



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DEL SINERGISMO ENTRE ESPECIES BACTERIANAS Y
FÚNGICAS, CON CAPACIDADES METABÓLICAS ESPECÍFICAS EN EL
CONSUMO DEL CONTAMINANTE EMERGENTE CARBAMAZEPINA.**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIERAS EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTORAS: LISSETH CAROLINA CONCHA TELLO

SARA CAMILA HERNÁNDEZ AGUILAR

TUTOR: GABRIELA INÉS MENDEZ SILVA

Quito-Ecuador

2023

**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Nosotros, Lisseth Carolina Concha Tello con documento de identificación N°1316980950 y Sara Camila Hernández Aguilar con documento de identificación N° 1720489655; manifestamos que:

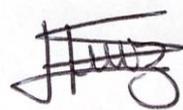
Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Quito, 04 de agosto del año 2023

Atentamente,



Lisseth Carolina Concha Tello
1316980950



Sara Camila Hernández Aguilar
1720489655

CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

Nosotros, Lisseth Carolina Concha Tello con documento de identificación No.1316980950 Sara Camila Hernández Aguilar con documento de identificación No.1720489655 expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del Trabajo experimental: “Evaluación del sinergismo entre especies bacterianas y fúngicas, con capacidades metabólicas específicas en el consumo del contaminante emergente carbamazepina”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingenieras en Biotecnología, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

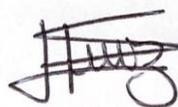
En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 04 de agosto del año 2023

Atentamente,



Lisseth Carolina Concha Tello
1316980950



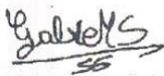
Sara Camila Hernández Aguilar
1720489655

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Gabriela Inés Méndez Silva con documento de identificación N° 1722305057, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **EVALUACIÓN DEL SINERGISMO ENTRE ESPECIES BACTERIANAS Y FÚNGICAS, CON CAPACIDADES METABÓLICAS ESPECÍFICAS EN EL CONSUMO DEL CONTAMINANTE EMERGENTE CARBAMAZEPINA**, realizado por Lisseth Carolina Concha Tello con documento de identificación N° 131698095-0 y por Sara Camila Hernández Aguilar con documento de identificación N° 1720489655, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 04 de agosto del año 2023

Atentamente,



Ing. Gabriela Inés Méndez Silva, Msc.

1722305057

Dedicatoria

A mis padres Margoth y Jorge, por motivarme a cumplir lo que me proponga, apoyarme en cada etapa de mi vida, y por ser mi refuerzo emocional.

A mi hermana Sofía que a pesar de la distancia siempre ha estado presente en mi vida y ha sido un soporte.

A mi abuelita Natividad que siempre ha confiado en mí, y ha estado a mi lado motivándome a cumplir mis sueños.

A mí misma, por ser perseverante y luchar cada día por cumplir mi objetivo, por confiar en mi capacidad y cada día demostrarme que todo es posible.

Carolina

Con inmenso cariño y gratitud, dedico este logro a mis padres Patricia y Roberto, su amor incondicional, su inagotable paciencia y su apoyo me han dado la fortaleza necesaria para perseverar.

A mis hermanas Gabriela, María José, Alejandra y a Wicho; su compañía ha sido un pilar fundamental durante este largo y desafiante camino académico, han sido mi fuerza impulsora en momentos de duda y desanimo.

A mis abuelos Adelaida y Carlos por su gran amor y ser cómplices en este camino.

Y como no a mí, por persistir en momentos difíciles, por creer y demostrar mi capacidad de lograr grandes metas.

Sara

Agradecimientos

Primero que nada, quiero agradecerle a mi familia, por su amor y su confianza, por enseñarme cada día a seguir el camino correcto y convertirme en una buena persona, a mis tíos José y Lourdes por acogerme como parte de su familia y brindarme de su apoyo, también agradecer a cada una de las personas que han estado durante este proceso dándome palabras de motivación en especial a Sara Hernández por cada día ser un apoyo y una ayuda durante la carrera, por cada risa y cada momento, vivido.

Carolina

Gracias familia por siempre estar, por su apoyo incondicional, porque la distancia no nos impidió estar juntos en esta trayectoria, gracias por creer y confiar en mi en cada paso del camino, este logro no hubiera sido posible sin el aporte de cada uno de ustedes.

Gracias amiga Carolina Concha por tu apoyo incondicional a lo largo de la carrera, gracias por las risas y los consejos que nunca faltaron, después de contar los días lo logramos.

Sara

A nuestra tutora Gabriela por confiar en nosotras, por su tiempo, esfuerzo, su guía, conocimiento y apoyo invaluable a lo largo del desarrollo del proyecto.

A las profesoras Erika, Elizabeth por ayudarnos cada vez que lo necesitábamos, con la mejor predisposición y guiarnos en este trabajo. Al profesor Daniel por su paciencia y predisposición al colaborarnos en este trabajo.

A la universidad por brindarnos la oportunidad de conocer personas maravillosas Christopher, Roberto, Mateo, Martin gracias por brindarnos de su conocimiento y ayuda.

Carolina y Sara

Resumen

La carbamazepina (CBZ) es un fármaco utilizado comúnmente para el tratamiento de trastornos neurológicos, pero su presencia en el medio ambiente como contaminante ha despertado preocupación debido a sus efectos adversos en los organismos acuáticos y en la salud humana. La aplicación de tratamientos biológicos sobre este contaminante emergente son una alternativa para su degradación, por ello el objetivo de este trabajo fue aislar hongos de muestras ambientales de diferentes puntos del Ecuador, con la capacidad de crecer en la presencia de CBZ. El índice de tolerancia (IT) de dos hongos, a concentraciones crecientes de CBZ se evaluó mediante el promedio del crecimiento en milímetros (mm) del micelio de los ensayos respecto a sus controles. Se determinó que la concentración de CBZ que mejor fue tolerada por el hongo H3 fue de 15 ppm, presentando un índice de tolerancia de 0,99 categorizado como alto; mientras que la concentración mejor tolerada por el hongo H6 fue de 40 ppm presentando un índice de tolerancia de 1,19 categorizado como muy alto. Adicionalmente, se evaluó el sinergismo entre la bacteria *Enterobacter quasihormaechei* y los dos hongos en estudio, que presentan capacidades metabólicas específicas en el consumo de CBZ, mediante ensayos *in vitro*, cuyos resultados se evaluaron mediante la determinación del crecimiento obtenido a través de unidades de área bajo la curva complementadas con análisis funcionales de comparaciones ortogonales y con pruebas independientes t-student; en los cuales se demostró que el consorcio formado por hongo H3- hongo H6-bacteria (*Enterobacter quasihormaechei*) presentó el mejor valor de sinergismo a 40 ppm del CBZ. La alta capacidad de tolerancia de estos microorganismos, resultan en un sinergismo y capacidad de formación de consorcios, que puede indicar su potencial uso como agentes biorremediadores de contaminantes emergentes de preocupación mundial, dado que la bacteria ha demostrado ser resistente a condiciones

ambientales adversas y los hongos reconocidos por su capacidad para producir enzimas capaces de descomponer este contaminante.

Palabras clave: carbamazepina, índice de tolerancia, consorcios, sinergismo, hongos

Abstract

Carbamazepine (CBZ) is a drug commonly used for the treatment of neurological disorders, but its presence in the environment as a contaminant has raised concern due to its adverse effects on aquatic organisms and human health. The application of biological treatments on this emerging pollutant are an alternative for its degradation, so the objective of this work was to isolate fungi from environmental samples from different parts of Ecuador, with the ability to grow in the presence of CBZ. The tolerance index (TI) of two fungi to increasing concentrations of CBZ was evaluated by means of the average growth in millimeters (mm) of the mycelium of the trials with respect to their controls. It was determined that the CBZ concentration that was best tolerated by the H3 fungus was 15 ppm, presenting a tolerance index of 0,99, categorized as high; while the concentration best tolerated by the H6 fungus was 40 ppm, presenting a tolerance index of 1,19, categorized as very high. Additionally, the synergism between the bacterium *Enterobacter quasihormaechei* and the two fungi under study, which present specific metabolic capacities in the consumption of CBZ, was evaluated by *in vitro* assays, whose results were evaluated by determining the growth obtained through units of area under the curve complemented with functional analysis of orthogonal comparisons and with independent t-student tests; The results showed that the consortium formed by fungus H3 - fungus H6 - bacteria (*Enterobacter quasihormaechei*) presented the best synergism value at 40 ppm of CBZ. The high tolerance capacity of these microorganisms, resulting in synergism and consortium formation capacity, may indicate their potential use as bioremediation agents for emerging contaminants of global concern, given that the bacteria have proven to be resistant to adverse environmental conditions and the fungi are recognized for their ability to produce enzymes capable of decomposing this contaminant.

Key words: carbamazepine, tolerance index, consortia, synergism, percent inhibition of radial growth.

Contenido

1	Introducción.....	1
2	Fundamentación teórica	4
2.1	Contaminantes emergentes	4
2.1.1	Carbamazepina	5
2.2	Ruta metabólica de degradación de la carbamazepina.....	6
2.3	Efectos en el ecosistema de la carbamazepina.....	7
2.4	Fuentes del contaminante carbamazepina.....	8
2.5	Métodos de degradación de carbamazepina.....	9
2.6	Bacterias asociadas a la degradación de carbamazepina.....	10
2.7	Hongos asociados a degradación de carbamazepina.....	13
2.8	Uso de consorcios para la degradación de contaminantes emergentes	15
2.8.1	Ejemplos de consorcios	16
2.8.2	Técnicas de evaluación de interacción en consorcios.....	18
3	Marco metodológico.....	21
3.1	Fase de campo.....	21
3.1.1	Recolección de muestras ambientales para aislamiento de hongos.....	21
3.2	Fase de laboratorio.....	22
3.2.1	Medios de cultivo	22
3.2.2	Preparación del estándar de carbamazepina	23
3.2.3	Aislamiento de hongos de interés a partir de muestras ambientales.....	23
3.2.4	Aislamiento de hongos en medio con contaminante	26

3.2.5	Caracterización macroscópica y microscópica de hongos de interés	26
3.2.6	Ensayos de tolerancia al contaminante carbamazepina de los hongos aislados	27
3.2.7	Reactivación de cepas bacterianas.....	28
3.2.8	Ensayos de sinergismo y antagonismo	29
3.2.9	Ensayos entre un hongo y una bacteria.....	30
3.2.10	Ensayos entre dos hongos y una bacteria	31
3.2.11	Ensayos entre dos hongos	32
3.3	Análisis estadístico.....	32
4	Resultados y discusión	34
4.1	Fase campo.....	34
4.2	Fase de laboratorio.....	35
4.2.1	Hongos aislados de muestras ambientales	35
4.2.2	Hongos aislados tolerantes al contaminante	35
4.2.3	Caracterización macroscópica y microscópica	36
4.2.4	Ensayos de tolerancia	42
4.2.5	Ensayos de sinergismo-antagonismo.....	51
5	Conclusiones	58
6	Recomendaciones.....	59
7	Bibliografía.....	60
8	Anexos.....	71

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura química de la carbamazepina (CBZ)	6
Figura 2. Ruta metabólica de la CBZ.	7
Figura 3. Representación del ensayo de placa de cultivo dual y ensayos modificados para pruebas de antagonismo	20
Figura 4. Procedimiento para aislamiento de muestras de suelo	25
Figura 5. Aislamiento de muestras de hongos obtenidos de troncos.....	26
Figura 6. Elaboración y observación de improntas	27
Figura 7. Ensayos de tolerancia.....	28
Figura 8. Ensayo de sinergismo una bacteria un hongo	31
Figura 9. Ensayos de sinergismo entre una bacteria y dos hongos.....	31
Figura 10. Ensayo de interacción entre dos hongos	32
Figura 11 Recolección de muestras. a) Recolección de cuerpos fructíferos en el tronco de un árbol frondoso de Mindo, b) y c) cuerpos fructíferos hallados en madera de la ciudad de Mera.	35
Figura 12. Ensayos de tolerancia de los hongos H6 y H3 en medio Czapek Dox modificado con contaminante.	49

Índice de Tablas

Tabla 1 Clasificación contaminantes emergentes.	4
Tabla 2. Géneros de bacterias degradadoras de Carbamazepina	12
Tabla 3. Hongos asociados a la degradación de Carbamazepina	14
Tabla 4. Constante de velocidad de primer orden (k) y vida media ($t_{1/2}$) para la degradación de CBZ.	17
Tabla 5. Recolección de muestras ambientales	21
Tabla 6. Componentes del medio Czapek-Dox modificado.	22
Tabla 7. Composición del medio MBM y elementos traza.	22
Tabla 8. Características macroscópicas de los hongos H3 y H6 en medio con CBZ.....	36
Tabla 9. Caracterización macroscópica y microscópica del hongo H3.....	36
Tabla 10. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Fusarium</i> sp. según bibliografía.	37
Tabla 11. Características microscópicas y macroscópicas de H6.	38
Tabla 12. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Fusarium</i> según bibliografía. ...	39
Tabla 13 Ensayos de tolerancia del hongo H3	42
Tabla 14. Ensayos de tolerancia del hongo H6	45
Tabla 15. Ensayos de sinergismo-antagonismo a 10 ppm	53
Tabla 16. Ensayos de sinergismo-antagonismo a 25ppm	54
Tabla 17. Ensayos de sinergismo-antagonismo a 40ppm	55
Tabla 18. Comparación crecimiento hongos con bacteria <i>Enterobacter quasihormaechei</i>	55

Índice de Ecuaciones

Ecuación 1. Índice de tolerancia	28
Ecuación 2. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial	29

Índice de Anexos

Anexo 1. Hongos aislados a partir de muestras ambientales 71

1 Introducción

En las últimas décadas la presencia de contaminantes emergentes en el medio ambiente se ha convertido en una preocupación global. Estos contaminantes son compuestos químicos que han sido introducidos en el entorno cuyos efectos sobre la salud humana se han asociado con el desarrollo de cáncer, problemas reproductivos, alteraciones endocrinas, daño hepático y renal, considerando que su efecto varía dependiendo del compuesto y concentración del químico en el ecosistema. Estos compuestos pueden ser bioacumulativos, es decir que pueden acumularse en organismos vivos a lo largo del tiempo y aumentar su toxicidad, entre algunos ejemplos de contaminantes se encuentran productos farmacéuticos, productos de cuidado personal, productos químicos industriales y sus metabolitos (Reinoso et al., 2017).

Los contaminantes emergentes pueden ser liberados al medio a través de diferentes vías como descargas de aguas residuales, la aplicación de productos químicos en la agricultura y la liberación accidental de sustancias químicas durante la producción industrial. Estudios han demostrado que estos pueden afectar a la salud humana y animal incluso en niveles bajos de exposición y puede tener efectos a largo plazo en el medio ambiente. Cabe mencionar que algunos de estos contaminantes no se encuentran debidamente controlados por las normativas de muchos países, como en el caso de la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU (Escobar, 2019). Y pueden tener un impacto significativo en los ecosistemas acuáticos y terrestres; afectando la calidad del agua, el crecimiento de los cultivos, salud de los animales y plantas (Jaimes & Vera, 2020).

Entre algunos ejemplos de estos contaminantes se encuentra la carbamazepina el cual es un fármaco utilizado principalmente para tratar la epilepsia y el trastorno bipolar, y es excretada en la orina sin metabolizar, por lo que puede ser liberada a través de aguas

residuales, la misma ha recibido una atención creciente debido a su presencia e impacto en el medio ambiente y salud humana (Gauthier, 2008).

Este contaminante emergente puede ser detectado en diferentes fuentes de agua, como ríos, lagos y acuíferos. Estudios han demostrado que la carbamazepina puede tener efectos negativos en los organismos acuáticos, como la disminución de la tasa de crecimiento y la alteración de la reproducción. Además, la carbamazepina puede ser transportada por el aire y depositarse en el suelo, donde puede persistir durante largos períodos de tiempo (Sanchez, 2018).

La exposición a este fármaco puede tener efectos negativos en la salud humana. Si bien los niveles de exposición a la carbamazepina en el agua potable son generalmente bajos, algunos estudios han encontrado una posible relación entre la exposición crónica a la carbamazepina y el aumento del riesgo de malformaciones congénitas, reacciones alérgicas, trastornos del sistema endócrino y cambios en el sistema inmunológico (Pachés, 2020).

Para abordar la preocupación por la carbamazepina como contaminante emergente, se han llevado a cabo diversas investigaciones y estrategias de control donde han propuesto estrategias de prevención, como la reducción del uso de la carbamazepina y la implementación de prácticas de gestión adecuadas para su eliminación, entre estas estrategias se incluyen el monitoreo de la calidad del agua, la regulación de los sistemas de suministro de agua; y para el tratamiento de las aguas residuales se han implementado tratamientos (físico) químicos, biológicos e híbridos; sin embargo con los tratamientos (físico) químicos como la coagulación-floculación y flotación no han logrado la eliminación completa del contaminante. Por otro lado, métodos como degradación fotocatalítica y fotolítica han permitido obtener altos porcentajes de degradación no obstante se generan productos tóxicos que pueden llegar a ser igual o más tóxicos que el

compuesto inicial. Algunos tratamientos de oxidación química generan productos intermedios estructuralmente similares a sustancias no biodegradables (Nguyen et al., 2022).

Por otro parte, los tratamientos biológicos permiten el uso de procesos naturales e implementación de enzimas producidas por los propios microorganismos, como la bioacumulación, biosorción que han contribuido a la eliminación de este fármaco (Sobrinho, 2017). La efectividad de estos tratamientos se ven influenciados por factores químicos, estequimétricos, concentración de contaminante, tiempo de retención y eficiencia de la cepa microbiana. Se han evaluado cepas bacterianas y fúngicas con el fin de biodegradar la carbamazepina con lo que se ha observado porcentajes de eliminación que van desde 45% al 90% (Castellet-Rovira et al., 2018; Mejías, 2020). Así mismo, el uso de hongos y bacterias en conjunto ha mejorado la eficacia y disminuido el tiempo de remoción. Sin embargo, no muchos estudios han explorado el uso de consorcios microbianos para la remoción de este contaminante (Robles et al., 2021).

Por lo que, en el presente trabajo se busca evaluar el sinergismo entre especies bacterianas y fúngicas, con capacidades metabólicas específicas en el consumo del contaminante emergente carbamazepina, para ello se realizará la caracterización macroscópica y microscópicamente de dos hongos aislados de muestras ambientales, de los mismos se evaluará la tolerancia al contaminante emergente carbamazepina, y mediante ensayos de sinergismo *in vitro* se va a evaluar si existe sinergismo entre una bacteria y los hongos aislados, por ensayos *in vitro* de confrontación. Se planteará una hipótesis nula donde todos los tratamientos son iguales y una hipótesis alternativa en la que al menos un tratamiento muestre diferencias significativas.

2 Fundamentación teórica

2.1 Contaminantes emergentes

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos ha definido como contaminantes emergentes al “químico o material que se presenta como una amenaza potencial o real para la salud humana y/o medioambiental o para los que existe una falta de normas vigentes de salud” (EPA, 2014). Se trata de contaminantes orgánicos, inorgánicos y organometálicos que son producidos a escala industrial de manera indiscriminada; algunos de ellos son persistentes considerados así si su vida media es superior a 2 meses para aguas o 6 meses para suelos y sedimentos; se caracterizan porque pueden biodegradarse en intermedios, sin embargo, pueden ser más tóxicos para el medio ambiente que sus precursores (Ramírez et al., 2015).

La Tabla 1 muestra la clasificación resumida de los contaminantes emergentes por familias enfocando su interés en su acción toxicológica y preeminencia científica por su mecanismo de acción.

Tabla 1. Clasificaciones contaminantes emergentes.

Grupo	Compuesto
Esteroides y hormonas	1. Estradiol
	2. Testosterona
	3. Estrona
	4. α -etinilestradiol
	5. β -etinilestradiol
Productos para el cuidado personal	6. Galaxolida
	7. Tonalida y otros (PCP)
	8. Triclosan
	9. Oxibenzona
	10. DEET
Industriales	11. Pentaclorofenol
	12. Nonifenoles
	13. Bisfenol A
	14. Compuestos organiestánicos
	15. Butilbencilftalato

Fármacos

16. Ácido mefenámico
17. Sulfasalazina
18. Ibuprofeno
19. Diclofenaco
20. Nimesulida
21. Ketoprofeno
22. Metil de ácido salicílico
23. Gemfibrozil
24. Ácido clofíbrico y metabolitos
25. Benzafibrate
- 26. Carbamazepina**
27. Salvasartan
28. Metilprednisolona
29. Tadalafilo
30. Dexametasona
31. Clofenamina
32. Astemisol
33. Amlodipino
34. Diltiazem
35. Pentoxifilina
36. Avilamicina
37. Metaprol
38. Citrato de sildenafilo

Antibióticos

39. Sulfametoaxol
 40. Trimetropina
 41. Ciprofloxacino
 42. Roxitromicina
 43. Norfloxacino
 44. Sulfadiazina
 45. Cloranfenicol
 46. Conazol
 47. Imidazoles y triazoles
 48. Sulfaclopiridazina
-

Fuente: (Ramírez et al., 2015).

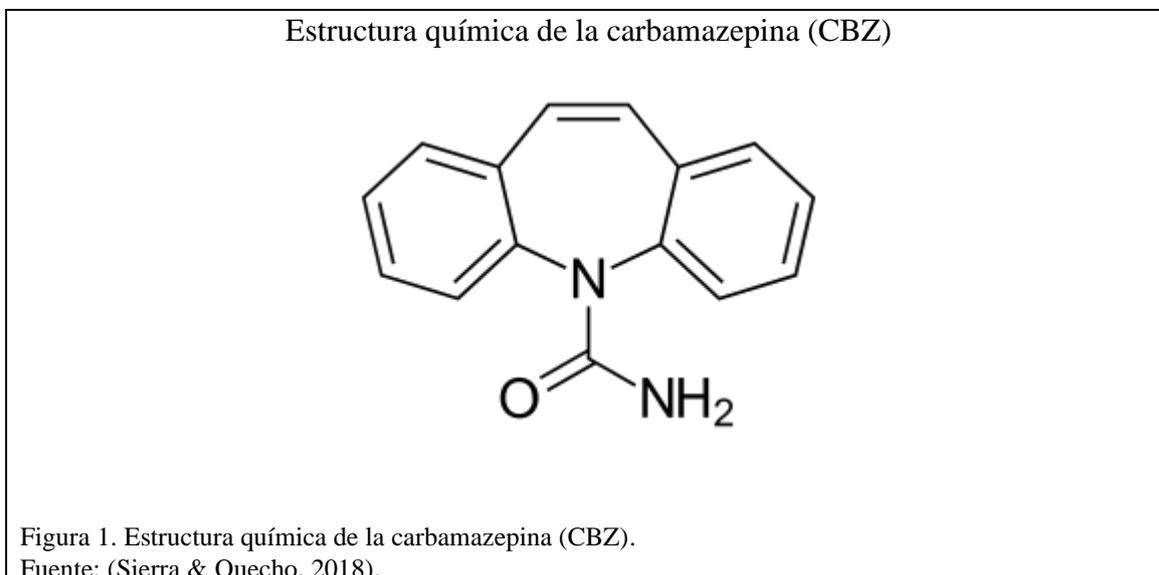
Elaborado por: (Las autoras, 2023).

2.1.1 Carbamazepina

La carbamazepina es un fármaco utilizado principalmente como antiepiléptico, no obstante, presenta otras propiedades tales como, anticolinérgica, antidiurética, antiarrítmica, relajante muscular, antidepresiva, sedante e inhibidora de la transmisión neuromuscular (Samper, 2016).

La carbamazepina, 5H-dibenzazepina-5-carboxamida, tiene estructura similar a la imipramina, que es una dibenzodiazepina, que posee en su estructura una columna

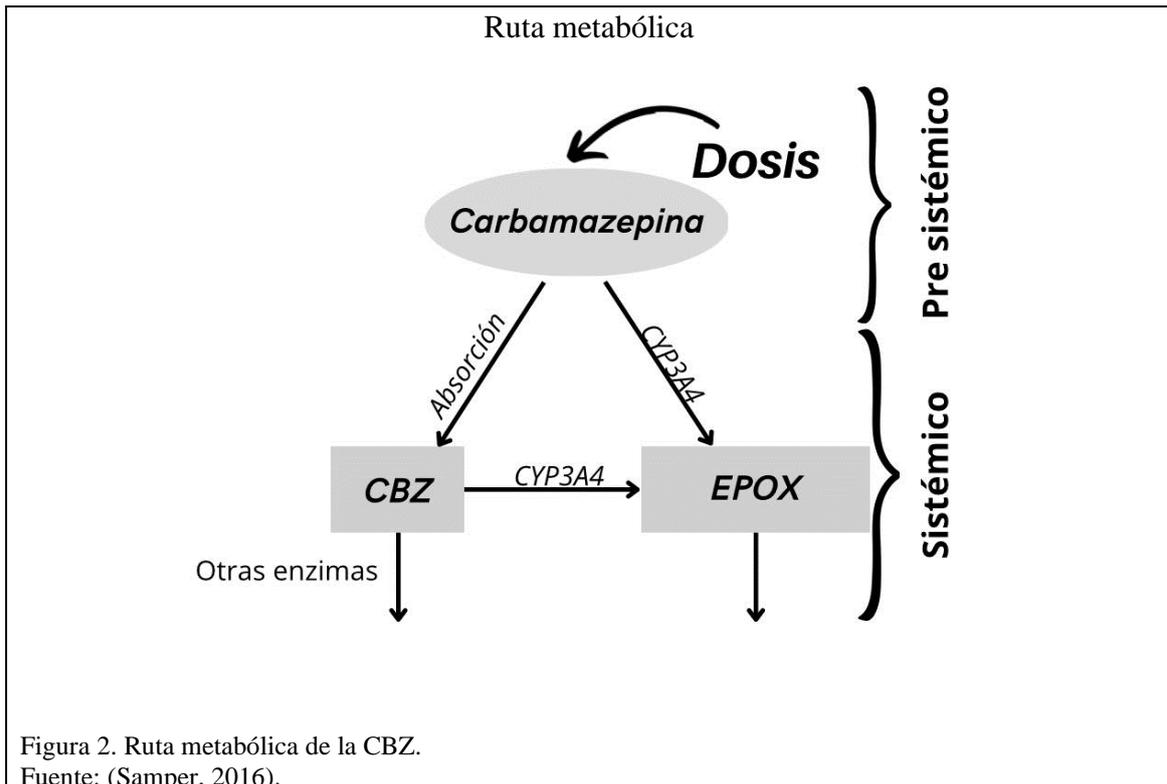
vertebral no polar y una amida polar, la cual puede enlazar con hidrógenos. En la Figura 2 se visualiza la estructura química dimensional de la carbamazepina (Sierra & Quecho, 2018).



2.2 Ruta metabólica de degradación de la carbamazepina

El metabolismo de la carbamazepina se da principalmente en el hígado por la enzima CYP3A4 y es excretado del cuerpo vía urinaria y fecal (Morales & Méndez, 2021), siendo solo un 1% excretado como forma inalterada. El tiempo de vida media de eliminación de la carbamazepina depende de la dosis, pero generalmente está en el rango de 25 a 65 horas después de la administración. Sus metabolitos urinarios importantes como se ven en la Figura 2, son 10,11-dihidro-10,11-epoxycarbamazepina (CBZ-epóxido) y trans-10,11-dihidro-10,11-dihidroxicarbamazepina (CBZ-diol), destacando que el primero es farmacéuticamente tan activo como su fármaco original. En cuanto al CBZ-diol representa una gran parte de la dosificación oral, aproximadamente el 30%, comparable a la porción total de carbamazepina inalterada (28% en heces, más de 1% en orina). Además, es un metabolito de la oxcarbazepina, que es un derivado de la carbamazepina, con átomo de oxígeno extra en el anillo de dibenzazepina. Por lo tanto, se espera observar

una mayor concentración de CBZ-diól en cuerpos de agua, aproximadamente tres veces la de carbamazepina (Y. Zhang et al., 2008). La cantidad de CBZ o de sus metabolitos encontradas en las matrices acuáticas de los ecosistemas va a depender de dos factores, primero la incidencia de epilepsia o dolencias relacionadas con el consumo de CBZ y por último la eficiencia en la eliminación de este tipo de sustancias (Samper, 2016).



2.3 Efectos en el ecosistema de la carbamazepina

A pesar de que estos contaminantes emergentes se encuentran en bajas concentraciones pueden causar problemas de magnificación trófica, tales como alteración de las funciones endócrinas bloqueando o perturbando las funciones hormonales, en algunas especies de peces provoca el desarrollo de las gónadas de la intersexualidad y la reducción en fecundidad (Reinoso et al., 2017). Como indican Niemuth & Klaper (2015) en su estudio, la exposición del pez piscardo de cabeza gorda (*Pimephales promelas*) a concentraciones altas de 10 ng/L de contaminante durante una ventana de 10 a 15 días posteriores a la

eclosión fue suficiente para dar como resultado la feminización de las gónadas masculinas observables en la madurez sexual.

En el estudio de Ferrari et al., (2003) se obtiene la tasa de eclosión y mortalidad embrionaria del pez cebra de agua dulce (Cyprinidae, *Danio rerio*) después de 10 días de exposición al contaminante en una concentración de 25000 ug/L, donde se evidencio la mortalidad de embriones y larvas.

Por otro lado, en el ser humano este contaminante influye en la función reproductiva, además de afectar a la tiroides, próstata y tamaño de testículos, causando resistencia en patógenos bacterianos (Reinoso et al., 2017). También, al ser contaminantes mutagénicos aumentan la frecuencia de mutación en las células y/o en los organismos, pudiendo generar la aparición de tumores benignos o malignos, patologías relacionadas con el sistema inmune y efectos adversos en mujeres embarazadas. Al mismo tiempo que pueden ser teratogénicos produciendo alteraciones en el feto durante su desarrollo (Pachés, 2020).

En el estudio de Pomati et al., (2006), se presenta la inhibición del crecimiento de células embrionarias humanas HEK293, con una disminución del 30% en la proliferación celular, en comparación a los controles, debido a la exposición al contaminante en una concentración de 100 ng/L, lo que estimuló la expresión de los genes p16 y p21 que median en la progresión del ciclo celular, con una ligera acumulación de células en la fase G2/M del ciclo celular.

2.4 Fuentes del contaminante carbamazepina

Los contaminantes emergentes enfocándose principalmente en los fármacos, ingresan al ciclo del agua por la excreción de estos a través de la orina que forma parte de las aguas residuales domésticas. Estos fármacos también provienen de descargas hospitalarias por

productos caducados e industriales. Una vez liberados en el medio ambiente, estos pueden experimentar cambios estructurales por una variedad de procesos bióticos o no bióticos incluyendo fotólisis, hidrólisis y biotransformación que pueden ser más tóxicos e incluso más bioacumulables que los contaminantes precursores (Escobar, 2019).

La carbamazepina, es un compuesto de difícil remoción, ya que es persistente, permanece en el ambiente hasta 100 días y solo se logra remover valores menores; aproximadamente el 72% del fármaco administrado por vía oral es absorbido, mientras que el 28% es desechado por medio de las heces. Una vez excretados ingresan a plantas de tratamientos de aguas residuales, pero no son eliminados en su totalidad, por tanto, su presencia en el ambiente ha generado preocupación al ser una amenaza para las especies acuícolas y el ser humano (Morales & Méndez, 2021).

2.5 Métodos de degradación de carbamazepina

Se han realizado estudios de diferentes tratamientos de remoción, como los procesos convencionales de lodos activados a gran escala y a escala de laboratorios, reactores de membrana a escala piloto y de laboratorio, y reactores por lotes de secuenciación, donde los investigadores concluyeron que, la CBZ es persistente y sus eficiencias de eliminación por parte de las plantas de tratamiento de aguas residuales son en su mayoría por debajo del 10% (Y. Zhang et al., 2008).

Los tratamientos convencionales de depuración de aguas residuales no tratan contaminantes farmacéuticos, por tanto, se identifica la presencia de estos al final del proceso, por lo que sus metabolitos son descargados al medio ambiente, no obstante, gracias a los avances tecnológicos se ha podido encontrar concentraciones de estos entre los ng/L a los µg/L mostrando así su carácter persistente y no biodegradable (Morales & Méndez, 2021).

En cuanto a los procesos oxidativos avanzados como UV/H₂O₂ se ha logrado alcanzar altas tasas de remoción de carbamazepina, por ejemplo, en la reducción completa del sustrato después de un tratamiento de 4 minutos se obtuvo un valor del 35% de carbono orgánico total eliminado, sin embargo estos tratamientos no son ampliamente aceptados debido a su alto costo operativo y los subproductos formados por procesos oxidativos en este caso la actina, resultan ser más tóxicos y persistentes que el compuesto original (Vogna et al., 2004).

Otra alternativa, es la biorremediación, una tecnología innovadora y en evolución debido a su estrecha relación con la conservación del medio ambiente. Este proceso hace uso de varias técnicas microbianas ecológicas, donde estos se adaptan al contaminante y desarrollan cepas ambientalmente aclimatadas que convierten a las sustancias nocivas en formas no dañinas dependiendo de su actividad enzimática. No obstante, la mayoría de las especies utilizadas permiten que algunos compuestos permanezcan recalcitrantes, lo que impulsa a una mayor investigación para encontrar nuevos candidatos a la biodegradación (Porika et al., 2021).

2.6 Bacterias asociadas a la degradación de carbamazepina

Los microorganismos se adaptan a las condiciones naturales, permitiendo así eliminar los contaminantes presentes, al incluirlos en sus procesos metabólicos. Es conocido que el metabolismo bacteriano bajo ciertas condiciones de estrés libera diferentes metabolitos secundarios, que reaccionan con moléculas grandes y complejas que las convierten en elementos relativamente más pequeños, simples y no tóxicos (Poddar et al., 2022). De la misma forma, los contaminantes se pueden eliminar mediante adsorción, volatilización, biotransformación y mineralización (Casado, 2010).

El metabolismo de biodegradación de carbamazepina en bacterias puede dividirse en varias vías en las cuales se ven involucradas la conjugación de Glutación reducido (GSH) y 2,3-dihidroxiación, donde el metabolismo puede caracterizarse por el uso de sistemas enzimáticos tal como la adsorción de CBZ el cual es un mecanismo de eliminación mediante el cual reduce la cantidad de xenobióticos (Sauvêtre et al., 2018).

Algunos géneros de bacterias demuestran la capacidad de transformar los compuestos tóxicos debido a la adaptabilidad de los mismos microorganismos, además las propiedades inespecíficas de los mismos permiten degradar amplia variedad de contaminantes (Sauvêtre et al., 2018).

Con la aplicación de bacterias se han obtenido porcentajes de biodegradación hasta el 90%, tomando en cuenta que para los estudios de remoción de contaminantes se basan en concentraciones iniciales del mismo, por lo que, en el estudio de Nguyen et al., (2022) se utilizaron diferentes condiciones entre las cuales se destaca las condiciones anóxicas, es decir ausencia de oxígeno en presencia de nitratos, y una concentración inicial de 10 uM.

También, en otros estudios asociados a la degradación del microcontaminante carbamazepina se investigó a las bacterias acidogénicas fermentativas (FAB) y bacterias reductoras de sulfato (SRB), en los que se obtuvieron porcentajes de degradación en un rango de 36% al 98% e incluso producción de ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico (Tahir et al., 2021).

Se destaca que las especies identificadas con considerables porcentajes de degradación poseen la capacidad de biotransformar el contaminante de manera que pueden utilizar a la CBZ como su principal fuente de energía, sin embargo, algunos resultados se han visto limitados por las condiciones como el pH, temperatura y la adición de nutrientes que son

importantes para el desarrollo, crecimiento y biotransformación de los microorganismos (Nguyen et al., 2022).

En la Tabla 2 se hace referencia a algunos ejemplos de bacterias y sus respectivos porcentajes de degradación del contaminante.

Tabla 2. Géneros de bacterias degradadoras de Carbamazepina.

Género/especie	Porcentaje de degradación	Descripción del ensayo	Fuente	
<i>Streptomyces spp.</i>	35%	Se utilizó 20µL de inóculo bacteriano, con 3mL de medio MSM, 3µL de SNs y 3 mL de CBZ en una concentración de 10 ppm, en tubos de vidrio estériles con agitación constante a 150 rpm a 20°C durante 90 días. La cuantificación del fármaco se realizó por HPLC.	(Mejías, 2020)	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	46,6%			
<i>Pseudomonas putida</i>	46,6%			
<i>Pseudomona jinjuensis</i>	83,6%			
<i>Phragmites australis</i>	90%			
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	46,6%			
<i>Delfita sp.</i>	NR			
<i>Streptomyces sp.</i>	35%			(Bessa et al., 2019)
<i>Labrys portucalensis</i>	95,4%			
<i>F11</i>				
<i>Bacillus subtilis</i>	46,6%	El ensayo se realizó en matraces de 200 mL donde se transfirió el contaminante en cada matraz con diferentes concentraciones (42,3 µmol/L, 84,6 µmol/L, 126,9 µmol/L, 169,2 µmol/L). Se mantuvieron en una incubadora con temperatura controlada de 35±1°C a 150 rpm.	(Tahir et al., 2021)	
<i>Bacillus Thuringensis</i>	46,6%			
<i>Sphingomonas herbicidovorans</i>	46,6%			
<i>Cupriavidus sp.</i>	NR			
<i>Sphingomonas sp.</i>	NR			
<i>Methylobacterium sp</i>	NR			
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	NR			

Nota: NR: No reportado; MSM: medio de sal mineral; SNs: Solución de nutrientes; MM: Medio mínimo de sales.

Elaborado por: (Las autoras, 2023).

2.7 Hongos asociados a degradación de carbamazepina

La cantidad de organismos utilizados para la degradación de contaminantes como la carbamazepina son innumerables, entre estos se encuentran los hongos, que poseen 3 mecanismos para la biodegradación, dos son procesos oxidativos y uno reductivo (Morales & Méndez, 2021).

Por ejemplo, los hongos de la pudrición blanca poseen enzimas las cuales desempeñan un papel importante en la reducción de la concentración de este contaminante, debido a que lo incorporan a su metabolismo (Mejías, 2020); entre estas enzimas se encuentran las modificadoras de lignina extracelulares que degradan la estructura de la lignina, causando a su vez un enriqueciendo en celulosa, lo que produce una coloración blanca en el tronco, por este fenómeno a estos hongos se los denomina como “hongos de la pudrición blanca” o “podredumbre blanca” (Kasonga et al., 2021; Morales & Méndez, 2021).

De igual importancia son los hongos filamentosos, debido a pueden crecer en diferentes sustratos, con diferentes valores de pH, menor cantidad de nutrientes o en la presencia de contaminantes, los cuales los incorporan en su metabolismo; los convierte en organismos de utilidad para biorremediación; sin embargo, hay que considerar que también las características del contaminante pueden influir en su remoción. Adicionalmente, Bulkan et al., (2020) expone que, estos hongos permiten utilizar tanto células enteras, como lodos biocatalizadores o enzimas derivados de estos, los cuales son aislados para usarse en sistemas libres de células que permitan la eliminación del contaminante.

Por otro lado, para el crecimiento y establecimiento del medio de cultivo del hongo se deben considerar las condiciones del medio y parámetros ambientales, por ejemplo, para

Trametes versicolor en los ensayos de degradación se utiliza mayoritariamente el medio Kirk en el cual el nitrógeno se encuentra limitado, por lo que causa estrés al hongo lo que provoca la expulsión de enzimas lignolíticas al medio. Así que, las condiciones ideales para el crecimiento varían, en temperatura de 22°C a 30°C y un pH menor a 3,5 (Morales & Méndez, 2021).

En la Tabla 3 se observan los hongos más importantes en la degradación de CBZ.

Tabla 3. Hongos asociados a la degradación de Carbamazepina

Especies	Porcentaje de degradación	Descripción del ensayo	Fuente
<i>Aspergillus niger</i>	>70%	Ensayos de degradación realizaron a temperatura ambiente y continuamente aireados, en los Erlenmeyer estériles se añade 200mL de medio líquido, 30% de hongo sin aislar, 1mg/L de CBZ. El tiempo de duración de los ensayos fue de 14 días.	(Kasonga et al., 2021)
<i>Mucor circinelloides</i>	<70%		
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	<70%		
<i>Trametes polizona</i>	>70%		
<i>Rhizopus microsporus</i>	>70%		
<i>Ganoderma lucidum</i>	60%	Experimentos de degradación realizaron en matraces de 250 mL con 100mL de medio, 4,5 g/L de gránulos de micelio, 40-184,7 mg/L de concentración del contaminante.	(Castellet-Rovira et al., 2018)
<i>Irpex lacteus</i>	62%		
<i>Stropharia rugosoannulata</i>	75%		
<i>Gymnopulis luteofolius</i>	55%	Se realizó durante 6 días considerando que los tratamientos se realizaron por triplicado incubados a 135 rpm a 25°C en condiciones de oscuridad.	
<i>Agrocybe erebia</i>	45%		
<i>Trametes versicolor</i>	95%		

<i>Pleurotus ostreatus</i>	68%	En recipientes de vidrio sellados de 125mL se alicuotó 50 mL de medio (PDB, Murashige & Skoog) con hongo+ 4ug/L de CBZ. Los recipientes se oxigenan durante 1 minuto y se incuban a 25°C a 100 rpm en oscuridad durante 15 días.
<i>Phanerochaete chysosporium</i>	80%	
<i>Trichoderma harzianum</i>	71%	

Elaborado por: (Las autoras, 2023).

2.8 Uso de consorcios para la degradación de contaminantes emergentes

Un consorcio microbiano es una asociación de microorganismos (bacterias, arqueas, hongos, virus y algas) que contiene al menos dos o más miembros, que viven juntos en un ambiente contiguo e interactúan entre sí (Morocho, 2020).

Los consorcios de microorganismos son una alternativa en el proceso de disminución de contaminantes emergentes en el medio ambiente, caracterizados por sus capacidades específicas de biodegradación, sin embargo, solo pocos estudios han explorado el uso de consorcios microbianos definidos con hongos y bacterias. Se considera que los hongos poseen una amplia variedad de enzimas con capacidad de biotransformar una gran cantidad de sustratos, mientras que, las bacterias tienen una acción biocatalítica eficiente asociada a su mayor tasa de crecimiento (Robles et al., 2021).

Por lo tanto, se puede implantar la posibilidad de establecer interacciones sinérgicas entre estos tipos de microorganismos para alcanzar altas tasas de biodegradación incluso a altas concentraciones de contaminante, dado que se ha demostrado que es difícil lograr la degradación completa de los contaminantes por una sola cepa, por lo que se considera que los consorcios microbianos pueden integrar las ventajas de cada microorganismo para lograr la degradación eficiente de estos, exhibiendo un buen desempeño en la tolerancia

al sustrato, la rapidez y una degradación significativa de los contaminantes (Robles et al., 2021).

En cuanto a las ventajas del uso de consorcios frente a las cepas individuales en primer lugar se puede mencionar que, aumenta la degradación metabólica sinérgica puesto que, los miembros del consorcio pueden promover el crecimiento de otros microorganismos mediante el uso de metabolitos después de la degradación del contaminante, aumentando así las vías metabólicas para la biodegradación. En segundo lugar, algunos microorganismos producen muchos biosurfactantes de alta eficiencia, lo que aumenta la solubilidad y el contenido de contaminantes, mejorando su biodisponibilidad y biodegradabilidad. Finalmente, los consorcios se pueden autorregular y adaptarse durante la degradación mostrando así un mejor desempeño que los cultivos individuales (T. Zhang & Zhang, 2022).

2.8.1 Ejemplos de consorcios

Se han realizado ensayos de degradación de diversos contaminantes emergentes con diferentes microorganismos, tanto bacterias como hongos. De la aplicación de consorcios, existen algunos estudios asociados a la degradación de estos contaminantes, como por ejemplo la aplicación de un consorcio de bacterias degradadoras de estrógenos conformado por los géneros *Methylobacterium*, *Ochrabactrum*, *Pseudomonas* y *Mycobacterium* eliminando altos porcentajes de estrona (E1), 17 β -estradiol (Be2) y equol (EQO) (Martine et al., 2011).

Por otro lado, se ha evaluado la biodegradación del triclosán por medio de un consorcio bacteriano procedente de lodos activados conformado por *Pseudomonas* spp., *Alcaligenes* sp., *Rhodanobacter* sp., *Agrobacterium* sp. y *Sphingomonas* sp. obteniendo resultados

eficientes después de aproximadamente 13 días de crecimiento con 500 mg/L de triclosán, casi el 35% de este fue mineralizado y capturado como CO₂ (Acosta, 2010).

También se expone el uso de consorcios conformados por *Enterococcus lactis*, *Bacillus paranthracis*, *Citrobacter portucalensis* y *Enterococcus faecium* capaces de degradar diclofenaco (DFC) que es un contaminante emergente de la subclase de productos farmacéuticos (Chopra & Kumar, 2020).

En el caso de la carbamazepina, en cuanto al uso de consorcios no hay muchos estudios, sin embargo, se ha evaluado la degradación de algunos hongos filamentosos como *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* y *Gandema lucidum* para la remoción de este debido a sus sistemas enzimáticos (Severo, 2021). Por otro lado, se han analizado cepas bacterianas como *Starkeya* sp. y *Rhizobium* sp. aisladas de lodos activados de plantas de tratamiento de aguas residuales municipales como degradadores potenciales de carbamazepina, como lo presentan Bessa et al., (2017) en la Tabla 4, donde *k* es la constante de velocidad de degradación y *t*_{1/2} la vida media de biodegradación a una concentración de 10 mg/L de carbamazepina; se observa que se evalúa la biodegradación del compuesto como sustrato único y en presencia de una fuente de carbono suplementaria como el acetato a 5,9 mM para simular el contenido de carbono de un afluente de una planta de tratamiento de aguas residuales.

Tabla 4. Constante de velocidad de primer orden (*k*) y vida media (*t*_{1/2}) para la degradación de CBZ.

Suplementación farmacéutica CBZ (10 mgL⁻¹)				
	Cepa C11 <i>Starkeya</i> sp.		Cepa C12 <i>Rhizobium</i> sp.	
	<i>k</i> (d ⁻¹)	<i>t</i> _{1/2} (d)	<i>k</i> (d ⁻¹)	<i>t</i> _{1/2} (d)
Como única fuente de carbón	0,016	43,3	0,014	49,5
Con adición de acetato 5,9mM	0,016	43,3	0,010	69,3

Con adición de acetato 5,9 mM (alimentación periódica)	0,015	46,2	0,011	63,0
---	-------	------	-------	------

Fuente: (Bessa et al., 2017) .

Elaborado por: (Las autoras, 2023).

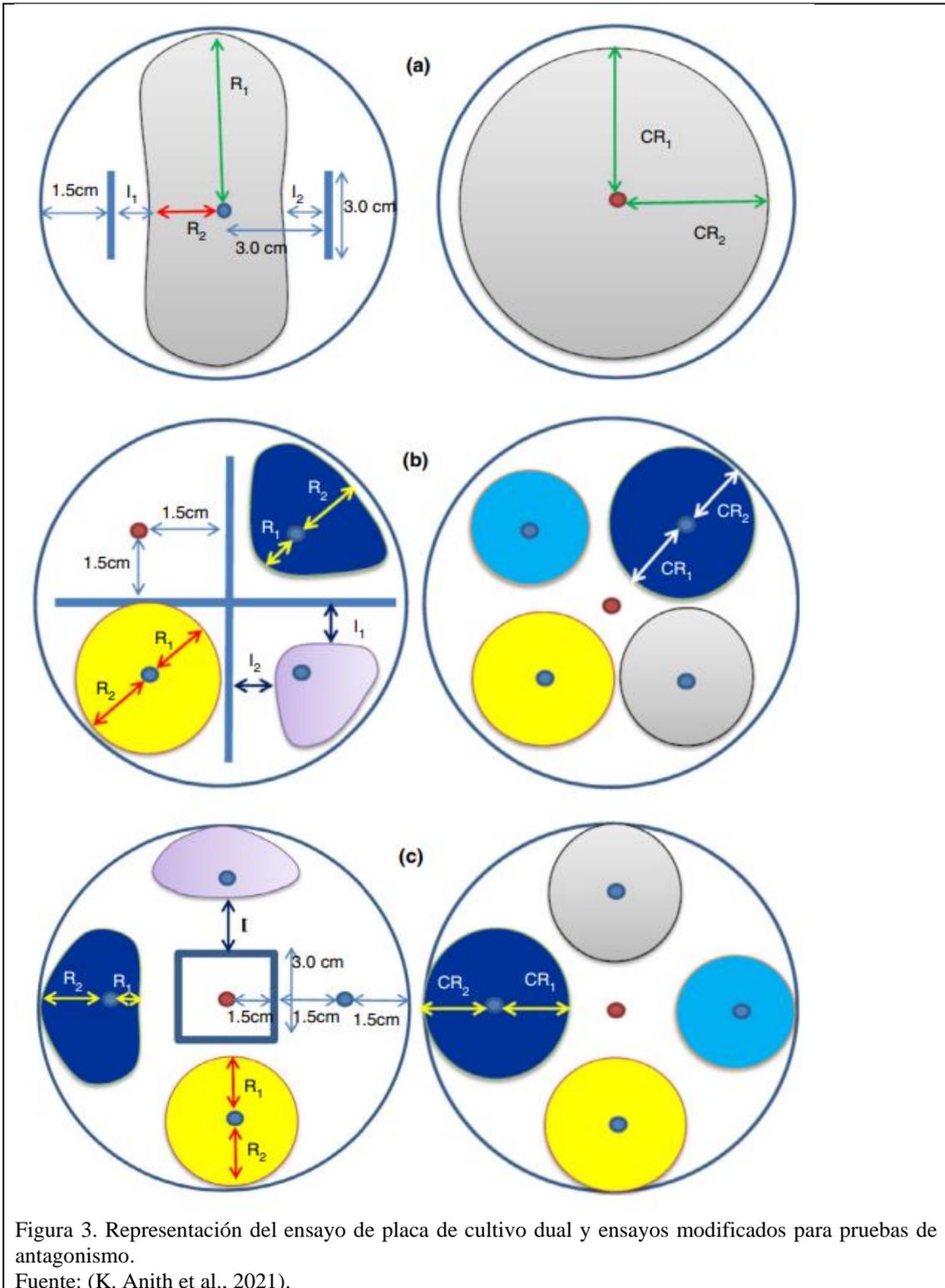
2.8.2 Técnicas de evaluación de interacción en consorcios

Actualmente, se están desarrollando comunidades con diferentes microorganismos capaces de interactuar sinérgicamente por medio de la aplicación de estudios *in vitro* (Tabacchioni et al., 2021); dado que cuando las bacterias y hongos comparten un sustrato en común en el mismo entorno, su proximidad espacial conduce a interacciones ya sean sinérgicas o antagónicas. Para lo cual por lo general se utiliza ensayos cualitativos de inhibición de crecimiento utilizando pruebas de cultivo dual en medios sólidos de agar, donde la capacidad de antagonismo de las cepas evaluadas se determina mediante el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PIRG) (Robles et al., 2021); en el cual se consideran parámetros como: el tiempo de contacto, que es el lapso en número de días en el cual las cepas del antagonista y el patógeno entran en contacto; y se mide el crecimiento radial de las cepas expresado en centímetros (cm) (Calvo et al., 2012).

Para representar estos resultados, se utiliza la escala de Bell, la cual consta de cinco clases: en la uno, el antagonista ocupa completamente la superficie del medio de cultivo cubriendo totalmente al patógeno; en la dos, el antagonista llega a sobrepasar las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo; en la tres, el antagonista y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie del medio y no parece haber dominancia; en la cuatro, el patógeno sobrepasa al crecimiento del antagonista colonizando tres cuartas partes de la caja Petri y en la clase cinco, el agente patógeno llega a cubrir totalmente la caja Petri (Calvo et al., 2012).

Sin embargo, existen otros métodos para realizar pruebas antagónicas como son los de raya cuadrada y método de racha positiva donde es posible probar el antagonismo de una sola cepa bacteriana contra cuatro patógenos, permitiendo así reducir en un 70%, el número de placas de agar requeridas para estos ensayos. En la Figura 3 se puede observar los métodos de evaluación de antagonismo, en la primera sección (a) se representa un ensayo dual de placa, al lado izquierdo se visualiza la placa de prueba y a la derecha la placa de control, donde R es el radio de la colonia del patógeno en la placa de ensayo y CR es el radio de la colonia del patógeno en la placa de control, I representa las zonas de inhibición y las líneas azules gruesas representan la línea bacteriana. En la segunda sección (b) se representa el método de racha positiva, donde R y CR se miden de manera exterior e interior; y la última sección (c) representa el método de raya cuadrada donde los radios se miden de la misma manera que el anterior; cabe mencionar que en los dos últimos métodos los patógenos representados por tonos azules y grises en la placa de prueba son antagonizados por la cepa bacteriana, no se produce antagonismos con el patógeno representado por el área sombreada amarilla (K. Anith et al., 2021).

Representación del ensayo de placa de cultivo dual para pruebas de antagonismo
--



3 Marco metodológico

3.1 Fase de campo

3.1.1 Recolección de muestras ambientales para aislamiento de hongos.

Las muestras de suelo se recolectaron en diciembre de 2022 en los puntos descritos en la Tabla 5. Para la recolección se tomó una muestra de 250 gramos de suelo superficial (15 cm de profundidad), se colocó en fundas ziploc (31x25 cm) debidamente etiquetadas como se indica en la normativa del Instituto Ecuatoriano de Normalización (2014); y se conservaron en refrigeración a 4°C hasta su transporte al laboratorio.

Tabla 5. Recolección de muestras ambientales.

Provincia	Lugar de recolección	Coordenadas geográficas
Tungurahua	Ciudad Baños	1°24'12,7"S 78°18'03,3"W
	Salasaca	1°14'54,6"S 78°36'47,8"W
Pastaza	Ciudad Puyo	1°28'40,6"S 77°59'53,8"W

Elaborado por: (Las autoras, 2023).

Adicionalmente, en el mes de noviembre de 2022, se recolectaron cuerpos fructíferos de hongos encontrados en madera en estado de pudrición, retenidos por operativos de control forestal en la provincia de Pastaza, ciudad Mera (1°27'36"S 78°06'50"O); y en troncos de árboles frondosos que se encontraban en ambientes húmedos y frescos de la provincia de Pichincha, ciudad Quito, parroquia Mindo (0°4'39"S 78°45'35"O).

En cuanto al método de recolección, se tomaron alrededor de 4 cuerpos fructíferos de hongos cavando con un cuchillo alrededor de este, extrayéndolo con parte del sustrato, luego se colocó en fundas ziploc (31x25 cm) debidamente etiquetadas para cada área de muestreo, y se colocaron en alcohol al 70% para su conservación y posterior transporte a los laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana (Lugo et al., 2018).

3.2 Fase de laboratorio

3.2.1 Medios de cultivo

Los medios de cultivo usados para el aislamiento y crecimiento de hongos fueron: Extracto de Malta, Papa Dextrosa Agar (PDA) y Sabouraud Agar + Cloranfenicol (Curvelo & Rojas, 2010).

Adicionalmente, para el crecimiento de los hongos en presencia del contaminante se utilizó el medio Czapek Dox modificado a una concentración de 1x con los componentes detallados en la Tabla 6 (Koitabashi et al., 2012). Para preparar los medios se pesó cada uno de los componentes, se mezclaron entre sí, y se aforó con agua destilada. Luego se autoclavó a 121°C durante 45 minutos.

Tabla 6. Componentes del medio Czapek-Dox modificado.

Componente	Cantidad (1X)
NaNO ₃	2 g/L
K ₂ HPO ₄	1 g/L
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0,5 g/L
FeSO ₄ * 7H ₂ O	0,01 g/L
NaCl	0,5 g/L

Elaborado por: (Las autoras, 2023).

Fuente: (Koitabashi et al., 2012).

Para la reactivación de las cepas bacterianas se utilizó el medio Tripticasa Soya Agar (TSA) y Medio Basal Mineral (MBM) + Agar con 1 mL de elementos traza. El medio MBM y TSA se autoclavaron a 121 °C durante 45 minutos, luego de esto en el medio MBM se añadió 1 mL de elementos traza por cada 1000 mL de medio (Gauthier, 2008)

En la Tabla 7 se encuentra detallado los componentes del medio MBM y los elementos traza, con las cantidades a utilizarse para 1000 mL (Weber et al., 2005).

Tabla 7. Composición del medio MBM y elementos traza.

Componentes MBM	Cantidad
K ₂ HPO ₄	3,5 g/L
KH ₂ PO ₄	1,5 g/L

(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g/L
NaCl	0,5 g/L
MgSO ₄ *7H ₂ O	1,5 g/L
Elementos traza	Cantidad
NaHCO ₃ *10H ₂ O	2g/L
MnSO ₄ *4H ₂ O	0,3 g/L
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0,2 g/L
(NH ₄) ₂ MO ₇ O ₂ *4H ₂ O	0,02 g/L
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,1 g/L
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,05 g/L
FeSO ₄ *7H ₂ O	0,5 g/L

Fuente: (Weber et al., 2005).

Elaborado por: (Las autoras, 2023).

Nota: Los elementos traza se preparan con agua destilada estéril, y se colocan en el medio una vez autoclavado.

3.2.2 Preparación del estándar de carbamazepina

Para la preparación del estándar de carbamazepina, se pesó 10 mg del contaminante y se añadió 25 mL de agua destilada, se colocó un imán pequeño y se dispuso en una plancha de agitación. Cuando se disolvió casi por completo, se transfirió a un balón de 100 mL y se aforó con agua destilada estéril, obteniendo así el contaminante a una concentración de 100 ppm. A partir de esta muestra madre y mediante la fórmula $C1 * V1 = C2 * V2$ se obtuvieron los estándares a diferentes concentraciones (Barrientos & Gutiérrez De Los Santos, 2020).

3.2.3 Aislamiento de hongos de interés a partir de muestras ambientales

El cultivo de las muestras se realizó en 3 diferentes medios: Extracto de malta, Papa Dextrosa Agar (PDA) y Sabouraud Agar + Cloranfenicol, sin contaminante. Inicialmente con las muestras tomadas del suelo se realizaron diluciones seriadas, para la primera dilución se pesaron 10g del suelo y se mezcló en un frasco boeco con 90mL de agua peptonada (dilución 10⁻¹), a partir de esta dilución se tomó 1000 µL y se colocó en un tubo de ensayo con 9 mL de agua peptonada y se llevó al vortex durante 30 segundos, luego se procedió a tomar 1000µL de la dilución 10⁻² (realizada anteriormente) y se realizó el mismo procedimiento hasta llegar a la dilución 10⁻⁸ (Castillo, 2021).

Para el aislamiento, se tomó 100µL de la dilución 10^{-1} , se colocó en cajas con medio Sabouraud y PDA con un asa de Digrafski; y se realizó la siembra por extensión en placa. Luego se sembró las diluciones 10^{-4} , 10^{-6} y 10^{-8} en medio Sabouraud, PDA y extracto de malta como se describió previamente. Las cajas Petri se incubaron a 24°C durante 7 días, luego se realizaron resiembras hasta obtener cultivos puros (Maldonado, 2022).

En la Procedimiento para aislamiento de muestras ambientales

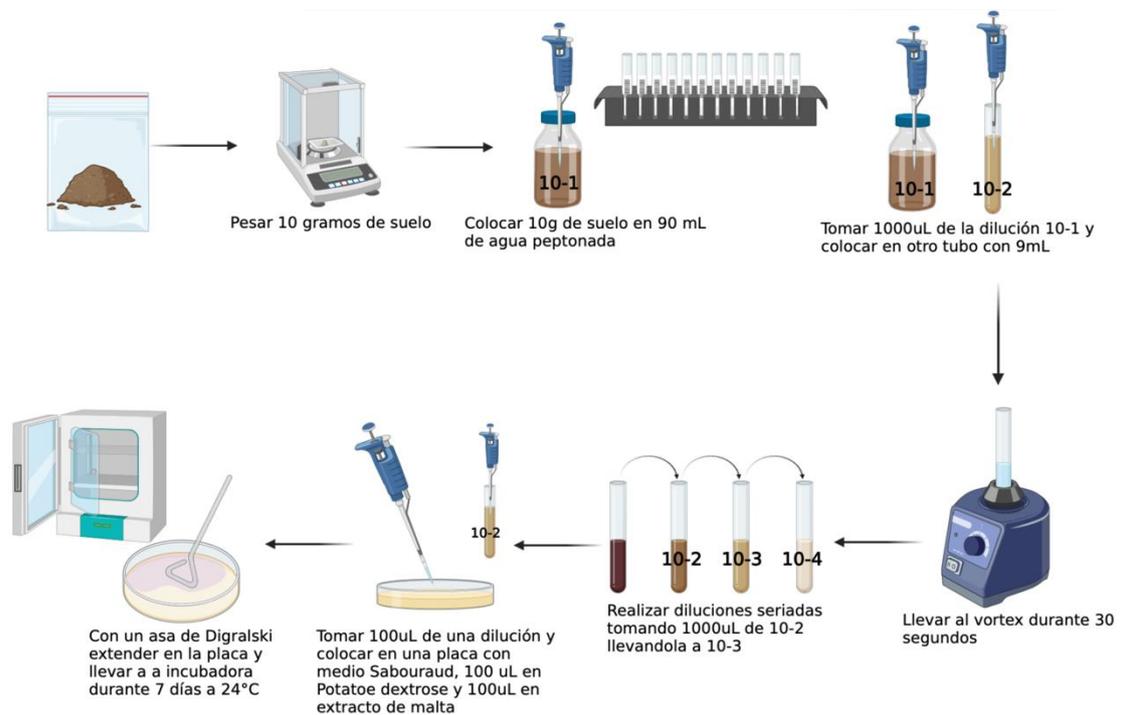
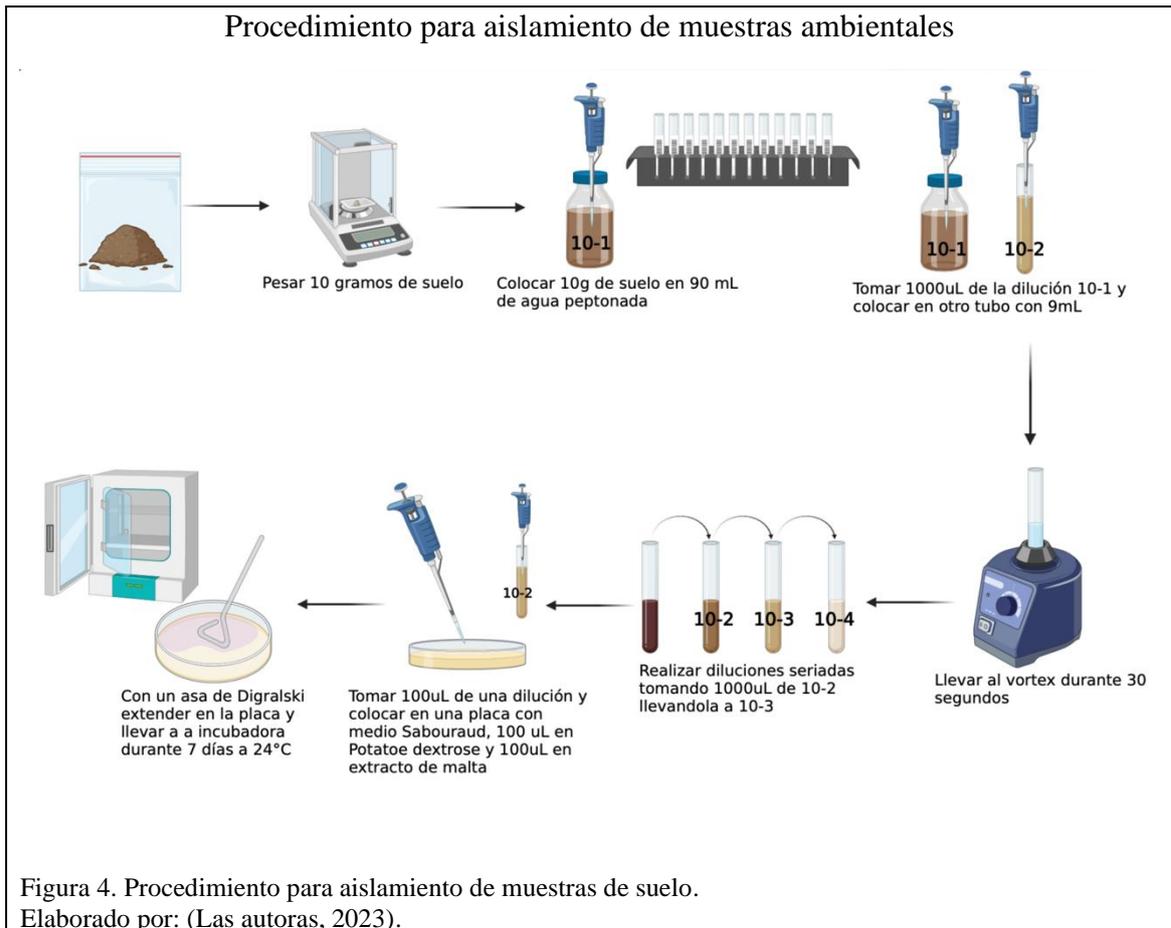
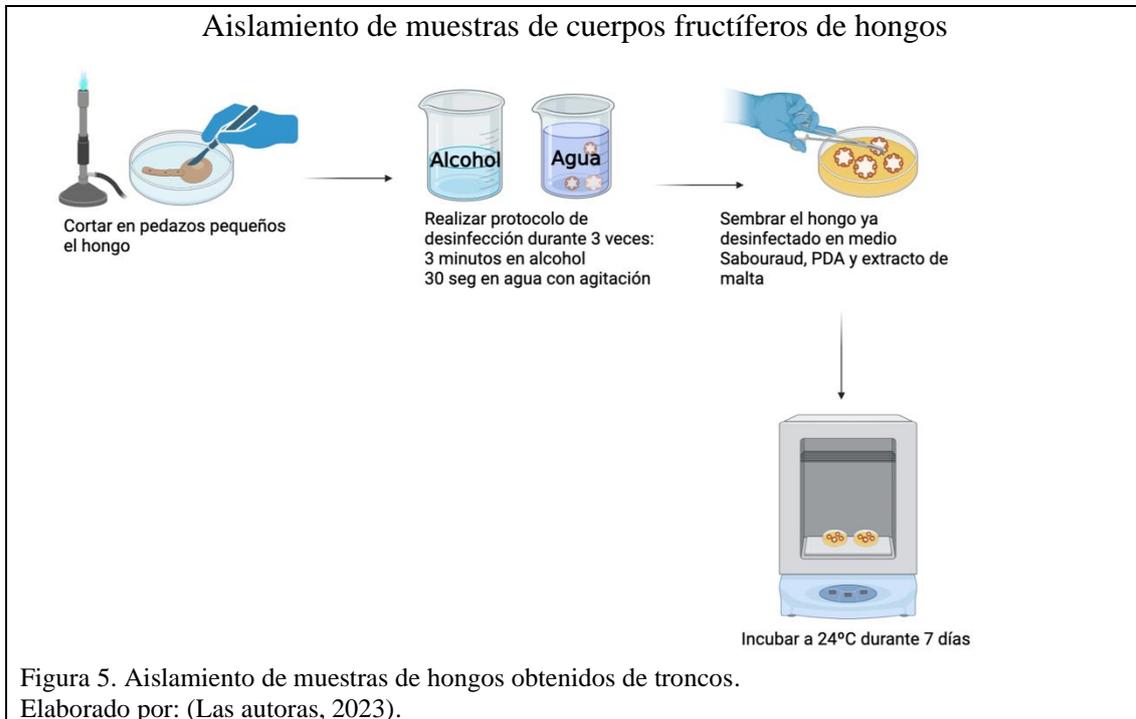


Figura 4 se detalla el procedimiento de aislamiento de hongos a partir de muestra de suelo.



Por otro lado, para el aislamiento de hongos a partir del cuerpo fructífero, estos fueron sometidas a un protocolo de desinfección, el cuál consistió en cortar en cuadros en las zonas que se logró observar micelio, luego se lavó en agua destilada estéril durante 1 minuto, se limpió con alcohol al 70% durante 30 segundos, y se volvió a enjuagar con agua destilada. Todo el protocolo se realizó dentro de cabina de flujo y los cortes en cajas Petri estériles. Después de la desinfección, con ayuda de una pinza estéril se colocó un fragmento del hongo en el centro de las diferentes cajas Petri con 25 mL de medio Sabouraud Agar + Cloranfenicol, Papa Dextrosa Agar y extracto de malta. Los hongos se incubaron a 24°C durante 7 días para después realizar resiembras y purificar el hongo (Estrada & Ramírez, 2019).

En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se detalla el procedimiento de aislamiento de hongos obtenidos de cuerpos fructíferos en troncos.



3.2.4 Aislamiento de hongos en medio con contaminante

Se utilizó el medio Czapek-Dox modificado con una concentración inicial de 5 ppm de carbamazepina, para lo cual se tomó el hongo aislado previamente con un sacabocados estéril, y se colocó en el centro de la caja Petri con contaminante, y se incubaron a 24°C durante 10 días (Ortiz, 2020).

3.2.5 Caracterización macroscópica y microscópica de hongos de interés

La caracterización macroscópica se realizó describiendo la forma, elevación, margen, superficie, pigmentación en anverso y reverso de la colonia, textura y tamaño; mientras que, para la identificación microscópica, se realizó una impronta de hongo con azul de lactofenol, para identificar las características de las hifas y formas reproductivas. Para la tinción, el hongo debe tener de 3-5 días en incubación, posteriormente se coloca en una placa portaobjetos 1 gota de azul de lactofenol, luego con un pedazo de cinta adhesiva se

tomó un poco de la parte superficial del hongo y se lo pegó en la placa evitando que queden burbujas o grumos como se observa en la Figura 6 (Padilla, 2020).

Una vez preparadas las placas se observaron al microscopio con los lentes de 10x y 40x; luego, se colocó una gota de aceite de inmersión y se observó en el lente 100x.



3.2.6 Ensayos de tolerancia al contaminante carbamazepina de los hongos aislados

Para los ensayos de tolerancia se expuso a los hongos a diferentes concentraciones de carbamazepina: 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, 30 ppm, 35 ppm, 40 ppm, 45 ppm y 50 ppm. Se tomaron los hongos con ayuda de un sacabocados y se colocaron en el centro de una caja Petri con medio Czapek-Dox modificado, inicialmente con 5 ppm de CBZ. Estos ensayos se realizaron por triplicado. Como control se sembró el mismo hongo por triplicado en medio Sabouraud sin contaminante. Los hongos se incubaron a 24°C

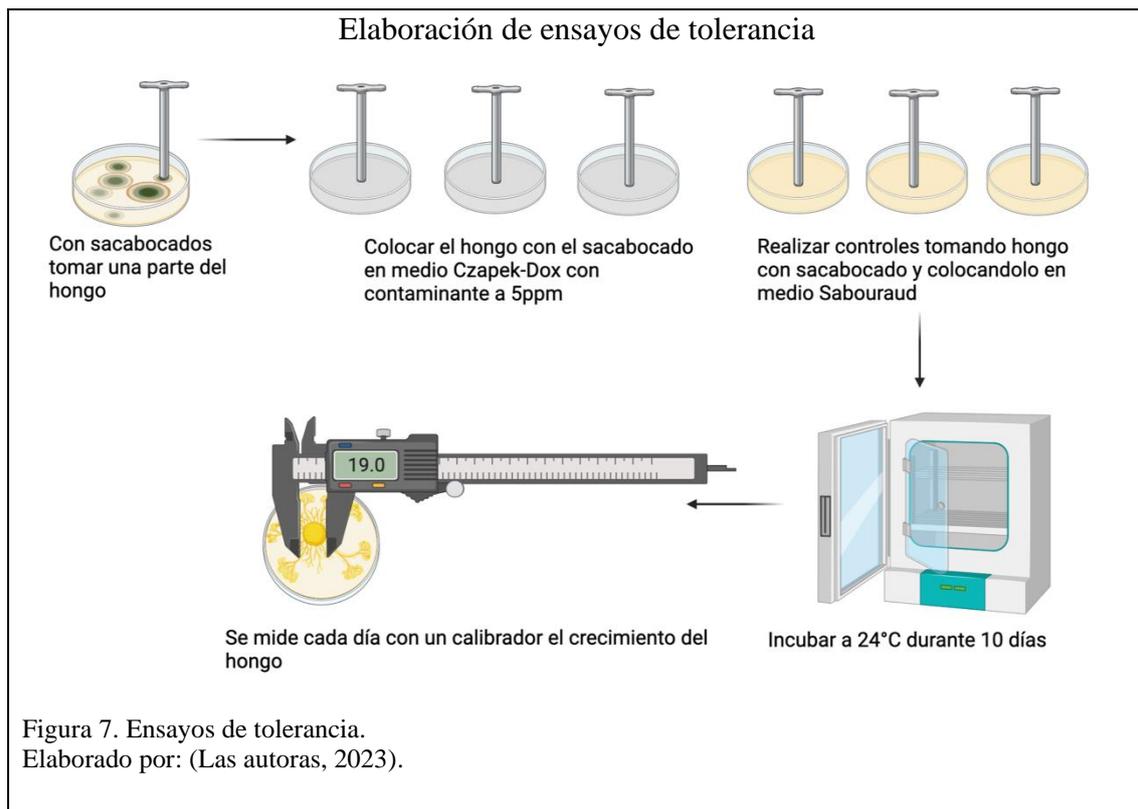
durante 10 días como se observa en la Figura 7, y se midió el diámetro de crecimiento (mm) cada día (Juárez et al., 2020).

Con los resultados obtenidos se calculó el índice de tolerancia aplicando la Ecuación 1:

$$\text{Índice de tolerancia} = \frac{\text{Promedio de las medidas de los ensayos}}{\text{Promedio de las medidas de los controles}}$$

Ecuación 1. Índice de tolerancia

Donde IT es índice de tolerancia, haciendo referencia a que un IT que va de 0,00 a 0,39 corresponde a una tolerancia muy baja, una tolerancia baja va de 0,40 a 0,59, una tolerancia moderada corresponde a un IT de 0,60 a 0,79, una tolerancia alta de 0,80 a 0,99, finalmente un $\text{IT} \geq 1$ corresponde a una tolerancia muy alta (Oladipo et al., 2018).



3.2.7 Reactivación de cepas bacterianas

La cepa para utilizar para los ensayos de confrontación se obtuvo de estudios previos realizados por Carrera & Olivo (2023). Para la reactivación de la cepa tolerante a carbamazepina se tomó con un asa esterilizada una colonia aislada de una caja que

contenía la cepa bacteriana, se inoculó mediante la técnica de estriación por cuadrantes en medio TSA y MBM con elementos traza y contaminante a una concentración de 50 ppm (es la concentración en la cual se obtuvo el índice de tolerancia más alto en estudios previos). Finalmente se llevó a incubar a 32°C durante 3 días.

3.2.8 Ensayos de sinergismo y antagonismo

De los hongos que crecieron en medio Czapek Dox modificado con contaminante, se seleccionó los de mayor crecimiento para realizar los ensayos de sinergismo y antagonismo, para lo cual se utiliza ensayos cualitativos de inhibición de crecimiento utilizando pruebas de cultivo dual en medios sólidos de agar, donde la capacidad de antagonismo de las cepas evaluadas se determina mediante el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PIRG) como se describe en la Ecuación 2:

$$PIRG = \left(\frac{R1-R2}{R1} \right) * 100 \quad \text{Ecuación 2. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial}$$

Donde R1 es el radio mayor correspondiente al crecimiento radial de los hongos sin bacterias (controles) y R2 es el radio correspondiente al crecimiento radial de hongos en el cultivo dual (hongos-bacterias). El nivel antagónico según los rangos PIRG son: nivel 0, PIRG = 0, no invasión de la superficie del hongo; nivel 1, PIRG ≤ 25%, hasta ¼ de invasión de la superficie del hongo; nivel 2, PIRG ≤ 50%, hasta ½ de invasión de la superficie del hongo, nivel 3 > 50%, más de ½ de invasión de la superficie del hongo y nivel 4, PIRG = 100%, total invasión de la superficie del hongo con esporulación (Robles et al., 2021).

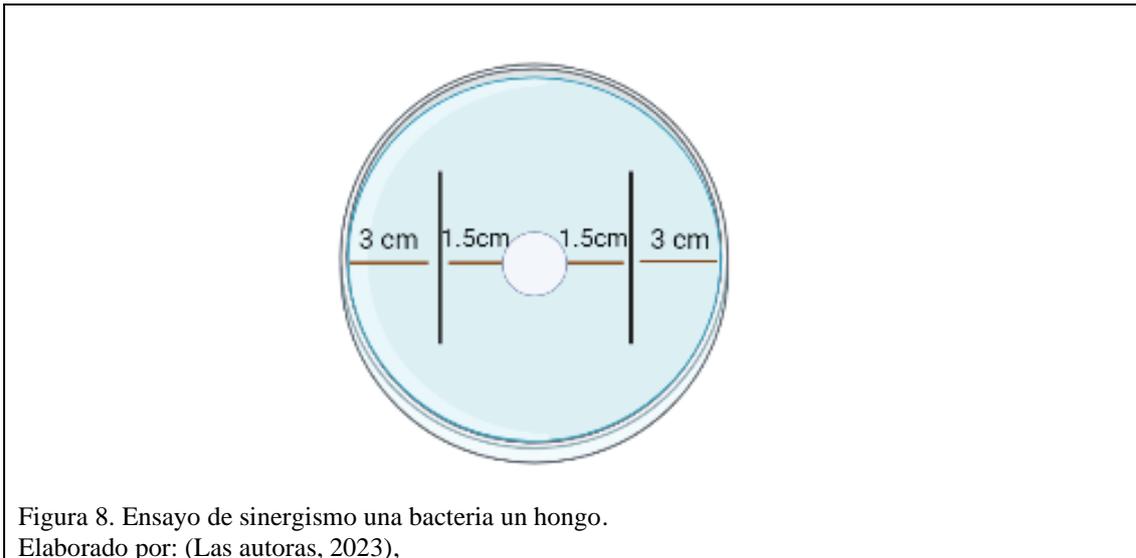
Por lo que, para la evaluación del sinergismo se cambió la interpretación de los datos, de manera que: nivel 0, PIRG = 100% inhibición total de superficie del hongo, nivel 1, PIRG > 50%, nivel 2, PIRG ≤ 50%, nivel 3, PIRG ≤ 25% y nivel 4, PIRG = 0.

3.2.9 Ensayos entre un hongo y una bacteria

Para los ensayos de sinergismo, primero se sembró el hongo en medio Sabouraud y la bacteria en medio TSA y MBM con carbamazepina. Para preparar la suspensión de la bacteria, se ajustó a una escala McFarland de 0,5, para lo que se tomó con un hisopo estéril colonias bacterianas (2 aproximadamente) y se inoculó en 9mL de caldo Tripticasa Soya (TSB), luego se tomó 1mL de esta solución y se colocó en una celda de plástico para medir la absorbancia en el espectrómetro Shimadzu UV mini-1240 a 625 nm, para lo cual se midió primero el blanco y luego la suspensión bacteriana hasta alcanzar una densidad óptica entre 0,08 y 0,1 (Matheus et al., 2016).

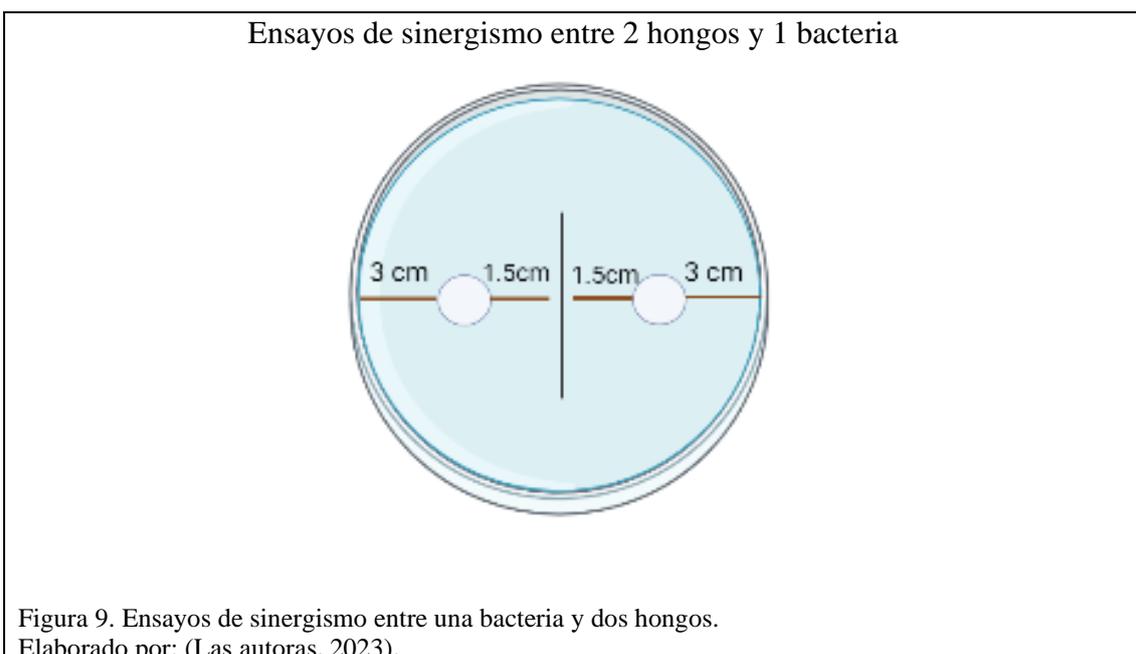
Una vez establecida la suspensión bacteriana, se vertió en una caja Petri estéril y se sumergió un portaobjetos previamente esterilizado en la caja con la suspensión, el portaobjetos se colocó de manera vertical a 3 cm del borde de la caja Petri del lado derecho y se repitió en el lado izquierdo, la caja Petri tenía el medio Czapek-Dox con 5ppm, 10 ppm, 25 ppm y 40 ppm de carbamazepina. Por otro lado, el hongo aislado previamente con 7 días de incubación, se tomó con un sacabocados estéril y se colocó en el centro considerando una medida de 1,5 cm de distancia respecto a cada bacteria como se observa en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** Se incubó a 24°C durante 10 días y se midió el halo de crecimiento del hongo (Anith et al., 2021).

Ensayo de sinergismo entre 1 hongo y 1 bacteria



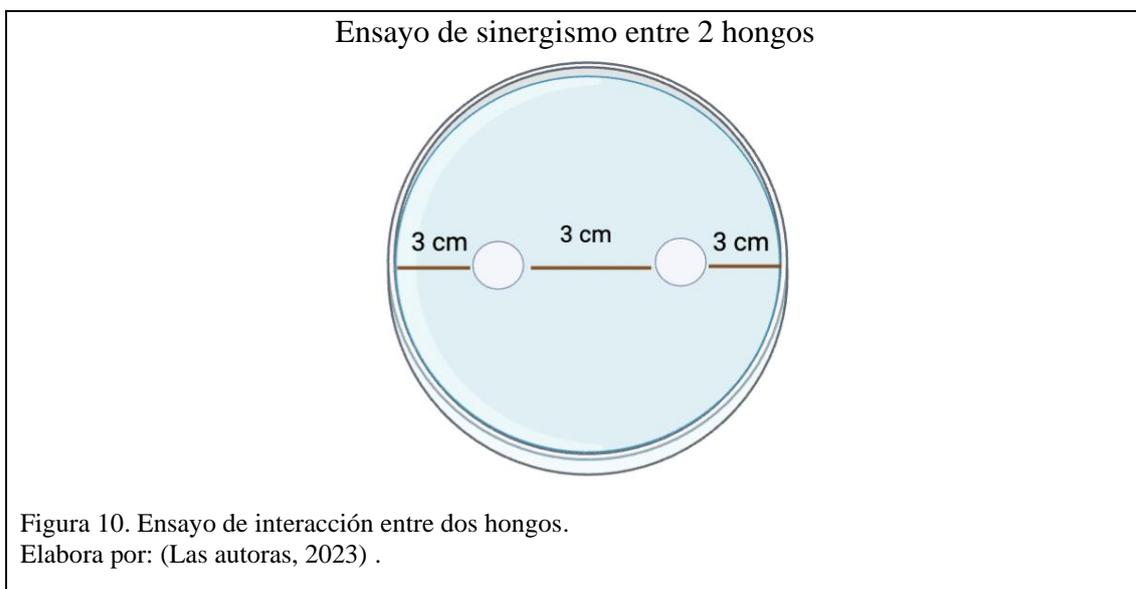
3.2.10 Ensayos entre dos hongos y una bacteria

Para este ensayo se tomaron los hongos con diferentes sacabocados estériles; y se colocó el primer hongo en medio Czapek-Dox con carbamazepina (5ppm, 10 ppm, 25 ppm y 40 ppm) a 3 cm del borde de la caja Petri del lado izquierdo y el segundo hongo a 3 cm del borde del lado derecho, luego se sumergió un portaobjetos en la solución bacteriana preparada previamente y se colocó la suspensión a 1,5 cm de distancia respecto a los hongos como se observa en la Figura 9 (González, 2020).



3.2.11 Ensayos entre dos hongos

En este ensayo, se tomó con un sacabocados estéril el primer hongo y se colocó en medio Czapek-Dox modificado con carbamazepina (5 ppm, 10ppm, 25 ppm y 40 ppm) a 3 cm del borde de la caja de lado izquierdo, luego se tomó el segundo hongo y se colocó a 3cm del borde de la caja del lado derecho, manteniendo una distancia de 3 cm entre los hongos como se observa en la Figura 10 (González, 2020).



3.3 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se calculó el área bajo la curva de crecimiento de los hongos evaluados en función del tiempo para un análisis más detallado de su crecimiento, obteniendo las unidades de área a través de las integrales de la ecuación de la recta para ser procesados en el programa estadístico Infostat 2020I, donde se aplicó un análisis estadístico de varianza con una prueba Post Hoc, posterior se llevó a cabo el análisis funcional de comparaciones ortogonales, donde se evidenció cual tiene mejor desarrollo de acuerdo a su diferencia estadística, por tanto, si el control no es igual al ensayo se infiere que hay una afectación. Y por último se realizaron pruebas t-student para muestras

independientes que compara características de la media entre dos grupos, en este caso del control frente al ensayo, donde a mayores valores de la media habrá un mejor crecimiento por lo tanto existirá un sinergismo. Tanto los ensayos como los controles se realizaron con 3 repeticiones.

Para el análisis se planteó la hipótesis nula y alternativa, donde la primera establece que los “tratamientos son iguales”, y la segunda establece que “al menos un tratamiento se diferencia de los demás” en lo que respecta al sinergismo-antagonismo de los microorganismos evaluados. Donde el porcentaje de sinergismo, diámetro de crecimiento de los diferentes microorganismos y unidades de área corresponden a las variables dependientes, mientras que la variable independiente serán los tratamientos que en este caso corresponden a los microorganismos que se emplearon en la técnica de cultivo dual.



Figura 11 Recolección de muestras. a) Recolección de cuerpos fructíferos en el tronco de un árbol frondoso de Mindo, b) y c) cuerpos fructíferos hallados en madera de la ciudad de Mera.

Elaborado por: (Las autoras, 2023).

4.2 Fase de laboratorio

4.2.1 Hongos aislados de muestras ambientales

A los hongos aislados de muestras de suelo se les asignaron códigos con la letra H (hongo) y numeraciones dependiendo del orden de su aislamiento. Ver Anexo 1.

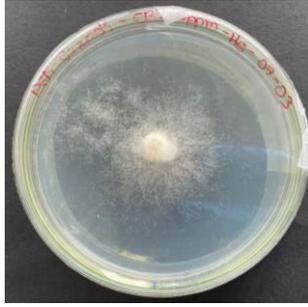
A partir de las muestras de suelo, se pudo aislar 20 hongos, y a partir de cuerpos fructíferos se aislaron 8 hongos.

4.2.2 Hongos aislados tolerantes al contaminante

De los hongos previamente aislados y expuestos al contaminante carbamazepina, se seleccionaron para esta investigación los dos hongos que presentaron un mejor crecimiento de acuerdo a lo planteado como objetivos de esta investigación. Estos hongos fueron los correspondientes a la codificación de H3 y H6.

En la Tabla 8, se puede observar las características macroscópicas del hongo H3 y el H6, ambos en medio Czapek-Dox modificado, con 5 ppm de concentración de contaminante carbamazepina, a los 7 días de cultivo.

Tabla 8. Hongos H3 y H6 en medio con CBZ.

	Anverso	Reverso
H3		
H6		

Elaborado por: (Las autoras, 2023).

4.2.3 Caracterización macroscópica y microscópica.

En la caracterización macroscópica de los dos hongos en medio Sabouraud + Cloranfenicol, se estableció que el hongo H3 presenta un color blanco en el anverso con apariencia algodonosa y homogénea, y un color crema-amarillo en el reverso. En cuanto a sus características microscópicas presenta hifas esqueléticas no ramificadas con pared delgada a ligeramente gruesa, que dan soporte al micelio del hongo. Se observa la presencia de algunas esporas libres alargadas, y otras pequeñas que se forman en las puntas de las hifas (Tabla 9).

Tabla 9. Caracterización macroscópica y microscópica del hongo H3.

Imagen anverso	Imagen reversa	Visualización microscópica con lente de 100X
----------------	----------------	--

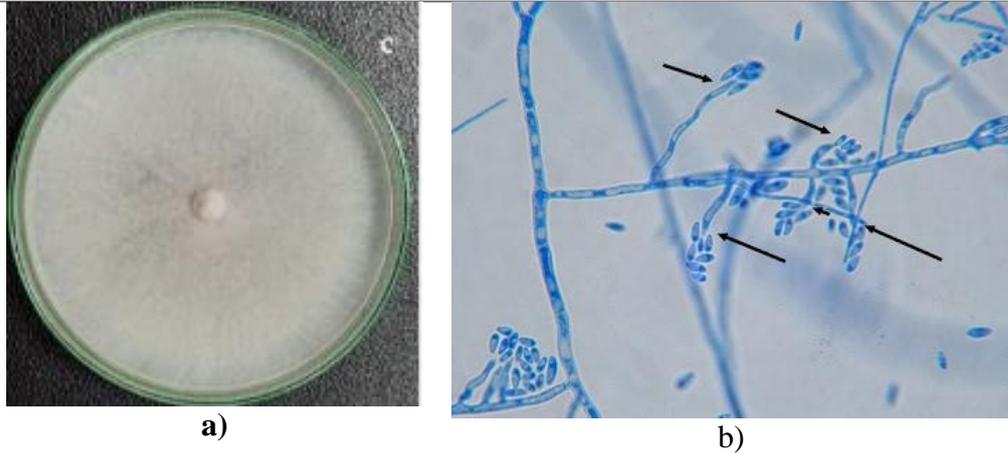


Elaborado por: (Las autoras, 2023).

Las características que presenta el hongo podrían sugerir que corresponde a alguna especie de *Fusarium* sp (*F.oxysporum*) por la visualización de características macroscópicas similares a lo observado por Rana et al., (2022) en la parte (a) de la Tabla 12. En cuanto a sus características microscópicas se pueden visualizar micro conidias, que poseen variadas formas (fusiformes, ovales, clavadas, entre otras) o forman agrupaciones (estructuras mucoides llamadas “falsas cabezas”) (Rana et al., 2022), similar a los observado en la Tabla 9 y parte (b) de la Tabla 10, donde se visualiza fiálides que producen y acumulan microconidios (JF & Summerell, 2006; Piontelli, 2011).

Tabla 10. Características macroscópicas y microscópicas de *Fusarium oxysporum* según bibliografía.

Características macroscópicas	Características microscópicas
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>



Nota: a) Visualización macroscópica. b) Las flechas indican fiálides donde se producen y acumulan microconidios en lente de 100X.

Fuente: (Rana et al., 2022).

Con respecto al hongo H6 se caracteriza por presenta una textura algodonosa, color blanco en el anverso con una ligera tonalidad rosada de fondo, con apariencia polvosa; y color naranja en el reverso. En cuanto a sus características microscópicas presentan hifas septadas, al final de las hifas se observa una apariencia nodular como se visualiza en la Tabla 11 (Toapanta et al., 2017).

Tabla 11. Características microscópicas y macroscópicas de H6.

Imagen anverso	Imagen reversa	Visualización microscópica
a)		



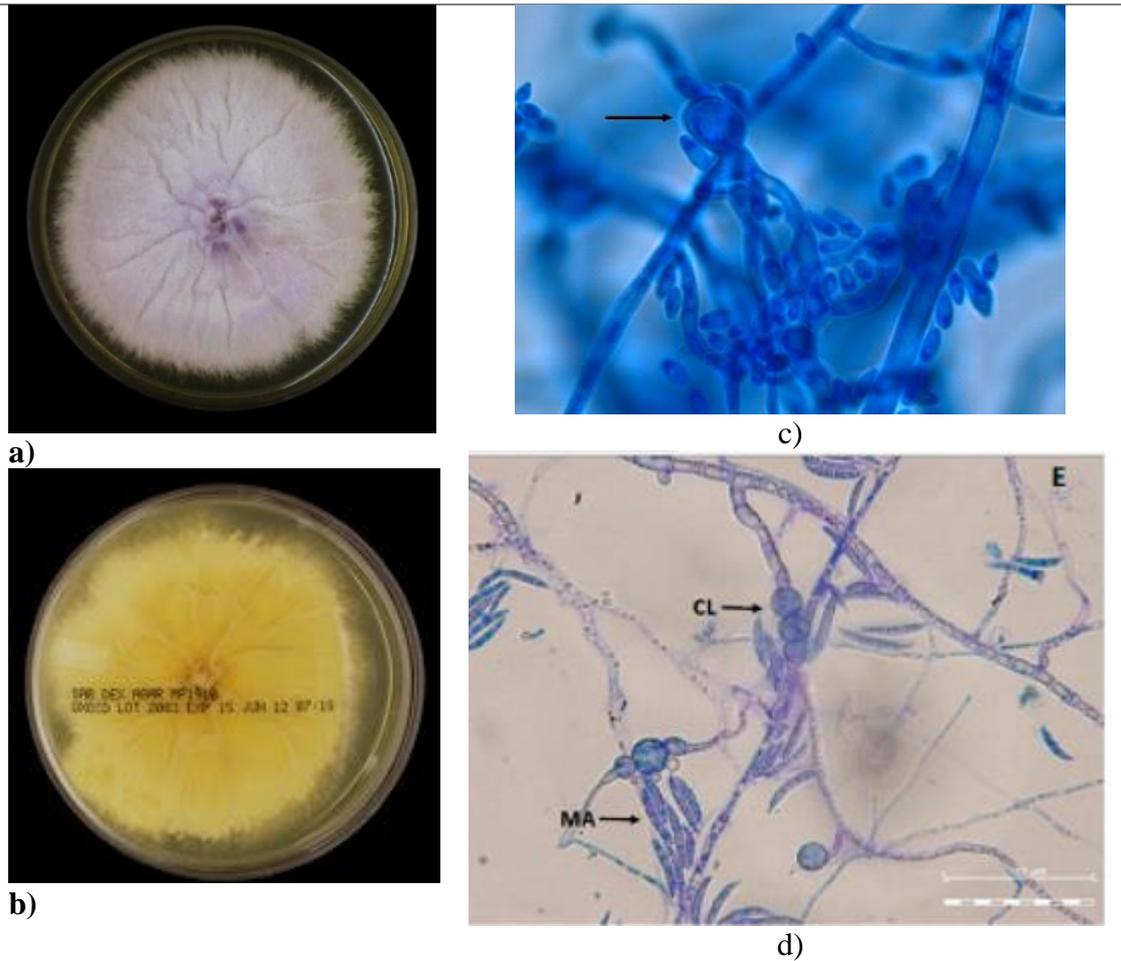
b)

Nota: a) lente de 40X b) lente de 100X.
Elaborado por: (Las autoras, 2023).

El hongo H6 macroscópicamente indica que podría corresponder al género *Fusarium* sp, al tener características similares a lo reportado por Rana et al. (2022) (Tabla 12 (a)), quien menciona que diferentes especies de *Fusarium* pueden tomar colores ligeramente rosados a fucsia con el paso del tiempo (Al-Otibi et al., 2023); y en cuanto a sus características microscópicas se pueden visualizar clamidosporas entre las hifas y al final de las hifas, similar a lo observado en la Tabla 11 y la Tabla 12 (b) según Rana et al., (2022). Las clamidosporas características tienen doble pared gruesa, lisa o rugosa; de manera aislada, en pareja o en grupo (JF & Summerell, 2006; Piontelli, 2011).

Tabla 12. Características macroscópicas y microscópicas de *Fusarium* según bibliografía.

Características macroscópicas	Características microscópicas
<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.



Nota: a) Características macroscópicas anverso, b) Características macroscópicas reverso, c y d) Clamidosporas.

Fuente: (Gordon & Ribes, 2018; JF & Summerell, 2006; Rebollar & Silva, 2020).

Es importante considerar que los resultados presentados anteriormente en la Tabla 9 y Tabla 11 corresponden a una caracterización preliminar de los hongos aislados, debido a la falta de claridad en los límites determinados por características morfológicas y criterios taxonómicos para algunos hongos (Rana et al., 2022); es por ello que, para llegar a una identificación precisa, se requiere pruebas más específicas, por lo que para próximos estudios se recomienda realizar una identificación molecular de los mismos.

En cuanto al género *Fusarium* sp., no existe información relacionada con la degradación de carbamazepina, sin embargo, se ha evidenciado su uso en degradación de diferentes contaminantes emergentes; lo que es un indicativo de su posible participación en la degradación de este contaminante. Por ejemplo, en el estudio llevado a cabo por Shi et

al., (2002) se ha observado que *Fusarium proliferatum* posee la capacidad de degradar eficientemente contaminantes como el etinilestradiol (EE₂), se demostró que logro degradar hasta un 97% de EE₂, a una concentración inicial de 25 mg/L, en un periodo de 15 días, manteniendo un pH inicial de 7.2.

Por otro lado, Hidayat & Tachibana, (2013) reportaron la capacidad de *Fusarium* sp. de degradar contaminantes, como el petróleo crudo, en un cultivo líquido salino. Durante el estudio se observó una degradación de aceite inferior en la muestra C con 56% en comparación con la muestra A, que mostro una degradación del 89%, estos resultados mejoraron significativamente con la adición de surfactantes como el Tween 80 que aumentó la degradación en un 78%, y los surfactantes Tween 40 y Mn²⁺ que aumentaron en un 67%, todo esto se llevó a cabo a una concentración inicial de 1000 mg/L durante un periodo de 60 días. Además, se evidenció la degradación del n-octadecano por parte del mismo hongo alcanzando un 89% de degradación a una concentración inicial de 125 mg/L después de 60 días.

También, Al-Otibi et al., (2023) evaluaron la capacidad de tolerancia de *Fusarium proliferatu* y *Fusarium verticillioides* a la presencia de hidrocarburos, mediante la determinación de su respuesta de inhibición (DIR) a una concentración de 10mg/L de contaminante, los resultados revelaron que *Fusarium proliferatum* mostró mayor tasa de crecimiento, alcanzando un impresionante porcentaje de degradación de aceite usado del 77,14%, en contraste, *Fusarium verticillioides* exhibió el menor porcentaje de degradación con un 42,22% al enfrentarse a aceites mixtos que contenían aceite crudo, aceite usado, diesel y queroseno.

Por otro lado, con otro tipo de contaminantes como el endosulfán, que es ampliamente reconocido como un pesticida organoclorado, Siddique et al., (2003) han demostrado que

después de 12 días este compuesto puede ser metabolizado por *Fusarium ventricosum* a endosulfan diol y éter que son compuestos de menor toxicidad, durante el ensayo se utilizó una concentración inicial de contaminante de 100 mg/L.

Akinpelu et al., (2018) muestran la capacidad de *Fusarium oxysporum* aislado de la rizosfera de *Zea mays* contaminada con pesticidas a base de cianuro libre, donde después de 5 días y con una concentración inicial de 100mg/L de contaminante, se observa una notable eficiencia de degradación del 77,6%.

Finalmente, Porri et al., (2011) destacan la capacidad de *Fusarium oxysporum* para degradar completamente un colorante azoico textil-glicoconjugado de síntesis química (4-{N,N-Bis[2-(D-galactopiranos6-iloxi)etil]-amino}azobenceno:GAD-4), en este estudio se logró una degradación del 100% después de 7 días de incubación en un medio líquido cuya concentración final fue de 150 mg/L.

4.2.4 Ensayos de tolerancia

En la Tabla 13 se visualiza el hongo H3 en los ensayos de tolerancia; en el cual se puede observar que a los 15 ppm el hongo es donde presenta mayor crecimiento con 81,11 mm a los 11 días; a diferencia de a los 40 ppm donde se observó el menor crecimiento; con un diámetro de 23,45 mm, comparando con el control donde a los 8 días ocupó toda la caja Petri. A los 45 ppm el hongo no presentó crecimiento.

Tabla 13. Ensayos de tolerancia del hongo H3.

Concentración CBZ	Medio con CBZ	Control
------------------------------	----------------------	----------------

5 ppm



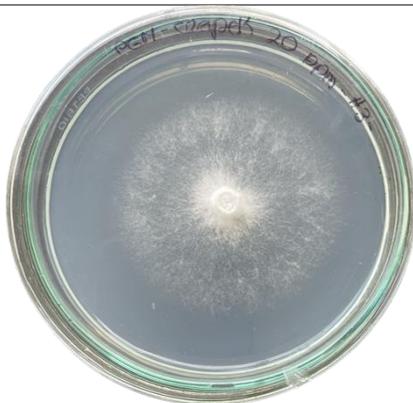
10ppm



15 ppm



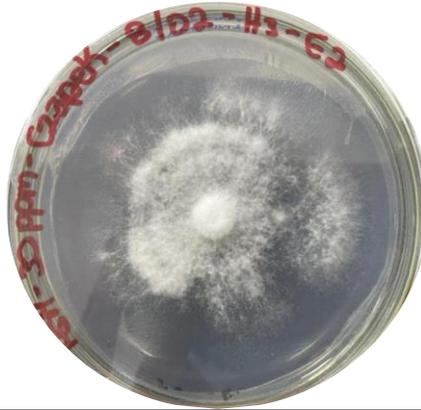
20 ppm



25 ppm



30 ppm



35 ppm



40 ppm



45 ppm No se presenta crecimiento



Elaborado por: (Las autoras, 2023).

Por otro lado, con el hongo H6, se puede observar que a los 25 ppm el hongo es donde presenta mayor crecimiento con 87,31 mm a los 11 días; a diferencia de a los 40 ppm donde se observó el menor crecimiento con un diámetro de 66,56 mm, comparando con el control donde a los 6 días ocupó toda la caja Petri como se observa en la Tabla 14. Adicionalmente, este hongo si presento crecimiento a los 45 y 50 ppm, que fue la concentración máxima evaluada.

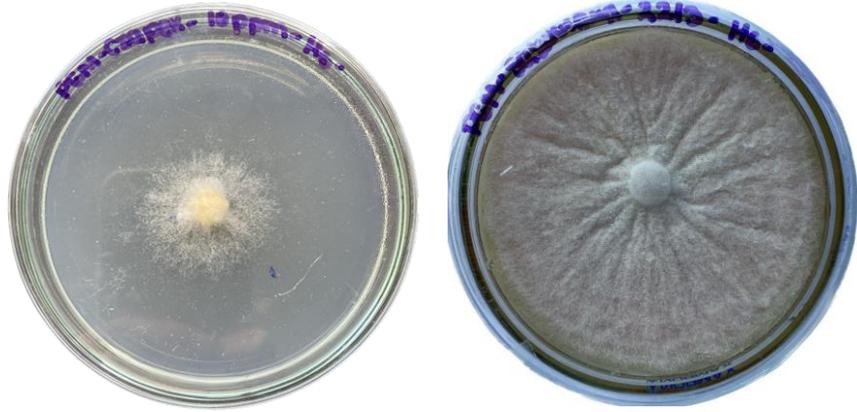
Tabla 14. Ensayos de tolerancia del hongo H6.

Concentración CBZ	Medio con CBZ	Control
------------------------------	----------------------	----------------

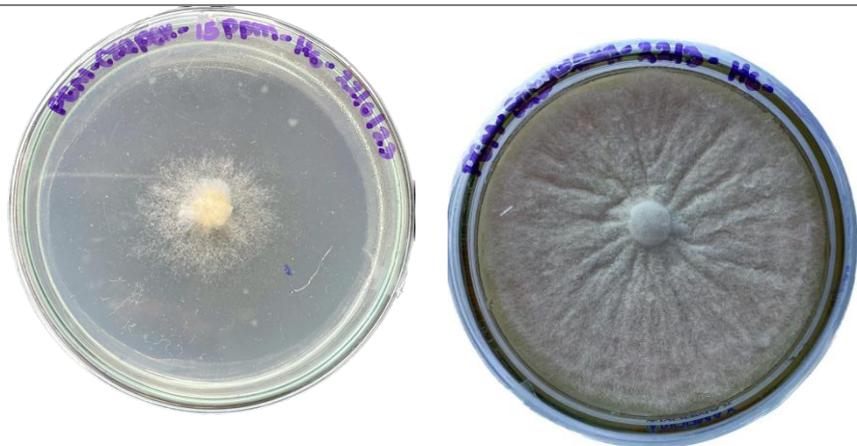
5ppm



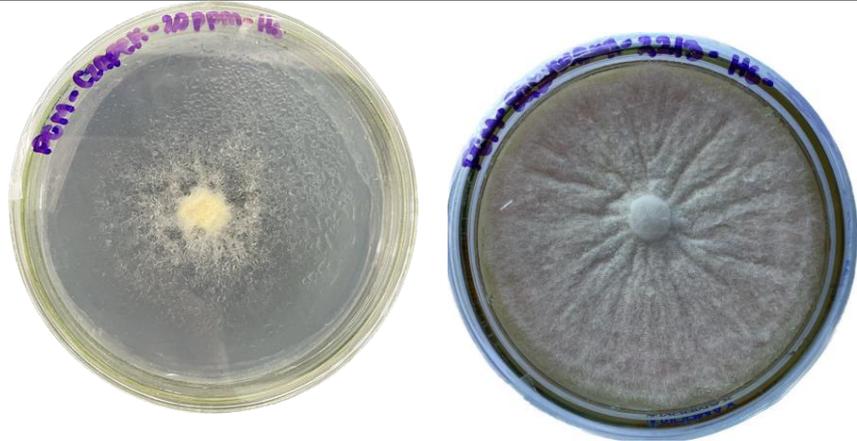
10 ppm



15 ppm



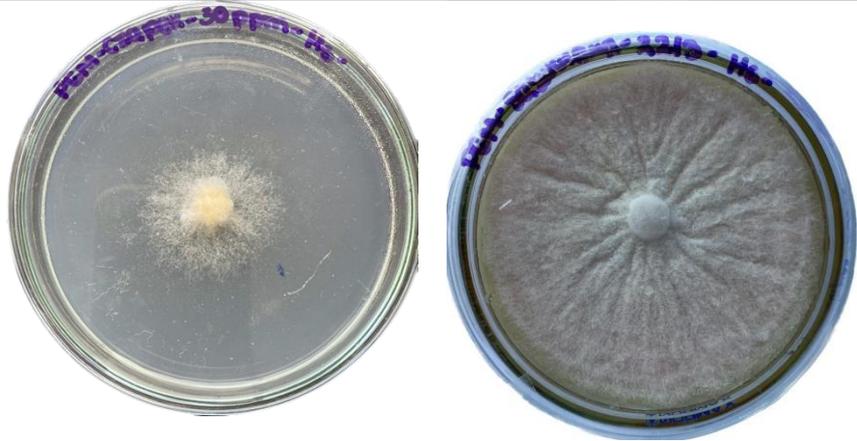
20 ppm



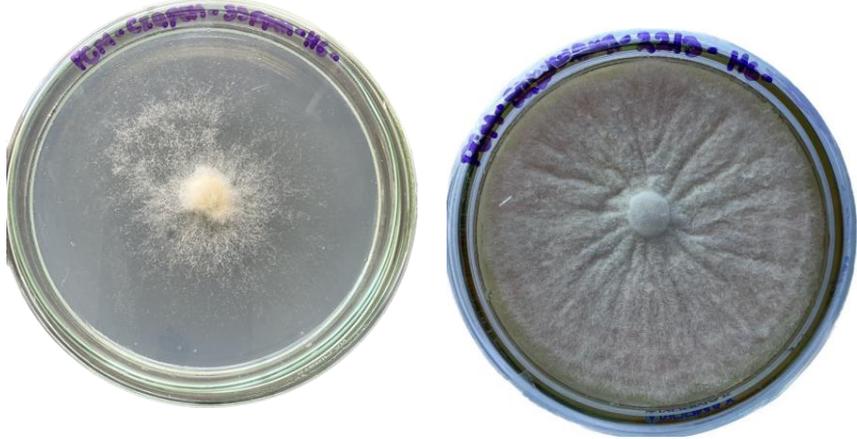
25 ppm



30 ppm



35 ppm



40 ppm



45 ppm



50 ppm



Elaborado por: (Las autoras, 2023).

En la Figura 12, se visualiza el hongo H3 (línea roja) y el hongo H6 (línea amarilla), cuyo eje de las abscisas representa las diferentes concentraciones del contaminante carbamazepina a las que se expuso el microorganismo y el eje de las ordenadas representa el índice de tolerancia final de cada microorganismo por concentración de contaminante.

Gráfica de crecimiento de ensayos de tolerancia.

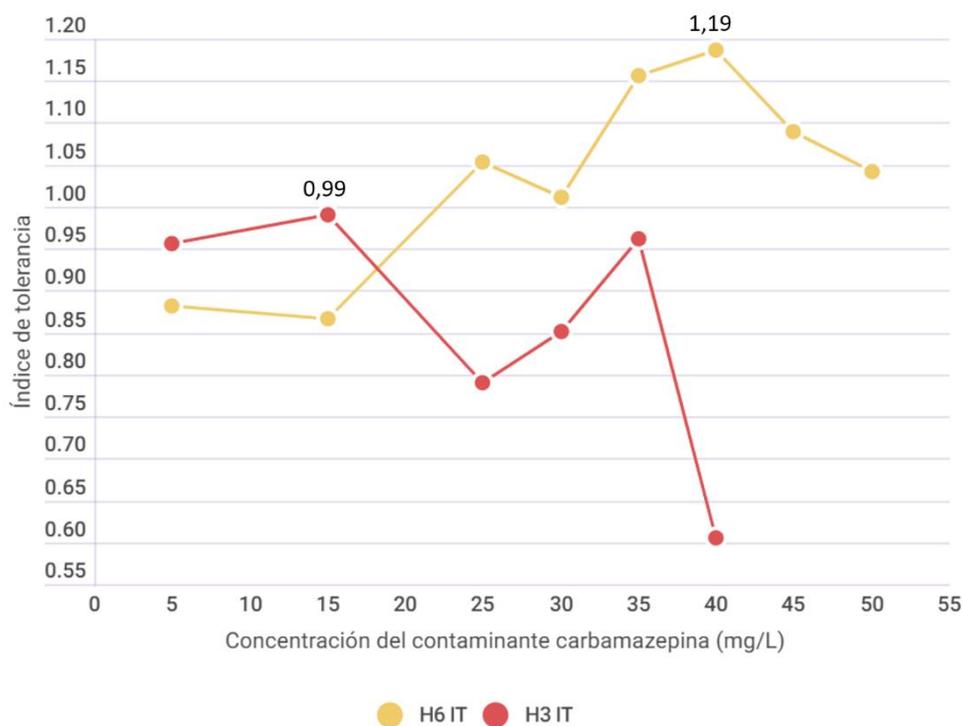


Figura 12. Ensayos de tolerancia de los hongos H6 y H3 en medio Czapek Dox modificado con contaminante. Elaborado por: (Las autoras, 2023).

En cuanto al hongo H3, a los 25ppm fue cuando presentó el menor índice de tolerancia con un valor de 0,78 mientras que a 15 ppm de concentración del contaminante carbamazepina existió el mayor índice de tolerancia 0,99. Por otro lado, el hongo H6 tuvo el menor índice de tolerancia a los 15ppm con 0,83, pero a los 40 ppm tuvo un valor de 1,19 siendo el valor más alto; considerando para la interpretación, que según Oladipo et al., (2018) los valores mayores o iguales a uno presentan una tolerancia muy alta, valores entre 0,80 y 0,99 una tolerancia alta, valores entre 0,60 y 0,79 tolerancia moderada, valores entre 0,40 y 0,59 una tolerancia baja y de 0,00 a 0,39 una tolerancia muy baja.

Se puede concluir que, en el caso del hongo H3 se visualiza que a mayor concentración de CBZ menor tolerancia, similar a los resultados obtenidos por Alharbi et al., (2019)

donde a la concentración inicial más baja de 1,25 mg/L la eficiencia de eliminación de CBZ fue menor que la obtenida a las concentraciones más altas de 5 mg/L; sin embargo, en el caso del hongo H6 se observa una alta tolerancia a la máxima concentración evaluada; esto podría deberse a diferentes factores como la concentración inicial del contaminante emergente, a la actividad enzimática, el tiempo de incubación y al tipo de hongo. Como (Kasonga et al., 2021) mencionan en su trabajo, a una concentración de 5 mg/L de carbamazepina *Aspergillus niger* y *Rhizopus microsporus* así como *Trametes polizona* mostraron un porcentaje de tolerancia superior al 70%. Por otro lado, el porcentaje de tolerancia de *Mucor circinelloides* y *Trichoderma longibrachiatum* fue inferior al 70% en la misma concentración, no obstante, a una concentración de carbamazepina de 5 mg/L *Aspergillus niger* y *Rhizopus microsporus* no experimentaron una disminución significativa en su tolerancia, logrando solo *Aspergillus niger* alcanzar una tolerancia del 70% a una concentración de 10 mg/L de carbamazepina.

Por otro lado, Castellet-Rovira et al. (2018) menciona que, si las concentraciones de los contaminantes son superiores a un valor umbral establecido, las especies fúngicas activan su metabolismo o inducen su toxicidad. Para los hongos *Trametes versicolor*, *Ganoderma lucidum*, *Irpex lacteus*, *Stropharia rugosoannulata*, *Gymnopilus luteofolius* and *Agrocybe erebia* se presenta un buen crecimiento de biomasa al exponerse a contaminantes, detectando las enzimas lacasa y MnP (Manganeso peroxidasa) como indicadores de actividad metabólica.

A modo de información complementaria, cabe destacar que en los últimos años, se ha trabajado con hongos de podredumbre blanca para la degradación de contaminantes emergentes como la carbamazepina, por lo que para próximos estudios se puede incluir este tipo de hongos en los estudios de tolerancia; según lo mencionado por Rodríguez et al., (2010), el hongo *Trametes versicolor* y otros hongos de podredumbre blanca, han

presentado resultados prometedores en la degradación de la carbamazepina, un compuesto altamente persistente, logrando una degradación de hasta el 50%, debido a la complejidad de sus sistemas enzimáticos, capaces de actuar sobre diversos sustratos a través del ataque de sus enzimas extracelulares como la lacasa, lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa, versátil peroxidasa y enzimas intracelulares del sistema citocromo P450.

4.2.5 Ensayos de sinergismo-antagonismo

Para llevar a cabo los ensayos de sinergismo-antagonismo se evaluaron 3 concentraciones, una concentración inicial de 10 ppm, después 25 ppm y luego de 40 ppm que es la concentración máxima que toleró el hongo H3 en los ensayos previos. Cabe mencionar que en el caso de la bacteria *Enterobacter quasihormaechei* en el estudio de Carrera y Olivo, (2023) se alcanzó un índice de tolerancia de 1,22 a 45 ppm.

Esta técnica se utilizó como un ensayo inicial para identificar probables interacciones simbióticas de diferentes aislados (Anith et al., 2021).

4.2.5.1 Ensayo a 10 ppm

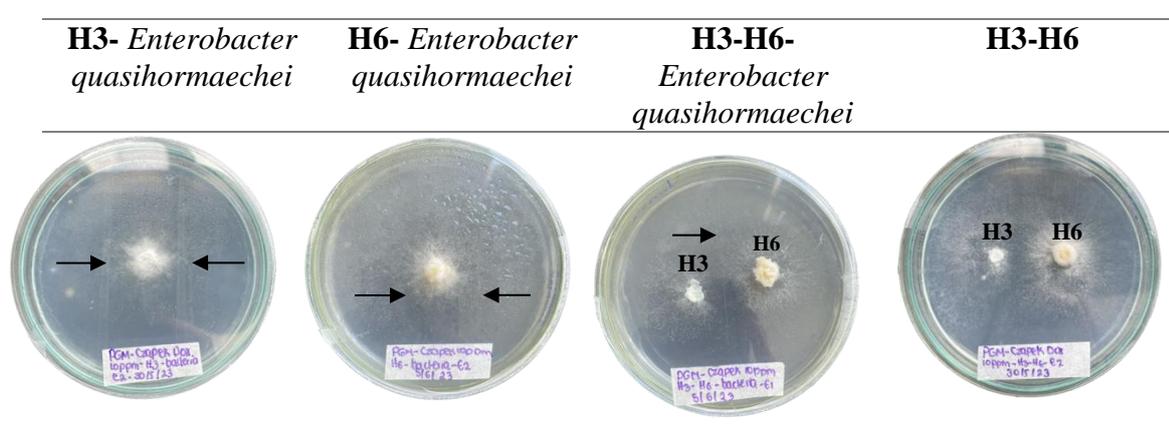
En la Tabla 15 se visualiza el resultado de los ensayos de sinergismo-antagonismo realizados en diferentes combinaciones entre el hongo H6, H3 y la bacteria *Enterobacter quasihormaechei*; obteniendo para H3-bacteria un sinergismo del 75% y para H6-bacteria un sinergismo del 100%. En estos ensayos el hongo H6 alcanzó un diámetro de crecimiento de $88,09 \pm 1,0$ mm a los 10 días, mientras que el hongo H3 alcanzó un diámetro de $61,1 \pm 5,5$ mm en el mismo tiempo, sin observarse un halo de inhibición. Este sinergismo mayor entre el hongo H6 y la bacteria se respalda con los resultados de los siguientes dos ensayos, dado que en el caso del ensayo entre los dos hongos y la bacteria; se obtuvo un sinergismo del 100%, donde en el caso del hongo H6 alcanzó un

diámetro mayor de crecimiento de $75,40 \pm 5,7$ mm a los 10 días, comparando con el hongo H3 ($50,12 \pm 1,11$ mm) a los diez días. Por último, en el ensayo entre los dos hongos H3-H6 sin la bacteria se observó un sinergismo menor del 50%, en el caso de H3 alcanzó un diámetro de crecimiento de $39,29 \text{ mm} \pm 6,40$ a los 10 días, y H6 alcanzó un diámetro de crecimiento mayor de $70,29 \text{ mm} \pm 10,30$ de a los 10 días; lo que sería un indicativo que la bacteria *Enterobacter quasihormaechei* influye de manera positiva en el crecimiento del hongo H6.

Es importante mencionar, que al existir sinergismo entre las especies bacterias y fúngicas las comunidades microbianas mixtas exhiben asociaciones e interacciones únicas que podrían resultar en sistemas más eficientes para la degradación y eliminación de contaminantes. Varios estudios previos han informado mayor biodegradación de ciertos contaminantes cuando se utilizan tratamientos combinados de hongos y bacterias en comparación con cultivos puros. Estos pueden desarrollar relaciones sinérgicas mediante la combinación de enzimas fúngicas y bacterianas, por un lado, las bacterias producen muchas enzimas oxidorreductoras intra y extracelulares como las azoreductasas, lacasas y diclorofenolindofenol-reductosa para la degradación de contaminantes orgánicos, por otro lado, muchos hongos poseen enzimas extracelulares, no específicas y no estereoselectivas como la lignina peroxidasa, lacasa y manganeso peroxidasa que pueden degradar; obteniendo así estabilidad, capacidad de sobrevivir al estrés y especialización para realizar diferentes tareas en una comunidad microbiana como es la dispersión de bacterias degradantes por hifas de hongos (Espinosa-Ortiz et al., 2022).

Por otro lado, al realizar el análisis de cuadrados ortogonales con los resultados obtenidos a los 10 ppm no se observa una diferencia estadísticamente significativa entre los controles y los ensayos en el caso de los ensayos: H3 - bacteria, H6 - bacteria y hongos H3 - H6; sin embargo, en el ensayo de H3 - H6 - bacteria hay diferencia significativa entre los contrastes y sus testigos, con un valor de p de 0,0006, donde el hongo que presenta mayor crecimiento en este consorcio es H6.

Tabla 15. Ensayos de sinergismo-antagonismo a 10 ppm.



Nota: La flecha indica donde se encuentra la bacteria.
Elaborado por: (Las autoras, 2023).

4.2.5.2 Ensayo a 25 ppm

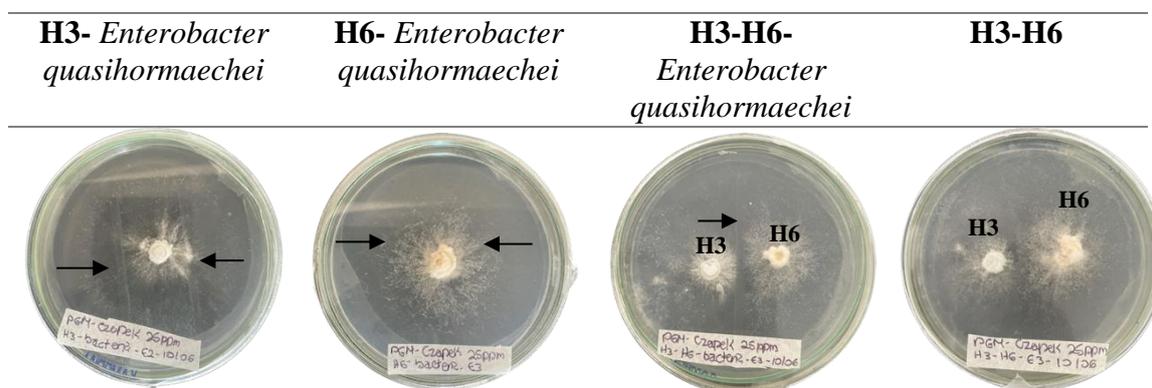
En la Tabla 16 se visualiza el resultado de los ensayos de sinergismo-antagonismo realizados en diferentes combinaciones entre el hongo H6, H3 y la bacteria *Enterobacter quasihormaechei* a 25ppm; en la que se establece que el hongo H3 y la bacteria tuvieron un sinergismo del 75%, mientras que para H6-bacteria el sinergismo fue del 100%, en el que el hongo H6 alcanzó un diámetro de crecimiento de $84,97 \pm 0,68$ mm a los 10 días, mientras que el hongo H3 alcanzó un diámetro de $58,64 \pm 21,85$ mm a los diez días, sin observarse un halo de inhibición, similar a los resultados reportados a 10 ppm.

Por otro lado, al evaluar el resultado del ensayo de sinergismo-antagonismo entre el H6, H3 y *Enterobacter quasihormaechei*; se obtuvo un sinergismo del 100%. En el caso del

H6 alcanzó un diámetro de crecimiento de $69,34 \pm 2,76$ mm a los 10 días, mientras que el H3 alcanzó un diámetro de $68,25 \pm 7,13$ mm a los diez días. Y en el caso del ensayo de sinergismo-antagonismo entre H6 y H3, se observó un sinergismo del 75%, donde H6 presentó un diámetro de $68,96$ mm \pm 3,98 a los 10 días, mientras que H3 alcanzó un diámetro de $55,68$ mm \pm 16,60 a los diez días; pudiéndose observar que el hongo H6 se desarrolló mejor a esta concentración que a los 10 ppm, que significa que tiene una mejor adaptación al aumento de la concentración del contaminante, lo que se evidenció y explicó previamente en los ensayos de tolerancia.

Al realizar el análisis de cuadrados ortogonales con los resultados obtenidos a los 25 ppm, estadísticamente no se evidencia que existan diferencias significativas entre los contrastes y sus testigos, en todos los ensayos, con valores de $p > 0.05$.

Tabla 16. Ensayos de sinergismo-antagonismo a 25ppm.



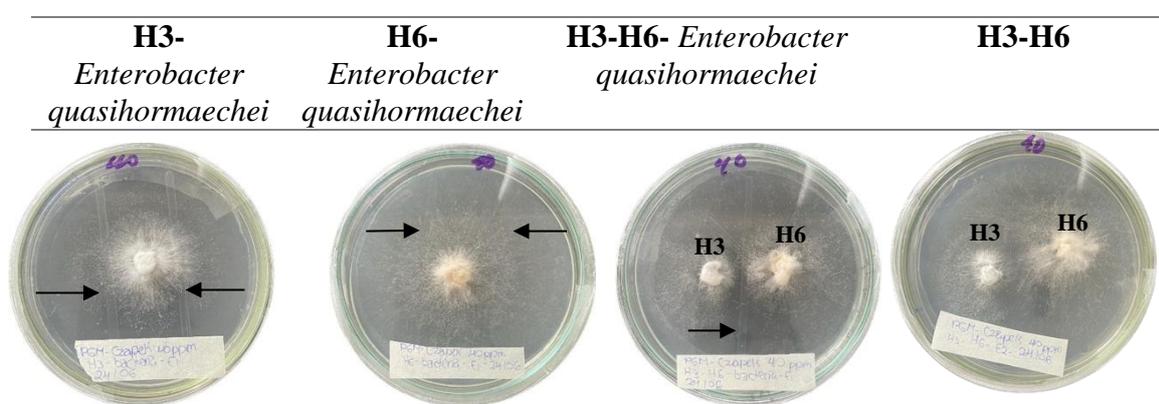
Nota: La flecha indica donde se encuentra la bacteria.
Elaborado por: (Las autoras, 2023).

4.2.5.3 Ensayo a 40 ppm

En la Tabla 17, se visualiza el resultado de los ensayos de sinergismo-antagonismo realizados en diferentes combinaciones entre el hongo H6, H3 y la bacteria *Enterobacter quasihormaechei*; en los cuales en todos los casos se presentó un sinergismo del 100%.

Respecto al análisis de cuadrados ortogonales, se pudo determinar que existen diferencias estadísticamente significativas al tener p-valor < 0,05 en todos los ensayos, presentando los siguientes resultados: $p = 0,029$ para el ensayo de H3 - bacteria, $p = 0,0419$ para el ensayo H6 - bacteria, y $p = 0,0001$ para H3 - H6-bacteria y H3 - H6. Adicionalmente se determinó que tanto en el ensayo H6 - bacteria, H3 - H6 - bacteria, y H3 - H6; el hongo H6 fue el que presentó mayor crecimiento.

Tabla 17. Ensayos de sinergismo-antagonismo a 40ppm.



Nota: Las flechas indican donde se encuentra la bacteria.
Elaborado por: (Las autoras, 2023).

Para poder determinar en cuál de los ensayos se observó mayor crecimiento de los hongos evaluados, en la Tabla 18 se compara la media de crecimiento de los hongos, donde la media de crecimiento del hongo H6 fue mayor que el hongo H3 en todos los ensayos, observándose un mejor crecimiento a los 25 ppm. Con lo que se puede concluir que existe mejor asociación para formar consorcios entre el hongo H6 y la bacteria *Enterobacter quasihormaechei*.

Tabla 18. Comparación crecimiento hongos con bacteria *Enterobacter quasihormaechei*.

Concentración de CBZ (ppm)	H3- <i>Enterobacter quasihormaechei</i>	H6- <i>Enterobacter quasihormaechei</i>	H3-H6- <i>Enterobacter quasihormaechei</i>		H3-H6	
			<i>H3</i>	<i>H6</i>	<i>H3</i>	<i>H6</i>
10ppm	36,14	55,01	28,59	48,55	26,54	42,78

Medias de crecimiento (mm)	25ppm	40,98	59,89	41,22	47,84	33,39	45,62
	40ppm	37,65	52,06	27,45	44,09	27,92	44,71

Elaborado por: (Las autoras, 2023).

También se puede observar que cuando se realizó el ensayo de los dos hongos con la bacteria. Se obtienen medianas de crecimiento inferiores a los obtenidos con los ensayos entre un hongo y una bacteria, esto se puede deber a que al sembrar dos hongos en una misma caja reducen el espacio de crecimiento de los mismos, sin embargo, no se registró antagonismo.

Por último considerando que los hongos caracterizados correspondan al género *Fusarium*, Bulkan et al. (2020) menciona que *Fusarium oxysporum* puede degradar contaminantes por completo, por lo que se han investigado las mezclas de hongos o consorcios de hongos con bacterias las cuales posean la capacidad de eliminación más amplia de microcontaminantes, siendo importante mencionar que la eficiencia se relaciona dependientemente con las similitudes de las condiciones de crecimiento entre microorganismos. El mecanismo de acción de los hongos filamentosos que contribuye a la degradación de contaminantes se basa en las reacciones Fenton con o sin enzimas modificadoras de lignina extracelular (LME), siendo este mecanismo de reacción particularmente eficaz debido a su alto potencial de oxidación de radicales de hidroxilo e inespecificidad (Bulkan et al., 2020).

Respecto al sinergismo entre especies Badia-Fabregat et al. (2017) menciona que *Fusarium oxysporum* en su estudio fue un hongo predominante en presencia de *Rhodotorula* sp., además en los biorreactores donde se realizaron los ensayos se encontraban comunidades de *Enterobacterias* sp, es decir que el hongo y la bacteria crecieron en el mismo medio, y no presentaron inhibición.

Fusarium ha sido aislado en diversos estudios debido a que este género ha desempeñado un papel importante en procesos de degradación, por ejemplo en el estudio presentado por Lladó et al., (2013) destaca que *Fusarium* y *Sphingomonas* sp se han destacado como principales cepas degradadoras en un consorcio microbiano, es de destacar que *Fusarium* puede mantener interacciones estables con otras bacterias degradadoras, debido a que los micelios fúngicos pueden promover la translocación microbiana en los ambientes no saturados de agua mejorando así la accesibilidad y biodisponibilidad de los contaminantes e incluso asegurando una relación sinérgica entre especies.

Por último, en cuanto a la bacteria evaluada en este estudio, se ha visto su asociación en consorcios con hongos, es así en el estudio de Jayanthi & Sivagnanam (2014) destacan el uso de consorcios formados por *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter cloacae* y especies fúngicas como *Aspergillus tamaris* y *Botryosphaeria laricina*, en los que se realizaron ensayos con concentraciones significativas de contaminante (1000 mg/L) en un medio acuoso bajo condiciones aeróbicas, donde después de un periodo de incubación de 4 días, se observó una eficiente remoción del 50% del contaminante.

5 Conclusiones

- Se detectaron 2 hongos filamentosos (H3 y H6) con capacidad de tolerar el contaminante emergente carbamazepina, utilizándolo como su fuente de carbono y crecimiento.
- Se determinó que la concentración a la cual el hongo H3 presenta el mayor índice de tolerancia (0,99) es a 15 ppm, mientras que el hongo H6 tiene un índice de tolerancia de 1,19, a 40 ppm.
- El mejor consorcio evaluado a 10, 25 y 40 ppm fue el que se encontraba conformado por el hongo H6 y *Enterobacter quasihormaechei*, con un sinergismo del 100 %.
- La mejor concentración de carbamazepina para la formación de un consorcio entre los hongos H3, H6 y *Enterobacter quasihormaechei* fue a los 40 ppm.
- El hongo H6 es el que presentó mejor adaptación bajo las condiciones evaluadas presentando mayor crecimiento en los ensayos y en los controles.

6 Recomendaciones

- Realizar análisis moleculares para identificar los microorganismos aislados en este estudio, para poder indagar su metabolismo y mecanismo de sinergismo que se puede producir con otros microorganismos.
- Evaluar más bacterias y hongos para la evaluación de la formulación de consorcios de utilidad en ensayos de degradación de contaminantes.
- Realizar ensayos de degradación, para evaluar si el mejor crecimiento reportado del hongo H6, también se relaciona con una mayor degradación del contaminante.

7 Bibliografía

Acosta, K. (2010). *Biodegradación de contaminantes emergentes en columnas empacadas con suelos del Valle de Tula*. 133.

Akinpelu, E. A., Adetunji, A. T., Ntwampe, S. K. O., Nchu, F., & Mekuto, L. (2018). Performance of fusarium oxysporum EKT01/02 isolate in cyanide biodegradation system. *Environmental Engineering Research*, 23(2), 223–227. <https://doi.org/10.4491/eer.2017.154>

Alharbi, S., Nghiem, L., Van De Merwe, J., Leusch, F., & Asif, M. B. (2019). *Degradation of diclofenac, trimethoprim, carbamazepine, and sulfamethoxazole by laccase from Trametes versicolor: Transformation products and toxicity of treated effluent products and toxicity of treated effluent*. <https://ro.uow.edu.au/eispapers1>

Al-Otibi, F., Al-Zahrani, R. M., & Marraiki, N. (2023). Biodegradation of Selected Hydrocarbons by Fusarium Species Isolated from Contaminated Soil Samples in Riyadh, Saudi Arabia. *Journal of Fungi*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/jof9020216>

Anith, K. N., Nysanth, N. S., & Natarajan, C. (2021). Novel and rapid agar plate methods for *in vitro* assessment of bacterial biocontrol isolates' antagonism against multiple fungal phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 73(2), 229–236. <https://doi.org/10.1111/lam.13495>

Badia-Fabregat, M., Lucas, D., Tuomivirta, T., Fritze, H., Pennanen, T., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., Caminal, G., & Vicent, T. (2017). Study of the effect of the bacterial and fungal communities present in real wastewater effluents on the performance of fungal treatments. *Science of the Total Environment*, 579, 366–377. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.088>

Barrientos, E., & Gutiérrez De Los Santos, I. (2020). *EQUIVALENCIA FARMACÉUTICA DE MEDICAMENTOS MULTIFUENTES DE CARBAMAZEPINA DISPONIBLES EN CERCADO DE LIMA*.

Bessa, V., Moreira, I., Murgolo, S., Mascolo, G., & Castro, P. (2019). Carbamazepine is degraded by the bacterial strain *Labrys portucalensis* F11. *Science of the Total Environment*, 690, 739–747. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.461>

Bessa, V., Moreira, I., Tiritan, M., & Castro, P. (2017). Enrichment of bacterial strains for the biodegradation of diclofenac and carbamazepine from activated sludge. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 120, 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.02.008>

Buchicchio, A., Bianco, G., Sofo, A., Masi, S., & Caniani, D. (2016). Biodegradation of carbamazepine and clarithromycin by *Trichoderma harzianum* and *Pleurotus ostreatus* investigated by liquid chromatography - high-resolution tandem mass spectrometry (FTICR MS-IRMPD). *Science of the Total Environment*, 557–558, 733–739. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.119>

Bulkan, G., Ferreira, J. A., & Taherzadeh, M. J. (2020). Removal of organic micro-pollutants using filamentous fungi. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 363–395). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819594-9.00015-2>

Calvo, J., Rivera, G., Orozco, S., & Orozco, R. (2012). Aislamiento y evaluación *IN VITRO* DE ANTAGONISTAS DE *Botrytis cinerea* EN MORA. *Agronomía Mesoamericana*, 23(2), 225–231.

Carrera, S., & Olivo, L. (2023). *Identificación molecular de bacterias Gram negativas aisladas de aguas contaminadas del río Machángara, tolerantes a los contaminantes emergentes Carbamazepina (CBZ) y Estrona (E1)*.

Casado, C. (2010). Degradación de naproxeno y carbamazepina por tratamientos microbiológicos. *Urjc*, 51.

http://www.ccom.urjc.es/informacion/estatutos/archivos/estatutos_urjc.pdf

Castellet-Rovira, F., Lucas, D., Villagrasa, M., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., & Sarrà, M. (2018). *Stropharia rugosoannulata* and *Gymnopilus luteofolius*: Promising fungal species for pharmaceutical biodegradation in contaminated water. *Journal of Environmental Management*, 207, 396–404.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.07.052>

Castillo, J. (2021). *Aislamiento e identificación de dos hongos entomopatógenos y evaluación de antagonismo en la plaga *Frankiniella occidentalis* en cultivos de *Rosa* spp de una florícola*.

Chopra, S., & Kumar, D. (2020). Characterization, optimization and kinetic study of diclofenac degradation by novel bacterial strains and their synthetic consortia. *Bioremediation Journal*, 24(2–3), 150–170.
<https://doi.org/10.1080/10889868.2020.1793723>

Curvelo, L., & Rojas, J. (2010). *REVISION PRELIMINAR DE MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS EN ESTUDIOS DE MICROORGANISMOS DE LOS PHYLUMS ASCOMYCETES, DEUTEROMYCETES Y OOMYCETES COMO AGENTES CAUSANTES DE ENFERMEDADES EN PLANTAS*. 21–26.

EPA, U. S. E. P. A. (2014). *Emerging Contaminants-Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) and Perfluorooctanoic Acid (PFOA) At a Glance*.

Escobar, A. (2019). Contaminantes emergentes: origen y destino. *Máster Universitario En Hidrología y Gestión de Recursos Hídricos*, 50.

Espinosa-Ortiz, E. J., Rene, E. R., & Gerlach, R. (2022). Potential use of fungal-bacterial co-cultures for the removal of organic pollutants. In *Critical Reviews in Biotechnology* (Vol. 42, Issue 3, pp. 361–383). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1940831>

Estrada, G., & Ramírez, M. (2019). *Micología general*.

Ferrari, B., Paxéus, N., Giudice, R. Lo, Pollio, A., & Garric, J. (2003). Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: Study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55(3), 359–370. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00082-9](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00082-9)

Gauthier, H. (2008). *Biodegradation of pharmaceuticals by microorganisms*. December.

González, I. (2020). *Evaluación de las estrategias de antagonismo de una cepa silvestre de Trichoderma atroviride*.

Gordon, L., & Ribes, J. (2018). *Color atlas of mycology* (College of American Pathologist, Ed.).

Hidayat, A., & Tachibana, S. (2013). Crude Oil and n-Octadecane Degradation under Saline Conditions by *Fusarium* sp., F092. *Journal of Environmental Science and Technology*. <https://doi.org/10.3923/jest.2013.29.40>

Instituto Ecuatoriano de Normalización, I. (2014). *Calidad del suelo. Muestreo*.

Jaimés, J., & Vera, J. (2020). Los contaminantes emergentes de las aguas residuales de la industria farmacéutica y su tratamiento por medio de la ozonización. *Informador Técnico*, 84(2). <https://doi.org/10.23850/22565035.2305>

Jayanthi, A., & Sivagnanam, S. (2014). Biomineralization and formulation of endosulfan degrading bacterial and fungal consortiums. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 116, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.09.006>

JF, L., & Summerell, B. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell .

Juárez, L., Martínez, G., Reyes, J., Aguilar, F., Sandoval, L., & Balderas, J. (2020). *Evaluación del crecimiento de trichoderma spp en presencia de arsénico* (Vol. 5, Issue 1).

Kasonga, T. K., Coetzee, M. A. A., Kamika, I., & Momba, M. N. B. (2021). Assessing the Fungal Simultaneous Removal Efficiency of Carbamazepine, Diclofenac and Ibuprofen in Aquatic Environment. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.755972>

Koitabashi, M., Noguchi, M., Sameshima, Y., Hiradate, S., Suzuki, K., Yoshida, S., Watanabe, T., Shinozaki, Y., Tsushima, S., & Kitamoto, H. (2012). Degradation of biodegradable plastic mulch films in soil environment by phylloplane fungi isolated from gramineous plants. *AMB Express*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-40>

Lladó, S., Gràcia, E., Solanas, A., & Viñas, M. (2013). Fungal and bacterial microbial community assessment during bioremediation assays in an aged creosote-polluted soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 67, 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.08.010>

Lugo, M., Iriarte, H., Crespo, E., Torres, L., Ontivero, E., Risio, L., Menoyo, E., & Ballesteros, S. (2018). *MANUAL DE METODOLOGÍAS PARA EL TRABAJO CON HONGOS Y SUS SIMBIOSIS* (Issue December).

Maldonado, J. (2022). *Caracterización de hongos entomopatógenos con potencial para el control biológico de estrés biótico en plantas.*

Martine, I., Villemur, R., Juteau, P., & Lépine, F. (2011). Isolation of estrogen-degrading bacteria from an activated sludge bioreactor treating swine waste, including a strain that converts estrone to β -estradiol. *Canadian Journal of Microbiology*, 57(7), 559–568. <https://doi.org/10.1139/w11-051>

Matheus, P., Ramírez, E., Araque, J., Belandria, O., & Durán, J. (2016). Espectrofotometría de absorción molecular ultravioleta como una herramienta para estudiar el crecimiento de las cepas ATCC 25922 Y ATCC 35218 de *Escherichia coli*. *Acta Bioclínica*, 6(11), 44–59. <http://erevistas.saber.ula.ve/index.php/actabioclinica/article/view/7367>

Mejías, C. (2020). *Enriquecimiento y aislamiento de bacterias degradadoras de fármacos presentes en lodos de depuradora.*

Morales, L. T., & Méndez, G. I. (2021). Bioremediation of carbamazepine by fungi and bacteria in wastewater. *Bionatura*, 6(2), 1851–1857. <https://doi.org/10.21931/RB/2021.06.02.28>

Nguyen, H. T., Adil, S., Cho, K., Jeong, S., & Kim, E. J. (2022). Improvement of carbamazepine removal through biodegradation coupled with peroxydisulfate-based Fenton oxidation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(4). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.108150>

- Oladipo, O., Awotoye, O., Olayinka, A., Bezuidenhout, C., & Maboeta, M. S. (2018). Heavy metal tolerance traits of filamentous fungi isolated from gold and gemstone mining sites. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(1), 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.06.003>
- Ortiz, B. (2020). *Evaluación del potencial antifúngico de Aloe Vera frente a hongos fitopatógenos y de postcosecha.*
- Pachés, M. (2020). *Contaminantes emergentes.*
- Padilla, J. (2020). *Elaboración de un protocolo y metodología de recolección de especies de hongos en la estructura del sustrato verde del bosque siempre verde Montano de la cordillera occidental de los Andes cantón Pujilí parroquia el Tingo la esperanza.*
- Piontelli, E. (2011). *Manual de Microhongos filamentosos comunes I* (Vol. 1).
- Poddar, K., Sarkar, D., & Sarkar, A. (2022). Construction of bacterial consortium for efficient degradation of mixed pharmaceutical dyes. *Environmental Science and Pollution Research, Cimpan 2013*. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-18217-4>
- Pomati, F., Castiglioni, S., Zuccato, E., Fanelli, R., Vigetti, D., Rossetti, C., & Calamari, D. (2006). Effects of a complex mixture of therapeutic drugs at environmental levels on human embryonic cells. *Environmental Science and Technology*, 40(7), 2442–2447. <https://doi.org/10.1021/es051715a>
- Porri, A., Baroncelli, R., Guglielminetti, L., Sarrocco, S., Guazzelli, L., Forti, M., Catelani, G., Valentini, G., Bazzichi, A., Franceschi, M., & Vannacci, G. (2011). *Fusarium oxysporum* degradation and detoxification of a new textile-glycoconjugate

azo dye (GAD). *Fungal Biology*, *115*(1), 30–37.

<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.10.001>

Ramírez, I., Martínez, P., Quiroz, M., & Bandala, E. (2015). Efectos de los estrógenos como contaminantes emergentes en la salud y el ambiente. *Tecnología y Ciencias Del Agua*, *6*(5).

Rana, S., Singh, S. K., & Dufossé, L. (2022). Multigene Phylogeny, Beauvericin Production and Bioactive Potential of Fusarium Strains Isolated in India. *Journal of Fungi*, *8*(7). <https://doi.org/10.3390/jof8070662>

Rebollar, A., & Silva, H. (2020). *La marchitez de la Zarzamora Diagnóstico, Epidemiología y manejo integrado*. Universidad Autónoma Chapingo.

Reinoso, J., Serrano, C., & Orellana, D. (2017). Contaminantes emergentes y su impacto en la salud. *Revista de La Facultad de Ciencias Médicas de La Universidad de Cuenca*, *35*, 55–59.

Robles, D., Reyes, A., Díaz, R., Tovar, X., Medina, S., & Jiménez, A. (2021). Design and Performance Evaluation of a Fungi-Bacteria Consortium to Biodegrade Organic Matter at High Concentration on Synthetic Slaughterhouse Wastewater. *Water, Air, and Soil Pollution*, *232*(6), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05177-1>

Rodríguez, C., Urrea, E., & Caminal, G. (2010). Degradation of naproxen and carbamazepine in spiked sludge by slurry and solid-phase *Trametes versicolor* systems. *Bioresource Technology*, *101*(7), 2259–2266. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.089>

Samper, R. (2016). *Efectos de la carbamazepina sobre la termorresistencia de Artemia parthenogenetica*.

Sanchez, J. (2018). Contaminantes emergentes en nuestros ecosistemas acuáticos: enemigos invisibles. *Ingeniería y Región*, 19, 18–21. <https://doi.org/10.25054/22161325.1750>

Sauvêtre, A., May, R., Harpaintner, R., Poschenrieder, C., & Schröder, P. (2018). Metabolism of carbamazepine in plant roots and endophytic rhizobacteria isolated from *Phragmites australis*. *Journal of Hazardous Materials*, 342, 85–95. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.08.006>

Severo, E. (2021). *Estudio del efecto de doce compuestos activos farmacéuticos en el crecimiento radial de Amylomyces rouxii*.

Shi, J. H., Suzuki, Y., Lee, B.-D., Nakai, S., & Hosomi, M. (2002). *Isolation and characterization of the ethynylestradiol-biodegrading microorganism Fusarium proliferatum strain HNS-1*. <https://iwaponline.com/wst/article-pdf/45/12/175/43962/175.pdf>

Siddique, T., Okeke, B. C., Arshad, M., & Frankenberger, W. T. (2003). Biodegradation Kinetics of Endosulfan by *Fusarium ventricosum* and a *Pandora* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 8015–8019. <https://doi.org/10.1021/jf030503z>

Sierra, E., & Quecho, G. (2018). *Síntesis y caracterización estructural de compuestos de coordinación de cobre y plata usando carbamazepina como ligando*.

Sobrino, A. (2017). *Selección de microorganismos para el desarrollo de procesos de biooxidación avanzada*.

Tabacchioni, S., Passato, S., Ambrosino, P., Huang, L., Caldara, M., Cantale, C., Hett, J., Fiore, A., Fiore, A., Schlüter, A., Sczyrba, A., Maestri, E., Marmiroli, N.,

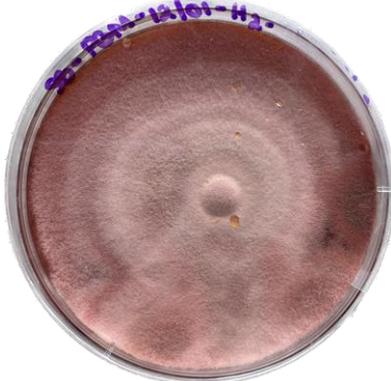
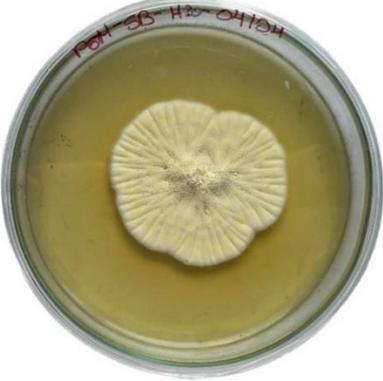
- Neuhoff, D., Nesme, J., Sørensen, S., Aprea, G., Nobili, C., Presenti, O., ... Bevivino, A. (2021). Identification of beneficial microbial consortia and bioactive compounds with potential as plant biostimulants for a sustainable agriculture. *Microorganisms*, 9(2), 1–23. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020426>
- Tahir, K., Miran, W., Jang, J., Shahzad, A., Moztahida, M., Kim, B., Lim, S. R., & Lee, D. S. (2021). Carbamazepine biodegradation and volatile fatty acids production by selectively enriched sulfate-reducing bacteria and fermentative acidogenic bacteria. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 96(3), 592–602. <https://doi.org/10.1002/jctb.6572>
- Toapanta, D., Morillo, L., & Viera, W. (2017). Diagnóstico molecular de *Phytophthora cinnamomi* asociado a la pudrición radicular en zonas productoras de aguacate en Ecuador. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 18(2), 285–294. https://doi.org/10.21930/rcta.vol18_num2_art:628
- Vogna, D., Marotta, R., Andreozzi, R., Napolitano, A., & D’Ischia, M. (2004). Kinetic and chemical assessment of the UV/H₂O₂ treatment of antiepileptic drug carbamazepine. *Chemosphere*, 54(4), 497–505. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00757-4](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00757-4)
- Weber, S., Leuschner, P., Kämpfer, P., Dott, W., & Hollender, J. (2005). Degradation of estradiol and ethinyl estradiol by activated sludge and by a defined mixed culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(1), 106–112. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1693-4>
- Zhang, T., & Zhang, H. (2022). Microbial Consortia Are Needed to Degrade Soil Pollutants. In *Microorganisms* (Vol. 10, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020261>

Zhang, Y., Geißen, S., & Gal, C. (2008). Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere*, 73(8), 1151–1161. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.086>

8 Anexos

Anexo 1. Hongos aislados a partir de muestras ambientales.

Sitio de muestreo	Código de la muestra	Origen de la muestra	Imagen macroscópica del hongo
Salasaca	H24	Suelo	
	H26	Suelo	
	H25	Suelo	
	H16	Suelo	

H8	Suelo	
H2	Suelo	
H20	Suelo	
H21	Suelo	

Baños

H23

Suelo



H14

Suelo



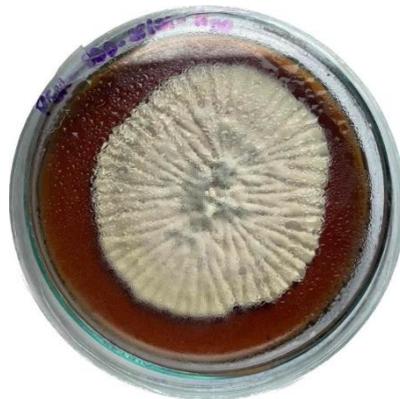
H28

Suelo



H30

Suelo



H17

Suelo



Puyo

H22

Suelo



H9

Suelo



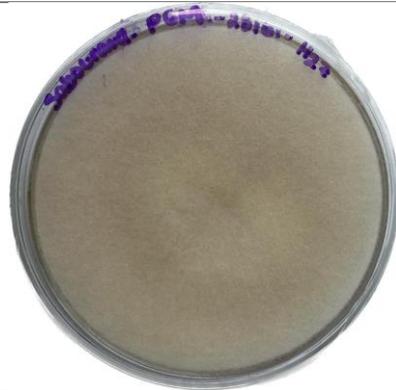
H7

Suelo



H27

Suelo



H29

Suelo



H13

Suelo



Mindo	H1	Árbol	
	H3	Árbol	
	H19	Árbol	
Sucumbíos	H6	Suelo	
	H15	Árbol	

H11

Árbol



H18

Árbol



H4

Árbol



H5

Árbol



H12



Elaborado por: (Las autoras, 2023).