

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE CUENCA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE
LOS RECURSOS NATURALES

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS
RECURSOS NATURALES

TRABAJO EXPERIMENTAL:

BIODEGRADACIÓN DE RESIDUOS PROCEDENTES DE UNA
LÍNEA DE PRODUCCIÓN DE LAMINADOS EMPLEANDO
***Trichoderma* sp.**

AUTORA:

YESSENIA ELIZABETH BERMEO ROJAS

TUTORA:

DRA. INÉS PATRICIA MALO CEVALLOS

CUENCA – ECUADOR

2018

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, Yessenia Elizabeth Bermeo Rojas, con cédula N° 0105633473, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del trabajo de titulación: BIODEGRADACIÓN DE RESIDUOS PROCEDENTES DE UNA LÍNEA DE PRODUCCIÓN DE LAMINADOS EMPLEANDO *Trichoderma* sp., mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado por La Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autora me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento de la entrega del trabajo final en formato impreso y digital en la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana

Cuenca, Julio del 2018



Yessenia Elizabeth Bermeo Rojas
C.I 0105633473

CERTIFICACIÓN

Yo, Inés Patricia Malo Cevallos, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación BIODEGRADACIÓN DE RESIDUOS PROCEDENTES DE UNA LÍNEA DE PRODUCCIÓN DE LAMINADOS EMPLEANDO *Trichoderma* sp., realizado por Yessenia Elizabeth Bermeo Rojas, obteniendo el Trabajo Experimental que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, Julio del 2018




Dra. Inés Patricia Malo Cevallos

CI: 0102291044

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Yo, Yessenia Elizabeth Bermeo Rojas, con cédula N° 0105633473, autora del trabajo de titulación BIODEGRADACIÓN DE RESIDUOS PROCEDENTES DE UNA LÍNEA DE PRODUCCIÓN DE LAMINADOS EMPLEANDO *Trichoderma* sp., certifico que el total contenido del Trabajo Experimental es de mi exclusiva responsabilidad y autoría

Cuenca, Julio del 2018



Yessenia Bermeo Rojas

0105633473

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación está dedicado en primer lugar a Dios por todas sus bendiciones a lo largo de mi carrera universitaria ya que sin el amor, fuerza y esperanza que de él provienen no sería posible hoy llegar a cumplir ésta meta, a mi familia y amistades sinceras, por su amor y apoyo incondicional en cada etapa que hoy se traduce en la culminación de una carrera y marca el inicio de nuevos objetivos por cumplir.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios quien es guía de mis pasos y fortaleza en momentos difíciles.

A mis padres Israel y Fabiola quienes son pilar fundamental e inspiración para seguir adelante cada día con esfuerzo y dedicación.

A mis hermanas Andrea, Karen y Dayanara por ser motivos para no desistir de llegar a la meta.

A mis maestros quienes durante estos años han formado parte del día a día impartiendo conocimientos pero también brindando amistad sincera.

A mis amigas Karla, Katherine, Paulina y Gabriela por su apoyo y cariño incondicional.

A todos ustedes gracias por confiar en mis capacidades y creer en mi potencial, un agradecimiento infinito y desde lo más profundo de mi corazón.

INDICE DE ABREVIATURAS

CMC1.10	CONTROL MELAZA CONTAMINANTE 1.10
CMC1.100	CONTROL MELAZA CONTAMINANTE 1.100
CMCP	CONTROL MELAZA CONTAMINANTE PURO
CPC1.10	CONTROL PAPA CONTAMINANTE 1.10
CPC1.100	CONTROL PAPA CONTAMINANTE 1.100
CPCP	CONTROL PAPA CONTAMINANTE PURO
Lat	Latitud
Lon	Longitud
mL	Mililitro
MMC1.10	MEDIO MELAZA CONTAMINANTE 1.10
MMC1.100	MEDIO MELAZA CONTAMINANTE 1.100
MMCP	MEDIO MELAZA CONTAMINANTE PURO
MPC1.10	MEDIO PAPA CONTAMINANTE 1.10
MPC1.100	MEDIO PAPA CONTAMINANTE 1.100
MPCP	MEDIO PAPA CONTAMINANTE PURO

INDICE

CAPÍTULO 1.....	2
1. INTRODUCCIÓN	2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
ANTECEDENTES	5
JUSTIFICACIÓN	8
OBJETIVOS	9
GENERAL	9
ESPECÍFICOS	9
HIPÓTESIS.....	10
CAPÍTULO 2.....	11
2. MARCO DE REFERENCIA	11
2.1 EL PETRÓLEO	11
2.1.1 FRACCIONES DE CRUDO.....	11
2.1.1 HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAP's).....	12
2.1.3 DIESEL.....	12
2.1.4 COMBUSTIBLE RESIDUAL	13
2.2 BIODEGRADACIÓN	13
2.2.1 MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE HAP's	14
2.2.2 BIODEGRADACIÓN MICROBIANA DE HIDROCARBUROS.....	16
2.2.3 FACTORES QUE CONDICIONAN LA BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS.....	16
2.3 HONGO <i>Trichoderma</i> sp.....	18
2.3.1 DESCRIPCIÓN DE <i>Trichoderma</i> sp.	18
2.3.2 MORFOLOGÍA Y TAXONOMÍA DE <i>Trichoderma</i> sp.....	19
2.3.3 CARACTERÍSTICAS DE <i>Trichoderma</i> sp.	20
2.3.4 FACTORES QUE INFLUYEN EN EL CRECIMIENTO DE <i>Trichoderma</i> sp.....	21
2.3.5 NECESIDAD NUTRICIONAL DE <i>Trichoderma</i> sp.	23
2.3.6 MEDIOS DE CULTIVO.....	23
2.4 CROMATOGRAFÍA DE GASES.....	24
2.5 MÉTODO QuEChERS	25

2.6 ESTADO DEL ARTE.....	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS	31
3.1. RECURSOS TÉCNICOS	31
3.2 CARACTERIZACIÓN DEL HONGO <i>Trichoderma</i> sp.	31
3.1.1 PREPARACIÓN DE TRAMPAS	31
3.1.2 COLOCACIÓN DE TRAMPAS	33
3.1.3 AISLAMIENTO DE <i>Trichoderma</i> sp.....	34
3.1.4 PRUEBAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DE LAS CARACTERÍSTICAS FÚNGICAS	36
3.3 DETERMINAR LA CAPACIDAD DE BIODEGRADACIÓN DE RESIDUOS UTILIZANDO EL HONGO <i>TRICHODERMA</i> MEDIANTE PRUEBAS DE LABORATORIO, PARA MINIMIZAR EL EFECTO CONTAMINANTE DEL RESIDUO EN CUESTIÓN	38
3.3.1 LAVADO DE ESPORAS.....	38
3.3.2 CONTEO DE ESPORAS.....	39
3.3.3 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO LÍQUIDOS.....	41
3.3.4 INOCULACIÓN MEDIO-MICROORGANISMO-CONTAMINANTE.....	43
3.3.5 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA ANÁLISIS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES	45
3.3.6 ANÁLISIS POR CROMATÓGRAFO DE GASES.....	47
3.4 DETERMINAR EL EFECTO DEL pH EN EL PROCESO DE DEGRADACIÓN MEDIANTE PRUEBAS DE LABORATORIO EVALUANDO EL pH ÓPTIMO DE DEGRADACIÓN	48
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
4.1 CARACTERIZACIÓN DEL HONGO <i>Trichoderma</i> sp.	49
4.1.1 RECOLECCIÓN DE FRASCOS TRAMPAS.....	49
4.1.2 AISLAMIENTO DE <i>Trichoderma</i> sp.....	50
4.1.3 PRUEBAS MACROSCÓPICAS DE LAS CARACTERÍSTICAS FÚNGICAS	50
4.1.4 PRUEBAS MICROSCÓPICAS DE LAS CARACTERÍSTICAS FÚNGICAS.....	51
4.2 DETERMINAR LA CAPACIDAD DE BIODEGRADACIÓN DE RESIDUOS DEL HONGO <i>Trichoderma</i> sp., MEDIANTE PRUEBAS DE LABORATORIO PARA MINIMIZAR EL EFECTO CONTAMINANTE DEL RESIDUO EN CUESTIÓN	55
4.2.1 CONTEO DE ESPORAS DE <i>Trichoderma</i> sp., EN LA CÁMARA DE NEUBAUER.....	55
4.2.2 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES.....	56

4.3 DETERMINAR EL EFECTO DEL pH EN EL PROCESO DE DEGRADACIÓN MEDIANTE PRUEBAS DE LABORATORIO EVALUANDO EL pH ÓPTIMO DE DEGRADACIÓN.	63
5. CONCLUSIONES.	68
6. RECOMENDACIONES.....	70
BIBLIOGRAFÍA	71
ANEXOS	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: <i>Orden de las muestras analizadas de acuerdo al medio de cultivo líquido y la concentración (C) del contaminante a degradar.</i>	47
Tabla 2: <i>Posibles muestras para aislar Trichoderma sp.</i>	49
Tabla 3: <i>Características macroscópicas identificadas en la cepa aislada.</i>	50
Tabla 4: <i>Características microscópicas de Trichoderma sp., bajo lente 40X.</i>	53
Tabla 5: <i>Concentración total de esporas de Trichoderma sp., en la solución madre y en dilución 10^{-3}.</i>	55
Tabla 6: <i>Porcentaje de degradación del contaminante por Trichoderma sp.</i>	57
Tabla 7: <i>Área total bajo la curva de las diferentes muestras analizadas por CG.</i>	59
Tabla 8: <i>ANOVA del Área bajo la Curva del proceso de degradación por Trichoderma sp.</i>	60
Tabla 9: <i>Método Tukey de las medias de las Áreas bajo la Curva de degradación del contaminante por Trichoderma sp.</i>	62
Tabla 10: <i>Valores promedio de pH registrados durante el proceso de degradación del contaminante por Trichoderma sp.</i>	63
Tabla 11: <i>Análisis de varianza no paramétrica: prueba Kruskal – Wallis del Área bajo la Curva de degradación del contaminante.</i>	66
Tabla 12: <i>Comparación y contrastes de los rangos de pH.</i>	68

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1:</i> Hongo <i>Trichoderma</i> sp.	18
<i>Figura 2:</i> Frascos Trampa con diferentes sustratos pre cocidos.....	32
<i>Figura 3:</i> Frascos trampa esterilizados en autoclave horizontal.....	32
<i>Figura 4:</i> Frascos trampa colocados junto a las raíces de <i>Solanum tuberosum</i>	33
<i>Figura 5:</i> Frasco trampa en funda hermética con posible presencia de <i>Trichoderma</i> sp. .	34
<i>Figura 6:</i> <i>Trichoderma</i> sp., tras 8 días de desarrollo apto para identificación macroscópica.....	36
<i>Figura 7:</i> Visualización morfológica de <i>Trichoderma</i> sp., bajo lente 40X en Microscopio de pantalla Micros AUSTRIA.	37
<i>Figura 8:</i> Matraz con <i>Trichoderma</i> sp., para lavado de esporas.	39
<i>Figura 9:</i> Diluciones seriadas en base 10 a partir del lavado de esporas madre.	40
<i>Figura 10:</i> Esporas de <i>Trichoderma</i> sp., en una sección de los cuadrantes de la cámara de Neubauer, bajo el lente 40X del microscopio de pantalla Micros AUSTRIA.....	40
<i>Figura 11:</i> Esporas de <i>Trichoderma</i> sp., en un cuadrante de la cámara de Neubauer, bajo el lente 40X del microscopio de pantalla Micros AUSTRIA.	41
<i>Figura 12:</i> Medio de cultivo líquido de papa ajustado a 5,5 el pH.	42
<i>Figura 13:</i> Frascos con medio de cultivo líquido de papa al interior del autoclave para ser esterilizados a 121 °C durante 20 min.	42
<i>Figura 14:</i> Medio de cultivo líquido de melaza ajustado a pH 5,5.....	43
<i>Figura 15:</i> Contaminante diluido en aceite de vaselina en 3 concentraciones de izquierda a derecha; 1 en 10, 1 en 100 y puro.	44
<i>Figura 16:</i> Inoculación del medio líquido de papa con el microorganismo <i>Trichoderma</i> sp.	44
<i>Figura 17:</i> Frascos etiquetados, colocados en fundas herméticas y almacenados en estufa BINDER.....	44
<i>Figura 18:</i> Muestras para análisis por CG.....	46
<i>Figura 19:</i> Análisis de degradación del contaminante por CG.....	47
<i>Figura 20:</i> Medición de pH con tiras comerciales durante el proceso de biodegradación.	48
<i>Figura 21:</i> <i>Trichoderma</i> sp., teñido con azul de metileno y observado bajo el lente 40X del microscopio de pantalla Micros AUSTRIA.....	53

<i>Figura 22: Trichoderma sp.</i> , teñido con azul de metileno y observado bajo el lente 100X del microscopio de pantalla Micros AUSTRIA.....	54
<i>Figura 23: Gráfica de Normalidad</i>	60
<i>Figura 24: Diagrama de Cajas Simultáneo de las Áreas bajo la curva de degradación de las muestras analizadas en medio líquido de melaza.</i>	61
<i>Figura 25: Diagrama de Cajas Simultáneo de las Áreas bajo la curva de degradación de las muestras analizadas en medio líquido de papa.</i>	62
<i>Figura 26: Prueba de Normalidad</i>	66
<i>Figura 27: Diagrama de Cajas Simultáneo de las mediciones de pH de degradación de las muestras analizadas.</i>	67

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Área total bajo la curva de las diferentes muestras analizadas por CG.	79
Anexo 2. Valores promedio de pH registrados durante el proceso de degradación del contaminante por <i>Trichoderma</i> sp.	80
Anexo 3: Hongo <i>Trichoderma</i> sp., en su cuarto día de desarrollo en medio de cultivo PDA.....	81
Anexo 4: Preparación de materiales para lavado de esporas de <i>Trichoderma</i> sp., en cámara de flujo laminar.	81
Anexo 5: Frascos con medio de cultivo líquido de papa y melaza.	82
Anexo 6: Frascos con medio de cultivo líquido de melaza-contaminante-microorganismo.	82
Anexo 7: Frascos con: medio de cultivo líquido de papa-contaminante-microorganismo.	83
Anexo 8: Crecimiento de <i>Trichoderma</i> sp., en frasco con el contaminante en concentración 1/100 a los 15 días de iniciado el proceso.	83
Anexo 9: Crecimiento de <i>Trichoderma</i> sp., en medio líquido de melaza con el contaminante en concentración 1/100 a los 15 días de iniciado el proceso.	84

RESUMEN

La presente tesis se desarrolló gracias a la cooperación interinstitucional entre la empresa "Plastiazuay", y la Universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca.

En esta investigación se evaluó la capacidad de degradación de *Trichoderma* sp., frente a hidrocarburos presentes en un contaminante líquido procedente de una línea de producción de laminados, cuya exposición al medio ambiente resulta peligroso y su tratamiento químico es de elevado costo.

En la presente tesis se aisló e identificó el hongo *Trichoderma* sp., a partir de un cultivo de *Solanum tuberosum* (papa) ubicado en la parroquia Paccha, perteneciente a la ciudad de Cuenca, provincia del Azuay. El estudio experimental se realizó mediante pruebas *in vitro*, empleando medio de cultivo líquido de papa y medio de cultivo líquido de melaza, bajo condiciones controladas de humedad, temperatura 26,5 °C y agitación manual, durante un período de 90 días. Los medios de cultivo líquido fueron inoculados con el microorganismo y se colocó el contaminante en tres concentraciones diferentes; como control del análisis se empleó medio de cultivo líquido con el contaminante sin presencia del microorganismo.

La preparación de las muestras se llevó a cabo mediante la técnica de Extracción en Fase Sólida Dispersiva QuEChERS, para la posterior evaluación de la capacidad de biodegradación de *Trichoderma* sp., mediante cromatografía de gases por comparación del área total bajo la curva tanto al inicio como al final del tratamiento.

Los resultados estadísticamente evidenciaron que, a los 90 días de tratamiento, el porcentaje de degradación más notable fue 28,2% correspondiente a MMC1.10, confirmando el potencial de biodegradación de *Trichoderma* sp., así también se comprobó que no existe significancia al emplear para el tratamiento *in vitro* medio de cultivo de papa o melaza en concentración pura del contaminante y diluciones.

Palabras clave: hidrocarburos, biodegradación, *Trichoderma* sp.

ABSTRACT

This thesis was developed thanks to the inter-institutional cooperation between the company "Plastiazuary", and the Politécnica Salesiana University, Cuenca.

In this research, the degradation capacity of *Trichoderma* sp., was evaluated against hydrocarbons present in a liquid contaminant from a laminate production line, whose exposure to the environment is dangerous and its chemical treatment is of high cost.

In the present thesis was isolated and identified the fungus *Trichoderma* sp., from a culture of *Solanum tuberosum* (potato) located in the Paccha parish, belonging to the city of Cuenca, province of Azuay. The experimental study was carried out through *in vitro* tests, using liquid culture medium of potato and liquid culture medium of molasses, under controlled conditions of humidity, temperature 26,5 °C and manual agitation, during a period of 90 days. The liquid culture media were inoculated with the microorganism and the contaminant was placed in three different concentrations; as a control of the analysis, liquid culture medium was used with the contaminant without the presence of the microorganism.

The preparation of the samples was carried out using the Dispersive Solid Phase Extraction technique QuEChERS for the subsequent evaluation of the biodegradation capacity of *Trichoderma* sp., by gas chromatography by comparing the total area under the curve both at the beginning and at the end of treatment.

The results showed statistically that, after 90 days of treatment, the most notable degradation percentage was 28,2% corresponding to MMC1.10, confirming the biodegradation potential of *Trichoderma* sp., likewise, it was found that there is no significance when using for *in vitro* treatment means of growing potatoes or molasses in pure concentration of the contaminant and dilutions.

Keywords: hydrocarbons, biodegradation, *Trichoderma* sp.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la industria laminada emplea diversos tipos de sustancias como materia prima para la producción de plásticos, entre las cuales figuran sustancias derivadas del petróleo (Carrión, J. C., 2014). En el caso particular y referente a la Empresa Plastiazuay, los residuos generados tras la producción se almacenan en contenedores para su posterior tratamiento, conforme a las prácticas de responsabilidad social empresarial RSE, debido a que hoy en día las empresas se enfocan en el entorno social y medioambiental (Padilla, Arévalo, Bustamante y Vidal, 2017). Las tecnologías que se emplean para reducir el efecto tóxico de éste hidrocarburo han aumentado en número debido a las diversas normativas y sanciones ambientales, a su vez el costo de estas técnicas atenuantes se han elevado, lo cual representa un costo significativo dentro de la industria, puesto que deben cumplir con reglamentos conformes a las leyes vigentes (Padilla, Arévalo, Bustamante y Vidal, 2017).

Gracias a los continuos avances biotecnológicos enfocados en microorganismos con capacidad para biodegradar residuos contaminantes, se ha hecho énfasis en los hongos, por su facilidad para biotransformar compuestos orgánicos complejos en otros más simples, esto debido a su potencial enzimático y su rápido desarrollo morfológico que le permite crecer en diversos medios (Adenipekun & Lawal, 2012).

Cuando se emplea el término biodegradación microbiana de hidrocarburos se hace referencia al hecho de que los microorganismos pueden desarrollarse a expensas de la utilización de estos compuestos químicos, tan extraños para el ser humano (Solanas, 2009). Las sorprendentes capacidades metabólicas de los microbios están siendo aprovechadas para

los continuos avances en las vías de degradación y para desarrollar nuevas estrategias dentro del proceso de biotransformación (Kumar *et al.*, 2015).

Según Tempest *et al.* (citado en Arrieta, 2012) uno de los principales mecanismos para eliminar los hidrocarburos potencialmente contaminantes es la atenuación natural; con esta tecnología, la biodegradación tiene lugar *in situ* o *ex situ*, por medio de procesos fisicoquímicos de interacción entre el contaminante y el microorganismo. Su principal objetivo es reducir la concentración del contaminante en forma natural gracias a la acción de las poblaciones nativas de microorganismos del suelo.

“El género *Trichoderma* sp., es genéticamente muy diverso con una serie de capacidades entre diferentes cepas con importancia agrícola e industrial. También es tolerante a una gama de contaminantes recalcitrantes, incluidos los metales pesados, pesticidas e hidrocarburos poliaromáticos. (Tripathi *et al.*, 2013). Tras investigaciones se ha confirmado que este género puede desarrollarse en ambientes donde existe presencia de hidrocarburos, ya que dependiendo la cepa de este género se observa un nivel de tolerancia relacionado directamente con el tipo de hidrocarburo y la concentración del mismo en el medio (Argumedo, Alarcón, Ferrera, Almaraz y Peña, 2012).

Según Singh y Nautiyal (citado en Pesántez y Castro, 2016) la aplicación de *Trichoderma* sp., para el tratamiento de sitios contaminados puede convertirse en una realidad en un futuro próximo, ya que puede producirse a bajo costo en grandes cantidades, a escala industrial y formularse para aplicaciones de campo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los residuos de producción de laminados plásticos genera preocupación por su elevado nivel de toxicidad en caso de ser liberados al medio ambiente sin un tratamiento adecuado, por otro lado las disposiciones hechas por las diversas entidades como son los GAD Municipales, en este caso el GAD de Cuenca y la Empresa Municipal de Aseo de Cuenca (EMAC), son organismos que controlan de forma estricta los residuos que se generan en la línea de producción de las empresas y establecen sanciones en caso de darse un mal manejo de los mismos o su liberación al medio ambiente.

Debido a las leyes vigentes, en la actualidad los residuos deben contar un tratamiento que reduzca al máximo el impacto que producen, por cuanto la industria o empresa que los genera debe contar con un plan de tratamiento o realizar inversión para que dicho proceso lo lleve a cabo una entidad ajena a la industria plástica, bajo lo cual, los procesos que realizan las empresas dedicadas al manejo de residuos presentan un elevado costo de recuperación, la incompleta eliminación del tóxico, alto consumo de energía y sustancias químicas, además de la generación de otros posibles subproductos tóxicos.

En busca de tecnologías innovadoras cuyo potencial vayan en pro de reducir numerosos problemas de contaminación ambiental, se realizan investigaciones empleando *Trichoderma* sp., para la remediación biológica de hidrocarburos.

ANTECEDENTES

La industrialización y su creciente afluencia en el mundo moderno está dando lugar a una degradación ambiental acelerada, por lo que, la gestión de residuos procedentes de fábricas se ha convertido en causa de preocupación, ya que al medio ambiente se están liberando residuos contaminantes.

Actualmente la industria de laminados en el mercado mundial produce aproximadamente 27 millones de toneladas anuales de productos laminados; en Latinoamérica, su producción representa el 5% del consumo mundial, datos estadísticos revelan que el Mercosur se consolida como el mayor consumidor con un 46%, a este le sigue el 22% de México y el 20% de la comunidad Andina y Chile (PVC: tendencias y oportunidades para la industria de América Latina, 2016).

La tasa de crecimiento a nivel industrial es relativamente baja en Ecuador, cuyo porcentaje equivale al 4,5% en los últimos años, a la cual se anexa la industria de productos laminados. De manera local y debido a un estudio realizado por la Cámara de Industrias de Cuenca, las empresas vinculadas a la industria de productos laminados han incrementado su producción en un 9,30% más que en el año 2012, lo que también eleva la cantidad de residuos que se generan (Carvajal, 2016).

Abordando la problemática que implica la generación de residuos contaminantes provenientes de la industria laminada, se considera de forma primordial, el llevar a cabo tratamientos respetuosos con el medio ambiente, enfocando las tecnologías actuales en la biodegradación, que no solo son representativamente ecológicas sino también económicas

y eficientes en cuanto a la conversión de compuestos tóxicos en productos no tóxicos, a través de la aplicación de procesos biológicos naturales, gracias a la interacción de microorganismos adecuados que realizan diversas reacciones físicas y químicas como parte de su metabolismo para producir la degradación y eliminación de contaminantes (Gillespie IMM & Philip JC., 2013) (Mishra y Malik., 2014)

Como se mencionó antes, la biodegradación de compuestos orgánicos es una ruta sostenible y verde para la limpieza de sitios contaminados, es así que en la publicación de Deshmukh, Khardenavis & Purohit, (2016) manifiestan que los hongos al ser un componente importante del ecosistema y apoyados en avances tecnológicos en el área de la biodegradación fúngica, reconocen que existe una notable interacción de la masa fúngica con el contaminante, lo que desencadena en un tiempo de biodegradación reducido, una fase sin retardo, una generación mínima de subproductos y un control de proceso sencillo.

Según Deshmukh, Khardenavis & Purohit (2016) se ha demostrado que los hongos desempeñan un papel importante en la biodegradación de diversos contaminantes como tintes textiles, hidrocarburos de petróleo, efluentes de la industria de la pulpa y el papel, efluentes curtidos de cuero, HAP, pesticidas, PPCP, entre otros, informando así que los miembros del género *Trichoderma* sp., degradan sustancias tóxicas durante el crecimiento en desechos agroindustriales.

Los hongos pertenecientes al género *Trichoderma* sp., son ascomicetos que se encuentran en los suelos de todo el mundo, se los ha estudiado en relación con diversas aplicaciones biotecnológicas y se conocen como colonizadores exitosos de sus hábitats

comunes, aunque se usan comúnmente para la producción comercial de enzimas líticas, como agente de control biológico, y también en la industria alimentaria, su uso en la biodegradación xenobiótica es aun limitado (Zafra y Cortes, 2015).

Los hongos con mayor tolerancia dentro del campo de degradación de hidrocarburos en la actualidad se consideran de gran importancia y valiosos como recursos efectivos para la biodegradación de compuestos tóxicos y una variedad de otras aplicaciones biotecnológicas (Lee *et al.*, 2014).

En la investigación realizada por Zafra y Cortes (2015) varias especies de *Trichoderma* sp., están asociadas con la capacidad de metabolizar una variedad de hidrocarburos de bajo peso molecular, una característica muy notable es la alta tolerancia mostrada por las cepas de *Trichoderma* sp., en presencia de hidrocarburos y el crecimiento continuo incluso en presencia de otros contaminantes.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente la industria de laminados ha tenido un alza en su crecimiento con un porcentaje del 9,30% hasta 2012 a nivel local, según registros de la Cámara de Comercio de Cuenca, las empresas de laminados se incluyen en este crecimiento, mismo que repercute en el índice de residuos generados, producto de su cadena de producción y lo cual exige una adecuada gestión y por tanto inversión económica para este tipo de tratamiento y cumplimiento con la ordenanza municipal.

La industria emplea diversos procesos como la incineración que es actualmente la práctica de remediación más eficaz y común para tratar residuos, pero es costosa en términos de dinero y energía utilizada. Un método de limpieza rápido, rentable y ecológicamente responsable es la "biodegradación" que utiliza microorganismos para minimizar los contaminantes tóxicos en un enfoque económico eficiente. Los productos químicos que resultan tóxicos se degradan y resultan en sustancias cuyo daño es menor para el medio ambiente (Adenipekun & Lawal, 2012)

OBJETIVOS

GENERAL

- Emplear *Trichoderma* spp., para biodegradación de residuos líquidos generados en una línea de producción de laminados.

ESPECÍFICOS

1. Caracterizar el hongo *Trichoderma* sp., para para identificar la especie a la que pertenece por comparación con claves taxonómicas establecidas.
2. Determinar la capacidad de biodegradación de residuos del hongo *Trichoderma* mediante pruebas de laboratorio para minimizar el efecto contaminante del residuo en cuestión.
3. Determinar el efecto del pH en el proceso de degradación mediante pruebas de laboratorio evaluando el pH óptimo de degradación.

HIPÓTESIS

El uso de *Trichoderma* sp., en biodegradación de residuos de una línea de laminados tiene capacidad de reducir la concentración de hidrocarburos disminuyendo su toxicidad.

CAPÍTULO 2

2. MARCO DE REFERENCIA

2.1 EL PETRÓLEO

El petróleo es uno de los principales contaminantes del medio ambiente, siendo este un líquido heterogéneo, de color negro y de consistencia viscosa. Está compuesto de hidrocarburos en un porcentaje de entre el 50% y 98%, que a su vez constituyen uno de los principales grupos de contaminantes ambientales (Izquierdo R., 2014).

2.1.1 FRACCIONES DE CRUDO

Según con la investigación de Sugiura *et al.* (citado en Izquierdo, 2014), la variabilidad en la composición química del petróleo está en función de su origen, debido a ello se aprecian cambios en las diferentes fracciones pertenecientes a las familias de los hidrocarburos.

De acuerdo a Sugiura *et al.* (citado en Izquierdo, 2014), debido a la solubilidad del petróleo en disolventes orgánicos, los componentes del mismo se clasifican en cuatro fracciones:

2.1.1.1 FRACCIÓN SATURADA

La primera denominada fracción saturada o fracción alifática, está compuesta por n-alcanos, así también por isoprenoides y cicloparafinas.

2.1.1.2 FRACCIÓN AROMÁTICA

La fracción aromática del crudo de petróleo está formada por compuestos que poseen uno o más anillos bencénicos en su estructura, siendo el naftaleno el representante de la fusión de anillos bencénicos más sencillo de esta fracción.

2.1.1.3 FRACCIONES DE RESINAS Y ASFALTENOS

Tanto las resinas como los asfaltenos, se encuentran formados por núcleos policíclicos, por tanto se consideran mezclas de elevada complejidad. En su composición se encuentran cadenas hidrocarbonadas con un número variable de compuestos NOS (Nitrógeno, Oxígeno y Azufre) y en ocasiones se pueden asociar con bajas concentraciones de Vanadio y Níquel.

2.1.1 HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAP's)

Los HAP's son un grupo de sustancias químicas que se forman durante la incineración incompleta del carbón, el petróleo, el gas, la madera, la basura y otras sustancias orgánicas, como el tabaco y la carne asada al carbón. Estas sustancias se encuentran de forma natural en el medio ambiente, pero también pueden ser producidas como compuestos individuales para efectos de investigación. Unos cuantos HAP's se utilizan en medicinas y para la producción de tintas, plásticos y pesticidas. También se pueden encontrar en sustancias como el petróleo crudo, el carbón, el alquitrán o la brea, la creosota y el alquitrán utilizado en el recubrimiento de techos. Los HAP's se encuentran en todo el medio ambiente en el aire, el agua y el suelo (De salud Pública-Cobre, R., 2014).

2.1.3 DIESEL

El diésel que se emplea como combustible, constituye la fracción media del crudo de petróleo, se encuentra presente entre los 200 a 350 °C y en él se encuentran los hidrocarburos entre C15 y C25. En los ambientes contaminados por diésel predomina un 75% compuestos alifáticos y el otro 25% entre monoaromáticos y HAP's (Izquierdo R., 2014).

De acuerdo con la investigación de Lee L., citado por Castro (2017) la composición química del diésel es distinta de acuerdo al lugar de donde proviene el petróleo, al grado de transformación química y a los métodos de separación que se emplean durante el fraccionamiento. Los químicos orgánicos que posee el diésel equivalen en un 20% a los hidrocarburos aromáticos, 40% a los n-alcanos, 40% a los cicloalcanos, y se considera un porcentaje muy bajo de compuestos azufrados, nitrogenados y de oxígeno.

El número y complejidad de componentes en el diésel imposibilita un análisis exhaustivo para identificar y cuantificar la concentración de los constituyentes químicos en él, sin embargo, la caracterización química del diésel proporciona un perfil cuantitativo del producto (Castro D., 2017).

2.1.4 COMBUSTIBLE RESIDUAL

Speight (2015) describe al combustible residual como aquel que no ardería en condiciones normales y que parte de un residuo que queda de la destilación. Su composición es variada, mediante cromatografía de adsorción se puede identificar cuatro o cinco fracciones principales. El término incluye todos los aceites residuales, incluso el obtenido por reducción de la viscosidad, así como mediante la mezcla de productos residuales de otras operaciones. La variedad de grados de los combustibles pesados se produce de acuerdo a rígidas especificaciones con el fin de asegurar su idoneidad para su posterior aplicación específica.

2.2 BIODEGRADACIÓN

La biodegradación, químicamente está fundamentada en reacciones de óxido-reducción que se llevan a cabo durante la respiración, o cuando se produce el transporte de electrones de las células. Esta cadena de reacciones se inicia cuando un sustrato orgánico

externo a la célula proporciona electrones, donde la actividad metabólica de la célula degrada y consume la sustancia. Los aceptores utilizados por microorganismos son: hierro (III), nitratos, sulfatos, dióxido de carbono y oxígeno (Maroto y Rogel, 2013).

La biodegradación, se considera un método de alta efectividad y de bajo costo a nivel económico para el proceso que implica transformar y eliminar de forma definitiva hidrocarburos de petróleo que no pueden minimizarse por métodos convencionales, por ello es el mecanismo más importante dentro de las tecnologías ambientales. En la biodegradación se recurre a diversas reacciones de oxidación que como resultado promueven la formación de hidrocarburos de bajo peso molecular, además del desprendimiento de dióxido de carbono, la formación de agua y la acumulación de biomasa microbiana (Benavides y Quintero 2006; citado en Del Ángel & Itzel, 2013).

“Como todas las tecnologías, la biodegradación también tiene sus desventajas, entre ellas se encuentra la necesidad de condiciones operacionales apropiadas para favorecer el crecimiento del microorganismo. Sin embargo, los grandes desarrollos realizados en los últimos años, han permitido la selección de microorganismos naturalmente adaptados o su manipulación genética, ampliando el abanico de microorganismos resistentes a diferentes condiciones medioambientales y su capacidad degradadora, logrando mejorar los procesos de biorremediación” (Cobas M., 2016).

2.2.1 MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE HAP's

Según Tyagi y Fonseca citados por Arcila (2016), en la naturaleza los microorganismos presentes en el suelo promueven la transformación y de forma aeróbica metabolizan los hidrocarburos y diferentes sustancias orgánicas hasta convertirlas en CO₂,

agua y fuentes de alimento, que el microorganismo emplea para su crecimiento, desarrollo y reproducción. Existen microorganismos puros que tienen la capacidad de adaptarse y degradar cualquier compuesto orgánico natural sin intervención del hombre. Pero las condiciones ambientales deben ser las adecuadas.

Se necesita una población microbiana adaptada, que posea las enzimas necesarias que catalicen las reacciones de degradación. Los microorganismos pueden degradar los contaminantes en forma de cultivos puros, mixtos o consorcios que siempre son más eficientes que el cultivo puro. En los consorcios se establece una completa interacción de las especies microbianas (Cruz, 2013).

En la actualidad existen gran cantidad de procesos de biodegradación con bacterias u hongos, por su excelente capacidad en cuanto a degradación de contaminantes orgánicos, pero en las últimas décadas la comunidad científica se ha inclinado más por el uso de bacterias que hongos, por su rápido crecimiento en comparación con los hongos. Gracias a investigaciones recientes se ha elevado la importancia y eficacia de los hongos y su potencial como degradadores de contaminantes orgánicos, esto debido a su gran capacidad de degradar la materia orgánica, así como sus hifas pueden penetrar mejor en los suelos (Pinedo-Rivilla, Aleu y Collado., 2009) y materiales porosos permitiendo la formación de biofilms.

El proceso de degradación y su elevado grado de eficiencia, está ligado íntimamente con los factores medio ambientales que rodean al denominado sistema que se forma a partir del microorganismo y el contaminante (Del Ángel & Itzel, 2013).

2.2.2 BIODEGRADACIÓN MICROBIANA DE HIDROCARBUROS

Para la biodegradación de hidrocarburos, los microorganismos requieren de contaminantes de origen orgánico, que constituyen una fuente de provisión de carbono, por ello es importante considerar que, cuando los factores de tipo ambiental no son los propicios para el proceso, estos deben regularse sobre la población microbiana para potencializar la metabolización de los compuestos nocivos (Roldán e Iturbe, 2005; citado por Cruz *et al.*, 2016).

Los hongos son microorganismos heterótrofos que extraen su fuente de carbono y electrones del medio que les rodea, por ello en muchos casos son capaces de degradar los contaminantes orgánicos presentes en el ambiente. Este hecho, junto con sus peculiaridades de crecimiento, formación de biofilms, así como la producción de enzimas, los hacen candidatos apropiados a utilizar en procesos de biorremediación (Cobas M., 2016).

2.2.3 FACTORES QUE CONDICIONAN LA BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS

Según Rodríguez L. (citado en Arcila L., 2016) los factores que determinan la biodegradación, son aquellos necesarios para brindar óptimas condiciones para el crecimiento de los microorganismos, debido a su elevada sensibilidad, a la variación de humedad, grados de temperatura, pH, oxígeno y disponibilidad de nutrientes

A continuación se describe cada una de las condiciones:

- pH: afecta de manera importante la actividad microbiana, puesto que no todos los microorganismos se desarrollan bajo las mismas condiciones de este parámetro, pero en general el crecimiento de la mayoría de hongos empleados en biodegradación oscila en un intervalo de pH entre 6,0 y 8,0.

- Temperatura: es el factor ambiental que influye directamente en el metabolismo del microorganismo y por ende interviene en el nivel de biodegradación. La temperatura promedio a la cual se desarrollan los microorganismos varía entre 20 y 30 °C. En temperaturas superiores a 40°C decrece la biodegradación por desnaturalización de las enzimas y se inhibe a temperaturas menores de 0°C.

- Humedad: se requieren condiciones mínimas de humedad para el crecimiento de microorganismos. El agua es un elemento fundamental en la estructura bacteriana (protoplasma) y una de sus funciones es la de transportar nutrientes y compuestos orgánicos a la célula. Es importante controlar la humedad debido a que su exceso inhibe el desarrollo del microorganismo por reducción de oxígeno en el medio.

- Oxígeno: los microorganismos oxidan compuestos tanto inorgánicos como orgánicos, que les proporcionan la energía necesaria para cumplir con sus funciones de crecimiento. En este proceso de oxidación se liberan electrones que ayudan a una cadena de reacciones al interior de la bacteria. Un ejemplo en el metabolismo aerobio el oxígeno es el aceptor y el agua el producto.

La mayoría de los hidrocarburos del petróleo se degradan con mayor efectividad en un ambiente aeróbico. En forma anaeróbica con aceptores de electrones alternativos (NO_3^- , SO_4^{2-} , CO_2 , Mn^{4+} Y Fe^{3+}) los hidrocarburos pueden ser degradados, pero las tasas de efectividad son muy inferiores a las aerobias.

2.3 HONGO *Trichoderma* sp.

2.3.1 DESCRIPCIÓN DE *Trichoderma* sp.

Según Poalacin J. M (2015) la presencia de *Trichoderma* sp., puede ser detectada por un ligero olor a coco en el sustrato, así como por su color verde y blanquecino. Produce enzimas y vitaminas, “antibióticos” que al ser absorbidos por las raíces de las plantas generan un crecimiento más rápido. En ciertos casos el antibiótico formado es específico contra el patógeno de las plantas, garantizando así su eficacia.



Figura 1: Hongo Trichoderma sp.

Fuente: Autor

Las especies de éste género se encuentran ampliamente distribuidas por todas las latitudes y se presentan naturalmente en diferentes ambientes, se encuentran principalmente en sitios con alto contenido de materia orgánica o sitios que poseen desechos vegetales en proceso de descomposición (Martínez, Infante y Reyes, 2013). Este beneficioso hongo es filamentoso, heterótrofo, aerobio, su pared celular está compuesta de quitina, coloniza fácilmente las raíces de las plantas, las mejora e impide que nuevos hongos colonicen la zona donde éste se desarrolla (Poalacin J. M., 2015).

De acuerdo a Howell C. (citado en Martínez, Infante y Peteira, 2015) la amplia distribución de *Trichoderma* sp., y su plasticidad ecológica se encuentran estrechamente ligadas a la alta capacidad enzimática para degradar sustratos, posee un metabolismo versátil y resistencia a inhibidores microbianos.

2.3.2 MORFOLOGÍA Y TAXONOMÍA DE *Trichoderma* sp.

Según Loayza Vargas (2017) este hongo crece y sus hifas pueden alcanzar un diámetro de entre 3 y 12 μm , de acuerdo al lugar donde se desarrolla, en los conidios unicelulares se produce la esporulación asexual cuyo diámetro varía entre 3 a 6 μm .

Entre las principales características se puede citar:

- Es fácil de aislar.
- Presenta crecimiento y reproducción rápidos.
- Ataca a un amplio rango de patógenos.
- Promueve el crecimiento vegetal, al producir sustancias promotoras de crecimiento.

Taxonomía

La clasificación taxonómica del hongo *Trichoderma* de acuerdo a Loayza Vargas, (2017) es la siguiente:

- Reino: Fungi
- División: Ascomycota
- Orden: Eurotiales
- Familia: Hypocreaceae
- Género: *Trichoderma*

2.3.3 CARACTERÍSTICAS DE *Trichoderma* sp.

2.3.3.1 REPRODUCCIÓN

Trichoderma sp., se reproduce de forma asexual, emplea sustratos de elevada complejidad como: almidón, celulosa, quitina, y pectina que son asimilados durante el metabolismo como fuente de carbono. El medio en que se desarrolla *Trichoderma* sp., varía debido a que pueden crecer en medios sólidos, así como en medios líquidos o caldos de cultivo, se caracteriza por tolerar diferentes temperaturas y adaptarse a humedades muy bajas e incluso pueden desarrollarse en medios ligeramente ácidos (Poalacin J., 2015).

2.3.3.2 CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

Según Poalacin J. (2015) las siguientes características macroscópicas son las más representativas en cuanto a la identificación de *Trichoderma* sp.:

- **Conidióforos.** Son hialinos, erectos, no verticilados, generalmente ramificados, pueden estar en solitario o agrupados.

- **Fiálides.** En esta estructura se forman los conidios (esporas asexuales). Presentan una forma de botella, están solas o agrupadas, son hinchadas en la región central pero delgada en sus terminaciones.

- **Conidios.** Son esporas asexuales de coloración verde, amarillo o blanco; con esporulación densa para asegurar la supervivencia, dispersión y reproducción del hongo. Las paredes de los conidios están compuesta por quitina y glucanos.

- **Clamidosporas.** Presentan una coloración amarillenta o verdosa, un olor a humedad, una forma de globo o elipse, estas estructuras son comunes en las especies del género. *Trichoderma*, su diámetro es de 6-15 μ m en la mayoría de especies (Caiza V, 2013).

2.3.3.3 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS

Las colonias de los aislamientos de *Trichoderma* presentan rápido crecimiento. En 1969 Rifai señaló que poseen color blanco y se tornan verde oscuro con abundante esporulación. En general, en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) este hongo no presenta micelio aéreo y su pigmentación puede variar desde verde oscuro hasta verde claro y, en ocasiones, tornarse amarillento. Algunos aislamientos tienen olor típico a coco. Durante su desarrollo y crecimiento producen hifas de 5 -10 μ m de ancho que conforma el micelio septado, con paredes compuestas por quitina y glucano (Martínez, Infante y Peteira, 2015).

2.3.4 FACTORES QUE INFLUYEN EN EL CRECIMIENTO DE *Trichoderma* sp.

2.3.4.1 TEMPERATURA

Según Roselló, J. (citado en Poalacin J. M., 2015) la temperatura influye notablemente en el crecimiento fúngico y en la formación y germinación de conidios. Para el desarrollo de *Trichoderma* sp., la temperatura puede variar entre 10 – 40 °C y tiene su óptimo de crecimiento alrededor de los 25 y 30 °C. Pueden soportar temperaturas extremas y, aunque no pueden crecer, sus conidios se mantienen viables y germinarán cuando recuperen las condiciones apropiadas. El descenso de la temperatura provoca una ralentización del metabolismo, y es una medida que se utiliza para frenar, en general, el deterioro de productos almacenados.

2.3.4.2 HUMEDAD

La actividad metabólica del hongo depende estrechamente de la humedad del medio (sustrato), ya que esta variable influye significativamente en el crecimiento microbiano y la producción de distintos metabolitos. La humedad, en niveles muy bajos, limita la difusión de las sustancias nutritivas y la degradación del contaminante, los altos valores de humedad en la matriz sólida disminuye la porosidad del sustrato dificultando la transferencia de oxígeno. Por este motivo, es conveniente buscar el nivel óptimo de humedad con el objeto de optimizar el crecimiento del microorganismo o, en su caso, obtener una mayor producción de metabolitos (enzimas, ácidos orgánicos, etc.) (Jimenez y Pantoja, 2013).

2.3.4.3 AIREACIÓN

Según Moore-Landecker (citado en Poalacin J. M., 2015), tanto la presencia de oxígeno como la de dióxido de carbono son imprescindibles, sin embargo se debe cuidar la acumulación de CO₂ en un espacio físico cerrado, ya que éste puede inhibir el crecimiento del microorganismo.

2.3.4.4 pH

De acuerdo a la investigación de Flores Lema (2015) el pH óptimo de 6 a 6,5 es el adecuado para su desarrollo pero puede sobrevivir en rangos mayores, debido a la capacidad que tiene de acidificar el medio en el que se encuentra, mediante secreción de ácidos orgánicos.

La variación del pH es de amplio estudio por diversos investigadores ya que en el caso de las especies de *Trichoderma* un elevado porcentaje de esporulación y crecimiento se observa en un rango de valores de pH entre 2 y 7, considerando que el pH óptimo es de 5,5 y 7,5 (Singh *et al.*, 2014).

2.3.4.5 EXPOSICIÓN DE LUZ

De acuerdo a Cruz (citado en Poalacín J. M., 2015) la mayoría de especies del género *Trichoderma* son fotosensibles, puesto que presentan una mayor esporulación al ser expuestas a la luz. Sin embargo, cuando se someten a períodos alternados de luz y oscuridad, se favorece la colonización del hongo sobre diferentes sustratos sólidos.

2.3.5 NECESIDAD NUTRICIONAL DE *Trichoderma* sp.

La capacidad de degradación de *Trichoderma* es muy elevada, es así que emplea celulosa, pectina y almidón entre otros compuestos, considerados sustratos complejos, como fuente de carbono para su desarrollo, esto debido a que posee una alta capacidad enzimática, pero también se conoce que puede emplear monosacáridos y ácidos orgánicos para la obtención de carbono. Así mismo, *Trichoderma* asimila como fuente de nitrógeno compuestos tales como Sulfato de amonio, urea, aminoácidos, amoníaco y nitritos (Moore, 1996; citado en Ortiz N., 2017).

2.3.6 MEDIOS DE CULTIVO

Según Cañedo y Ames (citados en Castañeda L., 2014) el medio de cultivo es una sustancia o solución que permite el desarrollo de microorganismos, mientras que el cultivo es el producto del crecimiento de un organismo. Los medios de cultivo utilizados en micología deben contener nutrientes suficientes para asegurar el desarrollo y reproducción de los hongos (carbono, nitrógeno, vitaminas, oligoelementos, etc.) y un pH ligeramente ácido (6 – 6,3) para facilitar su crecimiento e inhibir al mismo tiempo el desarrollo de otros microorganismos.

2.3.6.1 MELAZA

Es un líquido de aspecto negruzco y de elevada densidad, es una concentración de hidratos de carbono, los azúcares representan aproximadamente el 80% de su contenido en

materia seca; son muy palatables y de apreciable contenido energético (FENDA., 2003; Ortiz N., 2017).

2.3.6.2 AGAR PAPA DEXTROSA

El Agar Papa Dextrosa (Potato Dextrose Agar, PDA, por sus siglas en inglés) es un medio de propósito general para levaduras y mohos que puede ser suplementado con ácidos o antibióticos para inhibir el crecimiento bacteriano. El PDA está compuesto por infusión de papa deshidratada y dextrosa que fomentan el crecimiento exuberante de los hongos. El agar es adicionado como agente solidificante. Muchos procedimientos estándares usan una cantidad específica de ácido tartárico estéril (10%) para reducir el pH de este medio a $3,5 \pm 0,1$, y así inhibir el crecimiento bacteriano. No recalentar el medio acidificado, el calentamiento en estado ácido hidrolizará el agar (NEOGEN, 2015)

2.4 CROMATOGRAFÍA DE GASES

Según Lozano y Riesco (2017), la cromatografía es un proceso mediante el cual se separan físicamente sustancias complejas con la finalidad de estudiar su composición y lograr su caracterización detallada. Para conseguirlo, se volatiliza la muestra y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica que haría de fase estacionaria, y que comúnmente se encuentra dentro de un horno. La muestra avanza dentro de dicha columna por el flujo de una fase móvil de gas inerte que no reacciona con las moléculas del analito. Los componentes de la muestra interactúan con la fase estacionaria en distinta forma a distintas velocidades por lo que se van separando, de modo que los primeros componentes del analito en separarse son los primeros en llegar al final de la columna, donde se encuentra un detector de ionización de llama (FID), que quema la muestra y genera una señal eléctrica que posteriormente es enviada al software.

2.5 MÉTODO QuEChERS

Según Fuentes, García y Fernández (2015), el método “QuEChERS” combina una primera fase de extracción simple con acetonitrilo y diferentes sales y una segunda etapa de dispersión en fase sólida (dSPE). Esta última fase permite la eliminación del agua presente en la muestra y una limpieza o “clean-up”, que se consigue adicionando una mezcla de sulfato de magnesio y un sorbente, que puede ser una amina primaria y secundaria (PSA), C18, carbón negro grafitado (GCB), o la mezcla de estos, en función de las características de la muestra analizada.

Después de la etapa de extracción, el extracto obtenido puede analizarse por cromatografía de gases o cromatografía líquida. Las técnicas cromatográficas son probablemente las técnicas más empleadas para llevar a cabo estas determinaciones debido su elevada sensibilidad, su capacidad de separar, identificar y analizar de manera cualitativa y cuantitativa compuestos de naturaleza muy diferente, así como por la rapidez de los nuevos sistemas cromatográficos, que permiten obtener resultados analíticos en cada vez menos tiempo (Fuentes, García y Fernández., 2015).

2.6 ESTADO DEL ARTE

Según Argumedo, Alarcón, Ferrera y Peña (2009) “El género fúngico *Trichoderma* y su relación con los contaminantes orgánicos e inorgánicos”, enfocaron su estudio en las especies de hongos del género *Trichoderma* ya que la información hasta la fecha es escasa, los investigadores se centraron en su comportamiento y efecto en ambientes terrestres y acuáticos contaminados con diversos contaminantes, los autores determinaron mediante su investigación que *Trichoderma* tiene gran influencia por lo que sugieren evaluar las respuestas fisiológicas, bioquímicas y moleculares de este género ante distintos tipos de contaminantes, y definir con ello su posible aplicación en los diferentes sistemas de

biorremediación, ya que cuenta con una alta capacidad enzimática que interviene en la degradación de compuestos orgánicos.

Según Vásquez, Guerrero y del Pilar (2010) "Biorremediación de lodos contaminados con aceites lubricantes usados", en su estudio se evaluaron consorcios microbianos nativos para el tratamiento de lodos provenientes de lavaderos de carros contaminados con aceites lubricantes de motor y de alcantarillado de la zona industrial de Bucaramanga. Los investigadores emplearon un inóculo en base a una concentración de 3×10^8 ufc/mL de bacterias y microorganismos como *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp., en una concentración de 1×10^6 esporas/mL y obtuvieron porcentajes de remoción de hidrocarburos totales de petróleo de 84% en 40 días y de 94% en un lapso de 120 días. Por lo anterior, se deduce que las cepas de hongos identificadas nativas del suelo contaminado lograron resistir el cambio en su ambiente.

Según Petit, Yegres, Moran & Richard (2013) "Biodegradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) por hongos aislados de aguas contaminadas con petróleo, podredumbre blanca, y acíbar de Aloe vera" en su trabajo se estudió la capacidad de cepas fúngicas aisladas de ambientes contaminados con petróleo, para degradar antraceno, fluoranteno y pireno. En la parte inicial de la experimentación las cepas fueron seleccionadas considerando su potencial para crecer en placas con Czapek complementadas con diesel como única fuente de carbono y energía, entre los géneros identificados se encontró *Trichoderma*, seguidamente las cepas fueron sometidas a ensayos de crecimiento en placas con medio Czapek complementado con los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) como única fuente de carbono, a partir de este ensayo la incubación duró 20 días, tras ese tiempo se determinó que el género

Trichoderma requiere de mayor tiempo para el proceso de biodegradación ya que en los 20 días transcurridos no hubo degradación notoria como la que presentaron otras cepas de otros géneros identificados.

De acuerdo a la investigación realizada por Pesantez y Castro (2017) "Potencial de cepas de *Trichoderma* sp para la biorremediación de suelos contaminados con petróleo", diversas especies de hongos pueden degradar hidrocarburos, el estudio evaluó tres cepas de hongo *Trichoderma*, las cuales fueron aisladas de un suelo contaminado con petróleo, se identificó a *T. harzianum*, *T. viride* y *T. pseudokoningii*, para llevar a cabo el proceso el inóculo se ajustó a una concentración de 1×10^{10} conidios mL^{-1} que se suministró en una área contaminada por un derrame de petróleo, el tiempo de inoculación fue de 96 días, posteriormente se tomaron muestras de suelo a una profundidad de 10 y 15 cm. Se llevó a cabo el análisis de hidrocarburos totales y aromáticos policíclicos así como de metales pesados, los datos permitieron establecer el porcentaje de remoción por cada cepa empleada, entonces se verificó que a una profundidad de 15 cm los hidrocarburos obtuvieron una degradación de entre 47 y 69,1% y para el caso de metales pesados hasta un 53.72%. Tras el análisis de resultados se confirmó la eficiencia de las tres cepas de *Trichoderma* en la biodegradación de suelos afectados por derrames de petróleo.

Según Meneses (2014) "Biorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos HAP's en microcosmos a suelo abierto", en su investigación realiza una evaluación de la capacidad de *Trichoderma* sp., para degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) mediante pruebas *in vitro*, *Trichoderma* sp. fue empleado como inóculo para la formación de los tratamientos que se aplicaron a microcosmos de suelo contaminado artificialmente con bunker-diésel, la experimentación se desarrolló a campo abierto en condiciones semicontroladas bióticas y abióticas por espacio de 90 días; el método

analítico que se utilizó en la valoración del proceso de biorremediación fue mediante cromatografía líquida de alta resolución HPLC con un revelador de fluorescencia, los resultados evidencian estadísticamente un biodegradación significativa a partir de los 30 días, culminando el proceso en un período de 90 días. Según los resultados se evidencia que algunos hidrocarburos aromáticos como es el caso del fluoreno y antraceno presentan una degradación del 100%; fenantreno 98,68%; y pireno 54%, evidenciándose la capacidad biodegradativa de las cepas en estudio.

Según Fernández & Humbser (2014). "Evaluación de la toxicidad del suelo durante y después de un proceso de biorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos HAP's", llevaron a cabo su investigación con el propósito de realizar una valoración del suelo posterior a un proceso de biorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos , la experimentación se centró en la actividad enzimática de la ureasa y la catalasa, además de bioensayos utilizando semillas de trigo (*Triticum aestivum*), lechuga (*Lactuca sativa*) y maíz (*Zea mays*) se considera en este caso la capacidad de germinación de las semillas en mención. En base al análisis estadístico de los resultados obtenidos en el bioensayo con semillas, se demuestra que los tratamientos (consorcios microbianos formados por hongos del género *Trichoderma* sp.) fueron eficaces en la biodegradación de HAP's a campo abierto. El análisis estadístico de los resultados de la actividad enzimática demuestra la eficacia de los tratamientos empleados en la biorremediación de HAP's, en este estudio no se pudo establecer una relación entre la germinación de las semillas y la actividad enzimática del suelo.

Según Szczepaniak, Z. *et al.* (2015) "Antibacterial effect of the *Trichoderma viride* fungi on soil microbiome during PAH's biodegradation", se evaluó la influencia

de *Trichoderma viride* sobre la actividad metabólica y la dinámica de la comunidad de bacterias del suelo durante la biodegradación de hidrocarburos poliaromáticos (HAP's). Durante la experimentación se introdujeron 16 HAP's en microcosmos del suelo con el fin de obtener una concentración inicial de 2000 mg kg⁻¹ de suelo, el tratamiento tomo un tiempo de 12 meses, en el análisis de resultados se reflejó que aproximadamente el 78% de HAP's fue removido de los microcosmos inoculados con el consorcio bacteriano y *T. viride*, en tanto que los microsomos inoculados únicamente con *T. viride* presentó un porcentaje equivalente al 47% de remoción de HAP's. La investigación llevó a valorar que *T. viride* pudo degradar los HAP's; sin embargo, su presencia contribuyó principalmente a modificar el metabioma bacteriano a través de interacciones antagónicas con la bacteria, lo que redujo notablemente la eficiencia de la biodegradación y la biodiversidad en los microcosmos.

Según Deshmukh, Khardenavis y Purohit (2016) "Diverse metabolic capacities of fungi for bioremediation", esta revisión se enfoca en diferentes grupos de hongos de una variedad de hábitats, haciendo notar mediante una compilación de información que entre los diversos microorganismos el género *Trichoderma* sp., desempeña un papel importante dentro de la biorremediación de diferentes compuestos tóxicos y recalcitrantes; contaminantes orgánicos persistentes, petróleo, hidrocarburos poliaromáticos, entre otros. La biorremediación de compuestos orgánicos tóxicos por hongos está considerada como la ruta más sostenible para remover contaminantes de diversos ecosistemas empleando enzimas fúngicas tales como: catalasas, lacasas, peroxidasas y citocromo P450 monooxigenasas. Se toma en consideración los avances en el área de ingeniería de enzimas y genómica con la finalidad de fortalecer este campo que beneficia ampliamente a la remoción de contaminantes.

Según Soto y Solanyi (2017) "Aplicación De Barreras Reactivas Permeables Para La Eliminación De Hidrocarburos En Suelos Contaminados", efectuaron estudios empleando *Trichoderma longibrachiatum* como medio reactor y esponja de nailon para la eliminación de hidrocarburos aromáticos policíclicos, de ello se obtuvo un hongo capaz de formar biopelículas fuertemente adhesivas entre la esponja de nailon. Se llevó a cabo el proceso de aprobación de este biorreactivo para remediar contaminación por HAP's a nivel de suelo y en medios acuosos. Las pruebas llevadas a cabo en medio acuoso en un tiempo de 14 días mostraron una reducción del 94% en cuanto a la concentración de HAP's, por otro lado la experimentación en suelo, demandó la colonización de hongos y el nivel alcanzado tras 28 días fue de alrededor de 70%, por tanto se concluyó que las barreras reactivas permeables con el *T. longibrachiatum* soportados sobre una esponja de nylon pueden ser un método eficaz para el tratamiento de agua contaminada con hidrocarburos.

Según Loayza (2017) "Eficiencia degradativa de tres especies de hongos benéficos *Aspergillus Niger*, *Thichoderma Harzianum* y *Paecilomyces Lilacinus* sobre suelos contaminados con petróleo en la parroquia San Carlos del cantón Joya de los Sachas" se evaluaron la eficiencia cepas de hongos para recuperar suelos contaminados con petróleo, se emplearon 3 especies: *Aspergillus niger*, *Thichoderma harzianum* y *Paecilomyces lilacinus*, tras los resultados obtenidos se observó que *Aspergillus niger* degradó un 37,65%, *Thichoderma harzianum* un 32,76 % y para la especie de hongo *Paecilomyces lilacinus* un 29,59 %, por tanto si existió degradación por parte de las tres especies de hongos. Por otra parte se llevó a cabo el mismo proceso aplicando las tres especies, dejando notar que la degradación de hidrocarburos fue de un porcentaje equivalente al 100% en su eficiencia, por lo cual las tres especies de hongos resultan de elevada capacidad en degradación, generando así un beneficio ambiental, económico y social.

Concluyendo con datos numéricos que *Aspergillus niger* presenta un elevado potencial de degradación frente a *Trichoderma harzianum* y *Paecilomyces lilacinus*.

CAPÍTULO 3

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente Tesis es investigativa-experimental, enfocada a la biodegradación de residuos procedentes de una línea de producción de laminados empleando *Trichoderma* sp., por lo que se aislaron las cepas de este género de hongo para llevar a cabo el proceso de biodegradación *in vitro* bajo condiciones controladas de laboratorio.

3.1. RECURSOS TÉCNICOS

La investigación se desarrolló en las instalaciones de los laboratorios de Biología, Microbiología y Biotecnología, que forman parte de los laboratorios de Ciencias de la Vida pertenecientes a la Universidad Politécnica Salesiana, sede Cuenca.

3.2 CARACTERIZACIÓN DEL HONGO *Trichoderma* sp.

3.1.1 PREPARACIÓN DE TRAMPAS

MATERIALES

- Arroz
- Melaza
- Cebada
- Frascos de vidrio
- Bandas elásticas
- Tejido poroso (media nylon)

- Autoclave

PROCEDIMIENTO

Se prepararon 12 frascos (Figura 2) trampas de acuerdo a lo que sugiere Vallejo M. (2014) se emplearon como sustratos pre-cocidos: arroz, arroz con melaza, quinua y cebada, colocados en frascos de vidrio, cubiertos con un tejido poroso, sujetos por una banda elástica y esterilizados (Figura 3), para posteriormente ser llevados a campo abierto.



Figura 2: Frascos Trampa con diferentes sustratos pre cocidos.

Fuente: Autor



Figura 3: Frascos trampa esterilizados en autoclave horizontal.

Fuente: Autor

3.1.2 COLOCACIÓN DE TRAMPAS

MATERIALES

- Pala
- Fundas herméticas

PROCEDIMIENTO

Los frascos trampa con sus respectivos sustratos para aislar *Trichoderma* sp., fueron colocados en la parroquia Paccha, perteneciente a la ciudad de Cuenca, provincia del Azuay.

El terreno donde se colocaron las trampas correspondió a un cultivo de *Solanum tuberosum* (papa), donde se procedió a realizar agujeros de entre 15 – 20 cm de profundidad y se colocó los frascos con los diferentes sustratos y su etiqueta de identificación correspondiente, quedando el material poroso como base del frasco y cerca de la raíz de la planta (Figura 4), posteriormente se cubrió con la misma tierra que se retiró previamente quedando así los frascos enterrados.



Figura 4: Frascos trampa colocados junto a las raíces de *Solanum tuberosum*.

Fuente: Autor

Al cabo de 8 días se retiró las trampas enterradas y de manera individual se colocó en fundas con cierre hermético aquellos frascos donde a simple vista se identificó hongos de coloración verdosa (Figura 5), estos fueron transportados al laboratorio donde se procedió a realizar el aislamiento de *Trichoderma* sp., a través de diluciones seriadas con el suelo donde se observaron formaciones verdosas.



Figura 5: Frasco trampa en funda hermética con posible presencia de *Trichoderma* sp.

Fuente: Autor

3.1.3 AISLAMIENTO DE *Trichoderma* sp.

MATERIALES

- Cajas Petri
- Parafilm
- Medio de cultivo PDA
- Matraz
- Algodón
- Papel Aluminio
- Asa de cultivo
- Micropipeta

- Mechero
- Alcohol
- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Estufa
-

PROCEDIMIENTO

Trichoderma sp., se aisló a partir de las trampas recolectadas, mediante diluciones seriadas. De acuerdo a la investigación de Ávila, Goretti y Lizcano (2014), se procedió a pesar 10 g de muestra de suelo tomada del frasco trampa para diluirlo en un matraz con 90 mL de agua destilada estéril y a partir de esta se realizaron dos diluciones posteriores 1 en 10.

Con las diluciones seriadas 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} , se empleó una micropipeta y se tomó de cada dilución un volumen de 0,5 mL y se colocó de forma individual en cajas Petri con medio de cultivo PDA, las cajas se incubaron en una estufa Mermmet a 26,5 °C durante 5 días. Una vez alcanzado el tiempo de incubación y a partir de estas cajas Petri, se efectuaron subcultivos empleando una asa estéril, se tomó parte del micelio blanco esporulado característico de *Trichoderma* sp., por su coloración verdosa y se sembró en nuevas cajas Petri con medio de cultivo hasta obtener una cepa cuya apariencia y pruebas indique la presencia exclusiva del género *Trichoderma* sp.

3.1.4 PRUEBAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DE LAS CARACTERÍSTICAS FÚNGICAS

MATERIALES

- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Asa de cultivo
- Azul de metileno
- Microscopio de pantalla Micros AUSTRIA

PROCEDIMIENTO

Para la caracterización macroscópica de los aislados de *Trichoderma* sp., se tomó como guía la investigación llevada a cabo por Armando, Marfetán y Folgarait (2017). Una vez que estuvo aislado el hongo, se procedió a realizar un rejuvenecimiento del mismo sembrando en cajas Petri nuevamente el microorganismo y dejando transcurrir 8 días para proceder a evaluar su crecimiento (Figura 6), color y forma del micelio, color del anverso de la colonia y aroma que presenta.



Figura 6: *Trichoderma* sp., tras 8 días de desarrollo apto para identificación macroscópica.

Fuente: Autor

Para la identificación microscópica se empleó cajas Petri con el hongo de 5 días de crecimiento, se colocó en el portabjetos 3 gotas de azul de metileno y con ayuda de una asa de cultivo se tomó un pequeña porción del hongo y se desprendió sobre el azul de metileno mediante ligeros movimientos, se cubrió con un cubreobjetos y se llevó a observación en el microscopio de pantalla Micros AUSTRIA (Figura 7), bajo lentes de 10X, 40X y empleando aceite de inmersión se visualizó también bajo el lente de 100X con la finalidad de apreciar de forma clara las estructuras, formas y tamaños de clamidosporas, fialides, conidios, y conidióforos (Chaverri *et al.*, 2015).



Figura 7: Visualización morfológica de *Trichoderma* sp., bajo lente 40X en Microscopio de pantalla Micros AUSTRIA.

Fuente: Autor

3.3 DETERMINAR LA CAPACIDAD DE BIODEGRADACIÓN DE RESIDUOS UTILIZANDO EL HONGO *TRICHODERMA* MEDIANTE PRUEBAS DE LABORATORIO, PARA MINIMIZAR EL EFECTO CONTAMINANTE DEL RESIDUO EN CUESTIÓN

3.3.1 LAVADO DE ESPORAS

MATERIALES

- Medio de cultivo PDA
- Matraz
- Algodón
- Parafilm
- Gasa estéril
- Cloruro de Sodio al 0.9%
- Mechero
- Vaso de precipitación
- Embudo
- Tubo de ensayo

PROCEDIMIENTO

Se realizó lavado de esporas para proceder al conteo en cámara de Neubauer e inocular los frascos con medio de cultivo y contaminante, para ello, se preparó medio de cultivo PDA en un matraz de 250 mL y se inculó una fracción de hongo *Trichoderma* sp. Se llevó a incubación durante 8 días a una temperatura de 26,5°C.

Transcurrido el tiempo de incubación y en condiciones estériles, se realizó 4 lavados de 20 mL empleando Cloruro de Sodio al 0,9% y se filtró con ayuda de gasa estéril para retener fracciones del medio de cultivo que se desprenden con la agitación. (Figura 8)



Figura 8: Matraz con Trichoderma sp., para lavado de esporas.

Fuente: Autor

Las filtraciones se acumularon en un vaso de precipitación y posteriormente se almacenaron en tubos de ensayo estériles y se llevaron a refrigeración.

3.3.2 CONTEO DE ESPORAS

MATERIALES

- Cámara de Neubauer
- Tubos de ensayo
- Micropipeta
- Microscopio de pantalla Micros AUSTRIA

PROCEDIMIENTO

El conteo de esporas se realizó en Cámara de Neubauer de acuerdo al proceso realizado por España (2015), se tomó un tubo de ensayo con la solución madre del lavado inicial de esporas para proceder a realizar diluciones seriadas 10^{-1} hasta 10^{-6} (Figura 9) , se empleó la dilución 10^{-3} para el conteo.



Figura 9: Diluciones seriadas en base 10 a partir del lavado de esporas madre.

Fuente: Autor

Con ayuda de una micropipeta se tomó 50 μL y se depositó en el extremo superior de la cámara de Neubauer, de esta forma se rellenaron los dos extremos mediante capilaridad. Una vez lista la muestra, ésta se colocó en la platina del microscopio Micros AUSTRIA (Figura 10) y se procedió a ubicar la cuadrícula central con el lente 40X y de forma ordenada se cuantificó las sub-cuadrículas con el lente de 40X (Figura 11).

Se empleó la siguiente fórmula para determinar la concentración de esporas por mililitro:

$$\text{Concentracion (esporas/mL)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células} * 10.000}{\text{n}^\circ \text{ de cuadrados contabilizados}}$$



Figura 10: Esporas de *Trichoderma* sp., en una sección de los cuadrantes de la cámara de Neubauer, bajo el lente 40X del microscopio de pantalla Micros AUSTRIA.

Fuente: Autor



Figura 11: Esporas de Trichoderma sp., en un cuadrante de la cámara de Neubauer, bajo el lente 40X del microscopio de pantalla Micros AUSTRIA.

Fuente: Autor

3.3.3 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO LÍQUIDOS

MATERIALES

- Hojuelas de papa
- Glucosa
- Agua destilada
- Melaza
- Levadura
- Frascos de vidrio
- Vaso de precipitación
- Varilla de agitación
- Autoclave
- Medidor de pH
- Autoclave
- Balanza
- Cámara de flujo laminar

- Estufa BINDER

PROCEDIMIENTO

3.3.2.1 MEDIO DE CULTIVO DE PAPA

Se llevó a ebullición 12,5 g de hojuelas de papa en 1 litro de agua destilada durante 30 minutos y se filtró. Se añadió glucosa y se ajustó el pH a 5,5 (Figura 12), se distribuyó en los diferentes frascos de vidrio estériles y se esterilizó a 121°C (Figura 13) durante 20 minutos (Harrigan y McCance, 2014).



Figura 12: Medio de cultivo líquido de papa ajustado a 5,5 el pH.

Fuente: Autor



Figura 13: Frascos con medio de cultivo líquido de papa al interior del autoclave para ser esterilizados a 121 °C durante 20 min.

Fuente: Autor

3.3.2.2 MEDIO DE CULTIVO DE MELAZA

Se preparó una solución acuosa de melaza de caña al 5 %, se ajustó el pH a 5,5 (Figura 14) y se esterilizó a 121 °C durante 20 min, se distribuyó en frascos de vidrio estériles y se refrigeró durante 24 horas antes de añadir 5% de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) por cada frasco (Benavides E, 2017).



Figura 14: Medio de cultivo líquido de melaza ajustado a pH 5,5.

Fuente: Autor.

3.3.4 INOCULACIÓN MEDIO-MICROORGANISMO-CONTAMINANTE

Los frascos con medio de cultivo líquido papa - melaza previamente preparados, fueron inoculados con el contaminante en tres concentraciones diferentes, diluidos en aceite de vaselina estéril (Figura 15) y por triplicado, conjuntamente con 1 mL de esporas (Figura 16) del microorganismo *Trichoderma* sp., el proceso se realizó en cámara de flujo laminar, los frascos fueron debidamente etiquetados e introducidos en fundas herméticas y llevados a incubación en una estufa Binder (Figura 17) durante un período de 90 días, a una temperatura de 26,5 °C y se les suministró agitación manual dos veces por día durante la etapa de incubación.



Figura 15: Contaminante diluido en aceite de vaselina en 3 concentraciones de izquierda a derecha; 1 en 10, 1 en 100 y puro.

Fuente: Autor



Figura 16: Inoculación del medio líquido de papa con el microorganismo *Trichoderma* sp.

Fuente: Autor



Figura 17: Frascos etiquetados, colocados en fundas herméticas y almacenados en estufa BINDER.

Fuente: Autor

3.3.5 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA ANÁLISIS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES

Las muestras al cabo de los 90 días fueron preparadas para analizarlas mediante cromatografía de gases, para ello se empleó la técnica de Extracción en Fase Sólida Dispersiva QuEChERS desarrollada por Fuentes, García y Fernández (2015), adaptada a las 24 muestras con las que se contó y fueron analizadas.

MATERIALES

- Acetonitrilo
- Sulfato de Magnesio
- Acetato de Sodio
- Difenilamina
- Silicagel
- Espátula
- Frasco de vidrio pequeños
- Tubos para centrífuga
- Pipeta automática
- Balanza
- Vortex
- Centrifuga

PROCEDIMIENTO

La preparación de las muestras (Figura 18) se efectuó en dos fases que se describen a continuación:

3.3.5.1 FASE DE EXTRACCIÓN

- Se colocó 8,77 mL del contenido de los frascos inoculados en un tubo de centrífuga.
- Se agregó 10 mL de acetonitrilo y se agitó durante un minuto en el vórtex.

- Se agregó 6 g de $MgSO_4$ y 1,5 g de acetato de sodio y se agitó por un minuto
- Finalmente se centrifugó a 4500 rpm durante cinco minutos.

Este proceso se realizó para cada una de las 24 muestras.

3.3.5.2 FASE DISPERSIVA

- Del tubo centrifugado se tomó una alícuota de 5 mL y se coloca en un nuevo tubo.
- Se añadió 0,4 g difenilamina, 0,4 g de silicagel y 1,2 g de $MgSO_4$
- Se centrifugó a 4500 rpm durante cinco minutos.
- Finalmente se extrajo 2 mL de alícuota y se almacenó en frascos de vidrio estériles
- Los frascos se etiquetaron adecuadamente y se llevaron a refrigeración.

Este proceso se realizó para cada una de las 24 muestras.



Figura 18: Muestras para análisis por CG.

Fuente: Autor

3.3.6 ANÁLISIS POR CROMATÓGRAFO DE GASES

Se analizaron las 24 muestras (Figura 19) de manera cualitativa, para establecer un rango de degradación por comparación, por ello se procedió a analizar las muestras siguiendo el orden que se detalla en la Tabla 1.



Figura 19: Análisis de degradación del contaminante por CG.

Fuente: Autor

Tabla 1: Orden de las muestras analizadas de acuerdo al medio de cultivo líquido y la concentración (C) del contaminante a degradar.

Muestra	N° de muestras
Medio de cultivo (Papa) – Contaminante (C1,C2,C3)	3
Medio de cultivo (Papa) – Contaminante (C1) - Microorganismo	3
Medio de cultivo (Papa) – Contaminante (C2) - Microorganismo	3
Medio de cultivo (Papa) – Contaminante (Puro) - Microorganismo	3
Medio de cultivo (Melaza) – Contaminante (C1,C2,C3)	3
Medio de cultivo (Melaza) – Contaminante (Puro) – Microorganismo	3
Medio de cultivo (Melaza) – Contaminante (Puro) – Microorganismo	3
Medio de cultivo (Melaza) – Contaminante (Puro) – Microorganismo	3
Total de las muestras	24

Fuente: Autor

3.4 DETERMINAR EL EFECTO DEL pH EN EL PROCESO DE DEGRADACIÓN MEDIANTE PRUEBAS DE LABORATORIO EVALUANDO EL pH ÓPTIMO DE DEGRADACIÓN

MATERIALES

- Tiras de pH
- Cámara de flujo laminar

PROCEDIMIENTO

Una vez se inocularon los frascos: Medio de cultivo-Microorganismo-Contaminante, en condiciones estériles, al interior de la cámara de flujo laminar (Figura 20) se realizó una primera medición de pH, para ello se emplearon tiras comerciales de pH y de forma individual se registró los datos de medición de cada frasco, posteriormente se llevaron a cabo nuevas mediciones cada 12 días, durante los 90 días de incubación.



Figura 20: Medición de pH con tiras comerciales durante el proceso de biodegradación.

Fuente: Autor

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CARACTERIZACIÓN DEL HONGO *Trichoderma* sp.

4.1.1 RECOLECCIÓN DE FRASCOS TRAMPAS

Se colocaron 12 frascos trampa en diferentes lugares del cultivo de *Solanum tuberosum*, pero únicamente 3 frascos fueron empleados para aislar el microorganismo de interés como se observa en la siguiente Tabla 2:

Tabla 2: Posibles muestras para aislar *Trichoderma* sp.

Muestra	Sustrato	Profundidad	Coordenadas	Presencia (+) Ausencia (-) del Microorganismo
M1 – M3	Arroz	15 - 20 cm	Lat: -2.87951° Lon: - 78.93482°	(-)
M4 – M6	Arroz – melaza	15 - 20 cm	Lat: -2.87951° Lon: - 78.93482°	(-)
M7 – M9	Quinua	15 - 20 cm	Lat: -2.87951° Lon: - 78.93482°	(+)
M10 – 12	Cebada	15 - 20 cm	Lat: -2.87951° Lon: - 78.93482°	(-)

Fuente: Autor

La cepa de *Trichoderma* sp., que se obtuvo fue a partir de los frascos trampa que contenían quinua precocida.

4.1.2 AISLAMIENTO DE *Trichoderma* sp.

Se identificó la posible presencia de *Trichoderma* sp., procedente del cultivo de *Solanum tuberosum*, correspondiente a la dilución 10^{-3} , en medio de cultivo PDA, a una temperatura de 26,5°C.

Se evidenció que con la siembra en medio de cultivo PDA, de las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} , hubo crecimiento de otros hongos, que por su apariencia y apreciación morfológica bajo el lente del microscopio correspondían a especies de otros géneros ajenos al microorganismo de interés de la presente investigación.

4.1.3 PRUEBAS MACROSCÓPICAS DE LAS CARACTERÍSTICAS FÚNGICAS

El análisis macroscópico se evaluó de acuerdo a Singh *et al.*, (2015) y las investigaciones realizadas por Bisset (1991a, b) cuyos aportes incluyen claves para la identificación de especies del género *Trichoderma* sp. En la siguiente Tabla 3 se detallan las características morfológicas más relevantes para la identificación macroscópica de *Trichoderma* sp.

Tabla 3: Características macroscópicas identificadas en la cepa aislada.

Características	Días (5 – 6 días)
Tasa de crecimiento de colonia	5 - 6 cm
Color de la colonia	Verde claro a verde oscuro
Color de la colonia reversa	Amarillo claro
Borde de la colonia	Ondulado
Olor del cultivo	Aroma similar a coco
Forma miceliar	Aglomerado - entrelazado
Color miceliar	Blanco algodonoso

Fuente: Autor

Las características descritas en la Tabla 3 coinciden con Gómez (2017), autor que en su trabajo " Evaluación de diferentes medios de cultivo y condiciones para la producción de conidios de TRICHODERMA SPP mediante fermentación en líquido y sólido" afirma que las colonias de *Trichoderma* sp., son de fácil reconocimiento gracias a su rápido crecimiento, las coloraciones de este hongo varían entre: blanco, verde o amarillo-verdoso; las áreas con colonias forman anillos concéntricos. Los reverses de las colonias se presentan de colores, amarillo, ámbar o amarillo-verde.

De acuerdo a Bisset (1991a) en su investigación " A revision of the genus *Trichoderma* II " establece claves para la identificación de especies del género *Trichoderma* sp., y respalda las características mencionadas en la Tabla 3, debido a que menciona en su trabajo que las colonias de *Trichoderma* sp., generalmente crecen rápidamente, en la mayoría de las especies tienen entre 5-9 cm de diámetro después de 4 días a temperaturas entre 20-27° C, el micelio aéreo se limita a una formación de tipo aglomerada: el inverso del cultivo varía entre incoloro a amarillenta opaco. Algunos aislados presentan un olor distintivo que facilita su clasificación entre ellos se distingue un ligero aroma a coco y aroma a malta.

4.1.4 PRUEBAS MICROSCÓPICAS DE LAS CARACTERÍSTICAS FÚNGICAS

Las pruebas microscópicas se enfocaron en la observación de las estructuras que diferencian al género *Trichoderma* sp., de otros géneros. Para la respectiva identificación se empleó la literatura proporcionada por Bissett (1991a, b).

En la siguiente Tabla 4 se puede diferenciar las características que se apreciaron bajo el lente 40X del microscopio de pantalla Micros AUSTRIA:

Tabla 4: Características microscópicas de *Trichoderma* sp., bajo lente 40X.

Características	Días (5 – 6 días)
Conidiación	Circular
Conidióforos	Ramificados
Forma de las fiálides	Similar a un matraz ensanchado en el medio y estrecho en la punta.
Forma de los conidios	Subglobosos a ovoides
Clamidiosporas	Presentes

Fuente: Autor

Como resultado de la identificación microscópica (Figura 21) se aprecia la presencia las hifas unicelulares y septadas, de las cuales se emiten conidióforos ramificados de tamaño corto pero abundante en número, se observa que las fiálides son de forma globosa e hialina, en tanto que los conidios poseen una forma ovoide. Debido a la tinción que se efectuó empleando azul de metileno para visualizar claramente las estructuras, no se pudo diferenciar el color de los conidios, mismos que de acuerdo a la información proporcionada por Singh *et al.*, (2015) afirma que son de un color verde claro observado al lente del microscopio.

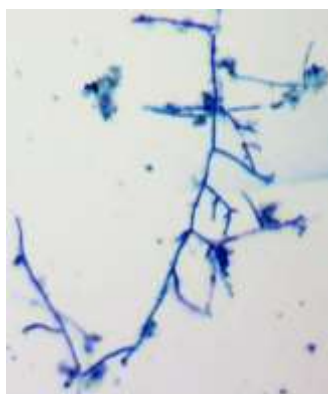


Figura 21: *Trichoderma* sp., teñido con azul de metileno y observado bajo el lente 40X del microscopio de pantalla Micros AUSTRIA

Fuente: Autor

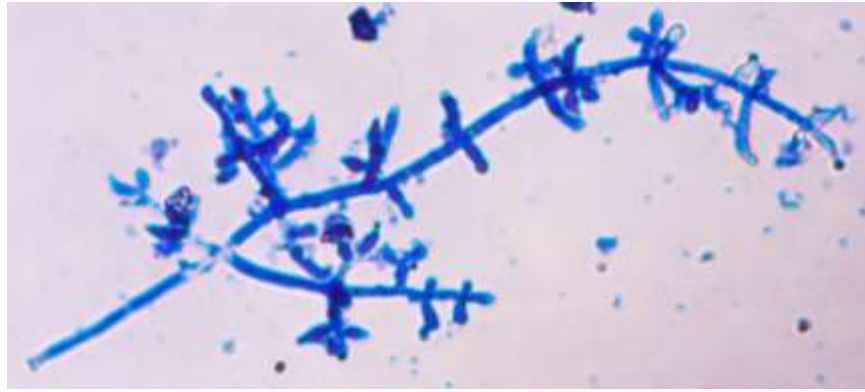


Figura 22: Trichoderma sp., teñido con azul de metileno y observado bajo el lente 100X del microscopio de pantalla Micros AUSTRIA

Fuente: Autor

Lo visualizado (Figura 22) se respalda con la información que proporciona Martínez, Infante y Peteira (2015) en su trabajo "Taxonomía polifásica y variabilidad en el género *Trichoderma*" y Gómez (2017) en su publicación "Evaluación de diferentes medios de cultivo y condiciones para la producción de conidios de *TRICHODERMA SPP* mediante fermentación en líquido y sólido", donde los autores exponen que: los conidióforos de *Trichoderma sp.*, tienen aspecto cónico cuando se observan al microscopio. Producen gran 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 μm . Estos 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 ramificadas y no verticiladas. 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 μm de diámetro. Estas esporas pueden perdurar a través del tiempo, por ello son consideradas estructuras de sobrevivencia.

4.2 DETERMINAR LA CAPACIDAD DE BIODEGRADACIÓN DE RESIDUOS DEL HONGO *Trichoderma sp.*, MEDIANTE PRUEBAS DE LABORATORIO PARA MINIMIZAR EL EFECTO CONTAMINANTE DEL RESIDUO EN CUESTIÓN

4.2.1 CONTEO DE ESPORAS DE *Trichoderma sp.*, EN LA CÁMARA DE NEUBAUER

La Tabla 5 presenta el resultado del conteo de esporas de *Trichoderma sp.*, en cámara de Neubauer, la concentración que se obtuvo fue de aproximadamente 32 152 500 células/mL en la solución madre sin diluir, en tanto que en la dilución seriada 10^{-3} se obtuvo una concentración de aproximadamente 4 617 500 células / mL. Para el proceso de biodegradación se inoculó 1 mL de la solución madre.

Tabla 5: Concentración total de esporas de *Trichoderma sp.*, en la solución madre y en dilución 10^{-3} .

Conteo	Concentración Total
	células/mL
Solución Madre	32 152 500 células / mL
Dilución 10^{-3}	4 617 500 células / mL

Fuente: Autor

La concentración de células / mL obtenidas en el presente trabajo de investigación es superior a los resultados presentados por Barranzuela (2016) en el trabajo "Crecimiento de *Trichoderma sp.*, utilizando como sustrato metamidofos en condiciones de laboratorio" quién incubó *Trichoderma sp.*, a 25°C durante 7 días y tras el recuento de esporas, obtuvo

una concentración de 10 000 000 células / mL. De acuerdo a Benites y Marroquín (2015) en su trabajo "Producción de *Trichoderma Harzianum* en diferentes sustratos orgánicos" realizaron conteo de esporas cuya concentración fue de aproximadamente 6 700 000 células / mL, misma que también deja denotar una cantidad menor a la concentración de 32 152 500 células / mL que se refleja en el presente trabajo de investigación.

Según Peraza., Orozco, y Esquivel. (2014) en su trabajo "Evaluación in vitro de hongos nematófagos en zonas arroceras de Costa Rica contra el nematodo agallador *Meloidogyne javanica*" en la dilución seriada 10^{-3} realizada para comparar con trabajos de investigación previos y con el hongo *Trichoderma* sp., aislado para este trabajo de investigación, se obtuvo una concentración entre 1 000 000 y 1 500 000 células / mL de esporas, de manera similar en el estudio realizado por Poalacin (2015) titulado "Estudio del adecuado crecimiento del hongo *Trichoderma Harzianum* y *Trichoderma Hamatum* en sustrato sólido" la cantidad del recuento de esporas es inferior al del presente trabajo, puesto que obtuvo aproximadamente 2 600 000 células / mL cantidad inferior a 4 617 500 células / mL del presente trabajo de investigación.

4.2.2 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES

Se recopiló la información para realizar análisis de datos mediante diseños estadísticos, con el fin de evaluar la efectividad del proceso de biodegradación y establecer el medio líquido más óptimo para el proceso. Empleando las muestras control y las muestras que se sometieron a la experimentación, se evaluó mediante pruebas estadísticas lo representativo de los medios de cultivo empleados. Se analiza mediante comparación, el área total bajo la curva del análisis cromatográfico para establecer un porcentaje de disminución

del contaminante inoculado, para cada uno de los casos se establecieron respectivamente una hipótesis nula y una hipótesis alternativa.

Tabla 6: Porcentaje de degradación del contaminante por *Trichoderma sp.*

Código	Área bajo la curva del Control		Área bajo la curva posterior al proceso de biodegradación		Total Degradado %
		%		%	
MMCP	1121441086	100%	821034470	73,2 %	26,8 %
MMC1.10	1209264855	100%	868712747	71,8 %	28,2 %
MMC1.100	996138380	100%	892314786	89,6 %	10,4 %
MPCP	1686463513	100%	1339654977	79,4 %	20,6 %
MPC1.10	1512277551	100%	1449098247	95,8 %	4,2 %
MPC1.100	1425736888	100%	1322046338	92,8 %	7,2 %

Fuente: Autor

En la Tabla 6 se puede visualizar las cantidades de área bajo la curva que se obtuvieron tras el análisis de las muestras mediante Cromatografía de Gases, cada área total bajo la curva de las muestras control se expresó en un porcentaje equivalente al 100% y se comparó con las con las equivalencias de los porcentajes de las muestras que se sometieron al proceso de biodegradado, lo que permitió establecer la cantidad de degradado en porcentaje en las tres concentraciones, observándose así que el mayor porcentaje de degradación se atribuyó a MMC1.10 con un total de 28,2% menos de contaminante y MPC1:10 con un 4,2% de contaminante degradado siendo el de menor porcentaje de disminución del contaminante por parte del microorganismo *Trichoderma sp.*, en condiciones *in vitro* durante noventa días a temperatura de 26,5 °C y con agitación manual.

DISCUSIÓN

De acuerdo a Atagana (2009) en su investigación " Biodegradation of PAHs by fungi in contaminated-soil containing cadmium and nickel ions " al cabo de diez semanas de tratamiento, aproximadamente el 93% de los HAP's fueron eliminados por parte de *Trichoderma* sp., de los experimentos de control biológico, bajo condiciones controladas de temperatura, pH y humedad. Muñoz (2016) en su tesis "Evaluación de la eficacia de *Trichoderma* sp y *Pseudomona* sp., para biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos" tras la experimentación obtuvo la reducción de HAP's en el suelo equivalente al 98% a los 90 días de iniciado el tratamiento, considerando que las condiciones de pH, temperatura y humedad fueron reguladas en el laboratorio, lo que favoreció para que el proceso sea estable. Castro y Rivillas (2012) en su estudio " *Trichoderma* spp. Modos de acción, eficacia y usos en el cultivo de café "afirman que *Trichoderma* sp., es un género de hongos aeróbico cuya habilidad para adaptarse y colonizar de manera eficaz distintos ambientes, facilita su alta capacidad de reproducción empleando compuestos orgánicos pertenecientes al petróleo ya que emplean su contenido de carbono para su desarrollo y crecimiento, su elevada capacidad de esporulación beneficia su reproducción en el medio en el que se inocula. De acuerdo a los resultados que se obtuvo en el presente trabajo de investigación, el porcentaje de degradación más relevante equivale al 42%, un porcentaje que está por debajo de otras investigaciones y en base al estudio de Argumedo, Alarcón, Ferrera y Peña, (2009) titulado "El género fúngico *Trichoderma* y su relación con los contaminantes orgánicos e inorgánicos", esto puede deberse a la influencia de las estructuras químicas de los hidrocarburos que interviene directamente en la capacidad de degradación por *Trichoderma* sp., sin embargo, los mecanismos de degradación que presentan las especies del género *Trichoderma* para compuestos orgánicos, aún no son del todo entendidas. Además se pone a consideración que el contaminante inoculado no fue la única fuente de carbono presente en el medio de

cultivo, puesto que el medio líquido de papa contenía un porcentaje representativo de glucosa, así también el medio líquido a partir de melaza contenía un bajo porcentaje de *Saccharomyces cerevisiae* que pudo haber ejercido influencia directa dentro del proceso de degradación.

La Tabla 7 muestra los datos recopilados en cuanto al área total bajo la curva de las muestras que se emplearon para realizar el test de Normalidad (Minitab 17) con el fin de comprobar el supuesto de normalidad.

Tabla 7: Área total bajo la curva de las diferentes muestras analizadas por CG.

Código	Área bajo la Curva
CMCP	1121441086
MMCP	505930132
CMC1.10	1209264855
MMC1.10	340552107
CMC1.100	996138380
MMC1.100	314543482
CPCP	1686463513
MPCP	346808536
CPC1.10	1512277551
MPC1.10	186407071
CPC1.100	1425736888

Fuente: Autor

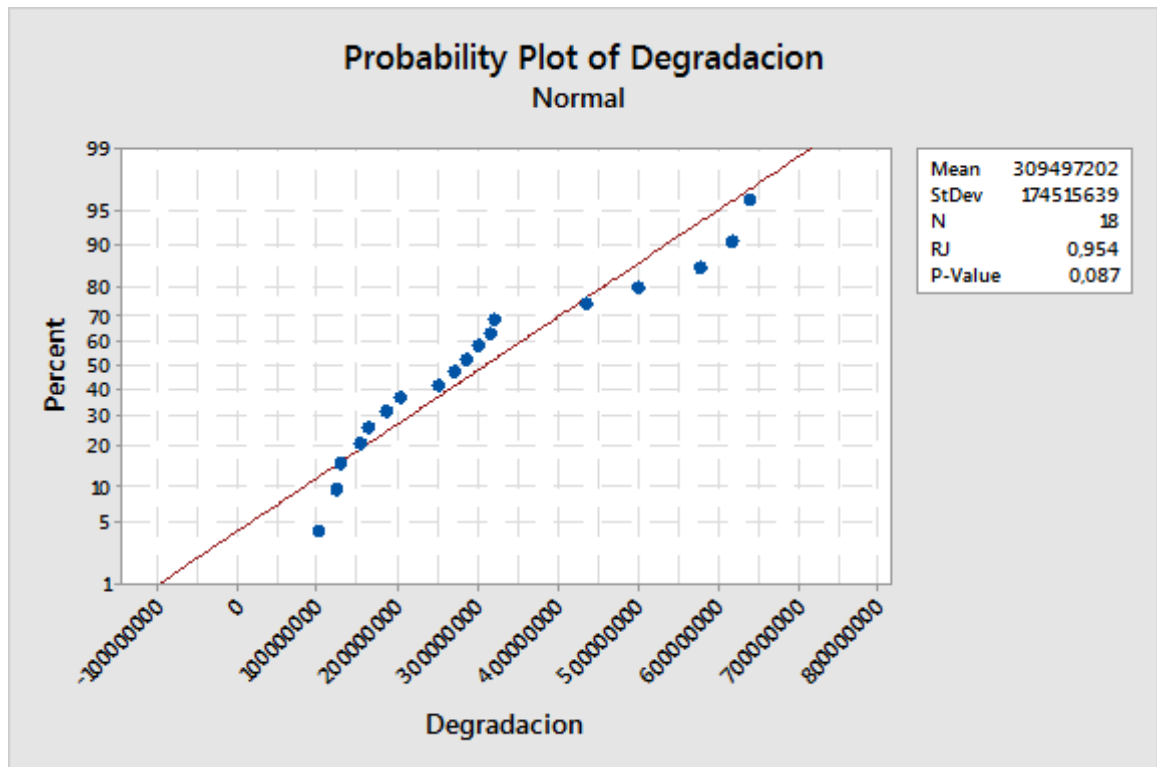


Figura 23: Gráfica de Normalidad

Fuente: Autor

En la Figura 23 se observa que el valor $-p > 0,087$, resultado de la prueba Ryan Joiner (similar a Shapiro – Wilks), es mayor al valor de la significancia 0,05; por tanto se determinó que el supuesto de normalidad se cumple existiendo así una distribución normal.

Se realizó un análisis de varianza ANOVA (Minitab 17) del diseño completamente al azar.

Tabla 8: ANOVA del Área bajo la Curva del proceso de degradación por *Trichoderma* sp.

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-value	P-value
Factor	5	2,38478E+17	4,76956E+16	1,91	0.166

Error	12	2,99733E+17	2,49777E+16
Total	17	5,38211E+17	

Fuente: Autor.

Los resultados del análisis de varianza ANOVA del diseño completamente al azar se visualizan en la Tabla 8, en la cual el valor $p = 0,166$ es mayor al valor de la significancia $0,05$, razón por la cual se acepta la hipótesis nula, que no existe significancia en las áreas bajo la curva de degradación en concentración pura del contaminante, trabajando en concentración diluida 1:10 y en una dilución 1:100 del medio inoculado con *Trichoderma* sp., en medio líquido de papa o melaza.

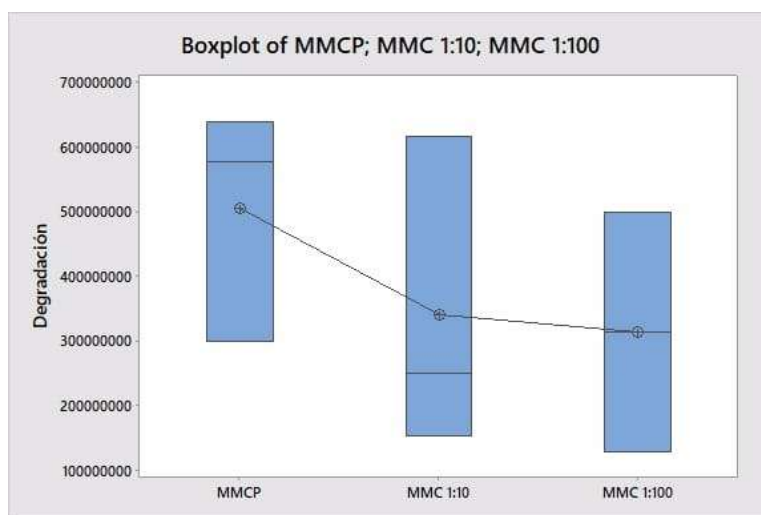


Figura 24: Diagrama de Cajas Simultáneo de las Áreas bajo la curva de degradación de las muestras analizadas en medio líquido de melaza.

Fuente: Autor

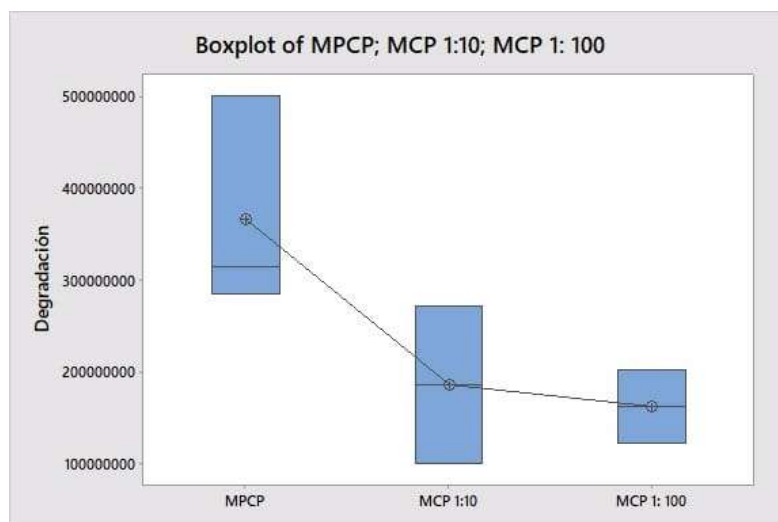


Figura 25: Diagrama de Cajas Simultáneo de las Áreas bajo la curva de degradación de las muestras analizadas en medio líquido de papa.

Fuente: Autor

En la Figura 24 y Figura 25 se puede comparar y apreciar que MMCP en relación a MMC1:10 y MMC1:100 se traslapa lo que denota que no existe una diferencia significativa en el proceso de degradación en este medio. Se observa que MPCP en relación a MPC1:10 y MPC1:100 no se traslapa por tanto existe una diferencia significativa en sus medias y dentro del proceso de degradación. Se puede apreciar también que MMCP y MPCP se traslapan lo que demuestra que no hay una diferencia significativa distinto a la Melaza Pura MMCP en relación a MPC1:10 y MPC1:100 donde no se traslapan y la diferencia en sus medias resulta significativa. Debido a estas variaciones se realiza prueba de Tukey, para ver que posibles muestras presentan significancia.

Tabla 9: Método Tukey de las medias de las Áreas bajo la Curva de degradación del contaminante por *Trichoderma* sp.

Factor	N	Mean	Grouping
MMCP	3	505930132	A
MPCP	3	366908002	A

MMC1:10	3	340552107	A
MMC1:100	3	314543481	A
MPC1:10	3	186407071	A
MPC1:100	3	162741882	A

Fuente: Autor.

Nota: medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En la Tabla 9 se observa que estadísticamente no existe significancia, al presentar sus medias una letra común se considera que para el proceso de biodegradación se puede emplear medio líquido de papa o medio líquido de melaza sin que el medio intervenga directamente al momento en que se lleve a cabo el proceso de biodegradación por parte del microorganismo.

4.3 DETERMINAR EL EFECTO DEL pH EN EL PROCESO DE DEGRADACIÓN MEDIANTE PRUEBAS DE LABORATORIO EVALUANDO EL pH ÓPTIMO DE DEGRADACIÓN.

Se registraron los datos de pH de cada 12 días y se elaboró una tabla para el análisis estadístico (Anexo 2).

Tabla 10: *Valores promedio de pH registrados durante el proceso de degradación del contaminante por Trichoderma sp.*

Código	pH
CMCP	5,5
MMCP	6,5
CMC1.10	5,5
MMC1.10	6,6
CMC1.100	5,5

MMC1.100	6,6
CPCP	5,5
MPCP	4,6
CPC1.10	5,5
MPC1.10	4,2
CPC1.100	5,5
MPC1.100	4,8

Fuente: Autor

DISCUSIÓN

De acuerdo a Cobas, Ferreira, Tavares, Sanromán y Pazos (2013) en su publicación "Development of permeable reactive biobarrier for the removal of PAHs by *Trichoderma longibrachiatum*", el monitoreo de pH realizado durante el proceso de biodegradación de PAH's por *Trichoderma longibrachiatum* registró que, en sus ensayos control el pH se mantuvo alrededor de 4,5, pero en la experimentación con el contaminante el pH osciló entre 5,5 y 6 debido a la actividad microbiana. Singh *et al.* (2014) en la investigación "Optimal physical parameters for growth of *Trichoderma* species at varying pH, temperature and agitation." hacen denotar lo esencial de las condiciones físicas favorables para el desarrollo de *Trichoderma* sp., debido a que, de las siete especies de estudio se determinó que el pH más favorable se encontraba entre 5,5 y 7, por otro lado, sus resultados en cuanto a la agitación durante el proceso de crecimiento se estableció como óptimo a una velocidad de 150 rpm gracias a la aireación que permite al medio para el desarrollo del microorganismo. Gaanappriya, Guhankumar, Balakrishnan (2011) en su

trabajo titulado "Isolation of xylan degrading enzyme from *Trichoderma* spp" manifestaron que el hongo *Trichoderma* sp., posee un pH óptimo para su desarrollo y la producción de enzimas degradadoras de xilano entre 5,5 y 5,7. De acuerdo a los resultados estadísticos del presente trabajo de investigación, se afirmó que el pH es un factor fundamental dentro del proceso de biodegradación, este parámetro intervino directamente, ya que tras realizar la prueba de comparación y contrastes (Tabla 12) en pH = 5 el proceso de degradación se consideraría óptimo, siendo este un valor más ácido al de pH 5,5 y 7 reportado por Singh *et al.* (2014) y por los autores Cobas, Ferreira, Tavares, Sanromán y Pazos (2013), pero a su vez menos ácido que pH = 4,2 valor que se obtuvo como resultado de la medición de pH de MPC1.10 reportado como el de menor porcentaje de degradación. Similar a la investigación de Singh *et al.* (2014) a los frascos en los que se llevó a cabo el proceso de biodegradación se les suministro agitación, pero considerando que esta agitación fue manual, que no permitió establecer una velocidad exacta además de no ser constante, sino en dos etapas del día, durante los 90 días del proceso de degradado, debido a ello se considera que la aireación también varió, lo que pudo influir directamente en el crecimiento y desarrollo de *Trichoderma* sp., y a su vez en su proceso metabólico que causa variaciones en el pH y potencia el proceso de biodegradación del contaminante.

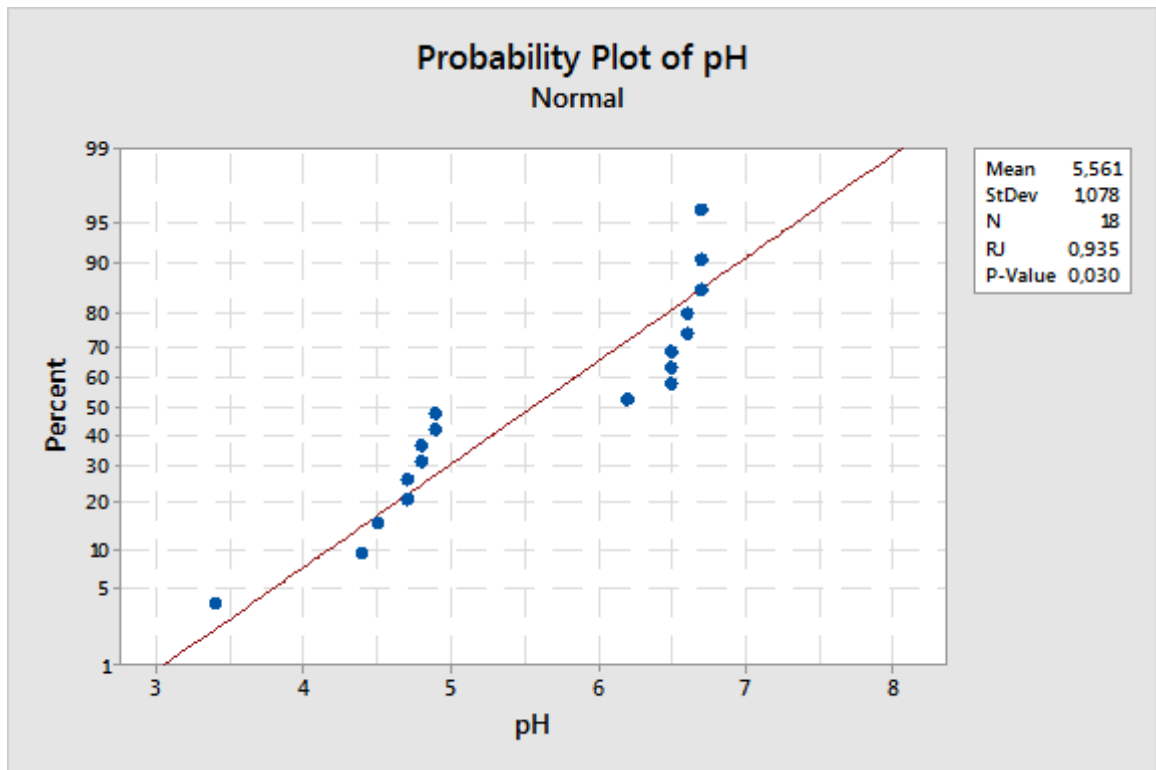


Figura 26: Prueba de Normalidad

Fuente: Autor

En la Figura 25 se visualiza que el valor $-p < 0,030$, que se obtuvo mediante la prueba Ryan Joiner (similar a Shapiro – Wilks), es un valor menor al de significancia 0,05; por ello se determina que no se cumple el supuesto de normalidad, por tanto no hay una distribución normal y se procedió a realizar un análisis de varianza no paramétrica, se llevó a cabo la prueba de Kruskal – Wallis (Minitab 17), que permitió comparar el pH en los dos medios de cultivo líquido.

Tabla 11: Análisis de varianza no paramétrica: prueba Kruskal – Wallis del Área bajo la Curva de degradación del contaminante.

Tratamiento	N	Medias	D.E	Medianas	Rangos	H	P
Medio Melaza	9	4,57	0,47	4,70	5,00	12,79	< 0,0001
Medio Papa	9	6,56	0,16	6,60	14,00		

Fuente: Autor

En la Tabla 11 se observa que el valor de $p < 0,0001$ tras el análisis de varianza no paramétrica: prueba Kruskal – Wallis, es menor al valor de la significancia 0,05, debido a ello se rechaza la hipótesis nula de que el pH no interviene directamente en el proceso de degradación del contaminante por *Trichoderma* sp., y se acepta la hipótesis alternativa donde el factor pH interviene directamente en el proceso de degradación del contaminante.

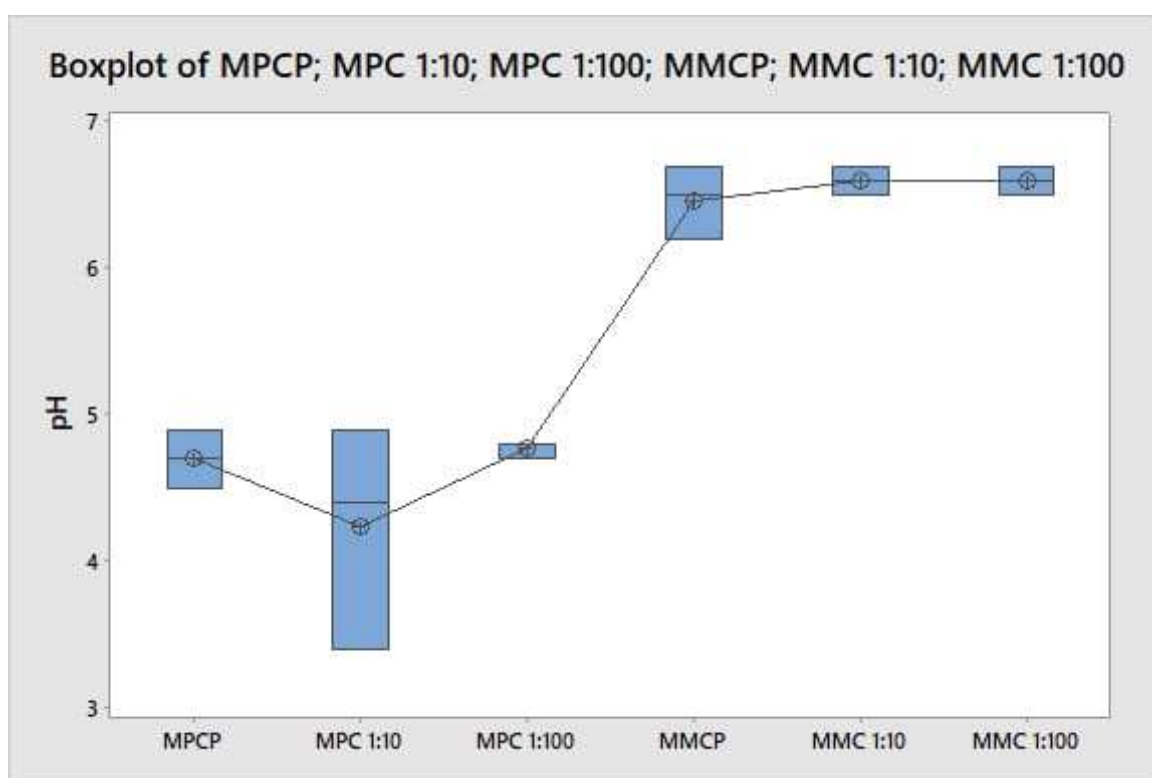


Figura 27: Diagrama de Cajas Simultaneo de las mediciones de pH de degradación de las muestras analizadas.

Fuente: Autor

En la Figura 26 se observa que MPCP presenta similitud con MPC1:10 y MPC1:100 en relación a sus medianas, debido a que MPCP puede traslaparse con el medio en dilución, por otra parte en cuanto al medio de melaza se observa que MMCP también presenta similitud con MMC1:10 y MMC1:100 en relación a sus medias por tanto es posible un traslapamiento. En una comparación entre medios de cultivo líquidos se puede diferenciar que entre MPCP, MPC1:10 y MPC1:100 en relación a MMCP, MMC1:10 y

MMC1:100 no existe similitud en sus medias por tanto una diferencia significativa debido a que no existe posibilidad de que se traslapen entre los dos medios, debido a ello se procedió a realizar una prueba de comparación y contrastes para establecer el medio que presenta mayor significancia para el proceso de biodegradación.

Tabla 12: Comparación y contrastes de los rangos de pH.

Tratamiento	Ranks
Melaza	5,00 A
Papa	14,00 B

Fuente: Autor

Nota: medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En la Tabla 12 se aprecia que de acuerdo a la prueba de comparación y contrastes de los rangos de pH, estos son significativamente diferentes, esta prueba se empleó para conocer el pH más óptimo para el proceso de biodegradación por *Trichoderma* sp., considerando así que el pH en rango 5, que a su vez corresponde al medio líquido de melaza es el más óptimo para potenciar la biodegradación del contaminante.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES.

Tras finalizar la presente investigación se concluye que:

- Se aisló e identificó con éxito tanto microscópica como macroscópicamente el hongo *Trichoderma* sp.

- El conteo de esporas que se realizó en la cámara de Neubauer superó en gran cantidad a la literatura consultada, obteniéndose así, en el conteo de la solución madre 32 152 500 células / mL, y en la dilución 10^{-3} , 4 617 500 células / mL.
- La capacidad de biodegradación de *Trichoderma* sp., se comprobó mediante cromatografía por comparación del área total bajo la curva tanto al inicio como al final del tratamiento, siendo el porcentaje de degradación más notable el equivalente al 28,2% correspondiente a MMC1.10, pero es preciso considerar para futuras investigaciones el trabajar en un tiempo mayor a 90 días para el proceso de biodegradación.
- Mediante pruebas estadísticas se compararon los medios líquidos empleados para la degradación del contaminante, comprobando así que no existe significancia al emplear para el tratamiento medio de cultivo de papa o melaza en concentración pura del contaminante y diluciones, considerando que se podrían emplear otros medios líquidos que potencien la degradación del contaminante.
- Tras evaluar estadísticamente las mediciones de pH en los dos medios empleados durante los 90 días, se estableció como pH óptimo para este proceso el correspondiente a pH = 5 para potenciar el biodegradado del contaminante, por ello es fundamental se mantenga estable éste parámetro para conseguir la mayor degradación posible del contaminante.
- Los resultados reflejados en el presente trabajo de investigación confirman que el hongo *Trichoderma* sp., es un microorganismo útil y parte de una tecnología de bajo costo para degradar hidrocarburos, considerando los factores físicos que intervienen directamente en el proceso para potenciar la biodegradación.

6. RECOMENDACIONES

Se recomienda:

- Trabajar en condiciones estériles durante la inoculación de esporas-contaminante en los medios líquidos, medición de pH y preparación de las muestras para análisis cromatográfico.
- Probar el proceso de biodegradación *in situ*, considerando los factores ambientales: humedad, temperatura así como el monitoreo en la medición de pH para mantenerlo estable.
- Proporcionar agitación constante a los frascos en cuyo contenido se produce la biodegradación para optimizar el proceso.
- Extender el tiempo de proceso de biodegradación para conseguir un mayor porcentaje de disminución de hidrocarburos.

BIBLIOGRAFÍA

- Adenipekun, C. O., y Lawal, R. (2012). Uses of mushrooms in bioremediation (review). *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*. 7(3), 62-68. doi:10.5897/BMBR12.006
- Arcila, L., (2016). *Análisis comparativo de la eficiencia de productos para la biorremediación de suelos contaminados con diésel (UN 1202) utilizando métodos de bioestimulación y bioaumentación a escala piloto*. (Tesis de pregrado). Universidad de la Salle, Bogotá, Colombia.
- Argumedo, R., Alarcón, A., Ferrera, R., & Peña, J. (2009). El género fúngico *Trichoderma* y su relación con los contaminantes orgánico e inorgánico. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 25(4), 257-269. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/pdf/370/37012013006.pdf>
- Argumedo, R., Alarcón, A., Ferrera, R., Almaraz, J., y Peña, J. (2012). Tolerance and growth of 11 *Trichoderma* strains to crude oil, naphthalene, phenanthrene and benzo [a] pyrene. *Journal of environmental management*, 95, S291-S299. doi: 10.1016/j.jenvman.2010.08.011
- Armando, N. G., Marfetán, J. A., y Folgarait, P. J. (2017). *Trichoderma* species associated with *Acromyrmex* ant nests from Argentina and first report of *Trichoderma* lentiforme for the country. *Darwiniana*, nueva serie 5(1): 72-82. doi:10.14522/darwiniana.2017.51.724
- Arrieta, O., Rivera, A., Arias, L., Rojano, B., Ruiz, O., y Cardona, S., (2012). Biorremediación de un suelo con diesel mediante el uso de microorganismos autóctonos. *Gestión y Ambiente*, 15(1). 27-39. Recuperado de: http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://www.redalyc.org/pdf/1694/Resumenes/Abstract_169424101004_2.pdf
- Atagana, H. I. (2009). Biodegradation of PAHs by fungi in contaminated-soil containing cadmium and nickel ions. *African Journal of Biotechnology*, 8(21): 5780-5789. doi: 10.5897/AJB2009.000-9465
- Ávila, C., Goretti, M., y Lizcano, R. (2014). Aislamiento de *Trichoderma* sp., en las unidades productivas agrícolas del centro de formación agroindustrial La Angostura de Campo alegre (Huila). *Agropecuaria y agroindustrial La Angostura*, 1(1).15-20. Recuperado de: <http://revistas.sena.edu.co/index.php/raaa/article/view/145/166>
- Barranzuela, Y. (2016). *Crecimiento de Trichoderma sp., utilizando como sustrato metamidofos en condiciones de laboratorio*. (Tesis pregrado). Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú.
- Benavides, E. (2017). *Desarrollo de un bioproceso para la conservación de cepas nativas de Trichoderma spp., a partir de la biodiversidad fúngica ecuatoriana* (Tesis Postgrado). Universidad Técnica del Norte. Ibarra, Ecuador.

- Benavides, J., Quintero, G., Guevara, A., Jaimes, D., Gutiérrez, D., y García, J., (2006). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova – Publicación científica* vol. 4 n° 5. Recuperado de: <http://www.unicolmayor.edu.co/publicaciones/index.php/nova/article/view/60/118>
- Benites, C., y Marroquín, L. (2015). Producción de *Trichoderma Harzianum* en diferentes sustratos orgánicos. *Portal de la Ciencia*, 4, 68-74. Recuperado de: <https://www.lamjol.info/index.php/PC/article/view/1864>
- Bisset, J. (1991a). A revision of the genus *Trichoderma* II (review). *Infragenric classification Canadian. J. Bot.* 69:2357-2372. doi: 10.1139 / b91-297
- Bisset, J. (1991b). A revision of the genus *Trichoderma* III (review). *Sect. Pachybasium. Canadian J. Bot.* 69:2373-2417 doi: 10.1139 / b91-298
- Caiza, V. (2013). *Colección, identificación y pruebas de eficacia in vitro de (Trichoderma sp). en el control biológico de (Botrytis cinerea) en la finca florícola picasso roses.* (Tesis de pregrado) Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito. Quito, Ecuador.
- Carrión, J. (2014). Procesos de fabricación de productos plásticos. *Industrial Data*, 3(1), 06-08.
- Carvajal. (2016). PVC: tendencias y oportunidades para la industria de América Latina. *Tecnología del plástico*, 4. Recuperado de <http://www.plastico.com/temas/PVC,-tendencias-y-oportunidades-para-la-industria-de-America-Latina+3033031>
- Castañeda, L. (2014). *Evaluación de diferentes medios de cultivo para la producción masiva del inóculo de" Pyricularia grisea"* (Tesis de Pregrado).Universidad de Guayaquil. Guayaquil, Ecuador.
- Castro, Á., y Rivillas, C. (2012). *Trichoderma spp. Modos de acción, eficacia y usos en el cultivo de café*, 5-7. Chinchina-Caldas, Colombia: Cenicafé.
- Castro, D. (2017). *Biorremediación de agua contaminada por diesel y petróleo empleando un microbioma y sustancias húmicas* (Tesis de Pregrado). Instituto Politécnico Nacional. Mexico.
- Chaverri, P., Branco, F., Jaklitsch, W., Gazis, R., Degenkolb, T., y Samuels, G. J. (2015). Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*, 107(3), 558-590. doi:10.3852/14-147
- Cobas, M. (2016). *Aplicación de técnicas físico-químicas y microbiológicas para la degradación de contaminantes* (Tesis Doctoral). Universidad de Vigo. Pontevedra, España.
- Cobas, M., Ferreira, L., Tavares, T., Sanromán, M. A., y Pazos, M. (2013). Development of permeable reactive biobarrier for the removal of PAHs by *Trichoderma longibrachiatum*. *Chemosphere*, 91(5), 711-716. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.01.028

- Cruz, H., Calleja, P., Herrera., Marín, A., Medinilla, E., Salinas, R., y Toledo, P. (2016). Biorremediación de suelos contaminados con aceite automotriz usados mediante sistema de biopilas. Recuperado de: <http://www.espacioimasd.unach.mx/articulos/num12/pdf/biorremediacion.pdf>
- Cruz, Y. (2013). *Saneamiento de aguas someras y subterráneas contaminadas con hidrocarburos del petróleo* (Tesis de Maestría). Instituto Politécnico Nacional. México.
- Cuan, A. G., Buelvas, A. M., y Cobos, J. F. L. (2017). Aislamiento e Identificación de Hongos filamentosos tolerantes a aceites dieléctricos usados y PCB's de suelos contaminados. *Biociencias*, 12(1), 25-30. Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6228785>
- De salud Pública-Cobre, R. (2014). Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (ATSDR)
- Del Ángel, L., y Itzel, D. I. (2013). *Tecnologías para la restauración de suelos contaminados por hidrocarburos*. Veracruz. (Tesis de Pregrado) Universidad Veracruzana. México.
- Deshmukh, R., Khardenavis, A. A., y Purohit, H. J. (2016). Diverse metabolic capacities of fungi for bioremediation. *Indian journal of microbiology*, 56(3), 247-264. doi: 10.1007 / s12088-016-0584-6
- España, C. (2015). *Aislamiento, caracterización y evaluación de Trichoderma spp., como promotor de crecimiento vegetal en pasturas de raygrass (Lolium perenne) y trébol blanco (Trifolium repens) en la hacienda La Alegría cantón Pedro Moncayo* (Tesis de Pregrado). Universidad Politécnica Salesiana. Quito, Ecuador.
- Fernández de Córdova, I., y Humbser, J. (2014). *Evaluación de la toxicidad del suelo durante y después de un proceso de biorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs* (Tesis de Pregrado). Universidad Politécnica Salesiana. Cuenca, Ecuador.
- Flores, V. (2015). *Determinación del efecto antagónico de Cepas Nativas de Trichoderma spp., frente a Mycosphaerella fijiensis en plantas de banano a nivel de invernadero* (Tesis de Pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador.
- Fuentes, A., García, E., y Fernández, I. (2015). *Procedimiento de extracción en fase sólida dispersiva QuEChERS para el análisis de plaguicidas*. Universidad Politécnica de Valencia. España. Recuperado de: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/51363/Extracci%C3%B3n%20PSE%20QuEChERS.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Gaanappriya, M., Guhankumar, P., Balakrishnan, V. (2011). Isolation of xylan degrading enzyme from *Trichoderma spp.* *Research in Plant Biology*. 1(3). 15–20. Recuperado de: <http://updatepublishing.com/journal/index.php/ripb/article/view/2578/2556>

- Gillespie, I., y Philip, J. (2013) Bioremediation, an environmental remediation technology for the bioeconomy. *Trends in Biotechnology*. 31(6). 329-332 doi:10.1016/j.tibtech.2013.01.015
- Gómez, T. (2017). *Evaluación de diferentes medios de cultivo y condiciones para la producción de conidios de TRICHODERMA SPP mediante fermentación en líquido y sólido* (Tesis de Pregrado). Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica.
- Haro, K., G. (2017). *Determinación y Caracterización de la enzima Manganese Peroxidasa presente en Pleurotus ostreatus y determinación del gen regulador de Hemicelulasas en Trichoderma pleuroti presente en extractos enzimáticos de paja de trigo. Interacción entre ambas especies* (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, España.
- Harrigan, W. F., y McCance, M. E. (2014). *Laboratory methods in microbiology*. London And New York. Academic press.
- Howell C. (2003) Mechanisms employed by Trichoderma species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*. 87(1). 4-10. doi: 10.1094/PDIS.2003.87.1.4
- Izquierdo R., (2014). *Biodegradación de HAPs durante la biorremediación aeróbica de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo. Análisis de poblaciones bacterianas y genes funcionales*. (Tesis Doctoral). Universidad de Barcelona. Barcelona, España.
- Jimenez, P., y Pantoja, V. (2013). *Diseño y construcción de un fermentador rotatorio de fase sólida para la multiplicación del hongo Trichoderma sp* (Tesis de Pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador.
- Kumar, A., Govil, M., Singh, S., Sharma, K. K., Tripathi, S. K., Tiwari, R. K., y Singh, S. (2015). Role of Micro-Organisms in Bioremediation: A Comprehensive Model Using Trichoderma spp. *Handbook of research on uncovering new methods for ecosystem management through bioremediation*. doi:10.4018/978-1-4666-8682-3.ch002
- Lee, H., Jang, Y., Choi, Y. S., Kim, M. J., Lee, J., Lee, H., y Kim, J. J. (2014). Biotechnological procedures to select white rot fungi for the degradation of PAHs. *Journal of microbiological methods*, 97, 56-62. doi:10.1016/j.mimet.2013.12.007
- Lee, L. S., Hagwall, M., Delfino, J. J., y Rao, P. S. C. (1992). Partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons from diesel fuel into water. *Environmental science & technology*, 26(11), 2104-2110. doi:10.1021/es00035a005
- Loayza, M. F. (2017). *Eficiencia degradativa de tres especies de hongos benéficos Aspergillus Niger, Thichoderma Harzianum y Paecilomyces Lilacinus sobre suelos contaminados con petróleo en la parroquia San Carlos del cantón Joya de los Sachas* (Tesis de Pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador.

- Lozano, F., y Riesco, J. (2017). Análisis Cromatográfico De Combustibles Obtenidos A Partir De Desechos Plásticos. *Jóvenes En La Ciencia*, 2(1), 1155-1158. Recuperado de: <http://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/download/1195/822>
- Maroto, M., y Rogel, J. (2013). Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos. *GEOCISA. Div. Protección Ambiental de Suelos*, 297-305.
- Martínez, B., Infante, D., & Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp., y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*, 28(1), 1-11. Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522013000100001&script=sci_arttext&tlng=en
- Martínez, B., Infante, D., y Peteira, B. (2015). Taxonomía polifásica y variabilidad en el género *Trichoderma*. *Revista de Protección Vegetal*, 30. 11-22. Recuperado de: <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v30s1/rpv004s15.pdf>
- Meneses, R. (2014). *Biorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs en microcosmos a suelo abierto* (Tesis de Pregrado). Universidad Politécnica Salesiana. Cuenca, Ecuador.
- Mishra A y Malik A. (2014). Novel fungal consortium for bioremediation of metals and dyes from mixed waste stream. *Bioresource Technology*, 171, 217–226. doi:10.1016/j.biortech.2014.08.047
- Moore-Landecker, E. (1972). *Fundamentals of the fungi*. Estados Unidos: Prentice Hall.
- Muñoz, D. (2016). *Evaluación de la eficacia de Trichoderma sp y Pseudomona sp para biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos* (Tesis de Pregrado). Universidad Politécnica Salesiana. Quito, Ecuador.
- Ortiz, N. (2017). *Biofertilización con cepas de Trichoderma sp sobre el crecimiento y nutrición de quinua (Chenopodium quinoa Willd) var. salcedo INIA en condiciones de invernadero* (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional del Altiplano. Puno, Perú.
- Padilla, C. P., Arévalo, D. X., Bustamante, M. A., y Vidal, C. L. (2017). Responsabilidad Social Empresarial y Desempeño Financiero en la Industria del Plástico en Ecuador. *Información tecnológica*, 28(4), 93-102. Recuperado de: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0718-07642017000400012&script=sci_arttext&tlng=pt
- Peraza, W., Orozco, M., y Esquivel, A. (2014). Evaluación in vitro de hongos nematófagos en zonas arroceras de Costa Rica contra el nematodo agallador *Meloidogyne javanica*. *Agronomía costarricense: Revista de ciencias agrícolas*, 38(2), 19-32. Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5018179.pdf>

- Pesántez, M., y Castro, R. (2016). Potencial de cepas de *Trichoderma* spp., para la biorremediación de suelos contaminados con petróleo. *Biotecnología Vegetal*, 16(4) Recuperado de: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/download/541/1368>
- Petit, K., Colina, J., Yegres, F., Moran, H., & Richard-Yegres, N. (2013). Biodegradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) por hongos aislados de aguas contaminadas con petróleo, podredumbre blanca, y acíbar de Aloe vera. *Química Viva*, 12(3). Recuperado de: <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v12n3/petit.pdf>
- Pinedo-Rivilla, C., Aleu, J., Collado, I.G., (2009). Pollutants biodegradation by fungi, *Current Organic Chemistry*. 13, 1194-1214. doi: 10.2174 / 138527209788921774
- Poalacin J. M., (2015). *Estudio del adecuado crecimiento del hongo Trichoderma Harzianum y Trichoderma Hamatum en sustrato sólido* (Tesis de Pregrado). Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador.
- Roselló, J. (2003). *Capacidad antagonista de Penicillium oxalicum Currie & Thom y Trichoderma harzianum Rifai frente a diferentes agentes fitopatógenos: Estudios ecofisiológicos*. (Tesis Doctoral). Universidad Politécnica de Valencia. España.
- Singh, A., Pandey, S., Srivastava, M., Shahid, M., Kumar, V., Trivadi, S., y Ratan, V. (2015). Phy siological and biochemical analysis of *Trichoderma* species isolated from different location UP. *African Journal of Agricultural Research*, 10(53), 4837-4843. doi: 10.5897/AJAR2015.10374
- Singh, A., Shahid, M., Srivastava, M., Pandey, S., Sharma, A, y Kumar, V. (2014). Optimal physical parameters for growth of *Trichoderma* species at varying pH, temperature and agitation. *Virology and Mycology*, 3(1), 1-7. doi:10.4172/2161-0517.1000127
- Solanas, A. (2009). La biodegradación de hidrocarburos y su aplicación en la biorremediación de suelos. *Estudios en la zona no saturada del suelo*, 9.
- Speight, J. (2015). *Handbook of Petroleum Product Analysis, 2nd Edition*. Laramie, Estados Unidos: Mark F. Vitha, Series Editor.
- Sugiura, K., Ishihara, M., Shimauchi, T., y Harayama, S. (1996). Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. *Environmental science & technology*, 31(1), 45-51. doi: 10.1021/es950961r
- Szczepaniak, Z., Cyplik, P., Juzwa, W., Czarny, J., Staninska, J., & Piotrowska-Cyplik, A. (2015). Antibacterial effect of the *Trichoderma viride* fungi on soil microbiome during PAH's biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 104, 170-177. doi: 10.1016/j.ibiod.2015.06.002
- Tripathi, P., Singh, P. C., Mishra, A., Chauhan, P. S., Dwivedi, S., Bais, R. T., & Tripathi, R. D. (2013). *Trichoderma*: a potential bioremediator for environmental clean up. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 15(4), 541-550. doi: 10.1007 / s10098-012-0553-7

- Tyagi, M., y Fonseca, M. (2011). Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes (review). *Springer Science*, 22 (2), 231-241 doi: 10.1007/s10532-010-9394-4
- Vallejo, M. (2014). *Caracterización y clasificación de trichodermas nativos aplicando diferentes medios de cultivo a nivel de laboratorio artesanal* (Tesis de Maestría). Universidad Técnica de Ambato. Ambato, Ecuador.
- Vásquez M. C., Guerrero Figueroa, J. T., del Pilar Quintero, A. (2010) Biorremediación de lodos contaminados con aceites lubricantes usados. *Revista Colombiana Biotecnológica*, 12(1), 141. Recuperado de: <https://search.proquest.com/openview/79eb18ecf474dcefbee2a50974f3904/1?pq-origsite=gscholar&cbl=2035764>
- Zafra G, Cortés-Espinosa D. (2015) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Trichoderma* species: a mini review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22 (24):19426–19433; doi: 10.1007/s11356-015-5602-4

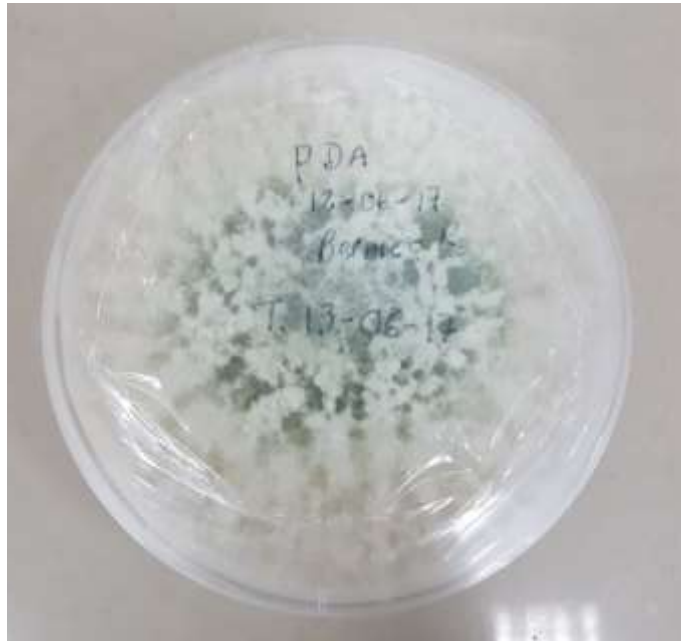
ANEXOS

Anexo 1. Área total bajo la curva de las diferentes muestras analizadas por CG.

Código	Área bajo la Curva
CMCP	1121441086
MMCP ₁	577589781
MMCP ₂	639794000
MMCP ₃	300406616
CMC1.10	1209264855
MMC1.10 ₁	618098016
MMC1.10 ₂	153884424
MMC1.10 ₃	249673882
CMC1.100	996138380
MMC1.100 ₁	128478221
MMC1.100 ₂	314543481,5
MMC1.100 ₃	500608742
CPCP	1686463513
MPCP ₁	285571782
MPCP ₂	435108427
MPCP ₃	319745399
CPC1.10	1512277551
MPC1.10 ₁	100902292
MPC1.10 ₂	186407071
MPC1.10 ₃	271911850
CPC1.100	1425736888
MPC1.100 ₁	202782688
MPC1.100 ₂	162741882
MPC1.100 ₃	122701075

Anexo 2. *Valores promedio de pH registrados durante el proceso de degradación del contaminante por Trichoderma sp.*

Código	pH
CMCP	5,5
MMCP ₁	6,7
MMCP ₂	6,2
MMCP ₃	6,5
CMC1.10	5,5
MMC1.10 ₁	6,6
MMC1.10 ₂	6,7
MMC1.10 ₃	6,5
CMC1.100	5,5
MMC1.100 ₁	6,7
MMC1.100 ₂	6,6
MMC1.100 ₃	6,6
CPCP	5,5
MPCP ₁	4,5
MPCP ₂	4,9
MPCP ₃	4,7
CPC1.10	5,5
MPC1.10 ₁	4,4
MPC1.10 ₂	3,4
MPC1.10 ₃	4,9
CPC1.100	5,5
MPC1.100 ₁	4,8
MPC1.100 ₂	4,7
MPC1.100 ₃	4,8



Anexo 3: Hongo *Trichoderma* sp., en su cuarto día de desarrollo en medio de cultivo PDA.

Fuente: Autor.



Anexo 4: Preparación de materiales para lavado de esporas de *Trichoderma* sp., en cámara de flujo laminar.

Fuente: Autor.



Anexo 5: Frascos con medio de cultivo líquido de papa y melaza.

Fuente: Autor.



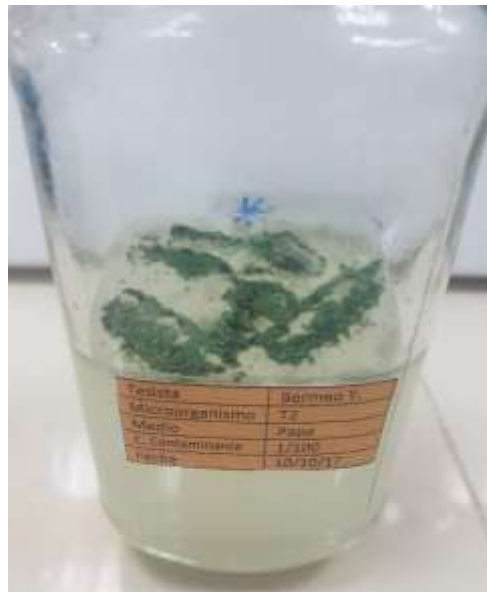
Anexo 6: Frascos con medio de cultivo líquido de melaza-contaminante-
microorganismo.

Fuente: Autor.



Anexo 7: Frascos con: medio de cultivo líquido de papa-contaminante-
microorganismo.

Fuente: Autor.



Anexo 8: Crecimiento de *Trichoderma* sp., en frasco con el contaminante en
concentración 1/100 a los 15 días de iniciado el proceso.

Fuente: Autor.



Anexo 9: Crecimiento de *Trichoderma* sp., en medio líquido de melaza con el contaminante en concentración 1/100 a los 15 días de iniciado el proceso.

Fuente: Autor.