

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y**  
**AMBIENTALES**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**



**INFORME FINAL DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR,**  
**MODALIDAD PRESENCIAL**

**TEMA:**

**“EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE HONGOS AISLADOS DE**  
**SUELO PRÍSTINO DE PÁRAMO DEL PARQUE NACIONAL CAYAMBE**  
**COCA”**

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

**Línea de investigación: Biotecnología, energía y recursos naturales renovables.**

**AUTOR:**

**Matías Benjamín García Navarrete**

**DIRECTOR:**

**MSc. Santiago Zárate Baca**

**Ibarra, julio 2024**



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**  
**BIBLIOTECA UNIVERSITARIA**

**AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN**  
**A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

**1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA**

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

<b>DATOS DE CONTACTO</b>			
<b>CÉDULA DE IDENTIDAD:</b>	100476838-6		
<b>APELLIDOS Y NOMBRES:</b>	García Navarrete Matías Benjamín		
<b>DIRECCIÓN:</b>	Av. El Retorno, Calle Quilago y Los Pinos		
<b>EMAIL:</b>	mbgarcian@utn.edu.ec		
<b>TELÉFONO FIJO:</b>	(06) 2-539-017	<b>TELÉFONO MÓVIL:</b>	0985307391

<b>DATOS DE LA OBRA</b>	
<b>TÍTULO:</b>	EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE HONGOS AISLADOS DE SUELO PRÍSTINO DE PÁRAMO DEL PARQUE NACIONAL CAYAMBE COCA.
<b>AUTOR (ES):</b>	Matías Benjamín García Navarrete
<b>FECHA: DD/MM/AAAA</b>	18/07/2024
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
<b>PROGRAMA:</b>	<input checked="" type="checkbox"/> <b>PREGRADO</b> <input type="checkbox"/> <b>POSGRADO</b>
<b>TITULO POR EL QUE OPTA:</b>	Ingeniero en Biotecnología
<b>ASESOR /DIRECTOR:</b>	MSc. Sandoval Guano Carla Alexandra / MSc. Santiago Zárate Baca

## 2. CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrollo, sin los derechos de autores terceros, por lo tanto, la obra es original y es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 18 días del mes de Julio de 2024

### **EL AUTOR:**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Matías Benjamín García Navarrete', is written over a horizontal dotted line. The signature is stylized and somewhat abstract.

Matías Benjamín García Navarrete

C.I.: 100476838-6

**CERTIFICACIÓN DIRECTOR DEL TRABAJO  
DE INTERGRACIÓN CURRICULAR**

Ibarra, 18 de julio de 2024.

Santiago Zárate Baca

DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final del trabajo de Integración Curricular, elmismo que se ajusta a las normas vigentes de la Universidad Técnica del Norte; en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.



MSc. Santiago Zárate Baca

C.C.: 171897484-1

## APROBACIÓN DEL COMITÉ CALIFICADOR

El Comité Calificado del trabajo de Integración Curricular “EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE HONGOS AISLADOS DE SUELO PRÍSTINO DE PÁRAMO DEL PARQUE NACIONAL CAYAMBE COCA” elaborado por Matías Benjamín García Navarrete, previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Universidad Técnica del Norte:

(f) 

MSc. Santiago Zárate Baca

C.C.: 171897484-1

(f) 

MSc. Sandoval

Guano Carla

Alexandra

C.C.: 171801729-4

## **PRESENTACIÓN**

Yo, García Navarrete Matías Benjamín como autor de la Tesis Titulada **“EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE HONGOS AISLADOS DE SUELO PRÍSTINO DE PÁRAMO DEL PARQUE NACIONAL CAYAMBE COCA.”**, me hago responsable de los resultados, discusión, conclusiones y demás parte de la investigación; pongo este documento como fuente de apoyo para consultas dirigidas a todos los estudiantes y futuras investigaciones relacionadas con el área.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a mi madre Mireya del Pilar Navarrete Díaz y a mi padre Luís Enrique García Moreno por el especial apoyo emocional, a mis hermanos Diego Sebastián García Navarrete y Kevin Santiago García Navarrete por atención presentada durante mi transcurso académico, a todos los docentes de la Carrera de Biotecnología por brindarme el conocimiento necesario para mi desarrollo ético y moral a nivel profesional, a los magísteres Carla Alexandra Sandoval Guano y Santiago Zárate Baca por la guía brindada durante el desarrollo de la investigación, a la ingeniera María Elena Cevallos Rivera técnica en los laboratorios de Biotecnología por brindarme nuevo conocimiento y ayuda en el laboratorio, finalmente, a la Universidad Técnica del Norte.

## **DATOS GENERALES**

**TÍTULO DEL TRABAJO DE GRADO:** EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE HONGOS AISLADOS DE SUELO PRÍSTINO DE PÁRAMO DEL PARQUE NACIONAL CAYAMBE COCA.

**FACULTAD:** INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES (FICAYA).

**CARRERA:** INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TIPO DE TRABAJO DE GRADO:**

- INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL
  - APLICACIÓN BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:**

**LUGAR DE EJECUCIÓN DEL PROYECTO:** IBARRA, IMBABURA, ECUADOR.

**FECHA DE INICIO:** FEBRERO

**AUTOR:** GARCÍA NAVARRETE MATÍAS BENJAMÍN

**DIRECTOR SUGERIDO:** MSc. ZARATE BACA SANTIAGO

## Índice de contenidos

<b>AGRADECIMIENTO .....</b>	<b>VII</b>
<b>Índice de contenidos.....</b>	<b>IX</b>
Índice de tablas.....	XII
Índice de gráficas .....	XIII
<b>Resumen.....</b>	<b>XIV</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>16</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>16</b>
1.1. Problema.....	16
1.2. Justificación.....	16
1.3. Objetivos de la investigación .....	17
1.3.1. General.....	17
1.3.2. Específicos.....	17
1.4. Pregunta directriz .....	17
1.5. Marco legal.....	18
1.6. Alcance.....	19
<b>CAPITULO II .....</b>	<b>20</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>20</b>
2.1. Hongos de páramo y actividad enzimática.....	20
2.2. <i>Phylum: Ascomycota</i> .....	21
2.3. Esporulación fúngica.....	22
2.3.1. Control nutricional.....	23
2.3.2. Efecto de luz .....	23
2.3.3. Tejido huésped.....	23
2.4. Aplicación de hongos en biorremediación .....	24

**CAPÍTULO III.....27**

**3. MARCO METODOLÓGICO .....27**

3.1. Descripción del área de estudio.....27

3.1.1. Investigación documental .....27

3.2. Determinación de actividad enzimática de los hongos en diferentes sustratos.....28

3.2.1. Crecimiento vegetativo de cepas fúngicas.....28

3.2.2. Cribados de actividades enzimáticas .....28

3.3. Formulación de medios líquidos de esporulación para cepas fúngicas.....28

3.3.1. Medios de esporulación líquida.....28

3.3.2. Estimulación en la producción de esporas en medios líquidos .....29

3.3.3. Germinación y viabilidad de esporas fúngicas .....30

3.4. Identificación de sustratos para la conservación de las cepas fúngicas .....30

3.4.1. Esterilización de semillas .....30

3.4.2. Inoculación y conservación de las cepas fúngicas.....30

3.4.3. Reactivación del cepario.....31

3.4.4. Análisis morfológico y enzimático .....31

3.5. Análisis estadístico.....32

3.5.1. Análisis del halo de hidrólisis y halo de crecimiento fúngico .....32

3.5.2. Análisis de esporas generadas y germinación .....33

3.5.3. Análisis del halo de crecimiento fúngico .....34

**CAPITULO IV .....35**

**4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....35**

4.1. Objetivo 1: Determinación de actividad enzimática de los hongos en diferentes sustratos  
.....35

4.1.1. Actividad amilasa .....35

4.1.2. Actividad ureasa .....36

4.1.3. Actividad fosfatasa .....38

4.1.4. Actividad ari-sulfatasa.....39

4.2. Objetivo 2: Formular medios líquidos de esporulación para cepas fúngicas.....39

4.3. Objetivo 3: Identificación de sustratos para la conservación de las cepas fúngicas. ....	43
4.3.1. Microscopía .....	43
4.3.2. Viabilidad enzimática .....	48
<b>CAPITULO V.....</b>	<b>58</b>
<b>5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>58</b>
5.1. Conclusiones .....	58
5.2. Recomendaciones.....	59
Bibliografía.....	60
ANEXOS.....	69

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Tipos de estructuras de ascas de Ascomycete.....	22
<b>Tabla 2.</b> Identificación de aislados prístinos y codificación. ....	27
<b>Tabla 3.</b> Agar Sabouraud Dextrosa con extracto de levadura (ASD). ....	29
<b>Tabla 4.</b> Medio extracto de malta (M). ....	29
<b>Tabla 5.</b> Medio extracto de levadura y glucosa (LG). ....	29
<b>Tabla 6.</b> Codificación de los medios enzimáticos a analizar en el objetivo 1.....	32
<b>Tabla 7.</b> Codificación de los medios de esporulación a analizar en el objetivo 2. ....	33
<b>Tabla 8.</b> Codificación de los medios de conservación a analizar en el objetivo 3.....	34
<b>Tabla 9.</b> Microscopia de las cepas reactivadas a los 45 y 90 días posteriores a su conservación en <i>Z. mays</i> y <i>O. sativa</i> .....	44

## Índice de gráficas

<b>Figura 1.</b> Resumen del potencial industrial, biotecnológico y biorremediación de ambientes utilizando actividad enzimática de hongos de suelo prístino de páramo .....	21
<b>Figura 2.</b> Peritecio de <i>Gibberella zeae</i> que muestra un asco (a) descargando su contenido de esporas y líquido epiplasmático, un asco maduro que se extiende hacia arriba listo para disparar (b) y un asco maduro no extendido (c). Barra de escala = 50 $\mu$ m .....	22
<b>Figura 3.</b> Actividad amilasa de las cepas MP4, PP2, PQ1 y <i>A. niger</i> .....	36
<b>Figura 4.</b> Actividad ureasa de las cepas MP4, PP2 y PQ1.....	37
<b>Figura 5.</b> Actividad ureasa de las cepas MP4, PP2 y PQ1 en las horas 9, 18 y 27.....	38
<b>Figura 6.</b> Actividad ureasa de las cepas PP3 y PP4 .....	39
<b>Figura 7.</b> Esporas totales producidas al quinto día de inoculación en los medios de esporulación .....	40
<b>Figura 8.</b> Esporas germinadas al quinto día de inoculación en los medios de esporulación ..	41
<b>Figura 9.</b> Actividad enzimática ureasa posterior a la reactivación en los días 45 y 90 en los sustratos <i>Z. mays</i> y <i>O. sativa</i> para la cepa MP4.....	49
<b>Figura 10.</b> Actividad enzimática ureasa posterior a la reactivación en los días 45 y 90 en los sustratos <i>Z. mays</i> y <i>O. sativa</i> para la cepa PP2.....	50
<b>Figura 11.</b> Actividad enzimática ureasa posterior a la reactivación en los días 45 y 90 en los sustratos <i>Z. mays</i> y <i>O. sativa</i> para la cepa PQ1 .....	51
<b>Figura 12.</b> Actividad enzimática ureasa posterior a la reactivación en los días 45 y 90 en los sustratos <i>Z. mays</i> y <i>O. sativa</i> para la cepa MP4.....	52
<b>Figura 13.</b> Actividad enzimática ureasa posterior a la reactivación en los días 45 y 90 en los sustratos <i>Z. mays</i> y <i>O. sativa</i> para la cepa PP2.....	53
<b>Figura 14.</b> Actividad enzimática ureasa posterior a la reactivación en los días 45 y 90 en los sustratos <i>Z. mays</i> y <i>O. sativa</i> para la cepa PQ1 .....	54
<b>Figura 15.</b> Actividad enzimática fosfatasa posterior a la reactivación en los días 45 y 90 en los sustratos <i>Z. mays</i> y <i>O. sativa</i> para la cepa PP3 .....	56
<b>Figura 16.</b> Actividad enzimática fosfatasa posterior a la reactivación al día 45 en los sustratos <i>Z. mays</i> y <i>O. sativa</i> para la cepa PP4 .....	57

# UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

## FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

### CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

#### EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE HONGOS AISLADOS DE SUELO PRÍSTINO DE PÁRAMO DEL PARQUE NACIONAL CAYAMBE COCA

##### Resumen

Los páramos de Ecuador cubren el 5% del territorio nacional abarcando 1 337 119 hectáreas, donde habitan alrededor de 628 especies endémicas únicas y gran riqueza con respecto a la micología del suelo. Además, investigaciones han demostrado que la actividad enzimática de varios hongos aislados de estos ecosistemas, poseen importantes aplicaciones en biorremediación y procesos industriales. Sin embargo, las investigaciones publicadas en el país no proporcionan suficiente información sobre la especificidad enzimática de especies fúngicas de páramo. El presente estudio evaluó las actividades enzimáticas amilasa, fosfatasa, ari-sulfatasa y ureasa de hongos aislados de suelo prístino de páramo del Parque Nacional Cayambe Coca obtenidos previamente en el proyecto de cooperación internacional BIOGEEC. En la determinación de las actividades enzimáticas, se realizaron ensayos en medios enzimáticos comerciales cuantificando el diámetro del halo de hidrólisis en milímetros, los géneros *Aspergillus sp.* y *Eupenicillium sp.* presentaron actividad amilasa y ureasa donde *Eupenicillium sp.* presentó mayor diámetro en actividad amilasa y ureasa, además, *Aspergillus sp.* y *Rhizopus sp.* evidenciaron actividad fosfatasa y *Aspergillus sp.* presentó mayor diámetro en actividad fosfatasa. Sin embargo, ningún aislado evaluado presentó actividad ari-sulfatasa dado a que las cepas no crecen en condiciones anóxicas. Posteriormente, se determinaron medios líquidos para la esporulación de las cepas con actividades enzimáticas, los medios evaluados fueron Agar Sabouraud Dextrosa con extracto de levadura (ASD), el medio Extracto de Malta (M) y el medio extracto de Levadura y Glucosa (LG), el medio M evidenció mayor germinación y esporulación en las cepas. Finalmente, se realizaron pruebas de conservación para las cepas aisladas, utilizando *Z. mays* y *O. sativa* en conjugación con agua estéril y se refrigeraron a -20°C con la finalidad de preservar las cepas con actividades enzimáticas para futuras aplicaciones. El cepario fue reactivado a los 45 y 90 días donde se evaluó las actividades

enzimáticas a los 7 días posteriores de la reactivación, se obtuvo la conservación enzimática en amilasa, además, las actividades ureasa y fosfatasa aumentaron en comparación con las actividades antes de la conservación gracias a que las semillas utilizadas proporcionan fuentes de fósforo y nitrógeno.

**Palabras clave:** *Aspergillus sp.*, *Eupenicillium sp.*, *Rhizopus sp.*, actividad enzimática, esporulación, conservación.

**Autor:** García Navarrete Matías Benjamín

Mayo – 2022

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Problema

Ecuador pese a tener una densidad de 0.016 especies/Km<sup>2</sup>, figurándolo tres veces por encima de Colombia y veintiún veces superior a Brasil en biodiversidad, sus páramos ubicados a una altitud promedio de 3 300 ms.n.m. (subministros de agua y esenciales sumideros de carbono) cubren el 5% del territorio nacional abarcando 1 337 119 hectáreas, donde habitan alrededor de 628 especies endémicas únicas, los páramos han sido muy poco estudiados con respecto a su micología del suelo. Además, se ha ignorado que su separación geoespacial por la Cordillera de los Andes proporciona hábitats únicos, obligando a diversas especies fúngicas a adaptarse a condiciones extremas de los distintos hábitats propiciando el aumento de la biodiversidad microbiológica (Estrella, 2005; Bravo, 2014; Morocho & Chunchu, 2019).

El estudio de la actividad enzimática de los hongos de páramo representa un gran paso para el desarrollo de tecnologías que permitan la protección y regeneración de la biodiversidad endémica del Ecuador. Sin embargo, las investigaciones publicadas en el país no proporcionan suficiente información sobre la especificidad enzimática de especies fúngicas de páramo frente a diversos sustratos que alteren la integridad del suelo y la capacidad que poseen los hongos en la regeneración de suelos. Además, la síntesis enzimática nativa está afectada por la disponibilidad de nutrientes, que, en suelos degradados por incendios, es extremadamente baja.

### 1.2. Justificación

La Biotecnología ha avanzado enormemente en los últimos años y con ello el desarrollo de nuevas técnicas de biorremediación e industriales *in situ* utilizando microorganismos nativos o recombinantes con actividad enzimática frente a sustratos específicos. Estos microorganismos son capaces de reducir y degradar contaminantes, como hidrocarburos de petróleo, hidrocarburos aromáticos policíclicos, bifenilos policlorados, ésteres de ftalato, compuestos nitroaromáticos, solventes industriales, pesticidas y metales, además, presentan una mayor actividad en presencia de inhibidores y una mayor eficacia a una baja concentración de contaminantes, estas características los vuelven muy atractivos ya que pueden realizar procesos metabólicos asegurando la supervivencia en condiciones extremas de vida (Dua, Sethunathan & Johri, 2012; Jain & Bajpai, 2012; Sharma, Dangi & Shukla, 2018; Saini, Rani, Sharma & Verma, 2021).

Ecuador al ser un país biodiverso presenta gran potencial en la Biotecnología enfocado a diferentes áreas de protección medioambiental, las investigaciones con enfoque en el análisis de actividades enzimáticas permiten desarrollar nuevas tecnologías y metodologías que beneficien a la protección de la biodiversidad ecuatoriana (Sutherland, Horne, Weir, Coppin, Williams, Selleck & Oakeshott, 2004; Corredor, Mesa, Gallo & Pino, 2013; Castro Fernández & Fernández, 2021). Las enzimas microbiológicas no solo permiten la restauración de diferentes ecosistemas, sino, son capaces de enriquecer el ecosistema facilitando la accesibilidad de nutrientes para plantas, animales u otros organismos presentes sin intervenir negativamente en su ciclo de vida debido a que su biodegradación es eficaz. Además, la capacidad de los microorganismos fúngicos para enriquecer suelos es usada en la actualidad como factor crucial en biofertilizantes adquiriendo relevancia en la industria agrícola ya que permite el aumento del rendimiento en sus productos con alta rentabilidad en el mercado (Sutherland et al., 2004; Sharma, Dangi & Shukla, 2018; Blanco & Castro, 2021; Saini et al., 2021).

El análisis de la actividad enzimática de microorganismos fúngicos de páramo nativos de Ecuador permitirá el desarrollo de tecnologías y metodologías para la preservación y protección de la biodiversidad, sustituyendo métodos convencionales. Las aplicaciones de hongos de páramo abrirán nuevas puertas para el desarrollo sustentable del Ecuador.

### **1.3. Objetivos de la investigación**

#### **1.3.1. General**

Evaluar la actividad enzimática de hongos aislados de suelo prístino de páramo del Parque Nacional Cayambe Coca.

#### **1.3.2. Específicos**

- Determinar la actividad enzimática de los hongos en diferentes sustratos.
- Formular medios líquidos de esporulación para cepas fúngicas.
- Identificar sustratos para la conservación de las cepas fúngicas.

### **1.4. Pregunta directriz**

¿Los hongos aislados de suelo prístino de páramo poseen actividades enzimáticas aplicables en procesos de biorremediación e industriales?

## 1.5. Marco legal

La Constitución del Ecuador (2008), Título VII, Segundo capítulo, Segunda sección, Art. 400, se declara que *“El Estado ejercerá la soberanía sobre la biodiversidad, cuya administración y gestión se realizará con responsabilidad intergeneracional. Se declara de interés público la conservación de la biodiversidad y todos sus componentes, en particular la biodiversidad agrícola y silvestre y el patrimonio genético del país”*. Además, en el mismo capítulo, Tercera sección, Art. 404 y 406, especifican que *“El patrimonio natural del Ecuador único e invaluable comprende, entre otras, las formaciones físicas, biológicas y geológicas cuyo valor desde el punto de vista ambiental, científico, cultural o paisajístico exige su protección, conservación, recuperación y promoción. Su gestión se sujetará a los principios y garantías consagrados en la Constitución y se llevará a cabo de acuerdo al ordenamiento territorial y una zonificación ecológica, de acuerdo con la ley”* y *“El Estado regulará la conservación, manejo y uso sustentable, recuperación, y limitaciones de dominio de los ecosistemas frágiles y amenazados; entre otros, los páramos, humedales, bosques nublados, bosques tropicales secos y húmedos y manglares, ecosistemas marinos y marinos-costeros”*, respectivamente. En la Quinta sección del mismo capítulo, Art. 409, decreta que *“Es de interés público y prioridad nacional la conservación del suelo, en especial su capa fértil. Se establecerá un marco normativo para su protección y uso sustentable que prevenga su degradación, en particular la provocada por la contaminación, la desertificación y la erosión. En áreas afectadas por procesos de degradación y desertificación, el Estado desarrollará y estimulará proyectos de forestación, reforestación y revegetación que eviten el monocultivo y utilicen, de manera preferente, especies nativas y adaptadas a la zona”*. El Plan de creación de oportunidades 2021 – 2025, eje de transición ecológica, Objetivo 11 declara *“El conservar, restaurar, proteger, y hacer un uso sostenible de los recursos naturales y es fundamental garantizar la administración de estos recursos y el desarrollo de actividades que permitan incrementar su conservación”*.

La presente investigación se ampara en los artículos de la Constitución del Ecuador y El Plan de creación de oportunidades ya mencionados, se plantea realizar una evaluación de la actividad enzimática de hongos de páramo prístino ecuatoriano en diferentes sustratos con la finalidad de ampliar su conocimiento como potenciales agentes en procesos bioregenerativos de suelos quemados. Estos procesos permitirán la restauración y protección de la biodiversidad en suelos afectados por incendios forestales.

## **1.6. Alcance**

En el presente estudio se generará nueva información científica sobre la actividad enzimática de hongos aislados de suelo prístino de páramo, partiendo de su afinidad hacia diferentes sustratos. La evaluación enzimática se realizará utilizando medios selectivos para identificar las enzimas secretadas por las cepas fúngicas. El análisis de la actividad enzimática permitirá la comprensión de los mecanismos enzimáticos necesarios que permiten al hongo biodegradar compuestos complejos. Además, facilitará la identificación de la función de los microorganismos fúngicos dentro de los suelos prístino de páramos. Adicionalmente, se establecerá un medio de esporulación genérico para las distintas cepas aisladas del suelo prístino de páramo. Finalmente, las cepas serán aplicadas en biorreactores que contengan como sustrato suelo quemado para evaluar la bioregeneración del suelo mediante parámetros físico-químicos.

Este estudio aumentará el conocimiento que posee Ecuador sobre la actividad enzimática de hongos de suelo de páramo, así mismo, abrirá paso al desarrollo de nuevas tecnologías, estrategias y métodos enfocados a la bioregeneración de suelos afectados por incendios forestales. La capacidad de biodegradación de los hongos será el factor principal de los procesos, además, utilizar hongos facilitará la recolonización de la flora y fauna, permitirá la accesibilidad de nutrientes yacientes en el suelo para autótrofos nativos de la zona.

Los microorganismos fúngicos de páramo poseen gran potencial en diferentes procesos de bioregeneración de suelos gracias a su gran cantidad de maquinaria enzimática y su versatilidad les permite adaptarse a diferentes procesos de producción industrial. Sin embargo, para identificar todo el potencial y la capacidad enzimática de los hongos, se requiere la realización de más investigaciones con la finalidad de comprender la complejidad y variedad enzimática de dichos microorganismos.

## CAPITULO II

### 2. MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Hongos de páramo y actividad enzimática

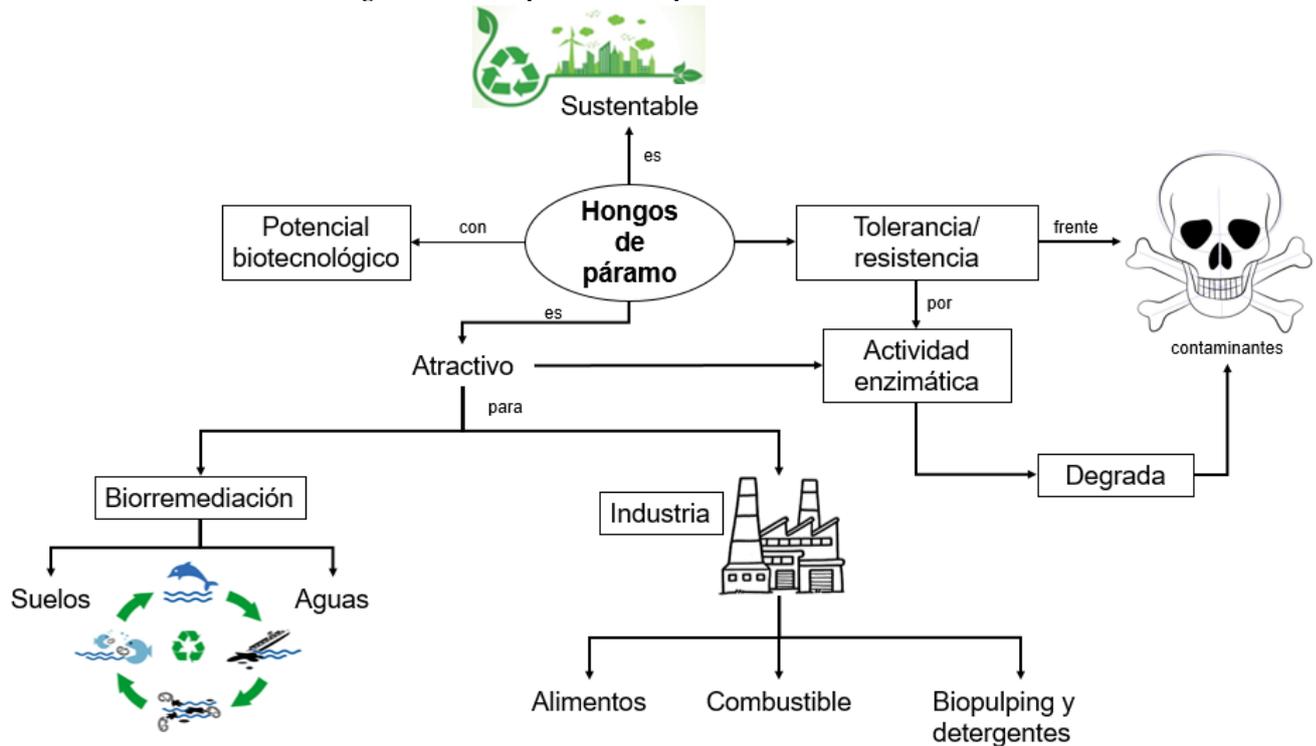
Los hongos son el linaje filogenético más versátil del Árbol de la Vida y son capaces de colonizar y sobrevivir en hábitats extremos como páramos, donde las temperaturas son extremadamente bajas (inferiores a 15 °C), además, los escasos nutrientes y disponibilidad de agua en estos hábitats es sumamente baja y la radiación ultravioleta-B es elevada dada su proximidad con la línea ecuatorial (Gerday, Aittaleb, Bentahir, Chessa, Claverie, Collins & Feller, 2000; Rafiq, Hassan, Rehman & Hasan, 2019). Los hongos que crecen en ambientes hostiles desarrollan perfiles psicotrófico o psicofílico, por consecuencia, su desarrollo es a 0 °C y con condiciones óptimas de crecimiento comprendidas entre 15 a 20 °C e inferiores a 15 °C (Gerday et al., 2000; Hassan, Rafiq, Hayat, Shah & Hasan, 2016; Rafiq et al., 2019).

La capacidad catalítica de las enzimas activas en frío de los hongos aislados en entornos fríos, ha sido analizada en diferentes investigaciones atrayendo el interés de diferentes procesos industriales que requieran de temperaturas bajas porque eliminan la necesidad de procesos de calentamiento que perjudican la calidad, la sostenibilidad y la rentabilidad de la producción industrial, además, las enzimas activas en frío son utilizadas en el ablandamiento de carne, la condimentación, el procesado de alimentos, la elaboración de cerveza, procesos de horneado, la producción de queso y en balanceados para animales (Santiago, Ramírez, Zamora & Parra, 2016; Kumar, Mukhia & Kumar, 2021; Jiang, Chen, Bao, Wang, Yang, Mei & Shen, 2021; Brück et al., 2022).

Además, algunas enzimas fúngicas son capaces de degradar los componentes de la pared celular vegetal, como los componentes del sistema celulolítico (endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasa), para la ruptura eficiente de la celulosa y del sistema xilanolítico (principalmente endoxilanasas y  $\beta$ -xilosidasa) para la descomposición del xilano al nivel de azúcares reductores. Son ampliamente aplicadas en procesos biotecnológicos en áreas como la industria alimentaria, la producción de combustibles, detergentes y la biopulpa biopulping (Polizeli, Rizzatti, Monti, Terenzi, Jorge & Amorim, 2005; Santiago et al., 2016; Andlar, Rezić, Mardetko, Kracher, Ludwig & Šantek, 2018; Pasin, Scarcella, de Oliveira, Lucas, Cereia, Betini & Polizeli, 2020). Los aspectos mencionados se encuentran resumidos en la Figura 1.

## Figura 1.

Resumen del potencial industrial, biotecnológico y biorremediación de ambientes utilizando actividad enzimática de hongos de suelo prístino de páramo.



Nota: Adaptado de Van Agteren et al. (1998); Polizeli et al. (2005); Van Stempvoort et al. (2006); Santiago et al. (2016); Boopathy (2017); Andlar et al. (2018); Ceci et al. (2018); Miri et al. (2019); Pasin et al. (2020); Kumar et al. (2021); Jiang et al. (2021); Brück et al. (2022).

## 2.2. Phylum: *Ascomycota*

Los ascomicetos son un filo de hongos que constituyen alrededor del 75% de todos los hongos descubiertos, además, la producción de esporas endógenas (células especializadas que funcionan como propágulos en reposo o dispersión para la colonización de los hongos) es masiva mediante reproducción asexual y sexual. Sus ascosporas (esporas sexuales) se desarrollan dentro de sacos tubulares llamados ascos cuya función es expulsar las esporas al ambiente mediante el aumento de osmolitos en el momento preciso dentro del asco, atrae agua para aumentar la presión de turgencia, las ascas punzantes han evolucionado para estirarse hacia arriba y empujar las esporas a través de un poro en la parte superior del saco, este mecanismo de reproducción se activa con la maduración de las ascas (Figura 2; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). La dispersión de esporas mediante descarga forzada es importante para la colonización de nuevos sustratos (Deacon, 2006; Trial, 2007).

## Figura 2.

*Peritecio de Gibberella zeae que muestra un ascó (a) descargando su contenido de esporas y líquido epiplasmático, un ascó maduro que se extiende hacia arriba listo para disparar (b) y un ascó maduro no extendido (c). Barra de escala = 50 µm.*



Nota: Extraído de Trail (2005).

Los hongos ascomicotas presenta estructuras de ascos unitarios inoperculados, ascos unitarios operculados o ascas bitunicadas cuya función consiste en expulsar esporas al medio, estas se presentan descritas en la Tabla 1.

### Tabla 1.

*Tipos de estructuras de ascas de Ascomycete.*

Estructura	Descripción
Ascos unitarios inoperculados	Estructura de única pared y poro en la punta del ascó que se abre para liberar las esporas. 'Muro único' se refiere al muro, el cual actúa como una sola unidad, sin importar cuántas capas se puedan distinguir. El poro no conserva una tapa, sin embargo, puede tener incluido un tapón que se expulsa cuando el ascó se fractura.
Ascos unitarios operculados	Tienen una sola pared y tapa con bisagras las cuales se abren para liberar las esporas, el opérculo se desarrolla temprano en la formación del ascó mediante un pellizco de una región de la punta del ascó.
Ascas bitunicadas	Tienen dos paredes, una pared externa es fina y dura, se abre a medida que el ascó se expande, mientras que, la pared interna se extiende a través de la pared externa y dispara las esporas. La mayoría de ascas bitunicadas en la pared interna tienen un poro para disparar las esporas.

Nota: Adaptado de Hung (1977); Minter y Cannon (1984); Read y Beckett (1996); Trail (2007).

### 2.3. Esporulación fúngica

La esporulación fúngica es un proceso complejo estimulado por ritmos biológicos ambientales y endógenos. Este proceso ha sido ampliamente estudiado en modelos biológicos

como *Aspergillus nidulans*, *A. niger* y *Neurospora crassa* enfocando el estudio en mecanismos moleculares para la inducción de conidios, donde se descubrió varios genes involucrados en la vía de transducción de señales. Además, varios eventos interdependientes deben interactuar durante el transcurso de la esporulación, por ejemplo, diferentes concentraciones de sustrato y actividades enzimáticas *in vivo*, además, diferentes factores controlan el proceso de esporulación (Su et al., 2012).

### **2.3.1. Control nutricional**

La mayoría de las especies fúngicas son grandemente afectadas por el control nutricional con respecto a las concentraciones de carbono, nitrógeno y microelementos. La esporulación generalmente sucede cuando la tasa de crecimiento se minimiza y se obstruye en condiciones que benefician el rápido crecimiento micelial (Wulandari et al., 2009; Braun et al., 2011; Su et al., 2012).

El medio más utilizado para el aislamiento y cultivo de especies fúngicas es el agar patata dextrosa (PDA) también existen otros medios utilizados como el agar malta dextrosa, agar sacarosa de patata, medio extracto de levadura-fosfato, agar autolisado de levadura Czapek, agar extracto de malta, agar harina de maíz, agar jugo de vegetales V8 y medio agar patata zanahoria. Sin embargo, estos medios proporcionen condiciones de crecimiento óptimas para el desarrollo fúngico teniendo como consecuencia ser ineficientes para inducir la esporulación de aislados (Guo et al., 1998; Li et al., 2007; Su et al., 2012). Algunos medios bajos en nutrientes comúnmente utilizados para la esporulación son agar agua, PDA de concentración media o  $\frac{1}{4}$  y medio de agar sintético pobre en nutrientes (Masangkay et al., 2000).

### **2.3.2. Efecto de luz**

La luz es un estímulo fundamental para la formación de conidios. La exposición de los micelios a luz ultravioleta (UV) y luz azul son utilizadas ampliamente. Estudios han inducido exitosamente la producción de esporas en algunas especies de Ascomycetos (Crous et al., 2006), Basidiomycetos (Miller, 1967), Myxomycetes (Starostzik y Marwan, 1995), y Zygomycetes (Idnurm et al., 2006) mediante el estímulo con luz UV donde las ondas comprendidas entre 350 y 500 nm son más efectivas para la inducción de esporas.

### **2.3.3. Tejido huésped**

Especies fúngicas fitopatógenas suelen ser utilizadas para inducir la esporulación en los tejidos del huésped fuente. Photita et al. (2001) utilizaron pecíolos de plátano para estimular la

esporulación de endófitos aislados de hojas de plátano silvestre (*Musa acuminata*). En algunas especies *Botryosphaeriaceae spp.* se utilizaron agujas de pino estériles sobre la superficie de medio agar para inducir picnidios. Se encontró que las hojas de clavel (*Dianthus caryophyllus*) son un buen sustrato para la esporulación en especies de *Fusarium* y *Pestalotiopsis* (Fisher et al., 1982; Wei y col., 2006; Liu y cols., 2010). Estudios realizados demostraron que las hojas de *Hydrangea* o *Gardenia* son efectivas para la formación de peritecios y ascosporas de *Pleospora herbarum*, *Glomerella cingulata*, *Mycosphaerella allicina*, *Metasphaeria spp.* y *Guignardia spp.* (Furukawa y Kishi, 2002). La biotina en los tejidos vegetales puede alterar la síntesis de polisacáridos de la pared y ácido oleico y así desencadenar la expresión selectiva de genes implicados en la esporulación (Yamaguchi, 1974; Timberlake, 1980).

#### **2.4. Aplicación de hongos en biorremediación**

La biorremediación de suelos es un proceso que se basa en mecanismos biológicos (degradar, mineralizar, detoxificar y transformar) para reducir la concentración de contaminantes a un estado inocuo, además, indica potencial en el ahorro de costos significativos y un enfoque práctico en comparación con tecnologías de remediación convencionales (Van Agteren, Keuningb & Oosterhaven, 1998; Van Stempvoort & Grande, 2006; Azubuike, Chikere, & Okpokwasili, 2016). Este proceso adquirió relevancia ambiental durante el suceso de derrame de petróleo de Exxon Valdez (1989) en Prince William Sound, Alaska debido a que la limpieza fue un éxito gracias a la utilización microbiológica de enzimas activas en frío (Atlas & Bartha, 1998; Miri, Naghdi, Rouissi, Kaur Brar & Martel, 2019). Los microorganismos como los hongos permiten la biorremediación de suelos y aguas contaminadas gracias a su capacidad de degradación en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Los hongos a partir de procesos oxidación de los contaminantes orgánicos generan energía suficiente para suplir sus necesidades metabólicas, además, son capaces de asimilar el carbono de dichos contaminantes e incorporarlo en su nuevo material celular (Miri et al., 2019).

Los hongos aeróbicos utilizan oxígeno como medio final de aceptor de electrones, mientras que los hongos anaerobios utilizan sustancias, como sulfato, nitrato, manganeso, hierro e intermedios orgánicos como aceptores de electrones (Van Agteren et al., 1998; Boopathy, 2017; Miri et al., 2019). En la degradación aeróbica, muchos contaminantes pueden servir como fuente de carbono y energía para hongos que son capaces de producir enzimas degradantes, mientras, la degradación anaeróbica los hongos pueden llevar a cabo la oxidación de sustratos por transferencia de electrones a un aceptor adecuado (Van Agteren et al., 1998; Boopathy, 2017). Un claro ejemplo de degradación anaerobea se visualiza en el estudio de

Coello (2012) donde el hongo *Pleurotus ostreatus* es capaz sobrevivir en suelos contaminados con elevadas concentraciones de metales pesado y bajas concentraciones de oxígeno siendo capaz de promover la regeneración de suelos gracias a su capacidad enzimática en degradar compuestos persistentes. En suelos contaminados por metales pesados e isómeros de hexaclorociclohexano (HCH), *Penicillium griseofulvum* fue elegido como modelo de evaluación para la tolerancia y resistencia frente a compuestos tóxicos, se determinó que *P. griseofulvum* tiene gran potencial como agente de biomineralización de metales, movilización de metales y biotransformación de mezclas de isómeros de hexaclorociclohexano (HCH), además, mostro gran resistencia frente a vanadio (Ceci, Pinzari, Riccardi, Maggi, Pierro, Petrangeli Papini & Persiani, 2018). Esto sugiere la viabilidad del uso de hongos en actividades de bioregeneración de suelos.

Los hongos adquieren cada vez más importancia como biofertilizantes para mejorar el rendimiento de los cultivos. Dada la gran variedad de zonas climáticas donde se siembran los cultivos, los biofertilizantes deben adaptarse a las condiciones climáticas de la zona, incluidas las regiones frías con una productividad baja en comparación con regiones con climas tropicales (Rafiq et al., 2019). Las fosfatasas adaptadas al frío pueden hidrolizar las fuentes de fosfato orgánico, que se vuelven asimilables por las raíces de las plantas, mejorando su crecimiento económico y ecológico, eliminando la necesidad de fertilizantes químicos (Wang, Jiang, Wu, Hao, Su, Cai & Liu, 2015; Rafiq et al., 2019; Adhikari, Jain, Sharma & Pandey, 2021).

En un estudio realizado por Jiang (2021) se aislaron hongos psicrótróficos que degradan la celulosa e identifico una nueva especie de hongo *Aureobasidium paleasum sp.* que posee un fuerte potencial de degradación de la paja de arroz y sus ensayos de actividad enzimática determinaron una alta actividad celulolítica a temperaturas muy bajas, con alta adaptabilidad térmica de 5 °C a 50 °C, siendo la más óptima de 10 °C, este hongo descompuso de manera eficaz la paja y la celulosa a 10 °C en comparación a hongos mesófilos, además, acortó la etapa termófila, mejoró la madurez del compost y mejoró la calidad del compost. Este y otros estudios sugieren la existencia de hongos de frío capaces de degradar la celulosa mejorando el compostaje a bajas temperaturas u otros residuos agroindustriales como la paja de cebada, trigo y avena (Camacho, 2013).



## CAPÍTULO III

### 3. MARCO METODOLÓGICO

#### 3.1. Descripción del área de estudio

El presente estudio se realizó en los laboratorios de Biotecnología Aplicada ubicados en el campus “Antiguo Hospital San Vicente de Paul” perteneciente a la Universidad Técnica del Norte localizada en la ciudad de Ibarra, Imbabura-Ecuador.

##### 3.1.1. Investigación documental

Esta investigación utilizó las especies fúngicas aisladas de suelo de páramo prístino (BIOGEEC) expuestas en la Tabla 2 para el análisis de actividades enzimáticas, estableciendo medios de esporulación y la determinación de sustratos para la crioconservación de las cepas fúngicas. El periodo de investigación duró 12 meses.

**Tabla 2.**

*Identificación de aislados prístinos y codificación.*

Código	Identificación
PQ1	Género: <i>Aspergillus</i> Phylum: <i>Ascomycota</i>
MP1	Género: <i>Microsporum</i> Phylum: <i>Ascomycota</i>
PP2	Género: <i>Eupenicillium</i> Phylum: <i>Ascomycota</i> Orden: <i>Eurotiales</i>
PP3	Género: <i>Aspergillus</i> Phylum: <i>Ascomycota</i>
PP4	Género: <i>Rhizopus</i> Phylum: <i>Zygomycota</i>
MP3	Género: <i>Microsporum</i> Phylum: <i>Ascomycota</i>
MP4	Género: <i>Aspergillus</i> Phylum: <i>Ascomycota</i>

Nota: extraído y adaptado de BIOGEEC-UTN (2021).

## **3.2. Determinación de actividad enzimática de los hongos en diferentes sustratos**

### **3.2.1. Crecimiento vegetativo de cepas fúngicas**

Los hongos previamente aislados en el proyecto BIOGEEC fueron seleccionados por morfología después de la reactivación y se incubaron a temperatura ambiente en medio PDA adicionando cloranfenicol (0.1 g/L) en cajas Petri hasta un periodo de 18 días.

### **3.2.2. Cribados de actividades enzimáticas**

En el primer cribado, se prepararon medios comerciales ari-sulfatasa (Himedia), ureasa (Himedia), fosfatasa (Himedia) y almidón caseinasa (Himedia). En los medios enzimáticos se inocularon las 7 cepas en condiciones estériles mediante capilares e incubadas durante 13 días. Posterior a los 13 días de incubación, se adicionaron los reactivos carbonato de sodio (2 M), hidróxido de sodio (1M), lugol y urea (40% g/g) a los medios enzimáticos de ari-sulfatasa, fosfatasa, amilasa y ureasa, respectivamente, con la finalidad de observar la colorimetría en presencia de dichas actividades enzimáticas (Figuroa, Morales & Carmen, 2019; Jacques, Lenzo, Stevens, Lawrence & Tan, 2021; Brück, Comtato, Gamboa-Trujillo, de Oliveira, Cereia & Moraes Polizeli, 2022).

Para el segundo cribado se seleccionaron las cepas que presentaron actividades enzimáticas en los medios ari-sulfatasa, ureasa, fosfatasa y amilasa. Se extrajeron discos de 5 mm de radio provenientes del micelio de las cepas PP2, PP3, PP4, PQ1 y MP4. Posteriormente, se inocularon los medios enzimáticos con los discos durante 72 horas a 25°C, posterior al tiempo de incubación se adicionaron los reactivos para cuantificar los halos de hidrólisis midiendo el diámetro del halo en milímetros. Sin embargo, la medición del diámetro en el halo de hidrólisis en los ensayos de ureasa se ejecutó a las horas 9, 18 y 27, realizando el análisis estadístico en la hora 27. Se utilizó *Aspergillus niger* como control positivo amilasa (Figuroa et., 2019; Jacques et al., 2021; Brück et al., 2022).

## **3.3. Formulación de medios líquidos de esporulación para cepas fúngicas**

### **3.3.1. Medios de esporulación líquida**

Los medios de esporulación líquida fueron formulados a partir de la composición de Agar Sabouraud Dextrosa con medio líquido de extracto de levadura, extracto de Malta (M) y medio de extracto de levadura y glucosa (LG), la composición de los medios se observa en la Tabla 3, Tabla 4 y Tabla 5, respectivamente.

**Tabla 3.***Agar Sabouraud Dextrosa con extracto de levadura (ASD).*

Componente	Concentración (g/L)
D-glucosa	40.00
Peptona	10.00
Extracto de levadura	10.00

Nota: Extraído de Zhao et al. (2023).

**Tabla 4.***Medio extracto de malta (M).*

Componente	Concentración (g/L)
D-glucosa	20
Agua peptona	1
Extracto de Malta	20

Nota: Extraído de Zhao et al. (2023).

**Tabla 5.***Medio extracto de levadura y glucosa (LG).*

Componente	Concentración (g/L)
D-glucosa	40.00
Extracto de levadura	20.00

Nota: Extraído de Zhao et al. (2023).

### 3.3.2. Estimulación en la producción de esporas en medios líquidos

Las cepas PP2, PP3, PP4, PQ1 y MP4 fueron seleccionadas para los ensayos de esporulación debido a que presentaron actividades enzimáticas. Se preincubaron en medios PDA durante 7 días a una temperatura de 25°C para obtener crecimiento micelial. Posteriormente, se extrajeron discos de 5 mm de radio provenientes del crecimiento micelial con la finalidad de inocularlos en los medios de esporulación ya mencionados.

En el primer cribado se administró 15 mL de cada medio de esporulación en diferentes tubos Falcón de 15 mL, además, se utilizó agua estéril (15 mL) como control negativo. Se extrajo un disco de 5 mm de radio del micelio de las cepas para inocular los medios líquidos de esporulación y en el control negativo, el periodo de incubación duró 7 días a temperatura ambiente a 200 rpm en una incubadora orbital, sin triplicados. En la extracción de esporas se tomaron alícuotas de 1 mL del medio líquido (previamente homogeneizado) en tubos Eppendorf para ser centrifugados a 14 500 rpm durante 20 minutos donde se descartó el sobrenadante y se conservó el precipitado de esporas. Posteriormente, se adicionó 1 mL de agua destilada estéril al precipitado para luego homogeneizar en un vortex. Finalmente, se

extrajo 10 uL del líquido y se observó la presencia de esporas en un microscopio. Para el segundo cribado se siguió la misma metodología que en el primero, sin embargo, se realizaron triplicados y se utilizó un volumen de 30 mL en tubos Falcón de 50 mL. Además, en la extracción de las esporas se tomaron alícuotas al tercer, quinto y séptimo día posterior a la inoculación en los medios líquidos de esporulación. Las inoculaciones de los medios de esporulación se realizaron en condiciones estériles (Sloan et al., 1960; Kawchuk et al., 1993; Adams, 1995; Jacques et al., 2021; Zhao et al., 2023).

### **3.3.3. Germinación y viabilidad de esporas fúngicas**

Los tubos Eppendorf con las esporas previamente extraídas fueron nuevamente centrifugados en las mismas condiciones y se eliminó el sobrenadante de agua destilada estéril. Posteriormente, se adicionó 1 mL de una solución de sacarosa al 3% para luego ser homogeneizados en un vortex. Finalmente, se dejó germinar las esporas durante tres horas para adicionar azul de lactofenol y detener la germinación, se recolectaron 10 uL del líquido con las esporas activadas y se contabilizaron en cámara de Neubauer el total de esporas y las esporas que presenten tubos germinales (Sloan et al., 1960; Kawchuk et al., 1993; Wendland, 2020; Jacques et al., 2021; Zhao et al., 2023).

### **3.4. Identificación de sustratos para la conservación de las cepas fúngicas**

Los sustratos para la conservación de las cepas fúngicas aisladas de suelo prístino de páramo fueron semillas de *Zea mays* y *Oryza sativa* (sin pericarpio), las semillas fueron adquiridas en el mercado Amazonas de la ciudad de Ibarra.

#### **3.4.1. Esterilización de semillas**

Las semillas fueron esterilizadas superficialmente por inmersión en etanol al 70% (v/v) durante 1 minuto a 200 rpm. Posteriormente, se realizaron tres lavados en agua destilada para luego ser llevados a la autoclave a una temperatura de 121 °C y 15 Psi durante 45 minutos para terminar el proceso de esterilización (Doni et al., 2017; Ashton et al., 2019; Khashaba, 2021).

#### **3.4.2. Inoculación y conservación de las cepas fúngicas**

Se colocaron individualmente 30 gramos de *Z. mays* y 30 gramos de *O. sativa* en las cepas PP2, PP3, PP4, PQ1 y MP4 (previamente incubadas en cajas Petri durante 7 días), los sustratos con las cepas fueron incubados durante 14 días. Posteriormente, las semillas inoculadas con cada una de las cepas se extrajeron con pinzas estériles y se colocaron 15 gramos dentro de tubos Falcón (15 mL) por cada cepa y los 15 gramos restantes dentro de un segundo grupo de tubos Falcon por cada cepa para luego aforar con agua destilada estéril

(autoclavada 3 veces). Cada cepa contó con 2 tubos Falcon que contenían 15 gramos de *Z. mays* (inoculado con la cepa) cada uno y con 2 tubos Falcon que contenían 15 gramos de *O. sativa* (inoculado con la cepa) cada uno. Finalmente se guardaron los ensayos en una refrigeradora a una temperatura de -20°C durante 45 y 90 días (Alarcon, 2006; Vellanki et al., 2018; Acosta, 2019).

### **3.4.3. Reactivación del cepario**

Las cepas conservadas en los sustratos fueron reactivadas a los 45 y 90 días posteriores a su conservación. Las cepas se descongelaron a una temperatura de 4 °C durante 1 hora y 30 minutos, posteriormente, con el fin de terminar el proceso de descongelación, se las llevó a temperatura ambiente durante 1 hora y 30 minutos. Una vez descongeladas las cepas que fueron conservadas en *Z. mays* y *O. sativa* se procedió a descartar el agua contenida en los tubos Falcón para únicamente trabajar con las semillas inoculadas por los hongos. Finalmente, las semillas fueron colocadas en medios PDA con cloranfenicol (0.1 g/L) para la reactivación de los hongos (Alarcon, 2006; Vellanki, 2018; Ashton et al., 2019).

La primera reactivación de los hongos se realizó a los 45 días posteriores a la conservación, se utilizaron los primeros 15 gramos de *Z. mays* y los primeros 15 gramos de *O. sativa* de cada cepa conservada. La segunda reactivación se realizó a los 90 días posteriores a la conservación, se utilizaron los 15 gramos restantes de *Z. mays* y los 15 gramos restantes de *O. sativa* de cada cepa conservada, este proceso se realizó en condiciones estériles (Alarcon, 2006; Vellanki, 2018; Ashton et al., 2019).

### **3.4.4. Análisis morfológico y enzimático**

Las cepas reactivadas fueron incubadas durante 7 días, posteriormente, se realizó tinción con azul de lactofenol y microscopía del micelio de las cepas para el análisis morfológico con la finalidad de observar la existencia de cambios morfológicos posteriores a su reactivación y confirmar si la cepa fue conservada, este proceso se realizó en condiciones estériles.

Las cepas conservadas fueron sometidas a pruebas enzimáticas para amilasa, fosfatasa y ureasa, siguiendo la metodología del primer objetivo, sin embargo, la medición en el diámetro del halo de hidrólisis para actividad ureasa se realizó en la hora 9 posterior a la inoculación en el medio enzimático debido a que antes de la hora 18 el halo de hidrólisis cubrió todo el medio enzimático en todas las cepas con dicha actividad. El análisis permitió verificar si conservan iguales, menores o mayores actividades enzimáticas encontradas en el primer objetivo.

### 3.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó únicamente en las cepas que presentaron actividad enzimática para amilasa, ureasa, fosfatasa y ari-sulfatasa.

#### 3.5.1. Análisis del halo de hidrólisis y halo de crecimiento fúngico

El análisis estadístico tuvo 6 repeticiones por cada medio enzimático, donde cada cepa fúngica contó con 24 repeticiones totales. El objetivo 1 contó con 30 repeticiones en total de las 5 cepas con actividades enzimáticas, la codificación de cada repetición se muestra en la Tabla 6.

Se cuantifico el diámetro (mm) del halo de hidrólisis en los medios enzimáticos. Los resultados se analizaron mediante un análisis de la varianza con diseño de bloques completamente al azar (DBCA) para controlar los géneros de las cepas fúngicas y las observaciones, el nivel de significancia utilizado fue del 0.05. Se identificó la cepa con mayor halo de hidrólisis en diferentes actividades enzimáticas con el análisis funcional de Tukey 5% y T-student 5% para muestras independientes.

**Tabla 6.**

*Codificación de los medios enzimáticos a analizar en el objetivo 1.*

Medio enzimático		Repetición	Tratamiento
Nombre	Código		Código
Almidón	A	R1	XAR1
		R2	XAR2
		R3	XAR3
		R4	XAR4
		R5	XAR5
		R6	XAR6
Fosfatasa	F	R1	XAR1
		R2	XAR2
		R3	XAR3
		R4	XAR4
		R5	XAR5
		R6	XAR6
Ari-sulfatasa	S	R1	XSR1
		R2	XSR2
		R3	XSR3
		R4	XAR4

		R5	XAR5
		R6	XAR6
		R1	XUR1
		R2	XUR2
Ureasa	U	R3	XUR3
		R4	XAR4
		R5	XAR5
		R6	XAR6

Nota: X en el código del tratamiento simboliza el código de cada cepa fúngica asignada por el estudio BIOGEEC.

### 3.5.2. Análisis de esporas generadas y germinación

El análisis estadístico tuvo 3 repeticiones por cada medio líquido de esporulación, donde cada cepa fúngica conto con 9 repeticiones. El objetivo 2 conto con 45 repeticiones en total de las 5 cepas con actividades enzimáticas, la codificación de cada repetición se muestra en la Tabla 7.

Se realizaron análisis de la varianza factorial con diseño de bloques completamente al azar de los diferentes medios de esporulación líquidos utilizados, previo a la comprobación de los supuestos estadísticos de los datos obtenidos, el nivel de significancia utilizado fue del 0.05. Se identificó el medio líquido de esporulación con mayores unidades de esporas (u/mL) y germinación (u/mL) con el análisis funcional de Tukey 5%.

**Tabla 7.**

*Codificación de los medios de esporulación a analizar en el objetivo 2.*

Medio de esporulación		Repetición	Tratamiento
Nombre	Código		Código
Medio líquido de extracto de levadura y glucosa	EL	R1	XELR1
		R2	XELR2
		R3	XELR3
Medio extracto de malta	M	R1	XMR1
		R2	XMR2
		R3	XMR3
Agar Sabouraud Dextrosa con medio líquido de extracto de levadura	SD	R1	XSDR1
		R2	XSDR2
		R3	XSDR3

Nota: X en el código del tratamiento simboliza el código de cada cepa fúngica asignada por el estudio BIOGEEC.

### 3.5.3. Análisis del halo de crecimiento fúngico

El análisis estadístico siguió el mismo procedimiento ya mencionado en el análisis estadístico del objetivo 1, sin embargo, se realizaron 6 repeticiones para cada cepa reactivada en sus respectivos sustratos y 12 repeticiones por medio enzimático, siendo un total de 60 repeticiones, la codificación de cada repetición se muestra en la Tabla 8.

**Tabla 8.**

*Codificación de los medios de conservación a analizar en el objetivo 3.*

Medio de conservación		Repetición	Tratamiento
Sustrato	Código		Código
<i>Zea mays</i>	ZM	R1	XZMR1
		R2	XZMR2
		R3	XZMR3
		R4	XZMR4
		R5	XZMR5
		R6	XZMR6
<i>Oryza sativa</i>	OS	R1	XOSR1
		R2	XOSR2
		R3	XOSR3
		R4	XOSR4
		R5	XOSR5
		R6	XOSR6

Nota: X en el código del tratamiento simboliza el código de cada cepa fúngica asignada por el estudio BIOGEEC.

## CAPITULO IV

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se utilizó la caracterización morfológica de las cepas para sustentar los resultados obtenidos durante la investigación, la morfología fue definitiva por el proyecto BIOGEEC.

#### 4.1. Objetivo 1: Determinación de actividad enzimática de los hongos en diferentes sustratos

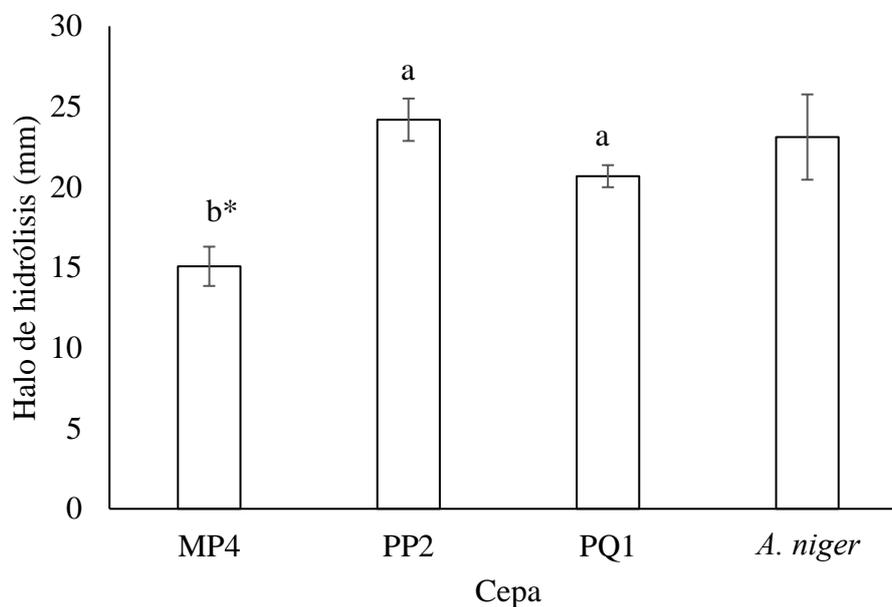
##### 4.1.1. Actividad amilasa

El primer cribado reveló la presencia de actividad amilasa para las cepas MP4 y PQ1 pertenecientes al género *Aspergillus sp.* y en la cepa PP2 perteneciente al género *Eupenicillium sp.*, el segundo cribado evidenció diferencias significativas para actividad amilolítica ( $gI=3.00$ ;  $F=35.85$ ;  $p<0,0001$ ) como se evidencia en el Anexo 1. La cepa PP2 evidenció mayor categoría de significancia con media de 24.19 mm en el diámetro del halo de hidrólisis en comparación a la cepa PQ1 con media 20.68 mm, pero misma categoría de significancia con la cepa MP4 cuya media es 15.08 mm (Figura 3). La actividad amilasa sugiere la secreción de enzimas activas en carbohidratos (CAZymes) perteneciente al filo *Ascomycota* para los géneros *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.* (Barrett et al., 2020). Sin embargo, el control *A. niger* cuya media es 23.11 mm no evidenció diferente categoría de significancia con las cepas PP2 y PQ1 pese a tener menor media en comparación a la cepa PP2, pero si con la cepa MP4 aun que pertenezcan al mismo género. Además, la cepa PP2 perteneciente al género *Eupenicillium sp.* reveló mayor crecimiento y esporulación en este medio en comparación al género *Aspergillus sp.* e incluyendo al control.

*Eupenicillium sp.* es un estado teleomórfico; estado reproductivo sexual de morfología fructificada (Samson et al., 1981; Pitt, 1979; Chen et al., 2015), de *Penicillium sp.* esto indica que los resultados obtenidos concuerdan con investigaciones realizadas por diferentes investigadores donde se comparan actividades enzimáticas para amilasa y celulasa en diferentes especies de *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.* revelando mayor actividad enzimática en el género *Penicillium sp.* (Oyewole et al., 2011; Khokhar et al., 2011; Ogbonna et al., 2014; Aisien et al., 2019). Las investigaciones de Sahoo et al. (2014) refuerzan los hallazgos con respecto a la actividad de las cepas PP2, PQ1 y MP4 donde reporta mayor actividad enzimática amilolítica en especies de *Eupenicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Trichoderma sp.*, *Paecilomyces sp.*, y *Eurotium sp.*, en aislados de manglares, además, reporta mayor actividad en fuentes de carbono para la producción de amilasas tales como dextrosa e inositol.

**Figura 3.**

Actividad amilasa de las cepas MP4, PP2, PQ1 y *A. niger*.



Nota: las letras significan diferencia estadística entre las cepas aisladas, \* significa diferencia estadística al comparar con el control. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los resultados y sus réplicas.

#### 4.1.2. Actividad ureasa

La actividad ureasa detectada en el primer cribado corresponden a las cepas MP4, PQ1 y PP2 de las siete cepas evaluadas, el segundo cribado reveló diferencias significativas para actividad ureasa ( $gl= 2.00$ ;  $F= 5.93$ ;  $p= 0.02$ ) como se evidencia en el

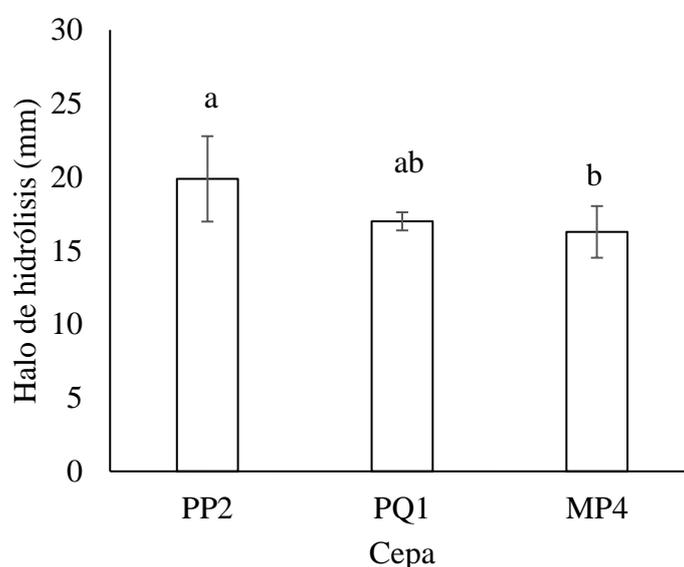
**Anexo 2.** La cepa PP2 correspondiente al género *Eupenicillium sp.* con media de 19.88 mm de diámetro en el halo de hidrólisis para actividad ureasa, reveló diferente categoría de significancia frente a la cepa MP4 con media de 16.28 mm, sin embargo, no existió diferente categoría frente a la cepa PQ1 con media 16.99 mm. Las cepas PQ1 y MP4 correspondientes al género *Aspergillus sp.*, no evidenciaron diferentes categorías de significancia en actividad ureasa (Figura 4,

## Anexo 2).

La presencia de actividad urea amidohidrolasa (ureasa) concuerdan con los reportados por Akhtar et al. (2014), Doriya et al. (2016) y Kemoni et al. (2016) reportan potencial urea amidohidrolasa en diferentes especies de *Aspergillus sp.* Diversas investigaciones enfocadas en la detección de actividad urea amidohidrolasa en diferentes aislados de suelos y sustratos indican que el género *Penicillium sp.* posee dicha actividad, sin embargo, el potencial de la enzima depende del tipo de especie y aislado utilizado (Alizadeh et al., 2017; Fang et al., 2018; Oses-Pedraza et al., 2020; Liu et al., 2021).

### Figura 4.

Actividad ureasa de las cepas MP4, PP2 y PQ1 en la hora 27.



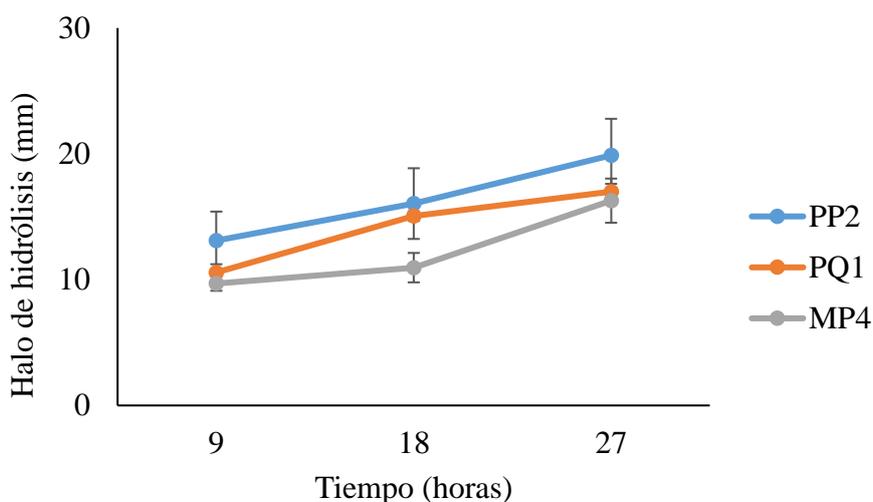
Nota: las letras significan diferencia estadística entre cepas. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los resultados y sus réplicas.

La

Figura 5 reporta la actividad de las cepas MP4, PQ1 y PP2 en la hora 9, 18 y 27 posteriores a su inoculación en el medio específico.

**Figura 5.**

Actividad ureasa de las cepas MP4, PP2 y PQ1 en las horas 9, 18 y 27.



Nota: Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los resultados y sus réplicas.

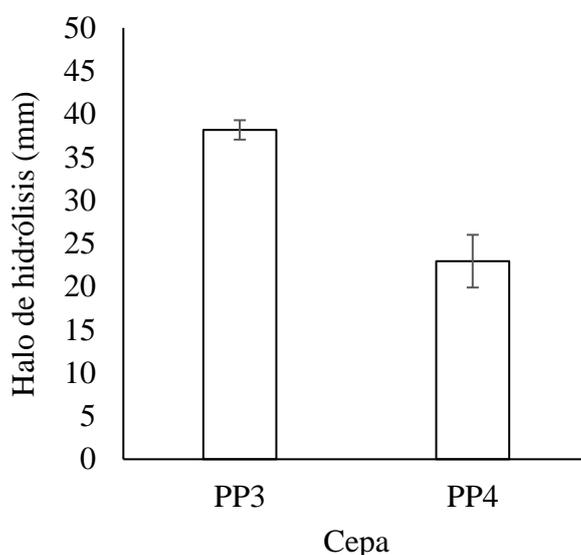
#### 4.1.3. Actividad fosfatasa

El primer cribado para actividad fosfatasa reveló la presencia de actividad para las cepas PP3 y PP4 correspondientes a los géneros *Aspergillus sp.* y *Rhizopus sp.*, respectivamente, el segundo cribado demostró diferencias significativas para actividad fosfatasa ( $T= 11.45$ ;  $p< 0.0001$ ) como se evidencia en el

Anexo 3. La cepa con mayor actividad en el diámetro del halo de hidrólisis fue PP3 cuya media es 38.17 mm, presentó diferente categoría de significancia con respecto a la media de 22.96 mm de la cepa PP4, sugiriendo mayor actividad en la aplicación de sustratos con elevados niveles de fósforo (Figura 6). El grado de actividad de las cepas está determinado por el género, estos resultados concuerdan con Tsekova et al., (2000) donde se analizó la actividad fosfatasa de diferentes especies de *Aspergillus sp.* y *Rhizopus sp.* y su capacidad en la bioacumulación de  $\text{Cu}^{2+}$ , se menciona que el mejor género para actividad fosfatasa corresponde a *Aspergillus sp.*, mientras que la cepa con mayor biocumulación de  $\text{Cu}^{2+}$  corresponde a *Rhizopus sp.* Sin embargo, se estudió la actividad en presencia del ion  $\text{Cu}^{2+}$  donde en *Aspergillus sp.* aumento la concentración extracelular de la enzima y en *Rhizopus sp.* la disminuyo, estos hallazgos sugieren que el ion  $\text{Cu}^{2+}$  puede actuar como cofactor para el aumento en la producción enzimática en la cepa PP3 mientras que en la cepa PP4 actuaría como inhibidor en la producción enzimática.

## Figura 6.

Actividad fosfatasa de las cepas PP3 y PP4 en la hora 27.



Nota: Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los resultados y sus réplicas.

### 4.1.4. Actividad ari-sulfatasa

Los cribados realizados para las cepas MP1, MP3, MP4, PQ1, PP2, PP3 y PP4 revelaron ausencia de actividad ari-sulfatasa debido a que los géneros *Aspergillus sp.*, *Eupenicillium sp.*, *Rhizopus sp.*, *Microsporium sp.* y *Mucor sp.*, son microorganismos los cuales no se desarrollan en ambientes anóxicos por un requerimiento mínimo de oxígeno para comenzar la biodegradación de diferentes sustratos y garantizar la supervivencia. La mayoría de microorganismos que se desarrollan en condiciones anóxicas pertenecen a bacterias, las cuales por las condiciones de su entorno están obligadas a biosintetizar enzimas sulfatasas para la supervivencia (Atlas et al., 1981; Buckman et al., 1991; Hyden et al., 2019; Kour et al., 2019).

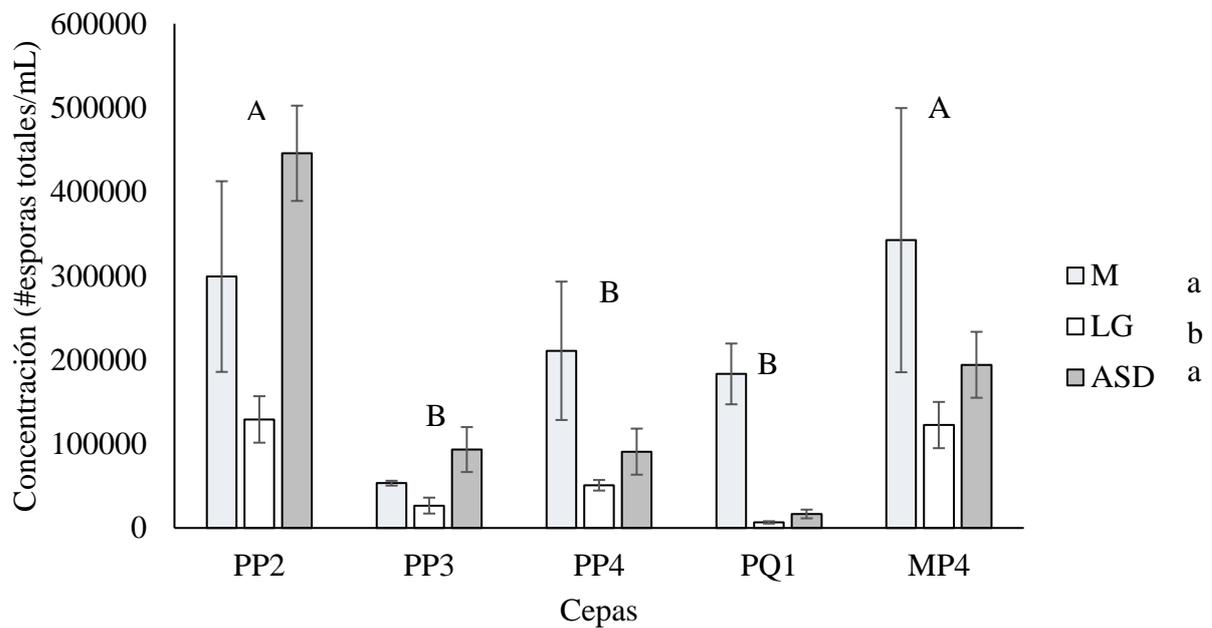
### 4.2. Objetivo 2: Formular medios líquidos de esporulación para cepas fúngicas

Se evaluó el medio líquido Agar Sabouraud Dextrosa con extracto de levadura (ASD), el medio extracto de Malta (M) y el medio extracto de Levadura y Glucosa (LG) para la esporulación de las cepas PP2, PP3, PP4, PQ1 y MP4, se contabilizó el número de esporas germinadas y totales. La selección de las cepas se basó en la presencia de actividades para amilasa, fosfatasa y ureasa. El análisis de la varianza para el número de esporas totales reveló diferencias significativas ( $gl= 2.00$ ;  $F= 23.49$ ;  $p<0.0001$ ) para los medios y diferencias significativas para las cepas ( $gl= 4.00$ ;  $F= 24.5$ ;  $p<0.0001$ ) como se observa en el Anexo 4. El medio ASD con media de 1681667 u/mL y el medio M con media de 217833 u/mL comparten

categoría de significancia, sin embargo, el medio LG con media de 67167 u/mL obtuvo inferior categoría de significancia en comparación con el medio M y ASD (Figura 7; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). El medio M evidenció ser 1.30 veces superior en comparación al medio ASD y 3.24 veces superior en comparación al medio LG. Se analizó las esporas totales producidas de las cepas y se evidenció que las cepas PP2 y MP4 con medias 291389 u/mL y 219722 u/mL, respectivamente, comparten misma categoría de significancia entre ellas y superior categoría de significancia en comparación a las cepas PP3, PQ1 y PP4 con medias de 57778 u/mL, 68889 u/mL y 117500 u/mL, respectivamente, las cuales comparten misma categoría de significancia (Figura 7; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

**Figura 7.**

*Esporas totales producidas al quinto día de inoculación en los medios de esporulación.*



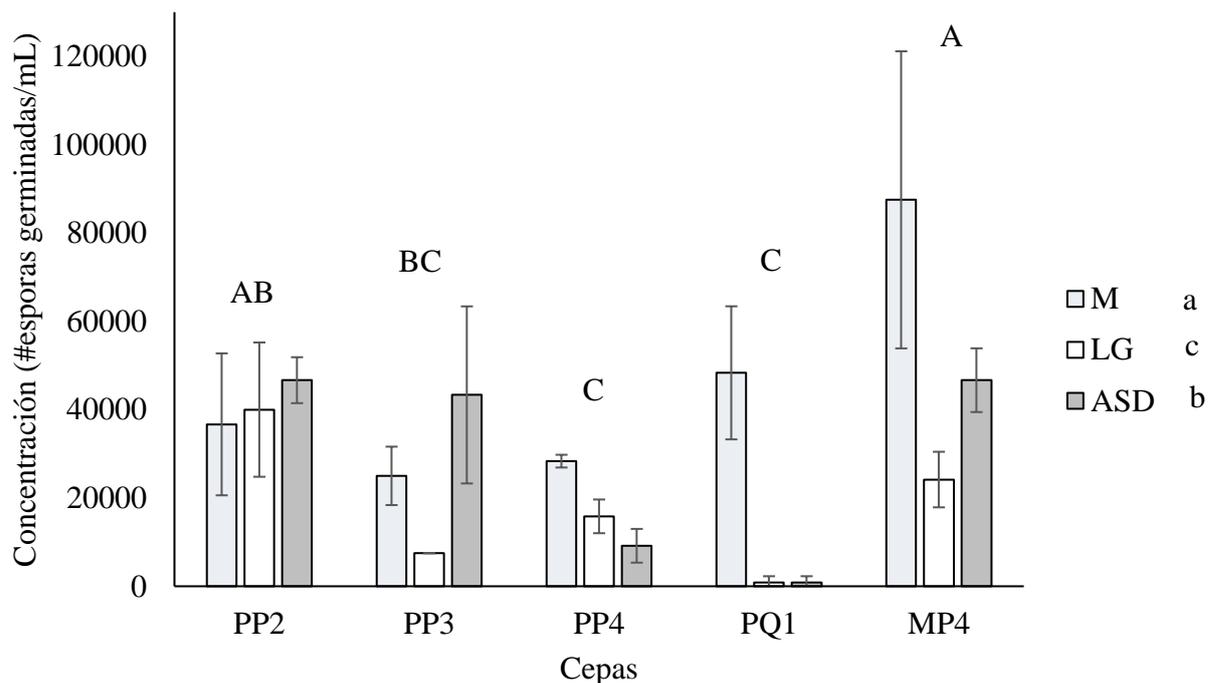
Nota: la sigla M, ASD y LG corresponde al medio de extracto de Malta, al medio Agar Sabouraud Dextrosa con extracto de levadura y al medio extracto de Levadura y Glucosa, respectivamente, las letras mayúsculas indican diferencia significativa entre cepas, las letras minúsculas indican diferencia estadística entre medios líquidos de esporulación. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los resultados y sus réplicas.

El análisis de la varianza para el número de esporas germinadas reveló diferencias significativas ( $gl= 2.00$ ;  $F= 18.79$ ;  $p<0.0001$ ) para los medios y diferencias significativas para

las cepas ( $gl= 4.00$ ;  $F= 14.63$ ;  $p<0.0001$ ) como se observa en el Anexo 5. La media de 45167 u/mL correspondiente al medio M demostró mayor categoría de significancia en comparación a la media de 29333 u/mL del medio ASD y a la media de 17667 u/mL del medio LG (Figura 8). El medio M con respecto a las esporas germinadas evidenció ser 1.54 veces superior en comparación al medio ASD y 2.56 veces superior en comparación al medio LG. El análisis para esporas germinadas en las cepas reveló que la media de 52778 u/mL de la cepa MP4 y la media de 41111 u/mL de la cepa PP2 comparten misma categoría de significancia y superior categoría de significancia en comparación a las cepas PP3, PP4 y PQ1 con medias de 25278 u/mL, 17778 u/mL y 16667 u/mL, respectivamente. Mientras que, la cepa PP3 comparte categoría de significancia con las cepas PP2, PP4 y PQ1 (Figura 8).

**Figura 8.**

*Esporas germinadas al quinto día de inoculación en los medios de esporulación.*



Nota: la sigla M, ASD y LG corresponde al medio de extracto de Malta, al medio Agar Sabouraud Dextrosa con extracto de levadura y al medio extracto de Levadura y Glucosa, respectivamente, las letras mayúsculas indican diferencia significativa entre cepas, las letras minúsculas indican diferencia estadística entre medios líquidos de esporulación. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los resultados y sus réplicas.

El medio ASD y LG tienen dextrosa como única fuente de carbono, mientras que, el medio M tiene dextrosa y extracto de malta como fuentes de carbono, sin embargo, el medio

M comparte misma categoría de significancia con el medio ASD y superior categoría de significancia que el medio LG con respecto a las esporas totales (Figura 7). El medio M al contener maltosa como fuente adicional de carbono resulto en superior categoría de significancia en comparación a los medios ASD y LG con respecto a las esporas germinadas (). Mulik et al. (2020) menciona que la utilización de maltosa promueve el crecimiento micelial y germinación de esporas, además, estudio diferentes fuentes de carbono donde analizó manitol, maltosa y dextrosa donde determinó que la maltosa en conjugación con diferentes fuentes de nitrógeno estimula eficientemente la esporulación en diferentes cepas de *Aspergillus sp.* en comparación con la dextrosa. Gao et al. (2010) en los resultados de su investigación con respecto a las concentraciones de carbono y nitrógeno para esporulación de hongos de biocontrol evidenció que la relación C:N de 5:1, el carbono debe estar en mayor proporción que el nitrógeno para inducir la esporulación en hongos, además, Teertstra et al. (2017) utiliza maltosa como medio de germinación en esporas de *A. niger*.

Basu et al. (1962) y Zong et al. (2015) realizaron diferentes pruebas de crecimiento micelial y esporulación en *Penicillium sp.* con fuentes de carbono como maltosa, dextrosa, fructosa, manosa, sacarosa y almidón donde mencionan que tanto en el crecimiento micelial y esporulación de las cepas, la maltosa siempre promovía de manera eficiente el crecimiento micelial y esporulación del hongo en comparación con la dextrosa gracias a que esta proporciona el doble de carbonos, además, Basu et al. (1962) recalca que las fuentes de carbono que sean monosacáridos son menos eficientes que los polisacáridos dado a que proporcionan menos moléculas de carbono. Pascual et al. (1997), Mossini et al. (2009), Sharma et al. (2010) y Li et al. (2021) evidenciaron mayor eficacia en la esporulación de *Penicillium sp.* utilizando fuentes de carbono polisacaridas, sin embargo, también evaluaron diferentes fuentes de nitrógeno en la esporulación y determinaron que la utilización de fuentes peptonadas y aminoácidos libres dieron mayores tasas de esporulación, esto concuerda con los medios utilizados donde el medio ASD y M contenían peptona bacteriológica (10 g/L) y agua peptona (1 g/L), respectivamente, como principales fuentes de nitrógeno resultando en mayor número de esporas totales en estos medios para la cepa PP2 del género *Eupenicillium sp.* Sin embargo, este comportamiento no se evidenció únicamente en la cepa PP2, las cepas PP3, PP4, PQ1 y MP4 presentaron mayor número de esporas totales en los medios que contienen fuentes de nitrógeno peptonadas (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Aguirre (2006) y Li et al. (2021) mencionan la importancia del nitrógeno en la estimulación de la esporulación debido a la necesidad de sintetizar aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos necesarios para

la construcción del protoplasma de las esporas, además, la mayoría de especies fúngicas prefieren utilizar fuentes de nitrógeno orgánico gracias a su fácil asimilación. Los resultados obtenidos en esporas totales y germinadas son inferiores en comparación a la bibliografía analizada debido al menor tiempo de incubación de las cepas en los medios líquidos de esporulación.

### **4.3. Objetivo 3: Identificación de sustratos para la conservación de las cepas fúngicas.**

#### **4.3.1. Microscopía**

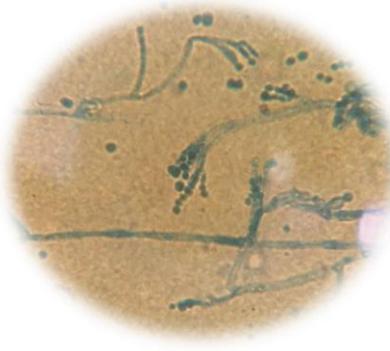
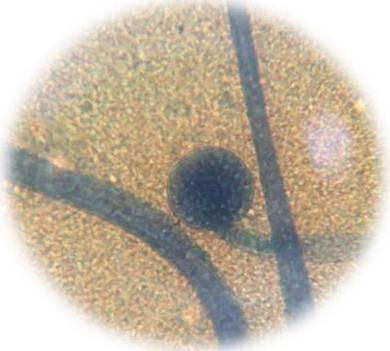
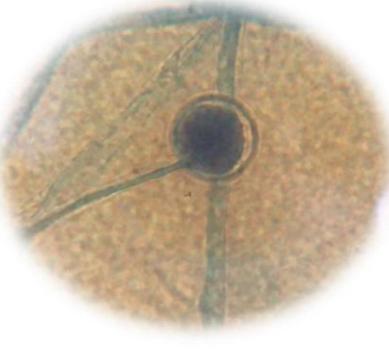
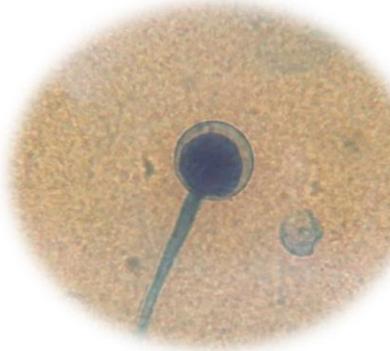
La conservación de las cepas fúngicas en *Z. mays* y *O. sativa* las cuales fueron sumergidas en agua destilada estéril dentro los tubos Falcon (15 mL) y llevadas a refrigeración (-20 °C) durante 45 y 90 días, conservaron sus respectivas morfologías en todos los periodos de reactivación (Tabla 9), los sustratos ricos en fuentes de carbono proporcionaron los nutrientes necesarios para la conservación del cepario fúngico. Las cepas reactivadas a los 45 días posteriores a sus reactivaciones no presentaron contaminación dado a que los medios PDA fueron enriquecidos con cloranfenicol (0.1 g/L). Sin embargo, la segunda reactivación del cepario al día 90, la cepa PP4 presentó contaminación de levaduras al octavo día posterior a su reactivación.

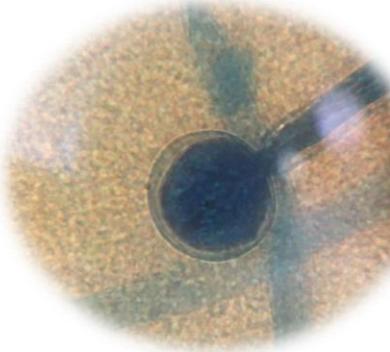
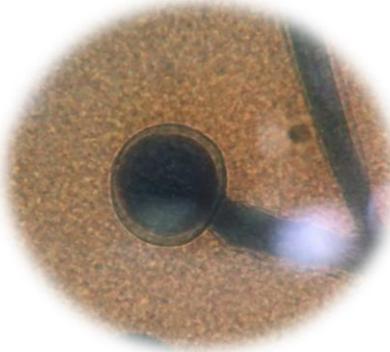
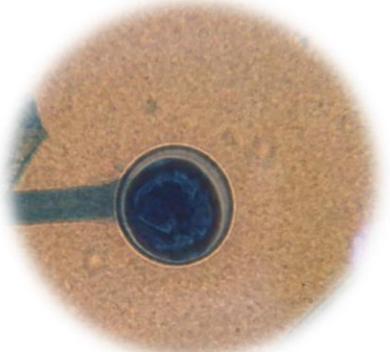
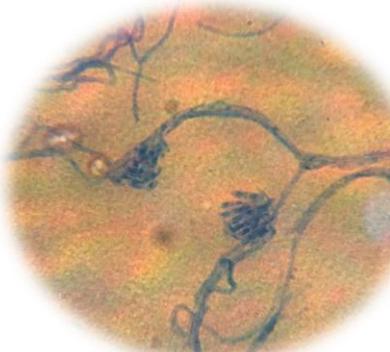
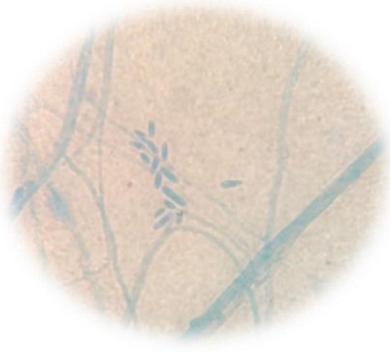
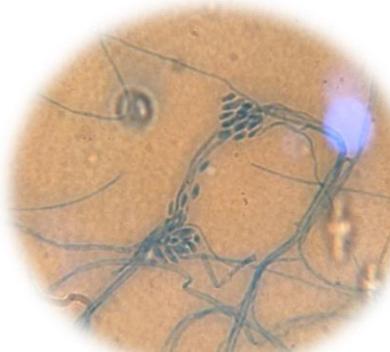
La cepa PP3 en la reactivación a los días 45 y 90 presentó producción de esporas en la superficie de las semillas a los 7 días posteriores a la reactivación en PDA, también, la cepa PP4 en la reactivación al día 45 presentó esporas al séptimo día de reactivación. Además, se observó producción de un pigmento amarillento característico de carotenoides en el noveno día posterior de la reactivación en las cepas PP3 y MP1 en los sustratos *Z. mays* y *O. sativa*.

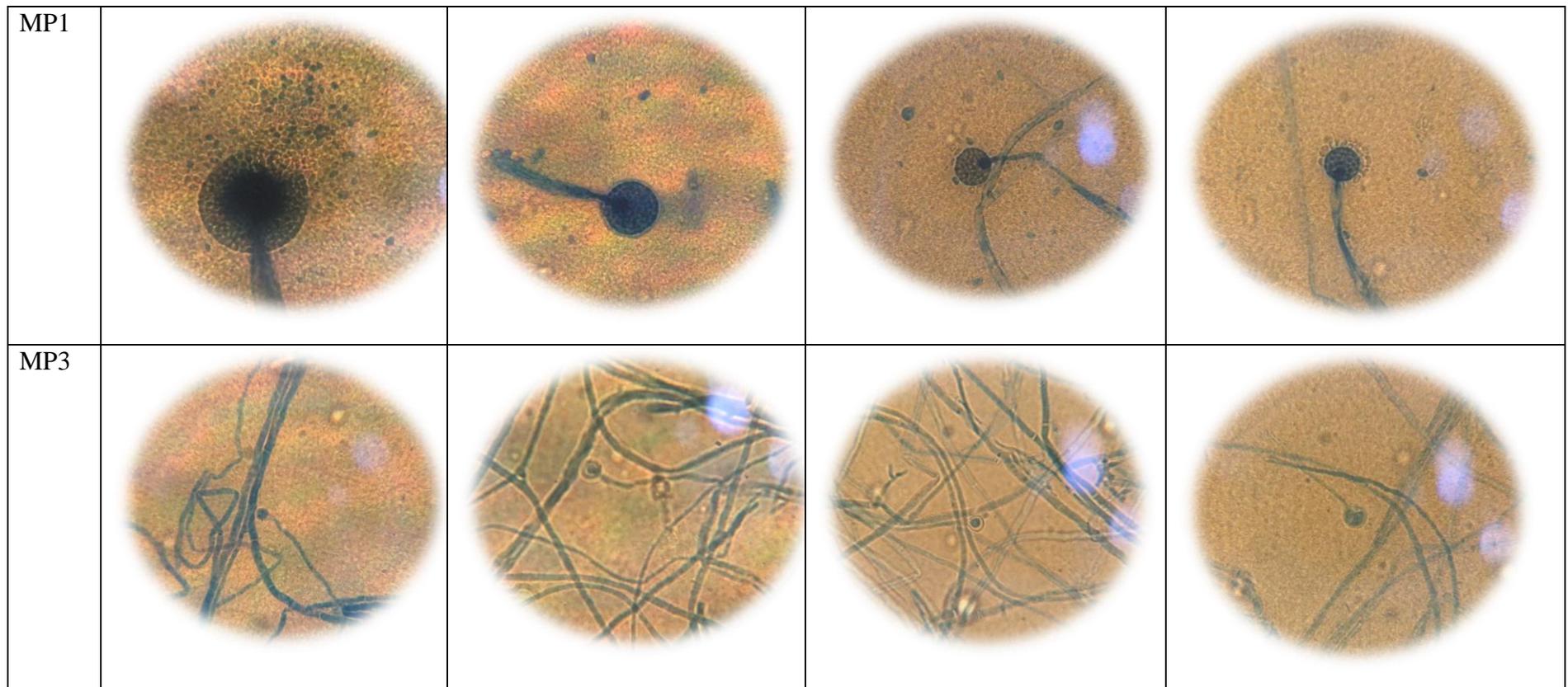
Bueno et al. (1998) y Ayala-Zermeño et al. (2017) experimentaron métodos de conservación de cepas fúngicas con agua destilada estéril y menciona la supresión del pleomorfismo gracias a la utilización de agua destilada estéril, además, mencionan la capacidad de recuperar propiedades físicas y bioquímicas de las cepas, sin embargo, Ayala-Zermeño et al. (2017) reportó pérdida de viabilidad en las cepas después de 12 meses de conservación y pérdida de la mayoría del cepario después de 24 meses.

**Tabla 9.**

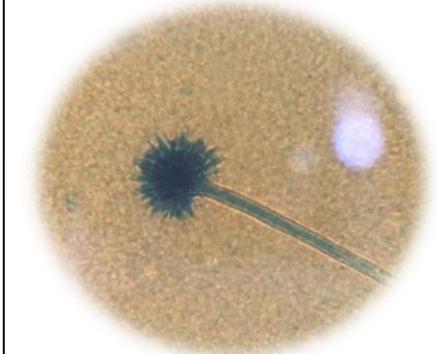
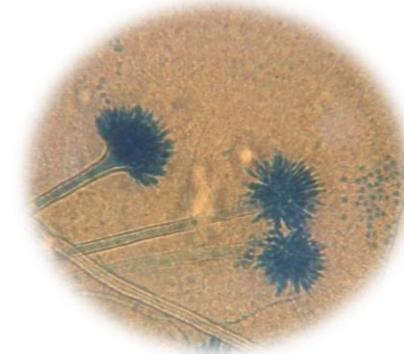
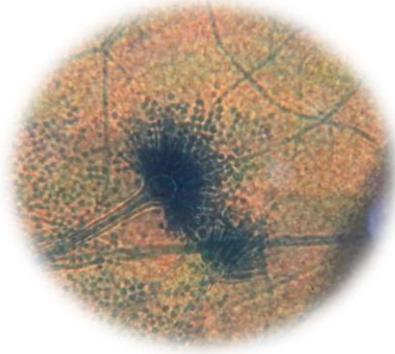
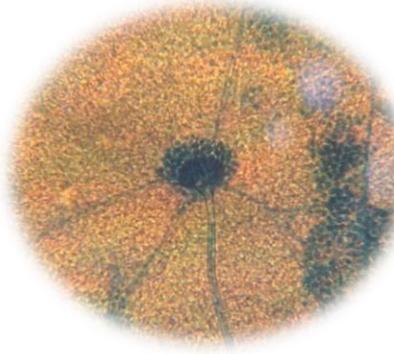
*Microscopia en 100X de las cepas reactivadas a los 45 y 90 días posteriores a su conservación en Z. mays y O. sativa.*

Cepa	Sustrato (día)			
	<i>Z. mays</i> (45 días)	<i>O. sativa</i> (45 días)	<i>Z. mays</i> (90 días)	<i>O. sativa</i> (90 días)
PP2				
PP3				

PP4				
PQ1				



MP4



### 4.3.2. Viabilidad enzimática

El análisis de viabilidad enzimática se realizó únicamente con las cepas que presentaron actividades enzimáticas en el objetivo 1.

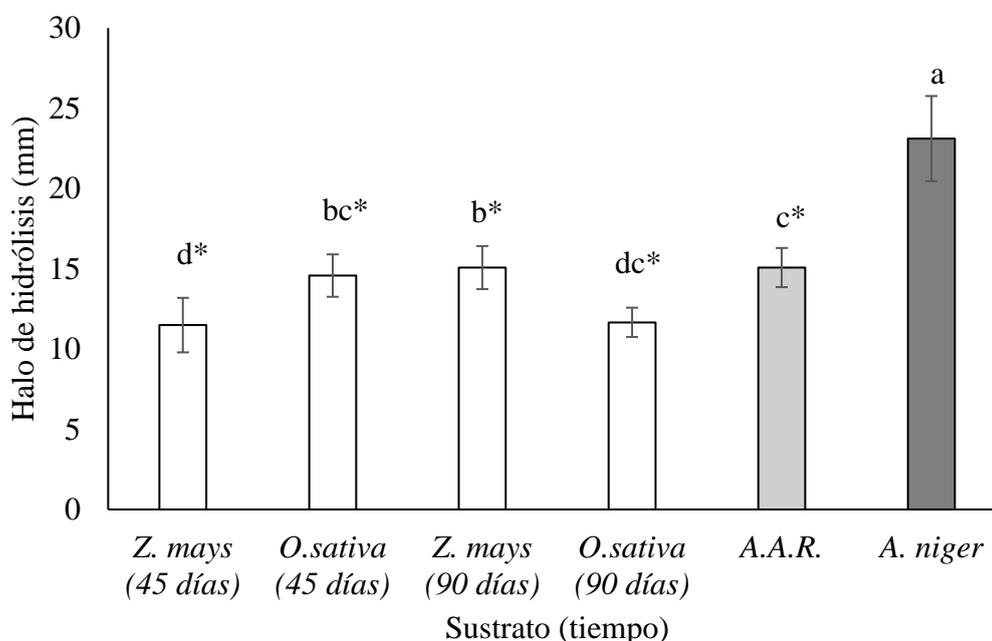
#### 4.3.2.1 Actividad amilasa

El análisis de viabilidad enzimática posterior a la reactivación para la cepa MP4 reveló diferencias significativas ( $gl= 5.00$ ;  $F= 36.46$ ;  $p<0.0001$ ) para los sustratos de conservación, evidenciado en el Anexo 6. Las medias del diámetro de 14.58 mm y 15.07 mm en el halo de hidrólisis para *O. sativa* (45 días) y *Z. mays* (90 días), respectivamente, coinciden con la misma categoría de significancia en comparación a la actividad antes de la reactivación (A.A.R.) cuya media es 15.08 como se evidencia en la Figura 9. Sin embargo, los sustratos *Z. mays* (45 días) con media 11.49 mm y *O. sativa* (90 días) con media 11.66 mm presentaron menor categoría de significancia con respecto a A.A.R.

*Z. mays* y *O. sativa* están conformados alrededor del 25-30% de amilosa y 70-75% de amilopectina (Musa et al., 2011; Uarrotta et al., 2013), los sustratos pese a contener elevado porcentaje de almidón (amilosa y amilopectina) no conservaron la misma categoría de significancia para actividad amilolítica en todos los tiempos de reactivación de la cepa en comparación con A.A.R. La diferencia categórica está relacionada con la condición del grano, es decir, *O. sativa* no poseía pericarpio (envoltura protectora del grano, conformada por celulosa, hemicelulosa y lignina) permitiendo accesibilidad directa de la cepa a la fuente nutricional del endosperma (amilosa y amilopectina) y evidenciando a los 45 días la misma categoría de significancia en comparación con A.A.R., pero disminuyendo su actividad enzimática a los 90 días, por contraparte, *Z. mays* poseía pericarpio interviniendo en el acceso al endosperma obteniendo como resultado mayor actividad enzimática a los 90 días y misma categoría de significancia con A.A.R., pero menor categoría de significancia a los 45 días de reactivación (Figura 9), esto sugiere que la accesibilidad proporcionada por el pericarpio actúa como regulador, además, la relación del género fúngico con el tipo de sustrato utilizado interviene en la conservación enzimática dado a la existencia de especies de *Aspergillus sp.* patógenas en *O. sativa* y *Z. mays*. La conservación de la cepa MP4 en *Z. mays* para periodos de 90 días es viable dado a la conservación de la actividad enzimática.

**Figura 9.**

Actividad enzimática amilasa posterior a la reactivación en los días 45 y 90 en los sustratos *Z. mays* y *O. sativa* para la cepa MP4.



Nota: la sigla A.A.R. significa actividad antes de la reactivación, las letras significan diferencia estadística entre los sustratos, \* significa diferencia estadística al comparar con el control. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los resultados y sus réplicas.

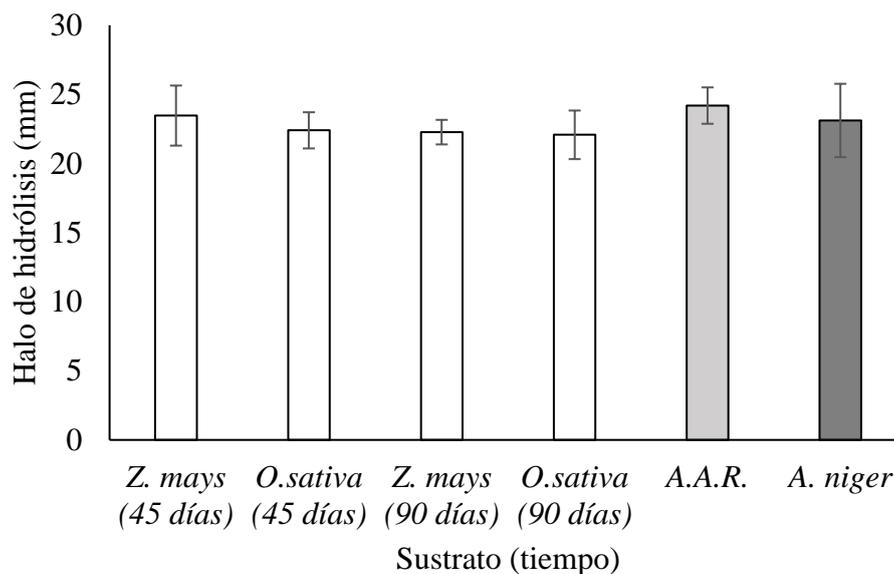
Los sustratos y tiempos de reactivación no evidenciaron diferencias significativas posterior al análisis de viabilidad enzimática ( $gl= 5.00$ ;  $F= 1.37$ ;  $p= 0.2693$ ) para la cepa PP2, evidenciado en el Anexo 7. El sustrato *Z. mays* para los tiempos 45 y 90 días con medias en el diámetro de sus halos de hidrólisis de 23.46 mm y 22.27 mm, respectivamente, se clasificaron en la misma categoría de significancia en comparación con A.A.R. cuya media es 24,19 mm. Adicionalmente, el sustrato *O. sativa* para los tiempos 45 y 90 días con medias de 22,40 mm y 22,07 mm, respectivamente, no reveló diferencia en categoría de significancia en relación a A.A.R. como se observa en la Figura 10. Los sustratos utilizados coinciden estadísticamente con la misma actividad enzimática en el halo de hidrólisis con *A. niger* de media 23,11 mm.

La conservación en la viabilidad amilolítica de la cepa PP2 está directamente relacionada con su género *Penicillium sp.* debido a su capacidad fitopatogena frente a granos de *Z. mays* y *O. sativa* (Chowdhury et al., 2021; Matei et al., 2015). El género *Penicillium sp.* posee mayor actividad celulolítica y amilolítica en comparación a géneros como *Aspergillus*

*sp.* (Khokhar et al., 2011; Barrett et al., 2020), obteniendo como resultado misma categoría de significancia en los sustratos utilizados gracias a la capacidad de degradar la composición bioquímica del pericarpio y aprovecharla para su conservación. Utilizar ambos granos para la conservación enzimática de la cepa es viable para periodos de 90 días.

**Figura 10.**

*Actividad enzimática amilasa posterior a la reactivación en los días 45 y 90 en los sustratos Z. mays y O. sativa para la cepa PP2.*



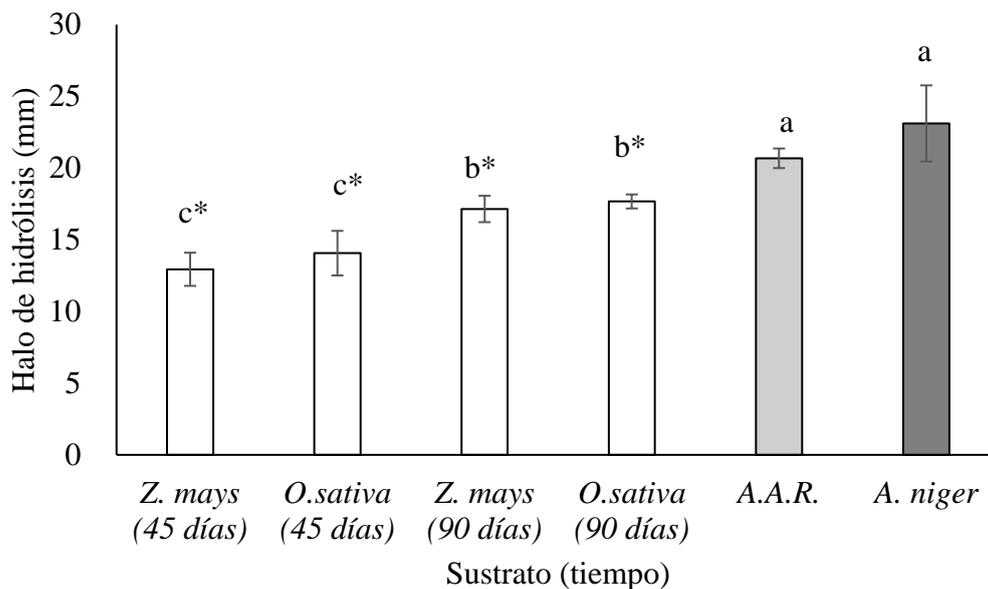
Nota: la sigla A.A.R. significa antes de la reactivación, las letras significan diferencia estadística entre los sustratos, \* significa diferencia estadística al comparar los sustratos con el control. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los resultados y sus réplicas.

El análisis de viabilidad enzimática para los sustratos y tiempos de reactivación evaluados evidenciaron significancia estadística ( $gl= 5.00$ ;  $F= 40.86$ ;  $p<0.0001$ ) para la cepa PQ1, evidenciado en el Anexo 8. Los sustratos *Z. mays* y *O. sativa* del tiempo de reactivación de 45 días obtuvieron misma categoría de significancia con medias de 12.94 mm y 14.06 mm en los diámetros de sus halos de hidrólisis, mientras que, los sustratos en el tiempo de reactivación de 90 días evidenciaron mayor categoría de significancia resultando con media de 17.15 mm para *Z. mays* y 17.67 mm para *O. sativa*. Sin embargo, los sustratos y tiempos de reactivación evaluados presentaron menor categoría de significancia en comparación a A.A.R. con media de 20,68 mm en el halo de hidrólisis (Figura 11). La cepa PQ1 pese a pertenecer al género fitopatógeno *Aspergillus sp.* evidenció disminución en su viabilidad enzimática, donde *Z. mays* y *O. sativa* en el periodo de 90 días fueron 0.83 y 0.85 veces inferiores,

respectivamente, en comparación a A.A.R. Bueno et al. (2006), Roy et al. (2014) y Ayala-Zermeño et al. (2017) mencionan la importancia de selección en la metodología de conservación basándose en la naturaleza del género fúngico, la disponibilidad de los nutrientes otorgados por el sustrato y factores físicos como la temperatura para prevenir la pérdida de viabilidad.

**Figura 11.**

*Actividad enzimática amilasa posterior a la reactivación en los días 45 y 90 en los sustratos Z. mays y O. sativa para la cepa PQ1.*



Nota: la sigla A.A.R. significa antes de la reactivación, las letras significan diferencia estadística entre los sustratos, \* significa diferencia estadística al comparar los sustratos con el control. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los resultados y sus réplicas.

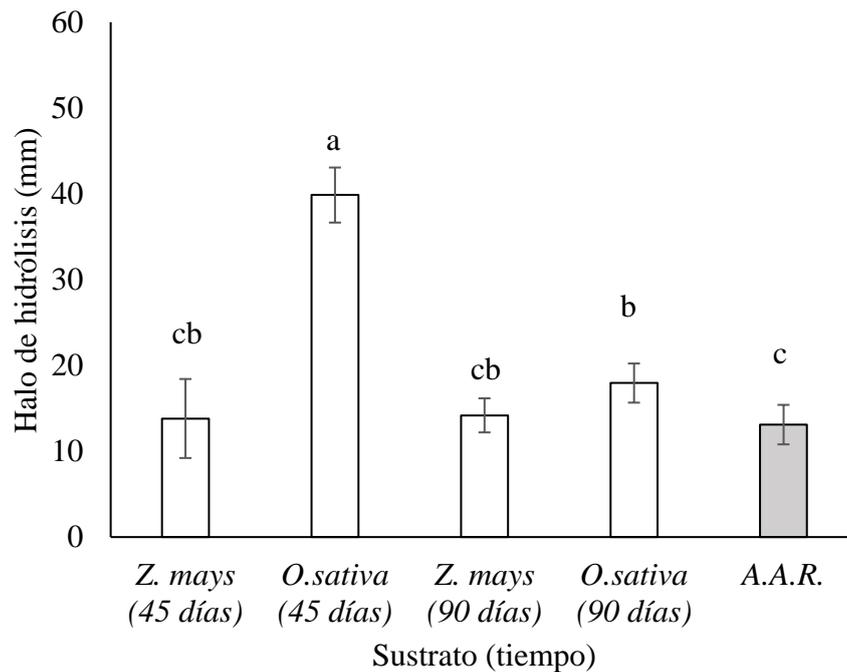
**4.3.2.2. Actividad urea amidohidrolasa**

El análisis de viabilidad enzimática en los sustratos evaluados reveló diferencias significativas ( $gl= 5.00$ ;  $F= 114.47$ ;  $p<0.0001$ ) para la cepa MP4, evidenciado en el Anexo 9. Se evidenció que A.A.R. obtuvo la menor categoría de significancia en comparación con los sustratos y tiempos de reactivación evaluados con una media de 13.11 mm en el diámetro del halo de hidrólisis, los sustratos *Z. mays* (45 días), *Z. mays* (90 días) y *O. sativa* (90 días) presentaron la misma categoría de significancia con medias 13.82 mm, 14.18 mm y 17.95 mm, respectivamente. Sin embargo, el sustrato *O. sativa* (45 días) evidenció la mayor categoría de significancia con una media de 39.86 mm como se observa en la Figura 12. En el periodo de 90 días *Z. mays* y *O. sativa* evidenciaron ser 1.10 y 1.37 veces mayores, respectivamente, en comparación a A.A.R. en el diámetro del halo de hidrólisis. *Z. mays* (90 días) comparte misma

categoría de significancia con A.A.R. y *O. sativa* (90 días), pero *O. sativa* (90 días) no comparte misma categoría de significancia con A.A.R. (Figura 12). Utilizar ambos granos para la conservación de la cepa MP4 es viable en periodos de 90 días, sin embargo, *O. sativa* evidenció mayor diámetro en el halo de hidrólisis.

**Figura 12.**

*Actividad enzimática ureasa posterior a la reactivación en los días 45 y 90 en los sustratos Z. mays y O. sativa para la cepa MP4.*



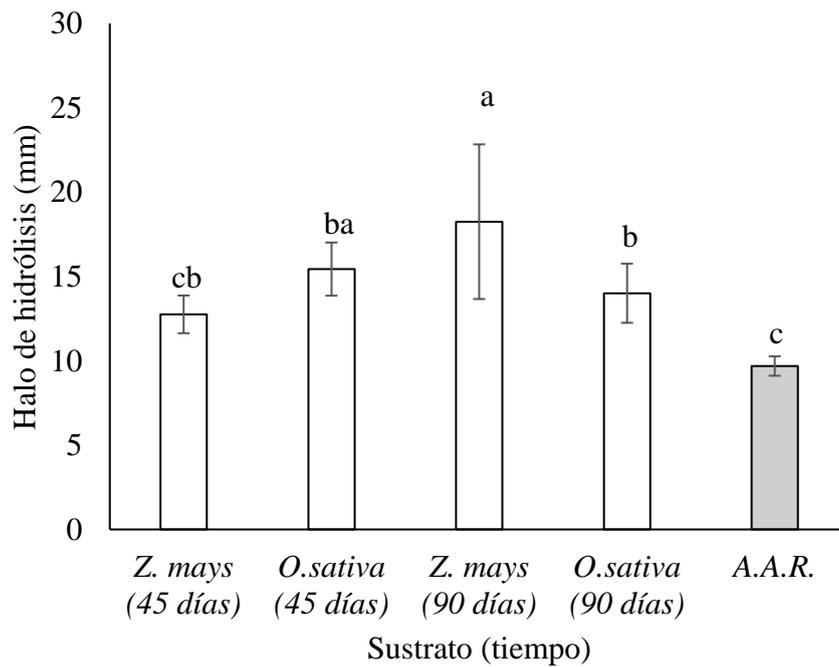
Nota: la sigla A.A.R. significa antes de la reactivación y corresponde al tiempo de 9 horas de evaluación, las letras significan diferencia estadística entre los sustratos. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los resultados y sus réplicas.

Los sustratos evaluados para viabilidad enzimática demostraron diferencias significativas ( $gl= 4.00$ ;  $F= 10.66$ ;  $p= 0.0001$ ) para la cepa PP2, evidenciado en el Anexo 10. Los sustratos *Z. mays* (45 días), *O. sativa* (45 días), *Z. mays* (90 días) y *O. sativa* (90 días) con medias de 12.75 mm, 15.44 mm, 18.25 mm y 14.00 mm en el diámetro del halo de hidrólisis, respectivamente, obtuvieron categorías de significancia mayores en comparación a A.A.R. con media de 9.69 mm. Sin embargo, el sustrato *Z. mays* (90 días) obtuvo mayor actividad enzimática correspondiente al halo de hidrólisis, mientras que, los demás sustratos evaluados comparten la misma categoría de significancia (Figura 13 Anexo 10.). Conservar la cepa PP2 en el grano de *Z. mays* evidenció 1.88 veces mayor actividad enzimática en comparación a

A.A.R., mientras que, *O. sativa* fue 1.44 veces mayor en relación al periodo de 90 días de conservación. Conservar la cepa PP2 en periodos de 90 días es viable en ambos granos, sin embargo, *Z. mays* evidenció mayor diámetro en el halo de hidrólisis.

**Figura 13.**

*Actividad enzimática ureasa posterior a la reactivación en los días 45 y 90 en los sustratos Z. mays y O. sativa para la cepa PP2.*



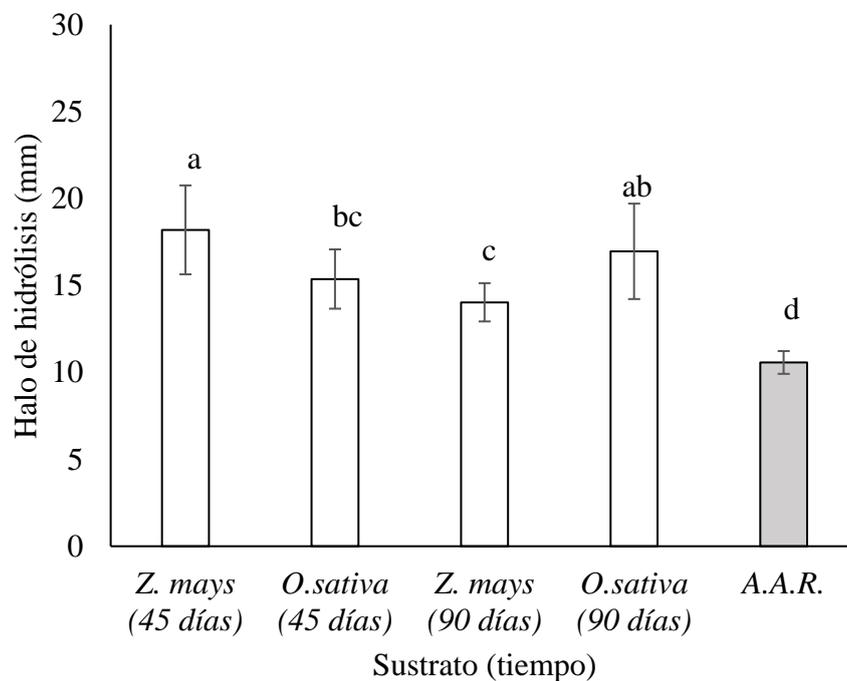
Nota: la sigla A.A.R. significa antes de la reactivación y corresponde al tiempo de 9 horas de evaluación, las letras significan diferencia estadística entre los sustratos. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los resultados y sus réplicas.

El análisis estadístico para la viabilidad enzimática en los diferentes sustratos y tiempos de conservación en la cepa PQ1 revelaron diferencias significativas ( $gl= 4.00$ ;  $F= 25.56$ ;  $p<0.0001$ ), evidenciado en el Anexo 11. La media de 10.57 mm en el diámetro del halo de hidrólisis correspondiente a A.A.R. que obtuvo la menor categoría de significancia en comparación a los demás sustratos y tiempos evaluados. El sustrato *Z. mays* (90 días) comparte categoría de significancia con *O. sativa* (45 días) cuyas medias son 14.03 mm y 15.37 mm, respectivamente. El sustrato *Z. mays* (45 días) con media de 18.20 mm obtuvo la mayor actividad enzimática compartiendo categoría de significancia con el sustrato *O. sativa* (90 días) con media 16.98 mm, sin embargo, este sustrato comparte diferente categoría de significancia

con *O. sativa* (45 días) como se evidencia en la Figura 14. Los sustratos *Z. mays* y *O. sativa* evidenciaron aumento de en el diámetro del halo de hidrólisis en el periodo de 90 días indicando su viabilidad como sustratos para la conservación de la catálisis enzimática para periodos superiores a los 90 días de conservación, donde *Z. mays* y *O. sativa* fueron 1.34 y 1.60 veces mayores en comparación a A.A.R., respectivamente.

**Figura 14.**

*Actividad enzimática ureasa posterior a la reactivación en los días 45 y 90 en los sustratos Z. mays y O. sativa para la cepa PQ1.*



Nota: la sigla A.A.R. significa antes de la reactivación y corresponde al tiempo de 9 horas de evaluación, las letras significan diferencia estadística entre los sustratos. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los resultados y sus réplicas.

El aumento en el diámetro del halo de hidrólisis indica mayor actividad de ureasas en el medio, las cepas fúngicas utilizadas fueron aisladas de ambientes psicrófilos (temperaturas inferiores a 15°C) permitiendo este aumento de actividad enzimática posterior a la conservación en agua estéril a una temperatura de -20 °C. Autores como González (2014), Piccinni (2019) y Wirth (2022) concuerdan con el aumento de actividad enzimática en microorganismos aislados de ambientes psicrófilos a bajas temperaturas, el aumento de actividad está directamente relacionado con las condiciones de crecimiento nativas de la cepa

fúngica dado a que son aislados de suelos de páramo (temperaturas inferiores a 15 °C), someter nuevamente las cepas a bajas temperaturas permitió mayor biosíntesis de ureasas para la degradación del sustrato. Teliz (2022) indica que las enzimas psicrófilas poseen mayor eficiencia catalítica que enzimas mesófilas gracias a que presentan adaptaciones en sus estructuras primarias, secundarias y terciarias, esto conlleva a reducir la entalpía dado a que las interacciones proteína-sustrato disminuyen, además, existe aumento de entropía por variaciones en la estabilidad y flexibilidad global, estas modificaciones varían la energía libre del proceso resultando en un menor  $K_m$  y mayor  $K_{cat}$ .

Mayorga et al. (2005), Ibrahim et al. (2011), Flores et al. (2020) y Serrano et al. (2022) enfocan la importancia de selección de sustratos teniendo en cuenta su composición carbono-nitrógeno para la secreción de enzimas fúngicas, como principal enfoque el tipo de fuente de nitrógeno para la biosíntesis de ureasa. Los sustratos *Z. mays* y *O. sativa* proporcionan alrededor del 10% de fuente de nitrógeno por grano en comparación al nulo a porte de nitrógeno del medio PDA resultando en un mayor estímulo para la producción de enzimas ureasas (Musa et al., 2011; Uarrota et al., 2013). Se observó en la cepa MP4 el aumento en el diámetro de hidrólisis para el sustrato *Z. mays* (90 días) fue de 1.10. veces mayor y para *O. sativa* (90 días) fue de 1.37 veces mayor en comparación con A.A.R., también la cepa PP2 reportó aumento de 1.88 en *Z. mays* (90 días) y 1.44 en *O. sativa* (90 días) y la cepa PQ1 fue de 1.34 y 1.60 veces mayor en *Z. mays* (90 días) y *O. sativa*, respectivamente. Los hongos *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.* son géneros fitopatógenos de los granos utilizados, esta característica influye en la conservación de viabilidad enzimática frente a los sustratos utilizados.

#### **4.3.2.3. Actividad fosfatasa**

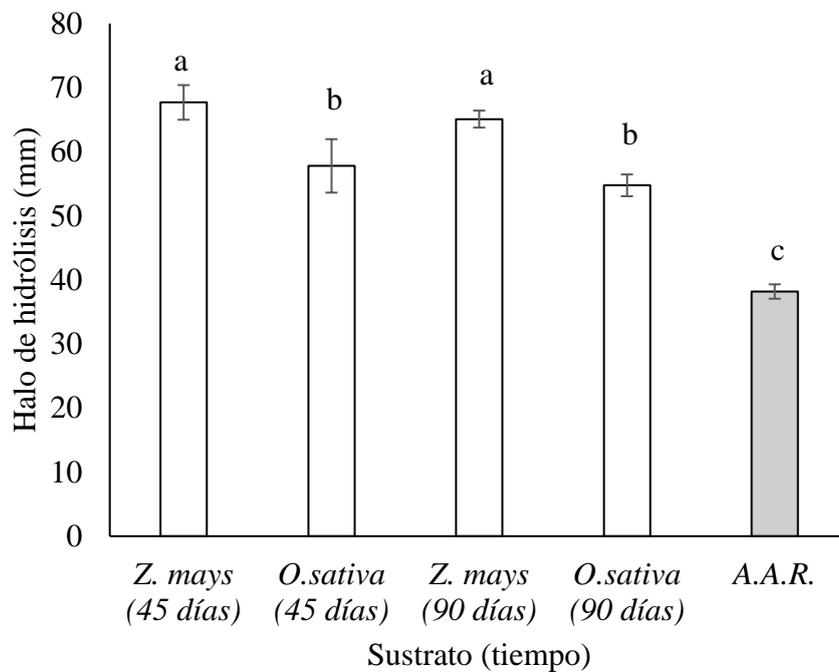
El análisis estadístico para evaluar la viabilidad enzimática en los sustratos *Z. mays* y *O. sativa* revelaron diferencias significativas ( $gl= 4.00$ ;  $F= 324.74$ ;  $p<0.0001$ ) para la cepa PP3, evidenciado en el Anexo 12. La menor categoría de significancia analizada corresponde a A.A.R. con media en el diámetro de hidrólisis de 38.17 mm, mientras que, el sustrato *O. sativa* a los 45 y 90 días de evaluación con medias 57.78 mm y 54.74 mm, respectivamente, pertenecen a la misma categoría de significancia. Sin embargo, el sustrato *Z. mays* (45 días) con media 67.68 mm y *Z. mays* (90 días) con media 65.08 mm obtuvieron mayor e igual categoría de significancia (Figura 15).

El aumento de actividad enzimática en los halos de hidrólisis en los periodos de 90 días fueron 1.71 veces mayor en *Z. mays* y 1.43 veces mayor en *O. sativa* en comparación con

A.A.R., además, *Z. mays* (45 días) y *O. sativa* (45) fueron 1.77 y 1.51 veces mayor. La conservación de la cepa en los granos analizados demostró viabilidad enzimática para periodos de 90 días e incluso aumentar gracias al aporte de fósforo del 20% al 30% en *Z. mays* y *O. sativa* (Musa et al., 2011; Uarrota et al., 2013). Adicionalmente, estresar la cepa a condiciones psicrófilas dado por la metodología de conservación influye en la actividad enzimática evidenciada en el aumento del diámetro en el halo de hidrólisis gracias a que son enzimas psicrófilas de cepas fúngicas aisladas de suelo prístino de páramo (González, 2014; Piccinni, 2019; Téliz, 2022; Wirth, 2022).

**Figura 15.**

*Actividad enzimática fosfatasa posterior a la reactivación en los días 45 y 90 en los sustratos Z. mays y O. sativa para la cepa PP3.*



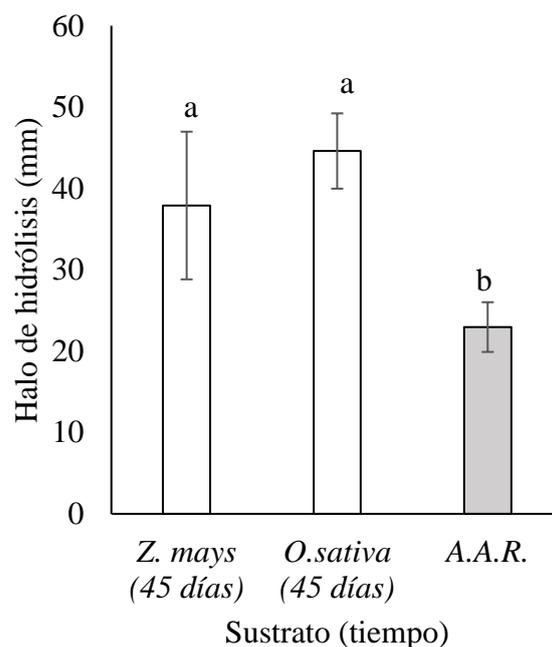
Nota: la sigla A.A.R. significa actividad antes de la reactivación, las letras significan diferencia estadística entre los sustratos. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los resultados y sus réplicas.

La viabilidad enzimática realizada posterior a los tiempos de reactivación demostró diferencias significativas en el análisis estadístico ( $gl= 2.00$ ;  $F= 28.66$ ;  $p= 0.0001$ ) para la cepa PP4, evidenciado en el Anexo 13, los sustratos que demostraron viabilidad enzimática fueron a los 45 días de reactivación, sin embargo, las reactivaciones al 90 día presentaron contaminación de levaduras en la cepa y pérdida de viabilidad enzimática. El sustrato *Z. mays* (45 días) y *O. sativa* (45 días) con medias 37.90 mm y 44.60 mm, respectivamente, comparten

misma categoría de significancia, mientras que, A.A.F. con media 22.96 mm obtuvo menor categoría de significancia (Figura 16; Error! No se encuentra el origen de la referencia.). Bueno et al. (2006), Roy et al. (2014) y Ayala-Zermeño et al. (2017) señalan la relevancia de selección en la metodología de conservación basándose en la naturaleza del género fúngico, la disponibilidad de los nutrientes otorgados por el sustrato y factores físicos como la temperatura para prevenir la pérdida de viabilidad.

**Figura 16.**

*Actividad enzimática fosfatasa posterior a la reactivación al día 45 en los sustratos Z. mays y O. sativa para la cepa PP4.*



Nota: la sigla A.A.R. significa actividad antes de la reactivación, las letras significan diferencia estadística entre los sustratos. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los resultados y sus réplicas.

## CAPITULO V

### 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones

Las cepas que presentaron actividades amilasa y ureasa fueron la cepa PP2 del género *Eupenicilium sp* y las cepas PQ1 y MP4 del género *Aspergillus sp.*, mientras que, las cepas que presentaron actividades fosfatasa fueron la cepa PP3 del género *Aspergillus sp* y la cepa PP4 del género *Rhizopus sp*.

La actividad enzimática está directamente relacionada al género, esto se evidenció en la cepa PP2 del género *Eupenicilium sp*. la cual presentó mayor actividad enzimática para amilasa y ureasa y en la cepa PP3 del género *Aspergillus sp*. que evidenció mayor actividad enzimática para fosfatasa.

El medio con mayor producción de esporas y germinación fue el medio líquido de extracto de Malta, la capacidad de esporulación de los hongos está directamente relacionada con el tipo de fuentes de carbono y nitrógeno, los polisacáridos con fuentes peptonadas estimulan eficientemente la producción y viabilidad de las esporas en comparación con monosacáridos y el extracto de levadura.

Las cepas aisladas de suelo prístino de páramo al poseer enzimas psicrófilas (inferiores a -15 °C) demostraron mayor diámetro en el halo de hidrólisis en actividades ureasa y fosfatasa, al ser sometidas a bajas temperaturas (-20 °C) por la metodología de conservación y la actividad amilasa fue conservada.

Los diferentes nutrientes proporcionados por los sustratos utilizados en la metodología de conservación, influenciaron el aumento del diámetro de los halos de hidrólisis en actividades ureasa y fosfatasa, mientras que, la actividad amilasa fue conservada pese a que los sustratos son ricos en almidón.

## **5.2. Recomendaciones**

Determinar sustratos orgánicos ricos en almidón, urea y fosforo para potenciar la biosíntesis de enzimas amilasas, ureasas y fosfatasas.

Realizar pruebas enzimáticas en condiciones psicrófilas (inferiores a 15 °C), mesófilas (25 °C a 45 °C) y termófilas (superiores a 45 °C) para determinar la temperatura óptima en el aumento de las actividades enzimáticas, además, realizar pruebas con iones de  $\text{Cu}^+$  para identificar el aumento o disminución enzimática y crecimiento fúngico.

Identificar fuentes de carbono accesibles y de bajo costo como sacarosa y extracto de malta para la formulación de medios de esporulación.

Someter la metodología de conservación de las cepas fúngicas en periodos superiores a un año y determinar la viabilidad enzimática.

## Bibliografía

- Acosta Ovallos, A. K. (2019). Evaluación de técnicas de conservación para microorganismos de importancia en microbiología industrial en el Cepario de la Universidad de Santander.
- Adams, T. H. (1995). Asexual sporulation in higher fungi. In *The growing fungus* (pp. 367-382). Springer, Dordrecht.
- Adhikari, P., Jain, R., Sharma, A., & Pandey, A. (2021). Plant growth promotion at low temperature by phosphate-solubilizing *Pseudomonas* Spp. Isolated from high-altitude himalayan soil. *Microbial Ecology*, 82(3), 677-687.
- Aguirre, N. d. (2006). *Determinación de algunas fuentes de carbono y nitrógeno, del pH y de la actividad de agua sobre el desarrollo de Nomuraea rileyi*. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10554/8271>.
- Aisien, E. T., & Igbinosa, I. H. (2019). Production, purification, and characterization of  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium expansum* using cassava peels as substrate. *Nigerian Journal of Biotechnology*, 36(2), 114-126.
- Alarcon, D. I. A. (2006). Evaluación de técnicas de conservación para hongos filamentosos y levaduriformes en el cepario de la Pontificia Universidad Javeriana. *Facultad de Ciencias de Microbiología*.
- Alizadeh, H., Kandula, D. R., Hampton, J. G., Stewart, A., Leung, D. W., Edwards, Y., & Smith, C. (2017). Urease producing microorganisms under dairy pasture management in soils across New Zealand. *Geoderma regional*, 11, 78-85.
- Ashton, G. D., & Dyer, P. S. (2019). Culturing and mating of *Aspergillus fumigatus*. *Current Protocols in Microbiology*, 54(1), e87.
- Atlas, R. M., & Bartha, R. (1998). Fundamentals and Applications. In *Microbial ecology*. 4th edition. (pp. 523–530). California: Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- Atlas, RM y R. Barta., (1981), *Seminario de microbiología básica*. Laboratorios Buckman Inc.
- Ayala-Zermeño, M. A., Gallou, A., Berlanga-Padilla, A. M., Andrade-Michel, G. Y., Rodríguez-Rodríguez, J. C., Arredondo-Bernal, H. C., & Montesinos-Matías, R. (2017). Viability, purity, and genetic stability of entomopathogenic fungi species using different preservation methods. *Fungal biology*, 121(11), 920-928.

- Azubuike, C. C., Chikere, C. B., & Okpokwasili, G. C. (2016). Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(11), 1-18.
- Barrett, K., Jensen, K., Meyer, A. S., Frisvad, J. C., & Lange, L. (2020). Fungal secretome profile categorization of CAZymes by function and family corresponds to fungal phylogeny and taxonomy: Example *Aspergillus* and *Penicillium*. *Scientific reports*, 10(1), 5158.
- Basu, SN y Bhattacharyya, JP (1962). Estudios sobre el crecimiento y esporulación de algunas especies de *Penicillium*. *Microbiología* , 27 (1), 61-73.
- Blanco, E. L., & Castro, Y. (2021). Antagonismo de rizobacterias sobre hongos fitopatógenos, y su actividad microbiana con potencial biofertilizante, bioestimulante y biocontrolador. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 23(1), 6-16.
- Boopathy, R. (2017). Anaerobic degradation of petroleum hydrocarbons in sediments. In *Current developments in biotechnology and bioengineering* (pp. 475–490). Amsterdam: Elsevier.
- Bravo Velásquez, E. (2014). La biodiversidad en el Ecuador. Abya-Yala/UPS.
- Brück, S. A., Contato, A. G., Gamboa-Trujillo, P., de Oliveira, T. B., Cereia, M., & de Moraes Polizeli, M. D. L. T. (2022). Prospection of Psychrotrophic Filamentous Fungi Isolated from the High Andean Paramo Region of Northern Ecuador: Enzymatic Activity and Molecular Identification. *Microorganisms*, 10(2), 282.
- Buckman, SJ y Buckman, JD, (1991), Microbiología. En: *Pulpa y papel, química y tecnología química* (JP Casey, comp.). vol. 2. LIMUSA. México.
- Bueno, C. J., Ambrósio, M. M. D. Q., & Souza, N. L. D. (2006). Storage of soilborne phytopathogenic fungi. *Summa Phytopathologica*, 32, 42-50.
- Bueno, L., & Gallardo, R. (1998). Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. *Rev Iberoam Micol*, 15(3), 166-168.
- Camacho Martínez, F. J. (2013). *Biorremediación de zonas contaminadas por hidrocarburos empleando hongos comestibles: efecto del antraceno sobre el crecimiento in vitro de Pleurotus ostreatus* (Master's thesis).

- Castro Fernández, H. M., & Fernández Gutiérrez, C. C. (2021). *Biodegradación de residuos agroforestales por hongos de la pudrición blanca (Pleurotus ostreatus y Ganoderma lucidum) y su aprovechamiento como biofertilizantes de suelo* (Bachelor's thesis, Universidad del Magdalena).
- Ceci, A., Pinzari, F., Riccardi, C., Maggi, O., Pierro, L., Petrangeli Papini, M. & Persiani, A. M. (2018). Metabolic synergies in the biotransformation of organic and metallic toxic compounds by a saprotrophic soil fungus. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(2), 1019-1033.
- Chen, S. C. A., Sorrell, T. C., & Meyer, W. (2015). *Aspergillus and Penicillium. Manual of clinical microbiology*, 2030-2056.
- Chowdhury, P., Shamsi, S., Begum, H. H., & Bashar, M. A. (2021). Mycoflora associated with diseased rice grains in Bangladesh and their pathogenic potentiality. *Bioresearch Communications-(BRC)*, 7(1), 932-940.
- Coello, J. M., & Burgos, F. (2012). Aplicación del hongo *Pleurotus ostreatus* como alternativa para la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados.
- Corredor, B. B., Mesa, G. P., Gallo, S. A. C., & Pino, N. (2013). Biorremediación de suelo contaminado con pesticidas: caso DDT. *Gestión y Ambiente*, 16(3), 119-135.
- Del Ecuador, A. C. (2008). Constitución de la República del Ecuador. *Quito: Tribunal Constitucional del Ecuador. Registro oficial Nro, 449, 79-93.*
- Doni, F., Zain, C. R. C. M., Isahak, A., Fathurrahman, F., Sulaiman, N., Uphoff, N., & Yusoff, W. M. W. (2017). Relationships observed between Trichoderma inoculation and characteristics of rice grown under System of Rice Intensification (SRI) vs. conventional methods of cultivation. *Symbiosis*, 72(1), 45-59.
- Doriya, K., & Kumar, D. S. (2016). Isolation and screening of L-asparaginase free of glutaminase and urease from fungal sp. *3 Biotech*, 6, 1-10.
- Dua, M., Singh, A., Sethunathan, N., & Johri, A. (2002). Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Applied microbiology and biotechnology*, 59(2), 143-152.
- Estrella, J. (2005). *Biodiversidad y recursos genéticos: una guía para su uso y acceso en el Ecuador*. Editorial Abya Yala.

- Fang, C., Kumari, D., Zhu, X., & Achal, V. (2018). Role of fungal-mediated mineralization in biocementation of sand and its improved compressive strength. *International biodeterioration & biodegradation*, *133*, 216-220.
- Figuroa-Ceballos, R., Morales-Esquivel, O., & de Carmen Bran-González, M. (2019). Producción de amilasas por cepas de hongos anamorfos aislados de la hojarasca de *Quercus* sp. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia*, *1*(29).
- Flores Icochea, Y. J., & Retamozo Calle, O. V. (2020). Revisión sistemática: biodegradación del poliuretano utilizando microorganismos fúngicos.
- Gao, L., & Liu, X. (2010). Sporulation of several biocontrol fungi as affected by carbon and nitrogen sources in a two-stage cultivation system. *The Journal of Microbiology*, *48*, 767-770.
- Gerday, C., Aittaleb, M., Bentahir, M., Chessa, J. P., Claverie, P., Collins, T., & Feller, G. (2000). Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends in biotechnology*, *18*(3), 103-107.
- González Pombo, A. (2014). Identificación molecular y métodos de conservación de levaduras y hongos filamentosos de muestras provenientes de Antártida.
- Hassan, N., Rafiq, M., Hayat, M., Shah, A. A., & Hasan, F. (2016). Psychrophilic and psychrotrophic fungi: a comprehensive review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, *15*(2), 147-172.
- Hyde, K. D., Xu, J., Rapior, S., Jeewon, R., Lumyong, S., Niego, A. G. T., & Stadler, M. (2019). The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Diversity*, *97*, 1- 136.
- Ibrahim, I. N., Maraqa, A., Hameed, K. M., Saadoun, I. M., & Maswadeh, H. M. (2011). Ürdün'e özgü habitatlardaki potansiyel plastik-indirgeyici mantarların değerlendirilmesi. *Turkish Journal of Biology*, *35*(5), 551-557.
- Jacques, S., Lenzo, L., Stevens, K., Lawrence, J., & Tan, K. C. (2021). An optimized sporulation method for the wheat fungal pathogen *Pyrenophora tritici-repentis*. *Plant methods*, *17*(1), 1-12.
- Jain, P. K., & Bajpai, V. (2012). Biotechnology of bioremediation-a review. *Int J Environ Sci*, *3*(1), 535-549.

- Jiang, G., Chen, P., Bao, Y., Wang, X., Yang, T., Mei, X., & Shen, Q. (2021). Isolation of a novel psychrotrophic fungus for efficient low-temperature composting. *Bioresource Technology*, 331, 125049.
- Kawchuk, L. M., Hutchison, L. J., & Reid, J. (1993). Stimulation of growth, sporulation, and potential staining capability in *Ceratocystiopsis falcata*. *European journal of forest pathology*, 23(3), 178-181.
- Kemona, A., & Piotrowska, M. (2016). Microorganisms potentially useful in the management of polyurethane foam waste. *Infrastruktura i Ekologia Terenów Wiejskich*.
- Khashaba, E. H. (2021). Inoculation and colonization of isolated entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* in rice plants, *Oryza sativa* L. through seed immersion method. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1), 1-7.
- Khokhar, I., Mukhtar, I., & Mushtaq, S. (2011). Comparative studies on the amylase and cellulase production of *Aspergillus* and *Penicillium*. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 15(4), 657-661.
- Kour, D., Rana, K. L., Yadav, N., Yadav, A. N., Singh, J., Rastegari, A. A., & Saxena, A. K. (2019). Agriculturally and industrially important fungi: current developments and potential biotechnological applications. *Recent advancement in white biotechnology through fungi: Volume 2: Perspective for value-added products and environments*, 1-64.
- Kumar, A., Mukhia, S., & Kumar, R. (2021). Industrial applications of cold-adapted enzymes: challenges, innovations a Brück future perspective. *3 Biotech*, 11(10), 1-18.
- Li, F., Matloob, M., Nzabanita, C., & Li, Y. (2021). Growth, sporulation and germination of *Verticillium alfalfae* on media. *European Journal of Plant Pathology*, 161(2), 383-395.
- Liu, C., Xiao, Y., Xiao, Y., & Li, Z. (2021). Marine urease with higher thermostability, pH and salinity tolerance from marine sponge-derived *Penicillium steckii* S4-4. *Marine Life Science & Technology*, 3, 77-84.
- Matei, S., Matei, A., MATEI, G. M., & CORNEA, C. P. (2015). Utilization of lactic acid bacteria and extracellular compounds in biological control of fungal species. *Research Journal of Agricultural Science*, 47(3).

- Mayorga, O. L., López, E., Díaz, T. E., & Barahona, R. (2005). Efecto de la fuente de carbono y el tipo de inóculo sobre la producción de enzimas hidrolíticas del hongo anaeróbico ruminal *Neocallimastix frontalis* NFT 101. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 6(1), 12-19.
- Miri, S., Naghdi, M., Rouissi, T., Kaur Brar, S., & Martel, R. (2019). Recent biotechnological advances in petroleum hydrocarbons degradation under cold climate conditions: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 49(7), 553-586.
- Morocho, C. C., & Chunchu, G. (2019). Páramos del Ecuador, importancia y afectaciones: Una revisión. *Bosques Latitud Cero*, 9(2), 71-83.
- Mossini, S. A., Arrotéa, C. C., & Kemmelmeier, C. (2009). Effect of neem leaf extract and neem oil on *Penicillium* growth, sporulation, morphology and ochratoxin A production. *Toxins*, 1(1), 3-13.
- Mulik, SM, Joshi, MS, Dawale, MB y Gadhave, AD (2020). Efecto de diversas fuentes de carbono y nitrógeno sobre *Aspergillus niger*, un organismo solubilizante de "fósforo". *Revista Internacional de Microbiología Actual y Ciencias Aplicadas*, 9 (7), 657-664.
- Musa, A. S., Umar, M., & Ismail, M. (2011). Physicochemical properties of germinated brown rice (*Oryza sativa* L.) starch. *African Journal of Biotechnology*, 10(33), 6281-6291.
- Ogbonna, C. N., Okpokwu, N. M., Okafor, C. U., & Onyia, C. E. (2014). Isolation and screening of amylase producing fungi obtained from garri processing site. *International Journal of Biotechnology and Food Science*, 2(5), 88-93.
- Oses-Pedraza, R., Torres-Díaz, C., Lavín, P., Retamales-Molina, P., Atala, C., Gallardo-Cerda, J., ... & Molina-Montenegro, M. A. (2020). Root endophytic *Penicillium* promotes growth of Antarctic vascular plants by enhancing nitrogen mineralization. *Extremophiles*, 24, 721-732.
- Oyewole, O. A., Oyeleke, S. B., Dauda, B. E. N., & Emiade, S. (2011). Production of amylase and protease enzymes by *Aspergillus niger* and *Penicillium frequestans* isolated from abattoir effluent.

- Pascual, S., Rico, J. R., De Cal, A., & Melgarejo, P. (1997). Ecophysiological factors affecting growth, sporulation and survival of the biocontrol agent *Penicillium oxalicum*. *Mycopathologia*, *139*, 43-50.
- Pasin, T. M., Scarcella, A. S. A., de Oliveira, T. B., Lucas, R. C., Cereia, M., Betini, J. H., & Polizeli, M. L. (2020). Paper industry wastes as carbon sources for aspergillus species Cultivation and production of an enzymatic cocktail for biotechnological applications. *Industrial Biotechnology*, *16*(2), 56-60.
- Pazmiño, D. (2019). Peligro de incendios forestales asociado a factores climáticos en Ecuador. *FIGEMPA: Investigación y Desarrollo*, *1*(1), 10-18.
- Piccinni, F. E. (2019). Caracterización de enzimas activas sobre carbohidratos de un aislamiento de *Cellulomonas* sp. para degradación de biomasa lignocelulósica.
- Pitt, J. I. (1979). *The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces*. Academic Press Inc. Ltd..
- Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., & Amorim, D. S. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, *67*(5), 577-591.
- Andlar, M., Rezić, T., Mardetko, N., Kracher, D., Ludwig, R., & Šantek, B. (2018). Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Engineering in Life Sciences*, *18*(11), 768-778.
- Rafiq, M., Hassan, N., Rehman, M., & Hasan, F. (2019). Adaptation mechanisms and applications of psychrophilic fungi. In *Fungi in extreme environments: ecological role and biotechnological significance* (pp. 157-174). Springer, Cham.
- Roy, C. B., Srinivas, P., & CK, J. (2014). Relative efficacy of long-term storage methods on survival and virulence of *Corynespora cassiicola* and *Phytophthora meadii* pathogenic on rubber (*Hevea brasiliensis*). *Rubber Sci*, *27*(2), 202-214.
- Sahoo, K., Dhal, N. K., & Das, R. (2014). Production of amylase enzyme from mangrove fungal isolates. *African journal of Biotechnology*, *13*(46).
- Saini, R., Rani, V., Sharma, S., & Verma, M. L. (2021). Screening of Microbial Enzymes and Their Potential Applications in the Bioremediation Process. In *Microbial Products for Health, Environment and Agriculture* (pp. 359-378). Springer, Singapore.

- Samson, R. A. (1981). The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*.
- Santiago, M., Ramírez-Sarmiento, C. A., Zamora, R. A., & Parra, L. P. (2016). Discovery, molecular mechanisms, and industrial applications of cold-active enzymes. *Frontiers in microbiology*, 7, 1408.
- Serrano, A. N., Reyes, B. G., & González, A. G. (2022). Evaluación de residuos agroindustriales en la producción de hidrolasas por *Penicillium crustosum* en fermentación sumergida. *Revista de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina (ISSN: 2448-8380)*, 4(suplemento 1), 28-28.
- Sharma, B., Dangi, A. K., & Shukla, P. (2018). Contemporary enzyme-based technologies for bioremediation: a review. *Journal of environmental management*, 210, 10-22.
- Sharma, C. S., Anand, T. N. C., & Ravikrishna, R. V. (2010). A methodology for analysis of diesel engine in-cylinder flow and combustion. *Progress in Computational Fluid Dynamics, an International Journal*, 10(3), 157-167.
- Sloan, B. J., Routien, J. B., & Miller, V. P. (1960). Increased sporulation in fungi. *Mycologia*, 52(1), 47-63.
- Sutherland, T. D., Horne, I., Weir, K. M., Coppin, C. W., Williams, M. R., Selleck, M. & Oakeshott, J. G. (2004). Enzymatic bioremediation: from enzyme discovery to applications. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, 31(11), 817-821.
- Teertstra, W. R., Tegelaar, M., Dijksterhuis, J., Golovina, E. A., Ohm, R. A., & Wösten, H. A. (2017). Maturation of conidia on conidiophores of *Aspergillus niger*. *Fungal Genetics and Biology*, 98, 61-70.
- Teliz González, M. (2022). Bioprospección de microorganismos antárticos productores de lipasas y esterases activas a bajas temperaturas.
- Tsekova, K., Galabova, D., & Todorova, K. (2000). Copper accumulation and phosphatase activities of *Aspergillus* and *Rhizopus*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 55(9-10), 708-712.

- Uarrota, V. G., Amante, E. R., Demiate, I. M., Vieira, F., Delgadillo, I., & Maraschin, M. (2013). Physicochemical, thermal, and pasting properties of flours and starches of eight Brazilian maize landraces (*Zea mays* L.). *Food Hydrocolloids*, 30(2), 614-624.
- Van Agteren, M. H., Keuning, S., & Oosterhaven, J. (1998). *Handbook on biodegradation and biological treatment of hazardous organic compounds* (Vol. 2). Springer Science & Business Media.
- Van Stempvoort, D. R., & Grande, P. (2006). *Bioremediation of petroleum hydrocarbons in soil and groundwater under cold climate conditions: a review, implications for applications in Canada*. National Water Research Institute.
- Vellanki, S., Navarro-Mendoza, M. I., Garcia, A., Murcia, L., Perez-Arques, C., Garre, V., ... & Lee, S. C. (2018). *Mucor circinelloides*: growth, maintenance, and genetic manipulation. *Current protocols in microbiology*, 49(1), e53.
- Wang, M., Jiang, X., Wu, W., Hao, Y., Su, Y., Cai, L., & Liu, X. (2015). Psychrophilic fungi from the world's roof. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 34(1), 100-112.
- Wendland, J. (2020). Sporulation in *Ashbya gossypii*. *Journal of Fungi*, 6(3), 157.
- Wirth, S. (2022). *Enzimas microbianas activas sobre polisacáridos estructurales de pared celular vegetal: producción recombinante y caracterización bioquímica y funcional* (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires).
- Zhao, X., Chai, J., Wang, F., & Jia, Y. (2023). Optimization of Submerged Culture Parameters of the Aphid Pathogenic Fungus *Fusarium equiseti* Based on Sporulation and Mycelial Biomass. *Microorganisms*, 11(1), 190.
- Zong, Y., Li, B., & Tian, S. (2015). Effects of carbon, nitrogen and ambient pH on patulin production and related gene expression in *Penicillium expansum*. *International journal of food microbiology*, 206, 102-108.

## ANEXOS

### Anexo 1.

*Análisis de la varianza con diseño de bloques completamente al azar para actividad amilasa de las cepas MP4, PQ1 y PP2.*

<b>F.V.</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	8	38,71	13,99	<0,0001
Cepa	3	99,18	35,85	<0,0001
Observación	5	2,43	0,88	0,5189
Error	15	2,77		
Total	23			

### Anexo 2.

*Análisis de la varianza con diseño de bloques completamente al azar para actividad ureasa de las cepas MP4, PQ1 y PP2 a las 27 horas.*

<b>F.V.</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	7	9,47	2,57	0,085
Cepa	2	21,84	5,93	0,02
Observación	5	4,52	1,23	0,365
Error	10	3,68		
Total	17			

### Anexo 3.

*Prueba T para muestras independientes entre las cepas PP3 y PP4.*

	PP3	PP4
<b>n</b>	6	6
<b>Media</b>	38,17	22,96
<b>Media 1 - Media 2</b>	15,22	
<b>LI (95)</b>	11,97	
<b>LS (95)</b>	18,47	
<b>pHomVar</b>	0,0466	

<b>T</b>	11,45
<b>p-valor</b>	<0,0001

---

#### **Anexo 4.**

*Análisis de la varianza factorial con diseño de bloques completamente al azar para el número de esporas totales.*

<b>F.V.</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	16	4.40E+10	11.7	<0.0001
Cepa	4	9.22E+10	24.5	<0.0001
Medio	2	8.84E+10	23.49	<0.0001
Observación	2	8.68E+08	0.23	0.7954
Cepa*Medio	8	1.96E+10	5.21	0.0005
Error	28	3.76E+09		
Total	44			

#### **Anexo 5.**

*Análisis de la varianza factorial con diseño de bloques completamente al azar para el número de esporas germinadas.*

<b>F.V.</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	16	1,43E+09	9,4	<0,0001
Cepa	4	2,23E+09	14,63	<0,0001
Medio	2	2,86E+09	18,79	<0,0001
Observación	2	3,18E+08	2,09	0,7954
Cepa*Medio	8	9,54E+08	6,27	0,0005
Error	28	1,52E+08		
Total	44			

### **Anexo 6.**

*Análisis de la varianza con diseño de bloques completamente al azar para actividad enzimática amilasa posterior a la reactivación al día 45 y 90 en los sustratos Z. mays y O. sativa para la cepa MP4.*

<b>F.V.</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	10	54,11	18,42	<0,0001
Sustrato	5	107,12	36,46	<0,0001
Observación	5	1,1	0,37	0,5189
Error	25	2,94		
Total	35			

### **Anexo 7.**

*Análisis de la varianza con diseño de bloques completamente al azar para actividad enzimática amilasa posterior a la reactivación al día 45 y 90 en los sustratos Z. mays y O. sativa para la cepa PP2.*

<b>F.V.</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	10	4,2	1,43	0,2259
Sustrato	5	4,03	1,37	0,2692
Observación	5	4,37	1,48	0,2308
Error	25	2,94		
Total	35			

### **Anexo 8.**

*Análisis de la varianza con diseño de bloques completamente al azar para actividad enzimática amilasa posterior a la reactivación al día 45 y 90 en los sustratos Z. mays y O. sativa para la cepa PQ1.*

<b>F.V.</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	10	45,29	20,75	<0,0001
Sustrato	5	89,14	40,85	<0,0001

Observación	5	1,43	0,66	0,6595
Error	25	2,18		
Total	35			

### Anexo 9.

*Análisis de la varianza con diseño de bloques completamente al azar para actividad enzimática ureasa posterior a la reactivación al día 45 y 90 en los sustratos Z. mays y O. sativa para la cepa MP4.*

<b>F.V.</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	9	355,77	52,41	<0,0001
Sustrato	4	777,01	114,47	<0,0001
Observación	5	18,78	2,77	0,0467
Error	20	6,79		
Total	29			

### Anexo 10.

*Análisis de la varianza con diseño de bloques completamente al azar para actividad enzimática ureasa posterior a la reactivación al día 45 y 90 en los sustratos Z. mays y O. sativa para la cepa PP2.*

<b>F.V.</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	9	29,89	5,28	0,001
Sustrato	4	60,36	10,66	0,0001
Observación	5	5,51	0,97	0,4577
Error	20	5,66		
Total	29			

### Anexo 11.

*Análisis de la varianza con diseño de bloques completamente al azar para actividad enzimática ureasa posterior a la reactivación al día 45 y 90 en los sustratos Z. mays y O. sativa para la cepa PQ1.*

<b>F.V.</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	9	28,99	14,21	<0,0001
Sustrato	4	52,15	25,56	<0,0001
Observación	5	10,46	5,13	0,0035
Error	20	2,04		
Total	29			

### Anexo 12.

*Análisis de la varianza con diseño de bloques completamente al azar para actividad enzimática fosfatasa posterior a la reactivación al día 45 y 90 en los sustratos Z. mays y O. sativa para la cepa PP3.*

<b>F.V.</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	9	866,82	145,72	<0,0001
Sustrato	4	1931,68	324,74	<0,0001
Observación	5	14,92	2,51	0,0643
Error	20	5,95		
Total	29			

### Anexo 13.

*Análisis de la varianza con diseño de bloques completamente al azar para actividad enzimática fosfatasa posterior a la reactivación al día 45 y 90 en los sustratos Z. mays y O. sativa para la cepa PP4.*

<b>F.V.</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	7	254,57	9,91	0,0008
Sustrato	2	736,51	28,66	0,0001

Observación	5	61,79	2,41	0,1114
Error	10	25,69		
Total	17			

---

## NOMBRE DEL TRABAJO

Garcia\_M\_Tesis\_version.final\_junio.2  
4.d ocx

## AUTOR

MATIAS GARCIA

## RECUENTO DE PALABRAS

16590 Words

## RECUENTO DE CARACTERES

90881 Characters

## RECUENTO DE PÁGINAS

73 Pages

## TAMAÑO DEL ARCHIVO

22.9MB

## FECHA DE ENTREGA

Jul 1, 2024 7:55 AM GMT-5

## FECHA DEL INFORME

Jul 1, 2024 7:57 AM GMT-5

● 10% de similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- 9% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 6% Base de datos de trabajos entregados
- 3% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● Excluir del Reporte de Similitud

- Material bibliográfico
- Coincidencia baja (menos de 8 palabras)
- Material citado
- Fuentes excluidas manualmente

