PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Biodegradación de Hidrocarburos Totales de Petróleo por Hongos Endófitos de la Amazonia Ecuatoriana

Disertación previa a la obtención del Título de Licenciado en Ciencias Biológicas

FERNANDO JAVIER MARÍN MINDA

Quito, 2018

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Sr. Fernando Javier Marín Minda ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

M.Sc. Alexandra Narváez Trujillo
Directora de la Disertación
Quito, 28 de noviembre de 2018

"La ciencia no es solo una disciplina
de razón, sino también de
romance y pasión."

-Stephen Hawking

AGRADECIMIENTOS

A Alexandra Narváez-Trujillo, directora de mi proyecto de tesis por su incondicional apoyo, motivación, tiempo compartido y por creer en mi desde el primer momento en que me incorporé a su grupo de trabajo, al acogerme en su laboratorio y transmitirme su amor por la ciencia y los hongos endófitos.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por el financiamiento de esta investigación.

A Hugo Navarrete Zambrano y al Centro de Servicios Ambientales y Químicos de la PUCE (CESAQ-PUCE) por su valioso aporte en el análisis de los resultados de este estudio.

A Carolina Portero, por haberme brindado su confianza y por enseñarme todo lo necesario para realizar mi trabajo de titulación de manera exitosa. Por siempre estar dispuesta a brindarme un poco de su tiempo cada vez que lo necesité. En especial le agradezco por su amistad y por siempre ser esa persona que cuida y vela por el bienestar de sus compañeros de trabajo.

A Javier Carvajal, por sus valiosas aportaciones, contribuyendo en la realización de un trabajo de calidad y rigurosidad científica.

A Elisa Jara por su gran apoyo durante la realización del análisis de los resultados de este trabajo.

A mis padres Fernando y Julia, que a pesar de los tiempos difíciles nunca se han rendido conmigo, espero seguir adelante sin decepcionar a su confianza y verdadero amor.

A mis hermanos Pedro y Pablo, compañeros de vida y juegos, quienes me han servido de motivación y a quienes espero haber alentado a seguir adelante y nunca rendirse.

A Elizabeth Veloz por su incondicional apoyo durante todo este tiempo de carrera, haciendo de los momentos duros y difíciles simples tormentas pasajeras, siempre ayudándome a ver esa luz en medio de la oscuridad.

A Eliana Veloz Villavicencio por su amistad, su gran apoyo y ayuda durante la realización de este trabajo, por las risas compartidas y nuestras tardes de fútbol y ciencia. A Caro Castro, Stephy Villota y Sofi López por su apoyo y por ser grandes compañeras tanto de trabajo como de risas en nuestro querido Laboratorio de Biotecnología Vegetal.

A mis compañeros de carrera por todos los buenos momentos compartidos, tanto en clases como en las salidas al campo. La mejor de las suertes en todos sus emprendimientos.

¡Gracias a todos!

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AA	Agar Agua
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNr	Ácido Desoxirribonucleico ribosómico
AEM	Agar Extracto de Malta
ANOVA	Analysis of Variance
APD	Agar Papa Dextrosa
BLAST	Basic Local Aligment Search Tool
BLASTn	Basic Local Aligment Search Tool of nucleotides
CEQCA	Colección de Endófitos Quito Católica
CESAQ	Centro de Servicios Ambientales y Químicos
CG	Cromatografía de Gases
cm^2	Centímetro cuadrado
CV	Coeficiente de variación
DCFIF	Diclorofenol Indofenol
DCM	Diclorometano
FID	Flame Ionization Detector
gtr	General time reversible
HAP	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
HQCA	Herbario Quito-Católica
HTP	Hidrocarburos Totales de Petróleo
ID	Identidad
IR	Espectroscopia Infrarroja
ITS	Internal Transcribed Spacer
Km	Kilómetro
min	Minuto
ml	Mililitro
MSM	Medio de Sales al Mínimo
Muscle	Multiple sequence alignment by log-expectation
O	Oeste
°	Grados

Abreviatura	Significado
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	Partes por millón
PUCE	Pontificia Universidad Católica del Ecuador
RAxML	Randomized Axelerated Maximum Likelihood
rpm	Revoluciones por minuto
S	Sur
Sig	Significancia
SDS	Dodecilsulfato sódico
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TPH	Total Petroleum Hydrocarbon

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS ……..…….……..….vi

1. RESUMEN …..……...…….……..…….1

2. ABSTRACT ....……...…….……..…….2

3. INTRODUCCIÓN ……..……...……..3

3.1 Objetivos ……...……...……...……..…6

3.1.1 Objetivo general ...…….....……...…..6

3.1.2 Objetivos específicos ……...……..……..6

4. MATERIALES Y MÉTODOS …….……..……7

4.1 Sitio de muestreo y colección de muestras vegetales …..……...…..……7

4.2 Aislamiento de hongos endófitos de tejido vegetal……...……...…..7

4.3 Ensayos cualitativos de degradación de petróleo por hongos endófitos..…..8

4.4 Ensayos cuantitativos y evaluación de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP) y cuantificación mediante Espectroscopia Infrarroja (IR) y Cromatografía de Gases (CG) …….……8

4.5 Identificación taxonómica de hongos endófitos ……...……9

4.6 Análisis estadístico ……..……..……..10

5. RESULTADOS ……..……..11

5.1 Identificación de muestras vegetales ……..…….……11

5.2 Aislamiento de hongos endófitos de tejido vegetal ……..…….....11

5.3 Ensayos cualitativos de degradación de petróleo por hongos endófitos..…11

5.4 Ensayos cuantitativos y evaluación de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP) y cuantificación mediante Espectroscopia Infrarroja (IR) y Cromatografía de Gases (CG) …….……..12

5.5 Identificación taxonómica de hongos endófitos …….……12

5.6 Análisis estadístico …….……13

6. DISCUSIÓN …….……14

6.1 Colección de muestras vegetales …….……14

6.2 Aislamiento de hongos endófitos y ensayos cualitativos ……...…….15

6.3 Cuantificación de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP) …...……..16

6.4 identificación taxonómica de hongos endófitos ……..……19

7. CONCLUSIONES ……...23

8. REFERENCIAS ……..……24

9. FIGURAS …….……32

10. TABLAS ……..…….37
11. ANEXOS ……...…….……..45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sitio de colección de muestras vegetales. A. Vista de la localidad "Las Minas" desde el nivel de la carretera. B. Suelo contaminado con petróleo crudo. C. Pequeño riachuelo donde se observa el nivel de contaminación del agua de la zona. ……..……..……...…...32

Figura 2. Figura 2. Ensayo cualitativo de biodegradación de hidrocarburos. A. Control negativo: donde se observa la apariencia inicial del medio de cultivo producto del petróleo crudo **B.** Resultado positivo: apariencia del medio de cultivo al producirse la biodegradación de hidrocarburos por un hongo endófito, en este caso se observa la degradación resultante con *Xylaria* sp. 8, observándose una aclaración total del medio de cultivo después de 10 días de ensayo.……..33

Figura 3. Tasas de remoción de hidrocarburos. Resultados obtenidos tras 30 días de incubación en el medio de cultivo MSM suplementado con petróleo crudo al 1%. Se puede observar los resultados cuantificados por espectroscopia infrarroja en azul (IR) y por cromatografía de gases en rojo (CG) con los 10 y 5 mejores biodegradadores de hidrocarburos respectivamente…...……..……34

Figura 4. Árbol filogenético de máxima verosimilitud de las secuencias ITS de hongos endófitos biodegradadores de hidrocarburos. Los aislados se muestran con el código CEQCA (verde), agrupados en sus respectivo ordenes taxonómicos (amarillo). *Spizellomyces punctatus* fue usado como grupo externo.……...……...…….35

Figura 5. Ordenes taxonómicos de hongos endófitos biodegradadores de hidrocarburos. Porcentajes de hongos clasificados en cada orden (N=53). El 4% de los endófitos identificados no pudieron asignárseles la categoría taxonómica de orden. Los ordenes con mayor número de aislados Diaporthales (26%) y Xylariales (22%).……...…36

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Identificación taxonómica de las plantas colectadas en el campo y número de endófitos aislados por planta……37

Tabla 2. Resultados de bioactividad positiva de hongos endófitos para ensayos cualitativos de biodegradación de hidrocarburos.……..……..39

Tabla 3. Tasas de biodegradación de hidrocarburos cuantificados por espectroscopia infrarroja (IR) y cromatografía de gases (CG)…….41

Tabla 4. Cuantificación de hidrocarburos de petróleo persistentes en el medio de cultivo por cromatografía de gases (CG) después de 30 días de incubación con hongos endófitos……...42

Tabla 5. Identificación taxonómica de los 53 aislados fúngicos endófitos biodegradadores de hidrocarburos……...43

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Cromatogramas resultado de la cuantificación de HTP por cromatografía de gases (CG) de los ensayos cuantitativos. **A.** Resultados de la muestra control (verde), junto con la muestra blanco de DCM (azul), en rojo se observan los picos con los compuestos identificados. **B.** Resultados obtenidos con el hongo endófito *Clonostachys* sp. 2.……...45

Anexo 2. Resultados ANOVA de un factor con los resultados de la cuantificación de HTP por espectroscopia infrarroja……46

Anexo 3. Análisis de comparaciones múltiples de Tukey con los resultados de la cuantificación de HTP por espectroscopia infrarroja..…….47

1. RESUMEN

Se evaluó la capacidad de 133 aislados fúngicos endófitos para biodegradar hidrocarburos. Los hongos endófitos se aislaron de hojas y tallos de 23 plantas que crecían en un hábitat natural contaminado con petróleo crudo localizado en la localidad "Las minas", provincia del Napo, centro norte ecuatoriano. La aptitud de biodegradación fue evaluada mediante un ensayo cualitativo colorimétrico *in vitro* durante 10 días, empleando el medio de sales al mínimo y petróleo crudo como fuente de carbono. La identificación taxonómica de los aislados que presentaron bioactividad en los bioensayos se realizó mediante análisis del gen ITS de la región 18S del ADNr. Con los endófitos de mejores resultados en los ensayos cualitativos previos, se realizaron ensayos cuantitativos *in vitro* durante 30 días. Los hidrocarburos residuales se cunatificaron mediante espectroscopia infrarroja y cromatografía de gases con FID. La tasas máximas de remoción de hidrocarburos totales de petróleo fueron del 99.6% (IR) y 99.8% (CG), correspondiente a los hongos del género *Verticillium* sp. y *Aspergillus* sp. respectivamente. Este es el primer reporte de biodegradación de hidrocarburos de petróleo crudo por hongos endófitos y se sugiere que estos aislados fúngicos son potenciales degradadores de hidrocarburos que pueden ser utilizados en procesos de biorremediación.

Palabras Clave: Hongo endófito, biodegradación, biorremediación, espectroscopia infrarroja, cromatografía de gases, hidrocarburo.

2. *ABSTRACT*

The capacity of 133 endophytes fungal isolates for degrading petroleum hydrocarbons was evaluated. The endophytes were isoltaed from leaf and stem tissues from 23 plants collected in a natural habitat contaminated with crude oil in north-center Ecuador. Their capacity for hydrocarbons biodegradation was tested by *in vitro* colorimetric qualitative test for 10 days, using the Minimal Salt Medium and crude oil as carbon source. Isolates taxonomic identification showed bioactivity in the qualitative test was carried out by the analysis of the ITS gene of the region 18S of the rDNA. The endophytes that showed the best results in the previous qualitative test where selected for a quantitative in vitro test for 30 days. Residual hydrocarbons were tracked by infrared spectroscopy (IR) and gas chromatography (GC) with a flame ionization detector. The maximun removal rates of total petroleum hydrocarbons were 99.6% (IR) and 99.8% (GC), corresponding to fungi of the genus *Verticillium* sp. and *Aspergillus* sp. respectively. This is the first report of biodegradation of crude oil hydrocarbons by endophytic fungi, the results suggest these fungal isolates are potential hydrocarbon biodegraders that could be used in bioremediation processes.

Keywords: Fungal endophyte, biodegradation, bioremediation, hydrocarbon, infrared spectroscopy, gas chromatography.

3. INTRODUCCIÓN

El petróleo constituye un recurso no renovable de importancia económica para varios países y muchas economías cimientan sus políticas de desarrollo y programas sociales en la explotación de crudo (Fontaine, 2013), entre ellos el Ecuador. La explotación de este recurso trae consigo graves problemas ambientales (Samanta, Singh y Jain, 2002). Entre los principales daños ocasionados por este tipo de contaminación está la disminución de la calidad del agua y suelos, que a su vez produce afectación directa a la flora y fauna silvestre. Además, los hidrocarburos contienen numerosos compuestos que pueden producir efectos irreparables en la salud de las personas (San Sebastian y Hurtig, 2004; Jadoon, Amin, Malik y Khalel, 2016).

Entre los compuestos que conforman el petróleo están los hidrocarburos: estos a su vez se pueden clasificar en alifáticos y aromáticos. Los hidrocarburos alifáticos corresponden a cadenas hidrocarbonadas lineales o cíclicas de tamaño y estructura variable. Ampliamente estudiados por su utilidad como combustibles y solventes. Mientras que los hidrocarburos aromáticos abarcan desde compuestos de estructura monocíclica hasta compuestos conformados por cadenas largas y complejas, constituidas por anillos aromáticos (Tisot y Welte, 2013). Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) han sido mayormente estudiados debido a que algunos de ellos constituyen una amplia variedad de productos de importancia biológica, química e industrial (Van Hamme, Singh y Ward, 2003). Adicionalmente, los hidrocarburos se encuentran entre los contaminantes de mayor impacto biológico debido a sus efectos cancerígenos y mutagénicos (Peltonen y Kuljukka, 1995; Hurtig y San Sebastian, 2002; Cuadras, Ramírez, Rovira, Marcé y Borrull, 2012).

Para tratar los daños provocados por contaminación con hidrocarburos se han desarrollado técnicas de limpieza que emplean organismos con metabolismos particulares que pueden utilizar hidrocarburos como fuente de carbono (Hammel, 1995). Generalmente, se emplean microorganismos bacterianos debido a sus ciclos rápidos de reproducción, por la facilidad que ofrecen para el estudio de sus vías metabólicas y su voracidad (Pieper y Reineke, 2000; Reda, 2009).

Sin embargo, las bacterias no son los únicos microorganismos empleados para procesos de biorremediación ambiental. En los últimos años se han reportado hongos que exceden las capacidades bacterianas para biodegradar hidrocarburos (Al-Nasrawi, 2012). Los hongos se utilizan debido a sus particulares capacidades metabólicas, las cuales median la transformación de una amplia variedad de compuestos orgánicos en compuestos de menor complejidad que posteriormente son incorporados a sus metabolismos (Cerniglia, 1997; Pointing, 2001); estos procesos se faciltan debido a las características de su complejo sistema enzimático y al vigoroso crecimiento de sus hifas (Hammel, 1995; Cerniglia, 1997; Drevinskas et al., 2016). Debido a su alto grado de efectividad tanto bacterias como hongos son empleados exitosamente en procesos de biorremediación ambiental de hidrocarburos (Cerniglia, 1997; Timmis y Pieper, 1999; Potin, Rafin y Veignie, 2004). Por lo tanto, el estudio de la diversidad e identificación de especies y cepas fúngicas de utilidad biotecnológica marcan prioridad en un sector ávido de innovación constante como el de la biorremediación ambiental.

Entre los hongos que mayor atención han generado en la comunidad científica en los últimos años, debido a su amplia diversidad y sus particulares capacidades, se encuentran los hongos endófitos (Schulz, Boyle, Draeger, Römmert y Krohn, 2002). Estos son microorganismos que colonizan los tejidos de las plantas, sin causar daño o síntomas aparentes de enfermedad sobre su hospedero (Arnold, 2007; Khan, Shahzad y Choudhary, 2010; Kusari, Hertweck y Spiteller, 2012). Se localizan tanto en los espacios intercelulares de los tejidos vegetales como en el simplasto (Strobel y Daisy, 2003). Planta y hongo coexisten, estableciendo entre ellos una interacción mutualista, dependiente de la virulencia del hongo y de las defensas de la planta. Ambos elementos se encuentran influenciados por factores ambientales y por la etapa de desarrollo de cada organismo (Schulz, Römmert, Dammann, Aust y Strack, 1999; Rodriguez, White, Arnold y Redman, 2009; Kusari et al., 2012).

Como consecuencia de la interacción planta-endófito, se ha determinado diversos efectos que mejoran la adaptación ecológica de la planta, incrementando su tolerancia al estrés, a cambios de temperatura y salinidad, desarrollo de resistencia frente a enfermedades, herbivoría, insectos, nemátodos, bacterias, y otros hongos patógenos y contaminantes (Kaul, Gupta, Ahmed y Dhar, 2012). El desarrollo de resistencia a contaminantes normalmente letales o altamente perjudiciales como el petróleo crudo se

produce cuando las plantas consiguen metabolizar los compuestos perjudiciales mediante enzimas extracelulares secretadas por los hongos endófitos, este proceso se puede desarrollar tanto en el interior de la planta como a nivel de sustrato por la secreción de enzimas a través de la raíz (Jordahl, Foster, Schnoor y Alvarez, 1997).

En la amazonía ecuatoriana existen zonas con suelos en los que, a pesar de estar contaminados con petróleo crudo, crecen diversas especies vegetales que han logrado colonizar, adaptarse y proliferar con éxito en este hábitat inhóspito (Arellano, Tansey, Balzter y Tellkamp, 2017). Por lo tanto, la exploración e identificación de la diversidad fúngica endófita que estas plantas albergan podrían dar lugar al hallazgo de hongos con con productos metabólicos capaces de biodegradar el petróleo y aprovecharlo como fuente de carbono, facilitando la adaptación y supervivencia de las plantas hospederas a condiciones adversas. Hallazgos de este tipo podrían contribuir en la innovación y desarrollo de nuevas tecnologías en la biorremediación ambiental.

Los objetivos de este estudio comprenden el aislamiento de hongos endófitos de plantas adaptadas a hábitats contaminados con petróleo crudo, la idenficación de aquellos que presentan capacidad para biodegradar hidrocarburos y cuantificar la cantidad de hidrocarburo que estos endófitos son capaces de metabolizar mediante ensayos en condiciones controladas de laboratorio. Todo esto permitirá conocer si los organismos fúngicos endófitos pueden ser empleados en procesos de biorremediación de hidrocarburos.

3.1 OBJETIVOS

3.1.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad de los diferentes aislados fúngicos, obtenidos de plantas de la amazonia ecuatoriana, para la biodegradación de hidrocarburos presentes en petróleo crudo mediante ensayos en condiciones controladas de laboratorio.

3.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Aislar hongos endófitos de tejidos vegetales de plantas que crecen en hábitats contaminados con petróleo crudo y analizar la capacidad de hongos endófitos para biodegradar hidrocarburos mediante ensayos *in vitro*.

Determinar la capacidad específica de remoción de los hidrocarburos presentes en el medio de cultivo por parte de hongos endófitos, mediante el uso de espectroscopia infrarroja (IR) y cromatografía de gases (CG).

Identificar hasta la máxima categoría taxonómica posible, mediante análisis molecular de ADN, a los hongos endófitos que presenten cualidades sobresalientes para la biodegradación de hidrocarburos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 SITIO DE MUESTREO Y COLECCIÓN DE MUESTRAS VEGETALES

El sitio en el cual se realizó la colecta se encuentra en la localidad “Las Minas” Km 10.1 vía El Hollín - Loreto, Provincia del Napo, Ecuador (0°42'39.63"; S 77°44'33.13"O). El área se encuentra contaminada con petróleo crudo proveniente de vertientes naturales. Se colectaron muestras de plantas que se encontraron creciendo sobre sustrato contaminado para su posterior identificación taxonómica y además, se tomaron muestras de hojas y tallos de cada planta para el aislamiento de hongos endófitos en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la PUCE.

4.2 AISLAMIENTO DE HONGOS ENDÓFITOS DE TEJIDO VEGETAL

Para el aislamiento de los hongos endófitos las muestras de tallos se sometieron a esterilización superficial y posteriormente, se removieron segmentos del tejido del tallo por medio de cortes longitudinales que se incubaron en cajas Petri con los medios de cultivo Agar Agua (AA) y Agar de Papa y Dextrosa (APD 1:10), a temperatura ambiente (Strobel, Dirkse, Sears y Markworth, 2001). Las muestras de hojas se esterilizaron superficialmente y se cortaron en pequeños fragmentos cuadrangulares (0.5 mm^2) y se incubaron en cajas Petri con el medio de cultivo Agar Extracto de Malta (AEM 1:10) a temperatura ambiente (Rodriguez, White, Arnold y Redman, 2009). Cada crecimiento fúngico aislado de los tejidos de tallo y hojas fue transferido a una caja Petri con el medio de cultivo APD 1X mediante el método de hifa terminal (Strobel, Dirkse, Sears y Markworth, 2001), cada aislado fue subcultivado hasta la obtención de cepas puras y permanecieron en cultivo durante siete días. Los endófitos aislados fueron agrupados en morfotipos, basados en homologías de caracteres morfológicos (Arnold, Maynard y Gilbert, 2001). Adicionalmente, se depositaron dos muestras de cada aislado en la Colección de Endófitos Quito-Católica (CEQCA) para su criopreservación a -80°C.

4.3 ENSAYOS CUALITATIVOS DE DEGRADACIÓN DE PETRÓLEO POR HONGOS ENDÓFITOS

Para determinar si los aislados fúngicos endófitos obtenidos tienen algún tipo de bioactividad para la degradación de hidrocarburos se realizaron ensayos colorimétricos en matraces Erlenmeyer de 125 ml, con 50 ml del medio de cultivo Medio de Sales al Mínimo (MSM) enriquecido con petróleo crudo al 1% (Al-Nasrawi, 2012; Maddela, Scalvenzi, Pérez, Montero y Gooty, 2015) como fuente de carbono, Tween®80 como surfactante y el compuesto Diclorofenol Indofenol (DCFIF) como indicador de actividad metabólica (Al-Nasrawi, 2012). Al medio de cultivo se le añadieron tres porciones (1 cm^2) de hongo endófito proveniente de un cultivo axénico de siete días de crecimiento. Este ensayo se incubó a temperatura ambiente y con agitación contínua a 180 rpm durante la totalidad del ensayo (Al-Nasrawi, 2012). Se evaluó el nivel de reducción del medio de cultivo, evidenciado por el cambio gradual en la coloración durante 10 días y los resultados fueron tabulados, según lo propuesto por Al-Nasrawi (2012). Adicionalmente, se realizó un ensayo control negativo con un hongo no tolerante al medio de cultivo. Todos los ensayos se efectuaron por triplicado.

4.4 ENSAYOS CUANTITATIVOS Y EVALUACIÓN DE HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO (HTP) MEDIANTE ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (IR) Y CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG)

Los hongos endófitos que mostraron el mayor aclaramiento del medio de cultivo en los ensayos cualitativos fueron seleccionados para este ensayo. Matraces Erlenmeyer de 125 ml con 50 ml del medio MSM enriquecido con petróleo crudo al 1% y Tween®80 (Maddela, Scalvenzi, Pérez, Montero y Gooty, 2015) se añadió tres porciones (1 cm^2) de hongo endófito proveniente de un cultivo axénico de siete días de crecimiento. El ensayo se incubó a temperatura ambiente con agitación contínua a 180 rpm durante la totalidad del ensayo. Se evaluó la cantidad de hidrocarburo persistente en el medio después de 30 días (Maddela, Scalvenzi, Pérez, Montero y Gooty, 2015). Adicionalmente se realizó un ensayo control sin endófito. Todos los ensayos se efectuaron por triplicado. Para determinar la cantidad de hidrocarburos biodegradados (tasa de remoción de hidrocarburos), los ensayos fueron sometidos a un análisis de Hidrocarburos Totales de

Petróleo (HTP) mediante espectroscopia infrarroja (IR) en el Centro de Servicios Ambientales y Químicos de la PUCE (CESAQ-PUCE).

Se seleccionaron a los cinco endófitos de mejores resultados de este ensayo para efectuar un nuevo análisis para corroborar los resultados previamente obtenidos. Este nuevo ensayo de biodegradación de hidrocarburos se realizó con las misma condiciones ya descritas (Maddela, Scalvenzi, Pérez, Montero y Gooty, 2015). Una vez concluido el experimento, se retiró el micelio de la fase líquida del medio de cultivo. Se realizó una extracción líquido-líquido asistida con ultrasonido por duplicado, para lo cual 6 ml de diclorometano (DCM) fueron añadidos a 5 ml del medio de cultivo, sonicado en un baño maría Branson®3800 por tres periodos de 5 min cada uno y se recuperó la fase orgánica posteriormente a la decantación de la mezcla, con dos porciones adicionales de DCM (Boonchan, Britz y Stanley, 2000). La fase recuperada fue secada con sulfato de sodio anhidro, concentrada con un evaporador rotatorio y el volumen resultante se aforó a 2 ml con DCM. Los extractos finales fueron analizados mediante cromatografía de gases (CG) (cromatógrafo de gases Agilent 7890A), con detector de ionización de flama (FID, siglas en inglés), columna capilar Agilent DB-TPH (30 m x 320 µm x 0.25 µm). Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 250°C y 320°C, respectivamente. Los parámetros programados fueron 40°C por 1 min, una rampa desde los 40°C a 220°C con incrementos de 8 °C/min. La temperatura final de 220°C se mantuvo durante 1 min. La muestra blanco se preparó con 2 ml de DCM.

4.5 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE HONGOS ENDÓFITOS

Se determinó la identidad taxonómica mediante análisis de secuencias de la región del espaciador transcrito interno (ITS, siglas en inglés) del gen 5.8S del ADN ribosómico (ADNr) de los endófitos identificados como degradadores en los ensayos cualitativos. Para ello se realizaron extracciones de ADN con el reactivo Chelex® 100 siguiendo los protocolos de Bucheli y colaboradores (2000) y Camacho y colaboradores (1997). Posteriormente, se amplificó el ADN extraído mediante PCR empleando los promotores universales ITS1 e ITS4 (White, Bruns, Lee y Taylor, 1990) bajo las condiciones descritas por Bascom-Slack y colaboradores (2012); los amplicones resultantes fueron secuenciados por Macrogen® (Seúl, Corea del Sur).

Para la identificación filogenética de los hongos endófitos se analizaron las secuencias consenso comparándolas con otras secuencias ITS de la base de datos del GenBank® empleando la herramienta de búsqueda y alineamiento local básico de secuencias nucleotídicas (BLASTn, siglas en inglés). Para la identificación taxonómica se seleccionaron las secuencias que mayor homología mostraron en BLAST para ser alineadas con las secuencias consenso empleando el programa bioinformático Muscle (Edgar, 2004). Finalmente, con 130 secuencias se construyó un árbol filogenético de máxima verosimilitud con el programa bioinformático RAxML (Stamatakis, 2006) con el modelo GTR ɣ de sustitución de nucleótidos y 1000 réplicas bootstrap (Gladden et al., 2006), *Spizellomyces punctatus* del phylum Chytridiomycota fue utilizado como grupo externo.

4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Inicialmente se transformaron los datos resultantes de la cuantificación de HTP (ppm) a logaritmo base 10 y se les aplicó una prueba Shapiro-Wilk ($p<0.05$) para determinar la normalidad de la distribución de los datos. Posteriormente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con los resultados obtenidos en los ensayos cuantitativos mediante IR. Con los resultados del ANOVA se realizó un análisis de comparaciones múltiples Tukey ($p<0.05$). Todos los análisis fueron elaborados en el programa SPSS (versión 22).

5. RESULTADOS

5.1 IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS VEGETALES

Se colectaron en total 23 plantas en la localidad de "Las Minas". Las plantas colectadas representan una muestra de las especies vegetales presentes en la zona contaminada, todas desarrollándose sobre sustrato rocoso contaminado con petróleo crudo o sobre fango (mezcla de petróleo crudo, tierra y agua) (figura 1). Las 23 plantas se clasifican dentro de 12 familias de angiospermas, una gimnosperma y una briofita (tabla 1). Las muestras botánicas fueron identificadas taxonómicamente en el Herbario de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (HQCA). Entre las angiospermas, las familias Melastomataceae, Boraginaceae y Poaceae son predominantes en la zona, llegando juntas a abarcar un 70% de la vegetación presente, mientras que el resto de vegetación se encuentra representada por las familias Rubiaceae, Gunneraceae y Urticaceae, entre otras (tabla 1). Dos muestras botánicas no fueron identificadas debido al escaso material colectado; en ambos casos las plantas eran individuos únicos y de tamaño reducido.

5.2 AISLAMIENTO DE HONGOS ENDÓFITOS

De las muestras de tallo y hojas provenientes de los 23 especímenes vegetales colectados se aislaron un total de 156 hongos endófitos, que, posteriormente fueron agrupados en 133 morfotipos.

5.3 ENSAYOS CUALITATIVOS DE DEGRADACIÓN DE PETRÓLEO POR HONGOS ENDÓFITOS

Los ensayos cualitativos realizados con 133 hongos demostraron que varios de los endófitos aislados presentan capacidades degradadoras de petróleo crudo (40% de los aislados) mientras que el resto de los individuos al ser puestos en contacto directo con el contaminante no presentaban crecimiento (60% de los aislados). El parámetro evaluado en este ensayo fue el grado de aclaramiento del medio según observación visual (figura 2). En estos ensayos se destacaron 10 hongos, los cuales aclararon totalmente el medio antes de los 10 días establecidos para la finalización del ensayo. El resto presentaron cambios parciales o nulos (tabla 2).

5.4 ENSAYOS CUANTITATIVOS Y EVALUACIÓN DE HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO (HTP) MEDIANTE ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (IR) Y CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG)

Los 10 individuos de mejor desempeño en los ensayos cualitativos fueron sometidos a un ensayo que permita cuantificar la cantidad de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) tanto al inicio del ensayo como al final del mismo. Entre los hongos con mejor rendimiento se encuentran *Clonostachys* sp. 2*, Aspergillus* sp.*, Verticillium* sp.*, Colletotrichum* sp. 1*, Phomopsis* sp. 1 y *Xylaria* sp. 1, todos ellos con un porcentaje de degradación promedio superior al 90% de los hidrocarburos presentes al inicio del ensayo. Sin embargo, también se determinaron individuos con capacidades degradadoras menores como *Clonostachys* sp. 1*, Colletotrichum* sp. 2*, Colletotrichum* sp. 3 y *Saccharicola* sp. 1; con niveles de degradación que pueden descender a valores de hasta el 31% (tabla 3 y figura 3). Los resultados de HTP obtenidos por cuantificación IR fueron corroborados por un nuevo análisis de HTP cuantificados por CG, efectuado con cinco hongos que exhibieron los mejores resultados por IR (tabla 3).

La evaluación de HTP por cromatografía de gases permitió la identificación de compuestos alifáticos (octano, nonano, undecano, dodecano y tetradecano) y aromáticos (1,2,3-trimetil benceno, trans-decahidro naftaleno, 1,2,4,5-tetrametil benceno y pentametil benceno) en las muestras control. Mientras que el análisis de los medios de cultivo donde se incubaron los hongos endófitos mostraron que la mayor parte de los compuestos detectados en los controles fueron degradados de forma total por parte de los hongos *Aspergillus* sp. y *Xylaria* sp. 1. Los aislados *Clonostachys* sp. 2, *Verticillium* sp. y *Colletotrichum* sp. 1 mostraron degradación total de los compuestos identificados en los controles con excepción de n-nonano (C9) que presentó degradación parcial con respecto de los controles (14%, 15% y 19% respectivamente) (tabla 4 y anexo 1).

5.5 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE HONGOS ENDÓFITOS

Se realizó el análisis filogenético de los 53 hongos endófitos aislados que presentaron algún grado de bioactividad degradadora de hidrocarburos en los ensayos cualitativos. Para esto se generó un árbol filogenético de máxima verosimilitud (figura 4),

el análisis de este mostró una diversidad total de tres phyla, subdivididos en cinco clases, 12 ordenes, 17 familias y 14 géneros (tabla 5). La mayoría de los hongos aislados pertenecen al phylum Ascomycota (94,3%), que representa el linaje dominante. La clase de mayor abundancia es Sordariomycetes, con una representación del 81% de individuos. Los ordenes Diaporthales y Xylariales aglutinan la mayor cantidad de hongos con 26% y 22%, respectivamente (figura 5). Dentro del orden Diaporthales, la familia Diaporthaceae es mayormente representada por el género *Diaporthe*, con un 4,5% de hongos. Dentro del orden Xylariales, la familia Xylariaceae se destaca como única representante, cuyos miembros pertenecen al género *Xylaria*. *Colletotrichum,* género perteneciente a la familia Glomerellaceae, se destaca por ser el de mayor representación con un 5,3% de los hongos aislados. Dos aislados solo pudieron ser identificados hasta nivel de orden, uno a nivel de clase y uno a nivel de familia. El hongo endófito Sordariomycetes sp. no mostró homología cercana a ningún espécimen identificado a mayor nivel taxonómico que clase; igualmente los individuos Xylariales sp., Pleosporales sp. y Pyriculariaceae sp. muestra un nivel de homología del 90%, 94% y 91% de acuerdo al BLAST, respectivamente.

5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La prueba Shapiro-Wilk demostró una distribución normal de los datos transformados a logaritmo base 10, por lo que se procedió a realizar un análisis de varianza (ANOVA) (anexo 2), demostrando la existencia de diferencias altamente significativas ($p<0.01$) entre grupos (endófitos *versus* control).

El análisis de comparaciones múltiples Tukey (anexo 3) evidenció diferencias entre endófitos, constituyendo subgrupos homogéneos en base al grado de variabilidad de las medias de cada tratamiento. Se establecieron tres subgrupos, el primer subgrupo integrado por los cinco endófitos de mejor rendimiento fue seleccionado para un ensayo adicional con CG.

6. DISCUSIÓN

6.1 COLECCIÓN DE MUESTRAS VEGETALES

La adaptación de plantas a hábitats altamente contaminados se encuentra restringida a un puñado de especies tolerantes a tales condiciones (Lundberg et al., 2012). Evidencia ha demostrado que los endófitos benefician la adaptación de la planta a condiciones de estrés, éstos estimulan el crecimiento, productividad, captación de carbono y tolerancia a contaminantes (Deng y Cao, 2017).

Deng y Cao (2017) demostraron que la diversidad y la abundancia de especies vegetales son afectadas negativamente por el nivel de contaminación del sustrato por hidrocarburos. En la localidad "Las Minas", con un alto nivel de contaminación, presenta vegetación típica de bosque húmedo tropical amazónico desarrollándose *in situ,* convirtiendo a esta zona en un punto de interés para el estudio de la diversidad y capacidades de los hongos endófitos de plantas adaptadas a este tipo de hábitats.

Una muestra de la diversidad vegetal de la zona fue colectada (23 individuos) (tabla 1), incluyendo muestras de tallos y hojas. Las familias Melastomataceae, Boraginaceae y Poaceae se destacaron por su predominancia en la zona, representando hasta un aproximado del 70% de las especies presentes. En menor grado se encontraron individuos de las familias Rubiaceae, Gunneraceae y Urticaceae. Arellano y colaboradores (2017) realizaron colecciones de plantas en bosque secundario contaminado con petróleo crudo, bosque secundario no contaminado y bosque prístino en la amazonia ecuatoriana, reportando varias familias en común con este estudio (Melastomataceae, Boraginaceae, Poaceae, Euphorbiaceae, Bignoniaceae y Rubiaceae), especies relativamente comunes en el bósque húmedo tropical ecuatoriano pero en el estudio de Arellano (2017) presentaron una abundancia anormalmente superior en bosque secundario contaminado en contraste de bosque secundario no contaminado y bosque prístino. Las familias con mayor predominancia fueron Melastomataceae, Rubiaceae, Fabaceae y Euphorbiaceae.

6.2 AISLAMIENTO DE HONGOS ENDÓFITOS Y ENSAYOS CUALITATIVOS

Se aislaron un total de 156 hongos endófitos provenientes de tejidos de tallo y hojas de las 23 plantas colectadas que se agruparon en 133 morfotipos (tabla 1). Los aislados fueron sometidos a pruebas *in vitro* que evaluaron sus capacidades para biodegradar hidrocarburos (Al-Nasrawi, 2012). Los ensayos cualitativos demostraron el potencial de biodegradación de hidrocarburos de un total de 53 hongos endófitos, como se indica en la tabla 3. El ensayo se fundamenta en que durante las reacciones de oxidación por parte de microorganismos, los electrones son transferidos a un aceptor de electrones como el oxígeno (O_2), nitratos (NO_3-) o sulfatos (SO_{4-2}) (Hutchins et al., 1991; Beller et al., 1992). Incorporando un reactivo aceptor de electrones en el medio de cultivo, como el DCFIF, es posible evidenciar la capacidad de los organismos para utilizar como fuente de carbono al sustrato de hidrocarburos a través del cambio de color del DCFIF de azul (oxidado) a traslúcido (reducido) (Hanson, Desai y Desai, 1993). Mediante esta técnica redox se evidenció que 53 aislados fúngicos poseen la habilidad para degradar petróleo crudo. De estos 53 endófitos un subgrupo constituido por 10 individuos presentaron resultados sobresalientes en los ensayos cualitativos, aclarando completamente el medio de cultivo en menor tiempo al de la duración total del ensayo (<10 días) (figura 2).

Con excepción de las plantas de la familia Orchidaceae sp. y Poaceae sp., todas las plantas colectadas poseen organismos fúngicos con capacidad variable para degradar hidrocarburos en este ensayo (tabla 3). Evidencia obtenida en los estudios de Peng y colaboradores (2013) y de Baoune y colaboradores (2018) demuestran que la composición de endófitos de una planta puede verse afectada por factores como contaminantes, estimulando la proliferación de organismos tolerantes a estas condiciones. Interesantemente, las plantas con mayor número de endófitos aislados, *Marattia* sp. (Marattiaceae) y FM006 (no identificada), con 12 y 10 individuos aislados respectivamente, corresponden a las plantas con mayor número de hongos con capacidades para biodegradar hidrocarburos (tabla 3), resultados que apoyan la hipótesis de que los endófitos podrían estar contribuyendo a una mejor adaptación de las plantas al sustrato contaminado (Kaul, Gupta, Ahmed y Dhar, 2012).

6.3 CUANTIFICACIÓN DE HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO (HTP)

Una vez comprobada la bioactividad de los aislados fúngicos se llevaron a cabo nuevos ensayos con los diez endófitos de mejores resultados (tabla 3). Los ensayos se enfocaron en la medición de los hidrocarburos remanentes al final del ensayo expresados en hidrocarburos totales de petróleo (HTP). La cuantificación de HTP por IR tiene como principio la medida de la energía absorbida para producir vibraciones de estiramiento y flexión en las moléculas. Los diferentes grupos funcionales y tipos de los enlaces absorben radiación en diferentes frecuencias e intensidades, y la intensidad de absorción es directamente proporcional a la cantidad de enlaces, esto se relaciona con la concentración de hidrocarburos presentes en la muestra (Korda, Santas, Tenente y Santas, 1997). Estos resultados al ser confrontados con una muestra blanco permitieron establecer las tasas de remoción de hidrocarburos.

Estudios con la misma metodología sobre biodegradación de hidrocarburos empleando hongos de vida libre, reportan tasas de remoción que van desde el 14.9% al 43.4% (Maddela, Scalvenzi, Pérez, Montero y Gooty, 2015). En este estudio obtuvimos tasas de degradación variables, desde el 31.5% (mínimo), hasta el 99.6% (máximo) de remoción de hidrocarburos, como muestra la tabla 5.

El ANOVA de los resultados de la tabla 5 muestra diferencias altamente significativas entre los tratamientos con los endófitos y el control ($p<0.01$). También el análisis determinó una alta variación (capacidad de degradación) entre los endófitos ensayados. Las réplicas de los ensayos no mostraron diferencias estadísticamente significativas. Adicionalmente, el análisis de comparaciones múltiples agrupó a los endófitos que presentan rendimientos estadísticamente homogéneos entre sí, estableciendo 3 subgrupos, el primer subgrupo es el de mayor interés ya que aglutina a los cinco endófitos de mejor rendimiento (*Xylaria* sp. 1, *Clonostachys* sp. 2, *Colletotrichum* sp. 1, *Verticillium* sp. y *Aspergillus* sp.) (anexo 3).

Con el objetivo de obtener mayor información sobre los resultados obtenidos con estos cinco endófitos mediante IR se efectuó un nuevo análisis, cuantificando los

hidrocarburos presentes en el medio de cultivo mediante CG. En este método de cuantificación de HTP se utiliza una fase móvil (gas inerte N_2) y una fase estacionaria (columna capilar) para separar la mezcla de hidrocarburos de las muestras en sus componentes individuales al ser arrastrada por la fase móvil a través de la fase estacionaria. La separación se lleva a cabo por una combinación de factores que incluyen el punto de ebullición, polaridad y diferencias de afinidad entre los diferentes hidrocarburos y la columna, por lo que la estimación de las concentraciones es de mayor exactitud y permite establecer si existen diferencias entre los métodos de cuantificación empleados. Además permite identificar varios de los compuestos que constituyen las muestras analizadas, por lo que proporciona información de los compuestos metabolizados y remanentes en el medio de cultivo.

Se identificaron hidrocarburos alifáticos y aromáticos en los controles, contaminantes orgánicos de mayor abundancia y principales constituyentes del petróleo crudo (Zhang et al., 2011). Los endófitos *Clonostachys* sp. 2, *Verticillium* sp. y *Colletotrichum* sp. 1 metabolizaron completamente todos los compuestos identificados excepto n-nonano que presentó tasas de remoción parciales respecto al control. Mientras que los endófitos *Aspergillus* sp. y *Xylaria* sp. 1 mostraron un metabolismo completo de los compuestos identificados (tabla 4). Todos los endófitos evaluados mostraron capacidades para degradar de manera simultánea los hidrocarburos alifáticos y aromáticos detectados.

Las condiciones de realización de los ensayos influyen directamente en los resultados. Las tasas de remoción pueden verse afectadas por diversos factores, entre estos la temperatura de ensayo. En el presente estudio, los ensayos se realizaron a una temperatura de 23ºC. Sin embargo, se ha reportado que la temperatura óptima para la realización de este tipo de ensayos oscila entre los 28ºC y 31ºC (Umanu y Dodo, 2013; Adams, Fufeyin, Okoro y Ehinomen, 2015), evidencia que sugiere que los resultados podrían mejorarse modificando la temperatura de experimentación.

Otro factor que influye en los resultados fue la adición de un surfactante al medio de cultivo. Existen estudios donde el medio de cultivo no fue suplementado con un surfactante para emulsificar la mezcla entre petróleo crudo y agua, volviendo el proceso de biodegradación aún más complejo para los microorganismos evaluados, por lo que el

rendimiento puede verse afectado (Hidayat y Tachibana, 2013). Ali y colaboradores (2009) experimentaron con el hongo *Metarhizium anisopliae*, obteniendo la máxima actividad de lipasas al añadir Tween®80 y SDS al medio de cultivo. En contraste, Chen y colaboradores (2006) investigaron el efecto de surfactantes en la biodegradación de HAPs por hongos de la pudrición blanca (*P. chrysosporium, Irpex lacteus* y *P. ostreatus*), encontrando que Triton X-100® y SDS inhibían la remoción de HAPs. En este caso, Tween®80, el surfactante usado en este estudio no es tóxico y ha demostrado ser un estimulante de la producción de la enzima manganeso peroxidasa (Ding, Cong, Zhou y Gao, 2008); los resultados obtenidos indican que fue el reactivo adecuado para optimazar la actividad enzimática sin efectos tóxicos.

La concentración de crudo evaluada en este estudio fue del 1%, por lo que posteriores estudios podrían evaluar el desempeño de estos hongos endófitos en concentraciones superiores ya que las concentraciones óptimas para hongos oscilan entre 1% y el 5% (Wang, Nomura, Nakajima y Uchiyama, 2012). La concentración de crudo empleada es de vital importancia para la obtención de resultados óptimos. Evidencia aportada por Rhaman y colaboradores (2003) demuestra que el porcentaje de degradación de un cultivo de un consorcio bacteriano decreció de un inicial 78% a 52% al incrementar la concentración de petróleo crudo del 1% al 10%.

Los resultados expuestos en la tabla 5 demuestran el enorme potencial de los hongos aislados para su eventual uso en el campo de la biorremediación. Los seis hongos (*Xylaria* sp. 1, *Clonostachys* sp. 2, *Colletotrichum* sp. 1, *Verticillium* sp., *Aspergillus* sp. y *Mucoraceae* sp.) que presentaron tasas de remoción superiores al 90% en las condiciones ensayadas son resultados sumamente alentadores para un ensayo fúngico y más aún tratándose de hongos endófitos. Diversos estudios han demostrado la capacidad de los endófitos para degradar ciertos sustratos complejos como el poliuretano (Russell et al., 2011). Sin embargo, por primera vez cepas fúngicas endófitas son evaluadas para biodegradación de hidrocarburos, ensayos restringidos exclusivamente a endófitos bacterianos en estudios anteriores (Bisht et al., 2014; Baoune et al., 2018).

Baoune y colaboradores (2018) aislaron bacterias endófitas de raíces de plantas que crecían en un ambiente contaminado con petróleo crudo y evaluaron las capacidades para biodegradar crudo a una concentración del 1%; obteniendo tasas de remoción de

hidrocarburos similares a las obtenidas en este estudio. El aislado *Streptomyces* sp. HIh9 mostró un 97.5% de remoción de hidrocarburo después de 7 días de incubación, mientras que en el presente estudio el hongo endófito *Verticillium* sp. mostró un 99.64% después de 30 días de incubación, lo cual, evidencia que las plantas albergan organismos endófitos degradadores de contaminantes como mecanismo de adaptación a hábitats hostiles debido a que la planta por sí sola es incapaz de metabolizar estos compuestos.

6.4 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE HONGOS ENDÓFITOS

Las posiciones taxonómicas de los hongos seleccionados fueron establecidas a través de un análisis filogenético (figura 4). El árbol filogenético muestra los cuatro phyla del reino Fungi definidos, Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota y *Spizellomyces punctatus* del phylum Chytridiomycota como grupo externo. El análisis muestra que la mayor parte de los ascomicetes aislados constituyen los órdenes Diaporthales, Xylariales y Glomerellales (figura 5).

Dentro del orden Diaporthales se identificaron 14 hongos pertenecientes a tres familias: Diaporthaceae, Valsaceae y Schizoparmaceae. Entre los 14 aislados del orden Diaporthales se destaca el endófito *Phomopsis* sp. 1 (tabla 2) que mostró un porcentaje de remoción de hidrocarburos del 90.7%. Se ha reportado biodegradación de fenantreno y ácido 4-hidroxibenzoico por parte de hongos del género *Phomopsis* (Tian et al., 2007; Chen, Peng, Dai y Ju, 2011); sin embargo, este es el primer reporte de biodegradación de petróleo crudo para hongos del género.

Dentro del orden Xylariales se identificaron 12 hongos, 11 pertenecientes a la familia Xylariaceae y uno identificado solo hasta nivel de orden (tabla 2). Dentro de los 12 individuos del orden se destaca el endófito *Xylaria* sp. 1 que mostró un 98.8% de remoción de hidrocarburos (tabla 3). Se ha reportado biodegradación de pireno y benzopireno por *Xylaria regalis* (Chang, Chen, Wei y Cheng, 2007) pero no existen reportes de biodegradación de petróleo crudo.

El orden Glomerellales agrupa a ocho hongos, todos pertenecientes a la familia Glomerellaceae y al género *Colletotrichum* (tabla 2). Dentro de este orden, se destacan tres individuos con capacidades de biodegradación que van desde 70.4% hasta el 97.5% (tabla

3). *Colletotrichum gleosporoides* es conocido por producir lipasas extracelulares (Balaji y Ebenezer, 2008), enzimas que han sido ampliamente estudiadas por su capacidad para degradar hidrocarburos (Bezalel, Hadar y Cerniglia, 1997; Balaji, Arulazhagan y Ebenezer, 2014). Sin embargo, al someter a *Colletotrichum gleosporoides* a un análisis de biodegradación de hidrocarburos, su capacidad de producción de lipasas se inhibió, posiblemente debido al impacto de las condiciones tóxicas del ensayo (Balaji, Arulazhagan y Ebenezer, 2014). Esta evidencia resalta la importancia de la adaptación de los microorganismos a un ambiente con características similares a las del ensayo para que la producción enzimática no se vea afectada (Rahman et al., 2003). Maccheroni y colaboradores (2004) evaluaron la producción de lipasas extracelulares para uso biotecnológico por hongos endófitos del género *Colletotrichum* sometiéndolos a diferentes condiciones de pH, por lo que las enzimas involucradas en los procesos de biodegradación evidenciados en este estudio posiblemente correspondan a lipasas extracelulares.

El orden Hypocreales tiene tres representantes identificados en este estudio, de éstos, el porcentaje de remoción de hidrocarburos por *Clonostachys* sp. fue 31.5% y 97.4% por *Clonostachys* sp. 2 (tabla 3). No existen reportes previos sobre biodegradación de hidrocarburos por parte de individuos del género *Clonostachys*. Estudios sobre las capacidades metabólicas de individuos del género *Clonostachys* determinan la biodegradación de zearalenonas (Takahashi-Ando et al., 2004; Kakeya et al., 2002).

En este estudio se identificaron dos especies del orden Eurotiales (familia Trichocomaceae) con capacidad para degradar hidrocarburos: *Aspergillus* sp. y *Penicillium* (tabla 2). *Aspergillus* sp. mostró un porcentaje de remoción del 97.6% (tabla 3). Estudios previos realizados con hongos de vida libre reportan las capacidades de *Aspergillus fumigatus* y *Penicillium chrysogenum* para la producción de lacasas (Balaji, Arulazhagan y Ebenezer, 2014), familia de enzimas que intervienen activamente en la biodegradación de hidrocarburos al oxidarlos (Bezalel, Hadar y Cerniglia, 1997; Balaji, Arulazhagan y Ebenezer, 2014). Adicionalmente existen reportes de biodegradación de fenantreno, pireno y benzopireno por parte de *Aspergillus niger* (Sack et al., 1997). Se reporta biodegradación de fluoranteno por *Penicillium* sp., pireno por *Penicillium janczewskii* y *P. janthinellum* y petróleo crudo por *Penicillium* sp. (Giraud, Guiraud, Kadri, Blake y Steiman, 2001; Cerniglia, 2010). Igualmente, Bourdel y colaboradores (2016) aislaron tres especies endófitas de *Penicillium* de las plantas *Eleocharis erythropoda* y *Populus balsamifera*, que

se encontraban creciendo en piscinas de desechos de hidrocarburos. Evidencia que demuestra que las características metabólicas de ciertas especies y cepas de *Penicillium* facilitan la adaptación y colonización de este tipo de hábitats.

El orden Pleosporales es representado por cuatro hongos, tres de los cuales pertenecen al género *Saccharicola*, familia Lophiostomataceae (tabla 2). El endófito *Saccharicola* sp. 1 mostró un porcentaje de remoción del 78.9% (tabla 3). Este es el primer reporte de biodegradación de hidrocarburos por parte de un hongo del género *Saccharicola* (97% ID). La producción de enzimas proteasas extracelulares ha sido confirmada en individuos de este género (Alberto et al., 2016) y estudios adicionales han identificado proteasas fúngicas, que por su actividad hidrolítica, podrían intervenir en la degradación de hidrocarburos (Bezalel, Hadar y Cerniglia, 1997; Balaji, Arulazhagan y Ebenezer, 2014).

El único representante del phylum Zygomycota, Mucoraceae sp. presentó buenos resultados en los ensayos cualitativos (tabla 3). Estudios previos reportan la producción de enzimas peroxidasas por *Mucor racemose*, enzimas implicadas en la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (Balaji, Arulazhagan y Ebenezer, 2014). También se ha reportado la biodegradación de benzopireno por parte de *Mucor* sp., pentaclorofenol por *Mucor racimosissimus*, diesel por *Mucor circinelloides* y petróleo crudo por *Mucor globosus* (Sorkhoh, Ghannoum, Ibrahim, Stretton y Radwan, 1990; Dan, Li, Frank y Xiong, 2006; Szewczyk y Długoński, 2009; Marchut-Mikolajczyk, Kwapisz, Wieczorek y Antczak, 2015).

El orden Amphisphaeriales es representado por tres individuos del género *Pestalotiopsis* (Pestalotiopsidaceae). Estos hongos mostraron capacidades para biodegradar hidrocarburos en el ensayo cualitativo (tabla 3). Estudios previos han demostrado la producción de lacasas extracelulares y capacidad para biodegradar hidrocarburos tanto ligeros como asfaltenos, entre otros compuestos complejos como poliéster-poliuretano (*P. microspora*) (Russell et al., 2011; Xiaoyu, Huiying, Dongsheng y Shanjing, 2013; Yanto y Tachibana, 2013; Yanto y Tachibana, 2014). Esta especie de hongo endófito ha demostrado diferentes capacidades metabólicas, como la producción de paclitaxel (*P. microspora y P. malicola*) (Bi et al., 2011), un potente anticancerígeno y capacidad para degradar plástico poliuretano *in vitro*. Sin embargo, se debe hacer incapié en que las

capacidades de los hongos varían con las cepas, ya que no todos los hongos de *P. microspora* pueden biodegradar poliuretano ni producir paclitaxel.

Los hongos Helmisthosphaeriaceae sp. (Trichosphaeriales), Mycosphaerellaceae sp. (Capnodiales), *Coprinellus* sp. (Agaricales) y *Polyporus* sp. (Polyporales) mostraron buenos resultados en los ensayos cualitativos (tabla 3). Estos resultados representan el primer reporte de este tipo de bioactividad para especies de hongos endófitos pertenecientes a los géneros *Coprinellus* y *Polyporus,* y a la familia Helminthospaeriaceae.

La biodegradación de hidrocarburos de petróleo es un proceso complejo, dependiente de la naturaleza y composición de petróleo crudo, las condiciones ambientales y la comunidad microbiana del suelo. La presencia de microorganismos biodegradadores de hidrocarburos es una respuesta adaptativa a la presencia de hidrocarburos (Leahy y Colwell, 1990; Baoune et al., 2018). Los mecanismos de adaptación incluyen enriquecimiento selectivo y cambios genéticos que favorecen la biodegradación de hidrocarburos de mayor complejidad. Las plantas que se ven obligadas a desarrollarse en este tipo de ambientes estimulan el crecimiento de estos microorganismos biodegradadores de hidrocarburos para desintoxicar a la planta de sustancias nocivas que normalmente no puede procesar por sí misma (Jordahl, Foster, Schnoor y Alvarez, 1997). En este estudio, cincuenta y tres de estos microorganismos endófitos biodegradadores de hidrocarburos fueron aislados de plantas que se encontraban creciendo en suelos contaminados con petróleo crudo en la amazonia ecuatoriana. Se identificaron seis hongos endófitos que, después de 30 días de incubación, presentaron tasas de remoción de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) superiores al 90%. La mejor tasa de remoción de HTP fue del 98.78 (IR) y 99.8% (CG) por parte del endófito *Xylaria* sp. 1. Los resultados de este estudio sugieren que hongos endófitos con capacidad para degradar HTPs podrían potencialmente emplearse en procesos de biorremediación. Los procesos para el reclutamiento de microorganísmos degradadores petróleo crudo son pobremente conocidos en la actualidad, por lo que un mayor conocimiento, tanto de los procesos de reclutamiento como del conocimiento del rol que las diferentes especies juegan dentro del microecosistema en el interior de la planta, podría ayudar enórmemente en el desarrollo y potenciamiento de las actuales estrategias de fitorremediación empleando hongos endófitos.

7. CONCLUSIONES

La metodología empleada en este estudio, tanto para los ensayos cualitativos como cuantitativos, permitió evaluar de manera óptima las capacidades metabólicas y la cuantificación de los hidrocarburos metabolizados por los hongos endófitos aislados, facilitando la identificación de microorganismos de interés biotecnológico.

De los 133 hongos endófitos evaluados en los ensayos cualitativos, el 40% de los endófitos presentaron algún grado de bioactividad. La gran cantidad de individuos degradadores encontrados respaldan la teoría de que las plantas estimulan el crecimiento de microorganismos con capacidades para biodegradar hidrocarburos.

Se aislaron especies con capacidades metabólicas novedosas, varias de ellas son primeros reportes de biodegradación de hidrocarburos (Helmisthosphaeriaceae sp., Mycosphaerellaceae sp., *Coprinellus* sp. y *Polyporus* sp.). Adicionalmente, varios de los aislados con capacidades para la biodegradación de hidrocarburos corresponden a posibles especies nuevas aún no descritas (Sordariomycetes sp., Xylariales sp., Pleosporales sp. y Pyriculariaceae sp.).

Los análisis filogenéticos demuestran que el grupo taxonómico con mayor abundancia de individuos degradadores de hidrocarburos corresponde al phylum Ascomycota, donde se reúne a la mayor parte de los aislados (94%). Dentro de los ascomicetes, los ordenes con mayor cantidad de aislados degradadores corresponden a Diaporthales, Xylariales y Glomerellales, respectivamente.

Cinco hongos endófitos (*Xylaria* sp. 1, *Clonostachys* sp. 2, *Colletotrichum* sp. 1, *Verticillium* sp., *Aspergillus* sp. y *Mucoraceae* sp.) mostraron resultados prometedores en los ensayos cuantitativos de biodegradación de hidrocarburos, sugiriendo que los endófitos asilados podrían ser utilizados en procesos de biorremediación ambiental.

8. REFERENCIAS

Adams, G. O., Fufeyin, P. T., Okoro, S. E. y Ehinomen, I. (2015). Bioremediation, biostimulation and bioaugmention: a review. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, *3* (1), 28-39.

Al-Nasrawi, H. (2012). Biodegradation of crude oil by fungi isolated from Gulf of Mexico. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, *3* (4), 1-6.

Alberto, R. N., Costa, A. T., Polonio, J. C., Santos, M. S., Rhoden, S. A., Azevedo, J. L. y Pamphile, J. A. (2016). Extracellular enzymatic profiles and taxonomic identification of endophytic fungi isolated from four plant species. *Genetics and molecular research: GMR*, *15* (4).

Ali, S., Huang, Z., Ren, S. X., Bashir, M. H., Afzal, M. y Tong, L. (2009). Production and extraction of extracellular lipase from entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae (Clavicipitaceae: Hypocreales). *Pakistan Journal of Zoology*, *41*, 341-347.

Arellano, P., Tansey, K., Balzter, H. y Tellkamp, M. (2017). Plant family-specific impacts of petroleum pollution on biodiversity and leaf chlorophyll content in the Amazon rainforest of Ecuador. *PloS one*, *12* (1), e0169867.

Arnold, A. E., Maynard, Z., y Gilbert, G. S. (2001). Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity. *Mycological Research*, *105* (12), 1502-1507.

Arnold, E. A. (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews*, *21* (2), 51-66.

Balaji, V. y Ebenezer, P. (2008). Optimization of extracellular lipase production in *Colletotrichum gloeosporioides* by solid state fermentation. *Indian Journal of Science and Technology*, *1* (7), 1-8.

Balaji, V., Arulazhagan, P. y Ebenezer, P. (2014). Enzymatic bioremediation of polyaromatic hydrocarbons by fungal consortia enriched from petroleum contaminated soil and oil seeds. *Journal of environmental biology*, *35* (3), 521.

Baoune, H., El Hadj-Khelil, A. O., Pucci, G., Sineli, P., Loucif, L. y Polti, M. A. (2018). Petroleum degradation by endophytic *Streptomyces* spp. isolated from plants grown in contaminated soil of southern Algeria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *147*, 602-609.

Bascom-Slack, C., Arnold, A. y Strobel, S. (2012). Student-directed discovery of the microbiome and its products. *Science*, *338* (6106), 485-486.

Beller, H. R., Grbić-Galić, D. y Reinhard, M. (1992). Microbial degradation of toluene under sulfate-reducing conditions and the influence of iron on the process. *Applied and Environmental Microbiology*, *58* (3), 786-793.

Bezalel, L., Hadar, Y. y Cerniglia, C. E. (1997). Enzymatic mechanisms involved in Phenanthrene degradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, *63*, 2495–2501.

Bi, J., Ji, Y., Pan, J., Yu, Y., Chen, H., y Zhu, X. (2011). A new taxol-producing fungus (*Pestalotiopsis malicola*) and evidence for taxol as a transient product in the culture. *African Journal of Biotechnology*, *10* (34), 6647-6654.

Bisht, S., Pandey, P., Kaur, G., Aggarwal, H., Sood, A., Sharma, S., Kumar, V. y Bisht, N. S. (2014). Utilization of endophytic strain Bacillus sp. SBER3 for biodegradation of polyaromatic hydrocarbons (PAH) in soil model system. *European Journal of Soil Biology*, *60*, 67-76.

Boonchan, S., Britz, M. L., y Stanley, G. A. (2000). Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Applied and environmental microbiology*, *66* (3), 1007-1019.

Bourdel, G., Roy-Bolduc, A., St-Arnaud, M., y Hijri, M. (2016). Concentration of petroleum-hydrocarbon contamination shapes fungal endophytic community structure in plant roots. *Frontiers in microbiology*, *7*, 685.

Bucheli, E., Gautschi, B. y Shykoff, A. (2000). Host specific differentiation in the anther smut fungus Microbotryum violaceum as revealed by microsatellites. *Journal of Evolutionary Biology*, *13* (2), 188-198.

Camacho, F. J., Gernandt, D. S., Liston, A., Stone, J. K. y Klein, A. S. (1997). Endophytic fungal DNA, the source of contamination in spruce needle DNA. *Molecular Ecology*, *6* (10), 983-987.

Cerniglia, C. E. (1997). Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *19* (5), 324-333.

Cerniglia, C. E., y Sutherland, J. B. (2010). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology* (pp. 2079-2110). Springer, Berlin, Heidelberg.

Chang, S. C., Chen, M. K., Wei, D. L. y Cheng, M. K. (2007). Isolation and characterization of a polycyclic aromatic hydrocarbons-degrading enzyme from *Xylaria regalis*. *Fungal Science*, *22* (1 y 2), 25-33.

Chen, J., Wang, X. J., Hu, J. D. y Tao, S. (2006). Effect of surfactants on biodegradation of PAHs by white-rot fungi. *Huan jing ke xue Huanjing kexue*, *27* (1), 154-159.

Chen, Y., Peng, Y., Dai, C. C. y Ju, Q. (2011). Biodegradation of 4-hydroxybenzoic acid by *Phomopsis liquidambari*. *Applied soil ecology*, *51*, 102-110.

Cuadras, A., Ramírez, N., Rovira, E., Marcé, R. y Borrull, F. (2012). Evaluación del riesgo asociado a la exposición de hidrocarburos aromáticos policíclicos en la salud de la población residente alrededor del complejo químico de Tarragona. *Revista de Salud Ambiental*, *12* (1), 14-25.

Dan, S. U., Li, P. J., Frank, S. y Xiong, X. Z. (2006). Biodegradation of benzo [a] pyrene in soil by *Mucor* sp. SF06 and *Bacillus* sp. SB02 co-immobilized on vermiculite. *Journal of Environmental Sciences*, *18* (6), 1204-1209.

Deng, Z. y Cao, L. (2017). Fungal endophytes and their interactions with plants in phytoremediation: a review. *Chemosphere*, *168*, 1100-1106.

Ding, J., Cong, J., Zhou, J. y Gao, S. (2008). Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation and extracellular enzyme secretion in agitated and stationary cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Environmental Sciences*, *20* (1), 88-93.

Drevinskas, T., Mickienė, R., Maruška, A., Stankevičius, M., Tiso, N., Mikašauskaitė, J. y Stankevičienė, A. (2016). Downscaling the in vitro test of fungal bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: methodological approach. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *408* (4), 1043-1053.

Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, *32* (5), 1792-1797.

Fontaine, G. (2013). Sobre bonanzas y dependencia: petróleo y enfermedad holandesa en el Ecuador. *Íconos-Revista de Ciencias Sociales*, *1* (13), 102-110.

Giraud, F., Guiraud, P., Kadri, M., Blake, G. y Steiman, R. (2001). Biodegradation of anthracene and fluoranthene by fungi isolated from an experimental constructed wetland for wastewater treatment. *Water research*, *35* (17), 4126-4136.

Gladden, J. M., Allgaier, M., Miller, C. S., Hazen, T. C., VanderGheynst, J. S., Hugenholtz, P., Simmons, B. A. y Singer, S. W. (2011). Glycoside hydrolase

activities of thermophilic bacterial consortia adapted to switchgrass. *Applied and environmental microbiology*, *77* (16), 5804-5812.

Hammel, K. E. (1995). Mechanisms for polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Degradation by ligninolytic fungi. *Environmental Health Perspectives*, *103* (5), 41.

Hanson, K. G., Desai, J. D. y Desai, A. J. (1993). A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnology techniques*, *7* (10), 745-748.

Hidayat, A. y Tachibana, S. (2013). Crude Oil and n-Octadecane Degradation under Saline Conditions by *Fusarium* sp., F 092. *Journal of Environmental Science and Technology*, *6* (1).

Hurtig, A. K. y San Sebastián, M. (2002). Geographical differences in cancer incidence in the Amazon basin of Ecuador in relation to residence near oil fields. *International Journal of Epidemiology, 31* (5), 1021-1027.

Hutchins, S. R., Sewell, G. W., Kovacs, D. A. y Smith, G. A. (1991). Biodegradation of aromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms under denitrifying conditions. *Environmental Science & Technology*, *25* (1), 68-76.

Jadoon, S., Amin, A. A., Malik, A. y Khalel, H. (2016). Effects of crude oil contamination under the controlled conditions on the physicochemical properties of water in Khurmala and Guwayar, Kurdistan Region, Iraq. *Journal of Pollution Effeccts and Control*, *4* (165), 2.

Jordahl, J. L., Foster, L., Schnoor, J. L. y Alvarez, P. J. (1997). Effect of hybrid poplar trees on microbial populations important to hazardous waste bioremediation. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *16* (6), 1318-1321.

Kaul S., Gupta S., Ahmed M. y Dhar M. K. (2012). Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. *Phytochemistry reviews*, *11* (4), 487-505.

Khan, R., Shahzad, S. y Choudhary, M. (2010). Communities of endophytic fungi in medicinal plant *Withania somnifera*. *Pakistan Journal of Botany*, *42* (2), 1281-1287.

Korda, A., Santas, P., Tenente, A., y Santas, R. (1997). Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used. *Applied microbiology and biotechnology*, *48* (6), 677-686.

Kusari, S., Hertweck, C. y Spiteller, M. (2012). Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. *Chemistry & Biology*, *19* (7), 792-798.

Leahy, J. G., y Colwell, R. R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological reviews*, *54* (3), 305-315.

Lundberg, D. S., Lebeis, S. L., Paredes, S. H., Yourstone, C., Gehring, J., Malfatti, S., Tremblay, J., Engelbrektson, A., Kunin, V., del Rio, T. G., Edgar, R. C., Eickhorst, T., Ley, R. E., Hugenholtz, P., Tringe, S. G. y Dangl, J. F. (2012). Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature, 488* (7409), 86-90.

Maccheroni Jr, W., Araújo, W. L., y Azevedo, J. L. (2004). Ambient pH-regulated enzime secretion in endophytic and pathogenic isolates of the fungal genus Colletotrichum. *Scientia agricola*, *61* (3), 298-302.

Maddela, N., Scalvenzi, L., Pérez, M., Montero, C. y Gooty, J. (2015). Efficiency of Indigenous Filamentous Fungi for Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Medium and Soil: Laboratory Study from Ecuador. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *95* (3), 385-394.

Marchut-Mikolajczyk, O., Kwapisz, E., Wieczorek, D. y Antczak, T. (2015). Biodegradation of diesel oil hydrocarbons enhanced with *Mucor circinelloides* enzyme preparation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *104*, 142-148.

Peltonen, K. y Kuljukka, T. (1995). Air sampling and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Chromatography*, *710* (1), 93-108.

Peng, A., Liu, J., Gao, Y. y Chen, Z. (2013). Distribution of endophytic bacteria in *Alopecurus aequalis* Sobol and *Oxalis corniculata* L. from soils contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons. *PLoS One*, *8* (12), e83054.

Pieper, D. H. y Reineke, W. (2000). Engineering bacteria for bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, *11* (3), 262-270.

Pointing, S. (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *57* (1-2), 20-33.

Potin, O., Rafin, C., y Veignie, E. (2004). Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *54* (1), 45-52.

Rahman, K. S. M., Rahman, T. J., Kourkoutas, Y., Petsas, I., Marchant, R. y Banat, I. M. (2003). Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial

consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresource Technology*, *90* (2), 159-168.

Reda, A. B. (2009). Bacterial bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in heavy oil contaminated soil. *Journal of Applied Sciences Research*, (Febrero), 197-201.

Rodriguez, R. J., White, J. F., Arnold, A. E. y Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, *182* (2), 314-330.

Russell, J., Huang, J., Anand, P., Kucera, K., Sandoval, A., Dantzler, K., Hickman, D., Jee, J., Kimovec, F., Koppstein, D., Marks, D., Mittermiller, P., Núñez, S., Santiago, M., Townes, M., Vishnevetsky, M., Williams, N., Núñez, M., Boulanger, L., Bascom-Slack, C. y Strobel, S. (2011). Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi. *Applied and environmental microbiology*, *77* (17), 6076-6084.

Sack, U., Heinze, T. M., Deck, J., Cerniglia, C. E., Cazau, M. C. y Fritsche, W. (1997). Novel metabolites in phenanthrene and pyrene transformation by *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, *63* (7), 2906-2909.

Samanta, S., Singh, O. y Jain, R. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *TRENDS in Biotechnology*, *20* (6), 243-248.

San Sebastian, M. y Hurtig, A. (2004). Oil exploitation in the Amazon basin of Ecuador: a public health emergency. *Pan American Journal of Public Health*, *15* (3), 109-116.

Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Römmert, A. K. y Krohn, K. (2002). Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, *106* (09), 996-1004.

Schulz, B., Römmert, A. K., Dammann, U., Aust, H. J. y Strack, D. (1999). The endophyte-host interaction: a balanced antagonism?. *Mycological Research*, *103* (10), 1275-1283.

Sorkhoh, N. A., Ghannoum, M. A., Ibrahim, A. S., Stretton, R. J. y Radwan, S. S. (1990). Crude oil and hydrocarbon-degrading strains of *Rhodococcus rhodochrous* isolated from soil and marine environments in Kuwait. *Environmental Pollution*, *65* (1), 1-17.

Stamatakis, A. (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, *22* (21), 2688-2690.

Strobel, G. A., Dirkse, E., Sears, J. y Markworth, C. (2001). Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*, *147* (11), 2943-2950.

Strobel G. A. y Daisy B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *67* (4), 491-502.

Szewczyk, R. y Długoński, J. (2009). Pentachlorophenol and spent engine oil degradation by *Mucor ramosissimus*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *63* (2), 123-129.

Takahashi-Ando, N., Ohsato, S., Shibata, T., Hamamoto, H., Yamaguchi, I. y Kimura, M. (2004). Metabolism of zearalenone by genetically modified organisms expressing the detoxification gene from *Clonostachys rosea*. *Applied and Environmental Microbiology*, *70* (6), 3239-3245.

Tian, L. S., Dai, C. C., Zhao, Y. T., Zhao, M., Yong, Y. H. y Wang, X. X. (2007). The degradation of phenanthrene by endophytic fungi *Phomopsis* sp. single and co-cultured with rice. *China Environmental Science-Chinese Edition*, *27* (6), 757.

Timmis, K., y Pieper, D. (1999). Bacteria designed for bioremediation. *Trends in Biotechnology*, *17* (5), 201-204.

Tisot, B. y Welte, D. (2013). Biological Productivity of modern aquatic environments. Springer-Verlag (Eds.). *Petroleum formation and occurrence* (pp. 126-127). New York: Springer Science & Business Media.

Umanu, G. y Dodo, D. S. (2013). Assessment of Oil-Eating Fungi Isolated from Spent Engine Oil Polluted Soil Environments. *The Pacific Journal Science and Technology*, *14* (2), 609-616.

Van Hamme, J., Singh, A. y Ward, O. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *67* (4), 503-549.

Wang, S., Nomura, N., Nakajima, T. y Uchiyama, H. (2012). Case study of the relationship between fungi and bacteria associated with high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. *Journal of bioscience and bioengineering*, *113* (5), 624-630.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J. W. (1990). PCR Protocols: guide to methods and applications: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA gene for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, *18* (1), 315-322.

Xiaoyu, F. E. N. G., Huiying, C. H. E. N., Dongsheng, X. U. E., y Shanjing, Y. A. O. (2013). Enhancement of laccase activity by marine-derived deuteromycete *Pestalotiopsis* sp. J63 with agricultural residues and inducers. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, *21* (10), 1182-1189.

Yanto, D. H. Y. y Tachibana, S. (2013). Biodegradation of petroleum hydrocarbons by a newly isolated *Pestalotiopsis* sp. NG007. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *85*, 438-450.

Yanto, D., y Tachibana, S. (2014). Enhanced biodegradation of asphalt in the presence of Tween surfactants, Mn2+ and H2O2 by *Pestalotiopsis* sp. in liquid medium and soil. *Chemosphere*, *103*, 105-113.

Zhang, Z., Hou, Z., Yang, C., Ma, C., Tao, F., y Xu, P. (2011). Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated Pseudomonas aeruginosa DQ8. *Bioresource Technology*, *102* (5), 4111-4116.

9. FIGURAS

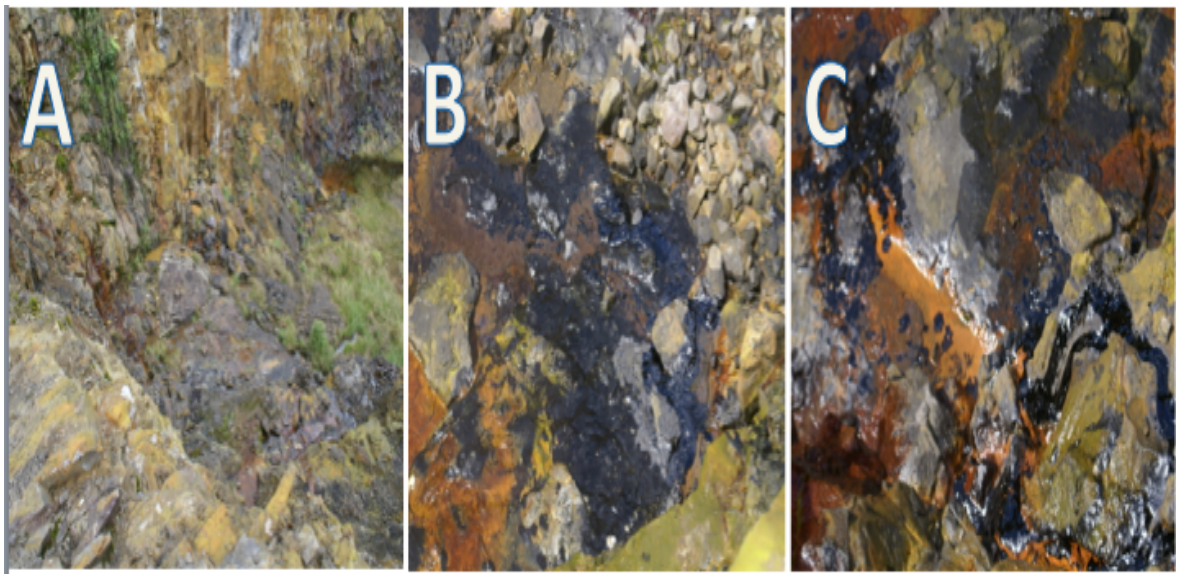


Figura 1. Sitio de colección de muestras vegetales. A. Vista de la localidad "Las Minas" desde el nivel de la carretera. **B.** Suelo contaminado con petróleo crudo. **C.** Pequeño riachuelo donde se observa el nivel de contaminación del agua de la zona.

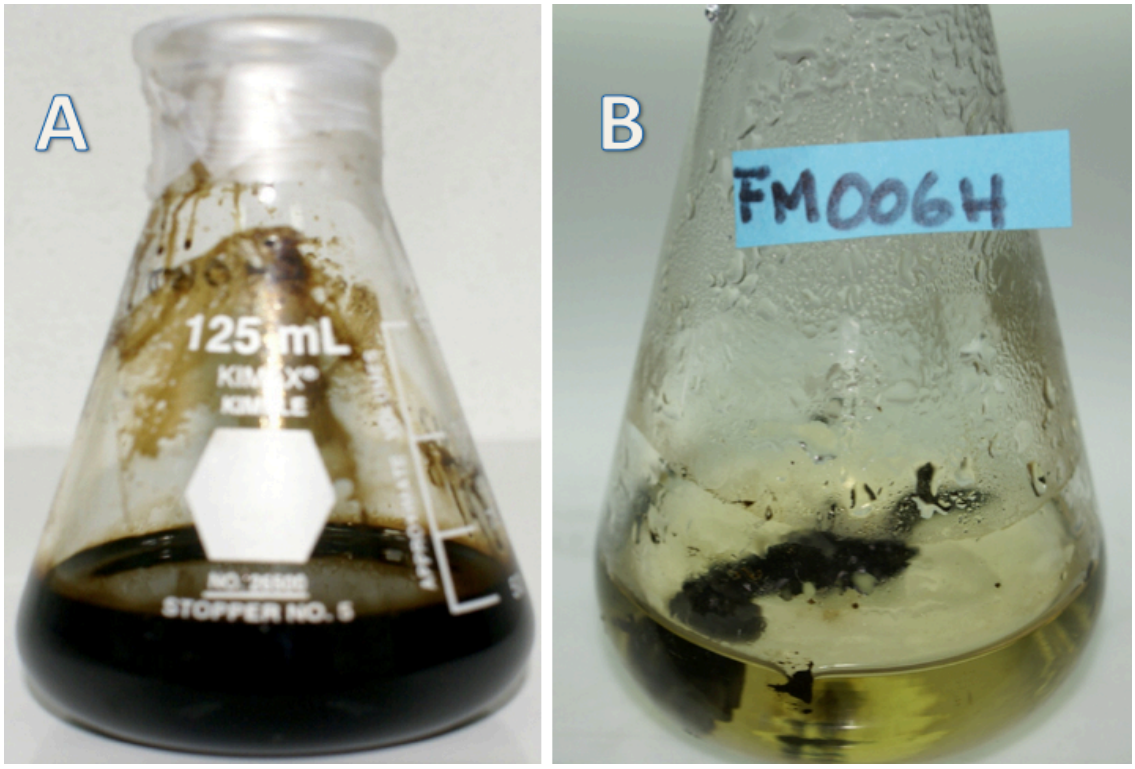


Figura 2. Ensayo cualitativo de biodegradación de hidrocarburos. A. Control negativo: donde se observa la apariencia inicial del medio de cultivo producto del petróleo crudo **B.** Resultado positivo: apariencia del medio de cultivo al producirse la biodegradación de hidrocarburos por un hongo endófito, en este caso se observa la degradación resultante con *Xylaria* sp. 8, observándose una aclaración total del medio de cultivo después de 10 días de ensayo.

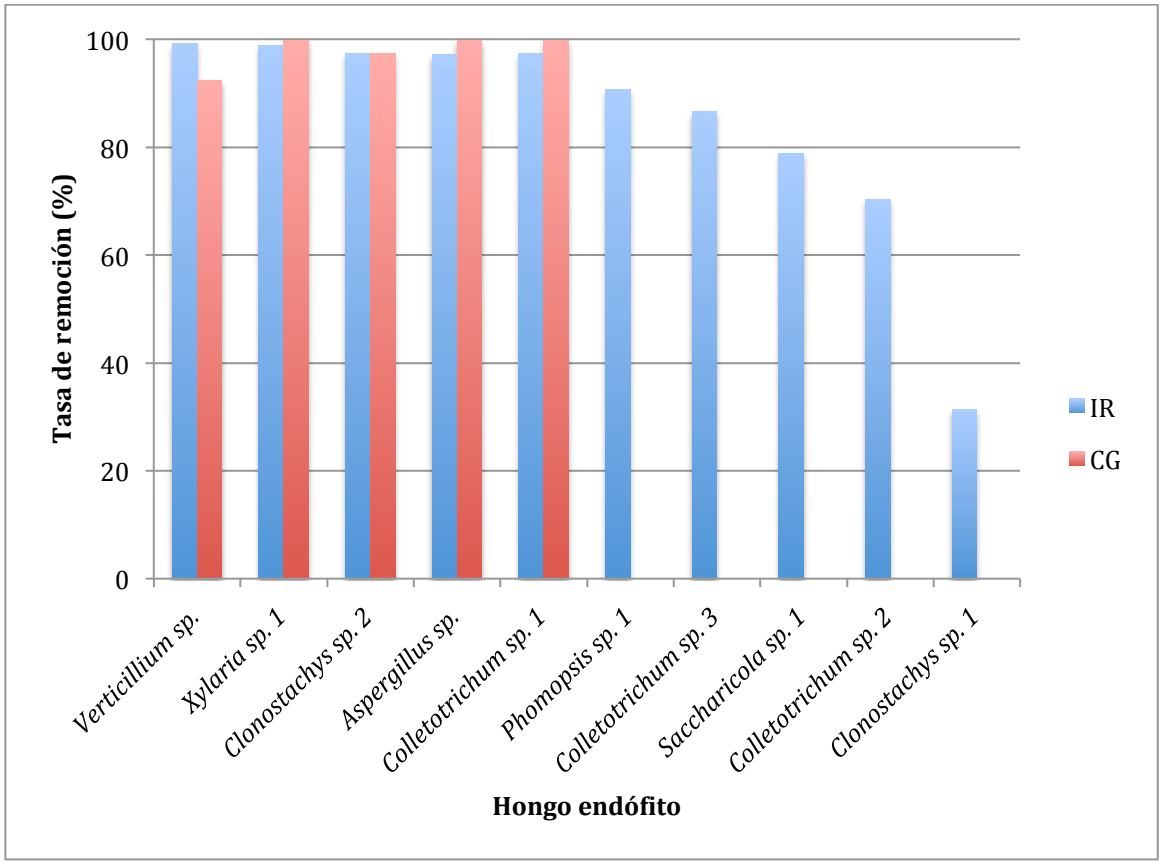


Figura 3. Tasas de remoción de hidrocarburos. Resultados obtenidos tras 30 días de incubación en el medio de cultivo MSM suplementado con petróleo crudo al 1%. Se puede observar los resultados cuantificados por espectroscopia infrarroja en azul (IR) y por cromatografía de gases en rojo (CG) con los 10 y 5 mejores biodegradadores de hidrocarburos respectivamente.

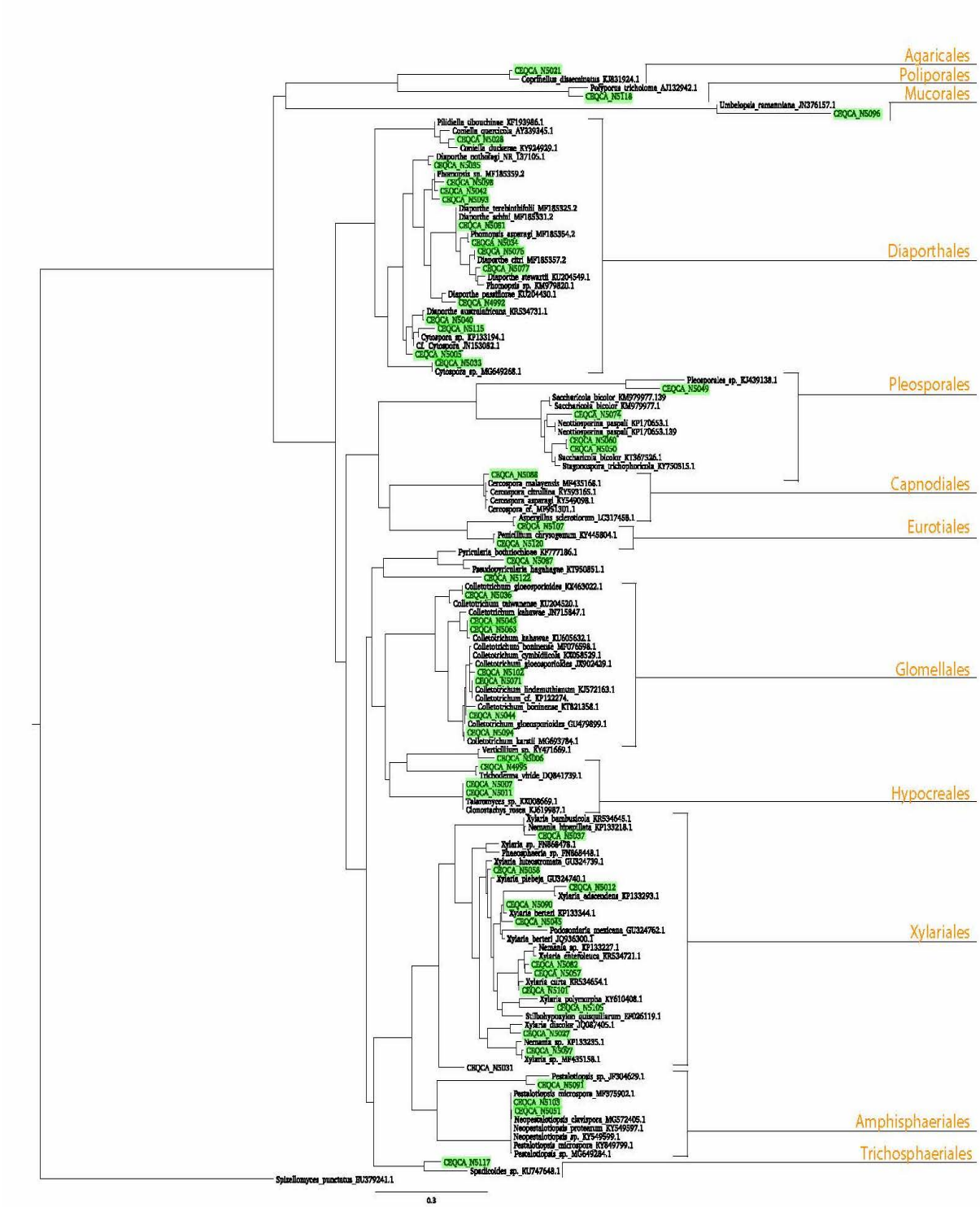


Figura 4. Árbol filogenético de máxima verosimilitud de las secuencias ITS de hongos endófitos biodegradadores de hidrocarburos. Los aislados se muestran con el código CEQCA (verde), agrupados en sus respectivo ordenes taxonómicos (amarillo). *Spizellomyces punctatus* fue usado como grupo externo.

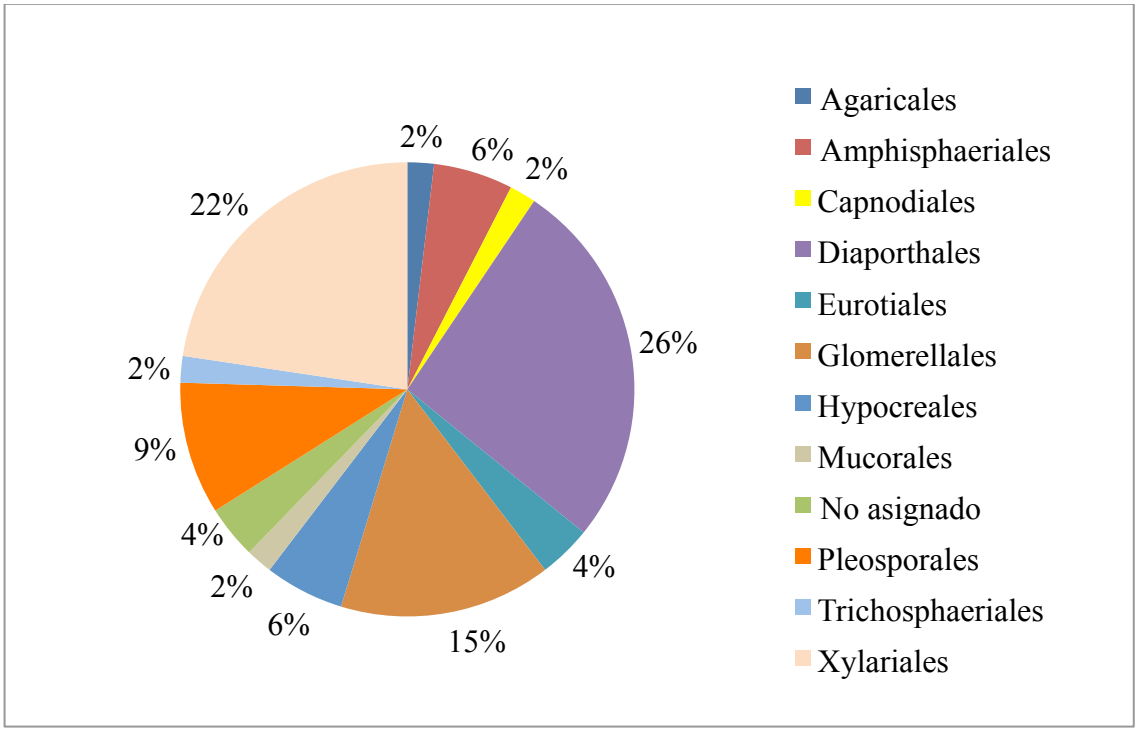


Figura 5. Ordenes taxonómicos de hongos endófitos biodegradadores de hidrocarburos. Porcentajes de hongos clasificados en cada orden (N=53). El 4% de los endófitos identificados no pudieron asignárseles la categoría taxonómica de orden. Los ordenes con mayor número de aislados Diaporthales (26%) y Xylariales (22%).

10. TABLAS

Tabla 1. Identificación taxonómica de las plantas colectadas en el campo y número de endófitos aislados por planta.

ID de Planta	Familia	Género	Especie	Total de endófitos aislados
FM001	MELASTOMATACEAE			7
FM002	GLEICHENIACEAE	*Gleichenia*	sp	5
FM003	MARATTIACEAE	*Marattia*	sp	12
FM004	POLYPODIACEAE	*Polipodium*	sp	9
FM005	ORCHIDACEAE			2
FM006	No Identificada			10
FM007	LYCOPODIACEAE	*Lycopodium*	sp	5
FM008	BORAGINACEAE			9
FM009	MELASTOMATACEAE	*Conostegia*	sp	5
FM010	CYPERACEAE	*Carex*	sp	2
FM011	POACEAE			6
FM012	POACEAE			2
FM013	BRYOPHYTA			4
FM014	BORAGINACEAE			4
FM015	MELASTOMATACEAE	*Miconia*	*crassa*	4
FM016	GUNNERACEAE			8
FM017	No Identificada			3
FM018	EUPHORBIACEAE	*Croton*	sp	9
FM019	URTICACEAE	*Cecropia*	*maxima*	4

Tabla 1. Continuación.

ID de Planta	Familia	Género	Especie	Total de endófitos aislados
FM020	POACEAE			6
FM021	BIGNONIACEAE	*Jacaranda*	sp	5
FM022	RUBIACEAE			8
FM023	POACEAE			4

Tabla 2. Resultados de bioactividad positiva de hongos endófitos para ensayos cualitativos de biodegradación de hidrocarburos. Nivel de aclaramiento leve (+), medio (++), total (+++).

No.	Código CEQCA	Resultado	Nivel de aclaramiento del medio	Tiempo
1	CEQCA-N4992	Positivo parcial	+	10 días (fin del ensayo)
2	CEQCA-N5028	Positivo parcial	++	10 días (fin del ensayo)
3	CEQCA-N5097	Positivo parcial	++	10 días (fin del ensayo)
4	CEQCA-N5096	Positivo	+++	7 días
5	CEQCA-N5011	Positivo	+++	5 días
6	CEQCA-N5012	Positivo	+++	8 días
7	CEQCA-N5071	Positivo	+++	5 días
8	CEQCA-N5005	Positivo parcial	+	10 días (fin del ensayo)
9	CEQCA-N5090	Positivo parcial	+	10 días (fin del ensayo)
10	CEQCA-N5091	Positivo parcial	++	10 días (fin del ensayo)
11	CEQCA-N5006	Positivo	+++	4 días
12	CEQCA-N5007	Positivo	+++	7 días
13	CEQCA-N5058	Positivo parcial	++	10 días (fin del ensayo)
14	CEQCA-N5107	Positivo	+++	4 días
15	CEQCA-N5122	Positivo parcial	+	10 días (fin del ensayo)
16	CEQCA-N5034	Positivo parcial	++	10 días (fin del ensayo)
17	CEQCA-N5035	Positivo parcial	+	10 días (fin del ensayo)
18	CEQCA-N5036	Positivo parcial	+	10 días (fin del ensayo)
19	CEQCA-N5037	Positivo parcial	++	10 días (fin del ensayo)
20	CEQCA-N5103	Positivo parcial	++	10 días (fin del ensayo)
21	CEQCA-N5074	Positivo parcial	++	10 días (fin del ensayo)
22	CEQCA-N5033	Positivo parcial	+	10 días (fin del ensayo)
23	CEQCA-N5102	Positivo	+++	6 días
24	CEQCA-N5087	Positivo parcial	+	10 días (fin del ensayo)
25	CEQCA-N5088	Positivo parcial	++	10 días (fin del ensayo)
26	CEQCA-N5050	Positivo parcial	+	10 días (fin del ensayo)
27	CEQCA-N5051	Positivo parcial	+	10 días (fin del ensayo)

Tabla 2. Continuación.

No.	Código CEQCA	Resultado	Nivel de aclaramiento del medio	Tiempo
28	CEQCA-N5060	Positivo	+++	8 días
29	CEQCA-N5057	Positivo parcial	++	10 días (fin del ensayo)
30	CEQCA-N5101	Positivo parcial	+	10 días (fin del ensayo)
31	CEQCA-N5043	Positivo	+++	5 días
32	CEQCA-N5044	Positivo parcial	+	10 días (fin del ensayo)
33	CEQCA-N5045	Positivo parcial	+	10 días (fin del ensayo)
34	CEQCA-N5081	Positivo parcial	++	10 días (fin del ensayo)
35	CEQCA-N5076	Positivo parcial	++	10 días (fin del ensayo)
36	CEQCA-N5077	Positivo parcial	+	10 días (fin del ensayo)
37	CEQCA-N5063	Positivo parcial	+	10 días (fin del ensayo)
38	CEQCA-N5105	Positivo parcial	++	10 días (fin del ensayo)
39	CEQCA-N5120	Positivo parcial	+	10 días (fin del ensayo)
40	CEQCA-N5117	Positivo parcial	+	10 días (fin del ensayo)
41	CEQCA-N5098	Positivo	+++	8 días
42	CEQCA-N5042	Positivo parcial	+	10 días (fin del ensayo)
43	CEQCA-N5049	Positivo parcial	+	10 días (fin del ensayo)
44	CEQCA-N5093	Positivo parcial	++	10 días (fin del ensayo)
45	CEQCA-N5094	Positivo parcial	++	10 días (fin del ensayo)
46	CEQCA-N5040	Positivo parcial	+	10 días (fin del ensayo)
47	CEQCA-N5082	Positivo parcial	++	10 días (fin del ensayo)
48	CEQCA-N5027	Positivo parcial	+	10 días (fin del ensayo)
49	CEQCA-N5031	Positivo parcial	++	10 días (fin del ensayo)
50	CEQCA-N4995	Positivo parcial	+	10 días (fin del ensayo)
51	CEQCA-N5021	Positivo parcial	++	10 días (fin del ensayo)
52	CEQCA-N5115	Positivo parcial	++	10 días (fin del ensayo)
53	CEQCA-N5118	Positivo parcial	+	10 días (fin del ensayo)

Tabla 3. Tasas de remoción de hidrocarburos cuantificados por espectroscopia infrarroja (IR) y cromatografía de gases (CG).

Endófito	IR		CG	
	Tasa de remoción %	**Desviación estándar**	**Tasa de remoción %**	**Desviación estándar**
***Verticillium* sp.**	99.64	0.21	92.41	4.55
***Xylaria* sp. 1**	98.78	0.98	99.82	0.02
***Aspergillus* sp.**	97.65	0.61	99.82	0.03
***Colletotrichum* sp. 1**	97.46	0.02	99.75	0.01
***Clonostachys* sp. 2**	97.41	0.94	99.69	0.01
***Phomopsis* sp. 1**	90.67	1.76	-	-
***Colletotrichum* sp. 3**	86.53	0.12	-	-
***Saccharicola* sp. 1**	78.94	0.26	-	-
***Colletotrichum* sp. 2**	70.37	2.31	-	-
***Clonostachys* sp. 1**	31.46	0.01	-	-

Tabla 4. Cuantificación de hidrocarburos de petróleo persistentes en el medio de cultivo por cromatografía de gases (CG) después de 30 días de incubación con hongos endófitos.

Compuesto	**Control 1**		***Verticill-ium* sp.**	***Clonostac-hys* sp. 2**	***Xylaria* sp.1**	***Colletotri-chum* sp. 1**	***Aspergillus* sp.**
	Tiempo de retención	Área	Área	Área	Área	Área	Área
n-octano	5.675	93622	-	-	-	-	-
n-nonano	8.241	13390	11391	11560	-	10450	-
1,2,3-trimetil benceno	10.242	34895	-	-	-	-	-
Trans-decahidro naftaleno	10.465	16317	-	-	-	-	-
1,2,4,5-Tetrametil benceno	11.003	28923	-	-	-	-	-
n-undecano	11.517	45834	-	-	-	-	-
n-dodecano	13.482	124133	-	-	-	-	-
Pentametil benceno	15.315	204225	-	-	-	-	-
n-tetradecano	16.868	241542	-	-	-	-	-

Tabla 5. Identificación taxonómica de los 53 aislados fúngicos endófitos biodegradadores de hidrocarburos.

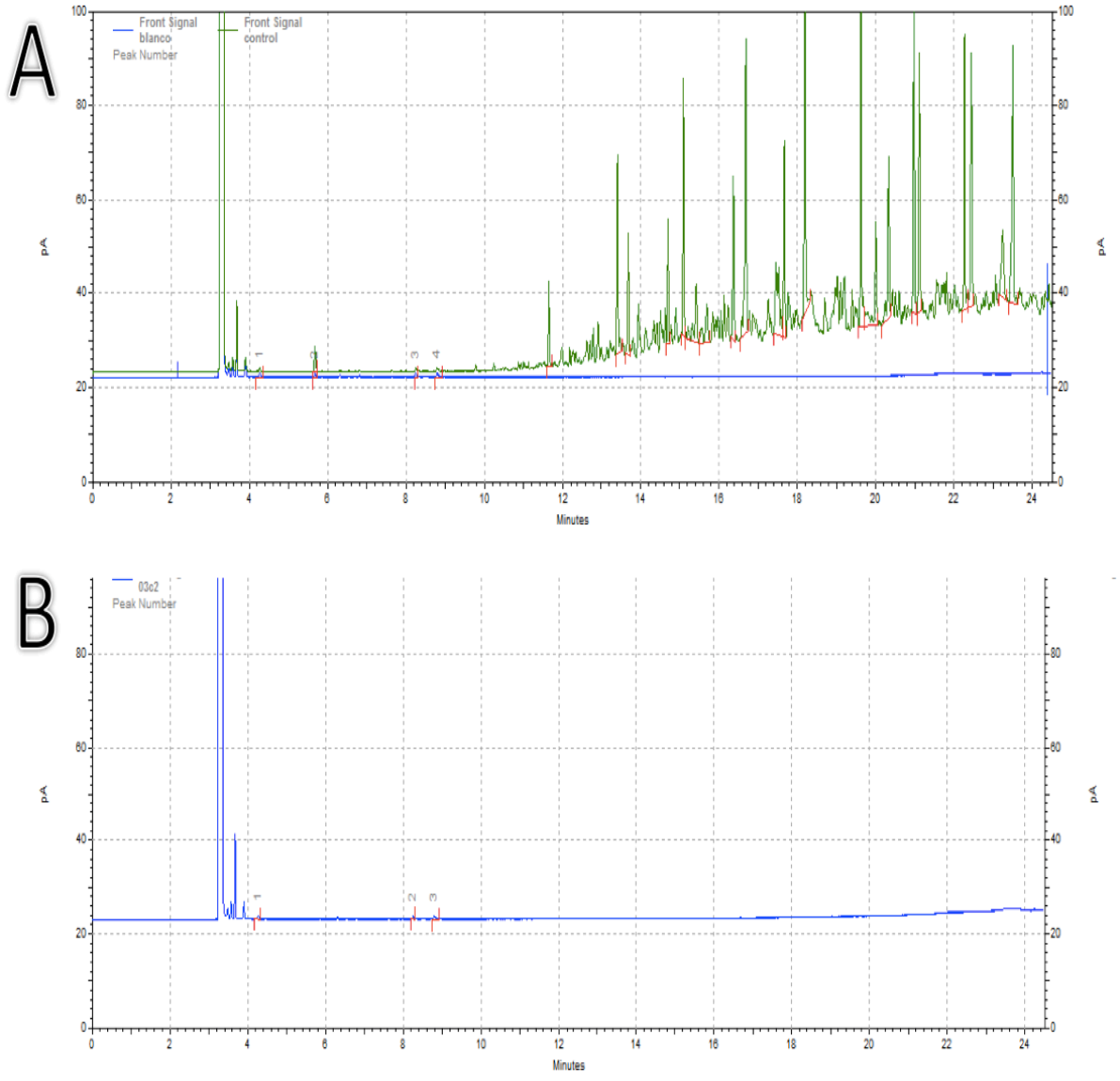
No.	Código CEQCA	ID (%)	QC (%)	Género y especie (BLAST)	ID establecida	Familia
1	**CEQCA-N4992**	97	99	*Diaporthe passiflorae*	*Diaporthe* sp. 5	Diaporthaceae
2	**CEQCA-N4995**	99	100	*Trichoderma viride*	*Trichoderma* sp.	Hypocreaceae
3	**CEQCA-N5005**	99	100	*Cytospora* sp.	Valsaceae sp. 1	Valsaceae
4	**CEQCA-N5006**	99	100	*Verticillium* sp.	*Verticillium* sp.	Plectosphaerellace-ae
5	**CEQCA-N5007**	100	100	*Clonostachys rosea*	*Clonostachys* sp. 1	Bionectriaceae
6	**CEQCA-N5011**	100	100	Clonostachys sp.	*Clonostachys* sp. 2	Bionectriaceae
7	**CEQCA-N5012**	99	100	*Xylaria adscendens*	*Xylaria* sp.1	Xylariaceae
8	**CEQCA-N5021**	100	98	*Coprinellus disseminatus*	*Coprinellus* sp.	Psathyrellaceae
9	**CEQCA-N5027**	99	100	*Xylaria discolor*	*Xylaria* sp.6	Xylariaceae
10	**CEQCA-N5028**	98	100	*Coniella* sp.	*Coniella* sp.	Schizoparmaceae
11	**CEQCA-N5031**	90	84	Xylariales sp.	Xylariales sp.	-
12	**CEQCA-N5033**	100	100	*Cytospora* sp.	Valsaceae sp. 2	Valsaceae
13	**CEQCA-N5034**	99	100	*Phomopsis asparagi*	*Phomopsis* sp. 4	Diaporthaceae
14	**CEQCA-N5035**	98	100	*Diaporthe nothofagi*	*Diaporthe* sp. 4	Diaporthaceae
15	**CEQCA-N5036**	100	100	*Colletotrichum taiwanense*	*Colletotrichum* sp. 7	Glomerellaceae
16	**CEQCA-N5037**	99	99	*Xylaria* sp.	*Xylaria* sp.9	Xylariaceae
17	**CEQCA-N5040**	99	100	*Diaporthe australafricana*	*Diaporthe* sp. 2	Diaporthaceae
18	**CEQCA-N5042**	99	100	*Phomopsis* sp.	*Phomopsis* sp. 2	Diaporthaceae
19	**CEQCA-N5043**	100	100	*Colletotrichum kahawae*	*Colletotrichum* sp. 3	Glomerellaceae
20	**CEQCA-N5044**	100	100	*Colletotrichum* sp.	*Colletotrichum* sp. 6	Glomerellaceae
21	**CEQCA-N5045**	99	100	*Xylaria* sp.	*Xylaria* sp.10	Xylariaceae
22	**CEQCA-N5049**	94	100	Pleosporales sp.	Pleosporales sp.	-
23	**CEQCA-N5050**	97	100	*Saccharicola* sp.	*Saccharicola* sp. 2	Lophiostomataceae
24	**CEQCA-N5051**	100	99	*Neopestalotiopsis protearum*	*Pestalotiopsis* sp. 2	Pestalotiopsidaceae
25	**CEQCA-N5057**	99	100	*Nemania* sp.	*Xylaria* sp. 3	Xylariaceae
26	**CEQCA-N5058**	99	99	*Xylaria plebeja*	*Xylaria* sp. 8	Xylariaceae
27	**CEQCA-N5060**	97	100	*Saccharicola* sp.	*Saccharicola* sp. 1	Lophiostomataceae

Tabla 5. Continuación.

No.	Código CEQCA	ID (%)	QC (%)	Género y especie (BLAST)	ID establecida	Familia
28	**CEQCA-N5063**	100	100	*Colletotrichum kahawae*	*Colletotrichum* sp. 4	Glomerellaceae
29	**CEQCA-N5071**	99	100	*Colletotrichum* sp.	*Colletotrichum* sp.1	Glomerellaceae
30	**CEQCA-N5074**	97	100	*Saccharicola bicolor*	*Saccharicola* sp. 3	Lophiostomataceae
31	**CEQCA-N5076**	100	100	*Diaporthe citri*	*Diaporthe* sp. 3	Diaporthaceae
32	**CEQCA-N5077**	99	100	*Diaporthe stewartii*	*Diaporthe* sp. 1	Diaporthaceae
33	**CEQCA-N5081**	100	100	*Diaporthe* sp.	*Diaporthe* sp. 6	Diaporthaceae
34	**CEQCA-N5082**	100	99	*Xylaria enteroleuca*	*Xylaria* sp.7	Xylariaceae
35	**CEQCA-N5087**	91	99	Pyriculariaceae sp.	Pyriculariaceae sp.	Pyriculariaceae
36	**CEQCA-N5088**	99	100	*Cercospora* sp.	Mycosphaerellacae sp.	Mycosphaerellace-ae
37	**CEQCA-N5090**	99	100	*Xylaria berteri*	*Xylaria* sp.5	Xylariaceae
38	**CEQCA-N5091**	95	100	*Pestalotiopsis* sp.	*Pestalotiopsis* sp. 3	Pestalotiopsidaceae
39	**CEQCA-N5093**	99	99	*Phomopsis* sp.	*Phomopsis* sp. 3	Diaporthaceae
40	**CEQCA-N5094**	100	100	*Colletotrichum Karstii*	*Colletotrichum* sp. 5	Glomerellaceae
41	**CEQCA-N5096**	99	100	*Umbelopsis ramanniana*	Mucoraceae sp.	Mucoraceae
42	**CEQCA-N5097**	99	100	*Nemania* sp.	*Xylaria* sp.2	Xylariaceae
43	**CEQCA-N5098**	100	100	*Phomopsis* sp.	*Phomopsis* sp. 1	Diaporthaceae
44	**CEQCA-N5101**	100	100	*Nemania* sp.	*Xylaria* sp.4	Xylariaceae
45	**CEQCA-N5102**	99	99	*Colletotrichum lindemuthianum*	*Colletotrichum* sp. 2	Glomerellaceae
46	**CEQCA-N5103**	100	99	*Neopestalotiopsis clavispora*	*Pestalotiopsis* sp. 1	Pestalotiopsidaceae
47	**CEQCA-N5105**	89	100	*Xylaria* sp.	*Xylaria* sp.11	Xylariaceae
48	**CEQCA-N5107**	100	100	*Aspergillus esclerotiorum*	*Aspergillus* sp.	Trichocomaceae
49	**CEQCA-N5115**	99	99	*Cytospora* sp.	Valsaceae sp. 3	Valsaceae
50	**CEQCA-N5117**	92	100	Spadicoides sp.	Helmisthosphaeria-ceae sp.	Helminthosphaeri-aceae
51	**CEQCA-N5118**	99	98	*Polyporus tricholoma*	*Polyporus* sp.	Polyporaceae
52	**CEQCA-N5120**	100	100	*Penicillium chrysogenum*	*Penicillium* sp.	Trichocomaceae
53	**CEQCA-N5122**	99	100	Sordariomycetes sp.	Sordariomycetes sp.	-

11. ANEXOS

Anexo 1. Cromatogramas resultado de la cuantificación de HTP por cromatografía de gases (CG) de los ensayos cuantitativos. **A.** Resultados de la muestra control (verde), junto con la muestra blanco de DCM (azul), en rojo se observan los picos con los compuestos identificados. **B.** Resultados obtenidos con el hongo endófito *Clonostachys* sp. 2.



Anexo 2. Resultados ANOVA de un factor con los resultados de la cuantificación de HTP por espectroscopia infrarroja.

Datos	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	Sig.
Entre grupos	21,834	10	2,183	14,638	0,000
Dentro de grupos	3,282	22	0,149		
Total	25,115	32			

Anexo 3. Análisis de comparaciones múltiples de Tukey con los resultados de la cuantificación de HTP por espectroscopia infrarroja.

Endófito	**Subconjunto**		
	1	**2**	**3**
***Clonostachys* sp. 1**	1,2933		
***Colletotrichum* sp. 2**	1,3967		
***Saccharicola* sp. 1**	2,1933	2,1933	
***Colletotrichum* sp. 3**	2,2200	2,2200	
***Phomopsis* sp. 1**	2,2433	2,2433	
***Clonostachys* sp. 2**		2,8033	2,8033
***Colletotrichum* sp. 1**		2,9667	2,9667
***Aspergillus* sp.**		3,1633	3,1633
***Xylaria* sp. 1**		3,3100	3,3100
***Verticillium* sp.**			3,6800
Control			3,8433
Sig.	0,152	0,054	0,088

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Fernando Javier Marín Minda, con CC.# 1719709840, autor del trabajo de graduación intitulado "Biodegradación de Hidrocarburos Totales de Petróleo por Hongos Endófitos de la Amazonia Ecuatoriana" previa la obtención del grado académico de licenciada en Ciencias Biológicas, en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 28 de noviembre del 2018

Fernando Javier Marín Minda
CC.# 1719709840