



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE RECURSOS NATURALES**  
**CARRERA AGRONOMÍA**

**DETERMINACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD FÚNGICA  
ASOCIADA AL COMPOST, DE MUESTRAS RECOLECTADAS EN  
TRES ETAPAS DIFERENTES, EN LA COMUNIDAD GAUSHI**

**Trabajo de Integración Curricular**

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar el grado académico de:

**INGENIERO AGRÓNOMO**

**AUTOR:**

**DENNYS XAVIER AMANCHA VARGAS**

Riobamba - Ecuador

2023



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE RECURSOS NATURALES**  
**CARRERA AGRONOMÍA**

**DETERMINACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD FÚNGICA  
ASOCIADA AL COMPOST, DE MUESTRAS RECOLECTADAS EN  
TRES ETAPAS DIFERENTES, EN LA COMUNIDAD GAUSHI**

**Trabajo de Integración Curricular**

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar el grado académico de:

**INGENIERO AGRÓNOMO**

**AUTOR: DENNYS XAVIER AMANCHA VARGAS**

**DIRECTOR: ING. PABLO ISRAEL ÁLVAREZ ROMERO Ph.D.**

Riobamba - Ecuador

2023

© 2023, **Dennys Xavier Amancha Vargas**

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio y procedimiento, incluyendo cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, Dennys Xavier Amancha Vargas declaró que el presente Trabajo de Integración Curricular es de mi autoría y los resultados de este son auténticos. Los textos en el documento que proviene de otras fuentes están debidamente citadas y referenciadas.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Integración Curricular el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 12 de junio del 2023.

**Dennys Xavier Amancha Vargas**

**060397656-4**

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE RECURSOS NATURALES**

**CARRERA AGRONOMÍA**

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; Tipo: Proyecto de Investigación, “**DETERMINACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD FÚNGICA ASOCIADA AL COMPOST, DE MUESTRAS RECOLECTADAS EN TRES ETAPAS DIFERENTES, EN LA COMUNIDAD GAUSHI.**”, de responsabilidad del señor **DENNYS XAVIER AMANCHA VARGAS**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

FIRMA

FECHA

Ing. Víctor Alberto Lindao Córdova Ph.D

**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

2023-06-12

Ing. Pablo Israel Álvarez Romero Ph. D

**DIRECTOR DEL TRABAJO DE**

\_\_\_\_\_

2023-06-12

**INTEGRACIÓN CURRICULAR**

Ing. Marco Aníbal Vivar Arrieta

**ASESOR DEL TRABAJO DE**

\_\_\_\_\_

2023-06-12

**INTEGRACIÓN CURRICULAR**

## DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo investigativo a mis padres **Gonzalo Amancha** y **Verónica Vargas** quienes han sido pilar fundamental durante este transcurso de mi formación académica con su amor, su cariño y paciencia me han sabido apoyar y guiar durante este camino, mi corazón se llena de alegría al tener el privilegio de compartir esta dicha con ellos, a mis hermanas **Alexandra Amancha** y **Vanessa Amancha** que son la luz de mis ojos quienes con su alegría me han sabido mantener firme en este camino, a ustedes mi familia quiero dedicarles este logro ya que son el motivo de cada día superarme y seguir firme y constante durante este largo camino y desde el fondo de mi corazón quiero dedicar este trabajo a mi abuelito **Segundo Amancha** aunque nos dejó muy temprano su amor está presente en mi camino.

Dennys

## **AGRADECIMIENTO**

Quiero agradecer a Dios por bendecirme y cuidarme durante este proceso formativo y el transcurso de este proyecto investigativo. A la Escuela Superior Politécnica del Chimborazo que me ha permitido formarme académicamente vivir gratos momentos y llevar a cabo el deseo de formarme como ingeniero agrónomo. Al Doctor Pablo Álvarez Ph.D le quiero expresar mi más grande respeto y cariño por su calidad como ser humano y docente, reiterar mi agradecimiento ya que con su conocimiento me ha sabido guiar de la mejor manera durante mi trabajo de integración curricular. Al ingeniero Marco Vivar, le quiero agradecer por su apoyo durante el presente proyecto investigativo ya que con su calidad de docente ha sabido guiarme durante el desarrollo de este proyecto. Al Ingeniero Álvaro Rivera le quiero agradecer por permitirme desarrollar el presente trabajo en el laboratorio de fitopatología por sus enseñanzas y conocimiento que me brindo. Al Ingeniero Juan Guerra por enseñarme los principios básicos del laboratorio y guiarme con su conocimiento. A mis compañeros que he encontrado en esta travesía quienes me han sabido motivar y apoyar durante esta travesía.

**Dennys**

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	XII
ÍNDICE DE ANEXOS .....	XIV
RESUMEN.....	XV
SUMARY .....	XVI
INTRODUCCIÓN .....	1

### CAPÍTULO I

1.	PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....	2
1.1.	Formulación del problema .....	2
1.2.	Justificación .....	2
1.3.	Objetivos .....	3
1.3.1.	<i>Objetivo general</i> .....	3
1.3.2.	<i>Objetivos específicos</i> .....	3
1.4.	Hipótesis.....	3
1.4.1.	<i>Hipótesis nula</i> .....	3
1.4.2.	<i>Hipótesis alternativa</i> .....	3
1.5.	Operación de variables .....	3
1.5.1.	<i>Variables dependientes</i> .....	3
1.5.2.	<i>Variables independientes</i> .....	4

### CAPÍTULO II

1.	MARCO TEÓRICO REFERENCIAL .....	5
1.1.	Antecedentes.....	5



1.2.	Los bioinsumos .....	5
1.3.	Elaboración de compostaje.....	6
1.4.	El compostaje.....	8
1.5.	El compost.....	9
1.6.	Factores que influyen en el compost.....	9
1.6.1.	<i>Temperatura</i> .....	10
1.6.2.	<i>Oxígeno</i> .....	11
1.6.3.	<i>Humedad</i> .....	12
1.6.4.	<i>pH</i> .....	12
1.6.5.	<i>Tamaño de la partícula</i> .....	13
1.6.6.	<i>Relación C/N</i> .....	13
1.7.	Fases del compostaje .....	14
1.7.1.	<i>Fase Mesófila</i> .....	14
1.7.2.	<i>Fase Termófila o de Higienización</i> .....	15
1.7.3.	<i>Fase de Enfriamiento o Mesófila II</i> .....	15
1.7.4.	<i>Fase de Maduración</i> .....	15
1.8.	Microorganismos fúngicos.....	15
1.9.	Hongos.....	16
1.9.1.	<i>Características</i> .....	16
1.9.2.	<i>Clasificación general</i> .....	16
1.10.	Métodos de identificación de microorganismos fúngicos .....	17
1.10.1.	<i>Método cultural</i> .....	17
1.10.2.	<i>Métodos morfológicos</i> .....	18
1.10.3.	<i>Métodos Moleculares</i> .....	20

### **CAPÍTULO III**

2.	MARCO METODOLOGICO.....	21
2.1.	Características del lugar .....	21

2.1.1.	<i>Localización del laboratorio</i> .....	21
2.1.2.	<i>Localización en campo</i> .....	22
2.1.3.	<i>Ubicación geográfica de San José de Gaushi</i> .....	22
2.1.4.	<i>Condiciones climáticas</i> .....	22
2.2.	<b>Materiales y equipos</b> .....	22
2.2.1.	<i>Materiales de campo</i> .....	22
2.2.2.	<i>Materiales de escritorio</i> .....	22
2.2.3.	<i>Equipo de campo</i> .....	23
2.2.4.	<i>Materiales de laboratorio</i> .....	23
2.2.5.	<i>Equipos de laboratorio</i> .....	23
2.2.6.	<i>Reactivos e insumos</i> .....	24
2.2.7.	<i>Material biológico</i> .....	25
2.3.	<b>Metodología</b> .....	26
2.3.1.	<i>Recolección de muestras</i> .....	26
2.3.2.	<i>Análisis químico del compost</i> .....	26
2.3.3.	<i>Caracterización cultural</i> .....	30
2.3.4.	<i>Caracterización morfológica</i> .....	30
2.3.5.	<i>Caracterización molecular de los morfotipos aislados mediante la PCR de la región ITS1-ITS4</i> .....	30
2.3.6.	<i>Análisis de datos</i> .....	34

#### **CAPÍTULO IV**

3.	<b>MARCO DE RESULTADO Y DISCUSIÓN</b> .....	35
3.1.	<b>Análisis químico del compost</b> .....	36
3.2.	<b>Caracterización cultural e identificación de los microorganismos fúngicos.</b> .....	37
3.3.	<b>Caracterización molecular</b> .....	56
3.3.1.	<i>Secuenciación de nucleótidos obtenidos de MACROGEN COREA</i> .....	56
3.4.	<b>Análisis de la diversidad fúngica asociada a las diferentes etapas del compost ..</b>	61

3.4.1.	<i>Abundancia relativa a nivel de filo, clase, orden, familia y género con relación a las tres etapas.....</i>	61
3.5.	Abundancia de los morfotipos por etapa .....	68
3.6.	Diversidad de los microorganismos fúngicos asociados a tres etapas diferentes de compost .....	69

## **CAPÍTULO V**

5.	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	78
5.1	<b>Conclusiones.....</b>	78
5.2	<b>Recomendaciones .....</b>	79

## **BIBLIOGRAFÍA**

## **ANEXOS**

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1:</b> Materiales del compostaje. ....	14
<b>Tabla 2-2:</b> Microorganismos encontrados, material biológico .....	25
<b>Tabla 3-2:</b> Pasos para la extracción del ADN genómico .....	31
<b>Tabla 4-2:</b> Primers utilizados para la PCR .....	32
<b>Tabla 5-3:</b> Análisis químico de las muestras de compost. ....	37
<b>Tabla 6-3:</b> Características culturales de las cepas del género <i>Purpureocillium</i> sp. ....	37
<b>Tabla 7-3:</b> Características culturales de las cepas del género <i>Phomopsis</i> sp. ....	39
<b>Tabla 8-3:</b> Características culturales de las cepas del género <i>Scedosporium</i> sp. ....	40
<b>Tabla 9-3:</b> Características culturales de las cepas del género <i>Colletotrichum</i> sp.....	42
<b>Tabla 10-3:</b> Características culturales de las cepas del género <i>Paramyrothecium</i> sp.....	45
<b>Tabla 11-3:</b> Características culturales de las cepas del género <i>Fusarium</i> sp. ....	47
<b>Tabla 12-3:</b> Características culturales de las cepas del género <i>Trichoderma</i> sp.....	49
<b>Tabla 13-3:</b> Características culturales de las cepas del género <i>Penicillium</i> sp. ....	51
<b>Tabla 14-3:</b> Características culturales de las cepas del género <i>Aspergillus</i> sp.....	54
<b>Tabla 15-3:</b> Resultado del análisis BLAST.....	56
<b>Tabla 17-3:</b> Porcentaje de microorganismos fúngicos aislados de tres etapas diferentes de compostaje. ....	61
<b>Tabla 18-3:</b> Índice de Riqueza en las diferentes etapas .....	69
<b>Tabla 19-3:</b> Índice de Shannon respecto a las tres etapas del compost.....	71
<b>Tabla 20-3:</b> Índice de Simpson en las tres etapas del compost .....	72

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<b>Ilustración 1-1:</b> Capas de compostaje con residuos orgánicos. ....	7
<b>Ilustración 2-1:</b> Temperatura, oxígeno y pH en el proceso de compostaje. ....	10
<b>Ilustración 3-1:</b> Características de las colonias .....	18
<b>Ilustración 4-2:</b> Localización del laboratorio de Fitopatología .....	21
<b>Ilustración 5-3:</b> Géneros fúngicos compartidos y exclusivos en las diferentes etapas del proceso de compostaje.....	36
<b>Ilustración 6-3:</b> Características culturales de las cepas del género <i>Purpureocillium</i> sp. crecidos en el medio de cultivo PDA incubados a 25 °C en condiciones de oscuridad, con 10 días de edad. a) Color del anverso de la colonia, b) color del reverso de la colonia. ....	38
<b>Ilustración 7-3:</b> Características culturales de las cepas del género <i>Phomopsis</i> sp. crecidos en el medio de cultivo PDA incubados a 25 °C en condiciones de oscuridad, con 10 días de edad. a) Color del anverso de la colonia, b) color del reverso de la colonia. ....	39
<b>Ilustración 8-3:</b> Características culturales de las cepas del género <i>Scedosporium</i> sp. crecidos en el medio de cultivo PDA incubados a 25°C en condiciones de oscuridad, con 10 días de edad. Morfotipo 7 (a1 a2). Morfotipo 9 (b1 b2). Morfotipo 10 (c1 c2). Morfotipo 28 (d1 d2). Morfotipo 33 (e1 e2). ....	41
<b>Ilustración 9-3:</b> Características culturales de las cepas del género <i>Colletotrichum</i> sp. crecidos en el medio de cultivo PDA incubados a 25°C en condiciones de oscuridad, con 10 días de edad. Morfotipo_3 (a1 a2). Morfotipo_5 (b1 b2). Morfotipo_16 (c1 c2). Morfotipo_32 (d1 d2). Morfotipo_35 (e1 e2). Morfotipo_36 (f1 f2). ....	43
<b>Ilustración 10-3:</b> Características culturales de las cepas del género <i>Paramyrothecium</i> sp. crecidos en el medio de cultivo PDA incubados a 25°C en condiciones de oscuridad, con 10 días de edad. Morfotipo 11 (a1 a2). Morfotipo 15 (b1 b2). Morfotipo_ 1 (c1 c2). Morfotipo26 (d1 d2). Morfotipo 34 (e1 e2). Morfotipo 40 (f1 f2). ....	45
<b>Ilustración 11-3:</b> Características culturales de las cepas del género <i>Fusarium</i> sp. crecidas en el medio de cultivo PDA incubados a 25°C en condiciones de oscuridad, con 10 días de edad. Morfotipo 14 (a1 a2). Morfotipo 22 (b1 b2). Morfotipo 23 (c1 c2). Morfotipo 39 (d1 d2). Morfotipo 44 (e1 e2). Morfotipo 62 (f1 f2)...	47
<b>Ilustración 12-3:</b> Características culturales de las cepas del género <i>Trichoderma</i> sp. crecidos en el medio de cultivo PDA incubados a 25°C en condiciones de oscuridad, con	

10 días de edad. Morfotipo_7 (a1 a2). Morfotipo_9 (b1 b2). Morfotipo_10 (c1 c2). Morfotipo_28 (d1 d2). Morfotipo_33 (e1 e2). Morfotipo_33 (f1 f2).	49
<b>Ilustración 13-3:</b> Características culturales de las cepas del género <i>Penicillium</i> sp. crecidos en el medio de cultivo PDA incubados a 25°C en condiciones de oscuridad, con 10 días de edad. Morfotipo 1 (a1 a2). Morfotipo_13 (b1 b2). Morfotipo 17 (c1 c2). Morfotipo 27 (d1 d2). Morfotipo 30 (e1 e2). Morfotipo 31 (f1 f2). Morfotipo 31 (g1 g2). Morfotipo 31 (h1 h2). .....	52
<b>Ilustración 14-3:</b> Características culturales de las cepas del género <i>Aspergillus</i> sp. crecidos en el medio de cultivo PDA incubados a 25°C en condiciones de oscuridad, con 10 días de edad. Morfotipo_8 (a1 a2). Morfotipo_24 (b1 b2). Morfotipo_25 (c1 c2). Morfotipo_41 (d1 d2). Morfotipo_45 (e1 e2). Morfotipo_55 (f1 f2). Morfotipo_56 (g1 g2). Morfotipo_65 (h1 h2). Morfotipo_66 (i1). Morfotipo_68 (i2).....	55
<b>Ilustración 15-3:</b> Abundancia relativa a nivel de clase de los microorganismos fúngicos de tres etapas diferentes de compostaje. ....	62
<b>Ilustración 16-3:</b> Abundancia relativa a nivel de orden de los microorganismos fúngicos de tres etapas diferentes de compostaje. ....	63
<b>Ilustración 17-3:</b> Abundancia relativa a nivel de familia de los microorganismos fúngicos de tres etapas diferentes de compostaje. ....	65
<b>Ilustración 18-3:</b> Abundancia relativa a nivel de género de los microorganismos fúngicos de tres etapas diferentes de compostaje .....	67
<b>Ilustración 19-3:</b> Abundancia de los microorganismos fúngicos en las tres etapas de compostaje.....	68
<b>Ilustración 20-3:</b> Índices de riqueza en las tres etapas de compost .....	70
<b>Ilustración 21-3:</b> Índice de Shannon en las tres etapas del compost .....	71
<b>Ilustración 22-3:</b> índice de Simpson en las tres etapas de compost.....	72

## **ÍNDICE DE ANEXOS**

**ANEXO A:** PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO

**ANEXO B:** RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE COMPOST

**ANEXO C:** ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO DE LAS MUESTRAS DE COMPOST

**ANEXO D:** PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO Y DISPENSADO

**ANEXO E:** EXTRACCIÓN DE ADN Y FORMACIÓN DE PELLET

**ANEXO F:** PCR Y ELECTROFORESIS

**ANEXO G:** ANÁLISIS QUÍMICO DE LAS MUESTRAS DE COMPOST

## RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo determinar la biodiversidad fúngica asociada a tres etapas diferentes de compost. Se recolectaron muestras de compost separándolas por etapas las cuales fueron dictaminadas según el número de volteos tomando un total de tres etapas. Se prepararon las muestras de compost de las cuales se aislaron los microorganismos fúngicos tanto de soluciones madres como diluciones  $10^{-1}$ , que fueron diseminados en cajas petri con medio PDA, se registro el numero de colonias presentes y se agruparon por morfotipos. En cuanto a la caracterización cultural se registró el borde, forma, superficie, color anverso y color reverso de la colonia, también se realizó la caracterización molecular la cual amplifico la cadena de ADN con los iniciadores ITS5 e ITS4 los productos de PCR obtenidos fueron secuenciados en la empresa MACROGEN COREA. Con los resultados obtenidos de la caracterización cultural se identificó el género de los microorganismos, respaldando la identificación de las cepas de hongos con la caracterización molecular. Se evaluó la diversidad fúngica, mediante la abundancia relativa empelando el programa r-studio, la riqueza de especies y los índices de diversidad de Shannon y Simpson. La caracterización nos permitió identificar los microorganismos presentes logrando identificar nueve géneros de los cuales la mayor presencia de estos se encontró en la tercera etapa en cuanto a la diversidad fúngica respecta la que mayor índice de riqueza presenta fue la segunda etapa en cuanto a los índices de diversidad de Shannon y Simpson la segunda etapa fue la que presento los valores más altos dándonos a entender que existe mayor biodiversidad en las etapas de compostaje. Los géneros identificados en el presente estudio fueron: *Aspergillus* sp., *Bipolaris* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Paramyothecium* sp., *Penicillium* sp., *Purpureocillium* sp., *Scedosporium* sp., *Trichoderma* sp., *Trichophyton* sp., y *Phomopsis* sp.

**Palabras clave:** <CARACTERIZACIÓN>, <COMPOST>, <MICROORGANISMOS FÚNGICOS>, <DIVERSIDAD>, <GAUSHI>, <BIOINSUMOS>, <COMPOSTAJE>.

1305-UPT-DBRA-2023



## SUMMARY / ABSTRACT

The aim of this research was to determine the fungal biodiversity associated with three different compost stages. Samples of compost were collected and separated by stages, which were determined according to the number of turnings, for a total of three stages. Compost samples were prepared from which fungal microorganisms were isolated from both stock solutions and  $10^{-1}$  dilutions, which were disseminated in petri dishes with PDA medium, the number of colonies present was recorded and grouped by morphotypes. As for the cultural characterization, the edge, shape, surface, front color and back color of the colony were recorded, as well as the molecular characterization, which amplified the DNA chain with the primers ITS5 and ITS4, the PCR products obtained were sequenced in the company MACROGEN COREA. With the obtained results from the cultural characterization, the genus of the microorganisms was identified, supporting the identification of the fungal strains with the molecular characterization. Fungal diversity was evaluated by means of relative abundance using the r-study program, species richness and Shannon and Simpson's diversity indexes. The characterization allowed us to identify the microorganisms present, identifying nine genera of which the greatest presence was found in the third stage in terms of fungal diversity with respect to the highest index of richness in the second stage with respect to the Shannon and Simpson diversity indexes, the second stage was the one with the highest values, giving us to understand that there is greater biodiversity in the composting stages. The genres identified in this study were: *Aspergillus sp.*, *Bipolaris sp.*, *Colletotrichum sp.*, *Fusarium sp.*, *Paramyothecium sp.*, *Penicillium sp.*, *Purpureocillium sp.*, *Scedosporium sp.*, *Trichoderma sp.*, *Trichophyton sp.*, and *Phomopsis sp.*

Key words: <CHARACTERIZATION>, <COMPOST>, <FUNGIC MICROORGANISMS>, <DIVERSITY>, <GAUSHI>, <BIOINSUMES>, <COMPOSTAGE>.

1305-UPT-DBRA-2023

Lcda. Elsa Basantes A. Mgs.

C.I: 0603594409

## INTRODUCCIÓN

El Ecuador es un país que se caracteriza por tener una tradición muy amplia en cuanto a la agricultura se refiere, ya que representa un logro importante desarrollado por el hombre. Se estima que el 90 % de las calorías y el 80 % de las proteínas de la dieta humana es de origen vegetal. Además, los alimentos de origen animal también dependen y se derivan de los vegetales (Mamani de Marchese, A & Filippone, M.P., 2018).

La agricultura busca mantener un esquema sostenible en cuanto al uso y beneficio de los recursos naturales, los cuales se han ido degradando a través de los años, por lo cual se han buscado nuevas alternativas que permitan optimizar la productividad, mejorar la salud de las plantas y mantener las características biológicas del suelo. Entre los cuales podemos mencionar el uso de bioinsumos (biofertilizantes, bioestimuladores y bioplaguicidas), ya que es una alternativa viable que permite mejorar la calidad de los cultivos, mantener estándares de control y dotar al suelo de los nutrientes necesarios para una adecuada producción (Mamani de Marchese, A & Filippone, M.P., 2018).

Al hablar de bioinsumos se debe mencionar el compost, que va ligado directamente con la historia de la agricultura puesto que con la mecanización de un sistema de producción vegetal las personas tuvieron la oportunidad de establecerse en lugares fijos, con lo cual desencadenó el uso de recursos naturales los cuales se convirtieron en desecho, los mismos que debían tener un adecuado tratamiento, es así que surge como una idea innovadora el desarrollo de composteras las cuales les darían un valor agregado a los desechos logrando retribuir al suelo parte de los nutrientes sustraídos (ESTRADA, 2019).

Los hongos son importantes organismos y junto con las bacterias intervienen en procesos de disgregación capaces de descomponer la materia orgánica, por lo que su ecología resulta ser de una gran importancia para un hábitat natural y su población biológica (Ortiz Paucay, 2016)

Ecuador es un país megadiverso en términos biológicos. Se encuentra entre las 17 naciones que albergan más del 70% de las especies terrestres y dulceacuícolas conocidas del mundo, a pesar de que abarca menos del 0,2% de la superficie del planeta, es así que el Ecuador es un país con más de 100 mil especies de hongos, de las cuales se han descrito tan solo 5 mil, de las 1,5 millones de especies estimadas en la naturaleza; sin embargo, se carece de un registro de la cantidad de hongos que se encuentran en el territorio nacional, gran parte de los hongos intervienen en los procesos de descomposición de materias orgánicas (Vela Núñez, 2018).

# CAPÍTULO I

## 1. Problema de investigación

### 1.1. Formulación del problema

Actualmente se desconoce la diversidad fúngica existente en bioinsumos específicamente en muestras de compost en la comunidad de Gaushi, el compost posee una gran diversidad de microorganismos, entre los cuales se encuentra las asociaciones fúngicas, la comunidad de hongos puede variar como respuesta a diversos factores es por eso importante realizar un análisis más detallado que permita entender y analizar la relación de los microorganismos fúngicos y su interacción en los procesos de descomposición de materia orgánica, productos de los cuales se obtiene compost.

### 1.2. Justificación

Los hongos tienen mucha importancia en lo que respecta a conservar el equilibrio de la naturaleza, puesto que descomponen o reciclan casi todos los residuos orgánicos y permiten así llevar a cabo el ciclo de la materia y energía, intervienen en la producción de compost, que es un aspecto muy importante en la fertilidad de los suelos, vigorosidad de las plantas y conservación de suelos (Ortiz Paucay, 2016).

Es por ende importante llevar a cabo una caracterización de los microorganismos fúngicos presente en las muestras de compost, la variación en cuanto a diversidad que presentan en las diferentes etapas y su influencia en los procesos de descomposición de la materia orgánica, con estos aspectos se podría determinar el grado de influencia que tienen estos microorganismos y la biodiversidad presente en los procesos de compostaje para posteriormente mejorar dichos procesos y obtener un producto de mayor calidad.

### **1.3. Objetivos**

#### ***1.3.1. Objetivo general***

Determinar la biodiversidad fúngica de microorganismos asociados al compost, de muestras recolectadas en tres etapas diferentes, en la comunidad Gaushi.

#### ***1.3.2. Objetivos específicos***

- Identificar los microorganismos fúngicos asociados al compost.
- Caracterizar la biodiversidad fúngica presente en las muestras de compost.
- Comparar la diversidad fúngica presente en las muestras recolectadas en tres etapas diferentes del compost.

### **1.4. Hipótesis**

#### ***1.4.1. Hipótesis nula***

H<sub>0</sub>: La biodiversidad fúngica de microorganismos asociados al compost no presenta diferencias entre las tres etapas, de muestras recolectadas en la comunidad Gaushi.

#### ***1.4.2. Hipótesis alternativa***

H<sub>a</sub>: La biodiversidad fúngica de microorganismos asociados al compost, si presenta diferencias en al menos una de las etapas, de muestras recolectadas en la comunidad Gaushi.

### **1.5. Operación de variables**

#### ***1.5.1. Variables dependientes***

- Biodiversidad de microorganismos fúngica presente en el compost.

### ***1.5.2. Variables independientes***

- Periodos de recolección de muestras de compost.
- Métodos de elaboración de compost.

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

#### 2.1. Antecedentes

La historia de la humanidad está ligada a la agricultura, una parte de la agricultura es el desarrollo de técnicas que permitan mejorar la producción y conservación de los suelos, entre estas técnicas podemos mencionar el compostaje que permite aportar nutrientes al suelo, puede considerarse como un antiguo arte o una ciencia moderna, la historia menciona que estos sistemas de tratamiento de residuos buscan aprovechar la energía y nutrientes contenidos en los residuos animales y vegetales (Bohórquez Santana, 2019).

Es complejo atribuir a una persona o sociedad, inclusive determinar en qué época concreta se dan los inicios del compostaje, se podría decir que surgieron con la agricultura, parte trascendental de estos procesos se lleva a cabo cuando la sociedad deja de ser nómada y adopta un estilo de vida sedentario el cual trajo consigo la acumulación de residuos, a partir de este momento la gestión de estos residuos se convirtió en un aspecto a tomar en cuenta en la sociedad, en un principio se gestionó que los residuos sean enterrados, quemados, utilizados para alimento, o bien transformándolos a través de un precario proceso de compostaje (Bohórquez Santana, 2019).

Este proceso de degradación de la materia orgánica o compostaje se realizaba sin control, requería largos periodos de tiempo y los procesos de compostaje no siempre aseguraban la conservación de los nutrientes, ni la esterilización del producto. Se necesitaba recuperar, reciclar parte de los residuos para el mantenimiento y la fertilización de los suelos cultivados con continuidad. aprovechando la materia orgánica y los nutrientes que contenían. Seguramente el uso de los residuos orgánicos para mantener la fertilidad de los suelos un adecuado control de los desechos fue un factor importante en las labores agrícolas de las antiguas civilizaciones (Bohórquez Santana, 2019).

#### 2.2. Los bioinsumos

Los bioinsumos como se conocen en la actualidad surgen a partir de los “biopreparados” que se desarrollaron a través de la historia a partir de la observación directa de los procesos y efectos que tenían dichos productos. En los últimos años estos procesos producto de la observación directa

que realizaron principalmente los agricultores comenzaron a llamar la atención de los investigadores, empresas e instituciones gubernamentales (Mamani de Marchese, A & Filippone, M.P., 2018).

### **2.3. Elaboración de compostaje**

La agricultura es una actividad que genera residuos, los cuales tienen que ser procesados de una manera adecuada por lo cual se ha planteado una serie de métodos que permitirán retribuir al suelo los recursos sustraídos por las actividades agrícolas. Según la FAO (2012), los campesinos aseguran la fertilidad de sus campos al incorporar al suelo materiales orgánicos descompuestos de los residuos animales y vegetales de sus granjas.

La elaboración de compostaje es una actividad importante para mejorar las condiciones del suelo siempre que se cumpla con los protocolos adecuados de elaboración, control y ensacado, consta de tres fases que son:

- Formación de pila de compostaje.
- Control básico.
- Cernido y almacenado.

Formación de pila de compostaje.

Para la implementación de la pila de compostaje se debe elegir un lugar que tenga luz solar, debe tener un suministro de agua, es importante tener un suelo con buen drenaje o con leve pendiente, para que escurra el exceso de agua (SAG, 2018).

Se mide en un sector de terreno de unos 2 m<sup>2</sup> y se pican con azadón. La pila puede tener máximo 2 m de ancho y el largo que se quiera, dependiendo de la cantidad de material disponible. En un apila de 2 x 2 m en el centro se coloca una estaca de unos 2 m de largo, si es más larga, se coloca cada 2 m (SAG, 2018).

## Proporción de materiales

- Una (pala, kilo, saco, valde) de gallinaza.
- Tres (pala, kilo, saco, valde) de residuos de ganado.
- Dos (pala, kilo, saco, valde) de cascarilla de arroz.

Las capas deben apilarse por los materiales

- Capa 1: Cascarilla de arroz.
- Capa 2: Residuos (ganado, cuy, otros), humedecer con caldo de melaza – microorganismos.
- Capa 3: Gallinaza y residuos cosecha (si hay).
- Capa 4: Cascarilla de arroz.
- Capa 5: Residuos (ganado, cuy, otros), humedecer con caldo de melaza – microorganismos.
- Capa 6: Gallinaza.
- Capa 7: Cascarilla.



**Ilustración 1-1:** Capas de compostaje con residuos orgánicos.

Fuente: Maquita 2019.

Realizado por: Amancha. D, 2023



## **Control básico**

Se debe tener un adecuado control, y se lo realizara durante el proceso de descomposición alrededor de 3 o 4 meses una vez instalada la compostera, para lo cual se evalúa los siguientes aspectos:

**Control de humedad:** Se debe realizar tomas de humedad al menos dos o tres veces por semana en 10 puntos distintos mínimo a lo largo y ancho de la pila, una manera práctica de llevar a cabo este control es la prueba del puño, la cual consiste en agarrar una porción de la pila de compost y evaluar si caen gotas o no, si caen gotas se debe virar y tapar la pila de compost (humedad adecuada 60 -70 %), si resulta estar muy seco se debe regar (SAG, 2018).

**Volteo:** Se debe voltear la pila de compost cada 3 meses o cuando la pila se esté enfriando o calentado puesto que no deben superar los 70 °C.

**Cuidados adicionales:** Cubrir la pila cuando haya temporadas de excesiva lluvia o de exceso de sol.

## **Cernido y almacenaje**

Cuando el periodo de maduración termina, se cierne en una zaranda con malla de 1 cm. La parte gruesa se puede utilizar en el siguiente proceso de compostaje y la fina queda lista para ser utilizada.

## **2.4. El compostaje**

El compostaje es un proceso de transformación mediante el cual la materia orgánica se descompone y se produce de manera aeróbica en ambientes controlados y mediante el cual muchos grupos de microorganismos influyen sobre las materias primas para la producción de compost, un producto equilibrado con buenas cualidades que actúa como fertilizante y

bioestimulante. La presencia de colonias fúngicas y bacterianas diversas son un requisito fundamental para que ocurra el proceso de compostaje de forma satisfactoria (De Compostaje R.E, 2014).

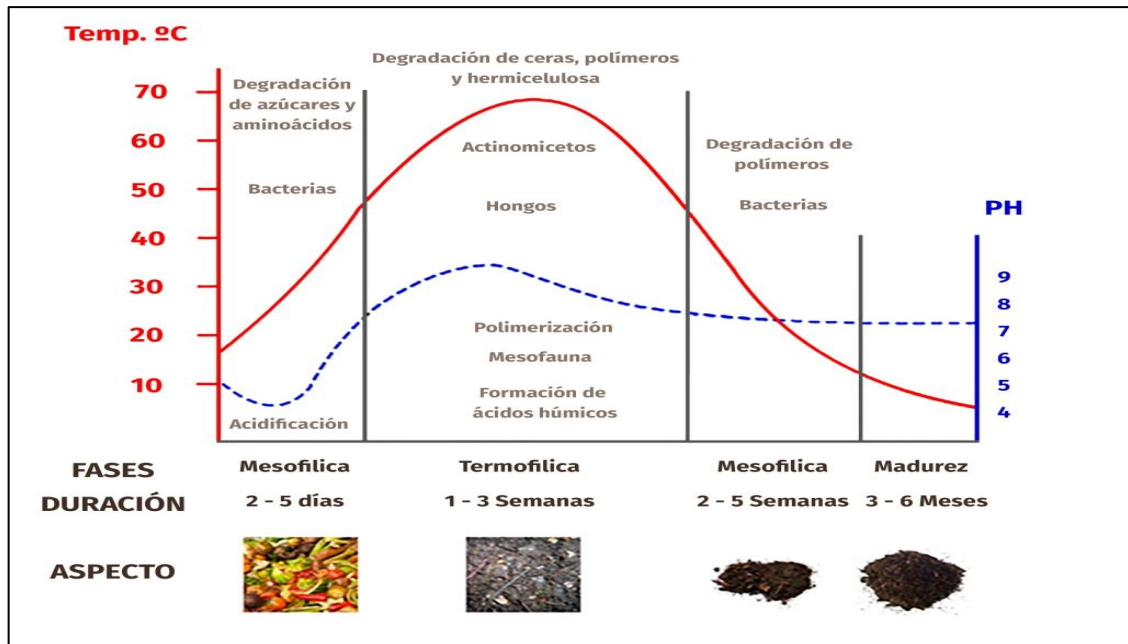
Durante este proceso en el cual la materia prima se descompone se han generado una gran variedad de microorganismos aerobios mesófilos, y termófilos que incluyen bacterias, actinomicetos, mohos y levaduras. Mediante los controles adecuados se ha logrado descubrir la presencia de arqueas, las cuales se desenvuelven típicamente en ambientes extremos y se encuentran principalmente representadas por especies productoras de metano. Por tanto, el conocimiento de la compostera, desde un punto de vista microbiológico, es importante para entender aquellos mecanismos implicados en la capacidad supresora de enfermedades, la cual puede observarse en la gran mayoría de compost obtenidos bajo un estricto control de calidad (De Compostaje R.E, 2014).

## **2.5. El compost**

Al referirnos al termino compost podemos decir que se trata de un bioinsumos natural resultante de un proceso de descomposición en el cual intervienen varios factores (temperatura, oxígeno, humedad, pH, tamaño de la partícula, relación C/N), otros aspectos que intervienen son bacterias, hongos y gusanos sobre los residuos orgánicos, y el compost es usado comúnmente para mejorar la fertilidad de la tierra, condiciones del suelo y como nutrientes para las plantas (Bohórquez Santana, 2019).

## **2.6. Factores que influyen en el compost**

Durante la elaboración del compost existen múltiples factores que influyen en los procesos de biotransformación como temperatura, oxígeno, humedad, pH, tamaño de la partícula y relación C/N (carbono/nitrógeno), son aspectos importantes ya que influyen y determinan la velocidad de las reacciones de oxidación y las características físicas y químicas del compost (Bohórquez Santana, 2019).



**Ilustración 2-1:** Temperatura, oxígeno y pH en el proceso de compostaje.

Fuente: FAO, 2014.

### 2.6.1. Temperatura

La temperatura es un factor importante que regula las reacciones bioquímicas que se generan en los organismos. A medida que se incrementa la temperatura, los procesos metabólicos se aceleran y la velocidad de la descomposición de la materia orgánica es influenciada de manera directa llegando a un punto crítico, ocasionando que el proceso disminuye, esto se debe particularmente debido a la desnaturalización de las proteínas que generan un bloque en el metabolismo normal de los microorganismos que participan en los procesos de descomposición (Bohórquez Santana, 2019).

Durante el proceso de compostaje, las colonias microbianas siguen una secuencia predecible, en las cuales podemos encontrar colonias de microorganismos mesófilos y termófilos, se normaliza la temperatura y se representan distintos géneros de hongos y bacterias. El proceso de compostaje presenta tres etapas que se relacionan de manera directa con la temperatura: una fase mesófila o de enfriamiento (temperaturas menores a 45 °C), una fase termófila (temperaturas mayores a 45 °C), y una fase mesófila o de enfriamiento, cuando la temperatura alcanza valores cercanos a la ambiental. En estas fases se presenta una característica en especial ya que presentan microorganismos peculiares (Bohórquez Santana 2020).

En las distintas temperaturas durante el compostaje es fundamental recalcar que se debe estar dentro del rango que sería 20 y 70 °C, ya que si excede el límite máximo de temperatura existe una alta probabilidad de que se pierdan los microorganismos existentes en la materia orgánica, por el contrario, si las temperaturas descienden de manera considerable debajo del límite mínimo las reacciones de transformación se retrasan considerablemente. La temperatura óptima del proceso se encuentra entre 45 y 60 °, sin embargo, cada microorganismo (hongo o bacteria) presenta una temperatura óptima en la que el desarrollo de sus células se ven influenciados de manera óptima y por ende incrementa la velocidad de las reacciones de oxidación de la materia orgánica, si la temperatura se encuentra dentro del rango óptimo permite una buena tasa de degradación de los residuos orgánicos (Bohórquez Santana, 2019).

### **2.6.2. Oxígeno**

Para el correcto desarrollo del compostaje es necesario la presencia de oxígeno, ya que los microorganismos que intervienen son aeróbicos, por tal razón es necesario la incorporación de oxígeno mediante los volteos manuales o mecánicos, o a través de la aplicación de aire forzado dentro de las pilas. Al disminuir la disponibilidad de oxígeno, se ve afectado el crecimiento de los microorganismos aeróbicos, la velocidad de la descomposición de los materiales se ve mermada y se ve un incremento de malos olores debido a que en esta condición proliferan microorganismos anaerobios, estos por medio de su metabolismo, generan compuestos orgánicos volátiles y amoniacales (Bohórquez Santana, 2019).

Es así como los microorganismos aeróbicos al realizar la degradación de los residuos orgánicos generan calor y consumen el oxígeno existente en la compostera, lo que ocasiona disminución de oxígeno por consecuencia un incremento en la temperatura, entonces, se requiere incorporar oxígeno para permitir que las condiciones aerobias continúen durante el proceso de biotransformación (Bohórquez Santana, 2019).

La manera que es más utilizada y que permite dar oxígeno al compost de mejor manera es el volteo que puede ser manual o mediante maquinaria. Según Santana (2019), el volteo manual es eficiente cuando se elabora compost de aproximadamente una tonelada, para cantidades mayores se debe utilizar maquinaria. La baja disponibilidad de oxígeno puede causar que el nivel de humedad incremente lo que afectaría los poros conformados por las partículas de residuos (Casco, 2008).

### **2.6.3. Humedad**

Los elementos o sustancias químicas del interior de las células microbianas y los residuos utilizados en el proceso de compostaje (material vegetales y animales) están conformados en gran parte por agua, la cantidad de humedad es importante al inicio del proceso de compostaje y debe estar aproximadamente rondando el 50%. Esto se debe llevar a cabo con la finalidad de aumentar las poblaciones microbianas que se encuentran generalmente en la materia prima que se utiliza, mediante reacciones enzimáticas se puede obtener moléculas orgánicas más estables. Al contrario, si el aumento de humedad supera el 60% crea condiciones de anaerobiosis que retrasa la transformación de los desechos orgánicos y aumenta la generación de olores desagradables, además de producir lixiviados que disminuyen los minerales del compost (Bohórquez Santana, 2019).

Una humedad adecuada es importante para el desarrollo microbiano ya que la actividad microbiana decrece mucho cuando la humedad está por debajo del 30 % y sobre el 70 % el agua desplaza el aire en los espacios libres existentes en la partícula reduciendo la fluctuación de oxígeno (Casco, 2008).

### **2.6.4. pH**

El pH constituye un factor importante que influye en las reacciones de biotransformación de los microorganismos, puesto que cada microorganismo tiene un pH óptimo en el que su crecimiento se ve favorecido. El pH óptimo para el crecimiento de muchos microorganismos es una medida propia del pH extracelular. El pH intracelular debe contemplar un valor neutral para prevenir la destrucción de las biomoléculas de la célula (Bohórquez Santana 2020).

Según Casco (2008) en la primera fase el pH disminuye por los ácidos orgánicos, producto de la acción de los microorganismos sobre la materia orgánica más fácilmente oxidable. De la misma manera, el compost inmaduro presenta un pH bajo antes de presentarse la etapa termófila ocasionado por la intensa producción de ácidos orgánicos. En la segunda fase el pH incrementa debida a la utilización por parte de los microorganismos de los ácidos orgánicos producidos en la primera etapa y por la generación de amoníaco producido por la hidrólisis de las proteínas.

Al final, el pH se equilibra en valores cercanos a la neutralidad por la generación de compuestos húmicos, los cuales se comportan como buffer o tampón, condiciones anaeróbicas dentro de la compostera estimulan aún más la disminución del pH. Por tanto, el mantenimiento de una

aireación adecuada permite regular, de una manera indirecta, el pH y que un valor de pH por encima de 7,5 es un indicador de una adecuada descomposición de los residuos orgánicos.

#### **2.6.5. *Tamaño de la partícula***

El tamaño de las partículas es un aspecto para considerar ya que con un menor tamaño de los restos vegetales y animales genera una mayor relación superficie/volumen, es decir, incrementa la actividad microbiana. Sin embargo, la disminución en el tamaño de la partícula puede generar una menor porosidad en la matriz del compost, lo que conlleva a limitaciones en la disponibilidad del oxígeno, disminuyendo la velocidad de la oxidación de los desechos orgánicos. Por lo cual se recomienda un tamaño de partícula que oscile entre 1 y 5 cm. utilizando máquinas picadoras o herramientas manuales, entre las que podríamos utilizar machetes, lampa o azada (Bohórquez Santana, 2019).

#### **2.6.6. *Relación C/N***

Para desarrollar un correcto compostaje que permita aprovechar y retener la mayor parte de C y N, la relación de C/N de desechos orgánicos debe ser estable, ya que la relación de estos influye en la degradación de los residuos generando un compost eficiente. Una relación apropiada al inicio del proceso debe ser de 25 (25 carbono y 1 de nitrógeno) hasta 35 (35 carbono y 1 de nitrógeno) (Bohórquez Santana, 2019).

Si la relación C/N aumenta a valores por encima de los permitidos, la actividad microbiana se ve limitada por deficiencia de nitrógeno fundamental para la biosíntesis de aminoácidos, que son constituyentes básicos de las proteínas. Cuando los materiales del compostaje presentan relaciones C/N bajas (menores de veinte), el proceso se desarrolla con mayor rapidez, ocasionando que se libere nitrógeno al ambiente en forma de amoníaco, disminuyendo la concentración del elemento en el compost, ocasionando problemas ambientales, como la liberación a la atmósfera de gases efecto invernadero (De Compostaje R.E, 2014)

Se debe considerar los diferentes materiales que pueden ser utilizados para la elaboración de compost, la mayoría difieren entre sí en la relación C/N, en la práctica se recomienda realizar una mezcla del 60% de residuos animales (estiércol) con un 40% de residuos vegetales con un proceso de lignificación (Bohórquez Santana, 2019).

**Tabla 1–1:** Materiales del compostaje.

<b>Producto</b>	<b>Relación C/N</b>
Cascarilla de arroz	66
Aserrín	638
Seudotallo de plátano	58
Bagazo de caña de azúcar	104
Restos de hortalizas	37
Estiércol porcino	10
Estiércol bovino	25
Gallinaza camada	18
Gallinaza pura	7

Fuente: INFAT, 2002.

## **2.7. Fases del compostaje**

Cuando inicia el proceso del compostaje y se descomponen el C, el N y todos los desechos orgánicos, los microorganismos generan calor que se evalúan a través de las variaciones de temperatura a lo largo del tiempo. En base a la temperatura generada durante el proceso de compostaje, se reconocen tres etapas principales en un compostaje, además de una etapa de maduración de duración variable (Román, 2014). Las diferentes fases del compostaje se dividen según la temperatura, en:

### **2.7.1. Fase Mesófila**

En esta fase el proceso de compostaje empieza a temperatura ambiente y en pocos días (e incluso en horas), la temperatura a medida que transcurre el proceso de compostaje aumenta hasta los 45°C. La actividad microbiana genera este incremento de temperatura, ya que en esta fase los microorganismos consumen las fuentes de C y N generando calor. La desintegración de compuestos solubles, como azúcares, produce ácidos orgánicos y, por tanto, el pH puede bajar (hasta cerca de 4,0 o 4,5). Es una fase que dura un corto tiempo (entre dos y ocho días) (FAO, 2014).

### **2.7.2. Fase Termófila o de Higienización**

Cuando la compostera alcanza temperaturas mayores a los 45°C, los microorganismos que se desarrollan a temperaturas medias (microorganismos mesófilos) son reemplazados por aquellos que se desarrollan a una mayor temperatura, la gran mayoría son bacterias (bacterias termófilas), que actúan facilitando la degradación de fuentes complejas de C, entre las cuales podemos mencionar la celulosa y la lignina (FAO 2018).

### **2.7.3. Fase de Enfriamiento o Mesófila II**

Una vez que se agotan las fuentes de carbono sobre todo el nitrógeno en el material en compostaje, la temperatura desciende hasta los 35-45°C. Durante esta fase, todavía existe la degradación de polímeros como la celulosa, y aparecen organismos fúngicos visibles a simple vista. Al bajar de 45 °C, los organismos mesófilos empiezan nuevamente su actividad y el pH del medio desciende, aunque en general el pH se mantiene de cierta manera alcalino. Esta fase de enfriamiento requiere de algunas semanas y puede confundirse con la fase de maduración (Román, 2014).

### **2.7.4. Fase de Maduración**

Es una etapa que demora algunos meses generalmente a temperatura ambiente, en este lapso se producen reacciones secundarias de condensación y polimerización de compuestos carbonados que permite la formación de ácidos húmicos y fúlvicos (Román, 2014).

## **2.8. Microorganismos fúngicos**

El suelo refleja una gran variedad de organismos vivos, algunos no son perceptibles a simple vista como los microorganismos (bacterias, hongos, protozoarios y nematodos) como mesofauna (ácaros, colémbolos) y la más reconocida macrofauna (lombrices y termitas). El suelo está compuesto por el conjunto de fauna y la flora, la gran mayoría de los organismos vive en las capas superficiales, donde las condiciones de humedad, temperatura, ventilación y luminosidad permiten su adecuado desarrollo (Ortiz Paucay, 2016).



## 2.9. Hongos

Los hongos son organismos eucariontes que conforman un complejo e interesante grupo de organismos, se estima alrededor de 200.000 especies, pueden desarrollarse en una gran variedad de ecosistemas, y aproximadamente alrededor de 400 son patógenos para mamíferos, aunque son patógenos igualmente de vegetales (Ortiz Paucay, 2016).

El reino *Fungi* representa un grupo importante de que se caracteriza por su biodiversidad, desempeñan actividades ecológicas importantes en todos los ecosistemas y con una notable diferencia en cuanto a morfología y ciclos de vida se refiere. Es difícil dar un diagnóstico diferencial conciso debido a que los organismos de este reino son muy diversos, en su mayoría, filamentosos con crecimiento apical, eucarióticos, aclorófilos, heterótrofos por absorción, con reproducción asexual y sexual mediante esporas, con pared celular constituida en su mayoría por quitina o celulosa (Herrera, 2016).

### 2.9.1. Características

Están formados por células en cuyo interior tenemos un citoplasma organizado dispuesto entre una membrana externa citoplasmática y otra interna nuclear en la cual se encuentra el núcleo y que es en donde se ubica el material genético. Los hongos son heterótrofos, se alimentan por absorción, almacenan glucosa formando glucógeno y presentan quitina en sus paredes celulares. Las esporas o unidades reproductoras de los hongos pueden ser unicelulares o pluricelulares, móviles (zoosporas), también inmóviles existen de tipo sexuales o asexuales, no presentan distinción entre 14 masculinas y femeninas, ya que son sus núcleos los encargados de dar una polaridad positiva o negativa (Ortiz Paucay, 2016).

### 2.9.2. Clasificación general

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

## **2.10. Métodos de identificación de microorganismos fúngicos**

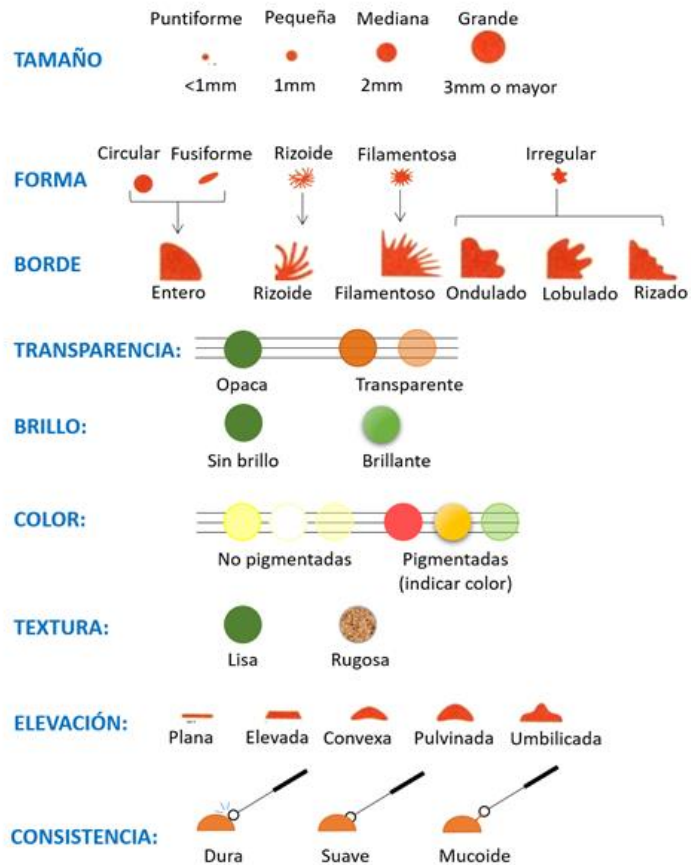
La identificación de los hongos se fundamenta en el examen macroscópico de la colonia y en sus características microscópicas. Similitudes macroscópicas entre las que podemos mencionar están la forma de la colonia, el color de la superficie, la textura y la producción de pigmentos son muy útiles para la identificación (Martí Solé, y otros, 2000). Según Alfenas, A.C; & Mafia, R.G (2016), los microorganismos pueden ser aislados de dos formas que son: aislamiento directo, se hace cuando la muestra ya presenta estructuras de las cuales es posible tomar una porción para posteriormente colocarla en una caja petri con medio de cultivo, la segunda forma es mediante el aislamiento indirecto.

Una vez aislados los microorganismos fúngicos se caracteriza para que posteriormente puedan ser identificados mediante los siguientes métodos cultural, morfológico y molecular.

### ***2.10.1. Método cultural***

En lo que respecta al método cultural se parte de la observación y la similitud que los organismos presenten con otros organismos previamente ya estudiados. Según Lescano (2015), los aspectos culturales se pueden apreciar a simple vista entre los cuales se encuentran el color de la colonia de microorganismos fúngicos en el anverso como en el reverso de la colonia, textura, forma, relieve, el crecimiento y la pigmentación del sustrato también se pueden describir los siguientes aspectos:

- Forma de la colonia: la colonia puede ser aterciopelada, pulverulenta, algodonosa, rugosa, plegada, cerebriforme, granulosa.
- Consistencia: entre las cuales podemos mencionar dura, membranosa, blanda, suave, etc.
- Relieve: plana o elevada.
- Pigmentación: esta puede ser variable dependiendo del tipo de micelio y de la presencia de estructuras reproductivas. Además, el reverso de la colonia puede presentar un pigmento expansivo.
- Tipo de micelio: vegetativo, reproductivo.



**Ilustración 3-1:** Características de las colonias.

Fuente: Guillen, 2020.

## 2.10.2. Métodos morfológicos

### 2.10.2.1. Microscopía de luz

La microscopía de luz permite obtener una imagen aumentada de los objetos o detalles muy pequeños en micología se utiliza para determinar los caracteres microscópicos de las setas y hongos logrando visualizar todos los caracteres importantes mediante el empleo del microscopio óptico efectuando visualizaciones con magnitudes diferentes (20x, 40x, 60x, 100x) se empieza con la magnitud de menor tamaño y gradualmente se va subiendo para enfocar el objeto, esta forma es la más fácil para localizar y enfocar el objeto situado en el portaobjetos, donde se determina la forma de las hifas, el tamaño de las esporas, forma y tamaño de las colonias de hongos (Osorio, y otros, 2019).

### 2.10.2.2. *Caracterización microscópica*

Según Estrada, G.; & Ramírez, C, (2019), dictaminan que las características morfológicas (macroscópicas) de hongos se observan mediante el microscopio, para posteriormente determinar aspectos de los organismos que crecen en los diferentes medios de cultivo (Papa Dextrosa Agar, Agar-Nutriente, Corn Meal Agar, etc.) y se determinan las características del cultivo: forma, elevación, margen, producción de pigmentos, textura, etc., También se describirán las características de las hifas: presencia o ausencia de tabiques, grosor, hifas en raqueta, hifas en espiral, además, manifiestan que las placas se realizan de dos formas que son:

#### 1) Placa realizada con estilete:

En condiciones estériles se coloca sobre una placa porta-objeto una gota de lactoglicerol, se realiza un pequeño corte tomando una porción del hongo en crecimiento de la caja de Petri, y se procede a dispersarla levemente con la ayuda de otro estilete; se cubre con un cubre-objetos y se determinan las características morfológicas con el microscopio, se visualiza con el lente de menor aumento y se va incrementando la capacidad de visualización gradualmente (Freire Haro, 2022).

#### 2) Placa realizada con cinta adhesiva:

En condiciones estériles se toma una porción de cinta adhesiva transparente con los dedos pulgar y anular (la parte pegante de la cinta dirigida hacia el cultivo del hongo, de donde se toma la muestra), se acerca la cinta al cultivo por la parte pegante y suavemente con el dedo índice se hace una pequeña presión sobre el cultivo, se retira y con la ayuda de la otra mano se extiende la cinta, se coloca sobre la placa que contiene una gota de lactoglicerol, se deja reposar por un minuto (mientras se tiñen las estructuras) y después se observa al microscopio, se visualiza con el lente de menor aumento y se va incrementando la capacidad de visualización gradualmente (Freire Haro, 2022).

### 2.10.2.3. *Caracterización microscópica por microcultivos*

Según Cando y otros, (2017), establecen que por cada hongo aislado se hace un microcultivo para registrar las características microscópicas, mediante la siguiente metodología:

Una vez que se obtuvieron los hongos se procedió a la realización de microtúbulos que se desarrollaron en medio PDA. Se colocaron tres gotas de medio PDA en una placa porta-objetos, para luego diseminar la colonia seleccionada y cubrirla con una lámina cubreobjetos. Este cultivo se coloca en una caja Petri, sobre papel humedecido, previamente tratado con luz UV. Se incubó a 25°C alrededor de ocho días, con revisión periódica de las estructuras que se desarrollen.

### **2.10.3. Métodos Moleculares**

#### **2.10.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa: PCR**

El polimorfismo natural de la región ITS del rDNA entre especies de hongos puede utilizarse para la evaluación de comunidades de hongos de compost. En el análisis el DNA fúngico es extraído del compost y amplificado por PCR utilizando Primers específicos para la región ITS. Después de la amplificación, los diferentes fragmentos de ITS son separados en un gel y posteriormente secuenciados (Freire Haro, 2022).

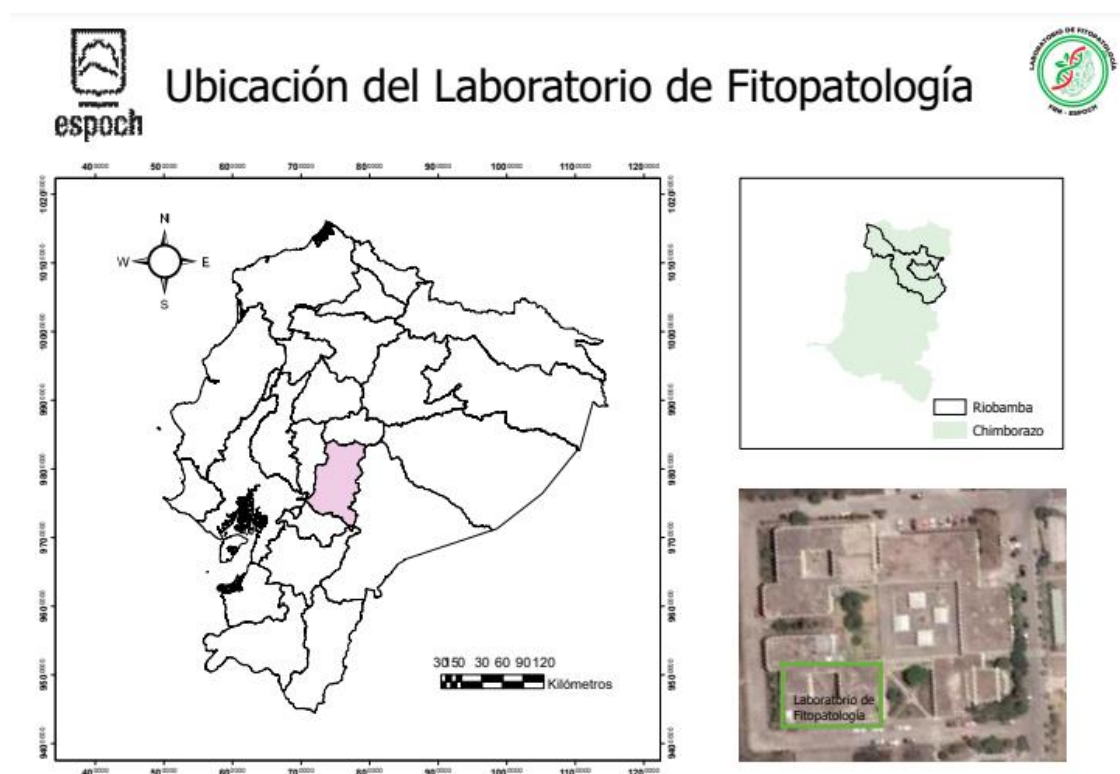
## CAPÍTULO III

### 3. MARCO METODOLOGICO

#### 3.1. Características del lugar

##### 3.1.1. Localización del laboratorio

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH), ubicado en la Panamericana Sur km 1/2, Cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo, Ecuador.



**Ilustración 4-2:** Localización del laboratorio de Fitopatología.

**Fuente:** Google Maps

**Realizado por:** Amancha. D, 2023

### **3.1.2. Localización en campo**

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología (ESPOCH), se trabajó con muestras recolectadas de la comunidad San José de Gaushi, parroquia Calpi, provincia de Chimborazo.

### **3.1.3. Ubicación geográfica de San José de Gaushi**

Altitud: 3121 msnm

Coordenadas (DMS)

X: 1°36'26,1''S

Y: 78° 43'59.91''W

Fuente: UTM Geo Map

### **3.1.4. Condiciones climáticas**

Temperatura: 16 °C

Precipitación: 750 mm/año

Humedad: 60%

Fuente: Climate – data 2019

## **3.2. Materiales y equipos**

### **3.2.1. Materiales de campo**

- Bolsa plástica
- Barreno
- Balde
- Recipientes aislantes
- Marcador

### **3.2.2. Materiales de escritorio**

- Computadora

- Impresora
- Hojas

### **3.2.3. *Equipo de campo***

- Cámara fotográfica (canon)
- GPS (Garmin)

### **3.2.4. *Materiales de laboratorio***

- Fundas Plásticas (20 x 30 cm)
- Cajas Petri (90 mm Ø)
- Probeta (100 mL y 1000 mL)
- Vasos de precipitación (50 mL y 100 mL)
- Matraz Erlenmeyer (250 mL)
- Puntas de micropipeta (10 µL, 100 µL y 1000 µL)
- Microtubos (2 mL, 1,5 mL y 200 µL)
- Morteros
- Pistilos
- Parafilm
- Porta y cubre objetos
- Cinta adhesiva
- Papel aluminio
- Cucharas desechables
- Palillos
- Papel toalla
- Recipientes plásticos
- Sobres de manila
- Pinzas
- Jeringa

### **3.2.5. *Equipos de laboratorio***

- Autoclave (BIOBASE BKQ-B100II) Cámara de flujo
- Cámara de flujo laminar vertical (BIOBASE BSC-1500IIA2-X)



- Microscopio óptico (LEICA DM 150)
- Incubadora (MEMMERT UN 30)
- Estereoscopio (COMECTA – IVYMEN 5313309)
- Adaptador de cámara fotográfica a microscopio (CANON SLR/DSLR)
- Cámara fotográfica (CANNON)
- Centrifuga (EPPENDORF 5424)
- Ultracongelador (BIOBASE BDF-40V450)
- Agitador orbital (COMENTA-IVYMEN 5312096)
- Agitador magnético (STABLE TEMP 03407-00)
- Balanza de precisión (RADWAG AS220.R2)
- Vortex (QILINBEIER QL-901)
- Biospectrofotometro (EPPENDORF Basic)
- Cuba electroforesis (FISHER SCIENTIFIC FB-SB-710)
- Fuente de poder para electroforesis (FISHER SCIENTIFIC FB300)
- Termociclador (EPPENDORF Vapo.protect)
- Transiluminador UV (FISHER SCIENTIFIC 88A)
- Termobloque (DLAB – HM 100-Pro)
- Destilador de agua (BOECO WS 8000)
- Secador de vidrio (SELECTA 200038)
- Microondas (Panasonic 900w)
- Mechero de Bunsen
- Micropipeta (10  $\mu$ L, 100  $\mu$ L y 1000  $\mu$ L)
- Refrigeradora (Durex)

### 3.2.6. *Reactivos e insumos*

- Agua destilada estéril
- Papa Dextrose Agar al 3.9% (PDA Difco<sup>TM</sup>)
- Bacto-Agar al 2.8% (PDA Difco<sup>TM</sup>)
- SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar)
- Sulfato de Estreptomicina
- Isopropanol frío
- Etanol
- Nuclei Acid Staining Solution (UniSafe Dye)
- Tris-Borate-EDTA Buffer (SIGMA)
- 10X BlueJuice<sup>TM</sup> Gel Loading Buffer (Invitrogen)

- DNA Ladder Bench Top 100 pb (PROMEGA)
- Cloranfenicol (BIO BASIC)
- Sulfato de potasio 99% (LOBAL Chemie)
- Nitrato de potasio 99% (LOBAL Chemie)
- Sulfato de magnesio heptahidratado 99,5% AR/ACS (LOBAL Chemie)
- KCl
- Glucosa
- Nitrógeno líquido
- Master Mix, 2X (Go Taq® Green)
- NaCl
- Alcohol antiséptico
- Lactoglicerol
- Cloroformo alcohol isoamílico (24:1)
- Avena
- LE Agarosa (Cleaver Scientific CSL-AG 100)
- Sucrosa D (+)-Saccharose, Sugar (LOBAL Chemie)
- Ácido cítrico Monohydrate 99,5-102% (LOBAL Chemie)
- Primers (EXXTEND)
- Agua ultrapura
- Kit de extracción de ADN (PROMEGA Wizard® Genomic DNA)

### 3.2.7. *Material biológico*

- Microorganismos encontrados 9 géneros diferentes.

**Tabla 2-2:** Microorganismos encontrados, material biológico.

<i>Aspergillus</i>
<i>Colletotrichum</i>
<i>Fusarium</i>
<i>Paramyrothecium</i>
<i>Penicillium</i>
<i>Purpureocillium</i>
<i>Scedosporium</i>
<i>Trichoderma</i>
<i>Phomopsis</i>

**Realizado por:** Amancha. D, 2023

### **3.3. Metodología**

#### **3.3.1. *Recolección de muestras***

La etapa inicial:

Esta etapa se caracteriza por que es el inicio del proceso de compostaje en la cual la materia orgánica, desechos animales y residuos vegetales se mezclan, empieza el proceso de descomposición y la materia prima esta fresca apilada en capas.

La etapa intermedia:

Esta etapa se caracteriza por que mediante procesos de biotransformación la materia prima comienza a descomponerse generando el compost.

La etapa final:

Esta etapa es la última en la cual el compost pasa a ser ensacado, se procede a cernir de la pila de compost las partículas que no estén aptas se descartan a otra pila para continuar el proceso de descomposición.

Las etapas se separaron en base al número de volteos por lo general estos volteos las muestras fueron recolectadas en intervalos de dos volteos entre cada etapa aproximadamente un intervalo de tiempo de mes a mes y medio entre cada toma de muestras, se procedió a tomar un valor de diez muestras de la pila de compostaje las muestras fueron recolectadas de la parte superior, inferior, al interior y a lo largo de la pila de compostaje con ayuda de un barreno a una profundidad de 40 cm se colocó en una funda con cierre posteriormente se mezcló todas las muestras para obtener una muestra homogénea, se etiquetó y se preservó en frío hasta llevar las muestras al laboratorio.

#### **3.3.2. *Análisis químico del compost***

Las muestras de compost fueron llevadas al laboratorio de Suelos de la ESPOCH, los análisis que se evaluaron fueron el porcentaje de materia orgánica por muestra, pH del sustrato y porcentaje de Nitrógeno (N), Fósforo (P) y Potasio (K).

Se colocaron las muestras en papel periódico en un lugar en el cual el sol actúe sobre las muestras de tal manera que se sequen, y se dejó por un lapso aproximado de 5 días, posteriormente se empleó el mortero para desagregar las muestras de compost y luego con ayuda de una zaranda se separaron los sólidos de la muestra. Se colocaron las muestras en vasos de precipitación y previamente etiquetadas se secaron en una estufa a 105°C por 24 h.

### **Porcentaje de materia orgánica**

Se pesó el crisol limpio y seco después se agregó 5 g de compost previamente seco en TSFA se colocaron en la estufa por 24 h a 105 °C para retirar y dejar enfriar se coloca el crisol en la mufla con su respectiva identificación por 20 min a 450 °C para posteriormente dejar enfriar en el desecador por alrededor de 30 min se pesó el crisol con la muestra luego se expresó la pérdida de peso como porcentaje de materia orgánica por ignición en base al peso del compost al horno (450°C) (Moreno, 2019).

### **pH de la muestra**

Se encendió el peachimetro por media hora, se pesó 20 g de compost, se colocó en el vaso plástico y se agregó 50 mL de agua destilada con una probeta, luego se mezcló con una varilla de vidrio durante un minuto posteriormente se dejó reposando por 30 min, se calibro el peachimetro con soluciones buffer luego se fue lavado para después medir los niveles de pH del compost (Moreno, 2019).

### **NPK de la muestra**

Se tomó una alícuota de 1mL y se colocó en un vaso de boca ancha luego se añadió 9 mL de fenol básico, se colocó 10 mL de clorox se mezcló suavemente luego se dejó reposar durante 20 m se tomó la lectura con ayuda del colorímetro (Nitrógeno) (Moreno, 2019).

Se tomó una alícuota de 0,5 mL y se colocó en un vaso de boca ancha se añadió 9,5 mL de agua destilada se colocó 10 mL del reactivo B se mezcló suavemente y se dejó en reposo 20 m se tomó la lectura con ayuda del colorímetro (Fósforo) (Santana, 2019).

Se tomó una alícuota de 1mL y se colocó en un vaso de boca ancha luego se añadió 9 mL de agua destilada, se colocó 10 mL de Oxido de Lantano, se mezcló suavemente y con ayuda del espectrofotómetro de absorción atómica se tomó la lectura (Potasio) (Santana, 2019).

#### *3.3.2.1. Aislamiento de microorganismos fúngicos asociados al compost*

Para el aislamiento de los microorganismos fúngicos asociados al compost se utilizó la técnica de diluciones seriadas para lo cual se detalla los procedimientos y materiales a continuación:

#### *3.3.2.2. Solución salina*

Se prepara una solución salina al 0,85 %, para lo cual se pesó en la balanza 2,13 g de cloruro de sodio y con ayuda de una probeta se midió la cantidad de 250 mL de agua destilada, se mezclaron en un erlenmayer los 2,13 g de cloruro de sodio con los 250 mL de agua destilada se selló con papel aluminio y se procedió a llevar al autoclave (BIOBASE BKQ-B100II) a 120 ° C durante alrededor de unos 60 min una vez que el autoclave detuvo su proceso de esterilización se esperó unos minutos que disminuya la temperatura después se colocó una cantidad de 27,77 g de compost en los erlenmeyer el cual contiene la solución salina, consecutivamente procedemos a llevar las muestras al agitador orbital (COMENTA-IVYMEN 5312096) a una temperatura de 25 ° C, a 160 rpm por 24 h.

#### *3.3.2.3. Blancos de dilución*

Se esterilizó tubos de ensayo y un frasco con 250 mL de agua destilada mediante la ayuda del autoclave se esterilizó los materiales, los blancos de dilución se prepararon colocando 9 mL de agua destilada estéril en tubos de ensayo, para después añadir 1 mL de la solución madre para obtener una dilución de  $10^{-1}$ .

#### 3.3.2.4. *Siembra*

Una vez que ya se obtuvo la disolución  $10^{-1}$  de las muestras de compost, se procede a sembrar en medio de cultivo PDA + Chloramphenicol (5%) y Streptomina (1%), se sembraron 50  $\mu$ L (0.05 mL) en las cajas que contienen los medios de cultivo con la ayuda de una espátula drigalsky se esparce la gota uniformemente por todo el contorno de la caja petri, posteriormente se sellaron las cajas con parafilm, se procedió a darle un código de identificación a cada caja, para luego ser llevadas a la incubadora en condiciones de oscuridad por 10 días. El crecimiento de los hongos se monitoreo cada 24 h.

#### 3.3.2.5. *Cultivos puros*

Se preparó medio y se dispensó en las cajas Petri que previamente contenían PDA + Chloramphenicol (5%) y Streptomina (1%), según las colonias que fueran identificadas durante el proceso de incubación se procedió a preparar las cajas, posteriormente se tomó una fracción de micelio de cada una de las colonias crecidas y se las pasó a medio PDA estéril, se selló con papel parafilm y se etiquetó, luego se las incubó a 28 ° C en condiciones de oscuridad por aproximadamente 5 días.

#### 3.3.2.6. *Preservación mediante el método de Catellani*

Los cultivos obtenidos fueron preservados según la metodología de Castellani descrita por Fernandez, (2014) con algunas modificaciones que son las siguientes:

Una vez que ya se obtuvieron aislados puros se utilizó microtubos de 2 mL previamente esterilizados, a los cuales se le añadieron aproximadamente 1,5 mL de agua destilada estéril, este es el medio en el cual se preservará los cultivos, luego se cortaron discos de aproximadamente 5 mm de diámetro de los cultivos monospóricos con sorbetes estériles y se coloraron aproximadamente de 5 a 6 discos en los microtubos con los palillos estériles, se tapó herméticamente el microtubo, se etiquetó y se almacenaron en un rafter que posteriormente se colocó en el refrigerador.

### **3.3.3. Caracterización cultural**

La caracterización cultural permite evaluar mediante la observación características externas de las colonias es así que se evaluaron los criterios expuestos por Ramos, (2014) con algunas características especiales. Se evaluó la forma (irregular, rizoide, filamentosa, circular, puntiforme), el borde (rizado, filamentoso, crenado, ondulado, entero), la elevación (efusa, plana, rizada, convexa, umbonada), la superficie (rugosa, concéntrica, radial, ondulada, lisa) y el color tanto del anverso como del reverso. El color se evaluó mediante la escala de Pantone (Pantone, 2012).

### **3.3.4. Caracterización morfológica**

#### **3.3.4.1. Placas con cinta adhesiva**

Las placas con cinta adhesiva se realizaron siguiendo la metodología de Estrada (2019), con algunas características:

En la placa cubreobjetos se añadió una gota de lactoglicerol, luego se tomó una porción de cinta adhesiva de los extremos, después se acercó la cinta hacia el cultivo con la parte pegante dirigida hacia el hongo, luego con ayuda de un lápiz se presionó suavemente sobre el cultivo posterior a eso se retiró la cinta y se pegó en la placa portaobjetos se esperó unos segundos para luego colocar la placa en el microscopio.

### **3.3.5. Caracterización molecular de los morfotipos aislados mediante la PCR de la región *ITS<sub>1</sub>-ITS<sub>4</sub>***

#### **3.3.5.1. Obtención del micelio**

Para la obtención de micelio se repicó una porción de micelio de los hongos que estén en estado puro cultivados en PDA con 10 días de edad en medio de cultivo Agar Avena (40 g/L) +

Chloramphenicol (5%) y Streptomycin (1%), luego se selló, se colocó la etiqueta y se incubó en condiciones de oscuridad a 28 °C por 10 días. Luego se raspó el micelio de cada hongo con una cuchara estéril, se dejó secar en una hoja estéril, posteriormente se tapó con papel aluminio, este se introdujo en una funda ziploc y se lo llevó al ultracongelador (BIOBASE BDF40V450) a -40 °C para su posterior procesamiento.

### 3.3.5.2. Extracción del ADN genómico

**Tabla 3-2:** Pasos para la extracción del ADN genómico.

---

Se colocó aproximadamente 1 g de micelio en un mortero estéril, se adicionó nitrógeno líquido, con el pistilo se maceró hasta obtener un polvo fino, luego con la cuchara estéril se colocó en un microtubo de 2 mL y se guardó a -40 °C

---

Seguidamente con el micelio macerado se utilizó el kit de extracción PROMEGA Wizard® Genomic DNA con las siguientes modificaciones del protocolo propuesto por el fabricante.

---

Posteriormente se adicionaron 600 µL de solución de lisis nuclear agitándola en un vortex (QILINBEIER QL-901) por 3 s y después incubándola a 65 °C por 15 minutos, invirtiendo los tubos cada 5 min.

---

Consecutivamente se adicionaron 200 µL de solución de precipitado de proteínas, luego se llevó a un vortex por 20 s, posteriormente se centrifugó por 10 min a 14000 rpm. El precipitado de proteínas formó un pellet, seguidamente se transfirió el sobrenadante conteniendo ADN para un nuevo microtubo (2 mL), a continuación, se añadieron 600 µL de cloroformo-alcoholisoamílico (24:1), se agitó en un vortex (QILINBEIER QL-901) por 20 s, luego se centrifugó por 8 min a 14000 rpm y finalmente se transfirió el sobrenadante ( $\pm$  600 µL) conteniendo el ADN para un nuevo microtubo (2 mL).

---

Luego se adicionaron 600 µL de isopropanol frío mezclando la solución invirtiendo los tubos, después se dejó la solución en el congelador por 10 min y finalmente se centrifugaron los tubos a 14000 rpm por 10 min.

---

Observando que ha existido la formación del pellet se descartó cuidadosamente el sobrenadante, finalmente se procedió a realizar dos lavados con etanol al 70% frío, en cada lavado se adicionaron 600 µL de etanol al 70% frío y se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos. Luego se descartó el etanol y se dejaron los tubos de forma horizontal con tapa abierta sobre papel toalla para el secado del pellet.

---

Finalmente, después de aproximadamente 12 h, se resuspendieron los pellets con 50 µL solución Buffer (TE) y 2 µL de RNasa en cada tubo incubando a 37° C por 3 h, luego se

---



---

almacenó el ADN en el ultracongelador (BIOBASE BDF-40V450) a -20 °C hasta su posterior uso.

---

**Realizado por:** Amancha. D, 2023

### 3.3.5.3. PCR

Para la identificación molecular de los diferentes morfotipos obtenidos se empleó la técnica de la amplificación en cadena de la ADN con los iniciadores ITS5 e ITS4.

**Tabla 4-2:** Primers utilizados para la PCR

Código	Secuencia
ITS <sub>5</sub> F (Forward)	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG- 3'
ITS <sub>4</sub> R (Reverse)	5'-TCCTCCGCTTATTGATARGC- 3'

**Fuente:** White, T. J. et al, 1990

**Realizado por:** Amancha. D, 2023

- Para la reacción de PCR se utilizaron los siguientes reactivos:

Se debe trabajar con guantes quirúrgicos 6,25 µL de Master Mix, 2X Go Taq® Green, 1 µL (1 pmol) primer Forward (ITS 1), 1 µL (1 pmol) primer Reverse (ITS 4), 2,25 µL de agua ultrapura estéril y 2 µL (ng / µL) de ADN de cada uno de los aislados dando un total de 12,5 µL por cada reacción de PCR.

- El programa de amplificación por PCR consistió en los siguientes pasos:

Para el programa de amplificación de la PCR se aplicó el siguiente perfil térmico 35 ciclos de las condiciones, 95 °C durante 60 s (desnaturalización), 94 °C durante 60 s (anelamiento), 53 °C

durante 60 s (extensión) y finalmente se realizó una última extensión a 72 °C durante 60 s, en el termociclador.

#### *3.3.5.4. Electroforesis*

La electroforesis consistió en la amplificación de los productos de PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa a una concentración de 1% adicionando Nuclei Acid Staining Solution UniSafe Dye (agente intercalante de ADN) en un volumen de 3 µL/60 mL de gel, usando Tris borato EDTA Buffer (TBE) a una concentración del 10%.

Las muestras de los productos de PCR fueron cargadas en los geles en un volumen de 2 µL, con 3 µL buffer de carga (10X BlueJuice<sup>TM</sup> Gel Loading Buffer), en el primer posillo de los geles se carga 2 µL DNA Ladder Bench Top 100 pb (PROMEGA) con 3 µL buffer de carga (10X BlueJuice<sup>TM</sup> Gel Loading Buffer) para determinar el tamaño de la cadena de ADN, por 70 min, con un voltaje de 80 voltios. Después de la electroforesis los productos de PCR fueron visualizados en un transiluminador UV (FISHER SCIENTIFIC 88A).

#### *3.3.5.5. Secuenciación*

Los productos de PCR obtenidos fueron secuenciados utilizando la tecnología SANGER en la empresa MACROGEN COREA.

#### *3.3.5.6. Análisis de las secuencias*

Los electroferogramas se visualizaron en el programa Chromas Technelysium Pty Ltd versión 2.6.6 y se editaron las partes de mala calidad, luego las secuencias fueron exportadas a formato fasta, además mediante la herramienta Blast del NCBI (National Center for Biotechnology Information) se realizó la comparación de las secuencias mediante el % de identidad, % de cobertura, e-value, obtenidas con la de los bancos de datos.

### **3.3.6. *Análisis de datos***

Para la caracterización cultural se observó las características físicas de los microorganismos fúngicos se comparó con bibliografía relacionada para determinar las similitudes con microorganismos previamente ya encontrados. Para la caracterización molecular se realizó extracción de ADN y se comparó usando la herramienta BLAST del NCBI para determinar el género al cual los microorganismos encontrados pertenecen clasificándolos por géneros. Se realizó una estadística descriptiva en base a los índices de riqueza, índice de biodiversidad de Simpson y Shannon.

## CAPÍTULO IV

### 4. MARCO DE RESULTADO Y DISCUSIÓN

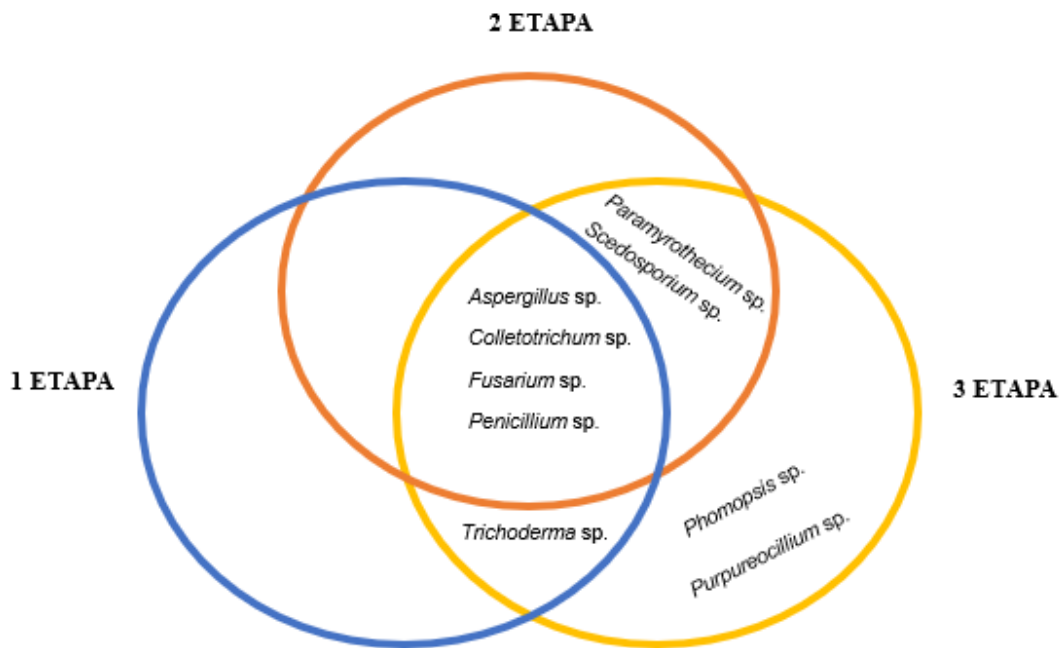
El presente trabajo investigativo presentó los siguientes resultados que detallamos a continuación en la (Tabla 4-3).

**Tabla 4-3:** Cuadro de resumen de microorganismos, aislados y caracterizados.

	<b>Morfotipos observados</b>	<b>Morfotipos seleccionados</b>	<b>Morfotipos Caracterizados</b>	
1 Etapa	146	13	6	
2 Etapa	315	13	7	
3 Etapa	388	26	9	

**Realizado por:** Amancha. D, 2023

Se observaron 933 morfotipos fúngicos, los cuales se agruparon en 52 morfotipos diferentes del total de morfotipos, al final se caracterizaron 22 morfotipos identificándose 9 géneros fúngicos. Se encontraron 146 morfotipos fúngicos en la primera etapa, identificándose 5 géneros diferentes; respecto a la segunda etapa se encontraron 315 morfotipos fúngicos lográndose identificar 7 géneros, finalmente en la tercera etapa se encontraron 388 morfotipos diferentes identificándose 9 géneros fúngicos.



**Ilustración 5-3:** Géneros fúngicos compartidos y exclusivos en las diferentes etapas del proceso de compostaje.

Realizado por: Amancha. D, 2023

Los géneros que se lograron caracterizar fueron 9: *Aspergillus* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp. y *Penicillium* sp., estos géneros fueron encontrados en las tres etapas del proceso de compostaje (fase inicial, fase intermedia y final). Los géneros siguientes fueron encontrados en dos etapas, el género *Paramyrothecium* sp. y *Scedosporium* sp. fue encontrado en la segunda y tercera etapa y el género *Trichoderma* sp. fue encontrado en la primera y *Purpureocillium* sp. y *Phomopsis* sp. fue encontrada solamente en la tercera etapa de compostaje (Ilustración 5-3).

#### 4.1. Análisis químico del compost

El análisis químico de las muestras de compost del presente trabajo investigativo nos indicó que existe un pH de 9,08 y 7,21 para la tercera etapa en cuanto se refiere a la materia orgánica el valor más alto se encuentra en la tercera etapa con un valor de 17,04 para el primer análisis y con 19,1 para el segundo análisis, la conductividad eléctrica nos indica que el menor valor se presentó en la primera etapa con un valor de 1,5 y el mayor valor se presentó en la tercera etapa con un valor de 12,1 en el segundo análisis, el porcentaje de Nitrógeno (N), Fósforo (P), Potasio (K) nos indica

que los valores más altos se encuentran en la tercera etapa de los dos ensayos con un valor para nitrógeno de 1,12, fósforo 2,5 y potasio 1,31 estos valores en el segundo ensayo como se indica en la (Tabla 5-3).

**Tabla 5-3:** Análisis químico de las muestras de compost.

Etapas de compost	Porcentaje					
	pH	% M.O	Conductividad Eléctrica	N	P	K
Compost 1 Etapa L1	9,06	16,8	5,86	0,98	1,7	1,12
Compost 2 Etapa L2	9,08	17,04	4,79	0,76	2	0,89
Compost 1 Etapa L1	8,07	18,1	1,5	0,56	1,5	0,92
Compost 2 Etapa L2	7,21	19,1	12,1	1,12	2,5	1,31

Realizado por: Amancha. D, 2023

#### 4.2. Caracterización cultural e identificación de los microorganismos fúngicos.

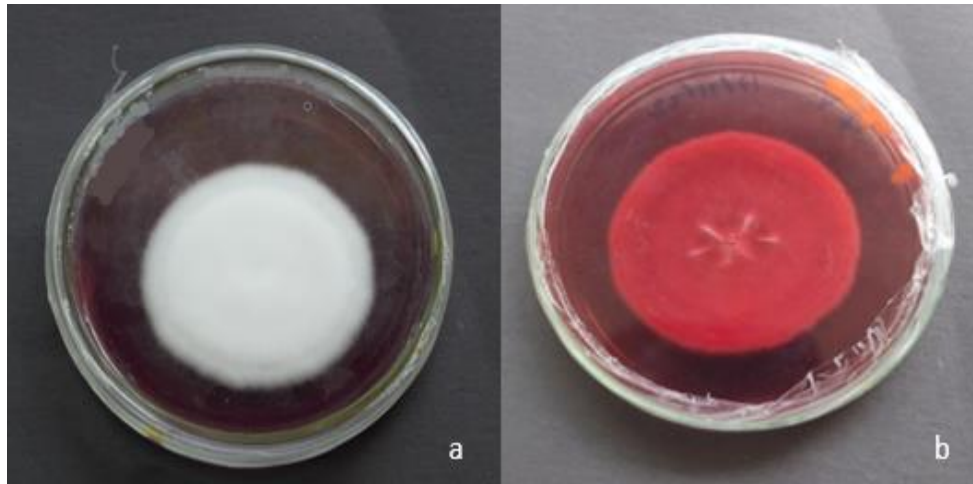
**Morfotipo 20:** *Purpureocillium* sp.

Las Cepas del **Morfotipo 20** presentaron forma circular, elevación convexa, borde ondulado, superficie suave el color observado en el anverso de la colonia fue de color blanco (#e8e8e8) y en el reverso de un tono rojizo (#f40006).

**Tabla 6-3:** Características culturales de las cepas del género *Purpureocillium* sp.

Morf.	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Color Anverso	Color Reverso
<b>T20</b>	Circular	Convexa	Ondulado	Suave	Blanco	Rojo

Realizado por: Amancha. D, 2023



**Ilustración 6-3:** Características culturales de las cepas del género *Purpureocillium* sp. crecidos en el medio de cultivo PDA incubados a 25 °C en condiciones de oscuridad, con 10 días de edad. a) Color del anverso de la colonia, b) color del reverso de la colonia.

**Realizado por:** Amancha. D, 2023

Con base en las características culturales de los aislados **Morfotipo\_20**, estos coinciden con el género *Purpureocillium* sp. (San miguel Chimbo, 2021).

El género *Purpureocillium* es comúnmente una especie saprobia aislada del suelo, también presente en la vegetación en descomposición, en adultos y larvas de insectos, nematodos, humanos, animales e inclusive en el aire. *Purpureocillium* tiene un gran potencial como biocontrolador de nematodos (Narayan Paul, et al., 2018). El parasitismo de nematodos se da cuando las hifas penetran en la superficie de los huevos de nematodos lo que ocasiona que se produzcan apresorios e infectando los huevos después de la adsorción. Durante la infección *Purpureocillium* puede secretar varias enzimas que pueden conducir a la descomposición de los componentes de proteína y quitina de la epidermis del nematodo. Además, se ha demostrado que el filtrado de la fermentación de *Purpureocillium* sp. puede inhibir el crecimiento de patógenos como *Helminthosporium maydis* y *Fusarium graminearum*, inhibiendo la germinación de esporas (Jiang Zhan, et al., 2021; Rosanne Sprute. et al., 2021).

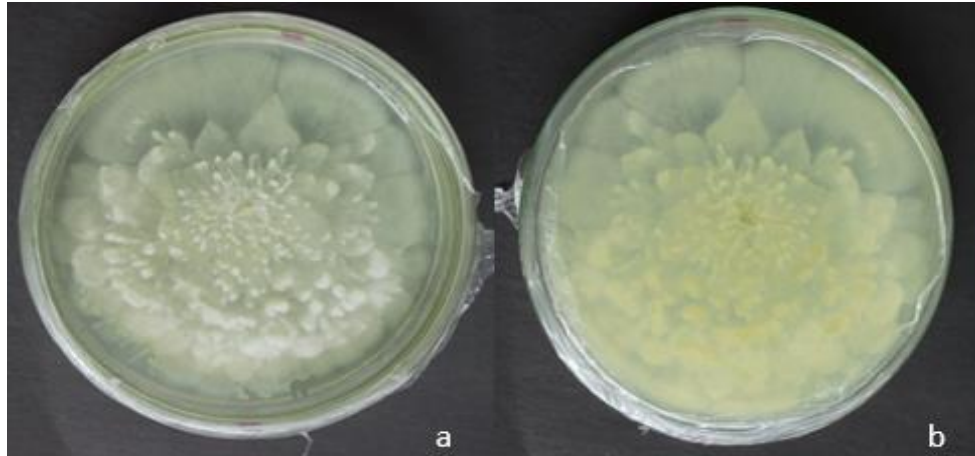
**Morfotipo 4:** *Phomopsis* sp.

Las Cepas del **Morfotipo 4** presentaron forma irregular, elevación elevada y plana, borde ondulado, superficie lisa y polvorienta el color observado en el anverso de la colonia fue de color blanco y en el reverso de un tono blanquecino (#fffaf2) y blanco seda (#fff7ea).

**Tabla 7-3:** Características culturales de las cepas del género *Phomopsis* sp.

Morf.	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Color Anverso	Color Reverso
<b>T4</b>	Irregular	Elevada	Ondulado	Lisa	Blanco	Blanco
<b>T18</b>	Irregular	Plana	Ondulado	Polvorienta	Blanco	Blanco
<b>T37</b>	Irregular	Convexa	Ondulado	Nubosa	Blanco	Blanco Seda
<b>T43</b>	Irregular	Convexa	Ondulado	Nubosa	Blanco	Blanco Seda

**Realizado por:** Amancha. D, 2023



**Ilustración 7-3:** Características culturales de las cepas del género *Phomopsis* sp. crecidos en el medio de cultivo PDA incubados a 25 °C en condiciones de oscuridad, con 10 días de edad. a) Color del anverso de la colonia, b) color del reverso de la colonia.

**Realizado por:** Amancha. D, 2023



El género *Phomopsis* sp. se observó por primera vez a finales del siglo XIX y se identificó a principios del siglo XX. Este hongo está asociado a la mayoría de las zonas vitivinícolas del mundo. Este microorganismo está asociado a problemas fitosanitarios durante la fase de brotación y crecimiento de brotes en plantas en áreas de producción donde el clima es húmedo (San Miguel Chimbo, 2021). Este género tiene la capacidad de sobrevivir en la superficie de las plantas ya sea de modo latente o a través de estructuras reproductivas asexuales (picnidios). Luego los picnidios maduran emergiendo los conidios. *Phomopsis* produce un metabolito secundario llamado la nectriapirona es un metabolito secundario producido por *Phomopsis* sp. que se ha empleado en el sector médico como antiinflamatorio y antimicrobiano. Lo anterior es un vistazo de la variedad y versatilidad de los metabolitos secundarios producidos por hongos endófitos de especies vegetales y permite pensar en la posibilidad de aprovechar estos géneros fúngicos para la obtención de compuestos bioactivos novedosos (Osorio, y otros, 2019).

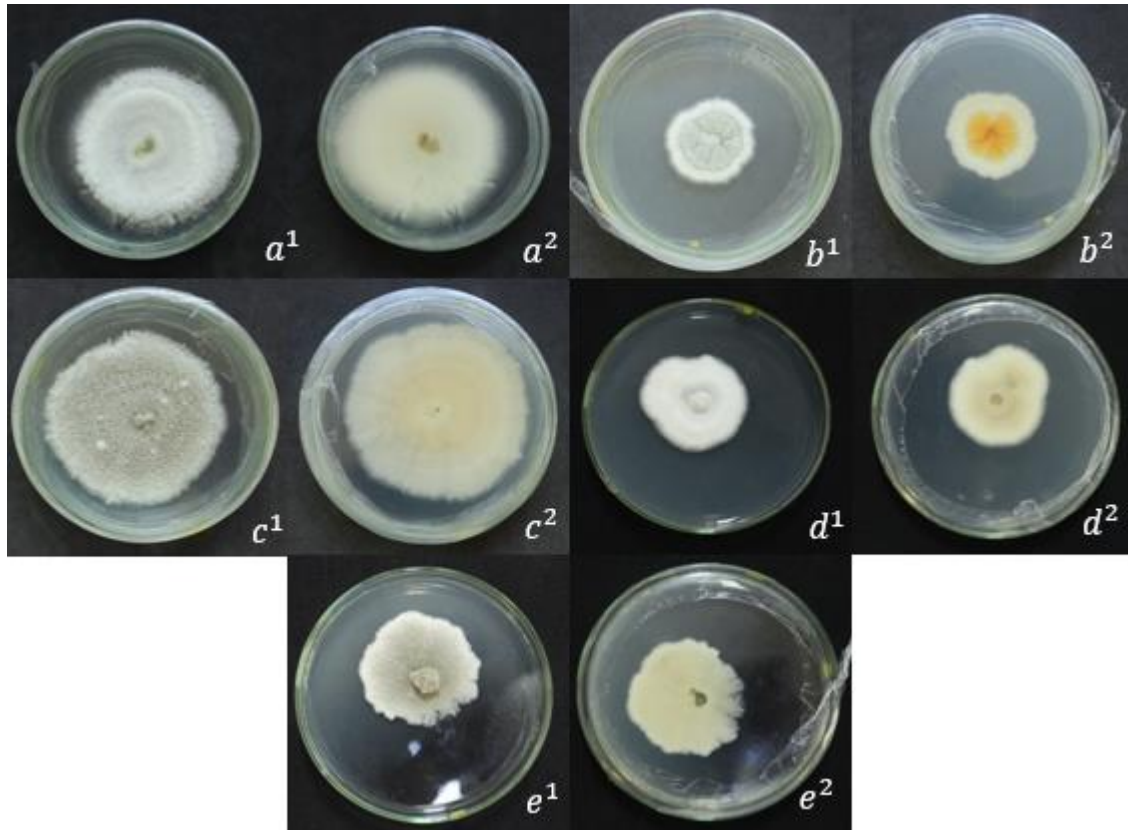
**Morfotipo S:** *Scedosporium* sp.

Las cepas pertenecientes al **Morfotipo S** presentaron forma irregular y circular; elevación plana, pulvinada y convexa; borde ondulado y entero; superficie rugosa, polvorienta y suave; el color observado en el anverso de la colonia fue de variable entre los que se encuentran color blanco (#fffaf2) y gris (#dcdaca); en el reverso de igual manera existe una variedad entre los que se encuentran un tono blanquecino Pantone (#fffaf2) y naranja (#df6c37).

**Tabla 8-3:** Características culturales de las cepas del género *Scedosporium* sp.

<b>Morf.</b>	<b>Forma</b>	<b>Elevación</b>	<b>Borde</b>	<b>Superficie</b>	<b>Color Anverso</b>	<b>Color Reverso</b>
<b>T7</b>	Irregular	Plana	Ondulado	Rugosa	Blanco	Pantone
<b>T9</b>	Irregular	Pulvinada	Ondulado	Rugosa	Blanco	Naranja
<b>T10</b>	Irregular	Plana	Ondulado	Polvorienta	Gris	Pantone
<b>T28</b>	Circular	Convexa	Entero	Suave	Blanco	Blanco
<b>T33</b>	Circular	Convexa	Entero	Suave	Blanco	Blanco

**Realizado por:** Amancha. D, 2023



**Ilustración 8-3:** Características culturales de las cepas del género *Scedosporium* sp. crecidas en el medio de cultivo PDA incubados a 25°C en condiciones de oscuridad, con 10 días de edad. Morfotipo 7 (a<sup>1</sup> a<sup>2</sup>). Morfotipo 9 (b<sup>1</sup> b<sup>2</sup>). Morfotipo 10 (c<sup>1</sup> c<sup>2</sup>). Morfotipo 28 (d<sup>1</sup> d<sup>2</sup>). Morfotipo 33 (e<sup>1</sup> e<sup>2</sup>).

**Realizado por:** Amancha. D, 2023

Las cepas de *Scedosporium* son hongos saprófitos que se encuentran en el suelo, en distintos sustratos ricos en materia orgánica (estiércol), en las aguas residuales y en los mares contaminados. También pueden encontrarse contaminando los sistemas de climatización-ventilación de los edificios se ha encontrado en agua salobre y salada, aguas residuales, suelo, zonas pantanosas, zonas costeras y en materia orgánica rica en compuestos nitrogenados como guano, estiércol y heces de murciélago (INSST, 2022).

*Scedosporium prolificans* y *Scedosporium apiospermum* han sido las únicas especies reconocidas del género *Scedosporium* (también denominado *Lomentospora*) hasta hace pocos años, pero recientes estudios moleculares han demostrado que *S. apiospermum* es realmente un complejo

compuesto de ocho especies: *Scedosporium boydii* (teleomorfo *Pseudallescheria boydii*), *Scedosporium apiospermum* (teleomorfo *Pseudallescheria apiosperma*), *Pseudallescheria ellipsoidea*, *Pseudallescheria angusta*, *Pseudallescheria fusioidea*, *Pseudallescheria minutispora*, *Scedosporium dehoogi* y *Scedosporium aurantiacum* (Pemán, 2014).

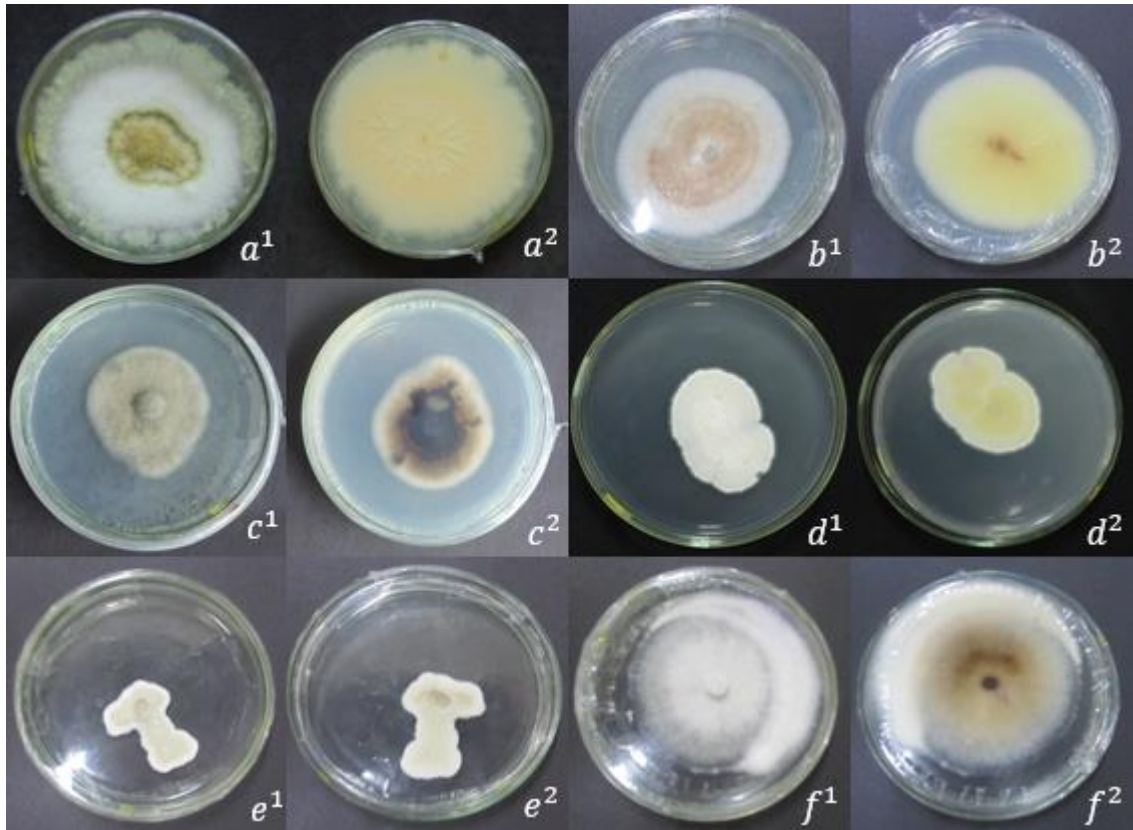
**Morfotipo C:** *Colletotrichum* sp.

Las Cepas del **Morfotipo C**, presentaron forma irregular y circular; elevación pulvinada y convexa; borde filamentosos, ondulado y entero; superficie rugosa, polvorienta, nubosa y suave; el color observado en el anverso de la colonia fue de variable entre los que se encuentran color blanco (#fffaf2), verde (#116802), marrón (#de6b36) y blanco gulf (#ecf4ec), en el reverso de igual manera existe una variedad entre los que se encuentran un tono blanquecino, delicia naranja (#df6c37), negro (#49382d) y café (#6b3806).

**Tabla 9-3:** Características culturales de las cepas del género *Colletotrichum* sp.

<b>Morf.</b>	<b>Forma</b>	<b>Elevación</b>	<b>Borde</b>	<b>Superficie</b>	<b>Color Anverso</b>	<b>Color Reverso</b>
<b>T3</b>	Circular	Pulvinada	Filamentosos	Rugosa	Verde con blanco	Delicia Naranja
<b>T5</b>	Circular	Convexa	Entero	Rugosa	Marrón	Blanco
<b>T16</b>	Circular	Convexa	Ondulado	Rugosa	Verde	Negro
<b>T32</b>	Irregular	Convexa	Ondulado	Polvorienta	Blanco Gulf	Blanco
<b>T35</b>	Circular	Convexa	Entero	Suave	Blanco Gulf	Blanco
<b>T36</b>	Circular	Convexa	Entero	Nubosa	Blanco	Café

**Realizado por:** Amancha. D, 2023



**Ilustración 9-3:** Características culturales de las cepas del género *Colletotrichum* sp. crecidos en el medio de cultivo PDA incubados a 25°C en condiciones de oscuridad, con 10 días de edad. Morfotipo 3 ( $a^1 a^2$ ). Morfotipo 5 ( $b^1 b^2$ ). Morfotipo 16 ( $c^1 c^2$ ). Morfotipo 32 ( $d^1 d^2$ ). Morfotipo 35 ( $e^1 e^2$ ). Morfotipo 36 ( $f^1 f^2$ ).

**Realizado por:** Amancha. D, 2023

Los aislados del **Morfotipo C**, presentaron características similares a aislados pertenecientes al género *Colletotrichum* sp. De acuerdo con (Barnett H y Hunter B, 1998), *Colletotrichum* es un género que se caracteriza por presentar acérvulos separados en forma de disco o cojín, cerosos, subepidermales que emergen de la planta hospedante, típicamente contienen setas o espinas negras en los bordes o entre los conidióforos; los conidióforos son simples y elongados; los conidios son hialinos, ovoides u oblongos.

El hongo *Colletotrichum* es uno de los géneros patógenos de plantas más importantes y de mayor distribución en el mundo ya que ataca especialmente cultivos de regiones tropicales y

subtropicales, es de gran importancia para el hombre ya que afecta una gran variedad de plantas de importancia.

De acuerdo con Cannon et al. (2012), todos los estudios de *Colletotrichum* asociados a plantas que no son ampliamente cultivadas, demuestran una considerable diversidad de taxones. A pesar de la evidencia preliminar de que la especificidad del hospedante es menor en árboles nativos de ecosistemas tropicales, comparados con ambientes controlados, la gran cantidad de hábitats (en forma de hojas, frutos, etc.) que permanecen sin muestrear, indican la probabilidad de que toda la diversidad a nivel de especies del género todavía está significativamente sin representar.

En condiciones controladas, el hongo afecta tejido joven y maduro, registrando periodos de incubación y latencia más cortos en hojas jóvenes, produciendo abundantes estructuras reproductivas, lo cual asegura que haya ciclos repetitivos en un periodo corto de tiempo. Los aislamientos obtenidos en cada hospedante pueden infectar a los demás, comprobándose que hay patogenicidad cruzada. Tanto la incidencia como la severidad causada por especies de *Colletotrichum* en el follaje de los hospedantes, pueden variar en diferentes épocas del año.

Los estudios epidemiológicos proporcionan conocimientos sobre el agente causal, la interacción patógeno-hospedante y el comportamiento de la enfermedad con relación a las condiciones climáticas, los cuales resultan indispensables para el diseño de estrategias de manejo integrado de enfermedades, que contribuirán a mejorar la calidad de las especies vegetales. La información generada, puede ayudar a comprender mejor la interacción patógeno-hospedante-ambiente, contribuyendo al planteamiento de nuevas investigaciones relacionadas con la etiología, epidemiología y manejo de los fitopatógenos que afectan a los árboles forestales.

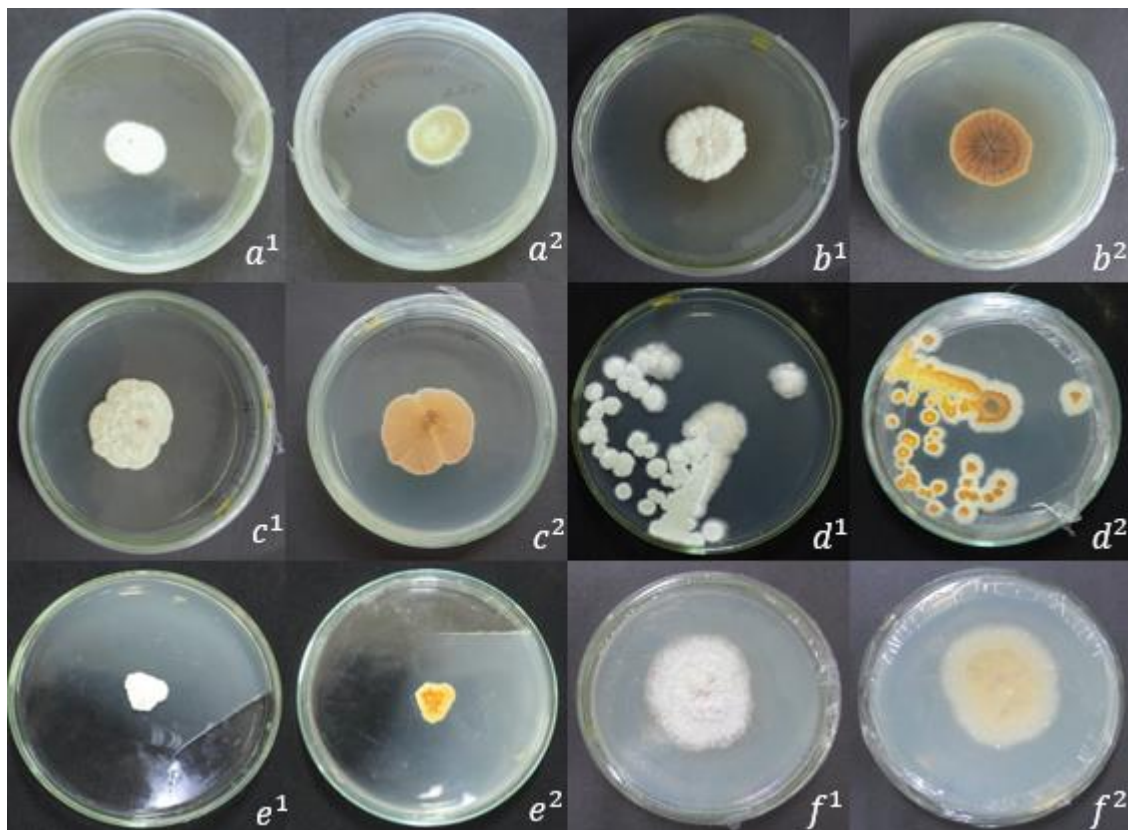
**Morfotipo PA:** *Paramyrothecium* sp.

Las Cepas pertenecientes al **Morfotipo PA**, presentaron forma irregular y circular; elevación pulvinada y convexa; borde ondulado y entero; superficie lisa y rugosa; el color observado en el anverso de la colonia el que predominó fue el color blanco (#fffaf2); en el reverso de igual manera existe una variedad entre los que se encuentran un tono marrón (#de6b36) y amarillo pika (#d6c800) (Escala Pantone, 2019).

**Tabla 10-3:** Características culturales de las cepas del género *Paramyrothecium* sp.

Morf.	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Color Anverso	Color Reverso
T11	Irregular	Plana	Ondulado	Lisa	Blanco	Amarillo Pika
T15	Circular	Convexa	Entero	Rugosa	Blanco	Marrón
T21	Circular	Convexa	Entero	Rugosa	Blanco	Marrón
T26	Irregular	Convexa	Ondulado	Rugosa	Blanco	Marrón
T34	Irregular	Pulvinada	Ondulado	Rugosa	Blanco	Marrón
T40	Circular	Convexa	Ondulado	Rugosa	Blanco	Marrón

Realizado por: Amancha. D, 2023



**Ilustración 10-3:** Características culturales de las cepas del género *Paramyrothecium* sp.

crecidos en el medio de cultivo PDA incubados a 25°C en condiciones de oscuridad, con 10 días de edad. Morfotipo 11 ( $a^1 a^2$ ). Morfotipo 15 ( $b^1 b^2$ ). Morfotipo\_ 1 ( $c^1 c^2$ ). Morfotipo26 ( $d^1 d^2$ ). Morfotipo 34 ( $e^1 e^2$ ). Morfotipo 40 ( $f^1 f^2$ ).

**Realizado por:** Amancha. D, 2023

El género *Paramyrothecium* sp. fue observado y recolectado en las provincias de Chiang Mai y Phetchaburi, Tailandia. Esta nueva especie se introduce en base a evidencia morfológica y molecular. Este hongo se caracteriza por su producción de sporodochium conidiomata con una franja con pigmentación blanquecina setosa que rodea una masa viscosa de conidios que pueden ir de color verde oliváceo a verde oscuro, conidióforos penicilladamente ramificados y conidios aseptados y cilíndricos a elipsoides (INSST, 2022).

La mayoría de estos hongos son saprobios o patógenos para plantas y algunos animales, algunos pueden llegar a representar un grave peligro para la salud de las personas. Ciertos están ligados a morfos sexuales con ascomas peritheciales que permanecen semi o totalmente sumergidos en el tejido del huésped, que pueden tomar tonalidades que van de color amarillo brillante a oscuro a naranja o negro que no cambian de color en KOH (L, Lombard, et al., 2016).

El género *Paramyrothecium* sp. es un patógena y principal causal de varias enfermedades en plantas de fresa las cuales presentan sus síntomas generando manchas en las hojas y lesiones en el pecíolo, los síntomas empiezan como pequeñas superficies necróticas que se expandieron velozmente hasta macerar folíolos y pecíolos completos. En fases avanzadas de la infección, se distinguieron evidentemente esporodocios de color verde oliva oscuro en los tejidos infectados (L, Lombard, et al., 2016).

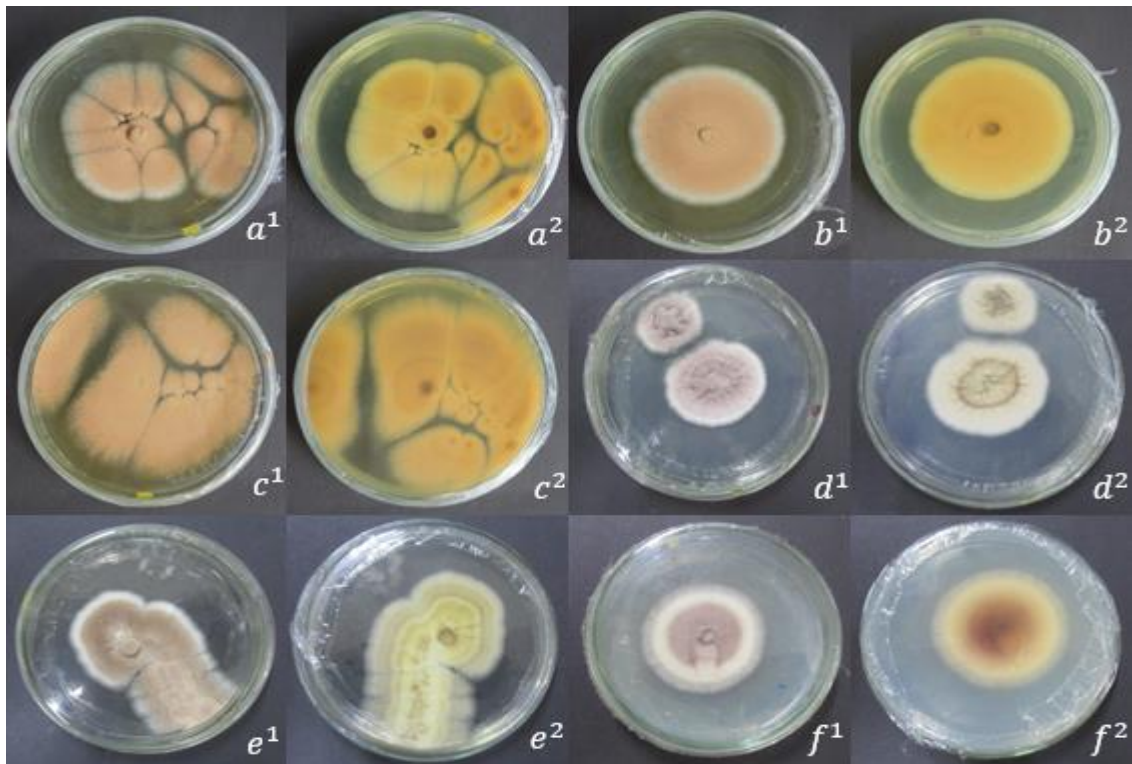
**Morfotipo F:** *Fusarium* sp.

Las Cepas del **Morfotipo F**, presentaron forma irregular, filamentosa y circular; elevación plana y convexa; borde ondulado y filamentoso; superficie polvorienta y rugosa; el color observado en el anverso de la colonia el que predominó fue el color rosado (#f999d4), lila (#611d4f) y marrón (#f9813b); en el reverso de igual manera existe una variedad entre los que se encuentran un tono marrón (#f9813b), blanco (#dcdaca) y naranja (#df6c37).

**Tabla 11-3:** Características culturales de las cepas del género *Fusarium* sp.

Morf.	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Color Anverso	Color Reverso
T14	Irregular	Convexa	Ondulado	Rugosa	Rosado	Naranja
T22	Filamentoso	Plana	Filamentoso	Polvorienta	Rosado	Barro
T23	Filamentoso	Plana	Filamentoso	Polvorienta	Rosado	Barro
T39	Circular	Convexa	Ondulado	Rugosa	Lila	Marrón Topo
T44	Irregular	Convexa	Ondulado	Polvorienta	Marrón	Blanco
T62	Filamentoso	Plana	Filamentoso	Polvorienta	Rosado	Barro

Realizado por: Amancha. D, 2023



**Ilustración 11-3:** Características culturales de las cepas del género *Fusarium* sp. crecidas en el medio de cultivo PDA incubados a 25°C en condiciones de oscuridad, con 10 días de edad. Morfotipo 14 ( $a^1 a^2$ ). Morfotipo 22 ( $b^1 b^2$ ). Morfotipo 23 ( $c^1 c^2$ ). Morfotipo 39 ( $d^1 d^2$ ). Morfotipo 44 ( $e^1 e^2$ ). Morfotipo 62 ( $f^1 f^2$ ).

Realizado por: Amancha. D, 2023



El género *Fusarium* es un grupo de hongos filamentosos ampliamente distribuidos en el suelo y plantas. Debido a su capacidad de crecer a 37°C, son considerados oportunistas son saprófitas, anamórficas que tienen cepas patogénicas y no patogénicas, tiene varios miembros patógenos de plantas que ocasionan la marchitez vascular en sus diversas etapas de crecimiento y tienen la capacidad de desarrollar o no una etapa de reproducción sexual de acuerdo con la especie, en campo se puede identificar fácilmente puesto que forma heridas hundidas de color negro con tonalidades marrones en la base de los tallos, además, puede manifestarse como manchas rojizas en los pecíolos cercanos a la copa de la planta y, en ocasiones se presentan masas de micelios rosadas con tonalidades lila o blancas inclusive que crecen en la base de los esquejes o en la copa de una planta Buechel (2018), además tiene una distribución cosmopolita es decir que se puede encontrar en una extensa variedad de suelos como habitante natural, también se registra como patógeno en una vasta y diversa gama de plantas hospedantes con base en propiedades morfológicas (Berruezo, 2018).

Las colonias de *Fusarium* sp. infectan la planta hospedera por medio de la germinación de las clamidosporas que son estructuras de resistencia que puede encontrarse en el suelo por casi diez años, además la infección en la planta hospedera se origina como repuesta a exudados de raíces primarias y secundarias, luego de la germinación las hifas se adhieren y ingresan en la epidermis, asimismo tienen la posibilidad de ingresar mediante heridas autogénicas, antrópicas o por nemátodos, una vez en la planta se mueve hacia el tejido vascular por colonización intercelular de los vasos del xilema y los invade una vez que están maduros y se sitúa en ellos, coloniza los vasos del xilema por crecimiento del micelio o por medio del transporte pasivo de los microconidios producidos en estos vasos, lo que genera una colonización inmediata y discontinua, al cortarse la base del cuello y durante la raíz principal, gracias a dichos ataques se obstruye el paso libre de algunas sustancias nutritivas hacia las raíces y la planta sucumbe (Pfenning , y otros, 2012).

**Morfotipo T:** *Trichoderma* sp.

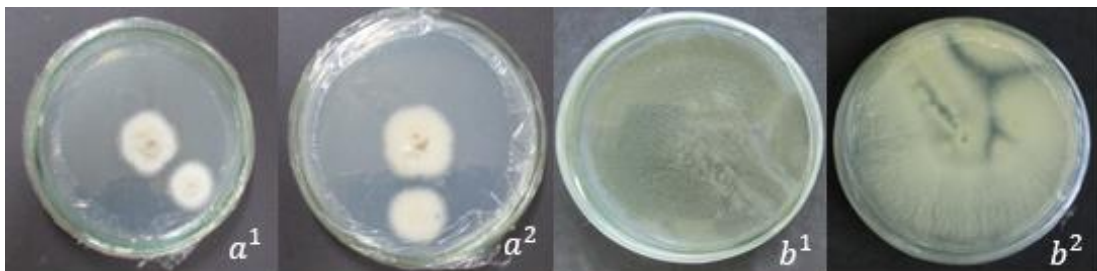
Las cepas pertenecientes al **Morfotipo T**, presentaron forma irregular y circular; elevación umbilicada, plana y convexa; borde ondulado y entero; superficie polvorienta, nubosa y rugosa; el color observado en el anverso de la colonia tiene algunas variedades entre las que podemos mencionar el color blanco (#dcdaca), verde (#2f6109), café (#7c470f) y amarillo (#f7c202); en

el reverso de igual manera existe una variedad entre los que se encuentran un tono marrón (#f9813b), blanco (#dcdaca) y amarillo ghee (#fddf71).

**Tabla 12-3:** Características culturales de las cepas del género *Trichoderma* sp.

Morf.	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Color Anverso	Color Reverso
T2	Irregular	Plana	Ondulado	Rugosa	Verde	Blanco
T12	Irregular	Umbilicada	Ondulado	Rugosa	Verde	Marrón Otoñal
T42	Circular	Convexa	Entero	Nubosa	Blanco	Blanco
T61	Circular	Convexa	Entero	Rugosa	Verde	Blanco

**Realizado por:** Amancha. D, 2023.



**Ilustración 12-3:** Características culturales de las cepas del género *Trichoderma* sp. crecidos en el medio de cultivo PDA incubados a 25°C en condiciones de oscuridad, con 10 días de edad. Morfotipo 42 ( $a^1 a^2$ ). Morfotipo 61 ( $b^1 b^2$ ).

**Realizado por:** Amancha. D, 2023.

Las especie de *Trichoderma* predominan en ecosistemas terrestres (bosques o suelos agrícolas), tienen bajo requerimientos son filamentosos anamórficos, heterótrofos, aerobios, con una pared celular compuesta por quitina, de un crecimiento rápido que puede emplear una gran variedad de sustratos complejos como celulosa, quitina, pectina y almidón como fuente de carbono, además presentan micelio septado, conidias generalmente ovaladas, conidióforo hialino no verticilado, fiálides singulares o en grupos, conidias unicelulares coloreadas, la colonia muestra un color blanquecino en los primero días para luego tornarse de color verde, amarillo y verde amarillento

con abundante esporulación, también es un hongo es saprofítico, lo cual concuerda con lo mencionado por Transito María (2014), además la mayoría de cepas de *Trichoderma* sp. no poseen etapa sexual, por lo que producen únicamente esporas asexuales, sin embargo, se conoce la etapa sexual de unas pocas cepas, pero no han sido consideradas para propósitos de biocontrol.

Durante su desarrollo y crecimiento producen hifas de 5 - 10  $\mu\text{m}$  de ancho que conforman el micelio septado, los conidióforos tienen aspecto cónico, además producen cantidad de conidios asexuales unicelulares de color verde o hialinos, lisos o con paredes muy poco ásperas, subglobosos, cilíndricos, oblongos, con diámetro promedio de 3 a 5  $\mu\text{m}$ , los cuales se forman a partir de células conidiógenas y fiálides (singulares o en grupos), que se ubican en los extremos de los conidióforos, los cuales son hialinos muy ramificados y no verticilados. Además, este hongo puede producir clamidosporas (unicelulares), globosas en sustratos naturales, las que pueden ser intercalares y, en ocasiones, terminales en los extremos de las hifas, de tono verde y menores de 15  $\mu\text{m}$  de diámetro. Estas esporas pueden perdurar a través del tiempo, por ello son consideradas estructuras de sobrevivencia (Maurício Conrado Meyer, 2019).

El género *Trichoderma* sp. muestra una enorme capacidad de colonizar la rizosfera de plantas y varios sustratos con diferentes propiedades, además varias cepas viven en climas templados y suelos ácidos; no obstante, tienen la posibilidad de crear estructuras de resistencia como clamidosporas y microesclerocios, por lo tanto, son capaces de sobrevivir en condiciones bastante adversas, además poseen enorme potencial de biocontrol de fitopatógenos que crecen en altas temperaturas, suelos salinos o alcalino y en condiciones de baja humedad. Dichos hongos se alimentan absorbiendo nutrientes por medio de sus hifas, para atravesar la pared celular y utilizar los componentes como nutrientes, los sustratos de elevado peso molecular se hidrolizan a moléculas más pequeñas lo que quiere decir que los hongos liberan enzimas extracelulares que, cuanto más distintas y numerosas, proporcionará más grandes ventajas para vivir en ambientes con diferentes condiciones (Maurício Conrado Meyer, 2019).

Una de las propiedades más importantes del género *Trichoderma* es su capacidad para parasitar hongos, ejemplificando *Trichoderma virens* tiene la capacidad de enrollar, penetrar y eliminar el contenido citoplasmático de *Rhizoctonia solani*, esto se debe a la función de generar metabolitos que son capaces de inhibir el crecimiento de *Rhizoctonia solani* y *Monilinia fruticola*. Estudios ecofisiológicos han manifestado que, en mayor o menor medida, cada una de las especies de *Trichoderma* son parásitos efectivos de hongos fitopatógenos y oomicetos Druzhinina et al.,

(2018), como estrategia de nutrición biotrófica, además tienen la posibilidad de alimentarse de biomasa fúngica y oomicetos muertos, por lo cual es más conveniente usar el concepto micotrofia para conceptualizar este estilo de vida común en especies de *Trichoderma* (Mauricio Conrado Meyer, 2019).

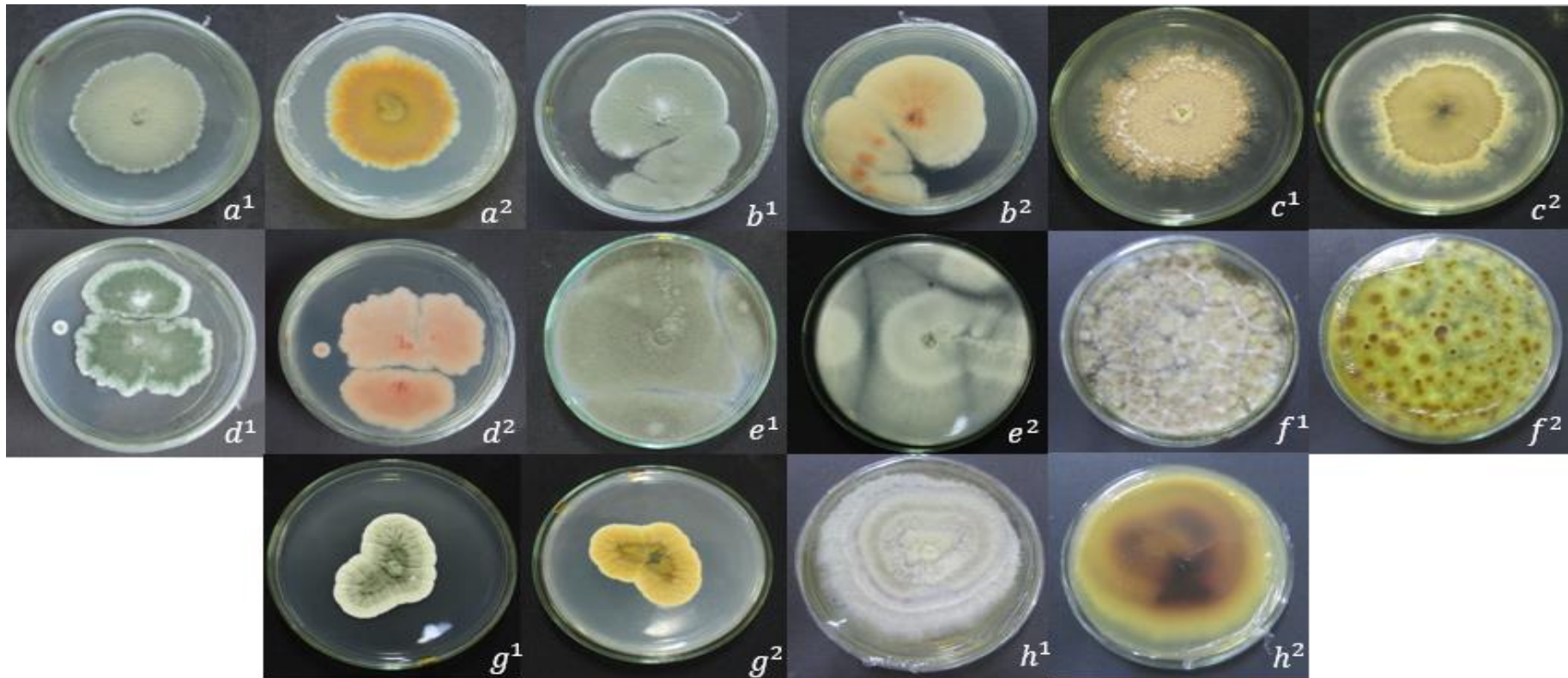
**Morfotipo PE:** *Penicillium* sp.

Las cepas pertenecientes al **Morfotipo PE**, presentaron forma irregular y circular; elevación pulvinada y convexa; borde ondulado y entero; superficie lisa y rugosa; el color observado en el anverso de la colonia el que predominó fue el color blanco (#dcdaca); en el reverso de igual manera existe una variedad entre los que se encuentran un tono marrón (#f9813b) y amarillo pika (#d6c800).

**Tabla 13-3:** Características culturales de las cepas del género *Penicillium* sp.

<b>Morf.</b>	<b>Forma</b>	<b>Elevación</b>	<b>Borde</b>	<b>Superficie</b>	<b>Color Anverso</b>	<b>Color Reverso</b>
<b>T1</b>	Circular	Convexa	Ondulado	Rugosa	Verde	Marrón
<b>T13</b>	Irregular	Plana	Ondulado	Polvorienta	Verde Oscuro	Blanco
<b>T17</b>	Irregular	Plana	Ondulado	Polvorienta	Verde	Salmon
<b>T27</b>	Irregular	Convexa	Ondulado	Polvorienta	Café	Marrón
<b>T30</b>	Irregular	Plana	Ondulado	Rugosa	Verde	Blanca
<b>T31</b>	Irregular	Convexa	Ondulado	Rugosa	Verde	Marrón
<b>T38</b>	Irregular	Convexa	Ondulado	Nubosa	Marrón Topo	Marrón Cacao
<b>T54</b>	Irregular	Umbilicada	Ondulado	Nubosa	Amarillo Pomelo	Amarillo Ghee

**Realizado por:** Amancha. D, 2023.



**Ilustración 13-3:** Características culturales de las cepas del género *Penicillium* sp. crecidos en el medio de cultivo PDA incubados a 25°C en condiciones de oscuridad, con 10 días de edad. Morfotipo 1 ( $a^1 a^2$ ). Morfotipo 13 ( $b^1 b^2$ ). Morfotipo 17 ( $c^1 c^2$ ). Morfotipo 27 ( $d^1 d^2$ ). Morfotipo 30 ( $e^1 e^2$ ). Morfotipo 31 ( $f^1 f^2$ ). Morfotipo 38 ( $g^1 g^2$ ). Morfotipo 54 ( $h^1 h^2$ ).

Realizado por: Amancha, D, 2023.

El género *Penicillium* sp. es un hongo su temperatura óptima de crecimiento es de 20-30 °C, aunque dependiendo de la especie puede crecer en el intervalo de 5-37 °C, produciendo la alteración de alimentos en refrigeración; también tolera grandes variaciones de pH entre 3,5-10, aunque crece mejor y más rápido a pH cercano a 4, sus esporas se encuentran en forma de bioaerosol en el aire, con una concentración ambiental más o menos estable a lo largo del año, aunque se dan concentraciones pico en invierno y primavera, de crecimiento relativamente rápido que está presente en todos los ambientes, como en los cultivos de ajo, invade tubérculos, aprovechando heridas o cualquier condición de estrés durante la germinación, brota y crece, esto provoca lesiones amarillas cubiertas de moho blanco que luego se pone verde (por fructificaciones), lo que impide que el tubérculo germine y si lo hace, tiene poco vigor hasta la muerte (Karina Astorga-Quirós, et al, 2013).

*Penicillium* sp. es uno de los hongos más comunes en una amplia variedad de hábitats, tiene una distribución mundial y un gran impacto económico en la vida humana, este género es de gran importancia en campos diversos, como el deterioro de los alimentos, la biotecnología, las enfermedades de las plantas y medicina, actualmente hay 83 especies aceptadas. Algunas de estas especies, clasificadas como patógenos precosecha y poscosecha, pueden conducir a una severa disminución de los cultivos alimentarios. *Penicillium* también puede producir una amplia gama de metabolitos secundarios, incluidas varias micotoxinas dañinas, compuestos antibacterianos y antifúngicos, inmunosupresores y agentes reductores del colesterol. El mejor ejemplo de un fármaco derivado de un hongo es la penicilina, el primer antibiótico de la historia. La biosíntesis de varios metabolitos secundarios, como las micotoxinas, depende de varios parámetros ambientales, incluidos los sustratos, el pH, la temperatura, la actividad del agua y las interacciones con otros microorganismos y las interacciones de estos diferentes factores en el entorno natural (Christelle El Hajj Assaf, et al, 2020).

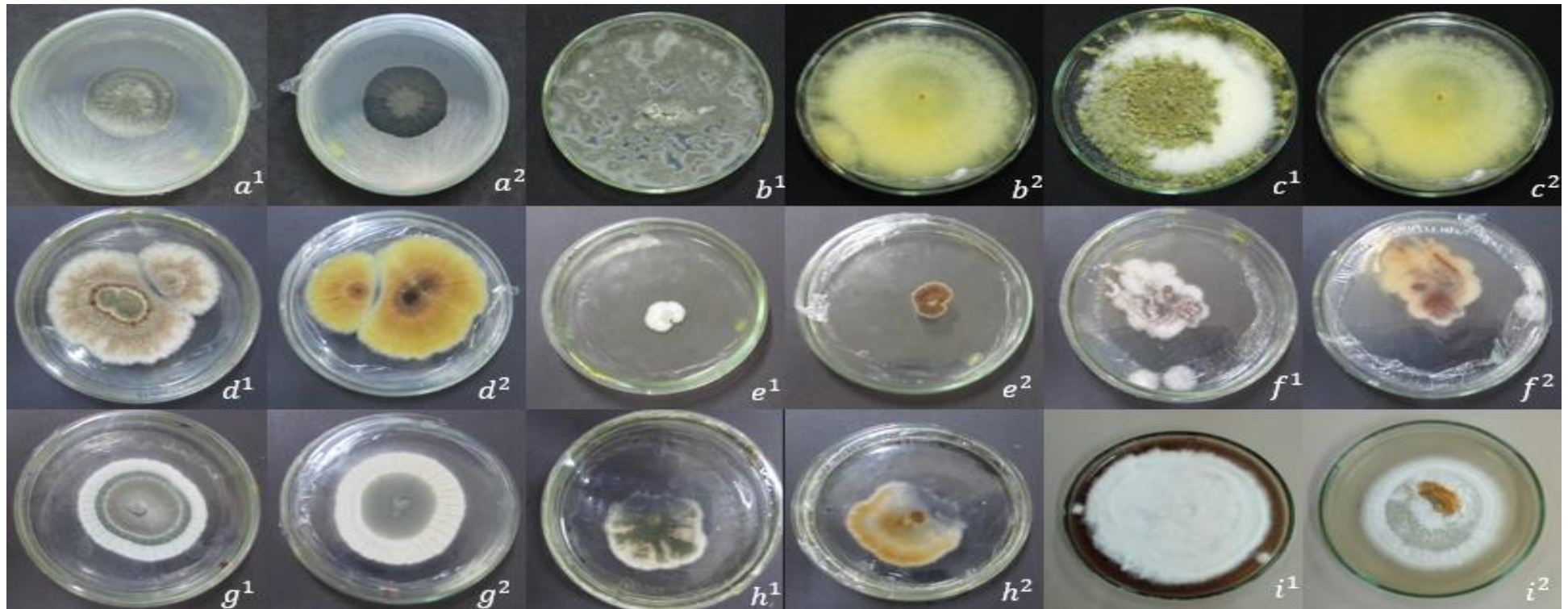
**Morfotipo A:** *Aspergillus* sp.

Las cepas pertenecientes al **Morfotipo A**, presentaron forma irregular, filamentoso y circular; elevación plana, umbilicada y convexa; borde ondulado, filamentoso y entero; superficie nubosa y rugosa; el color observado en el anverso de la colonia varía entre el color blanco (#dcdaca), negro () y verde (#2f6109); en el reverso de igual manera existe una variedad entre los que se encuentran un tono marrón (#f9813b), negro (), café (#7c470f), anaranjado (#e99e18), blanco (#dcdaca), marrón otoñal (#ae4305) y amarillo (#e99e18).

**Tabla 14-3:** Características culturales de las cepas del género *Aspergillus* sp.

<b>Morf.</b>	<b>Forma</b>	<b>Elevación</b>	<b>Borde</b>	<b>Superficie</b>	<b>Color Anverso</b>	<b>Color Reverso</b>
<b>T8</b>	Circular	Plana	Entero	Rugosa	Negro	Negro
<b>T24</b>	Irregular	Plana	Ondulado	Rugosa	Verde	Amarillo
<b>T25</b>	Irregular	Plana	Ondulado	Rugosa	Verde	Blanca
<b>T41</b>	Filamentoso	Umbilicada	Filamentosa	Rugosa	Verde	Marrón Otoñal
<b>T45</b>	Irregular	Convexa	Ondulado	Nubosa	Blanco	Café
<b>T55</b>	Irregular	Umbilicada	Ondulado	Nubosa	Blanco	Anaranjado
<b>T56</b>	Circular	Convexa	Entero	Rugosa	Verde	Blanco
<b>T65</b>	Filamentoso	Umbilicada	Filamentosa	Rugosa	Verde	Marrón Otoñal
<b>T66</b>	Circular	Convexa	Entero	Nubosa	Blanco	Blanco
<b>T68</b>	Circular	Convexa	Entero	Rugosa	Blanco	Blanco

Realizado por: Amancha. D, 2023.



**Ilustración 14-3:** Características culturales de las cepas del género *Aspergillus* sp. crecidos en el medio de cultivo PDA incubados a 25°C en condiciones de oscuridad, con 10 días de edad. Morfotipo\_8 ( $a^1 a^2$ ). Morfotipo\_24 ( $b^1 b^2$ ). Morfotipo\_25 ( $c^1 c^2$ ). Morfotipo\_41 ( $d^1 d^2$ ). Morfotipo\_45 ( $e^1 e^2$ ). Morfotipo\_55 ( $f^1 f^2$ ). Morfotipo\_56 ( $g^1 g^2$ ). Morfotipo\_65 ( $h^1 h^2$ ). Morfotipo\_66 ( $i^1$ ). Morfotipo\_68 ( $i^2$ ).

**Realizado por:** Amancha. D, 2023.



El género *Aspergillus* sp. fue descrito por primera vez en 1729 por P. A. Micheli, quien comprobó que la cabeza conidial de este hongo se parecía a un "aspergillum" (instrumento utilizado para dispersar agua bendita) (Luis Alcalá et al, 2019). Se conocen unas 900 especies de *Aspergillus*, que Rapper y Fennell clasifican en 18 grupos. Esta clasificación se basa en las siguientes características morfológicas del hongo: tamaño y forma de las cabezas conidiales, morfología de los conidióforos, fiálides y métulas, y en la presencia de células de Hülle y de esclerocios (Luis Alcalá et al, 2019).

El color de la colonia varía dependiendo de la especie, verde-amarillento (*A. flavus*), negro (*A. niger*), marrón (*A. terreus*) las cuales coinciden con lo mencionado por (Pfenning , y otros, 2012), además la coloración aparece casi siempre en todas las estructuras aéreas, tanto en el micelio como en las cabezas conidiales, además *Aspergillus* sp. es uno de los principales hongos productores de micotoxinas. Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos y secretados por el hongo durante el proceso de degradación de la materia orgánica, como mecanismo de defensa frente a otro microorganismo (Luis Alcalá et al, 2019).

### 4.3. Caracterización molecular

#### 4.3.1. Secuenciación de nucleótidos obtenidos de MACROGEN COREA

**Tabla 15-3:** Resultado del análisis BLAST

Código de morfotipo	Código	Max score	Query cover	% identidad	e-evalue	Género
M1	1-d	361	100%	85.47%	6,00E-95	<i>Penicillium</i>
M2	2-d	484	100%	97.86%	0	<i>Trichoderma</i>
M3	3-d	767	100%	98.61%	0	<i>Colletotrichum</i>
M4	4-d	241	98%	87.68%	0	<i>Phomopsis</i>
M5	5-d	255	81%	83.90%	3E-63	<i>Colletotrichum</i>
M7	7-d	420	96%	90.57%	1,00E-12	<i>Scedosporium</i>
M8	8-d	701	99%	100.00%	0	<i>Aspergillus</i>
M9	9-d	276	95%	84.62%	2E-69	<i>Scedosporium</i>
M10	10-d	536	100%	97.76%	0	<i>Scedosporium</i>
M11	11-d	313	89%	93.84%	1E-80	<i>Paramyrothecium</i>
M12	12-d	483	100%	100.00%	0	<i>Trichoderma</i>

<b>M13</b>	13-d	61.7	100%	92.68%	0	<i>Penicillium</i>
<b>M14</b>	14-d	750	100%	99.76%	0	<i>Fusarium</i>
<b>M15</b>	15-d	137	100%	100%	0	<i>Paramyrothecium</i>
<b>M16</b>	16-d	335	100%	92.15%	0	<i>Colletotrichum</i>
<b>M17</b>	17-d	432	100%	95.47%	1E-112	<i>Penicillium</i>
<b>M18</b>	18-d	235	100%	97.86%	0	<i>Phomopsis</i>
<b>M20</b>	20-d	654	100%	97.68%	0	<i>Purpureocillium</i>
<b>M21</b>	21-d	345	100%	93.90%	0	<i>Paramyrothecium</i>
<b>M22</b>	22-d	243	100%	90.91%	0	<i>Fusarium</i>
<b>M23</b>	23-d	543	100%	90.57%	0	<i>Fusarium</i>
<b>M24</b>	24-d	234	100%	100.00%	0	<i>Aspergillus</i>
<b>M25</b>	25-d	343	100%	94.62%	0	<i>Aspergillus</i>
<b>M26</b>	26-d	545	100%	97.76%	0	<i>Paramyrothecium</i>
<b>M27</b>	27-d	236	100%	93.84%	0	<i>Penicillium</i>
<b>M28</b>	28-d	389	100%	100.00%	2E-49	<i>Scedosporium</i>
<b>M30</b>	29-d	489	100%	92.68%	0	<i>Penicillium</i>
<b>M31</b>	30-d	398	100%	99.76%	0	<i>Penicillium</i>
<b>M32</b>	31-d	276	100%	100%	0	<i>Colletotrichum</i>
<b>M33</b>	32-d	536	100%	92.15%	0	<i>Scedosporium</i>
<b>M34</b>	33-d	313	100%	95.47%	0	<i>Paramyrothecium</i>
<b>M35</b>	34-d	483	100%	97.86%	0	<i>Colletotrichum</i>
<b>M36</b>	35-d	61.7	100%	98.61%	0	<i>Colletotrichum</i>
<b>M37</b>	36-d	750	100%	97.68%	2E-69	<i>Phomopsis</i>
<b>M38</b>	37-d	767	100%	93.90%	0	<i>Penicillium</i>
<b>M39</b>	38-d	241	100%	90.91%	0	<i>Fusarium</i>
<b>M40</b>	39-d	255	100%	90.57%	0	<i>Paramyrothecium</i>
<b>M41</b>	40-d	303	100%	100.00%	0	<i>Aspergillus</i>
<b>M42</b>	41-d	420	100%	94.62%	0	<i>Trichoderma</i>
<b>M43</b>	42-d	549	100%	97.76%	0	<i>Phomopsis</i>
<b>M44</b>	43-d	239	100%	93.84%	0	<i>Fusarium</i>
<b>M45</b>	44-d	630	100%	100.00%	0	<i>Aspergillus</i>
<b>M54</b>	45-d	439	100%	92.68%	0	<i>Penicillium</i>
<b>M55</b>	46-d	412	100%	99.76%	1,00E-112	<i>Aspergillus</i>
<b>M56</b>	47-d	320	100%	100%	0	<i>Aspergillus</i>
<b>M61</b>	48-d	430	100%	92.15%	0	<i>Trichoderma</i>
<b>M62</b>	49-d	278	100%	95.47%	0	<i>Fusarium</i>
<b>M65</b>	50-d	493	100%	97.86%	0	<i>Aspergillus</i>
<b>M66</b>	51-d	439	100%	98.61%	0	<i>Aspergillus</i>
<b>M68</b>	52-d	542	100%	97.68%	0	<i>Aspergillus</i>

Realizado por: Amancha. D, 2023.

**Tabla 16-3:** Resultado del análisis BLAST: Filo, Clase, Orden, Familia, Género y especie sugerida.

<b>Código morfotipo</b>	<b>Phylum</b>	<b>Clase</b>	<b>Orden</b>	<b>Familia</b>	<b>Género</b>	<b>Especie sugerida</b>
<b>M1</b>	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	<i>Aspergillaceae</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i> sp.
<b>M2</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	<i>Hypocreaceae</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma atroviride</i>
<b>M3</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Glomerellales	<i>Glomerellaceae</i>	<i>Colletotrichum</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
<b>M4</b>	Ascomycota	Sordariomycete	Diaporthales	<i>Valsaceae</i>	<i>Phomopsis</i>	<i>Phomopsis</i> sp.
<b>M5</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Glomerellales	<i>Glomerellaceae</i>	<i>Colletotrichum</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
<b>M7</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	<i>Microascaceae</i>	<i>Scedosporium</i>	<i>Scedosporium apiospermum</i>
<b>M8</b>	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	<i>Aspergillaceae</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<b>M9</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	<i>Microascaceae</i>	<i>Scedosporium</i>	<i>Scedosporium apiospermum</i>
<b>M10</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	<i>Microascaceae</i>	<i>Scedosporium</i>	<i>Scedosporium apiospermum</i>
<b>M11</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	<i>Stachybotryaceae</i>	<i>Paramyrothecium</i>	<i>Paramyrothecium</i> sp.
<b>M12</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	<i>Hypocreaceae</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma</i> sp.
<b>M13</b>	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	<i>Aspergillaceae</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i> sp.
<b>M14</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	<i>Nectriaceae</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>
<b>M15</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	<i>Stachybotryaceae</i>	<i>Paramyrothecium</i>	<i>Paramyrothecium</i> sp.
<b>M16</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Glomerellales	<i>Glomerellaceae</i>	<i>Colletotrichum</i>	<i>Colletotrichum magnum</i>
<b>M17</b>	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	<i>Aspergillaceae</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i> sp.
<b>M18</b>	Ascomycota	Sordariomycete	Diaporthales	<i>Valsaceae</i>	<i>Phomopsis</i>	<i>Phomopsis</i> sp.
<b>M20</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	<i>Ophiocordycipitaceae</i>	<i>Purpureocillium</i>	<i>Purpureocillium</i> sp.
<b>M21</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	<i>Stachybotryaceae</i>	<i>Paramyrothecium</i>	<i>Paramyrothecium</i> sp.
<b>M22</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	<i>Nectriaceae</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
<b>M23</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	<i>Nectriaceae</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>

<b>M24</b>	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	<i>Aspergillaceae</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i> sp.
<b>M25</b>	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	<i>Aspergillaceae</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i> sp.
<b>M26</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	<i>Stachybotryaceae</i>	<i>Paramyrothecium</i>	<i>Paramyrothecium</i> sp.
<b>M27</b>	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	<i>Aspergillaceae</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i> sp.
<b>M28</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	<i>Microascaceae</i>	<i>Scedosporium</i>	<i>Scedosporium</i> apiospermum
<b>M30</b>	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	<i>Aspergillaceae</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i> sp.
<b>M31</b>	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	<i>Aspergillaceae</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i> chrysogenum
<b>M32</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Glomerellales	<i>Glomerellaceae</i>	<i>Colletotrichum</i>	<i>Colletotrichum</i> sp.
<b>M33</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	<i>Microascaceae</i>	<i>Scedosporium</i>	<i>Scedosporium</i> apiospermum
<b>M34</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	<i>Stachybotryaceae</i>	<i>Paramyrothecium</i>	<i>Paramyrothecium</i> sp.
<b>M35</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Glomerellales	<i>Glomerellaceae</i>	<i>Colletotrichum</i>	<i>Colletotrichum</i> magnum
<b>M36</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Glomerellales	<i>Glomerellaceae</i>	<i>Colletotrichum</i>	<i>Colletotrichum</i> sp.
<b>M37</b>	Ascomycota	Sordariomycete	Diaporthales	<i>Valsaceae</i>	<i>Phomopsis</i>	<i>Phomopsis</i> sp.
<b>M38</b>	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	<i>Aspergillaceae</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i> sp.
<b>M39</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	<i>Nectriaceae</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i> oxysporum
<b>M40</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	<i>Stachybotryaceae</i>	<i>Paramyrothecium</i>	<i>Paramyrothecium</i> sp.
<b>M41</b>	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	<i>Aspergillaceae</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i> steynii
<b>M42</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	<i>Hypocreaceae</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma</i> harzianum
<b>M43</b>	Ascomycota	Sordariomycete	Diaporthales	<i>Valsaceae</i>	<i>Phomopsis</i>	<i>Phomopsis</i> sp.
<b>M44</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	<i>Nectriaceae</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i> moniliforme
<b>M45</b>	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	<i>Aspergillaceae</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i> sp.
<b>M54</b>	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	<i>Aspergillaceae</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i> sp.
<b>M55</b>	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	<i>Aspergillaceae</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i> sp.
<b>M56</b>	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	<i>Aspergillaceae</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i> sp.
<b>M61</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	<i>Hypocreaceae</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma</i> atroviride
<b>M62</b>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	<i>Nectriaceae</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i> oxysporum

<b>M65</b>	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	<i>Aspergillaceae</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus steynii</i>
<b>M66</b>	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	<i>Aspergillaceae</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i> sp.
<b>M68</b>	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	<i>Aspergillaceae</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i> sp.

**Realizado por:** Amancha. D, 2023.

#### 4.4. Análisis de la diversidad fúngica asociada a las diferentes etapas del compost

El resultado de los aislados del compost entre sus etapas nos indica que con un 18,76 % de los aislados del presente estudio corresponden al género *Aspergillus* sp. el cual fue el aislado con mayor frecuencia, posteriormente le siguieron los géneros *Penicillium* sp. (15,62%), *Trichoderma* (15,62 %), el género *Scedosporium* sp. (12,54 %), los géneros *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Paramyrothecium* sp., con 9,32%. Entre los géneros con menor frecuencia se encontraron *Phomopsis* (6,32%) y *Purpureocillium* sp. (3,11 %).

**Tabla 17-3:** Porcentaje de microorganismos fúngicos aislados de tres etapas diferentes de compostaje.

	Gaushi	
	Morfotipos	Porcentaje
<i>Aspergillus</i>	175	18,76
<i>Colletotrichum</i>	87	9,32
<i>Fusarium</i>	87	9,32
<i>Paramyrothecium</i>	87	9,32
<i>Penicillium</i>	146	15,65
<i>Purpureocillium</i>	29	3,11
<i>Scedosporium</i>	117	12,54
<i>Trichoderma</i>	146	15,65
<i>Phomopsis</i>	59	6,32

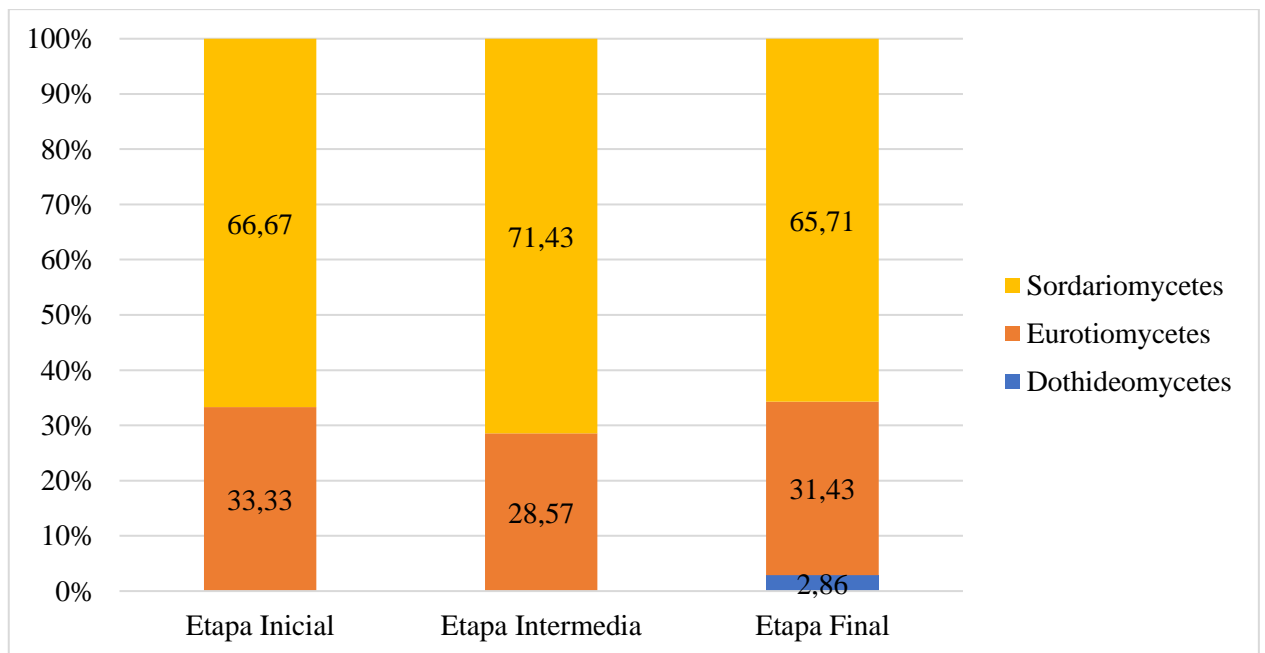
**Realizado por:** Amancha. D, 2023.

##### 4.4.1. Abundancia relativa a nivel de filo, clase, orden, familia y género con relación a las tres etapas.

En el presente trabajo investigativo se determinó la abundancia de los morfotipos caracterizados con filo, clase, orden, familia y género con relación a las tres etapas de los cuales se encontró que a nivel de filo el más representativo en las tres etapas de compostaje fue el filo Ascomycota representando el 100% de las especies encontradas.

A nivel de clase, tres clases estuvieron presentes en las tres etapas de compostaje las cuales son Sordariomycetes, Eurotiomycetes y Dothideomycetes.

Durante la primera etapa los microorganismos a nivel de clase presentaron los siguientes valores Sordariomycetes (66,67%) siendo la clase de mayor abundancia durante esta etapa, la clase que le sigue en abundancia fue la Eurotiomycetes (33,33%) y Dothideomycetes no tuvo presencia durante esta etapa, en la segunda etapa los microorganismos a nivel de clase presentaron los siguientes valores Sordariomycetes (71,43%) siendo la clase de mayor abundancia durante esta etapa y teniendo el valor con mayor frecuencia en relación a la primera y tercera etapa, la clase que le sigue en abundancia fue la Eurotiomycetes (28,57%) teniendo el menor abundancia en comparación con la primera y tercera etapa y Dothideomycetes no tuvo presencia durante esta etapa, en la tercera etapa los microorganismos a nivel de clase presentaron los siguientes valores Sordariomycetes (65,71%) siendo la clase de mayor abundancia durante esta etapa, la clase que le sigue en abundancia fue la Eurotiomycetes (31,43%) y Dothideomycetes si tuvo presencia durante esta etapa con un valor de (2,86%) como se muestra en la (**Gráfico 15-3**).

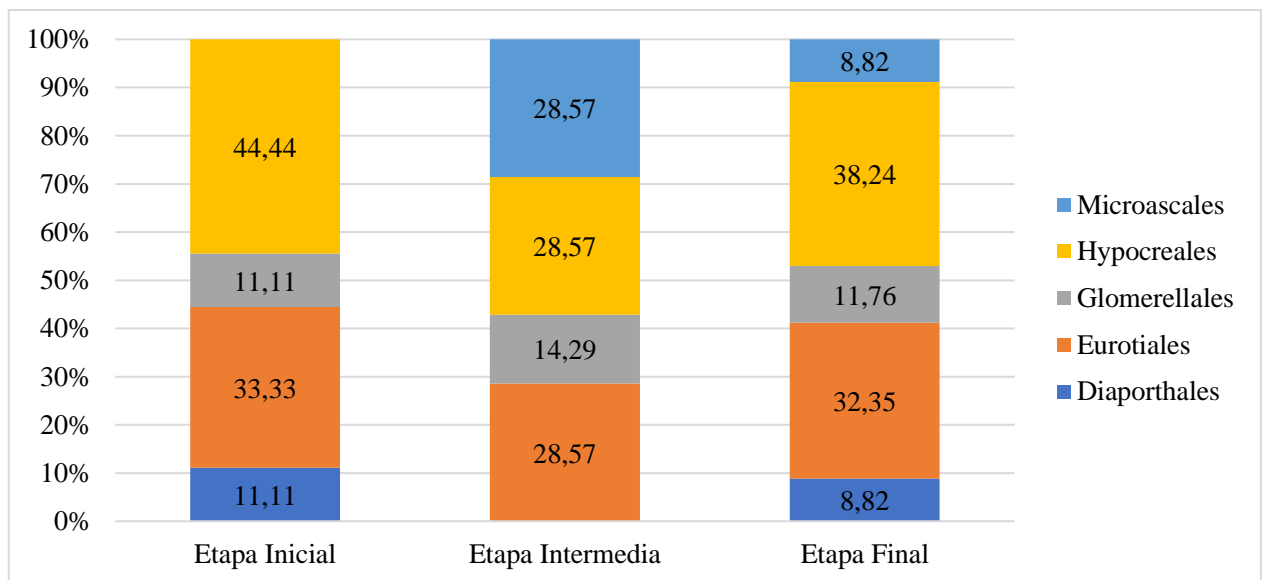


**Ilustración 15-3:** Abundancia relativa a nivel de clase de los microorganismos fúngicos de tres etapas diferentes de compostaje.

**Realizado por:** Amancha. D, 2023.

A nivel de orden, cinco ordenes estuvieron representes los cuales son: Hypocreales, Eurotiales, Diaporthales, Glomerellales y Microascales.

Durante la primera etapa los microorganismos a nivel de orden presentaron los siguientes valores Hypocreales (44,44%) siendo el orden de mayor abundancia durante esta etapa, el orden que le sigue en abundancia fue Eurotiales (33,33%), los órdenes Diaporthales (11,11%) y Glomerellales (11,11%) fueron los que menor abundancia presentaron en cuanto al orden Microascales no tuvo presencia durante esta etapa, en la segunda etapa los microorganismos a nivel de orden presentaron los siguientes valores Hypocreales (28,57%), Eurotiales (28,57%) y Microascales (28,57%) siendo los órdenes de mayor abundancia durante esta etapa, el orden que le siguen en abundancia fue Glomerellales (14,29%), el orden Diaporthales no tuvo presencia durante esta etapa, en la tercera etapa los microorganismos a nivel de orden presentaron los siguientes valores Hypocreales (38,24%) siendo el orden de mayor abundancia durante esta etapa, el orden que le sigue en abundancia fue Eurotiales (32,35%), el orden Glomerellales (11,16%) es el que les sigue en lo que a abundancia se refiere y los órdenes Diaporthales (8,82%) y Microascales (8,82%) fueron los que menor abundancia presentaron durante la tercera etapa cabe indicar que en esta etapa los cinco ordenes estuvieron presentes indicándonos que hay una mayor abundancia en al final del procesos del compostaje como se muestra en la (Gráfico 16-3).



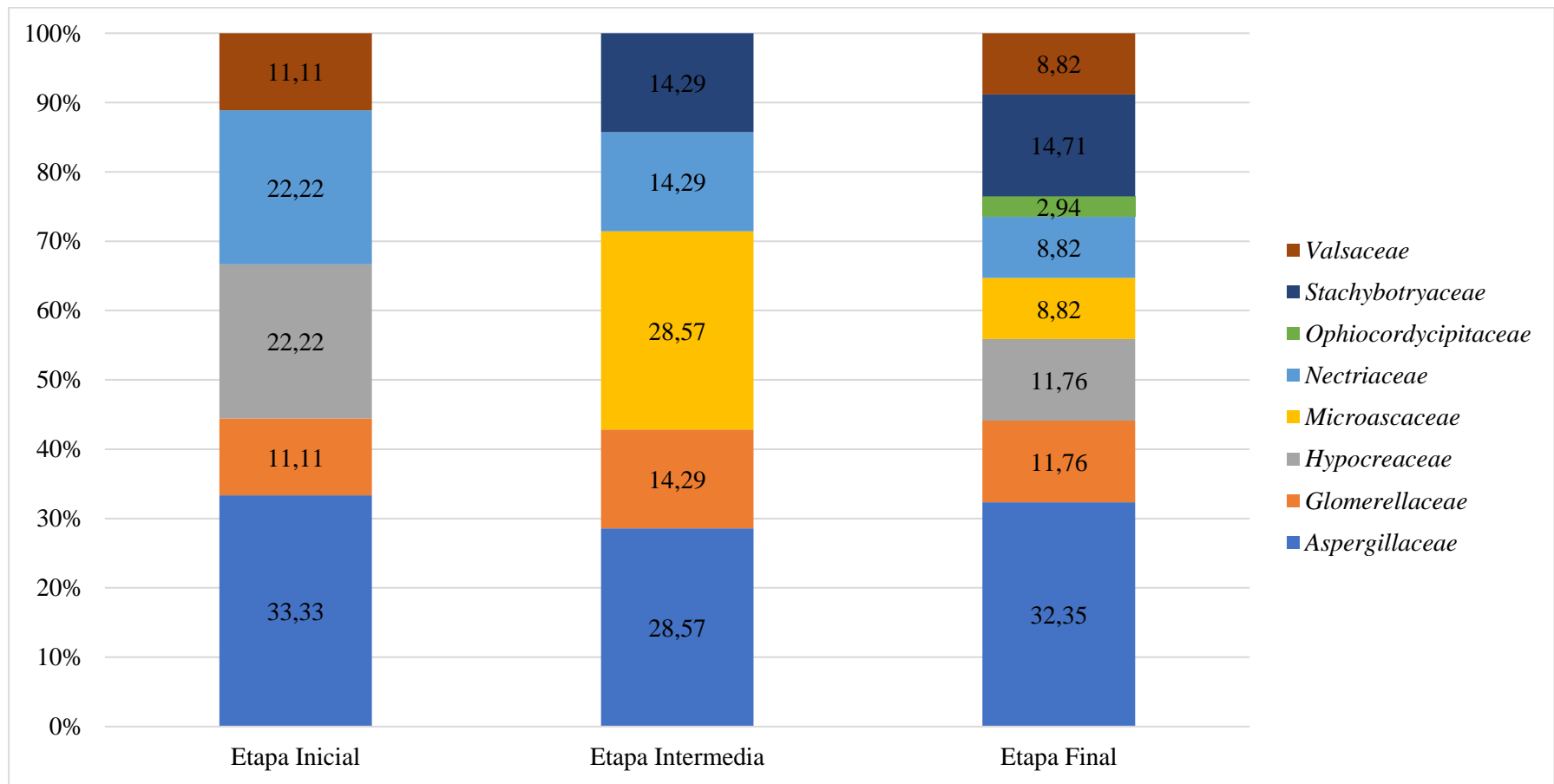
**Ilustración 16-3:** Abundancia relativa a nivel de orden de los microorganismos fúngicos de tres etapas diferentes de compostaje.

**Realizado por:** Amancha. D, 2023.



A nivel de familia, ocho familias estuvieron representes los cuales son: *Aspergillaceae*, *Glomerellaceae*, *Microascaceae*, *Nectriaceae*, *Hypocreaceae*, *Stachybotryaceae*, *Ophiocordycipitaceae* y *Valsaceae*.

Durante la primera etapa los microorganismos a nivel de familia presentaron los siguientes valores *Aspergillaceae* (33,33%) siendo la familia de mayor abundancia durante esta etapa, la familia *Nectriaceae* (22,22%) y *Hypocreaceae* (22,22%) son las que le siguen en cuanto a abundancia se refiere, con menor abundancia durante esta etapa se presentan las familias *Glomerellaceae* (11,11%) y *Valsaceae* (11,11%) y las familias *Microascaceae*, *Stachybotryaceae* y *Ophiocordycipitaceae* no tuvieron presencia durante esta etapa, en la segunda etapa los microorganismos a nivel de familia presentaron los siguientes valores *Aspergillaceae* (28,57%) y *Microascaceae* (28,57%) siendo las familia de mayor abundancia durante la segunda etapa, las familias *Nectriaceae* (14,29%), *Stachybotryaceae* (14,29%) y *Glomerellaceae* (14,29%) son las que le siguen en cuanto a abundancia se refiere, las familias *Hypocreaceae*, y *Valsaceae* y *Ophiocordycipitaceae* no tuvieron presencia durante esta etapa, en la tercera etapa los microorganismos a nivel de familia presentaron los siguientes valores *Aspergillaceae* (32,35%) siendo la familia de mayor abundancia durante la tercera etapa, la familia *Stachybotryaceae* (14,71%) le sigue en cuanto a abundancia se refiere, las familias *Glomerellaceae* (11,76%) y *Hypocreaceae* (11,76%) son las que les siguen en cuanto a abundancia se refiere, con menor abundancia se encuentran las familias *Nectriaceae* (14,29%), *Microascaceae* (28,57%) y *Ophiocordycipitaceae* (2,29%) durante esta etapa las ocho familias tienen presencia evidenciando que es la etapa que mayor abundancia y diversidad presenta como se observa en la (**Gráfico 17-3**).



**Ilustración 17-3:** Abundancia relativa a nivel de familia de los microorganismos fúngicos de tres etapas diferentes de compostaje.

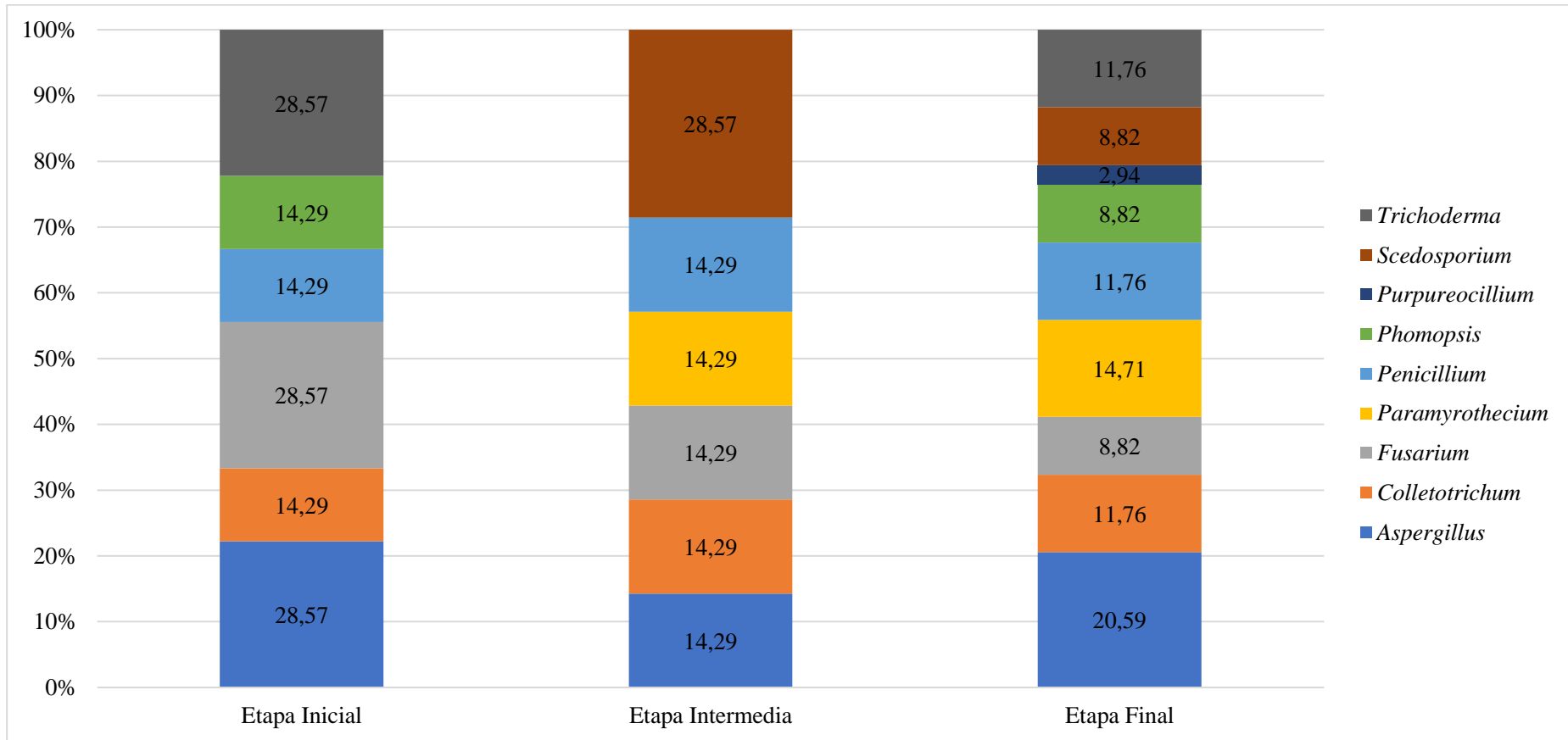
Realizado por: Amancha. D, 2023.

A nivel de género, ocho géneros estuvieron representes los cuales son: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Paramyrothecium*, *Penicillium*, *Scedosporium*, *Phomopsis* y *Purpureocillium*.

Durante la primera etapa los microorganismos a nivel de género presentaron los siguientes valores *Aspergillus* (28,57%), *Trichoderma* (28,57%) y *Fusarium* (28,57%) siendo los géneros de mayor abundancia durante esta etapa, los géneros *Phomopsis* (14,29%), *Penicillium* (14,29%) y *Colletotrichum* (14,29%) son los que le siguen en cuanto a abundancia se refiere, los géneros *Paramyrothecium*, *Scedosporium* y *Purpureocillium* no tuvieron presencia durante esta etapa.

En la segunda etapa los microorganismos a nivel de género presentaron los siguientes valores *Scedosporium* (28,57%) siendo el género de mayor abundancia durante esta etapa, los géneros *Penicillium* (14,29%), *Paramyrothecium* (14,29%), *Fusarium* (14,29%), *Colletotrichum* (14,29%) y *Aspergillus* (14,29%) son las que le siguen en cuanto a abundancia se refiere, los géneros *Phomopsis* y *Purpureocillium* no tienen presencia durante esta etapa.

En la tercera etapa los microorganismos a nivel de género presentaron los siguientes valores *Aspergillus* (20,59%) siendo el género de mayor abundancia durante esta etapa, el género *Paramyrothecium* (14,71%) es el que le sigue en cuanto a abundancia se refiere, los géneros *Trichoderma* (11,76%), *Penicillium* (11,76%) y *Colletotrichum* (11,76%) son los que les siguen en cuanto a abundancia se refiere, los géneros que menor abundancia presentan son *Scedosporium* (8,82%), *Phomopsis* (8,82%), *Fusarium* (8,82%) y *Purpureocillium* (2,94%), durante esta etapa los ocho géneros tienen presencia evidenciando que es la etapa que mayor abundancia y diversidad presenta como se observa en la (**Gráfico 18-3**).

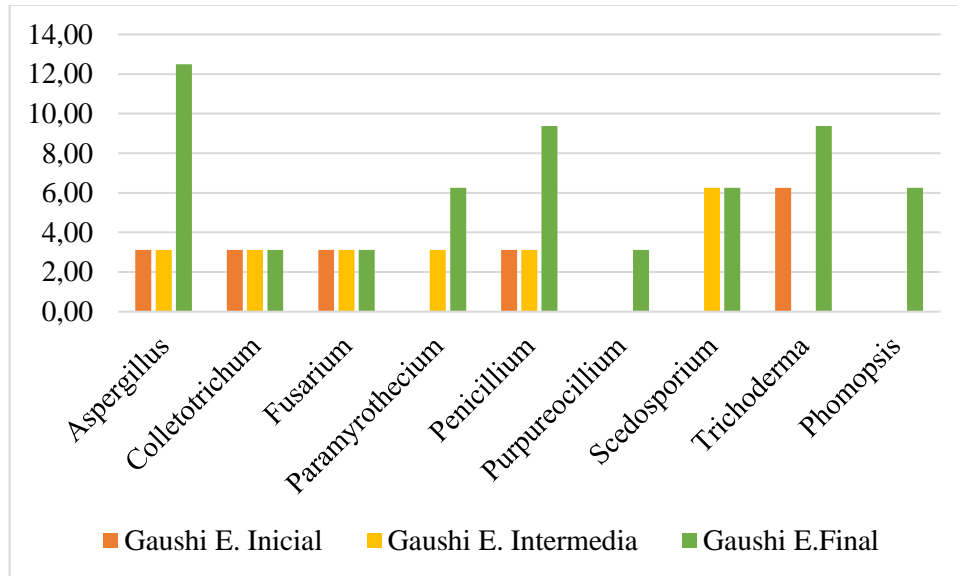


**Ilustración 18-3:** Abundancia relativa a nivel de género de los microorganismos fúngicos de tres etapas diferentes de compostaje.

Realizado por: Amancha. D, 2023.

#### 4.5. Abundancia de los morfotipos por etapa

El registro de datos nos indica que hay 933 microorganismos de los cuales se agruparon en 52 morfotipos diferentes del total de morfotipos diferentes se logró identificar 9 géneros como podemos observar en la gráfica (**Gráfico 19-3**).



**Ilustración 19-3:** Abundancia de los microorganismos fúngicos en las tres etapas de compostaje.

**Realizado por:** Amancha. D, 2023.

El género *Aspergillus* sp. con un porcentaje de 12,50% tuvo mayor abundancia en la tercera etapa en comparación con la primera y segunda etapa en las cuales tuvo un porcentaje de 3,13%. El género *Colletotrichum* con un porcentaje de 3,13%, tuvo una abundancia equitativa en las tres etapas del compostaje, el género *Fusarium* con un porcentaje de 3,13%, tuvo una abundancia equitativa en las tres etapas de compostaje, el género *Paramyothecium* con un 3,135 presentó la menor abundancia en la segunda etapa y en la tercera etapa con un porcentaje de 6,25% presentó la mayor abundancia en contraste con la primera etapa en la cual no se lo aisló, el género *Penicillium* con un porcentaje de 9,38% presentó mayor abundancia en la tercera etapa en contraste con la primera y segunda etapa en las cuales este género mantuvo un porcentaje equitativo con un valor de 3,13%, el género *Purpureocillium* 3,13% solo se presentó en la tercera etapa, el género *Scedosporium* con un 6,25% se presentó en la segunda y tercera etapa en contraste con la primera etapa en la cual no se encontró, el género *Trichoderma* con un 9,38 %

tuvo mayor presencia en la tercera etapa y con un porcentaje de 6,25% correspondiente a la primera etapa contrastó con la ausencia que presentó en la segunda etapa, el género *Phomopsis* con un 6,25% solo se presentó en la tercera etapa.

#### 4.6. Diversidad de los microorganismos fúngicos asociados a tres etapas diferentes de compost

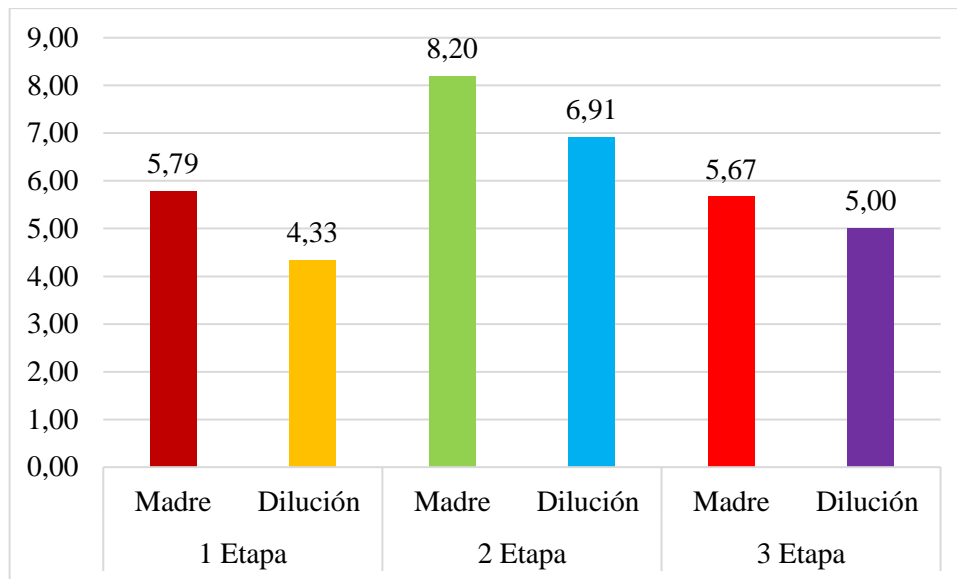
##### Índice de riquezas de especies:

En la primera etapa la solución madre tuvo un valor de índice de riqueza de 5,79 y para la dilución  $10^{-1}$  tuvo un valor de riqueza de 4,33, en lo que respecta a la segunda etapa para la solución madre tuvo un valor de riqueza de 8,20 y para la dilución  $10^{-1}$  tuvo un valor de riqueza de 6,91, para la última etapa la solución madre tuvo un valor de riqueza de 5,67 y para la dilución  $10^{-1}$  tuvo un valor de riqueza de 5,00, siendo la segunda etapa la que presentó el índice de riqueza más alto en la solución madre, por otro lado en la primera etapa en la dilución  $10^{-1}$  se presentó el valor más bajo de riqueza (**Tabla 18-3**).

**Tabla 18-3:** Índice de riqueza en las diferentes etapas

Etapa	Tipo	Observado	Estimado	s.e	LCL	UCL
<b>1 Etapa</b>	Suspensión Madre	5,67	5,79	1,75	5,67	9,21
	Dilución	4,33	4,33	1,30	4,33	6,88
<b>2 Etapa</b>	Madre	7,33	8,20	3,39	7,33	14,84
	Dilución	6,33	6,91	3,03	6,33	12,85
<b>3 Etapa</b>	Madre	5,67	5,67	1,22	5,67	8,06
	Dilución	5,00	5,00	1,31	5,00	7,57

Realizado por: Amancha. D, 2023.



**Ilustración 20-3:** Índices de riqueza en las tres etapas de compost.

**Realizado por:** Amancha. D, 2023.

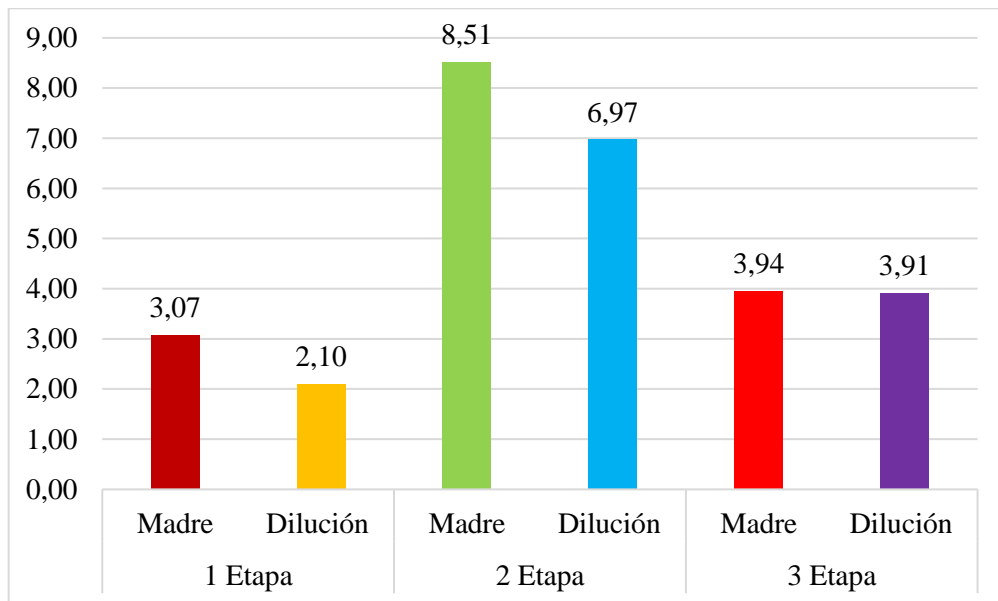
### Índice de Shannon:

En la primera etapa la solución madre tuvo un valor de índice de Shannon de 3,07 y para la dilución  $10^{-1}$  tuvo un valor de Shannon de 2,10, en lo que respecta a la segunda etapa para la solución madre tuvo un valor de Shannon de 8,51 y para la dilución  $10^{-1}$  tuvo un valor de riqueza de 6,97, para la última etapa la solución madre tuvo un valor de Shannon de 3,94 y para la dilución  $10^{-1}$  tuvo un valor de riqueza de 3,91, siendo la segunda etapa la que presentó el índice de Shannon más alto en la solución madre, por otro lado en la primera etapa en la dilución  $10^{-1}$  se presentó el valor más bajo de Shannon (**Tabla 19-3**).

**Tabla 19-3:** Índice de Shannon respecto a las tres etapas del compost

<b>Etap</b>	<b>Tipo</b>	<b>Observado</b>	<b>Estimado</b>	<b>s.e</b>	<b>LCL</b>	<b>UCL</b>
<b>1 Etapa</b>	Madre	2,10	3,07	0,99	1,14	5,01
	Dilución	1,71	2,10	0,56	1,01	3,19
<b>2 Etapa</b>	Madre	4,66	8,51	2,86	2,92	14,11
	Dilución	3,62	6,97	2,67	1,74	12,20
<b>3 Etapa</b>	Madre	3,52	3,94	0,61	2,74	5,15
	Dilución	3,48	3,91	0,68	2,58	5,24

Realizado por: Amancha. D, 2023.



**Ilustración 21-3:** Índice de Shannon en las tres etapas del compost.

Realizado por: Amancha. D, 2023.

### Índice de Simpson:

En la primera etapa la solución madre tuvo un valor de índice de Simpson de 2,50 y para la dilución  $10^{-1}$  tuvo un valor de Simpson de 1,73, en lo que respecta a la segunda etapa para la solución madre tuvo un valor de Simpson de 9,40 y para la dilución  $10^{-1}$  tuvo un valor de Simpson de 8,49, para la última etapa la solución madre tuvo un valor de riqueza de 3,20 y para la dilución

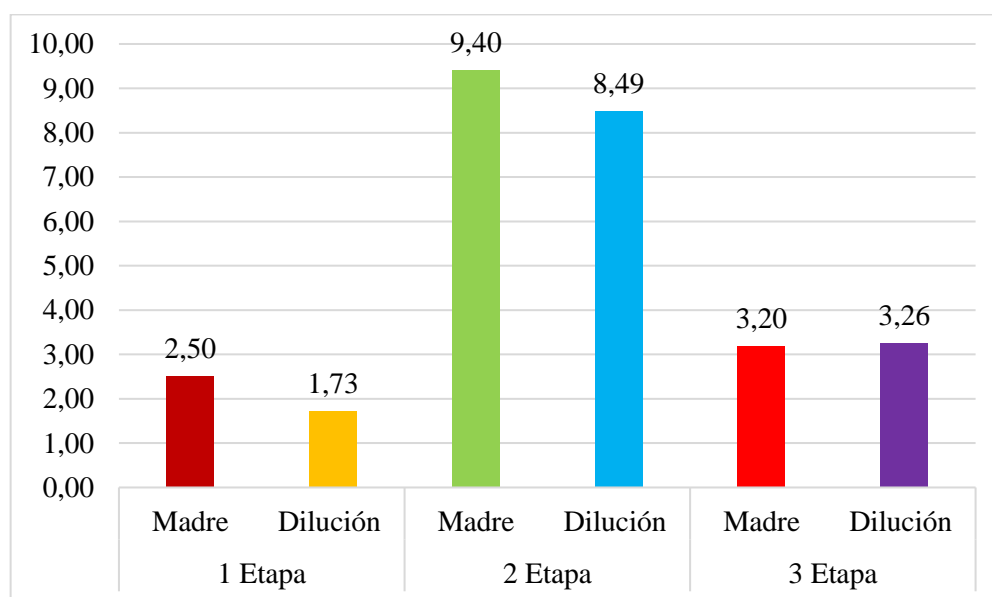


10<sup>-1</sup> tuvo un valor de Simpson de 3,26, siendo la segunda etapa la que presentó el índice de Simpson más alto en la solución madre, por otro lado en la primera etapa en la dilución 10<sup>-1</sup> se presentó el valor más bajo de Simpson (**Tabla 20-3**).

**Tabla 20-3:** Índice de Simpson en las tres etapas del compost.

<b>Etapa</b>	<b>Tipo</b>	<b>Observado</b>	<b>Estimado</b>	<b>s.e</b>	<b>LCL</b>	<b>UCL</b>
<b>1 Etapa</b>	Madre	1,72	2,50	0,13	0,63	1,13
	Dilución	1,46	1,73	0,65	0,58	3,00
<b>2 Etapa</b>	Madre	3,76	9,40	1,06	0,78	4,69
	Dilución	3,04	8,49	0,22	0,80	1,66
<b>3 Etapa</b>	Madre	2,78	3,20	0,65	1,92	4,48
	Dilución	2,88	3,26	0,65	1,98	4,53

Realizado por: Amancha. D, 2023.



**Ilustración 22-3:** índice de Simpson en las tres etapas de compost.

Realizado por: Amancha. D, 2023.

Según Casco (2008), el compostaje es una compleja interacción entre los restos orgánicos, los microorganismos, la aireación y la reproducción de calor, es importante entender como influyen

el ecosistema microbiano para mejorar la eficiencia del procesos de compostaje y permitir su control, los microorganismos son los elementos clave de este proceso por su actividad y naturaleza, En el presente estudio se obtuvieron 933 microorganismos de los cuales se agruparon en 52 morfotipos diferentes del total de morfotipos diferentes se logró identificar 9 géneros, en la distribución por etapas como se indica en la gráfica se encontró un valor de 146 morfotipos diferentes en la primera etapa de las cuales se aisló 13 al final se logró identificar 6 géneros diferentes en la primera etapa, respecto a la segunda etapa se encontró un valor de 315 morfotipos diferentes en la segunda etapa de las cuales se aisló 13 al final se logró identificar 7 géneros en la segunda etapa, respecto a la tercera etapa se encontró un valor de 388 morfotipos diferentes en la primera etapa de las cuales se aisló 26 al final se logró identificar 9 géneros diferentes en la tercera etapa, se tomó como referencia el nivel de abundancia para los morfotipos que se caracterizaron. Los microorganismos fúngicos que fueron aislados pertenecen al filo Ascomycota los géneros más representativos del filo fueron: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Paramyrothecium*, *Penicillium*, *Scedosporium*, *Phomopsis* y *Purpureocillium*.

El filo Ascomycota conforman el grupo de hongos más grande, diverso y ecológicamente importante; representan 60% de las especies y 72% de los géneros descritos Medel, R., G et al, (1999). Su distribución es cosmopolita y se han encontrado colonizando tanto hábitats continentales como marinos, ya sea como saprobios, parásitos o simbioses, lo cual les permite participar en interacciones ecológicas importantes para el funcionamiento de los ecosistemas. La característica básica de los ascomicetos es la presencia de ascos, un asco que básicamente es una célula en forma de saco que contiene un número determinado (normalmente 8) de ascosporas, formadas tras la cariogamia y la meiosis. Dicho de otro modo: un asco es un tipo particular de meiosporangio es importante recalcar que los términos meiosporangio y meióspora hacen referencia a estructuras obtenidas tras un proceso sexual, con cariogamia y meiosis. Paralelamente, mitosporangio y mitóspora se refieren a estructuras asexuales, obtenidas por mitosis. Salvo las levaduras, el micelio de los ascomicetos es septado; cada septo presenta un poro central que permite a los núcleos emigrar de una célula a otra. Cerca del poro hay unas estructuras, los cuerpos de Woronin, cuya función no es del todo clara. Las paredes celulares constan sobre todo de quitina. No presentan zoosporas flageladas. Además de la reproducción sexual por ascosporas, los ascomicetos pueden reproducirse asexualmente mediante conidios. En muchas ocasiones, la fase sexual y la asexual no coinciden en el tiempo, y eso da lugar a una gran confusión a la hora de clasificarlos (MYCO, 2016).

El filo Ascomycota gracias adaptaciones morfológicas, de alimentación, reproductivas y hasta de asociación con otros seres vivos, los podemos encontrar en un amplio rango de condiciones y de sustratos, cumpliendo un excelente rol como descomponedores de materia orgánica. Al igual que la mayoría de los hongos, los ascomicetos son esenciales dentro de los ecosistemas, ayudan al ciclo de nutrientes gracias a la descomposición de la materia orgánica, a la vez que sirven de alimento para numerosas especies como caracoles, insectos, roedores y animales de mayor tamaño como el chanco salvaje y el ciervo. Otra de las razones que los vuelve tan importantes en la naturaleza es su capacidad de establecer relaciones con otras especies (Marfetan, 2017).

El compost es un hábitat favorable para la proliferación de microorganismos y en las partículas que lo forman se desarrollan microcolonias. Las concentraciones de materia orgánica son relativamente altas en el compost, el cual favorece el desarrollo de microorganismos heterótrofos. Los actinomicetos muestran una actividad intensa y un crecimiento rápido sobre sustratos fácilmente utilizables que están disponibles en forma de manto vegetal, excrementos de animales y restos de animales muertos. Una actividad intermitente, con periodos inactivos de reposo, es una característica de los organismos zimógenos, como serían *Penicillium* y *Aspergillus* (Pascual Raquel et al, 2016).

El género *Aspergillus* sp. presente en el compost de Gaushi es un hongo filamentoso saprófito que desempeña un rol esencial en la degradación de la materia orgánica. Su hábitat natural es el suelo donde sobreviven y se desarrollan sobre materia en descomposición. Este género es uno de los más abundantes en la naturaleza y puede encontrarse en cualquier ambiente; se reproduce por conidios cuya germinación da origen a las hifas. Para su crecimiento, *Aspergillus* requiere de una humedad relativa entre el 70 y 90 %, contenido de agua en la semilla entre 15 y 20 % y un rango de temperatura amplio (0 a 45 °C). Según (Méndez, 2018) el género *Aspergillus* sp. disminuyó el tiempo de degradación del bagazo de maguey mezcalero, pero no del bagazo de caña. *Aspergillus* sp. actuó con mayor grado de degradación en ambos bagazos evaluados, lo cual se vio reflejado en los menores valores de materia y carbono orgánicos total.

En el presente trabajo también se encontró *Penicillium* sp., dicho género se caracteriza por formar conidios en una estructura ramificada semejante a un pincel que termina en células conidiógenas llamadas fiálides. Las hifas alcanzan un diámetro entre tres micrómetros y tienen septos, las paredes de las méticas pueden ser lisas o rugosas, mientras que la pared de las fiálides es siempre lisa. Según Gutiérrez (2011), son hongos con la capacidad de sintetizar enzimas celulolíticas

estables y altamente activas que pueden llegar a degradar los componentes de los residuos agrícolas, desarrollando así alternativas limpias y naturales para controlar la acumulación de residuos vegetales y desechos de otros cultivos este género es de gran importancia en varios campos, como el deterioro de los alimentos, la biotecnología, la fitopatología y la medicina, también puede ocasionar una variada gama de metabolitos secundarios, incluidas numerosas micotoxinas perjudiciales, antibacterianas y compuestos antifúngicos, inmunosupresores y agentes de reducción de colesterol. El ejemplo más icónico de un fármaco de procedencia fúngico es la penicilina, la primera sustancia antibiótica en la historia.

Entre uno de los géneros más abundantes que apareció en el presente estudio se encuentra *Fusarium* sp. puede producir varios tipos de elementos que le permiten propagarse en la naturaleza, macroconidias, microconidias y clamidosporas las cuales pueden estar todos presentes en algunas especies mientras que no lo están en otras (L, Lombard, et al., 2016).

El presente estudio presentó hongos antagonistas como es el caso de *Trichoderma* sp. *Trichoderma* es un hongo cosmopolita cuya importancia radica en su capacidad de adaptación y producción de metabolitos, como enzimas, compuestos promotores de crecimiento vegetal, y compuestos volátiles, entre otros, de interés biotecnológico y ambiental. Este género es utilizado como agente de biocontrol contra hongos fitopatógenos debido a sus múltiples mecanismos de acción, destacando la antibiosis, el micoparasitismo, la competencia por espacio y nutrientes, y la producción de metabolitos secundarios. Varias especies de *Trichoderma* se han utilizado en sistemas acoplados de fermentación en sustratos sólidos o cultivos sumergidos, para degradar residuos lignocelulósicos y para generar energías alternativas como etanol. Los biorreactores como sistemas de fermentación optimizan las condiciones del cultivo para favorecer la generación de biomasa y metabolitos (Hernández, 2019).

También en el presente estudio se encontraron otros hongos antagonistas como es el caso de *Purpureocillium* sp. el cual tiene un enorme potencial como agente de control biológico para el control de los nemátodos de los nudos de las raíces la producción de hongos como agentes de biocontrol se desarrolla empleando fermentación sobre sustratos sólidos (Pfenning , y otros, 2012).

Así también el presente trabajo mostro la presencia de *Scedosporium* sp., están compuestos por diferentes especies, de las cuales tres son patógenas oportunistas clínicamente importantes: *S.*

*apiospermum*, *S. prolificans* y *S. aurantiacum*. Dichas especies generan scedosporiosis especialmente en individuos inmunocomprometidos o pacientes con neutropenia, se encuentra frecuentemente en hábitats humanizados y con presencia de contaminación. Se caracteriza por la presencia de un color marrón o negro en las paredes de las hifas, las conidias o ambas, lo cual se refleja en colonias cuyo color oscila entre verde oliva y gris o negro en las placas de crecimiento, las características microscópicas comunes de *Scedosporium* son: conidióforos hialinos (largos o cortos), pie de la conidia con anillos hialinos abultados y conidias procedentes de un solo pie con final sub hialino ovalado que puede ser único o arracimado (Moreno, 2019).

El género *Colletotrichum* estuvo presente en el compost siendo un microorganismo que en la naturaleza vive de la materia orgánica y tiene la capacidad de volverse patógeno, como el agente causal de la antracnosis, prefiriendo atacar tejidos jóvenes y viejos, físicamente débiles. Existen algunos reportes de la patogenicidad de éste, en varias especies frutales como tomate de árbol, aguacate, cítricos, mango, papaya, maracuyá y guayaba, es uno de los hongos con mayor éxito en su estrategia de ataque a los vegetales, debido a que las estrategias físicas y químicas de defensa de las plantas, se presentan cuando la infección ha avanzado significativamente y el hongo ha invadido las células casi en su totalidad, lo que demuestra la efectividad del ataque fitoquímico del hongo que prácticamente pasa desapercibido por las plantas (Herrera, 2016).

La especie del género *Paramyrothecium* (anteriormente en el género *Myrothecium* ) son habitantes comunes del suelo y saprofitos de material vegetal en descomposición en todo el mundo. Son eficientes descomponedores de celulosa y se han utilizado como biopesticidas para el control de malezas, nematodos e insectos (L, Lombard, et al., 2016). Se han asociado con la producción de micotoxinas de tricoteceno macrocíclico (TRI), como verrucarina, roridina, epiroridina, mitoxina B y ácido de epiroridina. Estos compuestos TRI son fitotóxicos y tienen mecanismos citotóxicos en humanos. Su modo de acción les ha permitido ser utilizados como bioherbicidas para diversas malezas.

El conjunto de microorganismos que se desarrolla durante el compostaje influyen en el proceso de compostaje. En el grupo de los microorganismos beneficiosos se encuentran los que biotransforman la materia orgánica en presencia de oxígeno, que conducen a la obtención de compost de calidad; los microorganismos degradadores de compuestos contaminantes, que permiten aplicar el compostaje en biodescontaminación; y los microorganismos que ejercen actividad antagónica frente a patógenos, que contribuyen a la actividad higienizante del

compostaje. Las fluctuaciones de temperatura provocan la sucesión en el tiempo de distintas poblaciones microbianas mesófilas, con crecimiento entre 10 y 40°C, y termófilas, con crecimiento entre 40 y 70°C. Una vez finalizado el proceso, se obtiene un producto humificado estable o maduro en el que los mecanismos de descomposición microbiana no ocurren o lo hacen de forma muy lenta (Casco, 2008).

Los microorganismos pueden actuar sobre estos mineralizándolos o transformándolos parcialmente. Bacterias como *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., el hongo *Aspergillus* y los actinomicetos *Arthrobacter* spp. y *Streptomyces* spp. que están presentes durante el compostaje, tienen reconocida incidencia en procesos de biorremediación en suelos (Casco, 2008).

Por otra parte, en el presente estudio se determinó que la mayor riqueza de especies estuvo presente en la segunda etapa puesto que los microorganismos fúngicos en esa etapa se encuentran atravesado una serie de procesos de biotransformación por el contrario el menor valor de índice de riqueza se ubica en la primera etapa puesto que aun los procesos de biotransformación y degradación se encuentran en una etapa inicial, el índice de riqueza empezó a incrementarse a partir de la segunda etapa esto se da por el aporte de nutrientes provenientes de la materia orgánica ya que si tomamos como referencia Gaushi es una comunidad que mantiene un sistema mecanizado de compostaje el cual no difiere mucho de los materiales utilizados.

## CAPÍTULO V

### 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. CONCLUSIONES

Se aislaron un total 933 microorganismos fúngicos de los cuales se agruparon en 52 morfotipos diferentes, del total de morfotipos diferentes se logró identificar 9 géneros. Muestreados por el número de volteos.

Los microorganismos fúngicos aislados de las tres etapas de compost fueron clasificados en 9 géneros los cuales fueron identificados y caracterizados cultural y molecularmente como: *Aspergillus* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Paramyrothecium* sp., *Penicillium* sp., *Purpureocillium* sp., *Scedosporium* sp., *Trichoderma* sp., y *Phomopsis* sp.

Se encontró diferentes géneros de los cuales mediante la caracterización se llegó a determinar que el género *Aspergillus* sp. (18,76 %) se presentó con mayor frecuencia le siguieron los géneros *Trichoderma* sp. (15,65 %), *Penicillium* sp. (15,65 %), *Scedosporium* sp. (12,54 %), *Colletotrichum* sp. (9,32 %), *Fusarium* sp. (9,32 %), *Paramyrothecium* sp. (9,32 %), *Phomopsis* sp. (6,32 %) y el género que se presentó con menor frecuencia fue *Purpureocillium* sp. (3,11 %).

La biodiversidad fúngica entre las etapas del muestreo fue diferente, siendo la segunda etapa la que mayor índice de riqueza, Shannon y Simpson presentaron; en contraste la primera etapa fue la que presentó los valores más bajos en cuanto a índices mencionados se refiere, lo que nos indica que existe una mayor biodiversidad en la etapa intermedia.

## 5.2. RECOMENDACIONES

Estudiar la interacción de los nueve géneros identificados (*Aspergillus* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Paramyothecium* sp., *Penicillium* sp., *Purpureocillium* sp., *Scedosporium* sp., *Trichoderma* sp. y *Phomopsis* sp.) en el presente estudio en los procesos de compostaje.

Analizar el potencial biocontrolador de los géneros *Purpureocillium* sp. y *Trichoderma* sp. presente en las muestras de compost

Replicar este tipo de estudio en diferentes tipos de abonos orgánicos como lombricompost y bocashi y en otras localidades para determinar la biodiversidad fúngica presente en esos abonos orgánicos.



## **BIBLIOGRAFÍA**

**ALFENAS, A.C; & MAFIA, R.G.** (2016). 59-63, Brasil : 2a Ed. Universidad Federal de Viçosa, 2016, Vol. UFV.

**ARENAS, R.** (2014). Micología Médica Ilustrada, laboratorio y terapéutica. 5. Mexico D.F : Mc Graw Hill Education.

**BARNETT H; & HUNTER B.** (1998). Illustrated genera of imperfect fungi. Minesota, pág. 197. Vol. cuatro.

**BERRUEZO, LORENA.** (2018). “Caracterización morfológica, biológica y molecular de los complejos *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* asociados al cultivo de *Nicotiana tabacum* L. en el Noroeste Argentino”.

**BOHÓRQUEZ, W.** (2019). El proceso de compostaje. Bogota : Ediciones unisalle. 38 p.

**CANDO, MÓNICA Y CÁRDENAS, MARÍA.** (2017). Determinación mediante aislamiento y purificación de hongos. 2017. <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/26368/1/Tesis.pdf>.

**CANNON ET AL.** (2012). págs. 181-213. Vol. 73.

**CASCO, MORENO.** (2008). Compostaje. Madrid : Madrid.

**CHRISTELLE EL HAJJ ASSAF; ET AL.** (2020). Regulation of Secondary Metabolism in the *Penicillium* Genus.

**DE COMPOSTAJE R.E.** (2014). Compost y control biológico. Madrid : s.n.

**ESTRADA, GLORIA; & RAMIREZ, MARTHA.** (2019). Micología General. Manizales : Centro Editorial Universidad Católica de Manizales. págs. 95-96.

**FAO.** (2014). Fundamentos teóricos. Fundamentos teóricos. [En línea] <https://www.fao.org/3/i3388s/I3388S.pdf>.

**FERNADEZ, ANA.** (2014). Métodos para preservar hongos potencialmente toxigénicos. Vol. 45.

**FRAN, FREY.** (2019). MICOLOGÍA|Utilidad Clínica de la Técnica de Microcultivo-Método de Ridell o del Cuadrito.

**FREIRE HARO, DANIELA NICOLE.** (2022). ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD FÚNGICA ASOCIADA A SUELOS AGRÍCOLAS EN CINCO LOCALIDADES DE SANTA CRUZ-PROVINCIA DE GALÁPAGOS.  
File:///C:/RESPALDOS/xavi/Tesis/Documentos%20Ejemplo/Trabajo\_integracion\_curricular-Daniela%20Freire%20(1)%20(1).pdf.

**GUTIÉRREZ, IVONNE.** (2011). DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y CONIDOS DE *Penicillium* sp. AISLADO DE SUELOS DE ARROZ DEL TOLIMA. Tolima : s.n.

**HERNÁNDEZ, JAZMÍN.** (2019). Trichoderma: AGRICULTURAL AND BIOTECHNOLOGICAL IMPORTANCE, AND FERMENTATION SYSTEMS FOR PRODUCING BIOMASS AND ENZYMES OF INDUSTRIAL INTEREST.

**HERRERA, T; & ULLOA, M.** (2016). El Reino Fungi, micología básica y aplicada.

**INSST.** (2022). Agentes biológicos. España : s.n.

**J. S. HAUDENSHIELD, ET AL.** (2018). First Report of *Paramyrothecium roridum* Causing Myrothecium Leaf Spot on.

**JIANG ZHAN, ET AL.** (2021). Efficacy of a Chitin-Based Water-Soluble Derivative in Inducing *Purpureocillium lilacinum* against Nematode Disease (*Meloidogyne incognita*).

**KARINA ASTORGA-QUIRÓS, ET AL.** (2013). Aislamiento e identificación de patógenos de la estirpe silvestre del ajo (*Allium sativum* L.).

**KLICH.** (2002). Identification of Common *Aspergillus* Species. Pág. 166. Vol. 1.

**L, LOMBARD, ET AL.** (2016). Generic hyper-diversity in Stachybotriaceae. Pág. 202. Vol. 36.

**LESCANO, ALFONSO ET AL.** (2015). Caracterización cultural y morfológica e identificación de especies de *Aspergillus*. Vol. 38.

**LUIS ALCALÁ ET AL.** (2019). *Aspergillus* y aspergilosis.

**MAMANI DE MARCHESE, A; & FILIPPONE, M.P.** (2018). Bioinsumos componentes claves de una agricultura sostenible. [https://notablesdelaciencia.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/92661/CONICET\\_Digital\\_Nro.ee07db96-c339-4b9d-a335-62213099a55c\\_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://notablesdelaciencia.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/92661/CONICET_Digital_Nro.ee07db96-c339-4b9d-a335-62213099a55c_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y).

**MANAMGODA ET AL.** (2015). El género *Bipolaris*. Estudios en micología.

**MARFETAN, ARMANDO.** (2017). Trichoderma species associated with acromyrmex ant nests from argentina and first report of trichoderma lentiforme for the country.

**MARTÍ SOLÉ; ET AL.** (2000). Identificación de hongos. Identificación de hongos. [En línea]. [https://www.insst.es/documents/94886/326962/ntp\\_488.pdf/b3aaaa0f-8664-4142-8749-26b0a362c3ed#:~:text=La%20identificaci%C3%B3n%20de%20los%20hongos,muy%20%C3%BAtiles%20para%20la%20identificaci%C3%B3n](https://www.insst.es/documents/94886/326962/ntp_488.pdf/b3aaaa0f-8664-4142-8749-26b0a362c3ed#:~:text=La%20identificaci%C3%B3n%20de%20los%20hongos,muy%20%C3%BAtiles%20para%20la%20identificaci%C3%B3n).

**MAURÍCIO CONRADO MEYER.** (2019). Trichoderma USO NA AGRICULTURA. Brasília : s.n. pág. 183.

**MEDEL, R., G ET AL.** (1999). Especies de Macromicetos citadas de México IX. Ascomycetes. Vol. III.

**MÉNDEZ, ARTEMIO.** (2018). ompostaje de residuos agroindustriales inoculados con hongos.

**MORENO, VIRGINIA.** (2019). DIVERSIDAD FÚNGICA en SUELOS CON DIFERENTES USOS. DIVERSIDAD FÚNGICA en SUELOS CON DIFERENTES USOS. [En línea] <https://scielo.conicyt.cl/pdf/chjaasc/v35n2/0719-3890-chjaasc-00301.pdf>.

**MYCO.** (2016). UNIVERSIDAD DE ALMERÍA. Almeria : s.n.

**NARAYAN PAUL; ET AL.** (2018). First Report on Isolation of Penicillium adametzioides and Purpureocillium lilacinum from Decayed Fruit of Cheongsoo Grapes in Korea.

**ORTIZ PAUCAY; & LISETH.** (2016). BIODIVERSIDAD FÚNGICA EN EL SUELO DEL BOSQUE PROTECTOR AGUARONGO, PROVINCIA DEL AZUAY. BIODIVERSIDAD FÚNGICA EN EL SUELO BOSQUE PROTECTOR AGUARONGO, PROVINCIA DEL AZUAY. [En línea]. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/12814/1/UPS-CT006692.pdf>.

**OSORIO; ET AL.** (2019). Identificación de hongos endófitos presentes en mazorcas de. Bogota : s.n.

**PANTONE.** (2012). C Color. Pantone 2012 C Color. [En línea]. <https://icolorpalette.com/color/pantone-2012-c>.

**PASCUAL RAQUEL; ET AL.** (2016). LA MATERIA ORGÁNICA DEL SUELO PAPEL DE LOS MICROORGANISMOS.

**PEMÁN; & JAVIER.** (2014). Enfermedad fúngica invasora por *Scedosporium*, *Fusarium* y *Mucor*. Págs. 242-248. Vol. 31.

**PFENNING; ET AL.** (2012). Hongos del suelo saprófitos y patógenos de plantas.

**RAMOS BEATRIZ.** (2014). CARACTERIZACIÓN CULTURAL DE DOS CEPAS DE HONGOS PERTENECIENTES A LOS *Beltrania* y *Beltraniella*, en diferentes medios de cultivos.

**ROMÁN, PILAR; & MARTÍNEZ, MARÍA; & PANTOJA, ALBERTO.** (2014). Manual del compostaje del agricultor. Manual del compostaje del agricultor. [En línea]. <https://www.fao.org/3/i3388s/I3388S.pdf>.

**ROSANNE SPRUTE. ET AL.** (2021). Invasive infections with *Purpureocillium lilacinum*: clinical characteristic and outcome of 101 cases from FungiScope and the literature.

**SAG.** (2018). AGRICULTURA ORGÁNICA. [En línea]. [https://www.sag.cl/sites/default/files/agricultura\\_org.\\_nacional\\_bases\\_tecnicas\\_y\\_situacion\\_actual\\_2013.pdf](https://www.sag.cl/sites/default/files/agricultura_org._nacional_bases_tecnicas_y_situacion_actual_2013.pdf).

**SAN MIGUEL CHIMBO; & JOSUE DAVID.** (2021). CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS FÚNGICOS. Riobamba : s.n.

**VELA NÚÑEZ; & PABLO ROBERTO.** (2018). DESARROLLO DE UN PROCESO A ESCALA DE LABORATORIO PARA LA. DESARROLLO DE UN PROCESO A ESCALA DE LABORATORIO PARA LA. [En línea]. <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/10238/2/PG%20784%20TRABAJO%20GRADO.pdf>.

**WHITE, T. J. ET AL.** (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA.

## ANEXOS

### ANEXO A: PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO

Reactivos	Proporciones
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 g
$\text{KNO}_3$	1 g
$\text{MgSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
KCl	0,5 g
Glucosa	0,2 g
Sacarosa	0,2 g
Agar	25 g
Agua destilada	1000 mL

Realizado por: Amancha. D, 2023.

### ANEXO B: RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE COMPOST



Realizado por: Amancha. D, 2023.

## ANEXO C: ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO DE LAS MUESTRAS DE COMPOST



Preparación de las muestras para el análisis físico químico



Muestras reposando a temperatura ambiente



Macerando las muestras



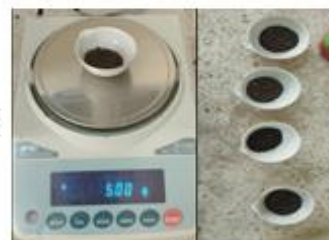
Muestras en reposo



Preparación de materiales para el análisis físico químico



El sustrato se coloca en los recipientes



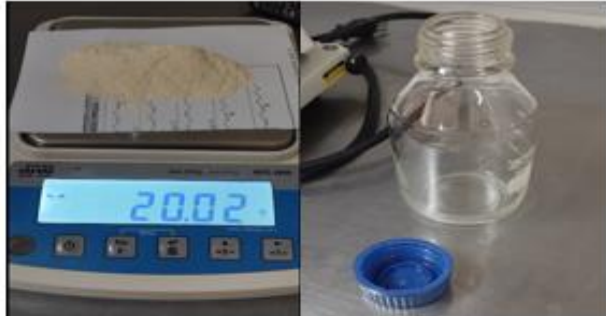
Pesaje de muestras para el porcentaje de materia orgánica



Preparación para análisis de NPK y pH



## ANEXO D: PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO Y DISPENSADO



Preparación de medio de cultivo



Preparación para esterilización de cajas y medio de cultivo



Cajas y medio de cultivo esterilizados en la cabina de flujo



Preparación de cajas y esterilización del medio de cultivo



Dispensado de medio de cultivo



Cajas dispensadas con medio de cultivo

Realizado por: Amancha. D, 2023.

## ANEXO E: EXTRACCIÓN DE ADN Y FORMACIÓN DE PELLET



Extracción de micelio



Incubación



Centrifugación



Se añadió cloroformo-  
alcohol-isoamílico



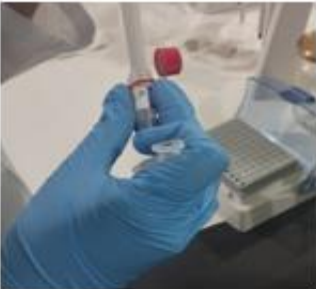
Se agitó en vortex



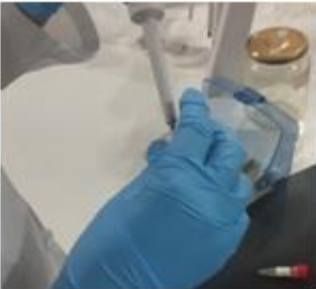
Secado de los pellets

Realizado por: Amancha. D, 2023.

**ANEXO F: PCR Y ELECTROFORESIS**



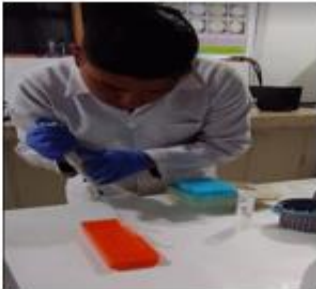
Preparación de Mix



Pipeteado de Mix y ADN en microtúbulos



Se colocó los microtúbulos en el termociclador



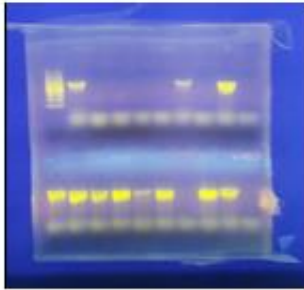
Pipeteado de productos de PCR



Productos de PCR + Loading Buffer colocado en gel de agarosa




Pipeteado de Mix y ADN en microtúbulos




Gel revelado producto de la electroforesis

## ANEXO G: ANÁLISIS QUÍMICO DE LAS MUESTRAS DE COMPOST



**ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE RECURSOS NATURALES**  
**LABORATORIO DE SUELOS**



Nombre del Propietario: Dennys Amancha Fecha de ingreso: 07/12/2022  
Fecha de salida: 12/01/2023

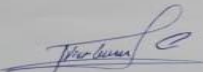
TEMA TIC: "DETERMINACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD FÚNGICA ASOCIADA AL COMPOST DE MUESTRAS RECOLECTADAS EN TRES ETAPAS DIFERENTES, EN LA COMUNIDAD GAUSHI"  
 CARRERA: Ingeniería Agronómica

Ubicación:  
 San José de Gaushi/San Francisco Calpi Riobamba Chimborazo  
 Nombre de la granja Parroquia Cantón Provincia


**RESULTADOS E INTERPRETACIÓN DEL ANALISIS QUIMICO DE COMPOST**

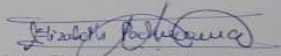
Identificación	pH	% M.O	Cond. Eléct.	% N P K		
				N	P	K
Compost 1ra etapa inicial- Gaushi	9.06 Alc.	16.8 A	5.86 mS/cm Salino	0.98	1.7	1.12
Compost 2da etapa final -Gaushi	9.08 Alc	17.04 A	4.79 mS/cm Salino	0.76	2.0	0.89
Compost 1ra etapa inicia- S. Francisco	8.07 Alc	18.1 A	1.524 uS/cm No salino	0.56	1.5	0.92
Compost 2da etapa final-S. Francisco	7.21 N	19.1 A	12.10 mS/cm Salino	1.12	2.5	1.31

CODIGO:	
N: Neutro	A: alto
S: Suficiente	M: medio
Alc. Alcalino	B: bajo



Ing. Víctor Lindao PhD.  
JEFE DE LABORATORIO





Ing. Elizabeth Pachacama Ch.  
TECNICO DOCENTE

Dirección: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Panamericana Sur Km1 ½. Facultad de Recursos Naturales. Teléfono 2998220 Extensión 418  
 "Apoyando a la producción sana, rentable y amigable con la naturaleza"

Realizado por: Amancha. D, 2023.