



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS PUEBLA

POSTGRADO EN ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

**EFFECTO DEL ANTRACENO SOBRE EL CRECIMIENTO *IN VITRO*
DEL MOHO VERDE (*Trichoderma spp.*) Y SU POTENCIAL PARA
DESARROLLAR ESTRATEGIAS DE BIORREMEDIACIÓN *IN SITU***

PAOLA CORTÉS MIRANDA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PUEBLA, PUEBLA

2015



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
CAMPECHE-CÓRDOBA-MONTECILLO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TABASCO-VERACRUZ

SUBDIRECCIÓN DE EDUCACIÓN
CAMPUS PUEBLA

CAMPUE- 43-2-03

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, la que suscribe **Paola Cortés Miranda**, alumna de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección del Profesor **Dr. Porfirio Morales Almora** por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **Efecto del antraceno sobre el crecimiento *in vitro* del moho verde (*Trichoderma spp.*) y su potencial para desarrollar estrategias de biorremediación *in situ***, y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, el Consejero y la que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Puebla, Puebla, a 26 de Noviembre de 2015

Paola Cortés Miranda

Vo. Bo. Profesor Consejero
Dr. Porfirio Morales Almora

La presente tesis, titulada: **Efecto del antraceno sobre el crecimiento *in vitro* del moho verde (*Trichoderma spp.*) y su potencial para desarrollar estrategias de biorremediación *in situ***, realizada por la alumna: **Paola Cortés Miranda**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. PORFIRIO MORALES ALMORA

ASESOR:



DR. DANIEL CLAUDIO MARTÍNEZ CARRERA

ASESORA:



DRA. MERCEDES SOBAL CRUZ

ASESOR:



DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ ROSAS

Puebla, Puebla, a 26 de noviembre de 2015

EFFECTO DEL ANTRACENO SOBRE EL CRECIMIENTO *IN VITRO* DEL
MOHO VERDE (*Trichoderma* spp.) Y SU POTENCIAL PARA
DESARROLLAR ESTRATEGIAS DE BIORREMEDIACIÓN *IN SITU*

Paola Cortés Miranda, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015

En el presente estudio se evaluó el efecto del antraceno y del ácido acetil salicílico (AAS) en el crecimiento *in vitro* de tres cepas de diferentes especies de *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. aggressivum* f. *aggressivum*, *T. atroviride*), aisladas de cultivos de substratos de diversos hongos comestibles. Se utilizaron tres concentraciones de antraceno (0.4 g, 0.8 g y 1.6 g) adicionando en cada caso AAS (100 μ M) al medio de cultivo de agar papa y dextrosa (PDA). A la par se elaboró un control que consistió en medio de cultivo PDA, y el testigo de PDA más AAS (100 μ M). Se determinó la velocidad de crecimiento, el área de la colonia, la producción de esporas y la actividad volumétrica de enzimas lacasas. Las tres cepas de *Trichoderma* fueron capaces de crecer en las condiciones estudiadas. En cuanto al área de la colonia, no se presentaron cambios significativos entre cada una de las cepas, lo mismo ocurrió en la velocidad de crecimiento, aunque se observaron variaciones en el tiempo para colonizar completamente la caja de Petri. La producción de espora disminuyó por la concentración más alta de antraceno (1.6 g) obteniéndose en la cepa CPM-108 (*T. harzianum*) una concentración de 1.5×10^6 esporas mL^{-1} , mientras que en el testigo se registraron 2.6×10^6 esporas mL^{-1} ; a los 7 días de colonización completa (CC); en la cepa CPM-121 (*T. atroviride*) se observaron 6.1×10^5 esporas mL^{-1} , a los 9 días de colonización completa (CC), mientras que el testigo produjo 1.8×10^6 esporas mL^{-1} ; y en la cepa CPM-113 (*T. aggressivum* f. *aggressivum*) se contaron 3.5×10^5 esporas mL^{-1} , en comparación con el conteo del testigo que fue de 6.0×10^5 esporas mL^{-1} , a los 12 días de colonización completa (CC). La más alta actividad volumétrica de lacasas se obtuvo en el tratamiento 3 (1.6 g de antraceno + AAS 100 μ M) en las cepas CPM-121 de *T. atroviride* con 0.85 U mL^{-1} así como en la cepa CPM-113 de *T. aggressivum* f. *aggressivum* con 0.63 U mL^{-1} . En la cepa CPM-108 de *T. harzianum* la actividad fue de sólo 0.04 U mL^{-1} . Los resultados de la presente investigación muestran el potencial de *Trichoderma* para desarrollar estrategias de biorremediación *in situ*.

Palabras clave: Antraceno, biorremediación, lacasas, *Trichoderma*

ANTHRACENE EFFECT ON THE *IN VITRO* GROWTH OF THE GREEN MOLD (*Trichoderma* spp.) AND ITS POTENTIAL TO DEVELOP *IN SITU* BIOREMEDIATION STRATEGIES

Paola Cortes Miranda, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2015

In the present study the effect of anthracene and acetylsalicylic acid (ASA) in the growth *in vitro* of three strains of different species of *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. aggressivum* f. *aggressivum* and *T. atroviride*) isolated from different mushroom substrates was evaluated. Three anthracene concentrations (0.4 g, 0.8 g and 1.6 g) plus acetylsalicylic acid (ASA) 100 μM was added to the culture medium PDA. At the same time, a control consisted in PDA culture medium plus acetylsalicylic acid (ASA) 100 μM was prepared. Growth rate, colony area, spore production and enzymatic activity of laccase were analyzed. The three strains of *Trichoderma* were able to grow in all conditions. In the area of the colony, no changes between each of the strains or the rate of growth was observed, the only effect that can be seen in the four treatments, it was time to colonize completely the Petri dish. Spore production was affected by the higher concentration of anthracene (1.6 g) in the strain CPM-108 (*T. harzianum*) where a concentration of 1.5×10^6 spores mL^{-1} was obtained compared to the control with 2.6×10^6 spores mL^{-1} in the day 7 of colonization; for the strain CPM -121 (*T. atroviride*) 6.1×10^5 spores mL^{-1} for the highest concentration of anthracene (1.6 g) were observed, whereas the control produced 1.8×10^6 spores mL^{-1} in the day 9 of colonization, and in the case of the CPM-113 (*T. aggressivum* f. *aggressivum*) 3.5×10^5 spores mL^{-1} were obtained in the concentration of 1.6 g of anthracene, compared to the control with 6.0×10^5 spores mL^{-1} in the day 12 of colonization. The higher volumetric activity of laccases was obtained in treatment 3 (1.6 g anthracene + ASA 100 μM) in the strain CPM-121 of *T. atroviride* with 0.85 U mL^{-1} and in the strain CPM-113 of *T. aggressivum* f. *aggressivum* with 0.63 U mL^{-1} , while for the strain CPM-108 of *T. harzianum* the activity was lower with 0.04 U mL^{-1} . The results of this research show the potential of *Trichoderma* to develop strategies for *in situ* bioremediation.

Keywords: Anthracene, bioremediation, laccases, *Trichoderma*.

Agradecimientos

Al pueblo de México a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haber financiado mis estudios de Maestría en el Colegio de Postgraduados, *Campus Puebla*.

A mi familia que es lo más grande que Dios a me ha dado, por su apoyo moral y espiritual, que de una u otra forma estuvieron a mi lado para lograr y alcanzar mi meta. Gracias por su comprensión y amor.

A la Línea Prioritaria de Investigación 5, Biotecnología Microbiana Vegetal y Animal, por brindarme parte de los insumos que utilicé durante la realización de este trabajo de investigación.

A mi consejo particular integrado por el Dr. Porfirio Morales Almora, Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera, Dra. Mercedes Sobal Cruz y Dr. Francisco Rosas Hernández, por confiar en mí y por la oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales. Siempre les agradeceré el apoyo brindado para poder concluir con mi trabajo de Tesis.

A los integrantes del Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales, académicos y alumnos, por su apoyo durante mi estancia de investigación.

CONTENIDO

	Páginas
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO CONCEPTUAL	3
2.1. Contaminación por petróleo en México.....	3
2.2. Contaminación de suelos agrícolas.....	4
2.3. Principales contaminantes derivados del petróleo.....	5
2.4. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP).....	6
2.5. Biorremediación.....	7
2.6. Organismos usados en la biorremediación.....	9
2.7. Biorremediación por hongos.....	10
2.8. El género <i>Trichoderma</i>	11
2.9. Actividad enzimática en <i>Trichoderma</i>	17
2.10. Lacasas.....	17
2.11 El ácido acetil salicílico.....	19
III. MARCO DE REFERENCIA	21
3.1. Biorremediación del suelo con hongos filamentosos.....	21
3.2. Actividad enzimática de <i>Trichoderma</i>	22
3.3. Producción de esporas por <i>Trichoderma</i>	22
IV. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	23
V. HIPÓTESIS	24
VI. OBJETIVO GENERAL	24
6.1. Objetivos particulares.....	24
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	25
7.1. Material biológico.....	26
7.2. Obtención del inóculo.....	26
7.3. Condiciones experimentales.....	26
7.3.1. Esterilización del papel celofán y antraceno.....	26
7.3.2. Preparación del experimento.....	27
7.3.3. Inoculación de las cajas Petri.....	27
7.3.4. Muestreo.....	28
7.4. Cinética de crecimiento.....	29
7.4.1. Velocidad de crecimiento y área de la colonia.....	29
7.4.2. Esporulación de las cepas de <i>Trichoderma</i>	31
7.5. Determinación de la actividad volumétrica de lacasas.....	32
7.6. Análisis estadístico.....	34
VIII. RESULTADOS	35

8.1.	Morfología de las colonias.....	35
8.1.1.	CPM-108 de <i>T. harzianum</i>	35
8.1.2.	CPM-121 de <i>T. atroviride</i>	36
8.1.3.	CPM-113 de <i>T. aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	36
8.2.	Área de crecimiento de las cepas.....	37
8.2.1.	CPM-108 de <i>T. harzianum</i>	37
8.2.2.	CPM-121 de <i>T. atroviride</i>	38
8.2.3.	CPM-113 de <i>T. aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	39
8.3.	Velocidad de crecimiento de las cepas.....	40
8.3.1.	CPM-108 de <i>T. harzianum</i>	40
8.3.2.	CPM-121 de <i>T. atroviride</i>	41
8.3.3.	CPM-113 de <i>T. aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	42
8.4.	Producción de esporas.....	43
8.4.1.	CPM-108 de <i>T. harzianum</i>	43
8.4.2.	CPM-121 de <i>T. atroviride</i>	46
8.4.3.	CPM-113 de <i>T. aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	48
8.5.	Actividad volumétrica de lacasas.....	51
8.5.1.	CPM-108 de <i>T. harzianum</i>	51
8.5.2.	CPM-121 de <i>T. atroviride</i>	52
8.5.3.	CPM-113 de <i>T. aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	53
IX.	DISCUSIÓN	56
X.	CONCLUSIONES	59
XI.	PROPUESTA DE ESTRATEGIA PARA BIORREMEDIACIÓN <i>IN SITU</i> UTILIZANDO <i>TRICHODERMA SPP.</i>	60
11.1.	Introducción.....	60
11.2.	Actores sociales.....	62
11.3.	Objetivos estratégicos y específicos.....	63
XII.	LITERATURA CITADA	65
XIII.	ANEXOS	75

LISTA DE FIGURAS

		Páginas
Figura 1.	Estructura química del antraceno.....	7
Figura 2.	Conidios y conidióforos de <i>Trichoderma</i> spa. (400x).....	12
Figura 3.	Papel de la enzima lacasa oxidando sustratos no habituales por la acción de los mediadores redox (A), y los potenciales redox de las reacciones de oxidación de ABTS y HBT por lacasa (B). (Kunamneni, 2007).....	19
Figura 4.	Metodología general de la investigación realizada en el presente estudio.....	25
Figura 5.	Ubicación del inóculo de las cepas de <i>Trichoderma</i> . Cajas con las tres concentraciones de antraceno (arriba), caja testigo y caja blanco (abajo). Control= PDA. Testigo= PDA+AAS 100µM. Tx1= 0.4 g. + AAS 100µM. Tx2= 0.8 g. + AAS 100µM. Tx3= 1.6 g. + AAS 100µM.....	28
Figura 6.	Diagrama para conteo de esporas en la cámara de Neubauer para determinar la concentración de esporas por mL.....	31
Figura 7.	Retícula de la cámara de Neubauer para determinar la concentración de esporas por mL. A) Suspensión de esporas. B) Cuadrantes. C) Donde se realizó el conteo (Ramírez, 2006).....	32
Figura 8.	Determinación de la actividad de lacasas por el método de Bourbonnais <i>et al.</i> (1998) en microplaca.....	34
Figura 9.	Área de crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> (CPM-108) en medio de cultivo PDA. Control= PDA. Testigo= AAS 100 µM. Tx1= 0.4 g + AAS 100 µM. Tx2= 0.8 g + AAS 100 µM. Tx3= 1.6 g + AAS 100 µM (Tx3). (n= 3).....	38
Figura 10.	Área de crecimiento de <i>Trichoderma atroviride</i> (CPM-121) en medio de cultivo PDA. Control= PDA. Testigo= AAS 100 µM. Tx1= 0.4 g + AAS 100 µM. Tx2= 0.8 g + AAS 100 µM. Tx3= 1.6 g + AAS 100 µM (Tx3). (n= 3).....	39
Figura 11.	Área de crecimiento de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (CPM-113) en medio de cultivo PDA. Control= PDA. Testigo= AAS 100 µM. Tx1= 0.4 g + AAS 100 µM. Tx2= 0.8 g + AAS 100 µM. Tx3= 1.6 g + AAS 100 µM (Tx3). (n= 3).....	40
Figura 12.	Velocidad de crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> (CPM-108) en medio de cultivo PDA. Control= PDA. Testigo= AAS 100 µM. Tx1= 0.4 g + AAS 100 µM. Tx2= 0.8 g + AAS 100 µM. Tx3= 1.6 g + AAS 100 µM (Tx3). (n= 3).....	41
Figura 13.	Velocidad de crecimiento de <i>Trichoderma atroviride</i> (CPM-121) en medio de cultivo PDA. Control= PDA. Testigo= AAS 100 µM. Tx1= 0.4 g + AAS 100 µM. Tx2= 0.8 g + AAS 100 µM. Tx3= 1.6 g + AAS 100 µM (Tx3). (n= 3).....	42

Figura 14.	Velocidad de crecimiento de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (CPM-113) en medio de cultivo PDA. Control= PDA. Testigo= AAS 100 μ M. Tx1= 0.4 g + AAS 100 μ M. Tx2= 0.8 g + AAS 100 μ M. Tx3= 1.6 g + AAS 100 μ M (Tx3). (n= 3).....	43
Figura 15.	Producción de esporas por mL de la colonia de las cepa: CPM-108 <i>Trichoderma harzianum</i> . Control= PDA. Testigo= AAS 100 μ M. Tx1= 0.4 g + AAS 100 μ M. Tx2= 0.8 g + AAS 100 μ M. Tx3= 1.6 g + AAS 100 μ M. AC= 3días. DC= 5 días. CC= 7 días. Las barras de error muestran la desviación estándar (n= 3).....	44
Figura 16.	Muestreo de la cepa de <i>Trichoderma harzianum</i> (CPM-108) en medio de cultivo PDA para la producción de esporas y actividad enzimática. Control= PDA. Testigo= PDA+AAS 100 μ M. Tx1= 0.4 g. + AAS 100 μ M. Tx2= 0.8 g. + AAS 100 μ M. Tx3= 1.6 g. + AAS 100 μ M. AC=3 días de incubación. DC=5 días de incubación. CC=7 días de incubación.....	45
Figura 17.	Producción de esporas por mL de la colonia de las cepa: CPM-121 <i>Trichoderma atroviride</i> . Control= PDA. Testigo= AAS 100 μ M. Tx1= 0.4 g + AAS 100 μ M. Tx2= 0.8 g + AAS 100 μ M. Tx3= 1.6 g + AAS 100 μ M. AC= 3días. DC= 5 días. CC= 7 días. Las barras de error muestran la desviación estándar (n= 3).....	46
Figura 18.	Muestreo de la cepa de <i>Trichoderma atroviride</i> (CPM-121) en medio de cultivo PDA para la producción de esporas y actividad enzimática. Control= PDA. Testigo= PDA+AAS 100 μ M. Tx1= 0.4 g. + AAS 100 μ M. Tx2= 0.8 g. + AAS 100 μ M. Tx3= 1.6 g. + AAS 100 μ M. AC= 5 días de incubación. DC= 7 días de incubación. CC= 9 días de incubación.....	47
Figura 19.	Producción de esporas por mL de la colonia de las cepa: CPM-113 <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> . Control= PDA. Testigo= AAS 100 μ M. Tx1= 0.4 g + AAS 100 μ M. Tx2= 0.8 g + AAS 100 μ M. Tx3= 1.6 g + AAS 100 μ M. AC= 9 días. DC= 11 días. CC= 12 días. Las barras de error muestran la desviación estándar (n= 3).....	48
Figura 20.	Muestreo de la cepa de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (CPM-113) en medio de cultivo PDA para producción de esporas y actividad enzimática. Control= PDA. Testigo= PDA+AAS 100 μ M. Tx1= 0.4 g. + AAS 100 μ M. Tx2= 0.8 g. + AAS 100 μ M. Tx3= 1.6 g. + AAS 100 μ M. AC= 9 días de incubación. DC= 11 días de incubación. CC= 12 días de incubación.....	49
Figura 21.	Actividad volumétrica de lacasas de la cepa CPM-108 <i>Trichoderma harzianum</i> . T0= Tiempo cero. AC= Antes del contacto del micelio con el antraceno. DC= Después del contacto del micelio con el antraceno. CC= Colonización completa de la colonia en presencia del antraceno. Control= PDA. Testigo= AAS 100 μ M. Tx1= 0.4 g + AAS 100 μ M. Tx2= 0.8 g + AAS 100 μ M. Tx3= 1.6 g + AAS 100 μ M. Las barras de error muestran la desviación estándar (n= 3)....	52

Figura 22.	<p>Actividad volumétrica de lacasas de la cepa CPM-121 <i>Trichoderma atroviride</i>. T0= Tiempo cero. AC= Antes del contacto del micelio con el antraceno. DC= Después del contacto del micelio con el antraceno. CC= Colonización completa de la colonia en presencia del antraceno. Control= PDA. Testigo= AAS 100 µM. Tx1= 0.4 g + AAS 100 µM. Tx2= 0.8 g + AAS 100 µM. Tx3= 1.6 g + AAS 100 µM. Las barras de error muestran la desviación estándar (n= 3)....</p>	53
Figura 23.	<p>Actividad volumétrica de lacasas de la cepa CPM-113 <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>. T0= Tiempo cero. AC= Antes del contacto del micelio con el antraceno. DC= Después del contacto del micelio con el antraceno. CC= Colonización completa de la colonia en presencia del antraceno. Control= PDA. Testigo= AAS 100 µM. Tx1= 0.4 g + AAS 100 µM. Tx2= 0.8 g + AAS 100 µM. Tx3= 1.6 g + AAS 100 µM. Las barras de error muestran la desviación estándar (n= 3).....</p>	54
Figura 24.	<p>Actores principales de la problemática de suelos agrícolas contaminados con hidrocarburos.....</p>	63

LISTA DE CUADROS

		Páginas
Cuadro 1.	Clasificación de hidrocarburos en función de su densidad API. (PEMEX, 2013.).....	5
Cuadro 2.	Propiedades fisicoquímicas de 16 contaminantes prioritarios de hidrocarburos aromáticos policíclicos de la USEPA de Estados Unidos (ATSDR, 2005).....	6
Cuadro 3.	Capacidad de degradación de hidrocarburos saturados y aromáticos presentes en el aceite combustible que tienen algunas especies del género <i>Trichoderma</i> (Chaîneau <i>et al.</i> , 1999).....	15
Cuadro 4.	Capacidad de degradación de benzo[α]pireno por algunas especies de hongos (Verdín <i>et al.</i> , 2004).....	16
Cuadro 5.	Cepas de <i>Trichoderma</i> utilizadas en el presente estudio y depositadas en la UREGENHCFyM.....	26
Cuadro 6.	Cinética de muestras.....	28
Cuadro 7.	Caracterización de la morfología del crecimiento micelial.....	29
Cuadro 8.	Caracterización morfológica de las colonias de la cepa CPM-108 de <i>Trichoderma harzianum</i> , cultivada en las diferentes condiciones.....	35
Cuadro 9.	Caracterización morfológica de las colonias de la cepa CPM-121 de <i>Trichoderma atroviride</i> , cultivadas en diferentes condiciones.....	36
Cuadro 10.	Caracterización morfológica de las colonias de la cepa CPM-113 (<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>), cultivadas en diferentes condiciones.....	37
Cuadro 11.	Producción de esporas de las cepas CPM-108 de <i>Trichoderma harzianum</i> , CPM-121 de <i>Trichoderma atroviride</i> y CPM-113 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> en las diferentes muestras....	51
Cuadro 12.	Actividad volumétrica de lacasas de las cepas CPM-108 de <i>Trichoderma harzianum</i> , CPM-121 de <i>Trichoderma atroviride</i> y CPM-113 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	55
Cuadro 13.	Matriz de potencialidades, limitaciones y problemas.....	61
Cuadro 15.	Asignación de objetivos de la estrategia para biorremediar suelos agrícolas contaminados con hidrocarburos en México.....	64

I. INTRODUCCIÓN

Los problemas de contaminación ambiental a nivel local, nacional e internacional son parte de nuestra vida cotidiana; es preocupante la manera en cómo se han ido degradando los ecosistemas en nuestro planeta, y la capa superficial de la corteza terrestre no es la excepción. En México, y como consecuencia de varios siglos de actividad minera, de la industria de la química, petroquímica y de refinación del petróleo, se han producido grandes cantidades de residuos peligrosos que han causado pérdidas económicas y ecológicas (Spezzia-Mazzocco, 2012).

Entre los numerosos compuestos que contiene el petróleo están los hidrocarburos aromáticos, los cuales varían en estructura, tamaño y complejidad; desde compuestos monocíclicos hasta estructuras de cadenas largas y complejas constituidas por anillos aromáticos (Tisot y Welte, 1984). De estos compuestos, los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) han sido los más estudiados debido a que forman parte de una amplia variedad de productos de importancia biológica, química e industrial (Van Hamme *et al.*, 2003).

En los últimos años se ha incrementado el interés en el uso de biotecnologías destinadas a recuperar ambientes contaminados con petróleo o sus derivados, que complementen los métodos químicos y físicos tradicionales. La biorremediación, una técnica basada en el uso de microorganismos para degradar los hidrocarburos presentes en el petróleo y otros combustibles representa uno de los principales mecanismos por los cuales estos contaminantes pueden ser eliminados del ambiente y generalmente resulta más económica que otras alternativas de restauración (Riojas *et al.*, 2010).

Se sabe mucho de las habilidades que presentan las bacterias y su uso en estas tecnologías ambientales, pero en menor medida la de los hongos. Existe poca información con lo que respecta a especies del género *Trichoderma* en este campo pero, se sabe de manera general que son capaces de biodegradar algunos plaguicidas e hidrocarburos del petróleo (Smith, 1995; Chaîneau *et al.*, 1999; Das *et al.*, 2003). La mayoría de los estudios sobre el género *Trichoderma* están enfocados en el control biológico de hongos fitopatógenos y en la producción de enzimas útiles para la industria alimentaria y papelera (Argumedo-Delira, 2011).

La presente investigación se enfoca en la evaluación del potencial de cepas de *Trichoderma* como agente biológico aplicado a sistemas de biorremediación, ante la presencia de antraceno a diferentes concentraciones, el cual es un contaminante tóxico que se ha acumulado en el medio ambiente debido a una variedad de actividades humanas, con la finalidad de generar información útil para la implementación de especies del género *Trichoderma* en los procesos de biorremediación en sitios contaminados con compuestos poliaromáticos.

II. MARCO CONCEPTUAL

2.1. Contaminación por petróleo en México

El crecimiento poblacional y el desarrollo industrial durante los últimos tiempos, ha incrementado de forma relevante la presencia de contaminantes sólidos y líquidos convencionales, así como el vertimiento de gases contaminantes a la atmósfera. La consecuencia ha sido la aparición de graves problemas de contaminación sin antecedentes y para los cuales la naturaleza no estaba preparada, este grave problema de contexto ambiental lo representan los residuos peligrosos, que aproximadamente el 54% corresponden a derivados del petróleo. Debido a esto, el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos es esencial para mantener la calidad del medio ambiente (Rosales, 2008).

A nivel mundial, la industria petrolera produce, distribuye y consume grandes cantidades de petróleo y sus derivados, los cuales, representan la mayor fuente de energía para industrias de proceso y transporte. Por ejemplo, Estados Unidos en el 2011 consumió 18.83 millones de barriles de petróleo y subproductos de su refinación, comprendiendo el 22% del consumo total mundial; en tanto que importó 11.4 millones de barriles diarios de petróleo (mbd) (USEIA, 2013).

El petróleo es un producto estratégico para México ya que representa la base fundamental de su economía; el 90% de la energía primaria que se consume proviene de los hidrocarburos del petróleo crudo. En el 2013, la producción de petróleo fue de 418.7 mbd, mientras que la producción de diésel fue de 392.9 mbd (PEMEX, 2013), paralelamente el crecimiento constante de la industria petrolera también ha generado daños al ambiente, ya que los constantes derrames en el suelo forman capas que disminuyen su capacidad para retener agua disponible para las plantas (Gutiérrez y Zavala, 2002).

En nuestro país existe un gran número de sitios contaminados, principalmente con hidrocarburos del petróleo, los cuales tienen efectos negativos en la textura, la materia orgánica, la densidad real y la porosidad del suelo (Martínez y López, 2001), este importante elemento contiene grandes cantidades de hidrocarburos, principalmente de tipos parafínicos, nafténicos y aromáticos, en una proporción constitutiva de 82-85% de C, 12-15% de H, cerca del 3% de azufre, oxígeno y nitrógeno, contiene además varios elementos metálicos, con variaciones en la concentración de estos últimos, de acuerdo al sitio en donde se ha formado el petróleo (Jiménez Cisneros, 2001; Miller, 2002). Por lo mismo se ha generado en los últimos

años el interés de las Instituciones gubernamentales y privadas por la remediación de estos sitios. El conocimiento del tipo de contaminación y su concentración es fundamental para establecer las condiciones del sitio, el riesgo que presenta y la selección de posibles tecnologías de recuperación (Arce *et al.*, 2004).

La exposición al petróleo no está limitada al área cercana a la contaminación. Cuando el petróleo contamina el medio ambiente, los componentes más pesados tienden a depositarse en los sedimentos donde pueden contaminar repetidamente las fuentes de agua o ser consumidos por organismo que pueden entrar en la cadena alimenticia del hombre, los componentes del petróleo más ligeros pueden evaporarse en cuestión de horas y ser depositados a gran distancia de su lugar de producción a través del aire o del agua.

2.2. Contaminación de suelos agrícolas

La contaminación del suelo supone la alteración de la superficie terrestre con sustancias químicas que resultan perjudiciales para la vida en distinta medida, poniendo en peligro los ecosistemas y también nuestra salud. Esta alteración de la calidad de la tierra puede obedecer a muy diferentes causas, y del mismo modo sus consecuencias provocan serios problemas de salubridad que afectan gravemente a la flora, fauna o a la salud humana a lo largo del tiempo. Lo hacen por ejemplo, a través de la agricultura o afectando al equilibrio del ecosistema, contaminando el agua potable o el agua de riego, ya sea por entrar en contacto con estos lugares o por el simple hecho de que proceda de ellos. Lamentablemente, no siempre puede solucionarse el problema, y en ocasiones sólo se recupera parcialmente con la consiguiente contaminación del área.

Las afectaciones en el suelo van desde la exploración y explotación de pozos petroleros hasta la ocurrencia de siniestros, los cuales pueden suceder en cualquier parte del ecosistema, terrestre o acuáticos. Una afectación importante sucede cuando estos siniestros dañan suelos agrícolas, provocando un perjuicio económico y social debido a la inutilización de estos suelos para la producción de cultivos o ganadería.

La contaminación del suelo y el agua ha venido en aumento como resultado de las malas prácticas en la explotación, refinación, distribución, mantenimiento y almacenamiento de petróleo crudo y sus derivados (Iturbe *et al.*, 2007). La tendencia de este tipo de desastres acontece principalmente en las zonas rurales, teniendo mayor efecto en las poblaciones

dedicadas a la agricultura (Dettmer, 2002). Generalmente a esto le acompaña el rezago económico, la pobreza alimentaria y la marginación, comunes entre las poblaciones rurales agrícolas (Piñeiro, 2001).

2.3. Principales contaminantes derivados del petróleo

El petróleo crudo posee tres estados de la materia (sólido, líquido y gas), según su composición, presión, volumen y temperatura a la que se encuentra, y su color varía entre ámbar y negro. En estado gaseoso es inodoro, incoloro e insípido; la densidad es menor que la del agua y su peso específico varía entre 0.75 y 1.01 g mL⁻¹. En estado líquido su densidad y peso específico es mayor que la del agua, su viscosidad se expresa en grados API (10 centipoise a 37.8°C) (PEMEX, 1998). La industria de hidrocarburos líquidos, clasifica al petróleo crudo, de acuerdo con su densidad API (Instituto Americano del Petróleo) con lo que se diferencia la calidad del crudo (Cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación de hidrocarburos en función de su densidad API (PEMEX, 2013.).

Petróleo crudo	Densidad (g cm ⁻³)	Densidad (Grados API)
Extrapesado	>1.0	10
Pesado	1.0 – 0.92	10.0 – 22.3
Mediano	0.92 – 0.87	22.3 – 31-1
Ligero	0.87 – 0.83	31.1 – 39.0
Supe ligero	<0.83	>39.0

El petróleo es el producto de la degradación anaeróbica de materia orgánica, durante largos períodos de tiempo y bajo condiciones de alta presión y temperatura, que la convierte en gas natural, crudo y derivados del petróleo. El petróleo crudo es una mezcla extremadamente compleja y variable de compuestos orgánicos, donde la mayoría de ellos son hidrocarburos, que varían en peso molecular. Estos hidrocarburos pueden presentarse en un amplio rango de estructuras moleculares: cadenas lineales y ramificadas, anillos sencillos, condensados o aromáticos. Dentro de los compuestos saturados están los de cadena lineal n-alcanos o n-parafinas, en las ramificadas algunos alcanos con cadenas alquílicas, las

cicloparafinas cicloalcanos o naftenos y los hopanos. Los dos grupos principales de hidrocarburos aromáticos (HAPs) tales como el naftaleno, antraceno y fenantreno (Torres y Zuluaga, 2009).

2.4. Hidrocarburos aromático policíclico (HAP)

Los compuestos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) están en la lista de contaminantes de prioridad (Terrazas *et al.*, 2005), debido a los efectos cancerígenos y mutagénicos que provocan en los seres vivos (Cuadras *et al.*, 2012). Este efecto biológico varía en función de la estructura del HPA, es por ello que la agencia para la protección ambiental americana (EPA) seleccionó de los HAPs, como prioritarios debido a su alta toxicidad, entre los que se encuentran antraceno, fluoranteno y pireno (Peltonen y Kuljukka, 1995).

Existen dos clases de hidrocarburos aromáticos: los de bajo peso molecular que tienen de 2 a 3 anillos aromáticos como el naftaleno, fluoreno, fenantreno y antraceno y derivados, y los de alto peso molecular que tienen de 4 a 7 anillos aromáticos como el criseno. Sus características físicas y químicas varían de acuerdo a su peso molecular y, en consecuencia, en su distribución y conducta en el ambiente, lo mismo sus efectos en los sistemas biológicos (Menzie *et al.*, 1992). Se han identificado cerca de 100 HAP potencialmente cancerígenos. La Agencia de Protección Ambiental de los EE.UU. (USEPA) ha clasificado a 16 HAP como principales contaminantes con base en su toxicidad, exposición, frecuencia y persistencia en los sitios de desechos peligrosos y campos petroleros (ATSDR, 2005) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Propiedades fisicoquímicas de 16 contaminantes prioritarios de hidrocarburos aromáticos policíclicos de la USEPA de Estados Unidos (ATSDR, 2005).

HAP's	Número de anillos	Peso molecular (g mol ⁻¹)	Solubilidad (mg L ⁻¹)	Presión de vapor (mm Hg)
Naftaleno	2	128.17	31	8.89E-02
Acenaftaleno	3	154.21	3.8	3.75E-03
Acenaftileno	3	152.2	16.1	2.90E-02
Antraceno	3	178.23	0.045	2.55E-05
Fenantreno	3	178.23	1.1	6.80E-04
Fluoreno	3	166.22	1.9	3.24E-03
Fluoranteno	4	202.26	0.26	8.13E-06
Benzoantraceno	4	228.29	0.011	1.54E-07
Criseno	4	228.29	0.0015	7.80E-09
Pireno	4	202.26	0.132	4.25E-06
Benzo(a)pireno	5	252.32	0.0038	4.89E-09

Benzo(b)fluorantreno	5	252.32	0.0015	8.06E-08
Benzo(k)fluorantreno	5	252.32	0.0008	9.59E-11
Dibenzo(a,h)antraceno	6	278.35	0.0005	2.10E-11
Benzo(g,h,i)perileno	6	276.34	0.00026	1.00E-10
Indeno (1,2,3-cd)	6	276.34	0.062	1.40E-10

Los HAP en letra cursiva, la USEPA los clasifica como probables carcinógenos en humanos.

El benzo(a) antraceno o b(antraceno) a, está catalogado por la IARC, perteneciente a la OMS en la categoría 2, que agrupa a las sustancias que poseen probada acción cancerígena en humanos. Los estudios realizados indican que este compuesto es el hidrocarburo policíclico que se encuentra en mayor porcentaje que los demás. La exposición crónica a este compuesto condiciona la formación de tumores a nivel pulmonar, dérmico y renal en animales, almacenándose principalmente en el tejido lipídico (Menzie *et al.*, 1992). Se presenta como escamas incoloras (esta característica depende del solvente eluyente), es soluble en etanol, tolueno, acetona, benceno y éter etílico, poco soluble en agua. Presenta una fluorescencia verde amarillenta, ya sea en solución o en su forma cristalina (Rodríguez *et al.*, 2002). Se produce por condensación de cuatro anillos de benceno durante los procesos de combustión incompleta (Figura 1).

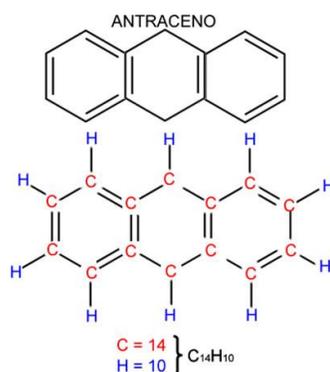


Figura 1. Estructura química del antraceno.

2.5. Biorremediación

Para comprender la utilización de biorremediación se debe ver como la humanidad fue dando una mirada hacia el control o mitigación de la contaminación, hasta llegar a la utilización de esta técnica como alternativa ambientalmente limpia (Rincón, 2004). A mediados del siglo XX se desarrollaron las primeras investigaciones encaminadas a estudiar el potencial de los

microorganismo para biodegradar contaminantes (Zobell, 1946). Este uso intencionado recibió entonces el nombre de biorremediación. Las primeras técnicas que se aplicaron fueron similares al landfarming actual y sus actores, lógicamente, compañías petrolíferas. Las primeras patentes, fundamentalmente para remediación vertidos de gasolina, aparecen en los años 70. En los años 80 se generalizó el uso del aire y peróxidos para suministrar oxígeno a las zonas contaminadas mejorando la eficiencia de los procesos degradativos. Durante los años 90 el desarrollo de las técnicas de burbujeo de oxígeno hizo posible la biorremediación en zonas por debajo del nivel freático. Al mismo tiempo, la implementación en la práctica de aproximaciones experimentales en el laboratorio permitió el tratamiento de hidrocarburos clorados, los primeros intentos con metales pesados, el trabajo en ambientes anaerobios, etc. Paralelamente, se desarrollaron métodos de ingeniería que mejoraron los rendimientos de las técnicas más populares para suelos contaminados (landfarming, composting, etc.) (Risers-Roberts, 1998). Hoy el proceso de biorremediación busca mejorar sus técnicas con el paso del tiempo, para empezar a convencer a muchas empresas que han ido implementando políticas ambientales y convertir este proceso en una verdadera industria.

Las prácticas de biorremediación consisten en el uso de microorganismo como plantas, hongos, bacterias naturales o modificadas genéticamente para neutralizar sustancias tóxicas, transformándolas en sustancias menos tóxicas o convirtiéndolas en inocuas para el ambiente y la salud humana (Schmidt, 2000; Plaza *et al.*, 2001). La biorremediación puede emplear organismos autóctonos del sitio contaminado o de otros sitios (exógenos), puede realizarse *in situ* o *ex situ*, en condiciones aerobias (presencia de oxígeno) o anaerobias (sin oxígeno). La biorremediación *in situ* se refiere al tratamiento que no requiere excavación del suelo contaminado; la biorremediación *ex situ* es un método donde se excava el suelo o material a tratar y se le maneja en un sistema controlado como una celda de landfarming o algún tipo de biorreactor (Bongkeun *et al.*, 2000; Ebru & Kilic 2004).

Las técnicas de biorremediación *in situ* presentan una mayor ventaja sobre las *ex situ* por el menor costo y la disminución de la generación de residuos a eliminar en la superficie (Daane, 2001). La biorremediación *in situ* es la más aplicada y utiliza microorganismos nativos, estos en el suelo pueden degradar un gran número de constituyentes y tiene una gran tolerancia a la toxicidad (Drydale *et al.*, 1999). Existen numerosas tecnologías de

remediación de suelos contaminados y de acuerdo a Volke y Velasco (2002), se pueden agrupar en 3 tipos:

- a) Biológicos (biorremediación, bioestimulación, fitorremediación, biolabranza, etc.).
- b).Fisicoquímicos (electrorremediación, lavado, solidificación/estabilización, etc.).
- c) Térmicos (incineración, vitrificación, desorción térmica, etc.).

Por su parte Marivela *et al.* (2002), señalan que el proceso de biorremediación puede clasificarse de acuerdo al organismo que efectúe la degradación del compuesto xenobiótico en los siguientes tipos:

- a. Fitorremediación. Consiste en el uso de plantas verdes para contener, remover o neutralizar compuestos orgánicos, metales pesados o radionucleidos. Un ejemplo de la fitorremediación la constituye el uso de la especie *Thlaspi caerulencen* en suelos contaminados con zinc y cadmio.
- b. Biorremediación animal. Existen animales que actúan como agentes descontaminantes, ya que pueden desarrollarse en medio con fuerte toxicidad y poseen en su interior microorganismos capaces de retener los metales pesados.
- c. Biorremediación microbiana. Existe la posibilidad del uso de bacterias con la propiedad de acumular o metabolizar metales pesados. La utilización de microorganismos que transforman diferentes compuestos nocivos en otros de menos impacto ambiental ha experimentado un gran desarrollo reciente.

2.6. Organismos usados en la biorremediación

Gran parte de los estudios de biorremediación, se han centrado en las bacterias, por la facilidad que ofrecen para estudiar sus vías metabólicas y llevar a cabo construcciones genéticas que permitan degradar específicamente determinados compuestos contaminantes; sin embargo, la capacidad de los hongos para transformar una gran variedad de compuestos orgánicos y llevarlos hasta compuestos más simples, ofrecen un potencial indiscutible para su utilización en procesos de tratamiento de contaminaciones. Ese potencial radica fundamentalmente en las características de su sistema enzimático y en su vigoroso crecimiento que les permite, a través del desarrollo de su micelio, colonizar diferentes tipos de sustratos y acceder a los compuestos que constituyen las contaminaciones más frecuentes (Hammel, 1995). La biorremediación en la recuperación de suelos contaminados por petróleo

ha resultado una técnica difundida y exitosa en México a partir de los primeros trabajos que se han llevado a cabo en el sureste del país en zonas tropicales afectadas por hidrocarburos del petróleo (Spezzia-Mazzocco, 2012).

Los microorganismos desempeñan funciones de gran importancia en relación con procesos de edafogénesis; ciclos biogeoquímicos de elementos como el carbono, el nitrógeno, oxígeno, el azufre, el fósforo, el hierro y otros metales; fertilidad de las plantas y protección a patógenos; degradación de compuestos xenobióticos, etc. (Arboleda y Bravo, 2008). Los microorganismos hacen parte fundamental de los procesos de biorremediación (Fernández, 2012). Los principales organismos responsables de la transformación química de los contaminantes son las bacterias anaeróbicas, incluyendo los actinomicetos y las cianobacterias, las bacterias anaeróbicas, los hongos y algunas algas. El mecanismo por el cual lleva a cabo la degradación de los compuestos orgánicos, incluye la participación de enzimas.

2.7. Biorremediación por hongos

Los hongos también han sido evaluados para la degradación de hidrocarburos, y han sido reconocidos como degradadores eficientes de compuestos orgánicos desde mediados de los 80's (Bumpus *et al.*, 1985). Los hongos de la podredumbre blanca, en especial, poseen enzimas oxidativas esenciales para la degradación de lignina y por lo tanto son capaces de degradar HAPs (Pointing *et al.*, 2011). Los hongos y mohos reportados que han mostrado buen desarrollo en medios de cultivo con petróleo o que ha removido hidrocarburos de suelos contaminados son principalmente: *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides*, *Paecilomyces*, *Penicillium glabrum* y *Trichoderma* (Pérez Armendáriz *et al.*, 2004).

Boldu *et al.* (2002), estudiaron el papel del hongo *Cladophialophora* sp. sobre la degradación de benceno, tolueno, etilbenzeno y xileno. El hongo no fue capaz de degradar el benceno, pero degradó compuestos alcalinizados (tolueno, etilbenzeno y xileno). El mecanismo de degradación fue una combinación de asimilación y co-metabolismo. El tolueno y el etilbenzeno fueron usados como fuente de carbono y energía.

La toxicidad de muchos contaminantes limita la atenuación natural por bacterias, pero los hongos de pudrición blanca pueden soportar los niveles tóxicos de la mayoría de los contaminantes orgánicos. Los hongos de podredumbre blanca son conocidos por su variedad y

su notable capacidad para degradar materiales naturales complejos y persistentes. Presentan un sistema no específico, extracelular enzimático, que es capaz de degradar lignina, uno de los materiales más resistentes que se encuentra en la naturaleza (Korcan *et al.*, 2013).

La eficiencia de los hongos para degradar diversos sustratos recae en varias características: su crecimiento micelial permite el acceso a las partes internas de sustrato, pueden crecer en condiciones de estrés ambiental y bajo condiciones de toxicidad, las enzimas son estimuladas en condiciones de deficiencia de nutrientes, su tasa de crecimiento es alta y los ciclos de vida cortos y, la degradación fúngica es más rápida que la bacteriana (Goltapeh *et al.*, 2013).

2.8. El género *Trichoderma*

Las especies de hongos que pertenecen al género *Trichoderma* han sido ampliamente caracterizadas por tener aplicación en el ámbito agrícola, principalmente para el control biológico de otros organismos patógenos que atacan a los cultivos. El género *Trichoderma* fue propuesto por Persoon (1794), con cuatro especies. Rifai (1969), agregó nueve especies más, y mencionó que no hay una forma real para definir a las especies biológicas en términos morfológicos ya que estos caracteres están continuamente cambiando y no se sabe el grado de variación tolerable dentro de una especie individual.

Representan un grupo de hongos filamentosos que pertenecen al Reino Mycetae (fungi), División Eumycota, Subdivisión Deuteromycotina, Clase Hyphomycetes, Orden Hyphales (Moniliales) y Familia Moniliaceae (Alexopoulos y Mims, 1979; Subramanian, 1983). Aunque de acuerdo con Lieckfeldt *et al.* (1999); Samuels y Chaverri (2003); Samuels (2005) y Jaklitsch *et al.* (2006), la clasificación taxonómica del género *Trichoderma* sería Reino Mycetae (Fungi), División Eumycota, Subdivisión Ascomycotina, Clase Euascomycetes, Orden Hypocreales, Familia Hypocraceae y Género *Trichoderma* e *Hypocrea*.

La mayoría de las colonias de *Trichoderma* en su inicio tienen color blanco, que se tornan a verde oscuro o amarillento, con esporulación densa (Rifai, 1969). El micelio es escaso en su mayoría, y visto al microscopio es fino, los conidióforos son ramificados, parecen un árbol pequeño. Los mismos se presentan como penachos compactados que forman anillos con un sistema de ramas irregular de manera piramidal (Fig. 2). Estos terminan en fiálides donde se forman las esporas asexuales o conidios, de gran importancia para la

identificación taxonómica a nivel de especies. Los conidios aseguran las generaciones del hongo durante gran parte del período vegetativo (Rifai, 1969). Son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucanos (Harman, 2003). Además de los conidióforos, estas se pueden producir sobre fiálides que emergen directamente del micelio.

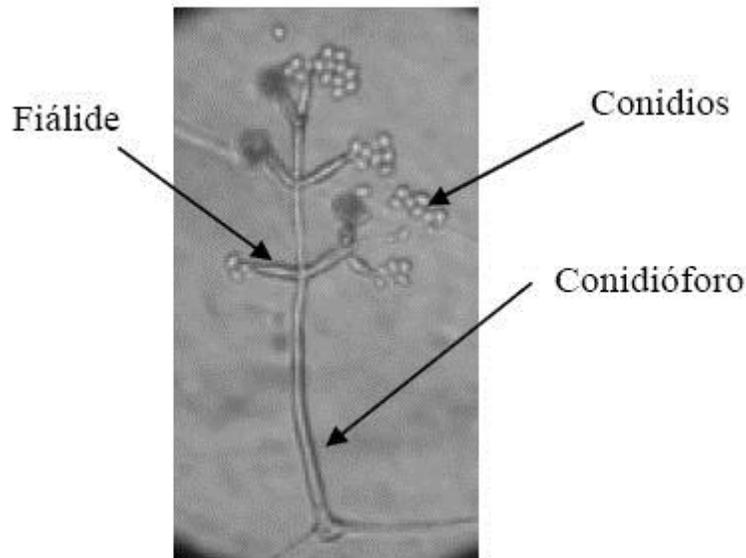


Figura 2. Conidios y conidióforos de *Trichoderma* sp. (400x).

La mayoría de las especies de *Trichoderma* presentan clamidosporas, las cuales pueden ser intercalares y en ocasiones terminales. Las clamidosporas toleran condiciones ambientales adversas, son estructuras de sobrevivencia y permiten que el hongo pueda perdurar a través del tiempo (Stefanova *et al.*, 1999). No obstante, las clamidosporas recién formadas presentan más de 75% de germinación bajo condiciones óptimas de humedad (> 75%) y temperatura (28-30°C). debido a esto se dice, que las especies de *Trichoderma* producen tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y conidios (Díaz, 1994).

Dentro del género *Trichoderma* existen especies que son de importancia biotecnológica, éstos hongos se caracterizan por predominar en los ecosistemas terrestres (suelos agrícolas, pastizales, bosques y desiertos) y acuáticos (Zhang *et al.*, 2005). Algunas especies se caracterizan por ser de vida libre en el suelo, oportunistas, simbioses de plantas, con excepción de algunas especies que son además, micoparásitas como *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. viride* y *T. virens* (Williams *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2006). Además estos

hongos presentan la habilidad de colonizar distintos ambientes, debido a su alta capacidad reproductiva (Bissett, 1991; Harman *et al.*, 2004), los requerimientos nutrimentales de estos hongos filamentosos son pocos, aunque su crecimiento es favorecido por la presencia de materia orgánica y humedad, y su temperatura óptima de crecimiento se encuentra en un rango de 25 a 30°C (Papavizas, 1985). Sin embargo, se ha encontrado que puede adaptarse y sobrevivir en condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad (Widden y Scattolin, 1988; Jackson *et al.*, 1991).

Dicho grupo fúngico, es capaz de competir por nutrientes y espacios con otros microorganismos, además de ser importante para las plantas, al contribuir en el control de hongos fitopatógenos, por su potencial de sintetizar y liberar enzimas como polisacaridasas, celulasas, xilanasas y quitinasas, las cuales se han aprovechado en procesos industriales (Verma *et al.*, 2007). Además este grupo fúngico es importante para las plantas, al contribuir en el control de organismos fitopatógenos ya que poseen propiedades mico parasitas y antibióticas, por lo que algunas especies han sido catalogadas como excelentes agentes en el control biológico de hongos causantes de enfermedades para diferentes plantas hortícolas (Ávila-Miranda *et al.*, 2006; Rojo *et al.*, 2007). Las cepas de *Trichoderma* más comercializadas para el control biológico son *T. viride*, *T. polysporum* y *T. harzianum*; está última especie es la más utilizada y reportada en la literatura (Harman, 2000; Ávila-Miranda *et al.*, 2006; Rojo *et al.*, 2007). La explotación comercial de estas enzimas es diversa, ya que se emplean para producción detergente para ropa, aceite de oliva, vino, cerveza, jugos, alimentos para animales y en la producción de algunos combustibles (Reese y Mandels, 1989; Galante *et al.*, 1993; Walsh *et al.*, 1993; Verma *et al.*, 2007). Además, las especies del género *Trichoderma* pueden producir diversos metabolitos secundarios, dentro de los que se encuentran algunas toxinas como la gliotoxina (Kleifeld y Chet, 1992). Gravel *et al.* (2007), probaron la capacidad de *T. atroviride* para promover el crecimiento de plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill).

La mayoría de cepas de *Trichoderma* no poseen etapa sexual, por lo que producen únicamente esporas asexuales (Herrera y Ulloa, 1990). Sin embargo, se conoce la etapa sexual de unas pocas especies, la identificada dentro del grupo de hongos Ascomycetes en el género *Hypocrea* (Samuels, 1996).

Las especies de *Trichoderma* que comúnmente causan daños en cultivos de hongos comestibles, durante el crecimiento del micelio o la formación de primordios son: *T. viride*, *T. harzianum* y *T. polysporum*. En cultivos de hongos comestibles donde el sustrato es pasteurizado, existe un riesgo de contaminación durante la etapa de incubación, provocada por *Trichoderma* spp. cuyas esporas son llevadas por el aire, los trabajadores o el material utilizado (Stamets, 1993; Savoie *et al.*, 2000).

El micelio de *Trichoderma*, crece y se ramifica desarrollando típicas hifas de 5 a 10 μm de diámetro. La esporulación asexual ocurre en conidios unicelulares (3 a 5 μm de diámetro); usualmente son de color verde y son liberados en grandes cantidades. También se forman clamidosporas, son unicelulares, pero pueden llegar a fusionarse entre dos o más. Gran parte de las cepas de este género están muy adaptadas al ciclo de vida asexual. En ausencia de la meiosis, se aprecia en estos organismos una alta plasticidad cromosómica; diferentes cepas pueden llegar a tener distintos números y tamaños de cromosomas. La mayoría de las células poseen numerosos núcleos y, en algunas células vegetativas pueden sobrepasar la cifra de 100. Varios factores genéticos asexuales, como la combinación parasexual, mutación y otros procesos, contribuyen a la variación de los núcleos en un solo organismo (talo). Por todo ello, se pueden encontrar una gran diversidad genética en las cepas silvestres (Harman y Kubicek, 1998).

Los antecedentes mencionados resaltan la importancia y los efectos benéficos que tienen las especies de *Trichoderma* para la producción agrícola y para la industria (Esposito y Da Silva, 1998). Con base en esta capacidad enzimática, las especies de *Trichoderma* pueden contribuir en la degradación de compuestos orgánicos contaminantes depositados en el suelo (Alexander, 1981).

Trichoderma es un hongo filamentoso que se ha destacado por su capacidad de degradar compuestos orgánicos debido a su habilidad enzimática, capacidad de reproducción, predominancia en diversos ecosistemas terrestres, así como por sus bajos requerimientos nutrimentales y sobrevivencia a condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad (Jackson *et al.*, 1991). *Trichoderma* también se ha aislado de sitios contaminados con petróleo en la Antártida; sin embargo no tolera altas concentraciones de hidrocarburos de petróleo, ya que se inhibe el desarrollo de sus hifas (Hugles *et al.*, 2007).

Con base en esta capacidad enzimática, las especies de *Trichoderma* pueden potencialmente contribuir en la degradación de compuestos orgánicos contaminantes depositados en el suelo. De manera específica, la forma en que un microorganismo interactúa con un contaminante de naturaleza orgánica es diferente a la de un contaminante de origen inorgánico (Shannon y Unterman, 1993). Los microorganismos pueden transformar los contaminantes orgánicos en compuestos que presenten menor o mayor toxicidad, con respecto al compuesto original. En contraste, algunos microorganismos pueden degradar completamente los contaminantes orgánicos, lo que implica su completa mineralización hasta compuestos inocuos como agua y dióxido de carbono (Alexander 1981). Chaîneau *et al.* (1999), reportaron la capacidad que tienen algunas especies de *Trichoderma* para degradar hidrocarburos saturados y aromáticos presentes en aceites combustibles (Cuadro 3). Con base en estos resultados se observó que la estructura química de los hidrocarburos influyó en la capacidad de biodegradación por *Trichoderma*. Así, la degradación de hidrocarburos saturados por las cepas de *Trichoderma* fue mayor en comparación con la observada por los hidrocarburos aromáticos.

Cuadro 3. Capacidad de degradación de hidrocarburos saturados y aromáticos presentes en el aceite combustible que tienen algunas especies del género *Trichoderma* (Chaîneau *et al.*, 1999).

Especies	Degradación (%)	Fracción de hidrocarburos degradados (%)	
		Saturados	Aromáticos
<i>Trichoderma polysporum</i>	27±9	54	28
<i>T. koningii</i>	24±5	34	21
<i>T. pseudokoningii</i>	27±4	33	24
<i>T. harzianum</i>	26±5	39	12

Las cepas fueron crecidas en 179 mg de aceite combustible, e incubadas a 27°C durante 30 días.

Hughes *et al.* (2007), expusieron a *T. koningii* y *Trichoderma* sp. ante diferentes hidrocarburos saturados (dodecano, hexadecano) y aromáticos (ácido benzoico, tolueno, fenol, bifenilo, naftaleno, *m* y *p*-xileno y etilbenceno) a dos temperaturas (4 y 17°C). Por una parte, los hidrocarburos aromáticos tuvieron mayor inhibición en el crecimiento hifal en comparación con los hidrocarburos saturados, denotando la alta toxicidad de los compuestos aromáticos en el crecimiento de ambos hongos. Lo anterior refleja la alta toxicidad que

presentan los compuestos aromáticos en el crecimiento de los hongos. El crecimiento del hongo en presencia de hidrocarburos disminuyó en todos los casos a 4°C, demostrando con ello que la temperatura afecta al desarrollo del hongo y su capacidad de degradación.

Revelet *et al.* (2000), demostraron que *T. harzianum*, *T. pseudokoninggi* y *T. viride* tienen la capacidad de degradar pireno. Además de utilizar al pireno como fuente de carbono, *T. harzianum* contribuyó en la degradación de 65 y 33.7% de este compuesto monoaromático a partir de las concentraciones de 50 y 100 mg L⁻¹, respectivamente (Saraswathy y Hallberg, 2002). Por otra parte Matsubara, *et al.* (2006), mencionan que el porcentaje de degradación de pireno y fenantreno (400 mg L⁻¹) por *T. harzianum*, fue menor del 10%, en comparación con los hongos *Pycnoporus coccineus* y *Coprinus cinereus* que tienen un porcentaje de degradación del 65 al 80%, para ambos contaminantes. Los tratamientos se incubaron a 30°C y se analizaron a los 7, 14 y 28 días. Sin embargo, Hadibarata *et al.* (2007), encontraron que *Trichoderma* sp S019 tiene una alta degradación de fenantreno (72%) empleando una concentración de 0.1 mM en medio líquido, durante un período de incubación de 30 días.

El porcentaje de degradación de benzo[α]pireno (BaP) que presenta *T. viride* es relativamente similar al de *Fusarium solani* (Cuadro 4), pero mayor al de *F. oxysporum*. Aun cuando *T. viride* degradó BaP, no se lograron detectar actividades enzimáticas relacionadas con la degradación de este compuesto poliaromático, como son la lacasa y la peroxidasa. Lo anterior sugiere que esta especie de *Trichoderma* tiene otro sistema enzimático para la degradación de BaP (Verdin *et al.*, 2004).

Cuadro 4. Capacidad de degradación de benzo[α]pireno por algunas especies de hongos (Verdin *et al.*, 2004).

Especie	Degradación (%)
<i>Trichoderma viride</i>	50
<i>Fusarium solani</i>	58
<i>Fusarium oxysporum</i>	30

La concentración inicial de benzo[α]pireno fue de 0.4 mM, los cultivos fueron incubados a 25°C durante 30 días.

Varias cepas de *Trichoderma* son capaces de degradar plaguicidas, debido a su capacidad enzimática. Esta capacidad bioquímica permite vislumbrar el potencial de aplicación de *Trichoderma* en la biorremediación de sitios contaminados teniendo con ello una relevancia ecológica.

2.9. Actividad enzimática en *Trichoderma*

Los diferentes grados de degradación de la lignina con respecto a los otros componentes de la madera dependen de las condiciones ambientales y las especies de hongos involucrados. Las enzimas ligninolíticas, tales como la manganeso peroxidasa (MnP), ligninoperoxidasa (LiP) y lacasas, las secretan los hongos de la podredumbre blanca, los cuales son los principales degradadores de la lignina de la madera en el medio ambiente natural. Estas enzimas son capaces de degradar una variedad de contaminantes, incluidos los HAPs, los bifenilos policlorados (PCB), y colorantes sintéticos debido a su baja especificidad de sustratos. En base a sus patrones de enzimas ligninolíticas, los hongos que pudren la madera se pueden dividir en tres grupos: 1. Hongos productores de LiP, MnP y lacasas; 2. Hongos productores de MnP y lacasas; y 3. Hongos productores de LiP y lacasas (Korcan *et al.*, 2013).

2.10. Lacasas

La lacasa es una enzima oxidoreductasa (p-difenol-oxígeno-óxidorreductasa, EC1.10.3.2). Se le considera dentro del grupo de las fenoloxidasas ya que utiliza monofenoles como sustrato. Las isoformas de la lacasas poseen similar peso molecular y sustratos específicos similares, aunque presentan considerables diferencias en la secuencia de aminoácidos (Okamoto *et al.*, 2000). Son enzimas que están ampliamente distribuidas en la naturaleza; se han reportado su presencia en animales, plantas y microorganismos (Lucas *et al.*, 2001).

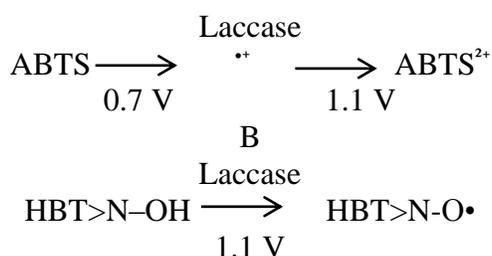
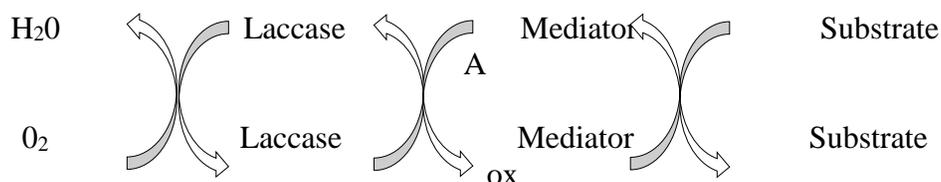
La lacasa es secretada por hongos basidiomicetos y resulta de gran importancia para el desarrollo de las fructificaciones y para la pigmentación conidial (Herman *et al.*, 1983). Esta enzima además de ser considerada importante en los procesos degradativos de la lignina, es capaz de oxidar fenoles y aminas aromáticas mediante un proceso de reducción de oxígeno molecular a agua en presencia de cobre, elemento presente en sus moléculas (Hublik y Schinner, 2000).

El sistema enzimático de las lacasas es posiblemente uno de los más estudiados. Estas enzimas fueron reportadas por primera vez en el año 1885 e identificadas a partir de árboles, en 1896 las encontraron en hongos y a partir de entonces se ha incrementado el interés y el conocimiento de estas enzimas, descubriendo cada vez más aplicaciones y usos para ellas, ahora se sabe que se encuentran en plantas, en hongos y en unas cuantas bacterias (Desai y Nityanand, 2011).

A la fecha se han purificado y caracterizado más de 100 lacasas, con longitudes que varían entre 516 y 567 aminoácidos. Las lacasas muestran tramos largos de secuencias conservadas con interrupciones de tramos cortos con más variaciones (Kilaru *et al.*, 2006a).

En el caso de HAP, al tratarse de compuestos de naturaleza no fenólica, que no son sustratos de las lacasas, se hace indispensable el uso de mediadores para llevar a cabo su oxidación. Entre estos mediadores, los más comúnmente usados son el HBT y ABTS (Fig. 3), se han utilizado con éxito en la oxidación de benzo-pireno y antraceno por la lacasa de *Trametes versicolor* (Esperanza *et al.*, 2003; Novotny *et al.*, 2004). Una alternativa al uso de mediadores sintéticos es el uso de mediadores naturales como fenol, anilina, ácido 4-hidroxibenzoico o alcohol 4-hidroxibenzílico, usados con igual eficiencia que el ABTS o el HBT en la degradación de diferentes HAP por la lacasas de *T. versicolor* (Martínez-Carrera y López-Martínez de Alba, 2010; Bourbonnais *et al.*, 1997).

Figura 3. Papel de la enzima lacasa oxidando sustratos no habituales por la acción de los mediadores redox (A), y los potenciales redox de las reacciones de oxidación de ABTS y HBT por lacasa (B) (Kunamneni, 2007).



Las lacasas son posiblemente, las enzimas más prometedoras para reemplazar muchos de los procesos químicos convencionales ya que catalizan la oxidación de una gran variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos (Kunamneni, 2007). Actualmente, se encuentran ya algunas lacasas en el mercado para la producción de textiles, alimentos y otras industrias, y existen muchas aplicaciones potenciales para las lacasas, que incluyen: blanqueo de pulpa de papel, de colorantes textiles, en síntesis orgánicos, usos ambientales y farmacéuticos y hasta en nanobiotecnología. Aportan ventajas adicionales, ya que consumen poca energía y son biodegradables, por lo que los procesos de biocatálisis con lacasas, pueden considerarse apropiados para desarrollar procesos industriales más eficientes, sustentables y ambientalmente amigables.

2.11. El ácido acetilsalicílico

Salgado (2012), menciona que el ácido acetilsalicílico (AAS) es un metabolito secundario de síntesis orgánica, derivado del grupo de los fenilpropanoides o también llamados compuestos fenólicos, descendiente del fenol, dichos compuestos están ligados a las actividades de

defensa de las plantas, así como, en el endurecimiento de la pared celular (ligninas), actividad antimicrobiana (Furanocumarinas, isoflavonoides y estilbenos), repelentes (taninos) y en procesos de señalización (AAS). Actualmente, se ha considerado al AAS como un biorregulador del crecimiento de las plantas (Sánchez, 2011).

El AAS (ácido acetilsalicílico) participa en procesos tales como: la germinación de semillas, crecimiento celular, respiración, cierre de estomas, expresión de genes asociados a senescencia, respuesta a estrés abiótico y de forma esencial en la termogénesis, así como en la resistencia a enfermedades (Rangel, 2010). Se ha propuesto un modo de acción para el AAS basándose en el hallazgo de que éste se une e inhibe a la enzima catalasa. La inhibición de la catalasa podría conducir a un incremento en la concentración del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o de otras especies reactivas de oxígeno derivadas de esta molécula. El H_2O_2 podría tener una actividad antibiótica en contra de patógenos. Otro mecanismo de acción del ácido acetilsalicílico podría ser en la habilidad que tiene para formar por sí mismo radicales libres de AAS por medio de la inhibición de enzimas que contienen grupos hemo, tales como peroxidasa y catalasa. Tales radicales fenólicos libres podrían activar reacciones de defensa (Rangel, 2010).

Bioresearch (2010), menciona que el ácido acetilsalicílico (AAS) tiene como función la de romper las paredes celulares de las células del hongo, generando fitoalexinas para bloquear a los ataques a heridas en la planta; y también tiene como función disolver el exoesqueleto en el caso de ácaros. Rendón-Hernández (2015), indicó que el ácido acetilsalicílico tiene un efecto en la fisiología de los hongos *Fistulina guzmanii*, *Volvariella bombycina* y *Hericiium erinaceus*, así como en su eficiencia biológica y la cantidad de proteínas a una concentración de AAS 100 μ M.

III. MARCO DE REFERENCIA

3.1. Biorremediación del suelo con hongos filamentosos

En lo que respecta a microorganismos de vida libre, los estudios realizados se han enfocado al aislamiento de bacterias y hongos filamentosos de zonas contaminadas y con capacidad de degradar petróleo crudo y fracciones específicas como los HAP. Hongos filamentosos de los géneros *Penicillium*, *Trichoderma*, y *Aspergillus* que han sido caracterizados como degradadores de petróleo crudo y benzo [a] pireno, tanto en medios de cultivo líquido como en la rizósfera de plantas crecidas en suelo contaminado.

De las especies de hongos reportadas en procesos de biorremediación, están los hongos llamados de “podrición blanca”, pertenecientes a la división *Basidiomycota*. Son de los hongos más evolucionados del Reino *Fungi*; denominados así ya que la descomposición generada en la materia orgánica, especialmente de tipo ligninolíticos, producen masas en general blancas o amarillas (Cerniglia, 1997). También están reportados en forma no tan extensa, los hongos filamentosos del suelo de la División *Deuteromycota*, cuyas estructuras internas son distinguibles microscópicamente (Rittmann y McCarty, 2001).

Un estudio realizado por Matsubara *et al.*, (2006) demostraron que nueve cepas de hongos de la podredumbre blanca podrían degradar fenantreno y pireno. El uso de las isoenzimas provenientes de *Pleurotus eryngii* son una buena opción para la biorremediación de espacios contaminados con antraceno (Caramelo *et al.*, 2004), similares resultados obtuvo Hestbjerg *et al.*, (2003) quien trabajó con suelo contaminado con hidrocarburos, disminuyendo su grado de toxicidad por medio de la cepa *Pleurotus ostreatus*, teniendo resultados en la producción de lacasas.

Boldu *et al.* (2002), estudiaron el papel del hongo *Cladophialophora* sp. sobre la degradación de benceno, tolueno, etilbenzeno y xileno. El hongo no fue capaz de degradar el benceno, pero degradó los compuestos alquilados (tolueno, etilbenzeno y xileno).

Vargas *et al.* (2001), utilizaron *P. ostreatus* para biodegradar un suelo contaminado con antraceno y demostraron que el antraceno fue removido 90% en un tiempo de 15 días. Cardona *et al.* (2002), demostraron que *P. ostreatus* incubado *in vitro* en un sustrato lignocelulósico impactado con petróleo degrada los hidrocarburos de la fracción pesada, siendo más eficiente cuando el sustrato está contaminado al 10% de crudo y durante los

primeros 45 días. Bedoya y García (2003), demostraron que *P. ostreatus* incubado en un sustrato lignocelulósico impactado con petróleo y suelo estéril y no estéril, degrada los hidrocarburos de la fracción pesada de crudo y más aún, fructifica en la mezcla mencionada.

3.2. Actividad enzimática de *Trichoderma*

Muchos hongos lignolíticos son capaces de producir isoformas de las lacasas a partir de los mismo o diferentes genes, que varían de acuerdo al sustrato en el que se encuentran (Desai y Nityanand, 2011). A la fecha se han purificado y caracterizado más de 100 lacasas, con longitudes que varían entre 516 y 567 aminoácidos. Las lacasas muestran tramos largos de secuencias conservadas con interrupciones de tramos cortos con más variaciones (Kilaru *et al.*, 2006b). El estudio de la producción de lacasas ha sido motivo de atención para muchos trabajos de investigación, especialmente con hongos comestibles.

También las especies del género *Trichoderma* tienen el potencial de sintetizar y liberar diversas enzimas que han aprovechado en procesos industriales. Por otro lado, las especies del género *Trichoderma* son capaces de acumular metales pesados, degradar cianuro, hidrocarburos del petróleo, colorantes, plaguicidas, compuestos organoclorados, etc. Sin embargo estos estudios son mínimos y en la mayoría de los casos se desconocen los mecanismos de destoxificación y los procesos enzimáticos involucrados.

3.3. Producción de esporas por *Trichoderma*

El género *Trichoderma* es un hongo versátil, de fácil manipulación (Fernández-Larre, 2001), que presenta la versatilidad de cultivarse y desarrollarse sobre muchos y diferentes sustratos. Es importante considerar que la concentración de esporas se aplica en el control biológico de fitopatógenos. Michel-Aceves *et al.* (2005), con el sustrato que tradicionalmente se utiliza en la producción de hongos entomopatógenos (grano de arroz entero) obtuvo 4.0×10^8 esporas mL^{-1} . Ramos *et al.* (2008), obtuvieron concentraciones de hasta 2.3×10^8 conidios/g en sustrato de cascarilla de arroz. Tiene diversas ventajas como agente de control biológico pues posee un rápido crecimiento y desarrollo, también produce una gran cantidad de enzimas, inducibles con la presencia de hongos fitopatógenos. Su gran tolerancia a condiciones ambientales extremas y hábitat, donde los hongos son causantes de diversas enfermedades, les permiten ser eficientes agentes de control; de igual forma pueden sobrevivir en medios con contenidos significativos de pesticidas y otros químicos.

IV. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos del petróleo son considerados como agentes carcinogénicos y teratogénicos (Chen y Liao, 2006) e implicados en problemas ambientales y agrícolas, que han causado pérdidas económicas y ecológicas en nuestro país. Muchos de los compuestos poliaromáticos pueden permanecer durante un tiempo considerable en el suelo y acumularse a través de las cadenas alimenticias, siendo susceptibles de ser biodegradados vía actividad microbiana (Cerniglia *et al.*, 1985).

La necesidad de desarrollar métodos más eficientes para remediar los suelos contaminados propició el surgimiento de tecnologías de menor impacto, como la biorremediación, basada en procesos enzimáticos que llevan a cabo los organismos para transformar los compuestos tóxicos de forma natural y la recuperación de ambientes generalmente dañados por alguna actividad humana. Además de ser una tecnología alternativa de menor costo tiene la importante característica de transformar los contaminantes en sustancias más simples o de menor toxicidad o incluso, puede llegar a mineralizarlos (Baker y Herson, 1994).

Dadas las características que presenta el género *Trichoderma*, como primera etapa, se requiere conocer el uso de diferentes especies que toleren y tengan la capacidad de degradación de compuestos orgánicos *in vitro*. Todos los trabajos relacionados con este tema se han llevado a cabo en condiciones de laboratorio utilizando algunos compuestos adicionados al medio de cultivo líquido. A la fecha, no se han realizado estudios que expongan al mohó verde *Trichoderma* en contacto directo con derivados de hidrocarburos para probar su capacidad de biodegradación. Así mismo, existe controversia en la bibliografía sobre si *Trichoderma* es capaz o no de producir enzimas lacasas (Verdin *et al.*, 2004) En el presente trabajo, se estudió el crecimiento *in vitro* de tres especies de *Trichoderma* aisladas de los substratos de cultivo de hongos comestibles en presencia de cristales de antraceno colocados en la superficie del medio de cultivo. Se reporta por primera vez la actividad volumétrica de lacasas bajo las condiciones descritas, enzima clave en la biodegradación de hidrocarburos, lo que permitirá desarrollar estrategias de largo plazo para analizar su potencial de aplicación, en los procesos de biorremediación.

V. HIPÓTESIS

Al menos una cepa de *Trichoderma* será capaz de crecer *in vitro* en presencia de antraceno produciendo actividad de enzimas lacasas en medio de cultivo adicionado con ácido acetilsalicílico.

VI. OBJETIVO GENERAL

Determinar la tolerancia *in vitro* de diversas especies de *Trichoderma* a diferentes concentraciones de antraceno, en medio de cultivo semisólido de agar con dextrosa y papa (PDA) con ácido acetilsalicílico (ASS 100 μ M)

6.1. Objetivos particulares

1. Realizar una cinética de crecimiento *in vitro* de las cepas de *Trichoderma* en presencia de diferentes concentraciones de antraceno en el medio de cultivo PDA con AAS.
2. Determinar la actividad volumétrica de lacasas durante la cinética de crecimiento *in vitro*.
3. Desarrollar una estrategia para la aplicación potencial de cepas de *Trichoderma* en procesos de biorremediación *in situ* de suelos contaminados con hidrocarburos.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

El esquema general de trabajo que se llevó a cabo en esta investigación, se muestra en la Figura 4.

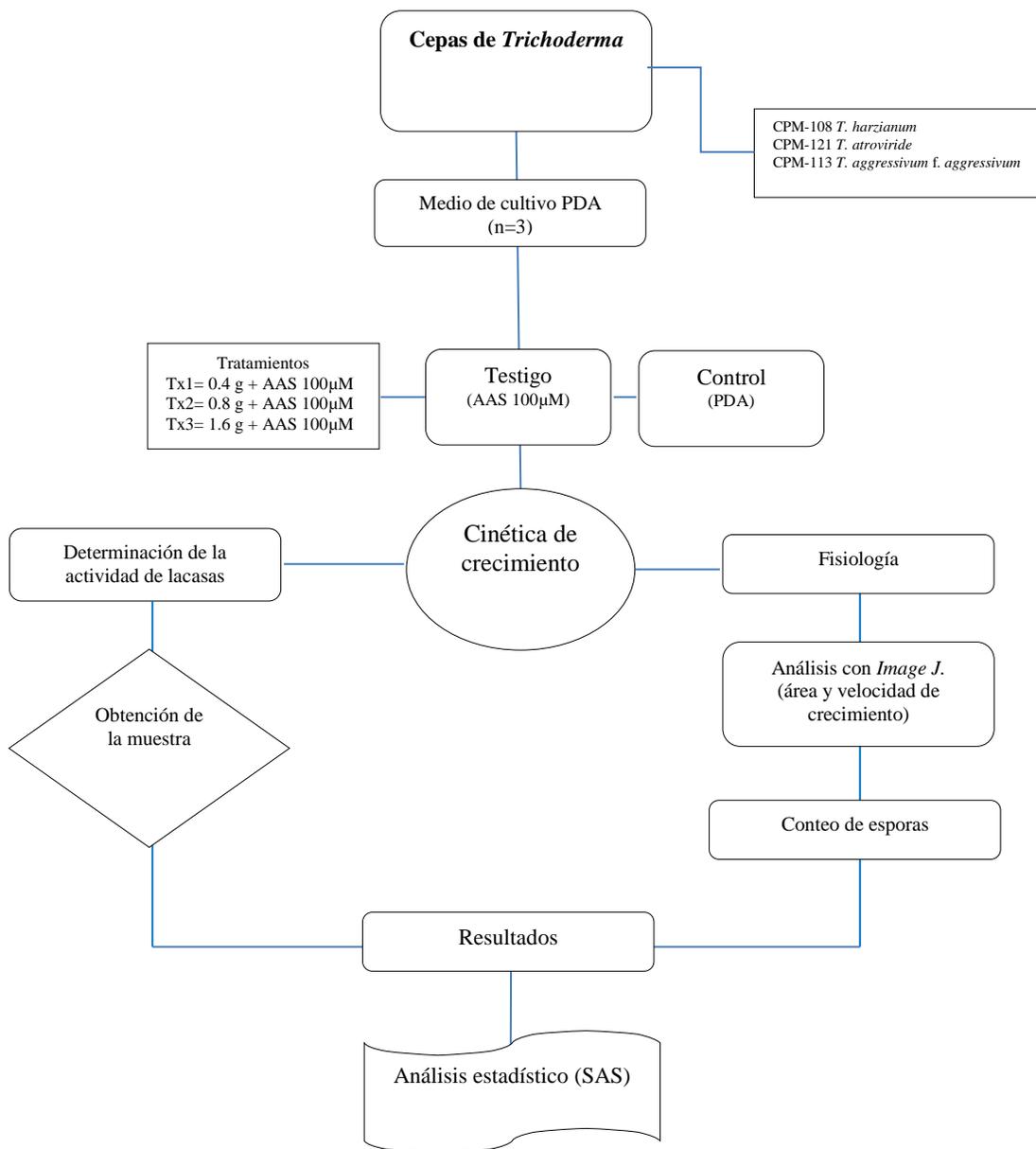


Figura 4. Metodología general de la investigación realizada en el presente estudio.

7.1. Material biológico

Las cepas de hongos estudiadas se encuentran depositadas en la Unidad de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales (UREGENHCFyM) del Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla. Las cepas utilizadas fueron aisladas de cultivos de hongos comestibles. La especie particular de cada uno, así como el número de registro y procedencia se muestran en el Cuadro 5. Las tres especies fueron identificadas por medio del análisis de la secuencia de la región ITS.

Cuadro 5. Cepas de *Trichoderma* utilizadas en el presente estudio y depositadas en la UREGENHCFyM.

Registro	Especie	Procedencia	Cultivo asociado
CPM-108	<i>T. harzianum</i> (Rifai, 1969)	Módulo del <i>Campus</i> Puebla	<i>Ganoderma</i> spp.
CPM-121	<i>T. atroviride</i> (P. Karsten, 1892)	Módulo del <i>Campus</i> Puebla	<i>Ganoderma</i> spp.
CPM-113	<i>T. aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (Samuels and W. Gams, 2002)	Hongos El Riojal, Xalapa, Veracruz	Compost de <i>Agaricus bisporus</i>

UREGENHCFyM= Unidad de recursos genéticos de hongos comestibles funcionales y medicinales, Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla.

7.2. Obtención del inóculo

Las cepas CPM-108 de *T. harzianum* (Rifai, 1969), CPM-121 de *T. atroviride* (P. Karsten, 1892) y CPM-113 de *T. aggressivum* f. *aggressivum* (Samuels and W. Gams, 2002) fueron conservadas y sembradas en medio de cultivo de agar con dextrosa y papa (PDA, Bioxon), preparado según las instrucciones del fabricante. El medio estéril se vertió a cajas Petri desechables de 100x15 mm (SYM Laboratorios, México) en una campana de flujo laminar (VECO, México). Solidificado el medio de cultivo se sembraron las cajas con la cepa de estudio y posteriormente se incubaron a temperatura ambiente ($24 \pm 2^\circ\text{C}$).

7.3. Condiciones experimentales

Las condiciones experimentales de la presente investigación se basaron en preparar el testigo, los tratamientos y el blanco para las cepas en estudio.

7.3.1. Esterilización del papel celofán y antraceno

Primero, se recortaron círculos de papel celofán, tomando como molde la base de la caja Petri y luego se cortaron a la mitad. Posteriormente, se colocaron en frascos con agua destilada y se esterilizaron a 121°C durante 25 minutos.

Cada concentración de antraceno (0.4, 0.8 y 1.6 g) se pesó en una balanza analítica (Ohaus, E.U.A.) y se envasaron en sobres de papel de 7 x 5 cm. Los sobres con el antraceno se colocaron en bolsas de polipapel y se esterilizaron a 121°C durante 25 minutos.

7.3.2. Preparación del experimento

Con la finalidad de que todas las cajas Petri tuvieran la misma cantidad de medio de cultivo, se colocaron 25 mL del medio de cultivo en tubos de ensayo de 60 mL de volumen con tapa de baquelita y se esterilizaron a 121°C durante 25 minutos. El medio de cultivo estéril de cada tubo se vació uno a uno en cajas de 100x15 mm y se dejaron solidificar en la cámara de flujo laminar.

Una vez solidificadas las cajas de Petri, se colocó el papel celofán estéril sobre el agar. Posteriormente, se puso el antraceno estéril en cada una de las cajas Petri con el medio de cultivo solidificado en el área que no estaba cubierta por el papel celofán estéril y distribuyéndolo homogéneamente. Cinco fueron las condiciones experimentales en las cajas de Petri con medio de cultivo PDA, a saber:

Control: PDA.

Testigo: Ácido acetilsalicílico 100 µM.

Tx1: 0.4 g de antraceno + ácido acetilsalicílico 100 µM.

Tx2: 0.8 g de antraceno + ácido acetilsalicílico 100 µM.

Tx3: 1.6 g de antraceno + ácido acetilsalicílico 100 µM.

7.3.3 Inoculación de las cajas Petri

La tres cepas en estudio: CPM-108 (*T. harzianum*), CPM-121 (*T. atroviride*) y CPM-113 (*T. aggressivum*), se crecieron previamente en cajas Petri con medio de cultivo de agar con dextrosa y papa (PDA), y con ayuda de popotes estériles se cortaron pequeños círculos de aproximadamente 5 mm de diámetro del área de crecimiento de la colonia del hongo y se colocaron del lado libre de antraceno, como se muestra en la Figura 5.

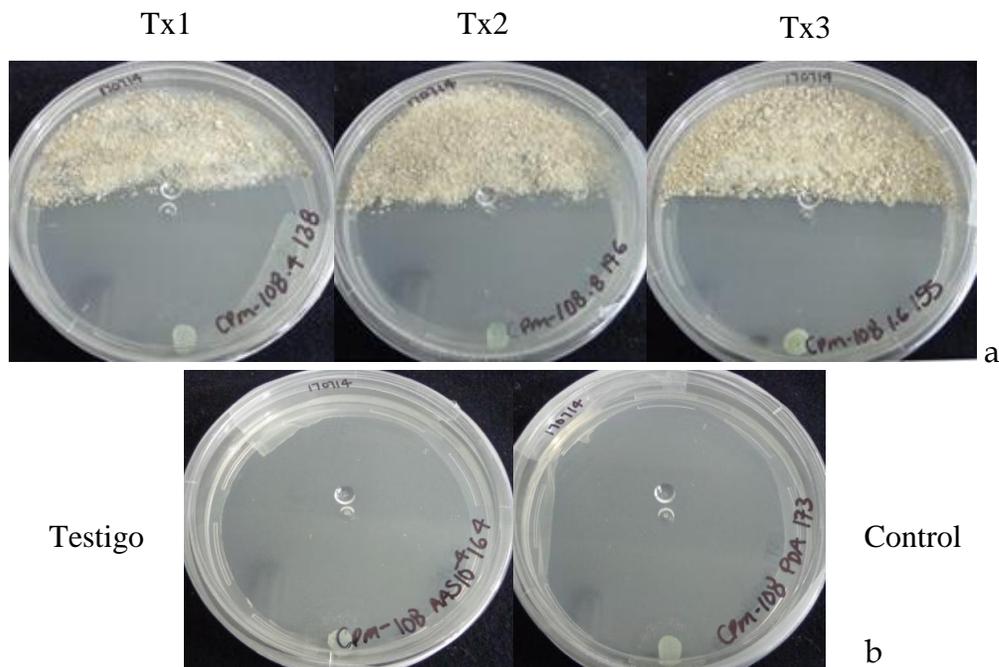


Figura 5. Ubicación del inóculo de las cepas de *Trichoderma*. Cajas con las tres concentraciones de antraceno (arriba), caja testigo y caja blanco (abajo). Control= PDA. Testigo= PDA+AAS 100µM. Tx1= 0.4 g. + AAS 100µM. Tx2= 0.8 g. + AAS 100µM. Tx3= 1.6 g. + AAS 100µM.

7.3.4. Muestreos

Los muestreos realizados se basaran en el crecimiento de cada cepa en estudio para poder medir las variables propuestas. Para el área de la colonia (cm²/día) y velocidad de crecimiento lineal del micelio (cm/día) los días que tardarán las cinéticas se muestran en el cuadro 6.

Cuadro 6. Muestreo para cada cepa durante la cinética de crecimiento.

Registro	Especie	Duración de la cinética (días)
CPM-108	<i>T. harzianum</i>	7
CPM-121	<i>T. atroviride</i>	9
CPM-113	<i>T. aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	12

Con respecto a la producción de esporas y actividad volumétrica de lacasas, la toma de muestra se realizó en los momentos en que la colonia crecía hacia el antraceno. Este muestreo

se basó en lo propuesto por Camacho (2013), empezando con el tiempo antes del contacto o de tocar el antraceno (AC), el tiempo después del contacto (DC) y el tiempo de colonización completa (CC). Estos tiempos fueron diferentes para cada una de las cepas pero bien definidos para estas variables.

7.4. Cinética de crecimiento

7.4.1. Velocidad de crecimiento y área de la colonia

Durante la colonización del hongo en todas las condiciones se describió la morfología, textura, densidad, color, micelio aéreo y borde de la colonia de cada cepa (Cuadro 7).

Cuadro 7. Caracterización de la morfología del crecimiento micelial.

Variable	Descripción
Color	Apariencia visual
Textura	Lanosa, aterciopelada, algodonosa, pulverulenta
Densidad	Abundante, regular, escaso
Micelio aéreo	Escaso, abundante
Borde de la colonia	Regular, irregular

Se captaron imágenes de cada repetición de los tratamientos, testigo y blanco dependiendo de los tiempos de muestreo de cada cepa, para ello se empleó una cámara Cyber-Shot Sony (DSC-W630), colocando las cajas Petri sobre un fondo negro y en el extremo superior se colocó una regla como referencia del tamaño de la caja de Petri y del crecimiento de la colonia. Una vez tomadas las imágenes se analizaron con el programa *ImageJ* 1.47v (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA), a cada imagen se ajustó la escala y se delimitó el contorno de la colonia (Camacho, 2013).

Por otro lado, se midió el diámetro en centímetros del crecimiento micelial desde el inóculo al límite de la colonia por cada toma de muestra, hasta la totalidad de la caja de Petri. Los datos fueron guardados en una hoja de cálculo Excel versión 2010 y se determinó el promedio y la desviación estándar de las réplicas de cada cepa (n= 3).

También se realizó el conteo de esporas en una cámara de Neubauer doble a partir del día tres, empleando la técnica descrita previamente por Martínez-Carrera (1995) y Ramírez (2006). Los resultados del conteo se reportaron en el número de esporas/mL (Fig. 6). Para la

determinación de las lacasas se utilizó el método de Bourbonnais *et al.* (1998). Los resultados obtenidos se exportaron a una hoja de cálculo Excel para su análisis.

7.4.2. Esporulación de las cepas de *Trichoderma*.

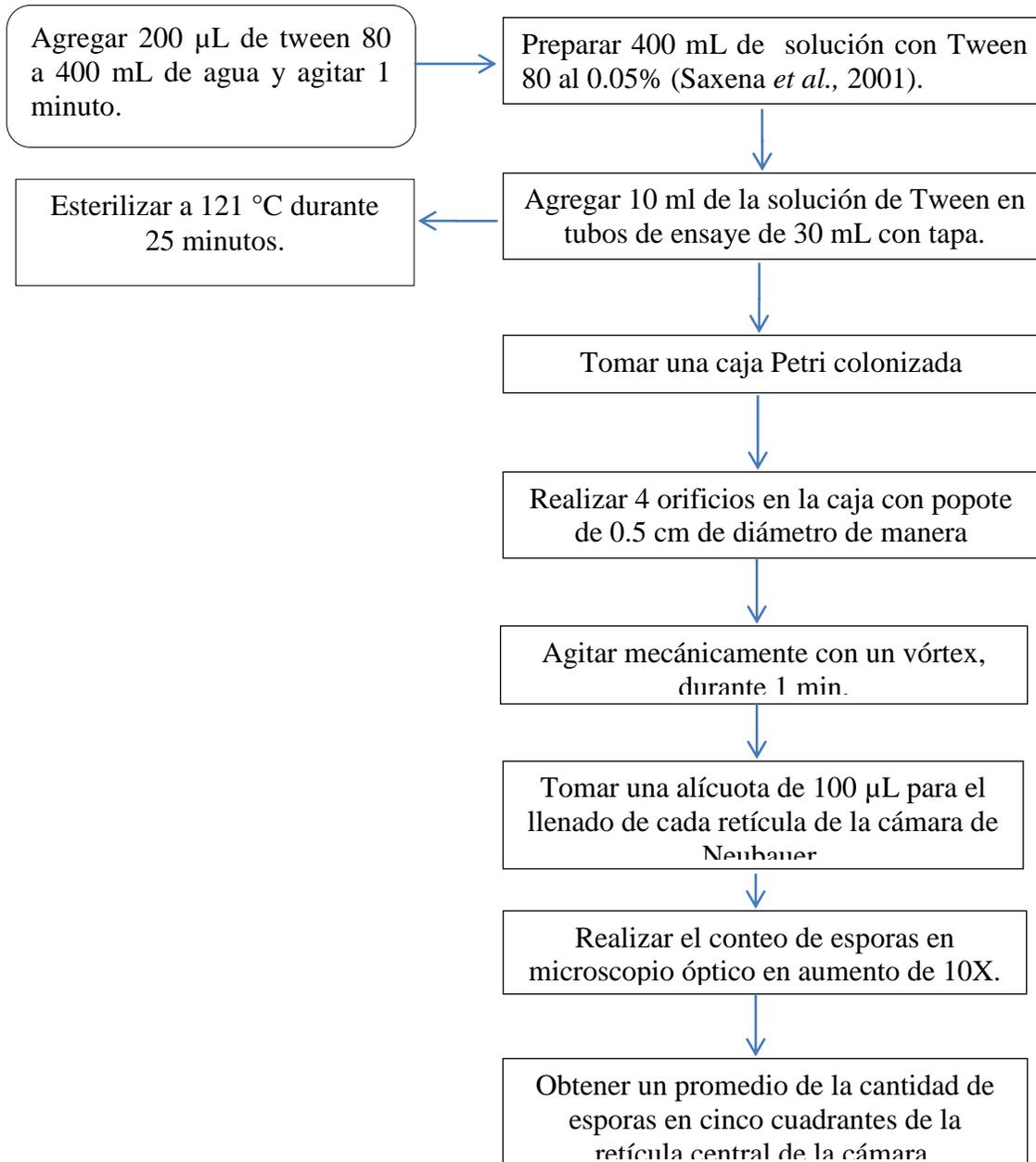


Figura 6. Diagrama para conteo de esporas en la cámara de Neubauer para determinar la concentración de esporas por mL.

Se realizó el conteo de esporas un una cámara de Neubauer (Figura 7) a partir del día tres para las cepas CPM-108 (*T. harzianum*) y CPM-121 (*T. atroviride*) y al día 5 para la CPM-113 (*T. aggressivum* f. *aggressivum*). Para ello conteo se realizó una suspensión de esporas tomando las muestras y utilizando popotes estériles como sacabocados de 0.5 cm de

diámetro de agar colonizado por el micelio de cada una de las tres cepas de *Trichoderma*. Las muestras se tomaron de la caja en series de cuatro inóculos muestreando periferia y centro de la colonia, los cuatro inóculos se colocaron en un tubo de ensayo con 10 mL de agua destilada estéril con Tween al 0.05% (Saxena *et al.*, 2001), se agitaron mecánicamente con un vortex por 30 segundos y se tomó una alícuota de 0.1 mL para el llenado de cada retícula de la cámara de Neubauer, la cual esta estandarizada con la capacidad de 0.0001 mL; repitiendo por duplicado para cada replica.

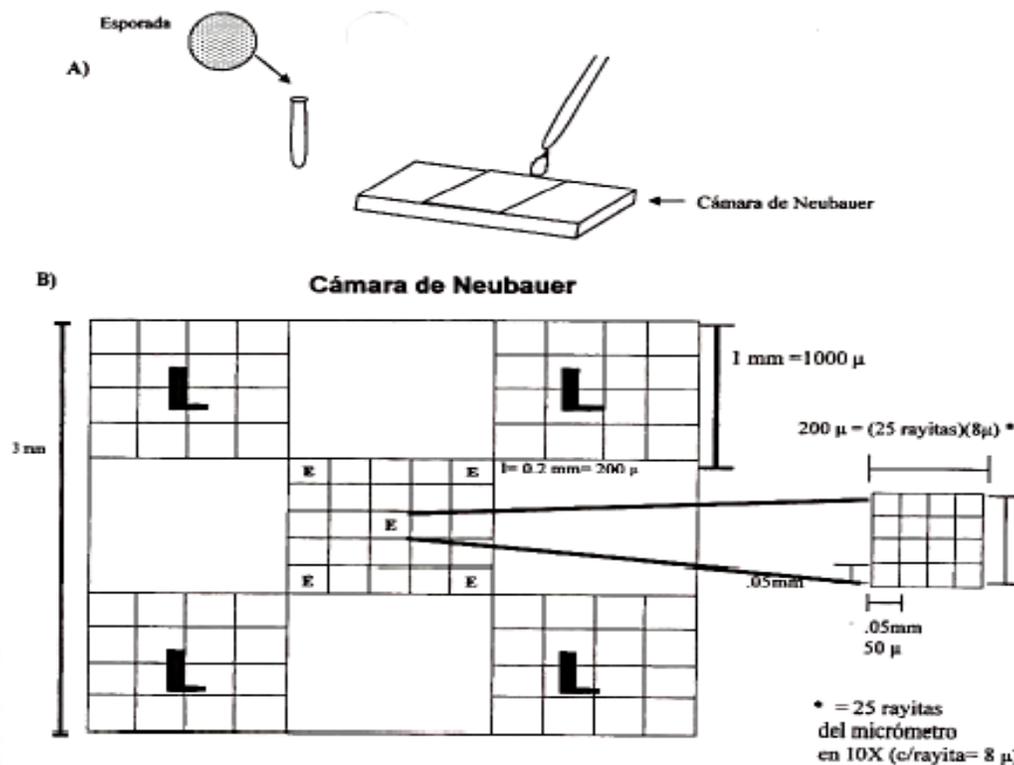


Figura 7. Retícula de la cámara de Neubauer para determinar la concentración de esporas por mL. A) Suspensión de esporas. B) Cuadrantes. C) Donde se realizó el conteo (Ramírez, 2006).

7.5. Determinación de la actividad volumétrica de lacasas

Las muestras se obtuvieron hasta finalizar su crecimiento y en cada tiempo de la toma de muestra se usaron tres cajas tomando la foto a las colonias para la determinación del área y velocidad. Como muestra se tomó todo el contenido de la caja y con una espátula estéril se colocó en un vaso de acero inoxidable estéril de 550 mL y se le agregó 5 mL de buffer de acetato de sodio 0.1 M con un pH de 5. Posteriormente, se homogeneizó en un homogeneizador (Pro 250, Pro Scientific) con un generador de 20 mm x 150 mm estéril a 12000 rpm por tres

minutos. El homogenizado se colocó en un tubo de 50 mL (Oak Teflon FEP, Thermo Scientific Nalgene) estéril y se centrifugó a 10 000 rpm a 21°C (Sigma, 4K14, Alemania) durante 10 minutos. El sobrenadante se vació en viales estériles de 10 mL. y se colocaron a -20 °C hasta su uso.

La actividad de las lacasas se determinó usando ABTS 1 mM, [2,2'-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt] (SIGMA) como sustrato, y como buffer se utilizó acetato de sodio a 0.1 M, pH5 a temperatura ambiente. La reacción se llevó a cabo en una microplaca de poliestireno de 96 pozos con base en forma de U estéril (Kima, Vacutest). La mezcla de la reacción se realizó con ayuda de una pipeta multicanal con 8 puntas (Gilson, Francia), cada pozo contenía lo siguiente: 160 µL de acetato de sodio 0.1 M, pH 5, 20 µL de la muestra o el blanco y 20 µL de ABTS 1 mM. La absorbancia fue medida en un lector de microplacas (Epoch, Biotek) a 420 nm durante ocho minutos con intervalos de un minuto ($\epsilon = 36\,000\text{ M}^{-1}$) (Matsumura *et al.*, 1986). Los resultados obtenidos se exportaron a una hoja de cálculo Excel y se analizaron. Una unidad de actividad de lacasas se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 µmol de ABTS por minuto, usando un coeficiente de extinción de $36\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (Bourbonais y Paice, 1990). (Fig. 8)

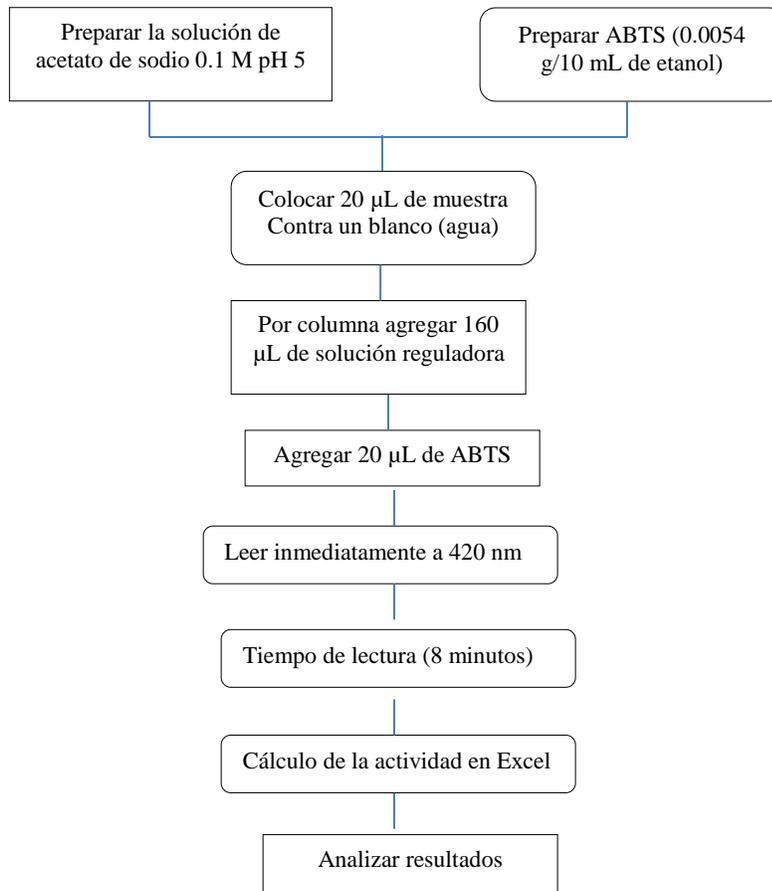


Figura 8. Determinación de la actividad de lacasas por el método de Bourbonnais *et al.* (1998) en microplaca.

7.6. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron con medias y su desviación estándar. Los resultados se analizaron mediante un diseño completamente al azar y se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y se les aplicó la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Todos los análisis se realizaron en el programa SAS 9.0.

VIII. RESULTADOS

8.1 Morfología de las colonias

Los resultados obtenidos durante su crecimiento de las tres cepas de *Trichoderma* en presencia de antraceno permitieron confirmar la tolerancia a este hidrocarburo derivado del petróleo. Sin embargo, cuando el micelio entró en contacto directo con el antraceno, se observó una forma irregular en el crecimiento y el cambio de color, posiblemente debido a una etapa de adaptación, para posteriormente crecer abundantemente, en los tratamientos que en los controles.

8.1.1. CPM-108 de *T. harzianum*

Es una cepa de rápido crecimiento que forma anillos concéntricos hacia el borde, su crecimiento colonial primero es color amarillo, transformándose a un color verde amarillento. El efecto del AAS ocasionó que el color de la colonia iniciara amarillo, transformándose a un color verde, pero en presencia de antraceno (0.4 g +AAS 100 μ M) fue a la inversa, inició verde, transformándose a un color amarillento, y en las diferentes concentraciones de antraceno (0.8 g y 1.6 g de antraceno más AAS 100 μ M) el crecimiento fue menos denso al tener contacto con el antraceno pero creció sobre éste, con una textura algodonosa y micelio aéreo variable (Cuadro 8).

Cuadro 8. Caracterización morfológica de las colonias de la cepa CPM-108 de *Trichoderma harzianum*, cultivada en las diferentes condiciones al final de la cinética.

Condiciones	Color	Textura	Densidad	Micelio aéreo	Borde
Control (PDA)	Verde-amarillento	Algodonosa	Abundante	Escaso	Regular
Testigo (AAS 100 μ M)	Verde- bandera	Algodonosa	Abundante	Escaso	Regular
Tx1 (0.4 g + AAS 100 μ M)	Verde-amarillento	Algodonosa	Abundante	Escaso	Regular
Tx2 (0.8 g + AAS 100 μ M)	Verde-bandera	Algodonosa	Abundante	Regular	Regular
Tx3 (1.6 g + AAS 100 μ M)	Verde-bandera	Algodonosa	Abundante	Regular	Regular

8.1.2. CPM-121 *T. atroviride*

El tiempo en colonizar completamente las cajas en las diferentes condiciones fue de 9 días para ésta cepa. Se observara conidios en medio de la colonia dispersos de manera uniforme, no se observó la formación de pústulas. El efecto del AAS comparado con los demás tratamientos fue de color verde en presencia de antraceno (0.4 g y 0.8 g de antraceno más AAS 100µM) el color fue amarillento y blanco, en la concentración 1.6 g de antraceno más AAS 100µM, y amarillento al inicio y antes del contacto con el antraceno formó un anillo color verde. (Cuadro 9).

Cuadro 9. Caracterización morfológica de las colonias de la cepa CPM-121 de *Trichoderma atroviride*, cultivadas en diferentes condiciones al final de la cinética.

Condiciones	Color	Textura	Densidad	Micelio aéreo	Borde
Control (PDA)	Blanco-Verde-amarillento	Algodonosa	Abundante	Escaso	Regular
Testigo (AAS 100µM)	Verde- blanco	Algodonosa	Regular	Escaso	Irregular
Tx1 (0.4 g + AAS 100 µM)	Amarillento-blanco	Algodonosa	Regular	Escaso	Irregular
Tx2 (0.8 g + AAS 100 µM)	Amarillento	Algodonosa	Regular	Escaso	Irregular
Tx3 (1.6 g + AAS 100 µM)	Amarillento-verde	Algodonosa	Regular	Escaso	Irregular

8.1.3. CPM-113 *T aggressivum f. aggressivum*

La cepa se caracterizó por ser de lento crecimiento en medio PDA, con una formación restringida de conidios al centro, se observó un color amarillento difuso y la formación de los conidios comenzó con un anillo de pústulas blancas que después se tornaron de color amarillo. El tiempo en colonizar completamente las cajas en las diferentes condiciones fue de 12 días. Los diferentes tratamientos mostraron diferencia en el color de la colonia y en presencia del antraceno el crecimiento del hongo fue formando anillos de crecimiento. (Cuadro 10).

Cuadro 10. Caracterización morfológica de las colonias de la cepa CPM-113 (*Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*), cultivadas en diferentes condiciones al final de la cinética.

Condiciones	Color	Textura	Densidad	Micelio aéreo	Borde
Control (PDA)	Amarillento-Verde	Algodonosa	Regular	Escaso	Irregular
Testigo (AAS 100µM)	Amarillento-Verde	Algodonosa	Regular	Escaso	Irregular
Tx1 (0.4 g + AAS 100 µM)	Amarillento	Algodonosa	Regular	Escaso	Irregular
Tx2 (0.8 g + AAS 100 µM)	Blanco	Algodonosa	Regular	Escaso	Irregular
Tx3 (1.6 g + AAS 100 µM)	Blanco	Algodonosa	Regular	Escaso	Irregular

8.2. Área de crecimiento de las cepas

8.2.1. CPM-108 de *T. harzianum*

En la figura 9, se observa el efecto de los tratamientos con el crecimiento micelial en la cepa CPM-108 (*T. harzianum*). Durante los primeros 5 días de crecimiento no hubo diferencia en los cinco tratamientos. Sin embargo, el área de crecimiento fue mayor en el testigo (AAS 100 µM), cuando presentó un área de 49.744 cm² a los siete días de crecimiento. Por otro lado, el tratamiento 2 (0.8 g de antraceno + AAS 100 µM) fue menor su crecimiento a lo largo de la cinética, al final presentó un área de 45.134. La cepa tardó 7 días en colonizar totalmente la caja Petri en todas las condiciones experimentales.

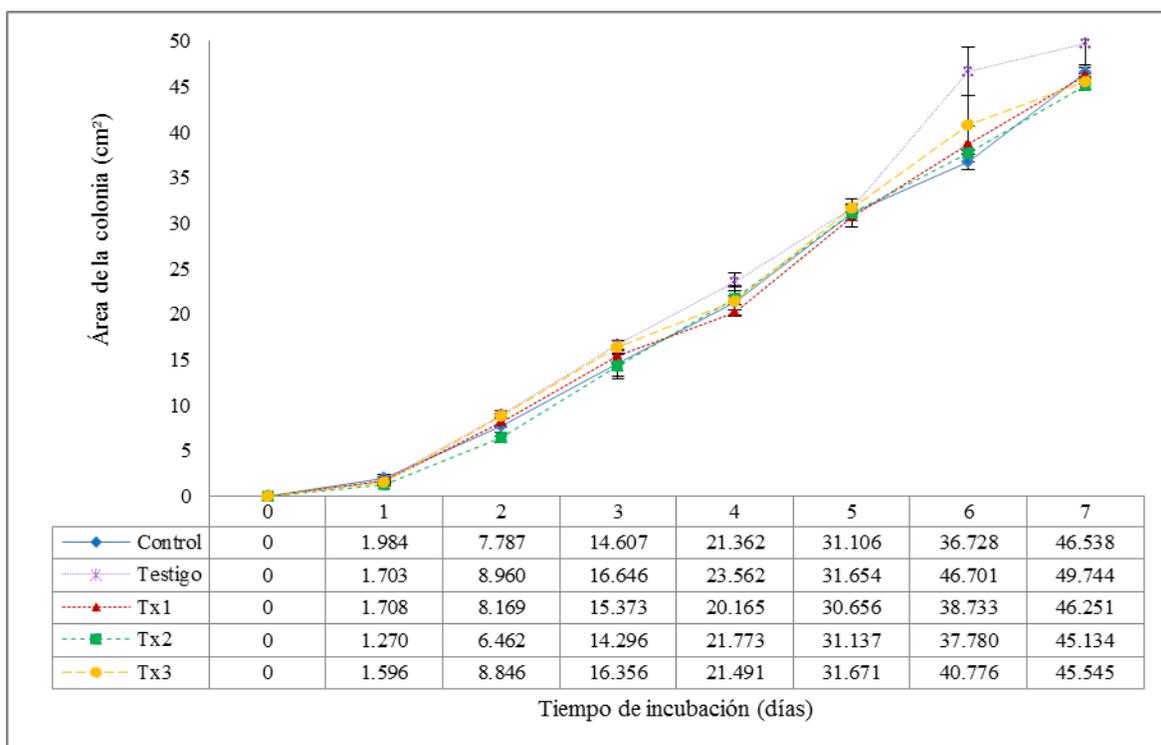


Figura 9. Área de crecimiento de *Trichoderma harzianum* (CPM-108) en medio de cultivo PDA. Control= PDA. Testigo= AAS 100 μ M. Tx1= 0.4 g + AAS 100 μ M. Tx2= 0.8 g + AAS 100 μ M. Tx3= 1.6 g + AAS 100 μ M (Tx3). (n= 3).

8.2.2. CPM-121 de *T. atroviride*

En la figura 10, se observa el efecto de los tratamientos en la cepa CPM-121 (*T. atroviride*). Puede observarse que en las primeras 48 h hubo un crecimiento similar en todos los tratamientos. A partir del día 3 se puede ver una disminución del 27.5% en el área de crecimiento de la cepa en el tratamiento 3 (1.6 g + AAS 100 μ M) con respecto al testigo. El mismo efecto se observó al día 7 entre el blanco y el tratamiento 2 (0.8 g + AAS 100 μ M) donde la diferencia fue del 32.0% entre el primero y el segundo. Al final de la cinética el área de crecimiento fue mayor en el testigo (AAS 100 μ M) con un área de 47.019 cm^2 mientras que el tratamiento 2 (0.8 g de antraceno + AAS 100 μ M), fue menor a lo largo de la cinética, al final en el Tx2 presentó un área de 46.222 cm^2 . Puede notarse que hubo un efecto del antraceno estadísticamente significativo en los tratamientos (Anexo 1). La cepa tardó 9 días en colonizar totalmente la caja Petri.

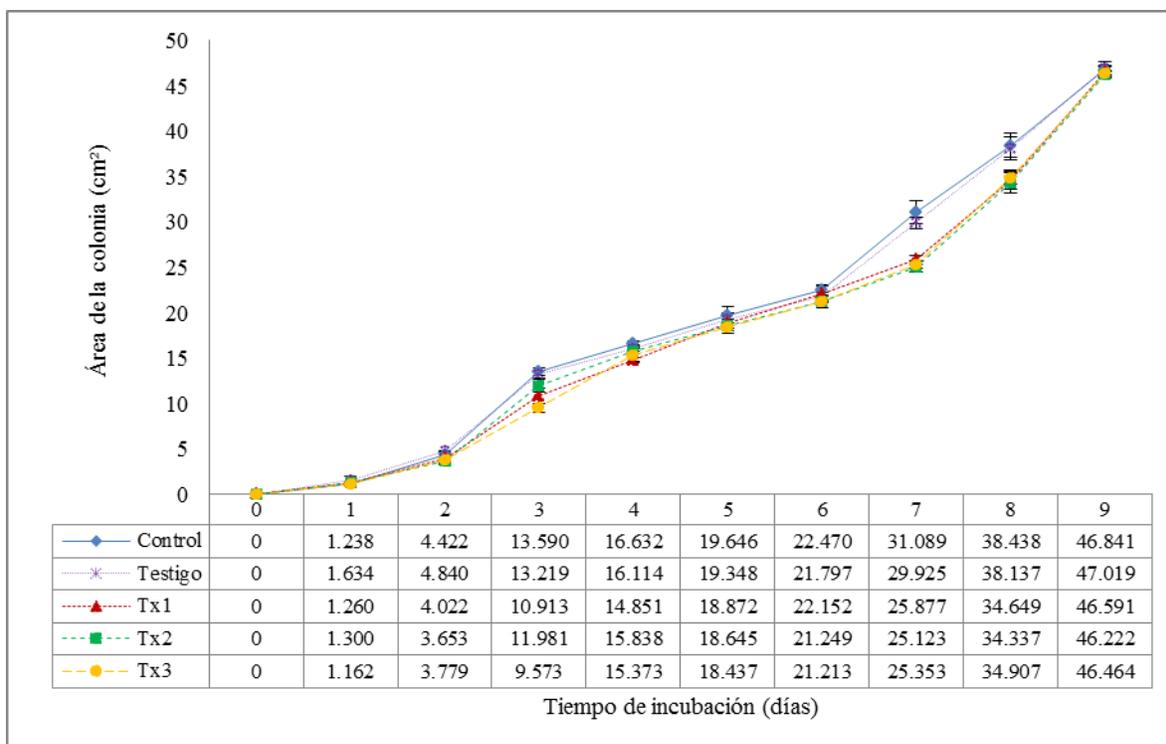


Figura 10. Área de crecimiento de *Trichoderma atroviride* (CPM-121) en medio de cultivo PDA. Control= PDA. Testigo= AAS 100 μ M. Tx1= 0.4 g + AAS 100 μ M. Tx2= 0.8 g + AAS 100 μ M. Tx3= 1.6 g + AAS 100 μ M (Tx3). (n= 3).

8.2.3. CPM-113 de *T. aggressivum f. aggressivum*

En la figura 11, puede observarse que a partir del día 3 hay una disminución del 38% en el área de crecimiento de la cepa en el tratamiento 2 (0.8 g de antraceno + AAS 100 μ M) con respecto al control. El mismo efecto se observa al día 8 entre el testigo y tratamiento 2 (0.8 g de antraceno + AAS 100 μ M), donde la diferencia es del 16.7%. Al final de la cinética el área de crecimiento fue mayor en el testigo (AAS 100 μ M) con un área de 47.058 cm² mientras que el tratamiento 2 (0.8 g de antraceno + AAS 100 μ M) fue menor, alcanzando un área de 46.448. La cepa tardó 12 días en colonizar totalmente la caja Petri.

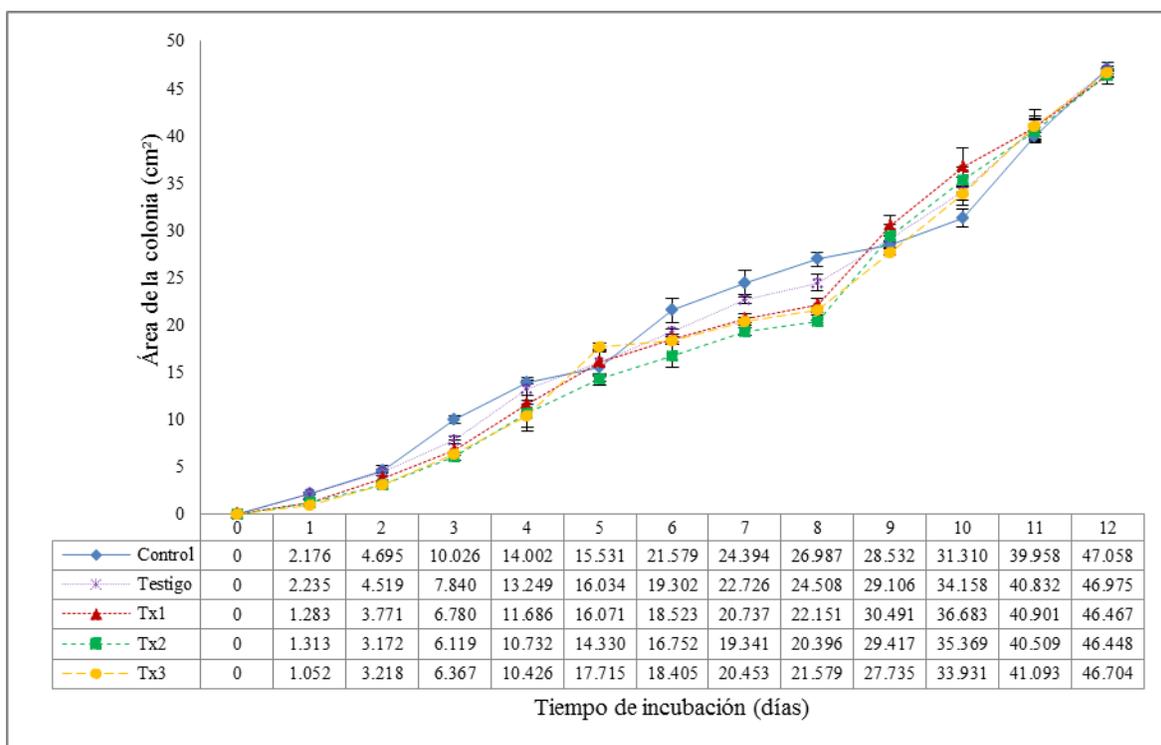


Figura 11. Área de crecimiento de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-113) en medio de cultivo PDA. Control= PDA. Testigo= AAS 100 μ M. Tx1= 0.4 g + AAS 100 μ M. Tx2= 0.8 g + AAS 100 μ M. Tx3= 1.6 g + AAS 100 μ M (Tx3). (n= 3).

8.3. Velocidad de crecimiento de las cepas

Para medir la velocidad de crecimiento se partió del contorno inicial de la colonia que presentó en el tiempo de toma de la muestra. Se expresó en cm día^{-1} .

8.3.1. CPM-108 de *T. harzianum*

En la figura 12 se observa la velocidad de crecimiento de *T. harzianum* (CPM-108) en los diferentes tratamientos, el testigo y blanco. A mayor concentración de antraceno el crecimiento es más lento, pero constante hasta el término de la cinética. Puede observarse que en los días 2 y 3 se presenta éste efecto con una diferencia del 30.91% y 17.10% entre el testigo y el tratamiento, respectivamente. Es posible que la cepa pudiera haberse adaptado a las condiciones del antraceno, pues se sabe que los hongos contienen un sistema enzimático altamente eficiente capaz de degradar compuestos complejos. Al final de la cinética de velocidad de crecimiento fue mayor en el testigo (AAS 100 μ M) con 6.996 cm mientras que el tratamiento 2 (0.8 g de antraceno + AAS 100 μ M) tuvo 6.955 cm . A los 7 días de incubación el micelio colonizó toda la caja Petri.

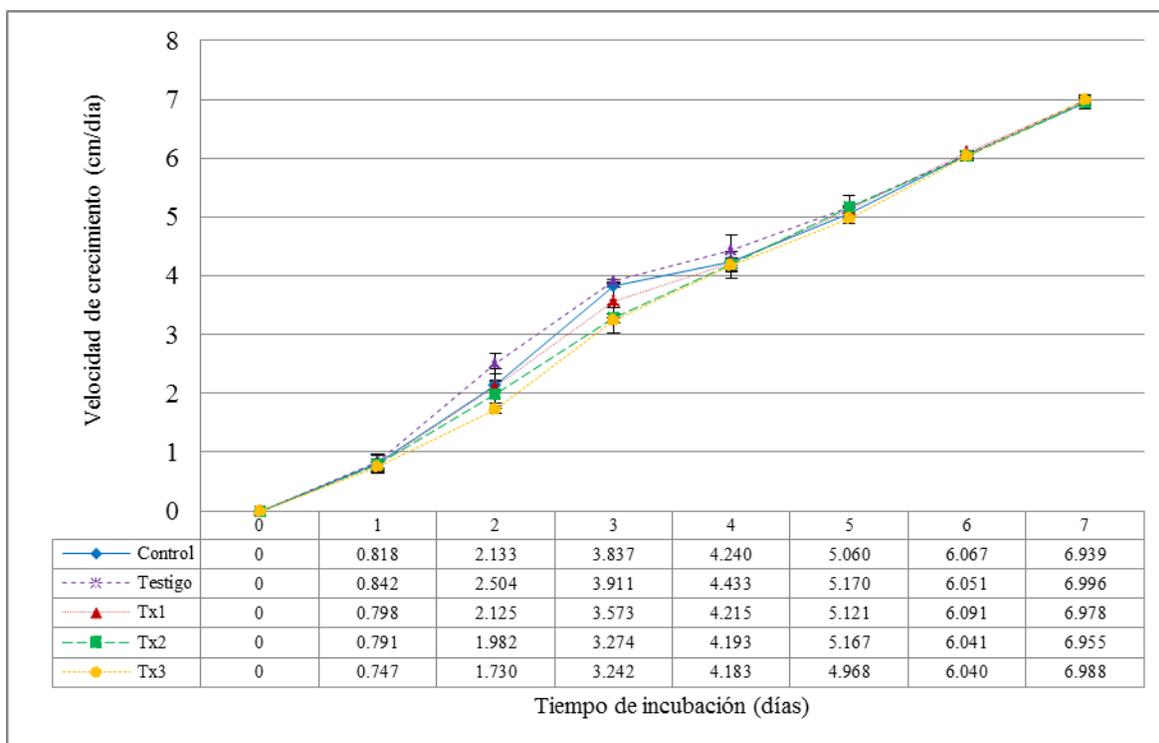


Figura 12. Velocidad de crecimiento de *Trichoderma harzianum* (CPM-108) en medio de cultivo PDA. Control= PDA. Testigo= AAS 100 μ M. Tx1= 0.4 g + AAS 100 μ M. Tx2= 0.8 g + AAS 100 μ M. Tx3= 1.6 g + AAS 100 μ M (Tx3). (n= 3).

8.3.2. CPM-121 de *T. atroviride*

La velocidad de crecimiento de testigo (AAS 100 μ M) y tratamientos fue mayor durante la cinética de velocidad de crecimiento (fig. 13). A los 4 días de incubación el testigo presentó 3.394 cm y el tratamiento 3 (1.6 g de antraceno + AAS 100 μ M) 2.829 cm. Puede observarse el mismo efecto a los 7 días con 5.512 cm en el testigo (AAS 100 μ M) y 4.857 cm en el tratamiento 3 (1.6 g de antraceno + AAS 100 μ M), lo que presenta una diferencia de 11.88%. A los 9 días de incubación el micelio colonizó toda la caja Petri, lo que indica que el antraceno en las tres concentraciones utilizadas no tuvo ningún efecto inhibitorio, esta característica puede ser útil para utilizarse en suelos altamente contaminados por este compuesto.

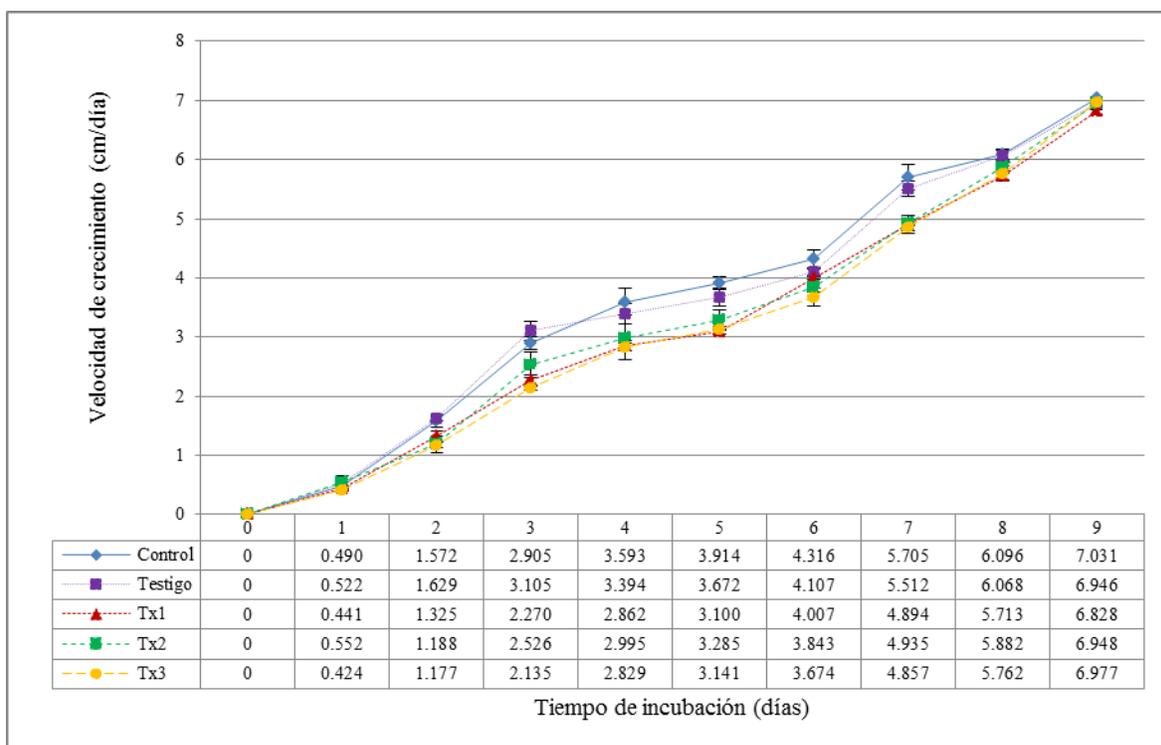


Figura 13. Velocidad de crecimiento de *Trichoderma atroviride* (CPM-121) en medio de cultivo PDA. Control= PDA. Testigo= AAS 100 μ M. Tx1= 0.4 g + AAS 100 μ M. Tx2= 0.8 g + AAS 100 μ M. Tx3= 1.6 g + AAS 100 μ M (Tx3). (n= 3).

8.3.3. CPM-113 de *T. aggressivum* f. *aggressivum*

En la figura 14 puede observarse que no se presentó una diferencia significativa (ver anexo 6) entre el testigo (AAS 100 μ M) y los tratamientos (0.4 g, 0.8 g y 1.6 g de antraceno + AAS 100 μ M). Al final de la cinética de velocidad de crecimiento fue de 6.937 cm para el testigo (AAS 100 μ M) y 6.817 cm para el tratamiento 1 (0.4 g de antraceno + AAS 100 μ M), por lo que se observa una diferencia muy mínima de 1.72%. Esta cepa fue la más lenta en crecer y lo hizo a los 12 días de incubación. Es posible que la cepa, también pudiera haberse adaptado a las condiciones del antraceno, porque no se observó ningún efecto inhibitorio, a pesar de su lento crecimiento.

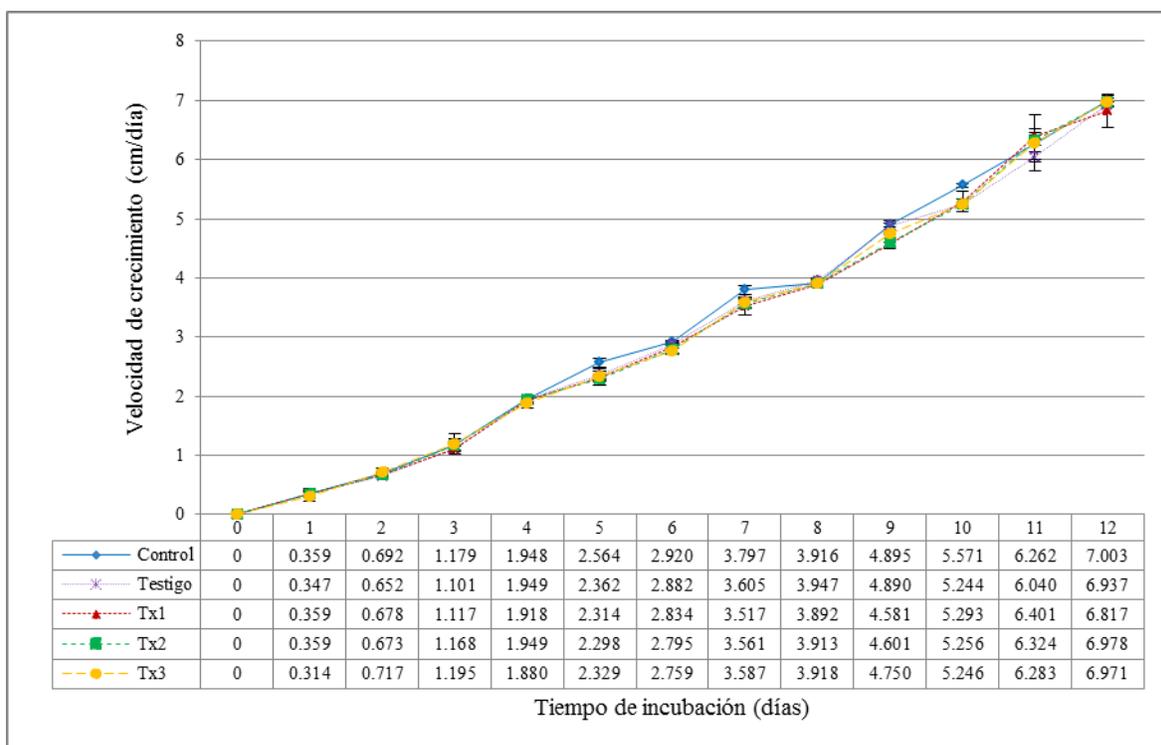


Figura 14. Velocidad de crecimiento de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-113) en medio de cultivo PDA. Control= PDA. Testigo= AAS 100 μ M. Tx1= 0.4 g + AAS 100 μ M. Tx2= 0.8 g + AAS 100 μ M. Tx3= 1.6 g + AAS 100 μ M (Tx3). (n= 3).

8.4. Producción de esporas

Los tiempos en días fueron diferentes para cada una de las cepas debido al tiempo de crecimiento de cada una de ellas. Se empezó con el tiempo antes del contacto o de tocar el antraceno (AC), el tiempo después del contacto (DC) y el tiempo de colonización completa (CC).

8.4.1. CPM-108 de *T. harzianum*

La producción de esporas se vio afectada por las concentraciones de antraceno, con respecto a la cepa *T. harzianum* CPM-108, el efecto sobre la disminución en el número de esporas, fue más notable en la concentración más alta de antraceno (1.6 g) la cual obtuvo 1.5×10^6 esporas mL^{-1} mientras que el testigo fue 2.6×10^6 esporas mL^{-1} (Fig. 15). Esto indica que la cantidad de esporas encontradas para esta cepa fue mínima comparada con el testigo, con excepción del quinto día (DC) en el testigo (ASS 100 μ M), mostró mayor cantidad de esporas que el control, dando una diferencia de 2.4×10^5 esporas mL^{-1} . Se observó que la producción de esporas fue

incrementando con los días de crecimiento de la cepa y que a mayor concentración de antraceno menor producción de esporas.

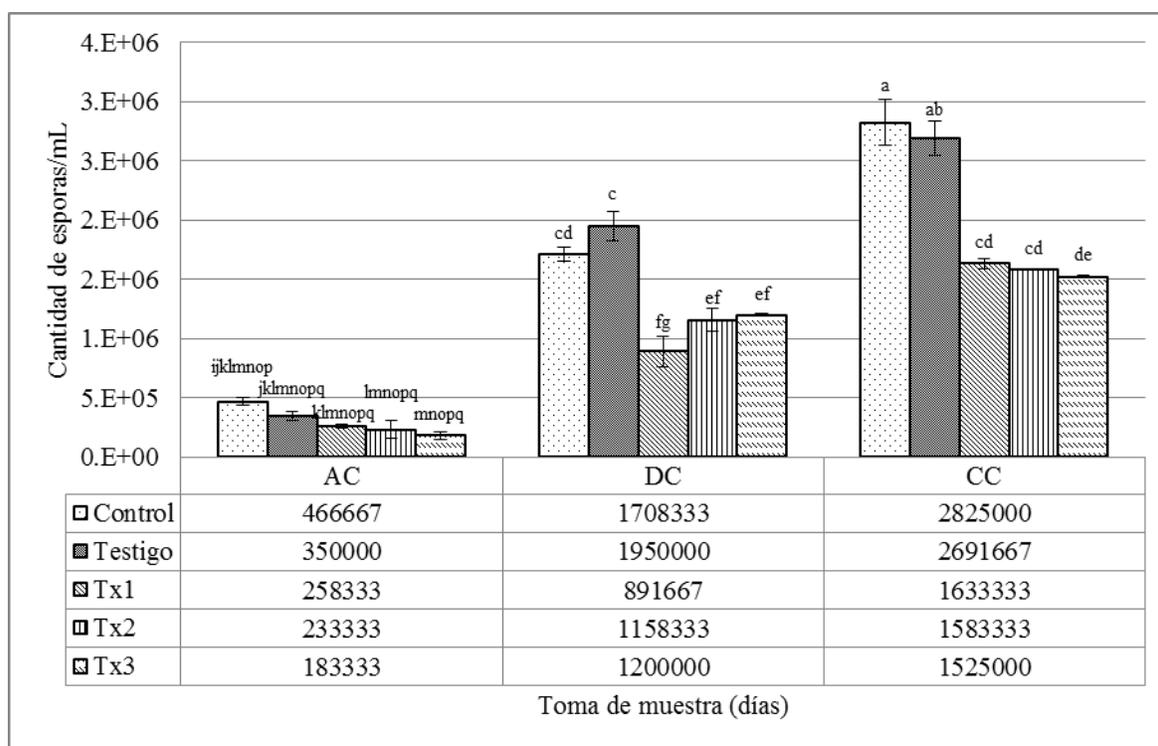


Figura 15. Producción de esporas por mL de la colonia de la cepa: CPM-108 *Trichoderma harzianum*. Control=PDA. Testigo=AAS 100 μ M. Tx1=0.4 g + AAS 100 μ M. Tx2=0.8 g + AAS 100 μ M. Tx3=1.6 g + AAS 100 μ M. AC= 3días. DC= 5 días. CC= 7 días. Las barras de error muestran la desviación estándar (n=3). Los datos representan las medias y la desviación estándar de las medidas de tres réplicas. Los valores estadísticamente homogéneos del mismo parámetro están marcados con la misma letra (ANOVA, Tukey $p < 0.05$).

La morfología de la colonia, color y forma de crecimiento se observan en la figura 16. En los momentos del muestreo para el conteo de las esporas la variación es notoria entre el blanco, el testigo y los 3 tratamientos.

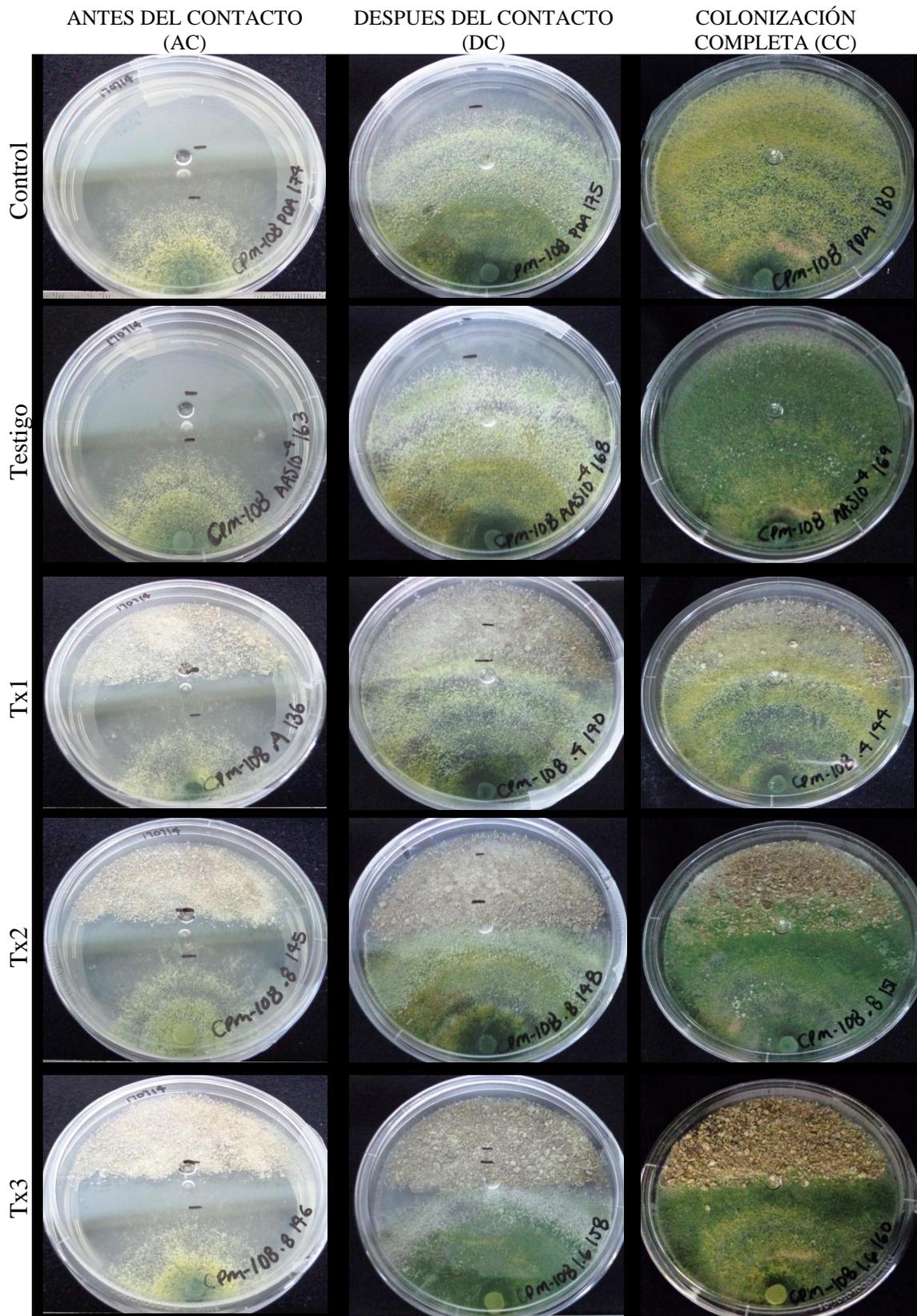


Figura 16. Muestreo de la cepa de *Trichoderma harzianum* (CPM-108) en medio de cultivo PDA para la producción de esporas y actividad enzimática. Control= PDA. Testigo= PDA+AAS 100 μ M. Tx1= 0.4 g. + AAS 100 μ M. Tx2= 0.8 g. + AAS 100 μ M. Tx3= 1.6 g. + AAS 100 μ M. AC= 3 días de incubación. DC= 5 días de incubación. CC= 7 días de incubación.

8.4.2. CPM-121 de *T. atroviride*

La producción de esporas (Fig. 17) se vio afectada por las concentraciones de antraceno, en la cepa *T. atroviride* CPM-121 el efecto sobre la disminución en el número de esporas, fue más notable para la concentración más alta de antraceno (1.6 g) la cual obtuvo 6.1×10^5 esporas mL^{-1} mientras que para el testigo fue 1.8×10^6 esporas mL^{-1} . Esto indica que la cantidad de esporas encontradas para esta cepa se mantuvo por debajo del testigo. Se observó que la producción de esporas fue incrementando con los días de crecimiento de la cepa y que a mayor concentración de antraceno menor producción de esporas.

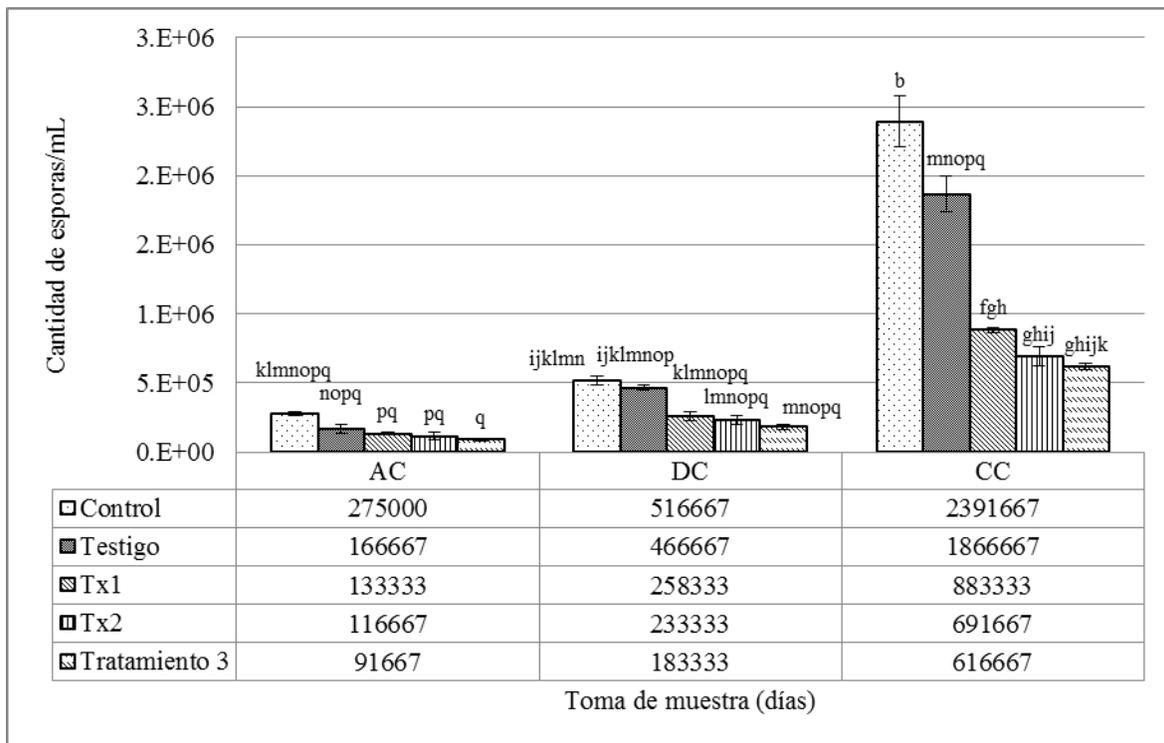


Figura 17. Producción de esporas por mL de la colonia de las cepa: CPM-121 *Trichoderma atroviride*. Control= PDA. Testigo= AAS 100 μM . Tx1= 0.4 g + AAS 100 μM . Tx2= 0.8 g + AAS 100 μM . Tx3= 1.6 g + AAS 100 μM . AC= 5 días. DC= 7 días. CC= 9 días. Las barras de error muestran la desviación estándar ($n= 3$). Los datos representan las medias y la desviación estándar de las medidas de tres réplicas. Los valores estadísticamente homogéneos del mismo parámetro están marcados con la misma letra (ANOVA, Tukey $p<0.05$).

La morfología de la colonia, color y forma de crecimiento se observan en la figura 18. En los momentos del muestreo para el conteo de las esporas la variación es notoria entre el blanco, el testigo y los 3 tratamientos.

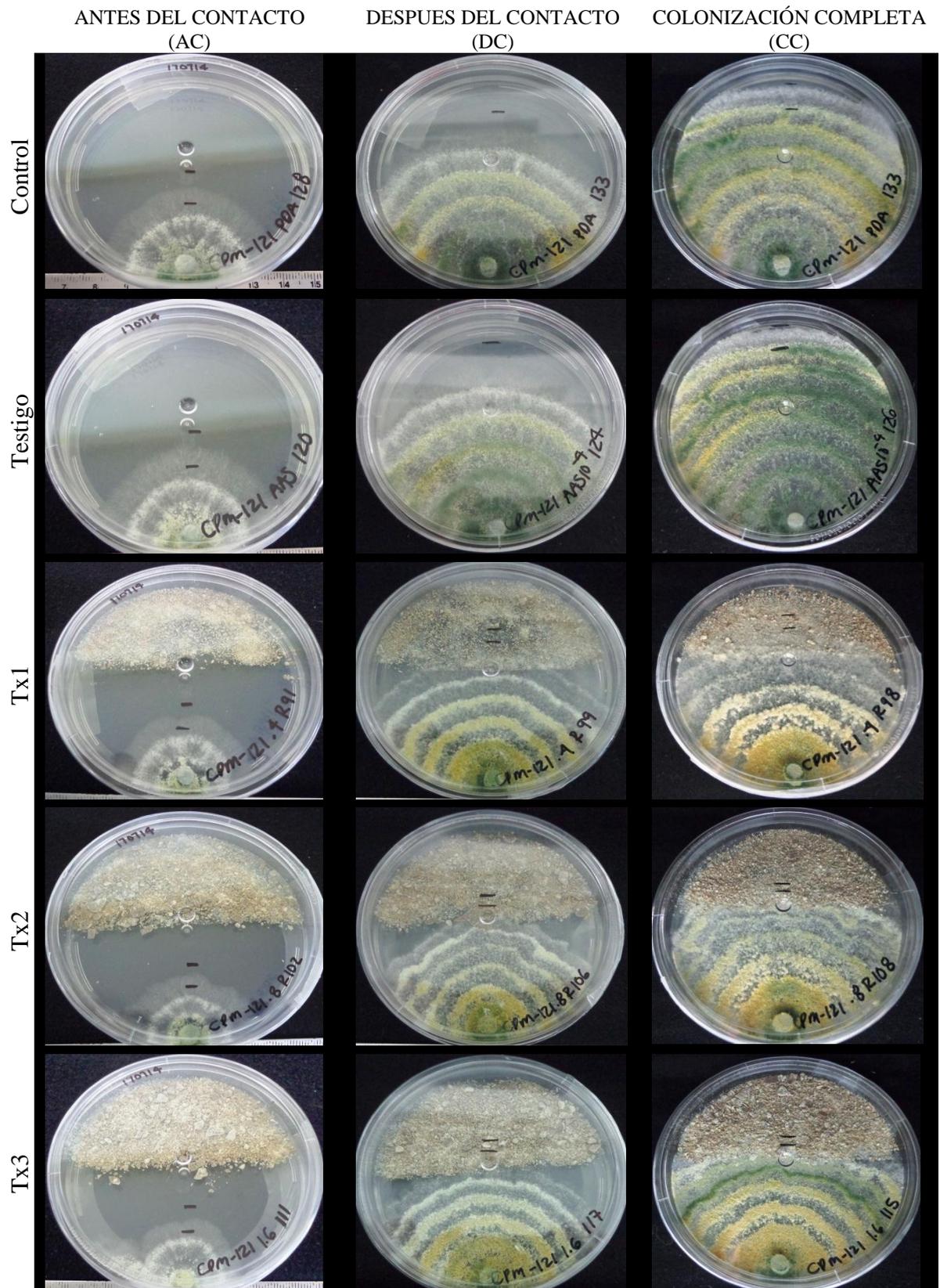


Figura 18. Muestreo de la cepa de *Trichoderma atroviride* (CPM-121) en medio de cultivo PDA para la producción de esporas y actividad enzimática. Control= PDA. Testigo= PDA+AAS 100 μ M. Tx1= 0.4 g. + AAS 100 μ M. Tx2= 0.8 g. + AAS 100 μ M. Tx3= 1.6 g. + AAS 100 μ M. AC= 5 días de incubación. DC= 7 días de incubación. CC= 9 días de incubación.

8.4.3. CPM-113 de *T. aggressivum* f. *aggressivum*

La cepa CPM-113 de *T. aggressivum* f. *aggressivum* se vio afectada por las concentraciones de antraceno. La concentración más alta de antraceno afectó la cantidad de esporas encontradas, aunque ésta se observa más homogénea en el resto de las condiciones producidas, la producción fue muy baja comparada con las demás cepas en estudio (Fig. 19). La cantidad de esporas que obtuvo la concentración más baja de antraceno al tiempo final fue de 3.5×10^5 esporas mL^{-1} , en comparación con el testigo que tuvo una producción al tiempo final de 6.0×10^5 esporas mL^{-1} .

La morfología de la colonia, color y forma de crecimiento se observan en la figura 20. En los momentos del muestreo para el conteo de las esporas la variación es notoria entre el blanco, el testigo y los 3 tratamientos.

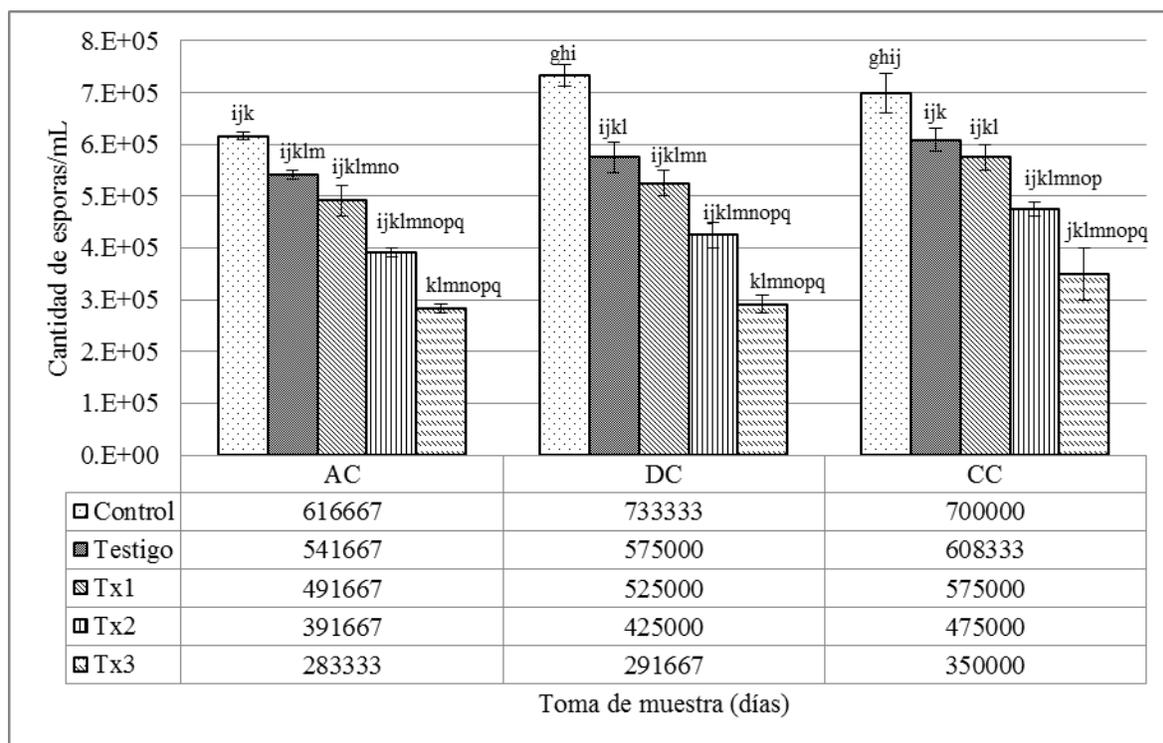


Figura 19. Producción de esporas por mL de la colonia de las cepa: CPM-113 *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*. Control= PDA. Testigo=AAS 100 μM . Tx1= 0.4 g + AAS 100 μM . Tx2= 0.8 g + AAS 100 μM . Tx3= 1.6 g + AAS 100 μM . AC= 5 días. DC= 9 días. CC= 12 días. Las barras de error muestran la desviación estándar (n= 3). Los datos representan las medias y la desviación estándar de las medidas de tres réplicas. Los valores estadísticamente homogéneos del mismo parámetro están marcados con la misma letra (ANOVA, Tukey $p < 0.05$).

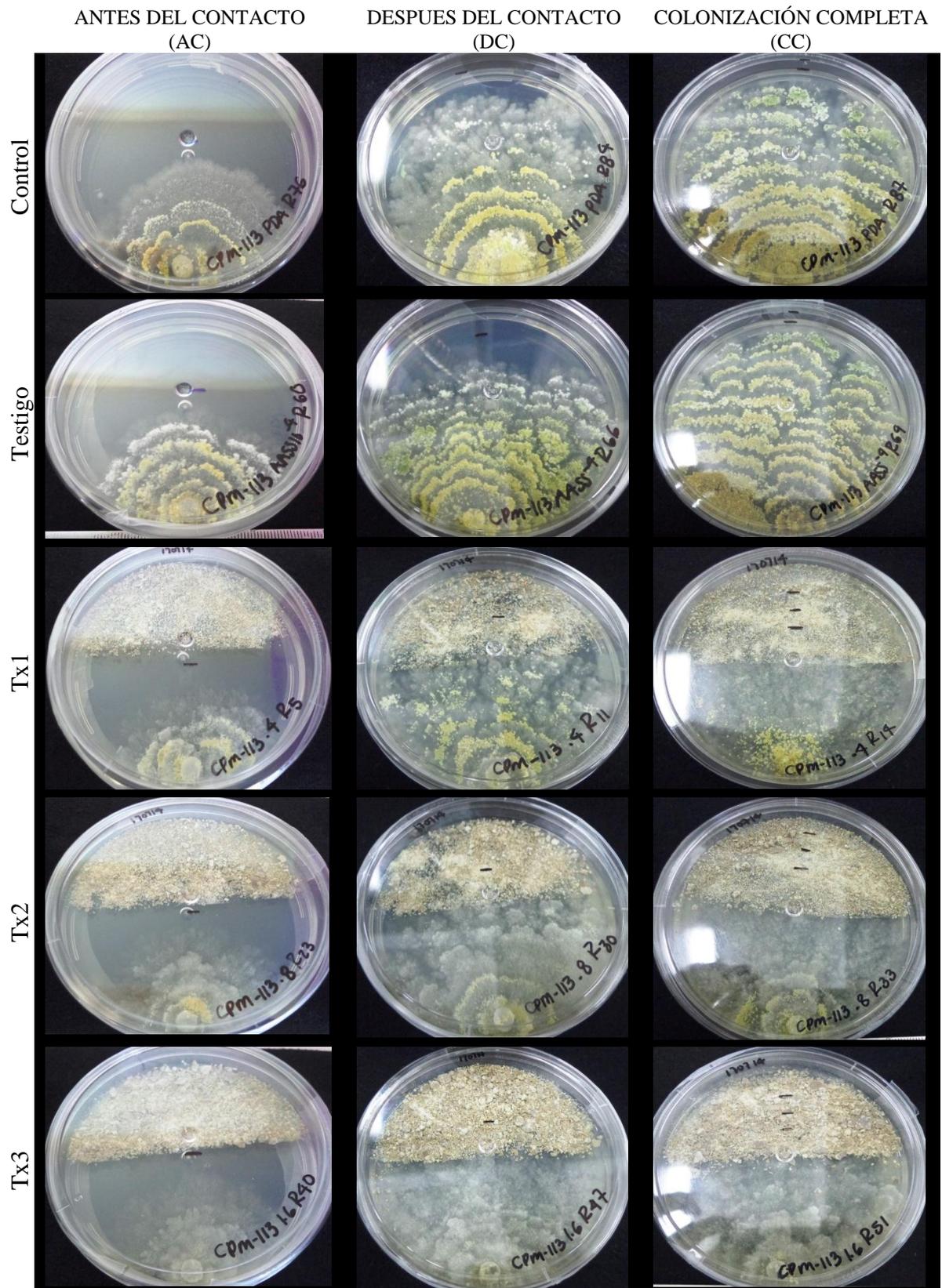


Figura 20. Muestreo de la cepa de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-113) en medio de cultivo PDA para producción de esporas y actividad enzimática. Control= PDA. Testigo= PDA+AAS 100 μ M. Tx1= 0.4 g. + AAS 100 μ M. Tx2= 0.8 g. + AAS 100 μ M. Tx3= 1.6 g. + AAS 100 μ M. AC= 5 días de incubación. DC= 9 días de incubación. CC= 12 días de incubación.

La producción de esporas se vio afectada por las concentraciones de antraceno en comparación con el testigo en las tres cepas (Cuadro11). En la cepa CPM-108 de *T. harzianum* el efecto más notable fue en la concentración más alta de antraceno (1.6 g) donde se obtuvo 1.5×10^6 esporas mL^{-1} mientras que en el testigo se obtuvieron 2.6×10^6 esporas mL^{-1} . Esto indica que la cantidad de esporas encontradas para esta cepa tuvo una diferencia de 1.1×10^6 .

La cepa CPM-121 de *T. atroviride*, también se vio afectada por las concentraciones de antraceno en los primeros días, mientras el testigo produjo 1.6×10^5 esporas mL^{-1} la producción más alta se obtuvo en la concentración 0.4 g de antraceno + AAS 100 μM siendo 1.3×10^5 esporas mL^{-1} . Al tiempo final de ésta cepa el testigo obtuvo una producción de 1.8×10^6 esporas mL^{-1} y en la concentración de 1.6 g de antraceno + AAS 100 μM (Tx3) fue de 6.1×10^5 esporas mL^{-1} . A pesar que la producción de esporas se vio incrementada al tiempo final en los diferentes tratamientos, se observó que a mayor concentración de antraceno menor producción de esporas.

Lo mismo sucedió con la cepa CPM-113 de *T. aggressivum* f. *aggressivum*, la cual resultó afectada por la concentración más alta de antraceno con respecto a las esporas producidas, aunque esta se observa más homogénea en los diferentes tratamientos. La producción fue muy baja comparada con las demás cepas en estudio. La cantidad de esporas que obtuvo con la concentración de antraceno (1.6 g) al tiempo final fue de 3.5×10^5 esporas mL^{-1} , en comparación con el testigo que tuvo una producción al tiempo final de 6.0×10^5 esporas mL^{-1} .

Cuadro 11. Producción de esporas de las cepas CPM-108 de *Trichoderma harzianum*, CPM-121 de *Trichoderma atroviride* y CPM-113 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* en las diferentes muestras.

Muestreo	Condición	CPM-108	CPM-113	CPM-121
AC	Control	4.6x10 ⁵ ±30046.26 ^{ijklmnop}	6.1x10 ⁵ ±8333.33 ^{ijk}	2.7x10 ⁵ ±14433.76 ^{klmnopq}
	Testigo	3.5x10 ⁵ ±38188.13 ^{ijklmnopq}	5.4x10 ⁵ ±8333.33 ^{ijklm}	1.6x10 ⁵ ±30046.26 ^{nopq}
	Tx1	2.5x10 ⁵ ±16666.67 ^{klmnopq}	4.9x10 ⁵ ±30046.26 ^{ijklmno}	1.3x10 ⁵ ±8333.33 ^{Opq}
	Tx2	2.3x10 ⁵ ±71200.03 ^{lmnopq}	3.9x10 ⁵ ±8333.33 ^{ijklmnopq}	1.1x10 ⁵ ±30046.26 ^{pq}
	Tx3	1.8x10 ⁵ ±33333.33 ^{mnpq}	2.8x10 ⁵ ±8333.33 ^{klmnopq}	9.1x10 ⁴ ±8333.33 ^q
DC	Control	1.7x10 ⁶ ±58333.33 ^{cd}	7.3x10 ⁵ ±22047.93 ^{ghi}	5.1x10 ⁵ ±33333.33 ^{ijklmn}
	Testigo	1.9x10 ⁶ ±125830.57 ^c	5.7x10 ⁵ ±28867.51 ^{ijkl}	4.6x10 ⁵ ±22047.93 ^{ijklmnop}
	Tx1	8.9x10 ⁵ ±126106.22 ^{fg}	5.2x10 ⁵ ±25000 ^{ijklmn}	2.5x10 ⁵ ±30046.26 ^{klmnopq}
	Tx2	1.1x10 ⁶ ±98248.55 ^{ef}	4.2x10 ⁵ ±25000 ^{ijklmnopq}	2.3x10 ⁵ ±30046.26 ^{lmnopq}
	Tx3	1.2x10 ⁶ ±14433.76 ^{ef}	2.9x10 ⁵ ±16666.67 ^{klmnopq}	1.8x10 ⁵ ±16666.67 ^{mnpq}
CC	Control	2.8x10 ⁶ ±195256.24 ^a	7.0x10 ⁵ ±38188.13 ^{ghij}	2.3x10 ⁶ ±183900.64 ^b
	Testigo	2.6x10 ⁶ ±148136.57 ^{ab}	6.0x10 ⁵ ±22047.93 ^{ijk}	1.8x10 ⁶ ±130968.61 ^{cd}
	Tx1	1.6x10 ⁶ ±46398.04 ^{cd}	5.7 ⁵ ±25000 ^{ijkl}	8.8x10 ⁵ ±16666.67 ^{fgh}
	Tx2	1.5x10 ⁶ ±8333.33 ^{cd}	4.7x10 ⁵ ±14433.76 ^{ijklmnop}	6.9x10 ⁵ ±71200.03 ^{ghij}
	Tx3	1.5x10 ⁶ ±14433.76 ^{de}	3.5x10 ⁵ ±50000 ^{ijklmnopq}	6.1x10 ⁵ ±22047.93 ^{ghijk}

Los datos representan las medias y la desviación estándar de las medidas de tres réplicas. Los valores estadísticamente homogéneos del mismo parámetro están marcados con la misma letra (ANOVA, Tukey p<0.05). Control= PDA. Testigo= PDA+AAS 100 µM. Tx1= 0.4 g. + AAS 100 µM. Tx2= 0.8 g. + AAS 100 µM. Tx3= 1.6 g. + AAS 100 µM. AC= Antes del contacto de la cepa con el antraceno. DC= Después del contacto de la cepa con el antraceno. CC= Colonización completa de la cepa en presencia del antraceno.

8.5. Actividad volumétrica de lacasas

8.5.1. CPM-108 de *T. harzianum*

La cepa CPM-108 (*T. harzianum*) mostró gran capacidad, ya que toleró y creció en altas concentraciones de antraceno. Podemos observar que a mayor concentración de antraceno, se presentó mayor producción de lacasas. En el tiempo 0 la actividad de lacasas fue 0; a los 3 días antes del contacto de la cepa con antraceno (AC), presentó actividad en el tratamiento 3 (1.6 g + AAS 100 µM), de 0.04 U mL⁻¹ y a los 5 días después del contacto de la cepa con el antraceno (DC) del tratamiento 2 (0.8 g + AAS 100 µM) tuvo una actividad de lacasas de 0.08 U mL⁻¹ (Fig. 21).

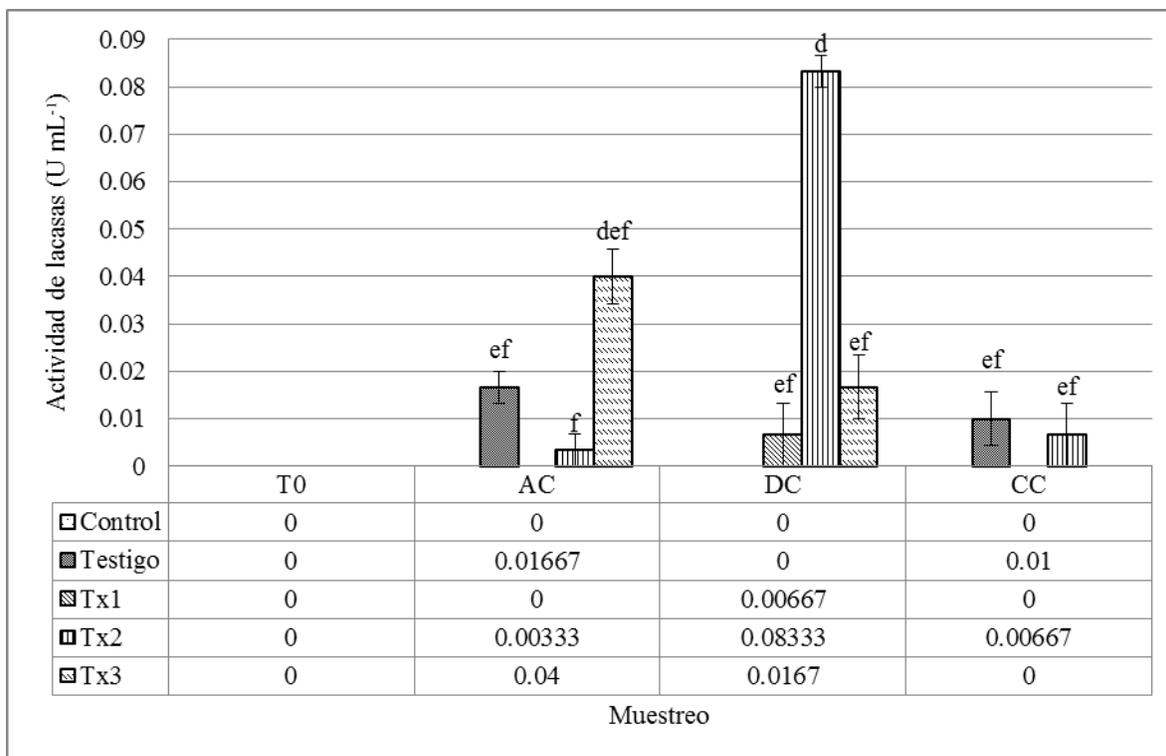


Figura 21. Actividad volumétrica de lacasas de la cepa CPM-108 *Trichoderma harzianum*. T0= Tiempo cero. AC= Antes del contacto del micelio con el antraceno. DC= Después del contacto del micelio con el antraceno. CC= Colonización completa de la colonia en presencia del antraceno. Control= PDA. Testigo= AAS 100 μM . Tx1= 0.4 g + AAS 100 μM . Tx2= 0.8 g + AAS 100 μM . Tx3= 1.6 g + AAS 100 μM . Las barras de error muestran la desviación estándar ($n= 3$). Los datos representan las medias y la desviación estándar de las medidas de tres réplicas. Los valores estadísticamente homogéneos del mismo parámetro están marcados con la misma letra (ANOVA, Tukey $p<0.05$).

8.5.2. CPM-121 de *T. atroviride*

En la figura 22, podemos observar la producción de lacasas de la cepa CPM-121 de *T. atroviride*. Puede notarse que en el tiempo cero no hay actividad en ninguna condición. A los 5 días antes del contacto del micelio con el antraceno (AC) presentó 0.85 U mL^{-1} en el tratamiento 3 (1.6 g + AAS 100 μM), y a los 7 días después del contacto del micelio con el antraceno (DC), tuvo una actividad de lacasas de 0.83 U mL^{-1} en el mismo tratamiento.

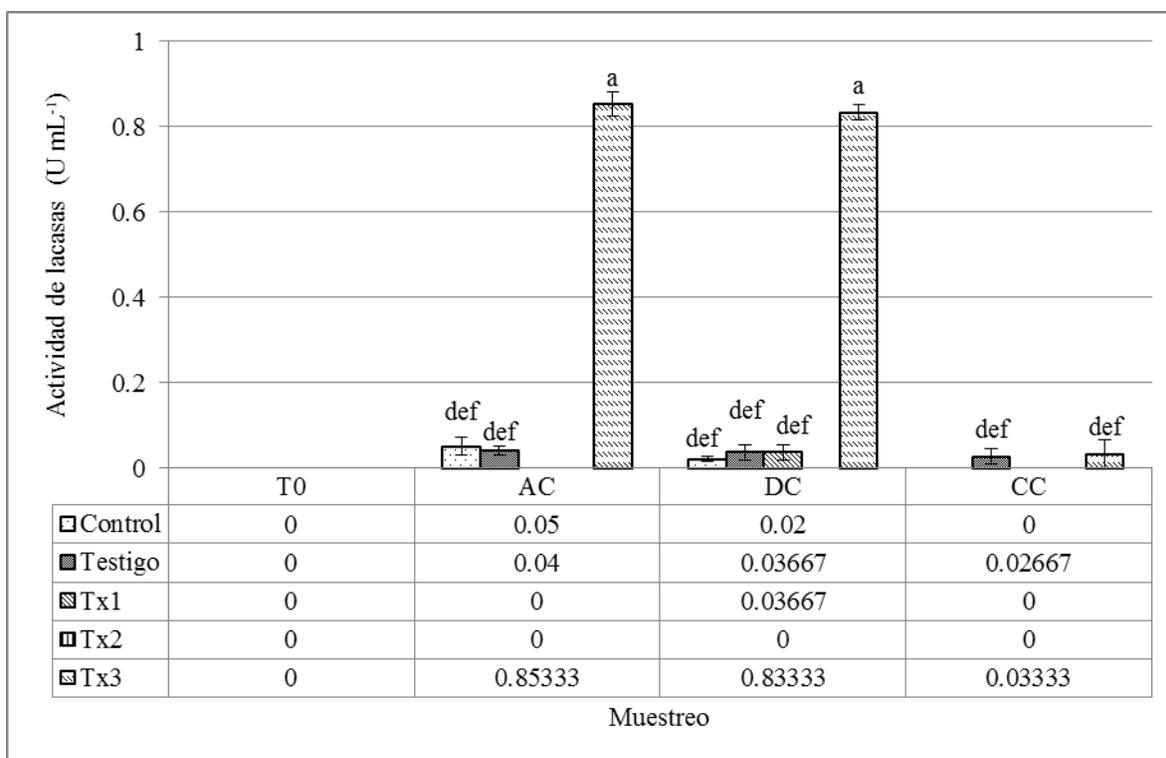


Figura 22. Actividad volumétrica de lacasas de la cepa CPM-121 *Trichoderma atroviride*. T0= Tiempo cero. AC= Antes del contacto del micelio con el antraceno. DC= Después del contacto del micelio con el antraceno. CC= Colonización completa de la colonia en presencia del antraceno. Control= PDA. Testigo= AAS 100 μM . Tx1= 0.4 g + AAS 100 μM . Tx2= 0.8 g + AAS 100 μM . Tx3= 1.6 g + AAS 100 μM . Las barras de error muestran la desviación estándar (n= 3). Los datos representan las medias y la desviación estándar de las medidas de tres réplicas. Los valores estadísticamente homogéneos del mismo parámetro están marcados con la misma letra (ANOVA, Tukey $p < 0.05$).

8.5.3. CPM-113 de *T. aggressivum* f. *aggressivum*

La mayor actividad de lacasas se presentó en la cepa CPM-113 (*T. aggressivum* f. *aggressivum*) podemos observar que a mayor concentración de antraceno hay mayor actividad de lacasas, sobre todo antes del contacto del micelio con el antraceno (AC), el cual fue a los 5 días de incubación, donde en el tratamiento 3 (1.6 g + AAS 100 μM), obtuvo una actividad de lacasas de 0.63 U mL^{-1} (Fig. 23)

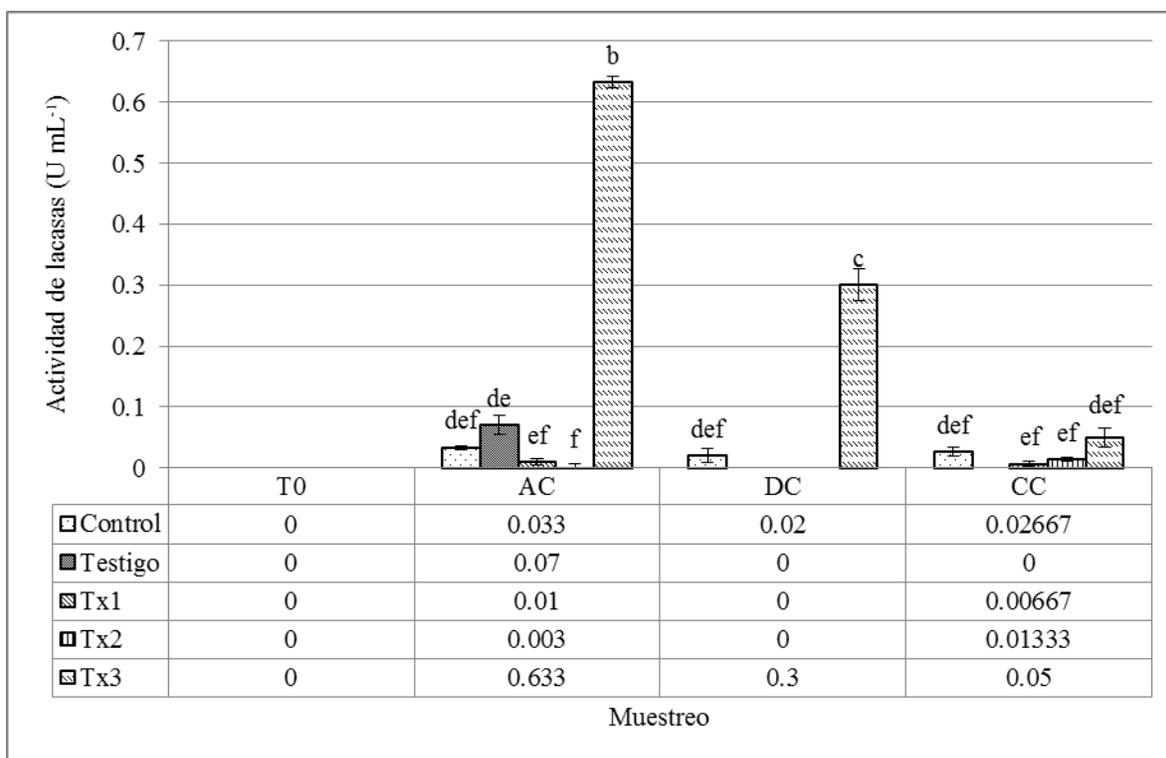


Figura 23. Actividad volumétrica de lacasas de la cepa CPM-113 *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*. T0= Tiempo cero. AC= Antes del contacto del micelio con el antraceno. DC= Después del contacto del micelio con el antraceno. CC= Colonización completa de la colonia en presencia del antraceno. Control= PDA. Testigo= AAS 100 μ M. Tx1= 0.4 g + AAS 100 μ M. Tx2= 0.8 g + AAS 100 μ M. Tx3= 1.6 g + AAS 100 μ M. Las barras de error muestran la desviación estándar (n= 3). Los datos representan las medias y la desviación estándar de las medidas de tres réplicas. Los valores estadísticamente homogéneos del mismo parámetro están marcados con la misma letra (ANOVA, Tukey $p < 0.05$).

En las tres cepas estudiadas de *T. harzianum*, *T. atroviride* y *T. aggressivum* f. *aggressivum*, se observó que a mayor concentración de antraceno existe actividad de lacasas. En el cuadro 12, podemos observar la producción de lacasas de las cepas CPM-121 (*T. atroviride*) y CPM-113 (*T. aggressivum* f. *aggressivum*), con el tratamiento 3 (Tx3) con 1.6 g de antraceno + ASS 100 μ M a los 3 y 5 días de incubación. Dando la mayor actividad de lacasas a los 3 días en el Tx1, observando el mismo comportamiento con las dos cepas, con una diferencia de 0.22 U mL⁻¹, la producción de lacasas fue de 0.85 U mL⁻¹ para la cepa CPM-121 (*T. atroviride*) y 0.63 U mL⁻¹ para la cepa CPM-113 (*T. aggressivum* f. *aggressivum*). Esta cepa mostró una gran capacidad para tolerar y crecer en altas concentraciones de antraceno.

Cuadro 12. Actividad volumétrica de lacasas de las cepas CPM-108 de *Trichoderma harzianum*, CPM-121 de *Trichoderma atroviride* y CPM-113 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*.

Muestreo	Condición	CPM-108	CPM-113	CPM-121
AC	Control	0 ± 0 ^f	0.03333 ± 0.00333 ^{def}	0.05 ± 0.02081 ^{def}
	Testigo	0.01667 ± 0.00333 ^{ef}	0.07 ± 0.01527 ^{de}	0.04 ± 0.01 ^{def}
	Tx1	0 ± 0 ^f	0.01 ± 0.00577 ^{ef}	0 ± 0 ^f
	Tx2	0.00333 ± 0.00333 ^f	0.00333 ± 0.00333 ^f	0 ± 0 ^f
	Tx3	0.04 ± 0.0057735 ^{def}	0.63333 ± 0.00882 ^b	0.85333 ± 0.029059 ^a
DC	Control	0 ± 0 ^f	0.02 ± 0.01154 ^{def}	0.02 ± 0.00577 ^{def}
	Testigo	0 ± 0 ^f	0 ± 0 ^f	0.03667 ± 0.01855 ^{def}
	Tx1	0.00667 ± 0.00666 ^{ef}	0 ± 0 ^f	0.03667 ± 0.01855 ^{def}
	Tx2	0.08333 ± 0.00333 ^d	0 ± 0 ^f	0 ± 0 ^f
	Tx3	0.01667 ± 0.00666 ^{ef}	0.3 ± 0.02645 ^c	0.83333 ± 0.01855 ^a
CC	Control	0 ± 0 ^f	0.02667 ± 0.00666 ^{def}	0 ± 0 ^f
	Testigo	0.01 ± 0.0057 ^{ef}	0 ± 0 ^f	0.02667 ± 0.01763 ^{def}
	Tx1	0 ± 0 ^f	0.00667 ± 0.00333 ^{ef}	0 ± 0 ^f
	Tx2	0.00667 ± 0.00666 ^{ef}	0.01333 ± 0.00333 ^{ef}	0 ± 0 ^f
	Tx3	0 ± 0 ^f	0.05 ± 0.01527 ^{def}	0.03333 ± 0.03333 ^{def}

Los datos representan las medias y la desviación estándar de las medidas de tres replicas. Los valores estadísticamente homogéneos del mismo parámetro están marcados con la misma letra (ANOVA, Tukey p<0.05). Control= PDA. Testigo= PDA+AAS 100 µM. Tx1= 0.4 g. + AAS 100 µM. Tx2= 0.8 g. + AAS 100 µM. Tx3= 1.6 g. + AAS 100 µM. AC= Antes del contacto del micelio con el antraceno, DC= Después del contacto del micelio con el antraceno y CC= Colonización completa de la colonia en presencia del antraceno.

IX. DISCUSION

En el presente estudio tres especies de *Trichoderma* aisladas de substratos de hongos comestibles se cultivaron en cajas de Petri con medio de cultivo PDA en presencia de AAS 100 μM y tres concentraciones de antraceno. Las cepas tres de *Trichoderma* crecieron en todas las condiciones estudiadas. Todas las cepas fueron capaces de crecer en presencia de antraceno y el micelio de los hongos creció sobre los cristales del antraceno. En México, la industria del petróleo en su conjunto ha tenido un impacto negativo en materia ambiental. Debido a la amplia gama de productos derivados del petróleo, no ha sido posible evaluar cuantitativamente la contaminación involucrada desde la fase de explotación hasta la obtención de los productos petroquímicos básicos. El problema de los suelos contaminados con hidrocarburos radica en que hasta hace pocos años no existía conciencia del grado de la dificultad y el costo que representa la remediación de los suelos y cuerpos de agua contaminados, por lo que es más caro remediar que prevenir (Saval, 1995). Se ha calculado que cada pozo de petróleo puede afectar a 1,000 m^2 de suelo a una profundidad de 2 m. El suelo contaminado presenta niveles de hidrocarburos de alrededor de 100,000 mg de TPH kg^{-1} de materia seca (Rivera-Cruz *et al.*, 2002).

Las especies de hongos que pertenecen al género *Trichoderma* han sido plenamente caracterizadas por tener aplicación en el ámbito agrícola, principalmente para el control biológico de otros organismos patógenos que atacan a los cultivos. Sin embargo, los estudios sobre su comportamiento y su efecto en ambientes terrestres y acuáticos contaminados han sido escasamente estudiados.

La literatura reporta pocos datos sobre la degradación de los HAP por especies de *Trichoderma*, sin embargo, los estudios han demostrado que varias especies de *Trichoderma* son capaces de tolerar y metabolizar hidrocarburos (Argumedo-Delira *et al.*, 2012).

Bajo este escenario, se realizó el estudio de cepas de hongos aisladas de cultivos comestibles con el fin de conocer el potencial de este grupo fúngico en la biorremediación de ambientes contaminados. Los resultados en este trabajo mostraron que las cepas seleccionadas de *Trichoderma* revelaron tener la capacidad para crecer en presencia de antraceno en el medio de cultivo.

Chaîneau *et al.* (1999), reportaron la capacidad que tienen algunas especies de *Trichoderma* para degradar hidrocarburos saturados y aromáticos presentes en aceites combustibles, lo que indica que el antraceno en las tres concentraciones utilizadas no tuvo ningún efecto inhibitorio, esta característica puede ser útil para utilizarse en suelos altamente contaminados por este compuesto. A diferencia de algunos informes que indican bajos niveles de tolerancia a los HPA en varios miembros de *Trichoderma* como *T. harzianum*, *T. viride* y cepas de *T. sp.* (Argumedo-Delira *et al.*, 2012; Verdin, 2004), los niveles de tolerancia y la velocidad de crecimiento mostradas por las diferentes cepas en estudio podrían facilitar su adaptación a los suelos contaminados y así mejorar la degradación de los HPA.

Estudios anteriores sobre el metabolismo de HAPs indicaron que el crecimiento de hongos podría verse afectado de manera significativa en la presencia de HAP (Brodkorb y Legge, 1992). Las cepas en estudio mostraron un desarrollo activo en presencia del antraceno y se vio reflejado en el crecimiento. El tiempo en colonizar completamente la caja fue diferente para las tres cepas, para el caso de la CPM-108 (*T. harzianum*) mostró la más rápida colonización (7 días), para la CPM-121 (*T. atroviride*) fue de 9 días y finalmente para la CPM-113 (*T. aggressivum* f. *aggressivum*) fue de 12 días.

Cuando el micelio del hongo de *Trichoderma* estuvo en presencia en las diferentes concentraciones de antraceno (0.4, 0.8 y 1.6 g), mostraron diferencia en sus coloraciones, afectado en especial a la cepa CPM-113 en la formación de anillos de crecimiento. Zafra *et al.* (2015), obtuvieron resultados similares al estudiar una cepa de *T. asperellum* y una de *Aspergillus nonius* en altas concentraciones de fenantreno, pireno y Benzo[a]pireno (1,000-6,000 mg L⁻¹). Ellos observaron que cuando los hongos fueron expuestos a esas concentraciones de PAHs variaban su velocidad de crecimiento y la esporulación.

Efectos similares se han observado también en *Chrysosporium merdarium* y *T. harzianum* en presencia de lubricantes, lo que causó la presencia de un micelio de espesor intenso cultivados (Lugauskas *et al.*, 2008). La producción de pigmento amarillo en el micelio también se ha relacionado con la producción de aflatoxinas en *A. nomius* y *A. flavus* (Abbas *et al.*, 2004; Shier *et al.*, 2005) como una respuesta frente al estrés abiótico y condiciones limitadas de crecimiento (Yu *et al.*, 1996). El impacto de las tres concentraciones de antraceno en la esporulación fúngica fue evidente, ya que las tres cepas presentan menor esporulación y mostraron cambios en la pigmentación de conidias.

La producción de la enzima lacasa se monitorea cada 48 h, puede observarse que la producción de lacasas inicia al día 3, siendo este día donde se obtuvo la máxima actividad con 0.85 U mL^{-1} en la cepa CPM-121 de *T. atroviride* y de 0.63 U mL^{-1} en la cepa CPM-113 de *T. aggressivum* f. *aggressivum*, en el tratamiento 3 (1.6 g de antraceno + ASS $100 \mu\text{M}$) a los 3 y 5 días de incubación. Adnan *et al.* (2015), encontraron un resultado similar en una cepa de *T. atroviride* en un estudio sobre el proceso de biodegradación del colorante RB5. Se conoce poco sobre la función de las lacasas en *Trichoderma*, en las tres especies estudiadas (*T. harzianum*, *T. atroviride* y *T. aggressivum* f. *aggressivum*), se observó que a mayor concentración de antraceno existe actividad de lacasas. La producción de lacasas de las cepas CPM-121 (*T. atroviride*) y CPM-113 (*T. aggressivum* f. *aggressivum*) en el tratamiento 3 (Tx3) con 1.6 g de antraceno + ASS $100 \mu\text{M}$ a los 3 y 5 días de incubación, fue similar en las dos cepas, con una diferencia de 0.22 U mL^{-1} , la producción de lacasas fue de 0.85 U mL^{-1} para la cepa CPM-121 (*T. atroviride*) y 0.63 U mL^{-1} para la cepa CPM-113 (*T. aggressivum* f. *aggressivum*). Verdin *et al.* (2004), reportaron la capacidad de degradación de benzo[α]pireno (BaP) por algunas especies de hongos filamentosos, aun cuando *T. viride* degradó BaP, no se detectaron actividades enzimáticas relacionadas con la degradación de éste hidrocarburo aromático policíclico, como lacasas y peroxidases, sugiriendo que *Trichoderma* posiblemente tiene otro sistema enzimático para degradar BaP, con ello se explica que el contenido tan bajo de actividad de lacasas encontrado en este estudio.

La gran capacidad de para tolerar y crecer en altas concentraciones de antraceno le confiere una ventaja para utilizarse en medios contaminados, además de ser organismos que benefician a la agricultura utilizados como control biológico, estos organismos son capaces de producir enzimas que puedan ayudar a la descontaminación de suelos siniestrados.

X. CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos en la presente investigación mostraron que las cepas de *Trichoderma* fueron capaces de tolerar y desarrollarse *in vitro* en presencia de antraceno en medio de cultivo adicionado con ácido acetilsalicílico y que durante la cinética de crecimiento la diferencia fue el tiempo en colonizar completamente la caja.
2. La adición del ácido acetilsalicílico (AAS 100 μ M) al medio de cultivo incrementó la producción de esporas los 5 días después del contacto (DC) un 12.39% en comparación con el control en la cepa CPM-108 (*T. harzianum*), sin embargo para las demás cepas se observó que a mayor concentración de antraceno menor producción es esporas.
3. La actividad de lacasas se vio estimulada por la concentración más alta de antraceno (1.6 g.) en los primeros 7 días de crecimiento de las cepas, la actividad más alta se obtuvo en las cepas CPM-121 de *T. atroviride* y CPM-113 de *T. aggressivum*.
4. Comparativamente la actividad de lacasas de CPM-121 de *T. atroviride* fue 95.3% mayor (0.85 U mL⁻¹) que la actividad del testigo (0.04 U mL⁻¹) y de la CPM-113 de *T. aggressivum* f. *aggressivum* fue 88.88% mayor (0.63 U mL⁻¹) que la actividad del testigo.
5. La hipótesis se confirma porque dos cepas en mayor concentración de antraceno produjeron actividad de enzimas lacasas en medio de cultivo adicionado con ácido acetilsalicílico.

XI. PROPUESTA DE ESTRATEGIA PARA BIORREMEDIACIÓN *IN SITU* UTILIZANDO *TRICHODERMA* SPP.

11.1 Introducción

Las zonas industriales y los sitios de explotación petrolera y minera son aquellos que han originado contaminación en diversos puntos del país. Aunado a lo anterior se incrementa el riesgo y la problemática, en cuanto se ven abandonados los sitios. Dichas actividades no solo afectan el uso sustentable del suelo y el desarrollo urbano, sino que también afecta la salud de la población, y en muchos casos, impacta negativamente los recursos naturales estratégicos y fundamentales para el desarrollo, como lo es la disponibilidad de agua para consumo humano (SEMARNAT, 2012).

Las actividades de remediación y rehabilitación de sitios contaminados, contribuye al desarrollo sustentable del país a través de los siguientes aspectos básicos: i) permite eliminar contaminantes que representan riesgos para el ambiente, los recursos naturales y la salud humana, ii) permite recuperar el valor del suelo para reintegrar los valores monetario, funcional y social al desarrollo sustentable de los núcleos poblacionales, iii) permite reintegrar las áreas remediadas a los ciclos económicos regionales, mejorando a través de ello la calidad de vida de la población al eliminar riesgos por la contaminación (SEMARNAT, 2012).

La biorremediación de suelos contaminados es una técnica de tratamiento que tiene como objetivo utilizar el potencial de la microbiota autóctona o exógena, para degradar los compuestos orgánicos constituyentes de los residuos, con la consecuente disminución de la toxicidad. Esta tecnología es, en general, eficiente y económica cuando se compara con las alternativas físicas y fisicoquímicas convencionales de tratamiento de suelo (Ferreira *et al.*, 2013).

Se sabe que el género *Trichoderma* tiene una alta capacidad para degradar diversos compuestos del sustrato donde se desarrolla. Su metabolismo enzimático tiene la capacidad de degradar una amplia variedad de sustratos, que van desde celulosa hasta compuestos inorgánicos (Argumedo-Delira *et al.*, 2009). Dicho potencial radica fundamentalmente en las características de su sistema enzimático y en su capacidad adaptativa de crecer en diferentes ambientes (Field *et al.*, 1993). Esta habilidad les permite a través del desarrollo de su micelio, colonizar diferentes sustratos y acceder a los compuestos que constituyen los contaminantes más frecuentes de los suelos (Martín-Moreno *et al.*, 2004).

La presente estrategia plantea la producción y aplicación de inóculos de hongos del género *Trichoderma* en suelos agrícolas para atenuar los compuestos tóxicos derivados del petróleo. La cual se basa en el potencial de degradar y crecer en compuestos poliaromáticos del petróleo. Para conocer los recursos con que se cuentan para la elaboración de una propuesta de estrategia se realizó una matriz de potencialidades, limitaciones y problemas (Cuadro 13)

Cuadro 13. Matriz de potencialidades, limitaciones y problemas.

Área temática	Potencialidades	Limitaciones	Problemas
Recursos naturales y ambientales	Cepas de <i>Trichoderma</i> aisladas e identificadas de hongos comestibles	Falta de conocimiento de las especies con potencial enzimático	No se aprovecha los recursos genéticos con potencial para la biorremediación.
Sistema físico-natural	Suelos agrícolas fértiles	Hidrocarburos poliaromáticos (HAPs) del petróleo, compactan el suelo, modifican del pH y por su toxicidad reducen la fertilidad de los suelos y la capacidad para retener agua para las plantas	Problemas de contaminación con hidrocarburos en suelos agrícolas en México. Pérdida de suelos fértiles para la producción de alimentos
Área económica	Existencia de mercado para la comercialización de hongos	Poco interés por las especies de <i>Trichoderma</i> en biorremediación	Baja producción y aprovechamiento del recurso genético de hongos competidores
Demografía y mercado de trabajo	Población agrícola. Zonas petroleras cercanas a suelos de uso agrícola	Pocas oportunidades de empleo. Migración. Enfermedades por la presencia de HAPs en suelos agrícolas.	Consecuencias negativas para la salud humana por contaminación de HAPs
Infraestructura	Espacios accesibles para la producción de hongos.	Falta de conocimiento sobre tecnologías para la producción de hongos y para la biorremediación de suelos usando hongos	Falta de infraestructura y conocimiento adecuado para la producción de inóculos con hongos con potencial para degradar contaminantes
Aspectos	Planes de desarrollo	Falta de	Falta de prevención

institucionales	para la producción de hongos. Normas mexicanas para la regulación de contaminantes en México.	seguimientos a los sitios contaminados. Poco conocimiento de las normas	y sanciones por parte de las instituciones
-----------------	---	---	--

11.2. Actores sociales

El proceso de biorremediación requiere del intercambio y el trabajo coordinado de los diferentes actores involucrados en el proceso de remediación. Para los actores involucrados son de importancia los aspectos de responsabilidad acerca de la contaminación del suelo, la eliminación de los riesgos y la protección a la salud. A continuación se describen los principales actores implicados (Fig. 24)

1. La comunidad afectada: son los campesinos propietarios de los suelos agrícolas afectados por la contaminación de hidrocarburos del petróleo. Quienes tienen la responsabilidad de estar conscientes de los riesgos de la contaminación y de participar en las acciones necesarias para minimizar los riesgos.
2. Responsables de la contaminación: son todas las personas o figuras que están involucradas en los problemas de contaminación, que sea de forma accidental o imprudencial. Tienen como responsabilidad la remediación y eliminación de los riesgos a la salud del público.
3. Las instituciones gubernamentales: son las instituciones encargadas de regular, administrar, gestionar soluciones relacionadas con los problemas de contaminación. Por ejemplo CONAGUA, COFEPRIS, PROFEPA, SEMARNAT, PEMEX, CNH. Tienen una corresponsabilidad por los procesos de gestión administrativa (en cuanto al cumplimiento de las disposiciones legales) y la responsabilidad por la protección de los recursos naturales y la protección de la salud humana.
4. La comunidad científica: tienen que dar informaciones científicas y apoyar así el proceso de minimizar el riesgo para la salud. Tienen que proporcionar los servicios necesarios complementarios para formar recursos humanos calificados y competitivos en todos los campos de la formación, así como en lo referente a la investigación y desarrollo (I+D) y la transferencia de tecnología.

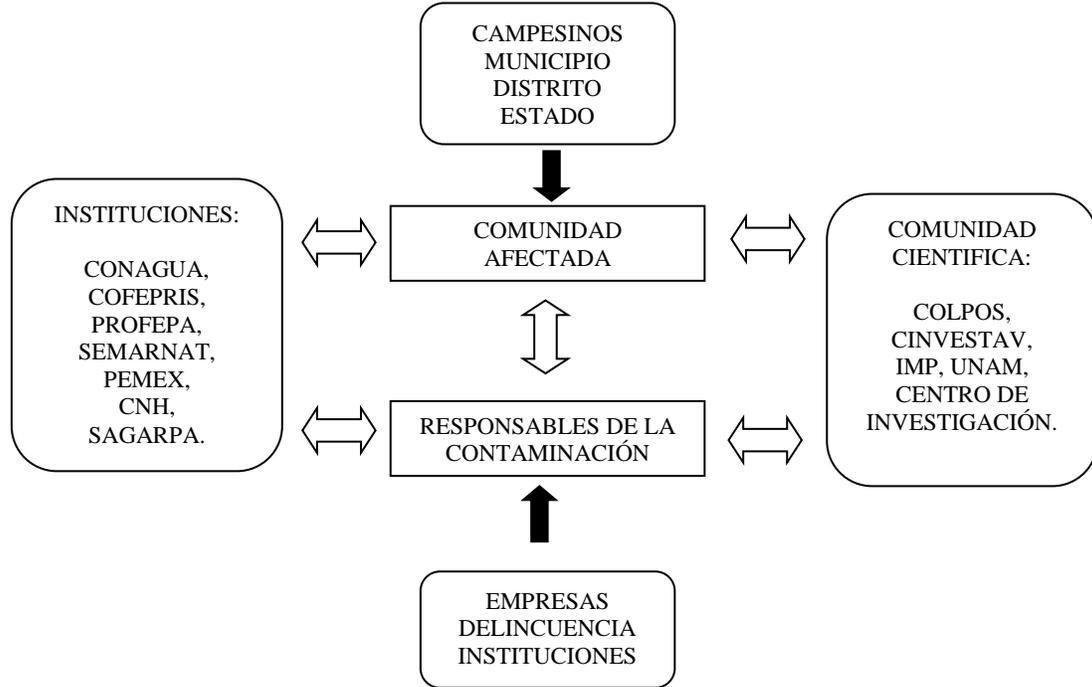


Figura 24. Actores principales de la problemática de suelos agrícolas contaminados con hidrocarburos.

11.3. Objetivos estratégicos y específicos

En el cuadro 15 se presentan los objetivos, resultados y actividades principales que conlleva la propuesta de estrategia para biorremediar suelos agrícolas contaminados con hidrocarburos en México.

Cuadro 15. Asignación de objetivos de la estrategia para biorremediar suelos agrícolas contaminados con hidrocarburos en México.

OBJETIVO GENERAL	Biorremediar suelos agrícolas contaminados con hidrocarburos del petróleo en México utilizando hongos filamentosos (mohos)
OBJETIVOS ESPECIFICOS	Aprovechar el potencial de los hongos para biorremediación Restaurar suelos agrícolas contaminados con hidrocarburos y mejorar la calidad de vida de las familias agrícolas afectadas.
RESULTADOS	<ol style="list-style-type: none"> 1. Suelos agrícolas libres de contaminación. 2. Desarrollo de técnicas para biorremediar suelos contaminados <i>in situ</i>. 3. Manual para el cultivo de hongos con potencial para biorremediar suelos agrícolas.
ACTIVIDADES	<ol style="list-style-type: none"> 1. Experimentación en microcosmos para evaluar la producción enzimática en suelo. 2. Determinación de la expresión genética de cepas de <i>Trichoderma</i>. 3. Evaluación de diferentes sustratos sólidos suplementados con ácido acetil salicílico para la producción de enzimas. 4. Recuperación de las enzimas producidas por los mohos. 5. Diseños de técnicas para la aplicación <i>in situ</i> (Bioreactores y Biopilas). 6. Elaboración de manuales para la recuperación de suelos agrícolas contaminados con hidrocarburos usando hongos.

Se sugiere encaminar la investigación a una escala en microcosmos para evaluar la actividad de las especies de *Trichoderma* en suelos agrícolas y evaluar su capacidad de adaptarse a sustratos que han sido contaminados.

XI. LITERATURA CITADA

- Adnan, L. A., P. Sathishkumar, A. R. M. Yusoff y T. Hadibarata. 2015. Metabolites characterisation of laccase mediated Reactive Black 5 biodegradation by fast growing ascomycete fungus *Trichoderma atroviride* F03. *International Biodeterioration & Biodegradation* 104: 274-282.
- Abbas, H. K., W. T. Shier y B. W. Horn. 2004. Cultural methods for aflatoxin detection. *J. Toxicol Toxin Rev.* 23: 295-315
- Alexander, M. 1981. Biodegradation of chemical of environmental concern. *Science* 211: 132-138.
- Alexopoulos, C. J. y C. W. Mims. 1979. *Introductory Mycology*. 3^{ed}. New York: Willey.
- Arboleda, J. V. G. y B. V. M Bravo. 2008. Biorremediación del suelo contaminado con hidrocarburos de la central hidroeléctrica del campamento Secoya mediante Landfarming. Facultad de Ciencias. Escuela de Ciencias Químicas. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. Tesis de grado previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología Ambiental.
- Arce, O. J. M., V. R. Rodríguez y A. N. G. Rojas. 2004. Identification of recalcitrant hydrocarbons present in a drilling waste-polluted soil. *J. Environ Sci & Health Part A.* 39 (6): 1535-1545.
- Argumedo-Delira, R. 2011. Respuesta fisiológica de miembros del género *Trichoderma* a hidrocarburos poliaromáticos. Tesis de Doctorado en Ciencias. Postgrado en Edafología. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Edo de México.
- Argumedo-Delira R., A. Alarcón, R. Ferrera-Cerrato y J. J. Peña-Cabriales. 2009. El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 25 (4): 257-269.
- Argumedo-Delira R., A. Alarcón, R. Ferrera-Cerrato, J. J. Almaraz y J. J. Peña-Cabriales. 2012. Tolerance and growth of 11 *Trichoderma* strains to crude oil, naphthalene, phenanthrene and benzo [α] pyrene. *Journal of Environmental Management* 95: 291-299.
- ATSDR. 2005. Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): Department of Health Human Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Ávila-Miranda, M. E., A. Herrera-Estrella y J. J. Peña-Cabriales. 2006. Colonization of the rhizosphere, rhizoplane and endorhiza of garlic (*Allium sativum* L.) by strains of *Trichoderma harzianum* and their capacity to control allium white-rot under field conditions. *Soil Biology Biochem.* 38: 1823-1830.
- Baker, K. H. y D.S. Herson. 1994. *Bioremediation*. Pp. 375. McGraw-Hill, Nueva York.
- Bedoya, P. y F. García. 2003. Biodegradación de la fracción pesada de crudo Cusiana por *Pleurotus ostreatus*. Trabajo dirigido de grado. Universidad de Colombia. Sede Medellín. P 57.
- Bioresearch. 2010. *Vademécum Agrícola*. 11^a Edición ed. Ecuador: Serie. (P.D.R.).
- Bissett, J. 1991. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes of section *Longibrachiatum*. *Can J. Bot.* 69: 2418-2420.

- Boldu, F., J. Vervoort, J. Grontehuis y J. Van Groenestijn. 2002. Substrate interactions during the biodegradation of Benzene, Toluene Ethylbenzene and Xylene (BTEX) Hydrocarbons by the fungus *Cladophialophora* sp strains T1. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2660-2665.
- Bongkeun, S., J. Norberto y M. Palleroni. 2000. Isolation and characterization of diverse halobenzoate, degrading denitrifying bacteria from soils and sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 66(8): 3446-3453.
- Bourbonnais, R. y M.G. Paice. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded Role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters* 267: 99-102.
- Bourbonnais, R., M. G. Paice, B. Freiermuth, E. Bodie, y S. Bomeman. 1997. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4627-4632.
- Bourbonnais, R., M. G. Paice, D. Leech, y B. Freiermuth. 1998. Reactivity and mechanism of laccase mediators for pulp delignification. *TAPPI Biological Science Symposium* 19 (23): 335-338.
- Brodkorb, T. S. y R. L. Legge. 1992. Enhanced biodegradation of phenanthrene in oil tar-contaminated soil supplemented with *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3117-3121.
- Bumpus, J., M. Tien, D. Wright y S. Aust. 1985. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science* 228: 1434-1436.
- Camacho, F. 2013. Biorremediación de zonas contaminadas por hidrocarburos empleando hongos comestibles: Efecto del antraceno sobre el crecimiento *in vitro* de *Pleurotus ostreatus*. Tesis de Maestría en Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional. Colegio de Postgraduados, Campus Puebla. Puebla. 88 pp.
- Caramelo L., Martínez, M. J. y Martínez, A. T. 2004. Search for ligninolytic peroxidases in the fungus *Pleurotus eryngii* involving α -keto- γ -thiomethylbutyric acid and lignin model dimers. *Applied and Environmental Microbiology* 65(3): 916-922.
- Cardona, F., D. Restrepo, P. Niño y R. González. 2002. Aumento de la productividad de *Pleurotus ostreatus* y su utilización en la biodegradación de petróleo. *Gestión y Ambiente* 5(2): 105-110.
- Cerniglia, C. 1997. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 19: 324- 333.
- Chaîneau, C. H., U. J. Morelb, J. Duponta, E. Burya y J. Oudota. 1999. Comparison of the fuel oil biodegradation potencial of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. *Sci Total Environ.* 227: 237-247.
- Chen, S. y Liao, C. 2006. Health risk assessment on human exposed to environmental polycyclic aromatic hydrocarbons pollution sources. *Sci. Total Environ.* 366: 112-123.
- Cuadras, A., N. Ramírez, E. Rovira, R. Marcé y F. Borrull. 2012. Evaluación del riesgo asociado a la explotación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en la salud de la población residente alrededor del complejo químico de Tarragona. *Rev. Salud Ambient.* 12 (1): 14:25.

- Daane, L., I. Harjono, G. Zylstra y M. Häggblom. 2001. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria associated with the Rhizosphere of salt Marsh plants. *Applied and Environmental Microbiology* 67(6): 2683-2691.
- Das, A. C., A. Chakravarty, P. Sukul y D. Mukherjee. 2003. Influence and persistence of phorate and carbofuran insecticides on microorganisms in rice field. *Chemosphere* 53: 1033-1037.
- Desai, S. S. y C. Nityanand. 2011. Microbial laccases and their applications: a review. *Asian Journal of Biotechnology* 3: 98-124.
- Dettmer, J. G. 2002. Educación y desastres: reflexiones sobre el caso de México. *Red Revista Latinoamericana de Estudios Educativos* 32 (2): 10-17.
- Díaz, J. 1994. Algunos aspectos biológicos de *Trichoderma* y su posible uso como biocontrol. Trabajo de Diploma en opción al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Agraria de La Habana.
- Drysdale, G., H. Kusan y F. Bux. 1999. Denitrification bacteria during activated sludge treatment. *Water SA* 25: 357-362.
- Ebru, Ç. y M. A. Kilic. 2004. Isolation and characterization of aerobic denitrifiers from agricultural soil. *Turk J. Biol.* 29: 9-14.
- Esperanza-Ramírez, N., M. C. Vargas, J. C. Ariza y C. Martínez. 2003. Caracterización de la lacasa obtenida por dos métodos de producción con *Pleurotus ostreatus*. *Revista Colombiana de Biotecnología* 5 (2): 64-72.
- Esposito, E. y M. Da Silva. 1998. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma* spp. *Enzyme Microbiology Technology* 32: 629-634.
- Fernández, C. A. C. 2012. Descripción y análisis del Sistema de recuperación de la piscina de lodos en el terminal beaterio, considerada pasivo ambiental y los recursos necesarios para mejorar su recuperación como el programa a ejecutarse por EP PETROECUADOR 2012. Facultad de Ciencias de la ingeniería. Carrera de petróleos. Universidad Tecnológica Equinoccial, Quito. Tesis de grado previa a la obtención del título de tecnóloga de petróleos.
- Fernández-Larrea, V.O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas* (Costa Rica) 62: 96-100.
- Ferreira, Do N. T. C., F. J. Santos Oliveira y F. Pessoa De Franca. 2013. Biorremediación de un suelo tropical contaminado con residuos aceitosos intemperizados. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 29 (1): 21-28.
- Field, J. A., E. de Jong, G. Feijoo Costa y J. A. de Bont. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 2219-2226.
- Galante, Y. M., R. Monteverdi, S. Inama, C. Caldini, A. De Conti, V. Lavelli y F. Bonomi. 1993. New applications of enzymes in wine making and olive oil production. *Ital. Journal Biochem.* 4: 34-38.
- Goltapeh, E. M., D. Y. Rezaee y A. Varma. 2013. Introduction to bioremediation; Capítulo 1. Pp. 5-15. In: *Fungi as Bioremediators*. Springer-Verlag, Berlín Heidelberg.

- Gravel, V., Antoun, H. y Tweddell, R.J. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biol Biochem.* 39: 1968-1977.
- Gutiérrez, C. C. y C. J. Zavala. 2002. Rasgos hidromórficos de suelos tropicales contaminados con hidrocarburos. *Terra Latinoamericana* 20:101-111.
- Hadibarata, T., S. Tachibana y K. Ttoh. 2007. Biodegradation of phenanthrene by fungi screened from nature. *Park Journal Biology Sci.* 10: 2535-2543.
- Hammel, K. 1995. Mechanisms for polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Degradation by ligninolytic fungi. *Environmental Health Perspectives* 103: 508-512.
- Harman, G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis.* 84: 377-393.
- Harman, G. E. 2003. *Trichoderma harzianum*, *T. viridis*, *T. koningii*, *T. hamatum* (Deuteromycetes: Moniliales). Disponible en: <http://www.ibun.unal.edu.co/r2r7e.html>.
- Harman, G. E. y C. P. Kubicek. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vol. 2 Taylor & Francis, London.
- Harman, G. E., C. R. Howell, A. Viterbo, I. Chet y M. Lorito. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol.* 2: 43-56.
- Harman, G. E., M. B. Kurtz y S. P. Champe. 1983. Laccase localized in hülle cells and cleistothecial primordial of *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriology* 154: 955-964.
- Herrera, T. y M. Ulloa. 1990. *El Reino de los Hongos*. Ed. Fondo de la Cultura Económica. México.
- Hestbjerg H., P. A. Willumsen, M. Christensen, O. Andersen, y C. S. Jacobsen. 2003. Bioaugmentation of tar-contaminated soils under field conditions using *Pleurotus ostreatus* refuse from commercial mushroom production. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 (4): 692-698.
- Hublik, G. y F. Schinner. 2000. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. *Enzyme and Microbial Technology* 27: 330-336.
- Hughes, K. A., P. Bridge y M. S. Clark. 2007. Tolerance of Antarctic soil fungi to hydrocarbons. *Sci. Total Environ.* 372: 539-548.
- Iturbe, F. R., C. A. Carlos y G. L. Torres. 2007. Sub-soil contamination due to oil spills in zones surrounding oil pipeline-pump stations and oil pipeline right-of-ways in Southwest-Mexico. *Environmental Monitoring Assess* 113: 387-398.
- Jackson, A. M.; J. M. Whipps y J. M. Lynch. 1991. Effects of temperature, pH and water potential on growth of four fungi with disease biocontrol potential. *World Journal Microbiology Biotechnology* 7: 494-501.
- Jaklitsch, W. M., G. J. Samuels, S. L. Dodd, B. S. Lu e I. S. Druzhinina. 2006. *Hypocrea rufa/Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. *Stud. Mycol.* 55: 135-177.

- Jiménez-Cisneros, B. 2001. *La contaminación ambiental en México: causas, efectos y tecnología apropiada*. Editorial LIMUSA S.A. de C.V. Primera edición, pp. 641-650.
- Kilaru, S., P. J. Hoegger y U. Kües. 2006b. The laccase multi-gene family in *Coprinopsis cinerea* has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies. *Current Genetics* 50: 45-60.
- Kilaru, S., P. J. Hoegger, A. Majcherczyk, C. Burns, K. Shishido, A. Bailey, G. D. Foster y U. Kües. 2006a. Expression of laccase gene *IccI* in *Coprinopsis cinerea* under control of various basidiomycetous promoters. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71: 200-210.
- Kleifeld, O. e I. Chet.1992. *Trichoderma harzianum*-interaction with plants and effect on growth response. *Plant Soil*. 144: 267-272.
- Korcan, S. E., I. H. Cigerci y M. Konuk. 2013. White-rot fungi in bioremediation. Pp.371-390. *In: Fungi as Bioremediators: An Introduction to Bioremediation*. Eds. E.M. Goltapeh, D. Y. Rezaee y A. Varma. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Kunamneni, A., A. Ballesteros, F. J. Plou y M. Alcalde. 2007. Fungal laccase a versatile enzyme for biotechnological applications. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Ed. A. Méndez-Vilas. Formatex. Madrid España.
- Lieckfeldt, E., G. Samuels, J. Nirenberg y H. Petrini. 1999. A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one two species. *Applied Environmental Microbiology* 65: 2418-2428.
- Lucas, L. R., A. M. Robles Gómez, A. Galvez del Postigo Ruíz, T. García Gutiérrez, T. Pérez Pulido, R. Álvarez de Cienfuegos y G. López. 2001. Biodegradación de la celulosa y la lignina. Universidad de Jaén. Pp. 148.
- Lugauskas, A., A. Griguceviene y S. Asadauskas. 2008. Selection of micromycetes capable of developing on technical lubricants. *Ekologija* 54: 186-194.
- Marivela, C., C. Guerrero, L. López, V. Sánchez y A. Toledo. 2002. *Metales pesados y medio ambiente*. Grupo de seminario 1-26. Barcelona, España.
- Martín-Moreno C. A., González-Becerra y M. J. Blanco-Santos. 2004. Tratamientos biológicos de suelos contaminados por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. *Revista Iberoamericana de Micología* 21: 103-120.
- Martínez, M. V. y F. S. López. 2001. Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso. *Terra Latinoamericana* 19: 9-17.
- Martínez-Carrera, D. y L. López-Martínez de Alva. 2010. Historia del cultivo comercial de hongos comestibles en México II: éxitos y fracasos durante el período 1991-2009. Pp. 513-554. *En: Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI*.Eds. D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales y V. M. Mora. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-MINAP, Puebla.

- Martínez-Carrera, D. C. 1995. Classical and molecular characterization of the *Agaricus bitorquis* complex. PhD. Thesis, University of London King College, Londres.
- Matsumura, E., E. Yamamoto, A. Numata, T. Kawano, T. Shin y S. Murao. 1986. Structures of the laccase-catalyzed oxidation products of hydroxybenzoic acids in the presence of ABTS. *Agric. Biol. Chem.* 50:1355–1357.
- Matsubara, M., J. M. Lynch y F. A. A. M. De Leij. 2006. A simple screening procedure for selecting fungi with potential for use in the bioremediation of contaminated land. *Enzyme and Microbial. Technology* 39: 1365-1372.
- Menzie, C., B. Potocki y J. Santodonato. 1992. Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environment Science Technology* 26 (7): 1278-1284.
- Michel-Aceves, A. C., A. Reyes-De la Cruz, M. A. Otero-Sánchez, O. Rebolledo-Domínguez y R. Lezma-Gutiérrez. 2005. Potencial Antagónico de *Trichoderma* Pers.: Fr. spp., sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Snyder y Hansen) y *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) *in vitro* e invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23 (3): 284-291.
- Miller, T. G. Jr. 2002. El agua, recursos y contaminación. Pp 333-370. *En: Introducción a la ciencia ambiental*. Eds. Miller Tyler G. Madrid, España.
- Novotny, C., K. Svobodova, P. Erbanova, T. Cajthaml, A. Kasinath, E. Lang y V. Sasek. 2004. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biology & Biochemistry* 36: 1545-1551.
- Okamoto, K., S. Yanagi y T. Sakai. 2000. Purification and characterization of extracellular laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Mycoscience* 41: 7-13.
- Papavizas, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Annu Rev Phytopathol.* 23: 23-54.
- Peltonen, K. y T. Kuljukka. 1995. Air sampling and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Chromatogra.* 710: 93-108.
- PEMEX, (Petróleos Mexicanos). 1998. El petróleo. Edición editada por H. Covantes. México, D.F. 176 p.
- PEMEX, (Petróleos Mexicanos). 2013. Informe Anual 2013 de Petróleos Mexicanos. México, D.F. 116 pp.
- Pérez-Armendáriz, B., O. Loera-Corral, L. Fernández-Linares, F. Esparza-García y R. Rodríguez-Vázquez. 2004. Biostimulation of micro-organisms from sugarcane bagasse pith for the removal of weathered hydrocarbon from soil. *Letters in Applied Microbiology* 38: 373-377.
- Persoon, C. H. 1794. Dispositio methodica fungorum. Romer's neues. *Magazin Botanische* 1: 81-128.
- Piñeiro, D. E. 2001. Población y trabajadores en el context de transformaciones agrarias. *In: Giarraca, N. (comp) ¿Una nueva ruralidad en América Latina? Consejo Latinoamericano de Ciencias Sociales, Buenos Aires, Argentina. 200p.*

- Plaza, G., M. Otero, N. Torres, M. Velásquez, E. Corbalan y T. Rodríguez. 2001. Biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos. *Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente* 5: 163-167.
- Pointing, S. 2011. Feasibility of bioremediation by white rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57: 20-33.
- Prince, R. C. 1993. Petroleum spill bioremediation in marine environments. *Crit. Rev. Microbiol.* 19: 217-242.
- Ramírez, A. P. 2006. Cepas comerciales como una estrategia para el desarrollo de la producción rural de hongos comestibles (*Pleurotus*): Mejoramiento genético empleando marcadores y segregación meiótica. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. P 122.
- Ramos, A., E. Yabid, R. I. Zapata Navarro, L. E. Oviedo Zumaqué, B. Violeth y J. Luis 2008. Evaluation of substrates and fermentation solid process for spore production of *Trichoderma* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología* 10(2): 23-34.
- Rangel, A. M. 2010. El ácido salicílico y su participación en la resistencia de patógenos en plantas. *Instituto de Investigaciones Químico Biológicas* 12(2): 90-95.
- Reese, E. T. y M. Mandels. 1989. Rolling with the times: production and applications of *Trichoderma reesei* cellulose. *Annu. Rep. Ferment. Proc.* 7: 1-20.
- Rendón-Hernández, G. A. 2015. Caracterización y cultivo de diferentes recursos genéticos de hongos y su importancia en el desarrollo regional de la zona central de México. Tesis de Maestría en Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional. Colegio de Postgraduados, Campus Puebla. Puebla. Pp 158.
- Revelet, C., S. Krivobok, L. Sage y R. Steiman. 2000. Biodegradation of pyrene by sediment fungi *Eisenia Andrei*. *Chemosphere* 40: 557-563.
- Rifai, M. A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol. Pap.* 116: 1-56.
- Rincón, L. M. C. 2004. "Estudio de la Biorremediación como una alternativa en la mitigación de la contaminación ambiental". Facultad de Ciencias Básicas. Escuela de Química. Especialización en Química Ambiental, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Santander. Monografía para optar el título de especialista en Química Ambiental.
- Riojas, H., L. Torres, I. Moncada, J. Balderas y P. Gortáres. 2010. Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Revista Química Viva* 3(9):120-145.
- Riser-Roberts, E. 1998. Remediation of petroleum contaminated soil. Biological, Physical and Chemical Processes. Lewis Publishers. Estados Unidos de América. Pp 542.
- Rittmann, B. y P. McCarty. 2001. Biotecnología del Medio Ambiente. Principios y aplicaciones. McGraw-Hill/Interamericana de España. Pp 745.
- Rivera-Cruz, M, R. Ferrera-Cerrato, V. Volke-Haller, L. F. Linares y R. Rodriguez-Vazquez. 2002. Microbial populations in soil profiles affected by oil hydrocarbons at Tabasco State, México. *Agrociencia* 36: 149-160.

- Rodríguez, C., E. Ruber, H. Gutiérrez y J. Orlando. 2002. Formación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y del 3,4-Benzopireno en aceites comestibles alterados por recalentamiento. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Departamento Académico de Farmacología y Toxicología. Lima Perú. P-104.
- Rojo, F. G., M. M. Reynoso, M. Ferez, S. N. Chulze y A. M. Torres. 2007. Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions. *Crop Prot.* 26: 549-555.
- Rosales, M. L. A. 2008. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. Tesis de Maestría en Ciencias en Gestión ambiental. CIIDIR-IPN. Durango.
- Salgado-Siclán. M. L. 2012. Inductores de Resistencia a TuMV en *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. Tesis de Doctorado, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México.
- Samuels, G. L. 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematic of the genus. *Mycol. Res.* 100: 923-935.
- Samuels, G. L. 2005. Changes in taxonomy, occurrence of the sexual stage and ecology of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96: 195-206.
- Samuels, G. L. y P. Chaverri. 2003. *Hypocrea/Trichoderma* (ascomycota, hipocreales, hypocreaceae): species with green ascospores. *Stud. Mycol.* 48: 1-116.
- Sánchez, Ch. 2011. Efecto del ácido salicílico sobre biomasa, actividad fotosintética, contenido nutricional y productividad del chile jalapeño. *Revista Chapingo. Serie Horticultura* 17(1): 1-7.
- Saraswathy, A. y R. Hallberg. 2002. Degradation of pyrene by indigenous fungi from a former gasworks site. *FEMS Microbiol.* 210: 227-232.
- Saval, B. S. 1995. Acciones para la remediación de suelos en México. Segundo minisimposio internacional sobre contaminantes de agua y suelo. Instituto de ingeniería. UNAM.
- Savoie, J. M., P. Delpech, C. Billete y G. Mata. 2000. Inoculum adaptation changes the outcome of the competition between *Lentinula edodes* and *Trichoderma* spp. during shiitake cultivation on pasteurized wheat Straw. *Science and cultivation of Edible Fungi.* (Ed) Van Griensven. 667-674.
- Saxena, J., C. Munimbazi y L. B. Bullerman. 2001. Relationship of mould count, ergosterol and ochatoxin a production. *International Journal of Food Microbiology* 29: 34.
- Schmidt, W. 2000. Suelos contaminados con hidrocarburos: la biorremediación como una solución ecológicamente compatible. *Cooperación Técnica Alemana (GTZ).*
- SEMARNAT. 2012. Guía para Orientar en la Ejecución de la Comunicación de Riesgos en sitios contaminados prioritarios o de alto riesgo. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México, D. F. 155 pp.
- Shannon, M. J. R. y K. Unterman. 1993. Evaluating bioremediation: Distinguishing fact from fiction. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 715-738.

- Shier, W. T., Y. Laoy T. W. Steele. 2005. Yellow pigments used in rapid identification of aflatoxin-producing *Aspergillus* strains are anthraquinones associated with the aflatoxin biosynthetic pathway. *Bioorg. Chem.* 33:426-438.
- Singh, S. K., V. P. Sharma, S. R. Sharma, S. Kumar y M. Tiwari. 2006. Molecular characterization of *Trichoderma* taxa causing green mould disease in edible mushrooms. *Curr Sci India.* 90: 427-431.
- Smith, W. H. 1995. Forest occurrence of *Trichoderma* species: Emphasis on potential organochlorine (xenobiotic) degradation. *Ecotoxicol Environ Saf.* 32: 179-183.
- Spezzia-Mazzocco, T. 2012. Selección de cepas de hongos comestibles productoras de lacasas y su potencial de aplicación a procesos de bioremediación en zonas contaminadas con hidrocarburos en México. Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados, *Campus Puebla*.
- Stamets, P. 1993. Growing gourmet & medical mushrooms. Ten Speed Press, Berkeley. Pp 552.
- Stefanova, M, A. Leiva, L. Larriganaga L y M. F. Coronado. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Revista Facultad de Agronomía* 16: 509-516.
- Subramanian, C. V. 1983. Hyphomycetes; Taxonomy and Biology (1a Ed). New York: Academic Press.
- Terrazas, E. 2005. Fungal redox enzymes involved in the oxidation of organic pollutants. Tesis doctorado. Universidad de Lund.
- Tisot, B. y D. Welte. 1984. Petroleum formation and occurrence, Springer-Verlag. New York. Pp 699.
- Torres, D. K. y M. T. Zuluaga. 2009. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. Facultad de Mina. Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia, Medellín.
- USEIA (United States Energy Information Administration). 2013. How much oil does the United State consume per year; How much petroleum does the United State import and from where? <http://www.eia.gov/tools/faqs/>
- Van Hamme, J, A. Singh y O. Ward. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67:50.
- Vargas, M. V., R. Rodríguez, F. Sánchez y N. Ramírez. 2001. Biological transformation of anthracene in soil by *Pleurotus ostreatus* under solid-state fermentation conditions using wheat bran and compost. *CT&F Ciencia, Tecnología y Futuro* 2(2): 43-50.
- Verdin, A., A. L. Sahraoui y R. Durand. 2004. Degradation of benzo [α] pyrene by mitosporic fungi and extracelular oxidative enzymes. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 53: 65-70.
- Verma, M., S. K. Brar, R. D. Tyagi, R. Y. Surampalli y J. R. Valéro. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp: Panoply of biological control. *Biochem. Eng. J.* 37: 1-20.
- Volke, T. y J. Velasco. 2002. *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. Instituto Nacional de Ecología, México, 64 pp.

- Walsh, G. A., R. F. Power y D. R. Headon. 1993. Enzymes in the animal feed industry. *Trends in Biotechnology* 11: 424-430.
- Widden, P. y V. Scattolin. 1988. Competitive interactions and ecological strategies of *Trichoderma* species colonizing spruce litter. *Mycologia* 80: 795-803.
- Williams, J., J. M. Clarkson, P. R. Mills y R. M Cooper. 2003. A selective medium for quantitative reisolation of *Trichoderma harzianum* from *Agaricus bisporus* compost. *Applied Environmental Microbiology* 69: 4190-4191.
- Yu, J. H., R. A. Butchko, M. Fernandes, N. P. Keller, T. J. Leonard y T. H. Adams. 1996. Conservation of structure and function of the aflatoxin regulatory gene aflR from *Aspergillus nidulans* and *A. flavus*. *Current Genetics* 29(6): 549-555.
- Zafra, G, A. E. Absalón y D. V. Cortés-Espinoza. 2015. Morphological changes and growth of filamentous fungi in the presence of high concentrations of PAHs. *Brazilian Journal of Microbiology* 46(3): 937-941.
- Zhang, C., I. Druzhinina, C. P. Kubick y T. Xu. 2005. *Trichoderma* biodiversity in China: evidence for a north to southern distribution of species in East Asia. *FEMS Microbiol. Lett.* 251: 251-257.
- Zobell, C. E. 1946. Action of microorganisms on hydrocarbons. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 10: 1-49.

	F	21.491	3	108TTD4
	F	21.362	3	108T4D4
G	F	20.165	3	108T8D4
G	H	16.646	3	108TBD3
G	H	16.356	3	108TTD3
	H	15.373	3	108T8D3
	H	14.607	3	108T4D3
	H	14.296	3	108T16D3
	I	8.960	3	108TBD2
	I	8.846	3	108TTD2
	I	8.169	3	108T8D2
	I	7.787	3	108T4D2
	I	6.462	3	108T16D2
	J	1.984	3	108T4D1
	J	1.708	3	108T8D1
	J	1.703	3	108TBD1
	J	1.596	3	108TTD1
	J	1.270	3	108T16D1

Anexo 2. Análisis estadístico del área de crecimiento de la cepa CPM-121 (*T. atroviride*).

Sistema SAS
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Área de crecimiento

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	44	25858.06384	587.68327	1427.50	<.0001
Error	90	37.05180	0.41169		
Total correcto	134	25895.11564			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	are Media
0.998569	3.137735	0.641628	20.44877

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Trat	44	25858.06384	587.68327	1427.50	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para área de crecimiento

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	90
Error de cuadrado medio	0.411687
Valor crítico del rango estudentizado	5.77806
Diferencia significativa mínima	2.1404

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Trat
A	47.0190	3	121TTD9
A	46.8413	3	121TBD9
A	46.5910	3	121T4D9
A	46.4643	3	121T16D9
A	46.2220	3	121T8D9

	B		38.4383	3	121TBD8
	B		38.1367	3	121TTD8
	C		34.9067	3	121T16D8
	C		34.6487	3	121T4D8
	C		34.3373	3	121T8D8
	D		31.0890	3	121TBD7
	D		29.9247	3	121TTD7
	E		25.8773	3	121T4D7
	E		25.3533	3	121T16D7
	E		25.1230	3	121T8D7
	F		22.4697	3	121TBD6
	F		22.1520	3	121T4D6
	F		21.7973	3	121TTD6
G	F		21.2490	3	121T8D6
G	F		21.2127	3	121T16D6
G	H		19.6457	3	121TBD5
G	H		19.3483	3	121TTD5
	H		18.8723	3	121T4D5
I	H		18.6453	3	121T8D5
I	H		18.4373	3	121T16D5
I	J		16.6320	3	121TBD4
	J		16.1140	3	121TTD4
	J		15.8383	3	121T8D4
K	J		15.3727	3	121T16D4
K	J	L	14.8510	3	121T4D4
K	M	L	13.5897	3	121TBD3
	M	L	13.2193	3	121TTD3
N	M		11.9813	3	121T8D3
N	O		10.9130	3	121T4D3
	O		9.5730	3	121T16D3
	P		4.8403	3	121TTD2
	P		4.4217	3	121TBD2
	P		4.0217	3	121T4D2
	P		3.7787	3	121T16D2
Q	P		3.6527	3	121T8D2
Q	R		1.6337	3	121TTD1
	R		1.2997	3	121T8D1
	R		1.2597	3	121T4D1
	R		1.2380	3	121TBD1
	R		1.1620	3	121T16D1

Anexo 3. Análisis estadístico del área de crecimiento de la cepa CPM-113 (*T. aggressivum* f. *aggressivum*).

Sistema SAS
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Área de crecimiento

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	56	30430.15912	543.39570	17.30	<.0001
Error	123	3864.56426	31.41922		
Total correcto	179	34294.72339			

R-cuadrado 0.887313 Coef Var 26.36025 Raiz MSE 5.605285 are Media 21.26416

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Trat	56	30430.15912	543.39570	17.30	<.0001

Anexo 4. Análisis estadístico de la velocidad de crecimiento de la cepa CPM-108 (*T. harzianum*).

Sistema SAS
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Velocidad de crecimiento

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	34	426.7140292	12.5504126	673.69	<.0001
Error	70	1.3040547	0.0186294		
Total correcto	104	428.0180838			

R-cuadrado 0.996953 Coef Var 3.312819 Raiz MSE 0.136489 vel Media 4.120038

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Trat	34	426.7140292	12.5504126	673.69	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para vel

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa 0.05
Error de grados de libertad 70
Error de cuadrado medio 0.018629
Valor crítico del rango estudentizado 5.64655
Diferencia significativa mínima 0.445

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Trat
A	6.9960	3	108TTD7
A	6.9877	3	108T16D7
A	6.9777	3	108T4D7
A	6.9550	3	108T8D7
A	6.9387	3	108TBD7
B	6.0910	3	108T4D6
B	6.0673	3	108TBD6
B	6.0513	3	108TTD6
B	6.0407	3	108T8D6
B	6.0397	3	108T16D6
C	5.1700	3	108TTD5
C	5.1673	3	108T8D5
C	5.1210	3	108T4D5
C	5.0603	3	108TBD5
C	4.9683	3	108T16D5
D	4.4327	3	108TTD4
E	4.2403	3	108TBD4
E	4.2147	3	108T4D4
E	4.1933	3	108T8D4
E	4.1830	3	108T16D4
E	3.9107	3	108TTD3
E	3.8370	3	108TBD3
G	3.5727	3	108T4D3
G	3.2737	3	108T8D3
G	3.2420	3	108T16D3
H	2.5037	3	108TTD2
I	2.1327	3	108TBD2

I	H	2.1247	3	108T4D2
I		1.9820	3	108T8D2
I		1.7297	3	108T16D2
	J	0.8417	3	108TTD1
	J	0.8183	3	108TBD1
	J	0.7980	3	108T4D1
	J	0.7913	3	108T8D1
	J	0.7473	3	108T16D1

Anexo 5. Análisis estadístico de la velocidad de crecimiento de la cepa CPM-121 (*T. atroviride*).

Sistema SAS
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Velocidad de crecimiento

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	44	533.8381483	12.1326852	824.47	<.0001
Error	90	1.3244147	0.0147157		
Total correcto	134	535.1625629			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	vel Media
0.997525	3.305485	0.121308	3.669911

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Trat	44	533.8381483	12.1326852	824.47	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para velocidad de crecimiento

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	90
Error de cuadrado medio	0.014716
Valor crítico del rango estudentizado	5.77806
Diferencia significativa mínima	0.4047

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Trat
A	7.03133	3	121TBD9
A	6.97700	3	121T16D9
A	6.94800	3	121T8D9
A	6.94600	3	121TTD9
A	6.82833	3	121T4D9
B	6.09567	3	121TBD8
B	6.06767	3	121TTD8
C	5.88233	3	121T8D8
C	5.76233	3	121T16D8
C	5.71267	3	121T4D8
C	5.70500	3	121TBD7
C	5.51167	3	121TTD7
D	4.93467	3	121T8D7
D	4.89400	3	121T4D7
D	4.85667	3	121T16D7
E	4.31633	3	121TBD6
F	4.10667	3	121TTD6

F		E	G	4.00667	3	121T4D6
F	H	E	G	3.91433	3	121TBD5
F	H		G	3.84300	3	121T8D6
	H	I	G	3.67367	3	121T16D6
	H	I	G	3.67200	3	121TTD5
	H	I		3.59300	3	121TBD4
J		I		3.39433	3	121TTD4
J		I	K	3.28500	3	121T8D5
J		L	K	3.14133	3	121T16D5
J		L	K	3.10533	3	121TTD3
J		L	K	3.10000	3	121T4D5
J		L	K	2.99467	3	121T8D4
M		L	K	2.90467	3	121TBD3
M		L		2.86167	3	121T4D4
M		L		2.82933	3	121T16D4
M		N		2.52633	3	121T8D3
		N		2.27033	3	121T4D3
		N		2.13467	3	121T16D3
		O		1.62900	3	121TTD2
P		O		1.57200	3	121TBD2
P		O		1.32467	3	121T4D2
P				1.18767	3	121T8D2
P				1.17667	3	121T16D2
		Q		0.55167	3	121T8D1
		Q		0.52233	3	121TTD1
		Q		0.49000	3	121TBD1
		Q		0.44100	3	121T4D1
		Q		0.42433	3	121T16D1

Anexo 6. Análisis estadístico de la velocidad de crecimiento de la cepa CPM-113 (*T. aggressivum* f. *aggressivum*).

Sistema SAS

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Velocidad de crecimiento

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	56	696.5375831	12.4381711	18.45	<.0001
Error	123	82.9280662	0.6742119		
Total correcto	179	779.4656494			

R-cuadrado	0.893609	Coef Var	24.55891	Raiz MSE	0.821104	vel Media	3.343406
------------	----------	----------	----------	----------	----------	-----------	----------

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Trat	56	696.5375831	12.4381711	18.45	<.0001

Anexo 7. Análisis estadístico de la producción de esporas de las cepas CPM-108 (*T. harzianum*), CPM-113 (*T. aggressivum* f. *aggressivum*) y CPM-121 (*T. atroviride*).

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Producción de esporas

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	44	6.5437843E13	1.4872237E12	118.50	<.0001
Error	90	1.1295833E12	12550925926		
Total correcto	134	6.6567426E13			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	esp Media
0.983031	14.34931	112030.9	780740.7

Fuente trat	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
	44	6.5437843E13	1.4872237E12	118.50	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para producción de esporas

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	90
Error de cuadrado medio	1.255E10
Valor crítico del rango estudentizado	5.77806
Diferencia significativa mínima	373731

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento		Media	N	trat						
	A	2825000	3	108TBC3						
B	A	2691667	3	108TTC3						
B		2391667	3	121TBC3						
	C	1950000	3	108TTC2						
D	C	1866667	3	121TTC3						
D	C	1708333	3	108TBC2						
D	C	1633333	3	108T4C3						
D	C	1583333	3	108T8C3						
D	E	1525000	3	108T16C3						
F	E	1200000	3	108T16C2						
F	E	1158333	3	108T8C2						
F	G	891667	3	108T4C2						
F	G	H	883333	3	121T4C3					
I	G	H	733333	3	113TBC2					
I	J	G	H	700000	3	113TBC3				
I	J	G	H	691667	3	121T8C3				
K	I	J	G	H	616667	3	121T16C3			
K	I	J	G	H	616667	3	113TBC1			
K	I	J	G	H	608333	3	113TTC3			
K	I	J	G	H	L	575000	3	113T4C3		
K	I	J	G	H	L	575000	3	113TTC2		
K	I	J	G	M	H	L	541667	3	113TTC1	
K	I	J	N	G	M	H	L	525000	3	113T4C2
K	I	J	N	M	H	L	516667	3	121TBC2	
K	I	J	N	O	M	L	491667	3	113T4C1	
K	I	J	N	O	M	P	L	475000	3	113T8C3
K	I	J	N	O	M	P	L	466667	3	108TBC1

K	I		J	N	O	M	P	L	466667	3	121TTC2
K	I	Q	J	N	O	M	P	L	425000	3	113T8C2
K	I	Q	J	N	O	M	P	L	391667	3	113T8C1
K		Q	J	N	O	M	P	L	350000	3	108TTC1
K		Q	J	N	O	M	P	L	350000	3	113T16C3
K		Q		N	O	M	P	L	291667	3	113T16C2
K		Q		N	O	M	P	L	283333	3	113T16C1
K		Q		N	O	M	P	L	275000	3	121TBC1
K		Q		N	O	M	P	L	258333	3	121T4C2
K		Q		N	O	M	P	L	258333	3	108T4C1
		Q		N	O	M	P	L	233333	3	108T8C1
		Q		N	O	M	P	L	233333	3	121T8C2
		Q		N	O	M	P		183333	3	108T16C1
		Q		N	O	M	P		183333	3	121T16C2
		Q		N	O		P		166667	3	121TTC1
		Q			O		P		133333	3	121T16C1
		Q					P		116667	3	121T8C1
		Q							91667	3	121T4C1

Anexo 8. Análisis estadístico de la actividad de lacasas de las cepas CPM-108 (*T. harzianum*), CPM-113 (*T. aggressivum* f. *aggressivum*) y CPM-121 (*T. atroviride*).

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Actividad de lacasas

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	44	5.10877333	0.11610848	311.00	<.0001
Error	90	0.03360000	0.00037333		
Total correcto	134	5.14237333			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	lac Media
0.993466	26.50862	0.019322	0.072889

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
trat	44	5.10877333	0.11610848	311.00	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para la actividad de lacasas

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	90
Error de cuadrado medio	0.000373
Valor crítico del rango estudentizado	5.77806
Diferencia significativa mínima	0.0645

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	0.85333	3	121T16C1
A	0.83333	3	121T16C2
B	0.63333	3	113T16C1
C	0.30000	3	113T16C2
D	0.08333	3	108T8C2

E	D		0.07000	3	113TTC1
E	D	F	0.05000	3	113T16C3
E	D	F	0.05000	3	121TBC1
E	D	F	0.04000	3	108T16C1
E	D	F	0.04000	3	121TTC1
E	D	F	0.03667	3	121T4C2
E	D	F	0.03667	3	121TTC2
E	D	F	0.03333	3	113TBC1
E	D	F	0.03333	3	121T16C3
E	D	F	0.02667	3	113TBC3
E	D	F	0.02667	3	121TTC3
E	D	F	0.02000	3	113TBC2
E	D	F	0.02000	3	121TBC2
E		F	0.01667	3	108T16C2
E		F	0.01667	3	108TTC1
E		F	0.01333	3	113T8C3
E		F	0.01000	3	108TTC3
E		F	0.01000	3	113T4C1
E		F	0.00667	3	108T4C2
E		F	0.00667	3	113T4C3
E		F	0.00667	3	108T8C3
		F	0.00333	3	113T8C1
		F	0.00333	3	108T8C1
		F	0.00000	3	108TTC2
		F	0.00000	3	108T4C3
		F	0.00000	3	108TBC1
		F	0.00000	3	113TTC3
		F	0.00000	3	108T4C1
		F	0.00000	3	121T4C1
		F	0.00000	3	113T8C2
		F	0.00000	3	113T4C2
		F	0.00000	3	108T16C3
		F	0.00000	3	121T8C2
		F	0.00000	3	121T8C3
		F	0.00000	3	121T4C3
		F	0.00000	3	121T8C1
		F	0.00000	3	121TBC3
		F	0.00000	3	108TBC2
		F	0.00000	3	108TBC3
		F	0.00000	3	113TTC2