

**ANÁLISIS CUALITATIVO DE LITERATURA SOBRE LAS TÉCNICAS DE  
BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS POR HIDROCARBUROS Y  
CONTAMINANTES ORGÁNICOS PERSISTENTES EMPLEANDO EL HONGO  
*Trichoderma sp.***

**KAREN STEFANNY BECERRA CORREA**

**DIRECTOR DE PROYECTO:  
IVÁN ALEJANDRO AVILA, PhD**

**UNIVERSIDAD ANTONIO NARIÑO  
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL Y CIVIL  
BOGOTÁ, 3 DE NOVIEMBRE DE 2020**

# TABLA DE CONTENIDO

ABSTRACT .....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
1. OBJETIVOS.....	10
OBJETIVO GENERAL .....	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	10
2. MARCO CONCEPTUAL .....	11
2.1. CONTAMINACIÓN POR HIDROCARBUROS.....	11
2.2. CONTAMINACIÓN POR PESTICIDAS.....	11
2.3. PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN.....	11
2.3.1. Hongos ligninolíticos en procesos de biorremediación.....	12
2.3.1.1. <i>Trichoderma</i> en la degradación de contaminantes orgánicos .....	12
2.3.2. Actividad enzimática ligninolítica.....	13
2.3.2.1. Lacasa.....	13
2.3.2.2. Manganese Peroxidasa .....	13
2.4. REVISIÓN SISTEMÁTICA PARA LA INVESTIGACIÓN.....	13
3. ESTADO DEL ARTE .....	15
3.1. DEGRADACIÓN DE CONTAMINANTES POR <i>TRICHODERMA</i> Y COMBINACIONES DE TÉCNICAS.....	15
3.2. <i>TRICHODERMA</i> EN LA DEGRADACIÓN Y PROCESOS DE BIOAUMENTACIÓN. ....	16
3.3. CAPACIDAD DE DEGRADACIÓN DE <i>TRICHODERMA</i> EN BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS.....	17
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	19
5. METODOLOGÍA .....	20
5.1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Y ECUACIONES DE BÚSQUEDA PARA LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS.....	20
5.2. DEFINICIÓN DE CRITERIOS DE SELECCIÓN .....	22
5.3. DEPURACIÓN DE LA INFORMACIÓN CON PALABRAS CLAVES PARA LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS.....	22
5.3.1. Criterios de exclusión e inclusión y eliminación de palabras claves .....	22
5.4. GENERACIÓN DE NUEVA ECUACIÓN DE BÚSQUEDA PARA LA DEGRADACIÓN DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS PERSISTENTES E HIDROCARBUROS.....	23

5.5	BÚSQUEDA DE VARIABLES DE EXPERIMENTACIÓN.....	24
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
6.1	ANÁLISIS DE LAS PUBLICACIONES .....	25
6.2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA INICIAL Y DEFINICIÓN DE CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	27
6.3	DEPURACIÓN DE INFORMACIÓN OBTENIDA .....	29
6.4	NUEVA ECUACIÓN DE BÚSQUEDA .....	30
6.4.1	Revisión bibliográfica inicial.....	30
6.5	ANÁLISIS DE VARIABLES DE EXPERIMENTACIÓN .....	32
6.5.1	Especie de hongo.....	33
6.5.2	Medio de cultivo para la degradación .....	34
6.5.3	Matriz a descontaminar.....	36
6.5.4	Tipo de contaminante a degradar.....	36
6.5.5	Técnicas complementarias.....	37
6.5.6	Actividad enzimática.....	39
6.5.7	Porcentajes de degradación.....	41
7.	CONCLUSIONES.....	44
8.	RECOMENDACIONES.....	45
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Metodología .....	20
Figura 2 Búsqueda inicial por medio de palabras claves. Tomado de: Búsqueda de Scopus .....	21
<i>Figura 3 Ecuación de búsqueda inicial. Tomado de: Base de datos Scopus .....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 4 Ecuación de búsqueda avanzada. Fuente: Base de datos Scopus.....</i>	<i>24</i>
Figura 5 Análisis de documentos obtenidos por año. Fuente: Base de dato Scopus.....	25
Figura 6 Análisis de publicación de documentos por país. Fuente: Base de datos Scopus .....	26
Figura 7 Análisis de número de documentos por autor. Fuente: Base de datos Scopus.....	26
Figura 8 Ecuación de búsqueda contaminantes orgánicos persistentes. Fuente: Base de datos Scopus .....	30
Figura 9 Depuración dentro de la ecuación de búsqueda <i>Fuente: Base de datos de Scopus .....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 10 Especies de Trichoderma encontrada dentro de los documentos recuperados Fuente: Autor.....</i>	<i>33</i>
Figura 11 Medio de cultivo más mencionados dentro de los artículos de investigación Fuente: Autor .....	34
Figura 12 Tipo de matriz a descontaminar, identificada en los artículos de investigación. <i>Fuente: Autor.....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 13 Contaminantes en la investigación Fuente: Autor .....</i>	<i>37</i>
Figura 14 Porcentaje de publicaciones que implementaban técnicas complementarias.....	38
Figura 15 Relación de la actividad enzimática y número de artículos .....	39
Figura 16 Análisis de porcentajes de degradación por tipo de contaminante .....	43

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Características de los documentos a seleccionar .....	22
Tabla 2 Identificación de palabras claves.....	27
Tabla 3 Exclusión de palabras claves no relevantes.....	28
Tabla 4 Exclusión de documentos por criterios de selección. ....	29
Tabla 5 Criterios de exclusión e inclusión .....	29
Tabla 6 Palabras claves segunda ecuación de Búsqueda .....	30
Tabla 7 Palabras claves excluidas de la nueva ecuación de búsqueda .....	31
Tabla 8 Resultados de la depuración .....	32
Tabla 9 Medios líquidos identificados en la degradación de contaminantes .....	35
Tabla 10 Biorreactores identificados en las investigaciones.....	39
Tabla 11 Relación de actividad enzimática y tipos de contaminantes.....	40
<i>Tabla 12 Relación contaminante y especie .....</i>	<i>42</i>

## ANEXOS

Anexo 1. Matriz de seguimiento de variables.

Anexo 2. Artículo de investigación

**Nota de aceptación**

---

---

---

**Director UDCI**

---

**Jurado 1**

---

**Jurado 2**

---

**Bogotá D.C., Noviembre 2020**

## **AGRADECIMIENTOS**

En principio, le doy gracias a Dios por permitirme culminar esta etapa de mi vida, un logro más que con satisfacción pude cumplir. A mi mamá Franci Correa, porque por ella pude llegar hasta aquí, gracias a su esfuerzo diario, gracias por motivarme, alentarme, aconsejarme y no dejarme sola en ningún momento. A mi abuela Doris Rojas por brindarme su amor y palabras de consuelo que siempre me animaron. A mí hermano Felipe Becerra y mi papá Luis Becerra por su paciencia y apoyo en cada momento, sin ustedes esto tampoco hubiera sido posible. A mí familia en general y a mi novio, gracias por cada palabra que me impulso a seguir. A mi profesor, gracias por la orientación y el acompañamiento que tuvo, la paciencia y los conocimientos que me brindo durante todo el proyecto y a lo largo de la carrera.

## **RESUMEN**

Los hidrocarburos son un contaminante xenobiótico y persistente en el suelo por su baja solubilidad en agua, así como su estructura policondensada estable. Estos contaminantes orgánicos son derivados de la quema de combustibles fósiles y de desechos de actividades industriales, al igual que los plaguicidas que son contaminantes también orgánicos persistentes en suelos y agua, pero generados por actividades de origen agrícola. Debido a la presencia de estos contaminantes, la biorremediación surge como una alternativa de degradación de estas sustancias en compuestos más simples.

El objetivo de la revisión será determinar las técnicas más prometedoras para el uso de *Trichoderma* en procesos de biorremediación, esto por medio de artículos de investigación obtenidos por la base de datos de Scopus, con el fin de guiar nuevos estudios en el tema.

Dentro de la revisión se encontraron aspectos relevantes tales como la especie más usada para la biorremediación, el medio de cultivo más frecuentado, así como el potencial de degradación, su actividad enzimática y las diferentes técnicas de este proceso.

Palabras claves: Biorremediación, *Trichoderma*, hidrocarburos, pesticidas

## **ABSTRACT**

Hydrocarbons are a xenobiotic and persistent pollutant in the soil due to their low solubility in water as well as their stable polycondensed structure. These organic pollutants are derived from the burning of fossil fuels and waste from industrial activities, as well as pesticides that are also persistent organic pollutants in soils and water but generated by activities of agricultural origin. Due to the presence of these pollutants, bioremediation arises as an alternative for the degradation of these substances into simpler compounds.

The objective of the research is to determine the most promising techniques for the use of the *Trichoderma* fungus, used in bioremediation through a literature review of research articles, in order to guide new studies on the subject. The database used for the collection of information was Scopus.

Within the review, relevant aspects were found such as the species most used for bioremediation, the most frequented culture medium as well as the potential for degradation, its enzymatic activity and the medium of the different techniques of this process.

Keywords: Bioremediation. Hydrocarbons, pesticides, *Trichoderma*

## INTRODUCCIÓN

Los efectos de los hidrocarburos en el ambiente son nocivos y su degradación puede llegar a tener altos costos por el uso de productos químicos y largos tiempos de tratamiento. Estos contaminantes tienen propiedades de persistencia en los suelos por lo que el uso de tratamientos de biorremediación puede ser una alternativa viable. El hongo *Trichoderma*, debido a su capacidad de producir enzimas extracelulares, ha tenido una ampliación en investigaciones de tratamiento de contaminantes (Clavijo,1998). A pesar de tener alguna información del uso del hongo, se requiere identificar sus mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares, además de la identificación de la especie específica de *Trichoderma* para establecer su potencial biodegradante en contaminantes orgánicos (Argumedo et al,2009). Las investigaciones realizadas en las que se analiza la biodegradación de suelos contaminados por petróleo, apoyan los resultados en la degradación de hidrocarburos, por lo que es necesario identificar la efectividad de *Trichoderma* en las que sus condiciones permitan obtener un mayor porcentaje de degradación de manera eficaz y con los métodos más específicos (Pesántez y Castro, 2016).

Por tal motivo, a través de esta revisión bibliográfica se recopilarán los aspectos relevantes del hongo *Trichoderma* en la degradación de los hidrocarburos en los suelos, mediante un análisis de información entregada por la base de datos de Scopus como: condiciones de cultivo, experimentación y respuesta ante este contaminante; el análisis pretende guiar las investigaciones con el hongo para evidenciar su potencial en la biorremediación de un ambiente contaminado.

## **1. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar dentro de la literatura las alternativas y técnicas más prometedoras para el uso del hongo *Trichoderma* con mejores resultados en la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Recopilar información actual sobre el uso del hongo *Trichoderma* en la degradación de contaminantes, mediante una búsqueda sistemática en bases de datos de Scopus.
- Analizar variables expuestas en la búsqueda enfatizando en la eficacia de degradación de los hidrocarburos por uso del hongo *Trichoderma*.
- Plantear la estrategia de enfoque más eficaz en la degradación de los hidrocarburos en el suelo, de acuerdo a los resultados de las variables expuestas.

## **2. MARCO CONCEPTUAL**

### **2.1. CONTAMINACIÓN POR HIDROCARBUROS**

La contaminación por hidrocarburos afecta directamente aguas y suelos (Plohl y Leskovsek, 2002). Debido a la persistencia de estos contaminantes debe realizarse una remediación por los efectos nocivos en la salud humana y el medio ambiente. Los métodos más usuales para la eliminación son costosos y presenta acciones a largo plazo, además del uso de sustancias químicas que alteran la composición del suelo (Jiménez *et al* 2010). Dentro de las alternativas menos costosas se encuentran microorganismos como cepas bacterianas y hongos que pueden degradar de manera efectiva algunos hidrocarburos contaminantes, por esto la biorremediación es una solución viable y menos costosa que otras alternativas (Garzón *et al*, 2017).

### **2.2 CONTAMINACIÓN POR PESTICIDAS**

Los pesticidas son usados en la agricultura por su potencial de tratar plagas e insectos. Su función es reducir las pérdidas de cosechas y alimentos, por lo que se produjo un aumento indiscriminado en el uso de estos productos. Estos compuestos afectan directamente la salud humana y se han evidenciado efectos directos en órganos como el cerebro, el hígado y pulmones (Sharma *et al*, 2020). Este contaminante no es biodegradable, y es capaz de bioacumularse en el medio que es aplicado, lo que hace que lo hace persistir durante años.

### **2.3 PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN**

Para la limpieza de suelos contaminados se han utilizado elementos biológicos que benefician la degradación y transformación de los contaminantes, los métodos de biorremediación son eficientes debido a la capacidad de los microorganismos de degradar contaminantes, esto gracias al medio en el que se encuentre, el cual definirá su disponibilidad de nutrientes, entre otros; esta técnica ha permitido tratar grandes volúmenes de contaminantes con bajos y casi nulos impactos al ambiente a diferencia de otros procesos de descontaminación (Ortiz *et al*, 2005). La biorremediación puede realizarse en condiciones aerobias o anaerobias y las técnicas empleadas pueden realizarse de manera *in situ*, en la que no hay necesidad de trasladar y excavar el material contaminado si no tratarlo propiamente en el sitio. Para esto es necesario mantener condiciones de temperatura, nutrientes y cantidad

de oxígeno para el crecimiento del microorganismo con uso de birreactores (Velasco y Sepúlveda, 2003). En tratamientos ex situ se trasladada el material, entre los procesos más usuales para la degradación de hidrocarburos es el uso de biopilas en la que se estimula la actividad de los microorganismos, aireando, adicionando nutrientes y equilibrando factores como la humedad (Velasco y Sepúlveda, 2003). Igualmente, para obtener buenos porcentajes de degradación en procesos de biorremediación se debe realizar un estudio de la capacidad de los microorganismos para metabolizar estos compuestos (Ortiz *et al*, 2005),

### **2.3.1 Hongos ligninolíticos en procesos de biorremediación**

El uso de microorganismos y hongos ha demostrado varias ventajas en procesos de biorremediación, estos hongos son más económicos que las bacterias por su crecimiento en sustratos como desechos agrícolas y madera (Okafor *et al*, 2009). Los hongos filamentosos son agentes potenciales de degradación gracias a sus hifas ramificadas por lo que puede llegar a profundidad a los sustratos contaminados, a través de sus enzimas extracelulares, estas enzimas no son específicas del sustrato y, por lo tanto, pueden oxidar una amplia gama de xenobióticos, incluidos pesticidas, plásticos e hidrocarburos, además, los hongos pueden crecer en condiciones ambientales diferentes y extremas (Magan, 2007). Este tipo de hongos son destacados por competir por su espacio y la colonización del suelo, por mantener su crecimiento por periodos largos, además de su capacidad de producción de enzimas ligninolíticas (Abadulla *et al*, 2000).

#### **2.3.1.1 *Trichoderma* en la degradación de contaminantes orgánicos**

*Trichoderma* es usado en la actualidad para la producción industrial de enzimas, y más comúnmente para el crecimiento de plantas y control biológico (Martínez *et al*, 2015). *Trichoderma* es capaz de adaptarse a condiciones ambientales y sustratos distintos, gracias a su producción enzimática y resistencia a inhibidores microbianos (Howell, 2003). Se observa que dentro de las investigaciones se pensó en la posibilidad de aprovechar las propiedades de *Trichoderma* en la biorremediación de hidrocarburos, en los que sus porcentajes de degradación son casi del 80% cuando su sustrato contiene glucosa como fuente de carbono (Cerniglia, 2010) para especies tales como *T.hamatum*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. viride*, *T. virens* y *T. asperellum*; por lo que se ha planteado la utilización de *Trichoderma* en la degradación de hidrocarburos incluida su producción enzimática. Los estudios realizados por

Cerniglia (2010), han demostrado la capacidad de *Trichoderma* para transformar contaminantes orgánicos en general y metales pesados, utilizando las especies mencionadas anteriormente.

Para el uso de *Trichoderma* y su análisis de respuesta es importante conocer en qué momento y bajo qué condiciones se favorece el uso de este y sus enzimas, además de seleccionar la especie adecuada para la eliminación de contaminantes a analizar, para orientar su forma de producción y aplicación en condiciones idóneas.

### **2.3.2 Actividad enzimática ligninolítica**

Los enzimas ligninolíticas: lacasas y manganeso peroxidasas, son las más estudiadas por su capacidad de degradación de lignina dado que su rompimiento es el más difícil (Kunamneni *et al*,2008), también son relevantes por su efecto sobre los contaminantes orgánicos persistentes como compuestos aromáticos, tintes sintéticos y compuestos organoclorados. Se han generado variedad de estudios alrededor de actividad en degradación de contaminantes y la producción enzimática (Wesenberg *et al*, 2003).

#### **2.3.2.1 Lacasa**

El potencial de la lacasa la diferencia de otras enzimas, se basa en su producción de anión superóxido y junto al peróxido de hidrógeno degradan la lignina. Esto permite que el rompimiento de los contaminantes sea de manera más eficaz (Wesenberg *et al*, 2003).

#### **2.3.2.2 Manganeso Peroxidasa**

El potencial de oxidación de la enzima manganeso peroxidasa, se debe a su actividad de formación de radicales  $Mn^{+3}$  a  $Mn^{+2}$  en la que se estabiliza el proceso formando quelatos con ácidos carboxílicos, estos actúan eliminando electrones e hidrógenos de las moléculas orgánicas y de esta forma aumenta la disponibilidad de sustratos implicados en metabolismo microbiano (Hofrichter, 2002).

## **2.4 REVISIÓN SISTEMÁTICA PARA LA INVESTIGACIÓN**

Para obtener una evidencia de la utilización de *Trichoderma* en procesos de biorremediación, en la que se tomen las decisiones correctas guiadas a obtener los mejores resultados en su aplicación, se debe realizar un análisis bibliográfico en donde se depuren los

estudios pertinentes, por lo que es necesaria una revisión sistemática. Para realizar una revisión sistemática se combinan los estudios alrededor de la misma pregunta de investigación, por medio de un análisis cualitativo con los que se pretende facilitar de manera más objetiva la evidencia de las investigaciones originales, resolver los conflictos generados observados en los diferentes estudios, analizar los objetivos que no fueron parte de las investigaciones para así guiar esta al camino definitivo y eficaz dando una respuesta concreta a la investigación (Henaó, 2015). Para la elaboración de una revisión sistemática generalmente se siguen las siguientes etapas: formulación del problema, búsqueda de estudios, codificación de los mismos, calcular la cantidad, análisis e interpretación (Sánchez y Botella, 2010).

Dentro de las ventajas de las revisiones sistemáticas, presentan una síntesis de información alrededor de la pregunta problema planteado, permitiendo obtener toda la evidencia dentro del tema puntual, con base en estos estudios se plantean hipótesis y se guían las investigaciones. Dentro de las limitaciones de las revisiones se identifica riesgo al sesgo dentro de la búsqueda con lo que se selecciona, se analiza y se sintetiza la información, para esto se debe realizar de manera correcta una identificación y selección de documentos (Sánchez y Botella, 2010).

### 3 ESTADO DEL ARTE

Son pocas las investigaciones sobre la degradación de los hidrocarburos mediante el uso de *Trichoderma* (Pesántez y Castro, 2016), aunque *Trichoderma* tiene varias aplicaciones a nivel industrial en el crecimiento de plantas gracias a su producción enzimática, se pretende recopilar toda la información de respuesta de *Trichoderma* en la degradación de hidrocarburos en los suelos, mediante las bases de datos de Scopus.

A continuación, se describirán las investigaciones seleccionadas respecto a la degradación de hidrocarburos por cepas del hongo *Trichoderma*, obtenidas gracias a parámetros de exclusión y palabras claves definidas previamente.

#### 3.1 DEGRADACIÓN DE CONTAMINANTES POR *TRICHODERMA* Y COMBINACIONES DE TÉCNICAS.

**Título: Efecto de microremediación de la cepa T22 de *Trichoderma harzianum* combinado con ozonización en arena contaminada con diésel.**

La investigación tuvo como objetivo utilizar una tecnología de remediación para suelos contaminados con diésel en la que se utilizaba *Trichoderma Harzianum* combinado con tratamiento de ozonización para oxidar los compuestos orgánicos contenidos en el diésel, antes y después de un periodo de inoculación de 28 días, con la que se pretendía utilizar el diésel como fuente de carbono (Elshafie *et al*, 2020). Se estableció la efectividad de degradación del diésel por *Trichoderma*, dentro de las variables de investigación, se realizaron tratamientos por ozonización durante 30 minutos a  $225 \text{ Lh}^{-1}$  con el fin de observar la capacidad de oxidación individual y una combinación con las cepas del hongo, se analizaron resultados de inhibición en el crecimiento del hongo por efectos del diésel después de 72 horas. La investigación mostró efectos positivos en la biodegradación del diésel con porcentajes de 70.16% y 88.35%. Se obtuvieron mayores porcentajes de degradación posterior a la ozonización en combinación con el hongo y el crecimiento del hongo se vio afectado en dosis altas de diésel, demostrando que necesita más tiempo de adaptación en el medio (Elshafie *et al*, 2020). Como conclusión el uso del hongo con o sin aplicación del ozono puede ser un enfoque factible para potenciar la degradación natural de los hidrocarburos.

### **3.2 TRICHODERMA EN LA DEGRADACIÓN Y PROCESOS DE BIOAUMENTACIÓN.**

**Título: Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) por *Trichoderma reesei* FS10-C y efecto de la bioaumentación en un suelo envejecido contaminado con HAP.**

El estudio fue realizado en un suelo de área agrícola contaminado con hidrocarburos aromáticos policíclicos hace 30 años por lo cual los contaminantes presentaban proceso de meteorización largo. La especie de *Trichoderma Reesei* fue utilizada en el proceso de biodegradación, aislada previamente y con la preparación necesaria, se realizó un cultivo en medio líquido (Yao *et al*, 2015). Se determinó el crecimiento de los hongos y la actividad enzimática en el medio líquido, se analizó la actividad enzimática del suelo y la diversidad funcional de la comunidad microbiana de éste, se analizó la degradación de hidrocarburos BaP (Benzo-Pireno), la eliminación del HAP en el suelo por el hongo, con lo que se concluyó que el uso del hongo *Trichoderma Reesei* mostró capacidad de degradación en medio líquido con sustrato de glucosa. La bioaumentación realizada en el estudio de microcosmos mejoró significativamente la degradación de HAP en el suelo (Yao *et al*, 2015). El uso de bioaumentación dentro de los tratamientos de biodegradación con el hongo mostró resultados prometedores en suelos envejecidos dado los porcentajes de degradación de BaP (Benzo-Pireno) del 54%, además aumentó la actividad microbiológica del suelo, por lo que es necesario ampliar el uso de estos procesos en diferentes tipos de suelo y condiciones de crecimiento dentro de la investigación.

**Título: *Trichoderma longibrachiatum* Evx1 es un biocatalizador fúngico adecuado para la remediación de suelos contaminados con combustible diésel e hidrocarburos aromáticos policíclicos.**

La investigación utilizó *Trichoderma sp* para la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos, los cuales fueron aislados de un suelo de bosque semideciduo en los que por temporada seca y prolongada pierden su follaje. Los porcentajes de degradación y tolerancia de los hidrocarburos aromáticos policíclicos fueron analizados en cultivos suplementados con fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, lo que demostraba la respuesta de degradación del hongo. Se determinó la especie de *Trichoderma* dentro de un análisis de

árbol filogenético, se observó el proceso de decoloración de colorantes aromáticos y pruebas de reacción de ácido gálico. El análisis filogenético reveló que la cepa perteneciente a *Trichoderma longibrachiatum* puede ser utilizada para la degradación ambiental de hidrocarburos, se identificó que estas también descomponen los clorofenoles, se obtuvo una degradación eficiente de HAP como fenantreno, benzo, antraceno entre otros; esto mediante un biorreactor por modo lotes (Andreolli *et al*, 2016). En conclusión, *Trichoderma longibrachiatum* fue la especie seleccionada para la degradación de hidrocarburos dado su potencial evidenciado en los estudios, se evidencia también que es ideal para procesos a gran escala de biorremediación en contaminantes como los combustibles diésel, esto por la técnica de bioaumentación y el uso de biorreactores modo lotes, en la que se obtuvieron porcentajes del 50,1% de degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos.

### **3.3 CAPACIDAD DE DEGRADACIÓN DE *TRICHODERMA* EN BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS.**

**Título: *Trichoderma*: Evaluación de sus capacidades degradantes para la biorremediación de mezclas de complejos de hidrocarburos**

Dentro de esta investigación se utilizaron cepas pertenecientes a *Trichoderma asperellum* y especies de *Trichoderma harzianum*, inoculadas directamente con aceite de motor usado durante 45 días (Daccò *et al*, 2020). Para lo anterior se analizaron las cepas de *Trichoderma* y sus relaciones filogenéticas las cuales fueron aisladas en ambientes distintos con suelos contaminados por hidrocarburos. Se realizaron pruebas de tolerancia de los hongos a sustancias hidrocarbonadas mediante placas de Petri en agar mineral para evaluar el crecimiento del hongo en el aceite usado. Se analizaron las actividades enzimáticas ligninolíticas (lacasa y peroxidasa) y dentro de esta prueba de tolerancia se concluyó que todas las cepas pudieron crecer y el aceite de motor no inhibe su crecimiento. Para *Trichoderma asperellum* se identificó eliminación del 74% de HAP y una mejor degradación por parte *Trichoderma harzianum*, lo anterior dependiendo de sus características de crecimiento en concentración de hidrocarburos (Daccò *et al*, 2020). En general la cepa de *Trichoderma harzianum* fue la más exitosa en procesos de degradación. Ésta tolera la presencia de aceite de motor y lo utiliza para su crecimiento, la eficiencia de degradación depende de las cepas y especies individuales. *Trichoderma hazrianum* respondió mejor a

todas las pruebas posiblemente debido a su mecanismo adaptativo en la degradación de hidrocarburos. El medio de cultivo complementado con aceite de motor además de los experimentos realizados en esta investigación, demostraron la eficiencia de degradación de hidrocarburos en la que su porcentaje más alto fue del 83% (Fenantreno y pireno), demostrando sus mecanismos enzimáticos. La mejor respuesta de degradación se obtuvo por *Trichoderma harzianum*.

**Título: Degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en el suelo por una cepa tolerante de *Trichoderma asperellum***

Para identificar el potencial de degradación de contaminantes se utilizó una cepa de *Trichoderma Asperellum H15*, aislada previamente en un suelo contaminado con petróleo crudo pesado, a la que se le ha demostrado su capacidad de utilizar éste como fuente de carbono. Se mantuvo en placas de agar dextrosa de patata con temperatura de 30°C (Zafra *et al*, 2015). Se llevaron a cabo pruebas de degradación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos por la cepa seleccionada en un medio de cultivo sólido suplementado con hidrocarburos, con el fin de e medir su uso como fuente de carbono y posterior degradación. Se realizó un estudio de las medidas de actividad heterotrófica con el fin de preservar las condiciones aeróbicas y evitar la acumulación de CO<sub>2</sub>, junto con ensayos enzimáticos. La actividad heterotrófica de la cepa permitió el crecimiento de ésta durante la biodegradación de HAP y se evidenció aumento de CO<sub>2</sub> en el medio no contaminado a lo largo del proceso. Dentro de los resultados de los ensayos enzimáticos se encontró que dioxigenasa, lacasa y peroxidasa están involucradas en la degradación de los HAP por *Trichoderma Asperellum*. Se obtuvieron resultados de 78% en la degradación de fenantreno, 81% de BaP (Benzo-Pireno) ,63% de pireno (Zafra *et al*, 2015). Dados los porcentajes de degradación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos altos, demuestran que *Trichoderma asperellum* es viable en procesos de biorremediación, con capacidad de eliminar grandes cantidades de estos contaminantes en el suelo.

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El petróleo contiene numerosos hidrocarburos aromáticos y heterocíclicos, que tienen varios tamaños moleculares y complejidad (Tissot, BP y Welte, DH, 2013). Los hidrocarburos son uno de los contaminantes más complejos principalmente por su composición de anillos bencénicos. La liberación constante al ambiente por medio de actividades antropogénicas dadas por combustión incompleta, procesos industriales y derrames accidentales de crudo, es una de las principales problemáticas; el aumento de contaminación de aguas y suelos por estos compuestos generan un gran impacto ecológico por sus características tóxicas y su persistencia en el medio (Arias,2017). Por lo anterior, es importante realizar una remoción oportuna del contaminante, para esto son utilizados diferentes procesos biológicos en la que se ha demostrado la capacidad de los microorganismos en la degradación de los contaminantes, contribuyendo en la oxidación, la degradación y transformación de éstos (Arroyo et al,2004).

Muchas bacterias y hongos pueden degradar componentes de hidrocarburos contaminantes. La capacidad de producción de enzimas de los hongos (Fierro y Onofre, 2011), hace que sean relevantes dentro de la remoción de contaminantes ambientales; por ejemplo los hongos ligninolíticos han sido de los más usados para degradar contaminantes por su sistema enzimático no específico, constituido por oxidasas. Se identificó que varias especies de *Trichoderma* son utilizadas para la biorremediación especialmente en hidrocarburos empleándolos como fuente de carbono dentro sus ensayos, con ayuda de ciertas enzimas que facilitan su proceso dentro de la biodegradación de los hidrocarburos, mineralizando este compuesto (Lladó, 2012).

Por lo anterior surge la pregunta de investigación ¿Cuáles son los métodos más prometedores en investigación con el hongo *Trichoderma*, para su uso en biorremediación? con la que se pretende redefinir el potencial del hongo mencionado y guiar las investigaciones sobre el uso de este en la degradación de los hidrocarburos, lo que determinará el uso eficaz de la tecnología.

## 5. METODOLOGÍA

En la Figura 1 se observa el esquema de la metodología empleada en el presente trabajo de grado.

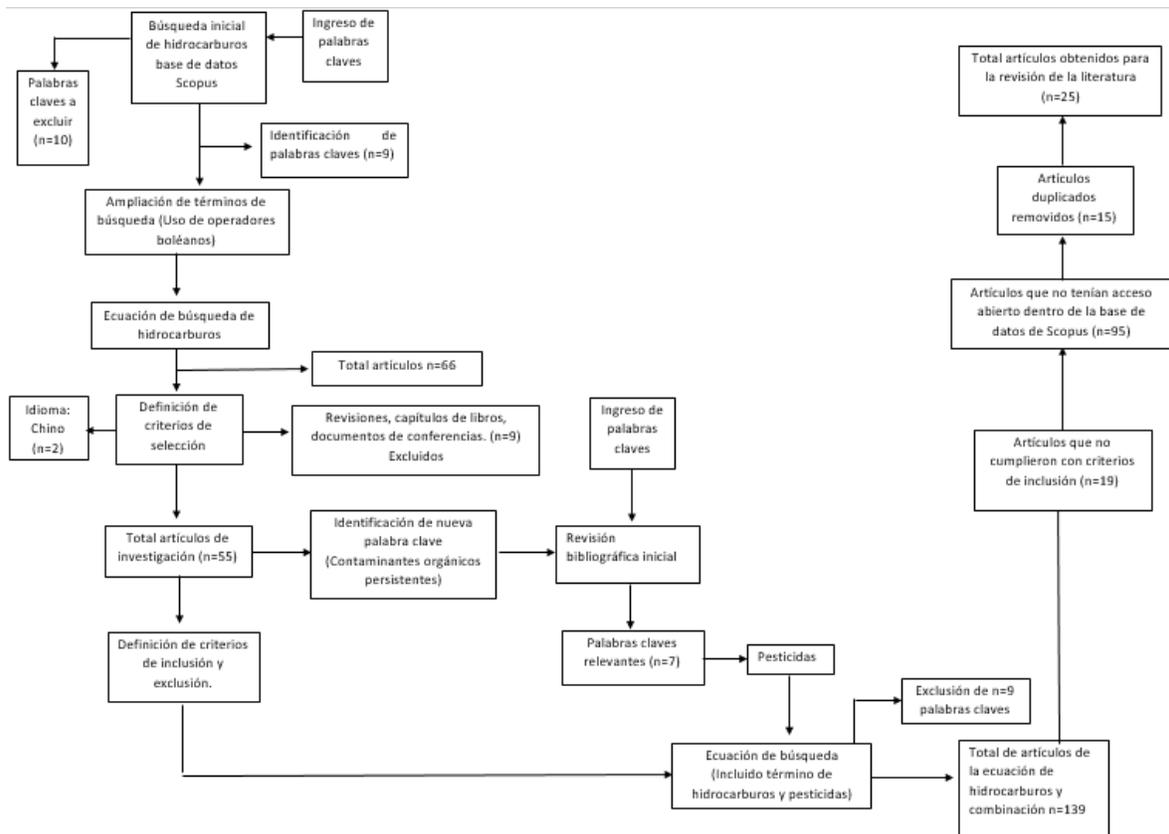


Figura 1 Metodología. Fuente: Autor

### 5.1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Y ECUACIONES DE BÚSQUEDA PARA LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS

Para el inicio de la búsqueda general de artículos relevantes para la investigación de degradación de contaminantes orgánicos persistentes con *Trichoderma*, fueron ingresadas las siguientes palabras claves iniciales dentro de la búsqueda en Scopus, como se presenta en la Figura 1.

<b>Términos de la búsqueda inicial</b>
<p>(TITLE-ABS-KEY (bioremediation OR biodegradation) AND TITLE-ABS-KEY (trichoderma) AND TITLE-ABS-KEY (hydrocarbons) AND PUBYEAR &gt; 2008</p>

Figura 2 Búsqueda inicial por medio de palabras claves. Tomado de: Búsqueda de Scopus

Esta tuvo como objetivo identificar las palabras claves que iban a ser relacionadas en la implementación de la ecuación de búsqueda, para esto se usaron palabras claves relevantes como: hidrocarburos, enzimas, *Trichoderma*, bioremediación y biodegradación; e irrelevantes como: bacteria, bacillus y crecimiento bacteriano. Con esto se eliminó directamente la información relacionada con *Bacterias* que, aunque tenía gran cantidad de resultados, no era el tema de investigación, centrando el tema en la degradación por hongos como se observa en la Figura 2.

Con la exclusión de estas palabras, se eliminaron artículos dirigidos a la degradación por bacterias. Con lo anterior, se ampliaron los criterios de búsqueda para que las palabras fueran buscadas en todo el cuerpo del artículo y no solamente en el título-keywords y resumen; además fue eliminado en general el término “bacteria” como se presenta en la Figura 3, en relación con las palabras claves de la Tabla 2. En la misma figura se evidencia que se emplearon los operadores boléanos “AND, OR, NOT”, con los cuales se define el límite de la búsqueda, gracias al uso adecuado de palabras claves y términos alternativos.

<b>Términos de búsqueda</b>
<p>(ALL(Bioremediation OR Biodegradation) AND ALL (<i>Trichoderma</i> AND NOT Bacteria) AND TITTLE-ABS-KEY (Hydrocarbons))AND PUBYEAR &gt; 2008</p>

Figura 3 Ecuación de búsqueda inicial. Tomado de: Base de datos Scopus

## 5.2 DEFINICIÓN DE CRITERIOS DE SELECCIÓN

Para la recolección de los artículos se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de selección (Tabla 1), con los cuales se establecerán los estudios de revisión, para posteriormente realizar la extracción de los datos necesarios:

Tabla 1 Características de los documentos a seleccionar

<b>Criterios de selección</b>	
<b>Información de investigación</b>	Métodos específicos
	Resultados favorecedores ante la degradación.
	Magnitudes de los resultados obtenidos y de variables expuestas.
<b>Información bibliométrica</b>	Cantidad de documentos relevantes recuperados sobre la degradación de contaminantes por hongos.
	Tipo de documento: artículo de investigación
	Idiomas: inglés, español y portugués

Fuente: Autor

## 5.3 DEPURACIÓN DE LA INFORMACIÓN CON PALABRAS CLAVES PARA LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS

### 5.3.1 Criterios de exclusión e inclusión y eliminación de palabras claves

Los criterios de exclusión e inclusión se establecieron con el fin de realizar la depuración de manera más precisa, incluían la prioridad de la investigación, el tipo de resultado que se quería obtener y como debían ser mostradas las técnicas y en general el cuerpo del artículo. Éstos fueron aplicados a los 55 artículos de investigación recuperados de la primera ecuación de búsqueda. Con los criterios se identificaron palabras claves que aparentemente no iban a ser cruciales porque estaban dirigidas al estudio genético de los hongos. Por la relevancia del

cuerpo del artículo, no se realizó ningún descarte de las diez palabras claves, no se realizó el descarte de estas diez palabras, se identificó que estos exponían de manera explícita los resultados, técnicas y magnitudes de degradación del contaminante. Sólo fue descartado el 10% de los artículos que relacionan las palabras claves no cruciales.

La cantidad de documentos obtenidos de la ecuación de búsqueda inicial (ítem 4.1) 55 artículos en total, contenían gran cantidad de información sobre la degradación de hidrocarburos por hongos, y con la lectura de estos se concluyó que otro tema de investigación que era importante, era la degradación de contaminantes orgánicos persistentes dado su mención dentro de los documentos, y se implementó una nueva ecuación de búsqueda.

#### **5.4 GENERACIÓN DE NUEVA ECUACIÓN DE BÚSQUEDA PARA LA DEGRADACIÓN DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS PERSISTENTES E HIDROCARBUROS**

Para incluir el término de “Contaminantes orgánicos persistentes” se realizó una búsqueda inicial con el fin del identificar las palabras claves e incluir la más relevante en la ecuación empleada para la degradación de hidrocarburos; de los términos encontrados se seleccionó “pesticidas”; es importante mencionar que quince de estos artículos estaban incluidos en la búsqueda con hidrocarburos,

Con ambos términos (“hidrocarburos” y “pesticidas”) se obtuvieron 104 artículos de investigación. Se realizó una nueva exclusión de palabras claves que hablaban de agentes de control biológico y como resultado final se obtuvieron 84 documentos. Se unificaron los documentos obtenidos de la ecuación inicial (sólo hidrocarburos) y ecuación final (ambos términos), con un número de documentos recuperados de 139 artículos. A estos 139 documentos se les realizó la debida depuración de la información, 95 documentos no tenían acceso abierto en las bases de datos de la Universidad Antonio Nariño, por lo que no fue posible realizar un análisis a profundidad de la información, 19 de los artículos restantes fueron descartados por su intrascendencia en la investigación basado en los criterios de exclusión e inclusión.

Se realizó una combinación de la ecuación de búsqueda por hidrocarburos y la ecuación de contaminantes orgánicos persistentes presentada en la Figura 3.

<b>Términos de búsqueda</b>
(ALL (bioremediation OR biodegradation) AND ALL ( <i>Trichoderma</i> AND NOT bacteria ) AND TITLE-ABS-KEY ( hydrocarbons OR pesticides ) ) AND PUBYEAR > 2008

Figura 4 Ecuación de búsqueda avanzada. Fuente: Base de datos Scopus

### **5.5 BÚSQUEDA DE VARIABLES DE EXPERIMENTACIÓN**

Para la búsqueda de variables de experimentación se implementó una revisión manual dentro del cuerpo del artículo, específicamente en los métodos y resultados, y fueron revisados los siguientes conceptos, relevantes en la investigación desarrollada en la Facultad de Ing. Ambiental: especie de hongo, medio de cultivo y actividad enzimática entre otros. Las anteriores variables fueron identificadas por palabras claves relacionadas en cada uno de los documentos recuperados y se seleccionaron las que más se repetían para generar una búsqueda más sencilla.

Para las variables identificadas se realizó una lectura a profundidad de los resultados del artículo, con esto se obtuvo información de técnicas complementarias, matriz de descontaminación y porcentajes de degradación. Esta información recolectada se unificó dentro de una matriz que comparaba todos los artículos obtenidos, con el fin de comprender el contexto y la cantidad de variables; posterior a esto se realizó un análisis de magnitudes de las variables investigadas.

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 ANÁLISIS DE LAS PUBLICACIONES

La base datos Scopus permite analizar los resultados de los artículos de investigación. Aquí se obtuvo el número de documentos por año de los 139 recuperados de la depuración. Se identificó que en el año 2014 se publicaron mayor cantidad de artículos (Ver Figura 5) y alrededor del 2014-2017 fueron en aumento la cantidad de publicaciones, lo que demostró que durante estos años aumentaron las investigaciones y usos sobre la utilización de hongos en procesos de biorremediación.



Figura 5 Análisis de documentos obtenidos por año. Fuente: Base de datos Scopus

Los países con mayor número de publicaciones según la Figura 6, dentro de las 139 publicaciones utilizadas para la revisión sistemática, fueron China e India, y en la búsqueda se establecen con 17 y 11 publicaciones respectivamente, las publicaciones de América Latina presentan mayor número de publicaciones en Brasil, México, y Argentina.

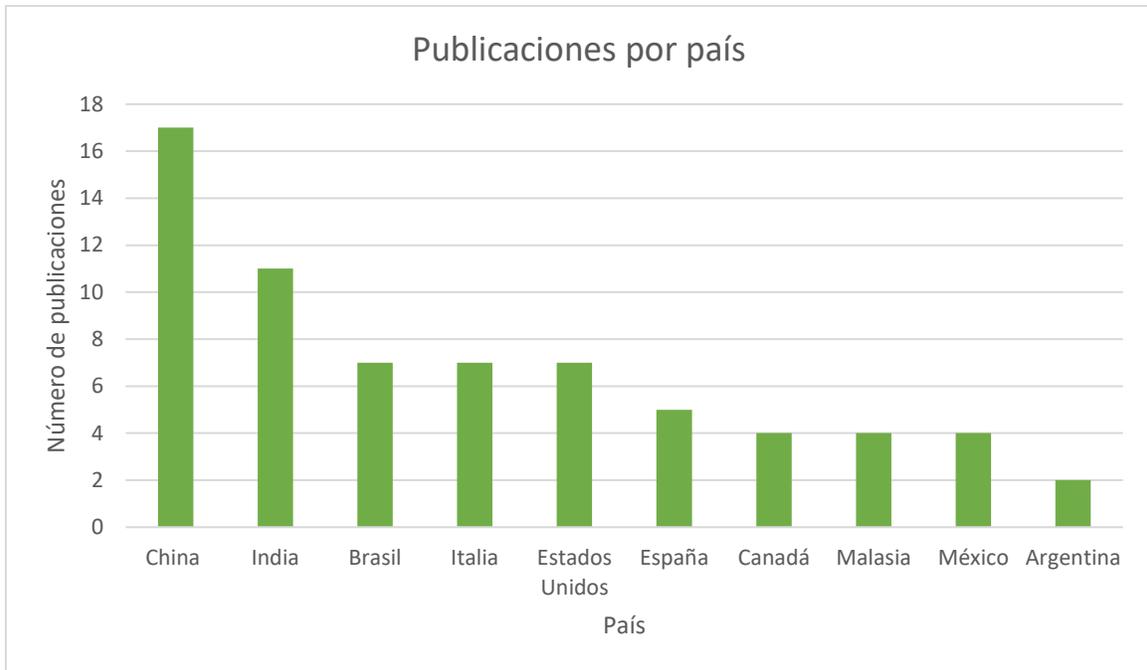


Figura 6 Análisis de publicación de documentos por país. Fuente: Base de datos Scopus

Los autores con mayor número de publicaciones, como se observa en la Figura 7, fueron Hadibrata T. Pazos, M. y Sanromán, M.A. con tres artículos recuperados dentro de la búsqueda, aunque no hay una notable diferencia del número de publicaciones por artículo, en promedio tienen 2 artículos publicados por autor.

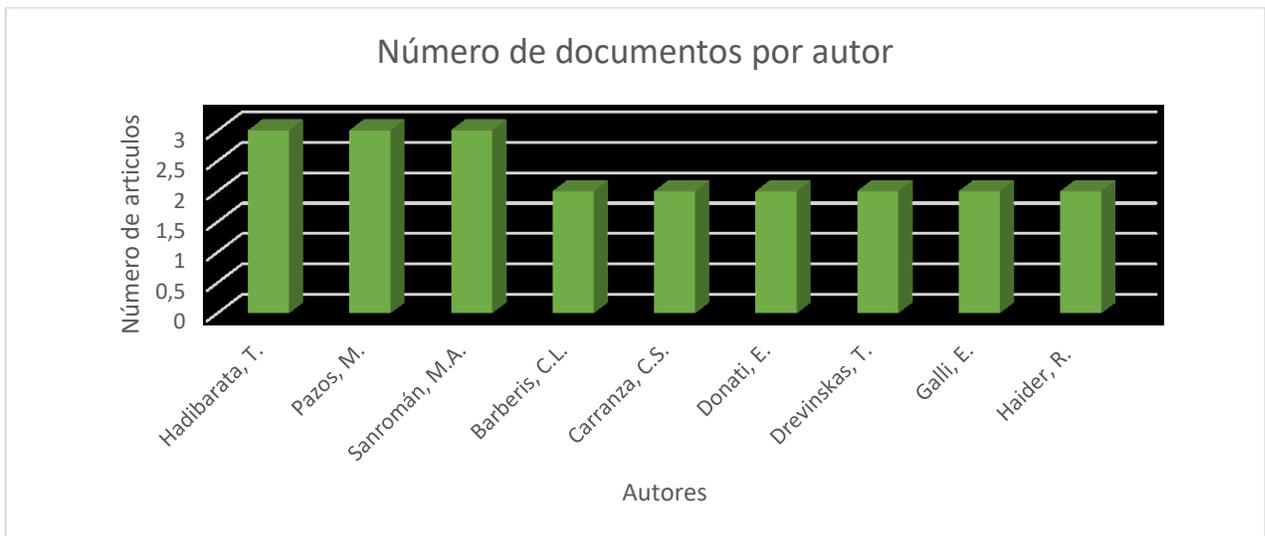


Figura 7 Análisis de número de documentos por autor. Fuente: Base de datos Scopus

## 6.2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA INICIAL Y DEFINICIÓN DE CRITERIOS DE SELECCIÓN

Con esta búsqueda inicial se revisaron los temas más relevantes para la investigación y cuales debían ser descartados; esto se logró identificando las palabras claves entregadas por la base de datos: en total se obtuvieron 157 palabras, las relevantes se demuestran en la Tabla 2 y las demás fueron descartadas por su intrascendencia en la investigación.

*Tabla 2 Identificación de palabras claves*

<b>PALABRAS CLAVES RELEVANTES IDENTIFICADAS</b>
Trichoderma Hydrocarbons
Hydrocarbons
Biorremediation
Biodegradation
Enzymes
Fungi
Ligninolytic Fungi
Contaminated Soil
Filamentous Fungus

*Fuente: Base datos Scopus.*

De las palabras claves expuestas en la búsqueda inicial, muchas de ellas no iban dirigidas a la degradación por hongos, por lo que se excluyeron de la lista temas relacionados con: bacterias, compostaje, explosivos, metales pesados y efluentes contaminados (Ver Tabla 3). Se identificaron también palabras claves que debían ser incluidas, como actividad enzimática, hongos ligninolíticos, *Trichoderma*, contaminantes orgánicos y contaminación de suelos.

Tabla 3 Exclusión de palabras claves no relevantes.

<b>Palabras claves excluidas</b>
Bacteria
Bacterium
Heavy Metal
Bacillus
Bacterial Growth
Bacterium Insolate
Acido Bacteria
Bacteriology
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Pseudomonas</i>

Fuente: Base de datos Scopus.

Con esto se eliminó directamente la información relacionada con *bacterias* que, aunque tenía gran cantidad de resultados, no era el tema de investigación, centrandolo el tema en la degradación por hongos.

### 6.2.1 Criterios de selección

Para la ecuación de búsqueda inicial (ítem 4.1) se obtuvieron un total de 66 documentos sin aplicar los criterios de selección, Scopus permite identificar estos de manera específica. Dentro del criterio “Tipo de documentos” se concluyó que estos ítems se encontraban solo en artículos de investigación y se excluyeron (Tabla 4):

Tabla 4 Exclusión de documentos por criterios de selección.

	Número de artículos excluidos	Tipo de documento excluido
<b>Total artículos iniciales: 66</b>	5	Review
	2	Book chapter
	2	Conference paper
<b>Idiomas excluidos</b>	2	Chino-mandarín
<b>Total resultados:</b>	<b>55 artículos</b>	

Fuente: Autor

Los 55 artículos obtenidos se utilizaron para el posterior análisis de información de la revisión sistemática.

### 6.3 DEPURACIÓN DE INFORMACIÓN OBTENIDA

Los criterios de exclusión e inclusión, descritos en Tabla 5, se aplicaron con el fin de hacer la depuración manual de los documentos obtenidos de manera más concreta.

Tabla 5 Criterios de exclusión e inclusión

CRITERIOS DE INCLUSIÓN	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN
1. Uso de hongos del género <i>Trichoderma</i> en la degradación de contaminantes. 2. Estudios con resultados positivos sobre la degradación de contaminantes orgánicos persistentes. 3. Técnicas precisas utilizadas dentro de las investigaciones, para la degradación de contaminantes.	1. Artículos que no tengan relación con la investigación sobre biorremediación de suelos. 2. Documentos que no realicen análisis experimentales

Fuente: Autor

La depuración permitió establecer la degradación de contaminantes orgánicos persistentes, como otro tema relevante para la investigación, el 3% de los artículos recuperados en la ecuación de búsqueda inicial, se hacía mención de la importancia del tema, se establece como nuevo término de búsqueda.

## 6.4 NUEVA ECUACIÓN DE BÚSQUEDA

### 6.4.1 Revisión bibliográfica inicial

Para la revisión bibliográfica inicial se incluyó el término “Persistent organic pollutants” como se evidencia en la Figura 7.

<b>Términos de revisión bibliográfica inicial</b>
( <b>ALL</b> (Bioremediation OR Biodegradation) <b>AND ALL</b> (Trichoderma) <b>AND ALL</b> (persistent <b>AND</b> organic <b>AND</b> pollutants) <b>AND</b> PUBYEAR > 2008

*Figura 8 Ecuación de búsqueda contaminantes orgánicos persistentes. Fuente: Base de datos Scopus*

Dentro de esta búsqueda y basado en la ecuación obtenida de hidrocarburos con la depuración final, se planteó la ecuación (Figura 7); no se descartó ninguna palabra clave irrelevante, y se determinaron las que tenían incidencia con la investigación, demostradas en la Tabla 6.

*Tabla 6 Palabras claves segunda ecuación de Búsqueda*

<b>Palabras claves relevantes</b>
Pesticides
Laccase
Enzymes
Organochlorine pesticides
Organophosphorus pesticides
agricultural fields
Dichlorophenolindophenol

*Fuente: Base de datos Scopus*

Se determinó que el término relevante de esta búsqueda era “Pesticidas”, debido a que era mencionada en la mayoría de información de la búsqueda inicial, muchos de estos fueron

identificados en la depuración inicial de los hidrocarburos, por lo que se estableció una nueva búsqueda en la que se incluyeran todos los términos y se unificaran estos documentos.

Para esta ecuación de búsqueda avanzada se obtuvieron 104 documentos a la que se le aplicaron los términos de selección establecidos en el ítem 4.2 y además se excluyeron las siguientes palabras claves de la lista:

*Tabla 7 Palabras claves excluidas de la nueva ecuación de búsqueda*

<b>Palabras claves excluidas</b>
Biological control
Drug effect
Unclassified Drug
Biocontrol Agent
Biocontrol

*Fuente: Base de datos Scopus*

Como resultado de esta eliminación se obtuvieron 84 documentos de la búsqueda avanzada, que junto con los documentos obtenidos en la búsqueda por hidrocarburos dieron en total 139, a la cual se le realizó la depuración pertinente siguiendo los criterios determinados y con los que se basó la revisión sistemática. 95 documentos no tenían acceso, por lo que no fue posible realizar un análisis a profundidad de la información, 19 de los artículos restantes fueron descartados por su intrascendencia en la investigación basado en los criterios de exclusión e inclusión.

Tabla 8 Resultados de la depuración

<b>Artículos ecuación final: 84</b>	
<b>Artículos de ecuación de hidrocarburos: 51</b>	
<b>Total artículos obtenidos: 139</b>	
Prioridad <i>Trichoderma</i>	18
Artículos duplicados	-15
Estudio de enzimas (Lacasa)	12
Uso de otros hongos ligninolíticos	10
<b>Total artículos para la revisión:</b>	<b>25</b>

Fuente: Autor

Dentro de la Figura 9 se muestra ecuación final obtenida, en la que se excluyeron los términos irrelevantes y se limitó el lenguaje, con el fin de realizar la recolección de información.

<b>Términos de búsqueda</b>
<p>( ALL ( bioremediation OR biodegradation ) AND ALL ( trichoderma AND NOT bacteria ) AND TITLE-ABS-KEY ( hydrocarbons OR pesticides ) ) AND PUBYEAR &gt; 2007 AND ( LIMIT-TO ( DOCTYPE , "ar" ) ) AND ( LIMIT-TO ( LANGUAGE , "English" ) OR LIMIT-TO ( LANGUAGE , "Spanish" ) ) AND ( EXCLUDE ( EXACTKEYWORD , "Unclassified Drug" ) OR EXCLUDE ( EXACTKEYWORD , "Drug Effect" ) ) AND ( EXCLUDE ( EXACTKEYWORD , "Biocontrol Agent" ) )</p>

Figura 9 Depuración dentro de la ecuación de búsqueda Fuente: Base de datos de Scopus

El 75% de los artículos de la búsqueda “degradación de hidrocarburos” se encontraban en los documentos recuperados de la búsqueda final.

## 6.5 ANÁLISIS DE VARIABLES DE EXPERIMENTACIÓN

Se analizaron las variables relevantes para guiar posibles investigaciones, cada uno de los datos están evidenciados en el Anexo 1, en el que por medio de una matriz se demuestra el

número de publicaciones por variables y magnitudes de cada una de ellas. Estos documentos fueron recuperados de la búsqueda final, con 25 artículos analizados en total. Estas variables se identificaron de la siguiente manera:

### 6.5.1 Especie de hongo

Dado la variación de especies que fueron identificadas en las investigaciones se recolectó la información con el fin de obtener la especie más usada por el número de publicaciones, como se muestra en la Figura 10:

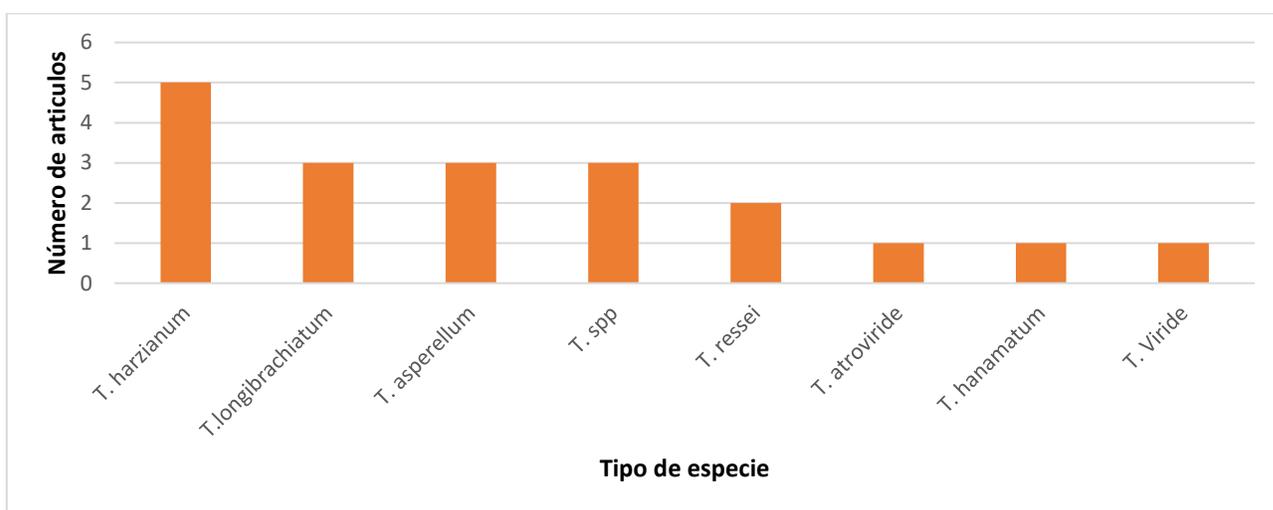


Figura 10 Especies de *Trichoderma* encontrada dentro de los documentos recuperados Fuente: Autor

La especie de *Trichoderma* que se encontró con mayor frecuencia en los artículos recopilados y en los que se obtenían resultados prometedores fue la especie *Trichoderma harzianum* con un número de mención en un total de 6 publicaciones. También se definieron otras especies de hongos que mostraron su relevancia de investigación tales como: *Byssochlamys spectabilis*, *Aspergillus niger*, *Fusarium sp*, *Fusarium proliferatum*, *Aspergillus terreude* y *Penicillium ochrochloron*; estas especies fueron encontradas dentro de las investigaciones por el uso de *Trichoderma* la cantidad de artículos en las que fueron mencionados fue de uno por hongo, sobre estos se obtuvo información importante para la eficacia de degradación de contaminantes como medios de cultivo y técnicas complementarias.

## 6.5.2 Medio de cultivo para la degradación

Dentro de la revisión de los artículos se identificó que no se utilizaban los mismos medios de cultivo, había variación de usos de estos en medio líquido y medio sólido, en la que utilizaban diferentes complementos de acuerdo al contaminante, para esto inicialmente se analizó la cantidad de artículos que hacían mención alguno de estos dos, como se muestra en la Figura 11:

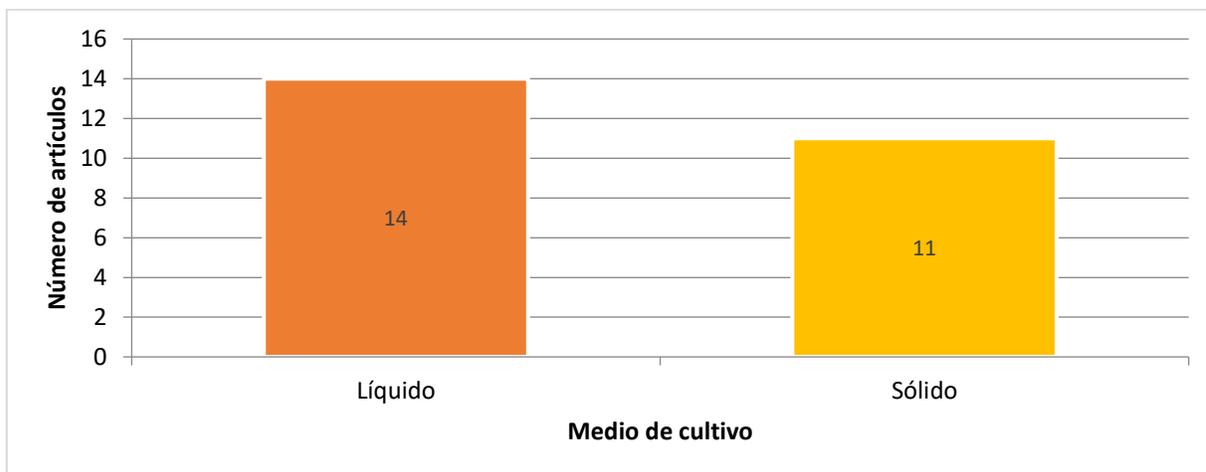


Figura 11 Medio de cultivo más mencionados dentro de los artículos de investigación Fuente: Autor

Los sustratos más usados como fuente de carbono para *Trichoderma* son: glucosa, fructosa, manosa, galactosa, xilosa, trehalosa y celibosa. El medio que más se repite en los documentos recuperados es líquido con un 56%, este medio es usado para los experimentos de degradación; en la Tabla 9 se muestran los medios de cultivo líquidos utilizados en los artículos de investigación, se destacan por su repetición en 10 artículos los medios: caldos de extracto de malta (MEA) (Husaini *et al*, 2008) y extracto de levadura y malta (MYEB), mientras que los medios sólidos, se destaca el medio (PDA) agar papa dextrosa. Los disolventes que más se repetían en la prueba de degradación de medios líquidos fueron: acetona y dimetil sulfoxido.

Uno de los suplementos para controlar el crecimiento bacteriano fue el sulfato de estreptomicina (Ramoutar *et al*, 2019). Los medios eran suplementados con los contaminantes mencionados en el siguiente apartado, para que se usaran como fuente de

carbono, y así medir la degradación del contaminante. Las vitaminas más utilizadas dentro de la degradación por hidrocarburos identificadas en 5 artículos fueron tiamina y biotina (Venice *et al*, 2020). Las concentraciones del hidrocarburo o pesticida a usar dependían del experimento, como en el caso de la degradación de benzo [a] antraceno en medio líquido en la que se usan 50mL de este mismo, en un Erlenmeyer de 250 mL (Rosales *et al*, 2012)

Tabla 9 Medios líquidos identificados en la degradación de contaminantes

MEDIO LÍQUIDO	COMPOSICIÓN	TIPO DE CONTAMINANTE
MEA	Maltosa; dextrosa; glicerol; peptona y agar.	Hidrocarburos aromáticos y alifáticos.
MYEB	Extracto de malta y extracto de levadura	Hidrocarburos aromáticos y alifáticos.
CDA	Sacarosa, nitrato de sodio, dihidrogenofosfato de potasio, sulfato de magnesio, cloruro de potasio, sulfato ferroso y agar.	Pesticidas
BH	Sulfato de magnesio Cloruro de calcio Fosfato monopotásico, Fosfato dipotásico, Nitrato de amonio Cloruro férrico	Hidrocarburos aromáticos (Benzo a Antraceno) y pesticidas
BSM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , NH <sub>4</sub> Cl, MgCl <sub>2</sub> , glicerol, CaCl <sub>2</sub> , FeCl <sub>3</sub> , Tetraciclina	Hidrocarburos aromáticos y alifáticos

Fuente: Autor- Recuperación de documentos de investigación

El tiempo y temperatura del medio de cultivo son factores relevantes y de estos depende el porcentaje de degradación que se va a obtener o si a medida del tiempo se inhibe el crecimiento del hongo. La recolección de información mostró que en promedio un tiempo eficaz según los autores eran 15 días y a una temperatura de 25°C (Cocaign *et al* 2013). El tiempo máximo

encontrado dentro de la revisión fue de 20 días, tiempo mínimo 3 días, la temperatura máxima fue de 30°C y mínima de 25°C (Ver anexo 1); se demuestra que los hongos tienen un tiempo corto de capacidad de adaptación por lo que en periodos cortos se logra evidenciar degradación de los contaminantes (Zafra *et al*, 2015) para la investigación realizada por Zafra el tiempo de incubación fue 8, 14 y 18 días, la eficiencia de degradación de Phe(Fenantreno), Pyr(Pireno), y BaP(Benzo-Pireno) alcanzó un porcentaje de 78,3% a los 14 días de incubación y el aumento de temperatura disminuye los porcentajes de degradación.

### 6.5.3 Matriz a descontaminar

Esta variable fue seleccionada con el fin de analizar los medios en los que se degradaba el contaminante por medio del hongo *Trichoderma*; como se demuestra en la Figura 12, se obtuvieron dos tipos de matriz: suelos con un total de 22 artículos y aguas con 3 artículos.

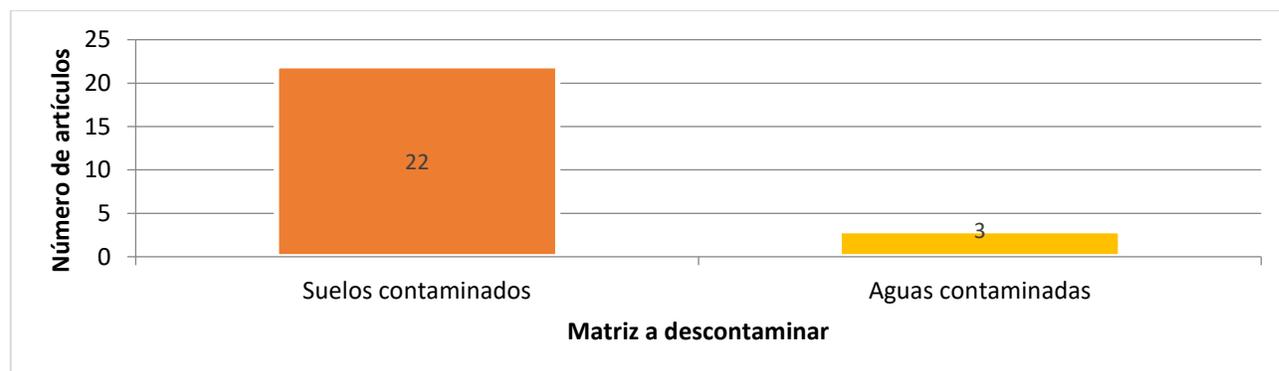


Figura 12 Tipo de matriz a descontaminar, identificada en los artículos de investigación.

Fuente: Autor

Las matrices estaban contaminadas por algún tipo de hidrocarburo o pesticidas, la biorremediación por hongos en suelos es más común, por las altas concentraciones que se han encontrado en los suelos, los hongos son usados con más frecuencia por su capacidad de degradar grandes cantidades de contaminantes, junto con su producción de enzimas degradadoras(Coello, 2012).

### 6.5.4 Tipo de contaminante a degradar

La variación de experimentos de biorremediación de diferentes contaminantes, permitió establecer una relación entre contaminante y número de veces mencionados, como se demuestra en la Figura 123 los contaminantes están diferenciados en hidrocarburos aromáticos (Naranja), hidrocarburos alifáticos (Verde) y pesticidas (Amarillo)

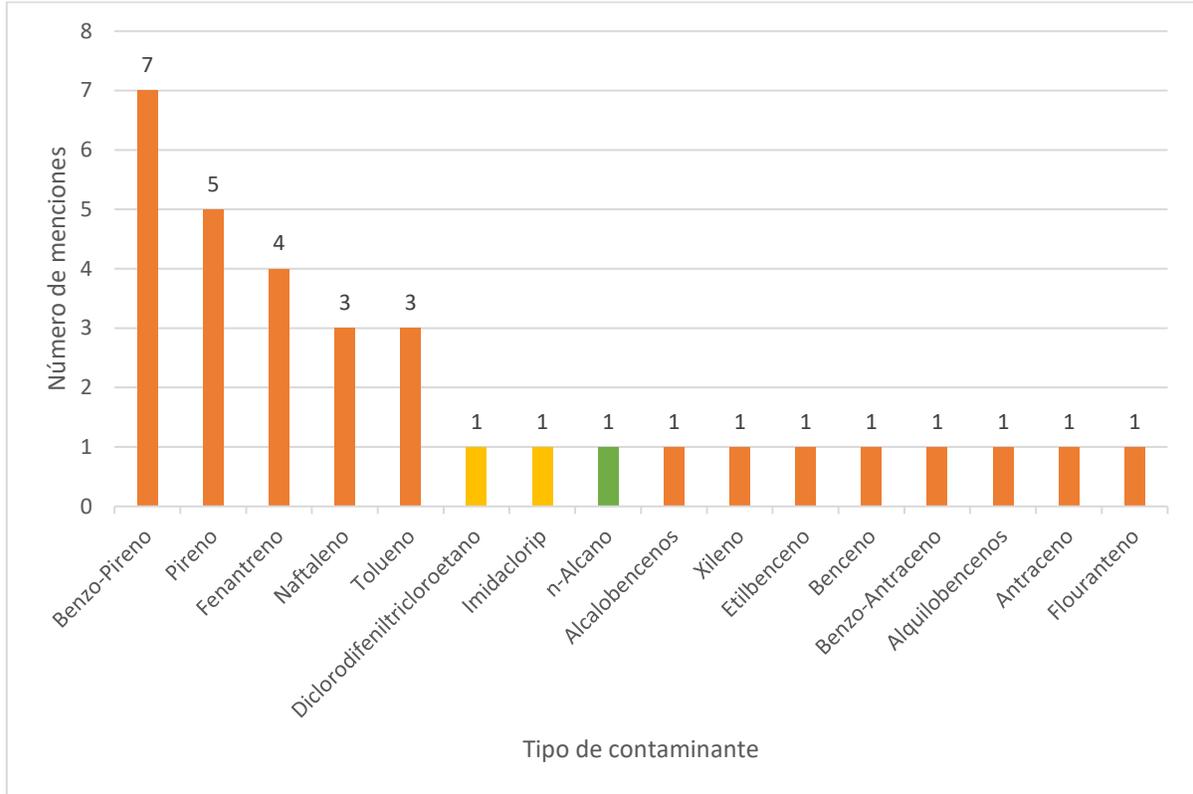


Figura 13 Contaminantes en la investigación Fuente: Autor

Los artículos de investigación recuperados estudian en su mayoría la degradación de los hidrocarburos aromáticos con un total de 18 de los recuperados en la búsqueda inicial, el contaminante con mayor número de estudios dentro de los artículos es el Benzo a Pireno (BaP), 5 artículos estudian la degradación de hidrocarburos alifáticos, 2 artículos realizan la degradación de pesticidas.

### 6.5.5 Técnicas complementarias

Las técnicas complementarias son aquellas que fueron implementadas con el fin de favorecer el crecimiento del hongo y aumentar la biodisponibilidad del contaminante. El 40% de los artículos de investigación recuperados utilizaban técnicas complementarias, en la Figura 14 se muestran las técnicas y el número de publicaciones en la que se utilizaban para favorecer la degradación.

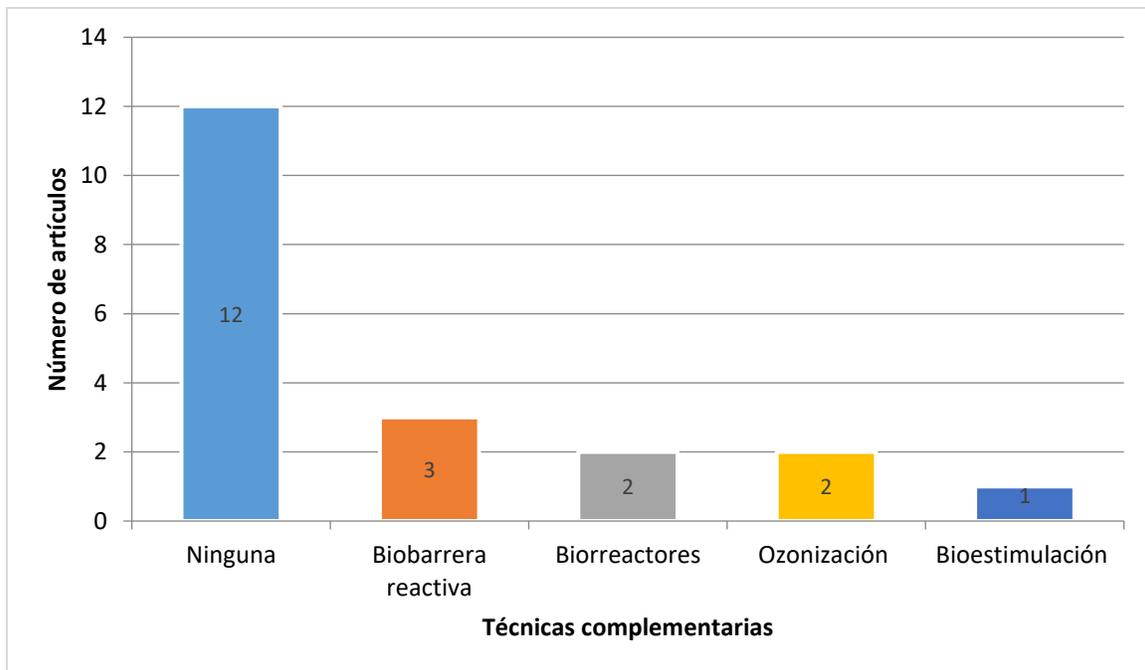


Figura 14 Porcentaje de publicaciones que implementaban técnicas complementarias

Fuente: Autor

La bioestimulación se realizó dentro del medio de cultivo de degradación, en el cual se agregó bagazo de caña con el fin de servir como soporte del hongo, también fueron dosificados nutrientes dentro de los suelos en los que se pretendía aumentar la fuente de nitrógeno, mediante el uso de urea (Paredes *et al*, 2017) el contenido de nitrógeno es relevante debido a que este está ligado al metabolismo de los microorganismos (Otiniano, 2013); por su parte la ozonización tiene la capacidad de degradar compuestos de baja reactividad y por la capacidad oxidativa en el medio contaminado, esta técnica se combinó con el tratamiento del hongo y los porcentajes de degradación superaron el 80% (Diesel) (Elshafie *et al*, 2020), en donde las dosis utilizadas fueron de 225 L/h durante 30 minutos. Las biobarreras reactivas se utilizaron con el fin de inmovilizar el hongo; se evidencia que una esponja de nailon y el celofán estéril fueron los más usados para la inmovilización del hongo, lo que permitió mejorar el intercambio de nutrientes y el flujo del medio contaminado a través de ésta (Cobas *et al*, 2013). La biobarrera es formada por la retención del microorganismo sobre el soporte de inmovilización, esto forma una biopelícula que demuestra la capacidad de degradación del hongo y esto permite obtener porcentajes de degradación del 90% (Cobas *et al*, 2013).

Los biorreactores son implementados con el fin de mantener las condiciones estables en el cultivo, los más mencionados se evidencian en la Tabla 10

Tabla 10 Biorreactores identificados en las investigaciones

<b>BIORREACTORES IMPLEMENTADOS</b>	<b>MATRIZ DE INMOVILIZACIÓN</b>
Biorreactor de lecho expandido	Esponja de Nailon
Biorreactor de tanque agitado	Celofán estéril

Fuente: Autor

La degradación se estableció en la matriz de la inmovilización, las más repetidas son celofán y esponja de nailon, está para el aumento de biomasa y eliminación del contaminante (Rosales *et al*, 2012). Se obtuvo una eficiencia del 50% y la velocidad de crecimiento de los hongos no se vio afectada por el contaminante.

### 6.5.6 Actividad enzimática

Se identificó que en algunos de los artículos se realizaban pruebas de actividad enzimática que demostraban su relación con la degradación del contaminante. En la Figura 15 se relacionaron el número de artículos y las enzimas más mencionadas.

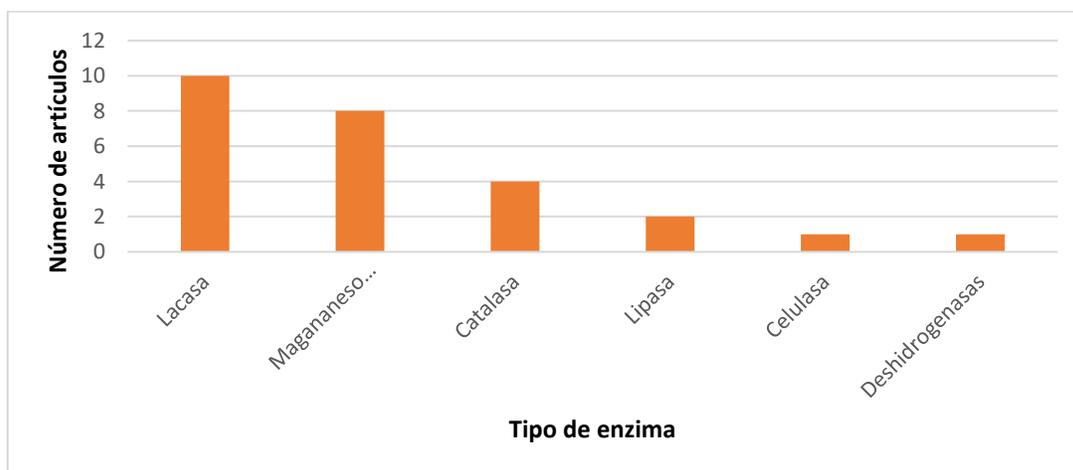


Figura 15 Relación de la actividad enzimática y número de artículos

Fuente: Autor

Se observa que en la mayoría de artículos hay actividad enzimática de lacasa y manganeso peroxidasa, estas están relacionadas a las especies de *Trichoderma*, entre ellas: *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. spp*, *T. reesei* y *T. viride*, así mismo se analizó la actividad enzimática en los siguientes contaminantes: Benzo-antraceno, fenantreno, pireno y benzo-prinero, 3,4-dicloroanilina y 2,6-diclorofenol indofenol. La presencia de estos contaminantes aumenta la producción enzimática de lacasa y manganeso peroxidasa (de Lima *et al*, 2016). Los mejores resultados de degradación fueron obtenidos por hongos ligninolíticos por su alta capacidad de producir enzimas. Para las enzimas lacasa, catalasa y manganeso peroxidasa, está directamente relacionada con la degradación de HAP de alto peso molecular. Éstas oxidan varios compuestos fenólicos y aromáticos, por el uso de oxígeno como aceptor final de electrones (Asemoloye *et al*, 2018), se muestra en la Tabla 11 que la producción de estas enzimas está relacionada con pesticidas E hidrocarburos aromáticos policíclicos. La actividad metabólica de la lipasa, dentro de suelos contaminados con hidrocarburos alifáticos se evidencia pues usan éstos como fuente de carbono (Essabri *et al*, 2019).

Tabla 11 Relación de actividad enzimática y tipos de contaminantes

<b>ACTIVIDAD ENZIMÁTICA</b>	<b>ESPECIE DE HONGO</b>	<b>TIPO DE CONTAMINANTE</b>
Lacasa	<i>Trichoderma Asperellum</i>	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
	<i>Trichoderma harzianum</i>	
	<i>Trichoderma spp.</i>	
	<i>Trichoderma Reesei</i>	
	<i>T. viride</i>	
Manganeso peroxidasa	<i>Trichoderma spp.</i>	Pesticidas
	<i>Trichoderma Asperellum</i>	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
	<i>Trichoderma Reesei</i>	
	<i>Trichoderma Harzianum</i>	
Dimutasa	<i>Trichoderma hamatum</i>	Pesticidas
Celulasa y Lipasa	<i>Trichoderm spp.</i>	Hidrocarburos aromáticos policíclicos, hidrocarburos alifáticos.

Fuente: Autor. Recolección de datos de documentos de investigación.

La presencia y actividad de las enzimas extracelulares facilita los procesos de biorremediación de hidrocarburos y pesticidas, estas transforman de manera eficaz las sustancias oleososas en compuestos menos tóxicos (Hatvani *et al*, 2002)

### **5.1.1 Porcentajes de degradación**

Para demostrar el potencial de degradación de los hongos, se recolectó información de los porcentajes por especie y contaminante.

De acuerdo con la Tabla 12 y la Figura 16 la especie que obtuvo mayores porcentajes de degradación fue *T. Longibrachiatum* respecto a la degradación de hidrocarburos aromáticos, *T. Harzianum* y *T. longibrachiatum* obtuvieron porcentajes superiores al 90% gracias a la implementación de técnicas de ozonización. Las variaciones de los resultados en la degradación evidenciada por la desviación estándar, está relacionada a la implementación de técnicas complementarias en las cuales la degradación aumentaba en un 59,85% en el caso del fenantreno, gracias al uso de biorreactores.

Tabla 12 Relación contaminante y especie

Especie	Contaminante (Porcentaje de Degradación)										
	Imidaclorip	Fenantreno	Antraceno	Pireno	Fluoranteno	Benzo a Antraceno	BTEX	Alquilo-bencenos	Naftaleno	Benzo Pireno	BAP
<i>T. Hamatum</i>	65%										
<i>T. asperellum</i>		76%		62%						80%	
<i>T. harzianum</i>						77%	92%	94%			
<i>T. Longibrachiatum</i>		74%	96.8%	72%	88.1%						
<i>Trichoderma spp</i>									82%	80%	47%
<i>T. Reesei</i>										54%	
<i>T. Viride</i>										49%	

Fuente: Autor

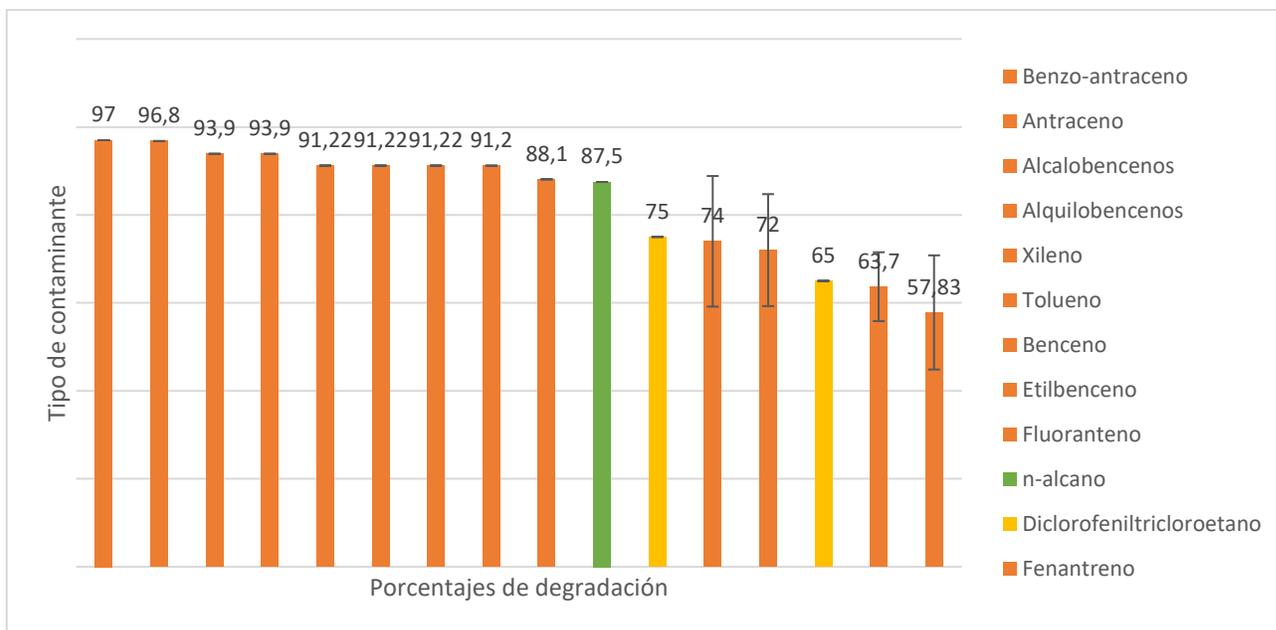


Figura 16 Porcentajes de degradación por tipo de contaminante

Las especies de *T. harzianum* y *T. asperellum*, son especies potenciales en procesos de biorremediación, gracias a la capacidad de tolerar altas concentraciones de hidrocarburos e inducir la producción de enzimas como lacasa en el proceso de degradación (Wei *et al.*, 2017); fueron de las especies más mencionadas en los artículos lo que demuestra su relevancia en nuevos estudios de biorremediación, la mayoría de investigaciones realizaron biorremediación in situ por medio de biorreactores. Para estudiar la tolerancia y eliminación de los contaminantes, se emplearon medios de cultivos líquidos que son suplementados con concentraciones del contaminante, las condiciones que no inhibían en el crecimiento del hongo y la biodisponibilidad del contaminante fueron de temperaturas promedios de 25° en un lapso de tiempo máximo de 15 días. Se identificaron técnicas complementarias para un aumento de biomasa y por ende un aumento de degradación las más estudiadas fueron por procesos de bioaumentación en los que eran favorecidos la fuente de carbono, de nitrógeno y fósforo, la ozonización fue una de las técnicas en las que se obtuvieron porcentajes de degradación superiores al 90%. Los porcentajes mayores porcentajes de degradación de HAP (Benzo, antraceno, BaP, Xileno) fue obtenido por la especie de *T. Longibrachiatum* y *T. Asperellum*.

## 7. CONCLUSIONES

La recopilación de la información fue realizada por medio de una revisión de la literatura, el análisis fue de manera manual, con la identificación de palabras claves para determinar las alternativas y técnicas más actuales del uso del hongo *Trichoderma* en la degradación de contaminantes. Se identificaron las variables, y se concluyó que *Trichoderma* tiene un alto potencial de degradación de contaminantes como hidrocarburos aromáticos policíclicos y alifáticos y pesticidas. El potencial de degradación va directamente relacionado a su actividad enzimática.

La revisión sistemática permitió identificar la especie de *Trichoderma* más usada, junto con los porcentajes de remoción de los contaminantes, superiores al 40%; el uso de nuevas técnicas complementarias fueron definidas para aumentar la biodisponibilidad del contaminante, o para el soporte de crecimiento de la biomasa en medio de cultivo; los porcentajes de degradación superaban el 80%. Entre los más relevantes está el tratamiento con ozonización por obtener porcentajes superiores al 93%. Se obtuvieron variables relevantes como el medio de cultivo, las temperaturas y tiempos idóneos para resultados efectivos.

*T. asperellum* y *T. longibrachiatum* demostraron ser organismos capaces de soportar altas concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos, entre los más repetidos y con mejores resultados de tolerancia el benzo-pireno, fenantreno y pireno, demostrando su uso como única fuente de carbono por el organismo. La inhibición en el crecimiento del hongo está relacionada por el uso de concentraciones superiores a 6000mg/kg de estos contaminantes según Zafra, y las condiciones del medio de cultivo que deben estar en temperaturas promedio 25°C y tiempos de 15 días. Se identificó que estas especies eliminan los HAP, por su liberación de enzimas tales como peroxidasa y lacasas, que fue identificado por su actividad en la degradación. Para obtener estos resultados de degradación superiores al 90% se deberán aplicar técnicas complementarias tales como ozonización que además de degradar hidrocarburos aromáticos a un 40% con la combinación de del uso del hongo se obtienen resultados potenciales, se deben usar medios líquidos, suplementando fuentes de carbono y nitrógeno.

Esta revisión realiza una descripción general, y recolecta información para el uso de *Trichoderma* en procesos de degradación de hidrocarburos, se deben realizar investigaciones en base a los datos relevantes con el fin de obtener resultados eficientes, de acuerdo los mecanismos que utilizan las especies, para tolerar y transformar estos contaminantes.

## **8. RECOMENDACIONES**

*Trichoderma* en todos los documentos recuperados fue definido por su gran potencial en procesos de biorremediación, se identificó que se han estado realizando estudios recientes sobre el uso de este, debido a los resultados que se han observado. Se recomienda el uso de técnicas que apoyen la eficiencia de remoción de contaminantes del hongo, para obtener mejores resultados en el proceso de biorremediación, tener en cuenta los factores de inhibición del hongo y cuáles son los más favorables respecto a resultados en crecimiento y degradación.

Para realizar una revisión de la literatura, es necesario plantear palabras claves que nos lleven a resolver el planteamiento del problema, si se requiere se debe ampliar la búsqueda en varias bases de datos con el fin de evitar el sesgo en las investigaciones, se debe identificar de manera correcta a donde se quiere guiar la recolección de documentos, y analizar porque se están presentando cada uno de los resultados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Argumedo-Delira, R., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R., & Peña-Cabriales, J. J. (2009). El género fúngico *Trichoderma* y su relación con los contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 25(4), 257-269
- Arias, J. A. V. (2017). Contaminación de suelos y aguas por hidrocarburos en Colombia. Análisis de la fitorremediación como estrategia biotecnológica de recuperación. *Revista de investigación Agraria y Ambiental*, 8(1), 151-167.
- Asemoloye, M. D., Ahmad, R., & Jonathan, S. G. (2018). Transcriptomic responses of catalase, peroxidase and laccase encoding genes and enzymatic activities of oil spill inhabiting rhizospheric fungal strains. *Environmental Pollution*, 235, 55-64.
- Clavijo, 1998. *Estudio de la actividad quitinolítica en procesos de control biológico de Rhizoctonia solani Kuhn en tomate (Lycopersicon esculentum), mediante tratamientos de pregerminación controlada de semillas en presencia de Trichoderma koningii Oudemans*. Tesis (Bio) Pontificia Universidad Javeriana 1998 Il. Dat. num. 124 ref .
- Cerniglia, C.E.; Sutherland, G.R. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*; Timmis, K.N., Ed.; Springer: Berlin, Germany, 2010
- Cocaign, A., Bui, L. C., Silar, P., Tong, L. C. H., Busi, F., Lamouri, A., ... & Dairou, J. (2013). Biotransformation of *Trichoderma* spp. and their tolerance to aromatic amines, a major class of pollutants. *Applied and environmental microbiology*, 79(15), 4719-4726.
- Cobas, M., Ferreira, L., Tavares, T., Sanromán, M. A., & Pazos, M. (2013). Development of permeable reactive biobarrier for the removal of PAHs by *Trichoderma longibrachiatum*. *Chemosphere*, 91(5), 711-716.
- Coello, J. M., & Burgos, F. (2012). Aplicación del hongo *Pleurotus ostreatus* como alternativa para la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados. Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceánicas y Recursos Naturales.
- Chan-Cheng, M., Cambronero-Heinrichs, J. C., Masís-Mora, M., & Rodríguez-Rodríguez, C. E. (2020). Ecotoxicological test based on inhibition of fungal laccase activity: Application to agrochemicals and the monitoring of pesticide degradation processes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 195, 110419
- de Lima Souza, H. M., Sette, L. D., Da Mota, A. J., do Nascimento Neto, J. F., Rodrigues, A., de Oliveira, T. B., ... & Zanotto, S. P. (2016). Filamentous fungi isolates of contaminated sediment in the Amazon region with the potential for benzo (a) pyrene degradation. *Water, Air, & Soil Pollution*
- Daccò, C., Nicola, L., Temporiti, MEE, Mannucci, B., Corana, F., Carpani, G. y Tosi, S. (2020). *Trichoderma*: Evaluación de sus capacidades degradantes para la

biorremediación de mezclas de complejos de hidrocarburos. *Ciencias Aplicadas*, 10 (9), 3152.

Essabri, A. M., Aydinlik, N. P., & Williams, N. E. (2019). Bioaugmentation and biostimulation of total petroleum hydrocarbon degradation in a petroleum-contaminated soil with fungi isolated from olive oil effluent. *Water, Air, & Soil Pollution*, 230(3), 76

Elshafie, HS, Camele, I., Sofo, A., Mazzone, G., Caivano, M., Masi, S. y Caniani, D. (2020). Efecto de micorremediación de la cepa T22 de *Trichoderma harzianum* combinado con ozonización en arena contaminada con diesel. *Chemosphere*, 126597.

Fierro, F. F., & Onofre, M. V. (2011). Impacto de la biología molecular y las nuevas tecnologías en el conocimiento de la función celular y sus aplicaciones. pp. 103

Hatvani, N., Kredics, L., Antal, Z., & Mécs, I. (2002). Changes in activity of extracellular enzymes in dual cultures of *Lentinula edodes* and mycoparasitic *Trichoderma* strains. *Journal of applied microbiology*, 92(3), 415-423.

Hofrichter, M. (2002). lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial technology*, 30(4), 454-466.

Howell, C. R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant disease*, 87(1), 4-10.

Husaini, A., Roslan, H. A., Hii, K. S. Y., & Ang, C. H. (2008). Biodegradation of aliphatic hydrocarbon by indigenous fungi isolated from used motor oil contaminated sites. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(12), 2789-2797.

Henaó, J. D. V. (2015). Una Guía Corta para Escribir Revisiones Sistemáticas de Literatura. Parte 4. *Dyna*, 82(190), 9-12.

Jiménez DJ, Medina SA, Gracida JN. (2010). Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 26 (1) 65-84

Lladó, S. (Septiembre de 2012). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos pesados y caracterización de comunidades microbianas implicadas, 34-35

Magan, N. Fungi in extreme environment. In *The Mycota Environmental and Microbial Relationships*; Esser, K., Lemke, P.A., Eds.; Springer-Verlag: Berlin/Heidelberg, Germany, 2007

Martínez, B., Infante, D., & Peteira, B. (2015). Taxonomía polifásica y variabilidad en el género *Trichoderma*. *Revista de Protección Vegetal*, 30.

Ortiz, E., Núñez, R., Fonseca, E., Oramas, J., Almazán, V., Cabranes, Y., ... & Borges, G. (2005). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Rev. Contribución a la Educación y la Protección del Medio Ambiente* (6): 51-60. Pág. 51-60

Okafor, U. , T. Floretta y M. Florence . 2009 . *Potencial de degradación de hidrocarburos de aislados de hongos indígenas de suelos contaminados con petróleo* . Revista Internacional de. Ciencias físicas 3

Otiniano-García, N. M. (2013). *Efecto de la fuente nitrogenada sobre la capacidad de degradación del petróleo diesel 2 por Pseudomonas sp.* Memorias del II Congreso Binacional de Investigación, Ciencia y Tecnología de las Universidades.

Plohl K, and Leskovsek H. (2002). *Biological degradation of motor oil in water.* Acta Chim. Slov., 49, 279-289

Pesántez, M., & Castro, R. (2016). *Potencial de cepas de Trichoderma spp. para la biorremediación de suelos contaminados con petróleo.* Biotecnología Vegetal, 16(4).

Paredes Sandoval, M. K. (2017). *Evaluación de la biodegradación de un insecticida carbamato en muestras de suelo de cultivo de papa, mediante Trichoderma harzianum y Pleurotus ostreatus.*

Tissot, BP y Welte, DH (2013). *Formación y aparición de petróleo.* Springer Science & Business Media. pp. 699.

Rosales, E., Pérez-Paz, A., Vázquez, X., Pazos, M., & Sanromán, M. A. (2012). Isolation of novel benzo [a] anthracene-degrading microorganisms and continuous bioremediation in an expanded-bed bioreactor. *Bioprocess and biosystems engineering*, 35(5), 851-855.

Ramoutar, S., Mohammed, A., & Ramsuhag, A. (2019). Laboratory-scale bioremediation potential of single and consortia fungal isolates from two natural hydrocarbon seepages in Trinidad, West Indies. *Bioremediation Journal*, 23(3), 131-141.

Sánchez-Meca, J., & Botella, J. (2010). Revisión sistemática y meta-análisis: Herramientas para la práctica profesional. *Papeles del psicólogo*.

Sharma, A., Shukla, A., Attri, K., Kumar, M., Kumar, P., Suttee, A., ... & Singla, N. (2020). *Global trends in pesticides: A looming threat and viable alternatives.* *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 201, 110812

Velasco, J. A., & Sepúlveda, T. L. V. (2003). *El composteo: una alternativa tecnológica para la biorremediación de suelos en México.* *Gaceta Ecológica*

Viñas Canals, M. (2005). *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica.* Universitat de Barcelona.

Venice, F., Davolos, D., Spina, F., Poli, A., Prigione, V. P., Varese, G. C., & Ghignone, S. (2020). Genome Sequence of *Trichoderma lixii* MUT3171, A Promising Strain for Mycoremediation of PAH-Contaminated Sites. *Microorganisms*, 8(9), 1258.

Wesenberg, D., Kyriakides, I., & Agathos, S. N. (2003). White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology advances*, 22(1-2), 161-187.

Wei, S. H. I., ZHANG, X. N., JIA, H. B., FENG, S. D., YANG, Z. X., ZHAO, O. Y., & LI, Y. L. (2017). Effective remediation of aged HMW-PAHs polluted agricultural soil by the combination of *Fusarium* sp. and smooth brome grass (*Bromus inermis* Leyss.). *Journal of integrative agriculture*, 16 (1), 199-209

Yao, L., Teng, Y., Luo, Y., Christie, P., Ma, W., Liu, F., ... & Li, Z. (2015). *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by Trichoderma reesei FS10-C and effect of bioaugmentation on an aged PAH-contaminated soil. Bioremediation Journal*, 19 (1), 9-17.

Zafra, G., Moreno-Montaña, A., Absalón, Á. E., & Cortés-Espinosa, D. V. (2015). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by a tolerant strain of *Trichoderma asperellum*. *Environmental Science and Pollution Research*

Kunamneni, A., Plou, F. J., Ballesteros, A., & Alcalde, M. (2008). *Laccases and their applications: a patent review. Recent patents on biotechnology*, 2(1), 10-24.