



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA  
SEDE GUAYAQUIL**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**MICORREMEDIACIÓN DE METALES PESADOS DE PLOMO, CROMO Y  
CADMIO MEDIANTE LA RESPUESTA DE CRECIMIENTO EN CONDICIONES *In vitro***

*Trabajo de titulación previo a la obtención  
del título de Ingeniería en Biotecnología*

**AUTOR:**

KATHERINE VANESSA GUSQUI SALTOS  
LAUREN CRISTHEL MARTÍNEZ ANGULO

**TUTOR:**

MSc. MARCOS XAVIER VERA MORALES

**GUAYAQUIL - ECUADOR**

**2025**

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

Nosotras, **Katherine Vanessa Gusqui Saltos** con documento de identificación N° 0950121368  
y **Lauren Cristhel Martínez Angulo** con documento de identificación N° 0850306515;  
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.

Guayaquil, 13 de febrero del año 2025

Atentamente,



---

Katherine Vanessa Gusqui Saltos  
CI: 0950121368



---

Lauren Cristhel Martínez Angulo  
CI: 0850306515

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

Nosotros, **Katherine Vanessa Gusqui Saltos** con documento de identificación N° **0950121368** y **Lauren Cristhel Martínez Angulo** con documento de identificación N° **08050306515**, 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: **MICORREMEDIACIÓN DE METALES PESADOS DE PLOMO, CROMO Y CADMIO MEDIANTE LA RESPUESTA DE CRECIMIENTO EN CONDICIONES *In vitro***, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniero/a 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.

Guayaquil, 13 de febrero del año 2025

Atentamente,



Katherine Vanessa Gusqui Saltos

CI: 0950121368



Lauren Cristhel Martínez Angulo

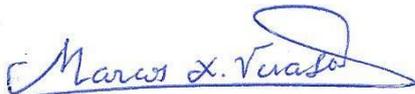
CI: 0850306515

## CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **Marcos Xavier Vera Morales** con documento de identificación N° 0930412747, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **MICORREMEDIACIÓN DE METALES PESADOS DE PLOMO, CROMO Y CADMIO MEDIANTE LA RESPUESTA DE CRECIMIENTO EN CONDICIONES *In vitro***, realizado por **Katherine Vanessa Gusqui Saltos**, con documento de identificación N° 0950121368 y **Lauren Cristhel Martínez Angulo**, con documento de identificación N° 0850306515, 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.

Guayaquil, 13 de febrero del año 2025

Atentamente,



---

Marcos Xavier Vera Morales

CI: 0930412747

## **CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Yo, **María Fernanda Ratti Torres** con documento de identificación N° 0802198960, docente/investigador en Facultad de Ciencias de la Vida (FCV-ESPOL) y Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE-ESPOL), declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **MICORREMEDIACIÓN DE METALES PESADOS DE PLOMO, CROMO Y CADMIO MEDIANTE LA RESPUESTA DE CRECIMIENTO EN CONDICIONES *In vitro***, realizado por **Katherine Vanessa Gusqui Saltos**, con documento de identificación N° 0950121368 y **Lauren Cristhel Martínez Angulo**, con documento de identificación N° 0850306515, 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.

Guayaquil, 13 de febrero del año 2025

Atentamente,



---

María Fernanda Ratti Torres

CI: 0802198960

## **DEDICATORIA**

A Dios, quien me ha brindado la fortaleza necesaria para avanzar, enseñándome que el fracaso es el camino hacia el éxito, iluminándome en los días más oscuros, en quien encuentro consuelo y esperanza.

Inspirado en su ejemplo, dedico este trabajo a mis primeros maestros, mis padres, que nos han enseñado a mi hermano y a mí el valor de la educación, cuyo apoyo y amor incondicional me ha permitido superar todos los obstáculos que se han presentado a lo largo de este camino y poder llegar hasta aquí, ellos, quienes me han enseñado el valor del esfuerzo y la perseverancia, gracias a ellos soy la persona que soy ahora. A mi hermano, que siempre ha sido un gran apoyo en mi vida, guiándome en cada paso.

A la vida, mi más grande maestra, quien me puso a prueba, haciéndome ver la fuerza interior que tenía y no dejarme vencer por las adversidades. A mi familia y amigos que cuyo amor y apoyo me mantuvo en los momentos más difíciles.

A todos aquellos que me han acompañado en este camino. A mis amistades, quienes hacen la vida un poco más fácil, quienes me han enseñado el valor de la amistad. A Ahinara Gómez, gracias a su compañía incondicional, que sin esperar nada a cambio estuvo ahí, encontrando maneras de ayudarme.

Al Blgo. Marcos Vera Morales, quien con su entusiasmo y conocimiento me inspiraron a explorar un nuevo campo de la biotecnología, que siempre estuvo abierto a aclarar mis dudas e inquietudes llevándome a ampliar mis conocimientos. Esto es un reflejo de todo lo que he aprendido de él.

**Katherine Gusqui.**

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mis padres, quienes con su amor incondicional y sacrificio me brindaron lo necesario para lograr mis metas. Su presencia a pesar de la distancia ha sido base fundamental de este sueño, desde el consejo con palabras de aliento, hasta un cálido abrazo en el silencio que reflejan la confianza y su apoyo inquebrantable. También a mis hermanos, fieles compañeros que me inspiran día a día para ser mejor y me enseñan a tener los pies sobre la tierra, estoy agradecida de haber crecido junto a ustedes y que sean una fuente de inspiración para mí orientándome que los objetivos se logran con disciplina y constancia.

A mi abuelo, quien ya no está físicamente, pero permanece en mi mente y corazón. Su risa y sabiduría ante la adversidad me acompañará para siempre dándome fuerzas para continuar con mis propósitos.

A mis amigas, Samantha Salazar, Emilia Véliz y Katherine Gusqui por su amor y paciencia. Gracias por las risas, por estar a mi lado cuando más las necesité y levantarme en los días más oscuros en dónde ni siquiera yo misma creía en mí, siendo testigos de retos y sueños cumplidos a través de su compañía dado que, sin la misma, este logro no sería igual.

A mi querida Morocha, quien con su presencia iluminó mi camino llenándolo de paz. Gracias por tus afectos que me han dado las fuerzas necesarias para continuar sin rendirme, este logro también te pertenece.

A mis docentes, por ser excelentes guías con una profunda paciencia y sabiduría. Les agradezco por impulsarme a ser una buena profesional con cada lección, cada consejo y nunca rendirse conmigo.

**Lauren Martínez.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Nuestros más sinceros agradecimientos al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), que gracias a su patrocinio nos permitió la culminación de nuestro proyecto, que con su innovación y desarrollo nos permitió desarrollarnos de una forma más profesional a través de su confianza.

Agradecemos al director del CIBE el Dr. Juan Manuel Cevallos, y los investigadores Marcos Xavier Vera, MSc, y María Fernanda Ratti, Ph.D., quienes con su experiencia y apoyo nos guiaban durante el desarrollo de este ensayo con sus enseñanzas y aportes brindados. Del mismo modo, queremos agradecer al laboratorista Emilio González, Ashley Alban y Giovanna Carpio que gracias a su colaboración este proyecto pudo alcanzar una estructura más organizada.

**Katherine Gusqui & Lauren Martínez**

## RESUMEN

Los metales pesados se encuentran en bajas concentraciones, pero debido al aumento de las actividades antropogénicas está siendo una gran problemática en la actualidad. El objetivo de esta investigación fue identificar y evaluar la capacidad micorremediadora de una cepa de microhongo filamentoso enfocándonos en la dinámica de crecimiento e interacción fúngica con los metales pesados de plomo, cromo y cadmio bajo condiciones controladas de laboratorio. En primer lugar, se llevó a cabo la preparación del medio sólido y líquido para la inoculación del hongo, posteriormente, se realizó un control de crecimiento en el medio sólido a través de mediciones, mientras que en el medio líquido se realizó la recolección del micelio de los viales para el procesamiento de muestras. A continuación, mediante una ecuación de porcentaje de inhibición e índice de tolerancia, se registró la actividad fúngica en respuesta a los metales pesados, también, se ejecutó la extracción de ADN, amplificación por PCR convencional, purificación y secuenciación Sanger para la caracterización del microhongo filamentoso efectuando así el árbol filogenético. El rendimiento de este estudio defiende que el microhongo filamentoso es potencial biorremediador para suelos contaminados con cromo, ya que indica un alto índice de tolerancia y una inhibición del 0% para medios sólidos contaminados con dicho metal, exponiendo una dinámica de crecimiento inusual en comparación al control y demás tratamientos, asimismo, presenta una ligera tolerancia a medios contaminados con plomo con un porcentaje de inhibición entre 21% a 38% y finalmente por la presencia de cadmio el crecimiento se inhibió al 100%.

**Palabras clave:** *Fusarium*, micorremediación, índice de tolerancia, metales pesados, crecimiento, porcentaje de inhibición

## ABSTRACT

Heavy metals are found in low concentrations, but due to the increase in anthropogenic activities, this is becoming a major problem today. The objective of this research was to identify and evaluate the mycoremediation capacity of a strain of filamentous microfungus, focusing on the dynamics of fungal growth and interaction with the heavy metals lead, chromium and cadmium under controlled laboratory conditions. First, the preparation of the solid and liquid medium for the inoculation of the fungus was carried out. Subsequently, growth control was carried out in the solid medium through measurements, while in the liquid medium the mycelium was collected from the vials for sample processing. Next, through an equation of percentage inhibition and tolerance index, the fungal activity in response to heavy metals was recorded. Also, DNA extraction, conventional PCR amplification, purification and sequencing were carried out for the characterization of the filamentous microfungus by making the phylogenetic tree. The performance of this study supports that the filamentous microfungus is a potential bioremediator for soils contaminated with chromium, since it indicates a high tolerance index and a 0% inhibition for solid media contaminated with this metal, exhibiting an unusual growth dynamic compared to the control and other treatments. It also shows a slight tolerance to media contaminated with lead with an inhibition percentage between 21% and 38% and finally, due to the presence of cadmium, growth was inhibited by 100%.

Keywords: *Fusarium*, mycoremediation, tolerance index, heavy metals, growth, inhibition percentage.

## Índice de contenido

<b>Capítulo 1</b> .....	<b>1</b>
<b>Antecedentes</b> .....	<b>1</b>
1.1. Introducción .....	1
1.2. Planteamiento del problema .....	2
1.2.2. Pregunta de investigación.....	3
1.3. Delimitaciones.....	3
1.4. Justificación.....	4
1.5. Objetivos .....	4
1.5.1. <i>Objetivo General</i> .....	4
1.5.2. <i>Objetivos Específicos</i> .....	4
1.6. Hipótesis.....	4
<b>Capítulo 2</b> .....	<b>5</b>
<b>Marco Teórico</b> .....	<b>5</b>
2.1. Hongos filamentosos .....	5
2.2. Metales pesados.....	6
2.3. Micorremediación y mecanismos de acción .....	7
2.4. Extracción de ADN .....	7
2.5. Árbol filogenético .....	8
<b>Capítulo 3</b> .....	<b>8</b>
<b>Materiales y Métodos</b> .....	<b>8</b>
3.1. Materiales .....	8
3.2. Diseño experimental.....	9

3.2. Metodología de investigación .....	11
3.3. Ubicación de muestreo .....	11
3.4. Variables de investigación .....	12
3.4.1 Variables independientes .....	12
3.4. Variables dependientes .....	13
3.4.3 Variables controladas .....	13
3.5. Procedimiento.....	14
3.5.1. Fase 1: Recolección de muestra.....	14
3.5.2. Fase 1: Aislamiento de microhongo filamentoso.....	14
3.5.3. Fase 1: Preparación de medio sólido .....	14
3.5.4. Fase 1: Inoculación de hongo.....	16
3.5.5. Fase 1: Condiciones de incubación .....	17
3.5.6. Fase 1: Registro de resultados.....	17
3.5.7. Fase 2: Preparación de medio líquido.....	18
3.5.8. Fase 2: Inoculación del microhongo filamentoso en el medio líquido .....	20
3.5.9. Fase 2: Condiciones de incubación .....	21
3.5.10. Fase 2: Control de crecimiento y procesamiento de muestras para obtención de resultados.....	22
3.5.11. Fase 3: Identificación del microhongo filamentoso.....	22
3.5.11.1 Extracción de ADN.....	22
3.5.11.2 Amplificación .....	24

3.5.11.3 <i>Electroforesis en gel agarosa</i> .....	25
5.5.11.4 <i>Análisis de calidad de ADN</i> .....	25
3.5.11.5 <i>Secuenciación</i> .....	25
3.5.11.6 <i>Análisis filogenético</i> .....	26
3.5.12 <i>Análisis de datos estadísticos</i> .....	26
<b>Capítulo 4</b> .....	<b>26</b>
<b>Resultados y Discusiones</b> .....	<b>26</b>
4.1 <i>Análisis estadístico</i> .....	26
4.1.1 <i>Evaluación de crecimiento radial en medio sólido de microhongo filamentoso bajo condiciones in vitro</i> .....	26
4.1.2 <i>Evaluación de crecimiento de microhongo filamentoso en medio líquido bajo condiciones in vitro</i> .....	37
4.2 <i>Identificación de microhongo filamentoso</i> .....	42
4.2.1 <i>Electroforesis</i> .....	42
4.2.2 <i>Limpieza y alineamiento de secuenciación</i> .....	42
4.2.3 <i>Construcción del árbol filogenético</i> .....	43
<b>Capítulo 5</b> .....	<b>44</b>
<b>Conclusiones y Recomendaciones</b> .....	<b>44</b>
5.1. <i>Conclusiones</i> .....	44
5.2. <i>Recomendaciones</i> .....	45
6.0 <i>Referencias</i> .....	46

## Índice de figuras

Figura 1. <i>Ubicación geográfica de la recolección de muestra de suelos contaminados del huerto de la Universidad Politécnica Salesiana, ubicado en las coordenadas 2°11'43.5"S 80°02'37.5"W.</i> .....	12
Figura 2. <i>Procedimiento de la preparación del medio sólido (PDA).</i> .....	16
Figura 3. <i>Procedimiento de la inoculación del microhongo filamentoso en el medio sólido (PDA).</i> .....	17
Figura 4. <i>Preparación de medio líquido (PDB) en viales de 25 ml.</i> .....	20
Figura 5. <i>Condiciones de incubación de los viales con el medio líquido.</i> .....	22
Figura 6. <i>Crecimiento radial de macrohongo en medio sólido (PDA) con plomo.</i> .....	27
Figura 7. <i>Resistencia del microhongo filamentoso en 5 concentraciones diferentes de plomo y el control después de 9 días de incubación en PDA.</i> .....	28
Figura 8. <i>Curva de crecimiento de los tratamientos T0, T1, T2, T3, T4 y T5 en los 9 días de exposición a plomo pesado en PDA.</i> .....	29
Figura 9. <i>Índice de tolerancia del microhongo filamentoso en concentraciones de plomo.</i> .....	30
Figura 10. <i>Crecimiento radial de macrohongo en medio sólido (PDA) con cromo.</i> ...	30
Figura 11. <i>Curva de crecimiento de los tratamientos T0, T1, T2, T3, T4 y T5 en los 9 días de exposición a cromo pesado en PDA.</i> .....	32
Figura 12. <i>Índice de tolerancia del microhongo filamentoso en concentraciones de cromo.</i> .....	33
Figura 13. <i>Crecimiento radial de macrohongo en medio sólido (PDA) con cadmio.</i> ...	33

Figura 14. <i>Curva de crecimiento de los tratamientos T0, T1, T2, T3, T4 y T5 en los 9 días de exposición a cadmio pesado en PDA.</i> .....	35
Figura 15. <i>Índice de tolerancia del microhongo filamentoso en concentraciones de cadmio.</i> .....	36
Figura 16. <i>Corrida del ADN en gel de agarosa.</i> .....	42
Figura 17. <i>Árbol filogenético.</i> .....	44

## Índice de tablas

Tabla 1. <i>Contenido de materiales, reactivos y equipos usados.</i> .....	8
Tabla 2. <i>Modelo de Diseño experimental.</i> .....	10
Tabla 3. <i>Cantidades de reactivos para los tratamientos de plomo, cromo y cadmio en PDA.</i> .....	15
Tabla 4. <i>Cantidades de reactivos para los tratamientos de plomo, cromo y cadmio en medio de cultivo líquido (PDB).</i> .....	19
Tabla 5. <i>Porcentaje de inhibición del microhongo filamentoso en plomo, cromo y cadmio.</i> .....	36
Tabla 6. <i>Peso de micelio seco del microhongo filamentoso de medio líquido en plomo.</i> .....	38
Tabla 7. <i>Peso de micelio seco del microhongo filamentoso de medio líquido en cromo.</i> .....	40
Tabla 8. <i>Peso de micelio seco del microhongo filamentoso de medio líquido en cadmio.</i> .....	41
Tabla 9. <i>Resultados del BLASTn de la secuenciación del ADN.</i> .....	43

## Índice de anexos

Anexo 1. Preparación de medio sólido y medio líquido. ....	49
Anexo 2. Preparación de medio de cultivo con las concentraciones de los metales pesados. ....	49
Anexo 3. PCR convencional para microhongo filamentoso. ....	50
Anexo 4. NanoDrop para análisis de calidad de ADN. ....	50
Anexo 5. Electroforesis. ....	51

## Capítulo 1

### Antecedentes

#### 1.1. Introducción

Los metales pesados son elementos químicos letales y tóxicos de alta densidad, que presentan la característica de acumularse en los tejidos de los organismos vivos. En la tierra se encuentran en concentraciones mínimas por su origen geogénico como las erupciones volcánicas o proveniente de las rocas madres, pero debido al aumento de las actividades antropogénicas estas concentraciones en la actualidad son alarmantes, ya que se encuentran en el agua, aire y suelos (Maftouh et al., 2024).

Desde los años noventa se han utilizados métodos convencionales para la eliminación de contaminantes del medio ambiente como la coagulación química, adsorción, precipitación, filtración de membrana, actividad de oxido-reducción, pero en la actualidad debido a los costos, depósitos secundarios, baja eficiencia en la remediación de estos contaminantes se ha visto la necesidad de encontrar alternativas más sostenibles (Zare et al., 2024).

Enfoques biotecnológicos innovadores como la biorremediación está siendo una de las alternativas más sostenibles a las técnicas convenciones, es un proceso por el cual se usan organismos vivos para que a través de los mecanismos de defensa o supervivencia estos eliminen los contaminantes y los transformen en formas menos tóxicas (Zare et al., 2024). Actualmente, los hongos se han visto como una propuesta prometedora a la biorremediación debido a que poseen la capacidad de bioacumulación, biomineralización, biosorción y biotransformación (Singh et al., 2021).

De acuerdo con (Yusuf et al., 2024) sugiere que los hongos son un potencial prometedor para la biorremediación de metales pesados por lo que el objetivo de esta investigación fue identificar y evaluar una cepa de microhongo filamentoso enfocándonos en la dinámica de

crecimiento e interacción fúngica con los metales pesados de plomo, cromo y cadmio bajo condiciones controladas de laboratorio.

## **1.2. Planteamiento del problema**

Algunos metales pesados se encuentran de forma natural en bajas concentraciones en el agua, aire, suelo y rocas, pero debido al aumento de las actividades antropogénicas como la minería, el uso de pesticidas, el desecho de residuos industriales, los niveles de metales pesados han ido aumentando exponencialmente poniendo en riesgo la salud de los humanos y el medioambiente, también tienden a infiltrarse de las fuentes naturales pudiendo acumularse en la cadena alimentaria de los seres vivos (Singh et al., 2024).

El cadmio, mercurio, cobre, arsénico, plomo, zinc, uranio y el cromo son los metales que más presentes están, clasificados como potenciales riesgos debido a su alta toxicidad, aunque estén presentes en trazas (Muzammal, 2023). Según Jabeen et al., 2009, el plomo puede acumularse en el suelo de 150 a 5000 años, el cadmio puede estar presente al menos entre unos 10 a 30 años, y la principal exposición de estos metales pesados para los humanos es proveniente de la vegetación causando efectos irreversibles como afectaciones del cerebro, alteraciones teratogénicas, generación de cáncer, entre otros, y los suelos en la actualidad presentan niveles altos de contaminación por metales pesados, no solo presentes en los suelos sino aguas, y aire (Muzammal, 2023).

Si bien es cierto los hongos son una solución prometedora para la remediación de los metales pesados, pero la falta de identificación de nuevas especies de hongos resalta la necesidad de investigaciones más exhaustivas sobre los mecanismos de acción y la integración de nuevas especies en este campo de la biorremediación (Majumdar, 2024).

### **1.2.2. Pregunta de investigación**

¿El microhongo filamentoso aislado de suelos del huerto de la Universidad Politécnica Salesiana, sede Guayaquil, vía a la costa cuando es cultivado en medios contaminados con metales pesados de plomo, cromo y cadmio muestra la capacidad de crecimiento y tolerancia de los metales pesados?

### **1.3. Delimitaciones**

El microhongo filamentoso aislado fue de suelos pertenecientes al huerto de la Universidad Politécnica Salesiana, sede Guayaquil, en ensayos de identificación de microorganismos capaces de biorremediar metales pesados. Se evidencio la presencia de un microhongo filamentoso en suelos contaminados con concentraciones de plomo a 100 ppm por lo que se tomó muestra del suelo y parte del microhongo filamentoso en una funda estéril con zip para posteriormente comenzar los ensayos de la investigación en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE).

Debido al tiempo estimado de la investigación, nos delimitamos a evaluar la capacidad biorremediadora de plomo, cromo y cadmio debido a la alta toxicidad y persistencia que tienen estos metales pesados en el medioambiente (Bouida et al., 2022), ajustando concentraciones más altas de los ensayos previos.

La metodología de la investigación se basó en métodos experimentales en condiciones controladas de laboratorio, usando medios líquidos y medios sólidos para el análisis de la dinámica de crecimiento radial y de la capacidad de tolerancia, limitándonos a ensayos in vitro y no en campos con suelos contaminados.

## **1.4. Justificación**

El presente proyecto se justifica por el campo poco explorado de los hongos y su eficiente capacidad de biorremediación de contaminantes como los metales pesados, el objetivo de este proyecto se enfoca en la identificación y evaluación de crecimiento de un microhongo filamentoso con potencial biorremediador de metales pesados, expuesto en medios líquidos y sólidos bajo condiciones controladas contribuyendo a presentar bases sólidas para futuras aplicaciones biotecnológicas fomentando el desarrollo de tecnologías más sostenibles en relación a la descontaminación de aire, aguas y suelos de estos metales pesados.

## **1.5. Objetivos**

### **1.5.1. *Objetivo General***

Evaluar la capacidad biorremediadora de metales pesados de plomo, cadmio y cromo de un microhongo filamentoso bajo condiciones controladas de laboratorio.

### **1.5.2. *Objetivos Específicos***

Caracterizar molecularmente al microhongo filamentoso aislado de suelos contaminados con metales pesados.

Analizar el crecimiento radial del microhongo filamentoso en medios de cultivos sólidos a diferentes concentraciones de metales pesados de plomo, cromo y cadmio.

Determinar la dinámica de crecimiento del microhongo filamentoso en medios de cultivos líquidos a diferentes concentraciones de metales pesados de plomo, cromo y cadmio.

## **1.6. Hipótesis**

El microhongo filamentoso aislado del suelo del huerto de la Universidad Politécnica Salesiana, sede guayaquil, vía a la costa con metales pesados, cuando es cultivado bajo

condiciones controladas de laboratorio, exhibe una alta capacidad de biorremediación y una dinámica de crecimiento diferenciada en medios de cultivo sólidos y líquidos, incluso en presencia de concentraciones variables de plomo, cadmio y cromo, lo que sugiere un potencial significativo en la remediación de ambientes contaminados.

## **Capítulo 2**

### **Marco Teórico**

#### **2.1. Hongos filamentosos**

Los microhongos filamentosos crecen en forma de hifas continuas o discontinuas formando estructuras alargadas, el conjunto de las hifas forman el micelio del hongo, se reproducen de forma sexual o asexual. Su metabolismo puede heterótrofo, saprofito, alimentándose de materia orgánica, el hábitat de los microhongos filamentosos puede ser agua, suelos, materia orgánica llegando a soportar condiciones de salinidad, bajas temperaturas, y ambientes con poco oxígeno Ruiz et al., 2014.

Los hongos compuestos por especies multicelulares y unicelulares se clasifican como segundos más grandes después de los insectos. La variedad macrofúngica tiene una función reguladora en el ecosistema como en el ciclo de algunos nutrientes, ya sea como patógenos, descomponedores o mutualistas, y algunos de estos hongos son usados de forma medicinal, como alimento y otros pueden llegar a ser tóxicos según Zeb et al., (2023).

Grace et al., (2022) argumentan que los hongos filamentosos remedian los contaminantes a través de redes miceliales que facilitan la absorción y el transporte de nutrientes, así como la liberación de enzimas extracelulares y otros componentes orgánicos.

## 2.2. Metales pesados

Existen dos actividades naturales por las cuales se puede dar la acumulación de metales pesados en el medio ambiente como la erosión de las rocas y las erupciones volcánicas, pero las actividades antropogénicas es una de las principales causas por las cuales existe una alta concentración de metales pesados en el medio ambiente, tales como la minería, la agricultura, el desecho de aguas residuales entre otros de acuerdo con Abo-Alkasem et al., (2023)

Hossain et al., 2021 argumenta a través de su estudio como afecta el lixiviado industrial por la contaminación metálica que se ve aumentada por las actividades manufactureras, como los efluentes procedentes de fábricas de baterías, ropa, curtidurías entre otras. También, las aguas residuales de industrias textiles se vierten de forma indiscriminada en enormes cantidades derramando con frecuencia desechos comerciales. Los metales pesados presentes en el agua, a un ph elevado se precipitan formando partículas sólidas que se adhieren a la superficie de los sedimentos y una vez absorbidos se despiden al agua superpuesta siempre y cuando la concentración de oxígeno sea menor a 7mg/L, esto se verá influenciado por los mismos contaminantes presentes en los desechos industriales que aumentan la demanda de oxígeno, lo que afecta al hábitat de ciertos organismos bentónicos.

Asimismo, según Hossain et al., 2021, indican que muchos metales pesados son tóxicos para los seres vivos a causa de su alta duración y bioacumulación en el agua o el suelo, puesto que estos pueden modificar la cadena alimentaria mediante los peces, que acumulan dichos contaminantes en sus órganos y espinas. También, Jiang et al., 2023 argumentan que utilizar el agua contaminada para riego agrícola representa una amenaza que puede causar riesgos significativos para la salud humana, como daños irreversibles en los pulmones, el corazón, los vasos sanguíneos del cerebro, el sistema inmunológico y otros.

### **2.3. Micorremediación y mecanismos de acción**

En la micorremediación se incluyen técnicas como la bioestimulación en donde se añaden nutrientes para mejorar la actividad microbiana, bioaumentación que implica la adición de microorganismos que puedan modificar la concentración de metales pesados en el medio, la bioacumulación utiliza células vivas para retener los contaminantes dentro de ellas y biosorción fuera de ellas, permitiendo adherirse a la membrana externa de los microorganismos. Estas técnicas se caracterizan por ser tecnologías de remediación promisorias desde el punto de vista económico y de efectividad (Valdez et al., 2023).

Tamim (2023) discute que, en la biotransformación los hongos cuentan con la producción de enzimas que provocan transformaciones químicas en los metales pesados, así, mediante procesos metabólicos pueden modificar su estado de oxidación, esto implica la transferencia de electrones convirtiendo los metales en compuestos más sencillos afectando a su solubilidad y biodisponibilidad. Los mecanismos de tolerancia a metales pesados tienen una función importante en la micorremediación, porque en el secuestro extracelular, los hongos liberan moléculas quelantes como proteínas o glucanos que se unen a los metales pesados, quedando así, los metales inmovilizándolos en la matriz, teniendo la capacidad de capturar metales pesados fuera de la célula evitando su interacción con estructuras celulares internas minimizando su toxicidad por biosorción.

### **2.4. Extracción de ADN**

En la actualidad, la mayor parte de los kits comerciales de extracción de ADN se desarrollan a partir de la extracción en fase sólida, dado que se posee ventajas intrínsecas, incluido el uso limitado de reactivos orgánicos nocivos, la simplicidad de operación manual y alto rendimiento. La extracción de ADN generalmente conlleva la rotura de la membrana celular, la integración de los ácidos nucleicos a los adsorbentes, el lavado de las sustancias no

adheridas a los adsorbentes y, para concluir, la elución del ADN de los adsorbentes (Zhang et al., 2024)

## 2.5. Árbol filogenético

El árbol filogenético recopila información de caracteres morfológicos y moleculares representando relaciones evolutivas entre organismos u otras especies entre sí, derivando de un ancestro en común. Se representan a través de diagramas bifurcados que para la construcción de este se usan distintos métodos que usan la distancia para estimar los parentescos con otros organismos o secuencias como lo son la máxima parsimonia y verosimilitud. Las cladogramas es la representación del patrón de ramificación sin las ramas que relacionan la divergencia entre organismos o secuencias, los filogramas es la representación de las longitudes relacionadas a la divergencia entre organismos o secuencias y los cronogramas son las longitudes que representan el tiempo de divergencia entre los organismos que se están analizando. La clasificación de los árboles filogenéticos esta dado por ser arboles enraizados que son los que tienen en su estructura nodos que llega hasta el ancestro más reciente, y están los árboles no enraizados que solo representan el parentesco (Moreira, 2023).

## Capítulo 3

### Materiales y Métodos

#### 3.1. Materiales

Dentro del desarrollo experimental del proyecto se usaron varios materiales, reactivos y equipos que se detallan en la tabla1.

**Tabla 1.** *Contenido de materiales, reactivos y equipos usados.*

<b>Materiales</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Equipos</b>

Cajas Petri	Medio de cultivo PDA	Balanza analítica
Viales de 25 ml	Cadmiumchlorid-1-hydrat	Autoclave
Puntas (100 $\mu$ L, 200 $\mu$ L, 1000 $\mu$ L)	Potassium dichromate	Incubadora
pipetas (500 $\mu$ L, 1000 $\mu$ L)	Plomo (II) Acetato 3-Hidrato	Cabina de bioseguridad
Matraz Erlenmeyer (100 ml)	Medio de cultivo PDB	Espectrofotómetro
Agua destilada		Termociclador
Aislamiento fúngico		Nanodrop
Sacabocado de 5mm		
Sondas de ADN		

**Elaborado por:** Gusqui & Martínez, (2024)

### 3.2. Diseño experimental

Los ensayos realizados en la investigación siguieron un diseño completamente al azar ya que al encontrarse bajo condiciones controladas del laboratorio no existían factores externos que influyeran directamente sobre los tratamientos llegando a afectar las variables dependientes.

El diseño experimental consistió que por cada metal pesados (Pb, Cr y Cd) obteníamos 5 tratamientos T0, T1, T2, T3, T4 y T5 correspondientes a las diferentes concentraciones que se expuso al microhongo filamentoso siendo un control 0ppm, 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm y 1000 ppm. Se realizaron cuatro replicas por cada tratamiento para distribuir proporcionalmente las variables externas que pudieron haber inferido sobre los tratamientos, reduciendo la variabilidad y teniendo un bajo margen de error a la hora de toma de resultados en los diferentes medios que se estaba trabajando.

**Tabla 2.** *Modelo de Diseño experimental.*

	<b>Metal pesado</b>	<b>Concentraciones</b>	<b>Replica 1</b>	<b>Replica 2</b>	<b>Replica 3</b>	<b>Replica 4</b>
<b>Concentraciones</b>	<b>Pb (ppm)</b>	0	*	*	*	*
		100	*	*	*	*
		250	*	*	*	*
		500	*	*	*	*
		750	*	*	*	*
		1000	*	*	*	*
	<b>Cd (ppm)</b>	0	*	*	*	*
		100	*	*	*	*
		250	*	*	*	*
		500	*	*	*	*
		750	*	*	*	*
		1000	*	*	*	*
	<b>Cr (ppm)</b>	0	*	*	*	*
		100	*	*	*	*
		250	*	*	*	*
		500	*	*	*	*
		750	*	*	*	*
		1000	*	*	*	*

**Elaborado por:** Gusqui, Martínez, (2024)

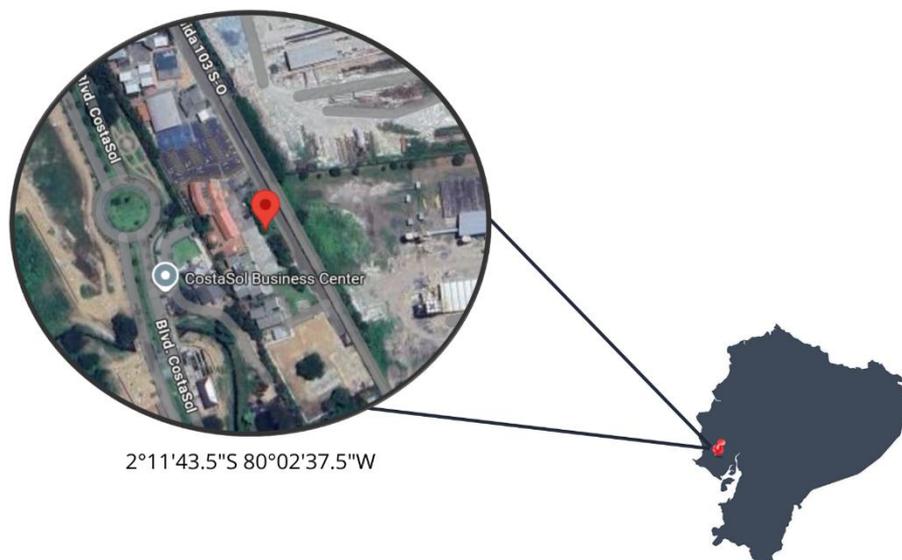
### **3.2. Metodología de investigación**

El desarrollo de esta investigación tuvo un enfoque experimental, analítico y cuantitativo, estructurándose en tres fases, la primera fase fue la exposición del microhongo filamentoso a los medios sólidos contaminados donde se analizó su crecimiento radial en las cajas de Petri, la segunda fase fue la exposición del microhongo filamentoso a los medios líquidos contaminados obteniendo resultados cuantitativos a través de la capacidad de absorción de metales pesados y, por último, se tuvo la identificación molecular del microhongo filamentoso para la creación del árbol filogenético, con procesos de análisis en software estadísticos. Las dos primeras fases corresponden a un enfoque experimental seguido que la fase tercera que tiene un enfoque netamente analítico.

### **3.3. Ubicación de muestreo**

El microhongo filamentoso se aisló de suelos contaminados del huerto de la Universidad Politécnica Salesiana, sede Guayaquil en el Campus María Auxiliadora que por estudios previos por parte de la docencia de la universidad se pudo obtener recolectar las muestras. Las investigaciones posteriores sobre el microhongo filamentoso y su capacidad de biorremediación se llevaron a cabo en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) bajo condiciones controladas de laboratorio.

**Figura 1.** *Ubicación geográfica de la recolección de muestra de suelos contaminados del huerto de la Universidad Politécnica Salesiana, ubicado en las coordenadas 2°11'43.5"S 80°02'37.5"W.*



**Elaborado por:** Gusqui & Martínez (2024)

### **3.4. Variables de investigación**

#### **3.4.1 Variables independientes**

##### **Concentración de metales pesados**

Las concentraciones de plomo, cromo y cadmio fueron cruciales para la investigación debido a que dentro de esta se expuso a altas concentraciones tomando como referencia las concentraciones que tenían los suelos de donde se tomaron las muestras, ajustándolas a concentraciones mayores de los ensayos previo que ya se tenían, con rangos de 100 ppm a 1000 ppm.

##### **Medio de cultivo**

Dentro del proceso experimental se decidió usar un medio líquido (PBD) y medio sólido (PDA) para el análisis de la dinámica de crecimiento que tenía el microhongo filamentoso en condiciones simuladas a la de suelos contaminados y para la determinación de la biomasa en los medios líquidos obteniendo la eficiencia de la remoción de los metales pesados.

### ***3.4. Variables dependientes***

#### **Crecimiento radial**

El crecimiento radial del microhongo filamentos se obtuvo del crecimiento observado en los medios sólidos.

#### **Biomasa**

De los medios líquidos se obtuvo la cantidad de biomasa que fue capaz de crecer y tolerar los medios contaminados con estos metales pesados.

#### **Capacidad biorremediadora**

El análisis de la capacidad biorremediadora fue registrada de los análisis de las concentraciones iniciales y finales de los metales pesados en el medio.

### ***3.4.3 Variables controladas***

#### **Temperatura de 28 grados centígrados**

#### **El periodo de incubación**

El periodo de exposición del microhongo filamentoso a los medios contaminados fue de 20 días donde se tomó de referencia la dinámica de crecimientos en los controles registrando el tiempo en el cual el microhongo filamentoso crecía lo suficiente.

## **Volumen de medio de cultivo**

El volumen tanto para los medios de cultivo líquido como para los medios sólidos se tomaba la precaución que fueron los mismo para todos los tratamientos y replicadas.

### **3.5. Procedimiento**

#### ***3.5.1. Fase 1: Recolección de muestra***

Se recolectaron muestras de los suelos de los ensayos previos, tomando parte del microhongo filamentoso que se visualizó, se recolectaron aproximadamente 20 gramos de muestra en fundas estériles que posterior a ello se transportaron al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador.

#### ***3.5.2. Fase 1: Aislamiento de microhongo filamentoso***

En esta parte de la primera fase del proyecto se esterilizaron previamente los materiales necesarios como bisturí, pinzas, placas de Petri con el medio de cultivo sólido PDA, se procedió a trabajar en la cámara de flujo laminar para estar en las condiciones estériles necesarias para evitar contaminaciones. Se procedió a abrir la funda con la muestra de suelo y parte del microhongo filamentoso con ayuda del bisturí se extrajo tejido del hongo pasando la muestra por una solución de hipoclorito al 1% durante 1 minuto haciendo tres lavados seguidos en agua destilada para eliminar totalmente la solución de hipoclorito, después con la ayuda del bisturí se inoculo la muestra del hongo en la caja Petri, y para finalizar y evitar contaminaciones se selló la caja con Parafilm e incubando la placa a una temperatura de 28 grados centígrados.

#### ***3.5.3. Fase 1: Preparación de medio sólido***

Se utilizaron 6 frascos Schott para la preparación de los medios de cultivos con los diferentes metales pesados, por cada metal pesados se preparó 6 frascos con los distintos tratamientos que se tenían T0, T1 (100ppm), T2 (250 ppm), T3 (500 ppm), T4 (750 ppm) y T5

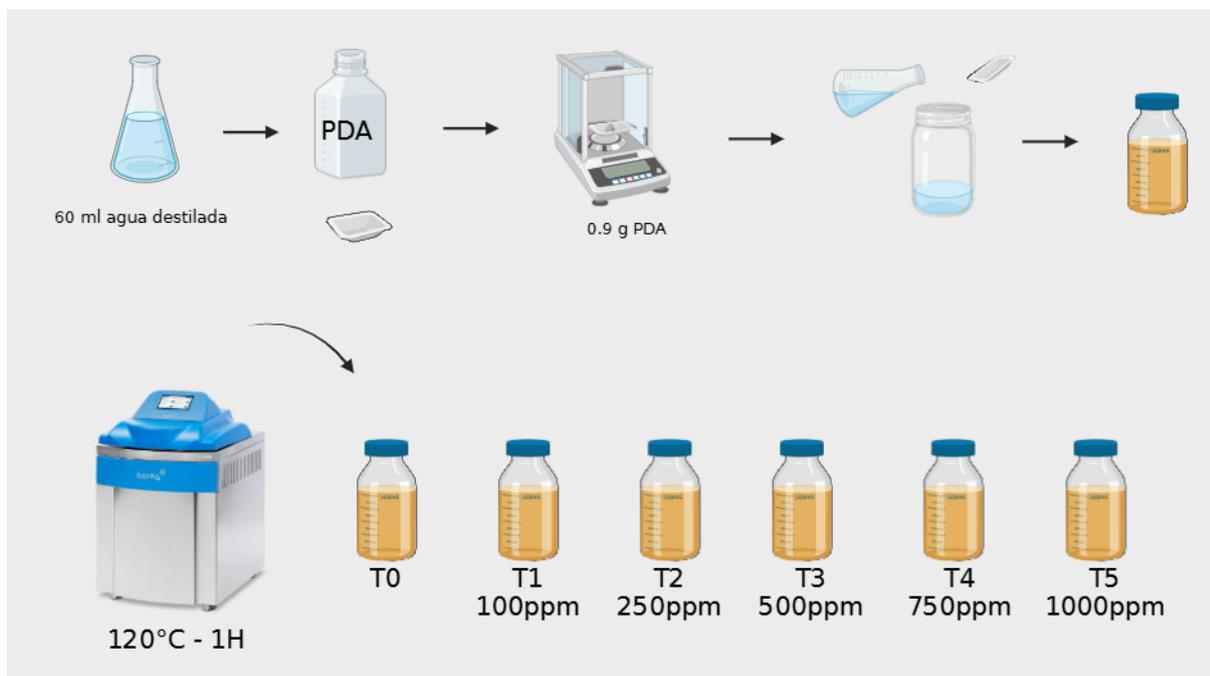
(1000 ppm) donde se aforaron con 60 ml de agua destilada con 0,9 gramos de medio PDA por cada frasco. Posterior a ello se procedió a calcular la cantidad de los reactivos necesario para alcanzar la concentración requerida detallado en la siguiente (ver tabla. 3). Cuando se pesaron las cantidades necesaria de los reactivos, medio de cultivo y se mido el agua destilada se procedió a autoclavar los frascos a 120 grados centígrados por una hora para esterilizarlos.

**Tabla 3.** *Cantidades de reactivos para los tratamientos de plomo, cromo y cadmio en PDA.*

<b>Reactivos</b>	<b>T0 (control)</b>	<b>T1 (100ppm)</b>	<b>T2 (250ppm)</b>	<b>T3 (500ppm)</b>	<b>T4 (750ppm)</b>	<b>T5 (1000ppm)</b>
Plomo  Plomo (II) Acetato 3- Hidrato	0 g	0,01 g	0,02 g	0,05 g	0,08 g	0,11 g
Cromo  Potassium dichromate	0 g	0,03 g	0,08 g	0,17 g	0,26 g	0,35 g
Cadmio  Cadmiumchlor id-1-hydrate	0 g	0,01 g	0,02 g	0,05 g	0,08 g	0,11 g

**Elaborado por:** Gusqui & Martínez, (2024)

**Figura 2.** Procedimiento de la preparación del medio sólido (PDA).

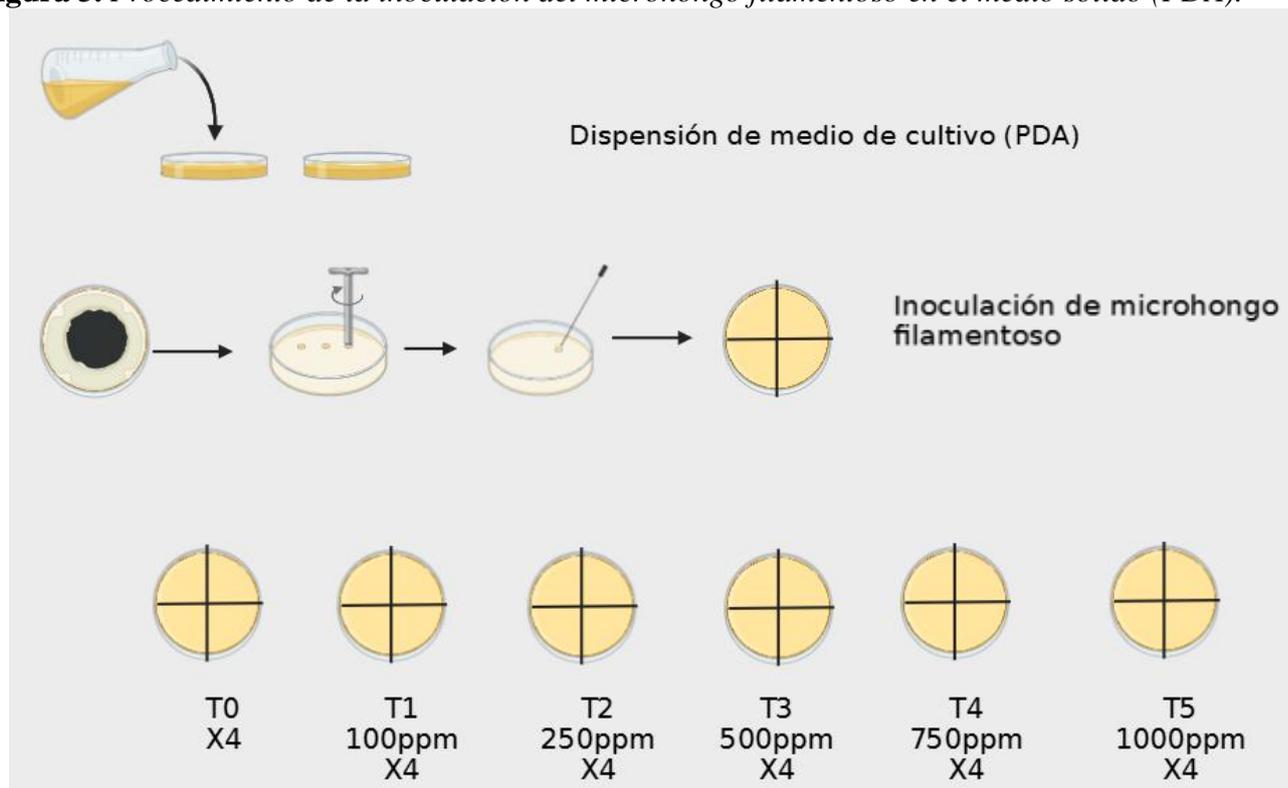


**Elaborado por:** Gusqui & Martínez (2024)

### 3.5.4. Fase 1: Inoculación de hongo

Una vez que los frascos estén estéril se procedió a dispensar en la cámara de flujo laminar el contenido en cuatro caja de Petri por cada tratamiento, luego cuando los medios se solidificaron se procedió dividir la cajas en la parte exterior en cuatro cuadrantes y también se procedió a llevar la caja donde se aisló el microhongo filamentoso a la cámara de flujo laminar y con un sacabocado de 5mm se recolecto la muestra del microhongo filamentoso de cualquier lugar de la caja donde se aisló previamente colocándolo en el centro de los cuadrantes sellando cada una de las cajas con Parafilm.

**Figura 3.** Procedimiento de la inoculación del microhongo filamentoso en el medio sólido (PDA).



**Elaborado por:** (Gusqui & Martínez, 2024)

### 3.5.5. Fase 1: Condiciones de incubación

Todas las cajas de Petri previamente inoculadas se llevaron a la incubadora a 28 grados centígrados por 9 días.

### 3.5.6. Fase 1: Registro de resultados

Por cada tratamiento se obtuvieron 4 réplicas, se identificaron previamente como R1, R2, R3 y R4. Un día después de la inoculación se revisó para registrar el crecimiento y a partir de ahí se comenzó a medir el crecimiento diariamente por los 9 días que se plantearon dónde con los registros diarios del crecimiento y con el procesamiento de esos datos se obtuvieron los resultados del índice de tolerancia refiriéndose a la capacidad que presenta el microhongo filamentoso de tolerar el estrés, se determinó para cada metal donde se hicieron los cálculos en función de la medición del crecimiento de la colonia (mm) en cada tratamiento (HMFG)

dividido para el crecimiento en (mm) de las colonias del hongo en el tratamiento de control (CFG) (Calvillo, 2021).

$$IT = \frac{HMFG}{CFG}$$

Con los datos también se obtuvo el porcentaje de inhibición con relación a la capacidad de cada uno de los tratamientos para inhibir el crecimiento del microhongo filamentoso que se obtuvo de la diferencia del diámetro de la colonia (mm) de los diferentes tratamientos (C) entre el diámetro del control (mm) (T) dividiendo para el diámetro de la colonia del control (mm) (T) multiplicado por 100 (Calvillo, 2021).

$$PI = \frac{C - T}{C} * 100$$

### **3.5.7. Fase 2: Preparación de medio líquido**

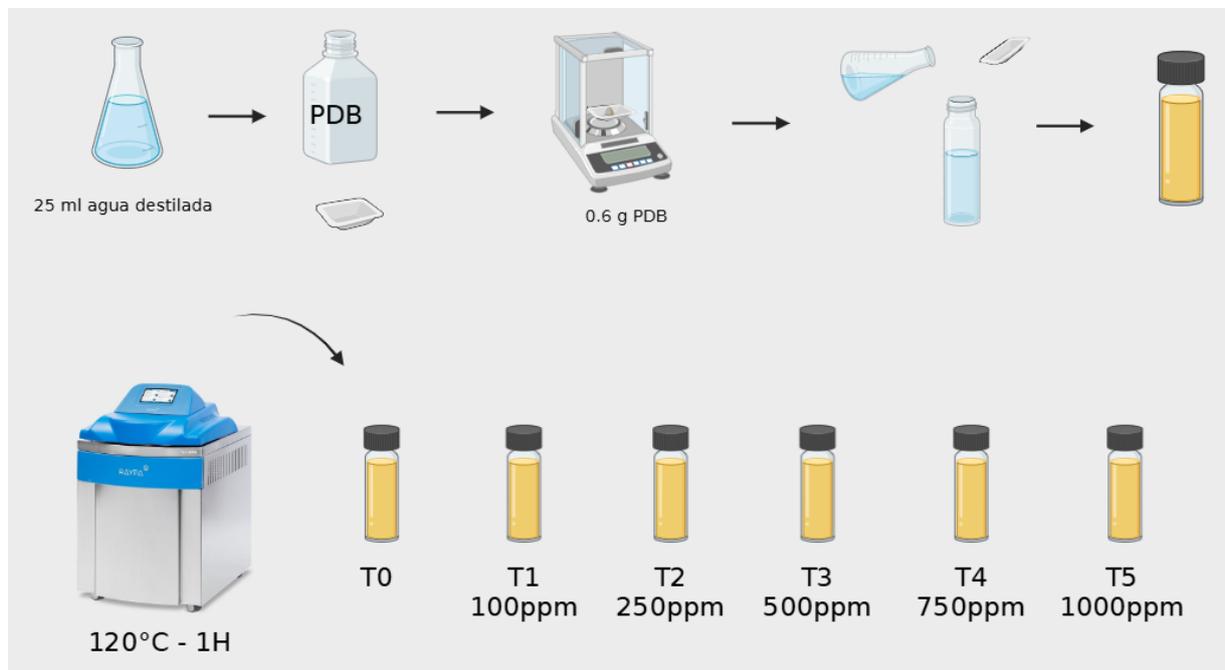
Para cada tratamiento T0, T1 (100ppm), T2 (250 ppm), T3 (500 ppm), T4 (750 ppm) y T5 (1000 ppm) se preparó viales de vidrio con 25 ml de agua de destilada, 0,6 gramos de medio de cultivo PDB y el reactivo con los diferentes metales pesados. Para cada tratamiento T0, T1 (100ppm), T2 (250 ppm), T3 (500 ppm), T4 (750 ppm) y T5 (1000 ppm) se prepararon 4 réplicas. Posterior a ello se procedió a calcular la cantidad de los reactivos necesario para alcanzar la concentración requerida detallado en la siguiente (ver tabla. 4). Con ello, por cada metal pesado se preparó un frasco de medio de cultivo de PDB sin contaminante. Cuando se pesaron las cantidades necesaria de los reactivos, medio de cultivo y se mido el agua destilada se procedió a autoclavar los frascos a 120 grados centígrados por una hora para esterilizarlos.

**Tabla 4.** *Cantidades de reactivos para los tratamientos de plomo, cromo y cadmio en medio de cultivo líquido (PDB).*

<b>Reactivos</b>	<b>T0 (control)</b>	<b>T1 (100ppm)</b>	<b>T2 (250ppm)</b>	<b>T3 (500ppm)</b>	<b>T4 (750ppm)</b>	<b>T5 (1000ppm)</b>
Plomo  Plomo (II) Acetato 3- Hidrato	0 g	0,004 g	0,01 g	0,02 g	0,03 g	0,04 g
Cromo  Potassium dichromate	0 g	0,01 g	0,03 g	0,07 g	0,11 g	0,14 g
Cadmio  Cadmiumchlor id-1-hydrate	0 g	0,004 g	0,01 g	0,02 g	0,03 g	0,04 g

Elaborado por: Gusqui & Martínez, (2024)

**Figura 4.** Preparación de medio líquido (PDB) en viales de 25 ml.

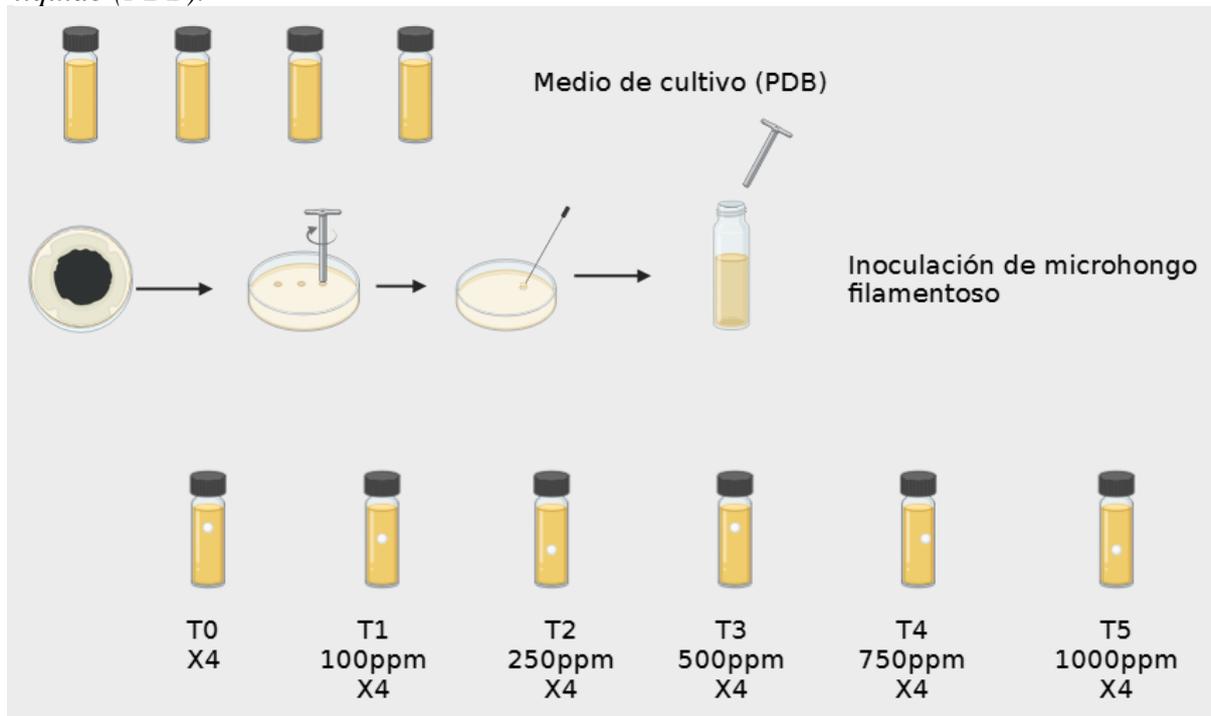


Elaborado por: Gusqui & Martínez (2024)

### 3.5.8. Fase 2: Inoculación del microhongo filamentoso en el medio líquido

Para la inoculación del microhongo filamentoso en el medio líquido se procedió a extraer las muestras de la caja de Petri del aislamiento y con la ayuda del sacabocado de 5 mm se inoculó directamente en los viales sellando el exterior con Parafilm para evitar la contaminación. Todo el procedimiento de la inoculación del microhongo filamentoso en el medio líquido se realizó dentro de la cámara de flujo laminar.

**Figura 5.** Procedimiento de inoculación del microhongo filamentoso en el medio de cultivo líquido (PDB).



**Elaborado por:** Gusqui & Martínez, (2024)

### 3.5.9. Fase 2: Condiciones de incubación

Los viales se colocaron sobre el shaker a 120 rpm, a una temperatura de 28 grados centígrados por los 9 días.

**Figura 5.** *Condiciones de incubación de los viales con el medio líquido.*



**Elaborado por:** (Gusqui & Martínez, 2024)

### ***3.5.10. Fase 2: Control de crecimiento y procesamiento de muestras para obtención de resultados***

Periódicamente se visualizaban todos los viales para descartar contaminación de alguno de ellos. Pasado los 9 días de incubación se procedió a realizar la recolección del micelio de los viales por tratamiento, se utilizó un embudo con papel filtro Whatman #44 por consiguiente se procedió a realizar un lavado con agua desionizada y se colocó el micelio en papel aluminio para secarlo a 105 grados centígrados por 2 horas. Se guardó el sobrenadante de los viales y se pesó el micelio previamente secado para después obtener el resultado de peso seco del hongo.

### ***3.5.11. Fase 3: Identificación del microhongo filamentoso***

#### ***3.5.11.1 Extracción de ADN***

Para la extracción del ADN del microhongo filamentoso se siguió el protocolo de (Cenis, 1992) donde se preparó previamente el buffer de extracción.

**Buffer de extracción****100 ml Tris HCL 1M <sup>1</sup>**

Para la preparación de Tris HCL 1M <sup>1</sup> se disolvió 12,1 g de Tris agorando la probeta con 80 ml de agua ultrapura ajustando el pH a 8.5 con la ayuda de HCL, posterior a ello se llegó a un volumen de 100 ml con agua ultrapura, finalmente se filtró el Tris-HCL con la ayuda de un filtro estéril de 0,22  $\mu$ m.

**100 ml NaCL 5M <sup>2</sup>**

Para la preparación de la solución de cloruro de sodio se midió 80 ml de gua ultrapura disolviendo el cloruro de sodio con la ayuda de un agitador magnético ajustando el volumen a 100 ml con agua ultrapura, finalmente se procedió a esterilizar en la autoclave a 15 psi con 20 minutos.

**100 ml EDTA 200mM <sup>3</sup>**

Se disolvió 1,7 gramos de EDTA con 80 ml de agua ultra destilada, finalmente se aforo la probeta hasta alcanzar un volumen de 100 ml.

**100 ml SDS 10% <sup>4</sup>**

Se peso 10 gramos de SDS en 80 ml de agua desionizada, después se calentó la solución a una temperatura de 40 -50°C para disolver el SDS, finalmente se alcanzó un volumen de 100 ml asegurándonos de que se haya disuelto por completo, no se debe autoclavar.

**100 ml Acetato de Sodio 3M <sup>5</sup>**

Se procedió a preparar la solución a un pH de 5.2. Se agregó 24,61 g de acetato de sodio en 80 ml de agua destilada, para ajustar la solución a un pH de 5.2 se procedió a dejar la solución que se enfríe durante toda la noche, se ajustó el volumen a 100 ml con agua destilada, finalmente se filtró y esterilizó la solución.

Previamente se haya preparado el buffer de extracción se continuo con el proceso procurando preparar la producción de micelio del hongo para la obtención necesaria de biomasa, sembrándola en un medio de cultivo durante una semana e incubada a 27°C.

Utilizando un bisturí se extrajo alrededor de 10mg del micelio, adicionando 350ul del buffer de extracción y por consiguiente se muele con la ayuda de un micro pistilo para estandarizar. Luego, se añadió 150 µL de acetato de sodio con una concentración 3M y un pH de 5.2, mezclando en su totalidad con el vortex para después colocar las muestras en -20°C por 15 minutos. Posteriormente, se centrifugan los tubos a 14000 rpm durante 10 minutos para trasladar el sobrenadante a tubos nuevos. Enseguida, se adicionan 500 µL de isopropanol en cada uno de los tubos, dejando reposar 5 minutos a temperatura ambiente y nuevamente se centrifuga a 14000 rpm, pero esta vez durante 5 minutos. Finalmente se traslada el sobrenadante, colocando 50ul de etanol al 70% para lavar el pellet y se centrifugó a la misma velocidad de 14000 rpm, pero por 2 minutos, se descartó el sobrenadante y se secó al vacío.

El precipitado resultante se reflota con 50 µL de agua destilada estéril.

### ***3.5.11.2 Amplificación***

Para identificar al microhongo filamentoso se procedió a realizar la amplificación de este mediante la PCR convencional, donde se usaron los cebadores ITS1 (5'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') e ITS4 (5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (Vera et al., 2024)

Para las reacciones de la PCR se utilizó 1  $\mu$ L de los cebadores ITS1 e ITS4, 12,5  $\mu$ L de Dream Taq, 10,5  $\mu$ L de agua destilada, 1  $\mu$ L de muestra de ADN (Özdoğan et al., 2022).

Se ajustaron los ciclos en el termociclador *AirClean 600 PCR Workstation – AirClean Systems* a 1 ciclo a 94 °C por 7 min, 35 ciclos 94 °C por 1 min, 60 °C por 1 min, 72 °C por 1 min, finalmente se dejó la muestra a 72 °C por 10 minutos (Vera et al., 2024).

### ***3.5.11.3 Electroforesis en gel agarosa***

Para la preparación del gel de agarosa nos basamos en el protocolo según (Yepez et al., 2022) donde se preparó en 90 ml de buffer TAE 0,5X, 1,63 g de agarosa con 8  $\mu$ L de SYBR Safe, obteniendo el gel de agarosa al 1%, luego de la solidificación se utilizó 5  $\mu$ L de la muestra de la PCR, aplicando el marcador molecular de 100 pb. La corrida se dio en a 150 voltios por 40 minutos, posterior a ello se observaron los resultados en el *Invitrogen™ Transiluminador de luz azul/blanca de LED doble*.

### ***3.5.11.4 Análisis de calidad de ADN***

El análisis de cantidad y la calidad obtenida del ADN se realizó mediante espectrofotometría, a una longitud de onda de A 260/280 y A 260/230 mm colocando 1  $\mu$ L de muestra en el equipo *NanoDrop 2000 Thermo Scientific* (Sandoval et al., 2017).

### ***3.5.11.5 Secuenciación***

Previamente analizada la calidad de la muestra obtenida de la PCR se procedió preparar las mismas para ser enviadas a la empresa *Psomagen Inc, Estados Unidos*, donde se secuenció la muestra utilizando el método de Sanger.

### **3.5.11.6 Análisis filogenético**

Para el análisis filogenético del hongo se procedió a realizar un proceso de comparativo de los resultados de la secuenciación con la base de datos NCBI, donde se pudo escogieron 10 secuencias con una similitud del 100% con la secuencia de interés.

El alineamiento de las secuencias que mostraron similitud y la secuencia de interés se realizó en el programa MEGA 11, usando *Clustal W Multiple Alignment* se construyó el árbol filogenético. Se utilizó el método *Neighbor-joining tree* dentro del programa MEGA 11 para el cálculo de las distancias evolutivas de las especies encontradas dentro de la base de datos NCBI y la secuenciación de interés (Tamura et al., 2021).

### **3.5.12 Análisis de datos estadísticos**

Para el análisis de las fluctuaciones significativas en el crecimiento en cada día se procedió a obtener el error estándar de cada uno de los tratamientos en cada día, obteniendo así la variabilidad que se presentaba. Por consiguiente, se aplicó la prueba de rangos múltiples de Duncan en el programa *InfoStat* para obtener así los tratamientos que eran distintos entre sí. El análisis estadístico fue aplicado para los datos obtenidos del medio líquido y medio sólido.

## **Capítulo 4**

### **Resultados y Discusiones**

#### **4.1 Análisis estadístico**

##### **4.1.1 Evaluación de crecimiento radial en medio sólido de microhongo filamentoso bajo condiciones in vitro**

###### **Plomo**

Se analizó el crecimiento radial del microhongo filamentoso durante 9 días en los diferentes tratamientos (T0, T1, T2, T3, T4, T5) con las respectivas réplicas, realizando la

medición en milímetros, del centro hacia el crecimiento del hongo tomando de referencia 4 lados de la caja de Petri. Se procedió a realizar una tabla en Excel para posterior realizar un análisis estadístico de los datos en *InfoStat* (ver figura 6).

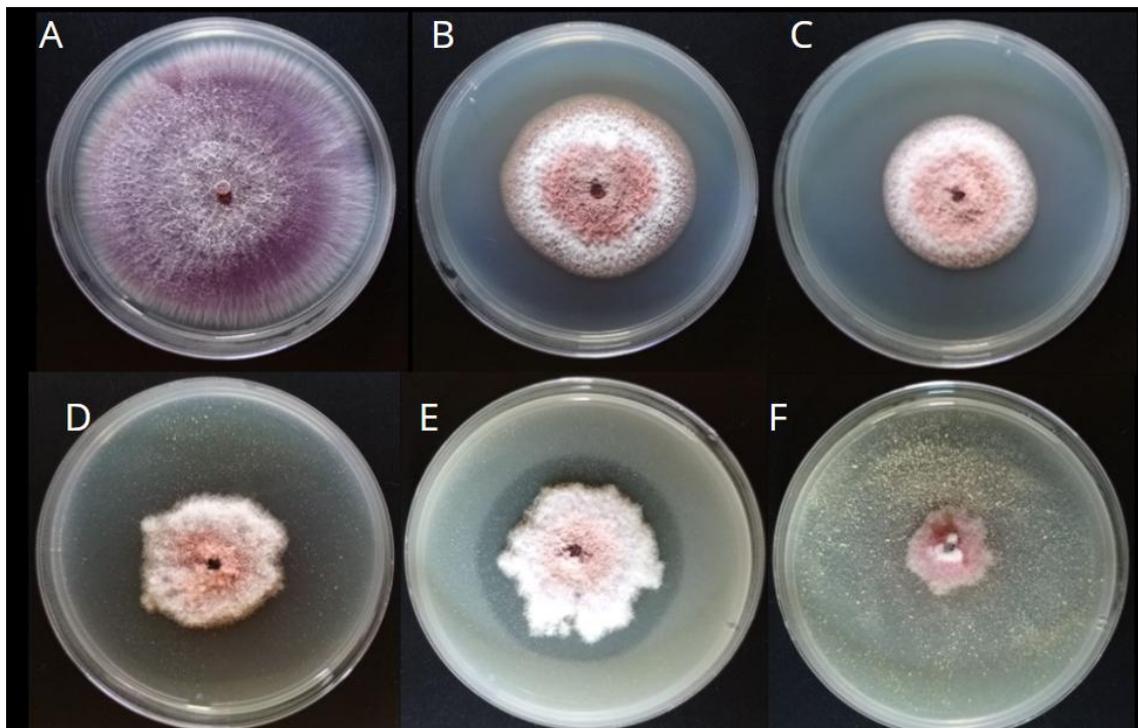
**Figura 6.** Crecimiento radial del microhongo filamentoso en medio sólido (PDA).

Tratamientos	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9
T0 (c)	2,06±0,1c	6±0 d	9±0 e	12±0 d	14,37±0,6 d	17,5±0,7 d	21,25±0,7 d	24,18±1 d	31±0,9 d
T1 (b, c)	1,56±0,4 b	4±0 c	7±0 d	9,5±0 c	11,87±0,4 c	13,93±0,4 c	17±0,5 c	19,12±0,9 c	23,06±1 c
T2 (a, b, c)	1±0 a	4±0 c	7±0 d	9±0 c	10,5±0 b, c	12,25±0,6 b, c	14,75±0,5 b, c	17,5±1 b, c	21,43±0,7 b, c
T3 (a, b)	1±0 a	4±0 c	6±0 c	8±0 b, c	9,33±0,3 b	10,91±0,6 b	12,33±0,7 b	13,5±0,7 b	15,16±0,7 a, b
T4 (a, b)	1±0 a	2,68±0,1 b	5±0 b	7,12±0,5 b	9,75±0,8 b	11,12±0,8 b	12,87±1 b	14,62±1 b, c	17,5±2 b, c
T5 (a)	1±0 a	2±0 a	2±0 a	3,68±0,1 a	5,93±0,6 a	6,62±0,7 a	7,81±0,8 a	8,81±0,5 a	9,56±1 a

**Nota.** La figura 6 muestra el crecimiento diario por 9 días del microhongo filamentoso en concentraciones de 100 ppm (T1), 250 ppm (T2), 500 ppm (T3), 750 ppm (T4), 1000 ppm (T5) y el control (T0) de plomo. Los valores representan la media  $\pm$  de la desviación estándar, las letras (a, b, c, d) representan las diferencias significativas según la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ ).

Al cabo de los 9 días T5 y T0 no presentan relación con los demás tratamientos, perteneciendo a los grupos (a) y (c) respectivamente, los tratamientos T3 y T4 pertenecen a los grupos (a, b) refiriéndose a que no son significativamente diferentes del T5 (a) y T2 (a, b, c). El tratamiento 1 (b, c) no es significativamente diferente de T2 (a, b, c) y T0 (c), el tratamiento T2 pertenece a los grupos (a, b, c) haciendo referencia a que no es significativamente diferente de T3 (a, b) y T4 (a, b) ni de T1 (b, c).

**Figura 7.** Resistencia del microhongo filamentoso en 5 concentraciones diferentes de plomo y el control después de 9 días de incubación en PDA.

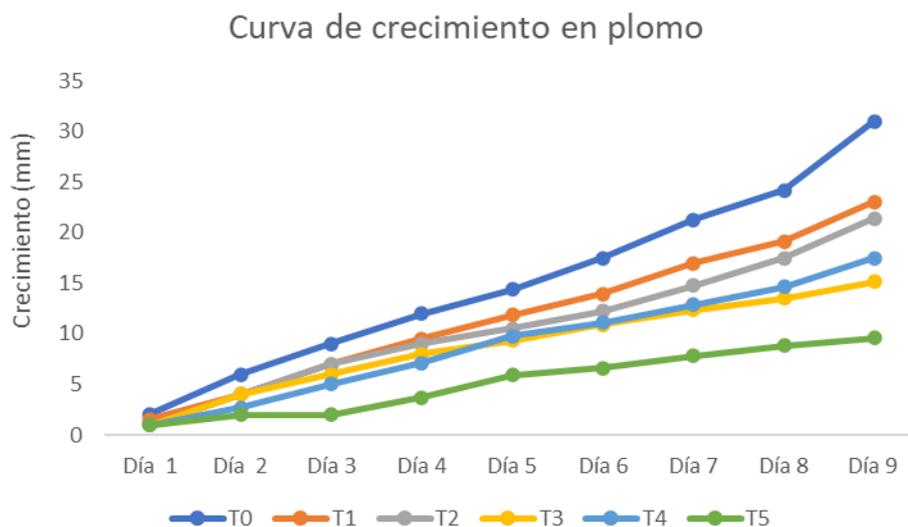


**Nota.** La figura 7 muestra el crecimiento del microhongo filamentoso sin concentraciones del metal pesado plomo (A), y en presencia de plomo a 100 ppm (B), 250 ppm (C), 500 ppm (D), 750 ppm (E) y 1000 ppm (F).

**Elaborado por:** Gusqui & Martínez, (2024)

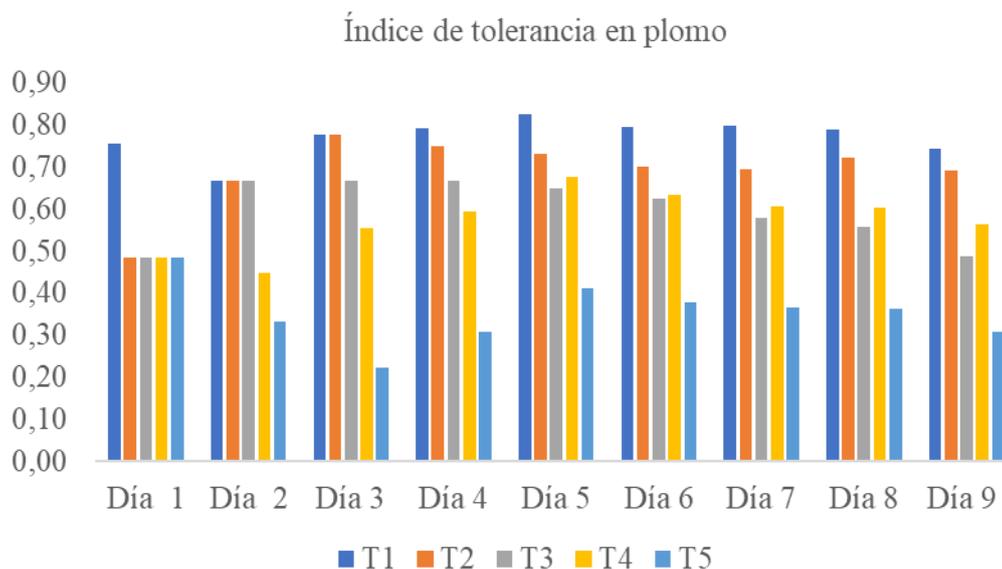
En base a la dinámica de crecimiento vemos que el T0 tiene un crecimiento de forma constante y rápida, a diferencia del crecimiento de los demás tratamientos, y al octavo día comienza a tener una dinámica exponencial. Los T1 y T2 llevan una dinámica de crecimiento similar, el T3 presenta un crecimiento constante a lo largo del tiempo, pero un poco más lento a diferencia de T0, T1 y T2. La dinámica de crecimiento que lleva T4, aunque su crecimiento es constante indicando un rendimiento intermedio, y finalmente el tratamiento 5 es más lento a diferencia de todos los demás tratamientos, para la curva del tratamiento T5 muestra una forma más aplanada a diferencia de los demás tratamientos (ver figura 8).

**Figura 8.** Curva de crecimiento de los tratamientos T0, T1, T2, T3, T4 y T5 en los 9 días de exposición a plomo pesado en PDA.



**Elaborado por:** Gusqui & Martínez, (2024)

Los resultados obtenidos del índice de tolerancia muestran que el tratamiento T1 presenta valores altos en casi todos los días, tratamiento 2 y el tratamiento 3 muestra una tolerancia significativa, manteniendo cierta estabilidad. Los tratamientos 4 y 5 presentan niveles bajos de tolerancia (ver figura 9).

**Figura 9.** Índice de tolerancia del microhongo filamentoso en concentraciones de plomo.

**Elaborado por:** Gusqui & Martínez, (2024)

### Cromo

Se analizó el crecimiento radial del microhongo filamentoso durante 9 días en los diferentes tratamientos (T0, T1, T2, T3, T4, T5) con las respectivas replicas, realizando la medición en milímetros, del centro hacia el crecimiento del hongo tomando de referencia 4 lados de la caj de Petri. Se procedió a realizar una tabla en Excel para posterior realizar un análisis estadístico de los datos en *InfoStat* (ver figura 10).

**Figura 10.** Crecimiento radial de macrohongo en medio sólido (PDA) con cromo.

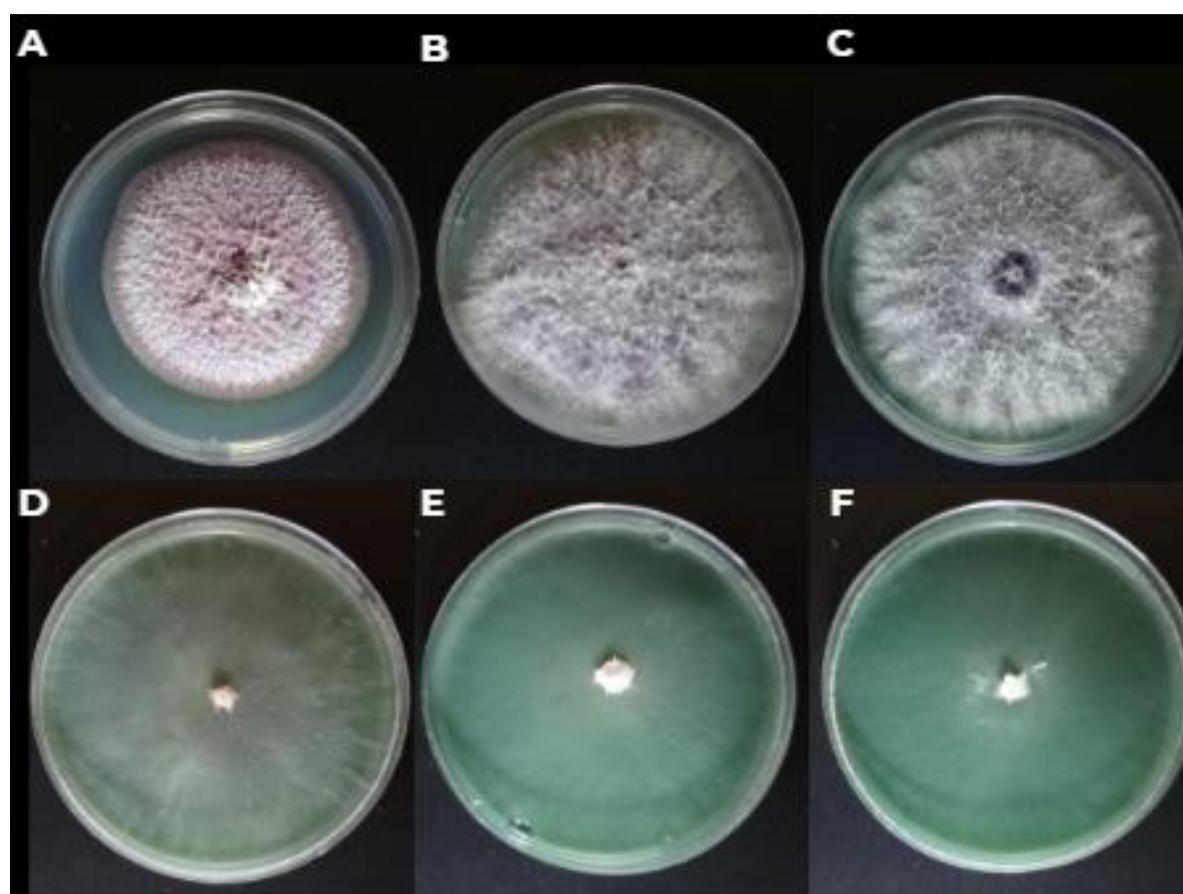
Tratamientos	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9
T0 (a)	2±0	6±0 a	10±0 a	13±0 a	15,44±0 a	18,25±1,05 a	22,94±1,18 a	27,25±0,91 a	32,94±1,33 a
T1 (a)	3±0	8±0 c	13,06±0,13 c	18,75±0 c	22,06±0,85 b, c	26,63±1 c	32,25±0,90 c	37,31±1,68 b	45±0 b
T2 (a)	3±0	8±0 c	12,88±0,25 c	16,81±0,38 b	19,94±1,38 b	23,50±1,66 b	28,25±2,29 b	36,50±1,65 b	42,81±1,57 b
T3 (a)	3±0	8,13±0,14 c	13,88±1,14 d	19,75±0 c	23,19±0,63 c	28,00±0,83 c	34,38±1,04 c	40,25±1,53 c	45±0 b
T4 (a)	3±0	7±0 b	12±0 b	17±0 b	21,38±0,61 b, c	26,19±0,62 b, c	32,38±0,58 c	38,13±2,17 b, c	45±0 b
T5 (a)	3±0	8±0 c	13±0 c	18,25±0 b, c	22,31±0,75 c	26,88±0,70 c	33,38±1,28 c	38,31±0,81 b, c	45±0 b

**Nota.** La figura muestra el crecimiento diario por 9 días, de microhongo filamentoso en concentraciones de 100 ppm (T1), 250 ppm (T2), 500 ppm (T3), 750 ppm (T4), 1000 ppm (T5)

y el control (T0) de cromo. Los valores representan la media  $\pm$  de la desviación estándar, las letras representan las diferencias significativas según la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ ).

Al cabo de los días, todos los tratamientos (T0, T1, T2, T3, T4, y T5) no demostraron diferencias significativas en relación con la media del crecimiento diario.

**Figura 12.** Resistencia del microhongo filamentoso en 5 concentraciones diferentes de cromo después de 9 días de incubación en PDA.

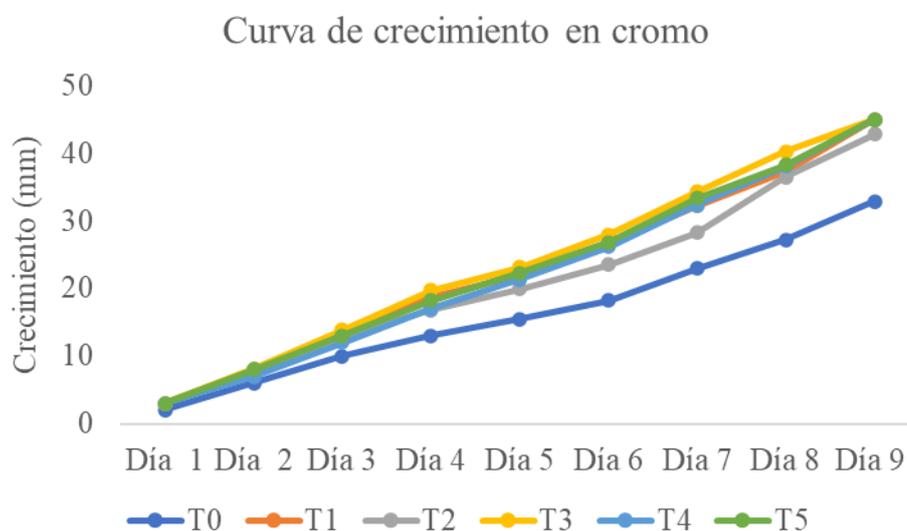


**Nota.** La figura 12 muestra el crecimiento del microhongo filamentoso sin concentraciones del metal pesado cromo (A), y en presencia de plomo a 100 ppm (B), 250 ppm (C), 500 ppm (D), 750 ppm (E) y 1000 ppm (F).

**Elaborado por:** Gusqui & Martínez, (2024)

En base a la dinámica de crecimiento del microhongo filamentoso muestra un crecimiento que va aumentando a lo largo del tiempo. El tratamiento de control muestra un crecimiento lento a diferencia de los demás tratamientos demostrando que el tratamiento 1, tratamiento 2 y el tratamiento 4 muestran una dinámica de crecimiento similar, a diferencia del tratamiento 3 y tratamiento 5 que muestran una curva que alcanza valores más altos (ver figura 11).

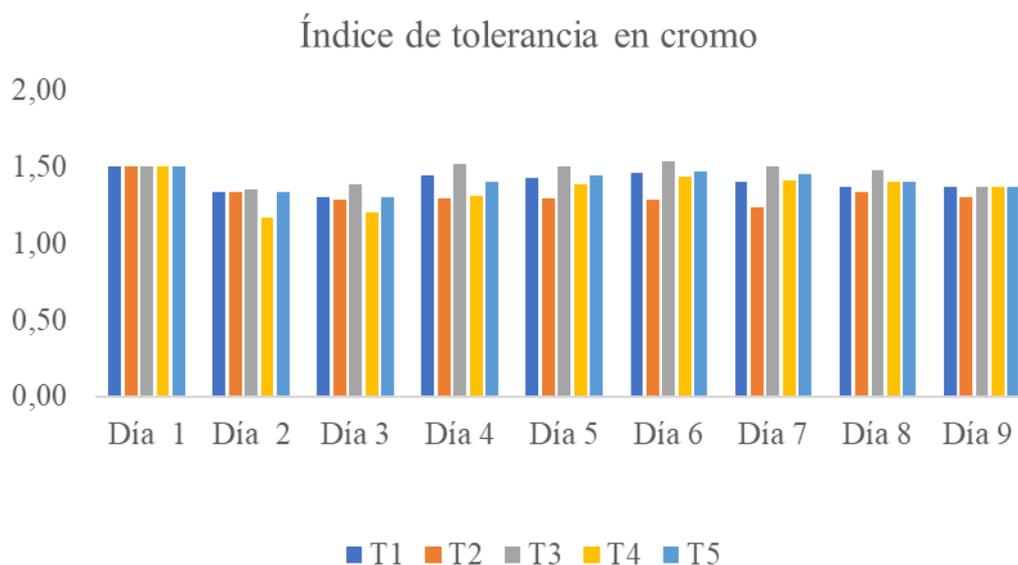
**Figura 11.** Curva de crecimiento de los tratamientos T0, T1, T2, T3, T4 y T5 en los 9 días de exposición a cromo pesado en PDA.



**Elaborado por:** Gusqui & Martínez, (2024)

De acuerdo con los resultados del índice de tolerancia todos los tratamientos de cromo a lo largo de los 9 días mostraron un índice de tolerancia mayor a 1 indicando que el microhongo filamentoso muestra una alta adaptación o mecanismos de biorremediación contra el cromo (ver figura 12).

**Figura 12.** Índice de tolerancia del microhongo filamentoso en concentraciones de cromo.



**Elaborado por:** Gusqui & Martínez, (2024)

### Cadmio

Se analizó el crecimiento radial del microhongo filamentoso durante 9 días en los diferentes tratamientos (T0, T1, T2, T3, T4, T5) con las respectivas replicas, realizando la medición en milímetros, del centro hacia el crecimiento del hongo tomando de referencia 4 lados de la caj de Petri. Se procedió a realizar una tabla en Excel para posterior realizar un análisis estadístico de los datos en *InfoStat* (ver figura 13).

**Figura 13.** Crecimiento radial de macrohongo en medio sólido (PDA) con cadmio.

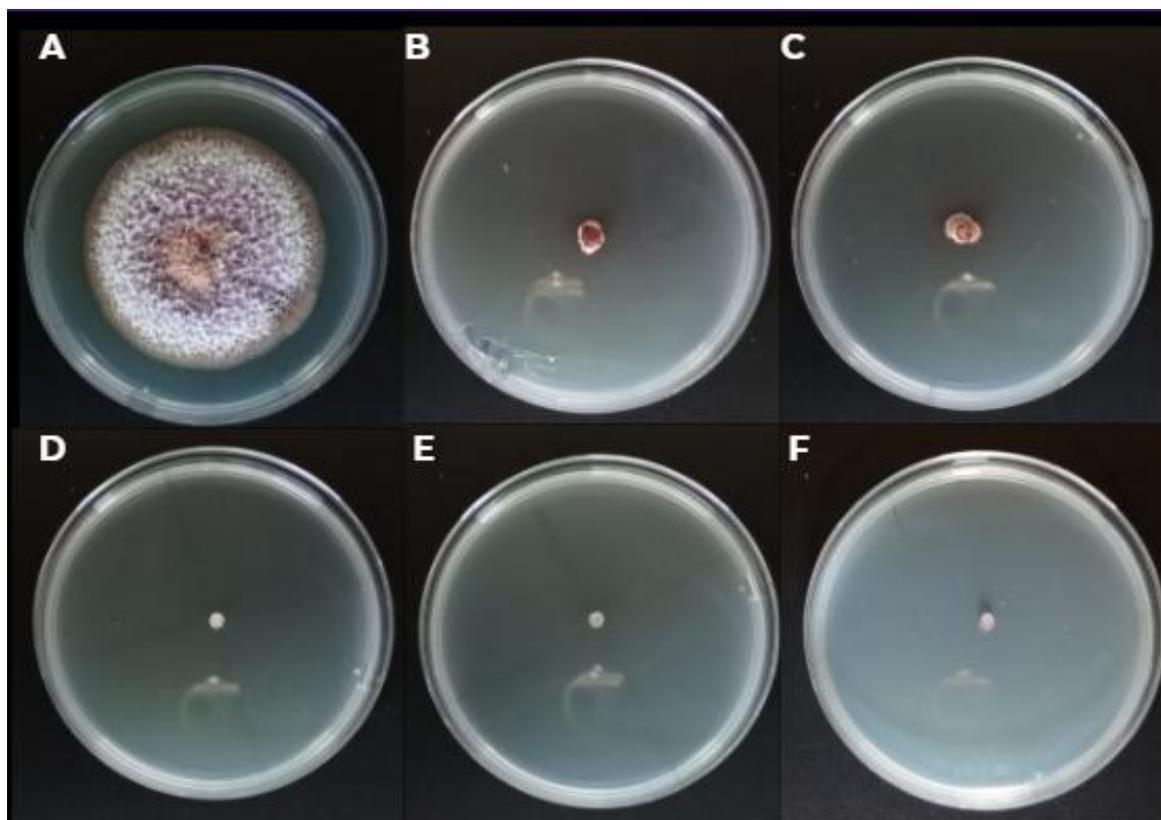
Tratamientos	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9
T0 (b)	2±0	6±0	9±0	12,75±0 b	14,63±0,75 b	17,56±0,68 b	21,06±0,83 b	24,88±1,95 b	29,69±1,80 b
T1 (a)	0	0	0	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
T2 (a)	0	0	0	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
T3 (a)	0	0	0	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
T4 (a)	0	0	0	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
T5 (a)	0	0	0	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a

**Nota.** La figura muestra el crecimiento diario por 9 días, de microhongo filamentoso en concentraciones de 100 ppm (T1), 250 ppm (T2), 500 ppm (T3), 750 ppm (T4), 1000 ppm (T5)

y el control (T0) de cadmio. Los valores representan la media  $\pm$  de la desviación estándar, las letras representan las diferencias significativas según la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ ).

Al cabo de los 9 días el tratamiento T0 pertenece al grupo (b), y los demás tratamientos T1, T2, T3, T4, y T5 pertenecen al grupo (a) demostrando que existe diferencia significativa con relación a la media de crecimiento.

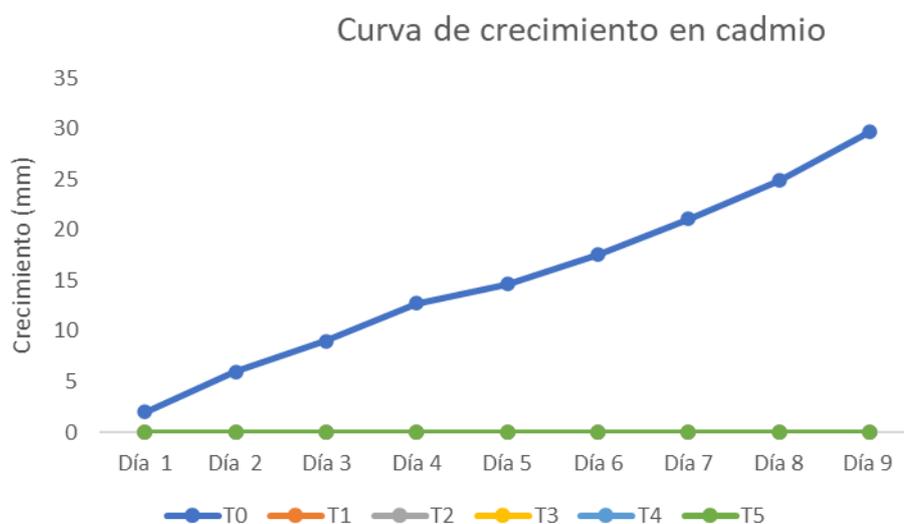
**Figura 16.** Resistencia del microhongo filamentoso en 5 concentraciones diferentes de cadmio después de 9 días de incubación en PDA.



**Nota.** La figura 16 muestra el crecimiento del microhongo filamentoso sin concentraciones del metal pesado cadmio (A), y en presencia de plomo a 100 ppm (B), 250 ppm (C), 500 ppm (D), 750 ppm (E) y 1000 ppm (F).

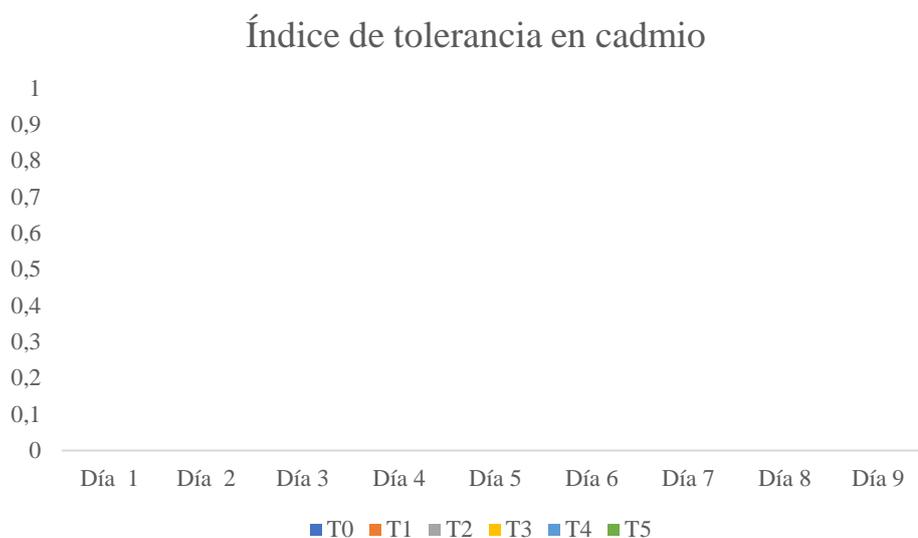
De acuerdo con la dinámica de crecimiento del microhongo filamentoso para los tratamientos T1, T2, T3, T4 y T5 no mostraron crecimiento en comparación con el grupo de control que si existió crecimiento a lo largo de los 9 días (ver figura 14).

**Figura 14.** Curva de crecimiento de los tratamientos T0, T1, T2, T3, T4 y T5 en los 9 días de exposición a cadmio pesado en PDA.



**Elaborado por:** Gusqui & Martínez, (2024)

Los datos obtenidos del índice de tolerancia del microhongo filamentoso para las concentraciones de cadmio fue nulo lo que demuestra una ausencia total de tolerancia (ver figura 15).

**Figura 15.** Índice de tolerancia del microhongo filamentoso en concentraciones de cadmio.

**Elaborado por:** Gusqui & Martínez, (2024)

### Porcentaje de inhibición

El análisis de los datos del porcentaje de inhibición de los diferentes tratamientos de los 3 metales pesados de plomo, cromo y cadmio, para los tratamientos de cadmio se mostró un inhibición del 100%, para los tratamientos de plomo los porcentajes de inhibición se encuentran en un 21% a 64% de inhibición dependiendo de la concentración de los tratamientos, los porcentajes de inhibición para los diferentes tratamientos de cromo indican que el cromo no tuvo influencia sobre el crecimiento del microhongo filamentoso en los 5 tratamientos con las concentraciones de (100 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm y 1000 ppm) respectivamente con un porcentaje de inhibición del 0% (ver tabla 5).

**Tabla 5.** Porcentaje de inhibición del microhongo filamentoso en plomo, cromo y cadmio.

**Tratamiento**

**Porcentaje de inhibición**

---

---

	Pb	Cr	Cd
T1	21,91%	0%	100%
T2	29,07%	0%	100%
T3	41,24%	0%	100%
T4	38,55%	0%	100%
T5	64,34%	0%	100%

---

**Elaborado por:** (Gusqui, Martínez, 2024)

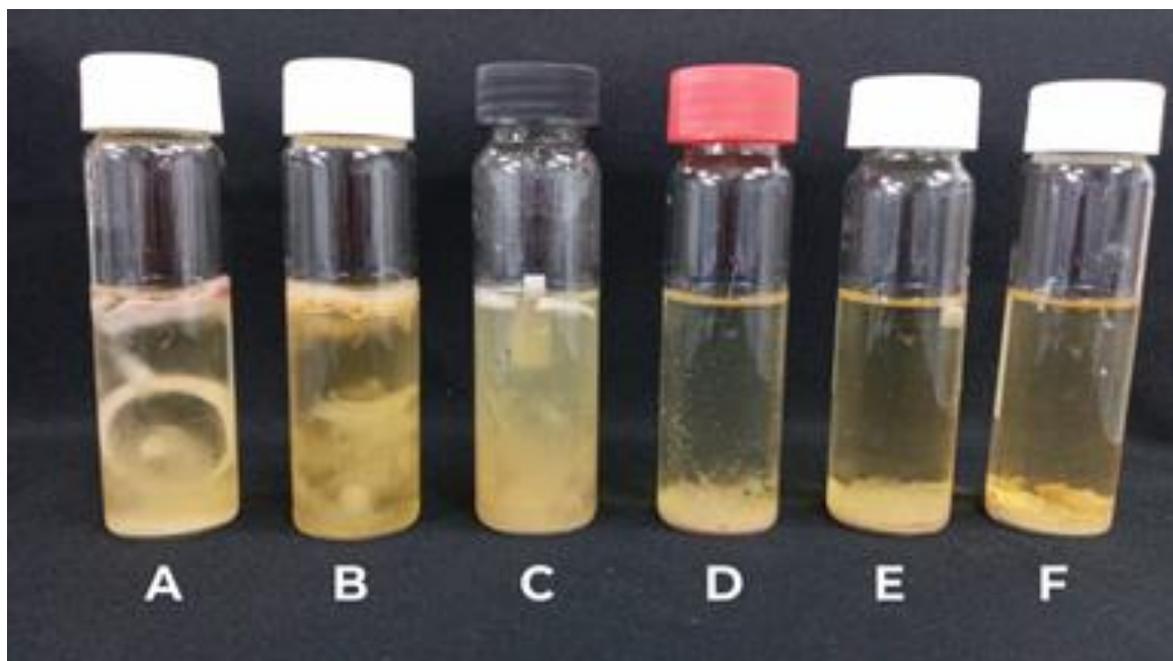
#### **4.1.2 Evaluación de crecimiento de microhongo filamentoso en medio líquido bajo condiciones in vitro**

Se recolecto el micelio de los viales de las diferentes concentraciones de metales pesados para posterior análisis de los pesos, se mantuvo los viales durante 9 días.

##### **Plomo**

Al finalizar los 9 días de exposición del microhongo filamentoso a el medio líquido y las réplicas por cada tratamiento se procedió a realizar un filtrado de los medios para la obtención de la biomasa de cada una (ver tabla 6).

**Figura 19.** Resistencia del microhongo filamentoso en 5 concentraciones diferentes de plomo después de 9 días de incubación en PDB.



**Nota.** La figura 19 muestra el crecimiento del microhongo filamentoso sin concentraciones del metal pesado plomo (A), y en presencia de plomo a 100 ppm (B), 250 ppm (C), 500 ppm (D), 750 ppm (E) y 1000 ppm (F).

**Tabla 6.** Peso de micelio seco del microhongo filamentoso de medio líquido en plomo.

<b>Plomo</b>	<b>Peso (g)</b>
T0 (a)	0,0032±0
T1 (a)	0,0111±0,01
T2 (a)	0,0050±0
T3 (a)	0,0138±0,01
T4 (a)	0,0058±0
T5 (a)	0,0072±0

**Nota.** El peso de la biomasa en gramos del medio cultivo de los tratamientos T0, T1, T2, T3, T4 y T5 con plomo está representada en gramos (Peso). Los valores representan la media ± del

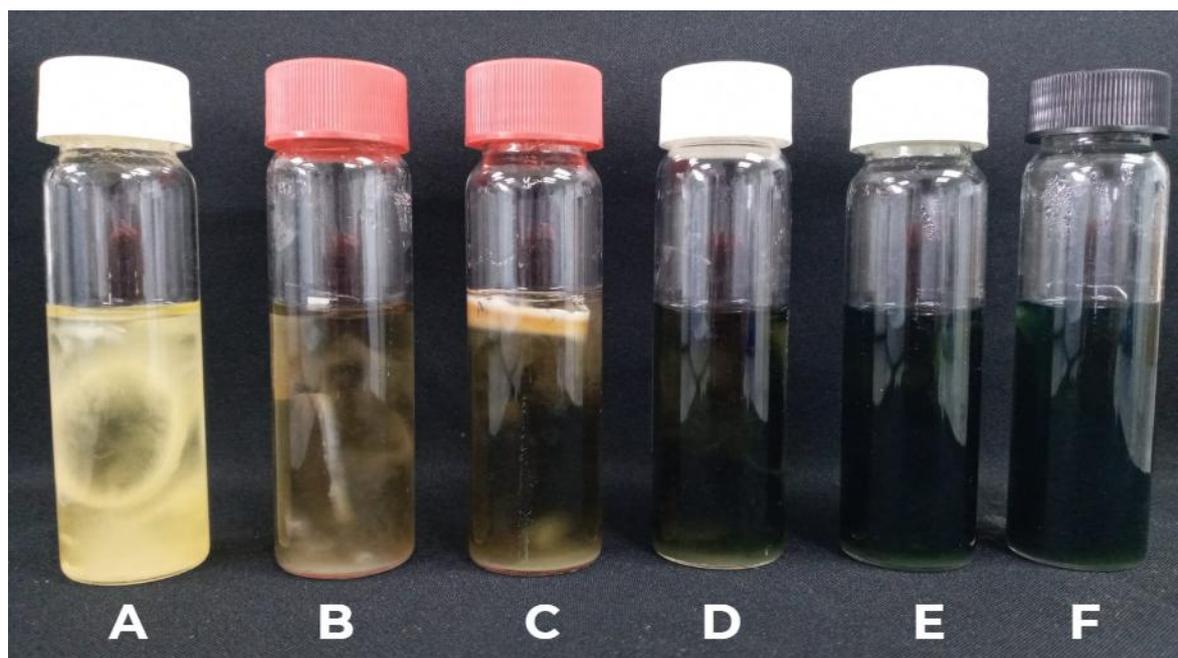
error estándar, las letras representan las diferencias significativas según la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ ).

Los tratamientos se presentan como grupos homogéneos, sin diferencias significativas entre sí.

### Cromo

Al finalizar los 9 días de exposición del microhongo filamentoso a el medio líquido y las réplicas por cada tratamiento se procedió a realizar un filtrado de los medios para la obtención de la biomasa de cada una (ver tabla 7).

**Figura 20.** Resistencia del microhongo filamentoso en 5 concentraciones diferentes de cromo después de 9 días de incubación en PDB.



**Nota.** La figura 20 muestra el crecimiento del microhongo filamentoso sin concentraciones del metal pesado cromo (A), y en presencia de plomo a 100 ppm (B), 250 ppm (C), 500 ppm (D), 750 ppm (E) y 1000 ppm (F).

**Tabla 7.** *Peso de micelio seco del microhongo filamentoso de medio líquido en cromo.*

Cromo	Peso (g)
T0 (a)	0,0423±0,03
T1 (a)	0,0399±0,01
T2 (a)	0,0455±0,04
T3 (a)	0,0359±0,03
T4 (a)	0,0298±0
T5 (a)	0,0187±0,02

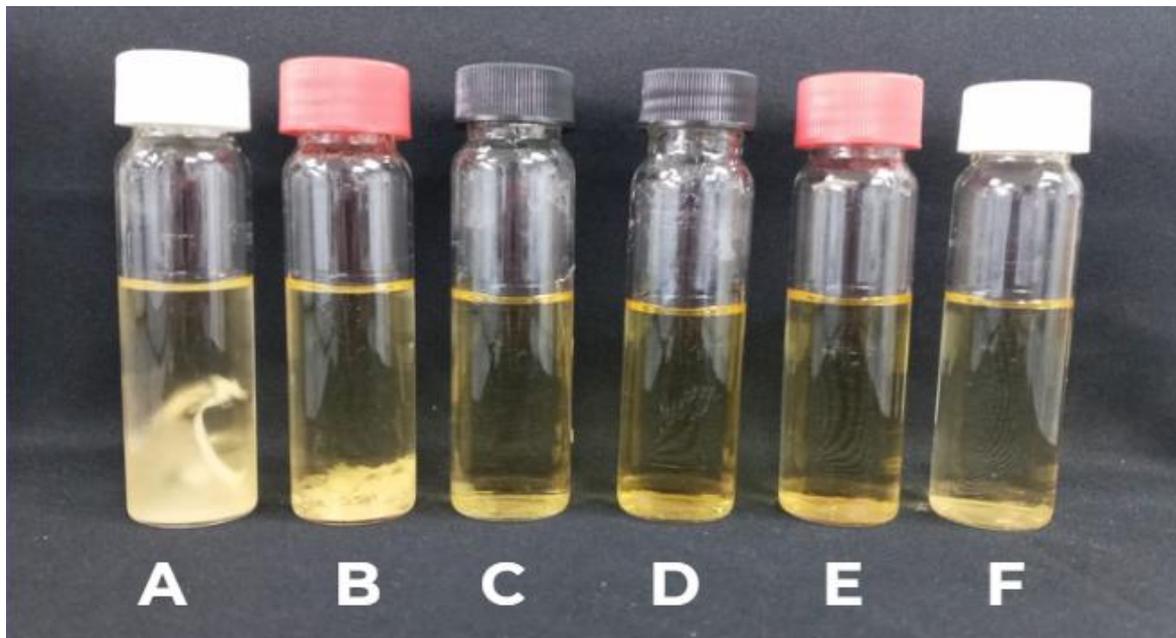
**Nota.** El peso de la biomasa en gramos del medio cultivo de los tratamientos T0, T1, T2, T3, T4 y T5 con cromo está representada en gramos (Peso). Los valores representan la media ± del error estándar, las letras representan las diferencias significativas según la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ ).

Los tratamientos se presentan como grupos homogéneos, sin diferencias significativas entre sí.

### **Cadmio**

Al finalizar los 9 días de exposición del microhongo filamentoso a el medio líquido y las réplicas por cada tratamiento se procedió a realizar un filtrado de los medios para la obtención de la biomasa de cada una (ver tabla 8).

**Figura 21.** Resistencia del microhongo filamentoso en 5 concentraciones diferentes de cadmio después de 9 días de incubación en PDB.



**Nota.** La figura 21. muestra el crecimiento del microhongo filamentoso sin concentraciones del metal pesado cadmio (A), y en presencia de cadmio a 100 ppm (B), 250 ppm (C), 500 ppm (D), 750 ppm (E) y 1000 ppm (F).

Elaborado por: Gusqui & Martínez, (2024)

**Tabla 8.** Peso de micelio seco del microhongo filamentoso de medio líquido en cadmio.

<b>Cadmio</b>	<b>Peso (g)</b>
T0 (b)	0,0175±0,01
T1 (b)	0,0120±0
T2 (a)	0±0
T3 (a)	0±0
T4 (a)	0±0
T5 (a)	0±0

**Nota.** El peso de la biomasa en gramos del medio cultivo de los tratamientos T0, T1, T2, T3, T4 y T5 con cadmio está representada en gramos (Peso). Los valores representan la media ±

del error estándar, las letras representan las diferencias significativas según la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ ).

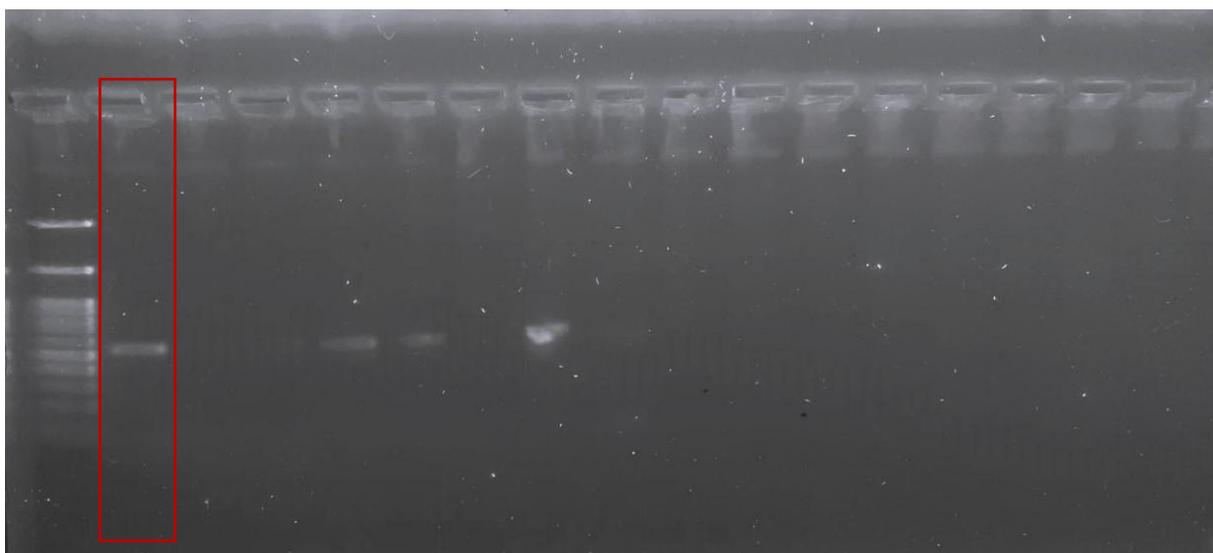
Los tratamientos T2, T3, T4 y T5 se presentan como grupos homogéneos, sin diferencias entre sí, pero con diferencias significativas con relación al tratamiento T0 y T1.

## 4.2 Identificación de microhongo filamentoso

### 4.2.1 Electroforesis

Posterior a la amplificación del ADN del microhongo filamentoso se realizó el corrido en el gel de electroforesis donde se pudo evidenciar que se amplificó al gen correctamente, en la figura 16, se observó que efectivamente el proceso se realizó de forma correcta.

**Figura 16.** *Corrida del ADN en gel de agarosa.*



**Nota.** Se muestra una correcta amplificación del microhongo filamentoso.

### 4.2.2 Limpieza y alineamiento de secuenciación

La secuencia que se recibió fue bastante buena, solo se eliminaron ruidos iniciales y finales con el programa *genus1023812093821*. Por consiguiente, se procedió a usar la base de datos del NCIBI para identificar las especies similares a nuestra muestra y poder realizar la construcción del árbol filogenético, se identificaron 10 especies todas pertenecientes al género *Fusarium* con un porcentaje de similitud del 100 %, el 70% represento al microhongo

filamentoso *Fusarium verticillioides*, y el 30% estaba comprendido de las especies *Fusarium oxysporum f. sp. Ciceris*, *Fusarium subglutinans* y de forma general a *Fusarium sp* (ver tabla 9).

**Tabla 9.** Resultados del BLASTn de la secuenciación del ADN.

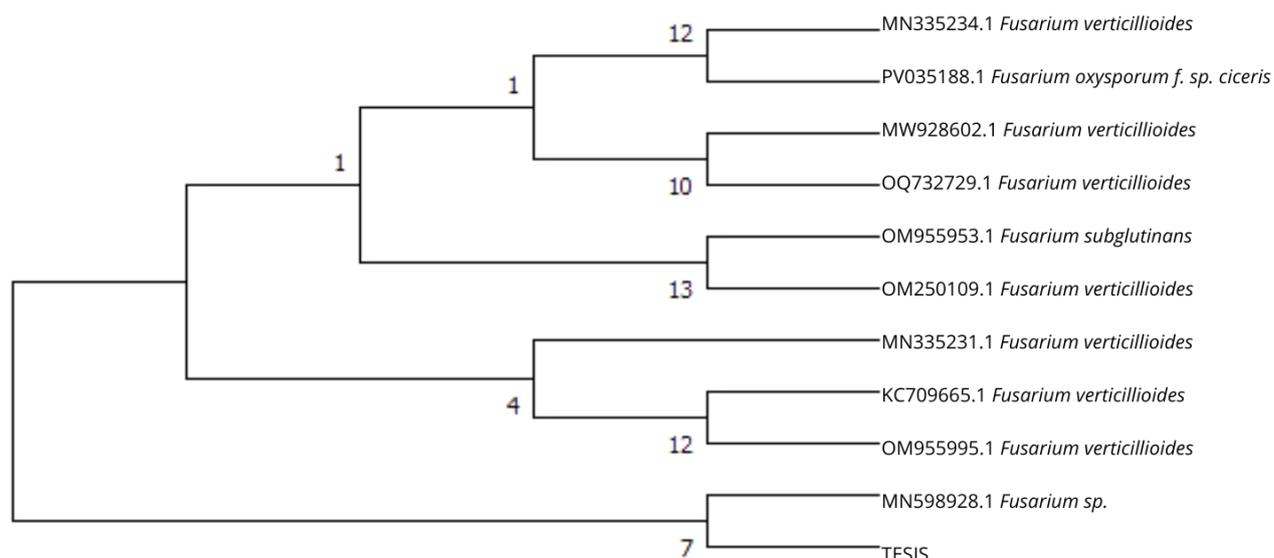
Nombre científico	Máxima puntuación	Puntuación total	Query Cover	E value	% de identidad	Acc. Len	Código
<i>[Gibberella] fujikuroi var. moniliformis</i>	990	990	100%	0.0	100.00%	545	KC709665.1
<i>Fusarium verticillioides</i>	990	990	100%	0.0	100.00%	550	MN335234.1
<i>Fusarium sp.</i>	990	990	100%	0.0	100.00%	538	MN598928.1
<i>Fusarium verticillioides</i>	990	990	100%	0.0	100.00%	548	MW928602.1
<i>Fusarium verticillioides</i>	990	990	100%	0.0	100.00%	548	MN335231.1
<i>Fusarium subglutinans</i>	990	990	100%	0.0	100.00%	553	OM955953.1
<i>Fusarium verticillioides</i>	990	990	100%	0.0	100.00%	553	OM955995.1
<i>Fusarium verticillioides</i>	990	990	100%	0.0	100.00%	546	OM250109.1
<i>Fusarium oxysporum f. sp. ciceris</i>	990	990	100%	0.0	100.00%	550	PV035188.1
<i>Fusarium verticillioides</i>	990	990	100%	0.0	100.00%	547	OQ732729.1

**Elaborado por:** Gusqui & Martínez, (2024)

#### 4.2.3 Construcción del árbol filogenético

En base a la gráfica obtenida del árbol filogenético, muestra que el microhongo filamentoso pertenece al género *Fusarium*, pero se presenta como la especie más divergente al resto sin lograr identificar su especie con exactitud, las demás secuencia se presentan una estrecha relación entre sí (ver figura 17).

**Figura 17.** Árbol filogenético.



**Elaborado por:** Gusqui & Martinez, (2024)

## Capítulo 5

### Conclusiones y Recomendaciones

#### 5.1. Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos de la evaluación del crecimiento en medio sólido el microhongo filamentoso presento un alto índice de tolerancia para cromo con una dinámica de crecimiento inusual entre los tratamientos y el control, donde se evidenció que en el control el microhongo filamentoso creció menos que en los tratamientos, concluyendo que utilizó al cromo como estimulante para su crecimiento. La dinámica de crecimiento en los medios sólidos contaminados con plomo demostraron que presentan una ligera tolerancia, los mejores tratamientos fueron los que tenían concentraciones de 100 ppm, 250 ppm y 750 ppm con un porcentaje de inhibición de un 21% - 38% considerándolo como tolerante al plomo, y por último, en los tratamientos de cadmio no se visualizó crecimiento, el índice de tolerancia fue de 0, presento una alta sensibilidad a medios contaminados con cadmio inhibiendo completamente su crecimiento.

En base a los resultados que se obtuvieron del crecimiento del microhongo filamentoso en los medios líquidos contaminados podemos concluir que efectivamente el microhongo filamentoso presenta una alta sensibilidad para cadmio, pero se produjo el crecimiento de biomasa en el tratamiento 1 (100 ppm) pudiendo ser por el contacto más uniforme con el medio demostrando una capacidad de tolerancia para concentraciones de 100 ppm. Para los demás tratamientos de plomo y cromo durante el desarrollo se presentaron dificultades en cuanto a la metodología de obtención de biomasa, quedándose adherida la mayor parte de la biomasa en el aluminio donde fue secada, por esta razón los datos obtenidos no presentan precisión.

De acuerdo con los resultados de la secuenciación y la construcción del árbol filogenético se logró identificar el género del microhongo filamentoso como *Fusarium*, se utilizaron los primers ITS1 e ITS 4, a consecuencia de que era primers muy generales no se logró identificar a la especie.

## **5.2. Recomendaciones**

Debido a que el microhongo filamentoso en ensayos in vitro presentó una alta tolerancia a medios contaminados con cromo, se recomienda realizar ensayos de adaptación a gran escala que simulen las condiciones ambientales contaminadas para futuras aplicaciones de micorremediación incluyendo la aplicación de biomarcadores para el seguimiento de la actividad metabólica.

Se recomienda mejorar la metodología de secado y filtrado a causa de la falta de precisión de resultados en medio líquido, también, el análisis ICP-OES para la identificación y cuantificación de concentración de metales pesados bioacumulados en la biomasa para determinar su capacidad micorremediadora.

Como resultado de la falta de precisión en la identificación específica de la especie del microhongo, se recomienda que en la PCR ya no se use primers ITS 1 e ITS 4 debido su alta variabilidad, sino que se apliquen los primers para el gen TEF-11 $\alpha$  o para la región LSU 28S rRNA.

## 6.0 Referencias

- Abo-Alkasem, M. I., Hassan, N. H., & Elsoud, M. M. A. (2023). Microbial bioremediation as a tool for the removal of heavy metals. Bulletin Of The

National Research Centre/Bulletin Of The National Research Center, 47(1). <https://doi.org/10.1186/s42269-023-01006-z>

- Cenis, J. (1992). Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*, 20(9), 2380. <https://doi.org/10.1093/nar/20.9.2380>
- Maftouh, A., Fatni, O. E., Moussa, A. B., Boukir, F., & Subha, W. N. U. (2024). Heavy Metals in the Ecosystem; Sources and Their Effects. *En Earth and environmental sciences library* (pp. 27-44). [https://doi.org/10.1007/978-3-031-53688-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-031-53688-5_2)
- Mozsik, Laszlo & Freidank-Pohl, Carsten & Meyer, Vera & Bovenberg, Roel & Nygård., Yvonne & Driessen, Arnold. (2021). Modular Synthetic Biology Toolkit for Filamentous Fungi. *ACS Synthetic Biology*. XXXX. [10.1021/acssynbio.1c00260](https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00260).
- Rosa, F. M., Mota, T. F. M., Busso, C., De Arruda, P. V., Brito, P. E. M., Miranda, J. P. M., Trentin, A. B., Dekker, R. F. H., & Da Cunha, M. A. A. (2024). Filamentous Fungi as Bioremediation Agents of Industrial Effluents: A Systematic Review. *Fermentation*, 10(3), 143. <https://doi.org/10.3390/fermentation10030143>
- Özdoğan, D. K., Akçelik, N., & Akçelik, M. (2022b). Genetic Diversity and Characterization of Plant Growth-Promoting Effects of Bacteria Isolated from Rhizospheric Soils. *Current Microbiology*, 79(5). <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02827-3>

- Pineda, J. F. S., Corona, F. O., & Rojas, E. T. (2017). Evaluación de diferentes métodos de extracción de ARN a partir del hongo nativo *Xylaria* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(1), 42-52. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.57114>
- Ruiz-Camps, I., & Jarque, I. (2014). Enfermedad fúngica invasora por hongos filamentosos en pacientes hematológicos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 31(4), 249-254. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2014.06.002>.
- Tamim, Marwa. (2023). Sequestration and Detoxification of Heavy Metals by Fungi. 10.1007/978-981-99-2560-5\_10.
- Wang, Y., Wang, X., Lan, W., Wei, Y., Xu, F., & Xu, H. (2021). Impacts and tolerance responses of *Coprinus comatus* and *Pleurotus cornucopiae* on cadmium contaminated soil. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 211, 111929. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.111929>
- Yusuf., Kutama., Shukor., Musa, H. (2024). Evaluation of Some Filamentous Fungi for Heavy Metal Tolerance. *Biological and Environmental Sciences Journal for the Tropics*. 21. 111-121. 10.4314/bestj.v21i2.12.
- Zare, P., Giyahchi, M., & Moghimi, H. (2024). Mycosorption and mycoremediation: Fungi as the tools for heavy metal removal. En *Mycosorption and Mycoremediation: Fungi as the Tools for Heavy Metal Removal* (1.a ed., Vol. 1, pp. 249-272). [https://doi.org/10.1007/978-981-97-4113-7\\_11](https://doi.org/10.1007/978-981-97-4113-7_11)

## Anexos

### Anexo 1. Preparación de medio sólido y medio líquido.



### Anexo 2. Preparación de medio de cultivo con las concentraciones de los metales pesados.

#### 1. Concentraciones de plomo.



#### 1. Concentraciones de cadmio.



#### 2. Concentraciones de cromo.



**Anexo 3.** PCR convencional para microhongo filamentoso.**Anexo 4.** NanoDrop para análisis de calidad de ADN.

**Anexo 5.** Electroforesis.

