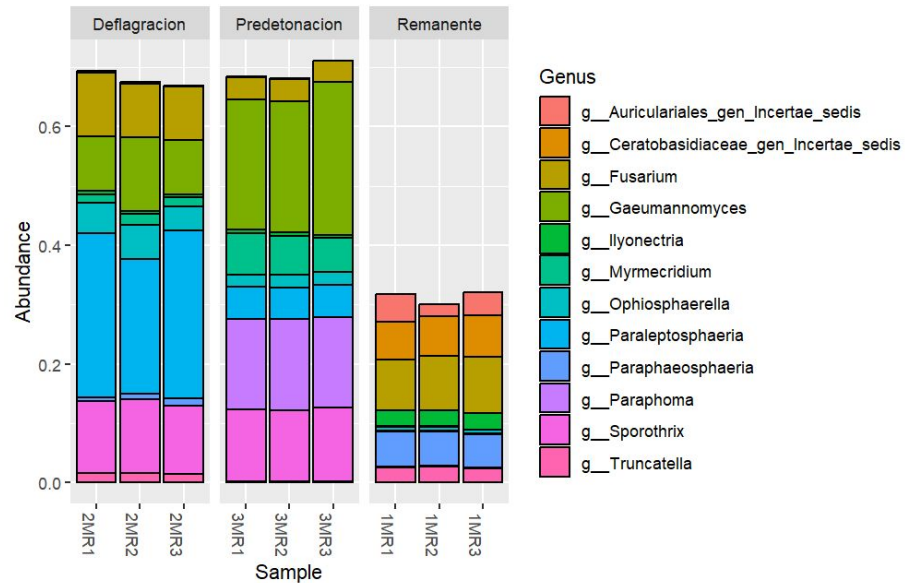
Egidi et al. (2021) destaca la dominancia del filo *Ascomycota* en una amplia gama de suelos a nivel mundial, obteniendo como resultado que efectivamente el filo *Ascomycota* dominada en todos los suelos analizados con un 20%, dándonos a entender que este filo puede desarrollarse en cualquier ambiente.

Callacombe et al. (2019), estudiaron este filo en suelos contaminados con explosivos, por lo que pueden ser potenciadores para reducir estos compuestos debida a su capacidad de descomponer mediante enzimas extracelulares.

*Basidiomycota* se encuentra con menor abundancia en suelos contaminados, Un estudio realizado por Lemmel et al. (2021), obtuvieron menor abundancia en suelos contaminados con TNT. Además se llevó a cabo una prueba de nutrientes, revelando que este filo se encontraba con mayor abundancia cuando había suficientes nutrientes de Na y K.

# Resultados y discusión

## b) Análisis taxonómico de hongos a nivel de género en función de la abundancia relativa



Gaeumannomyces -	10.2	23.2	0
Paraleptosphaeria -	26.2	5.4	0.1
Sporothrix -	12.1	12.1	0
Fusarium -	9.6	3.8	9.1
Paraphoma -	0	15.3	0.1
f__Didymellaceae_ASV_6 -	0.1	1.9	8
Myrmecridium -	1.6	6.4	0.1
Ophiosphaerella -	5	2.1	0.6
f__Didymellaceae_ASV_11 -	7.2	0.3	0
Ceratobasidiaceae_gen_Incertae_sedis -	0.3	0.1	6.7
	Deflagración -	Predetonación -	Remanente -

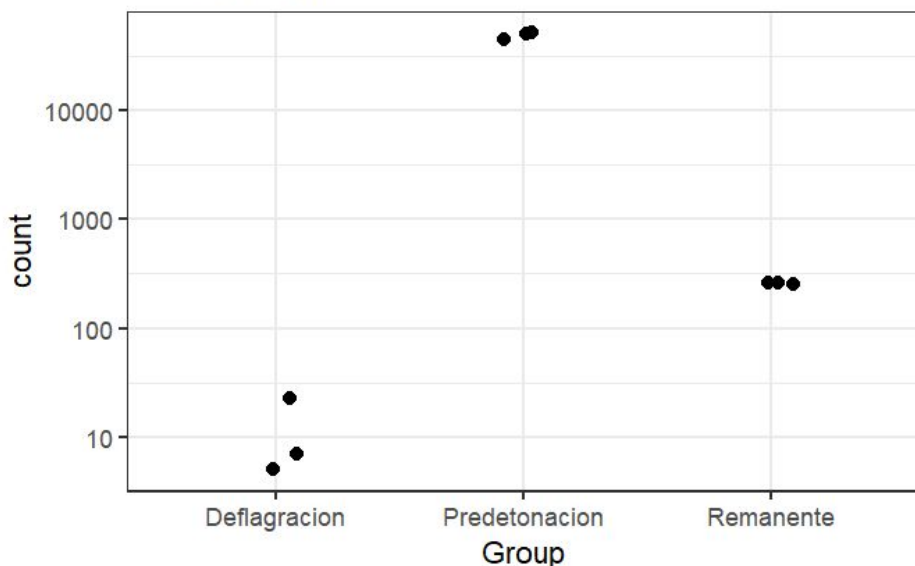
Según Al-Dhabaan & Bakhali (2016), *Fusarium* es uno de los géneros más abundantes en suelos contaminados con municiones.

Kalderis et al. (2011), nos confirma que el género *Fusarium* puede estimular la producción de enzimas que se requieren para poder degradar el TNT.

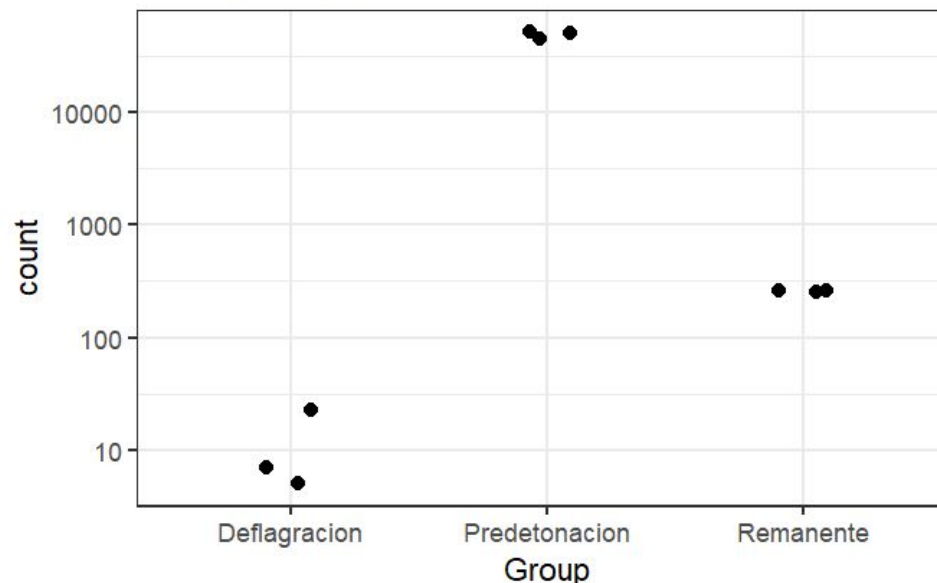
# Resultados y discusión

- Asignación taxonómica de los ASVs con mayor abundancia diferencial

ASV\_4, log<sub>10</sub>-scale



ASV\_55, log<sub>10</sub>-scale



Según Al-Dhabaan & Bakhali (2016), *Fusarium* es uno de los géneros más abundantes en suelos contaminados con municiones.

*Nectriaceae* puede establecer asociaciones simbióticas, produciendo beneficios nutricionales y protección a la planta (Rossman et al., 2023).

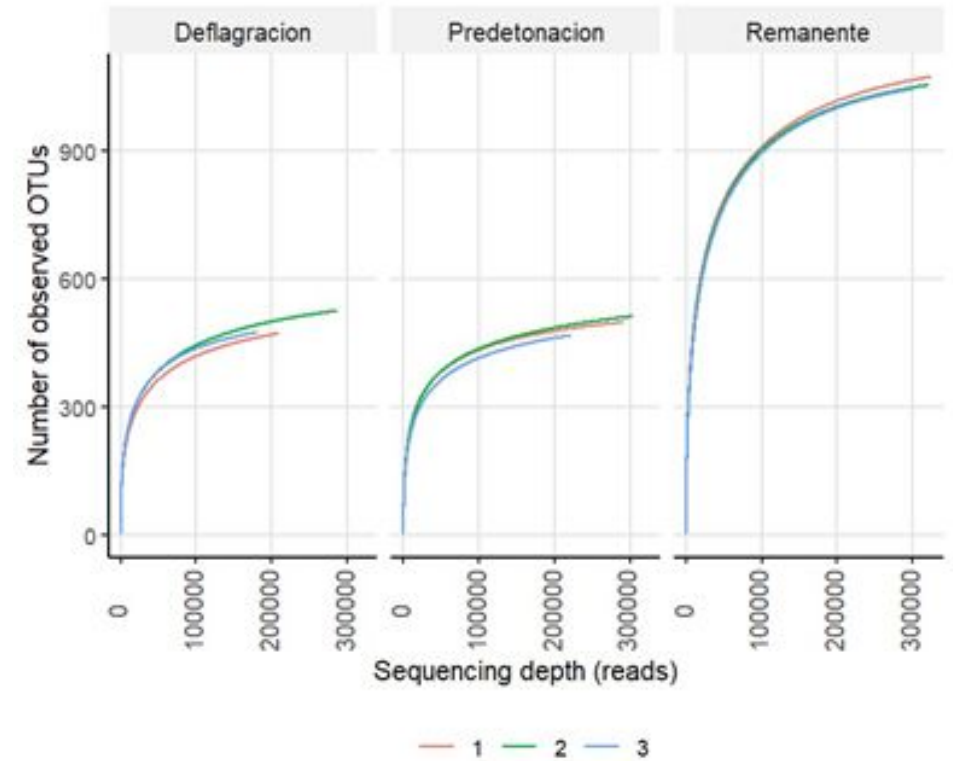
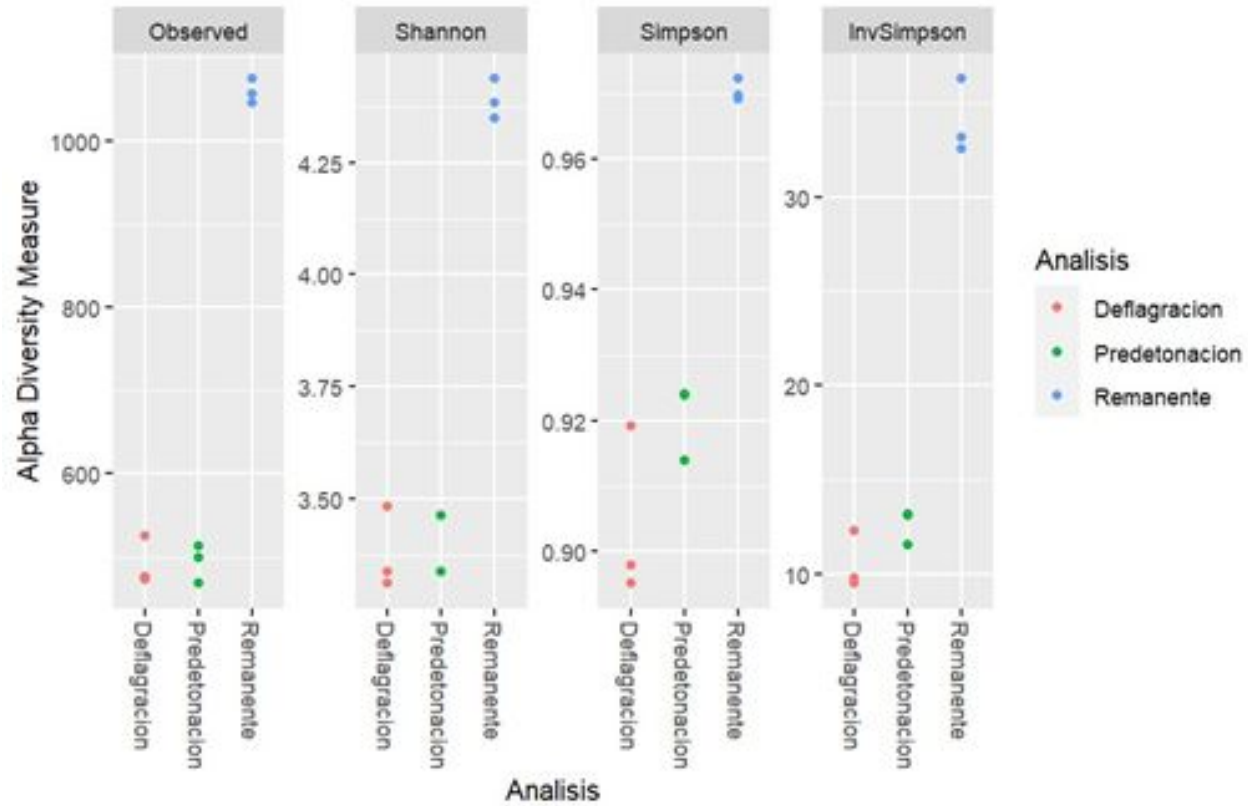
Gen	Tratamiento	ASV	Filo	Orden	Familia	Género
ITS	Deflagración	55	<i>Ascomycota</i>	<i>Hypocreales</i>	<i>Nectriaceae</i>	<i>Dactylonectria</i>
	Predetonación	8	<i>Ascomycota</i>	<i>Hypocreales</i>	<i>Nectriaceae</i>	<i>Fusarium</i>
	Deflagración	4	<i>Ascomycota</i>	<i>Pleosporales</i>	<i>Didymellaceae</i>	<i>Paraphoma</i>





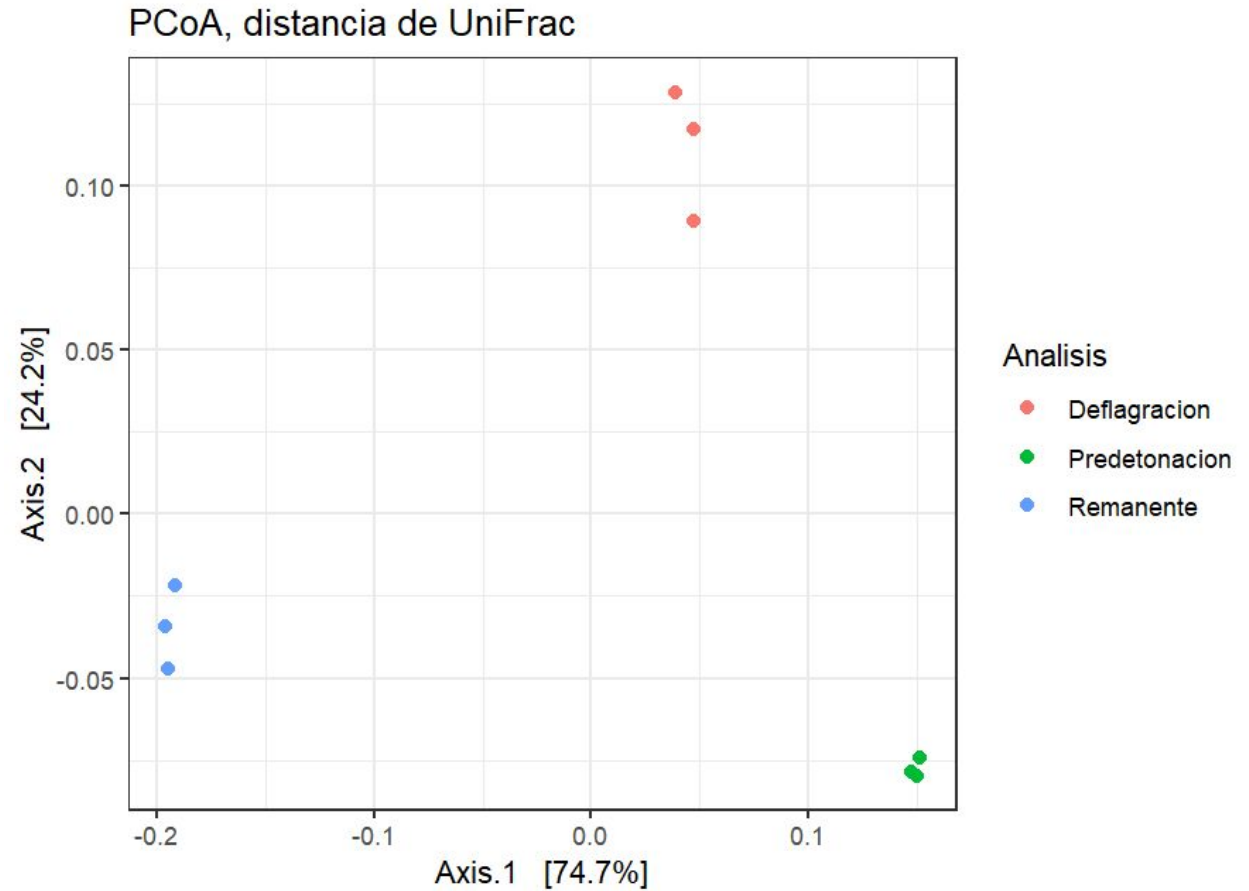
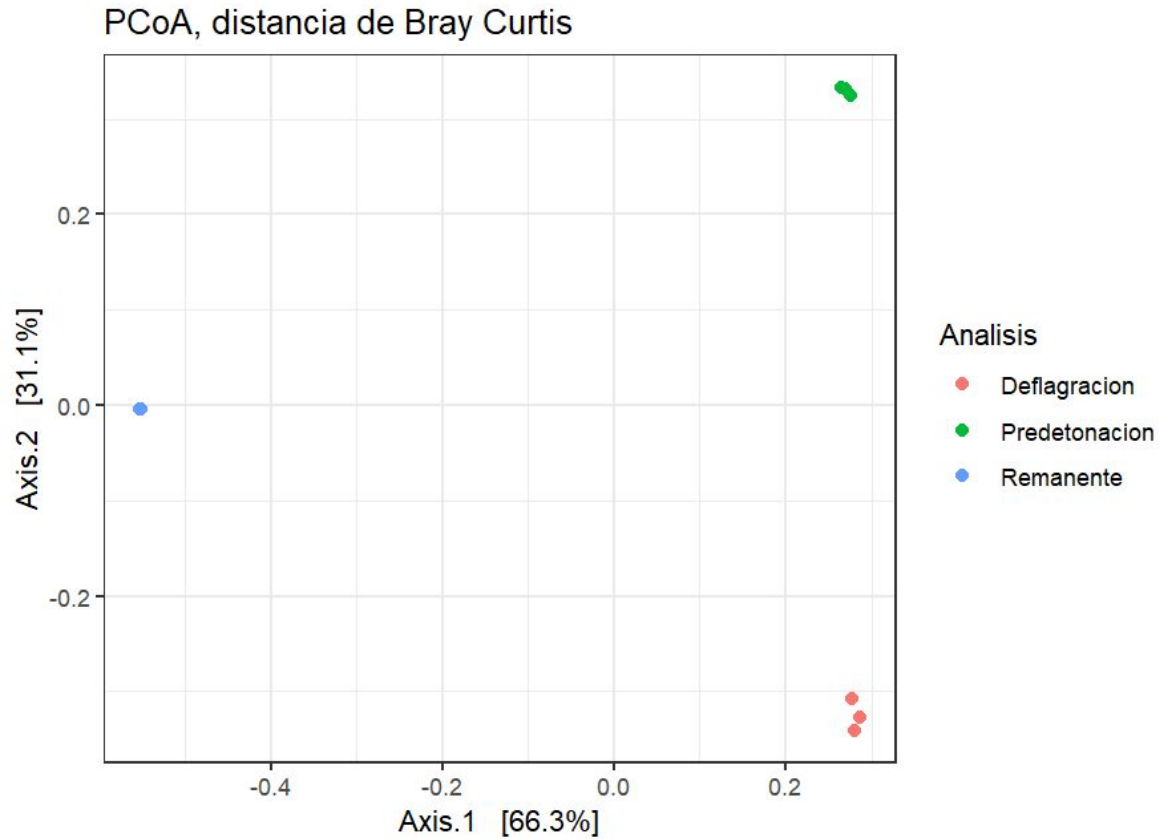
# Resultados y discusión

- **Análisis de diversidad : Diversidad Alfa**



# Resultados y discusión

- **Análisis de diversidad : Diversidad Beta**



# Resultados y discusión

- **Análisis estadístico:** PERMANOVA para diferencias en la composición de la comunidad en base al tratamiento

Distancia Utilizada	Factores analizados	Suma de cuadrados	R2	F	Pr (>F)
UniFrac	Tratamiento	0,154	0,985	190,98	0,0037
	Residual	0,002	0,001		
	Total	0,156	1,000		
Bray-Curtis	Tratamiento	2,014	0,973	180,75	0,0037
	Residual	0,054	0,026		
	Total	2,068	1,000		

# Contenido



- Introducción
- Objetivos
- Materiales y métodos
- Resultados y discusión
- Conclusiones**
- Recomendaciones
- Agradecimientos



# Conclusiones



En la actual investigación las muestras de ADN total de raíces en sitios contaminados y no contaminados con compuestos derivados de municiones fueron secuenciadas, procesadas y utilizadas para construir perfiles taxonómicos de hongos. Donde se logró obtener ADN genómico total de buena calidad a partir de muestras de ADN, dando lugar a 4060335 lecturas para la región ITS.



Dentro de las comunidades fúngicas encontradas en los 3 tratamientos (remanente, deflagración y predetonación) se encuentran en mayor abundancia los filos Ascomycota y Basidiomycota. Destacan los géneros *Gaeumannomyces*, *Paraleptosphaeria*.



Sin embargo, el filo *Ascomycota* se encontró con mayor porcentaje de diversidad en suelos contaminados con municiones (deflagración y predetonación), dándonos a entender que este filo puede que haya desarrollado diferentes mecanismos para poder sobrevivir en mayor abundancia en suelos contaminados.



Por el contrario, el filo *Basidiomycota* se encuentra con un porcentaje mayor en suelos no contaminados con compuestos derivados de municiones, por lo que puede que este filo todavía no haya desarrollado mecanismos para poder tratar este tipo de contaminantes.



El ASVs identificado con mayor abundancia diferencial fue para el género *Fusarium*, debido a que ya existen investigaciones previas donde este género puede ayudar a degradar este tipo de contaminantes. Además, cabe recalcar que este género no fue el más predominante en abundancia relativa.



Según el análisis estadístico PERMANOVA, sí se encontró diferencias significativas entre las comunidades fúngicas de las zonas remanente, deflagración y predetonación.



# Contenido



# Recomendaciones

Se recomienda extraer el ADN del material vegetal de la manera más pronta posible para evitar tener sesgos en el estudio, de la misma manera cuando ya esté el ADN extraído, se recomienda la preparación de librerías de la manera más pronta posible para evitar que el ADN se degrade por cambios de temperatura que se puedan presentar.

En el análisis estadístico verificar que tanto el programa como los paquetes utilizados sean compatibles para evitar perder información en el proceso.

# Contenido



Introducción



Objetivos



Materiales y métodos



Resultados y discusión



Conclusiones



Recomendaciones



Agradecimientos





# Agradecimientos

Jéssica Duchicela, Ph.D.

**Directora del Proyecto “Biodegradación de  
contaminantes derivados de municiones por inóculos  
nativos de micorriza”**

Silvana Granda M.Sc.

**Técnica del Laboratorio de Microbiología  
Molecular-ESPE**

Francisco Flores Ph.D.

**Lector**

Docentes, familia y amigos

