

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE CUENCA

CARRERA: INGENIERÍA AMBIENTAL

Trabajo de Titulación previo a la obtención del
Título de Ingeniera Ambiental

Título:

**BIODIVERSIDAD FÚNGICA EN EL SUELO DEL
BOSQUE PROTECTOR AGUARONGO, PROVINCIA DEL AZUAY -
ECUADOR**

Autora:

Liseth Paola Ortiz Paucay

Tutor:

Ernesto Delgado Fernández, PhD

CUENCA – ECUADOR

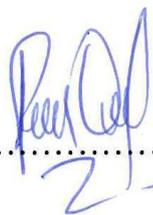
Octubre, 2016

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, Liseth Paola Ortiz Paucay, con documento de identificación N° 1400676316, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo de grado intitulado “BIODIVERSIDAD FÚNGICA EN EL SUELO DEL BOSQUE PROTECTOR AGUARONGO, PROVINCIA DEL AZUAY - ECUADOR”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de Ingeniera Ambiental en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, Octubre del 2016



Nombre: Liseth Paola Ortiz Paucay
Cédula: 1400676316

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Yo, Liseth Paola Ortiz Paucay, con número de cédula 1400676316 autor de la tesis “BIODIVERSIDAD FÚNGICA EN EL SUELO DEL BOSQUE PROTECTOR AGUARONGO, PROVINCIA DEL AZUAY - ECUADOR”, certifico que el total del contenido de ésta investigación es de mí exclusiva responsabilidad y autoría.

Cuenca, Octubre del 2016



Nombre: Liseth Paola Ortiz Paucay
Cédula: 1400676316

CERTIFICACIÓN

Declaro que bajo mi tutoría se desarrolló el trabajo de titulación “BIODIVERSIDAD FÚNGICA EN EL SUELO DEL BOSQUE PROTECTOR AGUARONGO, PROVINCIA DEL AZUAY - ECUADOR” realizado por la Srta. Liseth Paola Ortiz Paucay, el trabajo experimental cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerado como trabajo de titulación.

Cuenca, Octubre del 2016



Manuel Ernesto Delgado Fernández, PhD
0102073780

DEDICATORIA

Con todo el amor, a mi familia, quienes han sido mi apoyo y soporte durante toda mi carrera universitaria.

A todas las personas especiales que han formado parte de mi vida, quienes firmemente me han recordado que “la perseverancia logra, lo que la dicha no alcanza”.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Politécnica Salesiana y a todos los docentes de la Carrera de Ingeniería Ambiental, quienes me han brindado sus conocimientos a lo largo de ésta etapa; de manera especial al Dr. Ernesto Delgado Fernández, quien con su preparación académica y su invaluable apoyo moral, ha sabido guiarme de forma exitosa en el desarrollo del presente trabajo.

De igual manera al Ing. Alejandro Parra Gonzáles, por su asesoría en ésta investigación.

A los laboratorios de Ciencias de la Vida de la UPS.

RESUMEN

El presente trabajo experimental busca aportar al conocimiento científico mediante el estudio de la “biodiversidad fúngica, del Bosque Protector Aguarongo (ABVPA). Para cumplir con este propósito, se hicieron muestreos periódicos de la rizósfera del suelo en la zona de influencia, el área total del bosque es de 2080 hectáreas, y se diseñó un tipo de muestreo considerando tres niveles altitudinales de acuerdo a la cota máxima y mínima, se trazó una cuadrícula, el muestreo de suelo empleado es aleatorio estratificado, que busca mayor homogeneidad y reducir la varianza dentro de cada estrato”. (Ramírez *et al*, 2005)

Para el aislamiento de los hongos se utilizaron las técnicas: 1.- Dilución en placa (Muller, Bills, & Foster *et al*, 2004), 2.- Cultivo en medio líquido (Díaz *et al*, 2000) y 3.- Siembra Directa (Muller, Bills, & Foster *et al*, 2004), los medios de cultivo que se utilizaron fueron: Potato Dextrose Agar (PDA) MERCK, (Czapek) DIFCO, Malt Extract Agar (MEA), CONDA, y (Sabourad) MERCK.

La identificación por género de las cepas, se hizo mediante la utilización de claves taxonómicas, considerando las características macro y microscópicas. Es importante mencionar que la clasificación por género y especie se respaldará con el análisis biomolecular correspondiente al finalizar la investigación y que no es el objetivo de este trabajo de titulación. Los cultivos puros de los hongos filamentosos se conservaron en tubos de ensayo a pico de clarín, se formó un cepario con un total de 181 hongos, que constituyen un aporte muy importante para investigaciones posteriores en el área de la Biotecnología Ambiental. Los géneros más representativos aislados fueron: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, y *Fusarium*, las especies de estos géneros se determinarán mediante el análisis biomolecular correspondiente. En

base a los resultados, no existe diferencia significativa entre la carga fúngica en los 3 pisos altitudinales, sin embargo los métodos de aislamiento que resultan ser significativos estadísticamente son: siembra directa y dilución en placa.

INDICE

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR	I
DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD	II
CERTIFICACIÓN	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTO	V
RESUMEN	VI
INDICE	VIII
LISTADO DE FIGURAS	X
LISTADO DE TABLAS	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Áreas Protegidas del Ecuador	3
1.3 Ubicación del área de estudio	3
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo General	3
2.2 Objetivos Específicos	4
3 MARCO TEÓRICO	4
3.1 Área de Bosque y Vegetación Protectora Aguarongo	4
3.1.1 Características Geográficas de la Zona	5
3.1.2 Suelo del ABVPA	6
3.2 Suelo	9
3.3 Hongos del Suelo	12
3.3.1 Características	13
3.3.2 Clasificación General	14
3.3.3 Hongos Filamentosos	15
3.4 Géneros más representativos	20
3.4.1 <i>Aspergillus</i> sp.	20
3.4.2 <i>Trichoderma</i> sp.	22
3.4.3 <i>Penicillium</i> sp.	24
3.4.4 <i>Fusarium</i> sp	27
4. MATERIALES Y MÉTODOS	29
4.1 Clasificación de niveles altitudinales	29

4.2 Muestreo	29
4.2.1 Determinación del tipo muestreo.....	29
4.2.2 Tamaño de la muestra	29
4.2.3 Toma de muestras	32
4.3 Métodos de Aislamiento.....	32
4.3.1 Cultivo Líquido.	32
4.3.2 Dilución del suelo en placa	34
4.3.3 Placas de Suelo Warcup o Siembra Directa	35
4.4 Medios de Cultivo	36
4.5 Taxonomía	36
4.5.1 Cepario.....	36
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
5.1 Aislamiento por géneros obtenidos en cada piso.....	36
5.2 Análisis estadístico de la carga fúngica en los pisos altitudinales	37
5.3 Métodos de aislamiento	39
5.4 Análisis estadístico	40
5.5 Formación de un cepario de hongos filamentosos.....	41
5.6 Identificación Taxonómica	42
5.6.1 Características Macroscópicas.....	42
5.6.2 Características microscópicas	43
5.7 Banco de fotos de hongos filamentos aislados del ABVPA.....	43
5.7 Discusión	70
5.8 Proyección Futura.....	71
CONCLUSIONES.....	72
RECOMENDACIONES.....	73
BIBLIOGRAFÍA.....	74
GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	78

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1 Mapa de Ubicación del ABVPA	4
Figura 2 Mapa Hidrográfico del ABVPA	6
Figura 3 Tipo de Suelos del ABVPA.....	7
Figura 4 Uso de suelo del ABVPA	8
Figura 5 Perfil del suelo.....	11
Figura 6 Estructuras Somáticas.....	17
Figura 7 Tipos de esporas	18
Figura 8 Estructuras con esporas externas	19
Figura 9 Conidióforos de <i>Aspergillus</i>	21
Figura 10 Estructura de los Conidióforos del género <i>Penicillium</i>	25
Figura 11 Tipos de Conidióforos y subgéneros presentes en <i>Penicillium</i> sp.....	26
Figura 12 Tipo de fiálides presentes en <i>Penicillium</i> sp.....	26
Figura 13 Estructura del género <i>Fusarium</i> sp.	28
Figura 14 Mapa de Clasificación de Niveles Altitudinales del ABVPA	30
Figura 15 Transporte de las muestras	32
Figura 16 Gramos de suelo tamizado y homogéneo	33
Figura 17 Suelo tamizado en matraces de 1000ml para cultivo líquido	33
Figura 18 Agitación de la solución con la muestra del suelo.....	33
Figura 19 Cultivo líquido en reposo por 7 días.....	34
Figura 20 Diluciones seriadas	35
Figura 21 Siembra Directa de muestras de suelo en cajas petri con medio PDA	35
Figura 22 Géneros Aislados en los tres pisos altitudinales del ABVPA.....	38
Figura 23 Biodiversidad Fúngica del ABVPA	39
Figura 24 Hongos obtenidos por método de aislamiento	40
Figura 25 Placas porta-objetos que forman el cepario	41
Figura 26 Cepario de hongos filamentosos del ABVPA	41

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1 Cobertura al interior del Área Protegida.....	9
Tabla 2 Clasificación de Pisos Altitudinales.....	29
Tabla 3 Coordenadas de los puntos de muestreo. Sistema de Coordenadas: WGS-84.....	31
Tabla 4 Valores de géneros aislados por pisos	37
Tabla 5 Resultados t de Student para muestras relacionadas	37
Tabla 6 Número de hongos aislados en el ABVPA	38
Tabla 7 Géneros aislados con respecto al método de aislamiento	39
Tabla 8 Resultado t de Student de los métodos de aislamiento.	40
Tabla 9 Banco de fotos de hongos filamentosos.....	44

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

A mediados del siglo XX, se desarrollaron las primeras investigaciones direccionadas al estudio del potencial de los microorganismos en procesos de biorremediación, como lo indica (Zobell *et al*, 1946), siempre que sea expuesto a soluciones minerales en el que la vida microbiana es posible, el petróleo, caucho u otros tipos de hidrocarburos pueden descomponerse lentamente por microorganismos. La oxidación microbiana de hidrocarburos puede ayudar a explicar la rápida desaparición de grandes yacimientos de petróleo en este planeta.

Sin embargo, las primeras patentes relacionadas fundamentalmente para remediación de gasolina aparecen en los años 70. (Rodríguez & Sánchez *et al*, 2003); como consecuencia del desarrollo industrial y el uso de hidrocarburos entre otros aspectos, existe el peligro de contaminar el medioambiente, en este sentido se buscan mecanismos alternos amigables con el medio ambiente que busquen la recuperación de matrices ambientales contaminadas.

Los metales pesados producto de actividades antropogénicas como la minería pueden ser tratados con métodos biológicos, químicos o físicos, siendo éstos dos últimos poco factibles debido al elevado costo de sus procesos. La problemática así planteada faculta la búsqueda de métodos biológicos como alternativas amigables con el medio ambiente y viables en cuanto al costo de los procesos. El uso de métodos biológicos abre una pauta para el estudio de hongos filamentosos nativos presentes en el suelo como agentes de bioacumulación y biorremediación.

La capacidad de los microorganismos para degradar y remediar matrices contaminadas se conoce como biorremediación, este tipo de tecnología se basa en el uso de organismos naturales o mejorados genéticamente para recuperar sitios contaminados y proteger el ambiente. (Miller & Poidexter *et al*, 1994)

Estos sistemas de descontaminación se basan en la absorción de sustancias orgánicas por parte de microorganismos, estas sustancias son fuente de carbono y energía, necesaria para el crecimiento y el desarrollo de sus funciones metabólicas. (Torres *et al*, 2003)

Los hongos son los principales organismos junto con las bacterias capaces de descomponer la materia orgánica, por lo que su ecología resulta ser de una gran importancia para un hábitat natural y su población biológica. (Castro & Moreno *et al*, 2014)

Los hongos tienen gran importancia para conservar el equilibrio de la naturaleza, puesto que desintegran o reciclan casi todos los restos orgánicos y permiten así completar el ciclo de la materia y energía, intervienen en la producción de humus, que es un aspecto muy importante en la fertilidad de los suelos, algunas especies de hongos se han utilizado hasta la fecha en programas de control biológico. (Arenas *et al*, 2014)

El término “biosorción” se utiliza para referirnos a la acumulación de metales pesados a través de mecanismos fisicoquímicos como la adsorción o el intercambio iónico. (Acosta, Cárdenas, & Martínez *et al*, 2007)

Los microorganismos utilizados como biosorbentes, aislados a partir de ecosistemas contaminados retienen los metales pesados en intervalos de tiempo relativamente cortos al entrar en contacto con los metales, lo que permite minimizar

los costos en un proceso de remediación, ya que no se requiere el agregado de nutrientes al sistema “bioestimulación”. (Vullo, 2003)

1.2 Áreas Protegidas del Ecuador

El Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP) en la República del Ecuador, está formado por un conjunto de áreas naturales en los niveles terrestre, marino y costero marino, el Bosque Protector Aguarongo, fue declarado como área protegida, bajo la siguiente denominación “Área de Bosque y Vegetación Protectora Aguarongo” (AVBPA), mediante acuerdo ministerial N° 255 y publicado en el Registro Oficial el 22 de Agosto de 1985, a la zona de protección se le asignó el área N° 10. (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2007)

1.3 Ubicación del área de estudio

Ubicado en la Provincia del Azuay, el Bosque Protector Aguarongo, delimita al Norte con la Parroquia Jadán (Cantón Gualaceo), al Este con la Parroquia San Juan, al Sur la Parroquia San Bartolomé (Cantón Sigsig), y al Oeste la Parroquia Zhidmad (Cantón Gualaceo) y Santa Ana (Cuenca), dentro del área de la Cuenca del Río Paute provincia del Azuay, Cuenca-Ecuador, en el área se establece las siguientes coordenadas geográficas 7°48'54" y 78°52'22" de longitud occidental y 2°52'37" y 2°59'43" de latitud Sur.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

- Aislar y formar un cepario de hongos filamentosos nativos del suelo del Bosque y Vegetación Protectora Aguarongo.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar el aislamiento de hongos filamentosos del Bosque Protector Aguarongo
- Caracterizar macro y microscópicamente las cepas para establecer su clasificación taxonómica.
- Conservar las cepas para su posterior valoración en diferentes procesos biotecnológicos ambientales

3 MARCO TEÓRICO

3.1 Área de Bosque y Vegetación Protectora Aguarongo

El ABVPA en su declaración como área protegida en 1985 estaba destinada a la protección de 1.758 ha, sin embargo actualmente se han ampliado a 2.080 ha, que están repartidas entre varias comunidades (Ver Figura 1).



Figura 1 Mapa de Ubicación del ABVPA

Fuente: Instituto Geográfico Militar

Elaboración: Autora

3.1.1 Características Geográficas de la Zona

El ABVPA se encuentra en un rango de alturas que están entre los 2900 y 3320 m.s.n.m, el clima es variado, con una temperatura media anual que fluctúa entre 12 °C y 20°C. Según la estación meteorológica M0139, ubicada en el cantón Gualaceo la precipitación media anual de la zona es de 959.9 mm. En época seca la precipitación mensual varía de 7.6 a 55.9 mm, cuyo período va de Mayo a Septiembre, siendo su mínima en el último mes de la época, mientras que en invierno, desde Octubre hasta Abril, recibe de 72.2 a 161.0 mm de precipitación, con un máximo valor en el mes de Abril. (INAMHI, 2015)

3.1.1.1 Hidrografía

Según la cartografía digital del Instituto Geográfico Militar y del Sistema Nacional de Información, (Figura 2) el área en el que se encuentra ubicado el Bosque Protector Aguarongo, forma parte de dos microcuencas: la del río Jadán y la del río Santa Bárbara, que a su vez forman parte de la cuenca media del Paute. La zona cuenta con un gran número de quebradas, cuyas aguas van direccionadas a los ríos Jadán y Gualaceo. Por el relieve pronunciado del área, los diferentes ríos del sector son correntosos en invierno. Las quebradas más importantes en el área son la Siguncay y Chaquilcay, cuyos afluentes son los principales aportadores del río Jadán.

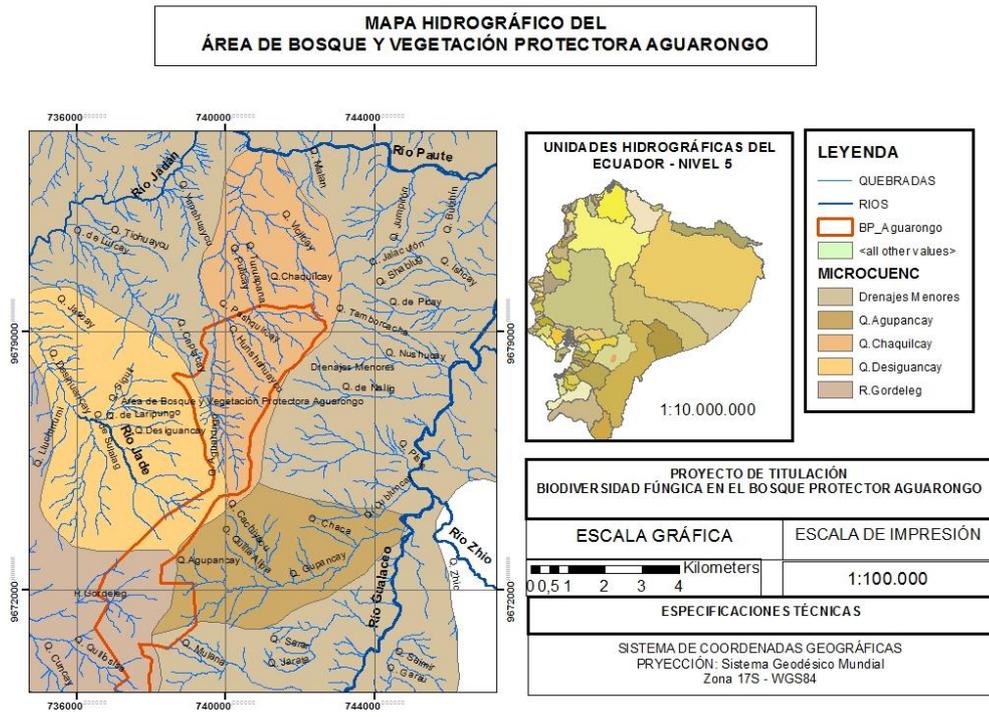


Figura 2 Mapa Hidrográfico del ABVPA
Fuente: Instituto Geográfico Militar - SNI
Elaboración: Autora

3.1.2 Suelo del ABVPA

La roca volcánica da origen a los suelos del área de estudio, presentándose suelos arcillosos de color pardo rojizo en su mayoría, de los límites del bosque al centro este tipo de suelo ha dado lugar a la formación de un horizonte superior negro de un espesor que varía de 20 a 40cm, caracterizado por un alto contenido de humedad, materia orgánica con textura arenosa y franco-arenosa, el pH es ácido alrededor de (5.5) los horizontes inferiores son profundos y presentan una coloración pardo rojiza. (Prado, 2015)

3.1.2.1 Tipos de Suelo del ABVPA

En la Figura 3 se muestra la clasificación de los suelos en el área, presentándose en su mayoría Inceptisoles, definidos según la (FAO, 2015), como suelos pocos

evolucionados, con características poco definidas al igual que sus horizontes. En zonas de clima frío, por lo general se presenta acumulación de materia orgánica en la superficie debido a las condiciones de baja degradación, estos suelos presentan un pH ácido y malas condiciones de drenaje.

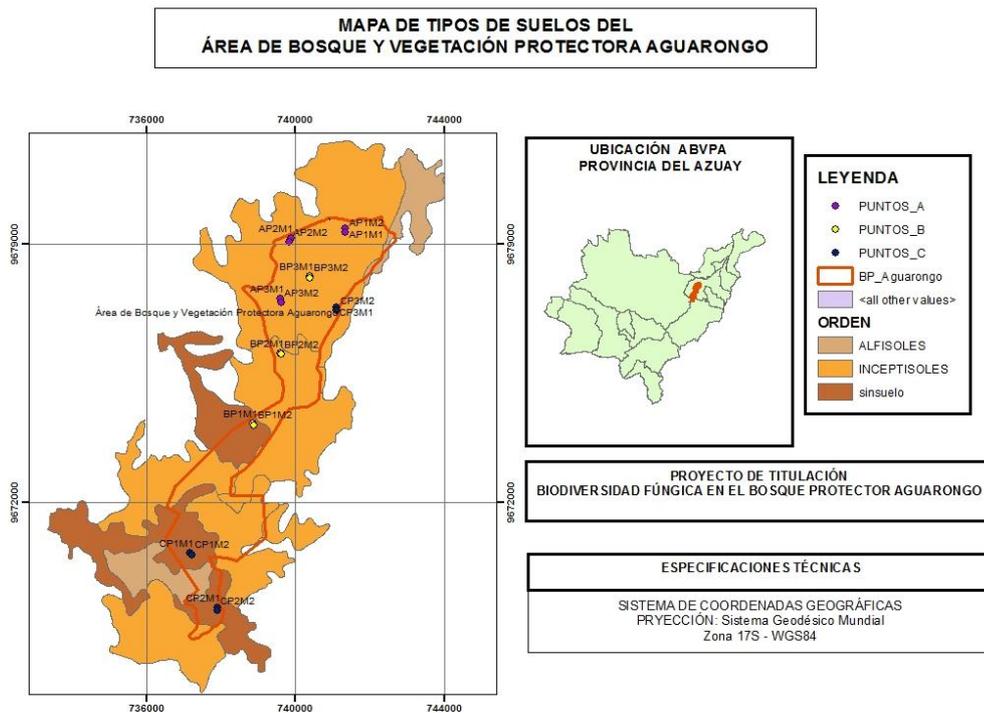


Figura 3 Tipo de Suelos del ABVPA
Fuente: Instituto Geográfico Militar
Elaboración: Autora

3.1.2.1 Uso del Suelo

Las 2080 ha forman parte del área, en los alrededores del bosque generalmente encontramos Pastos Naturales, y Vegetación Baja (Chaparro). (Ver Figura 4)

Tabla 1 Cobertura al interior del Área Protegida

USO ACTUAL	ÁREA (ha)	PORCENTAJE
Vegetación Baja (chaparro)	1020,2059	52,53 %
Pasto Natural	470.1497	24,21 %
Vegetación Leñosa	307.8646	15,85 %
Zonas de pastoreo y cultivos	123.6646	6,37 %
Suelo Descubierta (suelos erosionados, vías y asentamientos)	13.4551	0,69 %
Suelo Degradado (Suelo de arado)	6.6644	0,34 %

Fuente: (Prado, 2015)

3.2 Suelo

Se define como la capa superficial de materia mineral y orgánica no consolidada que sirve de medio natural para el crecimiento de las plantas, y que ha sido sujeto a los efectos de los factores que le dieron origen (*clima, topografía, biota, material parental y tiempo*); debido a la interacción de éstos, difiere en sus propiedades físicas, químicas, biológicas y morfológicas del sustrato rocoso del que se originó. Por ello, el suelo ya no es roca ni sedimento geológico, sino un producto proveniente de las alteraciones e interacciones que experimentan estos materiales. (SSSA, 1997)

El suelo está compuesto por minerales, materia orgánica, diminutos organismos vegetales y animales, aire y agua. Es una capa delgada que se ha formado muy lentamente, a través de los siglos, con la desintegración de las rocas superficiales por la acción del agua, los cambios de temperatura y el viento. Las plantas y animales que crecen y mueren dentro y sobre el suelo son descompuestos por los microorganismos, transformados en materia orgánica y mezclados con el suelo. (FAO, 2015)

El suelo puede concebirse como un sistema abierto que presenta intercambios de materia y energía con el medio, en él se desarrollan diversos procesos físicos,

químicos y biológicos, responsables de su morfología (forma), características y propiedades. (Arnold, Szabolcs, & Targulian *et al*, 1990)

En el suelo se multiplican miles de formas de vida, la mayoría invisibles para nuestros ojos. Una hectárea de tierra fértil puede contener más de 300 millones de pequeños invertebrados: insectos, arañas, lombrices y otros animales diminutos. La tierra que cabe en una cuchara puede encerrar un millón de bacterias, además de cientos de miles de células de levaduras y pequeños hongos. (FAO, 2015)

Químicamente, el suelo contiene una gran cantidad de sustancias orgánicas que se encuentran en los estratos más profundos. El medio ambiente edáfico es único en diferentes aspectos: contiene gran variedad de bacterias, actinomicetos, hongos, algas y protozoarios; es uno de los sitios más dinámicos en interacciones biológicas en la naturaleza, en el cual se realizan la mayor parte de las reacciones bioquímicas involucradas en la descomposición de materia orgánica, la intemperización de las rocas y la nutrición de cultivos agrícolas. (Alexander *et al*, 1980)

3.2.1 Horizontes del suelo

Los horizontes son niveles en el interior del suelo más o menos paralelos a la superficie. Se distinguen unos de otros por diferencias en granulometría de las partículas, color, estructura, contenido en materia orgánica, pedregosidad u otras propiedades edáficas. Los horizontes resultan normalmente, al menos en parte, de procesos de formación del suelo. (Hodgson *et al*, 1987)

El suelo está dispuesto en horizontes edáficos o perfiles, como se muestra en la Figura 5:



Figura 5 Perfil del suelo
Fuente: (Delgado, 2001)

- Horizonte O: es la capa superficial del suelo, con un alto contenido de materia orgánica como tallos, hojas y/o raíces muertas que se degradan progresivamente, siendo dominante en suelos de pastizales y de bosque, sin embargo su presencia es nula en suelos desérticos.
- Horizonte A: esta capa tiene una coloración oscura, con un alto contenido de humus, proveniente de la avanzada desintegración de la materia orgánica muerta; cuenta con una textura granular, y puede tener una pérdida de nutrientes, ya que es una zona de lavado vertical debido a la esorrentía superficial.
- Horizonte B: esta capa carece de humus por lo que su color es más claro en esta profundidad, siendo el depósito de materiales arrastrados desde la parte superior, tales como materiales arcillosos, óxidos e hidróxidos.

- Horizonte C: que es la capa que limita con la roca madre sólida y contiene fragmentos de roca intemperizada. Además, el horizonte C está más saturado de agua subterránea. (Solomon, Berg, Martin, & Villet *et al*, 1996)

3.2.2 Microorganismos del suelo

La biodiversidad del suelo refleja una gran variedad de organismos vivos, algunos no visibles a simple vista como los microorganismos (bacterias, hongos, protozoarios y nematodos) como mesofauna (ácaros, colémbolos) y la más reconocida macrofauna (lombrices y termitas). Las raíces de las plantas también se pueden considerar como organismos del suelo por su relación simbiótica con hongos y otros microorganismos. (FAO, 2015). La biota del suelo está compuesta por el conjunto de fauna y la flora que viven en él, la gran mayoría de los organismos vive en las capas superficiales, donde las condiciones de humedad, temperatura, ventilación y luminosidad satisfacen sus necesidades. (Jaramillo *et al*, 2002)

3.3 Hongos del Suelo

Los hongos son organismos eucariontes que constituyen un complejo y fascinante grupo de organismos, se calculan alrededor de 200.000 especies, viven en los medios más variados, y sólo alrededor de 400 son patógenos para mamíferos, aunque son patógenos igualmente de vegetales. (Arenas *et al*, 2014)

Poseen un amplio rango de funciones, incluyendo su papel como simbionte y patógenos de plantas y animales, oligótrofos e incluso carnívoros, sin embargo su papel más importante desde el punto de vista ecológico, es la descomposición de la materia orgánica, desde azúcares simples y aminoácidos hasta polímeros muy

resistentes como la lignina y complejos de ácidos húmicos. Debido a su gran tolerancia a la acidez, comparado con las bacterias heterótrofas, la descomposición de la materia orgánica en suelos ácidos es en su mayoría realizada por hongos, el papel de estos microorganismos como simbioses en las raíces de las plantas forman lo que conocemos como micorrizas, que cumplen un papel muy importante en la nutrición y desarrollo, además de la resistencia a enfermedades y condiciones desfavorables de humedad.

El reino *Fungi* representa uno de los más grandes acervos de biodiversidad, con actividades ecológicas cruciales en todos los ecosistemas y con una gran variabilidad en morfología y ciclos de vida. Los organismos incluidos en este reino son tan diversos que es difícil dar una diagnosis diferencial concisa, pero pueden ser descritos como organismos, en su mayoría, filamentosos con crecimiento apical, eucarióticos, aclorófilos, heterótrofos por absorción, con reproducción asexual y sexual por medio de esporas, con pared celular principalmente constituida por quitina o celulosa. (Herrera & Ulloa *et al*, 1990)

3.3.1 Características

Son organismos eucariotas, formados por células en cuyo interior tenemos un citoplasma organizado dispuesto entre una membrana externa citoplasmática y otra interna nuclear que contiene al núcleo y que es en donde se ubica el material genético.

Los hongos son heterótrofos, se alimentan por absorción, almacenan glucosa formando glucógeno y presentan quitina en sus paredes celulares. Las esporas o unidades reproductoras de los hongos, pueden ser unicelulares o pluricelulares, móviles (zoosporas) o inmóviles y sexuales o asexuales, no presentan distinción entre

masculinas y femeninas, ya que son sus núcleos los encargados de dar una polaridad positiva o negativa. (Castro & Moreno *et al*, 2014)

Los hongos al carecer de clorofila (aclorófilos) no pueden sintetizar los nutrientes que necesitan para vivir como los hacen las plantas, pero cuentan con tres formas básicas de conseguirlos: 1.- Parasitan organismos vivos 2.- Extraen nutrientes de la materia orgánica en descomposición. 3.- Establecen intercambios micorrízicos.

3.3.2 Clasificación General

Los hongos se ubican dentro del reino *Fungi*, separados de las plantas y los animales, comprenden varios filos (*phylum*): Myxomycota y Oomycota considerados como pseudo hongos; Chytridiomycota y Zygomycota (hongos inferiores) y Ascomycota y Basidiomycota que son hongos superiores o meiospóricos, que tienen una reproducción sexuada conocida, (aunque los Zigomycetos también presentan reproducción sexuada por zigosporas). Los hongos sin reproducción sexuada o mitospóricos se denominan anamorfos, que antes se los conocía como deuteromicetos o *Fungi imperfecti* (hongos imperfectos) (ascomicetos anamorfos). (Arenas *et al*, 2014)

Las diferencias de opinión entre los micólogos sobre la clasificación son numerosas y a menudo tan grandes que en la literatura se encuentran discrepancias. Inicialmente la clasificación general de los hongos partía de dos grandes grupos: 1) Myxomycota, en el que se encontraban los mohos mucilaginosos sin pared celular, y 2) Eumycota, que comprendía los hongos verdaderos con pared celular, en los Myxomycota se agrupaban los filos Acrasiomycota, Hidromyxomycota, Myxomycota y Plasmodiophoromycota. En los Eumycota se agruparon los filos Mastigomycota

(ahora Chytridiomycota), Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota. (Montes, Restrepo, & McEwen *et al*, 2003).

Respecto a su morfología, los hongos pueden ser organismos unicelulares, como levaduras, o pluricelulares (filamentosos), este último tipo a su vez se clasifica en dos grupos: inferiores y superiores. Los primeros forman un solo micelio o moho, que toman un cromatismo específico cuando producen sus esporas. Los hongos superiores pueden formar un moho o micelio y setas o cuerpos fructíferos. (Castro & Moreno *et al*, 2014). De acuerdo a las características morfológicas básicas, los hongos pueden ser clasificados en dos grupos: macroscópicos (setas, cuya forma, tamaño y color tienen gran variedad) y microscópicos.

3.3.3 Hongos Filamentosos

Microorganismos eucarióticos, aerobios facultativos que se reproducen de manera natural por esporas, sexual o asexualmente. (Vargas & Villamizar *et al*, 2005). Los requerimientos nutricionales de estos son pocos, aunque su crecimiento es favorecido por la materia orgánica, humedad y temperatura, que está en un rango de 25 a 30 °C. (Papavizas *et al*, 1985)

Fisiológicamente se adaptan a condiciones más severas que otros microorganismos, su desarrollo en sustratos puede ser con concentraciones de azúcares elevados, estos microorganismos no son sensibles a la presión osmótica elevada, crecen lentamente de 5 a 7 días resistiendo condiciones de acidez relativamente altas (pH entre 2 y 9; óptimo de 5 a 6). (Moreno *et al*, 2000)

Para obtener carbono, utilizan una gran cantidad de materiales orgánicos, sencillos como complejos dado que son heterótrofos. La glucosa es la principal fuente

de carbono ya que es de fácil degradación al igual que la sacarosa y la maltosa. No obstante, también pueden emplear fuentes de carbono más complejas como son el almidón y la celulosa las cuales degradan mediante la producción de grandes cantidades de enzimas hidrolíticas como las lipasas, pectinasas y proteinasas. (Vera *et al*, 2004)

3.3.3.1 Estructura de los Hongos

1. Estructuras Somáticas:

El tallo de los hongos filamentosos está formado por filamentos largos de células unidas que se denominan hifas. Las hifas de un hongo pueden clasificarse en (vegetativas) que son siempre sumergidas ya que son las encargadas de absorber los nutrientes para el crecimiento, o hifas de tipo reproductor que crecen sobre la superficie del medio (aéreas). (Vera *et al*, 2004)

Las hifas pueden presentar septos, entonces el micelio está tabicado, si los tabiques están ausentes se habla de micelio continuo, los mohos son micromicetos filamentosos, cuando el hongo es una célula aislada se dice unicelular o levadura. Los cortos filamentos compuestos por las células que brotan de una levadura constituyen el pseudomicelio. (Carrillo *et al*, 2003) Las diferentes estructuras somáticas de los hongos se muestran en la Figura 6.

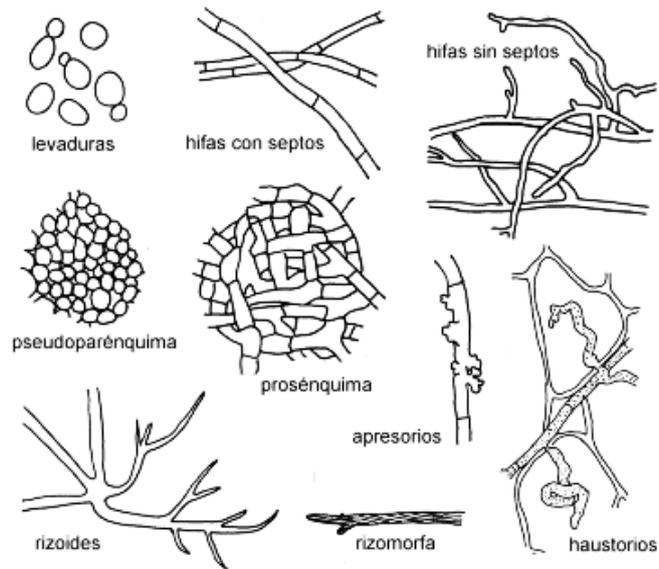


Figura 6 Estructuras Somáticas

Fuente: (Carrillo *et al*, 2003)

La pared celular del micelio de los mohos semeja un extenso sistema tubular por el que avanza el citoplasma para su dispersión y búsqueda de nutrientes. Los mohos se reproducen asexualmente en la mayoría de los casos y las estructuras sexuales sólo aparecen cuando las circunstancias son favorables o se encuentran micelios de distinta polaridad. (Carrillo & Audisio *et al*, 2007)

2. Estructuras reproductoras

Anamorfo es el hongo con multiplicación asexual y teleomorfo es el mismo con reproducción sexual, los hongos anamórficos generan esporas asexuales por mitosis, que tienen diversa forma y son mono o pluricelulares, la morfología de las estructuras que producen las esporas es muy variable, en cuanto al color de la mayoría de los mohos se debe a sus esporas asexuales, las que suelen desarrollarse en el extremo de unas estructuras especializadas que se extienden en el aire a partir del micelio, conocidas como esporóforos. (Carrillo & Audisio *et al*, 2007)

Las esporas permiten la perpetuación de la especie y pueden estar encerradas en un esporangio o ser externas (conidios). Los conidióforos generan esporas solitarias o en cadena, a veces están agrupados en un haz (coremio) o sobre un conjunto de hifas entrelazadas (acérvula, esporodoquio) o dentro de un conidioma (picnidio) (Carrillo & Audisio *et al*, 2007) (Ver Figura 7)

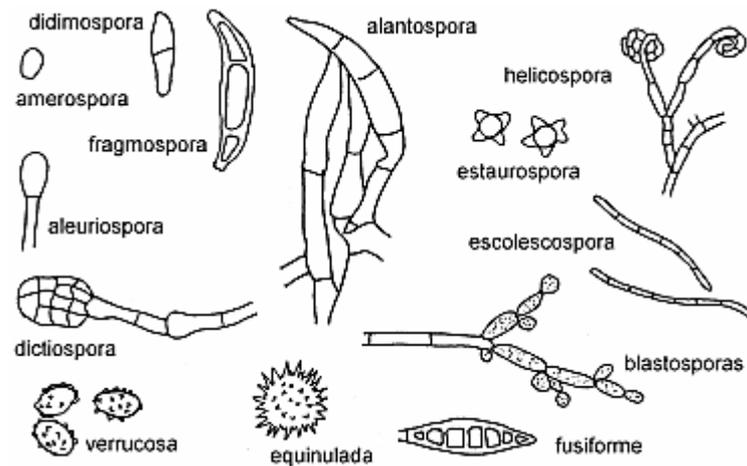


Figura 7 Tipos de esporas
Fuente: (Carrillo *et al*, 2003)

3. Estructuras anamórficas

Artrosporas o artroconidios son esporas desarrolladas en una hifa terminal que al madurar se separan, en algunos hongos se forman artrosporas separadas por una zona libre de citoplasma (disyuntor) cuya pared se rompe liberando las entosporas o clamido-artrosporas. Conidios o conidiosporas, son las esporas asexuadas externas, si están implantadas directamente sobre la hifa se llaman sésiles. La parte del micelio que origina y sostiene a las esporas se denomina esporóforo y si se trata de conidios se dice conidióforo, fiálide es la célula conidiógena que desde un extremo origina por brotación y sin aumentar su longitud, los fialoconidios o fialosporas, la pared de la fiálide suele extenderse en el ápice formando un collarín. Anélide es una célula

conidiógena con el ápice ancho y cicatrices en anillo, que se alarga con la formación de cada espora, los conidióforos pueden ser simples o ramificados y a veces están agrupados en un conidioma. (Carrillo L. , 2003)

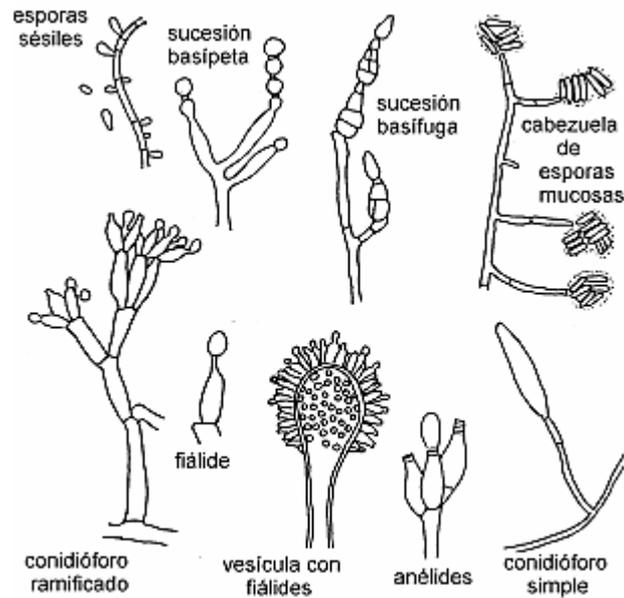


Figura 8 Estructuras con esporas externas
Fuente: (Carrillo *et al*, 2003)

3.2.3.1 Curva de Crecimiento

Los hongos pasan por tres fases de crecimiento: la primera es una fase donde no existe crecimiento evidente, seguido por una segunda fase de crecimiento rápido, y finalmente una fase estacionaria (Kavanagh *et al*, 2005)

La primera fase, sin crecimiento aparente, tiene dos componentes: una fase anterior a la germinación de esporas, y una fase en la que el crecimiento se presenta pero no se evidencia, en la segunda fase ocurre un rápido crecimiento y un desarrollo del micelio cuyo crecimiento ocurre en las extremidades de las hifas, en esta fase se utilizan carbohidratos, nitrógeno y fosfatos, pudiendo aparecer esporas al final de esta fase o antes de su finalización, la tercera fase se caracteriza por una disminución

en el peso del micelio y la aparición de nitrógeno y fosfatos en el medio. (Arias & Piñeros *et al*, 2008)

3.2.3.3 Condiciones de crecimiento

- **Medios de cultivo**

Los hongos deben encontrar en los medios de cultivo las condiciones para su crecimiento y desarrollo: *a*) sustancias nitrogenadas como peptona *b*) azúcares como glucosa o maltosa, que son indispensables; *c*) un soporte sólido, como la gelosa, que permite a los hongos filamentosos desarrollar micelio aéreo con órganos de fructificación, y *d*) un pH ácido entre 5 y 6.5 (Arenas *et al*, 2014)

- **Temperatura:**

De acuerdo a la temperatura, se pueden clasificar en tres grupos: Psicrófilos, mesófilos y termófilos. Los psicrófilos crecen en temperaturas debajo de 0°C y máxima 20°C, siendo la óptima de 0°C a 17°C. Los mesófilos, la mayoría de los hongos crece a una temperatura mínima de 0°C y máxima 50°C, siendo su óptima entre 15°C y 40°C; y los termófilos una mínima mayor a 20°C, máxima mayor a los 50°C y óptima entre 35°C y 50°C. (Kendrick *et al*, 2000)

3.4 Géneros más representativos

3.4.1 *Aspergillus* sp.

El género *Aspergillus* se caracteriza por la producción de hifas especializadas denominadas conidióforos, sobre los que se encuentran las células conidiógenas que originarán las esporas asexuales o conidios. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza debido a que no presentan condiciones abióticas muy selectivas y

poseen un efectivo mecanismo de dispersión de sus esporas. (Bennett *et al*, 2010). Pertenecen a la división *Deuteromycota*, clase *Hyphomycetes*, orden de los *Hyphomycetales* y familia *Moniliaceae*. (Ortega *et al*, 2002). El color es su principal característica macroscópica para la identificación de los grupos de *Aspergillus*. Poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro. Las cabezas conidiales al microscopio presentan cuatro formas básicas: globosas, radiada, columnar y claviforme (Ver figura 9) (Kozakiewics *et al*, 1989)

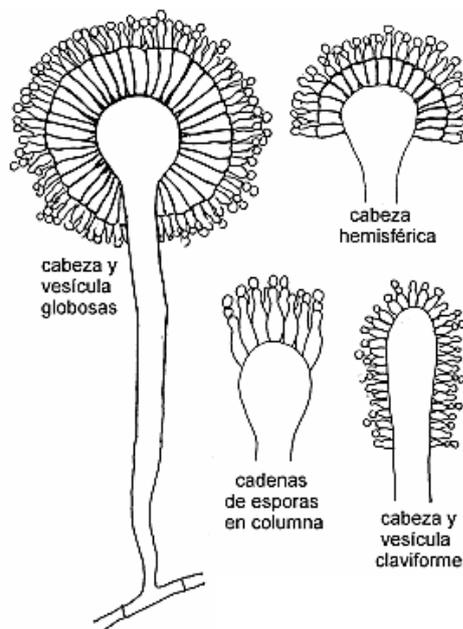


Figura 9 Conidióforos de *Aspergillus*
Fuente: (Carrilo *et al*, 2003)

Los conidios constituyen cadenas que se originan en la célula conidiógena o fiálides, en algunos hongos hay células adyacentes a las fiálides denominadas métulas o células de soporte. Poseen una o dos series de células sobre la vesícula, o bien presentan simultáneamente cabezas de ambos tipos. (Kozakiewics *et al*, 1989)

Pueden tener reproducción sexual (con formación de ascosporas en el interior de ascas) y asexual (con formación de conidios). Las diferentes especies de este género

se diferencian por el tamaño, tasa de crecimiento, textura (aterciopelada, granular, algodonosa) y color de la colonia: verde-amarillento (*A. flavus*), negro (*A. niger*), marrón (*A. terreus*). La coloración aparece casi siempre en todas las estructuras aéreas, tanto en el micelio como en las cabezas conidiales. *Aspergillus* es uno de los principales hongos productores de micotoxinas, que son metabolitos secundarios producidos y secretados por el hongo durante el proceso de degradación de la materia orgánica, y que constituye el mecanismo de defensa frente a otros microorganismos. (DATABIO, 2013)

La clasificación de este género se hace en base a las estructuras de reproducción y color de sus colonias, los miembros de éste género son aerobios de crecimiento rápido, la colonia es inicialmente plana y de color blanco que crece haciéndose algodonosa. A medida que envejece va apareciendo la esporulación, el centro de la colonia se va tornando de color distinto según la especie, así: amarillo *A. flavus*, verdoso *A. glaucus*, negro *A. niger*, gris *A. fumigatus*. (Guzmán *et al*, 1977)

3.4.2 *Trichoderma sp.*

Grupo de hongos filamentosos que pertenecen al Reino Mycetae (Fungi), división Eumycota, subdivisión Deuteromycotina, clase Hyphomycetes, orden Hyphales (Moniliales) y familia Moniliaceae (Alexopoulos & Mims *et al*, 1979) (Subramanian *et al*, 1983). Según, (Kuhls, Lieckfeldt, Sammuels, & Kubicek *et al*, 1997), (Samuels & Chaverrri *et al*, 2003), la clasificación taxonómica del género sería: Reino Mycetae (Fungi), División Eumycota, Subdivisión Ascomycotina, Clase Euascomycetes, Orden Hypocreales, Familia Hypocraceae y Género *Trichoderma* e *Hypocrea*. (Argumedo, Alarcón, Ferrera, & Peña *et al*, 2009)

Predominan en ecosistemas terrestres, suelos agrícolas, pastizales, bosques y desiertos (Zhang, Druzhinina, Kubick, & Xu *et al*, 2005)

Los requerimientos nutricionales son pocos, aunque su crecimiento es favorecido por la materia orgánica, humedad y temperatura (25 a 30 °C) (Papavizas *et al*, 1985).

***Trichoderma* sp y su relación con contaminantes orgánicos.**

Las sustancias orgánicas están formadas de carbono, hidrógeno y oxígeno, principalmente. Algunos ejemplos de compuestos orgánicos son los terpenos, los ácidos grasos, las proteínas, los carbohidratos, los ácidos nucleicos, así como algunos compuestos contaminantes como los hidrocarburos del petróleo, los plaguicidas, los colorantes, etc. (Argumedo, Alarcón, Ferrera, & Peña *et al*, 2009)

Los microorganismos pueden transformar los contaminantes orgánicos en compuestos que presenten menor o mayor toxicidad, con respecto al compuesto original. En contraste, algunos microorganismos pueden degradar completamente los contaminantes orgánicos, lo que implica su completa mineralización hasta compuestos inocuos como agua y dióxido de carbono. (Alexander, 1981)

***Trichoderma* sp y su relación con contaminantes inorgánicos.**

Son considerados como contaminantes inorgánicos, aquellas sustancias inertes tales como metales, minerales, óxidos de metales y no metales, etc. La interacción microbiana que existe con los metales es diferente a aquella que se presenta con los compuestos orgánicos. Los metales no pueden transformarse en otras sustancias, ni tampoco están sujetos a procesos de mineralización, en este caso, el microorganismo inmoviliza los metales a través de mecanismos fisiológicos y bioquímicos que

favorecen la quelatación, acumulación, y biosorción, es posible que también se pueda cambiar su estado de oxidación (Vullo *et al*, 2003)

Trichoderma sp crece formando colonias blancas que simulan una película sobre el medio, el micelio está formado por hifas septadas, los conidióforos por segmentos cortos que se hallan a lado y lado de la hifa, mostrando en su parte terminal pequeños conidios redondeados, la esporulación produce en la colonia colores verdosos. (Guzmán *et al*, 1977). Los estudios relacionados con la interacción de éste género fúngico con los contaminantes presentes en el suelo han recibido limitada atención (Argumedo, Alarcón, Ferrera, & Peña *et al*, 2009). En este sentido es imprescindible recabar información mediante proyectos de investigación que vayan encaminados al uso de este tipo de hongos en procesos de biosorción de metales pesados.

3.4.3 *Penicillium* sp

Este género se encuentra dentro de la familia *Trichocomaceae*, orden *Eurotiales*, *Phylum Ascomycota*. (Kirk P. , Cannon, David, & Stalpers *et al*, 2001). Se caracteriza por formar conidios en una estructura ramificada semejante a un pincel (Carrilo *et al*, 2003) de acuerdo a la morfología de esta estructura es a la a que se debe el nombre del género (del latín *Penicillus*, “pincel pequeño”). Los conidios se presentan en cadenas y son originados a partir de una célula especializada (fiálides). El conidióforo está unido al micelio mediante la estipe, entre ésta y las fiálides pueden aparecer diferentes células, las mismas que se presentan agrupadas partiendo de un mismo punto desde el que se originan. A parte del de las fiálides, los puntos de ramificación son uno, dos o excepcionalmente tres, a lo largo del conidióforo. La célula de soporte de la fiálides se denomina métula, y la célula de soporte de la métula

se denomina rama, en las especies que las presentan. (Martínez *et al*, 2003). Los tipos de conidióforos del género *Penicillium*, cuyas ramificaciones se ubican formando verticilos, nos sirven para determinar la clasificación del género en cuatro subgéneros, el conidióforo más simple es el que presenta un único punto de ramificación desde el conidio hasta la estipe (monoverticilados) pertenece al subgénero *Aspergilloides*, el conidióforo más complejo (terverticilado o cuatervicelado) pertenecen al subgénero *Penicillium*. Las especies pertenecientes a este subgénero presentan todas las estructuras descritas: fiálides, métulas y ramas, con o sin ramas intermedias y la estipe. Los biverticilados engloban dos subgéneros, las especies de *Bicertillium* presentan fiálides acerosas, más estrechas y delicadas que las que presentan el resto de subgéneros, los conidios en este subgénero suelen ser elípticos a diferencia de la mayoría de especies de los restantes subgéneros, los conidióforos en el subgénero *Furcatum* presentan las métulas de mayor longitud que las fiálides y las fiálides son ampulliformes (Martínez *et al*, 2003) (Ver figuras 10, 11 y 12)

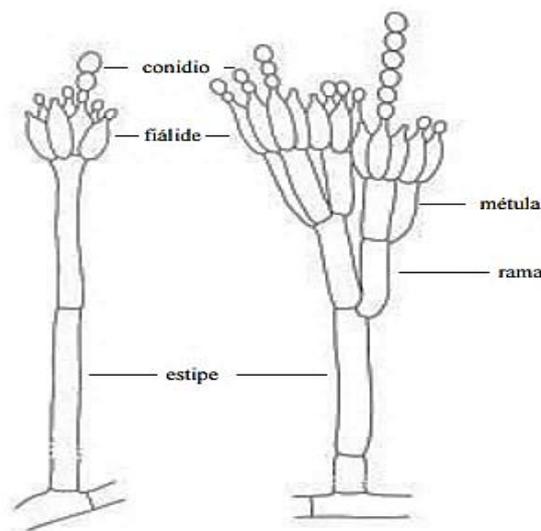


Figura 10 Estructura de los Conidióforos del género *Penicillium*
Fuente: (Samson, Hoekstra, Frisvad, & Filtenborg *et al*, 2000)

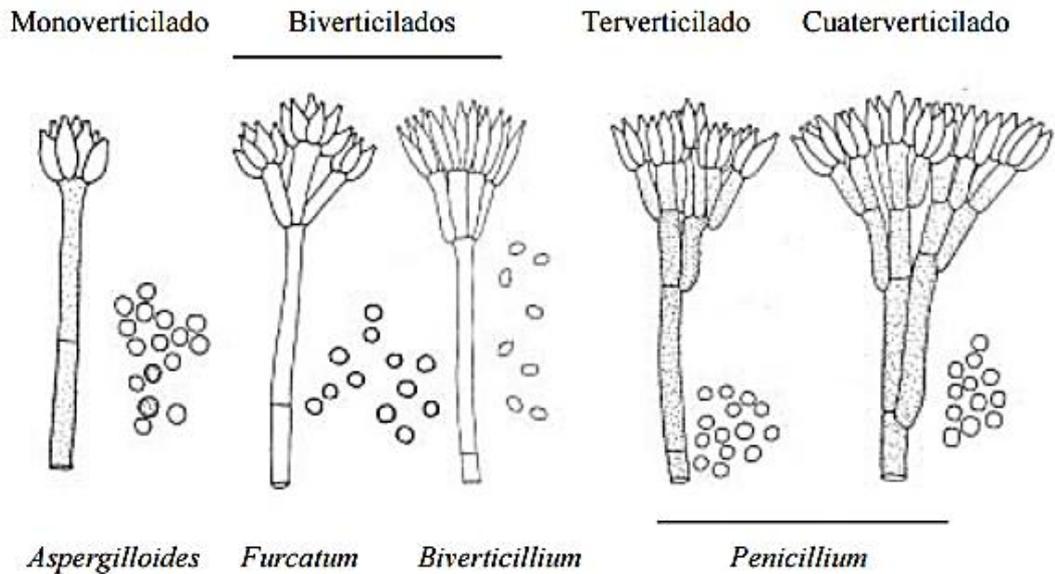


Figura 11 Tipos de Conidióforos y subgéneros presentes en *Penicillium* sp.
Fuente: (Samson, Hoekstra, Frisvad, & Filtenborg *et al*, 2000)

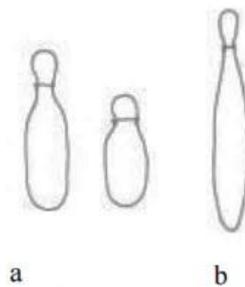


Figura 12 Tipo de fiálides presentes en *Penicillium* sp.
Fuente: (Samson, Hoekstra, Frisvad, & Filtenborg *et al*, 2000)

- a. Ampulliforme, presente en las especies de los subgéneros *Aspergilloides*, *Furcatoum* y *Penicillium*
- b. Acerosa, presente en las especies del subgénero *Biverticillium*

Se llama conectivo a la porción de pared que une entre sí a los conidios permitiendo la formación de cadenas, y en algunas especies se aprecia claramente con el microscopio óptico (Webster *et al*, 1986)

Las colonias de *Penicillium* son circulares, con un borde neto, muchas veces sin fructificación y mostrando el color del micelio, que es generalmente blanco, pero en algunas especies es amarillo, anaranjado, púrpura o pardo claro. La superficie de la colonia madura, (con sus conidios formados) puede ser: aterciopelada, ligeramente algodonosa o con pequeños haces (fascículos) de conidióforos. (Pitt *et al*, 1979)

El primer y mayor uso industrial de *Penicillium* sp. ha sido la producción de la penicilina, que sin lugar a dudas logró un avance muy significativo en el campo médico mediante el descubrimiento de un metabolito secundario en *P. notatum* (actualmente *P. chrysogenum*) por Alexander Fleming en 1928. (Martínez *et al*, 2003). El estudio del género se incrementó en años posteriores, en busca de cepas que presenten producción de penicilina y en busca de nuevos antibióticos. (Pitt *et al*, 1979)

3.4.4 *Fusarium* sp

El género se encuentra dentro de la División *Ascomycota*, Clase *Euascmycetes*, Orden *Hypocreales*, Familia *Hypocreaceae* (Booth *et al*, 1971)

Este género está distribuido prácticamente en todo el mundo, coloniza a menudo las raíces de las plantas en sus primeras fases de desarrollo, siendo capaz de penetrar el tejido vegetal a través de heridas o bien por contacto directo. (Beckman *et al*, 1987)

Las especies del género *Fusarium* son muy variables debido a sus características genéticas y a los cambios que el ambiente causa en la morfología de los cultivos. (Nelson, Tousson, & Maraassas *et al*, 1983)

Estos hongos son habitantes del suelo, pero pueden ser transportados por los residuos vegetales y corrientes de agua. (Summerell, Salleh , & Leslie *et al*, 2003)

La forma y tamaño de las esporas es la característica principal para su reconocimiento, los macroconidios son curvados, pluriseptados con una célula apical más o menos puntiaguda y en muchas especies con una célula basal en forma de pie. Los microconidios son comúnmente unicelulares, elipsoidales, fusiformes, claviformes, piriformes o subglobosos, similares en ancho a los macroconidios (Booth *et al*, 1971) (Ver figura 13)

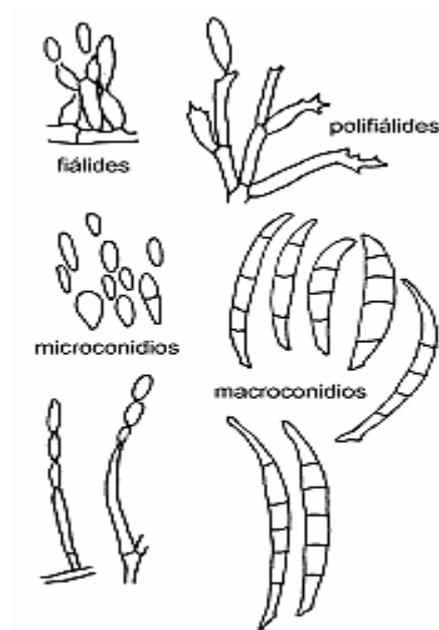


Figura 13 Estructura del género *Fusarium* sp.
Fuente: (Carrilo *et al*, 2003)

Las colonias tienen diversos colores (blanco, rosado pálido, rojo, anaranjado, púrpura, celeste, verde aceituna o pardo), especialmente en el reverso de la colonia, excepto pardo oscuro o negro, los pigmentos que difunden en el agar suelen variar de color o tono por el pH (Seifert *et al*, 2001)

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Clasificación de niveles altitudinales

En este estudio se consideraron tres niveles altitudinales de acuerdo al punto más bajo y punto más alto del ABVPA (Ver tabla 2)

Tabla 2 Clasificación de Pisos Altitudinales

NIVEL	RANGO
A	2910 – 3000 m.s.n.m
B	3050 – 3150 m.s.n.m
C	3200 – 3300 m.s.n.m

Fuente: Autora

Para el efecto se utilizaron Sistemas de Información Geográfica (Software ArcGis 10.3) que nos permitió clasificar el área total del bosque en varios rangos basados en capas con información de las curvas de nivel.

4.2 Muestreo

4.2.1 Determinación del tipo muestreo

Para tener mayor homogeneidad y disminuir la varianza dentro de cada estrato, se optó por un muestreo estratificado (Ramírez *et al*, 2005)

4.2.2 Tamaño de la muestra

La evaluación de un área cuyas poblaciones siguen una distribución aleatoria, no conlleva diferencias en cuanto a la precisión derivada bajo unidades de muestreo de diferente tamaño, es decir se puede seleccionar aquella que resulte más rápida, económica o cómoda. (Ramírez *et al*, 2005). Bajo estos criterios se hizo el muestreo correspondiente. El área total del bosque se incluyó en una grilla compuesta por subáreas, con dimensiones de 500m x 500m; en cada nivel se tomaron 3 muestras de

manera aleatoria, con una repetición por punto de muestreo, abarcando un área de 50m a la redonda del punto inicial. (Ver figura 14 y Tabla 3).

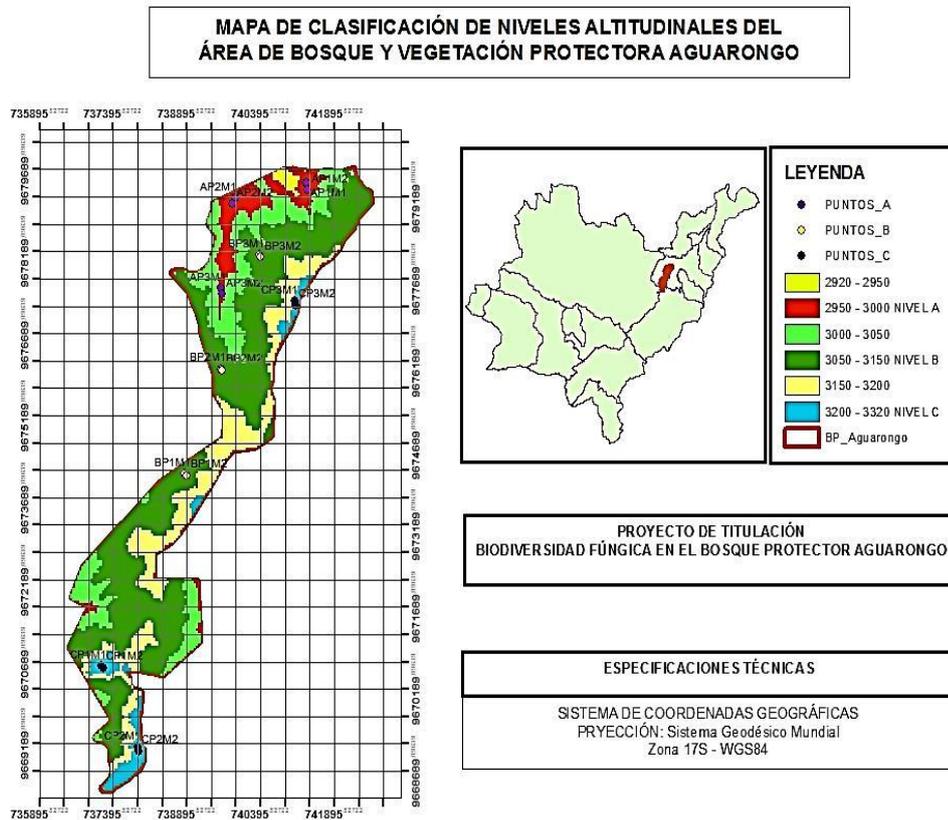


Figura 14 Mapa de Clasificación de Niveles Altitudinales del ABVPA

Fuente: Instituto Geográfico Militar

Elaboración: Autora

Tabla 3 Coordenadas de los puntos de muestreo. Sistema de Coordenadas: WGS-84

	PUNTO	X	Y	ALTURA m.s.n.m
NIVEL A	AP1M1	741333,174	9679443,14	2980
	AP1M2	741349,049	9679324,07	2980
	AP2M1	739880,608	9679173,26	2980
	AP2M2	739825,046	9679062,14	2980
	AP3M1	739594,858	9677522,26	3000
	AP3M2	739602,795	9677419,07	3000
NIVEL B	BP1M1	738848,95	9674128,64	3100
	BP1M2	738884,669	9674092,4	3100
	BP2M1	739581,936	9676045,16	3100
	BP2M2	739605,484	9676023,2	3100
	BP3M1	740374,629	9678133,78	3100
	BP3M2	740393,679	9678095,68	3100
NIVEL C	CP1M1	737143,613	9670602,15	3260
	CP1M2	737896,486	9670570,4	3260
	CP2M1	737896,486	9669118,37	3220
	CP2M2	737902,836	9669042,17	3220
	CP3M1	741090,542	9677284,48	3260
	CP3M2	741109,593	9677208,28	3260

Fuente: Autora

4.2.3 Toma de muestras

En los meses de Mayo y Junio del 2016 se hizo el muestreo de suelo en el área de estudio, cada muestra se tomó a una profundidad de 30cm; con el propósito de mantener las condiciones, características y naturaleza del suelo, las muestras se depositaron en fundas de polietileno con cierre hermético para su transporte al laboratorio, posteriormente se conservaron a una temperatura de 4°C el volteo de las muestras nos garantiza los niveles de oxigenación. (Burlage, Atlas, Stahl, Geesey, & Sayler *et al*, 1998) (Ver figura 12)



Figura 15 Transporte de las muestras
Fuente: Autora

4.3 Métodos de Aislamiento

4.3.1 Cultivo Líquido.

Se tomaron 10 g. de suelo fresco y tamizado, se colocaron en una matraz de 1000ml con agua destilada estéril y peptona al 0.1% (Díaz *et al*, 2000), Tween 80 al 0.5% y cloranfenicol 400ppm) (Vishnoi, Naidu, Singh, & Vishnoi *et al*, 2005) (Ver Figuras 16, 17 y 18)



Figura 16 Gramos de suelo tamizado y homogéneo
Fuente: Autora



Figura 17 Suelo tamizado en matraces de 1000ml para cultivo líquido
Fuente: Autora

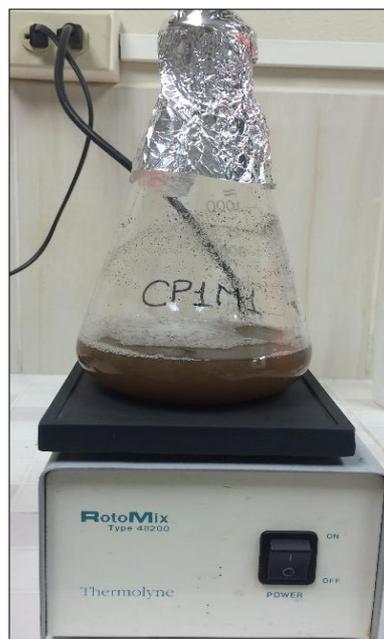


Figura 18 Agitación de la solución con la muestra del suelo
Fuente: Autora

La solución se colocó en un agitador giratorio durante 48 horas (Figura 18) y posteriormente se dejó en reposo a 28°C en una estufa hasta el desarrollo de los micelios. Todos los ensayos se trabajan por triplicado. (Valásková & Baldrian *et al*, 2006)



Figura 19 Cultivo líquido en reposo por 7 días
Fuente: Autora

4.3.2 Dilución del suelo en placa

Es el método más común de aislamiento, la técnica es muy simple y se han descrito varias modificaciones, una cantidad conocida de suelo es suspendida en agua estéril, se toma 10% de la suspensión, y se mantiene en agitación durante 10 minutos aproximadamente, se hacen diluciones hasta llegar a 10^{-4} ó 10^{-5} que se considera una dilución adecuada para el aislamiento. (Dhingra & Sinclair *et al*, 1985)

Para este procedimiento, se ha usado 5 tubos de ensayo por cada muestra de suelo, donde del primer tubo contiene 10ml de la mezcla de agua estéril con el suelo tamizado, previamente agitado, procediendo a tomar 1ml del primer tubo de ensayo y agregado al siguiente tubo, logrando la dilución del mismo; proceso realizado sucesivamente hasta lograr diluciones de 10^{-4} ó 10^{-5} .

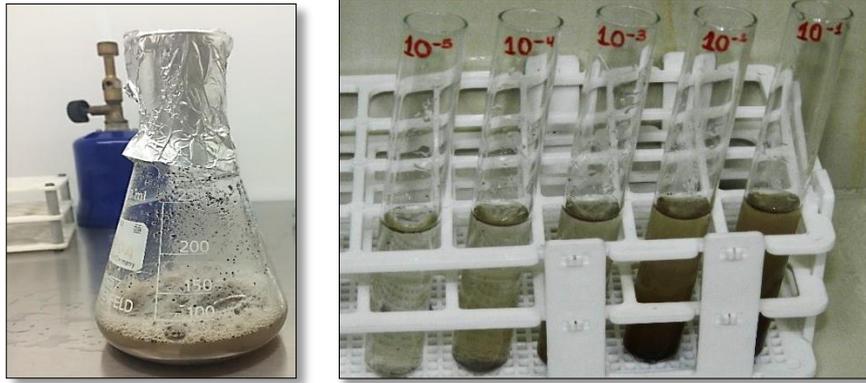


Figura 20 Diluciones seriadas
Fuente: Autora

4.3.3 Placas de Suelo Warcup o Siembra Directa

En cajas petri de 9cm se coloca pequeñas cantidades de suelo pulverizado y tamizado en medio PDA líquido, se agita lentamente para dispersar las partículas (Ver figura 21). El método sirve para identificación preliminar y rápida de especies de hongos del suelo. (Mueller, Bills, & Foster *et al*, 2004)

Este método se realizó con la siembra en 4 cajas petri por cada muestra de suelo de los puntos seleccionados en el presente estudio.

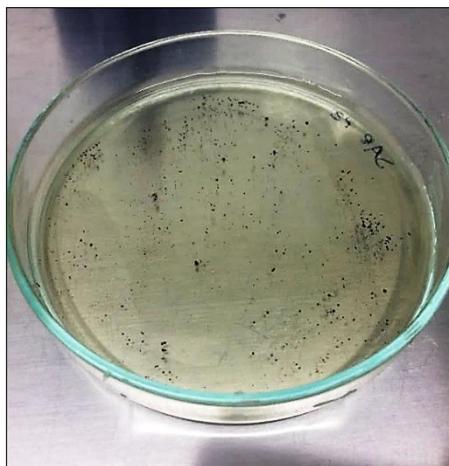


Figura 21 Siembra Directa de muestras de suelo en cajas petri con medio PDA
Fuente: Autora

4.4 Medios de Cultivo

Para la siembra y aislamiento, se utilizaron los siguientes medio de cultivo: Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar Extracto de Malta (MEA), Agar Sabouraud, y Agar Czapek.

4.5 Taxonomía

Mediante el análisis macroscópico, microscópico y la utilización de claves se hizo la taxonomía por género en su mayoría.

En el análisis macroscópico, se consideró el aspecto de la colonia fungina, el color, el tipo de micelio y el cambio de color en el medio de cultivo. En el análisis microscópico, se hizo un estudio del tipo, forma, y dimensión del conidióforo, fiálides cuando se presentan, las esporas, y el tipo de conidiogénesis, las claves taxonómicas utilizadas se reportan en el (Kirk, Cannon, & Stalpers *et al*, 2008)

4.5.1 Cepario

Es un muestrario inventariado de microorganismos tales como hongos, bacterias, virus y parásitos. La formación del presente cepario permite la conservación de cepas puras de hongos aislados del ABVPA

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Aislamiento por géneros obtenidos en cada piso.

Se aislaron 181 hongos en los tres pisos altitudinales, los géneros más representativos son: *Aspergillus* sp., *Penicilium* sp., *Trichoderma* sp., y *Fusarium* sp. Los resultados se pueden ver en la Tabla 4.

Tabla 4 Valores de géneros aislados por pisos

GÉNERO	PISO A		PISO B		PISO C	
	Hongos Aislados	%	Hongos Aislados	%	Hongos Aislados	%
<i>Aspergillus</i> sp.	18	40	33	53,23	35	47,30
<i>Penicilium</i> sp.	19	42,22	22	35,48	35	47,30
<i>Trichoderma</i> sp.	3	6,67	4	6,45	1	1,35
<i>Fusarium</i> sp.	3	6,67	2	3,23	2	2,70
Estructuras no Reproductivas	2	4,44	1	1,61	1	1,35
Total de hongos por piso	45	100	62	100,00	74	100,00

Fuente: Autora

5.2 Análisis estadístico de la carga fúngica en los pisos altitudinales

En este análisis se comparan las medias de los grupos de datos que se refieren al número de hongos aislados por piso, el recurso estadístico utilizado es una t de student. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5 Resultados t de Student para muestras relacionadas

Prueba de muestras emparejadas								
	Diferencias emparejadas					t	G l	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
				Inferior	Superior			
PISOA – PISO B	-3,40000	6,69328	2,99333	-11,71081	4,91081	-1,136	4	,319
PISOB – PISO C	-2,40000	6,18870	2,76767	-10,08429	5,28429	-,867	4	,435
PISOA – PISO C	-5,80000	9,78264	4,37493	-17,94675	6,34675	-1,326	4	,256

Fuente: Autora

Siendo los valores obtenidos en este análisis superior a 0,05 que es el nivel de significancia propuesto, se infiere como resultado la no significancia estadística entre

los grupos de datos, lo que nos daría a suponer que no existe diferencia de la carga fúngica entre los pisos altitudinales fruto de este análisis.

El número de hongos aislados y sus géneros se muestran en la Figura 22. Los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* se presentan en mayor porcentaje en los 3 pisos altitudinales, mientras que los géneros *Trichoderma* y *Fusarium* se presentan en menor frecuencia, aunque esta diferencia no es significativa.

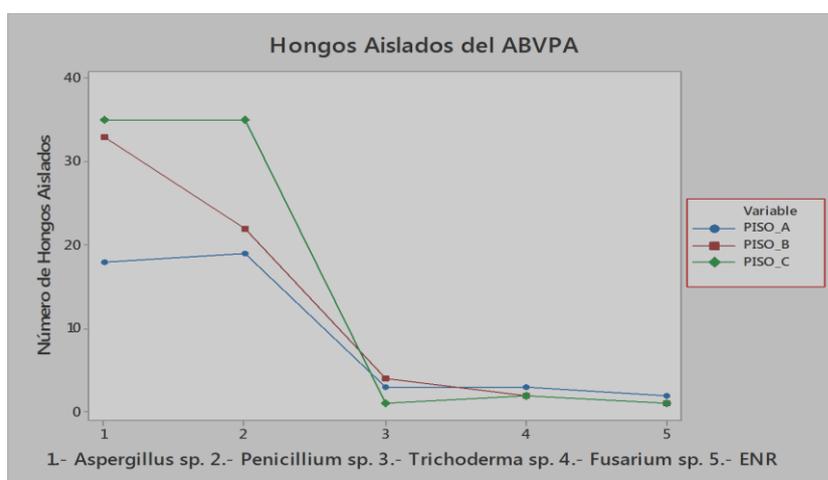


Figura 22 Géneros Aislados en los tres pisos altitudinales del ABVPA
Fuente: Autora

El total de hongos aislados en el bosque, y agrupados por género, se muestra en la Tabla 6 y Figura 23.

Tabla 6 Número de hongos aislados en el ABVPA

GÉNERO	Total de hongos en el ABVPA	%
<i>Aspergillus</i> sp.	86	47,51
<i>Penicillium</i> sp.	76	41,99
<i>Trichoderma</i> sp.	8	4,42
<i>Fusarium</i> sp.	7	3,87
Estructuras no Reproductivas	4	2,21
TOTAL	181	100

Fuente: Autora

Es importante señalar que las especies de los hongos que se agrupan en los géneros antes mencionados, son diferentes, y que mediante el análisis biomolecular correspondiente se establecerán en un trabajo de investigación futuro.

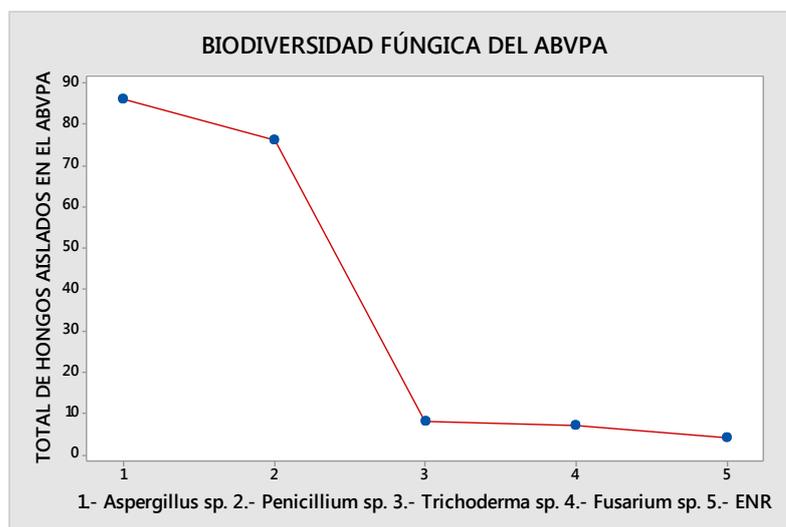


Figura 23 Biodiversidad Fúngica del ABVPA
Fuente: Autora

5.3 Métodos de aislamiento

Para el aislamiento de los hongos, se usaron tres métodos, que se detallan en la Tabla 7.

Tabla 7 Géneros aislados con respecto al método de aislamiento

Método de Aislamiento	Frecuencia	Porcentaje
Dilución en Placa	65	35,9 %
Cultivo Líquido	49	27,1 %
Siembra Directa	67	37 %
TOTAL	181	100 %

Fuente: Autora

5.4 Análisis estadístico

El análisis se hizo mediante un a prueba t de Student con un nivel de significancia del 0,05, se analizan las medias de los grupos de datos que se refieren al número de hongos aislados de acuerdo al método de aislamiento, los resultados obtenidos muestran la no significancia estadística entre el número de hongos aislados mediante siembra directa y dilución en placa, aunque la diferencia es significativa entre los métodos citados anteriormente frente al método de aislamiento mediante cultivo líquido. (Ver Tabla 8 y Figura 24)

Tabla 8 Resultado t de Student de los métodos de aislamiento.

Prueba de muestras emparejadas								
	Diferencias emparejadas					t	Gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
				Inferior	Superior			
Siembra Directa – Dilución en Placa	2,00000	1,63299	,81650	-,59846	4,59846	2,449	3	,092
Siembra Directa – Cultivo Líquido	17,75000	,50000	,25000	16,95439	18,54561	71,000	3	,000
Dilución en Placa – Cultivo Líquido	15,75000	1,25831	,62915	13,74775	17,75225	25,034	3	,000

Fuente: Autora

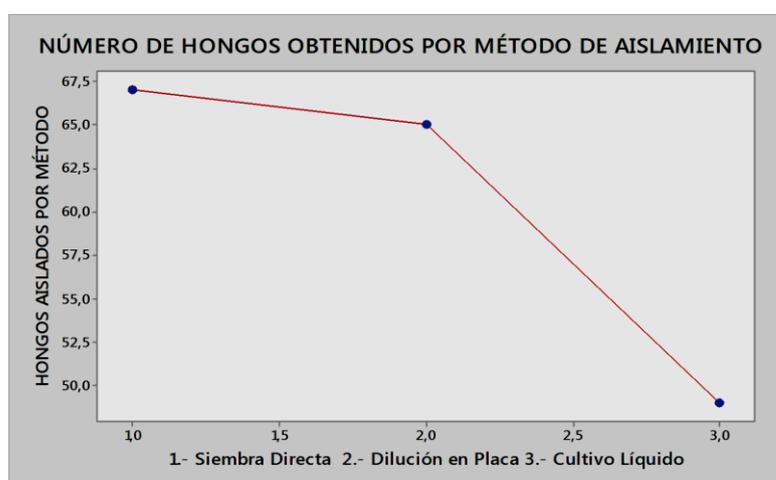


Figura 24 Hongos obtenidos por método de aislamiento

Fuente: Autora

5.5 Formación de un cepario de hongos filamentosos

Un cepario es una fuente importante de conocimiento en el área de la Micología y Biotecnología, nos sirve como soporte para el manejo adecuado de procesos encaminados a la investigación en el área de la Biotecnología Ambiental. La cepas de los hongos aislados producto de este estudio, se conservaron en tubos de ensayo por duplicado, e igualmente las placas portaobjetos, que son indicadores de logro de los objetivos propuestos en este trabajo de investigación (Ver figura 25 y 26)



Figura 25 Placas porta-objetos que forman el cepario
Fuente: Autora



Figura 26 Cepario de hongos filamentosos del ABVPA
Fuente: Autora

5.6 Identificación Taxonómica

5.6.1 Características Macroscópicas

- ***Aspergillus sp.***

Presentan una coloración verde clara, aunque con el envejecimiento de la colonia pueden tornarse café o negro.

Crece de forma uniforme, con un diámetro promedio que oscila entre los 3-5cm aunque con el desprendimiento de esporas produce el crecimiento de microcolonias. En algunas colonias, el crecimiento ocupa toda la caja Petri, ocupando un diámetro de 9cm. Su desarrollo se da entre los 5 – 7 días a una temperatura de 28°C, presentando una exudación de pequeñas gotas incoloras.

- ***Penicillium sp.***

Generalmente presentan una coloración verde oscura, con un borde blanco, en medio PDA, sin embargo en Agar Czapek puede presentar su primera fase una coloración cremosa. El reverso de la caja puede ser verde amarilloso o crema.

Su colonia crece de forma irregular, con un diámetro promedio de 4 – 5cm, a una temperatura de 28°C, en un lapso de 5 – 7 días.

- ***Trichoderma sp.***

Tiene una coloración blanco – verdoso, que con su crecimiento se torna verde oliva. Crecen uniformemente, alcanzando un diámetro de 9cm en un intervalo promedio de 7 días, a una temperatura de 28°C, cuyo reverso de la caja es incoloro.

- *Fusarium sp.*

De color blanco, púrpura en medio PDA, sin embargo en MEA tiene una coloración fucsia. Crece uniformemente alcanzando de 3 – 5cm de diámetro, con una textura algodonosa.

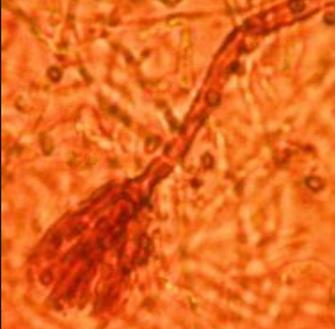
5.6.2 Características microscópicas

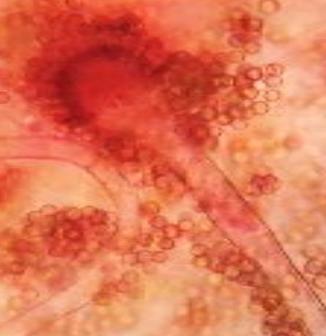
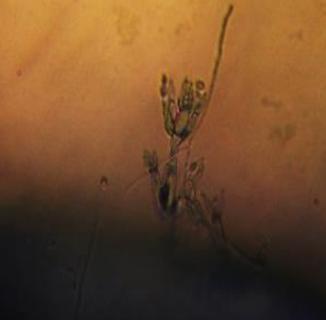
Para la identificación microscópica de los hongos, se tomó una parte de la superficie de la colonia y depositó sobre el portaobjetos con una gota de Fucsina ácida o Azul de metileno, que sirven para la tinción de las estructuras. Con la ayuda de una aza microbiológica se debe extender el preparado y cubrir con una lámina cubreobjetos, para su posterior visualización en el microscopio. Las placas preparadas deben ser selladas para su posterior uso.

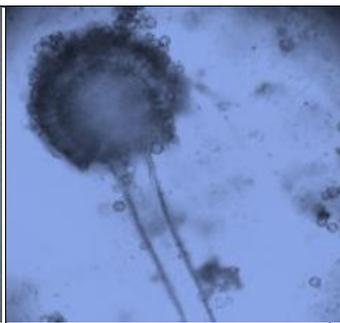
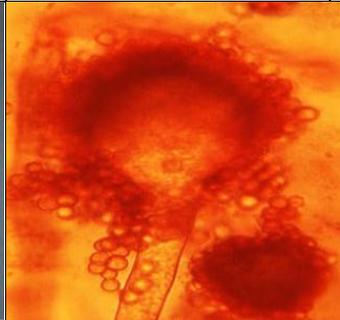
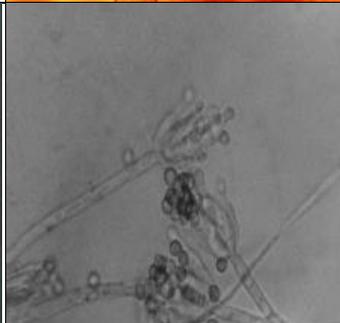
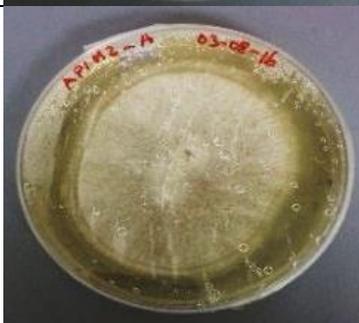
5.7 Banco de fotos de hongos filamentos aislados del ABVPA

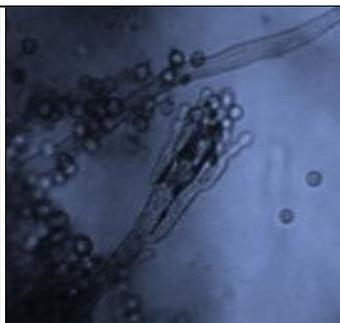
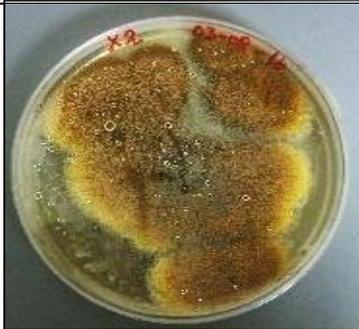
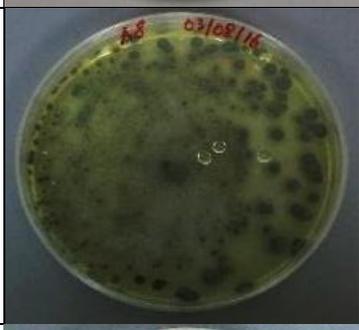
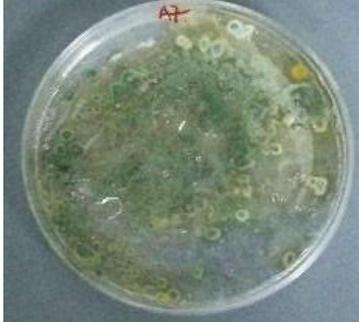
En la Tabla 9 se presenta imágenes de los hongos obtenidos en los tres pisos altitudinales, donde a la izquierda se observa la fotografía de la colonia en caja petri con medio PDA, y a la derecha la foto en el microscopio con una ampliación de 40X.

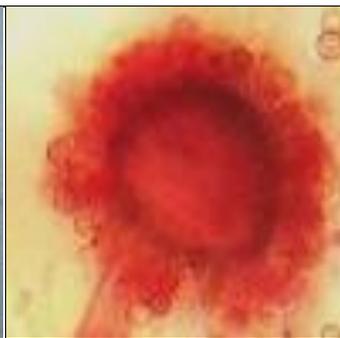
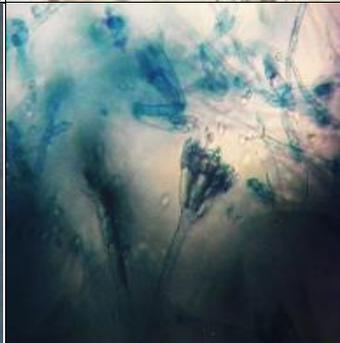
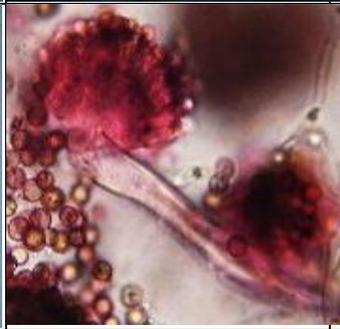
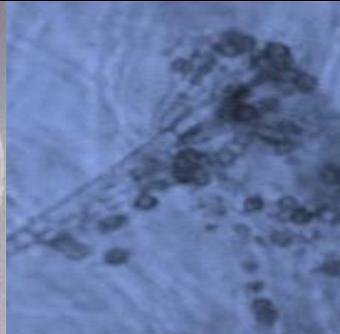
Tabla 9 Banco de fotos de hongos filamentosos

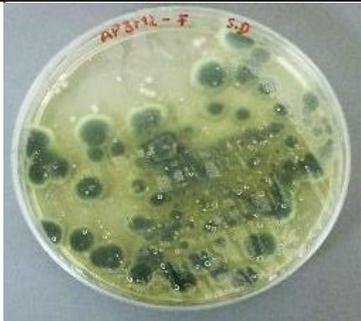
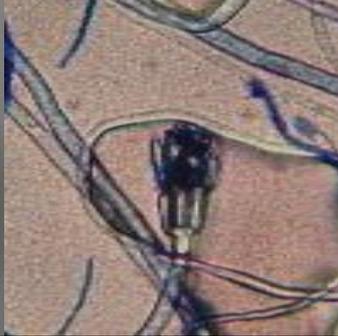
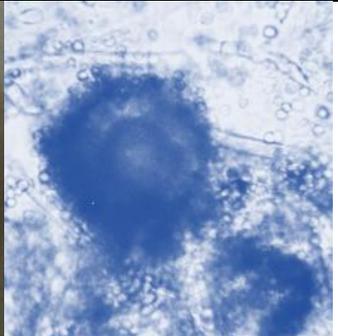
CÓDIGO	CAJA PETRI	FOTO MICROSCOPIO	GÉNERO
FOTOS HONGOS AISLADOS EN EL PISO A			
AP1M1 Y1			<i>Trichoderma</i> sp.
AP1M1 J1			<i>Penicillium</i> sp.
AP1M1 BU1			<i>Aspergillus</i> sp.
AP1M1 BU1X			<i>Aspergillus</i> sp.

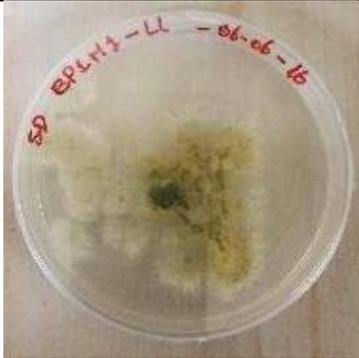
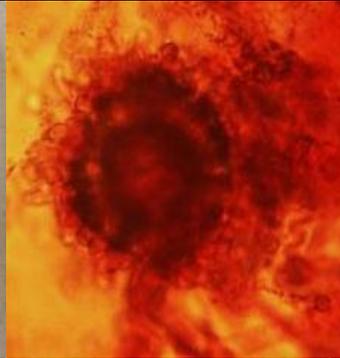
<p>AP1M1 ZOF81</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>
<p>AP2M1 A</p>			<p><i>Fusarium</i> sp.</p>
<p>AP2M1 C1</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>
<p>AP2M1 E1</p>			<p><i>Aspergillus fumigatus</i></p>
<p>AP2M1 Y</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>

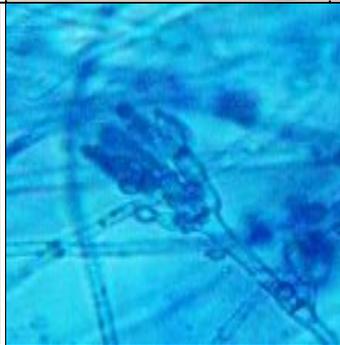
<p>AP2M1 F1</p>			<p><i>Aspergillus sp.</i></p>
<p>AP3M1 J</p>			<p><i>Aspergillus sp.</i></p>
<p>AP3M1 AR</p>			<p><i>Penicillium sp.</i></p>
<p>AP1M2 M2B</p>			<p><i>Fusarium sp.</i></p>
<p>AP1M2 A</p>			<p><i>Fusarium sp.</i></p>

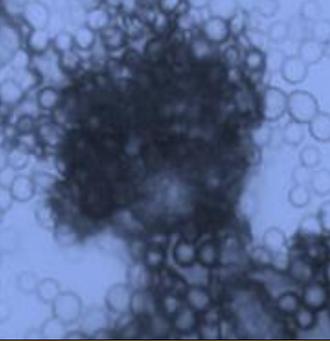
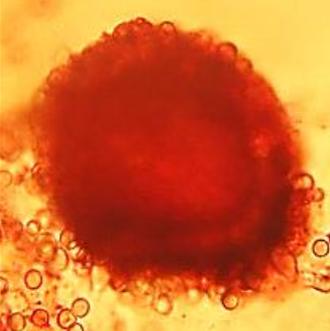
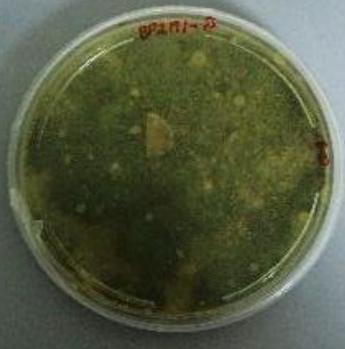
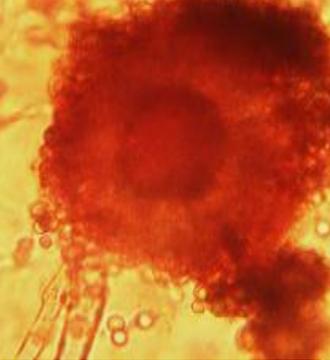
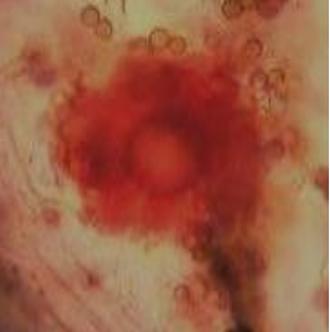
<p>AP1M2 F82</p>			<p><i>Penicillium echinulatum</i></p>
<p>AP1M2 X2</p>			<p><i>Aspergillus sp.</i></p>
<p>AP1M2 A6</p>			<p><i>Aspergillus niger</i></p>
<p>AP1M2 A8</p>			<p><i>Penicillium sp.</i></p>
<p>AP1M2 A7</p>			<p><i>Penicillium sp.</i></p>

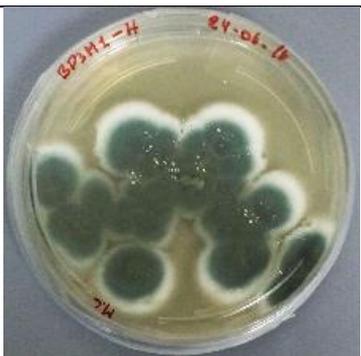
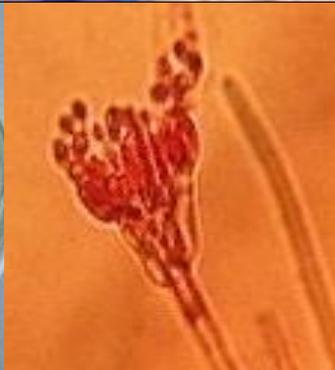
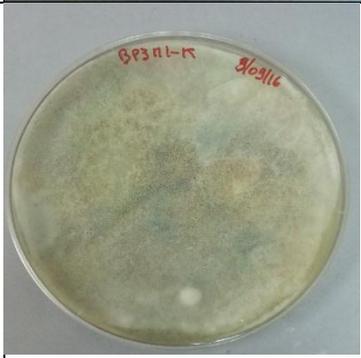
<p>AP2M2 C2</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>
<p>AP2M2 T2</p>			<p><i>Aspergillus fumigatus</i></p>
<p>AP2M2 B</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>
<p>AP3M2 B</p>			<p><i>Aspergillus fumigatus</i></p>
<p>AP3M2 C</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>

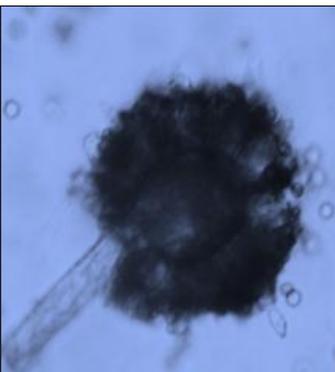
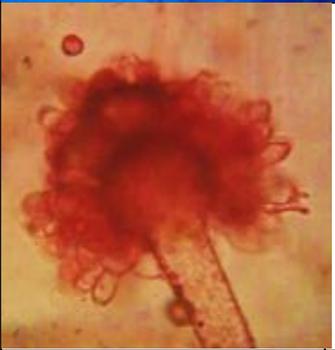
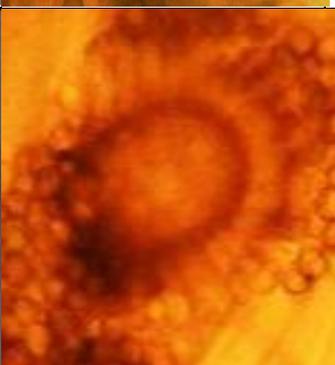
<p>AP3M2 J</p>			<p><i>Penicillium sp.</i></p>
<p>AP3M2 F</p>			<p><i>Penicillium sp.</i></p>
<p>FOTOS HONGOS AISLADOS EN EL PISO B</p>			
<p>BP1M1 CH1</p>			<p><i>Penicillium vanoranjei</i></p>
<p>BP1M1 Y</p>			<p><i>Aspergillus sp.</i></p>
<p>BP1M1 M</p>			<p><i>Aspergillus sp.</i></p>

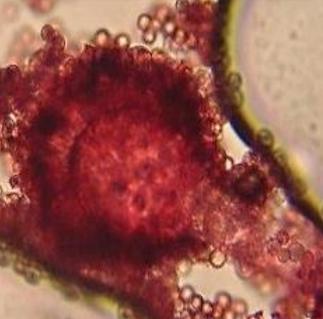
<p>BP1M1 K</p>			<p><i>Aspergillus fumigatus</i></p>
<p>BP1M1 LL</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>
<p>BP1M1 R</p>			<p><i>Trichoderma</i> sp.</p>
<p>BP1M1 S matraz ml</p>			<p><i>Trichoderma</i> sp.</p>
<p>BP1M1 R3</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>

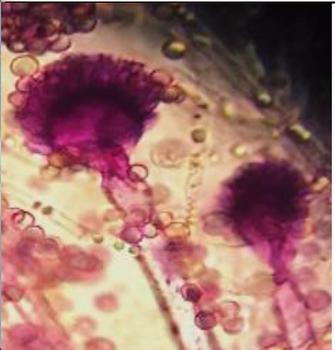
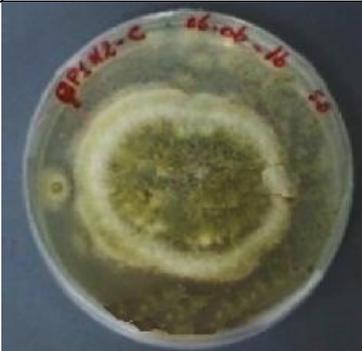
<p>BP1M1 E5</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>
<p>BP1M1 Z</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>
<p>BP1M1 I1</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>
<p>BP1M1 T</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>
<p>BP2M1 RA2</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>

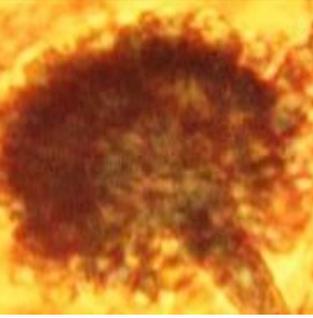
<p>BP2M1 N</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>
<p>BP2M1 XA</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>
<p>BP2M1 Ñ</p>			<p><i>Aspergillus niger</i></p>
<p>BP2M1 CD</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>
<p>BP3M1 K1</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>

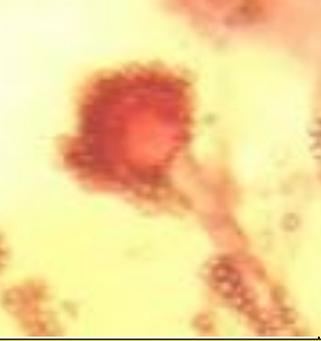
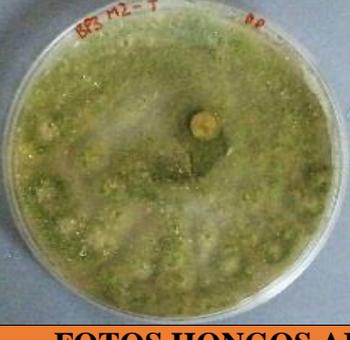
<p>BP3M1 H</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>
<p>BP3M1 A</p>			<p><i>Trichoderma</i> sp.</p>
<p>BP3M1 C</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>
<p>BP3M1 K</p>			<p><i>Trichoderma</i> sp.</p>
<p>BP1M2 B</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>

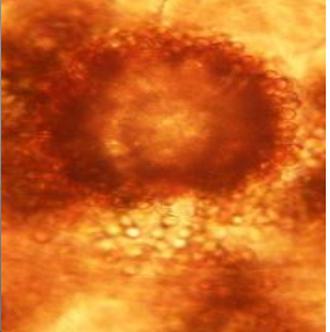
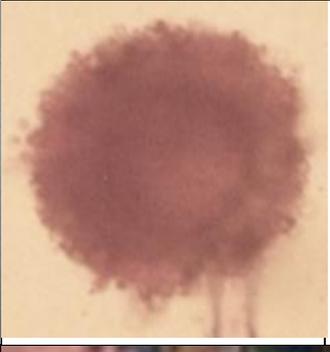
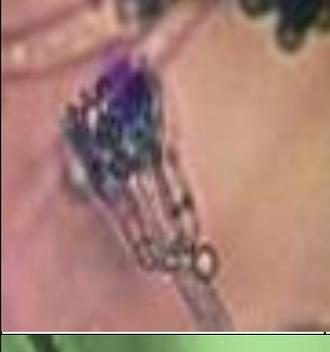
<p>BP1M2 I</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>
<p>BP1M2 H</p>			<p><i>Penicillium</i> sp</p>
<p>BP1M2 J</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>
<p>BP1M2 D</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>
<p>BP1M2 X</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>

<p>BP1M2 M</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>
<p>BP1M2 G1</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>
<p>BP1M2 Y</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>
<p>BP1M2 CJ1</p>			<p><i>Fusarium</i> sp.</p>
<p>BP1M2 K1</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>

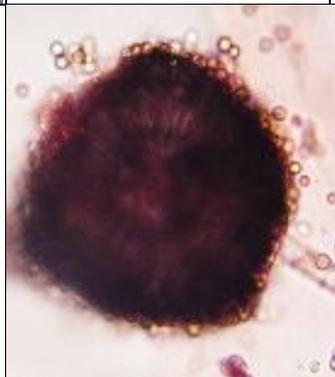
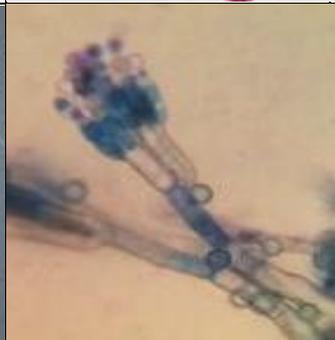
<p>BP1M2 G</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>
<p>BP1M2 P</p>			<p><i>Aspergillus flavus</i></p>
<p>BP1M2 C</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>
<p>BP2M2 7</p>			<p><i>Fusarium oxysporum</i></p>
<p>BP2M2 4</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>

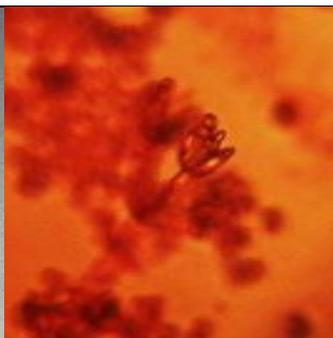
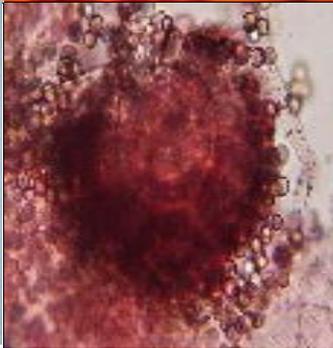
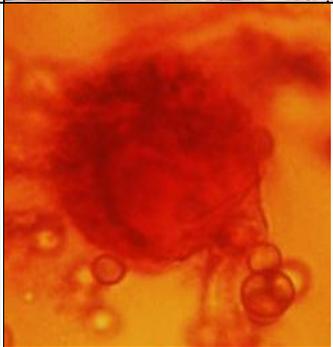
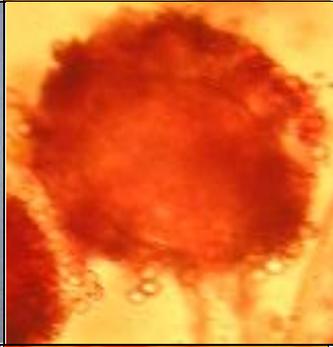
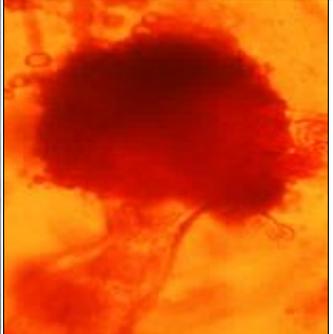
<p>BP2M2 W</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>
<p>BP2M2 B2</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>
<p>BP3M2 R</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>
<p>BP3M2 BM</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>
<p>BP3M2 03A</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>

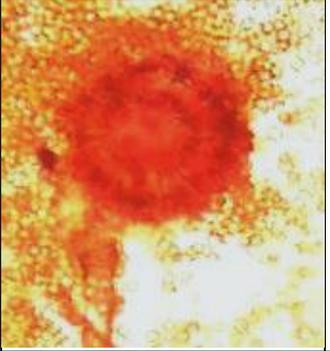
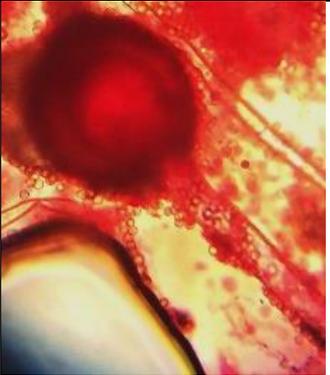
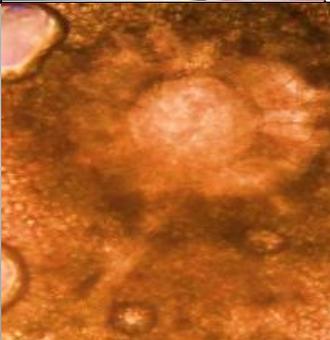
<p>BP3M2 03C</p>			<p><i>Aspergillus sp.</i></p>
<p>BP3M2 S</p>			<p><i>Aspergillus sp.</i></p>
<p>BP3M2 T</p>			<p><i>Aspergillus sp.</i></p>
<p>FOTOS HONGOS AISLADOS EN EL PISO C</p>			
<p>CP1M1 B</p>			<p><i>Penicillium sp.</i></p>
<p>CP1M1 C</p>			<p><i>Aspergillus sp.</i></p>

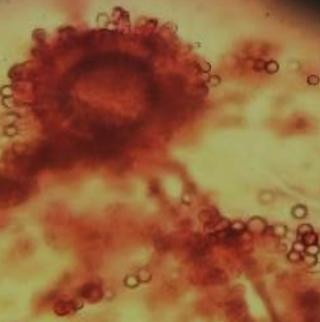
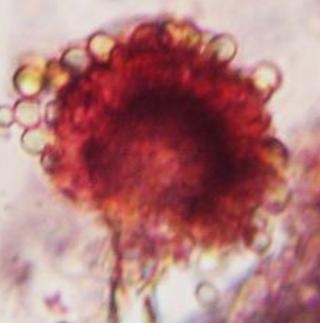
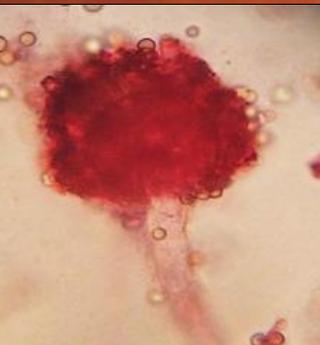
<p>CP1M1 N</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>
<p>CP1M1 J</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>
<p>CP1M1 D</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>
<p>CP1M1 D1</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>
<p>CP1M1 M7</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>

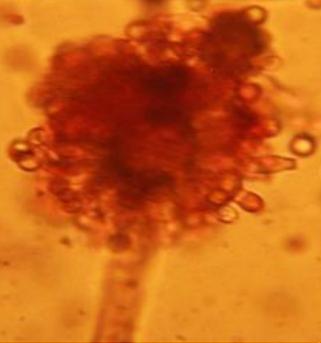
<p>CP1M1 W</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>
<p>CP1M1 T</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>
<p>CP2M1 D3</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>
<p>CP2M1 T</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>
<p>CP2M1 D2</p>			<p><i>Aspergillus niger</i></p>

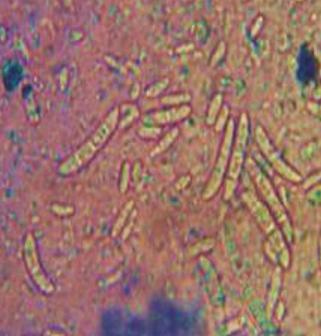
<p>CP2M1 Z</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>
<p>CP2M1 02B</p>			<p><i>Aspergillus niger</i></p>
<p>CP2M1 D4</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>
<p>CP2M1 02A</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>
<p>CP2M1 Q</p>			<p><i>Fusarium</i> sp.</p>

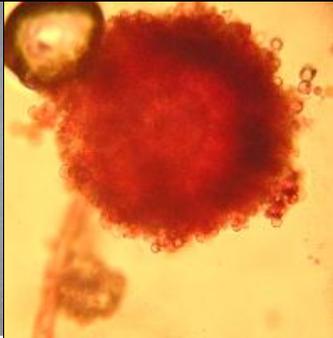
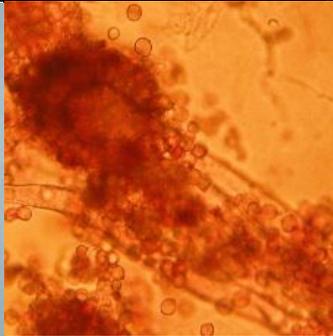
<p>CP2M1 R</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>
<p>CP2M1 S</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>
<p>CP2M1 D1</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>
<p>CP3M1 N</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>
<p>CP3M1 Q</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>

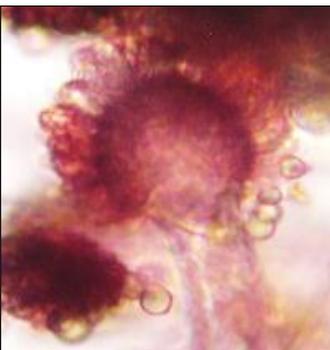
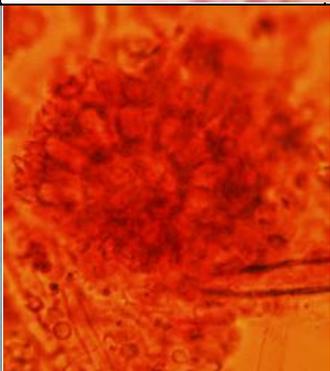
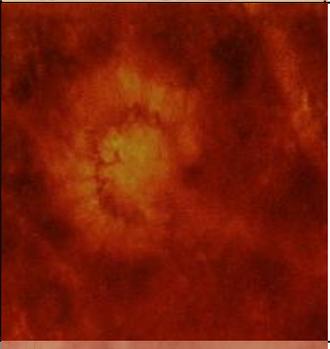
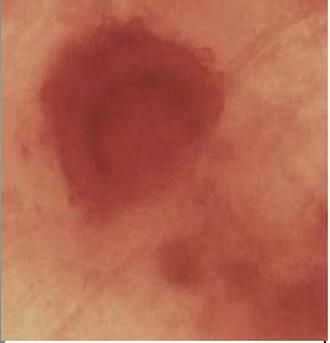
<p>CP3M1 7B</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>
<p>CP3M1 Y1</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>
<p>CP3M1 Y2</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>
<p>CP3M1 10</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>
<p>CP3M1 RS2</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>

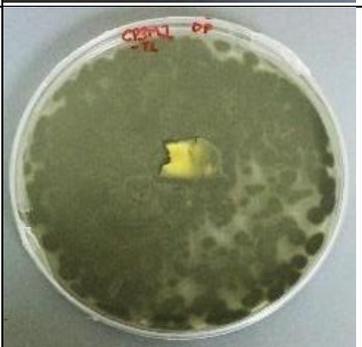
<p>CP3M1 T7</p>			<p><i>Aspergillus niger</i></p>
<p>CP3M1 7A</p>			<p><i>Penicillium sp.</i></p>
<p>CP3M1 RS1</p>			<p><i>Aspergillus sp.</i></p>
<p>CP3M1 Q2</p>			<p><i>Aspergillus niger</i></p>
<p>CP3M1 B</p>			<p><i>Aspergillus sp.</i></p>

<p>CP3M1 W1</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>
<p>CP1M2 J</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>
<p>CP1M2 X2</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>
<p>CP1M2 X1</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>
<p>CP1M2 W 10-5</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>

<p>CP1M2 T3</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>
<p>CP1M2 T2</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>
<p>CP1M2 Q</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>
<p>CP1M2 3B</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>
<p>CP1M2 Z</p>			<p><i>Fusarium</i> sp</p>

<p>CP1M2 7</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>
<p>CP1M2 T4</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>
<p>CP2M2 J</p>			<p><i>Aspergillus niger</i></p>
<p>CP2M2 J3</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>
<p>CP2M2 B2</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>

<p>CP2M2 2</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>
<p>CP2M2 J2</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>
<p>CP2M2 S1</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>
<p>CP3M2 L</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>
<p>CP3M2 Q</p>			<p><i>Aspergillus niger</i></p>

<p>CP3M2 T</p>			<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>
<p>CP3M2 N7</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>
<p>CP3M2 2</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>
<p>CP3M2 T1</p>			<p><i>Aspergillus niger</i></p>
<p>CP3M2 3</p>			<p><i>Penicillium</i> sp.</p>

Fuente: Autora

5.8 Discusión

Este estudio es uno de los pocos que se han ejecutado para determinar las características del suelo microfungal en una superficie que consta dentro del Sistema Nacional de Áreas Protegidas en la República del Ecuador. El ABVPA, está constituido por tres formaciones vegetales principalmente: chaparro, el bosque y musgos, plantas epifitas y árboles ramificados. El suelo arcilloso rico en materia orgánica, junto con la precipitación que se presenta en la zona favorece el desarrollo de la vegetación y son factores que actúan concomitantemente para mantener la humedad, y características únicas de lugar

Los resultados evidencian la abundancia de hongos en los 3 pisos altitudinales que se consideran en el estudio, el suelo en este ecosistema alberga una considerable cantidad de hongos que aparentemente no influyen los niveles altitudinales en su presencia. La carga microbica del suelo está directamente relacionada con la presencia de nutrientes, vegetación y humedad entre otros factores, es importante mencionar igualmente la época de muestreo, que para este caso de estudio fueron en los meses de Abril y Mayo, que en el Austro es invierno y la precipitación es elevada (INAMHI, 2015)

El presente estudio se desarrolló en un área protegida, por consiguiente reúne todas las características antes mencionadas, los hongos que se aislaron pertenecen a los géneros: *Aspergillus* sp., *Penicilium* sp., *Trichoderma* sp., y *Fusarium* sp los mismos que se reportan como hongos que están mayoritariamente presentes en sistemas terrestres (Zhang, Druzhinina, Kubick, & Xu *et al*, 2005) (Bennett *et al*, 2010) (Martínez *et al*, 2003).

Las especies más representativas de flora en el bosque son el chachaco, gual, jalo, tushig, guabisay, sarar, bromelias, etc (Prado, 2015) la diversidad fúngica juega un papel esencial para mantener y/o mejorar las características del suelo, la mayoría de los microorganismos, en especial los hongos forman parte de ecosistemas terrestres, descomponen materia orgánica y forman asociaciones simbióticas con las raíces de las plantas (micorrizas) para captar y acumular nutrientes y transferirlos a las plantas.

Según el mapa de suelo presentado el 80% del suelo es de tipo Inceptisol, con un alto nivel de materia orgánica. De acuerdo a (Patzel, 1996) cada 200m de altura, existe una disminución de 1°C, por lo que los niveles altitudinales a los que se llevó este estudio no representan significatividad, o no influye la altura en la carga microbica (hongos aislados). Es importante mencionar que, si bien el bosque es un área protegida, existen lugares dentro de sus límites en donde se llevan a cabo actividades antropogénicas como pastoreo y cultivos, actividades como la labranza, modifican la cobertura del suelo y sus características.

5.9 Proyección Futura

Este estudio se concluirá con el análisis biomolecular de los hongos filamentosos, que forman parte del cepario de hongos filamentosos de la Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca.

CONCLUSIONES

1. Se aislaron 181 hongos filamentosos en los tres pisos altitudinales ubicados en el Área de Bosque y Vegetación Protectora Aguarongo.
2. Los hongos filamentosos predominantes en el bosque son los Géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Fusarium*.
3. La clasificación de pisos altitudinales propuestos en el presente trabajo, no influye directamente en la carga fúngica, debido a que la diferencia con respecto a la altura no es significativa.
4. El tipo de suelo, la vegetación, humedad, etc. está directamente relacionada con la carga fúngica presente en la zona de influencia

RECOMENDACIONES

1. Ensayar las cepas con capacidad de biosorción de metales pesados en proyectos futuros de investigación y en procesos biotecnológicos innovadores.
2. Recopilar información referente a los géneros y especies de hongos filamentosos que forman parte del cepario.
3. Elaborar fichas técnicas de cada las cepas.
4. Sistematizar el cepario de hongos filamentosos de la Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, I., Cárdenas, J., & Martínez, V. (2007). El uso de diferentes biomásas para la eliminación de metales pesados de sitios contaminados. México DF: Ide@s CONCYTEG.
- Alexander, L. (1980). Introducción a la Microbiología del Suelo. México, D.F: AGT S.A.
- Alexander, M. e. (1981). Biodegradation of chemical of enviromental concern. Science 211(211), 132 - 138.
- Alexopoulos, M., & Mims, C. (1979). Introductory Mycology (3 ed.). Nueva York.
- Arenas, R. (2014). Micología Médica Ilustrada, laboratorio y terapéutica (5 ed.). (13, Trad.) México D.F: Mc Graw Hill Education.
- Argumedo, R., Alarcón, A., Ferrera, R., & Peña et al, J. J. (2009). El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. Revista Internacional de Contaminación Ambiental, 257 - 269.
- Arias, L., & Piñeros, P. (2008). Aislamiento de hongos filamentosos de muestras del suelo de los páramos del Guasca y Cruz Verde. Bogotá D.C.
- Arnold, R., Szabolcs, I., & Targulian, V. (1990). Global Soil Change. Luxemburgo, Austria: International Institute for Applied Systems Analysis.
- Barajas, O. (2015). HONGOS: Catálogo fotográfico de las especies del Bosque La Primavera (Vol. I). Guadalajara, México.
- Beckman, C. (1987). La naturaleza de las enfermedades silvestres de plantas. Minnesota: Sociedad Americana de Fitopatología.
- Bennett, J. (2010). An overview of the *genus Aspergillus*. In: *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Portland: Caiser Academic Press.
- Booth, C. (1971). The Genus *Fusarium* . Inglaterra.
- Burlage, R., Atlas, R., Stahl, D., Geesey, G., & Sayler, G. (1998). Techniques in Microbial Ecology. Oxford: Oxford University Press.
- Carrillo , L. (2003). Microbiología Agrícola. Salta: Universidad de Salta.
- Carrillo, L. (2003). Microbiología Agrícola. Salta: Universidad de Salta.
- Carrillo, L., & Audisio et al, C. (2007). Manual de Microbiología de los Alimentos. San Salvador de Jujuy: Asociación Cooperadora de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNJU.
- Carrilo, L. (2003). Los hongos de los alimentos y forrajes. Salta: Universidad Nacional de Salta.
- Castro, F., & Moreno, A. (2014). Recolección de Hongos Silvestres. España: Ediciones Paraninfo S.A.

- DATABIO. (2013). Fichas de Agentes Biológicos. España: Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.
- Delgado, M. J. (2001). Atlas de Imágenes. Recuperado el 18 de Agosto de 2016, de edafologia/Imagenes3.htm
- Dhinga, O., & Sinclair, J. (1985). Basic Plant Pathology Methods. Boca Raton: CRC Press Inc.
- Díaz, N. (2000). Guía para el muestreo y análisis del suelo. Bogotá.
- FAO. (2015). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Recuperado el 18 de Agosto de 2016, de <http://www.fao.org/docrep/006/W1309S/w1309s04.htm>
- Guzmán, M. (1977). Micología médica. Bogotá: Instituto Nacional de Salud.
- Hawksworth, D. (1995). Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi (8va Edición ed.). Wallingford: CAB International.
- Herrera, T., & Ulloa, M. (1990). El Reino Fungi, micología básica y aplicada. Universidad Nacional Autónoma de México - Fondo de Cultura Económica y desarrollo., México D.F.
- Hodgson, J. (1987). Muestreo y Descripción de Suelos. Barcelona: Reverté S.A.
- IGM. (2016). Instituto Geográfico Militar.
- INAMHI. (2015). Anuario Metereológico N°52 - 2012. Quito: Instituto Nacional de Metereología e Hidrología.
- INEN. (2013). Calidad del Suelo. Quito.
- Jaramillo, D. (2002). Introducción a la Ciencia del Suelo. Medellín: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias.
- Kavanagh, K. (2005). Fungi Biology and Applications. Inglaterra: John Wiley & Sons, Ltd.
- Kendrick, B. (2000). The Fifth kingdom (3ra Edición ed.). Massachussets: Focus Publishing.
- Kirk, P., Cannon, D., & Stalpers, J. (2008). Dictionary of the Fungi (10 ed.). Europe - UK: CABI.
- Kirk, P., Cannon, P., David, J., & Stalpers, J. (2001). Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi (9 Ed. ed.). Oxon: CAB International.
- Kozakiewics, Z. (1989). Aspergillus species on stored products. Surrey: CAB International Mycological Institute.
- Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Sammuels, G., & Kubicek, C. (1997). Revisión *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. Mycología(89), 442 - 460.
- Martínez, E. (2003). Estudio de Especies micotoxígenas del Género *Penicillium*: *Penicillium verrucosum* Dierckx. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona.

- Miller, P., & Poidexter, L. (1994). Predictability of biorremediation performance cannot be made with a High level of confidence. American Academic of Microbiology.
- Ministerio del Ambiente del Ecuador. (2007). Plan Estratégico del Sistema Nacional de Áreas Protegidas del Ecuador 2007- 2017. Quito: REGAL - ECOLEX.
- Montes, B., Restrepo, A., & McEwen, J. (2003). Nuevos aspectos sobre la clasificación de los hongos y su posible aplicación médica. Biomédica: Revista del Instituto Nacional de Salud.
- Moreno, Z. (2000). Correlación de la tasa de crecimiento radial y la tasa de crecimiento específico de hongos filamentosos aislados de la planta *Espeletia barclayana*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- Mueller, G., Bills, G., & Foster, M. (2004). Biodiversity of Fungi: inventory and monitoring methods. Londres: Elsevier Academic Press.
- Muller, G., Bills, G., & Foster, M. (2004). Biodiversity of Fungi: inventory and monitoring methods. Londres: Elsevier Academic Press.
- Nelson, P., Tousson, T., & Maraassas, W. (1983). *Fusarium* Species, a Illustrated Manual for Identificatin. The Pennsylvania State University Press.
- Ortega, L. (2002). Determinación de hongos filamentosos asociados a cráneos de colección del Instituto Alexander Von Humboldt, y evaluación in Vitro de sustancias biocidas para su control. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- Papavizas, G. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. Phytopathol, 23-24.
- Patzel, E. (1996). Flora del Ecuador. Quito: Banco Central del Ecuador.
- Pitt, J. (1979). The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. New York: Academic Press.
- Prado, K. (2015). Ordenación Territorial de Áreas Protegidas: Aplicación al área de influencia del Bosque y Vegetación Protectora - ABVP Aguarongo. Cuenca.
- Ramírez, A. (2005). Ecología Aplicada: Diseño y análisis estadístico. Bogotá: Centro Editorial Escuela Colombiana de Ingeniería.
- Ramos, J. (2004). Técnicas de Muestreo para Manejadores de Recursos Naturales. Microorganismos del Suelo. México D.F: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rodríguez, J., & Sánchez, J. (2003). Biorremediación. Aspectos tecnológicos y aplicación al vertido del Prestige. Industria y Minería, 17-21.
- Samson, R., Hoekstra, E., Frisvad, J., & Filtenborg, O. (2000). Introduction to food - and airborne fungi. Baarn, Holanda: CBS.

- Samuels, G., & Chaverri, P. (2003). *Hypocreal Trichoderma (ascomycota, hyphocreales, hyphocreaceae)*: species with green ascospores. *Stud. Mycol*(48), 1 -116.
- Seifert. (2001). *Fusarium* and anamorph generic concepts. *Fusarium*, 15- 28.
- Solomon, E., Berg, L., Martin, D., & Villee, C. (1996). *Biología de Ville*. México D.F: Interamericana Mcgraw Hill.
- SSSA . (18 de Agosto de 1997). Soil Science Society of America. Obtenido de <https://www.soils.org/publications/soils-glossary#>
- Subramanian, C. (1983). *Hyphocycetes: taxanomy and biology* (1 ed.). Nueva York: Academic Press.
- Summerell, B., Salleh , B., & Leslie, J. (2003). A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Disease*(87), 117 - 128.
- Torres, D. (2003). El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos. *Ecosistemas: Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente*(2), 1-7.
- Valásková, V., & Baldrian, P. (2006). Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus*. *Research in Microbiology*, 119 - 124.
- Vargas, A., & Villamizar, D. (2005). Estudio preliminar de la producción, extracción y purificación de T2 toxina por *Fusarium sporotrichioides* NRRL 3299 en dos medios sintéticos. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- Vera, G. (2004). *Introducción a la Microbiología* (2da Edición ed.). San José, Costa Rica: EUNED.
- Vishnoi, S., Naidu, J., Singh, S., & Vishnoi, R. (2005). Pathogenicity of *Curvularia geniculata* (C. *senegalensis*) for albino rats: study of clinically isolate from blood of a cancer patient. *Journal de Micologie Medicate*.
- Vullo, D. (2003). Microorganismos y metales pesados una interacción en beneficio del medio ambiente. *Rev. Quími. Viva* 2, 1-20.
- Webster, J. (1986). *Introduction to Fungi*. Cambridge University Press.
- Zhang, C., Druzhinina, I., Kubick, C., & Xu, T. (2005). *Trichoderma* biodiversity in China: evidence for north to southern distribution of species in East Asia. China: FEMS Microbiol Lett.
- Zobell, C. (1946). *Action of microorganisms in hydrocarbons*. California.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Aclorófilo: que carece de clorofila.

Anamorfo: Estado de esporulación asexual, conidial o imperfecto de un hongo que produce sus esporas por mitosis.

Anélide: célula conidiógena que origina conidios blásticos (enteroblásticos) de forma basípeta y presenta cicatrices características en forma de anillos donde se producen los conidios.

Asca: Estructura en forma de saco que contiene dos a ocho ascosporas formadas después de la cariogamia y la meiosis. Característicos en los hongos Ascomycetos.

Biorremediación: cualquier proceso que utilice microorganismos, hongos, plantas o las enzimas derivadas de ellos para retornar un medio ambiente alterado por contaminantes a su condición natural.

Biosorción: captación de metales que lleva a cabo una biomasa completa (viva o muerta), a través de mecanismos fisicoquímicos como la adsorción o el intercambio iónico.

Conidio: es una espora asexual inmóvil formada directamente a partir de una hifa o célula conidiógena o esporógena. Aparecen en hongos: Zygomycetes, Ascomycetes y algunos Basidiomycetes. **Conidióforo:** Hifa especializada y diferenciada donde son formadas las conidias

Conidioma: Cuerpo fructífero asexual que contiene conidios.

Espora: propágulo producido por reproducción sexual.

Esporóforo: cualquier estructura portadora de esporas.

Estipe: es una estructura soporte que puede comportarse como un tallo

Fiálide: Célula conidiógena con una abertura en forma de botella a través de la cual se forman conidias enteroblásticas de forma continua.

Holomorfo: el hongo completo, incluyendo todas las formas anamorfos y teleomorfos.

Métula: célula que se encuentra sobre una vesícula y sostiene las fiálides, presente en algunas especies de *Aspergillus* y *Penicillium*.

Micelio: aparato vegetativo de los hongos que le sirve para nutrirse y está constituido por hifas.

Teleomorfo: Forma sexual de esporulación de un hongo.