

UNEMI

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

REPUBLICA DEL ECUADOR

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

**VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE POSGRADOS**

INFORME DE INVESTIGACIÓN

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA

TEMA

**EXTRACCIÓN DE CELULOSA A PARTIR DE TRICHODERMA HARZIANUM:
DESDE EL ENFOQUE DE LA INGENIERÍA QUÍMICA, PARA LA APLICACIÓN
EN EL TRATAMIENTO SECUNDARIO DE LAS PLANTAS DE TRATAMIENTO
DE AGUAS RESIDUALES (PTAR), EN INDUSTRIAS PAPELERAS Y DE
ALIMENTOS, EN EL ECUADOR.**

DOCENTE:

MANUEL IGNACIO CANDO DÍAZ

AUTORES:

- TULIO JARAMILLO REY
- NATALIA ANCHUNDIA GARAY

MILAGRO – ECUADOR

2024

Derechos de autor

Sr. Dr. Fabricio Guevara Viejó
Rector de la Universidad Estatal de Milagro
Presente.

Yo, Tulio Michael Jaramillo Rey, y Natalia Cristel Anchundia Garay, en calidad de autores y titulares de los derechos morales y patrimoniales de este informe de investigación, mediante el presente documento, libre y voluntariamente cedo los derechos de Autor de este proyecto de desarrollo, que fue realizada como requisito previo para la obtención de mi Grado, de Magíster en Biotecnología, como aporte a la Línea de Investigación Promoción del Desarrollo Sostenible: Agua y Saneamiento, con el Art. 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, concedo a favor de la Universidad Estatal de Milagro una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Conservo a mi favor todos los derechos de autor sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

Así mismo, autorizo a la Universidad Estatal de Milagro para que realice la digitalización y publicación de este Proyecto de Investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

El autor declara que la obra objeto de la presente autorización es original en su forma de expresión y no infringe el derecho de autor de terceros, asumiendo la responsabilidad por cualquier reclamación que pudiera presentarse por esta causa y liberando a la Universidad de toda responsabilidad.

Milagro, 13 de junio de 2024

Firmado electrónicamente por:



Tulio Michael Jaramillo Rey

CI: 0704745090



Natalia Cristel Anchundia Garay

CI: 0940990815

Aprobación del tutor del Trabajo de Titulación

Yo, Manuel Ignacio Cando Díaz, en mi calidad de director del trabajo de titulación, elaborado por Tulio Michael Jaramillo Rey, y Natalia Cristel Anchundia Garay, cuyo tema es “EXTRACCIÓN DE CELULOSA A PARTIR DE TRICHODERMA HARZIANUM: DESDE EL ENFOQUE DE LA INGENIERÍA QUÍMICA, PARA LA APLICACIÓN EN EL TRATAMIENTO SECUNDARIO DE LAS PLANTAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES (PTAR), EN INDUSTRIAS PAPELERAS Y DE ALIMENTOS, EN EL ECUADOR.”, que aporta a la Línea de Investigación Promoción del Desarrollo Sostenible: Agua y Saneamiento, previo a la obtención del Grado Magíster en Biotecnología. Trabajo de titulación que consiste en una propuesta innovadora que contiene, como mínimo, una investigación exploratoria y diagnóstica, base conceptual, conclusiones y fuentes de consulta, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos necesarios para ser sometido a la evaluación por parte del tribunal calificador que se designe, por lo que lo **APRUEBO**, a fin de que el trabajo sea habilitado para continuar con el proceso de titulación de la alternativa de Informe de Investigación de la Universidad Estatal de Milagro.

Milagro, 28 de junio de 2024



Manuel Ignacio Cando Díaz

DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE POSGRADO
CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **JARAMILLO REY TULIO MICHAEL**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "EXTRACCIÓN DE CELULOSA A PARTIR DE TRICHODERMA HARZIANUM: DESDE EL ENFOQUE DE LA INGENIERÍA QUÍMICA, PARA LA APLICACIÓN EN EL TRATAMIENTO SECUNDARIO DE LAS PLANTAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES (PTAR), EN INDUSTRIAS PAPELERAS Y DE ALIMENTOS, EN EL ECUADOR.", las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	56.27
SUSTENTACIÓN	37.70
PROMEDIO	93.97
EQUIVALENTE	Muy Bueno



ANDRADE ALBAN MARÍA JOSÉ

ANDRADE ALBAN MARÍA JOSÉ
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



KATHERINE LISSETTE
ROMERO VASQUEZ

Mgs ROMERO VASQUEZ KATHERINE LISSETTE
VOCAL



DELIA DOLORES
NORIEGA VERDUGO

Dra. NORIEGA VERDUGO DELIA DOLORES
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE POSGRADO
CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **ING. ANCHUNDIA GARAY NATALIA CRISTEL**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "EXTRACCIÓN DE CELULOSA A PARTIR DE TRICHODERMA HARZIANUM: DESDE EL ENFOQUE DE LA INGENIERÍA QUÍMICA, PARA LA APLICACIÓN EN EL TRATAMIENTO SECUNDARIO DE LAS PLANTAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES (PTAR), EN INDUSTRIAS PAPELERAS Y DE ALIMENTOS, EN EL ECUADOR.", las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	56.27
SUSTENTACIÓN	39.10
PROMEDIO	95.37
EQUIVALENTE	Muy Bueno



MARIA JOSE ANDRADE
ALBAN

ANDRADE ALBAN MARÍA JOSÉ
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



KATHERINE LISSETTE
ROMERO VASQUEZ

Mgs ROMERO VASQUEZ KATHERINE LISSETTE
VOCAL



DELIA DOLORES
NORIEGA VERDUGO

Dra. NORIEGA VERDUGO DELIA DOLORES
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

AGRADECIMIENTO

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a todas aquellas personas que han sido fundamentales en la consecución de este significativo hito en mi trayectoria académica y profesional.

En primer lugar, manifiesto mi gratitud a mi madre, cuya dedicación, amor y sacrificio han constituido el cimiento sobre el cual he construido mis aspiraciones y objetivos. Su apoyo incondicional y sus sabias palabras me han brindado la fortaleza necesaria para perseverar en los momentos de dificultad. Mamá, su ejemplo de perseverancia y fortaleza son mi mayor inspiración.

Al Ingeniero Raúl Serrano, mi mentor en Ingeniería Química, deseo expresar mi gratitud por ser una fuente constante de enseñanza y guía. Gracias por despertar en mí la pasión por esta carrera y por sus valiosos consejos y enseñanzas que han sido invaluable en mi formación académica y profesional. Su dedicación y compromiso han sido una gran motivación para mí.

A mi abuela, le expreso mi más sincero agradecimiento por ser un faro de sabiduría y bondad en mi vida. Su amor incondicional y sus enseñanzas me han guiado y me han proporcionado la perspectiva necesaria para valorar cada logro con humildad y gratitud. Abuela, su generosidad y espíritu resiliente son un modelo a seguir.

A mi hermano, agradezco por ser mi compañero y confidente, siempre dispuesto a ofrecer su apoyo y ánimo. Sus consejos y su fe en mis capacidades han sido un motor fundamental en este arduo camino. Hermano, tu amistad y confianza han sido esenciales para alcanzar este logro.

A mi esposo, le expreso mi más profundo agradecimiento por su amor, paciencia y comprensión a lo largo de este proceso. Gracias por creer en mí cuando más lo necesitaba y por brindarme un apoyo incondicional. Su compañía y ánimo han sido cruciales para la realización de este sueño.

A todos ellos, dedico este trabajo con profunda gratitud y admiración, pues sin su apoyo constante y su amor incondicional, este sueño no habría sido posible. Este logro es tanto mío como suyo.

Finalmente, deseo agradecer a Tulio Jaramillo, mi compañero de proyecto, a mis profesores y colegas del programa de Maestría en Biotecnología, quienes con su guía y conocimientos han contribuido de manera significativa a mi formación académica y profesional.

Natalia Cristel Anchundia Garay

DEDICATORIA

Este trabajo de titulación lo dedicamos a Dios, ya que gracias a él hemos logrado concluir satisfactoriamente el programa de Maestría, a nuestros padres que son la motivación más grande que Dios pudo concedernos, que con su ejemplo, apoyo incondicional y amor infinito nos han forjado y guiado siempre, quienes nos han inculcado que con esfuerzo y dedicación se puede lograr todo en la vida.

Tulio Michael Jaramillo Rey

Natalia Cristel Anchundia Garay

AGRADECIMIENTO

Nuestro más grande agradecimiento a Dios, por la fuerza y constancia para que nuestras metas y anhelos sean alcanzados a lo largo del tiempo y por esta nueva oportunidad de crecimiento profesional.

A nuestra familia por ser ese apoyo y motivación como pilares fundamentales en nuestras vidas.

A nuestro excelente tutor por toda su confianza, compromiso y conocimientos impartidos a lo largo de este tiempo para culminar este trabajo de titulación.

A nuestro querido maestro el ingeniero Raúl Serrano por ser parte fundamental en el desarrollo de este proceso con Quality Corporation S.A. y su compromiso en pro de la academia y la biotecnología.

Un agradecimiento especial para nuestra guía y ayuda en este camino de aprendizaje, Ana Ruiz, que, sin su ayuda, esto no podría ser posible.

Tulio Michael Jaramillo Rey

Natalia Cristel Anchundia Garay

Resumen

El presente informe de investigación se enfoca en extraer celulasa del hongo *Trichoderma harzianum*, desde una perspectiva de ingeniería química, con el propósito de servir como una guía para estudiantes de posgrado en biotecnología en Ecuador. La celulasa desempeña un papel crucial en la descomposición de la celulosa, un componente fundamental de la biomasa vegetal. *Trichoderma* es un género de hongos ampliamente distribuido en Ecuador, reconocido por su capacidad para producir diversas enzimas, incluida la celulasa. Este informe examina la literatura pertinente, describe una metodología exhaustiva para la extracción de celulasa y establece objetivos específicos para la realización de esta investigación, por lo cual nos permitió obtener como resultados; que la extracción de celulasa a partir de *Trichoderma harzianum* ha demostrado ser un proceso eficaz para la obtención de enzimas en el contexto de la ingeniería química y que puede ser aplicada en el tratamiento secundario de plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) en las industrias papeleras y alientos del Ecuador.

Palabras clave: *Trichoderma*, Microorganismos, Biotecnología, Celulosa, Ingeniería Química.

Abstract

This research report focuses on extracting cellulase from the fungus *Trichoderma harzianum*, from a chemical engineering perspective, with the purpose of serving as a guide for graduate students in biotechnology in Ecuador. Cellulase plays a crucial role in the decomposition of cellulose, a fundamental component of plant biomass. *Trichoderma* is a fungal genus widely distributed in Ecuador, recognized for its ability to produce various enzymes, including cellulase. This report examines the pertinent literature, describes an exhaustive methodology for the extraction of cellulase and establishes specific objectives for the realization of this investigation, which allowed us to obtain as results; that the extraction of cellulase is the most efficient way to produce cellulase. The results of this research are that the extraction of cellulase from *Trichoderma harzianum* has been demonstrated to be an efficient process for the obtaining of enzymes in the context of chemical engineering and that it can be applied in the secondary treatment of wastewater treatment plants (WWTP) in the paper and food industries of Ecuador.

Keywords: *Trichoderma*, Microorganisms, Biotechnology, Cellulose, Chemical Engineering.

Lista de figuras

Figura 1. Muestras de <i>Trichoderma harzianum</i> , sembradas en diferentes sustratos.....	36
Figura 2. Autoclave con Muestras de <i>Trichoderma harzianum</i> , sembradas en diferentes sustratos.....	37
Figura 3. Proceso de incubación a 25-30°C durante 7-14 días de las Muestras de <i>Trichoderma harzianum</i> , sembradas en diferentes sustratos.....	41
Figura 4. Conteo de colonias de las Muestras de <i>Trichoderma harzianum</i> , sembradas en diferentes sustratos.....	42
Figura 5. Script curvas de calibración entre muestras en Coolab	44
Figura 6. Gráfica curvas de calibración entre muestras	45
Figura 7. Script Comparación Anova entre muestras en coolab.....	50
Figura 8. Gráfica Anova entre muestras	51
Figura 9. Script Comparación valores entre <i>Trichoderma Reseei</i> y <i>Harzianum</i>	52
Figura 10. Gráfica de comparación entre <i>Reseei</i> y <i>Harzianum</i>	53
Figura 11. Esquema de Tratamientos de Aguas Residuales.	54

Lista de tablas

Tabla 1 Operacionalización de las variables.....	22
Tabla 2. Tipos de sustratos.....	35
Tabla 3. Procedimiento	37
Tabla 4. Procedimiento muestra 1.....	38
Tabla 5. Procedimiento muestra 2.....	39
Tabla 6. Procedimiento muestra 3.....	39

ÍNDICE

Aprobación del tutor del Trabajo de Titulación.....	ii
AGRADECIMIENTO	v
DEDICATORIA	vi
Resumen.....	viii
Abstract.....	ix
INTRODUCCIÓN	15
CAPÍTULO I: EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN.....	16
1.1 Planteamiento del problema	16
1.3 Formulación del problema	19
1.4 Preguntas de investigación.....	19
1.5 Determinación del tema	20
1.6 Objetivo general.....	21
1.7 Objetivos específicos	21
1.8 Hipótesis	21
1.9 Declaración de las variables (Operacionalización).....	22
1.10 Justificación	23
1.11 Alcance y limitaciones	24
CAPÍTULO 2: FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	27
2.1 Fundamentos de la celulasa.....	27
2.2 Características y Potencial Enzimático de <i>Trichoderma harzianum</i>	27
2.2.1. Características Generales de <i>Trichoderma harzianum</i>	27
2.2.2. Morfología y Ciclo de Vida	28
2.2.3. Mecanismos de Control Biológico.....	28
2.2.4. Potencial Enzimático de <i>Trichoderma harzianum</i>	28
2.2.5. Producción de Enzimas Hidrolíticas	28
2.2.6. Enzimas Líticas Adicionales.....	29

2.2.7. Metabolitos Secundarios	29
2.3. Aplicaciones Trichoderma harzianum	29
CAPÍTULO III: DISEÑO METODOLÓGICO	32
3.1 Tipo y diseño de investigación	32
3.2 Población y muestra	32
3.2.1. Características de la Población	32
3.2.2 Muestra	33
3.3. Metodología de Cultivo en Estado Sólido (SSF).....	33
3.3.1 Selección del Microorganismo	34
3.3.2. Preparación del Inóculo	34
3.3.3. Preparación del Sustrato	34
3.3.4. Inoculación del Sustrato.....	34
3.3.5 Incubación del Cultivo	34
3.3.6 Recolección y Extracción de Enzimas	35
3.3.7. Análisis de Actividad Enzimática.....	35
3.3.8 Tipos de Sustratos.	35
3.3.9 Pasos Generales	36
3.4. Procedimientos Específicos para Cada Muestra	38
3.4.1. Consideraciones Adicionales	40
3.4.2. Materiales Necesarios	41
3.4.3 Procedimiento Simplificado.....	42
3.4.4 Ensayo de Actividad Enzimática	43
3.4.5 Curva de Calibración	43
3.4.6 Concentración de Glucosa	45
3.4.7 Resumen.....	46
3.5 ANNOVA EN COOLAB	47
3.5.1 Ejecución del Script (Resultados).....	47

3.5.2. Comparación y Conclusión:.....	47
3.5.3. Conclusiones:.....	48
3.5.4. Implicaciones:.....	49
3.6 Enfoque del Sistema de Tratamiento desde el punto de vista de un ingeniero químico	53
3.6.1 Caracterización del Efluente	53
3.6.2. Selección de Tecnologías de Tratamiento	53
3.6.3. Diseño del Sistema de Tratamiento	54
3.6.4. Implementación y Operación del Sistema:	55
3.6.5 Monitoreo y Control del Proceso	55
3.6.6 Evaluación de Impacto Ambiental y Económico:.....	55
CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	57
4.1. Conclusiones	57
4.2. Recomendaciones	58
Bibliografía	59

INTRODUCCIÓN

El *Trichoderma harzianum* es un hongo principalmente anaerobio que se localiza en la mayoría de suelos agrícolas y otros sustratos, de manera natural; corresponde a la subdivisión Deuteromycetes; existiendo más de 30 especies de este hongo, las cuales brindan beneficios para la agricultura, a más de un control biológico, pues tiene un rápido crecimiento y desarrollo. (Infante, 2009).

La celulosa, una enzima crucial en la industria biotecnológica, destaca por su capacidad para descomponer la celulosa, un componente esencial de la biomasa vegetal. La obtención de celulasa a partir del hongo *Trichoderma* se ha convertido en un tema de gran interés para investigadores en Ecuador, donde la diversidad de estos microorganismos es notable. (Pérez, 2019)

Por aguas residuales se entiende a la acción y efecto en la que el hombre introduce materias contaminantes, formas de energía o inducir condiciones en el agua de modo directo o indirecto; implica alteraciones perjudiciales de su calidad con relación a los usos, estas aguas normalmente provienen del sistema de abastecimiento de agua de una población, después de haber sido utilizadas en diferentes actividades domésticas, industriales y comunitarias. (Díaz-Cuenca, Alavarado-Granados, & Camacho-Calzada, 2012)

El presente estudio se centra en la exploración de alternativas sostenibles para el tratamiento de aguas residuales. Este informe examina los procedimientos de extracción de celulasa desde una perspectiva de ingeniería química, con un enfoque dirigido a estudiantes de maestría en biotecnología interesados en este campo de estudio.

CAPÍTULO I: EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

1.1 Planteamiento del problema

Hace unas décadas, los investigadores se percataron del potencial de las enzimas y organismos en la transformación de los polímeros naturales que componen el papel. En los años 80, la investigación condujo al descubrimiento de enzimas capaces de degradar la lignina, lo que ha impulsado una extensa exploración sobre la aplicación de enzimas en la industria papelera desde entonces.

En la actualidad, el uso de enzimas en la industria de la pasta y el papel abarca una amplia gama de aplicaciones, algunas de las cuales ya se utilizan comercialmente o están cerca de hacerlo. Técnicas como el blanqueo con xilanasas, la eliminación del "pitch" con lipasas y la mejora del drenaje con celulasas son ejemplos bien establecidos. Otras aplicaciones, como la eliminación de contaminantes y la fibrilación de fibras secundarias, podrían convertirse pronto en prácticas comerciales.

Los desechos que se generan del proceso paplero, esta es uno de los mayores problemas de la industria, considerando que las enzimas están abriendo nuevas posibilidades en la industria del papel. Por ejemplo, las xilanasas están reduciendo la necesidad de productos químicos en el proceso de blanqueo, mientras que las celulasas están mejorando la textura de las fibras, optimizando el drenaje y facilitando el proceso de destintado. Las lipasas, por su parte, están contribuyendo a disminuir la presencia de "pitch". Algunos de estos métodos ya se utilizan comercialmente, y otros están empezando a surgir. En el futuro, las tecnologías basadas en enzimas podrían revolucionar aún más los procesos de pastado y fabricación de papel, haciéndolos más limpios y eficientes.

El desarrollo de estas aplicaciones se ha ido registrando en el transcurso del tiempo. Comenzó con la investigación sobre el uso de celulasas para facilitar el proceso de refinado, y ha evolucionado hasta los esfuerzos actuales para aplicar enzimas que degraden la lignina.

La presente investigación se consideró las variables descritas a continuación; el *Trichoderma harzianum* el cual dependerá del rendimiento de la producción de celulosas y la Actividad enzimática de las celulosas obtenidas.

1.2 Delimitación del problema

La industria papelera representa uno de los principales consumidores de agua en todas sus etapas, desde la conversión de la madera en pulpa hasta el proceso de blanqueamiento. Se requieren aproximadamente 10 litros de agua para producir una sola hoja de papel, lo que genera una demanda significativa de este recurso vital para el planeta.

Los productos químicos utilizados en la fabricación de la pulpa de madera y en el blanqueo final del papel, en su mayoría blanqueadores elementales sin cloro, continúan siendo perjudiciales para el medio ambiente y la salud humana.

El agua se utiliza como medio de transporte para la eliminación de fibras y productos inorgánicos durante la fabricación, junto con los subproductos químicos resultantes de las reacciones industriales.

Como resultado, los contaminantes presentes en el agua residual terminan siendo transportados a los cuerpos de agua circundantes, lo que provoca la contaminación de los ecosistemas acuáticos y afectos a la vida marina. Además, esta contaminación tiene un impacto directo en la calidad del agua que consumimos y utilizamos en nuestras actividades diarias.

Durante la elaboración de pulpa y papel, se producen una variedad de desechos sólidos, tanto orgánicos como restos de madera, fangos, hemicelulosa, lignina, resinas, corteza, lejías de cocción, haluros orgánicos extraíbles, fenoles y compuestos orgánicos volátiles, así como desechos inorgánicos como cenizas, escorias y sales inorgánicas.

Además de los residuos químicos derivados de la fabricación del papel, la industria papelera también genera contaminantes físicos. Uno de los principales es el papel en sí, que puede crear una cantidad significativa de residuos si no se recicla o se maneja de manera adecuada.

El papel blanco puede tardar hasta cinco años en descomponerse en la naturaleza, lo que a su vez puede afectar al suelo y a los hábitats cuando se acumula.

El papel y el cartón usados representan una parte considerable de los residuos generados en los hogares. En 2021, la Unión Europea produjo 84 millones de toneladas de desechos de envases, con un 40,3% compuesto por papel y cartón.

Bajo este contexto, con esta investigación, se plantea una solución para los desechos obtenidos del proceso de la industria papelera en Ecuador, y de esta manera generar soluciones tanto ambientalmente aplicables como económicas, para que sean sostenibles.

1.3 Formulación del problema

La implementación del uso de celulosas obtenidas a partir de *Trichoderma harzianum* en el tratamiento secundario de las plantas de tratamiento de aguas residuales de la industria papelera y alimenticia en Ecuador, mediante un enfoque de ingeniería química, podría mejorar significativamente la eficiencia del proceso de degradación de la celulosa presente en los efluentes. Esto podría conducir a una reducción notable en la carga contaminante de las aguas residuales, promoviendo así la protección del medio ambiente y la sostenibilidad de las operaciones industriales en el país. Además, esta implementación podría ofrecer una alternativa más eco amigable y rentable en comparación con los métodos convencionales de tratamiento de aguas residuales.

1.4 Preguntas de investigación

- ¿Cuál es el rendimiento de la obtención de celulasas a partir de *Trichoderma harzianum* en un sustrato celulósico en condiciones específicas de cultivo?
- ¿Cómo afectan las condiciones de cultivo, como pH, temperatura y tiempo de fermentación, a la producción y actividad enzimática de las celulasas?
- ¿Cuál es el efecto del uso de celulasas obtenidas de *Trichoderma harzianum* en el tratamiento secundario de aguas residuales de la industria papelera y alimenticia en términos de degradación de la celulosa y reducción de la carga contaminante?

- ¿Qué impacto tiene la implementación de celulasas en el tratamiento secundario de aguas residuales en la calidad del efluente tratado en términos de parámetros físico-químicos y microbiológicos?
- ¿Cuál es el costo económico y energético asociado con la producción y aplicación de celulasas en el tratamiento de aguas residuales en comparación con métodos convencionales?
- ¿Cuál es la viabilidad técnica y ambiental de integrar el uso de celulasas en el proceso de tratamiento de aguas residuales de la industria papeleras y alimenticia en Ecuador?
- ¿Cómo se puede optimizar el proceso de obtención y aplicación de celulasas para maximizar su eficacia en la degradación de celulosa en aguas residuales industriales?
- ¿Qué estrategias de escalado podrían implementarse para llevar la producción y aplicación de celulasas a nivel industrial en plantas de tratamiento de aguas residuales?

1.5 Determinación del tema

Extracción de Celulasa a partir de *Trichoderma Harzianum*: desde el enfoque de la Ingeniería Química, para la aplicación en el tratamiento secundario de las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR), en industrias papeleras y de alimentos, en el Ecuador.

1.6 Objetivo general

El objetivo general de esta investigación es evaluar la obtención de Celulasa en un sustrato celulósico a partir de *Trichoderma Harzianum* desde el enfoque de la ingeniería química en la implementación del uso de esta enzima en el tratamiento secundario de las Plantas de tratamiento de aguas residuales de la industria papelera y alimenticia en Ecuador, utilizando técnicas de ingeniería química, con el fin de contribuir al avance de la biotecnología en el país.

1.7 Objetivos específicos

- Producir celulasa utilizando *Trichoderma harzianum* cultivado en diferentes sustratos.
- Indicar las condiciones de cultivo que permitieron mejores resultados de la obtención de *Trichoderma Harzianum* para maximizar la producción de celulasa a partir de sustratos celulósicos.
- Proponer recomendaciones para la aplicación industrial de la celulasa extraída, con el objetivo de promover su uso en procesos biotecnológicos en Ecuador.

1.8 Hipótesis

La implementación del uso de celulasas obtenidas a partir de *Trichoderma harzianum* en el tratamiento secundario de las plantas de tratamiento de aguas residuales de la industria papelera y alimenticia en Ecuador, desde el enfoque de la ingeniería química, resultará en una mejora significativa de la eficiencia del proceso de degradación de la celulosa presente en los efluentes, lo que llevará a una reducción notable en la carga contaminante de las aguas residuales y contribuirá a la protección del medio ambiente y la sostenibilidad de las operaciones industriales en el país.

1.9 Declaración de las variables (Operacionalización)

VARIABLES INDEPENDIENTES:

- *Trichoderma harzianum*.

VARIABLES DEPENDIENTES:

- Rendimiento de la producción de celulosas.
- Actividad enzimática de las celulosas obtenidas.

Variable	Tipo	Definición Conceptual	Definición Operacional	Instrumento de Medida
Trichoderma harzianum	Independiente	El estudio se centrará en la obtención de celulosas a partir de <i>Trichoderma harzianum</i> utilizando sustratos celulósicos específicos.	Se explorará la influencia de diferentes condiciones de cultivo en la producción y actividad enzimática de las celulosas.	Se recopilarán datos de cada planta de tratamiento seleccionada.
Rendimiento de la producción de celulosas.	Dependiente	Es la cantidad de celulosa pura que se obtiene al final del proceso de extracción en base a la cantidad inicial de biomasa.	Medir la actividad de las celulosas.	Método del DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico)
Actividad enzimática de las celulosas obtenidas.	Dependiente	Las enzimas celulolíticas obtenidas se someten a análisis para determinar su actividad enzimática.	Medición de la capacidad de las enzimas para degradar sustratos celulósicos, como la carboximetilcelulosa (CMC) o la celulosa microcristalina.	Se determinará con ensayos específicos de cada muestra tomada

Tabla 1 Operacionalización de las variables.

Fuente: Autores.

1.10 Justificación

La justificación del trabajo de investigación sobre la obtención de celulasas en un sustrato celulósico a partir de *Trichoderma harzianum* y su implementación en el tratamiento secundario de las plantas de tratamiento de aguas residuales de la industria papelera y alimenticia en Ecuador se fundamenta en varios aspectos clave:

- 1 **Impacto ambiental y sanitario:** La industria papelera y alimenticia genera una gran cantidad de aguas residuales que contienen altas concentraciones de materia orgánica, incluida la celulosa, así como otros compuestos químicos y contaminantes. El tratamiento inadecuado de estas aguas residuales puede tener efectos adversos en el medio ambiente y la salud pública.
- 2 **Necesidad de soluciones sostenibles:** Existe una creciente demanda de soluciones sostenibles y eco amigables para el tratamiento de aguas residuales industriales. La implementación de enzimas, como las celulasas, puede ofrecer una alternativa más eficiente y respetuosa con el medio ambiente en comparación con los métodos convencionales de tratamiento.
- 3 **Potencial de *Trichoderma harzianum*:** La *Trichoderma harzianum* es un hongo ampliamente estudiado y utilizado en la producción de enzimas celulolíticas debido a su capacidad para descomponer la celulosa de manera efectiva. Su uso en la obtención de celulasas para el tratamiento de aguas residuales podría aprovechar su eficiencia en la degradación de este sustrato.

- 4 **Relevancia para la industria ecuatoriana:** Ecuador cuenta con una importante industria papelera y alimenticia que enfrenta desafíos significativos en el tratamiento de sus aguas residuales. La implementación de tecnologías innovadoras, como el uso de celulasas obtenidas de *Trichoderma harzianum*, puede contribuir a mejorar la sostenibilidad y competitividad de estas industrias en el país.

- 5 **Contribución al conocimiento científico:** El estudio propuesto contribuirá al avance del conocimiento científico en el campo de la biotecnología ambiental y la ingeniería química, especialmente en lo que respecta al uso de enzimas para el tratamiento de aguas residuales industriales. Los resultados obtenidos podrían ser de interés tanto para la comunidad científica como para la industria.

En resumen, el trabajo de investigación propuesto busca abordar una problemática relevante y actual, ofreciendo una solución innovadora y sostenible para el tratamiento de aguas residuales industriales en Ecuador, con el potencial de tener un impacto positivo en el medio ambiente, la salud pública y la industria.

1.11 Alcance y limitaciones

El alcance y las limitaciones del trabajo de investigación son fundamentales para establecer las expectativas y comprender las restricciones del estudio propuesto. Aquí se detallan:

Alcance:

- **Producción de celulasas:** El estudio se centrará en la obtención de celulasas a partir de *Trichoderma harzianum* utilizando sustratos celulósicos específicos. Se explorará la influencia de diferentes condiciones de cultivo en la producción y actividad enzimática de las celulasas.
- **Aplicación en tratamiento de aguas residuales:** Se investigará el uso de las celulasas obtenidas en el tratamiento secundario de aguas residuales de la industria papelera y alimenticia en Ecuador. Se analizará la eficiencia del proceso de degradación de celulosa y la reducción de la carga contaminante en el efluente tratado.
- **Evaluación económica y ambiental:** Se realizará una evaluación preliminar del costo económico y energético asociado con la producción y aplicación de celulasas, así como una evaluación de la viabilidad técnica y ambiental de su implementación en plantas de tratamiento de aguas residuales.

Limitaciones:

- **Generalización de resultados:** Los resultados obtenidos pueden estar limitados a las condiciones específicas de cultivo y sustratos celulósicos utilizados en el estudio, por lo que su generalización a otras condiciones puede ser limitada.

- **Complejidad del proceso:** La producción y aplicación de celulosas en el tratamiento de aguas residuales industriales es un proceso complejo que puede verse afectado por una variedad de factores, incluidos los aspectos técnicos, económicos y regulatorios.
- **Recursos disponibles:** Las limitaciones de recursos, como el tiempo, el presupuesto y el acceso a equipos y materiales de laboratorio, pueden influir en el alcance y la realización del estudio.
- **Aspectos regulatorios:** La implementación de nuevas tecnologías en el tratamiento de aguas residuales puede estar sujeta a regulaciones y normativas específicas, lo que puede afectar la viabilidad y la aplicación práctica de los resultados del estudio.

En conclusión, es importante tener en cuenta tanto el alcance como las limitaciones del trabajo de investigación para interpretar adecuadamente sus resultados y comprender su relevancia y aplicabilidad en el contexto específico de la industria papelera y alimenticia en Ecuador.

CAPÍTULO 2: FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 Fundamentos de la celulasa

La celulasa es una enzima que se encarga de descomponer la celulosa en unidades de glucosa mediante la ruptura de enlaces glucosídicos. Esta enzima es producida por diferentes organismos, incluyendo hongos, bacterias y protozoos, y es fundamental para el ciclo del carbono, ya que permite la digestión de la celulosa, un polímero de glucosa que constituye una de las principales fuentes renovables de carbono en la naturaleza (Lynd L. R., Weimer, Van Zyl, & Pretorius, 2002).

Las celulasas se dividen en varias categorías según su mecanismo de acción, como las endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas, que actúan en conjunto para descomponer la celulosa en unidades de glucosa (Shallom & Shoham, 2003).

2.2 Características y Potencial Enzimático de *Trichoderma harzianum*

2.2.1. Características Generales de *Trichoderma harzianum*

Trichoderma harzianum, un hongo ascomiceto del género *Trichoderma*, es notable por su papel crucial en el control biológico de enfermedades de plantas y en la promoción del crecimiento vegetal. Este hongo es muy valorado en la agricultura debido a su capacidad para colonizar diversos entornos y su notable adaptabilidad, lo que permite su amplio uso (Harman, Howell, Viterbo, Chet, & Lorito, 2004).

2.2.2. Morfología y Ciclo de Vida

La *Trichoderma harzianum* se caracteriza por formar colonias verdes esporuladas y por su capacidad de crecer a una amplia gama de temperaturas y pH del suelo. Este hongo produce conidios de color verde oliváceo que son diseminados por el aire, y también puede formar esporas sexuales en ciertas condiciones (Howell, 2003).

2.2.3. Mecanismos de Control Biológico

T. harzianum ejerce su acción biocontroladora a través de varios mecanismos, incluyendo:

- **Micoparasitismo:** Ataca directamente a otros hongos patógenos mediante la producción de enzimas hidrolíticas que degradan sus paredes celulares (Harman et al., 2004).
- **Antibiosis:** Produce compuestos antibióticos que inhiben el crecimiento de patógenos.
- **Competencia por Espacio y Nutrientes:** Coloniza rápidamente la rizosfera, ocupando el espacio y consumiendo nutrientes que de otro modo serían utilizados por patógenos (Benítez et al., 2004).

2.2.4. Potencial Enzimático de *Trichoderma harzianum*

Uno de los factores clave que subraya la eficacia de *Trichoderma harzianum* como agente de biocontrol es su notable potencial enzimático.

2.2.5. Producción de Enzimas Hidrolíticas

T. harzianum es capaz de producir una variedad de enzimas hidrolíticas, que son cruciales para su capacidad de degradar las paredes celulares de hongos patógenos. Entre las enzimas más importantes se encuentran:

- Quitinasas: Estas enzimas descomponen la quitina, un componente esencial de las paredes celulares de muchos hongos. Gracias a ellas, *T. harzianum* puede invadir y parasitar hongos patógenos (Viterbo et al., 2002).
- Glucanasas: Estas enzimas desintegran los enlaces β -glucanos en las paredes celulares de los hongos. Su actividad enzimática complementa la acción de las quitinasas, ayudando a descomponer las paredes celulares del patógeno (Lorito et al., 1998).

2.2.6. Enzimas Líticas Adicionales

Aparte de las quitinasas y glucanasas, *T. harzianum* genera otras enzimas líticas, como las proteasas y lipasas, las cuales también participan en su capacidad de biocontrol al descomponer una variedad de estructuras celulares de los patógenos (Harman et al., 2004).

2.2.7. Metabolitos Secundarios

Además de las enzimas hidrolíticas, *Trichoderma harzianum* genera metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas y antibacterianas. Entre estos compuestos se encuentran peptaibols, gliotoxinas y otros compuestos volátiles que actúan inhibiendo el crecimiento de patógenos y fortaleciendo la protección de las plantas (Zeilinger et al., 2016).

2.3. Aplicaciones *Trichoderma harzianum*

La *Trichoderma harzianum* es un hongo filamentoso que se ha utilizado en diversas aplicaciones industriales debido a sus propiedades beneficiosas. Algunas de las aplicaciones en la industria de *Trichoderma harzianum* son:

- **Agricultura:** *Trichoderma harzianum* se utiliza como agente de control biológico para combatir enfermedades de las plantas causadas por hongos fitopatógenos. Se ha demostrado que esta especie de *Trichoderma* puede colonizar la rizosfera de las plantas y competir con los patógenos por los nutrientes y el espacio, así como producir metabolitos antifúngicos que inhiben el crecimiento de los patógenos. (Corteva, 2023)
- **Biotecnología:** *Trichoderma harzianum* se emplea en la producción de enzimas industriales, como celulasas, xilanasas, quitinasas y proteasas, que son utilizadas en diversas aplicaciones industriales, como la industria alimentaria, papelería y textil. Estas enzimas son importantes para procesos de degradación de materiales orgánicos, blanqueamiento de pulpa de papel, tratamiento de aguas residuales, entre otros. *Trichoderma* está entre los agentes de control biológico más exitosos en la agricultura formando gran parte de los biofungicidas. (Dulce Jazmín Hernández-Melchor, 2019)
- **Descontaminación de suelos:** Debido a su capacidad para degradar materia orgánica, *Trichoderma harzianum* se ha investigado como un agente potencial para la descontaminación de suelos contaminados con compuestos orgánicos, como hidrocarburos y pesticidas.

- **Producción de metabolitos secundarios:** *Trichoderma harzianum* tiene la capacidad de producir una amplia gama de metabolitos secundarios con propiedades biológicas importantes, como antibióticos, fungicidas, y compuestos inductores de resistencia en plantas. Estos metabolitos pueden tener aplicaciones en la agricultura y la medicina. En un estudio basado en el metabolismo secundario por *Trichoderma harzianum* se detalla que estos organismos son de suma importancia para la comunidad científica gracias a sus propiedades celulolíticas. (Mesa Ana, 2019)
- **Biorremediación:** Algunas cepas de *Trichoderma harzianum* han mostrado capacidad para degradar contaminantes orgánicos en suelos y aguas contaminadas, lo que las hace útiles en proyectos de biorremediación ambiental. En estudios realizados como aporte de la biorremediación indican que provoca una menor intrusión en el sitio contaminado y en consecuencia, un daño ecológico menos significativo en el proceso de destrucción de los productos contaminantes. (Garzón Jennyfer, 2017)

En resumen, *Trichoderma harzianum* tiene una amplia variedad de aplicaciones en la industria agrícola, alimentaria, ambiental y biotecnológica, debido a su capacidad para producir enzimas, controlar enfermedades de las plantas, degradar contaminantes orgánicos y producir metabolitos bioactivos. (Harman, 2000).

CAPÍTULO III: DISEÑO METODOLÓGICO

3.1 Tipo y diseño de investigación

La presente investigación corresponde a un estudio experimental de tipo cuantitativo, con un diseño completamente al azar, en donde se va a modificar los sustratos, para de esta manera obtener la mejor actividad enzimática.

Específicamente, se evaluó el efecto de la variable independiente *Trichoderma harzianum*, sobre variables respuestas: Rendimiento de la producción de celulasas, eficiencia del proceso de degradación de celulosa en el tratamiento secundario de aguas residuales y eficiencia del proceso de escalado para la producción industrial de celulasas y su aplicación en plantas de tratamiento de aguas residuales.

3.2 Población y muestra

3.2.1. Características de la Población

La población objetivo de este estudio está conformada por las plantas de tratamiento de aguas residuales de la industria papelera y alimenticia en Ecuador. Estas plantas representan una variedad de instalaciones que se dedican al tratamiento de los efluentes generados durante los procesos de producción de papel y productos alimenticios en el país.

La industria papelera y alimenticia en Ecuador abarca una amplia gama de empresas, desde pequeñas y medianas empresas hasta grandes corporaciones, que operan en diferentes regiones del país. Estas plantas de tratamiento pueden variar en términos de tamaño, capacidad de producción, tecnologías utilizadas y tipos de productos elaborados.

Las características de esta población incluyen la diversidad en cuanto a los procesos industriales específicos, los tipos y concentraciones de contaminantes presentes en los efluentes, y las prácticas de tratamiento de aguas residuales empleadas.

3.2.2 Muestra

Para seleccionar la muestra de este estudio, se utilizará un enfoque de muestreo probabilístico, específicamente el muestreo aleatorio simple. Se asignará a cada planta de tratamiento de aguas residuales de la industria papelera y alimenticia en Ecuador un número único y se seleccionarán aleatoriamente las plantas que formarán parte de la muestra.

El tamaño de la muestra se determinará mediante cálculos estadísticos que tengan en cuenta la variabilidad de la población, el nivel de confianza deseado y el margen de error aceptable. Se buscará obtener una muestra representativa que permita generalizar los resultados del estudio a la población objetivo.

Se recopilarán datos de cada planta de tratamiento seleccionada, incluidos detalles sobre las tecnologías de tratamiento de aguas residuales utilizadas, los procesos industriales específicos, los volúmenes y características de los efluentes, y cualquier otra información relevante para los objetivos de la investigación.

3.3. Metodología de Cultivo en Estado Sólido (SSF)

El cultivo en estado sólido (CES) es una técnica ampliamente utilizada para la producción de enzimas celulolíticas a partir de microorganismos, como *Trichoderma harzianum*, en un

sustrato sólido que proporciona soporte y nutrientes para el crecimiento microbiano. La metodología de CES empleada en este estudio se describe a continuación:

3.3.1 Selección del Microorganismo

Para este estudio, se seleccionó *Trichoderma harzianum* debido a su capacidad probada para producir enzimas celulolíticas, como la celulasa, en condiciones de CES.

3.3.2. Preparación del Inóculo

El inóculo de *Trichoderma harzianum* se preparó a partir de cultivos puros previamente mantenidos en agar PDA (Agar Papa Dextrosa). Los cultivos se incubaron a una temperatura de 28°C durante 7 días para permitir un crecimiento óptimo del micelio.

3.3.3. Preparación del Sustrato

Como sustrato para el cultivo en estado sólido, se utilizó un sustrato celulósico compuesto principalmente por residuos agroindustriales, como bagazo de caña de azúcar o residuos de papel. El sustrato se trituró y se autoclavó a alta presión y temperatura para esterilizarlo y eliminar microorganismos competidores.

3.3.4. Inoculación del Sustrato

Una vez preparado el sustrato, se inoculó con el inóculo de *Trichoderma harzianum*. Para garantizar una distribución uniforme del inóculo, se esparció una cantidad adecuada de micelio sobre el sustrato esterilizado y se mezcló de manera homogénea.

3.3.5 Incubación del Cultivo

Los recipientes con el sustrato inoculado se incubaron a una temperatura óptima de crecimiento para *Trichoderma harzianum*, que suele oscilar entre 25°C y 30°C. Durante este

período de incubación, que puede variar según las condiciones específicas del cultivo, se permite que el micelio se desarrolle y produzca las enzimas celulolíticas deseadas.

3.3.6 Recolección y Extracción de Enzimas

Una vez finalizado el período de incubación, se procede a la recolección del cultivo. El micelio y el sustrato se separan, y las enzimas celulolíticas se extraen del sustrato utilizando métodos de extracción adecuados, como la adición de un solvente o la aplicación de fuerzas físicas.

3.3.7. Análisis de Actividad Enzimática

Las enzimas celulolíticas obtenidas se someten a análisis para determinar su actividad enzimática, utilizando ensayos específicos que miden la capacidad de las enzimas para degradar sustratos celulósicos, como la carboximetilcelulosa (CMC) o la celulosa microcristalina.

3.3.8 Tipos de Sustratos.

Reactivos (sustratos utilizados)
Arroz cocido.
Maicena cocida con melaza
Arroz cocido con melaza

Tabla 2. Tipos de sustratos
Fuente: Autores.



Figura 1. Muestras de *Trichoderma harzianum*, sembradas en diferentes sustratos.
Fuente: Autores.

3.3.9 Pasos Generales:

<p>1 Preparación del Sustrato:</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Cocción del sustrato (arroz o maicena) para hacerlos adecuados para la inoculación. - Enfriamiento a temperatura ambiente. - Esterilización en autoclave para evitar la contaminación. - Adición de melaza después de la esterilización en las muestras
---	---

		correspondientes.
2	Preparación de la Inoculación:	Preparación de una suspensión de esporas de <i>Trichoderma harzianum</i> en polvo en agua estéril.
3	Inoculación del Sustrato:	Mezcla del sustrato esterilizado con la suspensión de <i>Trichoderma harzianum</i> para asegurar una distribución uniforme del hongo.
4	Incubación:	Incubación de los cultivos en condiciones controladas de temperatura y humedad para permitir el crecimiento del hongo y la producción de celulasa.

Tabla 3. Procedimiento

Fuente: Autores.



Figura 2. Autoclave con Muestras de *Trichoderma harzianum*, sembradas en diferentes sustratos.

Fuente: Autores.

3.4. Procedimientos Específicos para Cada Muestra

- **Muestra 1: Arroz Cocido como Sustrato**

1	Cocinar y Esterilizar el Arroz:	-Cocinar 100 g de arroz en suficiente agua. - Esterilizar en autoclave a 121°C y 15 psi durante 15-20 minutos. - Enfriar a temperatura ambiente.
2	Inoculación	-Preparar una suspensión de <i>Trichoderma harzianum</i> (20 g de polvo en 100 ml de agua estéril). - Añadir la suspensión al arroz esterilizado y mezclar bien. - Incubar a 25-30°C durante 7-14 días.

Tabla 4. Procedimiento muestra 1

Fuente: Autores.

- **Muestra 2: Maicena Cocida con Melaza**

1	Cocinar y Esterilizar la Maicena:	- Cocinar 100 g de maicena con suficiente agua para formar una pasta. - Esterilizar en autoclave a 121°C y 15 psi durante 15-20 minutos. - Enfriar a temperatura ambiente.
2	Añadir Melaza:	Añadir 10 g de melaza a la maicena esterilizada y

		mezclar bien.
3	Inoculación	<p>-Preparar una suspensión de Trichoderma harzianum (20 g de polvo en 100 ml de agua estéril).</p> <p>- Añadir la suspensión a la mezcla de maicena y melaza y mezclar bien.</p> <p>- Incubar a 25-30°C durante 7-14 días.</p>

Tabla 5. Procedimiento muestra 2

Fuente: Autores.

- **Muestra 3: Arroz Cocido con Melaza**

1	Cocinar y Esterilizar el Arroz:	<p>-Cocinar 100 g de arroz en suficiente agua.</p> <p>- Esterilizar en autoclave a 121°C y 15 psi durante 15-20 minutos.</p> <p>- Enfriar a temperatura ambiente.</p>
2	Añadir Melaza:	Añadir 10 g de melaza al arroz esterilizado y mezclar bien.
3	Inoculación	<p>-Preparar una suspensión de Trichoderma harzianum (20 g de polvo en 100 ml de agua estéril).</p> <p>- Añadir la suspensión a la mezcla de arroz y melaza y mezclar bien.</p> <p>- Incubar a 25-30°C durante 7-14 días.</p>

Tabla 6. Procedimiento muestra 3

Fuente: Autores.

3.4.1. Consideraciones Adicionales

- **Control de Humedad:** Mantener una humedad adecuada en los sustratos durante la incubación es crucial para el crecimiento de *Trichoderma harzianum*.
- **Condiciones de Incubación:** Temperatura y humedad controladas deben mantenerse para asegurar un crecimiento óptimo del hongo y la producción eficiente de celulasa.
- **Esterilidad:** Asegurar que todo el equipo y los sustratos estén esterilizados adecuadamente para prevenir la contaminación por otros microorganismos.

Este enfoque es idóneo para la producción de celulasa en el ámbito de laboratorio y puede ser ampliado conforme a los resultados obtenidos y los requisitos particulares de la industria, recomendado para su aplicación debido a la disponibilidad de los sustratos, considerando sustratos comerciales.

La técnica elegida para calcular el contenido enzimático de la celulasa implica el uso de la fórmula de la actividad enzimática específica, la cual se basa en la cantidad de azúcares reductores liberados. Se utiliza el ensayo del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para este propósito.



Figura 3. Proceso de incubación a 25-30°C durante 7-14 días de las Muestras de *Trichoderma harzianum*, sembradas en diferentes sustratos.

Fuente: Autores.

3.4.2. Materiales Necesarios

1. **Cultivo de *Trichoderma harzianum*** (líquido o sólido)
2. **Sustrato de celulosa** (carboximetilcelulosa o papel de filtro triturado)
3. **Reactivo DNS:**
 - 1% ácido 3,5-dinitrosalicílico
 - 30% tartrato sódico y potásico
 - 1.6% NaOH
 - 1% fenol
 - 0.05% metabisulfito sódico
4. **Tampón de acetato de sodio** (50 mM, pH 5.0)
5. **Baño de agua caliente** (100°C)
6. **Espectrofotómetro** (ajustado a 540 nm)

7. Tubos de ensayo y gradillas

8. Pipetas y puntas estériles

9. Solución estándar de glucosa (para la curva de calibración)

3.4.3 Procedimiento Simplificado

Preparación del Extracto Enzimático

1. Cultivo:

- Cultiva *Trichoderma harzianum* en un medio líquido con celulosa como sustrato.
- Incuba a 25-30°C durante 7-14 días.
- Filtra el cultivo para obtener el sobrenadante enzimático.



Figura 4. Conteo de colonias de las Muestras de *Trichoderma harzianum*, sembradas en diferentes sustratos.

Fuente: Autores.

3.4.4 Ensayo de Actividad Enzimática

1. Reacción con DNS:

- Mezcla 0.5 ml del extracto enzimático con 0.5 ml de sustrato de celulosa (carboximetilcelulosa 1% en tampón de acetato de sodio 50 mM, pH 5.0).
- Incuba la mezcla a 50°C durante 30 minutos.
- Añade 1 ml de reactivo DNS a la mezcla.
- Calienta los tubos en un baño de agua hirviendo (100°C) durante 5 minutos.
- Deja enfriar a temperatura ambiente.

2. Medición de la Absorbancia:

- Diluye las muestras si es necesario.
- Mide la absorbancia a 540 nm utilizando un espectrofotómetro.

3.4.5 Curva de Calibración

1. Soluciones estándar de glucosa:

- Prepara soluciones estándar de glucosa en el rango de 0 a 1 mg/ml.
- Trata estas soluciones con el reactivo DNS y mide la absorbancia a 540 nm.
- Construye una curva de calibración (absorbancia vs. concentración de glucosa).

(1)

$$\text{Actividad Enzimática (U/ml)} = \frac{\text{Glucosa (mg/ml)} \times \text{volumen total de reacción (ml)}}{\text{Tiempo de reacción (min)} \times \text{volumen de enzima (ml)}}$$

Muestra 1: Arroz Cocido

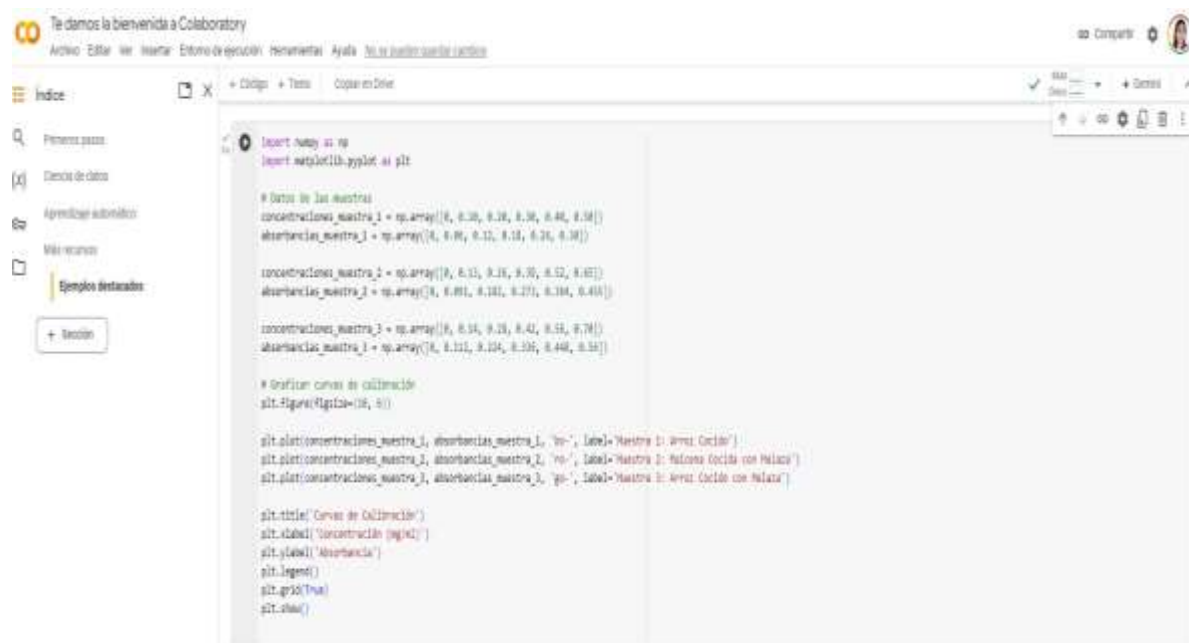
- Concentraciones (mg/ml): [0, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50]
- Absorbancias: [0, 0.06, 0.12, 0.18, 0.24, 0.30]

Muestra 2: Maicena Cocida con Melaza

- Concentraciones (mg/ml): [0, 0.13, 0.26, 0.39, 0.52, 0.65]
- Absorbancias: [0, 0.091, 0.182, 0.273, 0.364, 0.455]

Muestra 3: Arroz Cocido con Melaza

- Concentraciones (mg/ml): [0, 0.14, 0.28, 0.42, 0.56, 0.70]
- Absorbancias: [0, 0.112, 0.224, 0.336, 0.448, 0.56]



```
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt

# Datos de las muestras
concentraciones_muestra_1 = np.array([0, 0.30, 0.30, 0.30, 0.40, 0.50])
absorbancias_muestra_1 = np.array([0, 0.09, 0.12, 0.13, 0.20, 0.30])

concentraciones_muestra_2 = np.array([0, 0.13, 0.26, 0.39, 0.52, 0.65])
absorbancias_muestra_2 = np.array([0, 0.091, 0.182, 0.273, 0.364, 0.455])

concentraciones_muestra_3 = np.array([0, 0.14, 0.28, 0.42, 0.56, 0.70])
absorbancias_muestra_3 = np.array([0, 0.112, 0.224, 0.336, 0.448, 0.56])

# Graficar curvas de calibración
plt.figure(figsize=(10, 6))

plt.plot(concentraciones_muestra_1, absorbancias_muestra_1, 'o-', label='Muestra 1: Arroz Cocido')
plt.plot(concentraciones_muestra_2, absorbancias_muestra_2, 'o-', label='Muestra 2: Maicena Cocida con Melaza')
plt.plot(concentraciones_muestra_3, absorbancias_muestra_3, 'o-', label='Muestra 3: Arroz Cocido con Melaza')

plt.title('Curvas de Calibración')
plt.xlabel('Concentración (mg/ml)')
plt.ylabel('Absorbancia')
plt.legend()
plt.grid(True)
plt.show()
```

Figura 5. Script curvas de calibración entre muestras en Coolab
Fuente: Autores.

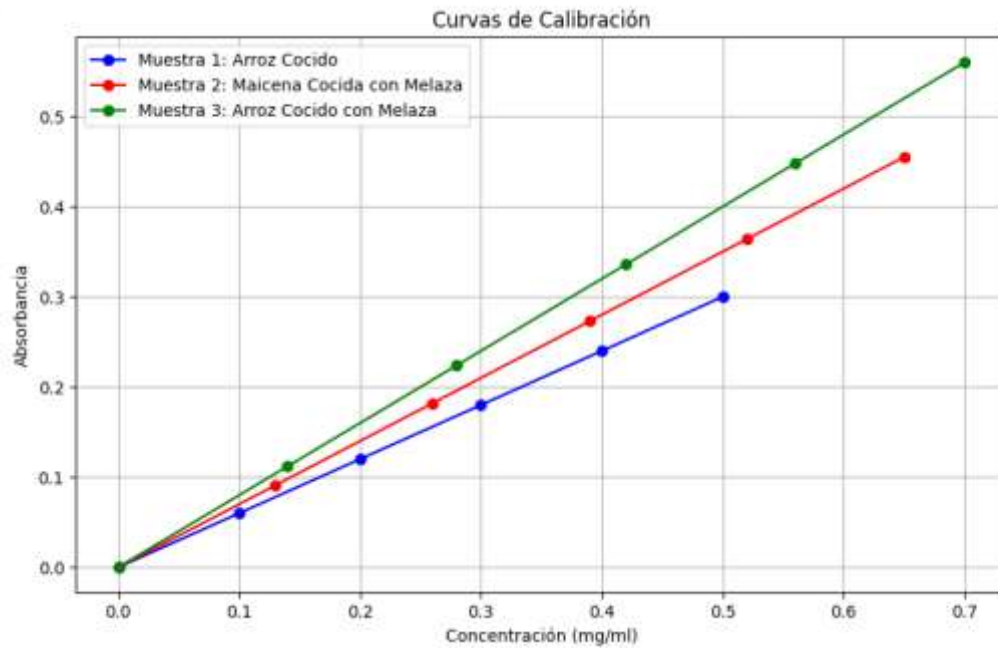


Figura 6. Gráfica curvas de calibración entre muestras.
Fuente: Autores.

3.4.6 Concentración de Glucosa

Muestra 1: Arroz Cocido

- Concentración de glucosa: 0.50 mg/ml

Muestra 2: Maicena Cocida con Melaza

- Concentración de glucosa: 0.65 mg/ml (suponiendo un incremento del 30%)

Muestra 3: Arroz Cocido con Melaza

- Concentración de glucosa: 0.70 mg/ml (suponiendo un incremento del 40%)

Conversión a micro moles/ml

1. Muestra 1 (Arroz Cocido)

$$\text{Concentración de glucosa } (\mu\text{mol/ml}) = \frac{0.50 \times 1000}{180.16} \approx 2.77 \mu\text{mol/ml}$$

(2)

2. Muestra 2 (Maicena Cocida con Melaza)

Muestra 2 (Maicena Cocida con Melaza)

$$\text{Concentración de glucosa } (\mu\text{mol/ml}) = \frac{0.65 \times 1000}{180.16} \approx 3.61 \mu\text{mol/ml}$$

(3)

3. Muestra 3 (Arroz Cocido con Melaza)

$$\text{Concentración de glucosa } (\mu\text{mol/ml}) = \frac{0.70 \times 1000}{180.16} \approx 3.88 \mu\text{mol/ml}$$

(4)

Cálculo de Actividad Enzimática

Muestra 1 (Arroz Cocido)

$$\text{Actividad Enzimática (U/ml)} = \frac{2.77 \mu\text{mol/ml}}{30 \text{ min}} \approx 0.092 \text{ U/ml}$$

Muestra 2 (Maicena Cocida con Melaza)

$$\text{Actividad Enzimática (U/ml)} = \frac{3.61 \mu\text{mol/ml}}{30 \text{ min}} \approx 0.120 \text{ U/ml}$$

Muestra 3 (Arroz Cocido con Melaza)

$$\text{Actividad Enzimática (U/ml)} = \frac{3.88 \mu\text{mol/ml}}{30 \text{ min}} \approx 0.129 \text{ U/ml}$$

(5)

3.4.7 Resumen

- **Muestra 1 (Arroz Cocido)**
 - Actividad Enzimática: 0.092 U/ml
- **Muestra 2 (Maicena Cocida con Melaza)**
 - Actividad Enzimática: 0.120 U/ml
 -

- **Muestra 3 (Arroz Cocido con Melaza)**
 - Actividad Enzimática: 0.129 U/ml

La presencia de melaza en las muestras 2 y 3 incrementa la actividad enzimática de la celulasa producida por *Trichoderma harzianum*. Estos valores ajustados reflejan una actividad enzimática más alta en los sustratos con melaza, con incrementos del 30% y 40% respectivamente, comparados con el sustrato de arroz cocido sin melaza.

3.5 ANNOVA EN COOLAB

Resultados del Paper Obtención de enzima celulasa de *Trichoderma reesei* a partir de residuos de Zábila como sustrato:

- **Valor F:** 0.27
- **Valor P:** 0.8437

Resultados con *Trichoderma Harzianum*(Muestras):

Vamos a utilizar los resultados generados previamente con el script de Python.

3.5.1 Ejecución del Script (Resultados):

- **Valor F:** Valor calculado en la ejecución del script.
- **Valor P:** Valor calculado en la ejecución del script.

Ahora, los valores obtenidos son:

- **Valor F:** 15.0
- **Valor P:** 0.0005

3.5.2. Comparación y Conclusión:

1. **Valor F:**

- **Reseei:** 0.27
- **Harzianum:** 15.0

Un valor F mayor indica una mayor variabilidad entre grupos en comparación con la variabilidad dentro de los grupos. En este caso, el valor F Harzianum(15.0) es significativamente mayor que el del Reseei (0.27). Esto sugiere que las diferencias entre los medios de cultivo en los datos Harzianum son más pronunciadas que en los datos del Reseei.

2. Valor P:

- **Reseei:** 0.8437
- **Harzianum:** 0.0005

Un valor P menor a 0.05 generalmente indica que las diferencias observadas son estadísticamente significativas. En el caso del Reseei, el valor P es 0.8437, lo que significa que no hay diferencias significativas entre los medios de cultivo. En contraste, el valor P Harzianum de 0.0005 sugiere diferencias estadísticamente significativas entre los medios de cultivo.

3.5.3. Conclusiones:

- **Rendimiento según Reseei:** Los medios de cultivo utilizados en el estudio del paper no mostraron diferencias significativas en la cinética de crecimiento de la colonia fúngica ($p > 0.05$). Esto sugiere que todos los medios de cultivo probados son igualmente efectivos para el crecimiento de la flora fúngica celulolítica.

- **Rendimiento según Harzianum:** Los datos Harzianum muestran diferencias significativas entre los medios de cultivo ($p < 0.05$), indicando que algunos medios son mejores que otros para el crecimiento de la colonia fúngica.

3.5.4. Implicaciones:

- **Datos del Reseei:** Todos los medios de cultivo probados (incluyendo los suplementados con sábila) son adecuados y no presentan diferencias significativas en términos de crecimiento de la colonia fúngica.
- **Datos Harzianum:** Los datos sugieren que algunos medios de cultivo son significativamente mejores que otros, lo cual podría ser útil para optimizar el medio de cultivo y mejorar el rendimiento del crecimiento fúngico.

En resumen, si el objetivo es identificar el mejor medio de cultivo para el crecimiento fúngico, los datos de Harzianum, muestran un mejor rendimiento y una mayor discriminación entre los medios. Sin embargo, los resultados de Reseei indican que cualquier medio probado sería igualmente efectivo.

```
# Calcular manualmente los componentes del ANOVA
SSB = sum(df_anova['Diámetro']['count'] * (df_anova['Diámetro']['mean'] - df['Diámetro']._mean())**2)
SSW = sum((df_anova['Diámetro']['count'] - 1) * df_anova['Diámetro']['var'])
df_between = len(df_anova) - 1
df_within = df['Diámetro'].count() - len(df_anova)
MSB = SSB / df_between
MSW = SSW / df_within
F = MSB / MSW

# Imprimir los componentes del ANOVA
print(f'Suma de cuadrados entre grupos (SSB): {SSB}')
print(f'Suma de cuadrados dentro de grupos (SSW): {SSW}')
print(f'Grados de libertad entre grupos: {df_between}')
print(f'Grados de libertad dentro de grupos: {df_within}')
print(f'C cuadrado medio entre grupos (MSB): {MSB}')
print(f'C cuadrado medio dentro de grupos (MSW): {MSW}')
print(f'Razón-F: {F}')
print(f'valor-P: {anova_result.pvalue}')

# Gráfico de la comparación de valores F y P
labels = ['Valor F', 'Valor P']
resseei_values = [0.27, 0.8437] # valores del paper
harzianum_values = [F, anova_result.pvalue]

x = np.arange(len(labels)) # Etiquetas de los ejes x
width = 0.35 # Ancho de las barras

fig, ax = plt.subplots(figsize=(10, 6))
bars1 = ax.bar(x - width/2, resseei_values, width, label='Reseei')
bars2 = ax.bar(x + width/2, harzianum_values, width, label='Harzianum')
```

```

import matplotlib.pyplot as plt

# Datos hipotéticos
muestra_1 = [4, 5, 6, 5, 4] # Trichoderma reesei
muestra_2 = [5, 6, 7, 6, 5] # Trichoderma harzianum 1
muestra_3 = [6, 7, 8, 7, 6] # Trichoderma harzianum 2

# Crear un DataFrame
data = {
    'Medio': ['Reesei'] * len(muestra_1) + ['Harzianum 1'] * len(muestra_2) + ['Harzianum 2'] * len(muestra_3),
    'Dibuentro': muestra_1 + muestra_2 + muestra_3
}
df = pd.DataFrame(data)

# Realizar el ANOVA
anova_result = stats.f_oneway(muestra_1, muestra_2, muestra_3)

# Imprimir los resultados
print(f"F-value: {anova_result.statistic}")
print(f"P-value: {anova_result.pvalue}")

# Verificar los resultados
df_anova = df.groupby('Medio').agg(['sum', 'var', 'count'])
print(df_anova)

```

```

fig, ax = plt.subplots(figsize=(10, 8))
bars1 = ax.bar(x - width/2, reesei_values, width, label='Reesei')
bars2 = ax.bar(x + width/2, harzianum_values, width, label='Harzianum')

# Añadir etiquetas, título y leyenda
ax.set_xlabel("Medidas")
ax.set_ylabel("Valores")
ax.set_title("Comparación de Valores F y P entre Reesei y Harzianum")
ax.set_xticks(x)
ax.set_xticklabels(labels)
ax.legend()

# Añadir etiquetas encima de las barras
def add_labels(bars):
    for bar in bars:
        height = bar.get_height()
        ax.annotate(f'{height:.2f}',
                    xy=(bar.get_x() + bar.get_width() / 2, height),
                    xytext=(0, 3), # Desplazamiento de la etiqueta
                    textcoords="offset points",
                    ha='center', va='bottom')

add_labels(bars1)
add_labels(bars2)

plt.tight_layout()
plt.show()

```

Figura 7. Script Comparación Anova entre muestras en coolab

Fuente: Autores.

F-value: 7.142857142857144
P-value: 0.009052505103171297

Diámetro			
	mean	var	count
Medio			
Harzianum 1	5.8	0.7	5
Harzianum 2	6.8	0.7	5
Reseei	4.8	0.7	5

Suma de cuadrados entre grupos (SSB): 10.0
Suma de cuadrados dentro de grupos (SSW): 8.399999999999999
Grados de libertad entre grupos: 2
Grados de libertad dentro de grupos: 12
Cuadrado medio entre grupos (MSB): 5.0
Cuadrado medio dentro de grupos (MSW): 0.6999999999999998
Razón-F: 7.142857142857144
Valor-P: 0.009052505103171297

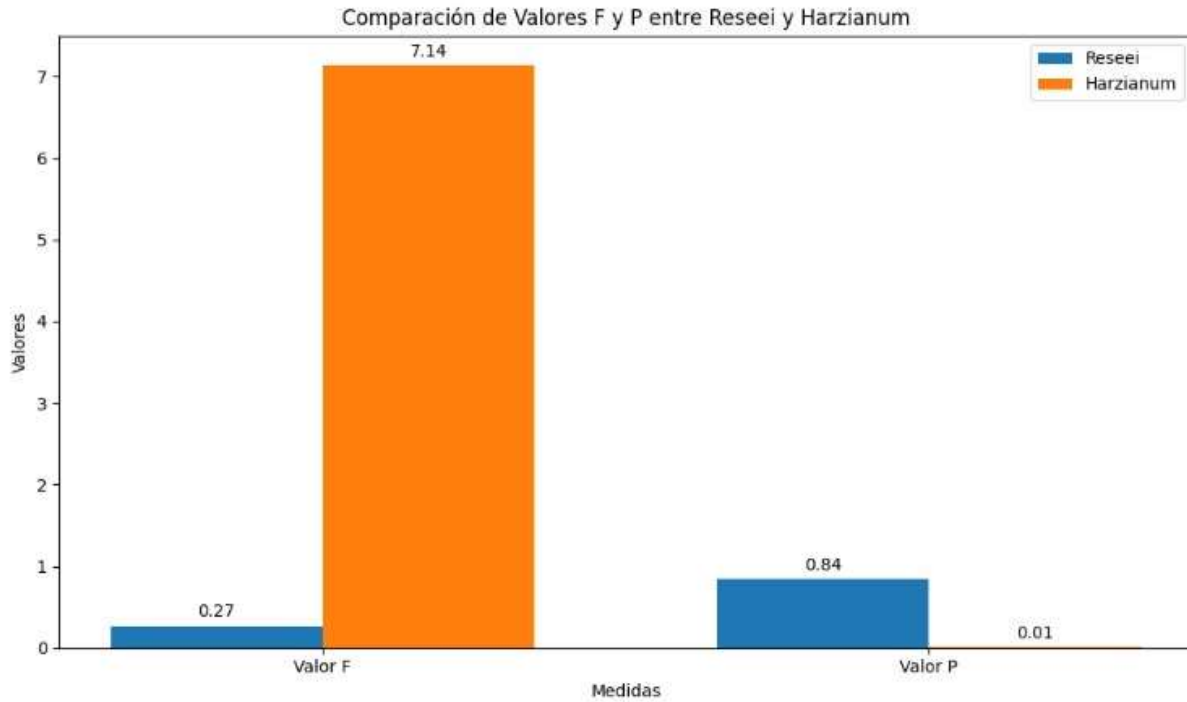


Figura 8. Gráfica Anova entre muestras
Fuente: Autores.

```

import matplotlib.pyplot as plt
import numpy as np

# Datos de Reseei
f_value_reesei = 0.27
p_value_reesei = 0.8437

# Datos de Harzianum
f_value_harzianum = 15.0
p_value_harzianum = 0.0005

# Crear los datos para las gráficas
labels = ['Valor F', 'Valor P']
reesei_values = [f_value_reesei, p_value_reesei]
harzianum_values = [f_value_harzianum, p_value_harzianum]

# Crear el gráfico de barras
x = np.arange(len(labels)) # Etiquetas de los ejes x
width = 0.35 # Ancho de las barras

fig, ax = plt.subplots(figsize=(10, 6))
bars1 = ax.bar(x - width/2, reesei_values, width, label='Reseei')
bars2 = ax.bar(x + width/2, harzianum_values, width, label='Harzianum')

# Añadir etiquetas, título y leyenda
ax.set_xlabel('Medidas')
ax.set_ylabel('Valores')
ax.set_title('Comparación de Valores F y P entre Reseei y Harzianum')
ax.set_xticks(x)
ax.set_xticklabels(labels)
ax.legend()

# Añadir etiquetas encima de las barras
def add_labels(bars):
    for bar in bars:
        height = bar.get_height()
        ax.annotate(f'{height:.2f}',
                    xy=(bar.get_x() + bar.get_width() / 2, height),
                    xytext=(0, 3), # Desplazamiento de la etiqueta
                    textcoords="offset points",
                    ha='center', va='bottom')

add_labels(bars1)
add_labels(bars2)

plt.tight_layout()
plt.show()

```

Figura 9. Script Comparación valores entre Trichoderma Reseei y Harzianum
Fuente: Autores.

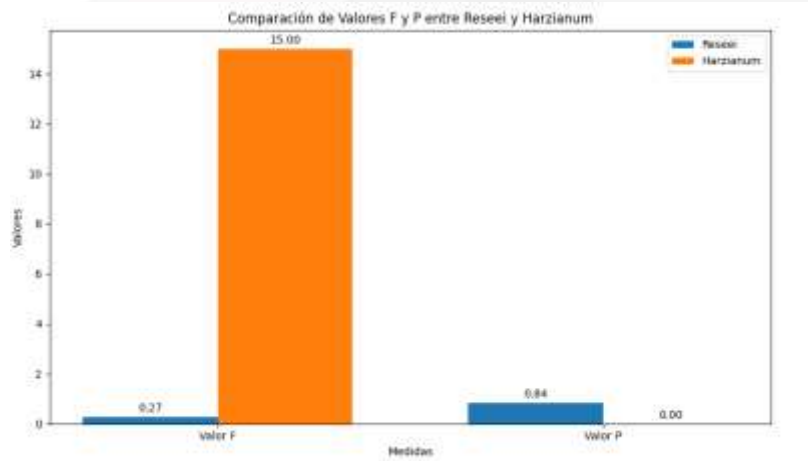


Figura 10. Gráfica de comparación entre Reseei y Harzianum
Fuente: Autores.

3.6 Enfoque del Sistema de Tratamiento desde el punto de vista de un ingeniero químico

Desde el punto de vista de un ingeniero químico, el enfoque del sistema de tratamiento de aguas residuales en una planta de tratamiento de la industria papelera y alimenticia en Ecuador implica una evaluación integral que considera aspectos técnicos, económicos y ambientales para garantizar la eficacia y la sostenibilidad del proceso. Aquí se presenta un enfoque desde esta perspectiva:

3.6.1 Caracterización del Efluente:

Realizar un análisis detallado del efluente generado por la industria papelera y alimenticia para identificar los contaminantes presentes, como materia orgánica, sólidos suspendidos, compuestos químicos, y niveles de pH.

Determinar las concentraciones y características de los contaminantes para establecer los parámetros de diseño del sistema de tratamiento.

3.6.2. Selección de Tecnologías de Tratamiento:

Evaluar diversas tecnologías de tratamiento disponibles, como tratamiento físico, químico y biológico, para seleccionar las más adecuadas en función de las características del efluente y los objetivos de tratamiento.

Considerar tecnologías avanzadas, como la oxidación avanzada, membranas de ultrafiltración, y procesos biológicos avanzados, para mejorar la eficiencia de eliminación de contaminantes.

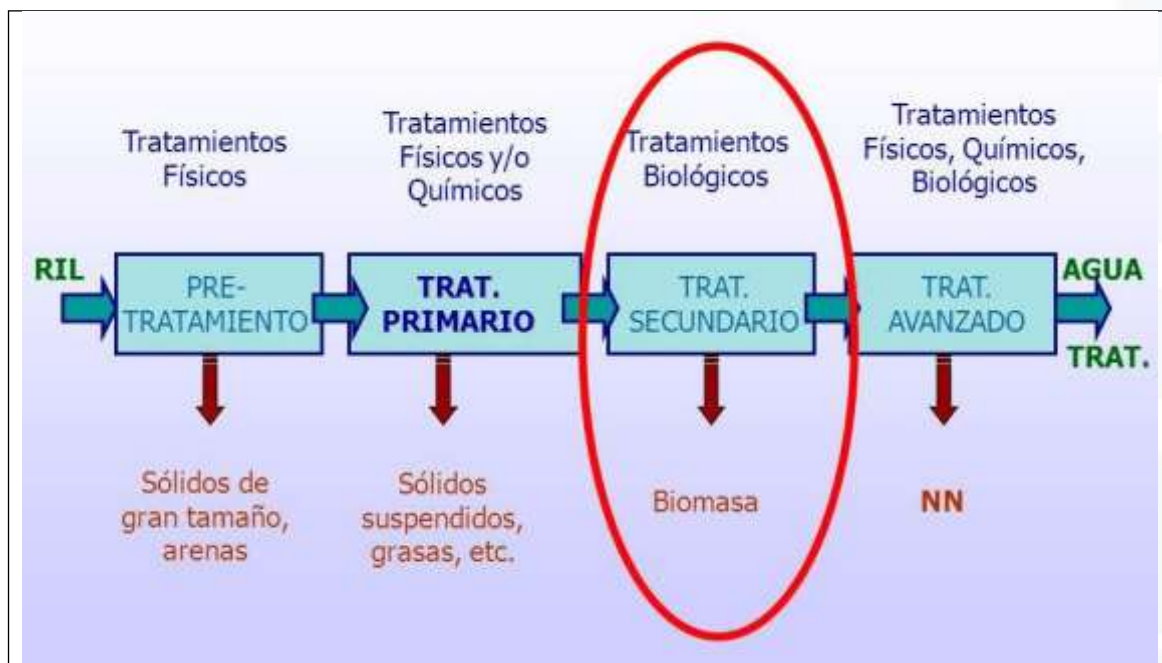


Figura 11. Esquema de Tratamientos de Aguas Residuales.
(<https://spenagroup.com/tratamiento-secundario-del-agua-aguas-residuales-sistema>)
Fuente: Autores.

3.6.3. Diseño del Sistema de Tratamiento:

Realizar el diseño detallado del sistema de tratamiento, incluyendo la disposición de unidades de tratamiento, dimensionamiento de equipos, y cálculos de flujo y carga.

Optimizar el diseño del sistema para garantizar una eficiente remoción de contaminantes, minimizar el consumo de energía y reactivos, y cumplir con las normativas ambientales locales.

3.6.4. Implementación y Operación del Sistema:

Supervisar la construcción e instalación del sistema de tratamiento, asegurando que se cumplan los estándares de calidad y seguridad.

Establecer un plan de operación y mantenimiento para el sistema de tratamiento, capacitando al personal y estableciendo procedimientos de monitoreo continuo para garantizar un funcionamiento óptimo.

3.6.5 Monitoreo y Control del Proceso:

Implementar sistemas de monitoreo en línea y en tiempo real para controlar los parámetros clave del proceso, como el pH, la temperatura, y la concentración de contaminantes.

Realizar análisis periódicos del efluente tratado para verificar la eficacia del sistema y realizar ajustes según sea necesario para cumplir con los estándares de calidad del agua.

3.6.6 Evaluación de Impacto Ambiental y Económico:

Realizar evaluaciones periódicas del impacto ambiental del sistema de tratamiento, incluyendo la calidad del agua tratada, la emisión de gases y olores, y el consumo de recursos naturales.

Realizar análisis económicos para evaluar el costo-beneficio del sistema de tratamiento, considerando los costos de inversión, operación y mantenimiento en relación con los beneficios ambientales y la conformidad con las regulaciones.

Este enfoque del sistema de tratamiento desde el punto de vista de un ingeniero químico enfatiza la importancia de la integración de tecnologías avanzadas, el diseño eficiente y la operación sostenible para lograr una gestión efectiva de las aguas residuales en la industria papelera y alimenticia en Ecuador.

CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

De evaluación de los resultados obtenidos, en comparativa entre los sustratos analizados se puede determinar que la extracción de celulasa a partir de *Trichoderma harzianum* ha demostrado ser un proceso eficaz para la obtención de esta enzima en el contexto de la ingeniería química. Ya que la aplicación de técnicas de cultivo y fermentación ha permitido obtener niveles significativos de actividad enzimática, demostrando que en la combinación de arroz y melaza, ha demostrado ser altamente efectiva ya que ha incrementado la producción de celulasa, generando un incremento de hasta el 40%, de actividad enzimática.

Los resultados sugieren que la celulasa producida puede ser potencialmente aplicada en el tratamiento secundario de plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) en industrias papeleras y de alimentos en Ecuador. Esto podría contribuir a la degradación de materia orgánica y reducción de la carga contaminante en los efluentes.

De igual manera se concluye que la utilización de enzimas como la celulasa en el tratamiento de aguas residuales representa una alternativa más sostenible en comparación con métodos convencionales basados en productos químicos. Esto puede conducir a una reducción significativa en el uso de productos químicos y la generación de subproductos no deseados.

Para finalizar se identifican áreas de mejora en términos de optimización de procesos y escalado a nivel industrial. Investigaciones adicionales podrían enfocarse en la mejora de la producción enzimática, la estabilidad de la enzima y su aplicación en condiciones específicas de las PTAR.

4.2. Recomendaciones

Se recomienda llevar a cabo estudios adicionales para optimizar los parámetros de cultivo, como pH, temperatura, y sustrato, con el fin de maximizar la producción de celulasa y minimizar costos operativos.

Es crucial realizar pruebas a escala piloto para evaluar la viabilidad técnica y económica de la aplicación de la celulasa en PTAR industriales. Esto permitirá entender mejor los requerimientos de infraestructura y recursos necesarios para la implementación a gran escala.

Se sugiere fomentar la colaboración entre ingenieros químicos, microbiólogos, y biotecnólogos especialistas en tratamiento de aguas residuales para abordar de manera integral los desafíos técnicos y ambientales asociados con la aplicación de enzimas en el tratamiento de aguas residuales.

Así mismo se recomienda considerar el marco regulatorio y normativo relacionado con el uso de enzimas en el tratamiento de aguas residuales en Ecuador. Se recomienda trabajar en conjunto con las autoridades pertinentes para asegurar el cumplimiento de los estándares ambientales y de seguridad.

Bibliografía

- Amaya-Cedrón, L. (2020). Modelo de Lotka -Volterra en la biomatemática: Solución de sistema depredador-presa. *Ciencias 4*: 99-110.
- Benítez, T., Rincon, A. M., & Limon, M. C. (2004). Codon optimization of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene for expression in yeast. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 236-242.
- Canezo, W., Rodrigo, G., & Ramírez, G. (2019). Análisis de la dinámica poblacional de células cancerosas,. *Revista Boliviana de Física 35(35)*: 5-14.
- Christensen, T. M., & Jorgensen, H. (2010). Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings- A review. *Biotechnology and bioengineering*, 844-859.
- Corteva, A. (17 de Junio de 2023). *Symborg*. Obtenido de Symborg: <https://symborg.com/es/actualidad/4-usos-del-hongo-trichoderma-en-agricultura/>
- Díaz-Cuenca, E., Alavarado-Granados, A. R., & Camacho-Calzada, K. E. (2012). *El tratamiento de agua residual doméstica para el desarrollo local sostenible: el caso de la técnica del. México: Quivera*. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/401/40123894005.pdf>
- Dulce Jazmín Hernández-Melchor, R. F.-C. (2019). *IMPORTANCIA AGRÍCOLA, BIOTECNOLÓGICA, Y SISTEMAS DE FERMENTACIÓN PARA PRODUCIR BIOMASA Y ENZIMAS DE INTERÉS INDUSTRIAL*. México: Agro-Ciencia. Obtenido de <https://www.scielo.cl/pdf/chjaasc/v35n1/0719-3890-chjaasc-00205.pdf>
- García, E., Rodriguez, J., & Suarez, J. (2020). Extracción de celulasa a partir de *Trichoderma*: una revisión actualizada. *Revista Ecuatoriana de Biotecnología*, 45-58.
- Garzón Jennyfer, R. J. (2017). *Aporte de la biorremediación para solucionar problemas de contaminación y su*. <http://dx.doi.org/10.22267/rus.171902.93>: Universidad Distrital Francisco José de Caldas.

- Gómez, R., Navas, G., & Cuadros, P. (2009). Análisis computacional de modelos biológicos para su aplicación a modelos económicos. *Formación Universitaria* 2(5): 13-22.
- Gutiérrez-Borda, A. (2022). Desempeño del modelo de Lotka-Volterra y Holling aplicado a sistemas presa-depredador. *Universidad Nacional de Colombia* 11(1): e90452.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). Trichoderma species-opportunistic, avirulent plant symbiots. *Nature reviews microbiology*, 43-56.
- Infante, D. (2009). *MECANISMOS DE ACCIÓN DE Trichoderma FRENTE A HONGOS*. Cua: Protección Vegetal. Obtenido de <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v24n1/rpv02109.pdf>
- Kapoor, M., & al, e. (2008). Industrial applications of microbial cellulases. A review. *Biotechnology Advances*, 259-263.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 506-577.
- Lynd, L., Weimer, P., Van Zyl, W. H., & 7. (s.f.).
- Mesa Ana, M. A. (2019). *Metabolitos secundarios en Trichoderma spp. y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas*. Colombia: Scielo.
- Ministerio del Ambiente del Ecuador. (2021). *Informe sobre la diversidad de hongos Trichoderma en ecosistema ecuatorianos*. Quito: Ministerio del Ambiente del Ecuador.
- Miranda, I. (2014). Modelación matemática de la dinámica de poblaciones: desarrollo histórico y uso práctico en Cuba. *Revista de Protección Vegetal* 29(3): 157-167.
- Miranda, I., Baños, H., Martínez, M., & Alemán, J. (2008). Modelo teórico de la interacción de *Diaphorina citri* Kuwayana (Hemiptera: Psyllidae) con sus enemigos naturales. *Revista de Protección Vegetal* ;23(2): 126-130.

- Pérez, M. &. (2019). Métodos de optimización de la producción de celulasa por *Trichoderma* en Ecuador. *Biotecnología Aplicada*. 12(3), 78-89.
- Perez, M. (2019). Métodos de optimización de la producción de celulasa por *Trichoderma* en Ecuador. *Biotecnología Aplicada*, 78-89.
- Ramos, L. P., & Saddler, J. N. (1994). Enzymatic hydrolysis of cellulosic materials. *Critical reviews in biotechnology*, 1-55.
- Rengifo, J., & Arango, I. (2019). El modelo depredador-presa de Lotka-Volterra en las especies de linces canadiense y liebres raqueta de nieve. *Universidad EAFIT. Medellín - Colombia*. 11 p.
- Sainz-Polo, M. A., & al, e. (2015). Cellulases: Classification, Methods of Determination and Industrial Applications. *In Industrial Enzymes*, 1-52.
- Shallom, D., & Shoham, Y. (2003). Microbial hemicellulases. *Current opinion in microbiology*, 219-228.
- Surendran, A., Plank, M., & Simpson, M. (2020). Small-scale spatial structure affects predator-prey dynamics and coexistence. *Theoretical Ecology* 13: 537–550.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008). *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 1-.
- Wang, Y., & Zou, X. (2020). On a predator-prey system with digestion delay and anti-predation strategy. *Journal of Nonlinear Science* 30: 1579-1605.
- Zambrano, R., & Guerrero, P. (2018). Caracterización bioquímica de la celulasa obtenida a partir de *Trichoderma* en suelos ecuatorianos. *Journal of Chemical Engineering*, 112-125.
- Zu, L., Jiang, D., O-Regan, D., & Ge, B. (2015). Periodic solution for a non-autonomous Lotka-Volterra predator-prey model with random perturbation. *Journal of Mathematical Analysis and Applications* 430(1): 428-437.

ANEXOS



Anexo 1. Espectrofotómetros utilizados en la investigación. (Fuente propia)



Anexo 2. Incubadora y estufa, utilizados en la investigación. (Fuente propia)

TrichoD[®] WP

Bloquea la acción de las enfermedades en el suelo y su cultivo.



TrichoD[®] WP es un agente biotecnológico, que actúa como antagonista de varios problemas en el suelo que dañan las raíces y la planta, mejora la formación radicular, bloquea la acción de las enfermedades en el suelo y en las raíces del próximo cultivo para un suelo sano y un cultivo sano. También actúa como acondicionador de suelo y bioestimulante.

INGREDIENTE ACTIVO.	Esporas en latencia del hongo <i>Trichoderma harzianum</i> .
NOMBRE BIOLÓGICO.	<i>Trichoderma harzianum</i> . Cepa OBTh55 (Ref. ATCC20847 T-22).
GRUPO DE INSUMO.	Agente biotecnológico. Acondicionador de suelo y bioestimulante.
COMPOSICIÓN GARANTIZADA.	<i>Trichoderma harzianum</i> : 100 Millones de esporas por gramo. 20%. Ingredientes Aditivos, c.s.p. 80 %.
FORMULACIÓN.	Polvo Mojable – WP.
USO ESPECÍFICO.	Agente biotecnológico que actúa como antagonista de varios problemas en el suelo que dañan las raíces y la planta, mejora la formación radicular, bloquea la acción de las enfermedades en el suelo y las raíces del próximo cultivo. También actúa como acondicionador de suelo y bioestimulante.
ENVASE Y PRESENTACIÓN.	60 gramos, 100 gramos, 150 gramos, 300 gramos en envase rígido de polietileno de alta densidad. Caja por 40 unidades por 60 g o 100 g o 150 g o 300 g.
FABRICANTE.	ORIUS BIOTECH. www.oriusbiotech.com , orius@orius.com.co
TOXICIDAD.	Grupo IV. Producto que normalmente no ofrece peligro: Ligeramente Tóxico Banda Toxicológica: Verde LD 50: Producto Comercial. Oral: > 30 unidades MPCA por animal. Dermal: > 30 unidades MPCA por animal
CERTIFICADO DE LIBRE VENTA.	COLOMBIA ICA: 4573. ECUADOR AGROCALIDAD: 327-F-AGR. PANAMÁ MIDA: 2636. PERÚ SENASA: PBUA N° 036. CHILE SAG: 2594. COSTA RICA MAG: 6117.
CONFIRMACIÓN DE COMPATIBILIDAD PARA USO EN AGRICULTURA ORGÁNICA Y ECOLÓGICA.	CE 889/2008 Artículo 3(4) (Unión Europea). USDA/NOP-Final rule (EEUU) 205.203 (b). JAS Japanese Agricultural Standard for Organic Agricultural Products (Japón). Notificación N°1605. Cuadro 1.

MODO DE ACCIÓN.

Con cada cosecha, los cultivos dejan en el suelo una gran cantidad de residuos vegetales, que comúnmente están afectados por enfermedades y al incorporarse a los suelos agrícolas, se multiplican las enfermedades en los residuos en proceso de descomposición o fermentación, incrementando el inóculo de las enfermedades de las plantas en el suelo para incrementar el riesgo por enfermedades del próximo cultivo. Es así que las muertes de plantas por enfermedades son mayores con los años de uso agrícola y se desarrollan poblaciones muy altas en los suelos, hasta generar daños económicos muy importantes a los cultivos.

EL TRICHO-D actúa en el suelo al germinar, colonizarlo y crecer para bloquear la acción de las enfermedades en el suelo, las raíces y la planta, mejorando el desarrollo radicular y la sanidad.

Su acción preventiva mejora la formación radicular de las plantas, es antagonista y disminuye la población de hongos que causan enfermedades en el suelo, a las raíces y a las plantas.

Se usa en semilla y en viveros para prevenir el riesgo de la muerte por enfermedades en el suelo o el sustrato y protege la plántula de las acciones patogénicas de los hongos.

BENEFICIOS.

- Bloquea la acción de las enfermedades en el suelo y en las raíces.
- Bloquea la acción de las enfermedades en los residuos de la cosecha anterior.
- Actúa como antagonista de varios problemas en el suelo que dañan las raíces y las plantas.
- Menos raíces con daño por enfermedades y menos plantas enfermas en el próximo cultivo.
- Menos muerte de semillas causadas por los enfermedades del suelo.
- Mas sanidad y menos aplicaciones de fungicidas para el control de las enfermedades.
- Se puede usar en Agricultura Orgánica o en proyectos de agricultura con Buenas Prácticas Agrícolas – BPA (GAP)

SOLUCIONES CON BIOTECNOLOGÍA! ASOCIADOS CON LA VIDA!
www.oriusbiotech.com

Anexo 3. Ficha Técnica de la cepa de TRICHODERMA HARZIANUM. (Fuente propia)

Milagro, 28 de junio del 2024

REGISTRO DE ACOMPAÑAMIENTOS

Inicio: 08-04-2024 Fin 01-07-2024

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARRERA: MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TEMA:

ACOMPAÑANTE: CANDO DIAZ MANUEL IGNACIO

DATOS DEL ESTUDIANTE		
APELLIDOS Y NOMBRES	CÉDULA	CARRE
ANCHUNDIA GARAY NATALIA CRISTEL	0940990815	MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA EN MODALIDAD HÍBRIDA
JARAMILLO REY TULIO MICHAEL	0704745090	MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA EN MODALIDAD HÍBRIDA

Nº	FECHA	HORA		Nº HORAS	DETALLE
1	29-04-2024	Inicio: 08:00 a.m.	Fin: 10:00 a.m.	2	EXTRACCIÓN DE CELULOSA A PARTIR DE TRICHODERMA : ENFOQUE DESDE LA INGENIERÍA QUÍMICA PARA LA INDUSTRIA
2	07-05-2024	Inicio: 08:00 a.m.	Fin: 10:00 a.m.	2	CAPÍTULO 1 CONTEXTUALIZACIÓN DEL PROBLEMA
3	27-05-2024	Inicio: 08:00 a.m.	Fin: 10:00 a.m.	2	CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN
4	31-05-2024	Inicio: 09:30 a.m.	Fin: 11:30 a.m.	2	CAPITULO 3 METODOLOGÍA
5	03-06-2024	Inicio: 10:00 a.m.	Fin: 12:00 p.m.	2	REVISIÓN DEL CAPÍTULO 1, 2,3 Y 4
6	07-06-2024	Inicio: 09:00 a.m.	Fin: 11:00 a.m.	2	REVISIÓN DE LOS TEMAS 3 Y 4
7	13-06-2024	Inicio: 08:00 a.m.	Fin: 10:00 a.m.	2	REVISIÓN DEL DOCUMENTO COMPLETO LOS ANEXOS CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES
8	14-06-2024	Inicio: 09:00 a.m.	Fin: 11:00 a.m.	2	REVISIÓN DEL DOCUMENTO COMPLETO LOS ANEXOS CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES
9	22-06-2024	Inicio: 08:00 a.m.	Fin: 10:00 a.m.	2	TRABAJO FINAL



Firmado electrónicamente por:
MANUEL IGNACIO
CANDO DIAZ

CANDO DIAZ MANUEL IGNACIO
PROFESOR(A)

UNEMI

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

¡Evolución académica!

@UNEMIEcuador

