



**Caracterización molecular y proteómica de hongos rizosféricos de tres especies  
arbóreas leguminosas plantadas en el centro de gestión de pasivos Auca 02 y en la  
plataforma que circunscribe el pozo petrolero Sansahuari 02 Amazonía del Ecuador**

Chicango Morales, Bertha Alexandra

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera Agropecuaria

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

Lic. Chiriboga Novillo, Carlos Eduardo, Dr.

07 de septiembre del 2023



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera Agropecuaria**

**Certificación:**

Certifico que el trabajo de integración curricular: **Caracterización molecular y proteómica de hongos rizosféricos de tres especies arbóreas leguminosas plantadas en el centro de gestión de pasivos Auca 02 y en la plataforma que circunscribe el pozo petrolero Sansahuari 02 Amazonía del Ecuador**, fue realizado por la señorita: **Chicango Morales, Bertha Alexandra**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta para verificación y/o análisis de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 07 de septiembre del 2023



CAROL ESPINOSA DE  
CARLOS EDUARDO  
CHIRIBOGA NOVILLO

**Lic. Chiriboga Novillo, Carlos Eduardo, Dr.**

C.C: 1706484613

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



### Plagiarism and AI Content Detection Report

Chicango Morales Bertha Alexandra\_ ...

#### Scan details

Scan time:  
September 7th, 2023 at 16:32 UTC

Total Pages:  
37

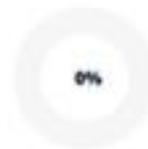
Total Words:  
9215

#### Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
Identical	1.3%	124
Minor Changes	0.2%	14
Paraphrased	0%	0
Omit 1 Words	4.2%	391

#### AI Content Detection



Text coverage		Words
AI text	0%	0
Human text	100%	8824

[LEARN MORE](#)



CARLOS EDUARDO  
CHIRIBOGA NOVILLO

Lic. Chiriboga Novillo, Carlos Eduardo, Dr.

C.C: 1706484613



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera Agropecuaria**

**Responsabilidad de Autoría:**

Yo, **Chicango Morales, Bertha Alexandra**, con cédula de ciudadanía No. 172788839-6 declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Caracterización molecular y proteómica de hongos rizosféricos de tres especies arbóreas leguminosas plantadas en el centro de gestión de pasivos Auca 02 y en la plataforma que circunscribe el pozo petrolero Sansahuari 02 Amazonía del Ecuador**, 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, 07 de septiembre del 2023

**Chicango Morales Bertha Alexandra**

C.C.: 1727888396



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**  
**Carrera Agropecuaria**

**Autorización de Publicación:**

Yo, **Chicango Morales, Bertha Alexandra**, con cédula de ciudadanía No. 1727888396 autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Caracterización molecular y proteómica de hongos rizosféricos de tres especies arbóreas leguminosas plantadas en el centro de gestión de pasivos Auca 02 y en la plataforma que circunscribe el pozo petrolero Sansahuari 02 Amazonía del Ecuador**, en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios es de mi responsabilidad.

Sangolquí, 07 de septiembre del 2023

**Chicango Morales, Bertha Alexandra**

C.C.: 1727888396

## **Dedicatoria**

Con todo el cariño para las mujeres más luchadoras y fuertes que conozco: mi madre y mis hermanas Diana, Luz Elena y Ruth.

A mí por no desistir hasta alcanzar cada meta propuesta.

Chicango Morales Bertha Alexandra

## **Agradecimientos**

A Dios, por darme la fortaleza y sabiduría en momentos difíciles, por ser generoso conmigo y poner en mi camino a personas grandiosas que han sido mi motivación y soporte en buenos y malos momentos.

A mi madre María Berta Morales por ser mi motivación, confiar en mí y enseñarme a ser una mujer valiente e independiente.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas “ESPE” a la Carrera de Ingeniería Agropecuaria “IASA I”, a los docentes que aportaron en mi formación académica y personal, y que me dieron las herramientas para poder desarrollarme como una profesional con ética y valores.

Al Dr. Wilmer E. Pozo-Rivera PhD. por sus conocimientos, su paciencia, apoyo y cariño que me brindó en mi formación académica y para el desarrollo de mi proyecto de unidad de integración curricular.

Al Dr. Carlos Chiriboga M Sc. por su interés y valiosa gestión para facilitar la realización de este trabajo.

Al Dr. Francisco Flores PhD. y a la Lic. Silvana Granda por la predisposición y valiosa orientación para llevar a cabo la inducción de técnicas moleculares.

A los técnicos del laboratorio: Ing. Xavier Paredes M Sc., Ing. Gaby Morales M Sc., e Ing Ariana Drouet, por colaborar, compartir sus conocimientos y acompañarme en el proceso de afinación de técnicas moleculares y el uso de herramientas bioinformáticas.

Al Dr. Darwin Rueda por facilitarnos el Laboratorio de Biotecnología del IASA I para realizar los ensayos requeridos en mi proyecto de investigación.

Al Ing. Miguel Tipán M Sc., por su amistad, consejos e invaluable apoyo durante cada etapa de mi formación profesional y personal.

A mis compañeros de Tesis: Jenny Villegas, Santiago Guevara, y Belén Chiriboga por su ayuda, apoyo y colaboración durante la realización de este proyecto.

A mis compañeros de aula que me acompañaron durante toda mi estancia universitaria e hicieron que esta sea mi mejor experiencia, especialmente a Wendy Guanocunga, Bryan Quinga y Jonathan Rivadeneira que tenían las palabras correctas en momentos difíciles.

Finalmente, me gustaría expresar mi gratitud al resto de mi familia y amigos por su apoyo.

## Índice de contenidos

Carátula.....	1
Certificación: .....	2
Resultados de la herramienta para verificación y/o análisis de similitud de contenidos.....	3
Responsabilidad de Autoría:.....	4
Autorización de Publicación:.....	5
Dedicatoria .....	6
Agradecimientos .....	7
Índice de contenidos .....	9
Índice de tablas .....	13
Índice de figuras .....	14
Resumen .....	15
Abstract .....	16
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>17</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>17</b>
Antecedentes .....	17
Justificación .....	18
Objetivos.....	19
<i>Objetivo general.....</i>	<i>19</i>
<i>Objetivos específicos.....</i>	<i>20</i>
Hipótesis .....	20
<i>Hipótesis Ho .....</i>	<i>20</i>
<i>Hipótesis Hi.....</i>	<i>20</i>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>21</b>
<b>MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>21</b>

Amazonía Ecuatoriana .....	21
Zonas de estudio .....	22
Especies arbóreas estudiadas .....	22
Hongos rizosféricos .....	22
Técnicas moleculares .....	23
Caracterización proteómica .....	23
Caracterización molecular .....	24
PCR .....	24
Elementos para la reacción PCR .....	24
<i>Master Mix</i> .....	24
<i>ADN</i> .....	25
<i>Taq ADN polimerasa</i> .....	25
<i>Primers o cebadores</i> .....	25
<i>ITS</i> .....	25
<i>dNTPs</i> .....	26
<i>Ión magnesio (Mg +)</i> .....	26
<i>Buffer</i> .....	26
<i>Agua ultrapura</i> .....	26
Fases de la PCR .....	27
<i>Desnaturalización</i> .....	27
<i>Alineamiento</i> .....	27
<i>Elongación</i> .....	27
Secuenciación del genoma .....	27
<i>Secuenciación sanger</i> .....	28
Análisis filogenético .....	29

Índice de diversidad Simpson (1-D).....	29
Índice de Diversidad de Shannon (H').....	29
Índice de equitatividad de Pielou (J') .....	29
Chao 1 .....	29
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>31</b>
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>31</b>
Zonas de estudio.....	31
<i>Zona Sansahuari</i> .....	31
<i>Zona Auca</i> .....	31
Fase de Laboratorio .....	31
Preparación de medios de cultivo.....	32
<i>Medio sólido</i> .....	32
<i>Medio Líquido</i> .....	32
Acondicionamiento de hongos rizosféricos del cepario .....	32
<i>Activación de muestras del cepario</i> .....	32
<i>Selección de cepas</i> .....	33
<i>Siembra en medio líquido</i> .....	34
Identificación de microorganismos mediante Espectrometría De Masas (MALDI-TOF).....	34
Identificación molecular de los hongos seleccionados. ....	35
Extracción de ADN .....	35
Determinación de la Integridad, concentración y pureza de ADN .....	36
<i>Dilución del material genético extraído</i> .....	37
Amplificación de la región ITS mediante PCR.....	38
Determinación del tamaño de los amplicones .....	39
Secuenciación .....	39

Obtención de las secuencias consenso .....	39
Análisis filogenético.....	40
Análisis de la abundancia riqueza y diversidad .....	40
<b>CAPITULO IV</b> .....	<b>42</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>42</b>
Activación de cepas .....	42
<i>Caracterización proteómica</i> .....	42
Caracterización molecular.....	43
Obtención del material genético .....	43
Pureza y cuantificación del ADN.....	44
Evaluación de la integridad .....	45
Amplificación de la región ITS .....	46
<i>Identificación molecular de las cepas de hogos rizosféricos</i> .....	48
Análisis de biodiversidad de la zona Auca 02 y Sansahuari 02.....	51
<b>CAPÍTULO V</b> .....	<b>55</b>
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	<b>55</b>
Conclusiones .....	55
Recomendaciones.....	56
<b>Bibliografía</b> .....	<b>57</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla 1</b> <i>Muestras seleccionadas de la zona PCPP</i> .....	33
<b>Tabla 2</b> <i>Muestras seleccionadas de la zona GCP</i> .....	33
<b>Tabla 3</b> <i>Valores referenciales de pureza</i> .....	37
<b>Tabla 4</b> <i>Cantidades utilizadas para la Master Mix</i> .....	38
<b>Tabla 5</b> <i>Condiciones para la amplificación del gen ITS</i> .....	39
<b>Tabla 6</b> <i>Datos de cepas activadas</i> .....	42
<b>Tabla 7</b> <i>Especies identificadas con MALDI-TOF</i> .....	42
<b>Tabla 8</b> <i>Resultados de calidad del ADN</i> .....	44
<b>Tabla 9</b> <i>Especies de hongos identificados de acuerdo con la secuenciación en las zonas PCPP y CGP</i> .....	48
<b>Tabla 10</b> <i>Análisis de la Biodiversidad según el nivel de contaminación</i> .....	52
<b>Tabla 11</b> <i>Especies fúngicas localizadas por especie Arborea</i> .....	53

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b>	<i>Secuenciación sanger</i> .....	28
<b>Figura 2</b>	<i>Medios líquidos inoculados</i> .....	34
<b>Figura 3</b>	<i>Sobrenadante del procedimiento para extracción de ADN</i> .....	35
<b>Figura 4</b>	<i>Secuencias Consenso en el software Geneious Prime</i> .....	40
<b>Figura 5</b>	<i>Secuencias alineadas en el software MEGA 11</i> .....	40
<b>Figura 6</b>	<i>Integridad del ADN extraído</i> .....	46
<b>Figura 7</b>	<i>Resultados de la corrida electroforética</i> .....	47
<b>Figura 8</b>	<i>Índice de Shannon (H') de las dos zonas de estudio PCPP Y CGP</i> .....	53
<b>Figura 9</b>	<i>Índice de Shannon según la diversidad por especie arbórea</i> .....	54

## Resumen

Con el creciente impacto de la explotación petrolera en la región Amazónica, la comprensión del cómo los microorganismos del suelo pueden influir en la adaptación de las plantas a las condiciones cambiantes del entorno, se ha vuelto crucial. Por ello el presente trabajo se estudió la identidad específica y la biodiversidad de hongos rizosféricos presentes en tres especies arbóreas leguminosas, plantadas dos áreas de interés ecológico en la Amazonía ecuatoriana: el Centro de Gestión de Pasivos Auca 02 y la plataforma que circunscribe al pozo petrolero Sansahuari 02. Se recuperaron cepas aisladas de estudios anteriores, del total de aislamientos activados se seleccionaron 10 para el análisis avanzado de secuenciación genómica y proteómica. La caracterización proteómica MALDI-TOF permitió identificar a *Aspergillus niger* y *Aspergillus terreus* que presentaron un 76 y 77.90 % de similitud, respectivamente. Dentro del proceso de caracterización molecular se estableció un protocolo para realizar la extracción del ADN genómico con el que se logró la extracción del 90% de las 10 cepas seleccionadas. Posteriormente, se amplificó la región ITS ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) cuyos amplicones se enviaron a secuenciar a Macrogen por el método Sanger. Las secuencias crudas del ADN obtenidas fueron ensambladas y curadas, las cuales se compararon con las depositadas en el GenBank utilizando la herramienta BLAST de la National Center for Biotechnology Information (NCBI). Se obtuvo valores entre 99,29 y 100 % de similitud mismos que corroboraron la identidad de las cepas. Los análisis ecológico-matemáticos mostraron que la diversidad está estrechamente ligada a la especie arbórea y no al nivel de contaminación.

**Palabras clave:** ADN, SECUENCIACIÓN, DIVERSIDAD, CONTAMINACIÓN

## Abstract

With the increasing impact of oil exploitation in the Amazon region, understanding how soil microorganisms can influence plant adaptation to changing environmental conditions has become crucial. Therefore, the present work studied the specific identity and biodiversity of rhizospheric fungi present in three leguminous tree species, planted in two areas of ecological interest in the Ecuadorian Amazon: the Auca 02 Liability Management Center and the platform surrounding the Sansahuari 02 oil well. Strains isolated from previous studies were recovered; from the total number of activated isolates, 10 were selected for advanced genomic and proteomic sequencing analysis. MALDI-TOF proteomic characterization allowed the identification of *Aspergillus niger* and *Aspergillus terreus*, which showed 76 and 77.90 % similarity, respectively. As part of the molecular characterization process, a protocol was established for the extraction of genomic DNA, with which 90% of the 10 selected strains were extracted. MALDI-TOF proteomic characterization allowed the identification of *Aspergillus niger* and *Aspergillus terreus* with 76 and 77.90% similarity, respectively. As part of the molecular characterization process, a protocol was established for the extraction of genomic DNA, with which 90% of the 10 selected strains were extracted. Subsequently, the ITS region ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) and ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATATGC) were amplified and the amplicons were sent to MacroGen for sequencing by the Sanger method. The raw DNA sequences obtained were assembled and curated, which were compared with those deposited in GenBank using the BLAST tool of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). Values between 99.29 and 100 % similarity were obtained, which corroborated the identity of the strains. Ecological-mathematical analyses showed that diversity is closely linked to the tree species and not to the level of contamination.

**Keywords:** DNA, SEQUENCING, DIVERSITY, CONTAMINATION

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

### Antecedentes

La región amazónica es considerada como una zona con presencia de una gran biodiversidad y recursos naturales (Bravo-Medina *et al.*, 2017). Debido a los hallazgos petroleros hicieron de ella un punto cardinal de la economía del Ecuador. En el proceso de extracción petrolera, las empresas multinacionales han utilizado prácticas tecnológicas poco amigables con el medio ambiente, lo que trajo consigo serios problemas de contaminación ambiental (Pino *et al.*, 2019), siendo éstos la deforestación y pérdida de biodiversidad (Del Pozo, 2002).

En los ecosistemas terrestres existen especies vegetales mismas que en ocasiones establecen relaciones simbióticas con los diversos microorganismos presentes en la rizósfera. La rizosfera es considerada como un reservorio fúngico de importancia en el que se encuentra micro hábitats, mismos tienen efecto sobre la diversidad de hongos favoreciendo a su incremento Ferrera *et al.*, (2006) menciona que, debido a las actividades ligadas a el proceso de explotación de crudo y sus derivados la contaminación del suelo y agua ha aumentado considerablemente.

Una de las técnicas de biorremediación es la utilización de microorganismos que transforman diferentes compuestos nocivos en otros de menor impacto ambiental. La biorremediación es un proceso en el que tiene lugar la degradación de compuestos tóxicos presentes en el suelo por diversas actividades que pueden llegar a modificar su estructura y para ello estudios previos han empleado con mayor frecuencia bacterias sin embargo es posible usar otros organismos como hongos, algas, cianobacterias y actinomicetos para la (Torres, 2003). Ferrera *et al.*, (2006) establece que la capacidad para degradar residuos que posee el microorganismo es uno de los factores a tomar en cuenta para ser usado dentro de un

método de tratamiento biológico cabe mencionar que en los últimos años la biorremediación ha presentado avances tecnológicos mismos que han permitido su optimización.

La biorremediación con hongos se basa en su metabolismo, el cual tiene la capacidad de degradar hidrocarburos que tengan un peso molecular superior, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPS), cuyos compuestos son altamente tóxicos y complejos de degradar (Luna, 2013). Además, Simbaña (2016) establece de acuerdo a estudios previos que hongos del género *Aspergillus* tienen la capacidad de crecer, desarrollarse y aportar a la desintoxicación de los suelos perturbados.

Investigaciones previas realizadas en suelos contaminados por hidrocarburos (Sosa, 2018; Quinsasamín, 2019; Remache, 2020; Vega, 2021), evaluaron diversas especies arbóreas como parte del proceso de fitorremediación, aislaron e identificaron morfológicamente hongos encontrados en la rizósfera. Es conocido que la identificación morfoespecífica puede conllevar errores, por lo se vio la necesidad de una identificación de las especies a nivel molecular, para de esta manera corroborar la identidad de los microorganismos encontrados y que están actuando en el proceso de biorremediación del suelo contaminado por hidrocarburos.

### **Justificación**

Las zonas Sansahuari 02 y Auca 02 ubicadas en la provincia de Orellana representa un sitio de importancia económica para el Ecuador ya que alberga varios pozos petroleros. Sin embargo, las repercusiones de la actividad petrolera y sus actividades anexas requieren de estrategias y alternativas eficientes e innovadoras que contribuyan a mitigar los efectos producidos por los derrames petroleros y conservar el medio ambiente. Entre estos procesos, la interacción simbiótica entre las plantas y los microorganismos del suelo desempeña un papel esencial en la salud y la productividad de los ecosistemas. En particular, los hongos rizosféricos asociados a las plantas leguminosas han demostrado tener un impacto significativo en la

nutrición de las plantas, la disponibilidad de nutrientes en el suelo y la resistencia a estrés biótico y abiótico.

La explotación petrolera en la Amazonía del Ecuador ha llevado a un crecimiento industrial y una mayor presión sobre los ecosistemas naturales en la región. La extracción de petróleo y las actividades asociadas pueden tener un impacto negativo en la biodiversidad y la calidad del suelo, afectando así la salud de los sistemas ecológicos locales. En este contexto, es fundamental comprender cómo los microorganismos del suelo, en particular los hongos rizosféricos, pueden contribuir a la adaptación y resiliencia de las especies vegetales en estas áreas impactadas.

Este proyecto de investigación se enfoca la identificación de hongos rizosféricos de tres especies arbóreas leguminosas plantadas tanto en el Centro de Gestión de Pasivos (CGP) Auca 02, como en la Plataforma que Circunscribe el Pozo Petrolero (PCPP) Sansahuari 02, ubicados en la Amazonía del Ecuador. Los enfoques principales de este trabajo fueron la caracterización a nivel molecular y proteómico de los hongos registrados, así como la evaluación de la diversidad fúngica en estos dos tipos de suelos contaminados (CGP y PCPP).

Los resultados de esta investigación podrían tener implicaciones importantes para la restauración y manejo sostenible de ecosistemas impactados por la industria petrolera en la Amazonía ecuatoriana. Además, contribuirían al conocimiento general de los procesos de simbiosis planta-microorganismo y su relevancia para la ecología y la conservación de los ecosistemas tropicales.

## **Objetivos**

### ***Objetivo general***

Caracterizar molecular y proteómicamente los hongos rizosféricos de tres especies arbóreas leguminosas plantadas en el centro de gestión de pasivos Auca 02 y en la plataforma que circunscribe el pozo petrolero Sansahuari 02 Amazonía del Ecuador.

### **Objetivos específicos**

Activar las cepas de hongos rizosféricos provenientes de suelos afectados por procesos de extracción petrolera de las zonas Auca 02 y Sansahuari 02 de la Amazonía del Ecuador.

Extraer proteínas de las cepas de hongos rizosféricos para la posterior lectura en el espectrómetro de masas (MALDI-TOF).

Amplificar el ADN ribosómico (región ITS, *Internal Transcribed Spacer*) mediante la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para cada una de las muestras provenientes de dos tipos de contaminación del suelo.

Comparar la abundancia riqueza y diversidad de especies entre tipos de suelos contaminados por actividades asociadas a la extracción petrolera.

### **Hipótesis**

#### ***Hipótesis Ho***

El tipo de perturbación del suelo no altera la abundancia, riqueza y diversidad de especies de hongos rizosféricos de los árboles leguminosos.

#### ***Hipótesis Hi***

El tipo de perturbación del suelo altera la abundancia, riqueza y diversidad de especies de hongos rizosféricos de los árboles leguminosos.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### **Amazonía Ecuatoriana**

La región amazónica del Ecuador está conformada por las seis provincias: Morona Santiago, Napo, Orellana, Pastaza, Sucumbíos, y Zamora (Secretaría Técnica de la Circunscripción Territorial Especial Amazónica [STCTEA], 2021); además, representan el 1,5% de la macrocuenca amazónica (López, 2013) y en ella se encuentra establecida un sin número de especies que la hacen una zona megadiversa.

Esta región al ser muy extensa presenta alturas diferentes que dan lugar a un abanico de nichos ecológicos en los que varían las especies de acuerdo a las condiciones que este hábitat presenta (Valdez, 2003). La Amazonía es una de las fuentes más importantes de agua dulce y posee una gran diversidad tanto en flora como en fauna (López *et al.*, 2013), en donde se encuentran registrados 7 000 especies de plantas vasculares, 183 especies de mamíferos, 761 de aves, 219 de reptiles, 285 de anfibios y 655 de peces (Instituto Nacional de Biodiversidad [INABIO], 2021).

La Cuenca Amazónica posee recursos estratégicos para el abastecimiento energético que impulsan la economía del Ecuador (STCTEA, 2021) como lo es el crudo de petróleo que es explotado y comercializado (López *et al.*, 2013). Diferentes hidrocarburos, o moléculas compuestas principalmente de carbono e hidrógeno, forman el petróleo, un tipo de combustible natural. Estas moléculas pueden tener una variedad de estructuras y pueden estar formadas por cadenas largas o cortas de átomos de carbono (Simbaña, 2016).

El proceso que se lleva a cabo para la explotación petrolera ha generado impactos dentro del ecosistema, de acuerdo con Bravo (2007) la contaminación de suelo generada por derrames de petróleo, residuos y sus compuestos asociados deja como consecuencia un sustrato inerte debido a que suprime los microorganismos del suelo, produciéndose un

desequilibrio ecológico general ya que los compuestos solventes se filtran, y los sólidos y grasas permanecen en la superficie.

Hernández *et al.*, (2003) mencionan que, en suelos con una estructura afectada debido a la impregnación de petróleo, se crea un hábitat idóneo para ciertos microorganismos que emplean al compuesto como fuente de carbono, para sus funciones metabólicas.

### **Zonas de estudio**

Dentro de las Zonas de estudio se tiene CGP que es lugar específico donde se construyen plataformas de tratamiento de hidrocarburos (lavado y secado de suelos) conocido como AUCA 02 y PCPP que es una plataforma base implantada alrededor del pozo para la extracción del crudo denominado Sansahuari 02 (Ulcuango *et al.*, 2014).

### **Especies arbóreas estudiadas**

Las especies arbóreas de donde provienen las cepas de hongos corresponden a *Platymiscium pinnatum*, *Zygia longifolia* y *Piptadenia pteroclada* (Sosa, 2018; Quinsasamín, 2019; Remache, 2020; Vega, 2021). Estas especies pertenecen al phylum Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, orden Fabales y Familia Fabaceae.

### **Hongos rizosféricos**

La rizósfera comprende el área alrededor de la raíz de la planta misma que cuenta con la presencia de una comunidad de microorganismos dependientes de los compuestos liberados por la raíz. Se divide en tres partes: la endorizósfera, comprendida por el córtex y la endodermis de la raíz; el rizoplano, con media directamente adyacente a la raíz y la ectorizósfera que es la zona más externa y se extiende hacia el suelo (Guerrero, 2018).

En la actualidad el hombre usa los hongos en diversas actividades como en la industria alimenticia, farmacéutica y biotecnológica. Debido a su abundancia y diversidad, los hongos desempeñan un papel ecológico muy importante (Cepero *et al.*, 2012). Para que un ecosistema mantenga su equilibrio, este depende en gran medida de los microorganismos presentes y su

actividad en el suelo, ya que estos son los protagonistas de diversas acciones benéficas, neutrales e incluso perjudiciales, aunque estas últimas en menor medida.

Las interacciones entre microorganismos (bacterias y hongos) y el sistema radicular de las plantas han jugado un papel determinante en la adaptación y productividad de las especies vegetales a través del tiempo (Velasco *et al.*, 2020). Los microorganismos poseen capacidades importantes dentro del ecosistema, las más importantes son la simbiosis que se genera entre planta y hongo que facilita la captación de nutrientes, mejora la estructura del suelo, descompone sustancias nocivas en el ecosistema, defiende a las plantas de los patógenos y producen hormonas vegetales que promueven la formación de raíces, (Jaizme-Vega y Rodríguez, 2008).

Medina *et al.*, (2014), menciona que las asociaciones microbianas, al estar integradas por varias cepas de diferentes géneros, tienen la capacidad enzimática necesaria para realizar el proceso de transformación de las diferentes moléculas constitutivas de los hidrocarburos, transformando las moléculas con características de peligrosidad (inflamabilidad, toxicidad, ecotoxicidad, volatilidad) en subproductos y metabolitos con capacidad de ser reincorporados a los ciclos biogeoquímicos naturales, generando un menor impacto al ambiente. Según Guerrero (2018) las cepas más comunes de hongos, que han sido aisladas de suelos perturbados pertenecen al grupo Ascomycota y Sordariomycetes.

### **Técnicas moleculares**

De acuerdo con Zambrano (2020) las técnicas moleculares permiten detectar el material genético de forma indirecta con los análisis de proteínas, o de forma directa mediante un análisis de ADN.

### **Caracterización proteómica**

Un método rápido y sencillo para identificar microorganismos es la espectrometría de masas, también conocida como *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass*

*spectrometry* (MALDI-TOF), este método crea espectros basados en perfiles de proteínas específicos (Bonifaz *et al.*, 2014; Relloso *et al.*, 2015).

### **Caracterización molecular**

La identificación molecular se basa en la composición constitutiva de los ácidos nucleicos más que en los productos de su expresión (Rodríguez-Lázaro y Hernández, 2006). Según Stamboulian (2019) estas técnicas permiten la detección de material genético (ácidos nucleicos), tanto ADN como ARN, que constituyen la característica inequívoca de especie y dentro de la microbiología la caracterización molecular permite la detección de porciones de ácidos nucleicos (ADN o ARN) que son específicos de cada microorganismo á (Diz, 2020).

### **PCR**

Una secuencia de ADN específica puede amplificarse millones de veces a lo largo de numerosos ciclos repetitivos durante la reacción en cadena de la polimerasa, es una reacción enzimática *in vitro* creada de acuerdo con los principios naturales de la replicación del ADN (Roche, 2019; Tamay de Dios *et al.*, 2013). Para dar lugar a la reacción de cadena de polimerasa se da un proceso comprendido de tres pasos (Desnaturalización, Alineación, Extensión) designado como un ciclo, que se repite un número específico de veces de acuerdo a lo establecido, se lo realiza en un termociclador, esta es un equipo que controla y cambia automáticamente la temperatura durante los ciclos programados (Roche, 2019) Después de este método se utiliza un gel de agarosa con un intercalador fluorescente no específico para la detección de amplificación (Diz, 2020).

### **Elementos para la reacción PCR**

#### ***Master Mix***

La preparación de esta solución tiene como objetivo minimizar las etapas de manipulación y reducir el riesgo de contaminación (Biotools, 2009).

La preparación de una “*Master Mix*” (mezcla de componentes) que se adiciona a todas

las muestras y en un orden específico (del componente que aporta mayor cantidad al de menor cantidad) agua bidestilada, buffer 10X, MgCl<sub>2</sub>, primers forward y reverse del gen del interés, ADN y Taq polimerasa (Márquez *et al.*, 2014).

### **ADN**

Para PCR es conocido también como templado o ADN molde, que es la muestra de ADN a partir del cual se va a obtener una copia de un fragmento, en otras palabras, es el ADN que queremos amplificar (Pérez, 2015).

### **Taq ADN polimerasa**

Es una enzima termoestable, proviene de una bacteria Gram negativa, termófila llamada *Thermus aquaticus* (Tamay de Dios *et al.*, 2013), una eubacteria aeróbica extremadamente termófila que se desarrolla a temperaturas superiores a 70, debido a esto la actividad enzimática óptima de la ADN Taq polimerasa se expresa aproximadamente a 72 °C (QIAGEN, 2023b).

### **Primers o cebadores**

Son oligonucleótidos conocidos también como cebadores (Rodríguez, 2009). Son segmentos de ADN complementarias de 15 a 30 bases de cadena simple, diseñados específicamente para la secuencia de ADN molde a investigar (Mendeluk y Palaoro, 2020).

Cabe mencionar que para la reacción de PCR se usan un par de cebadores para definir los extremos del producto que va a amplificarse, y a partir de ellos la ADN polimerasa inicia la adición de nucleótidos en dirección 5'-3'. Estos cebadores son denominados forward (iniciador hacia adelante) y reverse (iniciador reverso) según los extremos con que hibridan en la secuencia molde (González *et al.*, 2023).

### **ITS**

La región espaciadora transcrita interna del ADN ribosómico (ITS) es ampliamente utilizada en taxonomía y análisis de filogenia molecular, principalmente en hongos y plantas

(Andrade *et al.*, 2020).

El ITS1 forward (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') se refiere a una región del ADN que se encuentra entre los genes ribosomales 18S y 5.8S (Hurtado *et al.*, 2023), el ITS-4 reverse (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') corresponde al gen 28S ADNr (Ramirez y De La Torre, 2008) en el ADN ribosomal de los organismos eucariotas. Esta región se utiliza para identificar especies de hongos y plantas.

### ***dNTPs***

Son los desoxirribonucleótidos trifosfatados (adenina, timina, citocina y guanina) que usan la ADN polimerasa para generar la hebra de ADN hija a partir del molde (Mendeluk y Palaoro, 2020).

### ***Ión magnesio (Mg<sup>+</sup>)***

Los iones Mg<sub>2+</sub> en conjunto con dNTP forman complejos solubles que son de importancia para la incorporación de compuestos; aumenta la temperatura de fusión de la interacción cebador/molde de ADN, estabiliza la interacción entre las dos cadenas y estimula la actividad de la polimerasa (Ibian Tech, 2023).

### ***Buffer***

Solución amortiguadora que aporta principalmente a la regulación del pH óptimo para la funcionalidad de la enzima ADN polimerasa, y el ion Mg (Mendeluk y Palaoro, 2020).

### ***Agua ultrapura***

Stambouliau (2019) establece que para la PCR el agua (H<sub>2</sub>O) debe estar libre de DNAsas y RNAsas y esta se obtiene mediante un proceso que a partir de un desionizador que presenta un cartucho depurador y una lámpara UV que permite la eliminación de la materia orgánica presente en el agua.

## **Fases de la PCR**

### ***Desnaturalización***

Es la primera fase de un ciclo de PCR, consiste en denaturalizar mediante calentamiento ( típicamente a 95°C durante 1 minuto) las dos cadenas de ADN (Oliva y Vidal, 2006). En esta etapa los enlaces hidrógeno que unen las cadenas y que individualmente son débiles, se rompen debido al incremento de temperatura. Las dos cadenas de ADN ahora disociadas permanecen libres en la solución hasta que la temperatura sea reducida para favorecer el alineamiento de los primers (Piedra, 2002).

### ***Alineamiento***

La segunda fase de un ciclo de PCR consiste en hibridar dos oligonucleótidos (primers) diseñados de tal forma que sean complementarios a los extremos de la región que se quiere amplificar (ADN molde). La hibridación suele realizarse típicamente a una temperatura entre 37 °C y 60 °C durante 1 minuto (Oliva y Vidal, 2006).

### ***Elongación***

Es la última fase y suele durar típicamente 1 minuto a una temperatura de 72°C (Oliva y Vidal, 2006) para favorecer la actividad de la Taq polimerasa, la misma que a continuación realiza la extensión de la cadena nueva, produciendo una cadena complementaria a la cadena de ADN molde en la región determinada por los primers incorporando desoxirribonucleótidos a partir de cada terminal 3' de los cebadores (Piedra, 2002).

## **Secuenciación del genoma**

La identificación de microorganismos resulta de la comparación de la secuenciación de los productos amplificados mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con secuencias ya conocidas que reposan en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Diz, 2020). El orden de las bases nitrogenadas que presenta la muestra determina la secuencia de ADN con la que se realiza la comparación y resulta en un

% de identidad y semejanza a secuencias de la base de datos.

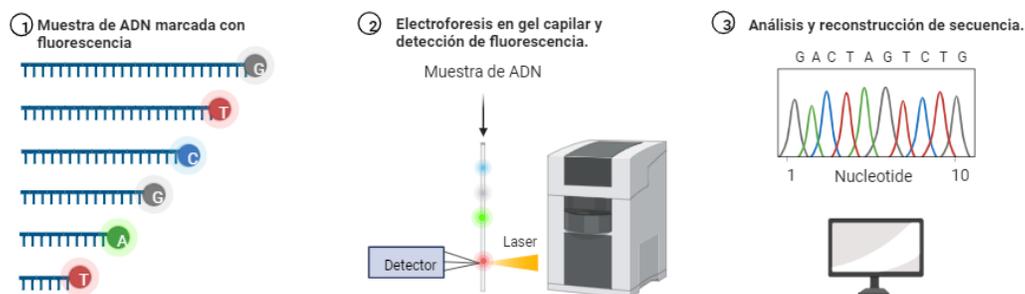
### **Secuenciación sanger**

Es una de las técnicas más usadas para el análisis que emplea la electroforesis capilar, permitiendo la determinación del orden de las bases nitrogenadas mediante la separación de colores, implica una previa reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Márquez *et al.*, 2014). Este método se basa en la capacidad de la ADN polimerasa para generar cadenas de diferentes tamaños de ADN complementario a una cadena patrón, esto debido a que en la mezcla de reacción son incluidos los cuatro dideoxynucleótidos (ddNTP) marcados con fluorescencia diferencial, que al ser incorporados a la cadena en crecimiento detienen la polimerización.

Utilizando la técnica de Sanger en sistemas automatizados de tecnología capilar y de fluorescencia, que mediante la separación de colores distintivos para cada base nitrogenada que mediante un equipo que determina el color se describe la cadena de ADN y por medio de un software, se descifra la secuencia de un fragmento de ADN (Laboratorio de Servicio Genómico [LabSerGen], 2022).

### **Figura 1**

#### *Secuenciación sanger*



*Nota.* Descripción de la secuenciación sanger. Autoría Propia

## **Análisis filogenético**

Este es un proceso de evaluación que permite sacar conclusiones sobre las relaciones evolutivas o historia ancestral entre las especies analizadas. Las relaciones genealógicas están indicadas por rasgos encontrados en varias especies que se heredan de un ancestro común. (Márquez *et al.*, 2014).

## **Índice de diversidad Simpson (1-D)**

Rushtone (2008) menciona que el índice de diversidad de Simpson es un índice probabilístico que permite medir la diversidad dentro de una comunidad, además comparar la diversidad entre comunidades diferentes, cuyo resultado oscila entre 0 y 1, siendo 0 homogeneidad total y 1 diversidad perfecta en donde se manejó los siguientes rangos de diversidad: diversidad alta (0,67-0,99), diversidad media (0,34-0,66) y baja (0-0,33).

## **Índice de Diversidad de Shannon (H')**

Basado en la cantidad de especies presentes y su abundancia relativa, el índice representa la heterogeneidad de la comunidad. Conceptualmente, es un indicador del nivel de incertidumbre involucrado en la selección aleatoria de miembros de una comunidad (Pla, 2006).

## **Índice de equitatividad de Pielou (J')**

Mide la diversidad en término de la abundancia proporcional y su representación en la comunidad (Moreno, 2001). Calcula la proporción de diversidad observada con respecto al nivel más alto posible de diversidad. Acepta un valor entre 0 y 1, donde 1 representa un entorno en el que todas las especies son iguales y 0 representa una ausencia de homogeneidad (Valdez *et al.*, 2018).

## **Chao 1**

Estimador no paramétrico que permiten detectar la precisión del inventario de especies. Compara la riqueza observada frente a la esperada (Moreno, 2001) mediante la formula detallada a continuación.

$$\text{Chao 1} = S + \frac{a^2}{2b}$$

Donde:

S: el número de especies en una muestra

a: es el número de especies que están representados solamente por un único individuo en esa muestra

b: número de especies representadas por exactamente dos individuos en la muestra

## CAPÍTULO III

### METODOLOGÍA

#### **Zonas de estudio**

##### ***Zona Sansahuari***

En el presente estudio se determinó la zona de Sansahuari como una parcela experimental de suelo perturbado, ubicada en la provincia de Orellana (E356042, N10009231) (Vega, 2021) su altitud es 205 m, presenta una temperatura promedio de 25,6° C y 2 943 mm de precipitación (Quinsasamín, 2019). Lugar en donde fueron establecidas las especies arbóreas.

##### ***Zona Auca***

Se le conoce como Auca a una parcela experimental de suelo perturbado (Vega, 2021), ubicada en la provincia de Orellana (E2901091, N9913436), a 255 m snm, su temperatura promedio de 24,8 °C, y presenta 3 319 mm de lluvia (Quinsasamín, 2019).

Dentro de las zonas fueron establecidas las especies arbóreas *Platymiscium pinnatum*, *Piptadenia pteroclada* y *Zygia longifolia* además se tomó un área denominada Claro en donde no se sembró ninguna especie arbórea. De estas rizosferas se aislaron e identificaron morfológicamente las cepas para los estudios previos.

#### **Fase de Laboratorio**

La parte experimental correspondiente a la activación de hongos y sus purificaciones, técnicas moleculares como la extracción de ADN, PCR (amplificación del gen ITS) y electroforesis, así como análisis de biodiversidad, se realizaron en los Laboratorios de Microbiología, Agrobiotecnología y de Zoología de la Carrera Agropecuaria del IASA I, respectivamente. Mientras que los análisis de la concentración y calidad del material genético (ADN) se realizó en los Laboratorios de Docencia de la Carrera de Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Finalmente, la caracterización proteómica se

realizó en el Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad Regional Amazónica IKIAM.

## **Preparación de medios de cultivo**

### ***Medio sólido***

Se preparó medio PDA (Agar Papa Dextrosa) en un matraz Erlenmeyer a una concentración de 40 g/L con 500 mg de amoxicilina usando como solvente agua destilada, éste fue colocado sobre una plancha de agitación (Hot y Stirrer ®) en donde se llevó a ebullición, posterior a esto se vertió la solución en un envase BOECO ® y se autoclavó por 15 min a 121°C, culminado el proceso de esterilización, en un ambiente estéril en la cámara de flujo laminar (Termoforma) previamente desinfectada con sablón, alcohol (96%) y 15 min con luz UV, se procedió a dispensar, en donde 1 L de medio de cultivo rindió para 50 cajas Petri.

### ***Medio Líquido***

El medio líquido se elaboró a base de dextrosa (20 g/L), peptona (5 g/L) y un antibiótico (amoxicilina 500 mg/L) para evitar contaminación por bacterias. Para lo cual se colocaron en un matraz todos los componentes a las concentraciones mencionadas y se adicionó agua destilada, éste fue colocado sobre una plancha de agitación, hasta su ebullición. En un ambiente estéril, se tomaron los tubos de ensayo limpios y secos y se dispensaron 5 mL del medio de cultivo en cada uno, se taparon con sus respectivas tapas, y se esterilizó mediante autoclave (All american®).

## **Acondicionamiento de hongos rizosféricos del cepario**

### ***Activación de muestras del cepario***

Las muestras de hongos ectorrizosféricos recolectados en investigaciones previas en zonas con diferente tipo de contaminación producto de los derrames de petróleo en la Amazonía ecuatoriana, los cuales fueron conservados a -20 °C en el cepario del Laboratorio de Microbiología de la Carrera Agropecuaria "IASA I" contenidas en viales y rotuladas con

información de la zona proveniente, fecha y género identificado. Se llevó a cabo la activación de cepas en la cámara de flujo laminar con el mechero encendido y aplicando las normas de bioseguridad, se pasó el contenido del vial a una caja Petri con medio de cultivo PDA con antibiótico.

Las cajas Petri sembradas y selladas con parafilm se conservaron durante 72 horas dentro de una incubadora (Rebelk ®) a 30°C según a lo establecido por Quinsasamín (2019), posterior a ello se observaron y verificaron la activación de las cepas constando la pureza.

### **Selección de cepas**

De las 70 cepas activadas, se escogió una cepa por cada género identificado morfológicamente en tesis anteriores (Sosa, 2018; Quinsasamín, 2019; Remache, 2020; Vega, 2021) resultando 6 cepas en PCPP y 4 en CGP, las cuales se detallan en las Tablas 1 y 2.

**Tabla 1**

*Muestras seleccionadas de la zona PCPP*

Código de muestra	Género
1 S	<i>Rizopus</i>
2 S	<i>Oidiodendro</i>
3 S	<i>Rizoctonia</i>
4 S	<i>Acremonium</i>
5 S	<i>Geotrichum</i>
6 S	<i>Paecilomyces</i>

*Nota:* Cepas identificadas a nivel de género por investigaciones previas. Autoría propia

**Tabla 2**

*Muestras seleccionadas de la zona GCP*

Código de muestra	Género
1 A	<i>Paecilomyces</i>
2 A	<i>Botrioderma</i>
3 A	<i>Aspergillus</i>
4 A	<i>Trichoderma</i>

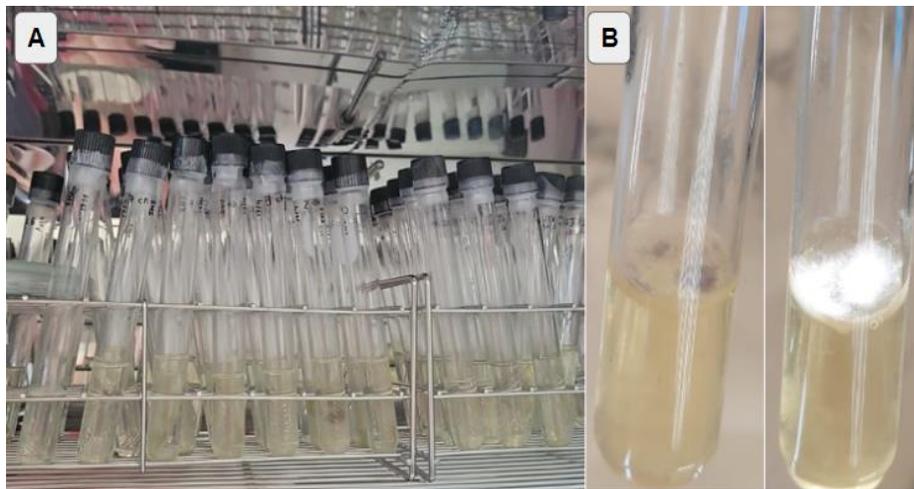
*Nota:* Cepas identificadas a nivel de género por investigaciones previas. Autoría propia

### **Siembra en medio líquido**

Los hongos activados, aislados e identificados mediante la comparación con las claves dicotómicas *Illustrated Genera of Imperfecte Fungi* (Barnett y Hunter, 1998) y *Morphologies of Cultured Fungi and key to Species* (Watanabe, 2010), fueron inoculados en medio líquido en un ambiente estéril, los cuales se dejaron incubar por 72 h para obtener una cantidad considerable de los micelios, mismos que se usaron en la extracción de ADN.

### **Figura 2**

*Medios líquidos inoculados*



*Nota.* A: Tubos con medio de cultivo líquido con el inóculo de interés B: Micelio crecido a las 72 h en medio líquido. Autoría propia

### **Identificación de microorganismos mediante Espectrometría De Masas (MALDI-TOF).**

La identificación mediante MALDI-TOF se efectuó a partir de aislamientos en agar PDA incubados a 30 °C durante 72 h. La extracción de proteínas se realizó según el protocolo establecido previamente por la Universidad IKIAM en donde se utilizó ácido fórmico al 70% para la fijación de la muestra y la matriz de ionización CHCA (alpha-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid) 40 mg/mL en modo lineal para la lectura de los pocillos. Los softwares MALDI-MS Aplicación (2.9.4.1) y SARAMIS (*System Versión 4.1.0.9*) fueron empleados para la identificación de microorganismos presentes en la muestra.

## Identificación molecular de los hongos seleccionados.

### Extracción de ADN

Para la extracción del material genético (ADN) se modificó el protocolo establecido por (Berrendero *et al.*, 2008) para lo cual se utilizaron hongos cultivados en medio líquido por 72 horas. En un ambiente estéril se trasladaron los micelios a microtubos y se añadieron 1,5 mL del medio cultivo de cada hongo, se centrifugaron a 10 000 rpm durante 2 min y posterior a ello se descartaron los sobrenadantes. Se agregaron 500  $\mu$ L del buffer de extracción [Tris HCl 100 Mm (Invitrogen), EDTA 20 mM (J.T. Baker), CTAB 2,5 % w/v, NaCl 1.4 M (EMSURE), pH 8] y con la ayuda de micropistilos estériles se realizaron una vigorosa disrupción manual.

Se homogenizaron las muestras en un vórtex durante 5 seg. Se incorporaron 3 perlas de vidrio y se añadieron 2  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol a cada microtubo, posteriormente se homogenizaron nuevamente por vórtex durante 30 seg. Las muestras se incubaron en un termobloque a 60 °C por 30 min invirtiendo los tubos cada 10 min. Se añadieron por muestra, 500  $\mu$ L de cloroformo frío y se homogenizaron por 30 seg utilizando un vórtex, posterior a esto se dejó en reposo por 2 min para después centrifugar a 14 500 g por 8 min, finalizada la centrifugación se visualizaron en los microtubos las separaciones de los compuestos como se muestra en la Figura 3.

### Figura 3

*Sobrenadante del procedimiento para extracción de ADN*



*Nota.* Tubos de eppendorf de 1,5 mL después de la centrifugación, donde se observa el sobrenadante. Autoría propia.

Se transfirieron los sobrenadantes a nuevos microtubos de 1,5 mL y se añadieron un volumen igual de etanol absoluto frío, se colocaron 150  $\mu$ L de acetato de sodio 3M, pH 5,5 (Baker Analyzed), y 300  $\mu$ L de etanol 70 % para estimular la precipitación de ADN después se dejaron en reposo a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 24 H para favorecer la precipitación, se centrifugaron a 14 500 g por 14 min, posterior a esto se eliminaron los sobrenadantes y cuidadosamente se lavaron dos veces con 200  $\mu$ L de etanol al 70 % con ello se eliminaron los restos de detergentes y sales.

Se dejaron secar por 30 min bajo la cámara de flujo laminar con el flujo prendido para favorecer al secado. Se resuspendieron los *pellets* entre 50 y 100  $\mu$ L de la solución de NaOH (8 mM) en agua ultra pura, se agregaron 1  $\mu$ L de RNAsa (20 mg/mL) y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 min, finalmente los tubos se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **Determinación de la Integridad, concentración y pureza de ADN**

Con el equipo Multiskan Sky Thermo Scientific™ se determinó la concentración y calidad de ADN, mediante espectrofotometría emite resultados instantáneos de las concentraciones medidas en ng/ $\mu$ L y para las purezas mide la transmitancia a ondas de 230, 260 y 280 nm mismos que al realizar la relación de absorbancias de 260/280 y 260/230 nm se compararon con los valores de referencia citados en la Tabla 3 con los que ese determina la pureza optima o la presencia de posibles contaminantes que pueden afectar en la reacción en cadena de la polimerasa.

Para la concentración se tomó como aceptables a los valores iguales o mayores de 100 ng/  $\mu$ L, con la finalidad de tener una buena concentración de secuencia molde de ADN para la PCR, en cuanto a la pureza medida a una onda de 260 a 280 nm los valores aceptados fueron mayores a 1,8 y para la pureza a una onda de 260 a 230 nm los valores aceptados fueron mayores de 1,5 (Tabla 3).

**Tabla 3***Valores referenciales de pureza*

Relación de ondas	Rango	Criterios de Validez
260/280	≥1,8-2,1	Pureza óptima
	≥1,6-1,7	Pureza aceptable
	<1,6	ADN contaminado con compuestos aromáticos
	>2,1	ADN contaminado con ARN
260/230	>2-2,2	Pureza óptima
	>1,8	Pureza aceptable
	<1,8	ADN contaminado con sales, fenol, hidratos de carbono
	<1,5	ADN altamente contaminado con sales, fenol, hidratos de carbono

*Nota.* Medidas por espectrofotometría para determinar los valores indicativos de pureza en las muestras de ADN. Recuperado de Tomás (2021)

Para observar la integridad de las muestras de ADN extraídas, se realizó una electroforesis con gel de agarosa al 0,8 % w/v con buffer TBE 1x [108 g de Tris (Invitrogen), 55 g de ácido bórico (AMP) y 40 mL de EDTA (JT. Baker)] y 4 µL de *Diamond Nucleic Acid Dye* (Promega), para ello en cada pocillo se cargaron 10 µL de las extracciones de ADN más 2 µL de *Blue juice*, y se corrió a 100 V por 45 minutos. Finalmente se observaron los resultados en un transiluminador (Alpha Innotech).

#### ***Dilución del material genético extraído***

Para las muestras que registraron concentraciones mayores a 100 ng/µL se realizó una dilución en 8 mM de NaOH en agua ultra pura, mediante la fórmula de diluciones para obtener una solución con dicha concentración

$$(C1V1 = C2V2)$$

En donde:

*C1: Concentración conocida de ADN*

*C2: Concentración deseada de ADN (50µg - 100µg)*

*V1: Volumen de ADN a tomar*

*V2: Volumen deseado (5 µL - 10µL)*

### **Amplificación de la región ITS mediante PCR**

Mediante la técnica PCR se realizó la amplificación de una región específica del ADN llamada Espaciador Interno Transcrito (ITS, por sus siglas en inglés), para lo cual se realizó un *mastermix* tal como se detalla en la Tabla 4, en donde se usaron los primers ITS-1 (forward) e ITS-4 (reverse). La amplificación se realizó mediante el protocolo establecido por (Berrendero *et al.*, 2008) el cual se detalla en la Tabla 5 en un termociclador (TECHNE TC-412).

En la Tabla 4 se encuentran detalladas las cantidades de los reactivos utilizadas para una reacción de 50 µL.

**Tabla 4**

*Cantidades utilizadas para la Master Mix*

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

*Nota: Modificado de Flores (2021)*

**Tabla 5**

*Condiciones para la amplificación del gen ITS*

Etapa	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	3 min	1
Desnaturalización	95 °C	30 s	
Hibridación	60 °C	30 s	30
Extensión	72 °C	60 s	
Extensión final	72 °C	3 min	1
Almacenamiento	4	Indefinido	

*Nota:* Modificado de Flores (2021)

### **Determinación del tamaño de los amplicones**

Se corrió la electroforesis con gel de agarosa al 1%, con buffer TBE 1x y 4 µL de Diamond Nucleic Acid Dye, tomando en cuenta los pocillos para el control positivo y negativo mismos que sirvieron para confirmar la amplificación, por lo que se cargaron en el gel 2 µL de *Blue Juice* con 5 µL de cada amplicón tanto de muestras como de los controles y 2 µL de marcador molecular 100 pb (promega). La migración se realizó a 70 voltios por 80 minutos. Finalmente se observaron los resultados en un transiluminador.

### **Secuenciación**

Los amplicones obtenidos fueron etiquetados y sellados con parafilm, los cuales mediante la empresa IDgen se enviaron al laboratorio Macrogen (Corea del Sur) en donde se realizó la secuenciación por el método Sanger.

### **Obtención de las secuencias consenso**

Las secuencias crudas obtenidas se alinearon con el programa Geneious Prime 2023.1.2, en donde se realizó su ensamblaje, obteniendo como resultado las secuencias consenso curadas, dichas secuencias se contrastaron con la base de datos del Centro



%, utilizando el método de Bootstrap con 10 000 iteraciones (MacGregor-Fors y Payton, 2013; Peña *et al.*, 2012) La riqueza observada en cada tipo de ecosistema se evaluó mediante el estimador no paramétrico Chao 1, mismo que estima el número de especies en una comunidad a partir del número de especies raras en la muestra. El Software utilizado para estos análisis fue Past (Hammer, 2023).

## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Activación de cepas

En la Tabla 6 se aprecia el número de viales activados de los hongos provenientes de las dos zonas de estudios, cuyas cepas fueron cultivadas en PDA el cuál proporcionó una fuente de carbono y nitrógeno a las cepas en crecimiento, dicho medio se utiliza para aislar todo tipo de hongo (Pedroza, 2015). Por otra parte, los componentes de los medios de cultivo líquidos permitieron el crecimiento de los hongos purificados. Becton (2015), menciona que tanto la dextrosa (20 g/L) y peptona (5 g/L) son componentes que favorecen su crecimiento.

**Tabla 6**

*Datos de cepas activadas*

	PCPP	CGP
Viales activados	36	34

*Nota.* CGP Centro de gestión de pasivos AUCA 02; PCPP Plataforma que circunscribe al pozo petrolero Sansahuari 02. Autoría propia

#### Caracterización proteómica

De las 9 cepas seleccionados correspondientes a las zonas PCPP y GCP, se identificaron solo 2 especies siendo éstas *Aspergillus niger* y *Aspergillus terreux* mediante el análisis de MALDI-TOF, tal como se detalla en la Tabla 7, cuyos porcentajes de identificación fueron menores al 77,9 %.

**Tabla 7**

*Especies identificadas con MALDI-TOF*

Zona	Código de muestra	MALDI-TOF	% Identificación
PCPP	3 S	<i>Aspergillus niger</i>	76
CGP	2 A	<i>Aspergillus terreux</i>	77,90

*Nota.* Especies identificadas por espectrofotometría de masas de PCPP Y CGP, zonas con diferente tipo de contaminación. Autoría propia

Relloso *et al.*, (2015) evaluaron la espectrometría de masas MALDI-TOF para la identificación rápida y confiable de levaduras, encontrando que esta metodología constituye una herramienta útil, confiable y práctica para identificar nivel de especie cepas de hongos levaduriformes aislados, sin embargo, como se observa en la Tabla 7 los porcentajes de identidad de las dos cepas identificadas fueron inferiores al 78 %, siendo éstos aceptables a nivel de género. Alegría (2021) menciona que, para una identificación fiable a nivel de especie, es aceptable resultados con puntuaciones del 99,9%, mientras que resultados de identificación con valores de confianza entre 50% y 99,8% se consideraron como aceptables a nivel de género.

La identificación de apenas dos especies por MALDI-TOF se debe a que la implementación de esta técnica para identificación de hongos filamentosos se ha retrasado debido a las dificultades para estandarizar un método de extracción de proteínas eficiente, así como a las limitaciones en las bases de datos disponibles (Maldonado *et al.*, 2017).

Por otra parte, la base de datos utilizada para la caracterización proteómica por fue SARAMIS la cual es característico en la identificación de bacterias y hongos. Sin embargo, existen algunas limitaciones ya que esta base de datos se encuentra desactualizada, provocando que no se pueda identificar correctamente a las especies estudiadas (Salas, 2020) por lo que se sugiere el uso del sistema MALDI-TOF-Vitek MS <sup>TM</sup>, lo que concuerda con lo establecido por (Ruiz, 2021), quien recomienda esta base de datos ya que es más actualizada.

## **Caracterización molecular**

### **Obtención del material genético**

El buffer [CTAB 2,5 %, 100 mM Tris HCl, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl 1.4 M, pH 8] permitió lisar las células para su posterior extracción del ADN, por lo que concuerda con lo establecido por Berrendero *et al.*, (2008), quienes utilizaron la misma composición del buffer de extracción de ADN. A su vez, Huanca-Mamani *et al.*, (2014), extrajeron ADN de hongos cultivados en PDA con la misma composición de la solución utilizada en esta investigación, a

excepción del porcentaje de CTAB, el cual fue del 2% CTAB, y adicional a éste se añadió 1% de PVP, y 0.2% LiCl, obteniendo concentraciones de ADN que oscilaron de 400 a 900 ng/uL.

### Pureza y cuantificación del ADN

Los valores de calidad del ADN extraídos son dados por la pureza que es la relación de las ondas medidas (A260/A28 y A260/A230) así como las concentraciones son detallados en la Tabla 8.

**Tabla 8**

*Resultados de calidad del ADN*

Zona	Código de muestra	Concentración (µg/mL)	Pureza (A260/A280)	Pureza (A260/A230)
PCPP	1 S	201,3	2,001	1,149
PCPP	2 S	406,7	2,072	1,564
PCPP	3 S	101,6	2,029	1,458
PCPP	4 S	209	2,149	1,784
PCPP	5 S	721,4	2,089	1,789
PCPP	6 S	95,41	1,985	1,159
CGP	1 A	74,18	1,822	0,7928
CGP	2 A	303	2,066	1,463
CGP	3 A	129	1,281	0,327
CGP	4 A	155,9	2,057	1,397

*Nota.* PCPP (Plataforma que Circunscribe el Pozo Petrolero Sansahuari 02) CGP (Centro de Gestión de Pasivos Auca 02). Concentración y pureza de las muestras de ADN analizadas. Autoría propia.

De acuerdo con Tomás (2021), los valores indicativos de pureza de las muestras de ADN de la relación 260/280 mayores o iguales a 1,8-2,1 se consideran óptimos, mientras que para la relación 260/230, se aceptan valores de 1,8 a 2,2; en el presente estudio valores obtenidos en la relación de 260/280 fluctuaron entre 1,822 a 2,072, es decir que se encontraron en el rango de pureza óptima, a excepción de una muestra, por lo que valores inferiores a 1,6 son considerados como ADN contaminado con compuestos aromáticos.

Mientras que para la relación 260/230 el valor de pureza mínimo fue 0,792 y el máximo de 1,789, por tanto, valores menores a 1,5 se consideran altamente contaminados con sales, fenoles e hidratos de carbono, los cuales pueden ser altamente inhibitorios en la PCR, razón por la cual las muestras con valores muy inferiores se realizaron diluciones para disminuir los contaminantes presentes en las muestras de ADN de acuerdo con lo mencionado con (QIAGEN, 2023a).

### **Evaluación de la integridad**

En la Figura 6 se presenta la integridad de las muestras de ADN extraídas, en donde podemos apreciar bandas definidas que representan una buena calidad, lo que concuerda con Cordero (2016), quién establece que se presenta una banda bien definida e integra cuando su perfil en una electroforesis en gel de agarosa corresponde a una banda discreta.

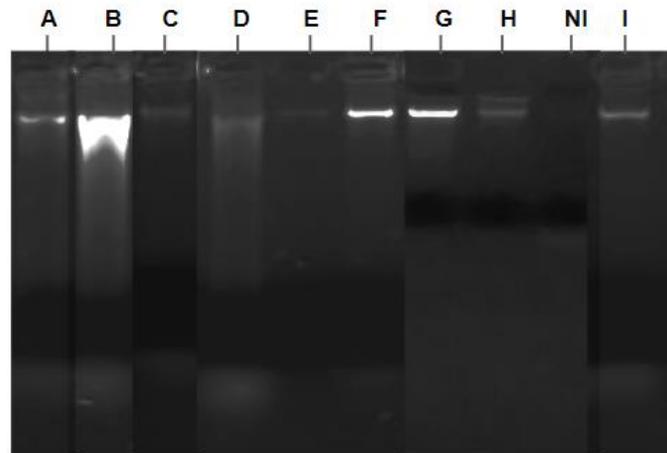
Por otra parte, se observó un carril sin banda de ADN la cual perteneció a la cepa 3 de la zona CGP, indicando la ausencia del material genético, lo que concuerda con los valores obtenidos de las relaciones 260/280 y 260/230, siendo éstos de 1,281 y 0,327, respectivamente (Tabla 8), por lo cual no posee los valores de pureza aceptables y por ello al realizar la electroforesis para determinar la integridad (Figura 6) no se visualizó la presencia de ADN en el carril identificado como NI.

Huanca-Mamani *et al.*, (2014) señalan que los problemas más comunes en la extracción del ADN de hongos aislados del suelo, es que éstos poseen paredes celulares conformadas

por estructuras complejas como quitina, glucanos, lípidos y otros polímeros que impiden la fácil ruptura de su pared celular y extraer ADN de calidad, mismo que ha sido un gran desafío para generar resultados de PCR aceptables. Adicional se encuentra la degradación del ADN debido a la presencia de endonucleasas, la alta producción de polisacáridos y la presencia de compuestos inhibidores como metabolitos secundarios que pueden reducir el rendimiento de la pureza al unirse covalentemente con el ADN extraído.

### Figura 6

*Integridad del ADN extraído*



*Nota.* Corrida electroforética en gel de agarosa 0,8% de las muestras de ADN. A=1S, B=2S, C=3S, D=4S, E=5S, F=6S, G=1A H=2B, I=4B NI= 3A (No extraído). Autoría propia

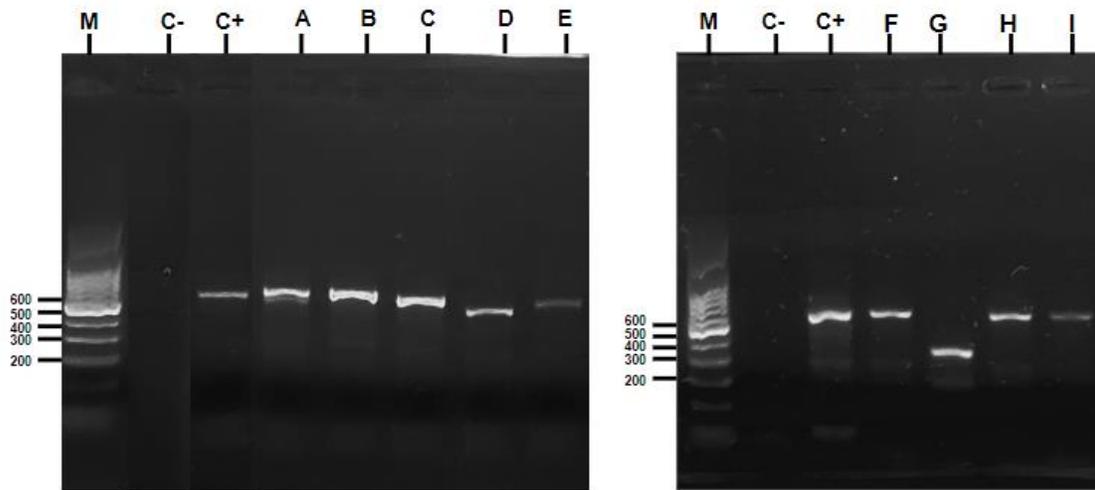
### Amplificación de la región ITS

Para la PCR según Méndez y Pérez-Roth, (2004) la calidad y cantidad de ADN molde, se debe partir de una concentración de 50 a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y sin la presencia de residuos inhibidores que puedan causar alteraciones en la reacción. Para lo que se realizaron diluciones para llegar a dichas concentraciones y garantizar buenos resultados en la PCR.

En la Figura 7, se presentan las amplificaciones de la región ITS con los cebadores ITS 1 e ITS 4, en donde se obtuvieron amplicones cuyos tamaños oscilaron entre 400 y 600 pb.

## Figura 7

Resultados de la corrida electroforética



Nota. Corrida electroforética de PCR de las muestras amplificadas con el ITS 1 e ITS 4. **M** Marcador molecular, **C-** Control Negativo, **C+** Control Positivo, **A** *Mucor irregularis* **B** *Gongronella butleri* **C** *Aspergillus fumigatus* **D** *Rhizopus arrhizus* **E** *Geotrichum candidum* **F** *Purpureocillium lilacinum* **G** *Penicillium pulvillum* **H** *Fusarium oxysporum* **I** *Trichoderma asperellum*. Autoría propia

Martin y Rygiewicz, (2005) mencionan que los cebadores de PCR que obtuvieron una amplia aceptación para el trabajo con secuencias de transcripción interna (ITS) de hongos fueron "ITS1" y "ITS4". Estos cebadores amplifican una amplia gama de objetivos fúngicos y funcionan bien para analizar ADN aislado de organismos individuales. Concidiendo con los resultados presentados por Huanca-Mamani *et al.*, (2014) quienes en su investigación generaron fragmentos de 300 a 400 pb para *Penicillium* sp corroborando la presencia del ADN hibridado, a su vez Mohankumar *et al.*, (2010) obtuvieron un producto de aproximadamente 600 pb, lo que coincide con los resultados obtenidos (Figura 6) cuyo promedio de tamaños fue de 567 pb. Según lo establecido por Vanegas *et al.*, (2014) la variación de los tamaños de los amplicones se debe a que las muestras pertenecen a diferentes especies.

### **Identificación molecular de las cepas de hongos rizosféricos**

Se recibieron 18 secuencias en total, de las cuales 8 correspondieron al cebador forward y 8 al reverse, mediante el ensamblaje de dichas secuencias se obtuvieron 9 secuencias consenso cuyos porcentajes de identidad oscilaron entre 99,29 y 100 % respecto a las secuencias registradas en el NCBI. Estos porcentajes permitieron la identificación a nivel de especie que de acuerdo con Bou *et al.*, (2011), se puede definir una especie cuando los valores de identidad sean mayores o iguales a 98,5 por el contrario, valores entre el 95 y 98,5 % define género. La longitud del fragmento y el código de acceso, y la especie identificada para cada aislado se muestra en la Tabla 9.

**Tabla 9**

*Especies de hongos identificados de acuerdo con la secuenciación en las zonas PCPP y CGP*

<b>Zona</b>	<b>Código de muestra</b>	<b>Nombre científico</b>	<b>% de identidad</b>	<b>Longitud</b>	<b>Accesión</b>
PCPP	1 S	<i>Mucor irregularis</i>	99,29	636	ON927130.1
PCPP	2 S	<i>Gongronella butleri</i>	100	707	ON927136.1
PCPP	3 S	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	573	MT597427.1
PCPP	4 S	<i>Rhizopus arrhizus</i>	100	607	MT279283.1
PCPP	5 S	<i>Geotrichum candidum</i>	99,65	282	MT353978.1
PCPP	6 S	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	100	560	AY213665.1
CGP	1 A	<i>Penicillium pulvillorum</i>	100	559	MK450709.1
CGP	2 A	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	515	MN944513.1
CGP	4 A	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	596	MF871569.1

*Nota.* PCPP (Plataforma que circunscribe el Pozo Petrolero Sansahuari 02) CGP (Centro de Gestión de Pasivos). Autoría propia

Mediante la caracterización molecular en la Zona Sansahuari 02 se identificaron seis especies (*Mucor irregularis*, *Gongronella butleri*, *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus arrhizus*, *Geotrichum candidum* y *Purpureocillium lilacinum*); mientras que, en la zona Auca 02 se identificaron tres especies (*Penicillium pulvillorum*, *Fusarium oxysporum* y *Trichoderma asperellum*).

Según lo señalado por Qianwei *et al.*, (2020) los hidrocarburos de petróleo pueden ser utilizados por varias especies de hongos como fuente de carbono y energía, materiales que son asimilados a la biomasa fúngica. Taxones fúngicos que incluyen a *Aspergillus*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Sporobolomyces*, *Cephalosporium* y *Penicillium* son capaces de degradar los hidrocarburos del petróleo secretando enzimas (p. ej., lacasas, tirosinasas, peroxidasas de manganeso, monooxigenasas del citocromo P450, dehalogenasas reductoras) y afectando la especiación de metales mediante la excreción de una variedad de otros metabolitos (p. ej., ácidos orgánicos, aminoácidos, sideróforos, proteínas extracelulares, etc.).

En el estudio de Asemoloye *et al.*, (2020) en donde se evaluó la degradación de hidrocarburos y actividades enzimáticas de *Aspergillus oryzae* y *Mucor irregularis* aislados de sitios contaminados por petróleo crudo en Nigeria demostró que la cepa aislada *Mucor irregularis* posee la capacidad de producir enzimas ligninolíticas. Por otra parte, *Gongronella butleri* presenta resistencia ante la exposición a diferentes concentraciones de uranio, por lo que Antunes (2019), destaca su potencial uso en procesos de biorremediación.

Latgé (1999) determina que *Aspergillus fumigatus* es un hongo saprófito y su importancia radica en su capacidad de reciclar el carbono y el nitrógeno en el medio ambiente. Su nicho ecológico natural es el suelo donde sobrevive y crece sobre desechos orgánicos. Esta especie puede producir lovastatina, un metabolito secundario del hongo utilizado frecuentemente en productos farmacéuticos, así como enzimas celulasa,  $\beta$ -xilosidasa, FPasa, xilanasa, peptidasa y amilasa, que se utilizan en una variedad de industrias manufactureras. El

aislamiento de microorganismos con potencial celulolítico es crucial porque la creciente industrialización de estas zonas ha provocado una importante cantidad de residuos que no han sido tratados adecuadamente cabe mencionar que los residuos agrícolas o agroindustriales han sido objeto de extensas investigaciones sobre su producción (Suárez y Peñaranda, 2021).

Por otro lado, en un estudio realizado por Maciel *et al.*, (2006) en el que evaluaron la toxicidad del queroseno degradado por *Geotrichum candidum*, concluyen que especie fúngica tiene el potencial de degradar los constituyentes del queroseno, reduciendo su toxicidad, y puede usarse en biorremediación de ambientes contaminados por este petroderivado

*Purpureocillium lilacinum* interviene positivamente en el crecimiento, el contenido de clorofila y participa en el control de fitopatógenos como *Botrytis* en ciertas especies vegetales. Además de contar con la capacidad solubilizar fósforo, producir sideróforos y IAA estas características hacen que se lo considere como un candidato para uso como biofertilizante. Tamayo y Cariga (2021) sostienen que *P. lilacinum* posee la capacidad de biodegradación sobre los suelos contaminados con aceite, diésel y crudo, además destacan que son capaces de crecer en aceites de petróleo.

Valenzuela *et al.*, (2006) evaluaron la facultad degradativa para petróleo de aislados de *Penicillium* en laboratorio durante 36 días y tuvieron como resultado de acuerdo a los análisis establecidos que estos presentaron la capacidad de degradar algunos de sus constituyentes. Por otra parte Bou *et al.*, (2011) señala que *Trichoderma asperellum* son ampliamente utilizados en la biorremediación de metales pesados, tanto en forma activa como inactiva. Cervantes *et al.*, (2001) analizaron la interacción del Cromo con microorganismos y plantas, y afirman que *Rhizopus arrhizus* presenta una considerable compatibilidad con este metal revelando potencial absorbente.

De acuerdo con Hernández *et al.*, (2003); Maciel *et al.*, (2006); Bou *et al.*, (2011); García Cuan *et al.*, (2017); Qianwei *et al.*, (2020); Tamayo y Cariga (2021), las especies identificadas

en el presente trabajo mantienen en común su potencial uso dentro de los procesos de biodegradación de residuos y derivados del petróleo.

En el estudio de Suárez y Peñaranda (2021) que identificaron molecularmente especies de hongos con potencial de interés en aplicaciones biotecnológicas distribuidos en los géneros *Trichoderma*, *Geotrichum*, *Purpureocillium*, *Penicillium* y *Aspergillus*, mismos que son parte de los géneros identificados en esta investigación que provienen de suelos contaminados por hidrocarburos.

Hernández *et al.*, (2003) estudiaron la relación de bacterias hidrocarbonoclastas (HCT's) y hongos (HCT's) aisladas de rizósferas de plantas que crecen en suelos de Minatitlán, Veracruz, registrando también a *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp. y *Mucor* sp., de los que *Aspergillus* sp. y *Trichoderma* sp. son reconocidos como hongos hidrocarbonoclastas.

García *et al.*, (2017) sostienen que estos géneros fúngicos también presentan un sistema enzimático bastante diverso, formado por complejos oxidativos, lipolíticos, biosurfactantes y son hongos aerobios estrictos. Cabe recordar que estos géneros también fueron registrados en CGP y de PCPP y, por lo tanto, estos suelos han iniciado un proceso de biorremediación bajando la carga de contaminación dada la acción enzimática de estos tres géneros mencionados.

### **Análisis de biodiversidad de la zona Auca 02 y Sansahuari 02**

En el centro de gestión de pasivos se activaron 34 individuos pertenecientes a 6 géneros mientras que en las plataformas que circunscriben a los pozos petroleros se activaron 36 individuos pertenecientes a 7 géneros identificados morfológicamente en investigaciones previas.

En los dos niveles de contaminación se encontraron diversidades altas de acuerdo a las escalas de valor del índice de Simpson 0,78 y 0,74 en CGP y PCPP, respectivamente. El índice de Shannon demostró que la diversidad entre los sitios tendió a ser ligeramente más alto en

CGP ( $H' = 1,64$ ) que en PCPP ( $H' = 1,58$ ). De acuerdo con el índice de Equitatividad de Pielou ( $J'$ ) CGP es ligeramente más homogéneo (0,91) que PCPP (0,81).

**Tabla 10**

*Análisis de la Biodiversidad según el nivel de contaminación*

Índices	PCPP	CGP
Riqueza específica	7	6
Abundancia	36	34
Diversidad de Simpson ( $1 - \lambda$ )	0,74	0,78
Diversidad de Shannon ( $H'$ )	1,58	1,64
Equitability de Peilou ( $J'$ )	0,81	0,91
Chao-1	100	100

*Nota:* Índices de diversidad determinados en el Software PAST.

Autoría propia

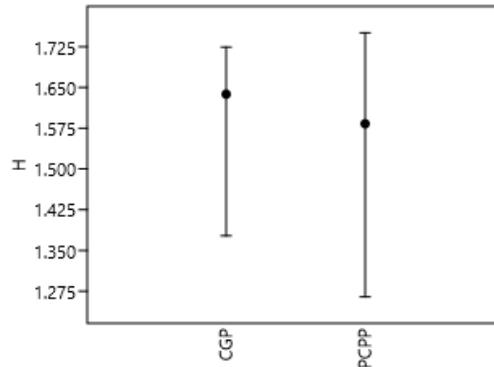
Con el análisis de diversidad de Shannon ( $H'$ ) se demostró que la diversidad no depende del nivel de contaminación (Figura 7) sino más bien de la especie arbórea leguminosa de la que fueron colectados (Figura 8) (Tabla 11). Esto concuerda con Maldonado-Chávez *et al.*, (2010) quienes evaluaron la interacción petróleo-planta-consorcio [constituido por bacterias (*Pseudomonas* sp. y *Serratia marcescens*) y hongos (*Aspergillus* sp. y *Trichoderma* sp.)], reportando que la asociación leguminosa+consorcio microbiano estimuló el mayor porcentaje de degradación.

Dado que la fitorremediación aumenta la aireación del suelo, aumenta también la transpiración y mejora el flujo de agua en el perfil del suelo, por lo tanto, es crucial que las plantas formen asociaciones con consorcios microbianos en el proceso de descontaminación de suelos afectados por petróleo además, las raíces de *Platymiscium pinnatum*, *Piptadenia pteroclada* y *Zygia longifolia* penetran a través del suelo y rompen los agregados del suelo contaminado, esto facilita que una mayor superficie quede expuesta a la degradación microbiana.

El índice de Chao 1 arrojó el valor de 100 lo que de acuerdo con Moreno (2001) se infiere que se obtuvo para los dos niveles de contaminación el 100 % de la riqueza observada frente a la esperada.

**Figura 8**

Índice de Shannon ( $H'$ ) de las dos zonas de estudio PCPP Y CGP



Nota. Plot del índice de Shannon. CGP Centro de Gestión de Pasivos; PCPP Plataforma que Circunscribe al Pozo Petrolero. Autoría propia

**Tabla 11**

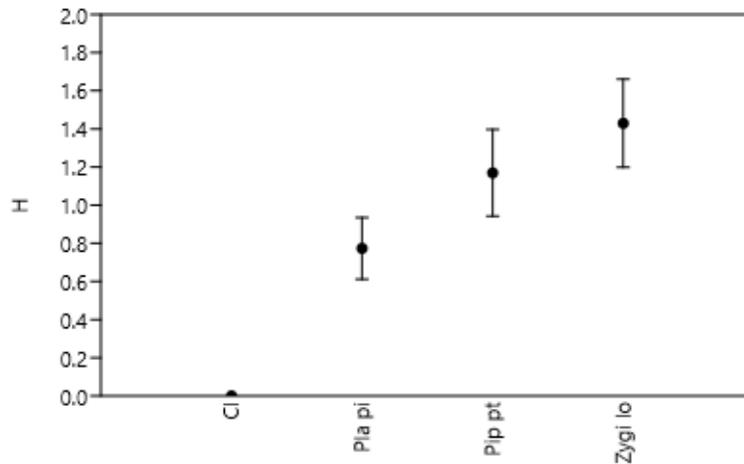
Especies fúngicas localizadas por especie Arborea

Zona	Especie Arborea	Especie Fúngica
PCPP	<i>Zygia longifolia</i>	<i>Mucor irregularis</i>
	<i>Zygia longifolia</i>	<i>Gongronella butleri</i>
	<i>Zygia longifolia</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
	<i>Zygia longifolia</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>
	<i>Zygia longifolia</i>	<i>Geotrichum candidum</i>
	<i>Zygia longifolia</i>	<i>Purpureocillium lilacinum</i>
CGP	<i>Piptadenia pteroclada</i>	<i>Penicillium pulvillorum</i>
	Claro	<i>Fusarium oxysporum</i>
	<i>Piptadenia pteroclada</i>	<i>Trichoderma asperellum</i>

Nota. Especies fúngicas localizadas por especie arbórea y por zona de contaminación. Autoría propia

## Figura 9

Índice de Shannon según la diversidad por especie arbórea



Nota: Diversidad fúngica de acuerdo a las especies arbóreas plantadas siendo Claro (C), *Platymiscium pinnatum* (Pla pi), *Piptadenia pteroclada* (Pip pt) y *Zygia longifolia* (Zig lo). Autoría propia

Considerando que la diversidad no presentó diferencias entre los sitios evaluados (Figura 8), se comparó el comportamiento del índice de Shannon ( $H'$ ) entre especies arbóreas de las que provienen los hongos (Figura 9). Así, el índice de Shannon fue diferentemente significativo en los claros ( $p \leq 0,0001$ ). La diversidad de la comunidad fúngica rizosférica difiere significativamente al comparar las cepas que provienen de *Platymiscium pinnatum* con las que provienen de *Piptadenia pteroclada* ( $p \leq 0,05$ ), y al ser comparadas con las que provienen de *Zygia longifolia* ( $p \leq 0,001$ ). Sin embargo; la diversidad de las cepas de hongos rizosféricos que provienen de *Piptadenia pteroclada* y *Zygia longifolia* no presentan diferencias significativas entre ellas. Lo que concuerda con Vega (2021) que menciona que dentro de las Plataformas que Circunscribe a los Pozos petroleros (PCPP) de Sansahuari 02, la abundancia registrada en *Zygia longifolia* tendió a ser mayor en relación a *Piptadenia pteroclada* y *Platymiscium pinnatum*.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### Conclusiones

- Se activaron el 100% de las 36 cepas provenientes de la zona Sansahuari 02 al igual que de las 34 cepas de la zona Auca 02.
- Se realizó la extracción de proteínas de 10 cepas de hongos rizosféricos; 6 pertenecientes a la zona PCPP y 4 de la zona GCP. Con la técnica de MALDI-TOF se identificó una especie de la zona PCPP con un 76% de similitud y correspondiente a *Aspergillus niger*, y para la zona CGP también se logró identificar una especie con un 77,90% de similitud correspondiente a *Aspergillus terreus*.
- Mediante la secuenciación Sanger, obtenida a partir de amplicones de regiones de ITS de hongos rizosféricos, se logró identificar un total de nueve cepas diferentes, seis especies de la zona PCPP (*Mucor irregularis*, *Gongronella butleri*, *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus arrhizus*, *Geotrichum candidum* y *Purpureocillium lilacinum*) y tres especies de zona CGP (*Penicillium pulvillorum*, *Fusarium oxysporum* y *Trichoderma asperellum*).
- En los dos niveles de contaminación se encontraron diversidades altas, sin embargo, la abundancia, riqueza e índice de diversidad de Shannon, no presentaron diferencias significativas entre niveles de contaminación, pero si entre especies arbóreas. Finalmente, se colectaron el 100 % de la riqueza esperada en los dos tipos de suelos contaminados evaluados.

## Recomendaciones

- Estandarizar un protocolo para extracción de proteínas de hongos y mejorar la base de datos del MALDI-TOF. A fin de que se logre similitudes de altos porcentajes, caso contrario los estudios moleculares continuarán siendo los más fiables.
- Estandarizar un protocolo para extracción de ADN con nitrógeno líquido de la especie que no se pudieron identificar en el presente estudio.
- Realizar un análisis del perfil enzimático de las cepas para conocer el mecanismo de acción dentro del proceso de biorremediación y así estimar la asociación de microorganismos más adecuada para la digestión de hidrocarburos.

## Bibliografía

- Alegría, C. (2021). *Evaluación del sistema maldi-tof vitek mstm para la identificación rápida de microorganismos de interés clínico*. [Tesis Doctoral, Universidad de Cantabria].  
<https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/24307/TESIS%20CRDAP.pdf?sequence=1>
- Andrade, H., Reyna, A., Lapo, J., y Baer, N. (2019). *Estandarización de PCR con primers para la región ITS en ADN vegetal*. Red Santo Domingo Investiga. Recuperado el 12 de agosto de 2023 en <http://www.redisd.org/index.php/es/resumen-recibidos-mt1/770-estandarizacion-de-pcr-con-primers-para-la-region-its-en-adn-vegetal-2>
- Antunes Coelho, E. (2019). *Isolamento de fungos com potencial para biorremediação na mina de uranio osamu utsumi*. [Tesis doctoral, Universidade de São Paulo].  
[https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42132/tde-09122021-104030/publico/ednei\\_da\\_assuncao\\_antunes\\_coelho\\_doutorado\\_original\\_parcial.pdf](https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42132/tde-09122021-104030/publico/ednei_da_assuncao_antunes_coelho_doutorado_original_parcial.pdf)
- Asemoloye, M. D., Tosi, S., Daccò, C., Wang, X., Xu, S., Marchisio, M. A., Gao, W., Jonathan, S. G., y Pecoraro, L. (2020). *Hydrocarbon degradation and enzyme activities of Aspergillus oryzae and Mucor irregularis isolated from nigerian crude oil-polluted sites*. *Microorganisms*, 8(12), 1–19. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121912>
- Barnett, B., y Hunter, H. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi* (4th Ed.).
- Becton Dikenson. (2015). *BBL Sabouraud Dextrose Agar with Chloramphenicol*. [Archivo PDF].  
<https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=22892>
- Berrendero, E., Perona, E., y Mateo, P. (2008). *Genetic and morphological characterization of Rivularia and Calothrix (Nostocales, Cyanobacteria) from running water*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(2), 447–460.  
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.65273-0>

- Biotoools. (2009). *DNA AmpliTools Master Mix*. [Archivo PDF].  
<http://www.biotoools.eu/documentospdf/DNA%20AmpliTools%20Master%20Mix.esp.ed%2004.%20Febrero%2016.pdf>
- Bonifaz, A., Montelongo-Martínez, F., Araiza, J., González, G. M., Treviño-Rangel, R., Flores-Garduño, A., Camacho-Cruz, A., y Tirado-Sánchez, A. (2014). *Evaluación de MALDI-TOF MS para la identificación de levaduras patógenas oportunistas de muestras clínicas*. *Biotechnology Advances*, 32(1), 230-241.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.002>
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., y Valdezate, S. (2011). *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601–608.  
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Bravo, E. (2007). *Los impactos de la explotación petrolera en ecosistemas tropicales y la biodiversidad*. [Archivo PDF].  
[https://www.inredh.org/archivos/documentos\\_ambiental/impactos\\_explotacion\\_petrolera\\_esp.pdf](https://www.inredh.org/archivos/documentos_ambiental/impactos_explotacion_petrolera_esp.pdf)
- Bravo-Medina, C., Marín, H., M.-L. P., R. M. E., Torres-Navarrete, B., Navarrete-Alvarado, H., y Changoluisa-Vargas, D. (2017). *Evaluación de la sustentabilidad mediante indicadores en unidades de producción de la provincia de Napo, Amazonia Ecuatoriana*. *Bioagro*, 29(1), 23-36. [http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S1316-33612017000100003&script=sci\\_abstract](http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S1316-33612017000100003&script=sci_abstract)
- Cepero de García, M. C., Restrepo Restrepo, S., Franco Molano, A. E., Cárdenas Toquica, M., y Vargas Estupiñán, N. (2012). *Biología de hongos*. Ed. Uniandes. <https://download.e-bookshelf.de/download/0003/7567/43/L-G-0003756743-0007711969.pdf>

- Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza- Tavera, H., Torres-Guzmán, J. C., y Moreno-Sánchez R. (2001). *Interactions of Chromium with microorganisms and plants. FEMS Microbiology Reviews*, 25(3), 335-347.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00581.x>
- Cordero, E. (2016). *Control de calidad muestras de ADN en solución*. [Archivo PDF].  
<https://docplayer.es/12584427-El-banco-nacional-de-adn-oferta-un-control-de-calidad-de-muestras-de-adn-y-arn.html>
- Del Pozo Vallejo, R. (2002). *Conflictos socio ambientales en las áreas de influencia del campo libertador, provocados por la extracción petrolera de la filial petro producción en la región amazónica ecuatoriana*. [Tesis de maestría, Facultad Latinoamericana de Ciencias Sociales Sede Ecuador].  
<https://repositorio.flacsoandes.edu.ec/handle/10469/5383>
- Diz Mellado, M. O. (2020). *Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Npunto*, 3(30), 88-111. <https://orcid.org/0000-0002-5408-6263>
- Ferrera C., R., Rojas A., N. G., Poggi Varaldo, H. M., Alarcón, A., y Cañizares Villanueva, R. O. (2006). *Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(2), 179-187. <https://www.medigraphic.com/pdfs/lamico/mi-2006/mi062s.pdf>
- Flores, F. (2021). *Protocolo para la identificación molecular de microorganismos*. IDgen. [Archivo PDF] - Facilitado por el revisor.
- García Cuan, A., Medina Buelvas, A., y Lara Cobos, J. F. (2017). *Aislamiento e Identificación de Hongos filamentosos tolerantes a aceites dieléctricos usados y los Bifenilos Policlorados (PCBs) de suelos contaminados. Biociencias*, 12(1), 25–30.  
<https://doi.org/10.18041/2390-0512/bioc..1.2431>

- Hurtado, D., Rueda, A., y Sánchez De La Vega. (2023). *Introducción al diseño de oligonucleótidos para la PCR en tiempo real*. *Revista de Educación Bioquímica*, 42(1), 44-45. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2023/reb231d.pdf>
- Guerrero Chávez, A. C. (2018). *Poblaciones de bacterias, hongos y colémbolos durante la fitorremediación de suelo contaminado con diésel*. [Tesis de Maestría, Colegio de Postgraduados Montecillo]. <https://www.biopasos.com/biblioteca/Poblaciones-bacterias-hongos-fitorremediacion-suelo.pdf>
- Hammer, Ø. (2023). *PAST PAleontological STatistics Reference manual (4.13)*. *Natural History Museum*. [Archivo PDF] <https://www.nhm.uio.no/english/research/resources/past/downloads/past4manual.pdf>
- Hernández Acosta, E., Ferrera Cerrato, R., Gutiérrez Castorena, M., Rodríguez Vázquez, R., Rubiños Panta, J., y Fernández Linares, L. (2003). *Bacterias y hongos hidrocarbonoclastas de rizósfera frijol y maíz, en un suelo contaminado con petróleo*. *Terra Latinoamericana*, 21(4), 493-502. <https://www.redalyc.org/pdf/573/57321405.pdf>
- Huanca-Mamani, W., Salvatierra Martínez, R., y Sepúlveda-Chavera, G. (2014). *A fast and efficient method for total DNA extraction from soil filamentous fungi*. *Idesia*, 32(2), 75-78. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292014000200010>
- Ibian Tech. (2023). *La importancia de los tampones para la PCR*. Technologies. Recuperado el 08 de agosto de 2023 de <https://www.ibiantech.com/tampones-en-la-pcr/>
- Instituto Nacional de Biodiversidad. (2021). *Los ODS y la Amazonía: avances y desafíos en el eje ambiental. Segundo ciclo de conferencias de conocimiento y saberes amazónicos*. Conservation international Ecuador. Recuperado el 1 de agosto de 2023 de <https://www.conservation.org/ecuador/noticias/2021/05/26/el-plan-integral-para-la-amazon%C3%ADa-es-presentado-en-puyo>

- Jaizme-Vega, M. del C., y Rodríguez-Romero, A. S. (2008). *Integración de microorganismos benéficos (hongos micorrícicos y bacterias rizosféricas) en agrosistemas de las Islas Canarias*. *Agroecología*, 3, 33-40. <https://revistas.um.es/agroecologia/article/view/95491>
- Laboratorio de Servicio Genómico. (2022). *Secuenciación Capilar, secuenciación Sanger*. *LanGeBio*. Recuperado el 02 de agosto de 2023 de <http://labsergen.langebio.cinvestav.mx/genomics/?services=sanger>
- Latgé J., P. (1999) *Aspergillus fumigatus and aspergillosis*. *Clin Microbio Rev*, 12(2), 310-50. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10194462/>
- López A., V., Espíndola, F., Calles, J. y Ulloa, J. (2013). *Atlas "Amazonía Ecuatoriana Bajo Presión"*. [Archivo PDF]. <https://biblio.flacsoandes.edu.ec/libros/digital/56384.pdf>
- Luna, N. (24 de septiembre de 2013). *Hongos para degradar hidrocarburos*. TSS Universidad Nacional de San Martín. Recuperado el 29 de agosto de 2023 de <https://www.unsam.edu.ar/tss/hongos-contra-la-contaminacion/>
- Maciel, J., Villela, A., Gomes, G., Carvalho, I., Melo, B., y Sousa, F. (2006). *Avaliação da toxicidade do querosene degradado por fungos*. [Archivo PDF]. <http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R1080-1.pdf>
- MacGregor-Fors, I., y Payton, M. E. (2013). Contrasting Diversity Values: Statistical Inferences Based on Overlapping Confidence Intervals. *PLoS ONE*, 8(2), 1-4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056794>
- Maldonado, N., Robledo, C., y Robledo, J. (2017). *La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica*. *Infectio*, 22(1), 35-45. <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v22n1/0123-9392-inf-22-01-00035.pdf>
- Maldonado-Chávez, E., Rivera-Cruz, M., Izquierdo-Reyes, F., y Palma-López, D. (2010). *Effects of rhizosphere, microorganisms and fertilization on bioremediation and*

- phytoremediation of soils with new and weathered crude oil. Universidad y Ciencia Trópico Húmedo*, 26(2), 121-136. <https://www.scielo.org.mx/pdf/uc/v26n2/v26n2a1.pdf>
- Márquez V., L. M., Serrato D., A., y Cerritos F., R. (2014). *Secuenciación de fragmentos de ADN en Cornejo Romero*, A. Serrato Díaz, B. Rendón Aguilar, y M. G. Rocha Munive (Eds.), *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. [https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4\\_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/\\$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcolog%C3%ADa.pdf](https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcolog%C3%ADa.pdf)
- Martin, K. J., y Rygiewicz, P. T. (2005). Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology*, 5(28), 1-11. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-28>
- Medina, J., García, F. y Paricaguán, B. (2014). Biodegradación de petróleo por microorganismos autóctonos en suelos contaminados provenientes de la bahía de Amuay del Estado Falcón. *Ingeniería UC*, 21(1), 62-69. <https://www.redalyc.org/pdf/707/70732642007.pdf>
- Mendeluk, G. y Palaoro, L. (2020). *Citología exfoliativa y de la reproducción*. Ed. Eudeba. <https://contentv2.tap-commerce.com/file/653546/Citolog%C3%ADa%20exfoliativa%20eudeba.pdf>
- Méndez A., S. y Pérez-Roth, E. (2004). *La PCR múltiple en microbiología clínica Multiplex PCR in clinical microbiology*. Elsevier, 22(3), 183-192. <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-la-pcr-multiple-microbiologia-clinica-13058027>
- Mohankumar, M., Vijayasamundeeswari, A., Karthikeyan, M., Mathiyazhagan, S., Paranidharan, V., y Velazhahan, R. (2010). *Analysis of molecular variability among*

- isolates of aspergillus flavus by pcr-rflp of the its regions of rdna. Journal of plant protection research*, 50(4), 446-451. <https://doi.org/10.2478/v10045-010-0075-4>
- Moreno, C. E. 2001. *Métodos para medir la biodiversidad*. Manuales y Tesis SEA. CITED, 1, 5-83. <http://entomologia.rediris.es/sea/manytes/metodos.pdf>
- Oliva V., R. y Vidal Taboada, J. M. (2006). *Genoma humano. Nuevos avances en investigación, diagnóstico y tratamiento*. (Vol. 2). Edicions de Universitat de Barcelona. [https://www.google.com.ec/books/edition/Genoma\\_humano\\_Nuevos\\_avances\\_en\\_investigacion\\_y4LARbhrGXwC?hl=es&gbpv=0](https://www.google.com.ec/books/edition/Genoma_humano_Nuevos_avances_en_investigacion_y4LARbhrGXwC?hl=es&gbpv=0)
- Pedroza S., A. (2015). *Manejo integrado fitosanitario*. [Guía didáctica, Universidad Autónoma Chapingo]. [https://www.researchgate.net/profile/Aurelio-Pedroza-Sandoval/publication/282850956\\_Guia\\_Didactica\\_de\\_Manejo\\_Integrado\\_Fitosanitario/links/561e769e08aec7945a26b47f/Guia-Didactica-de-Manejo-Integrado-Fitosanitario.pdf#page=51](https://www.researchgate.net/profile/Aurelio-Pedroza-Sandoval/publication/282850956_Guia_Didactica_de_Manejo_Integrado_Fitosanitario/links/561e769e08aec7945a26b47f/Guia-Didactica-de-Manejo-Integrado-Fitosanitario.pdf#page=51)
- Pérez, A. M. (2015). *Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)*. [Archivo PDF] <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacci%C3%B3n%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf>
- Piedra B., A. (2002). *Caracterización morfoagronómica y molecular de la colección nacional de oca (Oxalis tuberculosa) del Banco de Germoplasma del INIAP*. [Disertación, Pontificia Universidad Católica del Ecuador]. <https://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/768>
- Pino L., E. R., Briones García, J. I., Huebla Concha, V. H., y Mancheno Salazar, G. M. (2019). *Chevrón-Texaco case. Current problem of the Ecuadorian Amazon Region*. *Dilemas contemporáneos*, 6(2) 1-15. <https://dilemascontemporaneoseduccionpoliticayvalores.com/index.php/dilemas/article/view/669>

- Pla, L. (2006). Biodiversidad: *Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza*. *Interciencia*, 31(8), 583–590.  
[http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442006000800008&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006000800008&lng=es&tlng=es).
- QIAGEN. (2023a). *Desarrollo y resolución de problemas de ensayos de dPCR*. PCR Digital. Recuperado el 30 de agosto de 2023 de <https://www.qiagen.com/es-es/applications/digital-pcr/beginners/dpcr-guide/setup-and-troubleshooting>
- QIAGEN. (2023b). *Enzimas para biología molecular*. PCR y Amplificación Del ADN. Recuperado el 20 de agosto de 2023 de <https://www.qiagen.com/es-es/applications/enzymes/pcr-and-dna-amplification>
- Qianwei, L., Jicheng, L., y Gadd, G. M. (2020). *Fungal bioremediation of soil co-contaminated with petroleum hydrocarbons and toxic metals*. In *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer. (104), 8999–9008 <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10854-y>
- Quinsasamín Armas, J. I. (2019). *Diversidad de hongos rizosféricos de tres especies arbóreas plantadas en suelos perturbados por la actividad petrolera de la amazonía ecuatoriana*. [Trabajo de titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE].  
<https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/21015/1/T-IASA%20I-005491.pdf>
- Ramírez, F., y De La Torre, A. (2008). *Evaluación de los cebadores ITS3 e ITS4 para la detección de infecciones por Candida spp. en muestras de flujo vaginal y humor acuoso*. *Asociación Colombiana de Infectología*, 12(2), 332-339.  
<http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v12n2/v12n2a04.pdf>
- Relloso, M. S., Nievas, J., Taie, S. F., Farquharson, V., Mujica, M. T., Romano, V., Zarate, M. S., y Smayevsky, J. (2015). *Evaluación de la espectrometría de masas: MALDI-TOF MS para la identificación rápida y confiable de levaduras*. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(2), 103-107. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.02.004>

- Remache Arequipa, R. A. (2020). *Diversidad de hongos endorizosféricos de tres especies arbóreas plantadas sobre suelos perturbados inoculados con tierra de bosque natural*. [Trabajo de titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE].  
<https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/24805/1/T-IASA%20I-005607.pdf>
- Roche (30 de enero de 2019). *Laboratorio de diagnóstico molecular*. Recuperado el 20 de agosto de 2023 de <https://www.roche.com.ar/innovacion/ensayos-clinicos>
- Rodríguez, M. del C. (2009). *Técnicas de biología molecular*. *Odonto Moder*, 1, 6–7.  
<https://www.imbiomed.com.mx/articulo.php?id=58852#:~:text=Agentes%20cebadores%2C%20tambi%C3%A9n%20conocidos%20como,las%20cadenas%20de%20ADN%20di>  
ana.
- Rodríguez-Lázaro, y Hernández. (2006). *Molecular Methodology in food microbiology diagnostics: trends and current*. *IUFoST*, 1085-1099.  
<https://doi.org/10.1051/IUFoST:20060643>
- Ruiz, C. (2021). *Evaluación del sistema maldi-tof vitek ms tm para la identificación rápida de microorganismos de interés clínico*. [Tesis doctoral, Universidad de Cantabria].  
<https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/24307/TESIS%20CRDAP.pdf?sequence=1>
- Rushtone, M. (2008). *A Note on the Use and Misuse of the Racial Diversity Index*. *Policy Studies Journal*, 36(3), 445-459. <https://doi.org/10.1111/j.1541-0072.2008.00276.x>
- Salas C., D. (2020). *Identificación directa de uropatógenos por Maldi-Tof MS (Matrix-Assisted Laser desorción/Ionización Time of Flight)*. [Tesis de grado, Universidad nacional de San Agustín de Arequipa].  
<https://repositorio.unsa.edu.pe/server/api/core/bitstreams/0314695d-c9ab-4f2e-92a0-4640e2f9e002/content>

- Secretaría Técnica de la Circunscripción Territorial Especial Amazónica. (2021). *Plan Integral para la Amazonía 2021 - 2035*. [Archivo PDF].  
[https://www.secretariadelamazonia.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2022/09/PIA\\_final-Digital-.pdf](https://www.secretariadelamazonia.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2022/09/PIA_final-Digital-.pdf)
- Simbaña Cazar, C. J. (2016). “*Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de la parroquia Taracoa en Francisco de Orellana, mediante el hongo Pleurotus ostreatus*”. [Trabajo de titulación, Escuela Superior Politécnica del Chimborazo].  
<http://dspace.espech.edu.ec/bitstream/123456789/4916/1/236T0192.pdf>
- Sosa Vargas, V. S. (2018). *Diversidad de hongos presentes en raíces de tres especies arbóreas plantadas en suelos perturbados por la actividad petrolera en la Amazonia Ecuatoriana*. [Trabajo de titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE].  
<https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/15842/1/T-IASA%20I-005460.pdf>
- Stambouljan. (2019). Técnicas moleculares de Microbiología en la práctica diaria. Bioanálisis, 15-17. [https://www.stambouljan.com.ar/pdf/Tecnicas\\_moleculares.pdf](https://www.stambouljan.com.ar/pdf/Tecnicas_moleculares.pdf)
- Suárez Contreras, L. Y., y Peñaranda Figueredo, F. A. (2021). *Identificación molecular de hongos filamentosos y su potencial biotecnológico. Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 20(1), 194-206.  
<https://doi.org/10.18684/rbsaa.v20.n1.2022.1914>
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., y Velasquillo, C. (2013). *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real*. Investigación en Discapacidad, 2(2), 70-78.  
[www.medigraphic.org.mx](http://www.medigraphic.org.mx)  
<http://www.medigraphic.com/rid>  
[www.medigraphic.org.mx](http://www.medigraphic.org.mx)
- Tamayo, O., y Cariga, J. (2021). *Aplicaciones de Microorganismos para Remediar Suelos Contaminados por Petróleo y sus Residuos o Derivados*. [Tesis de grado, Universidad César Vallejo]. <https://hdl.handle.net/20.500.12692/66398>

- Tomás Gonzáles, E. Z. (2021). *Extracción de ADN a partir de sangre periférica y médula ósea*. [Archivo PDF]. file:///C:/Users/User/Downloads/RD%20N%C2%B0%20000187-2021-DG-INSNSB%20Gu%C3%ADa%20Extracci%C3%B3n%20de%20ADN%20en%20Sangre%20Perif%C3%A9rica%20y%20M%C3%A9dula%20Ósea.pdf
- Torres Rodríguez, D. (2003). El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos. *Ecosistemas*, 12(2), 1-5.  
<https://www.redalyc.org/pdf/540/54012219.pdf>
- Ulcuango, K., Villacís, J., y Basantes, E. (2014). *Estudio de las variables de crecimiento de 20 especies forestales y las características edafológicas de plataformas y celdas de lodos y ripios de la EP PETROECUADOR*. [Disertación Doctoral, Universidad Politécnica de Madrid]. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.32175.74403>
- Valdez, F. (2003). *Primeras sociedades de la alta Amazonia*. [Archivo PDF].  
[https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins\\_textes/divers17-07/010070442.pdf](https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/divers17-07/010070442.pdf)
- Valdez M., Carlos Gerardo, Guzmán L., Marco Antonio, Valdés G., Arcadio, Forougbakhch P., Rahim, Alvarado V. Marco Antonio, y Rocha E., Alejandra (2018). *Estructura y diversidad de la vegetación en un matorral espinoso prístino de Tamaulipas, México*. *Revista de Biología Tropical*, 66(4), 1674-1682.  
<https://www.scielo.sa.cr/pdf/rbt/v66n4/0034-7744-rbt-66-04-1674.pdf>
- Valenzuela, E., Solís, L., Martínez, O., y Pinochet, D. (2006). Hongos aislados desde suelos contaminados con petróleo. *Boletín Micológico*, 21, 35-41.  
<https://doi.org/10.22370/bolmicol.2006.21.0.242>
- Vanegas Berrouet, K. M., Sánchez, P. A. G., Montoya, M. A. M., y Montoya, M. M. (2014). *Molecular Identification of Fungi Isolated from Bean Tissues with Anthracnose Symptoms*. *Acta Biológica Colombiana*, 19(2), 43-154.

[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0120-548X2014000200002](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0120-548X2014000200002)

Vega Chimarro, M. A. (2021). *Efecto de la inoculación de suelos perturbados sobre la diversidad de hongos ectoizosféricos de tres especies arbóreas en la amazonía ecuatoriana*. [Trabajo de titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE].  
<https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/24876/1/T-IASA%20I-005706.pdf>

Velasco Jiménez, A., Castellanos Hernández, O., Acevedo Hernández, G., Aarland, R. C., y Rodríguez-Sahagún, A. (2020). Rhizospheric bacteria with potential benefits in agriculture. *Terra Latinoamericana*, 38(2), 343–355.  
<https://doi.org/10.28940/terra.v38i2.470>

Watanabe, T. (2010). *Pictorial atlas of soil and seed fungi: Morphologies of cultured fungi and key to species* (2a ed.). CRC Press.

Zambrano Fierro, Priscila M. (2020). *Caracterización molecular de un grupo de híbridos provenientes del cruzamiento (Solanum betaceum Cav. x Solanum unilobum) del Cadet*. [Trabajo de titulación, Universidad Central del Ecuador].  
<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/21510/1/T-UCE-0004-CAG-273.pdf>