



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

Navarrete Socasi, Johana Paulina

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

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

Ing. Duchicela Escobar, Jéssica Ivonne PhD.

5 de marzo del 2024

Resultados de verificación de similitud



Proyecto de UIC-Navarrete Johana.do...

Scan details

Scan time:
March 20th, 2024 at 15:17 UTC

Total Pages:
56

Total Words:
13906

Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
Identical	0.4%	62
Minor Changes	0.2%	25
Paraphrased	0.9%	131
Omitted Words	0%	0

AI Content Detection



Text coverage
 AI text
 Human text

🔍 Plagiarism Results: (15)

🌐 **Bilogia Flashcards | Quizlet** 0.7%

<https://quizlet.com/ec/773384288/bilogia-flash-cards/>

hello quizlet HomeSubjects Expert Solutions Log in Sign up Bilogia Flashcards Learn Test ...

🌐 **¿Qué Es La Taxonomía? | Sleeknote** 0.4%

<https://sleeknote.com/es/advanced/ecommerce-glossary/que-es-la-taxonomia>

Already have an account? ...

🌐 **CONICET | Buscador de Institutos y Recursos Humanos** 0.2%

https://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?keywords=&id=28435&congresos=yes&detalles=yes&congr...

Toggle navigation Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas Intranet ...

🌐 **Identification of Metabolic Routes and Catabolic Enzymes Involved in Ph...** 0.2%

<https://apps.dtic.mil/sti/tr/pdf/ada468820.pdf>

Schnoor, Jerald L.;Aken, Benoit Van;Brentner, Laura B.;Tanaka, Sachiyo;Flokstra, Brittany;Yoon, Jong M.

Identification of Metabolic Routes and Catabolic Enzymes Involved in Phytoremediation of the NitroSubstituted Explosives TNT, RDX, and HM...

Firma:



.....
Duchicela Escobar, Jéssica Ivonne Ph.D
 Director



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: **“Comparación de perfiles taxonómicos de hongos presentes en raíces de plantas de sitios contaminados y no contaminados con compuestos derivados de municiones”** fue realizado por la señorita **Navarrete Socasi, Johana Paulina**, 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 analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 5 de marzo del 2024



Firma:

.....
Duchicela Escobar, Jéssica Ivonne Ph.D

C. C. 1710463835



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Navarrete Socasi, Johana Paulina**, con cédula de ciudadanía n° 1728354737, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **“Comparación de perfiles taxonómicos de hongos presentes en raíces de plantas en sitios contaminados y no contaminados con compuestos derivados de municiones”** 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, 05 de marzo de 2024

Navarrete Socasi, Johana Paulina

C.C.: 1728354737



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, **Navarrete Socasi, Johana Paulina**, con cédula de ciudadanía n° 1728354737 autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **"Comparación de perfiles taxonómicos de hongos presentes en raíces de plantas de sitios contaminados y no contaminados con compuestos derivados de municiones"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi/nuestra responsabilidad.

Sangolquí, 05 de marzo del 2024

Firma

Navarrete Socasi, Johana Paulina

C.C.: 1728354737

Dedicatoria

Dedico este proyecto de investigación con profundo amor y gratitud a mis padres, Juan Carlos y María Mercedes, cuyo apoyo y amor incondicional han sido la principal inspiración a lo largo de mis estudios; A mis hermanos, Juan, Fernanda y Alexandra, les doy las gracias por su cariño y comprensión en todo momento; A mi sobrino, Isaac Alejandro, quien ilumina cada día de mi vida con su alegría contagiosa; Y a mis amigos, que siempre estuvieron en la buenas y en las malas. Les agradezco a todos por su apoyo inquebrantable y por compartir este viaje conmigo.

Johana Paulina Navarrete Socasi

Agradecimiento

Quiero comenzar expresando mi profundo agradecimiento a Dios, quien ha sido mi guía a lo largo de mi carrera. Agradezco iluminar mi camino en los momentos de oscuridad y por cuidar de mí en todo momento.

A mis padres, hermanos, tíos y primos, por esta siempre presente en cada paso que he dado, brindándome su apoyo incondicional.

A la directora del proyecto y tutora, Ing. Duchicela Jéssica Ph.D., por su financiamiento a través del proyecto “Biodegradación de contaminantes derivados de municiones por inóculos nativos de micorriza”, y por permitirme formar parte de su equipo de trabajo.

Al Ing. Francisco Flores Ph.D., por su tiempo y conocimiento, los cuales fueron fundamentales para realizar el trabajo de titulación. Del mismo modo, agradezco a la Lcda. Silvana Granda, por su apoyo.

A mis amigos, Liliana J., Odalis P., Fátima G., Grace S., Klever H., Dayan M., Damián C. y Andrea P. por su constante cariño, paciencia y apoyo a lo largo de mi trayectoria. Especialmente, deseo destacar a Fernanda Moya, cuyo apoyo incondicional durante toda la carrera ha sido verdaderamente invaluable. Y Grace Suntaxi, quien ha demostrado ser una amiga inquebrantable, presente en los momentos buenos y malos, brindándome su apoyo, gratitud y afecto de manera inigualable.

Índice de Contenido

Resultados de verificación de similitud	2
Certificación	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de Publicación	5
Resumen	15
Abstract	16
Capítulo I: introducción	17
Planteamiento del problema	17
Justificación del problema	18
Objetivo General	19
Objetivos específicos	19
Hipótesis	20
Alcance	20
Capítulo II: Marco teórico	20
Municiones y explosivos	20
Definición	20
Clasificación de municiones	21
Municiones y explosivos en Ecuador	22
Formas de disposición para eliminar las municiones	23
Detonación a cielo abierto	23
Incineración a cielo abierto o deflagración	24
Contaminación con compuestos derivados de municiones	24
Hongos degradadores de contaminantes derivados de municiones	28
Diferencia entre microbioma, microbiota y metagenoma	30
Generalidades	30

Microbioma endófito	31
Metagenómica y Metabarcoding	32
Metagenómica	32
Metabarcoding	32
Genes utilizados en el metabarcoding de hongos	33
Extracción de ADN	34
Secuenciación de alto rendimiento	35
Illumina	37
Análisis bioinformático	39
Pipeline	40
Diversidad alfa y beta	41
Análisis estadístico	42
Perfiles taxonómicos	43
Definición	43
Importancia de los perfiles taxonómicos de hongos	44
Capítulo III: Metodología	44
Caracterización de la zona geográfica	45
Muestreo	46
Procesamiento de muestras	47
Extracción de ADN total	49
Evaluación de la calidad de ADN total obtenido	50
Secuenciación de alto rendimiento	51
Pipeline bioinformático	51
Análisis de calidad de las secuencias y procesamiento de datos	51
Asignación taxonómica	52
Análisis exploratorio del microbioma	52

	10
Análisis de diversidad	53
Análisis estadístico	53
Capítulo IV: Resultados	53
Extracción de ADN total	53
Secuenciación de alto rendimiento	55
Control de calidad	55
Preparación de librerías	56
Secuenciación de alto rendimiento	56
Pipeline Bioinformático	57
Análisis de calidad de las secuencias y procesamiento de datos	57
Asignación taxonómica	60
ASVs con abundancia diferencial	66
Análisis de diversidad	66
Diversidad Alfa	66
Diversidad Beta	68
Análisis estadístico	70
Capítulo V: Discusión	72
Capítulo VI: Conclusiones	77
Capítulo VII: Recomendaciones	78
Bibliografía	79
Apéndices	94

Índice de tablas

Tabla 1 Aislados de hongos degradadores de TNT	29
Tabla 2 Codificación de las muestras según su tratamiento	48
Tabla 3 Cebadores utilizados para la amplificación de la región ITS	51
Tabla 4 Cuantificación y pureza de las muestras de ADN obtenidas	54
Tabla 5 Control de calidad	55
Tabla 6 Control de calidad de preparación de librerías	56
Tabla 7 Análisis de resultados de la secuenciación	56
Tabla 8 Lecturas obtenidas en el procesamiento de datos de la región ITS	59
Tabla 9 Análisis de permutación de varianzas (PERMANOVA)	71

Índice de figuras

Figura 1 Componentes de una munición	21
Figura 2 Distribución de municiones y explosivos en suelos de todo el mundo	22
Figura 3 Estructura de los contaminantes más frecuentes en el suelo	25
Figura 4 Diagrama del destino de compuestos derivados de municiones en plantas	26
Figura 5 Diferencias entre microbiota, microbioma y metagenoma	31
Figura 6 Esquema de regiones del gen ITS	34
Figura 7 Flujo de trabajo NGS desde el análisis de muestras hasta secuenciar	36
Figura 8 Flujo de trabajo de Illumina	39
Figura 9 Flujo de trabajo	45
Figura 10 Esquema de la toma de muestra en los tratamientos de predetonación y remanente	47
Figura 11 Procesamiento de muestra	49
Figura 12 Esquema de la extracción de ADN mediante el kit FastDNATM SPIN	50
Figura 13 Visualización del gel de electroforesis	54
Figura 14 Perfiles de calidad de las lecturas directas	57
Figura 15 Tasa de error estimada	59
Figura 16 Asignación taxonómica de hongos (Reino) en función de la abundancia	61
Figura 17 Asignación taxonómica de hongos (filo) en función de la abundancia	62
Figura 18 Asignación taxonómica de hongos (Género) en función de la abundancia	62
Figura 19 Mapa de calor respecto a la abundancia clasificada por filo de la región ITS ..	63
Figura 20 Mapa de calor respecto a la abundancia clasificada por filo de la región ITS ..	64
Figura 21 Árbol de calor fúngico	65
Figura 22 ASV fúngico con abundancia diferencial máxima en los tres tratamientos	66
Figura 23 Curva de rarefacción de las secuencias ITS	67
Figura 24 Índices de diversidad alfa para los ASVs obtenidos a partir de la región ITS ...	68

Figura 25 Análisis de coordenadas principales (PCoA) Bray Curtis distance	69
Figura 26 Análisis de coordenadas principales (PCoA) UniFrac Weighted distance	69
Figura 27 Mapas de calor tipo 1 en función de la abundancia de ASVs	71

Lista de abreviaturas

TNT: 2,4,6-trinitrotolueno

DNT: 4-dinitrotolueno

RDX: 1,3,5-trinitro-1,3,5-triazaciclohexano

HMX: Octahidro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocina

Pb: Plomo

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNr: Ácido Desoxirribonucleico Ribosomal

ARN: Ácido Ribonucleico

HTS: High Throughput Sequencing

PCR: Polymerase Chain Reaction

ITS: Internal Transcribed Spacer

OTU: Operational Taxonomic Units

ASV: Amplicon Sequence Variant

DADA2: Divisive Amplicon Denoising Algorithm

pb: pares de bases

PERMANOVA: Permutational Multivariate Analysis of Variance

PCoa: Principal Coordinates Analysis

Resumen

Los compuestos derivados de municiones, como el plomo (Pb), 4-dinitrotolueno (DNT), 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), 1,3,5-trinitro-1,3,5-triazaciclohexano (RDX) y octahidro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocina (HMX), representan un desafío ambiental significativo debido a su toxicidad y persistencia en el medio ambiente. Los actuales métodos de remediación son costosos y requieren demasiado tiempo, por ello ha generado un interés creciente en la identificación y utilización de microbiomas ambientales, incluidos los hongos capaces de tolerar y en algunos casos degradar estos contaminantes. En este contexto, el objetivo del presente proyecto de investigación fue comparar perfiles taxonómicos de hongos presentes en raíces de plantas de sitios contaminados y no contaminados con compuestos derivados de municiones. La metodología incluyó la recolección de la muestra en tres zonas: remanente o control, deflagración o fosa y predetonación o cielo abierto, seguido de la extracción de ADN total, secuenciación de amplicones de la región ITS, análisis bioinformático mediante el paquete DADA2 de R y análisis comparativo PERMANOVA basado en las distancias métricas UniFrac y Bray-Curtis. Los resultados indicaron que existe una gran diferencia entre la comparación de perfiles taxonómicos de hongos presentes en raíces de plantas en suelos contaminados (deflagración y predetonación) y no contaminados (remanente), obteniendo que el filo *Ascomycota* se encuentran con mayor porcentaje de diversidad en suelos contaminados, además algunos géneros de hongos cuya abundancia aumenta en condiciones de contaminación se identificaron a *Fusarium*, *Paraphoma*, *Geumannomyces*.

Palabras clave: municiones, perfiles taxonómicos fúngicos, Illumina Miseq.

Abstract

Ammunition-derived compounds, such as lead (Pb), 4-dinitrotoluene (DNT), 2,4,6-trinitrotoluene (TNT), 1,3,5-trinitro-1,3,5-triazacyclohexane (RDX) and octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX), represent a significant environmental challenge due to their toxicity and persistence in the environment. Current remediation methods are costly and time-consuming, which has led to a growing interest in the identification and utilization of environmental microbiomes, including fungi capable of tolerating and in some cases degrading these contaminants. In this context, the objective of the present research project was to compare taxonomic profiles of fungi present in plant roots from sites contaminated and uncontaminated with munitions-derived compounds. The methodology included sample collection in three zones: remnant or control, deflagration or pit and predetonation or open sky, followed by total DNA extraction, sequencing of amplicons of the ITS region, bioinformatics analysis using the DADA2 package of R and PERMANOVA comparative analysis based on UniFrac and Bray-Curtis metric distances. The results indicated that there is a great difference between the comparison of taxonomic profiles of fungi present in plant roots in contaminated soils (deflagration and predetonation) and non-contaminated (remnant), obtaining that the phylum *Ascomycota* are found with a higher percentage of diversity in contaminated soil, in addition to some genera of fungi whose abundance increases in contaminated conditions were identified *Fusarium*, *Paraphoma*, *Geumannomyces*.

Key words: munitions, fungal taxonomic profiles, Illumina Miseq.

Capítulo I: introducción

Planteamiento del problema

Los compuestos químicos, empleados en la fabricación de municiones y explosivos, tales como, plomo (Pb), 4-dinitrotolueno (DNT), 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) y 1,3,5-trinitro-1,3,5-triazaciclohexano (RDX) y octahidro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocina (HMX), son conocidos por su presencia en los suelos de los campos de entrenamiento militar y sitios de eliminación de explosivos y municiones. Estos compuestos se consideran contaminantes y plantean un desafío particular en el medio ambiente y la salud humana debido a su toxicidad y persistencia (Broomandi et al., 2020b; Funk et al., 1993).

La contaminación de suelos por sustancias químicas peligrosas y tóxicas, particularmente residuos de explosivos, se ha identificado como uno de los principales desafíos ambientales en el mundo industrializado (Boopathy, 2000). Varios estudios enfatizan que existen muchos sitios contaminados por compuestos derivados de municiones alrededor del mundo, especialmente la contaminación se centra en Estados Unidos y Canadá, atribuible a las actividades militares ocurridas durante la Primera y Segunda Guerra Mundial, así como la presencia de amplias zonas de entrenamiento militar (Broomandi et al., 2020a).

En Ecuador, el Comando Conjunto de las Fuerzas Armadas es el responsable de la protección y seguridad en el almacenamiento y manejo de municiones y explosivos. Estos materiales se encuentran almacenados en cuatro depósitos: Depósito Conjunto de municiones “El Corazón” ubicado en Pichincha, cantón Mejía; “Jaramijó” ubicado en Manabí, cantón Jaramijó; “Sur” ubicado en Loja, cantón Saraguro; “Taura” ubicado Guayas, cantón Naranjal y “Amazonas” ubicado en Orellana (Comando Conjunto de las Fuerzas Armadas, 2010). Estos depósitos cuentan con diferentes metodologías para la eliminación de municiones. Por ejemplo, el Depósito Conjunto de Municiones “El Corazón”, utiliza dos métodos principales: detonación y deflagración a cielo abierto, ambos destinados en sitios específicos dentro del depósito. Sin embargo, debido a la naturaleza de estas actividades, los sitios de eliminación pueden verse

afectados por la contaminación con productos derivados de las municiones, convirtiéndose así en puntos críticos que requieren una atención debido a la contaminación que se genera.

Anteriormente, y posiblemente aún en la actualidad, algunas personas recurren al uso de vertederos, incineración y oxidación avanzada para tratar la contaminación derivada de municiones. Sin embargo, estos métodos están cayendo en desuso debido a su alto costo y al tiempo prolongado que requieren para su implementación (X. Yang et al., 2023) Dada la situación, varios estudios se han enfocado en buscar microorganismos potenciales que pueden proporcionar información sobre la degradación de estos contaminantes.

Los avances de estos estudios han sido gracias al análisis de metabarcoding, debido a que esta técnica permite identificar y comprender la diversidad microbiana presente en una muestra (Rosa et al., 2020). En sí, el metabarcoding se basa en el estudio de microorganismos presentes en una muestra a partir de la extracción y análisis de su ADN. Además, varias investigaciones han demostrado que ha pedido identificar taxones que resultaban difíciles de detectar con método convencional (Tedersoo et al., 2022).

El metabarcoding utiliza marcadores genéticos para evaluar la biodiversidad, como el Espaciador Transcrito Interno (ITS) en hongos, que es altamente variable entre especies (Aranguren et al., 2023). Estos estudios representan una herramienta útil para la identificación taxonómica de hongos y su capacidad para tolerar y, en algunos casos, degradar compuestos contaminantes (Pathak et al., 2020; Vecherskii et al., 2021).

Justificación del problema

La contaminación de suelos debido a la presencia de compuestos derivados de municiones y explosivos presenta un desafío ambiental significativo, ya que estos contaminantes pueden persistir en los suelos durante largos periodos de tiempo, causando impactos negativos a su calidad (Fayiga & Saha, 2016).

Estudios anteriores han revelado una estrecha relación entre la riqueza taxonómica de los hongos y el proceso de descomposición, lo que los convierte en indicadores sensibles de

los cambios ambientales. Además, los hongos poseen características peculiares, como su capacidad para colonizar rápidamente el suelo, tolerar altas concentraciones de toxinas, secretar enzimas extracelulares y penetrar profundamente el micelio en el suelo. Estas características los pueden posicionar como posibles candidatos para la biorremediación de suelos contaminados con compuestos persistentes (Khatoon et al., 2020).

Por lo tanto, el presente proyecto de investigación surge de la necesidad de identificar la biodiversidad de los hongos que residen en las raíces de las plantas que crecen tanto en suelos no contaminados como en suelos contaminados con compuestos derivados de municiones y explosivos. El propósito principal es comparar los perfiles taxonómicos basados en la abundancia de hongos en las raíces de plantas que crecen en suelos contaminados con compuestos derivados de municiones en el Conjunto de Municiones “El Corazón”, ubicado en el Cantón Mejía, Provincia de Pichincha.

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 en sitios contaminados y no contaminados con compuestos derivados de municiones en el Depósito Conjunto de Municiones “El Corazón”.
- Secuenciar masivamente en 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 secuenciación del amplicón de la región ITS generados a partir de la secuenciación de alto rendimiento utilizando herramientas bioinformáticas.

Hipótesis

Existe diferencia significativa en los perfiles taxonómicos de hongos que se encuentran en las raíces de plantas presentes en sitios contaminados y no contaminados con compuestos derivados de municiones.

Alcance

Este proyecto de investigación se centrará en comparar los perfiles taxonómicos de hongos que residen en las raíces de plantas, específicamente en sitios contaminados y no contaminados con compuestos derivados de municiones. Se realizará un análisis exhaustivo de la diversidad y abundancia fúngica utilizando datos del proceso de metabarcoding bajo tres tratamientos: suelo no contaminado o remanente, suelo contaminado o deflagración y cielo abierto o predetonación. Sin embargo, es importante destacar que este estudio no implicará la evaluación directa de los efectos de la contaminación en la salud de las plantas ni en la biodisponibilidad de los contaminantes en el suelo. El enfoque estará específicamente dirigido a la caracterización taxonómica de los hongos asociados a raíces.

Capítulo II: Marco teórico

Municiones y explosivos

Definición

La definición de municiones incluye a cualquier dispositivo o elemento diseñado para generar una fuerza destructiva, siendo expulsado mediante un artefacto, como las armas de fuego. A lo largo del tiempo, esta definición ha evolucionado, dando lugar a una variedad de componentes, que incluyen cartuchos, balas, proyectiles, cascos de cartuchos, vainas, carga propulsora, entre otros (Albright, 2012). Además, la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU.

(2005) , amplía este concepto para incluir una gama más extensa de dispositivos, como: explosivos, pirotecnia, cohetes, misiles guiados, bombas, granadas, minas y torpedos.

Generalmente, una munición consta de cuatro componentes básicos: proyectil, pistón, pólvora y vaina (Figura 1) (Ghahremannezhad et al., 2022).

Figura 1

Componentes de una munición



Nota. Adaptado de *Ammunition Component Classification Using Deep Learning*, por Ghahremannezhad et al. (2022).

Por otro lado, un explosivo es cualquier sustancia o mezcla de sustancias que, al ser expuestas al calor, fricción o impacto, pueden detonar o descomponerse rápidamente. Esta liberación instantánea de gases a una temperatura, presión y velocidad lo suficientemente elevadas para provocar daños en el entorno (Lima et al., 2011; US Environmental Protection Agency, 2005). Los explosivos que causan mayor daño suelen tener una estructura alifática o aromática con grupos nitro sustituidos (Kent, 1942).

Clasificación de municiones

Se pueden clasificar según su velocidad de detonación:

Municiones de baja velocidad: Se asemejan a los propulsores y comprenden sustancias como: pólvora negra y pólvora sin humo. A diferencia de los explosivos tradicionales, que detonan de forma violenta, este tipo de municiones reaccionan de forma lenta. Sin embargo, su combustión es gradual, es decir, arden rápidamente en el lugar de detonación.

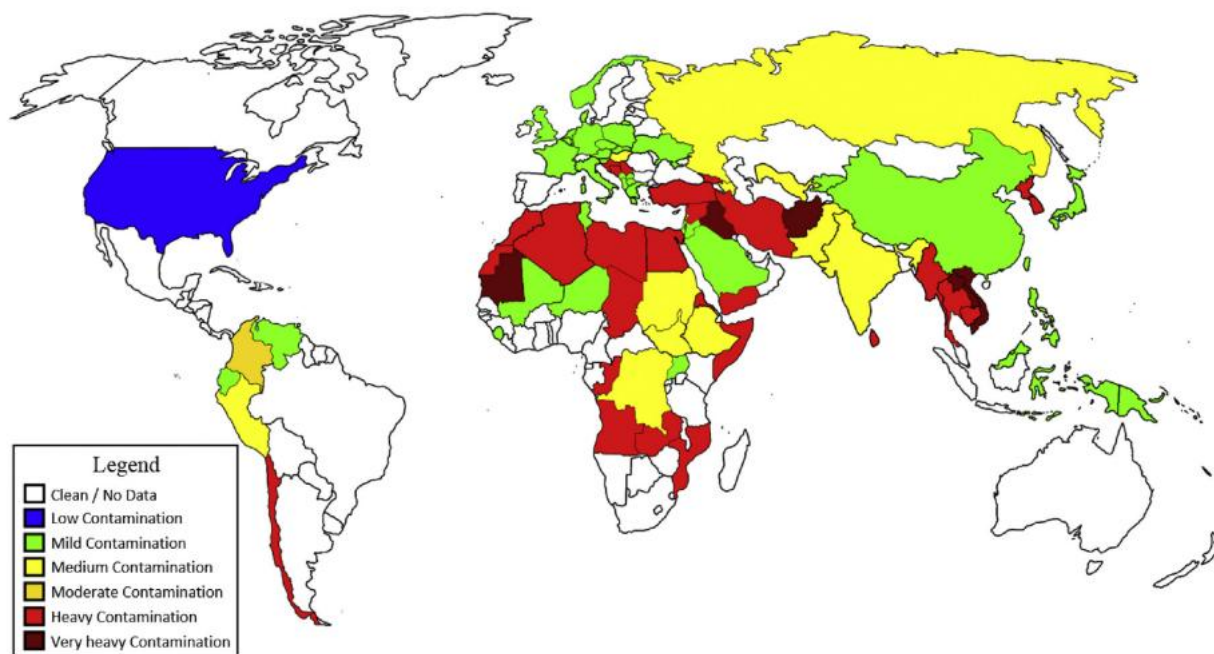
Municiones de alta velocidad: Estas producen presiones sumamente elevadas debido a su rápida detonación. Se consideran más estables y su detonación se produce al superar su energía de activación mediante un impacto. En este grupo se encuentran los ésteres alifáticos de nitrato, nitraminas y nitroaromáticos. Algunos ejemplos de estos son el TNT y RDX (Vučićević et al., 2022).

Municiones y explosivos en Ecuador

Los explosivos y municiones se emplean en diversos sectores, incluidos los civiles, industriales y militares. Siendo este último el principal impulsor de la demanda de estos productos (Via & Zinnert, 2016). La distribución global de los compuestos derivados de municiones y explosivos se ilustra en la figura 2, que muestra cómo están distribuidas las municiones en todo el mundo. En el caso de Ecuador, al igual que en muchos otros países, existe la posibilidad de enfrentar problemas de contaminación debido al uso actual o pasado de explosivos. Esta contaminación puede estar relacionada con actividades militares en curso o con los restos de conflictos armados anteriores, como la Guerra del 41 entre Ecuador y Perú.

Figura 2

Distribución de municiones y explosivos en suelos de todo el mundo



Nota. El gráfico presenta la contaminación de suelos por municiones y explosivos en todo el mundo. Ecuador se encuentra en una contaminación leve (color verde), Tomado de *Impacts of explosive compounds on vegetation: A need for community scale investigations*, por Via y Zinnert. (2016).

Formas de disposición para eliminar las municiones

Detonación a cielo abierto

La detonación a cielo abierto es un procedimiento químico utilizado para eliminar municiones inservibles, obsoletas o desechos. Este procedimiento se lleva a cabo un área designada al aire libre, donde se coloca una carga detonante que ayuda a iniciar la explosión de las municiones a denotar. La detonación avanza a un ritmo uniforme para destruir todo sin dejar objetos sin detonar. Este método es efectivo y seguro para eliminar grandes cantidades de municiones (Karin Alverbro et al., 2011; US Environmental Protection Agency, 2005).

Es fundamental considerar la seguridad al implementar este proceso. Por lo tanto, la zona de detonación debe estar ubicada alejada de zonas pobladas para minimizar el impacto

del ruido y que las fragmentaciones se limiten al sitio. Sin embargo, no requiere infraestructura, ni equipos sofisticados (K. Alverbro et al., 2009). La destrucción se lleva a cabo sin control de la contaminación, lo que resulta la dispersión de productos de desecho como sustancias tóxicas, gases de combustión y gases de efecto invernadero, en el medio ambiente (Karin Alverbro et al., 2011; Vučićević et al., 2022).

Incineración a cielo abierto o deflagración

La incineración de municiones es un proceso de combustión, como su nombre mismo lo dice, implica la incineración a altas temperaturas en suelo al descubierto. Se puede emplear para eliminar municiones de pequeño calibre, propulsores sobrantes y explosivos no confinados. Sin embargo, al utilizar esta técnica, es preferible incinerar cantidades pequeñas, debido a que la combustión de explosivos puede convertirse en una detonación completa (Organization for Security and Co-operation in Europe, 2008; Vučićević et al., 2022).

Una de las desventajas de este método es su potencial para generar contaminación atmosférica. No obstante, si las temperaturas superan los 850° C, se descomponen todos los compuestos orgánicos volátiles. Para aumentar el calor del proceso, se puede utilizar ciertas cargas de termita (Cho et al., 2020).

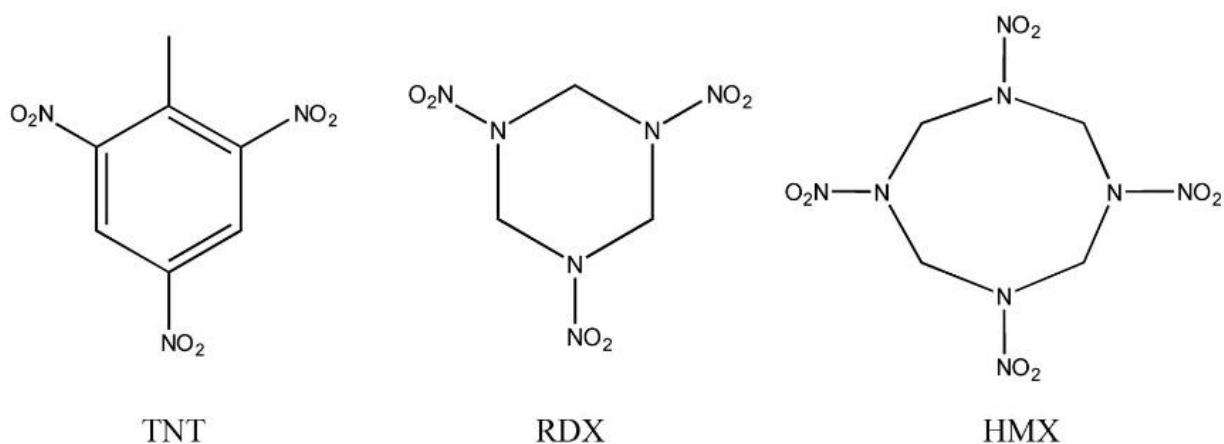
Contaminación con compuestos derivados de municiones

El plomo (Pb) es una de las sustancias inorgánicas comúnmente utilizadas en la fabricación de municiones (Green & Pain, 2019) junto con TNT, HMX y RDX, debido a sus propiedades térmicamente estables con alta densidad, alto calor de detonación y velocidad de detonación significativas (Figura 3). Además, otras sustancias presentes incluyen DNAN (2,4-dinitroanisol), U (uranio) y DNT (2,4-dinitrotolueno) (Khan et al., 2021; Srivastava et al., 2022). Muchas de estas sustancias no son biodegradables y son compuestos antropogénicos que no se encuentran naturalmente en el medio ambiente, siendo denominados xenobióticos debido a su resistencia a la degradación por parte de la microflora y fauna autóctona. Estos compuestos ingresan al ambiente del suelo a través de diversas fuentes, como pruebas de municiones,

entrenamiento militar, actividades de desmilitarización, minado, detonación, instalaciones de eliminación y destrucción de municiones, como fosas de quemado, cielo abierto e incineradores, y, crucialmente, en las etapas de producción, embalaje y almacenamiento de municiones (Adenipekun & Lawal, 2012; H. Zhang et al., 2023).

Figura 3

Estructura de los contaminantes más frecuentes en el suelo



Nota. Sustancias inorgánicas que con más frecuencia se encuentran en municiones: TNT, RDX y HMX. Tomado de *Soils contaminated with explosives*, por Kalderis et al. (2011).

Durante la fase de eliminación o destrucción de municiones, se desencadena una reacción de combustión que conduce a la oxidación de las sustancias al entrar en contacto con el aire, lo que las vuelve disponibles para la absorción en el suelo (Lima et al., 2011). Con el paso del tiempo, estas sustancias experimentan transformaciones a través de procesos como la fotólisis, hidrólisis, reducción y biodegradación, lo que da lugar a la formación de compuestos como nitrocompuestos aromáticos, ésteres de nitratos, nitraminas y sustancias oxidantes como nitratos, cloratos, percloratos y bromatos (Petrea et al., 2018).

Especialmente, la contaminación derivada de la liberación de sustancias como RDX, TNT y HMX ha suscitado una creciente preocupación, ya que numerosos estudios han documentado su toxicidad y los han clasificado como posibles carcinógenos, además de que

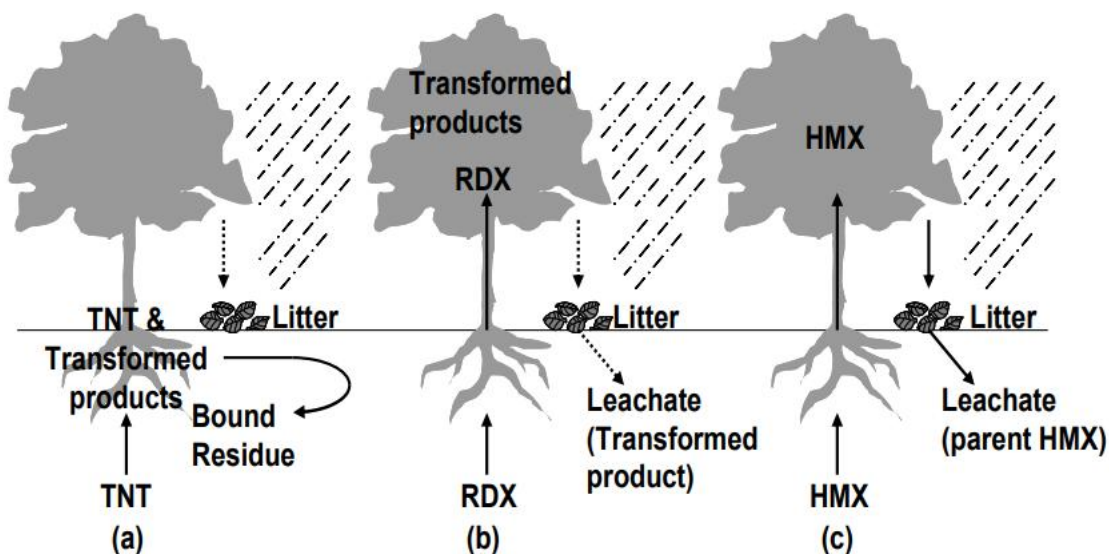
en algunos casos pueden ocasionar efectos adversos en plantas, invertebrados, animales y ecosistemas completos (Kalderis et al., 2011; Sharma et al., 2023). Los suelos contaminados se convierten en una fuente directa de contaminación para aguas superficiales, aguas subterráneas y el aire, dado que interactúan con las capas superiores del suelo que contienen estas sustancias y el agua de lluvia (Broomandi et al., 2020a; Lima et al., 2011).

Un aspecto crítico del TNT, HMX y RDX es su capacidad para adherirse a la parte orgánica del suelo, lo que genera una contaminación persistente con consecuencias significativas para el medio ambiente (Albright, 2012). Por otra parte, cuando el TNT está presente en el suelo, es propenso a la lixiviación, lo que conduce a la formación de productos de degradación como el DNT, el cual posee una toxicidad superior al TNT en sí mismo. Es importante señalar que cuando el TNT es absorbido por las plantas, tiende a acumularse en las raíces debido a su baja solubilidad acuosa, lo que resulta en una migración lenta, pero una fuerte unión a la materia orgánica (Cottrell & Dupuy, 2021; X. Yang et al., 2022).

Del mismo modo, el HMX y RDX también pueden representar graves amenazas ambientales. A pesar de su presencia en bajas concentraciones, su alta solubilidad acuosa y movilidad en el suelo los hacen más fácilmente disponibles. Por lo tanto, la contaminación por RDX puede extenderse más profundamente en el suelo y tiene una mayor capacidad para filtrarse en fuentes de agua potable. En las plantas, el HMX y RDX son conocidos por su capacidad para trasladarse dentro de la planta y, por lo tanto, pueden acumularse en varias partes de la misma, como se ilustra en la figura 2 (Kiiskila et al., 2015; Rylott & Bruce, 2019; Srivastava et al., 2022).

Figura 4

Diagrama del destino de compuestos derivados de municiones en plantas



Nota. Tomado de *Identification of Metabolic Routes and Catabolic Enzymes Involved in Phytoremediation of the Nitro-Substituted Explosives TNT, RDX, and HMX*, por Schnoor et al. (2006).

El impacto adverso de los explosivos en el medio ambiente, así como en los organismos vivos y su baja capacidad de biodegradación, resaltan la importancia de la remediación del suelo contaminado. Si bien los métodos convencionales de remediación, como los vertederos, la incineración y la oxidación avanzada, han sido ampliamente utilizados para este tipo de contaminantes, suelen ser costosos y requieren mucho tiempo (Panz & Miksch, 2012; Vecherskii et al., 2021). Se está explorando activamente métodos biológicos debido a su menor costo y su mayor aceptabilidad ambiental. Específicamente, se busca identificar microorganismos o plantas potenciales que puedan contribuir a la limpieza del medio ambiente mediante la conversión eficiente de contaminantes tóxicos y persistentes en productos ambientalmente benignos. Los agentes biológicos, ya sean animales, plantas, hongos, bacterias u otros, ya sea natural, adaptados o modificados, poseen una gran capacidad bioquímica para ayudar a eliminar o transformar los contaminantes ambientales (Geris et al., 2024; Panz & Miksch, 2012).

Hongos degradadores de contaminantes derivados de municiones

Los hongos representan el reino más extenso de organismos superiores en el planeta, siendo organismos eucariotas con estructuras celulares completas capaces de formar tejidos y órganos. Este reino constituye una parte diversa del árbol de la vida, ubicado dentro del dominio Eukarya. Sin embargo, la clasificación taxonómica de los hongos es un tema complejo y continuamente evolutivo. Dentro de este grupo diverso de organismos, se destacan varios filos, incluyendo: *Ascomycota*, *Basidiobolomycota*, *Zygomycota*, *Basidiomycota*, *Blastocladiomycota*, *Chytridiomycota*, *Glomeromycota*, *Monoblepharomycota*, *Mortierellomycota*, *Mucoromycota* y *Entomophthoromycota* (Wijayawardene et al., 2020).

La mayoría de los hongos están asociados con el suelo, las plantas y los animales. Son reconocidos como los principales descomponedores de materia orgánica e inorgánica gracias a su amplia diversidad de características morfológicas, fisiológicas y metabólicas, que participan en los procesos de descomposición (Geris et al., 2024). Además, sus poblaciones son genéticamente estables y se adaptan bien a las fluctuaciones físicas y químicas, incluyendo el pH, la temperatura, el potencial redox y la presencia de xenobióticos. A diferencia de otros organismos, los hongos son predominantemente encontrados en el suelo y poseen una maquinaria enzimática única, tanto extracelular como intracelular. Esta capacidad les permite descomponer y metabolizar una amplia variedad de compuestos, incluyendo contaminantes orgánicos e inorgánicos (Magnoli et al., 2023; Wijayawardene et al., 2020).

A pesar de la amplia diversidad de hongos en el planeta, no todos poseen la capacidad de degradar contaminantes tóxicos. Entre los hongos más estudiados para este propósito se encuentran los hongos de pudrición blanca, como *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* y *Pleurotus sp.*, los cuales son agentes clave en la biodegradación de la lignina en la madera debido a su maquinaria enzimática versátil. La capacidad intrínseca de estos hongos de pudrición blanca para descomponer la lignina sugiere que tienen un potencial significativo

para la descontaminación biológica de sustancias químicas tóxicas peligrosas, mediante la acción de diversas enzimas ligninolíticas (Geris et al., 2024).

Por otro lado, los hongos que tienen la capacidad de degradar compuestos explosivos como TNT, HMX y RDX, además los grupos nitro facilitan el ataque a la estructura aromática. Los hongos producen enzimas como oxidorreductasas que son altamente reactivas y capaces de romper la estructura aromática (Anasonye et al., 2015; N. Chakraborty et al., 2022). Este fenómeno es de gran interés en la biorremediación de sitios contaminados, ya que los hongos pueden descomponer estas sustancias de manera efectiva.

Tabla 1

Aislados de hongos degradadores de TNT

Microorganismo	Vía Metabólica
<i>Cladosporium resinae</i>	Reduce TNT a metabolitos no mineralizados
<i>Cunninghamella echinulata</i>	Reduce TNT
<i>Fusarium oxysporum</i>	Transforma TNT, pero solo en cultivos líquidos
<i>Irpex lacteus</i>	Mineraliza el TNT
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Reduce TNT
<i>Phlebia radiata</i>	Transforma TNT y reduce los metabolitos
<i>Stropharia rugosoannulata</i>	Mineraliza reduciendo DNT
<i>Zygomycota</i>	Alta tolerancia al TNT
<i>Acremonium, Cyllindrocarpon,</i> <i>Gliocladium y Trichoderma</i>	Toleran TNT

Nota. Adaptado de *Counterbalancing common explosive pollutants (TNT, RDX and HMX) in the environment by microbial degradation*, por Chakraborty et al. (2022).

Además, las condiciones del estilo de vida, su gran potencial de crecimiento, la alta producción de biomasa y extenso alcance de las hifas en el medio ambiente definen su capacidad de degradación (Anasonye et al., 2015).

Diferencia entre microbioma, microbiota y metagenoma

Generalidades

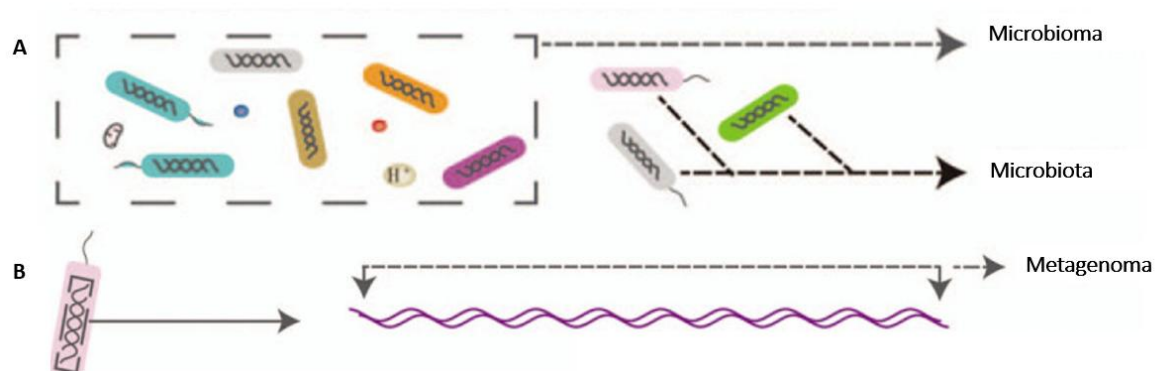
La microbiota se define comúnmente como la población de microorganismos vivos presentes en un entorno específico, como el suelo, el agua o el intestino humano, entre otros. Esta comunidad está formada por una diversidad de microorganismos, que incluyen bacterias, arqueas y eucariotas. Sin embargo, no se consideran parte de la microbiota los fagos, virus, plásmidos, priones, viroides y ADN libre, ya que no cumplen con los criterios para ser clasificados como microorganismos vivos (Marchesi & Ravel, 2015).

El metagenoma se refiere a la totalidad de los genomas y genes presentes en los miembros de una microbiota. Esta recopilación se obtiene típicamente mediante la secuenciación del ADN extraído de una muestra, seguida de un proceso de ensamblaje o mapeo utilizando una base de datos. (Malard et al., 2021; Marchesi & Ravel, 2015; Qian et al., 2020).

En contraste, el microbioma se refiere a la comunidad de microorganismos que coexisten y se interrelacionan en un entorno específico. Este término engloba no solo a los propios microorganismos, sino también a sus genomas, genes, productos genéticos, condiciones ambientales y las interacciones que se producen entre ellos, como el intercambio de metabolitos y elementos nucleicos, lo que a menudo se describe como un "teatro de actividad" (Berg et al., 2020; Marchesi & Ravel, 2015).

Figura 5

Diferencias entre microbiota, microbioma y metagenoma



Nota: El gráfico representa a la microbiota y microbioma (A) y metagenoma (B). Adaptado de “A guide to human microbiome research: study design, sample collection, and bioinformatics analysis”, por Qian et al. (2020).

Microbioma endófito

Las plantas albergan una amplia gama de microorganismos, entre los cuales solo una pequeña proporción es considerada patógena, mientras que la mayoría desempeña funciones beneficiosas para la salud y el desarrollo de la planta (Brader et al., 2017). Los endófitos constituyen un grupo diverso de microorganismos que residen dentro de los tejidos vegetales durante todo o parte de su ciclo de vida. Estos establecen una relación simbiótica mutuamente beneficiosa con la planta, ya que, a menudo, contrarrestan los efectos adversos y coexisten con patógenos (Fagorzi & Mengoni, 2022).

Anteriormente, el término "endófito" se utilizaba exclusivamente para referirse a hongos que residían dentro de las plantas. Sin embargo, diversas investigaciones han revelado que las plantas también pueden ser colonizadas por bacterias (Fagorzi & Mengoni, 2022; Hardoim et al., 2015).

Los endófitos conforman una comunidad microbiana versátil y altamente diversa, proporcionando valiosos recursos a la planta huésped y desempeñando un papel fundamental

en la mitigación del estrés biótico y abiótico (Microbiology et al., 2022). Los mecanismos de protección empleados por los hongos endófitos son variados, ya que pueden antagonizar directamente contra plagas o patógenos, activar los mecanismos de defensa de la planta o incluso llevar a cabo ambas acciones simultáneamente. Esta capacidad de los endófitos para proteger a la planta huésped es esencial para su supervivencia y salud en entornos desafiantes (Schouten, 2019).

Estudios han demostrado que casi todas las plantas albergan hongos endófitos, incluyendo aquellas que crecen en regiones árticas, desiertos, océanos y selvas tropicales (Jin et al., 2021)

Metagenómica y Metabarcoding

Metagenómica

La Metagenómica es un campo de investigación que se centra en el análisis de una colección de material genético recuperado directamente de una comunidad mixta de microorganismos. Este enfoque estudia la composición genómica de un organismo completo, incluyendo cada uno de los microbios presentes en su interior, sin la necesidad de identificación o amplificación individual previa (Liebl, 2011). La metodología metagenómica implica la secuenciación y análisis del ADN total extraído, abarcando así el ADN de todos los organismos presentes, tanto conocidos como desconocidos. Uno de los principales objetivos de la metagenómica es caracterizar la diversidad taxonómica de la comunidad microbiana en muestras de suelo, agua, piel humana, entre otros, con el fin de comprender su diversidad genética y funcional en profundidad (L. Zhang et al., 2021).

Metabarcoding

Metabarcoding es una técnica utilizada para identificar y cuantificar muestras ambientales complejas mediante el análisis de secuencias de ADN con genes específicos, conocidos como “barcodes” o “códigos de barra” mediante la reacción en cadena de la

polimerasa (PCR) y la secuenciación de alto rendimiento (HTS), sin la necesidad de experiencia taxonómica sobre el lugar de muestreo (Lamb et al., 2019).

El metabarcoding permite la evaluación de la biodiversidad mediante la amplificación y secuenciación de marcadores genéticos de múltiples especies presentes en una muestra, proporcionando una visión detallada de la composición taxonómica de la comunidad microbiana o biológica estudiada (Compson et al., 2020). Una de las ventajas del metabarcoding es que la gran cantidad de datos obtenidos de la secuenciación de ADN mediante HTS permite la asignación rápida de taxonomía a muchas especies presentes en una muestra (M. Liu et al., 2020).

Genes utilizados en el metabarcoding de hongos

Los marcadores genéticos empleados en la exploración de la diversidad fúngica comprenden el ITS (Espaciador Transcrito Interno), LSU (Subunidad Grande del ARN ribosomal) y SSU (Subunidad Corta del ARN ribosomal). Estos elementos genéticos desempeñan un papel crucial en la identificación y clasificación de hongos presentes en muestras biológicas y del entorno.

El ITS, situado entre los genes 18S y 28S del ARNr y separado por el gen 5.8S del ARNr, se divide en dos subregiones, ITS-1 e ITS-2, con una notable diversidad genética entre especies fúngicas. Esta variabilidad lo convierte en un marcador de elección en la investigación de diversidad fúngica, permitiendo una identificación precisa hasta el nivel de especie. Su amplio uso se sustenta en la disponibilidad de secuencias de referencia y la capacidad para diseñar cebadores específicos, lo que facilita su aplicación en la identificación de hongos en diversos ambientes (Aranguren et al., 2023). Además, la presencia de múltiples copias repetidas de ITS en el genoma haploide amplía su utilidad, permitiendo su detección incluso en muestras biológicas de baja cantidad (Xu, 2016).

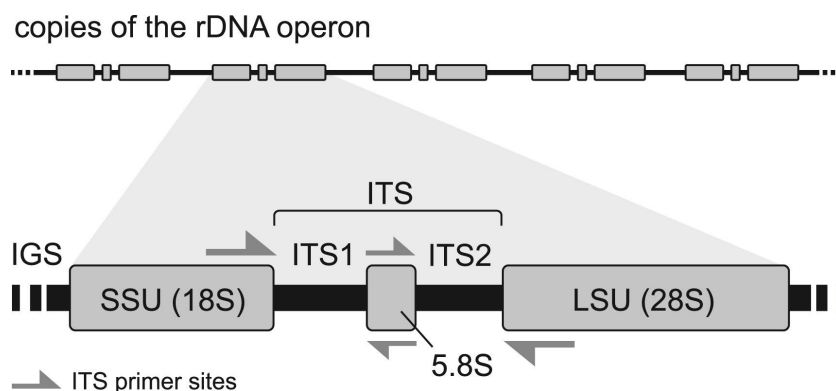
Por otro lado, el gen LSU, correspondiente al gen 28S del ARNr, se caracteriza por ser una región más conservada en comparación con ITS. Aunque menos variable, el LSU ofrece

información taxonómica relevante a niveles superiores, como género y familia, complementando así los datos obtenidos mediante ITS en análisis taxonómicos más amplios y en la elaboración de árboles filogenéticos (Brown et al., 2014).

El gen SSU, también conocido como gen 18S, es la región más conservada entre los tres mencionados. Aunque menos utilizado en estudios de diversidad fúngica en comparación con ITS y LSU, el SSU proporciona información taxonómica relevante a niveles más amplios, como filo o clase. Su conservación lo convierte en una herramienta valiosa para estudios evolutivos y filogenéticos que requieren una resolución taxonómica más amplia que la proporcionada por ITS y LSU (Tedersoo et al., 2022).

Figura 6

Esquema de regiones del gen ITS



Nota. Tomado de *ITS alchemy: On the use of ITS as a DNA marker in fungal ecology*, por Kauserud (2023).

Extracción de ADN

La homogeneización de muestras y la extracción eficiente de ADN son etapas críticas en cualquier estudio basado en ADN, dado que la calidad y la integridad del ADN extraído tienen un impacto directo en los resultados de la investigación (Majaneva et al., 2018). Es esencial que la extracción del ADN se realice lo más pronto posible después del muestreo, o en

su defecto, que las muestras sean almacenadas a -80°C en el momento de su recolección, ya que períodos prolongados antes de la congelación o extracción pueden causar alteraciones en la calidad y composición de la comunidad (Sudermann et al., 2023). Además, la desinfección del material vegetal previa a la extracción es crucial para minimizar la presencia de contaminantes.

El proceso de extracción de ADN implica la lisis de las células y la solubilización del ADN, seguido de métodos químicos o enzimáticos para eliminar macromoléculas, lípidos, ARN o proteínas (Gupta, 2019). En el caso específico de los hongos, se requieren kits que faciliten la ruptura eficiente de las resistentes paredes celulares, como por ejemplo la homogeneización con perlas (Naranjo-Ortiz & Gabaldón, 2020).

Una vez completada la extracción, es vital evaluar la calidad del ADN, para lo cual se emplean típicamente dos técnicas principales: la espectrofotometría y la electroforesis en gel. La espectrofotometría consiste en medir la cantidad de luz absorbida por la muestra a longitudes de onda específicas. El pico de absorción de los ácidos nucleicos se encuentra alrededor de $\sim 260\text{ nm}$, y una relación A_{260}/A_{280} de aproximadamente de $\sim 1,8$ indica una pureza adecuada del ADN, mientras que una relación inferior a $1,7$ sugiere contaminación proteica (Gupta, 2019). Por otro lado, la electroforesis en gel permite la separación de fragmentos de ADN según su tamaño. (Lee et al., 2012).

Finalmente, el ADN genómico puede ser almacenado a 4°C durante un máximo de 6 meses, o bien conservarse a temperaturas más bajas, entre -20°C y -80°C , para un almacenamiento a largo plazo (Rajalingam et al., 2010).

Secuenciación de alto rendimiento

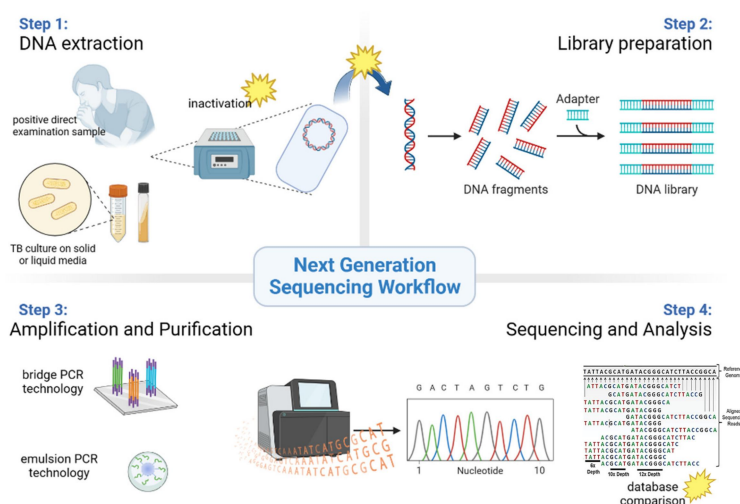
La secuenciación de alto rendimiento, también conocida como secuenciación de próxima generación (NGS), representa un conjunto de tecnologías que se basa en la secuenciación por síntesis para determinar la secuencia de bases en el ADN. Esta tecnología posibilita realizar análisis multigénicos con cantidades mínimas de ácidos nucleicos. La NGS

combina las ventajas químicas de la secuenciación única, diversas plataformas de secuenciación y avances en tecnología bioinformática, lo que permite la secuenciación masiva en paralelo de múltiples segmentos de ADN de diferentes longitudes en múltiples muestras, facilitando su posterior comparación con bibliotecas de secuencias de referencia. Esto conduce a una alta velocidad y rendimiento con un menor costo por base (Fonseca et al., 2012; Qin, 2019).

Aunque existen varias plataformas de secuenciación de alto rendimiento, como Illumina, Ion Torrent, PacBio y Oxford Nanopore, comparten generalmente cuatro etapas en su proceso. En primer lugar, el ADN extraído se fragmenta, luego se prepara la biblioteca mediante la unión de adaptadores e índices a los fragmentos, lo que permite que estos se adhieran a la matriz de secuenciación. Posteriormente, esta biblioteca se amplifica para formar grupos, y finalmente, estos grupos se secuencian y se analizan los datos (Beviere et al., 2023), como se describe en la figura 4.

Figura 7

Flujo de trabajo NGS desde el análisis de muestras hasta secuenciar



Nota. Las estrellas amarillas representan pasos críticos en la secuenciación de alto rendimiento.

Tomado de *The role of Next-Generation Sequencing (NGS) in the Management of Tuberculosis: Practical Review for implementation in Routine*, por Beviere et al. (2023).

Las tecnologías NGS con el tiempo han seguido mejorando, por ello se han dividido en dos tipos: las tecnologías de segunda generación que se refieren a las tecnologías de secuenciación más recientes desarrolladas después de la primera generación, que se caracterizan por la necesidad de preparar bancos de secuenciación amplificados antes de iniciar la secuenciación de clones de ADN amplificados. Y, las tecnologías de tercera generación que son técnicas de secuenciación de reciente aparición. Estas plataformas son conocidas como secuenciación de molécula única porque pueden realizar la secuenciación de una sola molécula sin necesidad de crear las bibliotecas de amplificación y son capaces de generar lecturas más largas (Emiyu & Lelisa, 2022).

Las plataformas consideradas de segunda generación, como Illumina o Ion Torrent, utilizan la tecnología de secuenciación por síntesis, generando millones de lecturas de pequeños fragmentos, lo que se conoce como "lectura corta". En estas plataformas, ocurren millones de reacciones de secuenciación individuales en paralelo. Sin embargo, debido a su naturaleza de lectura corta, los datos de secuenciación de tramos largos de ADN deben ser ensamblados posteriormente, lo que presenta desafíos con respecto a variaciones estructurales o regiones de baja complejidad (Elumalai & Gupta, 2021).

Por otro lado, plataformas como Pacific Biosciences o Oxford Nanopore pertenecen a la categoría de tercera generación. Una de las ventajas clave de estas tecnologías es su capacidad para generar lecturas de longitud superior a 10 kb, superando considerablemente las capacidades de la tecnología de Sanger o de las plataformas de secuenciación de lectura corta. Estas tecnologías de "lectura larga" tienen la capacidad de superar los desafíos encontrados con las lecturas cortas, como las repeticiones a nivel de genoma completo y la detección de variantes estructurales (Emiyu & Lelisa, 2022; Hu et al., 2021).

Illumina

La secuenciación por colorantes Illumina, también conocida como tecnología Solexa, es una técnica molecular empleada para determinar la secuencia de bases en el ADN. Esta

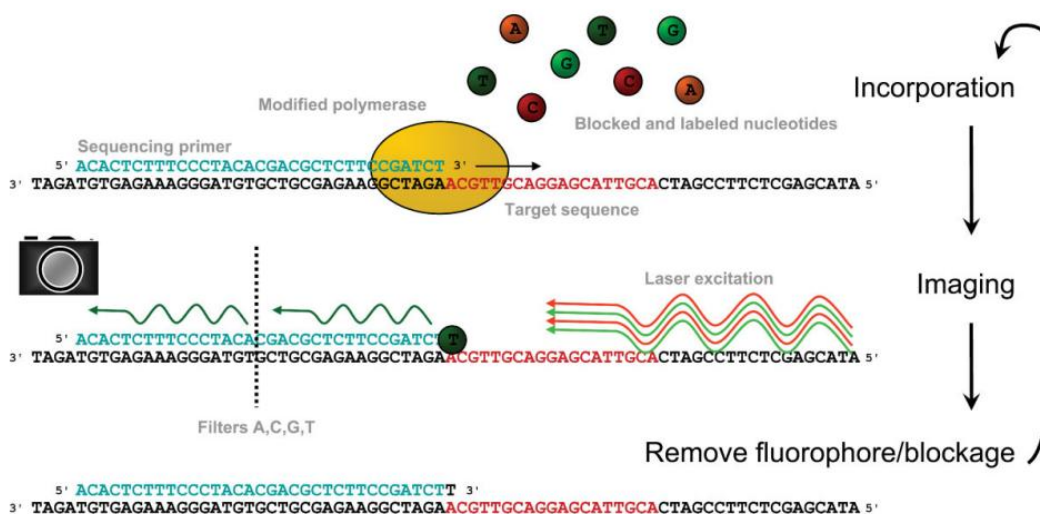
tecnología evolucionó en el campo de la genómica al permitir la secuenciación rápida y precisa de grandes cantidades de ADN. La técnica se basa en la secuenciación por síntesis (SBS), un proceso que utiliza terminadores de colorantes reversibles marcados con fluorescencia. Estos terminadores son moléculas especiales que se añaden a la cadena de ADN en crecimiento durante el proceso de secuenciación. Al final, cada terminador tiene un color diferente que identifica la base que se añadió (Emiyu & Lelisa, 2022; Preston et al., 2021).

La tecnología de Illumina se basa en dos técnicas clave: amplificación de puentes y terminación reversible cíclica. El proceso comienza con la fragmentación del ADN, ya sea mediante enzimas o sonicación. Posteriormente, los fragmentos se reparan y se les unen adaptadores en ambos extremos, los cuales se adhieren a una superficie sólida, como un portaobjetos de vidrio, donde se produce la hibridación con una celda de flujo, dando lugar a la formación de grupos de fragmentos con la misma secuencia durante la amplificación de puentes. Luego, se inicia la etapa de terminación cíclica reversible, en la cual en cada ciclo de secuenciación se añade un nucleótido marcado con fluoróforo y bloqueado químicamente a las moléculas de ADN en la superficie sólida. Tras la detección de la señal del fluoróforo correspondiente, se desbloquea químicamente el nucleótido y se procede a lavarlo para preparar el siguiente ciclo. Este proceso se repite en cada ciclo de secuenciación, generando una secuencia de cada fragmento (lectura). Posteriormente, estas lecturas se alinean con un genoma de referencia (Figura 8) (Kircher & Kelso, 2010; Reuter et al., 2015; Srivastava et al., 2022).

Además, la plataforma NGS de Illumina cuenta con la capacidad de secuenciar por pares, lo que implica la secuenciación desde ambos extremos de un fragmento de ADN. Este enfoque genera datos de alta calidad con una cobertura profunda y un elevado número de lecturas. En la actualidad, Illumina ofrece una variedad de sistemas de secuenciación, que incluyen: MiSeq, HiSeq 2500, HiSeq 3000, HiSeq 4000, HiSeq X Ten, HiSeq X Five y NextSeq 550. Cada uno de estos sistemas ofrece diferentes niveles de rendimiento (Qin, 2019).

Figura 8

Flujo de trabajo de Illumina



Nota. El flujo de la secuenciación de Illumina se basa en la incorporación de nucleótidos (rojo), imagen y ruptura o remoción del fluoróforo. Tomado de “*High-throughput DNA sequencing concepts and limitations*”, por Kircher and Kelson, (2010).

Una de las principales ventajas de Illumina sobre la pirosecuenciación es que puede generar lecturas más largas. Las tecnologías actuales permiten la generación de un archivo R1 directo y un archivo R2 inverso que pueden unirse en un contig para formar un fragmento más largo. Esto proporciona una mejor resolución de las comunidades microbianas debido a secuencias de mayor longitud (Ghosh & Bhadury, 2019). Además, MiSeq está diseñado para llevar a cabo secuenciaciones masivas de manera rápida.

Análisis bioinformático

El análisis bioinformático implica el uso de herramientas computacionales, bases de datos, matemáticas y estadísticas para recopilar, almacenar, organizar y analizar grandes cantidades de información biológica (Welch et al., 2014). Para llevar a cabo estas tareas, se requieren conocimientos y habilidades básicas en lenguajes de programación como R y Python. Además, se emplean sistemas operativos; sin embargo el más utilizado es Linux, debido a su

disponibilidad gratuita y su capacidad para manejar eficientemente grandes volúmenes de datos (Hernández et al., 2020). Una vez procesados, se utilizan diversas técnicas computacionales, como el ensamblaje de novo, el mapeo basado en referencias y el análisis del transcriptoma, para extraer información biológica significativa (Satam et al., 2023)

El objetivo principal del análisis bioinformático es extraer información de los datos relacionados con macromoléculas biológicas y emplear esta información para responder a preguntas biológicas específicas (Biron et al., 2007).

Pipeline

Para comprender los resultados de HTS, es necesario utilizar un flujo de trabajo bioinformático, que consiste en un programa o secuencia de comandos específicos que integran múltiples pasos en un orden preciso para llevar a cabo un análisis secuencial (Y. X. Liu et al., 2021).

Existen dos tendencias en los pipelines para análisis de microbioma, una basada en unidades taxonómicas operacionales (OTUs) y otra en las variaciones de secuencias de amplicón (ASVs).

Por lo general, un flujo de trabajo para un pipeline bioinformático basado en amplicones incluye los siguientes pasos:

1. Control de calidad
2. Alineación de secuencias
3. Asignación taxonómica
4. Análisis de diversidad
5. Análisis estadístico

Por otro lado, es importante comprender que es un Bioconductor. Se trata de un proyecto de Software libre y de código abierto diseñado para el análisis e interpretación de datos genómicos. Se basa principalmente en el lenguaje de programación estadística R (Gentleman et al., 2004). Además, Bioconductor promueve un enfoque de desarrollo

colaborativo y abierto, lo que permite a la comunidad científica contribuir con nuevos métodos y mejoras a la plataforma (Buetow, 2008).

DADA2 es un paquete de análisis de datos en R, deriva su nombre del "Algoritmo Divisivo de Denoising de Amplicones". Este innovador paquete se basa en la modelización de los errores de secuenciación, lo que permite inferir con mayor precisión la composición de la muestra. Esta metodología permite discernir incluso las diferencias más sutiles entre las secuencias, ofreciendo una resolución mucho mayor que los métodos de agrupación convencionales, como la agrupación de unidades taxonómicas operativas (OTUs). Como resultado, el análisis con DADA2 produce tablas de abundancia de variantes de secuencia de amplicones (ASVs), que representan las diferentes secuencias presentes en la muestra y su abundancia relativa. Estas tablas ofrecen una visión detallada y precisa de la comunidad microbiana (Ombrello, 2020).

Para el análisis de datos obtenidos en DADA2, se utiliza el paquete phyloseq para importar y manejar datos de secuenciación, lo que facilita su análisis y visualización en R. Phyloseq permite integrar los datos de secuenciación de amplicones con información de metadatos y realizar una variedad de análisis. Además, los ASVs obtenidos se pueden analizar con una variedad de paquetes disponibles en Bioconductor, como: vegan, ampvis, DECIPHER. Estos paquetes proporcionan herramientas para la exploración, visualización y análisis estadístico de datos. Desde la normalización y análisis diferencial de abundancia hasta la integración de elementos adicionales como árboles filogenéticos (Bayón et al., 2016).

Diversidad alfa y beta

La diversidad Alfa nos permite explorar la riqueza y variabilidad de especies dentro de una comunidad microbiana específica (Willis, 2019). Se emplean diversas métricas para determinar la biodiversidad, como los taxones observados, el índice de Shannon, el índice de Simpson y el índice de Simpson inverso. Los taxones observados representan la métrica más sencilla, ya que únicamente cuentan el número de taxones distintos que se observan en una muestra en un nivel taxonómico específico, generalmente especies. Por otro lado, el índice de

Shannon actúa como un estimador tanto de la riqueza como de la uniformidad de las especies. Mientras tanto, el índice de Simpson se basa en la probabilidad de que dos entidades extraídas de la muestra al azar sean de diferentes tipos (Andermann et al., 2022).

Los investigadores frecuentemente recurren a las curvas de rarefacción para evaluar si han secuenciado sus muestras con la profundidad suficiente. Las curvas de rarefacción son útiles en este sentido. Los investigadores llevan a cabo un submuestreo de sus datos de secuencia o lecturas para una muestra a diversas profundidades, calculan la diversidad alfa y representando gráficamente cómo varía la diversidad alfa a medida que aumenta el número de lecturas (Cameron et al., 2021).

Por otro lado, la diversidad beta nos lleva a un nuevo nivel de análisis, explorando las diferencias en la composición de especies entre diferentes comunidades microbianas (Andermann et al., 2022). Para analizar la diversidad beta, se emplean diversos índices de diversidad como Jaccard, Bray-Curtis, Morisita-Horn y Sorenson, lo que resulta la generación de una matriz de distancias que se utiliza para interpretar los datos. Las dos formas más comunes de representar estos datos son el análisis de coordenadas principales (PCoA) y el análisis de componentes principales (PCA). PCA se basa en las Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs), mientras que PCoA se basa en distancias ponderadas UniFrac (J. Chakraborty et al., 2022).

Análisis estadístico

El análisis de varianza permutacional multivariable (PERMANOVA), también conocido como MANOVA, destaca como uno de los métodos preeminentes en ecología y biología para explorar las relaciones entre comunidades con variables ambientales. La idea principal detrás de este análisis es evaluar si existen diferencias significativas entre los grupos de muestras en función de una matriz de distancias o disimilitudes entre ellas. La hipótesis nula plantea que no hay diferencia significativa entre los grupos, mientras que la hipótesis alternativa sugiere que al menos dos grupos difieren significativamente entre sí (Anderson, 2017).

Además, la implementación de PERMANOVA en R se facilita mediante varios paquetes, como es el caso del paquete “vegan”. Dentro de este paquete la función “adonis” permite la ejecución eficiente de este análisis.

Perfiles taxonómicos

Definición

La taxonomía es una ciencia que se encarga de categorizar y establecer relaciones entre organismos vivos y extintos. Este sistema fundamental permite agrupar los organismos en diferentes categorías, estableciendo relaciones entre ellos basadas en sus características morfológicas, genéticas, fisiológicas y ecológicas (Mace, 2004). Para llevar a cabo esta clasificación, se emplea la jerarquía taxonómica, que comprende distintos niveles, como dominio, reino, filo, clase, orden, familia, género y especie. Cada uno de estos niveles representa un grado de parentesco o relación entre los organismos. Esta jerarquía taxonómica facilita la organización y comprensión de la biodiversidad al ordenar los organismos en diferentes niveles, desde categorías amplias como dominio hasta más específicas como especie. Además, cada categoría superior puede abarcar todas las categorías inferiores. De esta manera, la jerarquía taxonómica no sólo ordena la diversidad biológica, sino que también refleja las relaciones evolutivas entre los organismos (Padiál et al., 2010; Paterlini, 2007).

El análisis de perfiles taxonómicos se ha convertido en la herramienta fundamental para identificar y caracterizar las comunidades microbianas presentes en una muestra. Además, permite determinar la abundancia relativa de cada microorganismo y vincular su composición con las funciones ambientales y los fenotipos relacionados con la salud del huésped (Portik et al., 2022).

Los estudios de perfiles taxonómicos han experimentado un proceso notable gracias a la metagenómica. Este avance se debe a la mejora de las tecnologías de secuenciación, que permiten llevar a cabo grandes cantidades de secuenciación de ADN de manera rápida y económica, además de ofrecer una caracterización más profunda de la comunidad microbiana

(B. Liu et al., 2011). En las últimas décadas, ha habido un aumento en el interés por investigar los perfiles de comunidades microbianas debido a que es fundamental para comprender y abordar procesos ecológicos como la degradación de contaminantes y la salud del suelo, entre otros (Bakir-Gungor et al., 2023).

Importancia de los perfiles taxonómicos de hongos

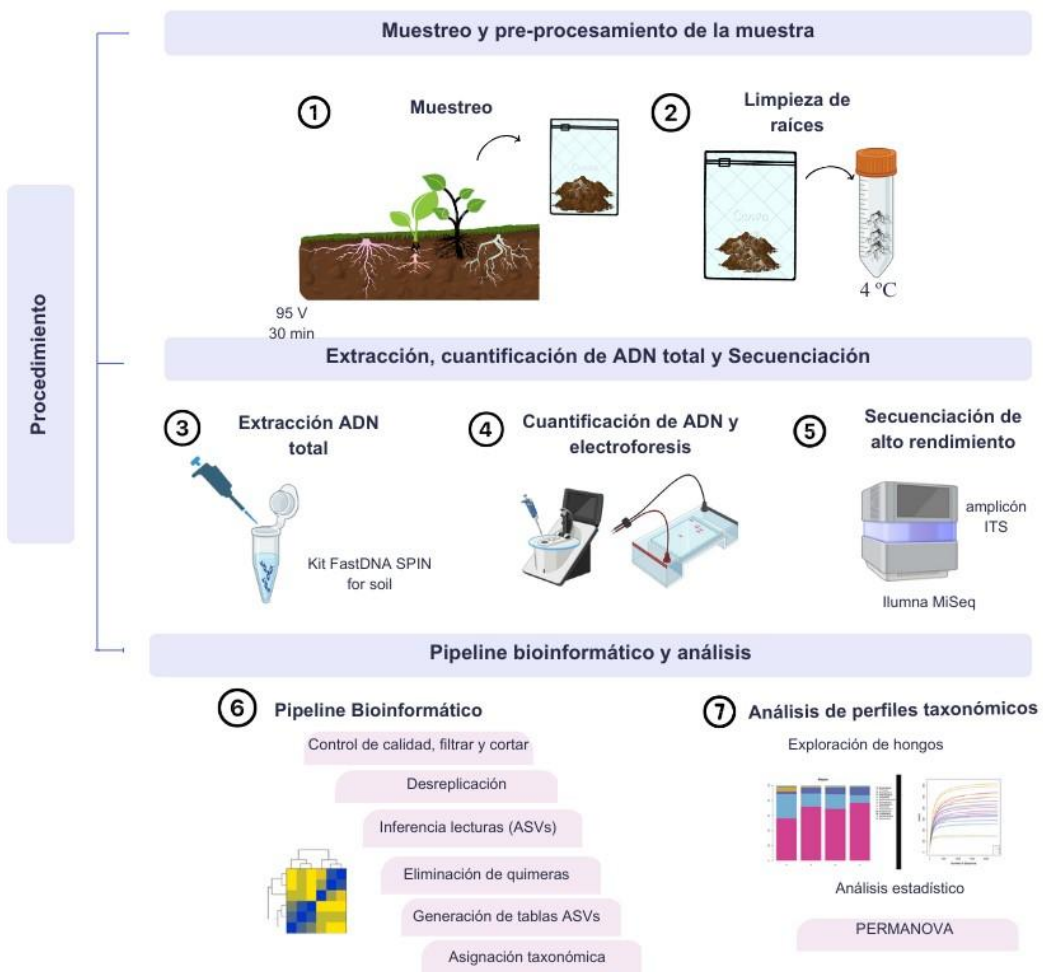
Los hongos son un grupo diverso de organismos eucariotas que forman un grupo amplio y diverso que ocupa una gran parte de los ecosistemas. Su importancia radica en su capacidad para establecer simbiosis con diversos organismos vivos, aunque también pueden actuar como descomponedores y en algunos casos como patógenos (Tennakoon et al., 2022). Debido a su amplia variedad, los perfiles taxonómicos se han convertido en una herramienta esencial para la investigación. Estos perfiles permiten identificar y caracterizar la diversidad fúngica en diferentes hábitats, lo que contribuye significativamente a la comprensión de las interacciones ecológicas y los ciclos biogeoquímicos (Watkinson, 2016).

Capítulo III: Metodología

El presente trabajo empezó con el muestreo y preprocesamiento de la muestra para finalizar con un pipeline bioinformático para el análisis comparativo de las muestras, como se detalla en el diagrama de flujo de trabajo (Figura 9).

Figura 9

Flujo de trabajo



Nota: Elaborado en Canva y BioRender

Caracterización de la zona geográfica

Antes de la toma de muestra, se conoció el lugar y sus características. El Depósito conjunto de Municiones “El Corazón”, es una base militar que se encuentra ubicada en la provincia de Pichincha, cantón Mejía, parroquia de Alóag, en el barrio llamado “El Corazón”, en las faldas del volcán Corazón. Esta institución tiene la responsabilidad de mantener en condiciones óptimas el material bélico como el almacenamiento, mantenimiento y destrucción de municiones y explosivos.

Las muestras de raíces fueron tomadas en tres zonas, que permitieron determinar los tratamientos en este proyecto de investigación:

1. Remanente o control: Esta zona se tomó como punto de control debido a que en este lugar no existe actividad de eliminación de explosivos.
2. Deflagración o fosa: En esta zona se realizan actividades de incineración de explosivos o municiones, está compuesto por tres pozos dentro de los cuales se realiza el proceso.
3. Predetonación o cielo abierto: En esta zona corresponde al lugar donde ocurre la detonación de material explosivo.

La ubicación exacta de estas tres zonas consideradas en este trabajo es de conocimiento confidencial, ya que las Fuerzas Armadas del Ecuador operan en este territorio.

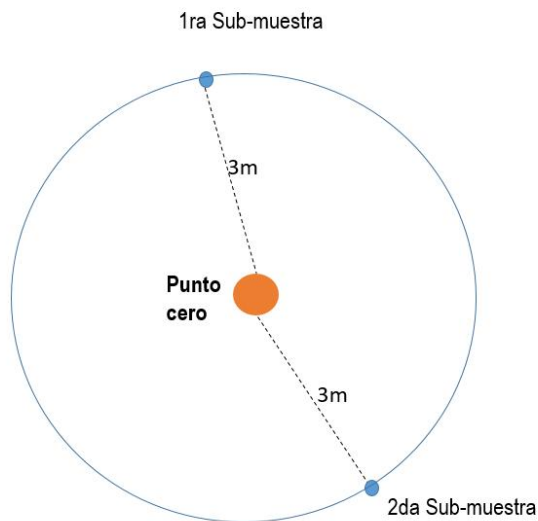
Muestreo

La toma de muestras se realizó en el Depósito conjunto de municiones “El Corazón”, bajo el protocolo SPUN (Anexo 1), enfocándonos en raíces de varias plantas. En total, se recolectaron 9 muestras de 10 cm de profundidad distribuidas en tres tratamientos distintos; cielo abierto predetonación, suelo contaminado (deflagración) y suelo no contaminado (remanente).

En la zona de predetonación y remanente, se designó la primera submuestra tomada como “punto cero” o “punto pivote”. A partir de este punto, se midieron radios de 3 m de distancia del centro para obtener 2 submuestras (Figura 10). Estas submuestras se colocaron inmediatamente en una bolsa con cierre hermético, posteriormente se mezclaron para obtener una muestra representativa de cada zona.

Figura 10

Esquema de la toma de muestra en los tratamientos de predetonación y remanente



Nota. Elaborado en Microsoft PowerPoint

Por el contrario, en el área de deflagración, se tomó una submuestra en cada pozo, totalizando tres submuestras. De manera similar, se guardaron en una funda de cierre hermético y se mezclaron. Cabe destacar que la toma de muestra se realizó con una pala desinfectada con alcohol al 70% en cada punto de muestreo para garantizar la integridad de los resultados, además cada funda de cierre hermético se guardó en una caja aislante respectivamente etiquetada.

Procesamiento de muestras

Se extrajo la mayor cantidad de raíces de cada muestra compuesta de suelo, y se colocaron en cajas Petri debidamente etiquetadas. Posteriormente, se llevó a cabo un proceso de lavado de las raíces con agua destilada para eliminar el exceso de suelo, seguido de un secado con papel absorbente.

Para asegurar una representación adecuada de cada tratamiento, cada muestra compuesta de cada área se dividió en tres partes, generando así 3 réplicas de cada tratamiento,

obteniendo un total de nueve muestras de raíces para su respectivo análisis (Figura 11). Cada frasco que contenía las raíces fue etiquetado meticulosamente de acuerdo con el código detallado en la tabla 2.

Tabla 2

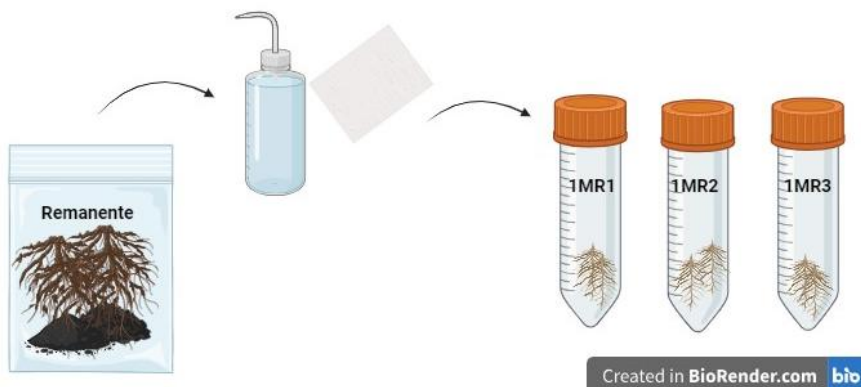
Codificación de las muestras según su tratamiento

Zona de toma de muestras(Tratamiento)	Codificación	Muestra	Réplica
Remanente	1MR1	Raíz	1
	1MR2	Raíz	2
	1MR3	Raíz	3
Deflagración	2MR1	Raíz	1
	2MR2	Raíz	2
	2MR3	Raíz	3
Predetonación	3MR1	Raíz	1
	3MR2	Raíz	2
	3MR3	Raíz	3

Nota: Para la codificación de las muestras, se siguió un sistema específico donde el primer número identifica la zona de muestreo, seguido por la letra "M" que representa muestra, luego la letra "R" que indica al tipo de muestra y finalmente el último número representa qué número de réplica corresponde. Por ejemplo, la codificación '1MR1' el primer número corresponde al tratamiento de Remanente, seguido de la letra "M" que representa muestra, luego la letra "R" que nos indica que tipo de tejido es, en este caso raíces, y finalmente el último número "1" representa la primera réplica de ese tratamiento.

Figura 11

Procesamiento de muestra



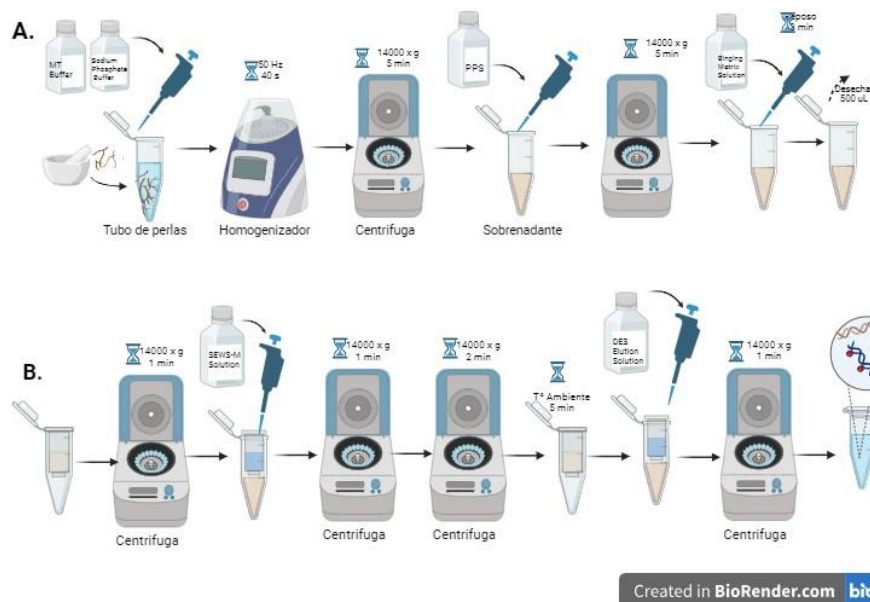
Nota. Elaborado en BioRender

Extracción de ADN total

Para la extracción del ADN, se realizó mediante el kit FastDNA™ SPIN. Previo a la extracción de ADN, las muestras de raíces fueron lavadas y desinfectadas con una solución de Tween 80 y etanol al 90%. Luego, se trituraron con la ayuda de un mortero y bistrú, fragmentándose en pedazos pequeños hasta obtener 0,3 g de raíz para cada tubo de extracción. Posteriormente, se continuó con las instrucciones del Kit (Anexo 2), aunque en el paso de homogeneización, se utilizó el homogeneizador cuya frecuencia fue de 50 Hz durante un periodo de 20 minutos en ciclos de 10 segundos como se detalla en la Figura 12.

Figura 12

Esquema de la extracción de ADN mediante el kit FastDNA™ SPIN



Nota. Elaborado en BioRender

Evaluación de la calidad de ADN total obtenido

Se cuantificó el ADN total obtenido con el propósito de evaluar la calidad de su extracción, así como sus índices de pureza. Para llevar a cabo esta evaluación, se empleó un espectrofotómetro (NanoDrop), se emplearon meticulosamente las instrucciones proporcionadas por el equipo. Como control de referencia, se utilizó la solución DES Elution, suministrada por el kit de extracción, lo cual se trató como solución blanco para calibrar el espectrofotómetro. Durante el proceso, se registraron tanto la concentración (ng/µL) como índices de calidad, expresados mediante las relaciones de absorbancia (A_{260}/A_{280}) y (A_{260}/A_{230}).

Posteriormente, se verificó la integración del mismo mediante electroforesis en gel de agarosa. Se preparó un gel de agarosa al 1X. Para cargar las muestras en el gel, se mezclaron 2 µL de BlueJuice™ Gel Loading Buffer (Invitrogen) con 5 µL de muestras a analizar.

El gel se expuso a una corrida electroforética durante 25 minutos a 95 voltios para permitir la separación de los fragmentos de ADN, el gel se visualizó utilizando un transiluminador de luz UV.

Secuenciación de alto rendimiento

Una vez obtenido y evaluado el ADN total, se procedió a enviar las 9 muestras de ADN extraídos a la empresa BioSequence EC, Quito-Ecuador para su secuenciación. La secuenciación se realizó utilizando la tecnología Illumina con el equipo MiSeq con la metodología de secuenciación masiva paralela por amplicones. Se solicitó específicamente la secuenciación para la región del espaciador interno transcrito (ITS), para la cual se amplificaron estas regiones utilizando los cebadores especificados en la tabla 2 para amplificar la región ITS2 del operón de ARNr.

Tabla 3

Cebadores utilizados para la amplificación de la región ITS

Gen	Cebadores	Secuencia
ITS	ITS 86F	GTGAATCATCGAATCTTTGAA
	ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC

Pipeline bioinformático

Las lecturas obtenidas de la secuenciación fueron procesadas utilizando el pipeline bioinformático DADA2 (1.18) en el programa R/RStudio. El procesamiento de datos se llevó a cabo tomando como base el tutorial DADA 2 propuesto por Callahan et al., (2016). Además, para el procesamiento de datos se utilizó el paquete de Bioconductor el cual fue instalado a través de BioManager.

Análisis de calidad de las secuencias y procesamiento de datos

El procesamiento de las secuencias se llevó a cabo utilizando el paquete bioinformático DADA2 (versión 1.18) en R para obtener secuencias de alta calidad. En primer lugar, se realizó un control de calidad de las secuencias crudas con el objetivo de evaluar su calidad y

establecer un punto de corte de las lecturas. Luego, se llevó a cabo un proceso de corte y filtrado (parámetros $\text{maxN}=0$, $\text{maxEE}=c(2,2)$, $\text{truncQ}=2$) para eliminar regiones que no cumplieran con los estándares de calidad, conservando únicamente las regiones de alta calidad de la secuencia. Se estimó la tasa de error y se realizó la inferencia de la composición de la muestra utilizando algoritmos de DADA2 hasta alcanzar una solución conjunta consistente. Posteriormente, se realizó una desreplicación, para eliminar secuencias redundantes, es decir, secuencias idénticas generadas varias veces durante la secuenciación. Luego, se fusionaron las secuencias forward (lecturas del extremo 5') y reverse (lecturas del extremo 3') para obtener secuencias completas sin ruidos. Se construyó una tabla de variantes de secuencia de amplicones (AVS) y, finalmente, se eliminaron las quimeras que son secuencias artificiales generadas durante la amplificación de PCR, para garantizar la fiabilidad de los resultados obtenidos.

Asignación taxonómica

Después de obtener las secuencias filtradas y libres de errores, se procedió a realizar la asignación taxonómica de las secuencias, se utilizó una base de datos de referencia específica para hongos. Esta base de datos fue obtenida del lanzamiento general de UNITE FASTA para hongos, versión 23-07-18 realizada por Abarenkov, K. et al., (2023) para el amplicón ITS. Se construyó una tabla de metadatos con la descripción de cada muestra (Réplica y tratamiento).

Análisis exploratorio del microbioma

Para realizar el análisis comparativo se utilizó el paquete Phyloseq, este paquete permite generar los perfiles filogenéticos que más se asemejan a la realidad. Además, se identificaron y eliminaron secuencias de taxones no deseados y muestras poco informativas (>1000 recuentos). Luego, se realizó una normalización donde se estableció una longitud de secuencia promedio para que puedan ser comparables.

Se representaron los perfiles taxonómicos en gráficas de barras en función de su abundancia relativa y mediante la librería “apvis 2”, se realizaron mapas de calor comparativos entre tratamientos.

Análisis de diversidad

Se analizó la diversidad *Alfa* y *Beta* utilizando los paquetes “vegan” y “ampvis 2”. La diversidad alfa se pudo analizar mediante sus índices de diversidad que son: Shannon, Simpson e InvSimpson. Por otro lado, la diversidad beta fue calculada mediante la distancia de Bray-Curtis y coordenadas principales (PCoA).

Análisis estadístico

Con el fin de realizar la comparación de los perfiles taxonómicos encontrados en cada una de las muestras contaminadas y no contaminadas con municiones, se planteó realizar un análisis PERMANOVA utilizando dos métricas de distancia: UNIFRAC y en distancia Bray-Curtis. Esto se llevó a cabo mediante la función “adonis2” del paquete “vegan”. Se ejecutaron 10,000 permutaciones para una estimación robusta de la significancia estadística entre los tratamientos.

El análisis estadístico se centró en evaluar si hay diferencias significativas en la composición taxonómica entre los grupos de muestras contaminadas y no contaminadas. La significancia entre los tratamientos se determinó mediante el valor p, donde valores bajos indican una mayor evidencia de diferencias significativas entre los grupos.

Capítulo IV: Resultados

Extracción de ADN total

A partir de la extracción de ADN utilizando el kit FastDNA™ SPIN, se obtuvieron 9 muestras de ADN total, cada una con un volumen final de 50uL. La evaluación de calidad de ADN total extraído se llevó a cabo mediante electroforesis (Figura 13), para poder comprobar su integridad se empleando el equipo NanoDrop™ (cantidad [ng/uL], A260/A280, A260/A230) (Tabla 4). Los resultados revelaron que el tratamiento remanente (848,1.78,0.14) cuenta con

mayor concentración y pureza promedio, seguido de deflagración (39.83,1.95,0.06) y predetonación (56.63,1.87,0.33).

Tabla 4

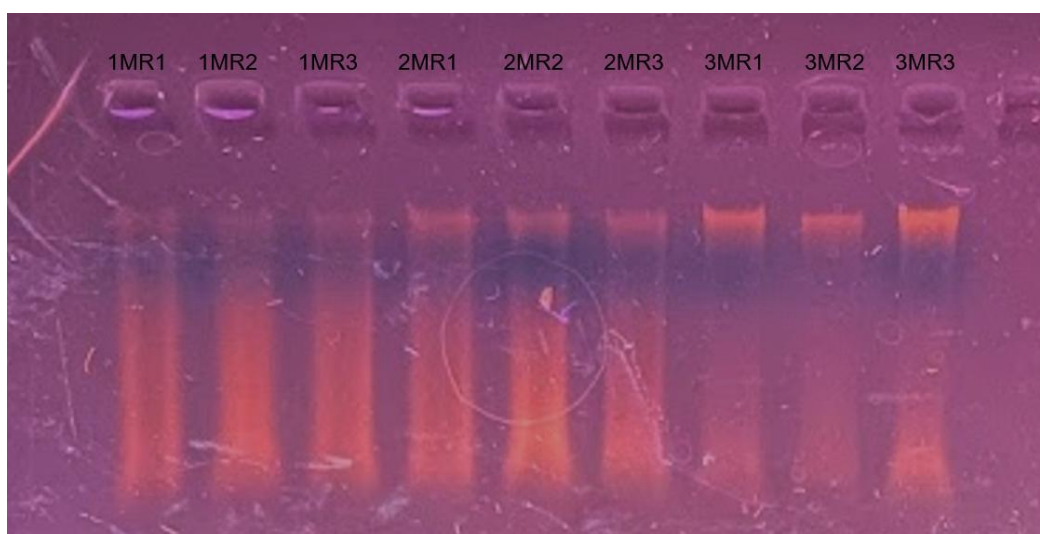
Cuantificación y pureza de las muestras de ADN obtenidas

Muestra	Concentración (ng/uL)	Pureza (A260/A280)	Pureza (A260/A230)
1MR1	84.0	1.81	0.20
1MR2	81.9	1.79	0.11
1MR3	88.5	1.75	0.11
2MR1	35.7	1.93	0.07
2MR2	39.7	2.01	0.05
2MR3	44.1	1.92	0.08
3MR1	56.0	1.87	0.95
3MR2	70.5	1.89	0.08
3MR3	43.4	1.85	0.12

Nota. La pureza A260/A230 no fue considerada por sus valores bajos.

Figura 13

Visualización del gel de electroforesis



Secuenciación de alto rendimiento

La secuenciación fue realizada por la empresa BioSequence EC, empleando la secuenciación de alto rendimiento por amplicones de Illumina Miseq con ITS2 como marcador genético de ARN ribosomal. Los resultados de la tabla 5 y 6 indican la concentración de las muestras antes y después de la preparación de librerías, así como el número de lecturas posteriores (Tabla 7).

Control de calidad

Tabla 5

Control de calidad

Muestra	Concentración (ug/mL)	Banda > 1000 bp	Arrastre	Aprobado
1MR1	35	Ok	Si	Si
1MR2	41	Ok	Si	Si
1MR3	55	Ok	Si	Si
2MR1	16	Ok	Si	Si
2MR2	28	Ok	Si	Si
2MR3	26	Ok	Si	Si
3MR1	30	Ok	Si	Si
3MR2	46	Ok	Si	Si
3MR3	26	Ok	Si	Si

Nota: Los datos fueron entregados por la empresa BioSequence EC.

Preparación de librerías**Tabla 6***Control de calidad de preparación de librerías*

Primera amplificación			Segunda amplificación	
Muestra	Amplificación	Banda(bp)	Concentración	Banda (bp)
1MR1	Ok	550	85	630
1MR2	Ok	550	66,50	630
1MR3	Ok	550	75	630
2MR1	Ok	550	65	630
2MR2	Ok	550	68	630
2MR3	Ok	550	72,50	630
3MR1	Ok	550	72,50	630
3MR2	Ok	550	56,50	630
3MR3	Ok	550	57,50	630

Nota: Los datos fueron entregados por la empresa BioSequence EC.

Secuenciación de alto rendimiento**Tabla 7***Análisis de resultados de la secuenciación*

Muestra	Lecturas	Índice de diversidad de especies de Shannon	Número de especies identificadas
1MR1	505,259	3.497	1,909
1MR2	498,106	3.437	1.818
1MR3	470,931	3.442	1,783
2MR1	382,198	2.932	1,118
2MR2	527,733	3.056	1,368

2MR3	335,015	2.989	1,122
3MR1	477,529	3.069	1,197
3MR2	501.653	3.073	1,267
3MR3	361,811	2.971	1,153

Nota: Los datos fueron entregados por la empresa BioSequence EC.

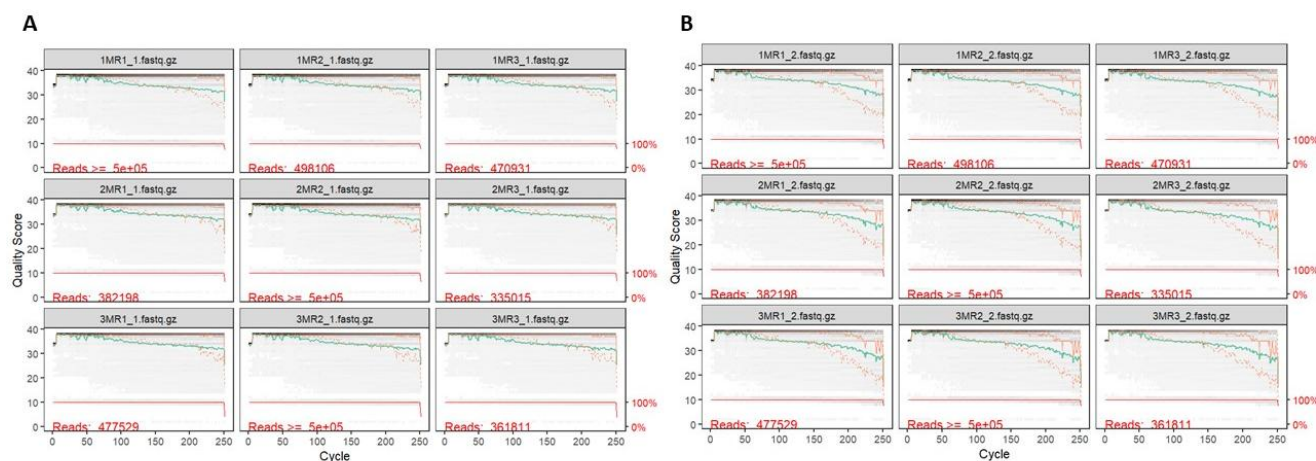
Pipeline Bioinformático

Análisis de calidad de las secuencias y procesamiento de datos

A través de la secuenciación del alto rendimiento mediante la plataforma Illumina se obtuvieron 4060335 lecturas de la región ITS. Por otro lado, la calidad de las secuencias en general, se encuentran en una puntuación de calidad media superior a los 30. Sin embargo, existen algunas regiones con baja calidad, especialmente al final de las lecturas. El deterioro de la calidad se apreció desde los 200 pb para la secuencia *forward* y 250 bp para la secuencia *reverse*, como se observa en la figura 14.

Figura 14

Perfiles de calidad de las lecturas directas



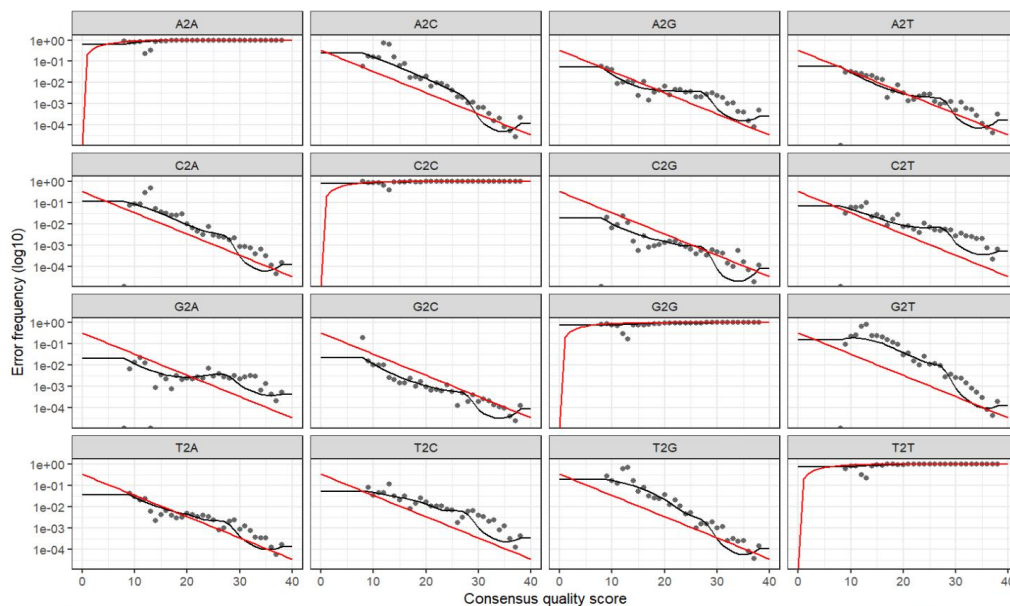
Nota. Lecturas para tres muestras diferentes (1MR, 2MR y 3MR), donde se pueden observar el control de calidad de las secuencias forward correspondientes a la región ITS (A) y

control de calidad de las lecturas de las secuencias reverse correspondientes a la región ITS (B). Las líneas verdes indican el puntaje de calidad medio en cada posición y las líneas naranjas los cuartiles de la distribución del puntaje de calidad. La línea roja muestra la proporción escalada de lecturas que se extienden al menos hasta esa posición.

Consecuentemente, en la figura 15 se puede observar la tasa de error para cada posible transición, como por ejemplo el error que implica cambiar una adenina por citosina o adenina por guanina, entre otros. Como conclusión, se puede decir que la tasa de error estimada media es inferior a 0,01 en todas las muestras, es decir, es baja, lo que indica que las lecturas son de alta calidad y pueden ser adecuadas para el análisis posterior. Del mismo modo, después de procesar la muestra mediante la filtración, eliminación de ruido, la unión de secuencias forward y reverse y la eliminación de quimeras, se obtuvo la tabla 6, que resume el número de secuencias en cada paso de análisis. Se puede observar que el número de secuencias se reduce en cada paso de análisis, donados como resultado que, de 4060335 secuencias totales iniciales, se recuperó el 60,11%, obteniendo, 2650239 ASVs fúngicos.

Figura 15

Tasa de error estimada



Nota. Se muestran las tasas de errores calculados para cada posible transición de nucleótidos de las secuencias forward para la elaboración de ASVs. La línea negra muestra las tasas de error estimadas después de la convergencia del algoritmo de aprendizaje automático. La línea roja muestra la tasa de error esperada según la definición normal del Q-score.

Tabla 8

Lecturas obtenidas en el procesamiento de datos de la región ITS

Muestra	Número de lecturas	Filtración	Eliminación de ruido (SF)	Eliminación de ruido (SR)	ASVs	ASVs sin quimeras
1MR1	505259	336370	335589	335710	327025	323723
1MR2	498106	331332	330806	330850	322883	321237
1MR3	470931	308872	308328	308367	301064	299355

2MR1	382198	254930	254613	254644	213278	209381
2MR2	527733	349307	348568	348777	296226	287083
2MR3	335015	216240	215776	215935	186534	181981
3MR1	477529	313475	312937	312763	298489	292951
3MR2	501653	323819	323328	323111	308970	303804
3MR3	361911	232681	232438	232313	222871	221369

Nota. SF: Secuencias forward, SR: Secuencias reverse

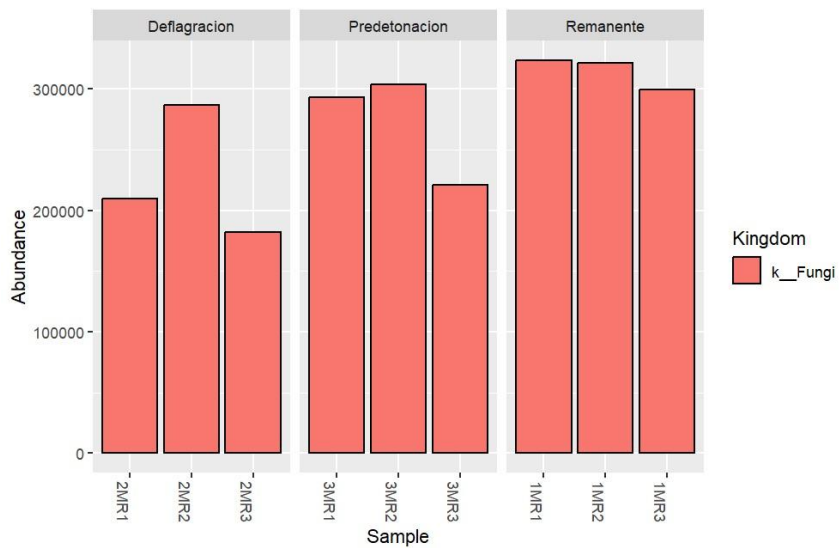
Asignación taxonómica

En los perfiles taxonómicos en función del Reino, se puede observar en la figura 16 que en el análisis todos los microorganismos pertenecen al reino Fungi, En cambio, en la categoría filo, se identificó que los hongos pertenecientes a *Ascomycota* son predominantes en los tres tratamientos, mientras que los hongos pertenecientes a *Basidiomycota* mostraron una reducción en su abundancia en los tres tratamientos. Por el contrario, los hongos del filo *Mortierellomycota* solo se encuentran presentes en el tratamiento remanente y en poca cantidad en suelos de predetonación (Figura17).

En función de género, los hongos de tipo *Gaeumannomyces* y *Paraphoma* predominan en detonación, mientras que los hongos de tipo *Paraleptosphaeria* y *Sporothrix* son los que predominan de deflagración. En remanente, su abundancia entre géneros se encuentra equilibrada (Figura 18). Además, en la figura 18 existe un grupo asignado como “Intertae sedis”, lo que significa que se desconoce su asignación dentro del género.

Figura 16

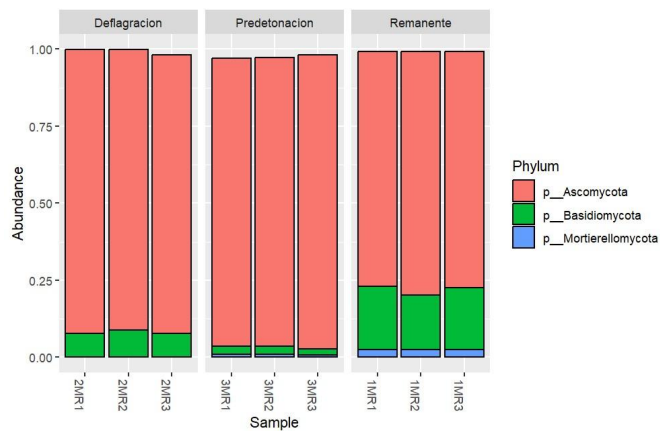
Asignación taxonómica de hongos (Reino) en función de la abundancia



Nota. Se compara la abundancia de las muestras normalizadas según su tratamiento en función de la categoría taxonómica "Reino". Se presentan los grupos taxonómicos por encima de 0.1 más abundantes.

Figura 17

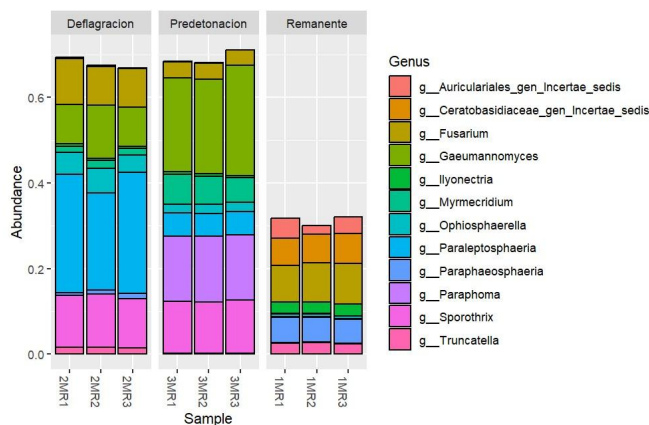
Asignación taxonómica de hongos (filo) en función de la abundancia



Nota. Se compara la abundancia de las muestras normalizadas según su tratamiento en función de la categoría taxonómica “Filo”. Se presentan los grupos taxonómicos por encima de 0.1 más abundantes.

Figura 18

Asignación taxonómica de hongos (Género) en función de la abundancia



Nota. Se compara la abundancia de las muestras normalizadas según su tratamiento en función de la categoría taxonómica “Género”. Se presentan los grupos taxonómicos por encima de 0.1 más abundantes.

Se obtuvieron gráficos de calor donde se puede observar en la figura 19, revelaron que en el tratamiento remanente el filo más abundante fue *Ascomycota* (77.4%), seguido por *Basidiomycota* (19.4%) y *Mortierellomycota* (2.4%). De manera similar, el filo más abundante en el tratamiento de deflagración fue *Ascomycota* (91.1%), seguido por *Basidiomycota* (8%) y finalmente *Chytridiomycota* (0.6%). Por otro lado, en el tratamiento predetonación el filo más abundante fue *Ascomycota* (94.2%) y *Basidiomycota* (2.5%).

Por otro lado, el mapa de calor a nivel de género (figura 20), da como resultado que en el tratamiento de deflagración los géneros más abundantes son *Paraleptosphaeria* (26.2 %), *Sporothrix* (12.1%), *Geumannomyces* (10.2%) y *Fusarium* (9.6%). Para el tratamiento de predetonación el género más abundante son *Gaeumannomyces* (23.2%), *Paraphoma* (15.3%), *Sporothrix* (12.1%), *Myrmecridium* (6.4%) y *Paraleptosphaeria* (5.4%). Finalmente, para el tratamiento remanente el género más abundante es *Fusarium* (9.1%).

Figura 19

Mapa de calor respecto a la abundancia clasificada por filo de la región ITS

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 -

Figura 20

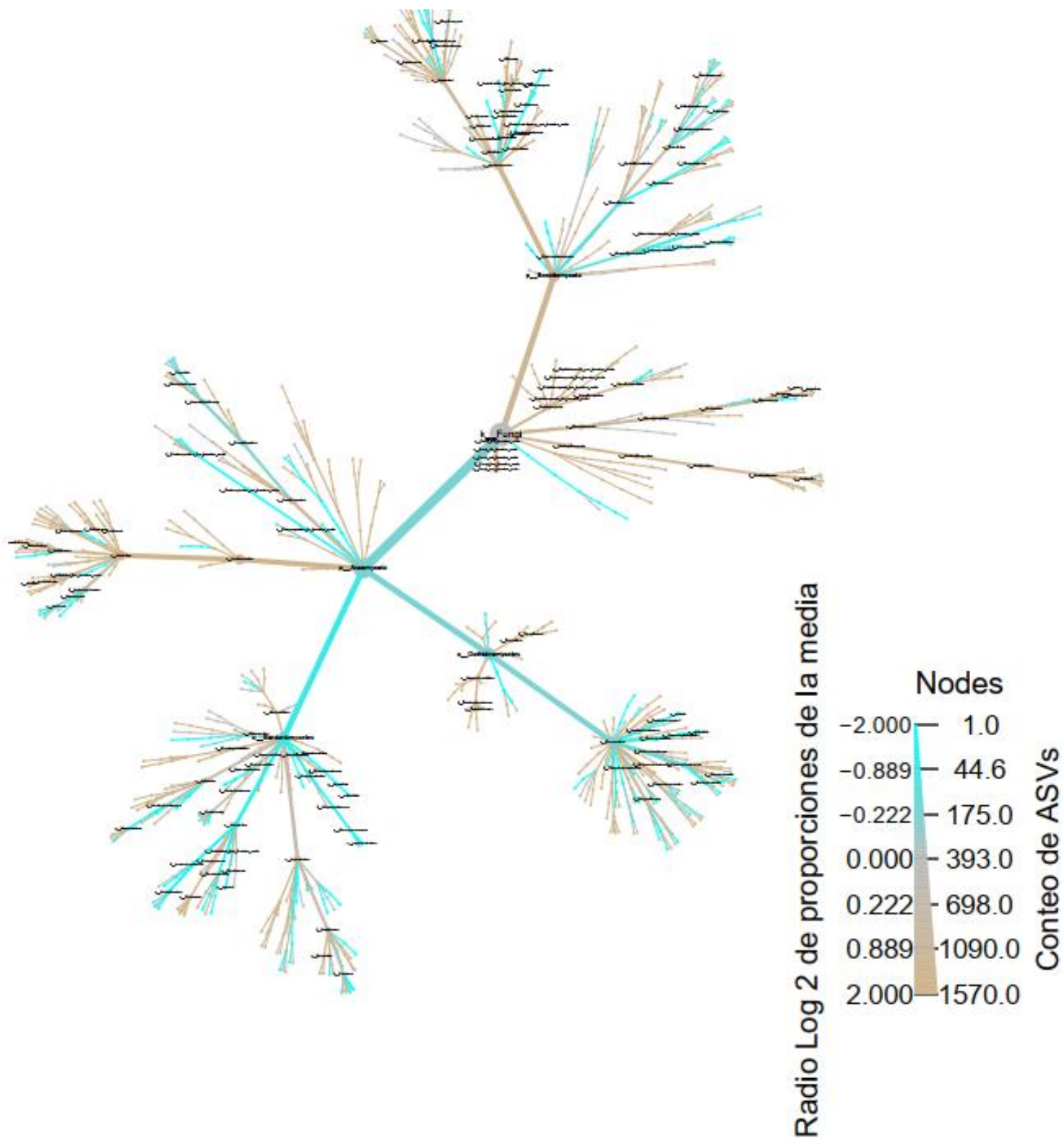
Mapa de calor respecto a la abundancia clasificada por filo de la región ITS

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

En la figura 18 se puede visualizar el árbol de calor fúngico. Este árbol nos permite visualizar la relación entre la estructura filogenética de las especies y sus perfiles de abundancia en diferentes muestras (Los gráficos en alta resolución se las puede observar en el Anexo 3).

El árbol de calor fúngico (Figura 21), se identificó que los géneros: *Exophiala*, *Microspypha*, *Fusarium*, *Cladophialophora* y *Ophiosphaerella*, se encuentran en el tratamiento remanente (celeste). Por otro lado, en el tratamiento de deflagración (gris) se encuentran los géneros: *Ophiosphaerella*, *Irregularis* y *Gaeumannomyces*. Finalmente, en predetonación (café), se encuentran géneros como: *Fusarium*, *Ophioshaerella*, *Phaeosphaeria* y *Teratiosphaeria*.

Figura 21

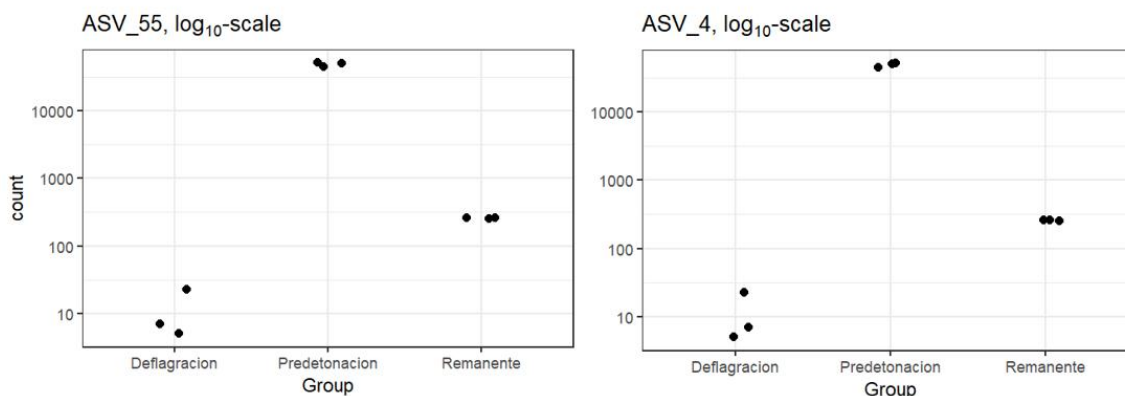
Árbol de calor fúngic

ASVs con abundancia diferencial

El análisis de abundancia diferencial (valor $p < 0.1$) reveló el ASVs con mayor abundancia en los tres tratamientos (remanente, deflagración, predetonación). El ASV 4 correspondiente al filo *Ascomycota*, familia *Phaeosphaeriaceae*, género *Paraphoma* estuvo presente en el tratamiento de predetonación con gran abundancia y el ASV 55 correspondiente igualmente al filo *Ascomycota*, familia *Nectriaceae*, género *Dactylonectria* (Figura 22). Además, en la lista también se encuentran los ASVs 22 y ASVs 82 correspondiente al filo *Ascomycota*, género *Ilyonectria* y *Dactylonectria* respectivamente. El ASVs 77 correspondiente al filo *Basidiomycota* género *Rhodospordiobolus*.

Figura 22

ASV fúngico con abundancia diferencial máxima en los tres tratamientos



Análisis de diversidad

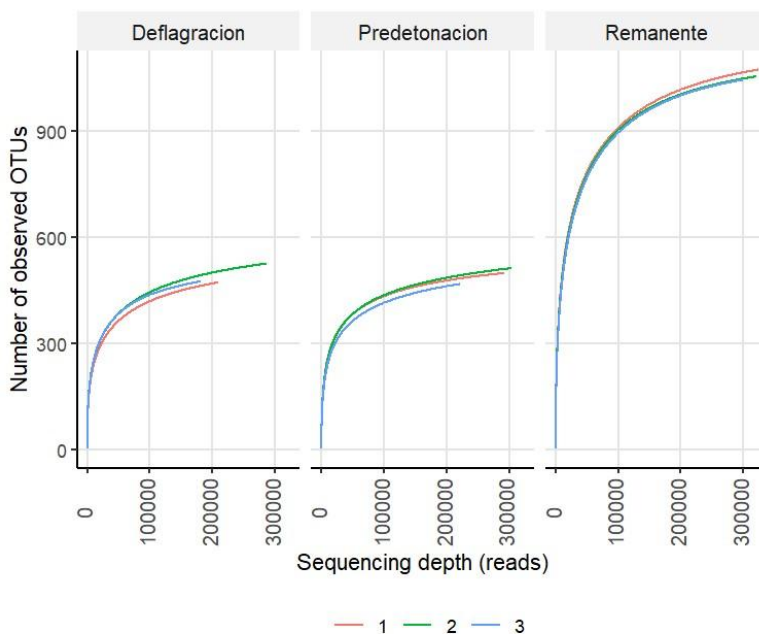
Diversidad Alfa

Las curvas de rarefacción evalúan cómo cambia el número de especies observadas a medida que aumentan las muestras secuenciadas, alcanzando alrededor de 300,000 lecturas de la región ITS. En el caso del tratamiento remanente, las asíntotas se están creando alrededor de los 1,000 ASVs, lo que sugiere que este tratamiento tiene una mayor abundancia de especies. Pero cabe recalcar que su asíntota todavía no está bien formada por lo que se

puede descubrir otras especies nuevas a medida que se secuencian más muestras. Por otro lado, en el caso de deflagración y remanente, las asíntotas se crearon alrededor de los 590, constituyéndose los dos tratamientos con menos abundancia (figura 23).

Figura 23

Curva de rarefacción de las secuencias ITS



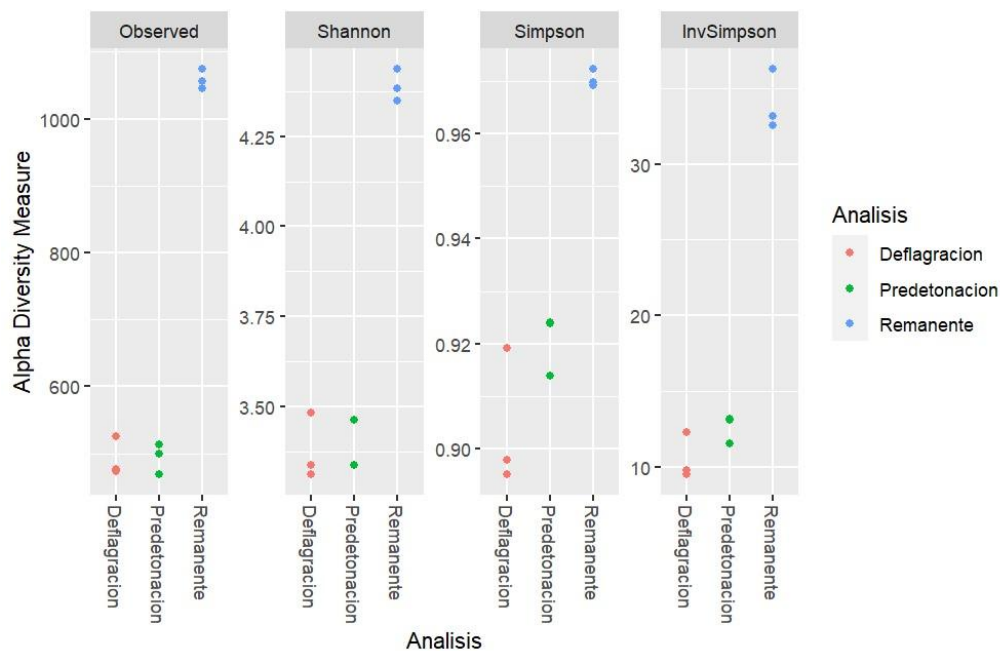
Por otro lado, la diversidad alfa fue analizada a través del cálculo de los índices de Shannon, Simpson e InvSimpson, además se analizó la diversidad observada, haciendo referencia a la diversidad propia de la muestra.

En la figura 24, el índice de Shannon se obtuvieron valores superiores a 3.0 para todas las muestras de predetonación, deflagración y remanente, lo cual se considera que son sitios con alta diversidad de especies, especialmente el tratamiento remanente, debido a que su índice es superior a 4.0. Por otro lado, el índice de Simpson de los ASVs analizados se acercan en todos los tratamientos a 1, indicando una alta diversidad, de la misma manera los pertenecientes al tratamiento remanente poseen un valor más alto. El índice de Simpson inverso corresponde al número de especies que existen en una comunidad o muestra, donde

se observa que el tratamiento con mayor diversidad es el remanente (entre 30 y 40 especies), seguido por predetonación (entre 10 y 15 especies) y finalmente se encuentra deflagración (entre 5 y 12 especies).

Figura 24

Índices de diversidad alfa para los ASVs obtenidos a partir de la región ITS

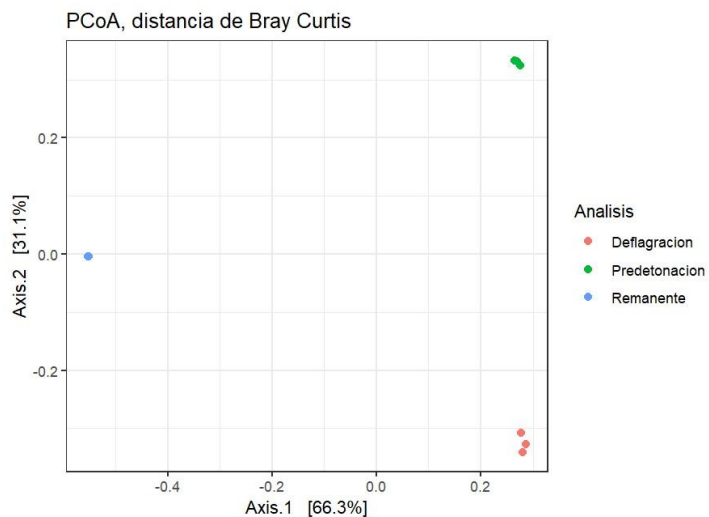


Diversidad Beta

La diversidad microbiana entre tratamientos se muestra bien agrupada en cada tratamiento cuando se analizan los ASVs encontrados (Figura 25).

Figura 25

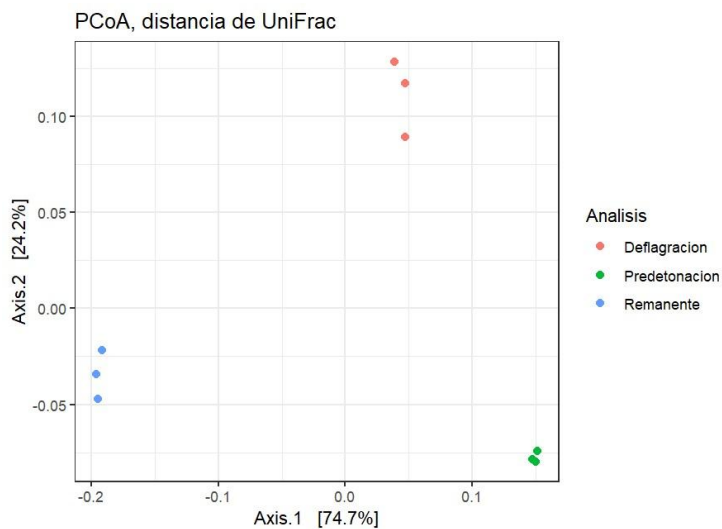
Análisis de coordenadas principales (PCoA) Bray Curtis distance



Nota. Se presenta la diferencia de la distancia en abundancia en composiciones microbianas entre tratamientos, no utiliza distancias filogenéticas

Figura 26

Análisis de coordenadas principales (PCoA) UniFrac Weighted distance



Nota. Se presenta la diferencia en composiciones microbianas entre tratamientos

Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo a través de un análisis PERMANOVA (análisis multivariado permutaciones de varianzas basado en distancias), el cual es una técnica comúnmente utilizada para en ecología y biología para determinar si hay diferencias significativas en la composición de las comunidades entre diferentes tratamientos o condiciones. En este estudio, se realizó el análisis estadístico a través del paquete “vegan” en RStudio, utilizando distancias UniFrac y Bray-Curt.

En la tabla 9, los resultados revelan un valor de F de 190,98 para la distancia UniFrac y un valor de F de 180.75 para la distancia Bray-Curt. Estos valores de F indican que hay diferencia significativa entre los tratamientos (remanente, deflagración y predetonación) en términos de composición de especies. Por otro lado, el estudio de abundancia taxonómica diferencial muestra gráficamente los conteos normalizados de los ASVs con significancia diferencial (figura 22). Además, de las diferencias significativas obtenidas en la figura 27, se muestran a los ASVs con mayor abundancia. Los hongos de familias *Leptosphaeriaceae* (ASV_2), *Didymellaceae* (ASV_12), *Didymellaceae* (ASV_16) y *Phaeosphaericaeae* (ASV_32) predominan en el tratamiento denominado “Remanente”. Por otro lado, *Leptosphaeriaceae* (ASV_1), *Ophiostomataceae* (ASV_2), *Didymellaceae* (ASV_11) y *Didymellaceae* (ASV_16) se encuentran más abundantes en deflagración: *Nectriaceae* (ASV_22). Finalmente, la familia *Leptosphaeriaceae* (ASV_2), *Didymellaceae* (ASV_12), *Phaeosphaericaeae* (ASV_32) y *Magnaporthaceae* (ASV_14) predominan en los suelos de predetonación.

Tabla 9

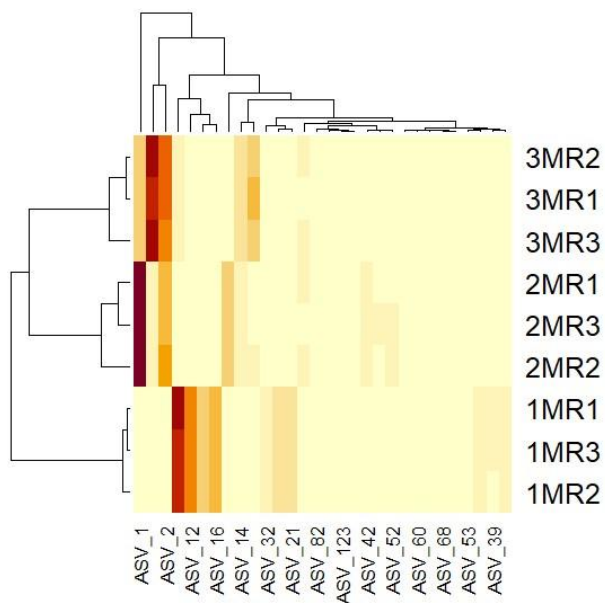
Análisis de permutación de varianzas (PERMANOVA) basado en las distancias UniFrac y Bray-Curtis para diferencias en la composición de la comunidad en base al tratamiento

Distancia Utilizada	Factores	DF	Suma de cuadrados	R2	F	Pr(>F)
UniFrac	Análisis	2	0,154	0,985	190,98	0,0037
	Residual	6	0,002	0,001		
	Total	8	0,156	1,000		
Bray-Curtis	Análisis	2	2,014	0,973	180,75	0,0037
	Residual	6	0,054	0,026		
	Total	8	2,068	1,000		

Nota. DF: Grados de libertad, F: Prueba de Fischer, Pr: Valor p. Se lograron códigos de significancia de 0,05. Se realizaron 10000 permutaciones.

Figura 27

Mapas de calor tipo 1 en función de la abundancia de ASVs



Capítulo V: Discusión

El proyecto de investigación se centró en comprender la composición y distribución de hongos presentes en las raíces de suelos de áreas de desmilitarización afectadas por compuestos derivados de municiones, con el fin de establecer perfiles taxonómicos asociados a las raíces de las plantas expuestas en suelos sometidos a tratamientos de eliminación de municiones, tales como la predetonación y deflagración. Es importante resaltar la investigación previa realizada por Frost (2021), quien destaca que los métodos de deflagración y predetonación a cielo abierto son comunes y ampliamente utilizados para la eliminación de municiones. Sin embargo, su investigación resalta los efectos adversos de estos métodos, ya que liberan residuos, como TNT, RDX, HMX, en el suelo y medio ambiente.

Los compuestos derivados de municiones tratados mediante diversos métodos químicos y físicos presentan varias desventajas, es por ello que la microbiota del suelo ofrece características atractivas y ecológicas, porque en los suelos contaminados se encuentran presentes microorganismos adecuados en su forma natural o modificados genéticamente (Kalsi et al., 2020). Aunque varios estudios se han centrado en los microorganismos degradadores de compuestos tóxicos, la información sobre las diferencias microbianas entre suelos contaminados y no contaminados con municiones es escasa. Por lo tanto, para analizar la microbiota de plantas se hipotetizó que existen perfiles taxonómicos de hongos significativamente diferentes entre de sitios contaminados y no contaminados con compuestos derivados de municiones.

Aplicaciones actuales basadas en la secuenciación de amplicón del gen ADNr ITS sugieren que es crucial que las muestras de ADN mantengan una calidad de pureza dentro del rango 1,8 a 2,0 en la proporción de absorbancia A260/280 y que la proporción A260/230 normalmente se sitúa entre 2,0 a 2,2 ng / μ L. (Bunu et al., 2020). En este proyecto, los resultados obtenidos cumplen con los estándares de pureza requeridos para la preparación de librerías en términos de la absorbancia A260/280. Sin embargo, se observa una discrepancia

en los valores de pureza para la absorbancia A260/230, los cuales se encuentran por debajo de los estándares esperados. Según Pineda-Rodríguez et al. (2023), mencionan que esta discrepancia podría atribuirse a una posible contaminación proteica o la presencia significativa de sales y/o fenoles que se absorben a 260 nm, comprometiendo así la pureza del ADN. Además, una investigación realizada por Cooper et al. (2013), han reportado que los explosivos con el RDX, HMX y TNT muestran un pico de absorbancia cerca de 230 nm, y especialmente el TNT mantenía un hombro adicional alrededor de 260 nm. A pesar de la poca estabilidad que presentó el ADN en la absorbancia A260/230, los datos provistos de la calidad de ADN por la empresa de secuenciación indican que no hubo problema en la preparación de librerías, paso en el cual incluye dichos contaminantes.

Por otro lado, el análisis de secuenciación Illumina MiSeq basado en amplicones del gen ADNr ITS (región ITS2) permitió determinar perfiles taxonómicos fúngicos en el proyecto de investigación. La región hipervariable ITS2 se ha usado ampliamente en análisis metabarcoding de comunidades fúngicas debido a su alta variabilidad en la composición de la secuencia, su capacidad para distinguir entre especies, menor variación de GC, mayor abundancia de referencias en bases de datos públicas (Das et al., 2023; C. Wang et al., 2020; R. H. Yang et al., 2018). Este estudio obtuvo un 92% de ASVs asignados taxonómicamente, lo que resultó en la obtención de 2,430,877 ASVs fúngicos. Estos resultados contrastan con el estudio realizado de Arfken et al. (2023), quienes compararon las regiones hipervariables ITS1 e ITS2, observando un 92,5% de lecturas de muestras identificadas como hongos para región ITS2, en relación con el 61,7% de lecturas para la región ITS1.

Recientemente, los enfoques de metabarcoding de ADN revelan la notable riqueza taxonómica de los hongos incluso en regiones frías donde se espera una diversidad fúngica relativamente baja (Matsuoka et al., 2021). Esto se puede confirmar con los datos obtenidos en esta investigación debido a que las muestras se tomaron en las faldas del volcán Corazón, donde sus temperaturas son bajas.

Utilizando la secuenciación por amplicon, Thouin et al. (2019) investigaron la abundancia fúngica en suelos contaminados con compuestos derivados de municiones, revelando la presencia predominante de los filos *Ascomycota*, *Basidiomycota* y *Chytridiomycetes*. Por otro lado, la investigación realizada por Wang y Pecoraro (2021), examinó las comunidades de hongos del suelo cerca al volcán Tianchi, en el noreste de China, encontrando que el filo de hongo más representativo fue *Ascomycota*, seguida por *Basidiomycota* y en menor proporción *Mucoromycotina*. Estos resultados coinciden con los obtenidos en la presente investigación, donde se observó una dominancia de los filos *Ascomycota* y *Basidiomycota* independientemente si se trataba de suelos no contaminados y suelos contaminados (predetonación y deflagración)

Ahora bien, se conoce que los filos más representativos son los *Ascomycota* y *Basidiomycota*, sin embargo, en nuestros resultados su abundancia varía, como es el caso de *Ascomycota* (Remanente: 74,4%, Deflagración: 91,1 y Predetonación:94,2%) y *Basidiomycota* (Remanente: 19,4%, Deflagración: 8% y Predetonación:2,5%), estos resultados pueden reflejar la complejidad de los ecosistemas fúngicos y su respuesta a diferentes condiciones ambientales y estrés. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Egidi et al. (2019), que destacan 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, puede que en algunos suelos se encuentren más o menos, pero siempre será el filo que más abundancia presente. Sin embargo, se necesita de estudios adicionales para entender mejor sus mecanismos en el ambiente.

Aunque el filo *Basidiomycota* se encuentra ampliamente distribuido en la mayoría de suelos, como se mencionó anteriormente, su abundancia en diferentes tipos de suelos puede verse comprometida. En este estudio dio como resultado que en suelos no contaminados con compuestos derivados de municiones (remanente) se obtuvieron mayor abundancia del filo

Basidiomycota con un 19,4%, en comparación con los suelos contaminados con compuestos derivados de municiones (deflagración y predetonación) con un porcentaje de 8 % y 2,5 % respectivamente. Estos resultados pueden compararse con el estudio realizado por Lemmel et al. (2021), quienes realizaron un estudio comparando suelos no contaminados frente a suelos contaminados con TNT, obteniendo como resultado que el filo *Basidiomycota* sufrió una reducción en su abundancia en suelos contaminados, además el estudio también se basó en comparar la abundancia de este filo con diferentes nutrientes, teniendo como resultado que el filo *Basidiomycota* se encuentra en mayor abundancia en suelos no contaminados con mayor concentración de Na y K. Esto nos puede dar una idea de porque nuestros resultados se observaron menos abundancia de especies en suelos contaminados con compuestos derivados de municiones.

Por el contrario, con el filo *Ascomycota*, se encontró mayor abundancia en suelos contaminados con compuestos derivados de municiones (deflagración y predetonación) con un 91,1 y 92,4 % respectivamente. Estos resultados pueden compararse con el estudio realizado por Challacombe et al. (2019), quienes estudiaron al filo *Ascomycota* teniendo como conclusión que este filo puede reciclar nutrientes, especialmente en la descomposición de la materia orgánica, además se podría decir que en este filo se puede encontrar diversos hongos que ayuden a la degradación de estos contaminantes debido a que se han adaptado a una condición ambiental adversa, pudiendo haber desarrollado mecanismos de resistencia y tolerancia hacia estos compuestos.

Por otro lado, se observa que el género *Gaeumannomyces* (23.2%), *Paraphoma* (15.3%) se encuentra en el tratamiento de predetonación, mientras que el género *Paraleptosphaeria* (26,2%), *Sporothrix* (12.1%), *Gaeumannomyces* (10.2%) y *Fusarium* (9.6%) en el tratamiento de Deflagración. Ambos tratamientos están contaminados con compuestos derivados de municiones y explosivos. Este hallazgo guarda relación con investigaciones previas realizadas por Abdullah Al-Dhabaan & Hassan Bakhali (2016), ya que los géneros *Fusarium* y *Drechslera*

fueron encontrados en suelos contaminados con municiones, donde concluyó que se podría utilizar para tratamientos de biodegradación de explosivos. Además, Kalderis et al. (2011), nos confirma que el género *Fusarium* puede estimular la producción de enzimas que se requieren para poder degradar el TNT.

Los ASVs con mayor abundancia diferencial fueron el ASV 55, ASV 4 y ASV 8, correspondientes al *Dactylonectria*, *Paraphoma*, *Fusarium*, respectivamente. Los géneros *Dactylonectria* y *Paraphoma* pertenecen a la familia *Nectriaceae*, el cual un estudio realizado por Rossman et al. (2013), menciona que esta familia puede establecer asociaciones simbióticas produciendo beneficios nutricionales y protección a la planta, sin embargo, no existen investigaciones específicas que estos géneros puedan ayudar en la degradación de contaminantes derivados de municiones. Por otro lado, también se obtuvo al género *Fusarium*, este género si se ha realizado diversas investigaciones. El estudio realizado por Abdullah Al-Dhabaan & Hassan Bakhali (2016), menciona que *Fusarium* es uno de los géneros que posee mayor abundancia diferencial en suelos contaminados por compuestos derivados de municiones, además de que puede tener la capacidad de degradar estos compuestos a través de diversos mecanismos enzimáticos, sin embargo, aunque *Fusarium* pueden ser uno de los microorganismos dominantes en la degradación de TNT, HMX, RDX, su abundancia relativa puede verse afectada por diversos factores. Como se vio antes *Fusarium* no era uno del género más abundante.

Otro ASVs con abundancia diferencial fue el ASV 4, identificado como *Paraphoma*. Este género se encuentra ampliamente distribuido en diferentes hábitats, algunas de estas especies se conocen como fitopatógenos que pueden causar enfermedades en las plantas (Dang & Li, 2022). No se encontró información que proporcione su importancia en suelos contaminados con compuestos derivados de municiones y explosivos.

En lo que respecta a índices de diversidad, tanto la diversidad alfa como diversidad beta reflejaron que si existe diferencia en cuanto a la composición fúngica de cada tratamiento

analizado: remanente, deflagración y predetonación. Sin embargo, las zonas contaminadas con compuestos derivados de municiones (deflagración y Remanente) poseen índices de diversidad altos (Observación, Shannon, Simpson, InvSimpson), pero comparándolo con la zona no contaminada (Remanente), se llega a la conclusión de que en zonas no contaminadas existe más diversidad de especies. Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Keshani-Langroodi et al. (2020), donde evaluaron los índices de diversidad de microorganismos presentes en sitios contaminados con TNT y en sitios no contaminados con TNT, dando como conclusión que la contaminación del suelo con TNT disminuye la diversidad general de la comunidad en suelos contaminados en comparación con suelos no contaminados. Debido a que la diversidad alfa se encuentra definida como el número de especies a nivel local (Baselga & Rodríguez, 2019).

Asimismo, en el caso de análisis estadístico a través de PERMANOVA nos dio como resultado una diferencia significativa entre especies de cada tratamiento. Este resultado se puede respaldar por Crocker et al. (2019), quienes obtuvieron diferentes especies fúngicas en suelos contaminados con RDX y DNT.

Capítulo VI: 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*, destacando los géneros

El análisis metabarcoding reveló que los miembros del filo *Ascomycota*, específicamente de la familia *Nectriaceae*, muestran una mayor abundancia relativa y

diferencial en los tratamientos de deflagración, remanente y predetonación. Este hallazgo sugiere una asociación significativa entre la presencia de estos organismos fúngicos y los procesos de deflagración y predetonación. La identificación de esta familia fúngica en mayor proporción en dichos tratamientos puede tener implicaciones importantes en la comprensión de los efectos ambientales de las actividades relacionadas con las municiones, así como en la posible función ecológica de los hongos en estos contextos.

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.

El análisis comparativo de los perfiles de hongos basados en la distancia Unifrac demostraron que existen diferencias significativas entre las comunidades fúngicas de los tratamientos. Además, el análisis PERMANOVA dio como resultado diferencias significativas entre las comunidades fúngicas en los tratamientos remanente, deflagración y predetonación.

Capítulo VII: 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 degrada 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.

Bibliografía

Abarenkov, Kessy; Zirk, Allan; Piirmann, Timo; Pöhönen, Raivo; Ivanov, Filipp; Nilsson, R.

Henrik; Kõljalg, U. (2023). UNITE general FASTA release for Fungi. *UNITE Community*.

<https://doi.org/10.15156/BIO/2938067>

Abdullah Al-Dhabaan, F. M., & Hassan Bakhali, A. (2016). Identification of contaminated soil from isolated fungi in Riyadh province. *Life Science Journal*, 13(2).

<https://doi.org/10.7537/marslsj13021609>

Adenipekun, C., & Lawal, R. (2012). Uses of mushrooms in bioremediation: A review.

Biotechnology and Molecular Biology Reviews, 7(3). <https://doi.org/10.5897/bmbr12.006>

Albright, R. D. (2012). Explosive Ordnance. *Cleanup of Chemical and Explosive Munitions*, 29–

43. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-3477-5.00004-0>

Alverbro, K., Björklund, A., Finnveden, G., Hochschorner, E., & Hägvall, J. (2009). A life cycle assessment of destruction of ammunition. *Journal of Hazardous Materials*, 170(2–3),

1101–1109. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.05.092>

Alverbro, Karin, Finnveden, G., & Sandin, P. (2011). Ethical analysis of three methods for destruction of ammunition. *Risk Management*, 13(1–2), 63–79.

<https://doi.org/10.1057/rm.2011.2>

Anasonye, F., Winqvist, E., Räsänen, M., Kontro, J., Björklöf, K., Vasilyeva, G., Jørgensen, K.

S., Steffen, K. T., & Tuomela, M. (2015). Bioremediation of TNT contaminated soil with fungi under laboratory and pilot scale conditions. *International Biodeterioration &*

Biodegradation, 105, 7–12. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2015.08.003>

Andermann, T., Antonelli, A., Barrett, R. L., & Silvestro, D. (2022). Estimating Alpha, Beta, and Gamma Diversity Through Deep Learning. *Frontiers in Plant Science*, 13(April).

<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.839407>

Anderson, M. J. (2017). Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA).

Wiley StatsRef: Statistics Reference Online, 1–15.

<https://doi.org/10.1002/9781118445112.stat07841>

Aranguren, R., Voyron, S., Ungaro, F., Cañón, J., & Lumini, E. (2023). Metabarcoding Reveals Impact of Different Land Uses on Fungal Diversity in the South-Eastern Region of

Antioquia, Colombia. *Plants*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/plants12051126>

Arfken, A. M., Frey, J. F., Carrillo, N. I., Dike, N. I., Onyeachonamm, O., Rivera, D. N., Davies, C. P., & Summers, K. L. (2023). Porcine fungal mock community analyses: Implications for mycobiome investigations. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13(February).

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.928353>

Bakir-Gungor, B., Temiz, M., Jabeer, A., Wu, D., & Yousef, M. (2023). microBiomeGSM: the identification of taxonomic biomarkers from metagenomic data using grouping, scoring and modeling (G-S-M) approach. *Frontiers in Microbiology*, 14(November).

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1264941>

Baselga, A., & Rodríguez, C. G. (2019). Diversidad alfa, beta y gamma: ¿cómo medimos diferencias entre comunidades biológicas? *Nova Acta Científica Compostelana*, 26(0).

<https://revistas.usc.gal/index.php/nacc/article/view/6413>

Bayón, G. F., Fernández, A. F., & Fraga, M. F. (2016). Bioinformatics Tools in Epigenomics Studies. *Epigenomics in Health and Disease*, 73–107. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800140-0.00004-2>

Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M.-C. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., ... Schlöter, M. (2020). Correction to: Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8(1), 1–22.

<https://doi.org/10.1186/s40168-020-00905-x>

Beviere, M., Reissier, S., Penven, M., Dejoies, L., Guerin, F., Cattoir, V., & Piau, C. (2023). The

- Role of Next-Generation Sequencing (NGS) in the Management of Tuberculosis: Practical Review for Implementation in Routine. *Pathogens*, 12(8).
<https://doi.org/10.3390/pathogens12080978>
- Biron, D. G., Hughes, A. L., Loxdale, H. D., & Moura, H. (2007). The Need for Megatechnologies: Massive Sequencing, Proteomics and Bioinformatics. *Encyclopedia of Infectious Diseases*, October, 357–377. <https://doi.org/10.1002/9780470114209.ch21>
- Boopathy, R. (2000). Bioremediation of explosives contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 46(1), 29–36. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(00\)00051-2](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00051-2)
- Brader, G., Compant, S., Vescio, K., Mitter, B., Trognitz, F., Ma, L. J., & Sessitsch, A. (2017). Ecology and Genomic Insights into Plant-Pathogenic and Plant-Nonpathogenic Endophytes. *Annual Review of Phytopathology*, 55, 61–83.
<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035641>
- Broomandi, P., Guney, M., Kim, J. R., & Karaca, F. (2020a). Soil contamination in areas impacted by military activities: A critical review. In *Sustainability (Switzerland)* (Vol. 12, Issue 21). <https://doi.org/10.3390/su12219002>
- Broomandi, P., Guney, M., Kim, J. R., & Karaca, F. (2020b). Soil Contamination in Areas Impacted by Military Activities: A Critical Review. *Sustainability 2020*, Vol. 12, Page 9002, 12(21), 9002. <https://doi.org/10.3390/SU12219002>
- Brown, S. P., Rigdon-Huss, A. R., & Jumpponen, A. (2014). Analyses of ITS and LSU gene regions provide congruent results on fungal community responses. *Fungal Ecology*, 9(1), 65–68. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.02.002>
- Buetow, K. H. (2008). Bioinformatics. *The Molecular Basis of Cancer*, 325–333.
<https://doi.org/10.1016/B978-141603703-3.10024-X>
- Bunu, S. J., Otele, D., Alade, T., & Dodoru, R. (2020). Determination of serum DNA purity among patients undergoing antiretroviral therapy using NanoDrop-1000 spectrophotometer

- and polymerase chain reaction. *Biomedical and Biotechnology Research Journal*, 4(3), 214–219. https://doi.org/10.4103/bbrj.bbrj_68_20
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 2016 13:7, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Cameron, E. S., Schmidt, P. J., Tremblay, B. J. M., Emelko, M. B., & Müller, K. M. (2021). Enhancing diversity analysis by repeatedly rarefying next generation sequencing data describing microbial communities. *Scientific Reports*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01636-1>
- Chakraborty, J., Palit, K., & Das, S. (2022). Metagenomic approaches to study the culture-independent bacterial diversity of a polluted environment—a case study on north-eastern coast of Bay of Bengal, India. *Microbial Biodegradation and Bioremediation: Techniques and Case Studies for Environmental Pollution*, 81–107. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85455-9.00014-X>
- Chakraborty, N., Begum, P., & Patel, B. K. (2022). Counterbalancing common explosive pollutants (TNT, RDX, and HMX) in the environment by microbial degradation. In *Development in Wastewater Treatment Research and Processes: Microbial Degradation of Xenobiotics through Bacterial and Fungal Approach* (Issue January). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85839-7.00012-8>
- Challacombe, J. F., Hesse, C. N., Bramer, L. M., McCue, L. A., Lipton, M., Purvine, S., Nicora, C., Gallegos-Graves, L. V., Porras-Alfaro, A., & Kuske, C. R. (2019). Genomes and secretomes of Ascomycota fungi reveal diverse functions in plant biomass decomposition and pathogenesis. *BMC Genomics*, 20(1), 1–27. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6358-x>
- Cho, S., Park, C., Lee, J., Lyu, B., & Moon, I. (2020). Finding the best operating condition in a novel process for explosive waste incineration using fluidized bed reactors. *Computers and*

- Chemical Engineering*, 142, 107054. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2020.107054>
- Comando Conjunto de las Fuerzas Armadas. (2010). *Proteccion Y Seguridad De La Poblacion Civil En El Almacenamiento Y Manejo De Municiones Y Explosivos De Fuerzas Armadas*. 1–54.
- Compson, Z. G., McClenaghan, B., Singer, G. A. C., Fahner, N. A., & Hajibabaei, M. (2020). Metabarcoding From Microbes to Mammals: Comprehensive Bioassessment on a Global Scale. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8(November), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.581835>
- Cooper, J. K., Grant, C. D., & Zhang, J. Z. (2013). Experimental and TD-DFT Study of Optical Absorption of Six. *Physical Chemistry A*, 117, 6043–6051.
- Cottrell, L., & Dupuy, K. (2021). Alternatives to Open Burning and Open Detonation: The Disparity Between HMA and Commercial Best Practices. *The Journal of Conventional Weapons Destruction*, 25(1), 107–112. <https://commons.lib.jmu.edu/cisr-journal/vol25/iss1/22>
- Crocker, F. H., Jung, C. M., Indest, K. J., Everman, S. J., & Carr, M. R. (2019). Effects of chitin and temperature on sub-Arctic soil microbial and fungal communities and biodegradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) and 2,4-dinitrotoluene (DNT). *Biodegradation*, 30(5–6), 415–431. <https://doi.org/10.1007/s10532-019-09884-9>
- Dang, S. Z., & Li, Y. Z. (2022). The Characterization and the Biological Activity of Phytotoxin Produced by *Paraphoma radicina*. *Journal of Fungi*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/jof8080867>
- Das, R., Rai, A., & Mishra, D. C. (2023). CNN_FunBar: Advanced Learning Technique for Fungi ITS Region Classification. *Genes*, 14(3). <https://doi.org/10.3390/genes14030634>
- Egidi, E., Delgado-Baquerizo, M., Plett, J. M., Wang, J., Eldridge, D. J., Bardgett, R. D., Maestre, F. T., & 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>

- Elumalai, E., & Gupta, K. K. (2021). High-Throughput Sequencing Technologies. *Bioinformatics in Rice Research: Theories and Techniques*, 283–304. https://doi.org/10.1007/978-981-16-3993-7_13/COVER
- Emiyu, K., & Lelisa, K. (2022). Review on Illumina sequencing technology. *Austin J Vet Sci & Anim Husb*, 9(1), 1–3.
- Fagorzi, C., & Mengoni, A. (2022). Endophytes: Improving Plant Performance. *Microorganisms*, 10(9), 19–21. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091777>
- Fayiga, A. O., & Saha, U. K. (2016). Soil pollution at outdoor shooting ranges: Health effects, bioavailability and best management practices. *Environmental Pollution*, 216, 135–145. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2016.05.062>
- Fonseca, N. A., Rung, J., Brazma, A., & Marioni, J. C. (2012). Tools for mapping high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 28(24), 3169–3177. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts605>
- Frost, A. (2021). Mitigating the Environmental Impact of Explosive Ordnance and Land Release. *Mine Action Review Policy Brief*, 1.
- Funk, S. B., Roberts, D. J., Crawford, D. L., & Crawford, R. L. (1993). Initial-phase optimization for bioremediation of munition compound- contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(7), 2171–2177. <https://doi.org/10.1128/aem.59.7.2171-2177.1993>
- Gentleman, R. C., Carey, V. J., Bates, D. M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., Hornik, K., Hothorn, T., Huber, W., Iacus, S., Irizarry, R., Leisch, F., Li, C., Maechler, M., Rossini, A. J., ... Zhang, J. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology*, 5(10).
- Geris, R., Soares, L. A., Cardoso, L., Neta, D. S., Pereira, N. S., Soares, M., Reis, S., & Pereira, M. D. G. (2024). *A Review about the Mycoremediation of Soil Impacted by War-like Activities : Challenges and Gaps*.

- Ghahremannezhad, H., Liu, C., & Shi, H. (2022). *Ammunition Component Classification Using Deep Learning*. <http://arxiv.org/abs/2208.12863>
- Ghosh, A., & Bhadury, P. (2019). Methods of Assessment of Microbial Diversity in Natural Environments. *Microbial Diversity in the Genomic Era*, 3–14. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814849-5.00001-0>
- Green, R. E., & Pain, D. J. (2019). Risks to human health from ammunition-derived lead in Europe. *Ambio*, 48(9), 954. <https://doi.org/10.1007/S13280-019-01194-X>
- Gupta, N. (2019). DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *Journal of Cytology*, 36(2), 116. https://doi.org/10.4103/JOC.JOC_110_18
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., Döring, M., & Sessitsch, A. (2015). The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 293–320. <https://doi.org/10.1128/membr.00050-14>
- Hernández, M., Quijada, N. M., Rodríguez-Lázaro, D., & Eiros, J. M. (2020). Bioinformatics of next generation sequencing in clinical microbiology diagnosis. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(2), 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.06.003>
- Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., & Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*, 82(11), 801–811. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>
- Jin, L., Yang, L., Li, W., Xu, D., Yang, N., Li, G., & Wan, P. (2021). Diversity and Biocontrol Potential of Culturable Endophytic Fungi in Cotton. *Frontiers in Microbiology*, 12(August), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.698930>
- Kalderis, D., Juhasz, A. L., Boopathy, R., & Comfort, S. (2011). Soils contaminated with explosives: Environmental fate and evaluation of state-of-the-art remediation processes (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry*, 83(7), 1407–1484.

<https://doi.org/10.1351/PAC-REP-10-01-05>

Kalsi, A., Celin, S. M., Bhanot, P., Sahai, S., & Sharma, J. G. (2020). Microbial remediation approaches for explosive contaminated soil: Critical assessment of available technologies, Recent innovations and Future prospects. *Environmental Technology and Innovation*, 18, 100721. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100721>

Kauserud, H. (2023). ITS alchemy: On the use of ITS as a DNA marker in fungal ecology. *Fungal Ecology*, 65, 101274. <https://doi.org/10.1016/J.FUNECO.2023.101274>

Kent, R. H. (1942). Explosives and their military applications. *Journal of Applied Physics*, 13(6), 348–354. <https://doi.org/10.1063/1.1714877>

Keshani-Langroodi, S., Lan, Y., Stenuit, B., Rosen, G., Hughes, J. B., Alvarez-Cohen, L., & Sales, C. M. (2020). Uncovering the structure and function of microbial communities formed during periodic tilling of TNT and DNT co-contaminated soils. *BioRxiv*, 215. <https://doi.org/10.1101/2020.12.12.420737>

Khan, M. A., Sharma, A., Yadav, S., Celin, S. M., Sharma, S., Noureldeen, A., & Darwish, H. (2021). Enhancing remediation of RDX-contaminated soil by introducing microbial formulation technology coupled with biostimulation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(5), 106019. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2021.106019>

Khatoun, H., Rai, J. P. N., & Jillani, A. (2020). Role of fungi in bioremediation of contaminated soil. In *Fungi Bio-prospects in Sustainable Agriculture, Environment and Nano-technology: Volume 2: Extremophilic Fungi and Myco-mediated Environmental Management*. INC. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821925-6.00007-1>

Kiiskila, J. D., Das, P., Sarkar, D., & Datta, R. (2015). Phytoremediation of Explosive-Contaminated Soils. *Current Pollution Reports*, 1(1), 23–34. <https://doi.org/10.1007/s40726-015-0003-3>

Kircher, M., & Kelso, J. (2010). High-throughput DNA sequencing - Concepts and limitations. *BioEssays*, 32(6), 524–536. <https://doi.org/10.1002/bies.200900181>

- Lamb, P. D., Hunter, E., Pinnegar, J. K., Creer, S., Davies, R. G., & Taylor, M. I. (2019). How quantitative is metabarcoding: A meta-analytical approach. *Molecular Ecology*, *28*(2), 420–430. <https://doi.org/10.1111/mec.14920>
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments*, *62*, 1–5. <https://doi.org/10.3791/3923>
- Lemmel, F., Maunoury-Danger, F., Leyval, C., & Cébron, A. (2021). Altered fungal communities in contaminated soils from French industrial brownfields. *Journal of Hazardous Materials*, *406*. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124296>
- Liebl, W. (2011). Metagenomics. *Encyclopedia of Earth Sciences Series*, *9781402092114*, 553–558. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9212-1_133/COVER
- Lima, D. R. S., Bezerra, M. L. S., Neves, E. B., & Moreira, F. R. (2011). Impact of ammunition and military explosives on human health and the environment. *Reviews on Environmental Health*, *26*(2), 101–110. <https://doi.org/10.1515/REVEH.2011.014>
- Liu, B., Gibbons, T., Ghodsi, M., Treangen, T., & Pop, M. (2011). Accurate and fast estimation of taxonomic profiles from metagenomic shotgun sequences. *BMC Genomics*, *12*(SUPPL.2), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-S2-S4>
- Liu, M., Clarke, L. J., Baker, S. C., Jordan, G. J., & BurrIDGE, C. P. (2020). A practical guide to DNA metabarcoding for entomological ecologists. *Ecological Entomology*, *45*(3), 373–385. <https://doi.org/10.1111/een.12831>
- Liu, Y. X., Qin, Y., Chen, T., Lu, M., Qian, X., Guo, X., & Bai, Y. (2021). A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data. *Protein and Cell*, *12*(5), 315–330. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00724-8>
- Mace, G. M. (2004). The role of taxonomy in species conservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *359*(1444), 711–719. <https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1454>

- Magnoli, K., Carranza, C., Aluffi, M., Magnoli, C., & Barberis, C. (2023). Fungal biodegradation of chlorinated herbicides: an overview with an emphasis on 2,4-D in Argentina. *Biodegradation*, 34(3), 199–214. <https://doi.org/10.1007/s10532-023-10022-9>
- Majaneva, M., Diserud, O. H., Eagle, S. H. C., Hajibabaei, M., & Ekrem, T. (2018). Choice of DNA extraction method affects DNA metabarcoding of unsorted invertebrate bulk samples. *Metabarcoding and Metagenomics*, 2, 1–12. <https://doi.org/10.3897/mbmg.2.26664>
- Malard, F., Dore, J., Gaugler, B., & Mohty, M. (2021). Introduction to host microbiome symbiosis in health and disease. *Mucosal Immunology*, 14(3), 547–554. <https://doi.org/10.1038/s41385-020-00365-4>
- Marchesi, J. R., & Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*, 3(1), 1–3. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5>
- Matsuoka, S., Doi, H., Masumoto, S., Kitagawa, R., Nishizawa, K., Tanaka, K., Hasegawa, M., Hobara, S., Osono, T., Mori, A. S., & Uchida, M. (2021). Taxonomic, functional, and phylogenetic diversity of fungi in a forest-tundra ecotone in Québec. *Polar Science*, 27(September 2020), 100594. <https://doi.org/10.1016/j.polar.2020.100594>
- Microbiology, M., E-mail, A. M. M., Castro, P., Parada, R., Corrial, C., Mendoza, L., Cotoras, M., Tapfuma, K. I., Nyambo, K., Baatjies, L., Keyster, M., Mekuto, L., Smith, L., Allie, N., Loxton, A. G., Malgas-Enus, R., Mavumengwana, V., Hassane, A. M. A., Taha, T. M., ... Bardosova, M. (2022). Endophytic Fungi: An Effective Alternative Source of Plant-Derived Bioactive Compounds for Pharmacological Studies. *PLoS ONE*, 12(2), 1–18. <https://doi.org/10.3390/polym13060904><https://doi.org/10.1186/s13568-020-01143-y><https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101462><http://www.springer.com/series/11224><https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.05.033><https://doi.org/10.1038/s41598-022-067>
- Naranjo-Ortiz, M. A., & Gabaldón, T. (2020). Fungal evolution: cellular, genomic and metabolic complexity. *Biological Reviews*, 95(5), 1198–1232. <https://doi.org/10.1111/brv.12605>

- Ombrello, A. K. (2020). Dada2. *Encyclopedia of Medical Immunology*, 13(7), 1–7.
https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9209-2_118-1
- Organization for Security and Co-operation in Europe. (2008). *OSCE Handbook of Best Practices on Conventional Ammunition*.
- Padial, J. M., Miralles, A., De la Riva, I., & Vences, M. (2010). The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*, 7. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-7-16>
- Panz, K., & Miksch, K. (2012). Phytoremediation of explosives (TNT, RDX, HMX) by wild-type and transgenic plants. *Journal of Environmental Management*, 113, 85–92.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.08.016>
- Paterlini, M. (2007). There shall be order. The legacy of Linnaeus in the age of molecular biology. *EMBO Reports*, 8(9), 814–816. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401061>
- Pathak, A., Jaswal, R., Xu, X., White, J. R., Edwards, B., Hunt, J., Brooks, S., Rathore, R. S., Agarwal, M., & Chauhan, A. (2020). Characterization of Bacterial and Fungal Assemblages From Historically Contaminated Metalliferous Soils Using Metagenomics Coupled With Diffusion Chambers and Microbial Traps. *Frontiers in Microbiology*, 11(June), 1–21.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01024>
- Petrea, N., Ginghina, R., Pretorian, A., Petre, R., Barsan, G., Otrisal, P., & Mosteanu, D. E. (2018). Experimental survey regarding the dangerous chemical compounds from military polygons that affect the military health and the environment. *Revista de Chimie*, 69(7), 1640–1644. <https://doi.org/10.37358/rc.18.7.6386>
- Pineda-Rodriguez, Y. Y., Pompelli, M. F., Jarma-Orozco, A., Rodríguez, N. V., & Rodriguez-Paez, L. A. (2023). A New and Profitable Protocol to DNA Extraction in *Limnospira maxima*. *Methods and Protocols*, 6(4), 2–9. <https://doi.org/10.3390/mps6040062>
- Portik, D. M., Brown, C. T., & Pierce-Ward, N. T. (2022). Evaluation of taxonomic classification and profiling methods for long-read shotgun metagenomic sequencing datasets. *BMC Bioinformatics*, 23(1), 1–39. <https://doi.org/10.1186/s12859-022-05103-0>

- Preston, J., VanZeeland, A., & Peiffer, D. A. (2021). Innovation at Illumina: The road to the \$600 human genome. *Nature Portfolio*.
- Qian, X. B., Chen, T., Xu, Y. P., Chen, L., Sun, F. X., Lu, M. P., & Liu, Y. X. (2020). A guide to human microbiome research: Study design, sample collection, and bioinformatics analysis. *Chinese Medical Journal*, *133*(15), 1844–1855.
<https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000871>
- Qin, D. (2019). Next-generation sequencing and its clinical application. *Cancer Biology and Medicine*, *16*(1), 4–10. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0055>
- Rajalingam, R., Cecka, M., & Reed, E. F. (2010). Molecular HLA Typing Methods Used in Clinical Laboratories. *Molecular Diagnostics: Techniques and Applications for the Clinical Laboratory*, 367–379. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369428-7.00030-6>
- Reuter, J. A., Spacek, D. V., & Snyder, M. P. (2015). High-Throughput Sequencing Technologies. *Molecular Cell*, *58*(4), 586–597. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.004>
- Rosa, L. H., da Silva, T. H., Ogaki, M. B., Pinto, O. H. B., Stech, M., Convey, P., Carvalho-Silva, M., Rosa, C. A., & Câmara, P. E. A. S. (2020). DNA metabarcoding uncovers fungal diversity in soils of protected and non-protected areas on Deception Island, Antarctica. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78934-7>
- Rossmann, A. Y., Seifert, K. A., Samuels, G. J., Minnis, A. M., Schroers, H. J., Lombard, L., Crous, P. W., Pöldmaa, K., Cannon, P. F., Summerbell, R. C., Geiser, D. M., Zhuang, W., ying, Hirooka, Y., Herrera, C., Salgado-Salazar, C., & Chaverri, P. (2013). Genera in Bionectriaceae, Hypocreaceae, and Nectriaceae (Hypocreales) proposed for acceptance or rejection. *IMA Fungus*, *4*(1), 41–51. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2013.04.01.05>
- Rylott, E. L., & Bruce, N. C. (2019). Right on target: using plants and microbes to remediate explosives. *International Journal of Phytoremediation*, *21*(11), 1051–1064.
<https://doi.org/10.1080/15226514.2019.1606783>
- Satam, H., Joshi, K., Mangrolia, U., Waghoo, S., Zaidi, G., Rawool, S., Thakare, R. P., Banday,

- S., Mishra, A. K., Das, G., & Malonia, S. K. (2023). Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. *Biology*, *12*(7), 1–25.
<https://doi.org/10.3390/biology12070997>
- Schnoor, J. L., Aken, B. Van, Brentner, L. B., Tanaka, S., Flokstra, B., & Yoon, J. M. (2006). Identification of Metabolic Routes and Catabolic Enzymes Involved in Phytoremediation of the Nitro- Substituted Explosives TNT , RDX , and HMX: Final Technical Report SERDP Project Number CU1317. *Serdp*, July.
- Schouten, A. (2019). Endophytic fungi: definitions, diversity, distribution and their significance in plant life. *Endophyte Biotechnology: Potential for Agriculture and Pharmacology*, 6–31.
<https://doi.org/10.1079/9781786399427.0006>
- Sharma, K., Sharma, P., & Sangwan, P. (2023). Bioremediation of RDX and HMX contaminated soil employing a biochar-based bioformulation. *Carbon Research*, *2*(1).
<https://doi.org/10.1007/s44246-023-00068-y>
- Srivastava, V., Boczkaj, G., & Lassi, U. (2022). An Overview of Treatment Approaches for Octahydro-1, 3, 5, 7-tetranitro-1, 3, 5, 7-tetrazocine (HMX) Explosive in Soil, Groundwater, and Wastewater. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *19*(23). <https://doi.org/10.3390/ijerph192315948>
- Sudermann, M. A., Foster, Z. S. L., Chang, J. H., & Grünwald, N. J. (2023). Metabarcoding for plant pathologists. *Canadian Journal of Plant Pathology*, *00*(00), 1–19.
<https://doi.org/10.1080/07060661.2023.2290041>
- Tedersoo, L., Bahram, M., Zinger, L., Nilsson, R. H., Kennedy, P. G., Yang, T., Anslan, S., & Mikryukov, V. (2022). Best practices in metabarcoding of fungi: From experimental design to results. *Molecular Ecology*, *31*(10), 2769–2795. <https://doi.org/10.1111/mec.16460>
- Tennakoon, D. S., Thambugala, K. M., Silva, N. I. d., Suwannarach, N., & Lumyong, S. (2022). A taxonomic assessment of novel and remarkable fungal species in Didymosphaeriaceae (Pleosporales, Dothideomycetes) from plant litter. *Frontiers in Microbiology*, *13*.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1016285>

Thouin, H., Battaglia-Brunet, F., Norini, M. P., Joulian, C., Hellal, J., Le Forestier, L., Dupraz, S., & Gautret, P. (2019). Microbial community response to environmental changes in a technosol historically contaminated by the burning of chemical ammunitions. *Science of the Total Environment*, 697, 1–33. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134108>

US Environmental Protection Agency. (2005). *Handbook on the Management of Munitions Response Actions, Interim Final, EPA 505-B-01-001*. May.

<http://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockkey=P100304J.txt>

Vecherskii, M. V., Semenov, M. V., Lisenkova, A. A., & Stepankov, A. A. (2021). Metagenomics: A New Direction in Ecology. *Biology Bulletin*, 48(3), S107–S117.

<https://doi.org/10.1134/S1062359022010150/FIGURES/5>

Via, S. M., & Zinnert, J. C. (2016). Impacts of explosive compounds on vegetation: A need for community scale investigations. *Environmental Pollution*, 208, 495–505.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.10.020>

Vučičević, N., Vuković, M., & Papić, M. (2022). Open Burning and Open Detonation of Explosives. Prediction of Pollutant Emissions. *Environment Protection Engineering*, 48(1), 23–34. <https://doi.org/10.37190/epe220102>

Wang, C., Zhang, Y., & Han, S. (2020). Its2vec: Fungal Species Identification Using Sequence Embedding and Random Forest Classification. *BioMed Research International*, 2020.

<https://doi.org/10.1155/2020/2468789>

Wang, X., & Pecoraro, L. (2021). Analysis of soil fungal and bacterial communities in tianchi volcano crater, Northeast China. *Life*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/life11040280>

Watkinson, S. C. (2016). Molecular Ecology. *The Fungi: Third Edition*, 189–203.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382034-1.00006-2>

Welch, L., Lewitter, F., Schwartz, R., Brooksbank, C., Radivojac, P., Gaeta, B., & Schneider, M. V. (2014). Bioinformatics Curriculum Guidelines: Toward a Definition of Core

Competencies. *PLoS Computational Biology*, 10(3).

<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003496>

- Wijayawardene, N. N., Hyde, K. D., Al-Ani, L. K. T., Tedersoo, L., Haelewaters, D., Rajeshkumar, K. C., Zhao, R. L., Aptroot, A., Leontyev, D. V., Saxena, R. K., Tokarev, Y. S., Dai, D. Q., Letcher, P. M., Stephenson, S. L., Ertz, D., Lumbsch, H. T., Kukwa, M., Issi, I. V., Madrid, H., ... Thines, M. (2020). Outline of Fungi and fungus-like taxa. *Mycosphere*, 11(1), 1060–1456. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/11/1/8>
- Willis, A. D. (2019). Rarefaction, alpha diversity, and statistics. *Frontiers in Microbiology*, 10(OCT). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02407>
- Xu, J. (2016). *Fungal DNA Barcoding*. April, 1–58. <https://doi.org/https://doi.org/10.1139/gen-2016-0046>
- Yang, R. H., Su, J. H., Shang, J. J., Wu, Y. Y., Li, Y., Bao, D. P., & Yao, Y. J. (2018). Evaluation of the ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS), specifically ITS1 and ITS2, for the analysis of fungal diversity by deep sequencing. *PLoS ONE*, 13(10), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206428>
- Yang, X., Huan, Z., Zhao, S., & Xi, H. (2023). Study on environmental pollution behavior/fate of ammunition soil and microbial remediation of TNT and its intermediates. *Journal of Cleaner Production*, 432, 139715. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2023.139715>
- Yang, X., Lai, J. long, Zhang, Y., & Luo, X. gang. (2022). Reshaping the microenvironment and bacterial community of TNT- and RDX-contaminated soil by combined remediation with vetiver grass (*Vetiveria ziznioides*) and effective microorganism (EM) flora. *Science of The Total Environment*, 815, 152856. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.152856>
- Zhang, H., Zhu, Y., Wang, S., Zhao, S., Nie, Y., Ji, C., Wang, Q., Liao, X., Cao, H., & Liu, X. (2023). Spatial-vertical variations of energetic compounds and microbial community response in soils from an ammunition demolition site in China. *Science of The Total Environment*, 875, 162553. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2023.162553>

Zhang, L., Chen, F., Zeng, Z., Xu, M., Sun, F., & Yang, L. (2021). *Advances in Metagenomics and Its Application in Environmental Microorganisms*. 12(December), 1–15.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.766364>

