



Estudio de métodos de inmovilización alternativos y de bajo costo del hongo

***Trichoderma sp*, para la degradación de compuestos fenólicos.**

Oscar Felipe Pay Casallas

Código: 11231925732

Universidad Antonio Nariño
Programa de ingeniería ambiental
Facultad de Ingeniería Ambiental y civil
Bogotá, D.C. Colombia
2022

**Estudio de métodos de inmovilización alternativos y de bajo costo del hongo
Trichoderma sp, para la degradación de compuestos fenólicos.**

Oscar Felipe Pay Casallas

Proyecto de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:

Ingeniero ambiental

Director:

(PhD) Iván Alejandro Ávila León

Universidad Antonio Nariño
Programa de ingeniería ambiental
Facultad de Ingeniería Ambiental y civil
Bogotá, D.C. Colombia
2022

NOTA DE ACEPTACIÓN

El trabajo de grado titulado
_____, Cumple
con los requisitos para optar
Al título de _____.

Firma del Tutor

Firma Jurado

Firma Jurado

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	5
1. 4	
2. 5	
Objetivo general	12
Objetivo específico	12
3. 6	
Potencial biotecnológico	13
Fermentación en sustrato sólido	13
<i>Trichoderma sp</i>	14
Producción enzimática	15
Lacasas.	15
Manganeso peroxidasa y Lignino peroxidasa.	15
Contaminantes aromáticos.	16
Métodos de Inmovilización de hongos.	17
Métodos de inmovilización física.	17
Inmovilización con poliuretano.	18
Inmovilización con PET	18
Inmovilización con biopolímeros	18
Inmovilización con estropajo.	18
4. 16	
Inmovilización de hongos	20
Potencial de hongos para degradar colorantes	21
Potencial del hongo <i>Trichoderma</i> para la degradación de colorantes	22
5. 21	
6. 22	
6.1Preparación de los soportes para la inmovilización.	24
6.2Reactivar el hongo	25
6.3Inoculación de los montajes de inmovilización.	25
6.4Preparación de medios de cultivo para los ensayos de inmovilización	27
6.5Preparación de soluciones stock	27
6.6Medio mínimo de sales (MMS) (2 veces concentrado)	27
6.7Micronutrientes 4 veces concentrados	28
6.8Dextrosa al 10% p/v	28

6.9 Experimentos de inmovilización del hongo en los cartuchos con los materiales de soporte	28
6.10 Evaluación de la inmovilización del hongo en los soportes empleados	29
6.11 Preparación del inóculo	29
6.12 Estimular la producción enzimática del hongo inmovilizado en un cultivo con lignina soluble	30
6.13 Evaluación de la degradación del rojo de fenol a partir de los extractos enzimáticos de los montajes con el hongo inmovilizado	30
7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
7.1 Inoculación de los montajes de inmovilización e incubación	32
7.2 Montajes de inmovilización con lignina soluble e incubación	36
7.3 Degradación del rojo de fenol	38
8 CONCLUSIONES	40
9 BIBLIOGRAFIA	41

LISTA DE ILUSTRACIONES.

Ilustración 1 hongo Trichoderma visto en microscopio	15
Ilustración 2 diseño de los cartuchos de soporte para la inmovilización en el software Blender.	24
Ilustración 3 proceso de impresión en 3D de los cartuchos.	25
Ilustración 4 cartucho para la inmovilización.	25
Ilustración 5 caja de Petri con PDA, inoculada con el hongo Trichoderma sp y estropajo. Día uno de contacto con el material-	26
Ilustración 6 en el lado izquierdo caja de Petri con PDA, inoculada con Trichoderma sp y espuma, al lado derecho caja de Petri con PDA, inoculada con Trichoderma sp y PET. Día uno de contacto con el material.	27
Ilustración 7 en el lado izquierdo caja de Petri con PDA, inoculada con Trichoderma sp y espuma, en el centro caja de Petri con PDA, inoculada con Trichoderma sp y PET, en el lado derecho caja de Petri con PDA, inoculada con Trichoderma sp y estropajo. Después de una semana de contacto con el material.	27
Ilustración 8 montajes de inmovilización	29
Ilustración 9 medios de cultivo alternativo con los materiales para realizar los experimentos de inmovilización con lignina soluble Fuente: autor	30
Ilustración 10 montajes de inmovilización	32
Ilustración 11 cartuchos para la inmovilización con el material y el hongo al finalizar el experimento	32
Ilustración 12 gráfica de concentración de conidios para el experimento A	34
Ilustración 13 gráfica de concentración de conidios para el experimento B	34
Ilustración 14 gráfica de concentración de conidios para el experimento C	35

Ilustración 15 gráfica de concentración de conidios/mL en el medio con lignina soluble	37
Ilustración 16 medios de cultivo líquido con lignina soluble después de terminar el experimento	38
Ilustración 17 gráfica de concentración del rojo de fenol respecto al tiempo	39

LISTA DE TABLAS.

Tabla 1 Preparación de Medio Mínimo de Sales (MMS 2 veces concentrada).	28
Tabla 2 Preparación de Micronutrientes (4 veces concentrado).	28
Tabla 3 conteo de conidios en la cámara de Neubauer de los medios con los diferentes materiales	33
Tabla 4 concentraciones de conidios por mililitro en los medio.	33
Tabla 5 conteo de hifas en la cámara de Neubauer	35
Tabla 6 conteo de conidios en la cámara de Neubauer en los experimentos con lignina soluble en el medio	36
Tabla 7 concentración de conidios/mL en el medio con lignina	36
Tabla 8 conteo de hifas en la cámara de Neubauer en el medio con lignina	37
Tabla 9 Mediciones de Absorbancia en los diferentes tiempos	38
Tabla 10 concentraciones de rojo fenol en los diferentes tiempos con un factor de dilución de 10	38

LISTA DE FIGURAS.

Figuras 1 ciclos catalíticos de las enzimas (LiP y MnP)	16
Figuras 2 selección de cuadros que se contaron en la cámara de Neubauer	29

Agradecimientos

Quiero empezar agradeciendo a las dos personas más importantes en mi vida que me apoyaron, me motivaron e hicieron este sueño realidad a mi mamá y mi hermana gracias por las palabras de aliento, por creer en mí, por el esfuerzo que finalmente nos traen acá, gracias totales.

Agradezco al Dr. Iván Ávila por brindarme su conocimiento y tiempo que fueron incondicionales a lo largo de mi carrera, por ser el que me impulsó al mundo de la investigación.

A todos los profesores que en algún momento me ayudaron y me brindaron su conocimiento gracias.

RESUMEN

En este proyecto de investigación se evaluaron diferentes metodologías para la inmovilización del hongo *Trichoderma sp.*, con el fin de degradar compuestos fenólicos para su posible uso en procesos de biorremediación. Este estudio tiene una gran importancia en el campo debido a las problemáticas que existen hoy en día por los compuestos fenólicos y por el interés de remover colorantes textiles utilizados en la industria, los cuales se ha demostrado que pueden llegar a ser carcinogénicos y mutagénicos.

Inicialmente para estos experimentos se imprimieron cartuchos en 3D que sirvieron como soporte para los materiales de inmovilización (PET triturado, estropajo y espuma); luego se realizaron tres diferentes combinaciones para inocular los mismos para encontrar la mejor metodología de inmovilización; posteriormente se realizaron los montajes de inmovilización con lignina soluble como fuente de carbono, con el fin de estimular la generación de enzimas capaces de degradar compuestos aromáticos; finalmente con el sobrenadante de cada material se realizaron los ensayos enzimáticos para degradar el rojo de fenol. Como resultado se encontró que el mejor inóculo fue el material colonizado y tres discos de agar; el sobrenadante del hongo inmovilizado con el estropajo tuvo la mayor degradación del rojo de fenol seguido por la espuma. Como conclusión se puede decir que el mejor material de inmovilización fue la espuma, la cual permitió la mejor adherencia del microorganismo y una buena degradación del colorante.

Palabras clave: inmovilización, compuestos fenólicos, degradación, *Trichoderma*.

Abstract

In this research project, different methodologies were evaluated for the immobilization of the fungus *Trichoderma* sp, in order to degrade phenolic compounds for their possible use in bioremediation processes. This study is of great importance in the field due to the problems that exist today due to phenolic compounds and the interest in removing textile dyes used in the industry, which have been shown to be carcinogenic and mutagenic.

Initially for these experiments, 3D cartridges were printed that served as a support for the immobilization materials (crushed PET, sponge and foam); then three different combinations were made to inoculate them to find the best immobilization methodology; subsequently, the immobilization assemblies were made with soluble lignin as a carbon source, in order to stimulate the generation of enzymes capable of degrading aromatic compounds; Finally, with the supernatant of each material, the enzymatic tests were carried out to degrade the phenol red. As a result, it was found that the best inoculum was the colonized material and three agar discs; the supernatant of the fungus immobilized with the sponge had the highest degradation of phenol red followed by the foam. In conclusion, it can be said that the best immobilization material was the foam, which allowed the best adherence of the microorganism and a good degradation of the dye.

Keywords: immobilization, phenolic compounds, degradation, *Trichoderma*.

1. INTRODUCCIÓN

En el siguiente trabajo de grado se evaluaron medios alternativos de inmovilización para el hongo *Trichoderma sp* como estropajo, espuma de poliéster y PET triturado, para estudiar la capacidad de este organismo de sobrevivir y crecer en medios compuestos por lignina y su potencial para degradar sustancias aromáticas como el rojo de fenol. Es un paso más en la investigación desarrollada por el semillero de investigación en Ingeniería de Bioprocesos de la Universidad Antonio Nariño, donde se ha aislado, identificado el hongo y analizado preliminarmente su potencial.

La importancia de la investigación radica en emplear un hongo poco reportado en la literatura como degradador de contaminantes como compuestos fenólicos o colorantes que pueden afectar la salud de los seres vivos y al ambiente, para poder comparar la eficiencia de este método con diferentes métodos físicos y químicos que se estén utilizando en la actualidad.

Para realizar este trabajo se imprimieron en 3D cartuchos que sirvieron como soporte para los diferentes materiales propuestos para la inmovilización del hongo, esto nos permitió hacer los montajes de una manera más fácil y eficiente

Finalmente como resultado de esta investigación se encontró que la mejor metodología para la inmovilización fue con el material colonizado y tres discos de agar PDA, por otra parte el material que se comportó de mejor manera, adhiriendo de forma más eficiente al hongo fue la espuma y por último en los ensayos enzimáticos para la degradación del rojo de fenol, se logró identificar que independiente de los materiales propuestos este fue degradado hasta en un 70%, sugiriendo el gran potencial biotecnológico del hongo *Trichoderma sp*.

2. OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar el potencial biotecnológico del hongo *Trichoderma sp* inmovilizado en matrices de bajo costo para degradar compuestos fenólicos.

Objetivo específico

- Estudiar diferentes métodos de inmovilización para el hongo.
- Evaluar la degradación del rojo de fenol por los extractos enzimáticos de los métodos de inmovilización del hongo.

3. MARCO CONCEPTUAL

Potencial biotecnológico

La biotecnología es definida como una aplicación tecnológica y científica de organismos vivos, como también sus partes, productos y modelos con el objetivo de modificar materiales u otros organismos vivos los cuales son aplicados a la producción, bienes y servicios (Bisang, 2009). El potencial biotecnológico es la variedad de aplicaciones de los microorganismos en la producción de alimentos y productos bioactivos como los enzimáticos, medicinales y farmacológicos que se obtienen gracias a la diversidad metabólica del microorganismo en este caso son los hongos (Curvetto, 2004).

Enfocándonos en los hongos este potencial radica en la posibilidad de aplicar la micología en áreas como medicina, farmacología, industria agropecuaria, ambiental, etc. gracias a las características metabólicas de los organismos. (Curvetto, 2004)

Los hongos como el *Pleurotus djamor* se han utilizado en diferentes procesos biotecnológicos que gracias a sus facultades nutrimentales y funcionales se ha demostrado habilidades de biosíntesis y biodegradativas. Por otra parte tenemos el *Pycnoporus* que es un hongo filamentosos que gracias a su capacidad de degradación y oxidación con diferentes compuestos, es usado ampliamente en la industria biotecnológica en la rama de biorremediación (Bisang, 2009). En la actualidad se tiene la necesidad de que estos microorganismos y sus derivados se produzcan en grandes cantidades por esta razón se plantean diferentes metodologías como:

Fermentación en sustrato sólido

Este es un método ya bastante conocido el cual ha ayudado en la industria en la generación de microorganismos y sus derivados en gran cantidad ya que este gracias a su funcionamiento es el más eficiente para esto. Actualmente podemos dividir este método en dos clases de cultivos sólidos: en el primero se habla de los cultivos en el que el material sólido, insoluble en agua actúa como fuente principal de nutrientes para los microorganismos y como soporte para los mismos. En algunas ocasiones este sustrato es enriquecido con nutrientes para mejorar la producción. En la segunda clase de cultivos el material sólido es inerte nutricionalmente por lo cual éste sólo actúa como lugar de anclaje para los microorganismos (Pastrana, 2009).

La fermentación en sustrato sólido para los hongos filamentosos es una alternativa bastante adecuada y eficiente dadas las diferentes características morfológicas y fisiológicas de los mismos, generando ventajas como una mayor producción enzimática, fácil de escalar y que asemeja las condiciones donde se encuentran estos microorganismos (Torres, 2003).

Este método nos genera varias ventajas en el momento de cultivar los microorganismos, como la simplicidad del cultivo ya que por lo general el sustrato proporciona casi todos los nutrientes necesarios, nos brinda una facilidad para el escalado a los diferentes procesos, el rendimiento puede llegar a ser superior a distintos procesos de cultivo, y se genera un ambiente similar al natural donde habitan los microorganismos (Pastrana, 2009).

Trichoderma sp

Las especies del género *Trichoderma* son hongos saprófitos, los cuales podemos encontrar en suelos con materia orgánica, que tienen la facilidad de descomponerla y en ocasiones con determinadas condiciones llegan a ser anaerobios facultativos. Esta especie en particular se puede adaptar a varios entornos por lo cual la podemos localizar desde zonas polares hasta la ecuatorial así demostrando una gran plasticidad ecológica que gracias a esto

poseen una alta capacidad enzimática para degradar distintos sustratos. También cuenta con un metabolismo versátil y resistencia a inhibidores microbianos. (Danay Infante, 2018).

Esta especie tiene un gran potencial para ser estudiado gracias a su fácil aislamiento y cultivo, así como su facilidad de crecimiento en varios sustratos. El hongo *Trichoderma* lo podemos ubicar taxonómicamente según Danay Infante, (2018) en:

Reino: Fungi.

División: Mycota

Subdivisión: Eumycota

Clase: Hyphomycetes.

Orden: Moniliales.

Familia: Moniliaceae.

Género: *Trichoderma*.

Para esta especie se describe que la temperatura óptima para el crecimiento en agar está entre 20 y 28 °C, aunque este se puede desarrollar bien entre 6 a 32 °C. Cabe resaltar que también tiene cierta respuesta a la luz, en especial azul y violeta las cuales promueven la formación de esporas (Omar Romero Arenas, 2009).

En su mayoría las colonias de *Trichoderma* son de color blanco, que después de un tiempo se tornan verde oscuro o amarillento. Cuenta con un micelio ralo en su gran mayoría, cuando se observa en el microscopio los conidióforos son ramificados similares a un árbol pequeño (Danay Infante, 2018).

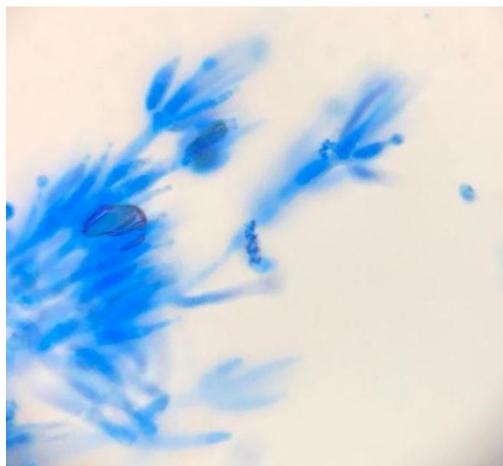


Ilustración 1 hongo *Trichoderma* visto en microscopio

Fuente: autor

Esta especie es conocida por su capacidad biocontroladora que regula el crecimiento de diferentes hongos fitopatógenos, los cuales se ven afectados por la capacidad colonizadora y por la secreción de diferentes enzimas que son compuestos inhibidores. *Trichoderma* invade rápidamente el sustrato obstaculizando el crecimiento de otros hongos, Además produce toxinas, antibióticos y una variación de pH generando un descenso en el medio. (Omar Romero Arenas, 2009).

Producción enzimática

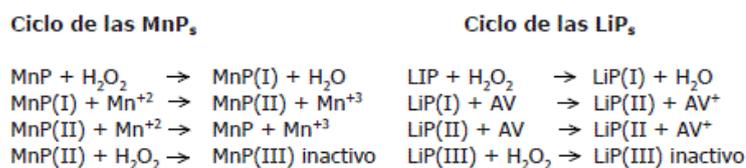
Las enzimas son moléculas orgánicas compuestas por largas cadenas de aminoácidos con enlaces peptídicos las cuales cumplen una función específica para los microorganismos (Juan Quintero, 2006). La producción de enzimas ligninolíticas en hongos por lo general radica en la necesidad de generar sustancias con actividad oxidativa la cual favorece el suministro de carbono donde este es uno de los componentes principales para el crecimiento del hongo (Juan Quintero, 2006). La importancia de identificar estas enzimas radica en que serán las encargadas de degradar compuestos complejos como aromáticos. A continuación se explicaran las enzimas ligninolíticas principales.

Lacasas.

Estas son enzimas que hacen parte del sistema enzimático lignolítico que es producida por algunos hongos. La lacasa es una fenoloxidasa, que se encarga de la oxidación de compuestos como las aminas aromáticas y fenólicos utilizando como aceptor molecular el oxígeno molecular. Estas enzimas extracelulares cuentan con el grupo N-glicosilato en cuya estructura encontramos dos monosacáridos Manosa y N-acetilglucosamina, además cuenta con cadenas glicosídicas (César A. Preussler, 2009).

Manganeso peroxidasa y Lignino peroxidasa.

Las enzimas manganeso peroxidasa es una proteína que ejerce su acción oxidativa por medio de la formación de radicales Mn^{+2} a Mn^{+3} . Esta presenta un potencial oxidativo suficiente para absorber electrones de estructuras fenólicas. El Mn^{+3} al estabilizarse forma quelatos con ácidos carboxílicos logrando oxidar una gran variedad de compuestos fenólicos (Díaz, 2011). La lignino peroxidasa contiene el grupo hemo férrico, esta logra ejercer la acción oxidativa, por otra parte también forma radicales libres gracias a compuestos orgánicos como el alcohol veratílico, el dimetoxibenceno entre más. Los radicales libres anteriormente nombrados son altamente oxidantes lo que les permite penetrar en matrices donde las enzimas no lo pueden hacer, esto es útil para aumentar la biodisponibilidad de sustratos y xenobioticos implicados en el metabolismo de los microorganismos (Díaz, 2011). Los ciclos catalíticos de estas enzimas Manganeso peroxidasa y Lignino peroxidasa en su reacción con H_2O_2 donde se forman los radicales libres Mn^{+3} y AV^+ se presenta en la siguiente imagen:



Figuras 1 ciclos catalíticos de las enzimas (LiP y MnP)

Fuente: (Díaz, 2011)

Por otra parte se ha demostrado que el mecanismo de oxidación de las enzimas pueden catalizar la degradación de gran cantidad de compuestos xenobióticos como tintes, cloroaromaticos, dioxinas, hidrocarburos poliaromaticos, entre otros (Díaz, 2011).

Contaminantes aromáticos.

Las moléculas con estructuras cíclicas y completamente conjugadas reciben el nombre de compuestos aromáticos, en otras palabras se dice que presenta enlaces covalentes dobles alternados con enlaces simples de tal forma que permite una influencia mutua lo que genera un fenómeno llamado “deslocalización electrónica”. Esta "deslocalización electrónica" o también llamada energía de resonancia se denomina "aromaticidad", la cual es responsable de la gran estabilidad termodinámica de estas moléculas (Mata, 2020).

Una gran gama de estos compuestos aromáticos son tóxicos y gracias a su estabilidad, permanecen o son persistentes en el ambiente causando un gran problema al mismo. En este gran grupo de compuestos encontramos los BTEX que están constituidos por benceno y tolueno, entre más. También encontramos los hidrocarburos policíclicos aromáticos. Actualmente son usados en grandes cantidades en la industria y debido a los malos tratamientos contaminan acuíferos y sedimentos (Mata, 2020).

Un compuesto aromático de importancia para este proyecto es el fenol el cual es uno de los principales contaminantes industriales. Este se utiliza en la industria química para la preparación de colorantes, resinas sintéticas, sustancias aromáticas, disolventes y otros derivados. (Delgado, 2008)

El fenol es un compuesto orgánico aromático con un grupo de alcohol, que generalmente puede producirse mediante la oxidación del benceno, las características a temperatura ambiente es incoloro, cristalino y carácter acidular (Delgado, 2008). El fenol presenta varias vías posibles para entrar al cuerpo humano, por aguas contaminadas, comida u

otros productos con compuestos fenólicos, diversos estudios afirman que una exposición prolongada al fenol ejerce efectos teratógenos y cancerígenos (Delgado, 2008).

En la actualidad, estos compuestos aromáticos tienen una gran importancia en la industria ya que son utilizados para producir distintos productos como pesticidas, disolventes, plástico, fibra sintéticas, entre más. A una gran parte de estos productos o compuestos se le llama "xenobióticos" ya que tienen un origen antropogénico lo cual indica que su estructura o sustituyentes no son comunes o habituales en la naturaleza (Mata, 2020).

Cuando se habla de compuestos xenobióticos, se habla de una gran complejidad que representa un mayor problema, ya que en la actualidad son liberados masivamente en el ambiente y el hecho de que la estructura sea tan novedosa en la naturaleza, no encontramos mecanismos biológicos capaces de degradar fácilmente estos compuestos, siendo además algunos de estos tóxicos como por ejemplo los polihalogenados de las dioxinas y los bifenilos (PCBs), derivados fenólicos halogenados entre más. A nivel celular los daños de estos compuestos aromáticos los encontramos en la membrana celular, en algunas proteínas citoplasmáticas, ácidos nucleicos que al final puede generar u ocasionar la muerte celular. Ya cuando se habla en un orden mayor (organismos pluricelulares) encontramos que estos compuestos aromáticos pueden generar leves daños dermatológicos como también grandes afecciones al sistema nervioso, pueden favorecer el desarrollo de distintos tipos de cáncer o incluso malformaciones en fetos (Mata, 2020).

Métodos de Inmovilización de hongos.

La inmovilización es el proceso mediante el cual los microorganismos se confinan o se localizan en una región definida de un espacio, con el fin de dar un lugar a la actividad catalítica de los microorganismos para ser utilizada repetidamente. La mayor característica de este proceso es restringir parcial o completamente los grados de libertad del microorganismo

gracias a la unión del soporte, estos microorganismos inmovilizados cuentan con un mayor tiempo de vida, además las enzimas inmovilizadas tienen mejor especificidad y mayor actividad lo que permite una mayor biodegradación del contaminante (Romero, 2007).

Este método conlleva varias ventajas la principal y más significativa es la posibilidad de reutilizar los derivados, también cabe resaltar que mejora significativamente la estabilidad del microorganismo, por otra parte este método disminuye los costos en el proceso de biodegradación ya que la vida de trabajo de los microorganismos aumenta (Romero, 2007).

Métodos de inmovilización física.

Inclusión en membranas: En esta técnica se rodean los microorganismos por membranas semipermeables las cuales permiten el paso del sustrato y sus nutrientes, pero no de los microorganismos esto permite encapsular gran variedad y poca pérdida de los mismos (Romero, 2007). Estas membranas las podemos clasificar en dos grupos biológicas las cuales están presentes en seres vivos y sintéticas que se clasifican en líquidas, poliméricas y cerámicas (Montiel, 2015).

Células adheridas a superficies: en este método se encuentra cualquier tipo de célula adherida a una superficie sin importar su tipo de enlace, esto genera una biopelícula con la que se puede trabajar (Romero, 2007). Algunos tipos de materiales que son utilizados para este método son: vidrio, óxidos metálicos, geles de sílice, entre más (Morales, 2022)

Atrapamiento: este método consiste en retener físicamente microorganismos en una matriz porosa que normalmente en su mayoría están compuestas por polímeros, este atrapamiento se genera en las fibras o geles del material que se optó por utilizar (Romero, 2007). Los materiales que comúnmente se están utilizando en esta metodología son polímeros como cloruro de polivinilo, micropartículas de poliuretano derivadas de alcohol polivinílico, Polianilina, entre más (Morales, 2022).

Inmovilización con poliuretano.

El poliuretano es un plástico poroso que está formado por una agregación de burbujas, lo cual permite una inmovilización de microorganismos por adsorción. Actualmente este material cuenta con gran relevancia para la biotecnología ya que en él podemos encontrar un soporte sólido, inerte, con buenas propiedades mecánicas, buena porosidad y con grandes posibilidades de escalamiento en la industria como en pruebas pilotos, con la gran ventaja de tener bajo costo. Por otra parte se ha logrado comprobar que es capaz de inmovilizar hongos (Bustos, 2018).

Inmovilización con PET

El polietilentereftalato (PET) es un tipo de plástico ampliamente usado en la industria y en elementos del cotidiano, lo podemos encontrar en envases de bebidas, en la industria textil, en la actualidad se busca aprovechar este tipo de residuos no biodegradables surgiendo así la posibilidad de utilizarlo como un soporte inerte para la inmovilización de microorganismos, por ejemplo en el artículo “inmovilización de lipasa b de *candida antarctica* en plásticos no biodegradables. Aplicación en la esterificación de r/s-ibuprofeno” de (Nanni, 2021). Demostraron la posibilidad de inmovilizar lipasa b en residuos de PET por medio de absorción, dándonos a evidencia el gran potencial de este material para la rama de la biotecnología (Nanni, 2021).

Inmovilización con biopolímeros

Los biopolímeros son macromoléculas de orígenes natural, estos tienen cuatro fuentes como: animal (colágeno), agrícola (lípidos, proteínas y polisacáridos), microbiano (ácido poliláctico) y marino (quitina, quitosano y alginato) (Villada, 2006). Actualmente el alginato es utilizado ampliamente en el campo de la biotecnología para la inmovilización de microorganismos, es un polímero natural, que comprende de dos monómeros: ácido α -L-gulurónico y ácido D-manurónico, unido por el enlace alfa 1-4 (Bedoya, 2018). Este polímero

natural es el más usado para la inmovilización por facilidad de manejo y ventajas como su nula toxicidad, es biodegradable, tiene mayor tiempo de vida útil y es un recurso renovable (Bedoya, 2018).

Inmovilización con estropajo.

Este es un material natural proveniente de especies del género *luffa*, donde en su mesocarpio se forma una redícula fibrosa constituida con lignocelulosa, el estropajo es material versátil, económico, que sirve como soporte no inerte para la inmovilización de microorganismos este material se postula como una alternativa de soporte ya que en varios artículos este material no inerte tuvo el mejor desempeño y al ser capaz de interactuar con el microorganismo este género más enzimas capaces de degradar colorantes (Bustos, 2018).

4. ESTADO DEL ARTE

De acuerdo a las investigaciones que se realizaron se encontraron diversos artículos y tesis que plantean diferentes métodos y técnicas relacionados a nuestro tema, cabe resaltar que en el momento de investigar y analizar se encontró muy poca referencias bibliográficas con el hongo *trichoderma sp* lo cual puede llegar a indicar que es un proceso y tema novedoso.

Inmovilización de hongos

La inmovilización del hongo es un aspecto importante a trabajar en este proyecto ya que se desea realizar de una forma innovadora y de bajo costo. Por esta razón se postula el estropajo y la espuma de poliuretano como soporte experimental, el artículo de investigación “Inmovilización de hongos ligninolíticos para la remoción del colorante negro reactivo 5” (2009). Estudia la posibilidad de aplicar tratamiento biológico para la remoción de este contaminante, tomando tres diferentes especies de hongos de podredumbre blanca. Se comprobó que el estropajo fue uno de los mejores materiales para inmovilizar de los microorganismos (hongos) por ser un producto natural logrando en promedio una decoloración del 97% del colorante negro reactivo 5. Por otra parte, la espuma de poliuretano que cuenta con una alta porosidad fue capaz de inmovilizar los microorganismos y ser eficiente para la degradación del contaminante (Fernández & Henao, 2009).

Además cabe resaltar que la metodología utilizada en este artículo se tomó como base para plantear la de este proyecto. En ella utilizaron dos tipos de medio para el inóculo (líquido y sólido). En el medio líquido utilizaron caldo extracto salvado de trigo el cual junto con 5 cubos de cada material fueron agregados a un Erlenmeyer para después ser esterilizado y posteriormente se inocularon con los hongos (Fernández & Henao, 2009).

En el medio sólido se colocaron 30 cubos de cada material en cajas de Petri que contenían agar salvado de trigo, se sembraron los microorganismos de una forma para que estuvieran en contacto con el agar y el material posteriormente se incubó. Para determinar la biomasa en cada material fue por medio de peso seco teniendo en cuenta el peso inicial del material (Fernández & Henao, 2009).

Se determinó que ambos soportes fueron efectivos, pero seleccionaron el estropajo por ser un producto no inerte el cual favoreció la producción de algunas enzimas importantes para la degradación del colorante, por otra parte el hongo que generó mayor decoloración fue *Trametes versicolor*, con 96%, 98% y 98% donde el agua tenía una concentración del colorante de 300 ppm, 150 ppm y 75 ppm respectivamente (Fernández & Henao, 2009).

Otro artículo que cabe resaltar se titula. La “Remoción de colorantes textiles aplicando hongos ligninolíticos inmovilizados en turmalina” de Mendoza Santamaría (2020) Se estudió la remoción del colorante textil Azul-F-Oro, por los hongos *Phanerochaete chrysosporium* y *Pycnoporus cinnabarinus*, inmovilizados en turmalina, el cual es un soporte no inerte con alto contenido de hierro y otros metales mejorando la actividad enzimática de los hongos. La inmovilización se realizó por separado para cada hongo en un caldo de extracto de malta el cual contenía la turmalina estéril, para después incubar a temperatura ambiente por 5 días. Los hongos inmovilizados se agregaron a un cultivo que contiene solución acuosa del colorante a una concentración de 50ppm y se incubó durante 24 días. La decoloración se determinó por el método espectrofotométrico a 564 nm. Arrojando buenos resultados con el *P. chrysosporium* y tuvo una remoción del 96.7% y el *P. cinnabarinus* del 99.7% siendo este un proceso viable y con potencial para la degradación de colorantes textiles (Mendoza Santamaría, 2020).

Potencial de hongos para degradar colorantes

Otro artículo del potencial que tienen los hongos para la degradación de colorantes se titula “Evaluación de una matriz para decolorar efluentes textiles utilizando *Pleurotus ostreatus*” de (Sebastián Kravetz, 2016). En este el micelio de *Pleurotus ostreatus* es expuesto a efluentes textiles estos fueron tomados y utilizados el mismo día del experimento de una industria textil ubicada en Luján Buenos Aires, para ello en los ensayos prepararon réplicas de matriz-efluente en vasos plásticos, a los que se le realizaron perforaciones circulares equidistantes, estos vasos se introdujeron en una bandeja rectangular que contenía 300 mL de efluente textil coloreado cuya altura fue de 2,5 cm de tal manera garantizando que el micelio tomará contacto con el líquido a través de las perforaciones de los vasos; previamente para esto el micelio fue desarrollado en granos de avena que fueron previamente esterilizados a 121°C durante 45 minutos, para resaltar el micelio creció de manera adecuada en el efluente, además el tiempo de decoloración varía de 24 a 72 horas dependiendo del color del efluente, por último se generó una decoloración promedio del 57% pero esto puede depender de la intensidad del color que tenga el efluente, una gran ventaja de este experimento es que el micelio se puede reutilizar pero cabe resaltar que su capacidad decolorativa puede disminuir. Esto nos indica que este tipo de métodos de inmovilización y reutilización de microorganismos son viables para tratar este tipo de efluentes (Sebastián Kravetz, 2016)

Inmovilización de hongos para degradar contaminantes aromáticos

En la literatura se encuentran varios antecedentes en la inmovilización de microorganismos para la degradación de compuestos aromáticos, es importante identificar estos métodos y resultados para poder comparar y analizar los resultados obtenidos. En el caso de la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en el artículo que lleva por nombre “Degradation of pyrene by immobilized microorganisms in saline-alkaline soil” de Wang (2012). La particularidad de este artículo radica en la difícil degradación de los

hidrocarburos aromáticos policíclicos en suelos salinos-alcálinos los cuales inhiben el crecimiento de microorganismos, la solución que se presenta es inmovilizar microorganismos que puedan degradar estos hidrocarburos con mayor eficiencia, ellos evaluaron dos microorganismos que son *Mycobacterium sp* y *Mucor sp* para después inmovilizarlos en subproductos agrícolas como el maíz, trigo y arroz, con el fin de degradar pireno que está presente en el suelo salino-alcálinos (Wang, 2012). Se encontró que *Mycobacterium sp* tuvo la mejor degradación alcanzando un 83.2% de pireno, por otra parte se encontró que la técnica de inmovilización especialmente en hongos (*Mucor sp. F2, MF*) aumentó significativamente la degradación de pireno (Wang, 2012). Este estudio sugiere que *Mycobacterium sp* se puede emplear para la biorremediación in situ y que la inmovilización de hongos en subproductos agrícolas mejora la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos ya que la estructura del material portador permite un espacio intermedio para el crecimiento de los microorganismos (Wang, 2012).

Otro material utilizado para la inmovilización es la vermiculita como se menciona en el artículo que lleva por nombre “Biodegradation of benzo[a]pyrene in soil by *Mucor sp. SF06* and *Bacillus sp. SB02* co-immobilized on vermiculite” de (Pei-jun, 2006). En el cual inmovilizan *Bacillus sp* y *Mucor sp* para la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos, la inmovilización se realizó por adsorción física este método consistió en una adherencia simple con el material creando así una biopelícula para la degradación de benzo-a-pireno, a la vez realizaron una comparación de la degradación por microorganismos libres e inmovilizados, dando como resultado que la mayor tasa de eliminación corresponde a los microorganismos inmovilizados llegando a un 95,3% lo cual fue notablemente mayor que con los microorganismos libres, sugiriendo el gran potencial de la inmovilización enfocada para la degradación de contaminantes aromáticos (Pei-jun, 2006).

Potencial del hongo *Trichoderma* para la degradación de colorantes

Para el hongo *Trichoderma* y la degradación de colorantes no se encuentra demasiada información, lo que puede indicar que su uso es algo innovador, vale destacar el trabajo de grado realizado en el Semillero de Investigación en ingeniería de bioprocesos en la universidad Antonio Nariño “Estudio Del Potencial Biotecnológico Del Hongo *Trichoderma* sp, Para La Degradación De Compuestos Fenólicos” de (Jimenez D. S., 2019).

En la metodología se resalta los medios de cultivos alternativos utilizados, como lo son los cultivos líquidos que fueron preparados con soluciones de dextrosa, micronutrientes, medio mínimo de sales y lignina soluble, dando buenos resultados donde se destaca el medio con lignina y dextrosa el cual tuvo la mayor producción conidial, por último para evaluar la actividad enzimática se realizó un ensayo enzimático con rojo de fenol donde se observó que la mejor degradación fue con el sobrenadante del medio con lignina (Jimenez D. S., 2019).

Para concluir esta investigación permitió entender y evaluar la actividad enzimática del hongo *Trichoderma* sp para degradar lignina soluble. Como gran conclusión se demostró que la actividad enzimática del hongo dio buenos resultados para la degradación de rojo de fenol, esto permite crear un camino a futuro donde se estudie de una manera más amplia la degradación de otro tipo de compuestos fenólicos y el potencial biotecnológico de este hongo (Jimenez D. S., 2019).

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad los colorantes son utilizados ampliamente en la industria, donde podemos dividirlos en dos grandes grupos, solubles e insolubles los cuales estos últimos están compuestos por más de una sustancia donde la principal es el grupo aromático (Mata, 2020). Desde la década de los 80's se han venido implementando diferentes tratamientos biológicos para la remoción de estas sustancias como por ejemplo los hongos de podredumbre blanca, gracias a que estos tienen la capacidad de degradar lignina la cual posee una gran concentración de anillos aromáticos (Jimenez R. C., 2009).

Por otra parte distintos estudios han demostrado que los hongos filamentosos tienen un gran potencial para degradar estos compuestos, Pese a esto en la literatura es difícil encontrar experimentos que aborden el hongo *Trichoderma sp*; se ha mencionado tiene gran potencial por mecanismos como biosorción y biodegradación para la remoción de los colorantes (Noronha Ribeiro, 2019). Además este hongo tiene un buen potencial para participar en la industria biotecnológica ya que es de fácil crecimiento, soporta una amplia variación de temperatura y en especial por su producción lítica, que es la etapa donde se producen enzimas extracelulares como las quitinasas, glucanasas y proteasas, las cuales degradan pared celular de otros microorganismos. (Cortazar-Martínez, 2012).

Estudios previos en el semillero de investigación han logrado demostrar la efectividad de la degradación de estos compuestos con el uso de enzimas extracelulares del hongo (Jimenez D. S., 2019). Dicho lo anterior se establece la siguiente pregunta para este proyecto ¿El hongo *Trichoderma sp* aislado en el laboratorio de Ing. Ambiental puede ser correctamente inmovilizado en los materiales propuestos y esto permitirá una remoción del colorante más efectiva?

6. METODOLOGÍA

Para la realización de este proyecto se evaluó la inmovilización del hongo *Trichoderma sp* en los soportes planteados con los tres tipos de materiales: estropajo (Fernández & Henao, 2009), espuma poliuretano (Bustos, 2018) y PET triturado (Nanni, 2021) y con tres diferentes combinaciones para inocular dichos soportes y materiales. Por otra parte se estudió la capacidad de este organismo para crecer en medios con lignina como fuente de carbono y su potencial para producir enzimas para degradar sustancias aromáticas como el rojo de fenol.

A continuación se expone la metodología utilizada:

6.1 Preparación de los soportes para la inmovilización.

Para el diseño del soporte tipo cartucho se utilizó el programa *Blender*; el soporte tenía muchas perforaciones para que el hongo esté en contacto con el medio pero no le permite salir de dicho cartucho, este lo podemos ver en la ilustración 2. Los cartuchos fueron llenados con los distintos materiales propuestos para la inmovilización del hongo: estropajo (Fernández & Henao, 2009), espuma de poliuretano (Bustos, 2018) y PET triturado (Nanni, 2021).

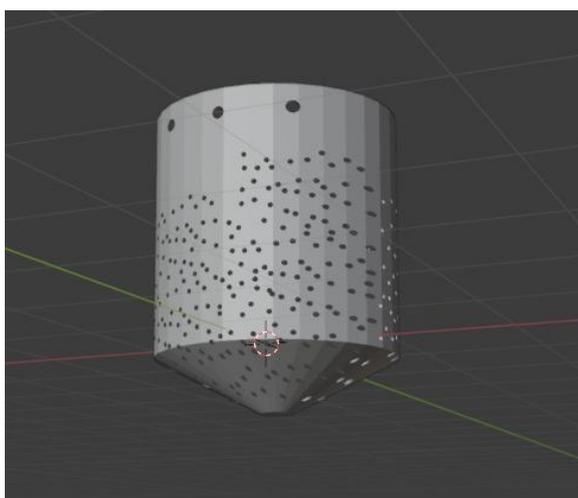


Ilustración 2 diseño de los cartuchos de soporte para la inmovilización en el software Blender.

Fuente: autor.

Posteriormente con el soporte diseñado se exportó al programa CUVANA el cual nos ayudó a establecer las medidas de altura y ancho deseadas.

Ya con la escala deseada se llevó el archivo a la impresora 3D. Se seleccionó el documento en la impresora y se imprimió la pieza en PLA (Ilustración 3). Finalmente se retiró la pieza de la impresora 3D, se limpió los pequeños residuos con la mano o con un encendedor y el cartucho quedó listo para los experimentos (ilustración 4).

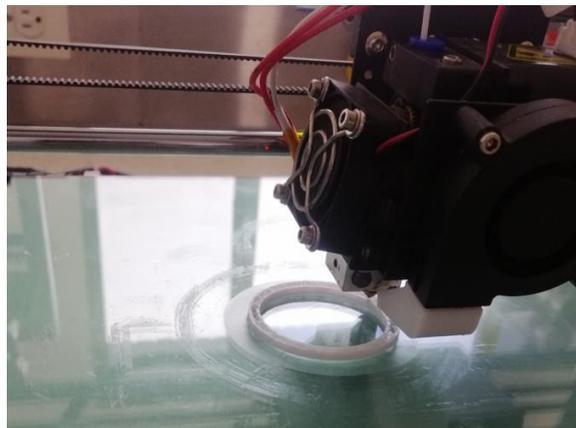


Ilustración 3 proceso de impresión en 3D de los cartuchos.

Fuente: autor



Ilustración 4 cartucho para la inmovilización.

Fuente: autor

6.2 Reactivar el hongo

Consistió en reactivar el hongo aislado en el laboratorio de ingeniería ambiental en medio de cultivo PDA, como se realizó en el trabajo de Jiménez DS (2019).

6.3 Inoculación de los montajes de inmovilización.

Esto consistió en los montajes para cada material que se proponen donde ocurre la inmovilización del hongo, donde se llevó a cabo la estimulación del mismo con lignina soluble.

Para llevar a cabo la inmovilización primeramente se colocó en contacto los diferentes materiales con el hongo; Esto se realizó en cajas de Petri con agar PDA, en este caso se utilizó seis cajas de Petri dándonos un volumen de 120 ml. Para ello con ayuda de una espátula y con el vidrio de reloj se pesó la cantidad necesaria de PDA, posteriormente se llevó a un Erlenmeyer, se le agregó el volumen calculado de agua destilada y finalmente se llevó al autoclave. Por último se sirvió el agar en las cajas de Petri, se sembró el hongo y se dejó incubado a 27°C durante tres días.

En el día tres de incubación del hongo se cortó los materiales (estropajo, espuma) de aproximadamente 2 cm de largo y 1cm de alto y el PET fue triturado en una procesadora de alimentos; se llevó el estropajo al autoclave para esterilizar, como los otros dos materiales se pueden derretir en el autoclave se colocaron en vaso de precipitados con alcohol durante 30 minutos. Por último se colocó todos los materiales y herramientas que se van a usar en la cabina de flujo y se dejó durante 15 minutos bajo la luz UV esto para garantizar la no contaminación.

Ya con el hongo después de incubado durante tres días, en la cabina de flujo se procedió a abrir la caja de Petri y con ayuda de unas pinzas que previamente estaban esterilizadas se tomó el estropajo y se colocó en contacto con el hongo y se cerró la caja de Petri como se observa en la ilustración 5.

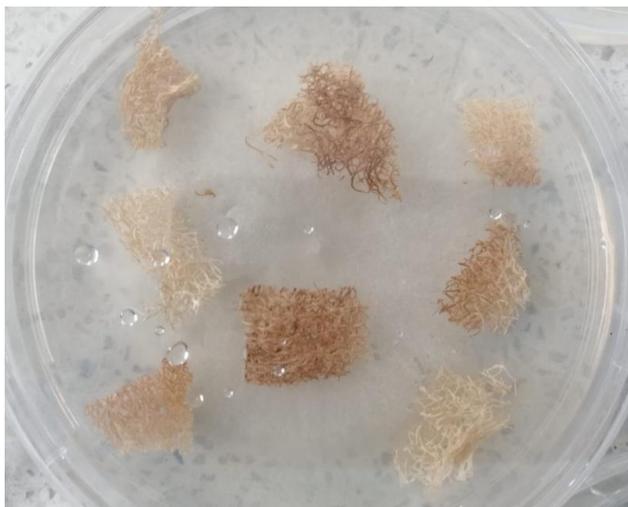


Ilustración 5 caja de Petri con PDA, inoculada con el hongo Trichoderma sp y estropajo. Día uno de contacto con el material-

Fuente: autor

Para los otros dos materiales restantes (PET y espuma) ya que estaban en alcohol, con ayuda de las pinzas se tomaron los mismos, se sumergieron en agua estéril y posteriormente se flamearon esto para eliminar por completo el alcohol, finalmente se colocaron en contacto con el hongo y se cerró la caja de Petri como se observa en la ilustración 6. Por último se llevaron a incubar a 27°C durante una semana.



Ilustración 6 en el lado izquierdo caja de Petri con PDA, inoculada con Trichoderma sp y espuma, al lado derecho caja de Petri con PDA, inoculada con Trichoderma sp y PET. Día uno de contacto con el material.

Fuente: autor

Para continuar con la inmovilización, después de una semana se observó que el hongo invade por completo todos los materiales como se observa en la ilustración 7.



Ilustración 7 en el lado izquierdo caja de Petri con PDA, inoculada con Trichoderma sp y espuma, en el centro caja de Petri con PDA, inoculada con Trichoderma sp y PET, en el lado derecho caja de Petri con PDA, inoculada con Trichoderma sp y estropajo. Después de una semana de contacto con el material.

Fuente: autor

6.4 Preparación de medios de cultivo para los ensayos de inmovilización

Para los montajes de inmovilización se preparó un medio de cultivo líquido el cual contenía medio mínimo de sales, micronutrientes y dextrosa (soluciones stock).

6.5 Preparación de soluciones stock

Estas soluciones son los reactivos necesarios para los experimentos de crecimiento del hongo en los soportes de inmovilización.

6.6 Medio mínimo de sales (MMS) (2 veces concentrado)

Para la preparación de 500 ml de una solución de (MMS), con la ayuda de una espátula se tomó: 0,05g de fosfato monopotásico (KH_2PO_4), 0,1 g de Cloruro de potasio (KCl), 0,1g de Nitrato de amonio (NH_4NO_3) y 0,1g de Sulfato de magnesio (MgSO_4); posteriormente se depositó en un frasco schott y con agua destilada se llevó a un volumen final de 500 ml, y por último se llevó al autoclave para esterilizar.

SAL	CANTIDAD g/L
-----	--------------

NH ₂ PO ₄	200
NH ₄ NO ₃	50
MgSO ₄ *7H ₂ O	50
KCl	100

Tabla 1 Preparación de Medio Mínimo de Sales (MMS 2 veces concentrada).

Fuente: (Jimenez D. S., 2019).

6.7 Micronutrientes 4 veces concentrados

En la siguiente tabla encontramos las sales y sus respectivas concentraciones que se utilizaron en este proyecto.

SAL	CANTIDAD g/L
MnSO ₄ *H ₂ O	1
(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₁₄	1
ZnSO ₄ *7H ₂ O	7
CuSO ₄	1

Tabla 2 Preparación de Micronutrientes (4 veces concentrado).

Fuente: (Jimenez D. S., 2019).

6.8 Dextrosa al 10% p/v

Se tomó 10 g de dextrosa y disolverlo en 100 ml de agua destilada, para ello con ayuda de una espátula y un reloj de vidrio, se pesó los gramos requeridos en la balanza, después se depositó en un frasco schott y se aforo con los 100 ml de agua destilada para finalmente esterilizarlo en el autoclave.

6.9 Experimentos de inmovilización del hongo en los cartuchos con los materiales de soporte

Se procedió a realizar los respectivos montajes para cada material, se realizaron tres diferentes combinaciones para inocular los mismos.

- A. El primer montaje se realizó con los tres tipos de materiales los cuales fueron colonizados previamente por el hongo en las cajas de Petri (ilustración 7).
- B. El segundo montaje se realizó con los tres materiales limpios y esterilizados, posteriormente se le agregaron al cartucho **siete** discos de agar PDA inoculado con el hongo, de medio centímetro de diámetro aproximadamente.
- C. El tercer montaje se realizó con los tres de materiales colonizados previamente por el hongo en las cajas de Petri y se le agregaron al cartucho **tres** discos de agar PDA inoculado con el hongo, de medio centímetro de diámetro aproximadamente.

Después de montar los experimentos estos son sellados y llevados a la incubadora durante siete días a 27°C, a una agitación de 150rpm con un sistema de agitación que fue diseñado previamente en el semillero de investigación de la Universidad Antonio Nariño (ilustración 8).

La dextrosa como fuente de carbono fue suministrada a pulsos durante los siete días para alcanzar una concentración final en el medio del 1%.



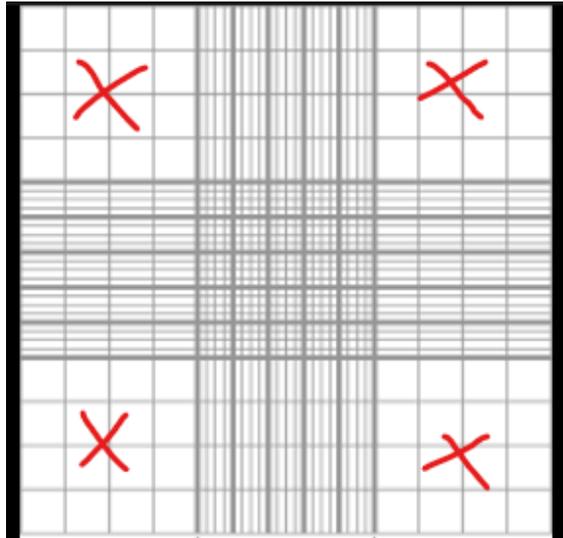
Ilustración 8 montajes de inmovilización

Fuente: autor

6.10 Evaluación de la inmovilización del hongo en los soportes empleados

Este proceso consistió en evaluar la inmovilización de los montajes propuestos, se realizó por medio de un conteo de conidios e hifas en la cámara de Neubauer, es un método indirecto de medición y se esperaba que entre más hifas se encontraran en los medios líquidos menor era la inmovilización en los materiales.

Se tomó 20 μL de los medios líquidos con una micropipeta y se colocó la muestra en la cámara de Neubauer, para después realizar el conteo como establece Flores;(2021): se tomaron 4 cuadrículas como se observa en la figura 2. El recuento de hifas se hizo de manera semi-cuantitativa, mientras que el recuento de conidios se determinó en conidios/mL



Figuras 2 selección de cuadros que se contaron en la cámara de Neubauer

Fuente: (Flores, 2021).

6.11 Preparación del inóculo

Consiste en preparar un medio de cultivo con características particulares donde posteriormente se deposita el hongo. Este proceso se realiza de acuerdo al trabajo de Jiménez D,S (2019). Por otra parte para estos medios de cultivo se colocó en contacto con los materiales como se hizo en el apartado 3 inoculación de los montajes de inmovilización (ilustración 9).



Ilustración 9 medios de cultivo alternativo con los materiales para realizar los experimentos de inmovilización con lignina soluble Fuente: autor

6.12 Estimular la producción enzimática del hongo inmovilizado en un cultivo con lignina soluble

Este proceso consistió en elaborar cultivos de lignina soluble al 1% con el hongo inmovilizado para favorecer la producción de enzimas que degradan compuestos fenólicos; el medio contiene medio mínimo de sales y micronutrientes (Jimenez D. S., 2019).

Para la extracción de lignina soluble se realizó por el método la extracción TAPPI T222 om-02 empleando como insumo bagazo de caña (Jimenez D. S., 2019).

Estos montajes se realizaron en vasos de precipitados de 250 ml, con un volumen final en el medio de 150 ml, se optó por este volumen para que las perforaciones del cartucho estuvieran completamente sumergidas y que hubiera suficiente espacio para el agitador magnético; por otra parte con dicho volumen final se calculó el volumen de micronutrientes, medio mínimo de sales y lignina soluble en el medio.

6.13 Evaluación de la degradación del rojo de fenol a partir de los extractos enzimáticos de los montajes con el hongo inmovilizado

Consistió en la degradación del rojo de fenol con los extractos enzimáticos de acuerdo al trabajo Jiménez, D.S (2019). Para esto se utilizó el sobrenadante de los medios con lignina, tomado 15 ml de cada uno que posteriormente se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 min. Este ensayo enzimático consistió en una reacción química donde se empleó Manganeso, solución buffer, rojo de fenol, caseína y peróxido de hidrógeno, llevando a cabo una reacción por la acción enzimática con el fin de degradar el sustrato de interés que en este caso es el rojo de fenol; estos reactivos anteriormente nombrados fueron preparados de acuerdo al trabajo de Jiménez, D.S (2019) en modificación al protocolo determinado por Glenn & Gold (1985).

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Inoculación de los montajes de inmovilización e incubación

Inicialmente se deseó encontrar la mejor metodología para inmovilizar el hongo *Trichoderma sp* en los soportes propuestos utilizando tres tipos de combinaciones para la inoculación de los mismos. Estos montajes se realizaron en medios de cultivo que contenían micronutrientes, medio mínimo de sales, dextrosa al 1% y un sistema de agitación (150 rpm) como se observa en la ilustración 10. En los cultivos se garantiza la temperatura óptima 25 °C para el crecimiento del microorganismo.



Ilustración 10 montajes de inmovilización en el sistema de agitación

Fuente: autor

Para determinar el tiempo adecuado de duración de los experimentos se observó que en el día 6 el hongo empezó a invadir los hilos de nailon que sostenían los cartuchos en los medios líquidos, como se aprecia en la ilustración 11, sugiriendo así que 5 días de incubación son suficientes para el crecimiento e inmovilización del hongo en los soportes.



Ilustración 11 cartuchos para la inmovilización con el material y el hongo al finalizar el experimento

Fuente: Autor

7.2 Evaluación del crecimiento del hongo en los montajes de inmovilización

Por otra parte se realizó un conteo de conidios en la cámara de Neubauer con el fin de evaluar el crecimiento del hongo e inmovilización de los montajes, los datos se recopilaron y se observan en la tabla 3.

Tabla 3 concentraciones de conidios por mililitro en los medios.

Fuente: Autor

tipo de inóculo para los experimentos de inmovilización	materiales de inmovilización	tiempo de incubación en días		
		día 1	día 3	día 5
material colonizado (A)	PET	4,8E+04	4,4E+05	9,0E+05
	espuma	6,5E+04	1,9E+05	4,0E+05
	estropajo	6,9E+05	1,1E+06	1,4E+06
material limpio con 7 discos de agar (B)	PET	3,3E+04	3,3E+05	6,5E+05
	espuma	7,5E+04	1,6E+05	3,0E+05
	estropajo	1,4E+05	6,0E+05	8,0E+05
material colonizado con 3 discos de agar (C)	PET	3,5E+05	6,9E+05	4,2E+05
	espuma	1,6E+05	2,1E+05	8,6E+05
	estropajo	2,6E+05	6,3E+05	8,8E+05

Al analizar los datos se encontró que en el experimento A (ilustración 12) el estropajo fue el que presentó mayor concentración de conidios en el medio líquido, esto es gracias a que este material no es inerte lo que le permite al hongo crecer con mayor facilidad porque lo puede utilizar como fuente de carbono ya que cuenta con las enzimas necesarias para degradar el material (Fernández & Henao, 2009). Por otra parte el material que presentó menor

concentración de conidios en el medio líquido fue la espuma sugiriendo que este material al ser inerte podría llegar a ser eficiente para la inmovilización y no permite un mayor crecimiento del hongo.

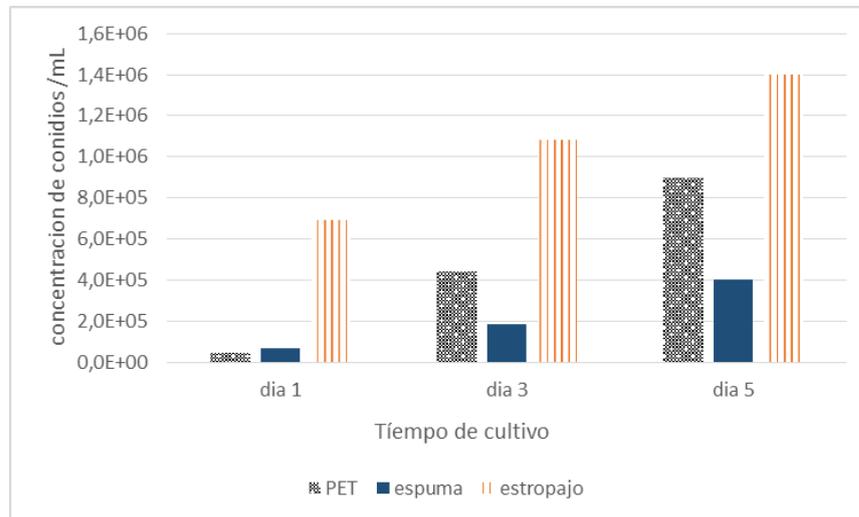


Ilustración 12 gráfica de concentración de conidios para el experimento A

Fuente: Autor

Para los experimentos B y C (ilustración 13 y 14 respectivamente) se observan comportamientos similares a lo largo del experimento, donde la concentración de conidios en el estropajo fue mayor con todos los inóculos, seguido por el pet y finalmente la espuma. Esto confirma que el estropajo está siendo utilizado como fuente de carbono (Fernández & Henao, 2009).

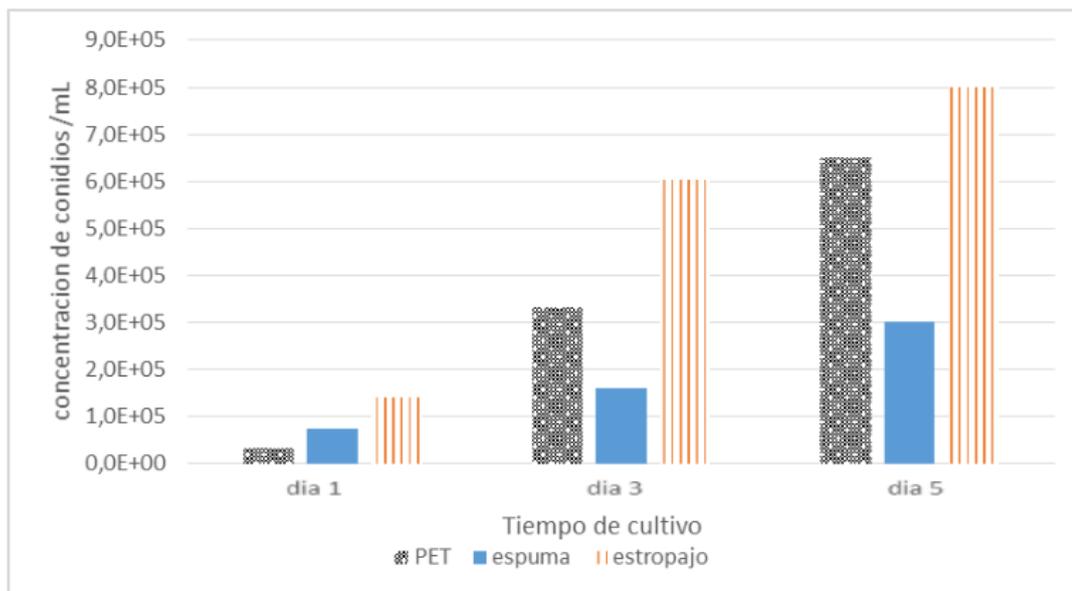


Ilustración 13 gráfica de concentración de conidios para el experimento B

Fuente: Autor

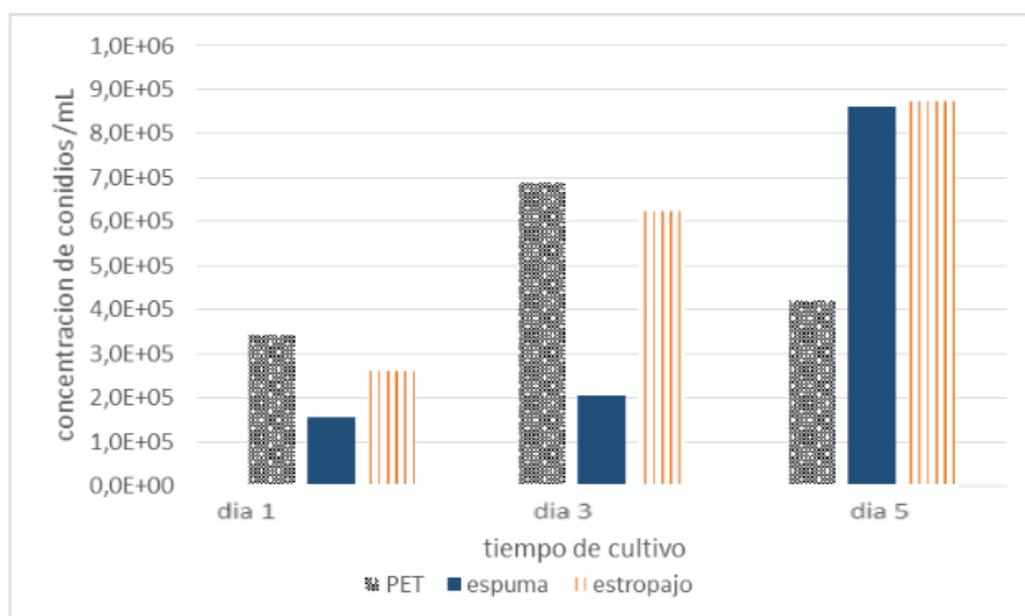


Ilustración 14 gráfica de concentración de conidios para el experimento C

Fuente: Autor

7.3 Evaluación de hifas libres en medios líquidos

En los experimentos la evaluación de las hifas libres nos sugiere la inmovilización de microorganismos en los materiales, ya que a mayor presencia de las mismas en el medio indica

menor inmovilización (Granada, 2015). los resultados del conteo de hifas los podemos observar en la tabla 5 donde en los experimentos con material colonizado (A) se presentó mayor cantidad de hifas libres al finalizar el experimento, seguido por el material limpio con 7 discos de agar (B) y finalmente el material colonizado con 3 discos de agar fue el que presentó menor cantidad de hifas.

Tabla 5 conteo de hifas en la cámara de Neubauer

Fuente: Autor

tipo de inóculo para los experimentos de inmovilización	materiales de inmovilización	tiempo de incubación en días			Hifas ramificadas
		Día 1	Día 3	Día 5	
material colonizado (A)	PET	0	2	5	frecuente
	espuma	0	3	4	frecuente
	estropajo	6	5	6	muy abundante
material limpio con 7 discos de agar (B)	PET	1	0	3	poco
	espuma	0	1	1	frecuente
	estropajo	1	1	3	muy abundante
material colonizado con 3 discos de agar (C)	PET	0	0	0	ninguno
	espuma	0	0	0	ninguno
	estropajo	0	0	2	muy abundante

Un aspecto a resaltar es que cuando se utilizaban discos de agar en los montajes estos presentaron menor conteo de hifas y menor concentración de conidios. Esto nos sugiere que al agregar los discos la inmovilización puede ser más efectiva ya que sirvieron como soporte, permitiendo un espacio intermedio para el crecimiento del hongo generando así que este se agrupará alrededor del agar PDA (Wang, 2012).

Es importante analizar la cantidad de hifas presente en el medio ya que es un medida directa de la inmovilización: el número y la ramificación de las hifas se relaciona con el crecimiento, ya que a mayor ramificación indica un mayor desarrollo de la morfología completa del hongo (Granada, 2015). Por consecuencia es deseable no encontrar o encontrar pocas hifas en el medio líquido para atribuir que se realizó una correcta inmovilización; como se observa en la tabla 5, el experimento A fue el que presentó mayor cantidad de hifas y fue descartado por ello. A pesar de que Wang (2012) sugiere que el agar funciona como soporte de inmovilización, el experimento B no se seleccionó para la siguiente fase de la investigación porque presentó mayor conteo de hifas libres en los medios y mayor ramificación que el experimento C, el cual presentó menor cantidad de hifas y solo un material (estropajo) con abundante ramificación de las mismas ya que fue utilizado como fuente de carbono. En conclusión se utilizó el material colonizado y con tres discos (C) para la siguiente fase de la investigación.

7.2 Montajes de inmovilización con lignina soluble como fuente de carbono

Ya seleccionado el experimento con mejor inmovilización se procedió a realizar el medio de cultivo líquido con lignina soluble, la cual fue adicionada a pulsos para llegar a una concentración final de 1% en el medio, además este también contó con medio mínimo de sales micronutrientes y un sistema de agitación.

Para evaluar la inmovilización y el crecimiento del hongo se realizó un conteo en la cámara de Neubauer como se observa en la tabla 7.

Tabla 7 concentración de conidios/mL en el medio con lignina

Fuente: Autor

	conidios/mL

materiales de inmovilización	Día 1	Día 3	Día 5
PET	3,23E+05	9,00E+05	8,50E+05
espuma	8,50E+04	5,75E+05	8,03E+05
estropajo	2,18E+05	8,00E+05	7,50E+05

En este experimento se encontró que hubo buen crecimiento del hongo por la concentración de conidios presentada, teniendo como única fuente de carbono lignina soluble, ratificando que el hongo tiene la capacidad de adaptarse y crecer con este sustrato como lo dedujo Jiménez, D.S (2019). Estas concentraciones de conidios la podemos observar en la figura 15

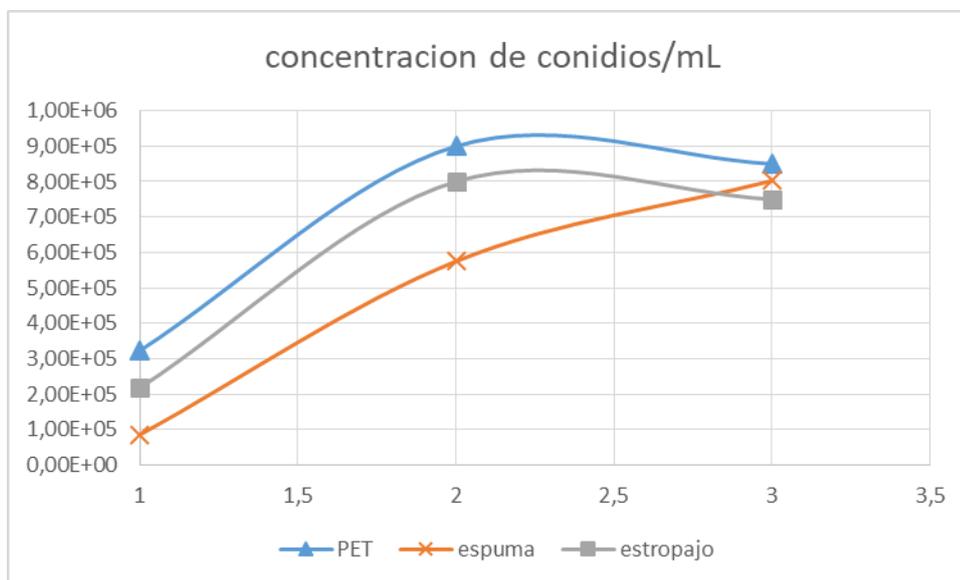


Ilustración 15 gráfica de concentración de conidios/mL en el medio con lignina soluble

Fuente: Autor

También se realizó el conteo de hifas libres en el medio líquido con lignina en la cámara de Neubauer (tabla 8) con el propósito de evaluar la inmovilización teniendo en cuenta cantidad

y su ramificación (Granada, 2015). Como se esperaba el que mayor cantidad de hifas libres presentó fue el estropajo ya que este sirvió como fuente de carbono, seguido por el PET y finalmente la espuma que no presentó hifas libres. Se puede sugerir que este material es el que permite la mejor adherencia del hongo.

Tabla 8 conteo de hifas en la cámara de Neubauer en el medio con lignina

Fuente: Autor

materiales de inmovilización	conteo de Hifas en cámara Neubauer			Hifas ramificadas
	Día 1	Día 3	Día 5	
PET	0	0	2	poco
espuma	0	0	0	ninguno
estropajo	0	0	3	muy frecuente

Cabe resaltar el color verdoso que tomó el medio líquido con el PET como material de soporte, como se observa en la ilustración 16. Esto puede ser por el proceso denominado conidiogénesis que indica que entre menor sea la concentración de carbono disponible mayor será la esporulación por la falta de carbono por esto el hongo formó conidios como mecanismo de supervivencia (Tibasosa, 2014) dándole este color característico; Se podría inferir que el hongo estaba estresado. ya que el sustrato es de difícil degradación, sin embargo el PET y la espuma, que generan mayor concentración de conidios, causan un interacción diferente en el hongo con el sustrato: esto se lo podemos atribuir a la espuma que favorece la inmovilización del hongo y así este logre soportar el pH del sustrato. Por otra parte, en los ensayos previos el PET presentó mayor cantidad de hifas libres presentes en el medio líquido y por lo tanto menor adherencia al soporte, lo que pudo causar que el hongo entrase en contacto directo con el

sustrato, y al no poder formar una biopelícula adecuada (Romero, 2007). pudo haber sufrido mayor estrés por lo que los conidios presentaron esa coloración.

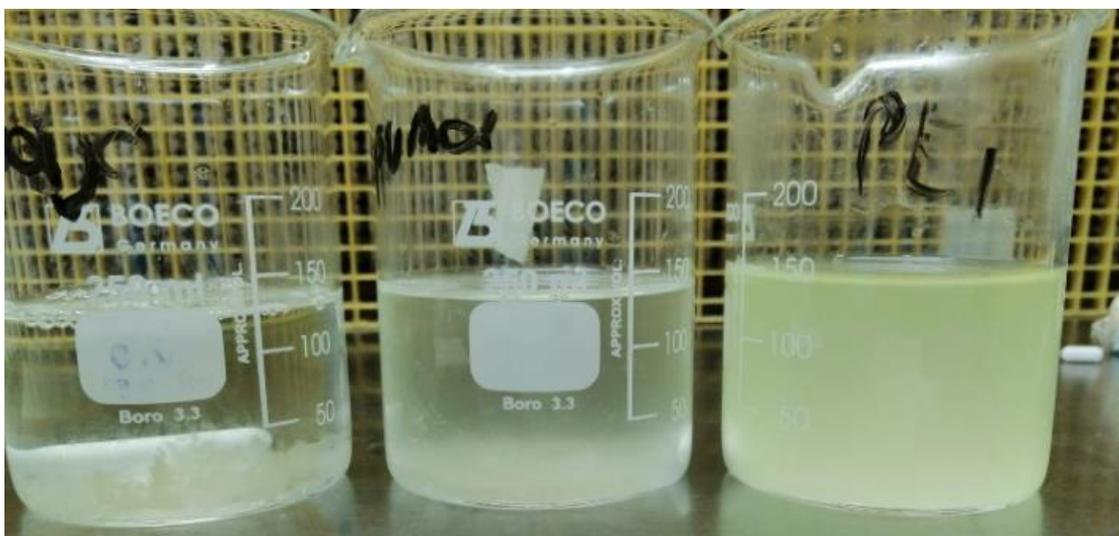


Ilustración 16 medios de cultivo líquido con lignina soluble después de terminar el experimento

Fuente: Auto

7.3 Experimentos de degradación del rojo de fenol

El objetivo del ensayo enzimático es observar la degradación del rojo de fenol en el tiempo, para ello se empleó la curva de calibración del trabajo de Jiménez D,S (2019). Se realizó el ensayo enzimático con los sobrenadantes de los experimentos de los medios líquidos con lignina soluble, se midió la absorbancia a 435nm cada 30 min y se tuvo un control negativo con agua destilada para verificar que el rojo de fenol era estable en el tiempo y no se degradó por otros mecanismos (ilustración 17).

Luego del ensayo enzimático se encontró que la degradación del rojo de fenol fue mayor con el sobrenadante del experimento con estropajo como soporte, se esperaba esta reacción ya que es un material inerte y por su composición llega a favorecer la generación de posibles enzimas ligninolíticas que degradan el rojo de fenol (Glenn & Gold, 1985).

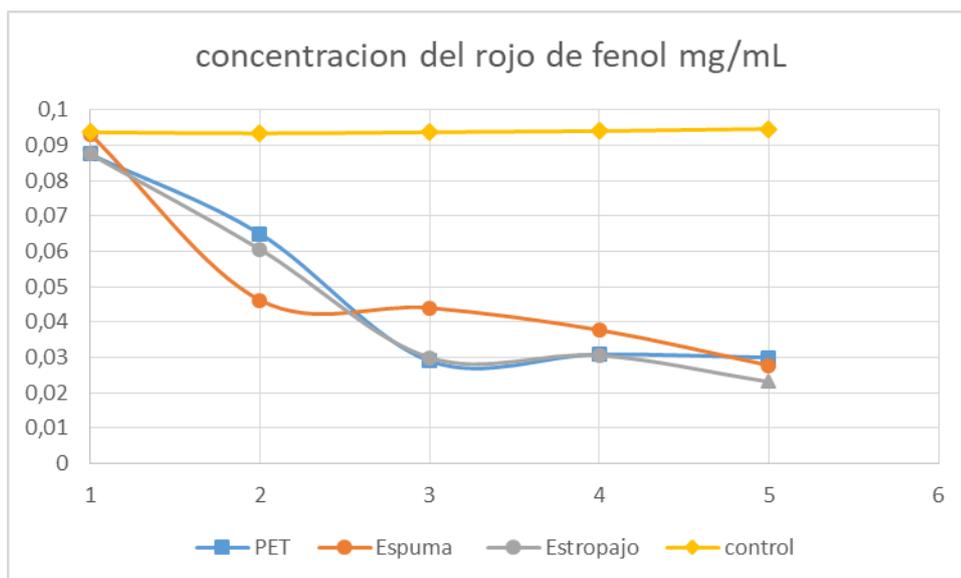


Ilustración 17 gráfica de concentración del rojo de fenol respecto al tiempo

Fuente: Autor

Los resultados indican que, sin importar el material de inmovilización, al utilizar lignina soluble como fuente de carbono el hongo puede crecer y formar las enzimas necesarias para posteriormente degradar el rojo de fenol en el ensayo enzimático, confirmado lo evidenciado previamente por Jimenez (2019). Finalmente, se sugiere que inóculo con material colonizado y tres discos de agar, junto con la espuma como material de soporte serían las combinaciones más adecuadas para la inmovilización del microorganismo y su posible uso en la descontaminación de efluentes con presencia de compuestos aromáticos.

8 CONCLUSIONES

8.1 Se concluye que la mejor metodología para la inmovilización del hongo *Trichoderma sp* es la que usó como inóculo material colonizado con tres discos de agar y espuma como material de soporte. El estropajo puede ser un material viable para el crecimiento del hongo y favorecer el crecimiento de las enzimas ligninolíticas para la degradación del rojo de fenol, pero al ser un material no inerte favorece un crecimiento abundante por lo cual no permite una adecuada inmovilización.

8.2 Se concluye que el hongo *Trichoderma sp* tiene potencial para degradar compuestos fenólicos, ya que se demuestra con los ensayos enzimáticos, es capaz de degradar el rojo de fenol sin importar el material de soporte. Cabe destacar que la mayor degradación fue con el estropajo ya que este por su composición favoreció la generación de las enzimas necesarias para descomponer el colorante.

8.3 Los cartuchos y materiales empleados funcionaron adecuadamente para el crecimiento e inmovilización del hongo, estos resultados de laboratorio son la base para un posible escudo del uso del hongo *Trichoderma* inmovilizado para el tratamiento de efluentes contaminados con sustancias aromáticas.

9. Recomendaciones

Para los medios de cultivo, es importante emplear un sistema de agitación para garantizar la inmovilización.

Es necesaria la solución Buffer para que los ensayos enzimáticos se realicen de forma adecuada.

Para la realización de los montajes se sugiere una preparación anticipada de las soluciones *stock* para una mayor facilidad en los procesos.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Bedoya, L. O. (2018). Efectividad de un hongo inmovilizado en alguitano para solubilizar P y promover el. [Tesis de doctorado Universidad Nacional De Colombia] repositorio unal
[.https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/76311/1036616542.2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/76311/1036616542.2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Bisang, R. (24 de marzo de 2009). Biotecnología y desarrollo . Obtenido de CEPAL:
https://www.cepal.org/sites/default/files/publication/files/3650/S2009064_es.pdf
- Bustos, P. D. (2018). EVALUACIÓN DE LA INMOVILIZACIÓN DE *Trametes versicolor* DSM 3086 EN ESTROPAJO COMÚN (*Luffa cylindrica*). [Tesis de pregrado Universidad el Bosque] repositorio.unbosque.edu.co Obtenido de
https://repositorio.unbosque.edu.co/bitstream/handle/20.500.12495/3306/Chaparro_Bustos_Paula_Daniela_2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=La%20inmoviliza
 ci% C3% B3n% 20de% 20un% 20microorganismo, Garz% C3% B3n% 20% 26% 20Barrag
 % C3% A1n% 2C% 202008).
- Preussler, César A., Shimizu, Ernesto, Villalba, Laura L., & Zapata, Pedro D.. (2009).
 Inducción con cobre de la enzima lacasa en el hongo de pudrición blanca *Trametes villosa* (sw.: Fr.) kreisel. *Revista de Ciencia y Tecnología*, (12), 09-16.
http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-75872009000200002&lng=es&tlng=es.
- Cortazar-Martínez. (18 de enero de 2012). BIOTECNOLOGÍA APLICADA A LA DEGRADACIÓN DE COLORANTES DE LA INDUSTRIA TEXTIL. Obtenido de
<http://www.scielo.org.mx/pdf/uc/v28n2/v28n2a9.pdf>

Curvetto, N. R. (2 de agosto de 2004). Biotecnología en hongos superiores . Obtenido de conicet:

https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/30434/CONICET_Digital_Nro.7d79e416-207d-439e-a3cd-87e3a0b8fa55_B.pdf.pdf?sequence=5&isAllowed=y&fbclid=IwAR0Dgml5xKKdyISBbtcE-LgHP87heDS1u9QyuTRODFS14uPkvQ8aSWUWf6M

Danay Infante, B. M. (15 de abril de 2018). MECANISMOS DE ACCIÓN DE Trichoderma FRENTE A HONGOS FITOPATÓGENOS. Obtenido de

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100002

Delgado, C. A. (2008). Fotocatalizadores nanoestructurados de TiO₂ y Fe-TiO₂ para la

degradación de compuestos aromáticos en medio acuoso empleando luz solar. [Tesis de doctorado Universidad Autónoma de Madrid]. Obtenido de

https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/1604/14646_adan_delgado.pdf?sequence=1

Quintero Diaz, Juan Carlos. (2011). REVISIÓN: DEGRADACIÓN DE PLAGUICIDAS

MEDIANTE HONGOS DE LA PUDRICIÓN BLANCA DE LA MADERA. Revista

Facultad Nacional de Agronomía Medellín, 64 (1), 5867-5882. De

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-28472011000100012&lng=en&tlng=es

Fernández, Jorge Andrés, Henao, Lina María, Pedroza-Rodríguez, Aura Marina, & Quevedo-

Hidalgo, Balkys. (2009). Inmovilización de hongos ligninolíticos para la remoción del colorante negro reactivo 5. Revista Colombiana de Biotecnología, 11(1), 59-72. De

[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752009000100007&lng=en&tlng=es.](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752009000100007&lng=en&tlng=es)

- Flores, P. C. (20 de agosto de 2021). camara de recuento. Obtenido de <https://www.studocu.com/pe/document/universidad-peruana-cayetano-heredia/bioquimica/camaras-de-recuento/8512669>
- Granada, E. G. (11 de octubre de 2015). Morfología y Clasificación de los hongos . Obtenido de http://ciencias.bogota.unal.edu.co/fileadmin/Facultad_de_Ciencias/Publicaciones/Imagenes/Portadas_Libros/Biologia/Morfologia_y_Clasificacion_de_los_Hongos/Morfologia_y_clasificacion_de_los_hongos_libro.pdf
- Glenn, J. K., & Gold, M. H. (1985). Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 242(2), 329–341. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(85\)90217-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(85)90217-6)
- Jimenez, D. S. (2019). Estudio Del Potencial Biotecnológico Del Hongo *Trichoderma* sp, Para La Degradación De Compuestos Fenólicos.[tesis de pregrado]Universidad Antonio Nariño.
- Jimenez, R. C. (2009). CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE COLORANTES TEXTILES DE DIFERENTES CLASES QUÍMICAS POR HONGOS Y BACTERIAS INMOVILIZADOS SOBRE FIBRA DE Agave tequilana. [Tesis de pregrado PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA]. repository.javeriana.edu.co. Obtenido de <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8222/tesis217.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Juan Quintero, G. F. (2006). PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS CON HONGOS BASIDIOMICETOS CULTIVADOS SOBRE MATERIALES LIGNOCELULOSICOS. REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA págs. 61-67. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v13n2/v13n2a08.pdf>

Mata, D. S. (2020). Degradación de compuestos aromáticos y alicíclicos en la bacteria *Azoarcus* sp. CIB, y sus aplicaciones biotecnológicas. [Tesis doctoral inédita leída en la Universidad Autónoma de Madrid]. Obtenido de <http://hdl.handle.net/10486/692725>

Mendoza Santamaría, L. O. (2020). Remoción de colorantes textiles aplicando hongos ligninolíticos inmovilizados en turmalina. Universidad Autónoma Metropolitana Revista *tediq* 6(6) 604, 202. Obtenido de <http://hdl.handle.net/11191/7771>

Montiel, P. O. (22 de mayo de 2015). Membranas de intercambio con aplicaciones energéticas. Obtenido de Madrid Blogs: <https://www.madrimasd.org/blogs/energiasalternativas/2015/05/22/132491>

Morales, K. B. (2022). Inmovilización una mirada a los métodos, soportes y retos. Revista *CENIC Ciencias Biologicas*, vol. 52, núm. 1, pp. 059-078, 2021. De: <https://www.redalyc.org/journal/1812/181268228007/html/#:~:text=Una%20gran%20cantidad%20de%20materiales,una%20resistencia%20t%C3%A9rmica%20y%20mec%C3%A1nica.>

Nanni, A. (20 de octubre de 2021). INMOVILIZACIÓN DE LIPASA B DE *CANDIDA ANTARCTICA* EN PLÁSTICOS NO BIODEGRADABLES. APLICACIÓN EN LA ESTERIFICACIÓN DE R/S-IBUPROFENO. Obtenido de

<http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/132471/Documento.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Noronha Ribeiro, J. S. (2019). Aplicación de hongos filamentosos para la remoción simultánea de metales y colorantes. [Tesis de maestría Universidad Autónoma de Nueva León]. Obtenido de <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/16092>

Omar Romero Arenas, M. H. (9 de octubre de 2009). Características de *Trichoderma harzianum*, como agente. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v11n2/v11n2a15.pdf?fbclid=IwAR3Tf0WxBXDj4H6UIsGCL-BU7w9Q7VrZ8M-OWYrzDoh7xInoKGn7Oe14wms>

Pastrana, L. (2009). FUNDAMENTOS DE LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SOLIDO. Ciencia y tecnología alimentaria Pages 4-12. Obtenido de <https://doi.org/10.1080/11358129609487556>

Pei-jun, L. (2006). Biodegradación de benzo[a]pireno en suelo por *Mucor* sp. SF06 y *Bacillus* sp. SB02 co-inmovilizado en vermiculita. Revista de Ciencias Ambientales Volumen 18, número 6, páginas 1204-1209. Obtenido de [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(06\)60063-6](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(06)60063-6)

Romero, S. C. (2007). Evaluación de la actividad enzimática de la enzima lacasa por inmovilización en alginato del hongo *Trametes Pubescens*. [Tesis de pregrado Universidad De Los Andes]. Obtenido de <https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/23565/u302870.pdf?sequence=1>

Sebastián Kravetz, A. G. (12 de septiembre de 2016). Evaluación de una matriz para decolorar efluentes textiles utilizando *Pleurotus ostreatus*. Obtenido de

<https://revistas.unal.edu.co/index.php/gestion/article/view/56223#textoCompletoHTML>

L

Torres, A. M. (3 de julio de 2003). Solid substrate fermentation for lignolytic enzyme.

Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/776/77650107.pdf>

Tibasosa Rodríguez, Geraldine .(2014).Evaluación del efecto de fuentes de carbono y de nitrógeno sobre la conidiogénesis de *Penicillium* sp. HC1 en medio sólido y líquido. [Tesis de pregrado PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA].

repository.javeriana.edu.co. <http://hdl.handle.net/10554/36984>

Villada, H. S. (1 de agosto de 2006). BIOPOLÍMEROS NATURALES USADOS EN EMPAQUESBIODEGRADABLES. Obtenido de

<https://revistas.unicordoba.edu.co/index.php/temasagrarios/article/view/652/768>

Wang, S. (2012). Degradation of pyrene by immobilized microorganisms in saline-alkaline soil. *Revista de Ciencias Ambientales* Volumen 24, número 9, páginas 1662-1669

Obtenido de

https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/46956020/Degradation_of_pyrene_by_immobilized_mic20160702-31466-yvu3eu-with-cover-page-

[v2.pdf?Expires=1664936653&Signature=V9jXpbPpQUKHkLVSn-](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/46956020/Degradation_of_pyrene_by_immobilized_mic20160702-31466-yvu3eu-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1664936653&Signature=V9jXpbPpQUKHkLVSn-)

[XUO10~MGBdvgRN4hL4eq7s6FGFNOsKuLcPktu2ieja0VIVKrlA7T2QoKBdYw86](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/46956020/Degradation_of_pyrene_by_immobilized_mic20160702-31466-yvu3eu-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1664936653&Signature=V9jXpbPpQUKHkLVSn-XUO10~MGBdvgRN4hL4eq7s6FGFNOsKuLcPktu2ieja0VIVKrlA7T2QoKBdYw86)

[RgjdJft8CJ3gq9](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/46956020/Degradation_of_pyrene_by_immobilized_mic20160702-31466-yvu3eu-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1664936653&Signature=V9jXpbPpQUKHkLVSn-RgjdJft8CJ3gq9)

