



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ  
MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

**CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL**

**INFORME DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR  
PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA AMBIENTAL**

**MECANISMO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**TEMA:**

**EVALUACIÓN DE LOS AISLADOS FÚNGICOS PARA LA  
BIODEGRADACIÓN DE ATRAZINA A NIVEL DE LABORATORIO  
EN LA ESPAM MFL**

**AUTORES:**

**GEMA MARÍA MOREIRA ALCÍVAR  
EVELYN MILENA PALADINES CHILA**

**TUTOR:**

**ING. FABRICIO ALCÍVAR INTRIAGO, M.Sc.**

**CALCETA, JULIO DEL 2023**

## DECLARACIÓN DE LA AUTORÍA

**MOREIRA ALCÍVAR GEMA MARÍA** con cédula de ciudadanía **1315128072** y **PALADINES CHILA EVELYN MILENA** con cédula de ciudadanía **1314707637** declaramos bajo juramento que el Trabajo de Integración Curricular título: **EVALUACIÓN DE LOS AISLADOS FÚNGICOS PARA LA BIODEGRADACIÓN DE ATRAZINA A NIVEL DE LABORATORIO EN LA ESPAM MFL** es de nuestra autoría, no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, y que hemos consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, concedemos a favor de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos, conservando a nuestro favor todos los derechos patrimoniales de autor sobre la obra, en conformidad con el Artículo 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos Creatividad e Innovación.



.....  
**GEMA MARÍA MOREIRA ALCÍVAR**  
CC: 1315128072



.....  
**EVELYN MILENA PALADINES CHILA**  
CC: 1314707637

## AUTORIZACIÓN DE LA PUBLICACIÓN

**MOREIRA ALCÍVAR GEMA MARÍA** con cédula de ciudadanía **1315128072** y **PALADINES CHILA EVELYN MILENA** con cédula de ciudadanía **1314707637** autorizamos a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, la publicación en la biblioteca de la Institución del Trabajo de Integración Curricular Titulado **EVALUACIÓN DE LOS AISLADOS FÚNGICOS PARA LA BIODEGRADACIÓN DE ATRAZINA A NIVEL DE LABORATORIO EN LA ESPAM MFL**, cuyo contenido, ideas y criterio son de nuestra exclusiva responsabilidad y total autoría.



.....  
**GEMA MARÍA MOREIRA ALCÍVAR**  
**CC: 1315128072**



.....  
**EVELYN MILENA PALADINES CHILA**  
**CC: 1314707637**

## **CERTIFICACIÓN DEL TUTOR**

**ING FABRICIO ENRIQUE ALCÍVAR INTRIAGO M. Sc** certifica haber tutelado el Trabajo de Integración Curricular Titulado **EVALUACIÓN DE LOS AISLADOS FÚNGICOS PARA LA BIODEGRADACIÓN DE ATRAZINA A NIVEL DE LABORATORIO EN LA ESPAM MFL**, previo a la obtención del título de Ingeniero Ambiental, de acuerdo al **REGLAMENTO DE LA UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR DE CARRERA DE GRADO** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

.....  
**ING. FABRICIO ALCÍVAR INTRIAGO M. SC.**  
**CC: 1308632262**  
**TUTOR**

## **APROBACIÓN DEL TRIBUNAL**

Los suscritos integrantes del Tribunal correspondiente, declaramos que hemos APROBADO el Trabajo de Integración Curricular titulado: **EVALUACIÓN DE LOS AISLADOS FÚNGICOS PARA LA BIODEGRADACIÓN DE ATRAZINA A NIVEL DE LABORATORIO EN LA ESPAM MFL**, que ha sido desarrollado por **Gema María Moreira Alcívar y Evelyn Milena Paladines Chila**, previo a la obtención del título de Ingeniero Ambiental, de acuerdo **al REGLAMENTO DE LA UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR DE CARRERA DE GRADO** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

**ING. VERÓNICA VERA VILLAMIL MG.**  
**CC: 1310201486**  
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

**ING. CARLOS VILLAFUERTE VÉLEZ MG.**  
**CC: 1307605541**  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

**PhD. JOAN COBEÑA CEVALLOS MG.**  
**CC:1307612885**  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por haberme dado las fuerzas, capacidades y sobre todo la sabiduría necesaria para superar cada obstáculo que se presentó a lo largo de este camino y lograr cumplir cada meta que me propuse.

A mis padres Gregorio Moreira y Verónica Alcívar por ser mi ejemplo más grande de fortaleza, por todo el apoyo brindado en esta etapa universitaria, por todo su esfuerzo y amor y por brindarme el mejor regalo que un padre puede dejar en sus hijos: la educación. A mis queridos hermanos Gabriel y Narcisa que han sido pilares fundamentales en cada paso que doy en mi vida.

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López” que me dio la oportunidad de crecer a nivel personal y profesional a través de su educación superior de calidad.

A mi esposo Leodan Moreira por ser incondicional y brindarme todo el apoyo a lo largo de mi carrera universitaria. A mis hijas Leonela y Leslie que se convirtieron en la mayor motivación para lograr cumplir esta meta.

Al resto de mi familia y familia política, le doy las gracias por su cariño y constante apoyo.

A mis queridos profesores de la carrera de Ingeniería Ambiental por todos los conocimientos brindados, en especial a mi tutor el Ing. Fabricio Alcívar Intriago, Mg.Sc. por su guía y apoyo en todo este proceso.

Al Ing. Diego Pazmiño y su querida esposa la Ing. Diana Andrade por cada una de las enseñanzas y conocimientos impartidos en el laboratorio de microbiología que aportaron en la ejecución de mi tesis.

**GEMA MOREIRA ALCÍVAR**

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios por darme el privilegio de la vida y sobre todo por darme las fuerzas necesarias y la perseverancia para seguir adelante.

A mis padres Agustín Paladines y Beatriz Chila por haberme llevado por el camino de bien con su amor y sus volares, por siempre haber creído en mí y por todo el apoyo incondicional en cada una de las etapas de mi vida.

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, que me dio la oportunidad de crecer como ser humano a través de una educación superior de calidad y en la cual he forjado mis conocimientos profesionales día a día.

A mis hermanos Alan y Ma. Mercedes quienes fueron mi equipo a lo largo de mi vida universitaria.

A mis queridos profesores de la carrera de Ingeniería ambiental por cada una de sus enseñanzas que me ayudaron a enriquecer mis conocimientos, en especial a mi tutor el Ing. Fabricio Alcívar Intriago, Mg.Sc. por su ayuda incondicional en momentos difíciles.

Al Ing. Diego Pazmiño y su querida esposa la Ing. Diana Andrade por cada una de sus enseñanzas y conocimientos en el laboratorio de microbiología que aportaron en la ejecución de mi tesis.

**EVELYN PALADINES CHILA**

## **DEDICATORIA**

Este trabajo se lo dedico en primer lugar a Dios, por darme la fortaleza y sabiduría para afrontar cada obstáculo que se presentó a lo largo de este camino, y poder concluirlo con éxito.

A mis padres Gregorio Moreira y Verónica Alcívar por apoyarme en cada etapa de mi vida, brindándome todo su amor y sobre todo por su esfuerzo y sacrificio para sacarme adelante, y por creer en mí en cada meta que me propongo.

A mis hermanos, por darme su apoyo incondicional en cada paso que doy en mi vida.

A mi esposo, por apoyarme en este largo camino y alentarme cada vez que sentía no poder más.

A mis hijas, por ser la mayor motivación en mi vida.

**GEMA MOREIRA ALCÍVAR**

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mi Dios por nunca haberme dejado sola en los momentos difíciles, por otorgarme su protección y la sabiduría necesaria para enfrentar los retos en el ámbito académico.

A mis padres Agustín Paladines y Beatriz Chila por siempre estar ahí, desde que era una bebé ellos han realizado un trabajo con mucho amor y lleno de valores para preparar a su hija en un mundo lleno de sacrificios, por haber creído en su pequeña desde el día uno y por brindarme todo el amor necesario para ser una persona de bien a lo largo de mi vida, este trabajo se lo merecen ellos por apoyarme en cada una de las etapas que he pasado y por siempre estar juntos de las manos.

A mis hermanos por darme su apoyo incondicional en cada una de los procesos que pasé y que los necesité.

A mi esposo Iván Garcés quien me alentó a seguir adelante y me acompañó en toda mi etapa universitaria; por todo su amor, cariño y respeto.

A mi sobrino Benjamín Saltos por sus ocurrencias y cariño que me ha demostrado todo este tiempo.

Y por último dedico este trabajo a mi querida bebe, mi angelito Ivana Garcés Paladines que, aunque no esté conmigo siempre seguirá presente en mi corazón y por ella sigo adelante.

**EVELYN PALADINES CHILA**

## CONTENIDO GENERAL

DECLARACIÓN DE LA AUTORÍA.....	ii
AUTORIZACIÓN DE LA PUBLICACIÓN.....	iii
CERTIFICACIÓN DEL TUTOR.....	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL.....	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
DEDICATORIA.....	viii
DEDICATORIA.....	ix
CONTENIDO GENERAL.....	x
CONTENIDO DE TABLAS.....	xiii
CONTENIDO DE FIGURAS.....	xiii
CONTENIDO DE ECUACIONES.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.....	1
1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	1
1.2. JUSTIFICACIÓN.....	2
1.3. OBJETIVOS.....	3
1.3.1. OBJETIVO GENERAL.....	3
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
1.4. HIPÓTESIS.....	3
1.4.1. HIPÓTESIS NULA.....	3
1.4.2. HIPÓTESIS ALTERNATIVA.....	3
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. AGROQUÍMICOS.....	4
2.1.1. DEFINICIÓN DE AGROQUÍMICOS.....	4
2.1.2. TIPOS DE AGROQUÍMICOS.....	4
2.1.3. IMPACTOS DE LOS AGROQUÍMICOS EN EL AMBIENTE.....	5
2.2. ATRAZINA.....	5
2.2.1. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LA ATRAZINA.....	6
2.2.2. CARACTERÍSTICAS DE LA ATRAZINA.....	7
2.2.3. IMPACTOS DE LA ATRAZINA.....	7
2.3. BIODEGRADACIÓN.....	7

2.3.1.	RUTAS DE BIODEGRADACIÓN .....	8
2.4.	AISLADOS FÚNGICOS .....	8
2.4.1.	MORFOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS .....	8
2.4.2.	REPRODUCCIÓN DE LOS FÚNGICOS .....	9
2.5.	<i>TRICHODERMA SPP</i> .....	9
2.6.	MEDIOS DE CULTIVOS.....	9
2.6.1.	MEDIOS DE CRECIMIENTO .....	10
2.6.2.	MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO .....	10
2.6.3.	PAPA DEXTROSA AGAR (PDA).....	10
2.7.	MECANISMO DE EVALUACIÓN .....	10
2.7.1.	MICROSCOPIO ÓPTICO.....	10
2.7.2.	PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN.....	11
CAPÍTULO III. DISEÑO METODOLÓGICO .....		12
3.1.	UBICACIÓN .....	12
3.2.	DURACIÓN .....	12
3.3.	MÉTODOS .....	13
3.3.1.	MÉTODO EXPLORATIVO .....	13
3.3.2.	MÉTODO ESTADÍSTICO.....	13
3.4.	TÉCNICAS.....	13
3.4.1.	PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN.....	13
3.5.	UNIDAD EXPERIMENTAL .....	14
3.6.	MANEJO DEL EXPERIMENTO .....	15
3.6.1.	FASE I. SELECCIÓN DE CEPAS FÚNGICAS POTENCIALMENTE ÚTILES PARA LA BIODEGRADACIÓN DE ATRAZINA.....	15
	ACTIVIDAD 1. IDENTIFICACIÓN DE CEPAS FÚNGICAS .....	15
	ACTIVIDAD 2. PREPARACIÓN DE PAPA DEXTROSA AGAR (PDA) .....	15
	ACTIVIDAD 3. REACTIVACIÓN DE CEPAS FÚNGICAS. ....	15
3.6.2.	FASE II. ESTIMACIÓN DEL PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN DE LA ATRAZINA .....	16
	ACTIVIDAD 5. INCORPORACIÓN DE LA ATRAZINA .....	16
	ACTIVIDAD 6. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN.....	16
3.6.3.	FASE III. CARACTERIZACIÓN A NIVEL MOLECULAR LAS CEPAS FÚNGICAS CON POTENCIAL DE BIODEGRADACIÓN DE ATRAZINA .....	17
	ACTIVIDAD 7. VERIFICACIÓN DE LOS RESULTADOS.....	17
3.7.	DISEÑO EXPERIMENTAL .....	17
3.7.1.	FACTORES EN ESTUDIO.....	17

3.7.2. NIVELES DEL FACTOR .....	18
3.7.3. TRATAMIENTOS .....	18
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
4.1 SELECCIÓN DE CEPAS FÚNGICAS POTENCIALMENTE ÚTILES PARA LA BIODEGRADACIÓN DE ATRAZINA.....	20
4.1.1 IDENTIFICACIÓN DE CEPAS FÚNGICAS.....	20
4.2 ESTIMACIÓN DEL PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN DE LA ATRAZINA .....	21
4.2.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN DE ATRAZINA.....	25
4.3 CARACTERIZACIÓN A NIVEL MOLECULAR LAS CEPAS FÚNGICAS CON POTENCIAL DE BIODEGRADACIÓN DE ATRAZINA.....	29
CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	31
5.1 CONCLUSIONES .....	31
5.2 RECOMENDACIONES.....	31
BIBLIOGRAFÍA.....	32
ANEXOS.....	38

## CONTENIDO DE TABLAS

<b>Tabla 2 1</b> Propiedades físicas y químicas de la atrazina.....	6
<b>Tabla 3 1</b> Características Climatológicas del Campus Politécnico	12
<b>Tabla 3 2</b> Esquema de ANOVA .....	17
<b>Tabla 3 3</b> Cepas fúngicas .....	18
<b>Tabla 3 4</b> Porcentaje de atrazina .....	18
<b>Tabla 3 5</b> Tratamientos de acuerdo a los factores en estudio bifactorial .....	18
<b>Tabla 4 1</b> Código de aislamiento de cepas.....	20
<b>Tabla 4 2</b> Porcentaje de biodegradación con la concentración de atrazina al 1%.....	22
<b>Tabla 4 3</b> Porcentaje de biodegradación con la concentración de atrazina al 2% .....	24
<b>Tabla 4 4</b> Porcentaje de biodegradación con la concentración de atrazina al 3%.....	26

## CONTENIDO DE FIGURAS

<b>Figura 2 1</b> Representación molecular de la atrazina.....	6
<b>Figura 3 1</b> Laboratorio Biología Molecular ESPAM MFL.....	12
<b>Figura 4 1</b> Aislados Fúngicos Trichoderma spp .....	21
<b>Figura 4 2</b> Porcentaje de biodegradación con la concentración de atrazina al 1%.....	23
<b>Figura 4 3</b> Porcentaje de biodegradación con la concentración de atrazina al 2%.....	25
<b>Figura 4 4</b> Porcentaje de biodegradación con la concentración de atrazina al 3%.....	27
<b>Figura 4 5</b> Resultados de la electroforesis para las ampliaciones obtenidas con los primers EF1-F/EF1-R [1] en los aislados analizados. MM: Marcador de peso molecular ABM 100pb plus opti DNA marker. ....	30

## CONTENIDO DE ECUACIONES

<b>Ecuación 2 1</b> Ecuación de biodegradación .....	11
<b>Ecuación 3 1</b> Cálculo del área de la caja Petri .....	14

## RESUMEN

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología Molecular de la carrera de Medicina Veterinaria de la ESPAM “MFL”, sitio “El Limón”, cantón Bolívar; misma que tiene como objetivo evaluar los aislados fúngicos para la biodegradación de atrazina. Para su efecto, se establecieron tres fases: En la selección de cepas fúngicas potencialmente útiles para la biodegradación de atrazina, se procedió a seleccionar diferentes cepas de hongos para evaluar su porcentaje de biodegradación, las cuales fueron elegidas al azar. Para la estimación del porcentaje de biodegradación de la atrazina, fue necesario sembrar los 48 aislados fúngicos en un medio de cultivo PDA para después colocar en cada cepa un determinado porcentaje de este herbicida (1%, 2% y 3%) y posteriormente llevarlo a incubación; transcurridas las 24, 48 y 72 horas de su aplicación se procedió a la toma de datos para realizar el cálculo de la biodegradación de atrazina con la ecuación planteada. Por otra parte, la caracterización a nivel molecular de las cepas fúngicas se realizó con dos tipos de hongos EM-64 y EM-134, estos fueron los que alcanzaron mayor porcentaje de biodegradación con un halo de 77,5 cm y un 121,81% y 75 cm de halo y 117,88% respectivamente. Se pudo evidenciar que los hongos pertenecen a la familia de *Trichoderma longibrachiatum* y *Trichoderma orientale*, presentando 99,63% de identidad la cepa EM-64 y 99,87% la cepa EM-134. Concluyendo que es fundamental seguir con investigaciones acerca de consorcios fúngicos que aporten una solución para remediar ambientes contaminados.

## PALABRAS CLAVE

Biodegradación, Aislados Fúngicos, Atrazina, Caracterización Molecular, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma orientale*.

## ABSTRACT

The present research was carried out in the Molecular Microbiology laboratory of the Veterinary Medicine major at ESPAM "MFL", "El Limón" site, Bolívar canton, with the objective of evaluating fungal isolates for the biodegradation of atrazine. For this purpose, three phases were established: in the selection of fungal strains potentially useful for atrazine biodegradation, different fungal strains were selected to evaluate their biodegradation percentage, which were chosen at random. To estimate the percentage of biodegradation of atrazine, it was necessary to sow the 48 fungal isolates in a PDA culture medium and then place in each strain a certain percentage of this herbicide (1%, 2% and 3%) and then incubate it; 24, 48 and 72 hours after its application, data were taken to calculate the biodegradation of atrazine with the proposed equation. On the other hand, the characterization at molecular level of the fungal strains was carried out with two types of fungi EM-64 and EM-134, these were the ones that reached the highest percentage of biodegradation with a halo of 77,5 cm and 121,81% and 75 cm halo and 117,88% respectively. It could be evidenced that the fungi belong to the family of *Trichoderma longibrachiatum* and *Trichoderma orientale*, presenting 99.63% of identity the strain EM-64 and 99.87% the strain EM-134. Concluding that it is fundamental to continue with investigations about fungal consortiums that provide a solution to remediate contaminated environments.

## KEY WORDS

Biodegradation, Fungal Isolates, Atrazine, Molecular Characterization, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma orientale*.

# CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

## 1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

El impacto ecológico procedente de la agricultura convencional lleva a entender sus grandes limitaciones para abordar la seguridad alimentaria, principalmente en los países en vía de desarrollo, su adopción provoca la degradación de los recursos naturales (agua, suelo y vegetación) asimismo, la pérdida paulatina del conocimiento campesino en el manejo de los diferentes sistemas de producción (Guzmán et al., 2017).

Según Vázquez et al. (2021) las malas prácticas agrícolas y el uso de agroquímicos en la actualidad se han convertido en uno de los problemas ambientales más severos, la expansión de las prácticas de labranza y el aumento de cultivos genéticamente modificados han dado como resultado el incremento de la aplicación de herbicidas, uno de los principales es la utilización de atrazina que se aplica en los cultivos en áreas donde se necesita controlar la maleza, por otro lado, su aplicación implica riesgos, debido a que ha sido detectado tanto en aguas superficiales como en subterráneas (Salazar et al., 2018).

Degradar este contaminante cuando aún se encuentra en las superficies del suelo mediante plantas y microorganismos es una de las alternativas más factibles para evitar que se lixivien y lleguen a aguas subterráneas, debido a que algunas especies fúngicas biodegradan de manera selectiva ciertos compuestos tóxicos para las plantaciones (Delgadillo et al., 2011).

Los hongos son considerados como uno de los organismos más diversos y abundantes presentes en la tierra, junto con otros organismos son los encargados de remediar procesos vitales para la mejora del medio ambiente; en los suelos agrícolas los herbicidas y sus residuos pueden producir cambios en las comunidades fúngicas provocando la pérdida de las funciones del suelo, la salud de las plantas y la productividad de los cultivos (Vázquez et al., 2021). En los últimos años se ha reportado que el uso de atrazina implica el riesgo de alterar la dinámica del carbono C y nitrógeno N, así como el riesgo de la

contaminación ambiental y sus consecuencias en la salud humana (Salazar et al., 2018).

La atrazina es uno de los herbicidas más utilizado en el país por lo que su utilización ha generado daños significativos en el medio ambiente; en las últimas décadas se han desarrollado diversas técnicas microbianas y se atribuye a varios autores la identificación de una variedad de microorganismos que generan enzimas específicas para la degradación de herbicidas, este es el caso de las bacterias, algas y hongos, ya que al aprovechar su potencial metabólico ayudan en el proceso de transformación de contaminantes orgánicos en compuestos más simples o en algunos casos poco o nada contaminantes (Hernández et al., 2017). Con base a lo mencionado anteriormente se plantea la siguiente interrogante: ¿Cómo se comportan los aislados fúngicos en la biodegradación de atrazina bajo condiciones controladas de laboratorio?

## **1.2. JUSTIFICACIÓN**

Los agroquímicos son sustancias comúnmente utilizadas en las prácticas agrícolas para promover y mejorar el crecimiento de los cultivos y aumentar su producción (Guzmán et al., 2016). La atrazina es un herbicida utilizado para el control emergente de las malezas, debido a que mejora el rendimiento agrícola al eliminar la competencia del cultivo con especies no deseadas; por otra parte, su uso constituye un elemento de cambio en disrupción en los ciclos biogeoquímicos, por lo que el aumento de compuestos orgánicos exógenos cambia la estructura funcional de la comunidad microbiana (Salazar et al., 2018).

A partir de ello, las investigaciones se han encaminado en hallar alternativas para reducir los niveles de atrazina presentes en suelos contaminados con este herbicida, siendo necesaria la búsqueda de linajes microbianos para la biorremediación de ambientes contaminados con este tipo de agroquímicos (Esparza, 2018). Considerando lo anteriormente expuesto, la biorremediación es un proceso tecnológico de descontaminación que utiliza sistemas biológicos para catalizar la destrucción o transformación de componentes peligrosos en el ambiente (Garzón et al., 2017).

En el ámbito legal y social, el presente estudio toma como base la Constitución de la República del Ecuador (2008), específicamente el Art. 14, donde indica: “Se reconoce el derecho de la población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y el buen vivir, Sumak Kawsay” además del anexo “Plan de Creación de Oportunidades 2021-2025”, Objetivo 3, donde estipula “Garantizar los derechos de la naturaleza para las actuales y futuras generaciones” (Secretaría Nacional de Planificación, 2021).

Con este aporte se busca validar la biodegradación de atrazina mediante aislados fúngicos a nivel de laboratorio con la finalidad de verificar si son capaces de biodegradar este tipo de herbicidas, ya que en Ecuador no se ha profundizado en investigaciones de biodegradabilidad por hongos, por lo tanto, se considera necesario indagar más sobre este estudio.

### **1.3. OBJETIVOS**

#### **1.3.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el comportamiento de los aislados fúngicos en la biodegradación de atrazina a nivel de laboratorio en la ESPAM MFL.

#### **1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Seleccionar cepas fúngicas potencialmente útiles para la biodegradación de la atrazina.
- Determinar el porcentaje de biodegradación de la atrazina.
- Caracterizar a nivel molecular la cepa fúngica con potencial de biodegradación de atrazina.

### **1.4. HIPÓTESIS**

#### **1.4.1. HIPÓTESIS NULA**

Ninguno de los aislados fúngicos biodegradan la atrazina a nivel de laboratorio en la ESPAM MFL.

#### **1.4.2. HIPÓTESIS ALTERNATIVA**

Los aislados fúngicos biodegradan la atrazina en un 95% a nivel de laboratorio en la ESPAM MFL.

## **CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. AGROQUÍMICOS**

#### **2.1.1. DEFINICIÓN DE AGROQUÍMICOS**

Son un conjunto de agentes químicos, mayormente utilizados por el ser humano con la finalidad de proteger de organismos dañinos la calidad y producción de los cultivos y también para el control de plagas perjudiciales para la salud pública, además, estos pueden ser utilizados de manera pecuaria y doméstica; este tipo de sustancias son consideradas mutágenos, ya que tienen propiedades de cambiar ADN (Oviedo y Díaz, 2017).

Para García (2012) estos agroquímicos son sustancias mayormente utilizadas en la agricultura para conservar y mantener los cultivos, por otra parte, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [FAO], (2019) define al agroquímico como cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier tipo de plagas, incluyendo las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que intervienen de una u otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos.

#### **2.1.2. TIPOS DE AGROQUÍMICOS**

- **Fungicidas**

Los fungicidas son químicos que son utilizados en la protección de cultivos, con el fin de controlar enfermedades fúngicas, inhibiendo o eliminando al hongo que causa la enfermedad, por lo tanto, es necesario antes de su aplicación asegurarse que los síntomas presentados por el cultivo encajen con la acción de este tipo de organismo (Santamaría y Ureta, 2014).

- **Insecticidas**

Son productos que se utilizan para el control de insectos, por lo general mediante la inhibición de enzimas, estos productos son de tipo biocida que son sustancias químicas sintéticas, naturales o biológicas empleadas para contrarrestar o ejercer acción sobre cualquier organismo; además, son de gran importancia para la agricultura (Vargas, 2013).

- **Herbicidas**

Son sustancias fitosanitarias que se utilizan para prevenir y controlar de forma directa las malezas que puedan resultar perjudiciales para los cultivos, estas sustancias inhiben o alteran el crecimiento de la planta o la semilla a través de la penetración de la misma desde su primera aplicación (García, 2019).

- **Fertilizantes**

Los fertilizantes son fuentes de nutrientes para los cultivos, estos aportan macro y micronutrientes por medio del suelo para suplementar las necesidades de las plantas, estas sustancias pueden ser sintéticas, fertilizantes de grado natural o abonos orgánicos, entre otros, dependiendo de su composición química (Collantes, 2015).

### **2.1.3. IMPACTOS DE LOS AGROQUÍMICOS EN EL AMBIENTE**

El uso de agroquímicos ha inferido un rol importante en la contaminación ambiental desde la década de los cincuenta, esto es debido a que estas sustancias se extienden con facilidad por medio del suelo y el agua, como consecuencia de la mala utilización, el tipo y la alta cantidad de producto usado (López, 2019).

Por otro lado, Roa y López (2016) manifiestan que la utilización de agroquímicos causa graves daños al ambiente desde el momento en que aumentó el uso de estas sustancias, estos degradan de manera significativa los ecosistemas naturales, asimismo, afecta la calidad del aire, agua y la fertilidad del suelo, causando el aumento de la dependencia de estos químicos en la agricultura.

Según Martínez et al. (2013) los fertilizantes que contienen nitrógeno tienen su disposición final en lagos, ríos y océanos, incrementando la proliferación de agentes patógenos, por ende, aumenta la generación de toxinas que pueden llegar a ser perjudiciales no solo para la diversidad acuática, sino también pone en riesgo la salud de las personas.

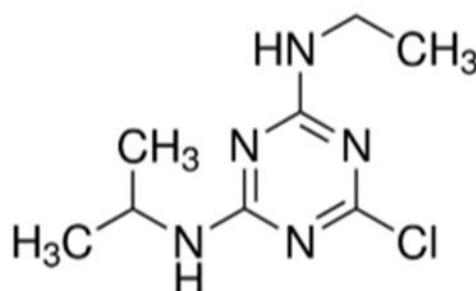
## **2.2. ATRAZINA**

La atrazina es una clase moderna de herbicida, con una estructura aromática simétrica que cuenta con átomos de carbono y nitrógeno de manera aleatoria en

un anillo de seis enlaces; este producto es utilizado para el control de maleza emergente, radicándose principalmente en las hojas impidiendo el proceso de fotosíntesis en las plantas, su persistencia es de más de 6 meses y en ocasiones puede perdurar en cultivos posteriores (Huerta, 2016).

La molécula de atrazina tiene baja solubilidad en agua, persistencia moderada a nula, baja volatilidad, alto potencial de lixiviación, moderada movilidad en el suelo y bajo potencial de bioacumulación (Esparza, 2018).

Para Hansen et al. (2013) la atrazina es un herbicida selectivo que se aplica al suelo y este absorbe por las raíces o las hojas de las hierbas, su alta solubilidad en el agua y baja absorción en el suelo, así como su elevada persistencia es la causa frecuente de encontrar atrazina en los cuerpos de agua.



**Figura 2 1** Representación molecular de la atrazina

Fuente: (Esparza, 2018)

### 2.2.1. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LA ATRAZINA

**Tabla 2 1** Propiedades físicas y químicas de la atrazina

Parámetro	Especificación
Nombre según IUPAC	2-Chloro-4 ethylamino-6 Isopropylamino-1,3,5-triazine
CAS nº	1912-24-9
Fórmula química	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> ClN <sub>5</sub>
Peso molecular (m mol <sup>-1</sup> )	215.69
Densidad (g em <sup>-3</sup> )	1.19
Punto de ebullición (°C)	Se descompone después de hervir
Presión de vapor (Pa)	3.8x10 <sup>-5</sup>
Solubilidad (mg L <sup>-1</sup> ) en agua a 25 °C	35
Constante de la ley de Henry (Pa m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )	1.09x10 <sup>-7</sup>
Constante de disociación (Pka)	1.85
Índice de potencial de lixiviación de Gus	3.20
Log k <sub>ow</sub>	2.67

Fuente: (Esparza, 2018)

### **2.2.2. CARACTERÍSTICAS DE LA ATRAZINA**

Según Gordillo (2017) las características de la atrazina son:

- Capacidad de absorción por las raíces de las plantas y una pequeña parte por las hojas, pudiendo provocar una translocación.
- Se distribuye hacia arriba a través del xilema y se acumula en los tejidos y sitios fotosintéticos.
- Cuando se aplica al follaje, actúa como herbicida.
- Cuando se aplica al suelo, es absorbido por el sistema radicular
- Transporte rápido a las hojas a través del apoplasto (xilema).
- Puede ser indicado como preemergencia y postemergencia; con efecto residual a largo plazo
- Depende de la textura del suelo, el clima, la dosis y necesita buena humedad para un buen control de malezas,
- Bloquea el transporte de electrones, inhibe la reacción de Hill, evitando así la fotosíntesis.

### **2.2.3. IMPACTOS DE LA ATRAZINA**

Según Gagneten y Regaldo (2021) varios estudios han demostrado que este herbicida afecta la supervivencia y crecimiento de insectos acuáticos, en estudios de laboratorio, las concentraciones fueron superiores a 230  $\mu\text{g L}^{-1}$ . La atrazina afecta significativamente los procesos biológicos como por ejemplo la regulación del ciclo celular. La atrazina afecta el metabolismo de los lípidos y esteroides y metabolismo de carbohidratos. En el caso de la microbiota del suelo, la atrazina es base débil, en la forma básica de una molécula, en este caso no será retenido por la electricidad estática en superficies con cargas negativas de ciertos componentes del suelo.

## **2.3. BIODEGRADACIÓN**

La biodegradación se define como una descomposición orgánica por microorganismos en la que los materiales se transforman en sustancias más simples (Arbeli, 2009). Para Contreras y Carreño (2018) la biorremediación es una técnica o procedimiento en el cual se utilizan plantas o microorganismos que pueden ser naturales o modificados genéticamente para mitigar, neutralizar o eliminar contaminantes, disminuyendo su grado de toxicidad para los seres

vivos, mediante este proceso se puede mineralizar hidrocarburos de petróleo hasta dióxido de carbono y agua.

### **2.3.1. RUTAS DE BIODEGRADACIÓN**

Las medidas biológicas para la restauración ambiental consisten principalmente en el uso de microorganismos como herramientas biocorrectoras para descomponer, degradar, transformar y en muchos casos metabolizar sustancias peligrosas (Cabrera, 2015).

De acuerdo con Esparza (2018) en condiciones de campo, la atrazina se degrada por procesos químicos y biológicos, degradación química por hidrólisis o fotólisis, mientras que la biodegradación está relacionada con bacterias, hongos y plantas; cuando el metabolismo de estos organismos promueve la descomposición parcial o la mineralización completa de los herbicidas. Aunque algunos estudios han demostrado que la fitodegradación es un mecanismo independiente de catálisis de atrazina, y su actividad, los microorganismos son el mecanismo más importante para su descomposición en el suelo.

## **2.4. AISLADOS FÚNGICOS**

Un aislado fúngico es la división o separación de un hongo específico del resto de microorganismos que se encuentran en el mismo medio, el método más usado es la siembra por estría en un medio de cultivo sólido con las condiciones adecuadas en caja Petri, sin embargo, también existen otros métodos menos convencionales para aislar hongos (Lemus et al., 2015).

### **2.4.1. MORFOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS**

- **Morfología**

Los hongos están conformados por dos estructuras: el micelio que tienen una composición filamentosa llamada hifas y tienen como función de fertilidad y alimentación; y las esporas que son las encargadas de la pigmentación de los hongos y, además, es el órgano que se encarga de la reproducción de los mismos (Navarro, 2013).

- **Características**

Los hongos pueden ser unicelulares o pluricelulares, las hifas pueden tener segmentos regulares o tabiques, pueden ser transparentes o pigmentados y se

llama micelio desgrasado. Los hongos no tienen la capacidad de formar tejidos, viven en diferentes ambientes: pueden ser en tierra, agua o incluso aire. También se consideran heterótrofos porque dependen de la materia orgánica sintetizada por otros organismos ricos en energía, como carbohidratos, lípidos y grasas, y producen enzimas para absorberlos (Gómez, 2017).

#### **2.4.2. REPRODUCCIÓN DE LOS FÚNGICOS**

La reproducción de los hongos se divide en sexual y asexual, la primera implica la producción y liberación de esporas haploides al medio ambiente en los esporangios, por otro lado, la reproducción sexual implica la fusión de los gametangios de diversos tipos de enlace, y seguidamente la fusión nuclear y meiosis (Ercoli y Maidana, 2019).

#### **2.5. TRICHODERMA SPP**

El género *Trichoderma spp* se considera como un modelo óptimo para ser estudiado debido a su fácil aislamiento y cultivo, se define también como un microorganismo de acelerado desarrollo en una amplia variedad de sustratos; este tipo de hongo es conocido como un anaerobio facultativo que se encuentra de manera natural en suelos agrícolas y otros tipos de medios. Este hongo tiene una velocidad bastante alta de crecimiento, por lo que es capaz de establecerse en el suelo y controlar enfermedades que afectan a los cultivos (Chiriboga et al., 2015). Tiene múltiples aplicaciones biotecnológicas agrícolas, pero la más destacada es inhibir el crecimiento, la esporulación y la germinación de las esporas de hongos patógenos (Mesa et al., 2019).

#### **2.6. MEDIOS DE CULTIVOS**

Un medio de cultivo es una mezcla de diferentes nutrientes que en condiciones físicas óptimas y en concentraciones correctas, ayudan al crecimiento y aislamiento de microorganismos, su utilización es de vital importancia en los laboratorios microbiológicos, es por esto que su control en la fabricación debe ser exacto y minucioso (Rodríguez y Zhurbenko, 2018). Para el desarrollo adecuado hay que considerar sus requerimientos nutricionales en cantidades y condiciones adecuadas (Checa, 2018).

### **2.6.1. MEDIOS DE CRECIMIENTO**

La finalidad de estos medios es que se presente un crecimiento de la mayor parte de microorganismos que tienen poca existencia, es el medio de cultivo que se utiliza con mayor frecuencia para preservar colonias de microorganismos, un ejemplo de estos es el agar común (Puerta et al., 2012). Para lograr el crecimiento de estos microorganismos, es indispensable aportar un medio con nutrientes y condiciones fisicoquímicas para su desarrollo (Barrero, 2017).

### **2.6.2. MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO**

Estos son medios de cultivo líquidos que contienen en su composición un agente que inhibe los microorganismos que no se desean, sin embargo, favorece el crecimiento de los agentes infecciosos, en otras palabras, es una técnica utilizada para permitir el desarrollo de microorganismos que parten de una muestra que tiene una gran variedad de los mismos (Puerta et al., 2012).

Los medios de enriquecimiento contienen compuestos adicionales que permiten el desarrollo de microorganismos existentes, que eventualmente no crecerían en un medio general (Barrero, 2017).

### **2.6.3. PAPA DEXTROSA AGAR (PDA)**

El PDA por sus siglas en inglés "Potato Dextrose Agar" es un medio de cultivo nutritivo sólido, no selectivo en el cual crecen especies bacterianas y fúngicas, sin embargo, su utilización está indicada especialmente para el aislamiento de hongos filamentosos y levaduras (Enríquez, 2016). Además, la fórmula es adecuada para mantener cultivos y diferenciación de algunos dermatofitos según la producción de pigmentos (Valdés, 2018).

## **2.7. MECANISMO DE EVALUACIÓN**

### **2.7.1. MICROSCOPIO ÓPTICO**

Es un instrumento que ayuda a observar objetos u organismos que no son perceptibles para el ojo humano, esto mediante un sistema óptico conformado por lentes de aumento, que ayudan a la ampliación de lo que se está observando, consta de dos partes, una mecánica y una óptica (Lazcano, 2018).

El microscopio óptico se considera como el tipo de microscopio más usado debido a la facilidad de acceso y manejo (Aravena et al., 2017). Además, tiene un límite de resolución aproximadamente de 200 nm, este se encuentra determinado por la longitud de onda de la luz y de la apertura numérica de la lente (Isac, 2018).

### 2.7.2. PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN

En una investigación realizada sobre condiciones controladas de compostaje a escala de laboratorio establece que para estimar un porcentaje de biodegradación de cualquier tipo de material es necesario previamente conocer por un medio analítico el contenido de carbono orgánico total del material que va a ser sometido al proceso de biodegradación (Portilla, 2019).

Aranzales, (2017), indica que la evolución del porcentaje de degradación de una sustancia o elemento, se estima desde un área inicial con respecto al tiempo.

$$\% \text{ Biodegradación} = \frac{\text{Área del halo de biodegradación (mm)}}{\text{Área de la caja (mm)}} \times 100$$

**Ecuación 2 1** Ecuación de biodegradación

**Fuente:** (Aranzales, 2017)

# CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

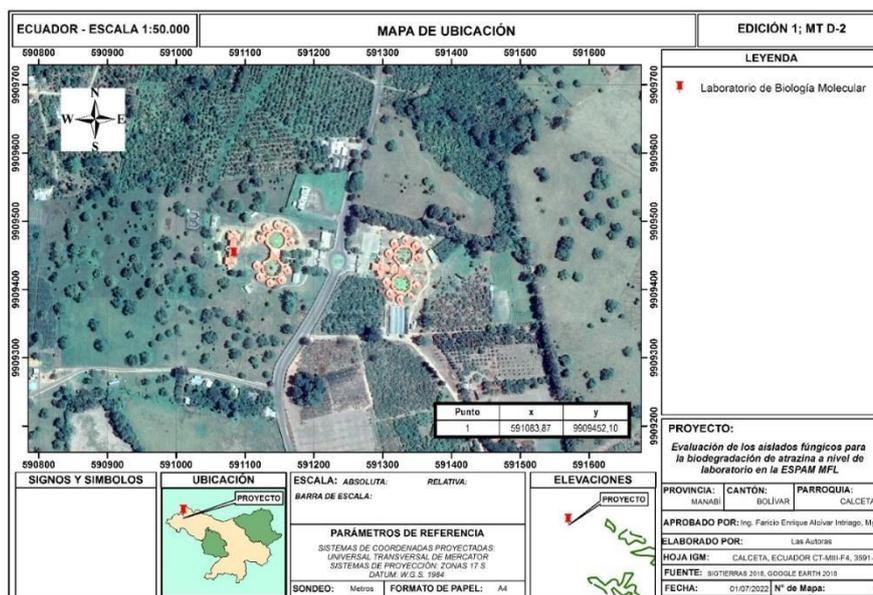
## 3.1. UBICACIÓN

La presente investigación se realizó en el laboratorio de biología molecular de la ESPAM MFL, la cual se encuentra situada en el sitio “El Limón” del cantón Bolívar de la provincia de Manabí. **(Figura 3.1.)**

**Tabla 3 1** Características Climatológicas del Campus Politécnico

Características	Campus Politécnico
Coordenadas geográficas	<b>Sur:</b> 0°49'8.87" <b>Oeste:</b> 80°10'53.03"
Altitud	15 msnm
Temperatura	<b>Mínima:</b> 31,11 °C <b>Máxima:</b> 20,60 °C
Precipitación	624 mm
Humedad relativa	82,42%

Fuente:(Valdivieso et al., 2021)



**Figura 3 1** Laboratorio Biología Molecular ESPAM MFL

Elaborado por: las autoras

## 3.2. DURACIÓN

La investigación tuvo un periodo de duración de 9 meses a partir de la aprobación del proyecto en estudio.

### **3.3. MÉTODOS**

Se aplicaron los siguientes métodos para la investigación.

#### **3.3.1. MÉTODO EXPLORATIVO**

Este tipo de investigación se utilizó para recopilar información de diferentes fuentes confiables, de la misma manera este método se utilizó para analizar los resultados del estudio con el objetivo de explorar el entorno y los problemas para obtener datos eficaces referente al tema indagado (Bernardo et al., 2019).

#### **3.3.2. MÉTODO ESTADÍSTICO**

Se empleó para la tabulación, análisis de datos y elaboración de gráficos los cuales ayudaron en dicha investigación (Esparza, 2018). Mediante este método se precedió a realizar el análisis de datos obtenidos mediante el porcentaje de biodegradación utilizando la ecuación 2.1.

#### **3.3.3. MÉTODO DE SANGER**

La secuencia del ADN o Método de SANGER permite determinar el orden de los nucleótidos (A, G, C, T) de una molécula de ADN, esto es de suma importancia ya que permite determinar la información genética para el funcionamiento de los organismos (Ongay y Códiz, 2021).

### **3.4. TÉCNICAS**

#### **3.4.1. PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN**

Según los autores (Portilla, 2019) y (Aranzales, 2017) la técnica de porcentaje de biodegradación consistió en la estimación del porcentaje de degradación realizado por los hongos, relacionando el área de la caja Petri utilizada para el cultivo con la dimensión de los halos de degradación medidos.

- Estimación del área del halo de biodegradación:

Con una regla milimetrada, se midió el radio del halo de inhibición, el cual se realizó mediante ojo al desnudo midiendo desde la parte central; las áreas se reconocieron por ser las zonas más claras dentro de la muestra y éstas sirvieron como referencia para la estimación del porcentaje de biodegradación.

### – Cálculo del área de la caja Petri

Se realizó midiendo el diámetro de la caja en su posición más amplia, con ayuda de una regla, el valor obtenido se dividió a la mitad para determinar al radio y éste se multiplicó por sí mismo, el resultado será multiplicado por el valor de Pi.

$$A = \pi \times r^2$$

**Ecuación 3 1** Cálculo del área de la caja Petri

Donde:

A: Área de la caja Petri

$\pi$ : Relación entre la longitud de la circunferencia y su diámetro (3,1415)

r: Radio

### – Cálculo de biodegradación

Con los datos obtenidos de los cálculos previos, se determinará el porcentaje de degradación de las cepas (**Ecuación 2.1**).

## 3.5. UNIDAD EXPERIMENTAL

La unidad experimental fueron las cajas de Petri (63.62 mm x 14.7 mm), en donde se colocaron 20ml de agar PDA con los respectivos tratamientos, obteniendo 48 unidades experimentales

## **3.6. MANEJO DEL EXPERIMENTO**

### **3.6.1. FASE I. SELECCIÓN DE CEPAS FÚNGICAS POTENCIALMENTE ÚTILES PARA LA BIODEGRADACIÓN DE ATRAZINA**

#### **ACTIVIDAD 1. IDENTIFICACIÓN DE CEPAS FÚNGICAS**

La identificación de cepas fúngicas se realizó en base a la metodología empleada por (Zambrano, 2021), quién aisló cepas fúngicas de *Trichoderma spp.* de la Loma de Mil Pesos en Calceta y posterior sembró las cepas en condiciones controladas en laboratorio para futuras investigaciones en la ESPAM MFL.

#### **ACTIVIDAD 2. PREPARACIÓN DE PAPA DEXTROSA AGAR (PDA)**

Según Peña et al. (2017) la preparación del PDA se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Verter el PDA en 39 gramos por cada litro de agua destilada, y luego pesarlo en la balanza para corroborar dicho peso.
- Luego se lleva a la plancha magnética con una bala para homogenizar el medio de cultivo.
- Una vez homogenizada la muestra, se lleva a la autoclave a 121°C para esterilizarlo por 30 minutos.

#### **ACTIVIDAD 3. REACTIVACIÓN DE CEPAS FÚNGICAS.**

Se empleó la metodología descrita por Camero y Linares (2013) para establecer una reactivación confiable de cepas fúngicas fue necesario realizar la siembra directa sobre agar PDA de los 4 hongos que se encontraron conservados, de la siguiente manera:

- Agregar PDA en las cajas Petri de 15 a 20 ml.
- Esperar que se solidifiquen por 3 minutos.
- Una vez solidificado, se utilizó el mechero para extraer un fragmento de las muestras fúngicas para después inocularlo en las cajas Petri esterilizadas, en un solo punto.
- Sellar con parafilm para que el cultivo no se contamine y posteriormente rotularlo con los códigos pertenecientes.

- Después de haberlo sellado, se llevará a la incubadora a 30°C durante 72 horas.

Cumplidos todos los pasos se visualizaron las muestras con el objetivo de identificar el crecimiento de los hongos.

### **3.6.2. FASE II. ESTIMACIÓN DEL PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN DE LA ATRAZINA**

#### **ACTIVIDAD 5. INCORPORACIÓN DE LA ATRAZINA**

El desarrollo de la actividad consistió en diluir un porcentaje de la muestra de atrazina en 100 ml de agua destilada para obtener la dilución, esta se realizó en diferentes porcentajes bajo (1%), medio (2%) y alto (3%). Después de haber obtenido las diluciones se procedió a inocular en cajas Petri previamente separadas con el medio de cultivo y así mismo sembrar las cepas *Trichoderma spp.* que presentaron el mejor crecimiento.

Obtenida la siembra, las placas se llevaron a una cámara de incubación con temperatura de 30 °C durante 72 horas.

Una vez adaptado el cultivo se replicaron por separado las colonias de *Trichoderma spp.* que se proliferaron con PDA.

#### **ACTIVIDAD 6. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN**

Para el cálculo del porcentaje de biodegradación de atrazina se consideraron los datos obtenidos a partir de la determinación proporcional entre el área del halo, la cual fue determinada mediante medición utilizando una regla milimetrada y el área de la caja Petri, aplicando la **Ecuación 2.1.**, se seleccionaron 2 tipos de microorganismos de los 4 aislados fúngicos y son aquellos que lograron alcanzar un mayor halo de biodegradación en los medios de cultivos con atrazina a nivel de laboratorio.

### 3.6.3. FASE III. CARACTERIZACIÓN A NIVEL MOLECULAR LAS CEPAS FÚNGICAS CON POTENCIAL DE BIODEGRADACIÓN DE ATRAZINA

#### ACTIVIDAD 7. VERIFICACIÓN DE LOS RESULTADOS

Se enviaron los microorganismos al Laboratorio IDGEN-Quito con características biodegradativas de atrazina a nivel de laboratorio más eficientes con el fin de identificar familia, género y especie a nivel molecular PCR. Además, se hizo la debida verificación de los resultados con el fin de conocer cual familia fúngica logró la mejor biodegradación.

#### 3.7. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se empleó un DCA (Diseño Completamente al Azar) con dos factores en estudio y con tres niveles por cada factor.

**Tabla 3 2** Esquema de ANOVA

FV	GL
Total	47
Factor A	3
Factor B	2
AXB	6
Error	36

Elaborado por: Las autoras

Los niveles y factores se detallan a continuación:

##### 3.7.1. FACTORES EN ESTUDIO

**Factor A:** Cepas fúngicas

**Factor B:** Porcentaje de atrazina

El medio de cultivo utilizado se mantuvo constante, mientras que la atrazina se incorporó en tres porcentajes.

### 3.7.2. NIVELES DEL FACTOR FACTOR A. CEPAS FÚNGICAS

*Tabla 3 3 Cepas fúngicas*

FACTOR A. CEPAS FÚNGICAS
a1. EM-70
a2. EM-134
a3. EM-64
a4. EM-63

*Elaborado por: las autoras*

### FACTOR B. PORCENTAJES DE ATRAZINA

*Tabla 3 4 Porcentaje de atrazina*

FACTOR B. PORCENTAJES DE ATRAZINA
b1. 1%
b2. 2%
b3. 3%

*Elaborado por: las autoras*

### 3.7.3. TRATAMIENTOS

La investigación tuvo como referencia 12 tratamientos por 4 repeticiones por cada una de las 3 concentraciones de atrazina (1%, 2% y 3%), es decir, un total de 48 repeticiones.

*Tabla 3 5 Tratamientos de acuerdo a los factores en estudio bifactorial*

TRATAMIENTOS	CÓDIGOS	DESCRIPCIÓN
T1	a1b1	(EM-70*1%)
T2	a1b2	(EM-70*2%)
T3	a1b3	(EM-70*3%)
T4	a2b1	(EM-134*1%)
T5	a2b2	(EM-134*2%)
T6	a2b3	(EM-134*3%)
T7	a3b1	(EM-64*1%)
T8	a3b2	(EM-64*2%)
T9	a3b3	(EM-64*3%)
T10	a4b1	(EM-63*1%)
T11	a4b2	(EM-63*2%)
T12	a4b3	(EM-63*3%)

*Elaborado por: las autoras*

#### **3.7.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Según De la Fuente (2022), para realizar el estudio estadístico fue necesario emplear el análisis de varianza ANOVA, el cual indica las diferencias de las medias de diferentes grupos; asimismo para el procesamiento de análisis de los datos se empleó la prueba de significancia Tukey con valor  $\alpha=0.05$ .

## CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 SELECCIÓN DE CEPAS FÚNGICAS POTENCIALMENTE ÚTILES PARA LA BIODEGRADACIÓN DE ATRAZINA

#### 4.1.1 IDENTIFICACIÓN DE CEPAS FÚNGICAS

En el presente estudio se consideraron hongos del género *Trichoderma spp.*, presente en el banco de muestra de la ESPAM MFL. En el Laboratorio de Biología Molecular se encuentran 100 cepas fúngicas de las cuales se escogieron al azar del grupo no estudiado 4 cepas. En la tabla 4.1 se detallan los códigos de los aislados fúngicos sujetos de estudio.

*Tabla 4.1. Códigos de Cepas*

CÓDIGOS DE AISLAMIENTO DE CEPAS FÚNGICAS
EM-70
EM-134
EM-64
EM-63

Elaborado por: Las autoras

El hongo del género de *Trichoderma spp.* es sujeto de estudio en el presente proyecto debido a sus características como agente de control biológico, al tener un crecimiento acelerado y producir eficazmente enzimas, las cuales actúan junto a los hongos fitopatógenos (Chiriboga et al. 2015). Otra de las razones por la cual el hongo de éste género destaca, es por la capacidad de aislarse de sustancias naturales y también algunas artificiales, especialmente de los xenobióticos, demostrando potencial de adaptación y biodegradación en algunos sistemas ecológicos (Mesa et al., 2019).

La reactivación de las cepas se logró gracias al procedimiento y metodología de Camero y Linares (2013), se observó el crecimiento y desarrollo de los hongos luego de la incubación por 72 horas, el cual se evaluó con un microscopio. Considerando de esta forma, que las cepas seleccionadas estuvieron aptas para inhibir un tipo de xenobiótico y analizar su potencial de biodegradación al momento de incorporarlo.

## 4.2 ESTIMACIÓN DEL PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN DE LA ATRAZINA

El procedimiento de la incorporación de la atrazina se desarrolló con la aplicación en tres concentraciones, las cuales fueron establecidas de la siguiente forma: 1% bajo, 2% medio y 3% alto. Posterior a este proceso, se hizo un respectivo control durante 24, 48 y 72 horas (**Ver anexo 3-tablas de Excel de control**), en el cual se tomaron los datos de medidas del halo para aplicar la ecuación 2.1 y de esta forma calcular el porcentaje de biodegradación que tenían cada una de las cepas (Portilla, 2019).

Las cepas fueron analizadas en el laboratorio de Biología Molecular de la ESPAM MFL, y a través de observación directa, se apreció el desarrollo de sus micelios, como se evidencia en la figura 4.1, que la cepa con código EM-64 y EM-134 presentan un crecimiento óptimo versus las otras dos cepas posterior a la incorporación de atrazina.

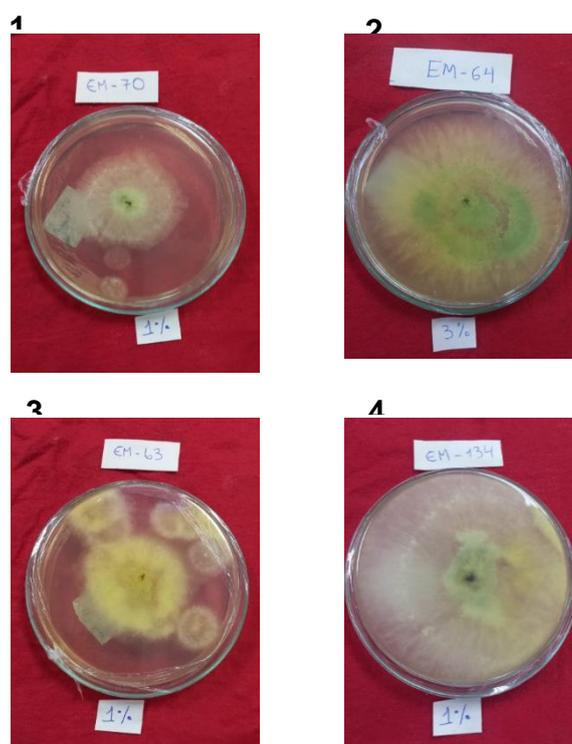


Figura 4.1. Aislados fúngicos de *Trichoderma* spp.

Elaborador por: Las autoras

Se determinó mediante el control periódico de la unidad experimental (**Ver anexo 3-tablas de Excel de control**), en la tabla 4.2 los resultados de las cepas que tuvieron mejor éxito en biodegradar la atrazina en una concentración de 1% durante 24, 48 y 72 horas. Esto se hizo a través de la suma de los porcentajes calculados mediante la ecuación 2.1.

Por lo que, es posible identificar que las cepas con un alto porcentaje de biodegradación fueron las siguientes: EM-64 biodegradando 75.45% de atrazina en un período de 24 horas, la cepa con código EM-70 también mostró potencial alto en biodegradar este herbicida, teniendo un 102.15% de éxito y la EM-64 con 113.96% transcurridas las 48 horas. Mientras que durante las 72 horas, las cepas que incrementaron su porcentaje de biodegradación fueron EM-70 con 116.31%, EM-134 con 117.88% y EM-64.

**Tabla 4. 2.** Porcentaje de biodegradación con la concentración de atrazina al 1%.

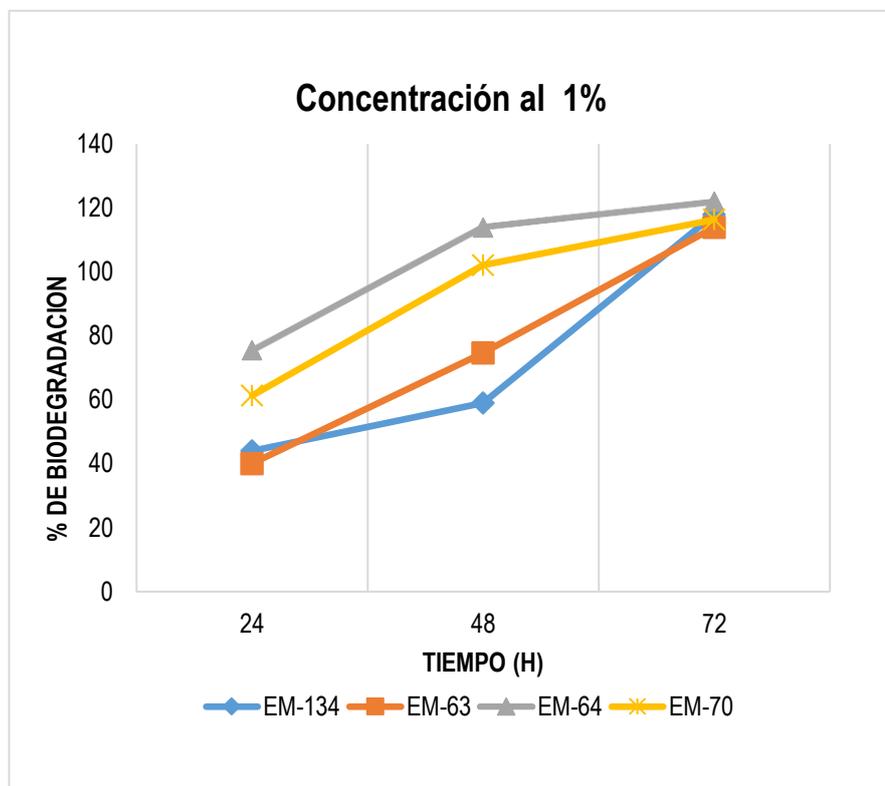
Concentración de atrazina al 1%				
Código de cepa	Tiempo (h)	Réplica	Medida de halo	Porcentaje de biodegradación
EM-70	24	2	39	61.3
EM-64	24	3	48	75.45
EM-63	24	2	25.5	40.08
EM-134	24	1	28	44.01
EM-70	48	3	65	102.15
EM-64	48	3	72.5	113.96
EM-63	48	3	47.5	74.66
EM-134	48	2	60	58.94
EM-70	72	1	74	116.31
EM-64	72	2	77.5	121.81
EM-63	72	3	72.5	113.9
EM-134	72	2	75	117.88

Elaborado por: Las autoras

De acuerdo a lo señalado por Pelcastre et al. (2013) en su estudio sobre perspectivas de biorremediación con *Trichoderma spp.*, los aislados fúngicos de este tipo tienden a biodegradar mejor la atrazina de acuerdo a la medida de su halo, por lo que cuanto exista mejor crecimiento del halo, más herbicida podrá biodegradar.

En la figura 4.2 se observa el comportamiento de las cepas respecto a la biodegradación de la atrazina, a través de las curvas se observa que

efectivamente todas alcanzan a degradar mejor el herbicida en un período de 72 horas, sin embargo, la cepa que destaca entre el grupo es la EM-64, la cual se mantiene como la primera con un porcentaje de biodegradación progresivo durante las 24, 48 y 72 horas.



**Figura 4. 2.** Porcentaje de biodegradación con la concentración de atrazina al 1%.

Elaborado por: Las autoras

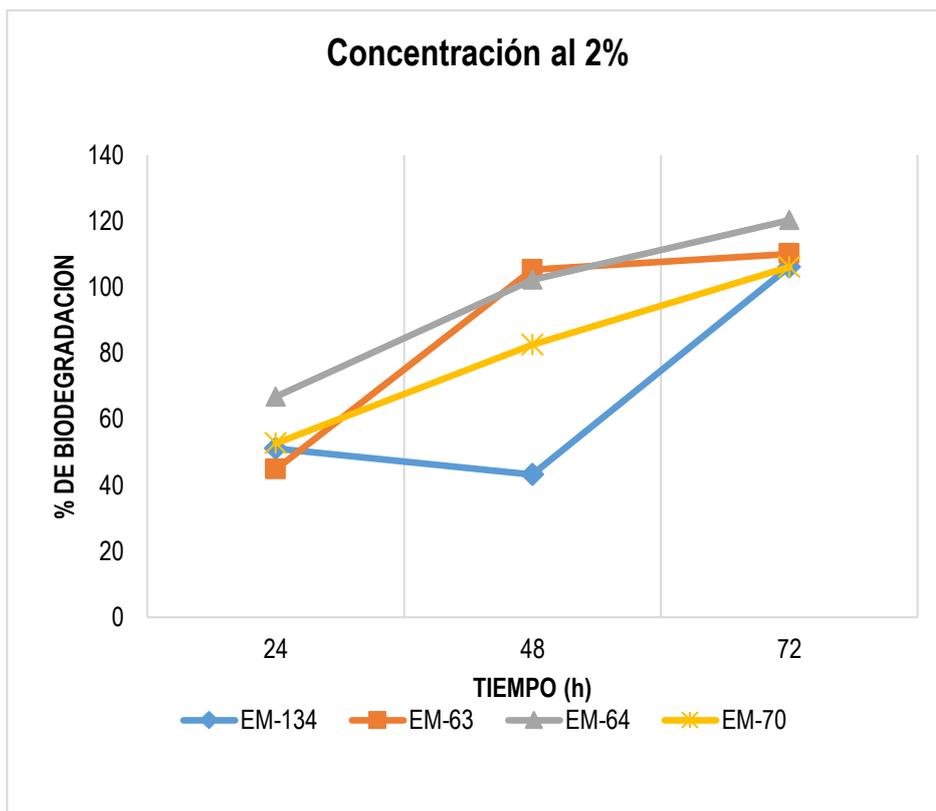
Los porcentajes de biodegradación más altos que alcanzaron las cepas al tener una concentración de atrazina al 2% se observan en la tabla 4.3, en la cual se destacan: la réplica 2 de la cepa EM-64 en 24 horas, la cepa EM-63 con su réplica 4 durante 48 horas, y finalmente las mismas cepas con su réplicas 2 durante las últimas 72 horas. Entre todas las cepas de estudio, la que sigue presentando mejores condiciones para transformar este herbicida es la EM-64, alcanzando un porcentaje de biodegradación de 120.25%.

**Tabla 4. 3.** Porcentaje de biodegradación con la concentración de atrazina al 2%.

Concentración de atrazina al 2%				
Código de cepa	Tiempo (h)	Réplica	Medida de halo	Porcentaje de biodegradación
EM-70	24	4	33.5	52.66
EM-64	24	2	42.5	66.8
EM-63	24	3	28.5	44.8
EM-134	24	3	32.5	51.08
EM-70	48	4	52.5	82.52
EM-64	48	2	65	102.17
EM-63	48	4	67	105.31
EM-134	48	2	58.5	43.22
EM-70	72	1	67.5	106.1
EM-64	72	2	76.5	120.25
EM-63	72	2	70	110.03
EM-134	72	1	67.5	106.1

Elaborado por: Las autoras

Las curvas de crecimiento que se observan en la figura 4.3 sobre las cepas en estudio a una concentración de atrazina al 2%, muestran una variación durante el período experimental. Es visible que la cepa EM-64 sigue con un desarrollo progresivo y exitoso de biodegradación del herbicida en comparación a las demás. Sin embargo, también se identifica que la cepa EM-134 presenta buenos porcentajes de biodegradación transcurridas las 72 horas, no obstante en las 48 horas existe un decrecimiento en la curva, lo que significa un menor porcentaje de biodegradación en contraste con las demás cepas, las cuales también mantienen una progresión.



**Figura 4. 3.** Porcentaje de biodegradación con la concentración de atrazina al 2%.

**Elaborado por:** Las autoras

Mediante el monitoreo de las cepas, se pudo señalar que la aplicación de atrazina al 3% tenía mejores efectos en las cepas del hongo del género *Trichoderma spp.* Por tanto, se detalla en la tabla 4.4 los datos de cada una de las cepas con su porcentaje de biodegradación durante las 24, 48 y 72 horas respectivamente.

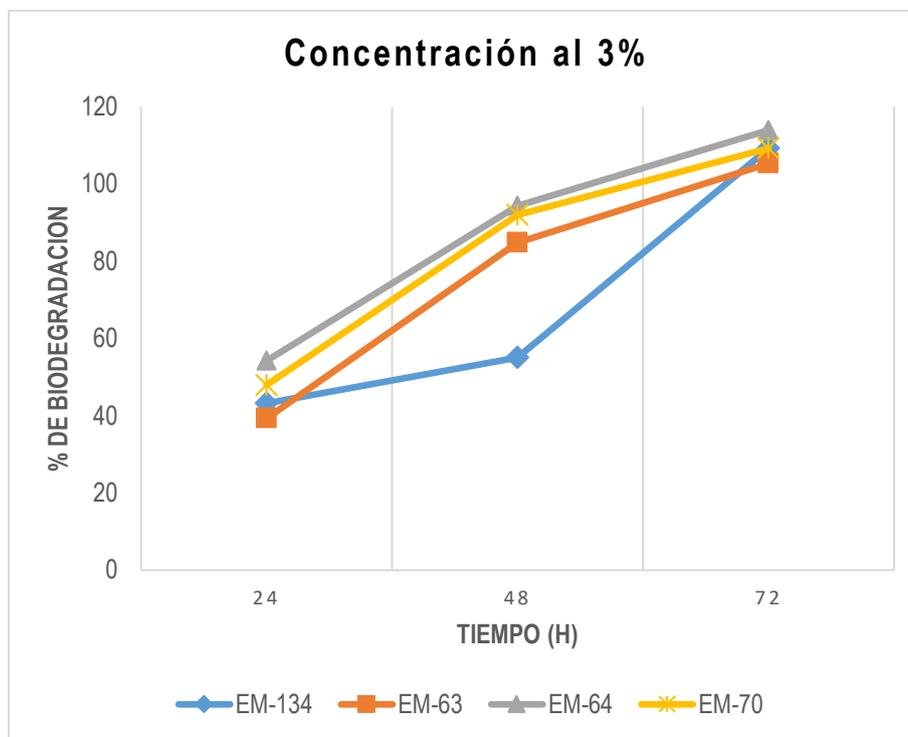
**Tabla 4. 4.** Porcentaje de biodegradación con la concentración de atrazina al 3%.

CONCENTRACIÓN DE ATRAZINA AL 3%				
Código de cepa	Tiempo (h)	Réplica	Medida de halo	Porcentaje de biodegradación
EM-70	24	1	30.5	47.94
EM-64	24	1	34.5	54.23
EM-63	24	4	25	39.3
EM-134	24	4	27.5	43.23
EM-70	48	2	58.5	91.95
EM-64	48	1	60	94.31
EM-63	48	4	54	84.88
EM-134	48	1	57	55.01
EM-70	72	2	68.5	108.24
EM-64	72	3	72.5	113.96
EM-63	72	3	67	105.31
EM-134	72	4	69.5	109.24

Elaborado por: Las autoras

La réplica tres de la cepa EM-64 que se observa en la tabla 4.4 presenta un potencial mayor a las demás, con un halo de 72,5 cm y un 113,96% de biodegradación, demostrando su alta capacidad de inhibir la atrazina durante un periodo de 72 horas de forma eficaz. Comprobando de esta forma, que los aislados fúngicos del género *Trichoderma spp.* son transformadores de sustancias como la atrazina y aportan en la restauración del suelo (Mesa et al., 2019).

Es evidente que las cepas que mejor porcentaje de biodegradación presentan, son aquellas que tienen un halo mayor, por tanto, se asocia que los aislados fúngicos del *Trichoderma spp.* logran inhibir la atrazina gracias a sus enzimas ligniolíticas, las cuales permiten que contribuyan a la degradación de xenobióticos mientras crecen. Los resultados del presente estudio concuerdan con los de la investigación realizada por Pelcastre et al. (2013), que demostraron el uso de la atrazina como única fuente de carbono y nitrógeno para el desarrollo de la cepa, así como un crecimiento exponencial en suelo contaminado con este herbicida.



**Figura 4. 4.** Porcentaje de biodegradación con la concentración de atrazina al 3%.

**Elaborado por:** Las autoras

En la figura 4.4 se aprecia que todas las cepas tienen potencial de biodegradación de atrazina. Sin embargo, las cepas que mejor inhibición muestran son la EM-64 y EM-134, de forma singular la última cepa en mención muestra un decrecimiento en la curva en el periodo de 24 a 48 horas, a su vez, se destaca también como la segunda en presentar mejor porcentaje de biodegradación debido a que su halo tiene un crecimiento óptimo y la suma de todos sus porcentajes calculados durante el monitoreo de 24, 48 y 72 horas, lograron identificarla como la segunda cepa que mejor biodegrada al herbicida en estudio a una concentración de 3%.

Los resultados de la presente investigación se asemejan con el estudio de Chan et al. (2014), quienes encontraron que las cepas tienen variaciones en su crecimiento e inhibición de un herbicida como la atrazina cuando la esporulación se ve afectada por esta sustancia, a pesar de desarrollarse empleándola como fuente de energía, también pueden presentar poca esporulación y su desarrollo se detiene. Esto es lo que muestra la cepa EM-134 que se considera como la segunda en biodegradar mejor este herbicida, sin embargo en las figuras 4.2, 4.3 y 4.4 existe un decrecimiento en la curva cuando está en las 48 horas, y empieza

ascender en las 72 horas, por lo tanto, se comprueba la variación de esta cepa en base al experimento de inhibición de atrazina.

#### 4.2.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN DE ATRAZINA

En la tabla 4.3 se detalla el análisis de varianza entre la medida del halo de las cepas del hongo *Trichoderma spp.* y el porcentaje de biodegradación durante el los tres tiempos de monitoreo de la unidad experimental:

**Tabla 4. 2** .Análisis de varianza (ANOVA) de la unidad experimental.

Factores	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media Cuadrática	F	Valor crítico P
Muestra	30024.92	2	15012.46	118.70	3.14
Columnas	14128.52	1	14128.52	111.71	3.99
Interacción	1590.20	2	795.10	6.29	3.14
Dentro del grupo	8347.48	66	126.48		
<b>Total</b>	54091.12	71.00			

Elaborado por: Las autoras

Se evidencia en la tabla 4.3 que al ser F mayor que el valor crítico P se rechaza la hipótesis nula, debido a que hay diferencias entre los grupos que muestran que los aislados fúngicos si biodegradan la atrazina. Esto coincide con la investigación de Chan et al. (2014), quienes demostraron que las cepas de *Trichoderma* eran eficientes en biodegradar la atrazina en dosis superiores a las recomendadas por los fabricantes de este tipo de herbicidas, las cuales oscilan entre 468 mg/L hasta 3750 mg/L.

No obstante se aplicó la prueba de Tukey para identificar los grupos que presentaban homogeneidad y significancia entre sí, con la finalidad de establecer cuáles son los factores que hacen posible que haya un mayor porcentaje de biodegradación por parte de las cepas del *Trichoderma spp.*

**Tabla 4. 3.** Prueba de Tukey para las variantes en estudio.

Factor A	Factor B	mean	p-value
Tiempo (h)	Medida de halo	6.764	0.885
Tiempo (h)	Porcentaje de biodegradación	34.780	0.047
Medida de halo	Porcentaje de biodegradación	28.016	0.000

Elaborado por: Las autoras

Considerando valor  $\alpha=0.05$  para determinar si hay o no significancia aplicando la prueba de tukey, se aprecia en la tabla 4.4 el p-valor para los factores A y B que corresponden a tiempo versus porcentaje de biodegradación y medida de halo, es menor que  $\alpha=0.05$ , por tanto, hay diferencias significativas entre estos grupos. Consecuentemente se evidencia que el crecimiento del halo se asocia al porcentaje de biodegradación y a su vez en función del tiempo, es decir, que mientras las cepas del *Trichoderma spp.* estén expuestas más tiempo inhibiendo la atrazina, su halo crecerá, esto se debe a que este hongo emplea la sustancia como fuente de energía para su desarrollo (Pelcastre et al., 2013).

Los resultados estadísticos se asemejan a las investigaciones de Chan et al. (2014), Chiriboga et al. (2015) y Mesa et al. (2019), que expusieron el éxito de los aislados fúngicos del *Trichoderma spp.* en laboratorio para biodegradar xenobióticos en sistemas de cultivos, contribuyendo a la restauración ecológica del suelo y actuando como controlador biológico para hongos patógenos. Por esta razón, es un organismo que actualmente se aplica como parte de micorremediación y biotecnología ambiental en el campo agrícola, hidrocarbúrico, alimenticio, entre otros.

### **4.3 CARACTERIZACIÓN A NIVEL MOLECULAR LAS CEPAS FÚNGICAS CON POTENCIAL DE BIODEGRADACIÓN DE ATRAZINA**

La identificación molecular de un aislado fúngico se realiza con la finalidad de comprobar si pertenece o no a un género en específico, en el presente estudio si las cepas analizadas por el Laboratorio IDGEN-Quito (**Ver anexo 4**) son del género *Trichoderma spp.*

En la tabla 4.5 se detallan los resultados de la caracterización de las cepas EM-64 y EM-134, las cuales fueron las que mejor porcentaje de biodegradación presentaron durante el periodo de monitoreo.

**Tabla 4. 4.** Resumen de caracterización molecular.

Código IDgen	Muestra	Longitud	Calidad	Organismo	Fragmento	% de identidad	Nº Accesoión
H476	EM-64	1023	92	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	EF1 alfa	99.63	<a href="#">MT671929.1</a>
H477	EM-134	993	94.9	<i>Trichoderma orientale</i>	EF1 alfa	99.87	<a href="#">KP008888.1</a>

**Elaborado por:** Camila Gallegos-IDGEN

Mediante este análisis molecular se verifica que ambas cepas son *Trichoderma longibrachiatum* y *Trichoderma orientale*, presentando 99.63% de identidad la cepa EM-64 y un 99.87% la cepa EM-134 respectivamente, por tanto, se comprueba que estas cepas son las que mejor potencial de biodegradación tuvieron en la inhibición de atrazina.

Mediante la caracterización se obtuvo ADN de alta calidad para el proceso de amplificación de los fragmentos EF1 alfa (**Figura 4.1**), visualizándose bandas de aproximadamente 1200 pb. A partir de las lecturas resultantes de la secuenciación SANGER se lograron secuencias ensambladas de alta calidad que permitieron determinar las especies fúngicas presentes en cada muestra.

La caracterización molecular en el presente estudio concuerda con la investigación de Hernández et al. (2013), que comprobaron la viabilidad genética en los aislados fúngicos del *Trichoderma*, demostrando que si pertenecían a este género de hongo y visualizando variación genética entre cepas. También ratificaron que la identificación de propiedades genéticas, pueden emplearse para encontrar los aislados en grupos o relacionarlos por áreas geográficas semejantes.



**Figura 4. 5.** Resultados de la electroforesis para las ampliaciones obtenidas con los primers EF1-F/EF1-R [1] en los aislados analizados. MM: Marcador de peso molecular ABM 100pb plus opti DNA marker.

**Elaborado por:** Camila Gallegos-IDGEN

# CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

## 5.1 CONCLUSIONES

- De un total de 100 cepas fúngicas del laboratorio de microbiología molecular de la ESPAM MFL se seleccionaron 4 cepas EM-64, EM-134, EM-63, EM-70, siendo las que presentaron una óptima adaptación al desarrollo para el trabajo experimental.
- Para la determinación del porcentaje de biodegradación, fue necesario realizar tres tipos de concentraciones de atrazina por cada una de las cepas seleccionadas, con el fin de determinar en cuál cepa y en qué concentración se obtuvo el mayor crecimiento del halo por un tiempo de 72 horas. Constatándose que el hongo EM-64 presentó un incremento de 121, 81% de biodegradación en comparación a los demás.
- Una vez realizado el análisis molecular de los hongos se evidenció que pertenecen a la familia *Trichoderma longibrachiatum* y *Trichoderma orientale*, presentando el 99,63% de identidad la cepa EM-64 y un 99,87% la cepa EM-134, las mismas que mostraron mejor porcentaje de biodegradación en el tiempo de análisis respectivo.

## 5.2 RECOMENDACIONES

- Evaluar diferentes familias de *Trichoderma spp.* con el fin de comprobar las alteraciones, características y efectividad en la biodegradación de atrazina u otros insumos químicos.
- Realizar estudios con aplicaciones de mayores dosis de atrazina en las cepas fúngicas para evaluar y comprobar si son capaces de biodegradar este herbicida.
- Continuar con la investigación y evaluación de especies *Trichoderma spp.* para verificar su comportamiento en experimento a nivel de campo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aranzales, U. (2017). Evaluación de la capacidad degradadora de hidrocarburos de una colección de hongos de la Universidad de los Andes. 1–31.
- Aravena, R., Contreras, N., Herrera, R., Infante, J., Del Valle, D., Marín, D., y Muñoz, C. (2017). Microscopía Óptica y Lupa.
- Arbeli, Z. I. V. (2009). Biodegradación De Compuestos Orgánicos Persistentes ( Cop ): I . El Caso De Los Bifenilos Policlorados ( Pcb ) Biodegradation Of Persistent Organic Pollutants ( POPs ): I The Case Of Polychlorinated Biphenyls ( PCB ). 14(1), 57–88.
- Barrero, L. (2017). Clínica Microbiología.
- Bernardo, C., Carbajal, Y., y Contreras, V. (2019). Investigación. Manual del estudiante.
- Cabrera, L. (2015). Técnicas Biológicas de Degradación.
- Camero, J., y Linares, M. (2013). Implementación de un Protocolo para la Conservación de Hongos filamentosos con potencial biotecnológico de la colección del Laboratorio de Química Microbiológica de la Pontificia Universidad Javeriana.
- Chan, W., Heredia, G., Rodríguez, R., y Arias, R. (2014). Toxicidad in vitro de los herbicidas atrazina y paraquat sobre el crecimiento vegetativo y la esporulación de hongos saprobios del suelo. 30(4), 393–406.
- Checa, A. (2018). Método: Medios de cultivo sólidos agar o agarosa.
- Chiriboga, H., Gómez, G., y Gárces, K. (2015). *Trichoderma* spp.
- Collantes, J. (2015). Estudio de dos tipos de fertilizantes químicos y orgánicos en dos híbridos comerciales de pimiento (*Capsicum annun* L.) en la parte alta de la Cuenca del Río Guayas. Universidad Técnica Estatal De Quevedo.
- Contreras, H., y Carreño, C. (2018). Eficiencia de la biodegradación de

hidrocarburos de petróleo por hongos filamentosos aislados de suelo contaminado.

De la Fuente, S. (2022). Modelos de análisis de la varianza.

Delgadillo, A., González, C., Prieto, F., José, V., y Otilio, A. (2011). Tropical and Subtropical Agroecosystems, 14 (2011): 597- 612. 14, 597–612. <http://www.scielo.org.mx/pdf/tsa/v14n2/v14n2a2.pdf>

Enriquez, M. (2016). Elaboración y evaluación de un medio de cultivo sólido a partir de quinua para la producción de hongos. Universidad Central Del Ecuador.

Ercoli, P., y Maidana, M. de los Á. (2019). Biología y evolución: diversidad y cambio (1st ed., Vol. 1). Editorial Maipue.

Esparza, B. (2018). Biodegradación De La Atrazina Mediante Hongos Del Parque Nacional Do Iguacu. Instituto Latinoamericano De Ciencias De La Vida Y De La Naturaleza (Ilacvn).

Esparza, S. (2018). Biodegradación de la Atrazina mediante Hongos del Parque Nacional Do Iguacu. [https://dspace.unila.edu.br/bitstream/handle/123456789/4464/TCC2\\_FINAL.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://dspace.unila.edu.br/bitstream/handle/123456789/4464/TCC2_FINAL.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Gagneten, A., y Regaldo, L. (2021). Informe técnico-científico sobre el uso e impactos del herbicida atrazina en Argentina. Programa Naciones Unidas Para El Desarrollo , 1.

García, J. (2019). Eficiencia De Herbicidas En El Control De Malezas En Plantaciones De Eucalyptus Globulus Labill., Cantón Urcuqui, Provincia De Imbabura.

García, R. (2012). El uso de Agroquímicos en huertos familiares.

Garzón, J., Miranda, J., y Gómez, C. (2017). Aporte de la biorremediación para solucionar problemas de contaminación y su relación con el desarrollo sostenible Introducción Materiales y métodos Resultados. Universidad y

Salud, 19(2), 309. <https://doi.org/10.22267/rus.171902.93>

Gómez, F. (2017). Características Generales De Los Hongos e Infecciones Sistémicas y Oportunistas De Las Micosis Tropicales. *Revista Médica Panamericana* .

Gordillo, J. (2017). Efectos Potenciales De La Atrazina en Mezcla Con Paraquat En Malezas De Cítricos En Tulumayo. *Universidad Nacional Agraria De La Selva* .

Guzmán, Á., Zambrano, D., y Rondón, A. (2017). Contribución al desarrollo de una producción agropecuaria eficiente y sostenible en Ecuador con el uso de bioproductos microbianos autóctonos. *Revista Alfa*, 1(2), 26–36. <https://doi.org/10.33996/revistaalfa.v1i2.22>

Guzmán, P., Olguin, L., Mancilla, O., y Guevara, R. (2016). Perspectiva campesina , intoxicaciones por plaguicidas y uso de agroquímicos. 69–80.

Hansen, A., Treviño, L. G., Márquez, H., Villada, M., González, L., Guillén, R., & Hernández, A. (2013). Atrazina: Un herbicida polémico. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29(SPEC.ISSUE), 65–84.

Hernández, A., Jimenez, M., Arcía, A., Ulacio, D., y Mendez, N. (2013). Caracterización Molecular De Doce Aislamientos De *Trichoderma* spp . MEDIANTE RAPD Y rADN-ITS. 25(3), 167–174.

Hernández, G., Álvarez, N., y Ríos, L. (2017). Biorremediación de organofosforados por hongos y bacterias en suelos agrícolas: revisión sistemática *Bioremediation of organophosphates by fungi and bacteria in agricultural soils* . A systematic review em solos agrícolas: revisão sistemática. 18(1), 139–159.

Huerta Jiménez, A. (2016). Monitoreo De Atrazina, Hidroxiatrazina Y Desetilatrazina, En Una Parcela Agrícola Regada Con Agua Residual, Durante Un Ciclo De Maíz. *Universidad Nacional Autónoma de México*.

Isac, L. (2018). Microscopio óptico. Figura 1, 27–32.

- Lazcano, E. (2018). El microscopio óptico. 1(1), 1–2.
- Lemus, D., Lemus, R., Maniscalchi, T., y Bónoli, S. (2015). Bacterial And Fungal Contamination Of Mobile Phone Equipment In Barcelona, Anzoátegui State, Venezuela. *Saber, Universidad de Oriente, Venezuela.*, 27, 547–553.
- López, H. (2019). Agroquímicos en Quintana Roo: Impacto en la Alimentación, Salud y Medio Ambiente. *Revista de Estudios Interculturales*.
- Martínez, M., Ormeño, E., y Moles, C. (2013). Manual teórico-práctico: Los biofertilizantes y su uso en la agricultura. SAGARPA-COFUCRO-UNAM., 1.
- Mesa, A., Marín, A., y Jaime, C. (2019). Metabolitos secundarios en *Trichoderma* spp . y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas applications. 41(111), 32–44. <https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v41n111a02>
- Navarro, E. (2013). *Micrología Veterinaria Tesis Y Disertaciones Academicas Educación Superior*.
- Ongay, L., y Códiz, G. (2021). Secuenciación de ADN por el método de terminación de la cadena de Sanger. *Mensaje Bioquímico*, 45, 23–34. <http://bq.facmed.unam.mx/tab>
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (2019). *El Estado mundial de la Agricultura y la Alimentación*.
- Oviedo, L., y Díaz, L. (2017). Microorganismos nativos tolerantes a Atrazina aislados de suelos agrícolas en el departamento de Córdoba , Colombia Atrazine- tolerant native microorganisms isolated from agricultural soils in the department of Cordoba , Colombia. *Revista Colombianade Ciencia Animal*, 9, 60–66. <https://doi.org/10.24188/recia.v9.nS.2017.522>
- Pelcastre, I., Ibarra, V., Roberto, J., Navarrete, M., Ramirez, G., Abelardo, C., Sandoval, A., y Arturo, O. (2013). Available in: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93928324012>.
- Peña, M., Macías, F., y Racines, E. (2017). Evaluación del crecimiento y

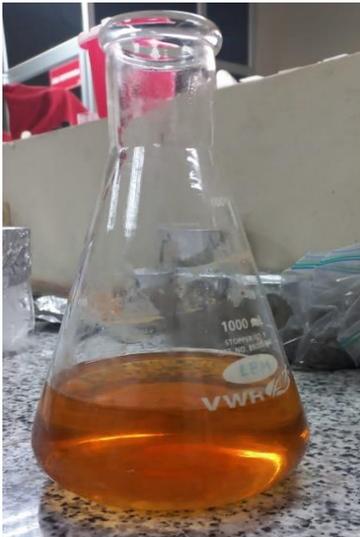
- producción de biomasa de dos cepas del género. 10, 33–39.
- Planificación, S. N. de. (2021). Plan-de-Creación-de-Oportunidades-2021-2025-Aprobado\_compressed.pdf.
- Portilla, H. (2019). Evaluación del porcentaje de biodegradación aerobia de dos materiales de empaque elaborados a partir de almidón y harina de yuca. 1–45.
- Puerta, I., Mejía, J., y Osorio, G. (2012). Microbiología De La Fermentación Del Mucílago De Café Según Su Madurez Y Selección. *Cenicafé*, 63(2), 58–78.
- Roa, L., y López, J. (2016). Agricultura funcional para la seguridad alimentaria. *Ciencia*, 1, 50–57.
- Rodríguez, C., y Zhurbenko, R. (2018). Manual de Medios de Cultivo 2018.
- Salazar, M., Mora, L., Chávez, B., Gómez, D., Zamor, O., y Prado, B. (2018). Susceptibilidad del suelo al impacto humano: Caso del herbicida atrazina. *Boletín de La Sociedad Geológica Mexicana*, 70(1), 95–119. <https://doi.org/10.18268/BSGM2018v70n1a6>
- Santamaría, L., y Ureta, C. (2014). *Fungicidas*. 12(2007), 703–712. <https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/saglikli-beslenme-hareketli-hayat-db/Yayinlar/kitaplar/diger-kitaplar/TBSA-Beslenme-Yayini.pdf>
- Valdés, R. (2018). Agar Papa Dextrosa (PDA). 562.
- Valdivieso, C., Cedeño, G., y Axel, G. (2021). Análisis Estadístico de los datos climáticos históricos de la SPAM MFL Statistical Analysis of the historical climate data of SPAM MFL .
- Vargas, S. (2013). Formulación, Caracterización Fitoquímica y Físicoquímica, y Dosificación de Insecticidas Orgánicos para el control de Mosca Blanca (*Bemisia tabaci*) en el cultivo de Fréjol (*Phaseolus vulgaris*, L.).
- Vázquez, M., Moreno, M., Amodeo, M., y Bianchinotti, M. (2021). Effects of glyphosate on soil fungal communities: A field study. *Revista Argentina de*

Microbiologia, 53(4), 349–358. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2020.10.005>

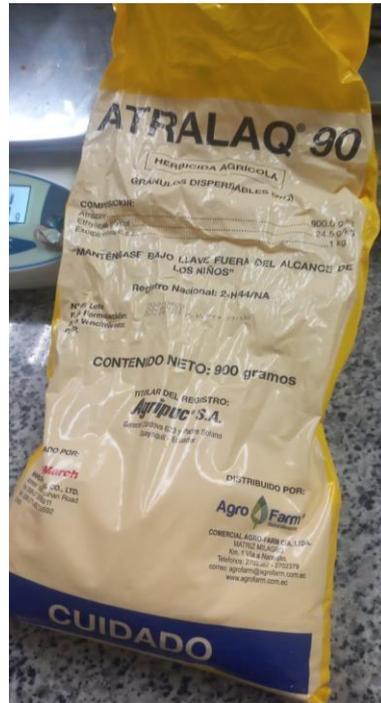
Zambrano, D. (2021). Bioprospección de cepas de hongo y bacterias productoras de enzimas que aceleren la descomposición de residuos agropecuarios en el compostaje.

**ANEXOS**

## ANEXO 1. Siembra de los aislados fungicos en el medio de cultivo



## ANEXO 2. Incorporación de la atrazina



## ANEXO 3. Tablas de Excel de control

## TABLAS DE EXCEL DE CONTROL 24 HORAS AL 1%

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	AREA	AREA2	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN
EM-70	1%	1	28	37	32,5	51,08
EM-70	1%	2	39	39	39	61,30
EM-70	1%	3	40	30	35	55,01
EM-70	1%	4	15	17	16	25,15

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	ÁREA	ÁREA2	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN
EM-64	1%	1	30	28	29	45,58
EM-64	1%	2	20	16	18	28,29
EM-64	1%	3	57	39	48	75,45
EM-64	1%	4	23	21	22	34,58

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	AREA	AREA2	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN
EM-63	1%	1	20	25	22,5	35,37
EM-63	1%	2	30	21	25,5	40,08
EM-63	1%	3	20	24	22	34,58
EM-63	1%	4	20	22	21	33,01

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	AREA	AREA2	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN
EM-134	1%	1	29	27	28	44,01
EM-134	1%	2	30	22	26	40,87
EM-134	1%	3	30	21	25,5	40,08
EM-134	1%	4	25	25	25	39,30

## TABLAS DE EXCEL DE CONTROL 24 HORAS AL 2%

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	ÁREA	ÁREA2	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJES DE BIODEGRADACIÓN
EM-70	2%	1	25	34	29,5	46,37
EM-70	2%	2	17	17	17	26,72
EM-70	2%	3	20	20	20	31,44
EM-70	2%	4	37	30	33,5	52,66

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	ÁREA	AREA2	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJES DE BIODEGRADACIÓN
EM-64	2%	1	35	30	32,5	51,08
EM-64	2%	2	45	40	42,5	66,80
EM-64	2%	3	40	30	35	55,01
EM-64	2%	4	10	15	12,5	19,65

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	ÁREA	ÁREA2	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJES DE BIODEGRADACIÓN
EM-63	2%	1	30	25	27,5	43,23
EM-63	2%	2	20	23	21,5	33,79
EM-63	2%	3	30	27	28,5	44,80
EM-63	2%	4	23	24	23,5	36,94

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	AREA	AREA2	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJES DE BIODEGRADACIÓN
EM-134	2%	1	20	20	20	31,44
EM-134	2%	2	30	20	25	39,30
EM-134	2%	3	30	35	32,5	51,08
EM-134	2%	4	17	12	14,5	22,79

#### TABLAS DE EXCEL DE CONTROL 24 HORAS AL 3%

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	AREA	AREA2	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN
EM-70	3%	1	30	31	30,5	47,94
EM-70	3%	2	30	20	25	39,30
EM-70	3%	3	13	15	14	22,01
EM-70	3%	4	19	15	17	26,72

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	AREA	AREA2	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN
EM-64	3%	1	32	37	34,5	54,23
EM-64	3%	2	18	17	17,5	27,51
EM-64	3%	3	30	28	29	45,58
EM-64	3%	4	15	18	16,5	25,94

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	AREA	ÁREA	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN
EM-63	2%	1	20	19	19,5	30,65
EM-63	2%	2	15	17	16	25,15
EM-63	2%	3	12	7	9,5	14,93
EM-63	2%	4	30	20	25	39,30

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	AREA	AREA2	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN
EM-70	1%	1	55	55	55	86,44
EM-70	1%	2	55	65	60	94,30
EM-70	1%	3	70	60	65	102,15
EM-70	1%	4	48	43	45,5	71,51

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	AREA	AREA	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN
EM-134	3%	1	25	20	22,5	35,37
EM-134	3%	2	15	15	15	23,58
EM-134	3%	3	20	23	21,5	33,79
EM-134	3%	4	25	30	27,5	43,23

**TABLAS DE ANEXO DE CONTROL 48 HORAS AL 1%**

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	ÁREA	ÁREA2	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN
EM-64	1%	1	70	65	67,5	106,10
EM-64	1%	2	65	65	65	102,17
EM-64	1%	3	75	70	72,5	113,96
EM-64	1%	4	60	59	59,5	93,52

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	AREA	AREA2	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN
EM-63	1%	1	45	45	45	70,73
EM-63	1%	2	35	45	40	62,87
EM-63	1%	3	50	45	47,5	74,66
EM-63	1%	4	24	25	24,5	38,51

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	AREA	AREA2	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN
EM-134	1%	1	55	65	60mm	47,15
EM-134	1%	2	60	60	60mm	58,94
EM-134	1%	3	55	57	56mm	15,71
EM-134	1%	4	55	60	57,5mm	20,43

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	AREA	AREA2	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJES DE BIODEGRADACIÓN
EM-134	2%	1	64	59	61,5mm	15,71
EM-134	2%	2	52	65	58,5mm	43,22
EM-134	2%	3	55	55	55mm	43,22
EM-134	2%	4	55	50	52,5mm	39,29

**TABLAS DE EXCEL DE CONTROL 48 HORAS AL 2%**

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	ÁREA	ÁREA2	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJES DE BIODEGRADACIÓN
EM-70	2%	1	55	65	60	94,31
EM-70	2%	2	50	50	50	78,59
EM-70	2%	3	58	65	61,5	96,67
EM-70	2%	4	50	55	52,5	82,52

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	ÁREA	AREA2	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJES DE BIODEGRADACIÓN
EM-64	2%	1	67	40	53,5	84,09
EM-64	2%	2	70	60	65	102,17
EM-64	2%	3	50	70	60	94,31
EM-64	2%	4	54	51	52,5	82,52

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	ÁREA	ÁREA2	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJES DE BIODEGRADACIÓN
EM-63	2%	1	58	50	54	84,88
EM-63	2%	2	50	50	50	78,59
EM-63	2%	3	65	50	57,5	90,38
EM-63	2%	4	69	65	67	105,31

**TABLAS DE EXCEL DE CONTROL 48 HORAS AL 3%**

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	AREA	AREA2	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN
EM-70	3%	1	50	44	47	73,88
EM-70	3%	2	59	58	58,5	91,95
EM-70	3%	3	39	35	37	58,16
EM-70	3%	4	50	45	47,5	74,66

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	AREA	AREA2	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN
EM-64	3%	1	65	55	60	94,31
EM-64	3%	2	55	55	55	86,45
EM-64	3%	3	60	53	56,5	88,81
EM-64	3%	4	70	40	55	86,45

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	AREA	ÁREA	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN
EM-63	3%	1	45	44	44,5	69,95
EM-63	3%	2	45	43	44	69,16
EM-63	3%	3	40	40	40	62,87
EM-63	3%	4	65	43	54	84,88

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	AREA	AREA	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN
EM-134	3%	1	55	59	57mm	55,01
EM-134	3%	2	56	54	55mm	27,5
EM-134	3%	3	50	60	55mm	15,71
EM-134	3%	4	60	55	57,5mm	31,43

#### TABLAS DE EXCEL DE CONTROL 72 HORAS AL 1%

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	AREA	AREA2	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN
EM-70	1%	1	60	55	57,5mm	90,38
EM-70	1%	2	60	70	65mm	102,16
EM-70	1%	3	65	70	67,5mm	106,09
EM-70	1%	4	75	73	74mm	116,31

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	ÁREA	ÁREA2	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN
EM-64	1%	1	70	80	75mm	117,88
EM-64	1%	2	75	80	77,5mm	121,81
EM-64	1%	3	69	75	72mm	113,17
EM-64	1%	4	75	78	76,5mm	120,24

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	AREA	AREA2	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN
EM-63	1%	1	60	65	62,5	98,23
EM-63	1%	2	70	70	70	110,02
EM-63	1%	3	75	70	72,5	113,9
EM-63	1%	4	50	54	52	81,73

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	AREA	AREA2	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN
EM-134	1%	1	68	70	69	108,45
EM-134	1%	2	75	75	75	117,88
EM-134	1%	3	65	60	62,5	98,23
EM-134	1%	4	70	68	69	108,45

**TABLAS DE EXCEL DE CONTROL 72 HORAS AL 2%**

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	ÁREA	ÁREA2	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJES DE BIODEGRADACIÓN
EM-70	2%	1	65	70	67,5	106,10
EM-70	2%	2	50	55	52,5	82,52
EM-70	2%	3	60	65	62,5	98,24
EM-70	2%	4	65	65	65	102,17

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	ÁREA	AREA2	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJES DE BIODEGRADACIÓN
EM-64	2%	1	65	70	67,5	106,10
EM-64	2%	2	70	83	76,5	120,25
EM-64	2%	3	70	75	72,5	113,96
EM-64	2%	4	60	65	62,5	98,24

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	ÁREA	ÁREA2	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJES DE BIODEGRADACIÓN
EM-63	2%	1	60	65	62,5	98,24
EM-63	2%	2	70	70	70	110,03
EM-63	2%	3	60	70	65	102,17
EM-63	2%	4	68	70	69	108,46

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	AREA	AREA2	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJES DE BIODEGRADACIÓN
EM-134	2%	1	70	65	67,5	106,10
EM-134	2%	2	55	62	58,5	91,95
EM-134	2%	3	65	70	67,5	106,10
EM-134	2%	4	65	70	67,5	106,10

## TABLAS DE EXCEL DE CONTROL 72 HORAS AL 3%

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	AREA	AREA2	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN
EM-70	3%	1	65	70	67,5	106,10
EM-70	3%	2	69	70	69,5	109,24
EM-70	3%	3	55	55	55	86,45
EM-70	3%	4	65	70	67,5	106,10

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	AREA	AREA2	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN
EM-64	3%	1	72	64	68	106,88
EM-64	3%	2	65	69	67	105,31
EM-64	3%	3	75	70	72,5	113,96
EM-64	3%	4	70	65	67,5	106,10

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	AREA	ÁREA	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN
EM-63	3%	1	60	65	62,5	98,24
EM-63	3%	2	60	70	65	102,17
EM-63	3%	3	60	74	67	105,31
EM-63	3%	4	60	70	65	102,17

CODIGO DE CEPAS	PORCENTAJE	RÉPLICA	AREA	AREA	MEDIDA DEL HALO	PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN
EM-134	3%	1	60	65	62,5	98,24
EM-134	3%	2	65	60	62,5	98,24
EM-134	3%	3	55	70	62,5	98,24
EM-134	3%	4	70	69	69,5	109,24

## ANEXO 4 Estudio de las cepas analizadas por el Laboratorio IDGEN-Quito



Av. De los Granados E14-285 y Eloy Alfaro  
 Teléfono: 0998982450  
 e-mail: [idgen.ecuador@gmail.com](mailto:idgen.ecuador@gmail.com)  
 R.U.C. 1713443479001

### Informe de Resultados

**Nombre del Proyecto:** Identificación molecular de microorganismos – Evelin Paladines  
**Informe No.:** A-356  
**Técnico Responsable:** Camila Gallegos, Ing.  
**Fecha:** 16/01/2023

### Resumen de Resultados

Código IDgen	Muestra	Longitud	Calidad	Organismo	Fragmento	% de identidad	Nº Acesión
H476	EM-64	1023	92	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	EF1 alfa	99.63	<a href="#">MT671929.1</a>
H477	EM-134	993	94.9	<i>Trichoderma orientale</i>	EF1 alfa	99.87	<a href="#">KP008888.1</a>

Firma autorizada

Francisco Javier Flores Flor, PhD.

Propietario IDgen



Av. De los Granados E14-285 y Eloy Alfaro  
 Teléfono: 0998982450  
 e-mail: [idgen.ecuador@gmail.com](mailto:idgen.ecuador@gmail.com)  
 R.U.C. 1713443479001

### Detalle de Resultados

**Nombre del Proyecto:** Identificación molecular de microorganismos – Evelin Paladines

**Informe No.:** A-356

**Técnico Responsable:** Camila Gallegos, Ing.

**Fecha:** 16/01/2023

**Estudio:** Identificación molecular (extracción de ADN, amplificación de barcode, secuenciación estándar, ensamblaje de productos de PCR y búsqueda en base de datos).

#### Detalles técnicos:

**Muestras usadas:** Aislados fúngicos en caja Petri

**Método de determinación:** Identificación molecular por barcoding EF1 alfa.

#### Procedimiento:

- La extracción de ADN se realizó por métodos convencionales, utilizando aproximadamente 100 mg de muestra de micelio
- Se evaluó la integridad y calidad del ADN mediante espectrofotometría de microvolúmenes y visualización en gel de agarosa.
- El ADN obtenido se diluyó hasta una concentración de aproximadamente 20ng/uL para la amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
- Se utilizaron los primers EF1 alfa: EF1-F/EF1-R<sup>[1]</sup> para la amplificación del ADN extraído
- Los productos de PCR fueron purificados previo a la secuenciación por el método SANGER
- Las secuencias obtenidas fueron limpiadas y ensambladas usando programas bioinformáticos.
- Se compararon las secuencias ensambladas con la base de datos de nucleótidos de GenBank del NCBI.

#### Resultados:

Se obtuvo ADN de alta calidad para el proceso de amplificación de los fragmentos EF1 alfa (Figura 1), visualizándose bandas de aproximadamente 1200 pb. A partir de las lecturas resultantes de la secuenciación SANGER se obtuvieron secuencias ensambladas de alta calidad que permitieron determinar las especies fúngicas presentes en cada muestra.

<sup>[1]</sup> Carbone, I., & Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91(3), 553-556.



**Figura 1:** Resultados de la electroforesis para los amplicones obtenidos con los primers EF1-F/EF1-R<sup>[1]</sup> en los aislados analizados.

MM: Marcador de peso molecular ABM 100pb plus opti DNA marker.

>H476.EM-64

```

TTTTTTTTTTTTTTTTTCTCTTTTTTTTTTTGATTGACTGATCACGGTACTTCCCGCCGACTGCGCCATTCTCATCAT
TGCCGCCGGTACTGGTGAKTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGCCAGACCCGTGAGCACGCTCTGCTCGCCTACAC
CCTGGGTGTCAAGCAGCTCATCGTCGCCATCAACAAGATGGACTGCGCAACTGGGCCGAGGCTCGTTACCAGGAAAT
CATCAAGGAGACTTCCAACCTCATCAAGAAGTGGCTTCAACCCCAAGGCCGTTGCTTTGTCGCCATCTCCGGCTTCA
ACGGTGACAACATGCTCACCCCTCCACCAACTGCCCTGGTACAAGGGCTGGGAGAAGGAGACCAAGGCTGGCAAG
TTCACGGCAAGACCCTCCTTGAGGCCATCGACTCCATCGAGCCCCCAAGCGTCCCACGGACAAGCCCTGCGTCTGC
CCCTGCAGGACGTCTACAAGATCGGTGGTATCGGAACAGTTCGCCGTCGGCCGTATCGAGACTGGTGTCTCAAGCCCG
GCATGGTCGTACCTTCGCCCCCTCAACGTCAACACTGAAGTCAAGTCCGTTGAGATGCACCACGAGCAGCTCGCCGA
GGGCCAGCCCGGTGACAACGTTGGTTTCAACGTGAAGAACGTTTCCGTCAAGGAAATCCGCCGTGGCAACGTTGCCGG
TGACTCCAAGAACGACCCCCCATGGCGCCGCTTCTTACCGCCCCAGGTCATGTCATGAACCACCCCGCCAGGTC
GGTGCCGGCTACGCCCCGTCCTCGACTGCCCACTGCCACATTGCCGCAAGTTCGCCGAGCTCCTCGAGAAGATCG
ACCGCCGTACCGGTAAGGCCACCGAGACTGCCCCAAGTTCATCAAGTCCGGTGACTCCGCCATCGTCAAGATGATTC
CTCCAAGCCCATGTGCGTTGAGGCTTNCACCGACWACCCTCCCCGGTCTGTTTCGCCCTCCGTGACATGCGCAAC

```



Av. De los Granados E14-285 y Eloy Alfaro  
Teléfono: 0998982450  
e-mail: [idgen.ecuador@gmail.com](mailto:idgen.ecuador@gmail.com)  
R.U.C. 1713443479001

>H477.EM-134

GGCCGACTGCGCTATTCTCATCATTGCCGCCGGTACTGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGCCAGACCCGT  
GAGCAGCTCTGCTCGCCTACACCCTGGGTGTCAAGCAGCTCATCGTCGCCATCAACAAGATGGACTGCCAAGTGG  
GCCGAGGCTCGTTACCAGGAGATCATCAAGGAGACTTCCAATTCATCAAGAAGTTCGGCTTCAACCCCAAGGCCGTT  
GCTTTCGTCCCATCTCCGGCTTCAACGGTGACAACATGCTCACCCCTCCACCAACTGCCCTGGTACAAGGGCTGGG  
AGAAGGAGACCAAGGCTGGCAAGTTCACCGCAAGACCCTCCTTGAGGCCATCGACTCCATCGACCCCAAGCGTC  
CCACGGACAAGCCCTGCGTCTGCCCTCCAGGACGTCTACAAGATCGGTGGTATCGGAACAGTTCGGTCCGGCGTAT  
CGAGACTGGTGTCTCAAGCCCGCATGGTGTACCTTCGCCCTCCACAGTCAACTGAAGTCAAGTCCGTTGAG  
ATGCCACGAGCAGCTCTCCGAGGGCCAGCCGGTGACAACGTTGTTTCAAGTGAAGAAGCTTTCGGTCAAGGAA  
ATCCGCCGTGGCAACGTTGCCGGTACTCCAAGAAGACCCCCCATGGGCGCCGTTCTTTCACCGCCAGGTCATTG  
TCATGAACCACCCGGCCAGGTCGGTGCCTGCTACGCCCCGCTCGACTGCCACACTGCCACATTGCCTGCAAGTT  
CGCCGAGCTCCTCGAGAAGATCGACCGCGTACCGGTAAGGCCACCGAGACTGCCCAAGTTCATCAAGTCCGGTGA  
CTCCGCCATCGTCAAGATGTTCCCTCAAGCCATGTGCGTTGAGGCTTTCACCGACTACCTCCCTGGGTCGTTTCG  
CCCTCCGTGACATGCGCCAACGCGTTTGGTGGGAGAAGAAAATAAAA

#### Conclusiones:

- Secuencias de alta calidad fueron obtenidas tras la amplificación con los primers EF1-F/EF1-R, del material genético extraído.
- Con porcentajes de identidad de 99.63% y 99.87%, se determinó que los aislados fúngicos pertenecen a *Trichoderma longibrachiatum* y *Trichoderma orientale*, respectivamente.

Firma autorizada

Francisco Javier Flores Flor, PhD.

Propietario IDgen

**ANEXO 5. Cepas fúngicas con sus diferentes porcentajes de atrazina**