



# TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO INSTITUTO TECNOLÓGICO DE NUEVO LEÓN

## División de Estudios Profesionales

### Trabajo de Titulación **Opción TI. Tesis**

Proyecto: “Ensayo cinético del crecimiento *in vitro* de *Trichoderma harzianum* aislado del suelo en Nuevo León para propósitos ambientales”

<b>ALUMNO(S):</b>	Ana Cecilia Salinas Méndez
<b>No. CONTROL:</b>	11480728
<b>CARRERA:</b>	Ingeniería Ambiental
<b>ASESOR DE RESIDENCIA:</b>	Dr. René Sanjuan Galindo
<b>REVISORES:</b>	Biol. Rodolfo Nájera Sánchez Ing. Norma Aracely Vizcaíno Hernández

Cd. Guadalupe, N.L.

Febrero, 2017

## **DEDICATORIA**

A mi familia y amigos que creyeron en mí.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi asesor el Dr. René Sanjuan Galindo por apoyarme en todo este proceso y crear ese gusto por la investigación.

A mis compañeros de carrera que estuvieron en cada una de las asignaturas y mis compañeros de cubículo que me apoyaron para que pudiera avanzar.

A cada uno de los maestros que tuve en la carrera y a Roberto que me fue guiando en el trabajo dentro del laboratorio.

Este trabajo se desarrolló en los laboratorios del Centro de Investigación e Innovación Tecnológica y en la División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Nuevo León, es parte de un proyecto global denominado “Consolidación de la infraestructura científica y tecnológica para la exploración y explotación sustentable de hidrocarburos no convencionales, oil/gas shale en México”

Clave del Proyecto      FORDECYT - 245838

En este proyecto participan otras instituciones de los estados de Nuevo León y Tamaulipas.

Para desarrollar este trabajo, se contó con una beca de tesis que aportó el proyecto.



## RESUMEN

*Trichoderma harzianum* es el hongo caracterizado y es utilizado como medio de biocontrol para algunos fitopatógenos presentes en plantas de consumo humano. El análisis de su crecimiento aporta datos para su producción y posterior comercialización.

Se realiza un aislamiento de un hongo presente en una muestra de suelo, el cual es caracterizado genéticamente, además de ser analizado micro y macroscópicamente. A partir de esto se comienza con un ensayo cinético, lo que dará a conocer la tasa de crecimiento y la producción de biomasa de dicho hongo.

Utilizando tres diferentes medios de cultivo (PDA, ADS y AEM) se analiza el crecimiento en medio sólido donde se incuba a 30° C por 4 días monitoreando el crecimiento radial, presentando una mayor tasa de crecimiento en AEM. Mientras tanto se utiliza el Caldo Extracto de Malta en la producción de biomasa se incuba a 30° C y a 150 rpm, donde la mayor producción de biomasa se obtiene a partir de las 192 horas.

## ABSTRACT

*Trichoderma harzianum* is the fungus characterized and used as biocontrol agent for some phytopathogens in plants for human consumption. The analysis of its growth contributes for production and later commercialization.

Isolation of this fungus is carried out in a soil sample, which is genetically characterized, in addition to being micro- and macroscopically analyzed. From this, starts a kinetic test of the growth rate and biomass production for *Trichoderma harzianum*.

The use of three different culture media (PDA, ADS y AEM) is analyzed. The growth in a solid medium is incubated at 30° C for 4 days, monitoring the radial increase, presenting a higher rate of growth in AEM. In the meantime the Malt Extract Broth is used in the production of biomass being incubated at 30° C and at 150 rpm, where the highest biomass production is obtained after 192 hours.

## Contenido

RESUMEN .....	5
ABSTRACT .....	6
INTRODUCCIÓN .....	10
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA A RESOLVER .....	11
OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS .....	11
JUSTIFICACIÓN .....	12
1. REVISIÓN DE LITERATURA.....	13
1.1. Generalidades de los hongos.....	13
1.2. Características y crecimiento de <i>Trichoderma</i> .....	19
1.3. Estudios <i>in vitro</i> para <i>Trichoderma</i> spp. ....	20
1.4. Características de <i>Trichoderma harzianum</i> .....	26
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
2.1. Crecimiento <i>in vitro</i> en medio sólido.....	28
2.2. Crecimiento <i>in vitro</i> en medio líquido.....	29
3. RESULTADOS .....	30
3.1. Identificación molecular de la cepa de trabajo .....	30
3.2. Crecimiento de <i>T. harzianum</i> en medio sólido.....	30
3.3. Crecimiento de <i>T. harzianum</i> en medio líquido .....	33
3.4. Determinación de la tasa de crecimiento de <i>T. harzianum</i> .....	33
CONCLUSIONES .....	37
REFERENCIAS.....	38
ANEXOS.....	41

## **Índice de Figuras**

Figura 1.1 Estructura de un hongo filamentoso .....	16
Figura 1.2 Estructuras de los hongos.....	17
Figura 1.3 Diferencia entre conidióforos y esporangios .....	17
Figura 2.1 Inoculación por estría cruzada en PDA.....	27
Figura 3.1 Crecimiento de cepa aislada de <i>Trichoderma harzianum</i> en medio sólido .....	30
Figura 3.2 Muestra de <i>Trichoderma harzianum</i> en agar extracto de malta (AEM).....	31
Figura 3.3 Muestra de <i>Trichoderma harzianum</i> en agar dextrosa sabouraud (ADS).....	31
Figura 3.4 Muestra de <i>Trichoderma harzianum</i> en agar dextrosa y papa (PDA) .....	32
Figura 3.5 Fragmento de hifa septada (40x) en AEM.....	32
Figura 3.6 Hifas ramificadas de la cepa <i>T. harzianum</i> (40x) en AEM.....	32
Figura 3.7 Comparación de crecimiento micelial en agar dextrosa y papa (PDA), agar extracto de malta (AEM) y agar dextrosa sabouraud (ADS).....	33
Figura 3.8 Producción de biomasa de <i>T. harzianum</i> en medio líquido.....	34
Figura 3.9 Velocidad específica de crecimiento de <i>T. harzianum</i> en medio líquido .....	36

## Índice de cuadros

Cuadro 1.1 Comparación entre los distintos Reinos .....	13
Cuadro 1.2 Comparación de estudios de <i>Trichoderma</i> spp. <i>in vitro</i> .....	23

## INTRODUCCIÓN

La situación actual sobre el uso de químicos para eliminar algunos fitopatógenos en los alimentos ha contribuido a la problemática referente tanto a la naturaleza como a la salud humana. Por este motivo se ha buscado solucionar este problema a través de biocontroles los cuales son más amigables con el ambiente.

Algunos tipos de hongos son utilizados como biocontroles donde participan como antagonistas hacia algunos fitopatógenos. Este tipo de hongos tienen un gran valor comercial por lo que es necesario tener una amplia gama de información sobre su crecimiento y características antagónicas.

El género *Trichoderma* forma parte de este tipo de fungicidas ya que actúan como hiperparásitos competitivos y producen metabolitos antifúngicos. Este género es el más utilizado para el control de fitopatógenos y que dentro de él se encuentra *T. harzianum* que cual presenta la capacidad de adaptarse a distintos tipos de suelo, por lo que es considerado como uno de los mejores y más comerciales en su tipo. Para lograr una eficiente producción de *T. harzianum* es importante analizarlo desde su morfología y su tasa de crecimiento hasta su capacidad para producir biomasa. Por esta razón, en el presente trabajo se realiza un ensayo cinético in vitro de este hongo, iniciando por una caracterización genética y analizando su estructura tanto macroscópica como microscópica.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA A RESOLVER**

El uso de hongos como antagonistas de algunos fitopatógenos presentan una gran demanda en la actualidad debido a su capacidad de conservar algunas plantas libres de químicos y de los agentes que las atacan. Uno de estos hongos es *Trichoderma harzianum* el cual tiene un gran valor comercial, por lo que su producción es constante.

La problemática que se presenta es debido a cuáles son los medios de cultivo pertinentes para el mejor desarrollo de la cepa, así como incrementar su tasa de crecimiento.

## **OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS**

El objetivo general de este trabajo es evaluar la tasa de crecimiento del hongo *Trichoderma harzianum* en medio sólido y medio líquido, con la finalidad de realizar estudios posteriores sobre sus aplicaciones medioambientales.

Los objetivos específicos son:

- Realizar el aislamiento de la muestra y caracterización de la cepa encontrada.
- Cuantificar la producción de biomasa de *T. harzianum* para diferentes parámetros.
- Comparación gráfica de la tasa de crecimiento de *T. harzianum* entre diferentes medios de cultivo.

## JUSTIFICACIÓN

La búsqueda de soluciones a los problemas ambientales se ha dirigido a la biorremediación donde se utilizan plantas, hongos o microorganismos, así como las enzimas que estos generan con la finalidad de restaurar las áreas afectadas. Esta estrategia permite disminuir o eliminar por completo el uso de químicos que puedan alterar los procesos naturales de un ecosistema, donde los organismos utilizados eliminan o modifican los contaminantes por medio de la biodegradación.

Las especies de hongos pertenecientes al género *Trichoderma* se han utilizado como control biológico en áreas de cultivo pero también se ha comenzado a investigar sobre sus propiedades enzimáticas para la degradación de algunos compuestos contaminantes. El desarrollo de investigaciones sobre esta propiedad del género *Trichoderma* es reducido, en especial de *T. harzianum*, por esta razón este proyecto busca contribuir a dichas investigaciones para la producción de biomasa y conocer los parámetros adecuados para un óptimo crecimiento de la cepa.

# 1. REVISIÓN DE LITERATURA

## 1.1. Generalidades de los hongos

La micología es la rama de la biología que se encarga del estudio de los hongos. Apareció a partir de la necesidad de identificar las características de las setas y seleccionar las comestibles, pero tuvo un mayor avance después de la invención del microscopio, donde además de describir los macromicetos (estructuras visibles como las setas comestibles), se empezó a obtener información sobre los micromicetos (se incluyen los hongos acuáticos y el moho del suelo o alimentos). Esta ciencia es una de las más extensas y diversificadas, la cual va aportando avances significativos a la investigación científica y al desarrollo tecnológico. A partir del estudio de varias especies de hongos, se han podido asociar diversas enfermedades, se han aprovechado de manera nutricional y utilizado en otras aplicaciones (Uribarren *et al.*, 2015).

De acuerdo con Webster y Weber (2007) los hongos son organismos eucariotas pertenecientes al reino Fungi, poseen células donde sus cromosomas e información genética están dentro del núcleo. La mayoría de las especies de hongos presentan diversos núcleos ya que están divididos en muchas células, pero también existen especies microscópicas como las levaduras que solamente presentan un núcleo. Este reino presenta características que lo diferencian de los otros reinos (Cuadro 1.1).

**Cuadro 1.1 Comparación entre los distintos Reinos**

Reino	Características	Ejemplos de Organismos
Fungi	Organismos multicelulares, eucarióticos y heterótrofos. Poseen paredes celulares que contienen quitina. Realizan digestión externa secretando enzimas.	Hongos, setas, mohos y levaduras.

	Son organismos descomponedores que se adhieren al suelo o a otros organismos debido a sus filamentos.	
<b>Animal</b>	Organismos multicelulares eucarióticos (organelos con membranas) y heterotróficos (que ingieren).	Gusanos, esponjas, mamíferos, insectos, entre muchos otros.
<b>Plantae</b>	Organismos multicelulares eucarióticos autotróficos (producen alimento), poseen clorofila.	Helechos, pinos, plantas con flores, entre otros.
<b>Protista</b>	Organismos unicelulares y multicelulares de células eucarióticas. No tienen sistemas de órganos complejos.	Algas doradas, protozoarios, amibas, flagelados, entre otros.
<b>Eubacteria</b>	Conocidas como bacterias verdaderas, son procarióticas (organelos sin membrana). Son organismos microscópicos y casi todos unicelulares.	<i>Nitrosomas</i> , <i>Streptococcus</i> y <i>Oscillatoria</i> .

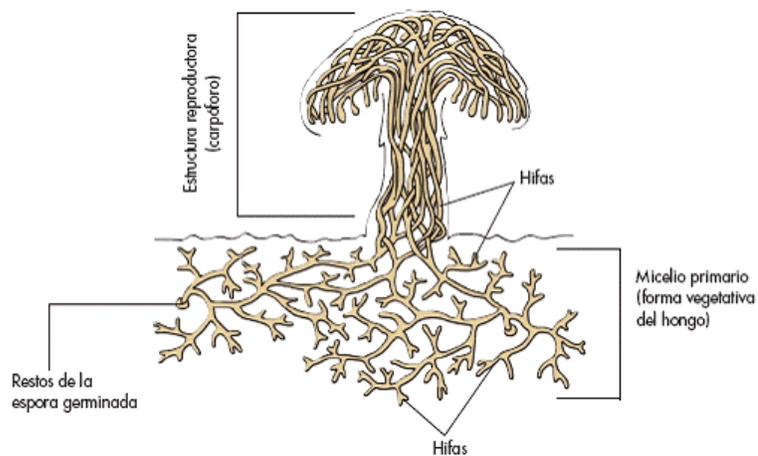
La alimentación de los hongos no es igual que la de las plantas, puesto que no producen clorofila ni pueden sintetizar su propio alimento, este tipo de organismos se denominan heterótrofos. Los hongos digieren del ambiente su alimento gracias a sus enzimas hidrolíticas llamadas exoenzimas que secretan al medio que los rodean. Las exoenzimas degradan las moléculas complejas de compuestos orgánicos para que los hongos puedan absorberlas y utilizarlas. (Cambel *et al.*, 2007)

Para poder llevar a cabo esto, se pueden clasificar en: saprobios (descomponen residuos orgánicos para alimentarse), parásitos (extraen las sustancias orgánicas de su hospedador) y los hongos simbióticos que extraen las sustancias orgánicas a su hospedador pero comparten ciertas ventajas (Popoff y Ferraro, 2009).

La hipótesis actual sobre la filogenia (desarrollo evolutivo de una especie) de los hongos presenta 5 linajes distintos. El primero de ellos representa a los hongos quitridios que viven en lagos o en el suelo, algunos son saprobios mientras que otros parasitan a plantas o animales. A un segundo linaje pertenecen los zigomicetos los cuales tienen muy diversos tipos de vida, se conoce cerca de mil especies de éstos. En este filo se incluyen mohos que son responsables de putrefacción de algunas frutas, otros zigomicetos viven como parásitos o como simbiontes comensales de animales.

Un tercer filo son los hongos glomeromicetos que tienen como particularidad introducirse a las células de las raíces de las plantas, donde cerca del 90% de éstas tienen esa asociación simbiótica con los glomeromicetos. En el cuarto y quinto linaje se encuentran los ascomicetos y basidiomicetos, el primero de ellos se encuentra en una variedad de hábitats marinos, de agua dulce y terrestres, su principal característica es la producción de esporas sexuales en sacos, entre ellos se incluyen algunos de los patógenos más devastadores de las plantas. Sin embargo muchos son saprobios importantes de sustancias vegetales. Los basidiomicetos son descomponedores importantes de la madera y de otras sustancias vegetales, por lo que son los mejores descomponedores de la lignina (polímero complejo de la madera) (Cambel *et al.*, 2007).

Los hongos se pueden diferenciar según sus estructuras: unicelulares (levaduras) o pluricelulares (filamentosos). Por lo general, el cuerpo de los hongos filamentosos es ramificado, cada uno de estos filamentos es llamado hifa, mientras que al conjunto de hifas se le denomina micelio. Otra característica importante dentro de los filamentos es la presencia o ausencia de septos, que son paredes transversales en las hifas (Figura 1.1).



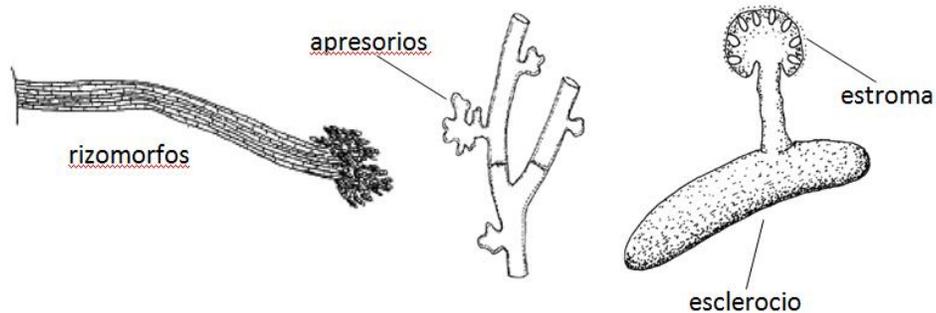
**Figura 1.1 Estructura de un hongo filamentoso**  
**Fuente:** <http://www.ual.es/GruposInv/myco-ual/vegetat.htm>

Lurá *et al.* (1997) mencionan que los septos también presentan una clasificación según sus características ya que pueden ser septos simples con un poro a ambos lados (ascomicetos) o septos con poros que presentan una prolongación (basidiomicetos). Cuando las hifas no están septadas se denominan cenocíticas. La pared celular de los hongos está conformada en su mayoría por quitina, lo que se diferencia con las plantas donde está conformada especialmente por celulosa. Esta sustancia es un polisacárido compuesto de nitrógeno, de estructura fuerte pero flexible, que se encuentra también en el esqueleto externo de los insectos y de otros artrópodos. Es el segundo polímero natural más abundante después de la celulosa. (Cambel *et al.*, 2007)

Además de la quitina también podemos encontrar algunas enzimas constituyentes de la pared lo cual ayuda al crecimiento de las hifas así como a la descomposición de la materia orgánica. Entre estas enzimas podemos encontrar peroxidasas, lacasas y celulasas, como la celobiosa deshidrogenasa (CDH).

La mayoría de las estructuras de los hongos están formadas por la agregación de hifas, según el acomodo de dichas hifas será el tipo de estructura vegetativa del hongo. Entre las estructuras más comunes se encuentran: rizomorfos (agregación paralela de hifas formando corteza y médula), esclerocios (masa redondeada y compacta de micelio endurecido que contiene reservas de alimento), apresorios

(hifas unicelulares laterales cortas y especializadas en la fijación en el sustrato), estromas (estructuras que dan soporte a los cuerpos reproductores), entre otras (Figura 1.2).

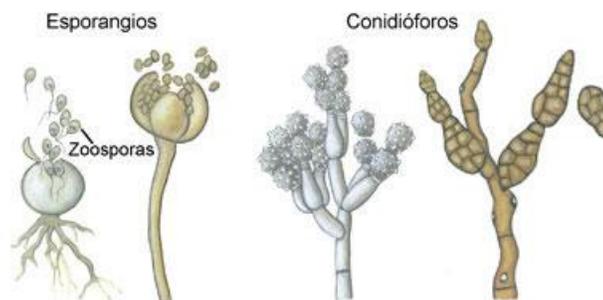


**Figura 1.2 Estructuras de los hongos**

Fuente: <http://www.plantasyhongos.es/hongos/Clavicipitaceae.htm>

La reproducción de este tipo de organismos puede presentarse de forma asexual o sexual. La fase de reproducción asexual es más rápida y se origina por diferentes formas como: la fragmentación del micelio, por gemación, con esporangios y mediante conidios. La primera de estas formas se da a través de un fragmento de la estructura del hongo o micelio, lo que dará lugar a un nuevo organismo. Esta es una de las formas de conservación más utilizadas en los laboratorios (Webster y Weber, 2007).

La gemación es cuando el organismo genera una protuberancia que al desprenderse forma otro individuo. Mientras tanto, mediante los conidios o esporangios, se generan esporas asexuales con la única diferencia que en los conidios son generadas de manera externa, mientras que en los esporangios son depositadas dentro de una estructura. (Figura 1.3)



**Figura 1.3 Diferencia entre conidióforos y esporangios**

Fuente: <http://unibio.unam.mx/>

La reproducción sexual en los hongos tiene como objetivo el intercambio genético y consta de una serie de procesos como la plasmogamia que consiste en la producción de órganos sexuales, formación de gametos y la fusión de éstos, después existe una fusión llamada cariogamia.

De acuerdo con Cambel *et al.*, (2007) los hongos influyen sobre otros organismos, entre ellos y en los seres humanos. En dichos seres pueden llegar a ser descomponedores, simbiotes, patógenos, como alimento y hasta antibióticos.

Como descomponedores llegan a afectar sustancias orgánicas como la celulosa y la lignina que pertenecen a las células vegetales. Algunos hongos pueden llegar a consumir cualquier sustrato con carbono, incluidos los combustibles y la pintura. Si no fuera por la acción de estos organismos, el carbono, nitrógeno y otros elementos quedarían atrapados en las sustancias orgánicas y no existir algunos de los ciclos biogeoquímicos.

Los hongos llegan a formar relaciones simbióticas con plantas, algas, cianobacterias y animales. Todas estas relaciones ejercen efectos en la ecología. En este aspecto se encuentran las micorrizas las cuales se encuentran en las plantas vasculares, quienes dependen de los hongos para adquirir sus nutrientes esenciales. También existe simbiosis con los animales donde los hongos prestan servicios digestivos ayudando a descomponer sustancias vegetales del intestino del ganado vacuno, además algunas hormigas crían hongos y se benefician del poder digestivo de éstos.

Como mencionan Cambel *et al.*, (2007): de las 100 000 especies de hongos conocidas, cerca del 30% viven como parásitos, los cuales llegan a ser plagas graves para la agricultura. Por otra parte, se conocen sólo 50 especies de hongos que parasitan al ser humano y a otros animales, pero esta cantidad puede causar un importante daño a dichos seres vivos. A las infecciones causadas por hongos se les denominan micosis.

El ser humano ha encontrado beneficios en ciertos hongos que son utilizados como alimento o para la generación de antibióticos. Como parte de los alimentos se encuentran las setas, también se utiliza el *Aspergillus* para la fabricación de ácido cítrico para algunas bebidas. Las levaduras y las trufas son otros tipos de hongos

que también consume el ser humano. Mientras que, para fines médicos, se utilizan algunos hongos los cuales producen antibióticos para el tratamiento de infecciones bacterianas, un ejemplo de esto fue el descubrimiento de la penicilina a partir del moho *Penicillium*.

## 1.2. Características y crecimiento de *Trichoderma*

Las especies del género *Trichoderma* representan un grupo de hongos filamentosos donde su clasificación taxonómica, de acuerdo a la NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (2015), es:

<b>SÚPER REINO</b>	<i>Eukaryota</i>
<b>REINO</b>	<i>Fungi</i>
<b>SUBREINO</b>	<i>Dikarya</i>
<b>FILUM</b>	<i>Ascomycota</i>
<b>SUBFILUM</b>	<i>Pezizomycotina</i>
<b>CLASE</b>	<i>Sordariomycetes</i>
<b>SUBCLASE</b>	<i>Hypocreomycetidae</i>
<b>ORDEN</b>	<i>Hypocreales</i>
<b>FAMILIA</b>	<i>Hypocreaceae</i>
<b>GÉNERO</b>	<i>Trichoderma</i>

Los hongos pertenecientes al género *Trichoderma* se pueden encontrar en la rizosfera, donde compiten por nutrientes y espacio con otros microorganismos. Este tipo de hongos predominan en los ecosistemas terrestres, tienen una alta capacidad reproductiva y sus requerimientos nutrimentales son pocos donde su crecimiento es favorecido con una humedad y temperatura óptimas que se encuentran en un rango de 25 a 30 °C. No se conocen especies de *Trichoderma* que afecten a las plantas, solamente toma nutrientes de los hongos fitopatógenos a los que degrada y de materiales orgánicos, por este motivo es beneficioso para la agricultura (Papavizas, 1985, Argumedo *et al.*, 2009).

### **1.3. Estudios *in vitro* para *Trichoderma* spp.**

Según Webster y Weber (2007), los hongos del género *Trichoderma* spp. pueden encontrarse en cualquier parte del mundo, así mismo, son los más dominantes y con un crecimiento más rápido cuando son aislados en placas con medio sólido. Un estudio sobre el crecimiento de *Trichoderma longibrachiatum* (Tang *et al.*, 2003) demuestra que utilizando como medio de cultivo el agar papa y dextrosa (PDA) se presentó un crecimiento de 60mm de radio después de 65h a 35°C y de 55mm a 30°C, este estudio muestra la diferencia de crecimiento por efecto de la temperatura, donde en la primera no se observa ninguna pigmentación, mientras que a los 30°C se observa una leve pigmentación amarilla. En su análisis microscópico las fiálides se mostraban de forma cilíndrica mientras que las conidias eran de forma elipsoidal con medidas de 3.5 a 5 µm de largo y de 2.5 a 3 µm de ancho. Hay presencia de clamidosporas, las cuales son las esporas de paredes gruesas que aparecen cuando el ciclo de vida del hongo se ve en condiciones secas o cálidas. Son el resultado de la reproducción asexual de los conidios. Dichas clamidosporas presentaban de 6 a 10 µm de largo y de 3 a 5 µm de ancho.

Por otra parte, Samuels *et al.* (s.f.) mencionan que el crecimiento más rápido de *Trichoderma* spp. se da entre los 25 y 30° C, mientras que a los 35°C por lo general no se observa crecimiento. Utilizando agar dextrosa de harina de maíz (CMD) el hongo es transparente, mientras que en PDA es de color blanco. En CMD no se observa fácilmente el micelio, dando lugar a conidióforos después de una semana con una coloración verde o amarilla. Por otra parte, en PDA, se muestra una coloración amarilla desde el inicio de su crecimiento y, de igual manera, los conidióforos aparecen de color verde o amarilla.

Los conidióforos muestran una gran cantidad de ramificaciones. Forman aros concéntricos a lo largo de las hifas aéreas, lo cual mejorará la dispersión de esporas. Las ramas principales de estos conidióforos producen otras ramas laterales que pueden presentarse en parejas o no. Todas estas ramas surgen cerca de los 90° respecto al eje principal (Samuels *et al.*, s.f.).

Comúnmente los conidióforos terminan en algunas fiálides, las cuales se agrandan en el medio siendo de forma cilíndrica. Las fiálides pueden estar agrupadas en el

eje principal (ej. *T. polysporum*, *T. hamatum*) o pueden ser solitarias (ej. *T. longibrachiatum*).

Mientras tanto Richter *et al.* (1999) utilizaron un agar de hojuelas de papa elaborado de forma casera y agar dextrosa sabouraud para determinar el crecimiento y las características de *Trichoderma*. Cada uno de los medios de cultivo se incubó en 25, 35 y 42°C, encontrando que hubo un crecimiento adecuado en cada una de las temperaturas. Las colonias aisladas eran inicialmente lisas, translúcidas y blancas pero rápidamente fueron tornándose de color verde claro a verde oscuro, dando lugar a un patrón radial de conidióforos los cuales tienen como función la producción de esporas llamadas conidios a través de una producción asexual. Los conidióforos se localizan en el extremo de las hifas las cuales, al ser analizadas microscópicamente, son septadas y ramificadas y portaban conidióforos con grandes ramificaciones.

En este caso se encontró que las fiálides llegaban a medir hasta 14 µm de largo, mientras que las fialoconidias tenían medidas de 3.4 a 6.4 µm de largo y 2.4 a 3.0 de ancho. A partir de las características observadas se pudo catalogar al *Trichoderma* dentro de la sección *Longibrachiatum*, lo cual fue confirmado a través de un análisis ribosomal.

Las conidias usualmente aparecen de forma seca pero en algunas especies llegan a formar gotas verdes o amarillas. Por lo general son de forma elipsoidal con medidas entre 3 y 5 µm de largo y de 2 a 4 µm de ancho. En algunos casos las conidias son lisas, mientras que en otros pocos casos llegan a tener protuberancias (Samuels *et al.*, s.f.).

Según Astudillo (1999) el número total de conidias producidas por *T. harzianum* es inversamente proporcional a la concentración de la fuente de carbono. Cuando la concentración de carbono superior a los 50 g/l, la producción de conidias disminuye, mientras que cuando la concentración de carbono es menor la producción se eleva. Como cita Cruz (2007) la mayoría de las especies del género *Trichoderma* llegan a presentar mayor esporulación al ser expuestas a la luz, por lo que son fotosensibles. Cuando se someten a períodos de luz y oscuridad se ve favorecida

la colonización del hongo sobre los sustratos sólidos. La exposición a la luz de los cultivos en agar de 20 a 30 es suficiente para inducir la esporulación.

Otros factores que afectan en gran medida el crecimiento del género *Trichoderma* son la salinidad y el pH. El crecimiento de *Trichoderma* se inhibe con altas concentraciones de sales, aproximadamente 80 g/l, llega a tolerar hasta una concentración de 60 g/l pero esto puede ocasionar mutaciones afectando el proceso de esporulación (Moore, 1996). Por otra parte este género tiene un rango de pH en valores que van entre los 2.0 y 9.0, pero con su crecimiento óptimo se encuentra entre los valores de pH de 4.0 y 7.0.

El género *Trichoderma*, debido a sus propiedades de biocontrol, se ha analizado a partir de la biomasa que genera (Chand *et al.*, 2014). Esto se realiza en medios de cultivo líquido, este autor menciona el uso de 100ml de caldo dextrosa y papa (PDB), así como el caldo Czapek-Dox (CCD), ambos caldos fueron inoculados con círculos de micelio de 5 mm de diámetro e incubados por 15 días a temperatura ambiente. La biomasa producida después de esos 15 días fue estimada a través de su peso. En cuanto al cultivo en PDB se produjo en promedio 96.30 g de biomasa, mientras que en CCD se produjeron 90.38 g.

Otra forma de análisis de crecimiento es a partir de la encapsulación de conidias donde se hace una suspensión con un inóculo específico de conidios. Mancera *et al.* (2016), realizan una suspensión de 40 µl de inóculo de conidias mezcladas con 50 ml de alginato de sodio al 2% y una solución gelificante de cloruro de calcio de 0.1 mL. Este encapsulado fue inoculado por duplicado en 100 ml de PDB e incubado a 30° C y 150 rpm por 48 h. La solución fue contenida en un reactor Airlift operado a una temperatura ambiente y alimentado con un flujo de aire esterilizado de 2 kg cm<sup>-2</sup>. Se fueron extrayendo muestras del cultivo de 10 ml cada 24 h para el conteo de las conidias liberadas. Este proceso produjo cápsulas con medidas entre 1.45 y 2.7 mm. A partir de esto se realizó un conteo donde la máxima producción de conidias encapsuladas se dio a los 9 días con 4.7x10<sup>7</sup> conidias por mililitro, mientras que las conidias libres llegaron a 3.6x10<sup>8</sup>.

Los anteriores análisis de crecimiento se realizaron debido a la gran utilidad que tiene el género *Trichoderma* como biocontrol. Este grupo fúngico, como mencionan

Argumedo *et al.* (2009), contribuye a las plantas en el control de hongos fitopatógenos ya que se ha detectado que poseen propiedades micoparasíticas y antibióticas. Por este motivo algunas especies han sido catalogadas como excelentes agentes de control biológico. La cepa de *Trichoderma harzianum* es la más utilizada de forma comercial para el control biológico, seguida por *Trichoderma viride* y *T. polysporum*.

El antagonismo a los patógenos de algunos cultivos puede estar asociado con el enrollamiento de *Trichoderma* alrededor de la hifa del huésped, seguido por la penetración y el parasitismo. A partir de este género también se pueden producir antibióticos y anitimicóticos volátiles y no volátiles (Webster y Weber, 2007). A este fenómeno se le denomina micoparasitismo.

**Cuadro 1.2 Comparación de estudios de *Trichoderma* spp. *in vitro***

Cepa de estudio	Variables de estudio	de	Resultados	Referencia
<i>T. longibrachiatum</i>	Cultivo en PDA a 30 y 35°C durante 65 h por medio de solución de esporas.		Radio de 55 mm a 30°C y de 65 mm a 35°C	Tang <i>et al</i> , 2003
<i>Trichoderma</i> spp.	Siembra en medio sólido con agar CMD y PDA, análisis de características físicas.		El crecimiento más rápido se observó en los 25 y 30°C. En 35°C disminuyó la velocidad de crecimiento. En CMD no existió coloración del hongo (transparente) mientras que en PDA la coloración del hongo es blanca o amarilla. Los conidióforos tuvieron una coloración verde o amarilla en ambos medios.	Samuels <i>et al.</i> , s.f.
<i>T. longibrachiatum</i>	Cultivo en medio sólido con agar de hojuelas de papa y		Incubación a 25, 35 y 42°C, la coloración inicialmente era	Ritcher <i>et al.</i> , 1999

	agar dextrosa sabouraud. Determinación de características de <i>Trichoderma</i> .	translúcidas y blancas, tornandose de color verde claro a verde oscuro con un patrón radial de conidióforos.	
<i>Trichoderma spp.</i>	Cultivo en medio sólido con PDB y CCD con un micelio de 5 mm de diámetro, incubado por 15 días a temperatura ambiente. Estimación de la producción de biomasa a través de su peso.	El cultivo en CDP se produjo un promedio de 96.30 g de biomasa, mientras que en el CCD se produjeron 90.38 g.	Chand <i>et al.</i> , 2014
<i>Trichoderma spp.</i>	Análisis del crecimiento a partir de la encapsulación de conidias en una suspensión, utilizando un reactor Airlift a temperatura ambiente y con un flujo de aire esterilizado.	Producción de cápsulas con medidas entre 1.45 y 2.7 mm. El conteo de conidias encapsuladas fue de $4.7 \times 10^7$ conidias por mililitro y las conidias libres llegaron a $3.6 \times 10^8$ .	Mancera <i>et al</i> (2016)

Algo que también se ha relacionado con el biocontrol de hongos patógenos vegetales y por su papel en la ruptura de las paredes celulares de los patógenos es la capacidad de *Trichoderma spp.* de secretar algunas enzimas como la glucanasa y quitinasas (citado por Paredes, 2011).

De esta manera, los miembros del género *Trichoderma* tienen el potencial de sintetizar y liberar enzimas como polisacaridasas, celulasas, xilanasas y quitinasas, las cuales se han aprovechado en procesos industriales. También, las especies del género *Trichoderma* pueden producir diversos metabolitos secundarios dentro de los que se encuentran algunas toxinas como la gliotoxina y hormonas de crecimiento como auxinas y giberelinas. Estas enzimas y metabolitos se manejan de manera

comercial para para producir detergente de ropa, aceite de oliva, vino, cerveza, jugos, alimentos para animales y en la producción de algunos combustibles

Estos procesos generados por las especies de *Trichoderma* resaltan la importancia que tienen para la industria así como para la producción de alimentos. A partir de esto ha comenzado a estudiarse la capacidad de dicho género para degradar algunos contaminantes de compuestos orgánicos e inorgánicos.

La mayoría de los miembros del género *Trichoderma* son conocidos por su capacidad de paralizar a otros hongos, por lo general fitopatógenos. Esta cualidad ha sido analizada y desarrollada como medio de biocontrol para disminuir los hongos que afectan a la agricultura. Infante *et al.* (2009) mencionan que los mecanismos de acción del biocontrol por parte de *Trichoderma* son la competencia por espacio y nutrientes, el micoparasitismo y la antibiosis, los cuales tienen una acción directa frente a los hongos fitopatógenos.

La competencia que existe entre *Trichoderma* y algunos hongos se define como el comportamiento desigual ante un mismo requerimiento, en este caso por sustrato o nutrientes, donde *Trichoderma* logra reducir la cantidad o el espacio disponible para el fitopatógeno. La presencia de este género de hongos en diferentes suelos hace constar de su capacidad como excelente competidor.

Otro mecanismo de acción utilizado por *Trichoderma* es el parasitismo el cual es definido como una "simbiosis antagónica entre organismos, en el que generalmente están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas, y que se corresponden con la composición y estructura de las paredes celulares de los hongos parasitados" (Infante *et al.*, 2009). Este mecanismo de acción consta de cuatro etapas distintas: el crecimiento quimiotrófico (crecimiento directo hacia un estímulo químico) donde *Trichoderma* detecta la localización del hospedante y sus hifas crecen en dirección a éste; el reconocimiento molecular entre *Trichoderma* y su hospedante; adhesión y enrollamiento de las hifas alrededor de las hifas del fitopatógeno; y la actividad lítica donde se producen las enzimas extracelulares (quitinasas, glucanasas y proteasas) que degradan las paredes celulares del hospedante.

#### 1.4. Características de *Trichoderma harzianum*

*Trichoderma harzianum* es un hongo antagonista de patógenos vegetales, y se encuentra presente en la mayoría de los suelos. Su crecimiento se ve favorecido por la presencia de raíces de plantas, a las cuales coloniza rápidamente. Además posee una gran cantidad de enzimas hidrolíticas y quitinolíticas las que le confieren la capacidad para establecer relaciones de parasitismo y simbiosis con microorganismos y plantas. (Rodríguez y Gato, 2010)

Este hongo se caracteriza por tener al inicio un color blanco, que se va tornando a verde oscuro o amarillento, con densa esporulación. El micelio es fino, los conidióforos son ramificados, y muestran hifas septadas. Estos terminan en fiálides donde se forman las esporas asexuales o conidios, de gran importancia para la identificación taxonómica a nivel de especies. Son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucanos.

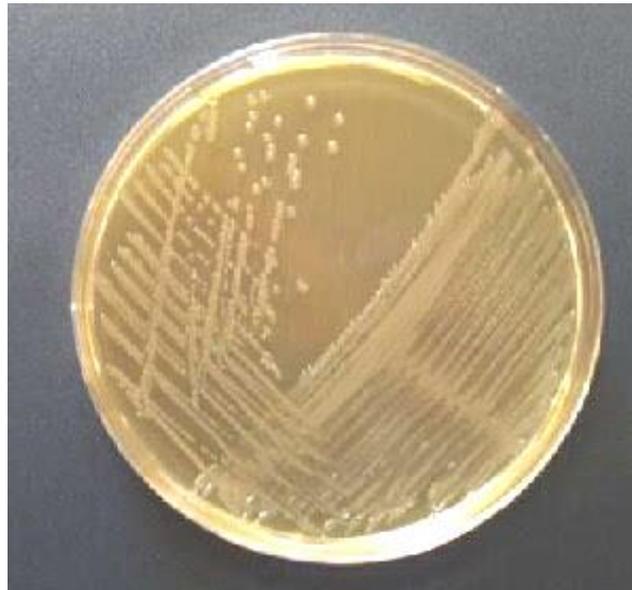
En los ensayos en laboratorio sobre *T. harzianum* se ha detectado que tiene la capacidad de proteger las raíces de enfermedades causadas por *Pythium*, *Rhizoctonia* y *Fusarium* y permite el crecimiento de raíces más fuertes y por lo tanto, sistemas radiculares más sanos. También aumenta la capacidad de captura de nutrientes y de humedad, así como mejora rendimientos en condiciones de estrés hídrico. Además algunas de las enzimas producidas por este hongo (endoquitinasa y quitobiosdasa) atacan al patógeno, especialmente inhibiendo la quitina de su pared celular.

De acuerdo con Rey et al., (2000): el antagonismo del *T. harzianum* se debe a su constante presencia en distintos tipos de suelo, a su facilidad para ser aislada y cultivada, a su crecimiento y a que no atacan a plantas superiores. Este género desplaza a los fitopatógenos por medio de la competencia directa por el espacio o por los nutrientes, por su producción de metabolitos antibióticos y por el parasitismo directo sobre el hongo fitopatógeno. Estos mecanismos de desplazamiento no son excluyentes sino que actúan de forma colaborativa en el control de los patógenos.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

La primera fase de este proyecto consistió en aislar una muestra de suelo recolectada en el camino al Cerro de “La Silla” en una zona boscosa, ubicada en Guadalupe, Nuevo León, en dicha muestra se podía observar el crecimiento del micelio del hongo. Se realizaron varias siembras de la muestra en diferentes medios de cultivo para comparar el crecimiento de las colonias. Los medios utilizados fueron: agar papa y dextrosa, agar dextrosa sabouraud y agar extracto de malta.

A partir de esto se seleccionó el Agar Papa y Dextrosa donde, a través de la técnica de estría cruzada, se inició el aislamiento de la cepa. Esta técnica consiste en realizar varias estrías a la caja de forma perpendicular donde, según Olivas (2004), la siembra por estría cruzada permite aislar los microorganismos que van a crecer de manera separada para después realizar una siembra en un nuevo medio para obtener un cultivo puro (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) .



**Figura 2.1 Inoculación por estría cruzada en PDA**

Las cajas Petri con las siembras se colocaron en una incubadora durante 5 días a una temperatura de 30° C. Esto permitió la recuperación de las células del micelio deseado.

A partir de las 24 horas de incubación se comenzó a observar un crecimiento de micelio en las estrías realizadas. La colonia se mostraba filamentosa a partir de las 72 horas y con estructuras radiales de color blanco.

Al haber aislado adecuadamente se realizaron nuevas siembras en el mismo medio de cultivo donde se colocó un pequeño fragmento de la cepa aislada en el centro de las cajas Petri. De igual manera se llevaron a la incubadora a una temperatura de 30°C.

## **2.1. Crecimiento *in vitro* en medio sólido**

La segunda fase se realizó a partir de una colonia pura del hongo que se utilizó como inóculo para realizar el ensayo cinético del crecimiento *in vitro* en medio sólido. Se utilizaron diferentes medios de cultivo para conocer las características macroscópicas microscópicas del micelio. Se prepararon medios sólidos en cajas Petri y se utilizaron los medios: agar Papa y Dextrosa (PDA), agar Dextrosa Sabouraud (ADS) y el agar Extracto de Malta (AEM). Cada caja Petri fue preparada con 10 ml del medio correspondiente.

Solo una de las cajas fue seleccionada para su resiembra tomando como inóculo muestras de 1 cm de lado. Cada uno de esos cuadros se colocó en el centro de las nuevas cajas Petri para su crecimiento. Las cajas inoculadas fueron colocadas en la incubadora con una temperatura constante de 30°C y se fueron tomando las mediciones del radio cada 12 horas en 4 puntos distintos de la caja.

La cepa de *T. harzianum* se observó en un microscopio de contraste de fases Lx 500 Trinocular LABOMED. Para registrar las imágenes de forma digital se utilizó una cámara Dino-Eye y el software de la misma (DinoCapture 2.0).

## 2.2. Crecimiento *in vitro* en medio líquido

La tercera fase del proyecto consistió en la cuantificación por peso seco de la producción de biomasa en medio líquido en matraz agitado. Esto se llevó a cabo esterilizando 22 matraces conteniendo 50 ml de caldo extracto de malta (CEM). Después de esterilizar y dejar en reposo los medios para que llegaran a la temperatura ambiente, fueron inoculados con muestras sólidas de PDA de tamaño de 1 cm por lado. Los matraces inoculados, los cuales se colocaron en una incubadora orbital a una temperatura de 30° C y a 150 rpm.

La medición de la producción de biomasa en medio sólido se realizó cada 24 horas donde se hacía pasar la muestra por un papel filtro para retener la biomasa producida. Para realizar esto se comenzó por dejar el papel filtro a secar durante 72 horas en la estufa con una temperatura de 50° C. Al pasar ese tiempo se colocaban los papeles en el desecador con sílica gel durante diez minutos y después se procedía a tomar el peso de cada uno.

A continuación se elegían dos matraces cada 24 horas para medir la producción de biomasa. El medio de cultivo se hacía pasar por el papel filtro para separar el caldo de la biomasa, también se agregaba agua destilada al matraz para que no quedaran restos de la biomasa a analizar.

Después de esto se colocaban los papeles filtro en la estufa a 50° C donde se dejaban secar y se iba tomando cada 24 horas el peso en seco hasta observar que no existieran variaciones. Este paso se repetía aproximadamente 4 días que era el tiempo donde ya se evaporaba todo el caldo que se encontraba en el papel filtro y se podía pesar únicamente la biomasa.

Esto se realizó con los 22 matraces, donde se inició con un tiempo 0 para calcular el peso del inóculo inicial y así poder comparar la biomasa que se iba produciendo al paso del tiempo. Por lo tanto, después de eliminar esos 2 matraces de tiempo 0, resultaban 10 parejas de matraces lo que es igual a 10 mediciones de 24 horas de diferencia.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Identificación molecular de la cepa de trabajo

A la cepa de trabajo se le realizó la identificación molecular mediante la purificación de secuencias en el laboratorio de la facultad de Ciencias Químicas de la UAC. Los resultados que se obtuvieron de la comparación en el NCBI determinaron una homologación al 100% con el hongo *Trichoderma harzianum*.

#### 3.2. Crecimiento de *T. harzianum* en medio sólido

El crecimiento del hongo en medio sólido se caracterizó por ser radial, se observaron filamentos de color blanco (Figura 3.1). Al permanecer 7 días más en incubación, se observó en las placas de agar la formación de anillos con coloración café y verde oscuro. Estas siembras fueron las que se utilizaron para partir de ellas durante todo el ensayo cinético de crecimiento *in vitro* en medio sólido.



**Figura 3.1 Crecimiento de cepa aislada de *Trichoderma harzianum* en medio sólido**

Las características macroscópicas que presentan cada uno de los agares fueron muy diferentes. En el AEM se observó un crecimiento radial donde la cepa se mostraba filamentososa y en su mayoría de color blanquecina, hubo presencia de anillos concéntricos de color verde pero no estaban muy bien definidos debido a los filamentos presentados (Figura 3.2).

En cuanto al ADS se observan anillos concéntricos con mayor definición y de un color verde más oscuro (Figura 3.3). Por último, con el PDA también tuvo un crecimiento radial donde cubrió la caja en 60 horas, esta muestra se observó de color blanco y la coloración verde no se presentó (Figura 3.4).



Figura 3.2 Muestra de *Trichoderma harzianum* en agar extracto de malta (AEM)

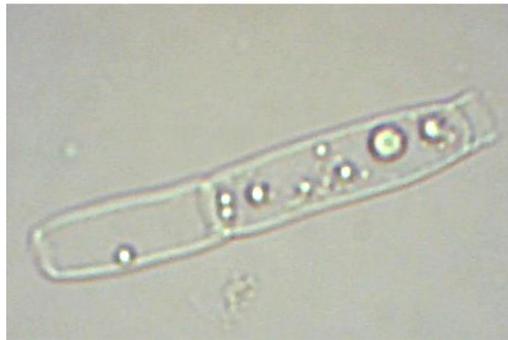


Figura 3.3 Muestra de *Trichoderma harzianum* en agar dextrosa sabouraud (ADS)



**Figura 3.4 Muestra de *Trichoderma harzianum* en agar dextrosa y papa (PDA)**

En las imágenes al microscopio se pudo observar la presencia de micelio compuesto por hifas septadas, que muestran en su interior algunas estructuras y esporas (Figura 3.5 y Figura 3.6). Por lo observado se pudo deducir que las hifas son generativas formando un sistema monomítico ya que presentan hifas ramificadas, septadas y con paredes delgadas.



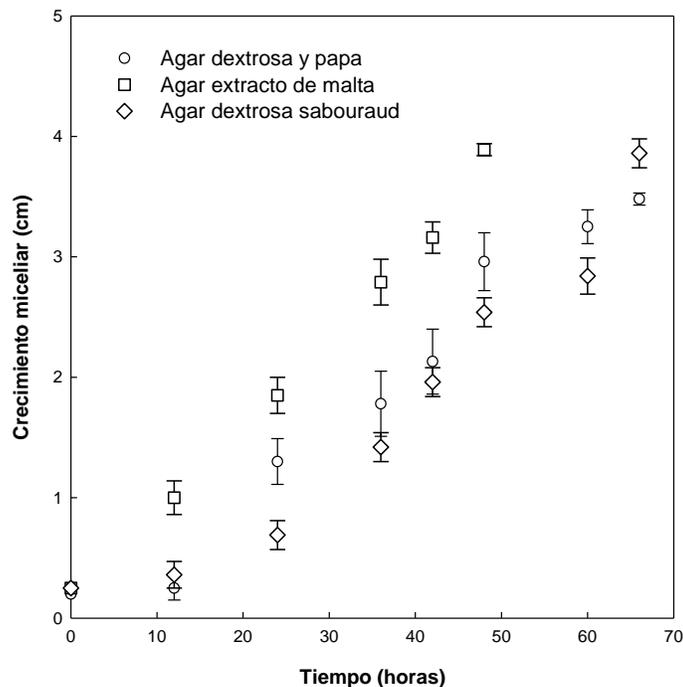
**Figura 3.5 Fragmento de hifa septada (40x) en AEM**



**Figura 3.6 Hifas ramificadas de la cepa *T. harzianum* (40x) en AEM**

En cuanto al medio sólido se pudo detectar que la mejor tasa de crecimiento detectada fue en el agar extracto de malta, en 48 horas cubrió por completo la

superficie de la caja. Mientras que el ADS necesitó 60 horas para completar los 4 cm de radio y el PDA, en ese tiempo, llegó a completar 3.8 cm de radio (Figura 3.7). Guigón *et al.* (2010) reportaron la tasa de crecimiento de una cepa de *Trichoderma* spp. un promedio de 17 mm/d, donde se tomó en cuenta el parámetro de temperatura (25° C), utilizando PDA como medio de cultivo. Podemos rescatar que el experimento realizado en este proyecto tiene una mayor tasa de crecimiento (19 mm/d).



**Figura 3.7 Comparación de crecimiento micelial en agar dextrosa y papa (PDA), agar extracto de malta (AEM) y agar dextrosa sabouraud (ADS)**

### 3.3. Crecimiento de *T. harzianum* en medio líquido

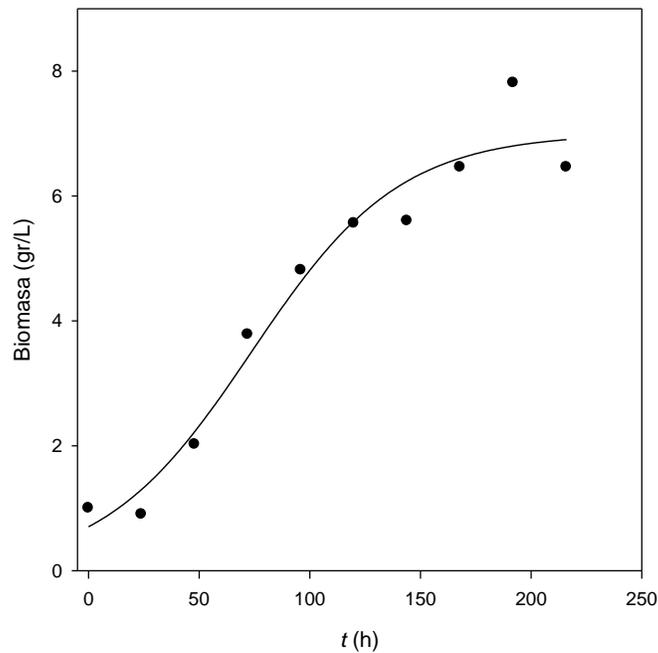
La producción de biomasa de *T. harzianum* en medio líquido se observó a partir de las 48 horas, el inóculo fue duplicando su tamaño hasta que hubo desprendimiento de partículas, las cuales llevaron a la formación de pellets. Dichos pellets también tuvieron el mismo proceso de aumento de tamaño y formación de otros pellets.

### 3.4. Determinación de la tasa de crecimiento de *T. harzianum*

En el análisis de la producción de biomasa se observó que la mayor producción se alcanzó en 192 horas con 7.81 gr. En la curva es posible identificar, en los datos

experimentales, que la fase de adaptación se encuentra en las primeras 25 horas, después se observó una fase exponencial (posterior a la hora 25 y hasta la hora

$$X = \frac{a}{1 + e^{\left(-\frac{t-t_0}{b}\right)}} \quad (Ec. 1)$$



**Figura 3.8 Producción de biomasa de *T. harzianum* en medio líquido**

92). Finalmente se observa una fase estacionaria. El experimento se realizó por 216 horas (Figura 3.8).

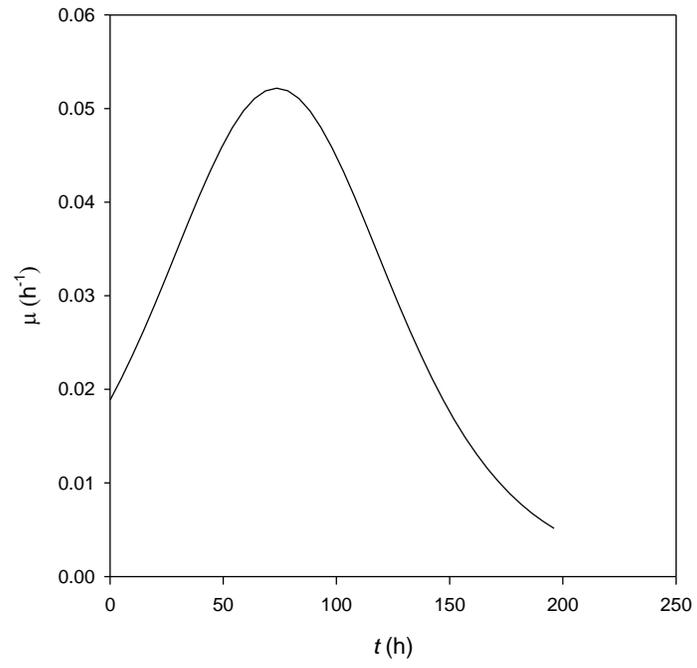
En la Figura 3.8 se muestra el promedio de las mediciones experimentales de la biomasa en base seca en función del tiempo. El mejor ajuste de la dispersión de datos es de acuerdo al modelo sigmoideal de 3 parámetros (Ec. 1), donde  $a= 7.0013$ ,  $b=33.5532$ ,  $t_0= 73.6165$ ,  $X$  y  $t$  representan a la biomasa producida (gr/L ) y al tiempo (h), respectivamente, con un ajuste de correlación  $r^2=0.9604$ .

Fernández (2014) menciona que la velocidad específica de crecimiento es el parámetro que relaciona el cambio de concentración de biomasa en función del tiempo, donde se mide la capacidad de generación de biomasa que tiene cada

unidad de biomasa. En otros términos, mide la cantidad de gramos de biomasa que es capaz de generar cada gramo de biomasa fresca en la unidad de tiempo. Se expresa con la letra  $\mu$  y tiene dimensiones de inverso del tiempo como  $\text{h}^{-1}$ .

La función que describe la velocidad específica de crecimiento está determinada por la derivada  $dx/dt$ . Es decir, se resuelve la derivada de la ecuación de la producción de biomasa en función del tiempo y se presenta en función de la biomasa ( $1/x$ ) (Ec. 2). La gráfica de la ecuación se presenta en la Figura 3.9, se encontró que la mayor velocidad específica de crecimiento tiene un valor de  $\mu_{\text{max}} = 0.052170699 \text{ h}^{-1}$  encontrándose en un tiempo de 73.6 h. La curva mostrada representa la rapidez de crecimiento a lo largo del cultivo. En términos gráficos, representa la pendiente de la curva mostrada en la Figura 3.8. Aunque hay generación de nuevas células de hongo todo el tiempo que duró la incubación del cultivo, la tasa de crecimiento no es constante pues depende de varios factores como es la disponibilidad de sustrato en el medio y la densidad celular.

$$\bar{\mu} = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt} = \frac{1}{x} \cdot \frac{ae^{\frac{x+x_0}{b}}}{b(e^{\frac{x}{b}} + e^{\frac{x_0}{b}})^2} \quad (\text{Ec. 2})$$



**Figura 3.9 Velocidad específica de crecimiento de *T. harzianum* en medio líquido**

## CONCLUSIONES

El aislamiento y caracterización adecuados de la cepa permitieron que se pudieran establecer parámetros adecuados a su especie, un ejemplo de esto fue la temperatura a la que presentan un mejor crecimiento y los medios de cultivo pertinentes. A partir de esto se presentaron resultados del crecimiento en medio sólido y en medio líquido de *Trichoderma harzianum*, los datos del crecimiento en medio líquido se ajustaron a un modelo sigmoideal. De esta forma se pudo evaluar la tasa de crecimiento del hongo y la velocidad específica del mismo.

Un aspecto que se debe evaluar en futuras investigaciones es la cuantificación de la producción de biomasa de *T. harzianum* para diferentes parámetros.

El presente ensayo cinético permitió conocer la capacidad de producción de biomasa y crecimiento de *Trichoderma harzianum*, lo cual proporciona datos específicos al momento de buscar su reproducción de la manera más eficiente para sus aplicaciones medioambientales

## REFERENCIAS

- Argumedo, R., Alarcón, A., Ferrera, R., & Peña, J.. (2009). El género fúngico *Trichoderma* y su relación con los contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 25(4), 257-269.
- Astudillo, M., Blanco, B. 1999. Establecimiento de los parámetros de producción semi-industrial del hongo *T. harzianum*, utilizado en control biológico. Tesis de pregrado. Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.
- Ávila, G., Woo, S., Guigón, C., Lanzuise, S., Bravo, L., Ruocco, M., Vargas, F., Lorito, M., Guerrero V., & Carvajal, E. (2010). Identificación Molecular de Cepas Nativas de *Trichoderma* spp. su Tasa de Crecimiento *in vitro* y Antagonismo contra Hongos Fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 28() 87-96.
- Cambel, N., Reece, J. & Cwi, S. . (2007). Biología. España: Médica Panamencana. Cruz, L. 2007. Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma konigii* Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Tesis de pregrado. Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.
- Chand, K., Babu, A., Bordoloi, M., Ali, A., (2014) Evaluation of Culture Media for Biomass Production of *Trichoderma viride* (KBN 24) and their Production Economics. *American Journal of Agriculture and Forestry*. Vol. 2, No. 6, pp. 317-320. doi: 10.11648/j.ajaf.20140206.24
- Durán, M., García, R. & Riera, R., Producción de biomasa de trichoderma *harzianum* por fermentación líquida Fitosanidad [en línea] 2006, 10 (Diciembre-Sin mes) Ezziyyani, M., Pérez, C., Ahmed, A., Requena, M. & Candela, M.. (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.). *Anales de biología*, 26, 35-44.
- Fernández, J.. (2014). Ingeniería de Procesos aplicada a la Biotecnología de Microalgas. febrero 9, 2017, de Universidad de Almería Sitio web: <http://www.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-1---generalidades/1-4-crecimiento-y-productividad.html#>
- Gomes, D., Corrêa, S., Minaré, L., Pádua, R., Mello, M., Ávila, Z., (2007). CEPAS DE *TRICHODERMA* SPP. PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE *SCLEROTIUM ROLFSII* SACC.. *Fitosanidad*, Marzo-Sin mes Harman, G.. (2000). Changes in Perceptions Derived from Research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant disease*, 84, pp. 377-393.
- Howell, C.. (2003). Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant disease* , 87, pp. 4 - 10.

- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). MECANISMOS DE ACCIÓN DE *Trichoderma* FRENTE A HONGOS FITOPATÓGENOS. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), 14-21.
- Kishor, C., Azariah, B., Mitali, B., & Ashif, A. Evaluation of Culture Media for Biomass Production of *Trichoderma viride* (KBN 24) and their Production Economics. *American Journal of Agriculture and Forestry*. Vol. 2, No. 6, 2014, pp. 317-320.
- Lurá, M., González, A., Basílico, J., Sarsotti, P., Gómez, R., & Freyre, L. . (1997). Introducción al estudio de la micología. Argentina: UNL.
- Mancera, M., Izquierdo, W., Ríos, E., & Barrera, J.. (2016). Evaluación de la capacidad de propagación de conidios encapsulados de *Trichoderma harzianum* en reactor Airlift. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 3(2), 195-202.
- Moore, E. 1996. *Fundamentals of Fungi*. Fourth edition. Prentice Hall. New Jersey. 574pp
- Olivas, E. & Alarcón, L. . (2004). Manual de prácticas de microbiología básica y microbiología de alimentos. México: Universidad autónoma de Ciudad Juárez.
- Paredes, J., Carrillo, J. ., Gregori, R., Sañudo, J., Labavitch, J., Allende, R. & Garcí, R., (2011). Enzimas líticas producidas por *Trichoderma* spp. y sus efectos con la inhibición *in vitro* de patógenos causantes de la pudrición de la raíz del garbanzo. *Revista Mexicana de Fitopatología*, Sin mes, 73-75.
- Popoff, O. & Ferraro, L. . (2009). Reino Fungi. noviembre 29, 2016, de Instituto de Botánica del Nordeste
- Rey, M., Delgado, J., Rincón, A., Limón, M. & Benítez, T.. (2000). Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas.
- Richter, S., Cormican, M., Pfaller, M., Lee, C., Gingrich, R., Rinaldi, M., & Sutton, D. (1999). Fatal Disseminated *Trichoderma longibrachiatum* Infection in an Adult Bone Marrow Transplant Patient: Species Identification and Review of the Literature. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(4), 1154–1160.
- Rodríguez, D. & Gato, Y., (2010). Métodos alternativos en la conservación de *Trichoderma harzianum* Rifai. *Fitosanidad*, Diciembre-Sin mes, 241-246.
- Samuels, G., Chaverri, P., Farr, D., & McCray, E. (s.f.) *Trichoderma* Online, *Systematic Mycology and Microbiology Laboratory*, ARS, USDA. Retrieved January 5, 2017, from /taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm
- Singh, A., Shahid, M., Srivastava, M., Pandey, S., & Sharma, A., (2014) Optimal Physical Parameters for Growth of *Trichoderma* Species at Varying pH, Temperature and Agitation. *Virol Mycol* 3: 127. doi:10.4172/2161-0517.1000127
- Tang, P., Mohan, S., Sigler, L., Witterick, I., Summerbell, R., Campbell, I., & Mazzulli, T. (2003). Allergic Fungal Sinusitis Associated with *Trichoderma longibrachiatum*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(11), 5333–5336.
- Uribarren, T., Bazán, E., & Castañón, L.. (2015). Generalidades de Micología. noviembre 22, 2016, de UNAM

Valencia, J. & Castro, B. (2004) Estudio de aspectos biológicos de aislamientos de *Trichoderma sp.* antagónicos a *Rosellinia bunodes*. Cenicafé 55 (1): 16 - 28.

## ANEXOS

### Anexo I: Reconocimiento de participación en Simposio Nacional de Ingeniería Química y Bioquímica Aplicada.



**5 Simposio Nacional de Ingeniería Química y Bioquímica Aplicada.**

Otorga el presente



# Reconocimiento a:

*Roberta Ramírez-Cortes, Ana Cecilia Salinas-Méndez, Diana Alonso-Segura, Rene Sanjuan-Galinda*

Por su ponencia **“AISLAMIENTO Y ENSAYO CINÉTICO DEL CRECIMIENTO IN VITRO DE UN HONGO ENDÉMICO AL SUELO DE NUEVO LEON PARA PROPOSITOS AMBIENTALES”** en el marco del 5º Simposio Nacional de Ingeniería Química y Bioquímica Aplicada, efectuado del 31 de agosto al 02 de septiembre de 2016 en la Unidad de Posgrados de la UASLP.

San Luis Potosí, S.L.P.

 Dra. Elsa Cervantes González Presidenta del 5º SNIQBA	 Dr. José Elías Pérez López Secretario del 5º SNIQBA y Coordinador del Doctorado Institucional en Ingeniería y Ciencias de Materiales-UASLP	 Dr. Victor Manuel Ovando Medina Líder del Cuerpo Académico Ingeniería de Procesos Químicos y Ambientales UASLP-CA-202
---	---	---

## Anexo II: Resumen de artículo presentado para la participación en Simposio Nacional de Ingeniería Química y Bioquímica Aplicada.



### 5º Simposio Nacional de Ingeniería Química y Bioquímica Aplicadas

Área: Ambiental.

#### **AISLAMIENTO Y ENSAYO CINÉTICO DEL CRECIMIENTO *IN VITRO* DE UN HONGO ENDÉMICO AL SUELO DE NUEVO LEÓN PARA PROPÓSITOS AMBIENTALES**

Roberto Ramírez-Cortes<sup>1</sup>, Ana Cecilia Salinas-Méndez<sup>1</sup>, Diana Alonso-Segura<sup>1</sup>, Rene Sanjuan-Galindo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación e Innovación Tecnológica, Instituto Tecnológico de Nuevo León, Av. Alianza Centro 507, Parque de Investigación e Innovación Tecnológica, CP 66629, Apodaca, Nuevo León.

\*Autor de contacto: renesg1@yahoo.com.mx

México posee una gran riqueza biológica. Sin embargo, en sus metrópolis los problemas ambientales se agravan con mayor frecuencia. Las zonas boscosas localizadas en la vecindad de éstas, desempeñan un papel primordial como mecanismos de remediación de la calidad del aire, captación de agua al subsuelo, y sobrevivencia de la flora y fauna, entre otras funciones. Los suelos de estas zonas son receptores de una gran cantidad de desechos orgánicos y albergan microbiota con funciones especiales que abren la oportunidad para desarrollar estudios para su identificación, con el fin de generar acciones que promuevan la calidad del suelo. En particular, los hongos cumplen un papel importante, participan en las redes tróficas, algunos mantienen asociaciones simbióticas a especies, otros, son responsables de la degradación de la materia orgánica residual, algunos más, producen los metabolitos que requieren otras especies, otros son capaces de captar metales pesados, y otros, son de valioso interés industrial o clínico.

En una muestra de suelo tomada en una zona boscosa de la Zona Metropolitana de Monterrey, en el estado de Nuevo León, México; se aisló un hongo endémico a las condiciones climatológicas y edafológicas características del lugar, para estudiar las condiciones de su cultivo *in vitro* tanto en placa como en medio líquido. En el presente trabajo, se reporta información de la actividad fisiológica del hongo aislado, y de las condiciones de donde fue aislado; se describe a detalle la morfología del mismo a partir de imágenes de microscopía de contraste de fases (MCF) y microscopía electrónica de barrido (MEB), en las que destaca su abundante ramificación miceliar. Al interior de los túbulos miceliales se aprecia la distribución abundante de las esporangiosporas. De acuerdo a la morfología descrita, se sospecha que el hongo aislado es parte del *Filum Zygomycota*, el cual se caracteriza por contener en su pared celular compuestos como quitosano, así como reservas de lípidos y complejos proteínicos. Su análisis cinético permitió describir el crecimiento *in vitro* desarrollado en completa ausencia de luz, en cajas Petri y usando como nutrientes dextrosa y papa (agar y caldo) en condiciones de temperatura de 28 °C y en un periodo de 66 horas.

*Palabras clave: microbiota endémica, microscopía miceliar, cinética miceliar.*

# Anexo III: Póster presentado para la participación en Simposio Nacional de Ingeniería Química y Bioquímica Aplicada.



Instituto Tecnológico de Nuevo León  
TECNOLOGICO NACIONAL DE MEXICO

## AISLAMIENTO Y ENSAYO CINÉTICO DEL CRECIMIENTO IN VITRO DE UN HONGO ENDÉMICO AL SUELO DE NUEVO LEÓN PARA PROPÓSITOS AMBIENTALES

Roberto Ramírez-Cortes<sup>1</sup>, Ana Cecilia Salinas-Méndez<sup>1</sup>, Diana Alonso-Segura<sup>1</sup>, Rene Sanjuan-Galindo<sup>1\*</sup>

Cuerpo académico: Automatización de procesos

<sup>1</sup> Centro de Investigación e Innovación Tecnológica, Instituto Tecnológico de Nuevo León, Av. Alianza Centro 507, Parque de Investigación e Innovación Tecnológica, CP 66629. Apodaca, Nuevo León

\* Autor de contacto: renesg1@yahoo.com.mx

SNQBA



Simposio Nacional de Ingeniería Química y Bioquímica Aplicada

### RESUMEN

México posee una gran riqueza biológica; sin embargo, las metrópolis de mayor dinamismo económico enfrentan problemas de contaminación cada vez más graves. Las zonas boscosas localizadas en la vecindad de éstas metrópolis, se desempeñan como mecanismos de equilibrio y regulación para la captura y eliminación de contaminantes, así como otras funciones ambientales. La vegetación en las zonas boscosas mantiene relaciones simbióticas importantes con la microbiota del suelo, siendo éste el receptor de una gran cantidad de desechos orgánicos a través del arrastre pluvial. De ahí que sea necesario identificar los microorganismos nativos en el suelo a fin de conocer su calidad y procurar su protección. En el presente trabajo se logró la reedición en suelo de un hongo adaptado a las condiciones climáticas y edafológicas características de la Zona Metropolitana de Monterrey (ZMM). Se logró su identificación y se desarrolló su cinética de crecimiento *in vitro*.

### INTRODUCCIÓN

La biodiversidad en México es abundante. En particular, en el estado de Nuevo León posee numerosas especies, algunas endémicas [1, 2]. Sin embargo, el dinamismo industrial y antropogénico de la región amenaza la existencia de algunas especies, incluyendo la salud humana. La atmósfera de la ZMM recibe un sinnúmero de contaminantes emitidos por fuentes fijas y móviles en los que se incluyen partículas suspendidas, compuestos orgánicos volátiles (COVs), NOx, SOx, CO<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>, HX (halógenos de H<sub>2</sub>) y compuestos alcaloides contenidos de plomo, entre otros; los cuales se encuentran suspendidos y sujetos a ser acarreados por las corrientes de aire. Posteriormente, a través de las precipitaciones pluviales se incorporan al suelo y a los cuerpos de agua.

Las áreas forestales en la periferia de la ZMM, cumplen con funciones como son formar cortinas que frenan las corrientes de aire, capturar partículas suspendidas y regular la temperatura, entre otras. A su vez, el suelo en estas áreas es una capa rica en sustratos orgánicos que hospeda diversos microorganismos, particularmente bacterias y hongos, que son responsables de metabolizar los desechos orgánicos. Sin embargo, el reconocimiento e identificación de los microorganismos propios del suelo de la ZMM no ha ocurrido en la misma manera que para otras especies [1]. La microbiota del suelo coexiste con la vegetación mediante asociaciones simbióticas; participa en los ciclos biológicos, promueve el dinamismo de los ecosistemas. La protección y cuidado de las especies, será posible solamente a partir del conocimiento que se tenga. Este trabajo describe el aislamiento, a partir de una muestra de suelo, del micelio de un hongo característico a las inmediaciones de la ZMM, así como su identificación y producción *in vitro*.

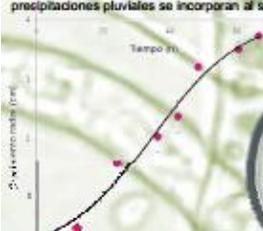


Figura 1. Gráfico del crecimiento exponencial de *T. harzianum* en medio sólido y líquido. Los datos en la ecuación representan la descomposición de la ecuación de crecimiento exponencial de la población.  $y = 0.0001e^{0.022x}$  con  $R^2 = 0.9999$ .  $y = 0.0001e^{0.022x}$  con  $R^2 = 0.9999$ .

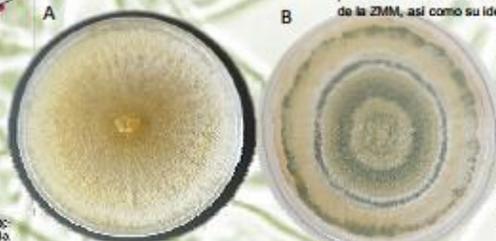


Figura 1. Crecimiento del micelio de *T. harzianum* en medio sólido: A) agar dextrosa y papa; B) agar extracto de malta.

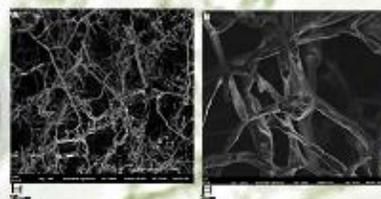


Figura 2. Morfología del micelio de *T. harzianum* observado mediante microscopía electrónica de barrido: A) 200x, barra de escala 10 µm; B) 2000x, barra de escala 2 µm.

### MATERIALES Y MÉTODOS

**Materiales biológicos.** La muestra de suelo fue colectada en una área boscosa de la ZMM, a una altitud de 1,100 msnm, y coordenadas 25.643182 latitud y -100.245311 longitud. A partir de esta muestra fue aislado el micelio del hongo de interés. El hongo se conserva en cajas Petri, en placas de agar PDA (BD Bioxon, pH 5.6) y en agar extracto de malta (AEM, Difco™, pH 4.7). El crecimiento se estudió a 30 °C durante 7 días. El micelio fue observado en un microscopio electrónico de barrido Carl Zeiss EVO LS 10 operado a un voltaje de 5 kV.

**Identificación morfológica y molecular.** Se contó con apoyo de la FQJ de la UAC para la identificación molecular mediante PCR.

**Tasa de crecimiento.** Se estudió en medio PDA. En el centro de la placa sólida fueron sembrados inoculos circulares de 5 mm de diámetro e incubados a 30 °C. El crecimiento radial fue medido diariamente hasta que el crecimiento del hongo cubrió completamente la caja Petri.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al comparar las secuencias purificadas en el NCBI se encontró 100% de homología con el hongo *Trichoderma harzianum*. En medio sólido, se observó un crecimiento radial y uniforme del micelio (Figura 1). En PDA, el micelio inicialmente fue de color blanco, y al madurar, desarrolló áreas de color verde oscuro (Figura 1A). Sin embargo, el crecimiento en el medio AEM se caracterizó por la formación de anillos concéntricos de colores blanco y verde oscuro (Figura 1B). Esta característica ha sido reportada en estudios anteriores [4,5]. La Figura 2, presenta las fotomicrografías del micelio de *T. harzianum* obtenidas con Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), donde se nota la extensa red de micelio, así como las septas. El cultivo en PDA (Figura 3), registró crecimiento exponencial a partir de las 18 h. El crecimiento radial cubrió el máximo permitido en la caja a las 60 h después de haber sido inoculado. La tasa de crecimiento máximo registrada es de 33.2 mm<sup>2</sup> y se alcanzó a las 42 h. La tasa de reproducción de la cepa es superior a otros experimentos reportados. En el trabajo de Guigón-López et al. (2010) se reportó una tasa de crecimiento máximo de 17 mm<sup>2</sup> para cepas nativas de *T. harzianum* en medio PDA a 25 °C [3]. En la literatura se describe al género *Trichoderma* como un agente cosmopolita de suelos. Se ha encontrado también en materia vegetal en proceso de descomposición. Se reconoce a *Trichoderma* spp. como un microorganismo dominante de la microbiota del suelo de una amplia variedad de hábitats; esta particularidad, puede ser atribuida a su naturaleza competitiva y a su gran capacidad metabólica.

### CONCLUSIONES

Se logró el aislamiento e identificación molecular de *Trichoderma harzianum* a partir de una muestra de suelo característica de la ZMM. Se establecieron las condiciones de cultivo *in vitro* en medio sólido y líquido del micelio aislado. Se caracterizó la morfología macroscópica y microscópica del hongo. Se determinó una tasa de crecimiento en medio PDA de 33.2 mm<sup>2</sup> y su modelo experimental. Se aprecia que la cepa aislada de *T. harzianum* posee ventajas competitivas de crecimiento y de adaptación para las condiciones de temperatura de la región, con potencial para mayor experimentación.

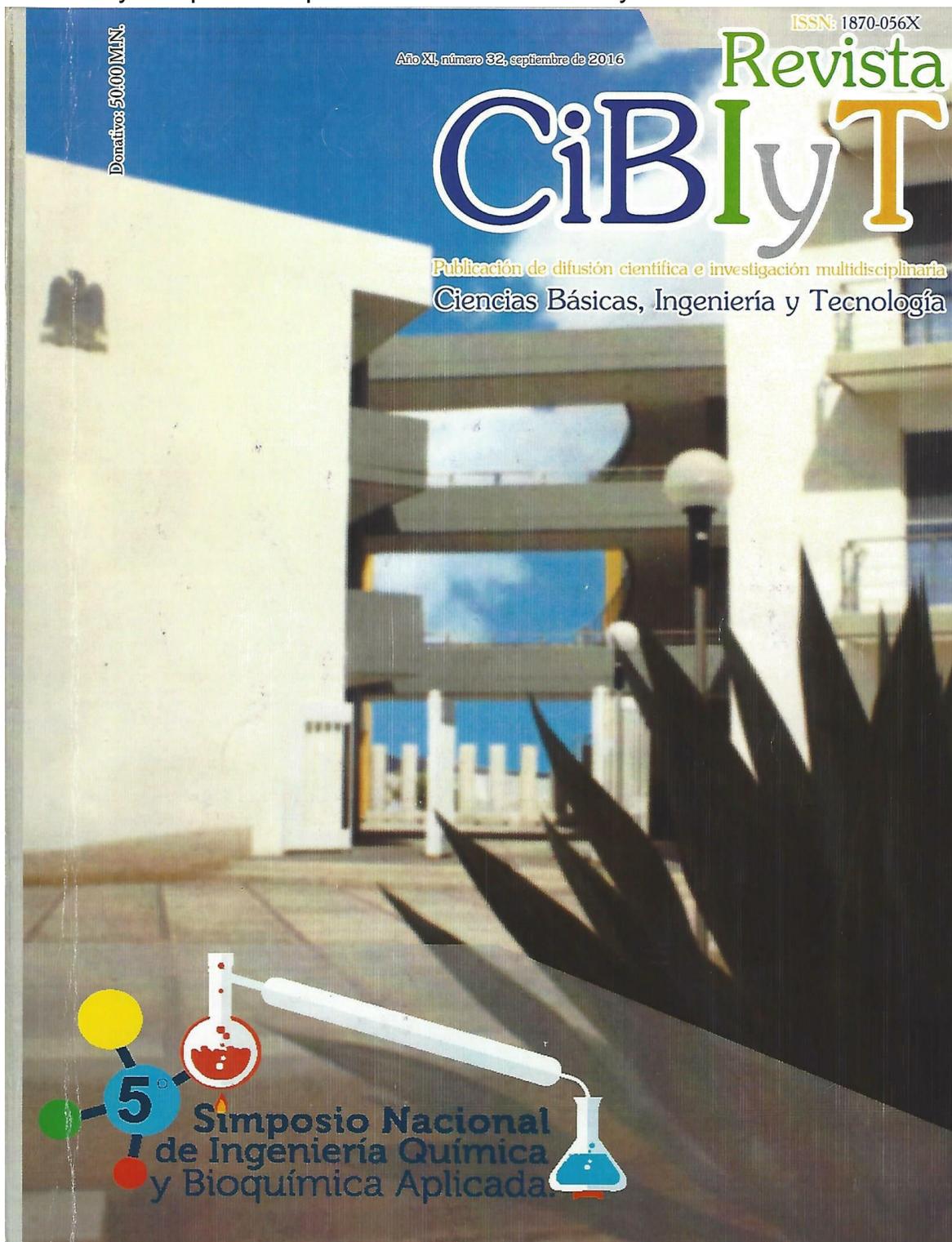
### BIBLIOGRAFÍA

- [1] Webster J. and Weber R. W. S., *Introducción a Fungi Third Edition*, (2007).
- [2] Gu H. J. and Webster J., *Fungal Ecology*, (1996).
- [3] Guigón-López C., Guzmán-Peña Y., Vargas-Hernández F., Carvajal-Hilán E., Aza-Ordóñez G. D., Brise-Luna L., Roscos M., Larrea S., Méndez S. y Lario M., *Revista Mexicana de Fitopatología*, 87 (2010).
- [4] Infante D., Martínez R., González N. y Reyes T., *Revista de Producción Vegetal*, 2(1), 16 (2006).
- [5] Kubicek C. P. and Herrewé G. E., *Trichoderma: A Glucocorticoid*, Volume 17: Basic biology, taxonomy and genetics, 3 (2002).

### AGRADECIMIENTOS

Se contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a través del proyecto FORNEXCYT 248826. Se agradece al apoyo del Dr. R. Rodríguez-Hernández del Departamento de Investigación en Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila, así como de su equipo de trabajo en la identificación molecular de la cepa de estudio. También se agradece al Sr. C. D. Tapia-Maruri del laboratorio de instrumentación del Centro de Desarrollo de Productos Biotécnicos (CeProBi) del INRA por su valiosa ayuda en la realización de la microscopía electrónica de barrido.

**Anexo IV:** Artículo publicado para Simposio Nacional de Ingeniería Química y Bioquímica Aplicada en la Revista CiBlyT.



## Presentación

En su 68° período de sesiones, la Asamblea General de las Naciones Unidas proclamó el año 2016 Año Internacional de las Legumbres. Para que estas lleguen al consumo humano es necesario aplicar conocimientos en diversas áreas múltiples y variadas, tales como alimentos, Biología, Química, medio ambiente e incluso industria de procesos, diseño de nuevos materiales y tecnologías, entre otras.

Todas estas áreas están íntimamente relacionadas con la Ingeniería Química, haciendo de ella una rama multidisciplinaria. Para lograr investigación y desarrollo interdisciplinario de punta, es necesario generar el encuentro entre pares, que contribuya a la discusión, generación de ideas y colaboración.

El SNIQBA nace en 2012 con la idea de crear un espacio en el cual se difundan y discutan los resultados más recientes en investigaciones con diferentes expertos en las disciplinas mencionadas.

Esta quinta reunión de docentes, investigadores y estudiantes involucrados en el área tiene el objetivo de incrementar la cooperación e interacción científica y tecnológica entre los participantes que, en esta ocasión, provienen de las siguientes instituciones: la Universidad Autónoma de Coahuila, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Universidad Agraria Antonio Narro, Universidad de Querétaro, Universidad de Guanajuato, Universidad Autónoma de Nuevo León y la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, quien este año es anfitriona y organizadora.

Este número de la Revista *CiBiT*, publicación de difusión científica e investigación multidisciplinaria, trae sesenta de los casi cien trabajos presentados del 31 de agosto al 7 de septiembre en el SNIQBA 2016 en las áreas de materiales, procesos, bioprocesos, ambiental, sustentabilidad energética y alimentos. Como en las ediciones previas, la mayoría de las contribuciones provienen de estudiantes, tanto de nivel licenciatura como de posgrado, haciendo del SNIQBA una oportunidad de crecimiento y garantía en la calidad de su educación.

A nombre del comité organizador, agradezco a todas las instituciones participantes que mantienen vivo este evento e invito a todos los asistentes a hacerlo crecer, consolidarse y trascender.

Dra. Shirley Carro Sánchez

---

*Comité editorial del 5º Simposio Nacional  
de Ingeniería Química y Bioquímica Aplicada*

Dr. Víctor Manuel Ovando Medina  
Dra. Elsa Cervantes González  
Dr. Miguel Ángel Corona Rivera  
Dr. José Elías Pérez López

*Editores invitados*

Dr. José Antonio Rodríguez de la Garza  
Dra. Silvia Y. Martínez Amador  
Dr. Alfredo Márquez Herrera  
Dra. Zaira Pineda Rico  
Dra. Iveth D. Antonio Carmona  
Dra. Lorena Farías Cepeda  
Dr. Isidro Palos Pizarro  
Dra. Lucero Rosales Marín  
Dra. Shirley Carro Sánchez  
Dra. Nancy V. Pérez Aguilar  
Dr. Hugo Martínez Gutiérrez  
M.C. José Luis Argüelles Ojeda  
Dr. Francisco J. Martínez López  
Dra. Martha Alejandra Cerpa Gallegos  
Lic. Eduardo Arciniaga Vázquez  
Dr. Omar González Ortega  
Q. Camerina J. Guzmán Álvarez  
Lic. América Pecina  
Dra. Candy Carranza Álvarez  
Dr. Hugo Martínez Gutiérrez

Revista CiBlyT está indizada en Latindex

Revista *CiBlyT*, septiembre de 2016, año 11, número 32, es una publicación cuatrimestral de difusión científica e investigación multidisciplinaria, fundada en 2004. Editada por Arnulfo Feliciano Sánchez Cortés. Mariano Matamoros 702, Col. Centro, Apizaco, Tlax. C. P. 90300, Tel: (01 241) 417 58 44, e-mail: [ciblyt@hotmail.com](mailto:ciblyt@hotmail.com) y [ciblyt@gmail.com](mailto:ciblyt@gmail.com).

Reserva de Derechos de uso exclusivo de título otorgado por el INDAUTOR: 04-2007-090509361300-102. ISSN: 1870-056X, con Licitud de Título y Licitud de Contenido en trámite. Impresa por Digimagen, Esmeralda 501, San Luis Apizaquito, Apizaco, Tlax. C.P. 90401, Tel: (01 241) 417 72 28. Este número se terminó de imprimir el 10 de septiembre de 2016 con un tiraje de 1,000 ejemplares.

El material de investigación publicado es original e inédito en las áreas de Ingeniería, de Ciencias Sociales y de Ciencias Exactas. La autorización para la publicación de los artículos es responsabilidad exclusiva de los autores. Cada artículo es propiedad intelectual de su autor(es), así como la institución de procedencia del autor(es) es propietaria del resultado de esas investigaciones. Las opiniones expresadas por los autores no reflejan la posición del editor. Se podrá autorizar solo la reproducción parcial de los contenidos para fines académicos y sin fines de lucro con previa autorización del editor y con la mención de la fuente.

Los requisitos de publicación aparecen en cada número publicado.

*Revista CiBlyT*

*Directorio editorial*

Arnulfo Sánchez Cortés  
Director y Editor

Ivonne Ilhuicatzí Cortés  
Coordinador Editorial

Roberto Carlos Cruz Becerril  
Coordinador de Arbitraje

Silvia Tomasa Rivera del Ángel  
Asesora Editorial

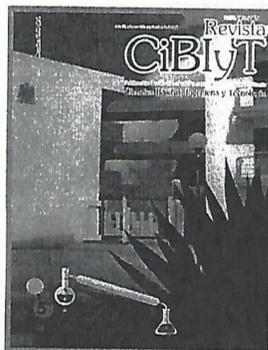
José Botello Hernández  
Coordinador de Diseño Gráfico y Edición

María Isabel Silva Aldrete  
Corrección y Revisión de Textos

María de los Ángeles Patiño Dorantes  
Traductora

Gustavo Sánchez Rodríguez  
Exprimidor de cerebros

**Nuestra portada**



Vista parcial del edificio de Ingenierías  
de la COARA-UASLP donde se imparte la  
carrera de Ingeniería Química  
Foto de América Pecina

Agradeceremos sus comentarios y sugerencias a:  
[ciblyt@hotmail.com](mailto:ciblyt@hotmail.com)  
[ciblyt@gmail.com](mailto:ciblyt@gmail.com)

No olvides visitar nuestro blog:  
<http://revistaciblyt.wordpress.com>

Revista *CiBlyT*, año 11, número 32, septiembre de 2016 ISSN: 1870-056X



## INDICE

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE ACEITES ESENCIALES DE CYMBOPOGON CITRATUS, C. FLEXUOSUS Y CITRUS SINENSIS ADICIONADOS A PELÍCULAS COMESTIBLES	1
EFFECTO DEL CALENTAMIENTO ÓHMICO SOBRE LA CALIDAD FÍSICOQUÍMICA, SENSORIAL Y MICROBIOLÓGICA DE AGUAMIEL DE AGAVE SALMIANA	6
EFFECTO DE UN RECUBRIMIENTO COMESTIBLE ELABORADO A BASE DE ALMIDÓN DE JÍCAMA ( <i>Pachyrhizus erosus</i> L. Urban) EN LA VIDA DE ANAQUEL DE LA FRESA	10
MODELADO DE CONTAMINANTES EN ZONAS URBANAS USANDO MODELOS HÍBRIDOS DE REDES NEURONALES. PARTE: ALTURA DE LA MEZCLA	16
RIESGO AMBIENTAL DE LAS SUSTANCIAS QUÍMICAS USADAS EN EL PROCESO DE FRACTURACIÓN HIDRÁULICA PARA LA EXTRACCIÓN DEL GAS DE LUTITAS	21
REPERCUSIÓN AMBIENTAL EN EL MUNICIPIO DE ANÁHUAC, N. L., DERIVADA DEL PROCESO DE EXPLORACIÓN Y EXPLOTACIÓN DEL GAS DE LUTITAS	26
POSIBLE USO DEL GLICEROL EN CELDAS DE COMBUSTIBLE	31
MODIFICACIÓN DE LA QUÍMICA SUPERFICIAL DEL HUESO DE NANCHE PARA AUMENTAR SU CAPACIDAD DE BIOSORCIÓN DE Pb <sup>2+</sup> PRESENTE EN SOLUCIÓN ACUOSA	35
AISLAMIENTO Y ENSAYO CINÉTICO DEL CRECIMIENTO <i>IN VITRO</i> DE UN HONGO ENDÉMICO AL SUELO DE NUEVO LEÓN PARA PROPÓSITOS AMBIENTALES	40
REMOCIÓN DE CROMO (VI) EN SOLUCIÓN ACUOSA POR LA BIOMASA DE LECHUGA ( <i>Lactuca sativa</i> )	45
BIOPROSPECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE UN CULTIVO MIXTO CON CAPACIDAD QUERATINOLÍTICA TOLERANTE A COBRE	50
REVALORIZACIÓN DE LOS RESIDUOS DE CAFÉ COMO MODIFICADOR DE ELECTRODOS DE PASTA DE CARBÓN PARA LA DEGRADACIÓN ELECTROQUÍMICA DEL ÁCIDO CARMÍNICO EXTRAÍDO DE LA COCHINILLA	55
ANÁLISIS DE SUELOS CONTAMINADOS CON FLUIDOS DE PERFORACIÓN DE LA CUENCA DE BURGOS	59
EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA ENZIMÁTICA DEL HONGO <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> SOBRE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS	63
PROPAGACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA ORQUÍDEA <i>CYRTOPODIUM PUNCTATUM</i> (L).	68
PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE RESIDUOS ALMIDONOSOS UTILIZANDO <i>Zymomonas mobilis</i> INMOVILIZADA	72
TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL MUNICIPAL MEDIANTE UN SISTEMA BIOELECTROQUÍMICO A ESCALA PLANTA PILOTO	77
ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE UN CULTIVO DE TOMATE ( <i>Lycopersicon esculentum</i> ) BAJO EL EFECTO DE DOS BIORREGULADORES	81

## AISLAMIENTO Y ENSAYO CINÉTICO DEL CRECIMIENTO *IN VITRO* DE UN HONGO ENDÉMICO AL SUELO DE NUEVO LEÓN PARA PROPÓSITOS AMBIENTALES

Roberto Ramírez-Cortés<sup>a</sup>, Ana-Cecilia Salinas-Méndez<sup>a</sup>, Diana Alonso-Segura<sup>a</sup>,  
Rene Sanjuan-Galindo<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Centro de Investigación e Innovación Tecnológica, Instituto Tecnológico de Nuevo León, Av. Alianza Centro 507, Parque de Investigación e Innovación Tecnológica, CP 66629, Apodaca, Nuevo León

\*Email Autor de contacto: [renesg1@yahoo.com.mx](mailto:renesg1@yahoo.com.mx)

Recibido el 15 de abril de 2016

### ABSTRACT

Mexico owns a big wildlife richness, nevertheless its main cities face severe pollution problems. Wooded areas surrounding these large cities play important roles, as a regulatory mechanism to capture and remove air pollutants, and some other environmental functions. Plants in the forests keep important symbiotic relationships with the soil microorganisms, and forested soil gathers many organic waste carried by rain. It is important to identify soil native microorganisms to know and guarantee soil quality and protection. The present work describes the study made from a fungus, isolated from a soil sample taken in the Metropolitan Area of Monterrey. The fungus is well adapted to the local weather and to the edaphological zone characteristics. The DNA identification for the filamentous fungus was achieved, and it was also grew *in vitro* conditions to study its growth rate.

### Keywords

Soil microorganisms; Molecular identification; Kinetic growth.

### RESUMEN

México posee una gran riqueza biológica; sin embargo, las metrópolis de mayor importancia económica enfrentan problemas de contaminación cada vez más graves. Las zonas boscosas

localizadas en la vecindad de éstas metrópolis, desempeñan un papel primordial como mecanismos de equilibrio y regulación para la captura y eliminación de contaminantes, así como otras funciones ambientales. La vegetación en las zonas boscosas mantiene relaciones simbióticas importantes con la microbiota del suelo, siendo éste el receptor de una gran cantidad de desechos orgánicos a través del arrastre pluvial: Es necesario realizar la identificación de los microorganismos nativos en el suelo para conocer su calidad y procurar su protección. En el presente trabajo se describe el estudio realizada a partir del aislamiento de un hongo tomado en una muestra de suelo y adaptado a las condiciones climatológicas y edafológicas características de la Zona Metropolitana de Monterrey. Se logró su identificación y se desarrolló su cinética de crecimiento *in vitro*.

### Palabras clave

Microorganismos del suelo; Identificación molecular; Cinética de crecimiento.

### Introducción

La biodiversidad en México es abundante. En particular, en el estado de Nuevo León se encuentran numerosas especies [1]. Algunas de ellas son endémicas, o están bien adaptadas a la

variabilidad de las condiciones climáticas del entorno. En la Zona Metropolitana de Monterrey (ZMM) la temperatura media oscila entre 5°C en invierno y 32 °C en verano, pudiendo alcanzar un máximo de hasta 40°C. La precipitación pluvial es alrededor de 650 mm anuales. Sin embargo, el dinamismo industrial y antropogénico de la ZMM genera condiciones de riesgo para las especies y la salud humana. La ZMM está expuesta a una atmósfera conteniente de un sinnúmero de contaminantes emitidos por fuentes fijas y/o fuentes móviles. Los contaminantes atmosféricos incluyen partículas suspendidas, compuestos orgánicos volátiles (COVs), NOx, SOx, CO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, HX (Halogenuros de H<sub>2</sub>) y compuestos alcaloides contenientes de plomo, entre otros. Estos materiales se encuentran suspendidos, sujetos a ser acarreados por las corrientes de aire. A través de precipitaciones pluviales se incorporan al suelo y alcanzan los cuerpos de agua. La concentración alta de contaminantes produce lluvia ácida con efectos nocivos. Las reservas forestales de la periferia de la ZMM, características de la cadena montañosa de la Sierra Madre Oriental, cumplen con funciones de carácter ambiental de gran importancia,

tal como la formación de cortinas que frenan las corrientes de aire, atrapan partículas suspendidas, regulan la temperatura, atraen lluvia, evitan la erosión, etc. Los árboles son el habitat de insectos, aves, roedores, reptiles, o diversos mamíferos que se albergan en sus raíces, ramas o copas. A su vez, en estas condiciones, el suelo es una capa rica en sustratos orgánicos que está en equilibrio con los microorganismos del suelo: La microbiota se conforma por bacterias, virus y hongos, principalmente, y es responsable de metabolizar los desechos orgánicos de origen vegetal o animal. Sin embargo, el reconocimiento e identificación de los microorganismos característicos en el suelo de la ZMM no ha ocurrido en la misma manera en que lo ha sido con otras especies [1]. La microbiota del suelo coexiste con los árboles y la vegetación mediante asociaciones simbióticas, participa en los ciclos biológicos, mantiene el dinamismo de los ecosistemas para lograr las funciones descritas anteriormente. La protección y cuidado de las especies se logrará solamente a partir del conocimiento que se tenga. Este trabajo describe la producción *in vitro* del micelio de un hongo aislado en una

muestra del suelo recogida en las inmediaciones de la ZMM.

#### Sección experimental

**Recolecta del material biológico y condiciones del cultivo *in vitro*.** La muestra de suelo fue recolectada en una zona boscosa de la periferia de la ciudad de Monterrey sobre la cordillera de la Sierra Madre Oriental a 1,100 m de altitud y coordenadas de latitud 25.643182 y longitud de -100.245311. A partir de esta muestra fue aislado el micelio de un hongo, habituado al suelo muestreado, característico a la ZMM. La identificación molecular del micelio se hizo mediante purificación de secuencias en el laboratorio de la facultad de Ciencias Químicas de la UAC, los resultados de la comparación en el NCBI determinaron homologación al 100 % con el hongo *Trichoderma harzianum*. Para mantener la cepa, se reprodujo en placa sólida en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA, Difco, Detroit, Mich.) con ajuste de pH 5.5, antes de esterilizar y se incubó a 28 °C.

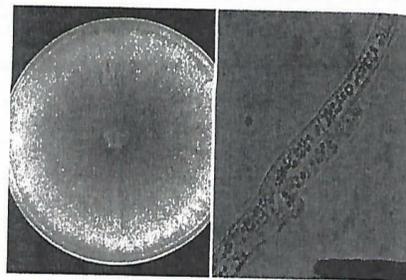
**Registro digital de la morfología del micelio.** Las estructuras microscópicas del micelio aislado, fueron observadas con un microscopio de contraste de fases Lx 500 Trinocular LABOMED. El

registro digital de imágenes se logró empleando el software DinoCapture 2.0.

**Caracterización de la tasa de crecimiento.** La tasa de crecimiento radial del micelio se estudió en placa sólida de PDA. En el centro de 6 cajas Petri de 90 mm de diámetro se hizo la siembra de inóculos circulares de 5 mm de diámetro y las cajas fueron incubadas a 28 °C. El registro del crecimiento se hizo de manera periódica hasta que el micelio del hongo cubrió completamente la superficie de la caja Petri.

#### Resultados y discusión

Se observó un crecimiento radial y uniforme del micelio (Figura 1).



**Fig. 1.** Crecimiento del micelio del hongo *T. harzianum* en medio PDA.

**Fig. 2.** Micelio de la cepa del hongo *T. harzianum* aislado. Imagen tomada usando un microscopio de contraste de fases (100x, barra de escala de 100 µm).

El color característico del micelio fue inicialmente blanco-amarillento y conforme el micelio maduraba se notó la formación de coronas de color verde oscuro, comportamiento similar al reportado para este tipo de hongo [2]. En las muestras observadas en el microscopio de contraste de fases se logró la observación de hifas septadas con una pared celular bien definida. En su interior, se observan diversas estructuras celulares (Figura 2).

En la Figura 3, se presenta el crecimiento radial registrado para el hongo crecido en medio PDA. El crecimiento observado es exponencial a partir de las 18 horas. El crecimiento radial cubrió el máximo permitido en la caja a las 60 h después de haber sido inoculado.

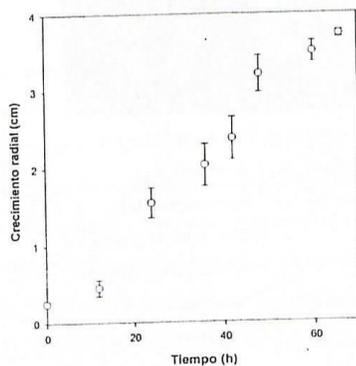


Fig. 3. Cinética del crecimiento miceliar del hongo *T. harzianum*, usando medio PDA y

crecido a 28 °C. Las barras en la dispersión representan la desviación estándar. Se presenta también el mejor ajuste de acuerdo al modelo sigmoïdal de 3 parámetros  $f = \frac{a}{1 + e^{-\frac{(x-x_0)}{b}}}$  con

los valores experimentales  $a = 4.0624$  (-),  $b = 13.2299$  h,  $x_0 = 34.5475$  h y  $R^2 = 0.98$ .

La tasa de crecimiento máximo registrada es de  $33.2 \text{ mmd}^{-1}$  y se alcanzó a las 42 h. Este valor refleja mayor capacidad de reproducción para otras cepas, pues en un trabajo previo se reportaron valores inferiores. Guigón-López *et al.*, reportaron una tasa de crecimiento máximo de  $17 \text{ mmd}^{-1}$  para cepas nativas de *T. harzianum* crecido en medio PDA a una temperatura de 25 °C [3]. El género *Trichoderma* es descrito en la literatura como un agente cosmopolita de suelos. Se ha encontrado también en materia vegetal en proceso de descomposición. El hongo *Trichoderma spp.* se reconoce como un microorganismo dominante de la microbiota del suelo de una amplia variedad de hábitats; esta particularidad, puede ser atribuida a su naturaleza competitiva y a su gran capacidad metabólica [4].

#### Conclusiones

Se reportó el aislamiento e identificación de la cepa *Trichoderma harzianum*, característica de la ZMM. Se

establecieron condiciones de cultivo *in vitro* del micelio aislado. Se logró caracterizar la morfología macroscópica y microscópica del hongo. Se presenta la cinética de crecimiento y el modelo experimental para dicho comportamiento. Se aprecia que la sepa aislada, nativa para la ZMM tiene ventajas competitivas de crecimiento y de adaptación para las condiciones de temperatura alta con potencial para mayor experimentación.

#### Agradecimientos

Se contó con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del proyecto FORDECYT 245838, 2014.

Se contó con el apoyo del equipo del Dr. R. Rodríguez Herrera de la UAC para la identificación molecular de la cepa de estudio.

#### Referencias

- [1] Estrada E., Villarreal J. A., Cantú C., Cabral I., Scott L., Yen C., *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3:8 (2007).
- [2] Infante D., Martínez B., González N. y Reyes Y., *Revista de Protección Vegetal*, 24:1, 14 (2009).
- [3] Guigón-López C., Guerrero-Prieto V., Vargas-Albores F., Carvajal-Millán E., Ávila-Quezada G. D., Bravo-Luna L., Ruocco M., Lanzuise S., Woo S. y Lorito M., *Revista Mexicana de Fitopatología*, 87 (2010).
- [4] Kubicek C. P. and Harman G. E., *Trichoderma & Gliocladium. Volume 1: Basic biology, taxonomy and genetics*, 3 (2002).