



UNIVERSIDAD NACIONAL DE JUJUY

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS



Facultad de Ciencias
Agrarias

Tesina para optar por el Título de Licenciado en Ciencias
Biológicas:

“Tolerancia a petróleo crudo de cepas autóctonas del genero *Trichoderma* aisladas de suelos contaminados y no contaminados; con potencialidad para la regulación biológica de hongos fitopatógenos. Jujuy, Argentina.”

Hinojosa, Edgardo Gustavo.

Dirección

Directora: Mag. Ing. Agr. Susana Álvarez.

Codirector: Mag. Jorge Baldo.

Tribunal Examinador

Dra. María Graciela del Valle Bovi Mitre.

Ing. Agr. Noemí Bejarano.

Lic. Ana Carranza.

DEDICATORIA

Este Trabajo lo dedico a mi Madre: Dora “La Exploradora” que siempre que está conmigo,
a mis hermanos María Rosa, Beatriz, Norma, Julio y Luis.
A mis sobrinos Carolina, Waldo, Amadeo, Valentín, Nicolás y Matías.

AGRADECIMIENTOS

- A mi Directora Mag. Ing. Agr. Susana Edith Álvarez y a mi codirector el Biol. Mag. Jorge Baldo por confiar en mí y por todo su apoyo incondicional.
- A la Cátedra de Fitopatología por darme la oportunidad de trabajar en el Laboratorio y por conocer a grandes personas del área.
- A la Dirección de Parques Nacionales (APN) por los permisos otorgados para realizar mi trabajo.
- A la Facultad de Ciencias Agrarias (UNJu) por el apoyo brindado en la realización de una pasantía en la Universidad Nacional de la Plata.
- Al Dr. Pedro Ballati, Dr. Ernesto Franco y todas las personas del área por su hospitalidad y conocimiento brindado durante la pasantía realizada en el CIDEFI-UNLP.
- A mis evaluadores: María Graciela del Valle Bovi Mitre, Ing. Agr. Noemí, Bejarano y Lic. Ana, Carranza por el tiempo y la paciencia llevada durante las correcciones.
- A la Dra. María Graciela del Valle Bovi Mitre por brindarme su gran apoyo en todo momento, siempre le estaré agradecido.
- A Ing. Sebastián Ruiz, al Ing. Agr. Lauro Cazón, al Ing. Agr. José Catacata, al Ing. Agr. Noemí Bejarano, al Bioquím. Javier Tshambler por el apoyo brindado para poder concluir con mi trabajo de tesis.

- A todos mis amigos que son muchísimos, donde cada uno de ustedes ha jugado un rol importante en mi vida y me han alentado a continuar superándome. Mil gracias por su amistad más que nada y por su ayuda.

Índice General

PORTADA	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
Resumen	- 1 -
Abstract.....	- 2 -
CAPITULO I	- 3 -
1.1. Introducción	- 3 -
1.2. Justificación.	- 4 -
1.3. Objetivos	- 4 -
1.3.1. Objetivo General:	- 4 -
1.3.2. Objetivos específicos:	- 5 -
1.4. Pregunta de investigación:	- 5 -
1.5. Hipótesis:	- 5 -
CAPITULO II	- 6 -
Marco teórico.....	- 6 -
2.1. Impacto de la Explotación Petrolera.....	- 6 -
2.2. Otros Efectos.....	- 7 -
2.3. Remediación de suelos contaminados con hidrocarburos.	- 8 -
2.4. Microorganismos	- 10 -
2.5. Hongos filamentosos.....	- 11 -
2.6. El Genero <i>Trichoderma</i> . Características Generales.....	- 12 -
2.7. Interacción de <i>Trichoderma</i> con contaminantes orgánicos e inorgánicos.	- 13 -
Bibliografía.....	- 16 -
CAPITULO III	- 25 -
Descripción de las zonas de muestreo. Metodología de muestreo.	- 25 -
3.1. Grupo Salta	- 25 -
3.2. Yacimiento Caimancito	- 25 -
3.3. Infraestructura del Yacimiento Caimancito	- 29 -
3.4. Sitios de Muestreo	- 31 -

3.5. Metodología de muestreo de suelos y criterio de selección de los sitios de muestreo en las zonas contaminadas del Yacimiento Caimancito.	- 32 -
Bibliografía.....	- 39 -
CAPITULO IV	- 42 -
Aislamiento e Identificación de cepas del genero <i>Trichoderma</i> de suelos de Caimancito y Maimara.....	- 42 -
Resumen	- 42 -
Abstract.....	- 43 -
4.1. Introducción	- 44 -
4.2. Materiales y Métodos.....	- 46 -
4.2.1. Aislamiento y Conservación de cepas de <i>Trichoderma</i>	- 46 -
4.2.2. Identificación del Género <i>Trichoderma</i>	- 47 -
4.2.3. Conservación de Cepas	- 48 -
4.3. Resultados y Discusión.....	- 48 -
4.3.1. Aislamiento, Identificación y Conservación de cepas	- 48 -
4.4. Conclusión	- 51 -
Bibliografía.....	- 52 -
CAPITULO V	- 55 -
Caracterización Morfológica de las 19 cepas de <i>Trichoderma</i> aisladas de suelos contaminados y no contaminados y Caracterización molecular de dos cepas Tolerantes a petróleo crudo.....	- 55 -
Resumen	- 55 -
Abstract.....	- 56 -
5.1. Introducción	- 57 -
5.2. Materiales y Métodos.....	- 59 -
5.2.1. Reactivación de cepas del genero <i>Trichoderma</i>	- 59 -
5.2.2. Descripción Macroscópica	- 59 -
5.2.3. Descripción Microscópica.....	- 59 -
5.2.4. Caracterización Molecular de cepas altamente tolerantes a petróleo crudo...	- 60 -
5.3. Resultados	- 62 -
5.3.1. Identificación Macroscópica y Microscópica	- 62 -

5.3.2. Caracterización Molecular de dos cepas altamente tolerantes a petróleo crudo.	- 101 -
5.4. Discusión	- 103 -
5.5. Conclusión	- 106 -
Bibliografía	- 106 -
CAPITULO VI	- 110 -
Tolerancia de cepas de <i>Trichoderma</i> a petróleo crudo	- 110 -
Resumen	- 110 -
Abstract	- 112 -
6.1. Introducción	- 114 -
6.2. Materiales y Métodos	- 117 -
6.2.1. Reactivación de cepas del genero <i>Trichoderma</i> .	- 117 -
6.2.2. Análisis de la Muestra de Petróleo Crudo del Yacimiento Caimancito	- 117 -
6.2.3. Pruebas de Tolerancia	- 117 -
6.2.3a Porcentaje de Inhibición del crecimiento fúngico FI % a las 96 horas de incubación.	- 117 -
6.2.3b Velocidad del crecimiento micelial:	- 118 -
6.2.3c Producción de conidios (conidios/ml)	- 118 -
6.2.3d Viabilidad: Porcentaje de germinación de conidios.	- 119 -
6.2.4. Análisis Estadístico	- 119 -
6.3 Resultados	- 119 -
6.3.1. Análisis de la muestra de petróleo crudo.	- 119 -
6.3.2. Pruebas de Tolerancia.	- 119 -
6.3.2a. Inhibición del crecimiento fúngico (FI %)	- 119 -
6.3.2b. Velocidad del crecimiento micelial.	- 122 -
6.3.2c Producción de Conidios.	- 129 -
6.3.2d. Viabilidad: Porcentaje de germinación de conidios.	- 131 -
6.4. Discusión	- 133 -
6.4. Conclusión	- 136 -
Bibliografía	- 136 -
Capítulo VII	- 141 -

Control Biológico de <i>Sclerotium rolfsii</i> . Pruebas de Antagonismo: Cultivos Duales y Metabolitos Difusibles.....	- 141 -
Resumen	- 141 -
Abstract.....	- 143 -
7.1. Introducción.....	- 144 -
7.2. Materiales y Métodos.	- 146 -
7.2.1. Preparación de Medio de Cultivo y Materiales.....	- 146 -
7.2.2. Cultivo de <i>Sclerotium rolfsii</i>	- 147 -
7.2.3. Cultivos duales o siembras apareadas.....	- 147 -
7.2.4. Método del Papel Celofán.....	- 148 -
7.2.5. Análisis Estadístico.....	- 150 -
7.3. Resultados y Discusión.....	- 150 -
7.3.1. Cultivos duales o siembras apareadas.....	- 150 -
7.3.2. Metabolitos Difusibles al Medio.....	157
7.3.3. Producción de Esclerocios	160
7.4. Conclusión.....	162
Bibliografía.....	163
CAPITULO VIII	169
Conclusiones.....	169
ANEXO 1	171
ANEXO 2	172
ANEXO 3	173

“Tolerancia a petróleo crudo de cepas autóctonas del genero *Trichoderma* aisladas de suelos contaminados y no contaminados; con potencialidad para la regulación biológica de hongos fitopatógenos. Jujuy, Argentina”

Resumen

La explotación, producción, refinación y transporte de petróleo y sus derivados conlleva ocasionalmente accidentes técnicos y operacionales que causan severo deterioro al ambiente. Existen hongos capaces de biodegradar hidrocarburos que pueden ser utilizados como estrategia en la micorrremediación de aguas y suelos impactados por la actividad petrolera. Se ha demostrado la capacidad de tolerancia y degradación de petróleo crudo y derivados de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* pero el comportamiento de *Trichoderma* es poco conocida. Esta investigación tuvo como objetivo general seleccionar cepas autóctonas de *Trichoderma* de suelos contaminados con petróleo y no contaminados y evaluar los niveles de tolerancia al petróleo crudo. Para cumplir con este objetivo se procedió de la siguiente manera: 1) aislar cepas de suelos contaminados y no contaminados con petróleo crudo, 2) identificar morfológicamente las cepas aisladas y molecularmente dos cepas altamente tolerantes, 3) evaluar la tolerancia de las cepas de *Trichoderma* al petróleo crudo mediante ensayos *in vitro*, 4) determinar *in vitro* si las cepas de *Trichoderma* aisladas son funcionales como antagonistas frente a *Sclerotium rolfsii*. De los 19 aislamientos de *Trichoderma*, 14 fueron de suelos contaminados y 5 de suelos no contaminados. De las cepas 4 fueron identificadas como *T. atroviride*, 3 como *T. sp* y 1 como *T. viride* (sección *Trichoderma*); 3 cepas como *T. citrinoviride* y 3 como *T. longibrachiatum* (sección *Longibrachiatum*), 4 cepas como *T. harzianum* y 1 *T. virens* (sección *Pachybasium*). La identificación molecular identificó una cepa como *Hypocrea andinensis* y una como *Hypocrea lixii/Trichoderma harzianum*. Las 19 cepas difirieron en su tolerancia y su crecimiento, clasificando 8 cepas como altamente tolerantes, 3 como tolerantes, 4 moderadamente tolerantes y 4 no tolerantes. En las pruebas de antagonismo el 60 % de las cepas de *Trichoderma* mostraron una inhibición del crecimiento de *Sclerotium rolfsii* mayor al 50 %. Estos resultados resaltan las características biológicas del género *Trichoderma* y su potencial biotecnológico para ser aplicadas en procesos de biorremediación de suelos contaminados con petróleo crudo y en el desarrollo de bioinsumos para el control de fitopatógenos.

Palabras clave: *Trichoderma*, taxonomía, petróleo crudo, tolerancia, control biológico.

“Tolerance to crude oil of autochthonous *Trichoderma* strains isolated from contaminated and uncontaminated soils; with potential for the biological regulation of phytopathogenic fungi. Jujuy, Argentina”

Abstract

The exploitation, production, refining and transportation of oil and its derivatives occasionally leads to technical and operational accidents that cause severe deterioration to the environment. There are fungi capable of biodegrading hydrocarbons that can be used as a strategy in the micorrremediation of waters and soils impacted by oil activity. The capacity of tolerance and degradation of crude oil and derivatives of the genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* has been demonstrated but the behavior of *Trichoderma* is little known. The general objective of this research was to select autochthonous *Trichoderma* strains from uncontaminated and contaminated petroleum soils, to evaluate the levels of tolerance to crude oil. In order to meet to this objective, we proceeded in the following manner: 1) Isolate contaminated and non-contaminated soil strains with crude oil, 2) morphologically identify the strains isolated and molecularly two highly tolerant strains, 3) evaluate the tolerance of *Trichoderma* strains to crude oil by tests *in vitro*, 4) determine *in vitro* whether isolated *Trichoderma* strains are functional as antagonists against *Sclerotium rolfsii*. Of the 19 isolates of *Trichoderma*, 14 were from contaminated soils and 5 from uncontaminated soils. Strains 4 were identified as *T. atroviride*, 3 as *T. sp* and 1 as *T. viride* (section *Trichoderma*); 3 strains as *T. citrinoviride* and 3 as *T. longibrachiatum* (section *Longibrachiatum*), 4 strains as *T. harzianum* and 1 *T. virens* (section *Pachybasium*). The molecular identification identified a strain as *Hypocrea andinensis* and one as *Hypocrea lixii/Trichoderma harzianum*. The 19 strains differed in their tolerance and their growth, classifying 8 strains as highly tolerant, 3 as tolerant, 4 moderately tolerant and 4 non tolerant strains. In the antagonism tests, 60% of the *Trichoderma* strains showed an inhibition of the growth of *Sclerotium rolfsii* greater than 50%. These results highlight the biological characteristics of the genus *Trichoderma* and its biotechnological potential to be applied in bioremediation processes of soils contaminated with crude oil and in the development of bioinsumes for the control of phytopathogens.

Key words: *Trichoderma*, taxonomy, oil crude, tolerance, biological control.

CAPITULO I

1.1. Introducción

La pérdida de sistemas naturales está relacionada directamente con la degradación ambiental. En Argentina la explotación de recursos naturales no renovables, la actividad agropecuaria y la actividad industrial no consideran en muchos casos el impacto sobre el medio ambiente afectando diversos ecosistemas y sus elementos, principalmente suelos, aguas superficiales, subterráneas y biodiversidad.

La contaminación de suelo y agua alrededor del mundo ha venido en aumento como resultado de la explotación, refinación, distribución y almacenamiento de petróleo crudo y sus derivados. A nivel local, el Parque Nacional Calilegua (PNC) está afectado por actividades vinculadas al Yacimiento Petrolífero Caimancito (Di Rizio *et al.*, 2012).

El petróleo tiene una gran importancia en la sociedad moderna, sin embargo su explotación tiene efectos negativos en él ambiente, con efectos residuales sobre el entorno, considerándose que una contingencia derivada de esta actividad puede tener efectos muy graves para el ambiente y las personas, más aun si estas actividades se desarrollan en una Área Protegida, área de elevada sensibilidad, singularidad y alto valor de conservación como la Selva Pedemontana (Prado 1995, 2000; Brown y Malizia, 2004).

Gran parte de la superficie explotada en el PNC corresponde a la Selva Pedemontana y la actividad petrolera del Yacimiento Caimancito representa el principal problema de conservación de dicho parque (Plan de Gestión PN Calilegua, 2009).

El desarrollo de la actividad petrolera dentro del PNC ha producido la contaminación de suelos y aguas, no solo por derrames de petróleo crudo sino también por la generación de desechos derivados de la actividad (agua de formación, metales pesados, fluidos de perforación, entre otros) y la deforestación para el establecimiento y funcionamiento del yacimiento.

A fin de mitigar la contaminación se han desarrollado tecnologías ambientales para remediar suelos y aguas contaminadas mediante métodos físicos, químicos y biológicos.

La biorremediación es la utilización de organismos para limpiar suelos y aguas contaminadas. Se ha comprobado la eficacia de plantas, bacterias, algas y hongos que contribuyen a la oxidación, degradación, transformación y completa mineralización de

contaminantes, muchos de ellos con efectos mutagénicos, cancerígenos y teratogénicos (Palhmann & Pelkonen, 1987; Manilal & Alexander, 1991; Toyooka & Ibuki, 2007).

El género *Trichoderma* Pers. ex Fr., hongo filamentoso clasificados como *Ascomycetes* ha demostrado plasticidad en diferentes procesos biotecnológicos (Schuster & Schmoll, 2010). Se registran antecedentes científicos sobre la tolerancia y degradación de *Trichoderma* a hidrocarburos saturados (Chaîneau *et al.*, 1999) y la degradación de fenantreno, benzo α pireno y naftaleno (Argumedo, 2011), componentes del petróleo.

Los estudios de tolerancia y biodegradación de hidrocarburos por especies del género *Trichoderma* que se registran a nivel local son escasos y esta investigación pretende generar información científica de especies autóctonas de *Trichoderma* tolerantes al contaminante y poder ser aplicados a futuro en procesos de biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos.

1.2. Justificación.

La búsqueda de alternativas biorremediadoras de ambientes contaminados, implica en una primera etapa, la selección y determinación de los niveles de tolerancia de un organismo al contaminante. En este sentido, verificar la disponibilidad de cepas locales de *Trichoderma* tolerantes al petróleo crudo implicará poder avanzar en el conocimiento de su potencialidad como biorremediador de suelos contaminados, con criterios de selección complementarios a los ya conocidos de control biológico de hongos fitopatógenos o promotores de crecimiento de plantas cultivadas (bioinsumos para la agricultura), con perspectivas biotecnológicas de múltiple funcionalidad.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General:

Seleccionar cepas autóctonas de *Trichoderma* de suelos contaminados con petróleo y no contaminados y evaluar los niveles de tolerancia al petróleo crudo.

1.3.2. Objetivos específicos:

- Recolectar muestras de suelo contaminado con petróleo del PNC y de suelos no contaminados de Maimara.
- Realizar aislamientos de cepas de *Trichoderma* a partir de muestras de suelos de ambos sitios.
- Caracterizar morfológicamente las cepas del género *Trichoderma*.
- Realizar el análisis físico químico de petróleo crudo proveniente del Yacimiento Caimancito.
- Evaluar tolerancia de las cepas de *Trichoderma* aisladas al petróleo crudo mediante ensayos *in vitro*.
- Determinar *in vitro* si las cepas de *Trichoderma* aisladas son funcionales como antagonistas frente a un hongo fitopatógeno.
- Caracterizar molecularmente las cepas de *Trichoderma* más tolerantes y con potencialidad antagonista.

1.4. Pregunta de investigación:

¿Existe correlación entre el origen de las cepas de *Trichoderma* aisladas de suelos contaminados y no contaminados con petróleo y su nivel de tolerancia al mismo? ¿Estas cepas tienen múltiple funcionalidad?

1.5. Hipótesis:

“Cepas de *Trichoderma* aisladas de suelos contaminados con hidrocarburos presentan mayores niveles de tolerancia al contaminante que aquellas de suelos sin el contaminante, manifestando acción antagonista frente a hongos fitopatógenos”.

CAPITULO II

Marco teórico

2.1. Impacto de la Explotación Petrolera.

Los contaminantes generados por la actividad petrolífera ingresan al ambiente a través de las distintas prácticas operacionales (extracción y traslado), los químicos que se usan para facilitar la extracción de petróleo, los compuestos asociados al crudo, los desechos generados, la ruptura de cañerías y las piletas de almacenamiento. La contaminación relacionada por la explotación de hidrocarburos puede ser de distinta naturaleza, siendo la más importante la química por el propio petróleo crudo y sus componentes.

Los derrames de petróleo crudo inician una serie de procesos físico-químicos simultáneos (evaporación y penetración), que dependiendo del tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad, textura de suelo y cantidad vertida puede resultar en un proceso más o menos lento que ocasiona una mayor toxicidad y recalcitrancia en los sitios contaminados (Castro *et al.*, 2004).

El petróleo crudo y los hidrocarburos que los componen resultan un factor de stress adicional a los existentes en el suelo en el suelo causando una reducción importante de la diversidad de las comunidades que lo habitan (Castle *et al.*, 2006).

Aunque la toxicidad del crudo disminuye con la degradación (biológica o física), sigue siendo una fuente de contaminación y de toxicidad para los organismos presentes en un ecosistema por largo tiempo (Di Toro *et al.*, 2007). Su tratamiento biológico se dificulta por los altos gradientes de salinidad que contiene ya que pueden destruir la estructura terciaria de las proteínas, desnaturalizar enzimas y deshidratar células, lo cual es letal para muchos microorganismos usados en el tratamiento de aguas y suelos contaminados (Restrepo, 2002; Siva *et.al.*, 2004).

Durante la perforación se generan los cortes y lodos de perforación. Los cortes de perforación se producen cuando se tritura la roca y están compuestos de una mezcla heterogénea que depende de la estratología local y puede incluir metales pesados (Cd, Pb, Hg, As, Cu, Cr, entre otros), substancias radioactivas e hidrocarburos (Neff, 2005; Méndez *et al.*, 2007). Estos compuestos inhiben el crecimiento y desarrollo reproductivo de algunas especies, genera condiciones anaeróbicas e impide el establecimiento de comunidades

biológicas en suelos, alterando la composición de las comunidades microbianas (Blackman *et al*, 1986).

Junto con el petróleo, salen del subsuelo dos tipos de compuestos asociados: las aguas de formación y el gas. El agua de formación es uno de los problemas más significativos en los yacimientos petroleros ya que contiene altos tenores de sales disueltas, retiene parte de los hidrocarburos solubles durante el tratamiento y puede estar acompañada de gases peligrosos como dióxido de azufre y sulfuro de hidrogeno (Regidor y Guzmán, 2015).

Cuando estas aguas sedimentarias son vertidas o llegan accidentalmente a los ríos y otros cuerpos de agua cercanos, pueden generar reacciones ambientales tipo cascada donde la mayoría de las especies dulceacuícolas mueren y sobreviven únicamente aquellas especies que tienen tolerancia a la alta salinidad, produciéndose impactos en toda la red trófica. El poder corrosivo de las aguas de formación provocan la ruptura de las tuberías contaminando el suelo y el agua dulce de la capas freáticas al ser fácilmente solubles (ARPEL, 2009) siendo un potencial contaminante de cuerpos de aguas superficiales cercanas a las zonas de explotación.

Esto sucede con los productos residuales generados dentro del PNC, cuyo volumen alcanzan los 190 m³ por día que se vertían mediante una cañería en un afluente del río Sauzalito. Actualmente son reinyectados en el subsuelo pero a escasa profundidad, sin garantizar que no se estén afectando los acuíferos.

La Selva Pedemontana ocupa el 15 % en el parque y posee 135 humedales lenticos de más de 1 ha de superficie que son contaminados por aguas residuales del yacimiento y otras actividades (Plan de Gestión PN Calilegua, 2009). Tal es el caso del pozo Ca-3 con una profundidad de 5.066 m, presenta una ruptura del tapón de aislamiento liberando 20.000 litros/día de agua de formación con una temperatura de 60–70°C, con niveles de 100 gr/L de NaCl y metales como Cu y Cr cuyo vertido afecta directamente al Arroyo Yuto que atraviesa un sector del PNC (Informe Calilegua, 2015).

2.2. Otros Efectos.

La instalación de plataformas de perforación, campamentos, pozos, piletas de almacenamiento, oleoductos, gasoductos y la apertura de vías de acceso ha llevado a la deforestación de grandes extensiones de selva pedemontana y al aumento del efecto de

borde, haciendo que la alteración sea mucho mayor. Esto lleva a que las especies típicas de una comunidad clímax sean desplazadas por especies pioneras, produciéndose alteraciones en la ecofisiología de las plantas (Kapos *et al.*, 1997).

Se registran alteraciones en la distribución de la fauna por falta de continuidad de la selva, lo que representa una amenaza continua, de la biodiversidad local y de especies de otros pisos o regiones de las selvas de yungas que buscan refugio (Brown y Malizia, 2004).

Las prospecciones sísmicas realizadas en los yacimientos generan la desestabilización de suelos produciéndose derrumbes, contaminación de acuíferos por hidrocarburos y el ruido de las explosiones altera el comportamiento de la fauna de la región (Forman y Alexander 1998; Almeida, 2002).

La posibilidad de generación de incendios por accidentes derivados de las tareas de explotación se incrementa si se considera que en la zona se practican habitualmente quemas de las plantaciones de caña de azúcar que rodean al parque. El período crítico se extiende entre los meses de septiembre y diciembre, cuando la baja humedad del ambiente y la acumulación de material vegetal combustible hacen el lugar vulnerable a los incendios. Los incendios tienen un impacto particularmente negativo en zonas con pendiente ya que eliminan la cobertura herbácea y dejan el suelo expuesto a la erosión que causan las intensas lluvias estivales.

Todos estos factores contaminan o impactan ocasionando el deterioro progresivo de la calidad del ambiente dentro del PNC y genera una amenaza real a la salud pública, así como la posible extinción de especies vegetales y animales.

2.3. Remediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

El tratamiento y recuperación de suelos contaminados se puede definir como el conjunto de operaciones realizadas con el objetivo de controlar, disminuir o eliminar los contaminantes presentes (Días, 2011). Las técnicas empleadas para la eliminación de hidrocarburos causadas por los derrames de petróleo en suelos y aguas han llevado a desarrollar numerosas estrategias, planteándose una serie de opciones que llevan desde la atenuación natural, hasta la aplicación de procesos físicos-químicos.

La atenuación natural consiste en utilizar procesos naturales para contener la contaminación resultante de los vertidos químicos, reduciendo la cantidad y concentración de los agentes

tóxicos en las zonas afectadas (USEPA, 1999). Sin embargo, estos procesos resultan ser lentos comparado con las tecnologías ingenieriles actuales (Mulligan, 2001).

Los procesos de atenuación natural pueden ser destructivos o no destructivos. Dentro de los procesos no destructivos están los físico-químicos como la volatilización, dispersión, dilución, desintegración radioactiva, estabilización química y bioquímica, precipitación y adsorción en partículas de materia orgánica y arcillas del suelo que tienen por objetivo reducir su concentración. Se aplican como primer paso de emergencia cuando los derrames son muy grandes y para recuperar grandes masas de suelo contaminado, aunque no es usado habitualmente por su gran costo, porque destruye el suelo y altera sus características de manera irreversible.

Estos procesos físicos-químicos debe ser monitoreados continuamente para certificar su éxito, pero para asegurar o completar la destrucción de los contaminantes han sido sustituidas y/o complementadas con tratamientos biológicos que son compatibles con el ambiente.

La estrategia que se centra en el estudio del metabolismo y de las capacidades metabólicas de los microorganismos que habitan los suelos se denomina Biorremediación. La biorremediación como procesos destructivo se define como una solución asistida y controlada que aporta una solución definitiva y no solo de medida de contingencia (Días, 2011).

Esta tecnología utiliza microorganismos, componentes celulares o enzimas libres, con el fin de lograr la mineralización o bien una transformación parcial del contaminante en sustancias menos tóxicas o inocuas para el ambiente y la salud humana (Röling *et. al.*, 2002).

La tecnología puede ser aplicada *in situ* (en el lugar), es la más aplicada y se aprovecha las capacidades degradadoras de los microorganismos autóctonos del sitio afectado y *ex situ* (fuera del sitio) para tratar el suelo afectado en biopilas o bioreactores (Benavides *et. al.*, 2006; Velasco & Volke Sepúlveda, 2003).

Aunque no todos los compuestos orgánicos son susceptibles a la biodegradación, los procesos de biorremediación se han utilizado con éxito para tratar suelos o lodos y sedimentos contaminados (Lina, 2010).

2.4. Microorganismos

Los organismos que viven en el suelo constituyen un ecosistema conocido como edafón y está constituido por bacterias, hongos, algas unicelulares, plantas vasculares y animales invertebrados; brindando una variedad de rutas metabólicas que intervienen entre el 80 al 90 % de las reacciones biológicas, asegurando la biodisponibilidad de nutrientes para el resto de los seres (Nannipieri & Badaluco, 2003).

El estado fisiológico y la capacidad de desarrollo de estos microorganismos dependen de la actividad metabólica (dirigida por numerosas enzimas y proteínas celulares codificadas por el material genético) y de la influencia de factores físicos y químicos, los cuales ejercen un efecto decisivo, favorable o desfavorable.

Cuando un suelo es contaminado con hidrocarburos, estos están sujetos a diferentes procesos físicos, químicos y biológicos que pueden resultar en la eliminación o en la transformación a otros compuestos menos tóxicos. Los procesos que sufren estos contaminantes son la evaporación, dilución, precipitación, reacciones abióticas (hidrolisis, oxidaciones, entre otros), biodegradación microbiana, bioacumulación y secuestro (Semple *et al.*, 2003) (**Imagen 2.1**).

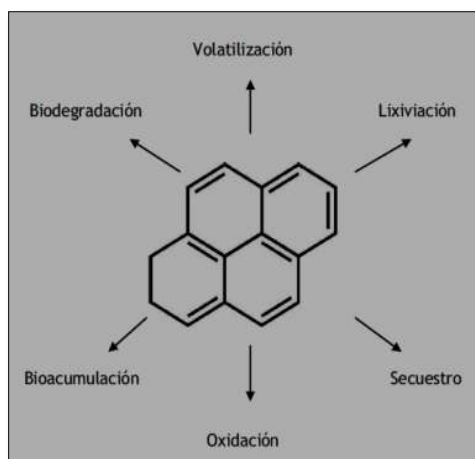


Imagen 2.1. Procesos que sufren los contaminantes en el ambiente (Semple *et al.*, 2003).

En la mayoría de los casos los contaminantes son redistribuidos en el suelo, siendo el resultado la degradación total o parcial catalizada por hongos, levaduras, algas y bacterias mediante procesos de mineralización o transformación.

Las tecnologías ambientales se han centrado en el estudio sobre la capacidad de plantas, bacterias, levaduras y hongos para la degradación de sustancias tóxicas, siendo la etapa previa, su capacidad de adaptación y tolerancia para crecer en medios contaminados.

Sin embargo, puede llevar varios años completar la restauración y recuperación de un área impactada, dependiendo de la cantidad de contaminante y de las condiciones ambientales que favorezcan la proliferación y actividad de los organismos que se utilicen (Ferrara-Cerrato *et al.*, 2006).

Los métodos de tratamiento biológico dependen básicamente de que los organismos sean capaces de tolerar condiciones extremas y puedan degradar compuestos tóxicos en compuestos inocuos.

2.5. Hongos filamentosos.

Los hongos del suelo juegan un papel importante en los procesos de descomposición ya que mineralizan y reciclan nutrientes de plantas. Estos interactúan con la diversidad de microorganismos edáficos y son los principales descomponedores de materia orgánica, debido a la acción de enzimas extracelulares (celulasas, ligninasas, proteasas) y metabolitos importantes con múltiples aplicaciones biotecnológicas (Bonkowsky *et al.*, 2000).

La capacidad de los hongos de transformar una variedad de compuestos complejos y llevarlos hasta compuestos más simples como H₂O y CO₂, ofrece un indiscutible potencial para su utilización en biorremediación. Este potencial radica en su sistema enzimático y su rápido crecimiento micelial para colonizar distintos sustratos y acceder a los compuestos que constituyen las contaminaciones más frecuentes (Hammel, 1995; Martín-Moreno *et al.*, 2004).

Hongos de los géneros *Penicillium*, *Trichoderma*, *Aspergillus* y *Mucor* han sido caracterizados como tolerantes y degradadores de plaguicidas e hidrocarburos (Mitra *et al.* 2001, Dan *et al.* 2006, Sagar y Singh 2011, Argumedo-Delira *et al.* 2012). Los hongos de las especies *Cunninghamella elegans* son capaces de degradar benzo[α]antraceno y *Phanerochaete chrysosporium* antraceno y fenantreno (Calero, 2012; Martínez & García-Rivero, 2012; Cerniglia & Yang, 1984; Bumpus, 1989; Sutherland *et al.*, 1991; Pothuluri *et al.*, 1992; Cerniglia *et al.*, 1994; Moen y Hammel, 1994). Si bien se estudia habitualmente la capacidad biológica de una especie de hongo, los procesos de degradación en suelos

contaminados con hidrocarburos se hacen más eficaces cuando se complementan con consorcios de plantas, hongos y bacterias, disminuyendo el tiempo de recuperación (Li *et al.*, 2009).

2.6. El Genero *Trichoderma*. Características Generales.

El género *Trichoderma* está representado por un grupo de hongos filamentosos que pertenecen al Reino Mycetae (Fungi), División Eumycota, Subdivisión Ascomycotina, Clase Euascomycetes, Orden Hypocreales, Familia Hypocreae y Genero *Trichoderma* e *Hypocrea* (Samuels y Chaverri, 2003; Samuels, 2005 y Jaklitsch *et al.*, 2006).

Son muy abundantes en los ecosistemas, colonizan distintos ambientes debido a su alta tasa reproductiva, sean ambientes antropizados (agrícolas), naturales (bosques, selvas y desiertos) y acuáticos (Paz *et al.*, 2010). Son abundantes en diferentes ecosistemas, sean ambientes antropizados (agrícolas), naturales (bosques, selvas y desiertos) y acuáticos; son de vida libre en el suelo, oportunistas, simbiontes con plantas y algunas especies son micoparásitas (*T. harzanium*, *T. atroviride*, *T. viride* y *T. virnes*) (Harman *et al.*, 2004). El desarrollo de *Trichoderma* se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, que son colonizadas rápidamente por este género. Algunas especies son componentes importantes de la rizósfera.

Además de su facilidad para colonizar las raíces de las plantas, *Trichoderma* ha desarrollado mecanismos para atacar y parasitar a otros hongos y así aprovechar una fuente nutritiva adicional. Se han determinado los mecanismos de *Trichoderma* con los cuales actúa como biocontrolador y colonizador de raíces (Samuels, 1996).

Los requerimientos nutricionales de este género son pocos y su crecimiento se ve favorecido por la presencia de materia orgánica y humedad, siendo la temperatura óptima de crecimiento entre los 25 y 30 °C (Papavizas, 1985) pero debido a sus características biológicas se pueden adaptar y sobrevivir a condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad (Widden & Scattolin, 1988; Jackson *et al.*, 1991).

Una acción importante desarrollada por el género *Trichoderma* se relaciona con la producción de redes miceliales que envuelven las partículas del suelo, aumentando la estabilidad y resistencia a la erosión, esta función sumada a la transformación de materia orgánica manifiesta un aumento de la porosidad, aireación y permeabilidad del suelo.

En la rizósfera compiten por espacio y nutrientes con otros microorganismos haciendo que sean catalogadas como excelentes agentes de control biológico de organismos fitopatógenos, consecuencia de la producción de numerosos metabolitos secundarios, como las gliotoxinas, viridina, pacibasina, trichodermina, 6-pentil- α pirona (6PAP) con efectos antagónicos (Ávila-Miranda *et al.*, 2006; Rojo *et al.*, 2007; Mitidieri *et. al.*, 2011, Mechan-Gaitan & Ferrucho, 2014; Romero, T., 2014).

Experiencias llevadas a cabo en el Centro de Estudios para el Desarrollo de la Agricultura Familiar (FCA-UNJu) han permitido seleccionar cepas de *Trichoderma* que presentan varios modos de acción (micoparasitismo, competición y antibiosis) frente a fitopatógenos como *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp., *Rhizoctonia* sp., *Sclerotinia* sp., *Sclerotium* sp. y *Alternaria* sp. También se han seleccionado cepas de *Trichoderma* con capacidad antagónica frente a *Fusarium* transmitido por semillas de poroto y papa (Abdo *et al*, 2008; Sivila & Álvarez, 2013, Pérez *et al.*, 2012; Colombo *et al.*, 2011a).

Se notificó que las quitinasas y proteasas de *Trichoderma* poseen potencial para atacar nematodos. El proceso parasítico y el efecto de las enzimas y metabolitos de *Trichoderma* sobre nematodos pueden ocurrir en el suelo, en el interior de las raíces o sobre la superficie de estos (Morton *et. al.*, 2004)

Se ha comprobado la capacidad de especies del genero *Trichoderma* de promover el crecimiento en plantaciones de lechuga (*Latuca sativa* L.) y tomate (*Lycopersicon esculentum* L.), de inducir resistencia a enfermedades, desarrollo de plantas transgénicas y biorremediación (Brutti *et al.*, 2015; Ranasingh *et. al.*, 2006).

2.7. Interacción de *Trichoderma* con contaminantes orgánicos e inorgánicos.

Varias cepas de *Trichoderma*, además de la capacidad de biocontrol de fitopatógenos representan una alternativa adicional a los procesos físicos y químicos de las tecnologías ambientales, teniendo con ello una relevancia ecológica (Argumedo, 2009).

Las aplicaciones del género *Trichoderma* en diversos procesos biotecnológicos es muy variada y su capacidad de sintetizar y liberar numerosas enzimas como polisacarasas, celulasas, xilanasas y quitinasas hace que se lo utilice en procesos industriales y biotecnológicos. Por ejemplo la mayoría de las enzimas celulasas y las endonucleasas I y II derivan de especies de la sección *Longibrachiatum* siendo *T. reesei* el organismo

celulolítico más utilizado en el mundo para el blanqueo de papel, remplazando al cloro que generan hidrocarburos clorados y en degradar compuestos de la celulosa radiactiva (algodón contaminado con radionucleótidos) (Gutierrez-Rojas *et al.*, 2015; Kubicek *et al.*, 1993).

El desarrollo de mutantes de *T. viride*, *T. reesei* y *T. longibrachiatum* por técnicas genéticas aumentan la producción de celulasas que son destructoras de celulosa cristalina (Schulein, 2000; Szengyel *et al.*, 2000).

Las especies de *Trichoderma* son capaces de degradar sustancias complejas como compuestos organoclorados, organofosforados, herbicidas, plaguicidas y carbamatos generados por la actividad agrícola (Ranasingh, *et al.*, 2006; Sun & Chen, 2008). Por ejemplo los compuestos organofosforados Forato y Carbofuran que se utilizan para el control de nematodos e insectos estimulan el crecimiento y son fuente de energía para especies del genero *Trichoderma* (Das *et al.*, 2003). Las especies *T. viride* y *T. harzianum* contribuyen en la degradación de los herbicidas trifluralina y arvadex en medios de cultivo liquido (Anderson & Domsch, 1976; Zayed *et al.* 1983).

Los plaguicidas organoclorados (DDT, el dieldrin y el endosulfan) son persistentes en el ambiente y presentan una alta toxicidad. Se ha documentado especies de *Trichoderma* capaces de degradarlos, como es el caso de *T. harzianum* que degrada endosulfan (Mukherjee & Mital, 2005).

Los colorantes de la industria textil y de los alimentos son sustancias orgánicas aromáticas que son de carácter recalcitrante para el medio ambiente. La especie *T. harzianum* demostró capacidad de remover el colorante rodamina en un sistema batch (Sadhavisam *et al.*, 2007).

Los componentes del petróleo crudo y sus derivados son compuestos recalcitrantes para el ambiente y demostrando la capacidad de *Trichoderma* de degradarlos. Cepas como *T. polysporum*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii* y *T. harzianum* son capaces de degradar hidrocarburos saturados y aromáticos presentes en aceites combustibles en mayor o menor porcentaje (Chaîneau *et al.*, 1999).

Hughes *et al.* (2007) expusieron cepas de *T. koningii* y *Trichoderma* a hidrocarburos saturados (dodecano, hexadecano) y aromáticos (ácido benzoico, tolueno, fenol, bifenil, naftaleno, m y p-xileno y etilbenceno); determinando que los aromáticos inhibieron o

detuvieron el crecimiento hifal mientras los saturados no afectaron al crecimiento de las cepas con respecto al testigo.

Se comprobó que *T. harzianum*, *T. pseudokoningii* y *T. viride* tienen la capacidad de degradar pireno (Ravalet *et al.*, 2000), mientras que *T. virens* y *T. viride* degradan fenantreno, benzo[α]pireno y naftaleno (Argumedo, 2011). El n-eicosano es un hidrocarburo saturado y es degradado en un 70 % por *Trichoderma* sp S019 y el fenantreno (aromático) en un 72 % en medio líquido (Hadibarata *et al.*, 2007).

Dentro de los contaminantes inorgánicos (arseniato de cobre, metales) se han encontrado aislados fúngicos del género *Trichoderma*, denotando con ello su capacidad para tolerar estos contaminantes inorgánicos, de asimilar metales pesados y degradar cianuro, cuyo potencial tóxico es elevado (Akhtar *et al.*, 2007; Guillermina *et al.*, 2002) (Ezzi & Lynch, 2005).

La construcción de biosensores a partir de especies de *Trichoderma* y marcadores genéticos de fluorescencia y luminiscencia es un avance como unidad de monitoreo de sitios contaminados como los ya desarrollados con *Pseudomonas bioluminiscentes* usada para monitorear naftaleno (Sayler *et al.*, 2001) o *Pseudomonas fluorescens* A506 (Stiner & Halverson, 2002).

La selección de bacterias y hongos a través de pruebas sucesivas de crecimiento poblacional en cultivo puro rico en petróleo, es una estrategia eficiente para evaluar la adaptación y sobrevivencia de cepas tolerantes a concentraciones altas de petróleo. Los resultados de las pruebas en laboratorio respaldan la selección de las cepas más tolerantes y adaptadas. El éxito de las etapas subsiguientes, en invernadero y en suelos contaminados en campo, depende de la calidad de la selección y de las condiciones ambientales que favorezcan su aplicabilidad en sitios contaminados con compuestos orgánicos.

Bibliografía

- Abdo, G., Álvarez, S., Bonillo, M., Rolle, R., Tapia S. (2008). Producción hortícola sustentable. Edición INTA: 103, disponible online: www.cedafjujuy.com.ar.
- Akhtar, K., Akhtar, M. W., & Khalid, A. M. (2007). Removal and recovery of uranium from aqueous solutions by *Trichoderma harzianum*. *Water research*, 41(6), 1366-1378.
- Almeida, A. (2002). Acción ecológica. Manuales de monitoreo ambiental comunitario. Manual 1 ¿Qué es el Petróleo? Fases de impacto de la actividad petrolera. (Quito-Ecuador). pág. 71.
- Anderson J.P. y Domsch K.H. (1976). Microbial degradation of the thiolcarbamate herbicide, diallate, in soils and pure culture of soil microorganisms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 4(1), 1-7.
- Argumedo, D. (2011). Respuesta Fisiológica de miembros del genero *Trichoderma* a Hidrocarburos Poliaromáticos. Argumedo-Delira R., Alarcón A., Ferrera-Cerrato R., Almaraz J.J. y Peña-Cabriales J.J. (2009). El Genero fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 25 (4) 257-269.
- ARPEL. Asociación Regional de Empresas de Petróleo y Gas Natural de América y El Caribe. (2009). Disposición y Tratamiento del agua Producida. Uruguay, p. p. 120.
- Ávila-Miranda, M.E., Herrera-Estrella, A., Peña-Cabriales, J.J., (2006). Colonization of the rhizosphere, rhizoplane and endorhiza of garlic (*Allium sativum* L.) by strains of *Trichoderma harzianum* and their capacity to control allium white-rot under field conditions. *Soil Biol Biochem.* 38, 1823-1830.
- Benavides López de Mesa J., Quintero Vizcaíno G, Guevara A L. Jaimes Cáceres D C, Gutiérrez S M. (2006). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova.* 4(5): 82-90.
- Blackman, R.A.A., Fileman, T.W., Law, R.J. (1986). The toxicity of alternative baseoil and drill muds on the settlement and development of biota in an improved trunk test. *Internacional Council for the Exploration of the Sea.* ICES C.M.

-
- Bonkowski, M., Griffiths, B. S., & Ritz, K. (2000). Food preferences of earthworms for soil fungi. *Pedobiologia*, 44(6), 666-676.
 - Brown, A. D., & Malizia, L. R. (2004). Las selvas pedemontanas de las Yungas. *Cienc. Hoy*, 14(83), 53-63.
 - Brutti, L., Alvarado, P., Rojas, T., & Martensson, A. (2015). Tomato seedling development is improved by a substrate inoculated with a combination of rhizobacteria and fungi. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil & Plant Science*, 65(2), 170-176.
 - Bumpus, J.A. (1989). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol.* 55, 154-158.
 - Calero Cáceres, W. R. (2012). Detección de metabolitos de biodegradación de HAPS en suelos contaminados.
 - Castle, D. M., Montgomery M. T. & Kirchman, D. L. (2006). Effects of naphthalene on microbial community composition in the Delaware estuary. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56, 55–63.
 - Castro, J. L. P., Rojas, M. C. P. & de Mesa, J. B. L. (2004). Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. *Nova*, 2(2).
 - Cerniglia, C.E., Gibson, D.T., Dodge, R.H. (1994). Metabolism of benzo[a]anthracene by the filamentous fungus *Cunninghamella elegans*. *Appl Environ Microbiol.* 60, 3931-3938.
 - Cerniglia, C.E., Yang, S.K. (1984). Stereoselective metabolism of anthracene y phenanthrene by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Appl Environ Microbiol.* 47, 119-124.
 - Chaineau, C. H., Morel, J., Dupont, J., Bury E., & Oudot, J. (1999). Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. *Science of the Total Environment*, 227(2), 237-247.
 - Colombo, M. H., Lattar, T., Obregón, V., Cardozo, N., Monteros, J., Mónaco, C. (2011a). Acción antagónica “in vitro” de *Trichoderma koningii*, *T. virens* y *T. harzianum* sobre *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* patógeno del tomate en

invernaderos plásticos. Resúmenes XXXIV Congreso Argentino de Horticultura. P. 348.

- Dan S., Pei-jun L., Stagnitti F. & Xian-zhe X. (2006). Biodegradation of benzo[*a*]pyrene in soil by *Mucor* sp. SF06 and *Bacillus* sp. SB02 co-immobilized on vermiculite. *J. Environ. Manage.* 18, 1204-1209.
- Das, A.C., Chakravarty, A., Sukul, P., Mukherjee, D. (2003). Influence and persistence of phorate and carbofuran insecticides on microorganisms in rice field. *Chemosphere* 53, 1033-1037.
- Di Risio, D., Gavaldà, M., Perez-Roig, D., & Scandizzo, H. (2012). Zonas de sacrificio. Impactos de la industria hidrocarbúfera en Salta y Norpatagonia. *Observatorio Petrolero Sur, América Libre. Disponible en <http://www.opsur.org.ar/blog/wp-content/uploads/2012/05/Zonas-de-sacrificio-impactos-de-la-industria-hidrocarburo%20C3%ADferra.pdf> (Acceso 26/9/2013).*
- Di Toro, D.M. McGrath, J.A., Stubblefield, W.A. (2007). Predicting the Toxicity of Neat and Weathered Crude Oil: Toxic Potential and the Toxicity of Saturated Mixtures. *Environmenatl Toxicology and Chemistry* 26(1): 24-36.
- Días, R. L. (2011). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos en clima frío y templado. Ensayo y Evaluación de distintas estrategias.
- Ezzi, M., & Lynch, J. (2005). Biodegradation of cyanide by *Trichoderma* spp. and *Fusarium* spp. *Enzyme Microbiology and Technology*. Vol. 36, No. 7, (March 2004), pp. 849–854, ISSN 0141-0229.
- Ferrera-Cerrato, R., Rojas-Avelizapa, N. G., Poggi-Varaldo, H. M., Alarcón, A., & Cañizares-Villanueva, R. O. (2006). Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Rev Latinoam Microbiol*, 48(2), 179-187.
- Forman R.T. & Alexander, L.E. (1998). Roads and their major ecological effects. *Annual review of ecology and systematic* 29:207-31.
- Guillermina, M., Romero, M., Cazau, M., & Bucszinsky, A. (2002). Cadmium removal capacities of filamentous soil fungi isolated from industrially polluted sediments, in La Plata (Argentina). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol. 18, No. 9, (July 2002), pp. 817–820, ISSN 1573-0972.

- Gutiérrez-Rojas, I., Moreno-Sarmiento, N., & Montoya, D. (2015). Revista Iberoamericana de Micología. *Rev Iberoam Micol*, 32(1).
- Hadibarata, T., Tachibana, S., & Itoh, K. (2007). Biodegradation of phenanthrene by fungi screened from nature. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(15), 2535-2543.
- Hammel, K. E. (1995). Mechanisms for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by ligninolytic fungi. *Environmental Health Perspectives*, 103(Suppl 5), 41.
- Harman, G. E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol*. 2, 43-56.
- Hughes, K.A., Bridge, P., Clark, M.S. (2007). Tolerance of Antarctic soil fungi to hydrocarbons. *Sci Total Environ*. 372, 539-548.
- Jackson, A. M., Whipps, J. M., & Lynch, J. M. (1991). Effects of temperature, pH and water potential on growth of four fungi with disease biocontrol potential. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7(4), 494-501.
- Jaklitsch, W.M., Samuels, G.J., Dodd, S.L., Lu, B.S., Druzhinina, I.S., (2006). *Hypocrea rufal/Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. *Stud Mycol*. 55, 135-177.
- Kapos, V., Wandelli, E., Camargo, J.L. & Ganade, G. (1997). Cambios Relacionados al Efecto del Borde en el Ambiente y en las Respuestas de Plantas, como consecuencia de la Fragmentación del Bosque en la Amazonia Central. En *Tropical Forest Remnants: Ecology, Management, and Conservation of Tropical Forest Remnants: Ecology, Management, and Conservation of Fragmented Communities*. Editado por William F. Laurance y Richard O. Bierregaard, Jr.
- Kubicek, C.P., Messner, R., Gruber, F., Mach, R.L., Kubicek-Pranz, E.M., (1993). The *Trichoderma* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. *Enzyme Microb Technol*. 15, 90-99.
- Li, X., Lin, X., Li, P., Liu, W., Wang, L., Ma, F., & Chukwuka, K. S. (2009). Biodegradation of the low concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by microbial consortium during incubation. *Journal of hazardous materials*, 172(2), 601-605.

- Lina T., Panb P. & Cheng S. (2010). Ex situ bioremediation of oil-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*. 176:27–34.
- Lu, X.Y., Zhang, T., Fang, H.H.P. (2011). Bacteria-mediated PAH degradation in soil and sediment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 1357–1371. doi:10.1007/s00253-010-3072-7
- Manilal, V.B., Alexander, M. (1991). Factors affecting the microbial degradation of phenanthrene in soil. *Appl Microbiol Biotechnol.* 35, 401-405.
- Martín Moreno, C., González Becerra, A., Blanco Santos, M.J. (2004). Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. *Rev Iberoam Micol.* 21, 103-120.
- Martínez, M. A., García-Rivero, M. (2012). Aplicaciones Ambientales de Microorganismos Inmovilizados. *Rev. Mexicana de Ingeniería Química* Vol. 11, (1), 55-73.
- Mechan-Gaitan J. B., Ferrucho, R. L., & Álavarez-Herrera, J. G. (2014). Effect of two *Trichoderma* strains on *Botrytis cinerea* control and fruit quality for the strawberry (*Fragaria* sp.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 8(1), 44-56.
- Méndez, J, Otahola, V., Pereira., E., Simosa, J., Tellis., L., Zabala, E. (2007). Comparación del desecho de un fluido de perforación base agua no dispersado con la fertilización química en el cultivo de frijol (*Vigna Unguiculata*). *IDESIA*, vol 25, N° 1. p 7-20.
- Mitidieri, M. S., Barbieri, M. O., Brambilla, M. V., Peralta, R., Piris, E. B., Piris, M., & Veron, R. A. (2011). Evaluación de dos cepas comerciales de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* como biocontroladores de *Monilinia fructicola* en San Pedro. In *Congreso Argentino de Fitopatología. 2. 2011 06 1-3, 1, 2 y 3 de junio de 2011. Mar del Plata, Buenos Aires. AR.*
- Mitra J., Mukherjee P.K., Kale S. P. & Murthy N. B. K. (2001). Bioremediation of DDT in soil by genetically improved strains of soil fungus *Fusarium solani*. *Bio-degradation* 12, 235-245.

-
- Moen, M. A., Hammel, K. E. (1994). Lipid peroxidation by the manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* the basis for phenanthrene oxidation by the intact fungus. *Appl Environ Microbiol.* 60, 1956-1961.
 - Mormina, M.V., Romero, A. E., Álvarez, S. E., Arias, M.P., De Pascuale, J.A., Bovi Mitre, G. (2013). Producción conidial y viabilidad de cepas autóctonas de *Trichoderma* sp aisladas de suelos de Maimara (Jujuy) expuestas *in vitro* a carbofuran. IX Reunión Nacional Científico-Técnica de Biología de Suelos, I Congreso Nacional de Biología Molecular de Suelos. Santiago del Estero, (ISBN 978-987-1676-05-7).
 - Morton CO, Hirsch PR, Kerry B. (2004). Infection of plant parasitic nematodes by nematophagous fungi – a review of application of molecular biology to understand infection processes and to improve biological control. *Nematology.* (6):161-170.
 - Mukherjee, I., Mittal, A., (2005). Bioremediation of endosulfan using *Aspergillus terreus* and *Cladosporium oxysporum*. *Bull Environ Contam Toxicol.* 75, 1034-1040.
 - Mulligan, C. N. (2001). An overview of in situ bioremediation processes. In *Proceedings of the 29th Annual Conference of the Canadian Society for Civil Engineering, Victoria, BC, May.*
 - Nannipieri, P. & Badalucco, L. (2003). Processes in the Soil–Plant System: Modelling Concepts and Applications. *European Journal of Soil Science.* 54: (4): 655–670.
 - Neff, J. M. (2005, January). Composition, environmental fates, and biological effect of water based drilling muds and cuttings discharged to the marine environment: A synthesis and annotated bibliography. In *Report prepared for the Petroleum Environmental Research Forum (PERF). Washington DC: American Petroleum Institute.*
 - Pahlman, R., & Pelkonen, O. (1987). Mutagenicity studies of different polycyclic aromatic hydrocarbons: the significance of enzymatic factors and molecular structure. *Carcinogenesis,* 8(6), 773-778.
 - Papavizas, G. C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual review of phytopathology,* 23(1), 23-54.

-
- Paz, Z., Komon-Zelazowska, M., Druzhinina, I. S., Aveskamp, M. M., Schnaiderman, A., Aluma Y., Carmeli, S., Ilan, M., & Yarden, O., (2010). Diversity and potential antifungal properties of fungi associated with a Mediterranean sponge. *Fungal diversity* 42:17-26.
 - Pérez, A.A., Muñoz, J.O., Arregui, G.O. (2012). Evaluación de la capacidad biocontroladora de una cepa nativa de *Trichoderma* sobre *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia solani* Kühn en un cultivo de papa. Resúmenes XIV Jornadas Fitosanitarias Argentinas. P. 38.
 - Pothuluri, J. V., Freeman, J. P., Evans, F.E., Cerniglia, C.E. (1992). Fungal metabolism of acenaphthene by *Cunninghamella elegans*. *Appl Environ Microbiol.* 58, 3654-3659.
 - Prado, D.E. (1995). Selva Pedemontana: contexto regional y lista florística de un ecosistema en peligro: 19-52. *En: Brown, A.D. & Grau, H.R. (eds.). Investigación, Conservación y desarrollo en Selvas subtropicales de montaña, Proyecto de Desarrollo Agroforestal - LIEY – UNT. Tucumán.*
 - Ranasingh, N., Saurabh, A. & Nedunchezhiyan, M. (2006). Use of *Trichoderma* in *Disease Management*. Orisa Review. (68-70).
 - Ravelet, C., Krivobok, S., Sage, L., Steiman R., (2000). Biodegradation of pyrene by sediment fungi. *Chemosphere* 40, 557-563.
 - Regidor, H., & Guzmán, J. (2015). Toxicidad del agua de producción hidrocarburífera sobre el pez *Astyanax abramis* (jenyns 1842). *Multiciencias*, 15(2).
 - Restrepo, R. (2002). Derrame de hidrocarburos. Impacto en los ecosistemas tropicales. ECOPETROL Instituto Colombiano de Petróleo.
 - Rojo, F.G., Reynoso, M.M., Ferez, M., Chulze, S.N., Torres, A.M., (2007). Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions. *Crop Prot.* 26, 549-555.
 - Röling W. F., Milner M. G., Jones M., Lee K., Daniel F., Swannell R. J. P. & Head I. M. (2002). Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5537-5548.

- Romero Rosales, T. (2014). Cepas nativas de *Trichoderma* spp., aisladas de suelo cultivado con jamaica, su antibiosis y micoparasitismo sobre *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*.
- Sadhasivam, S., Savithaa, S., Swaminathana, K., (2007). Exploitation of *Trichoderma harzianum* mycelial waste for the removal of rhodamine 6G from aqueous solution. *J Environ Manage.* 85, 155-161.
- Sagar V. & Singh D.P. (2011). Biodegradation of lindane pesticide by nonwhite-rot soil fungus *Fusarium* sp. *World J. Microb. Biot.* 27, 1747-1754.
- Samuels, G.J., (1996). *Trichoderma*: a review of biology and systematic of the genus. *Mycol Res.* 100, 923-935.
- Samuels, G.J., (2005). Changes in taxonomy, occurrence of the sexual stage and ecology of *Trichoderma* spp. *Phytopathology.* 96, 195-206.
- Samuels, G.J., Chaverri, P., (2003). *Hypocrea/Trichoderma* (ascomycota, hypocreales, hypocreaceae): species with green ascospores. *Stud Mycol.* 48, 1-116.
- Sayler, G.S., Fleming, J.T., Nivens, D.E., (2001). Gene expression monitoring in soils by mRNA analysis and gene lux fusions. *Curr Opin Biotechnol.* 12, 455-460.
- Schulein, M., (2000). Protein engineering of cellulases. *Biochim Biophys Acta.* 1543, 239-252.
- Schuster, A., & Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(3), 787-799.
- Semple, K. T., Morriss, A. W. J. & Paton, G. L., (2003). Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. *European Journal of Soil Science*, 54(4), 809-818.
- Siva S, Brett R, Tessa M, Vogeler I, Clothier B, Grant L. McNaughton N. & D. (2004). Bioremediation of soils contaminated with organic compounds. En: http://www.regional.org.au/au/asssi/supersoil2004/pdf/1455_sivakumarans.pdf.
- Sivila, N., Álvarez, S. (2013). Producción artesanal de *Trichoderma*. Tecnologías agroecológicas para la agricultura familiar. Ed. UNJu, E-book: 48 disponible online: www.cedafjujuy.com.ar.

-
- Stiner, L., Halverson, L.J., (2002). Development and characterization of a green fluorescent protein-based bacterial biosensor for bioavailable toluene and related compounds. *Appl Environ Microbiol.* 68, 1962-1971.
 - Sun, F., & Chen, H. S. (2008). Monitoring of pesticide chlorpyrifos residue in farmed fish: investigation of possible sources. *Chemosphere*, 71(10), 1866-1869.
 - Sutherland, J.B., Selby, A.L., Freeman, J.P., Evans, F.E., Cerniglia, C.E. (1991). Metabolism of phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol.* 57, 3310-3316.
 - Szengyel, Z., Zacchi, G., Varga, A., Reczey, K., (2000). Cellulase production of *Trichoderma reesei* Rut C-30 using steam-pretreated spruce: hydrolytic potential of cellulases on different substrate. *Appl Biochem Biotechnol.* 86, 679-691.
 - Toyooka, T., Ibuki, Y. (2007). DNA damage induced by coexposure to PAHs and light. *Environ Toxicol Phar.* 23, 256-263.
 - USEPA. (1999). Use of monitored natural attenuation at superfund, RCRA corrective action and underground storage tank sites. OSWER Directive Number 9200.4-17P. Office of Solid Waste and Emergency Response. Washington, DC.
 - Velasco, J.A. & Volke Sepúlveda, T.L. (2003). El composteo: una alternativa ecológica para la biorremediación de suelos en México. *Gaceta Ecológica.* 66: 41-53.
 - Widden, P., Scattolin, V. (1988). Competitive interactions and ecological strategies of *Trichoderma* species colonizing spruce litter. *Mycologia* 80, 795-803.
 - Zayed, S. M. A. D., Mostafa, I. Y., Parghaly, M. M., Ataby, H. S. H., Adam, Y. M., & Mahdy, P. M. (1983). Microbial degradation of tripluralin by *aspergillus carneus*, *Fusarium oxysporum* and *Trichoderma viride*. *Journal of Environmental Science & Health Part B*, 18(2), 253-267.

CAPITULO III

Descripción de las zonas de muestreo. Metodología de muestreo.

3.1. Grupo Salta

Los sedimentos que integran la llamada Cuenca Cretácica del Noroeste Argentino se extienden sobre gran parte de las Provincias de Jujuy, Salta, Tucumán y Formosa y se la ha dividido en grupos (Boll & Hernández, 1985; Boll *et al.*, 1989). El Grupo Salta en el noroeste está constituido por tres subgrupos que de base a techo son: Pirgua, Balbuena y Santa Bárbara (Reyes & Salfity 1973; Moreno 1970).

La Formación Yacoraite junto a la formación Lecho-lacustre pertenece al Subgrupo Balbuena (De Spirito, 1980). Esta formación fue definida en la quebrada del Rio Yacoraite al sur de la localidad de Uquia en la Provincia de Jujuy (Turner, 1959).

Las evidencias sedimentológicas, los elementos faunísticos y palinológicos permiten relacionar a la Formación Yacoraite con un ambiente lacustre con influencia marina a fines del Cretácico (Plan de Gestión, 2009).

En el primer periodo del Terciario (Cenozoico) por efectos tectónicos y el ascenso de la Cordillera de los Andes llevaron al retiro del mar que produjo una desecación acompañada de una deposición conformando las series basales del Subgrupo Santa Bárbara que está integrado por 4 formaciones: Olmedo, Mealla, Maíz Gordo y Lumbrera culminando la historia sedimentaria del Grupo Salta (Hernández *et al.*, 2008; Starck, 2011).

3.2. Yacimiento Caimancito.

El Yacimiento Petrolero Caimancito responde a una trampa estructural anticlinal de orientación N-S, con el flanco oriental fallado y más empinado que el occidental. Desde 1825 en la cuenca del Noroeste y antes del descubrimiento del Yacimiento Caimancito se perforaron algo más de una decena de pozos, que en el mejor de los casos mostraron manifestaciones o producciones marginales. Más tarde, en 1933 Yacimientos Petrolíferos Fiscales (YPF) se instala en Moralito y Santa Bárbara; dos años después realiza el pozo exploratorio en el Saladillo de la Brea, a unos 20 kilómetros de Yuto, denominado Jujuy Estructural 1 que ubicó gas y petróleo a los 1.590 m de profundidad (YPF, 1972).

Recién en el año 1969 se crea el Yacimiento Petrolero Caimancito, diez años antes de la creación del PNC (**Mapa 3.1**), con el pozo exploratorio YPF.Jj.Ca.x-1, realizado por la compañía estatal YPF, que luego de más de 7 meses de perforación resultó productivo para la Formación Yacoraite a una profundidad de 4.010 m con 500 m³ de petróleo diario.

Su principal reservorio lo constituyen carbonatos, dolomías y calizas naturalmente fracturadas que se encuentra a 4.000 m de profundidad (Grosso *et. al.*, 2013). El petróleo original *in situ* de la Formación Yacoraite es de 24.385.800 m³ con una temperatura de reservorio de 295°F a 4.580 m de profundidad, la salinidad del agua de formación es 110 gr/l de sales totales y la densidad es de 42°API, haciendo que sea muy liviano y no se mezcle con el agua. El yacimiento no presenta un casquete gasífero debido a la presión natural del reservorio (480 kg/cm²) que tiende a disminuir con la producción y se recupera cuando se deja de producir. Un ejemplo es el pozo Ca-3 del yacimiento con una presión generada de 57 kg/cm² en la boca y 461 kg/cm² a una profundidad de 4.000 m (Informe Pluspetrol, 1970).

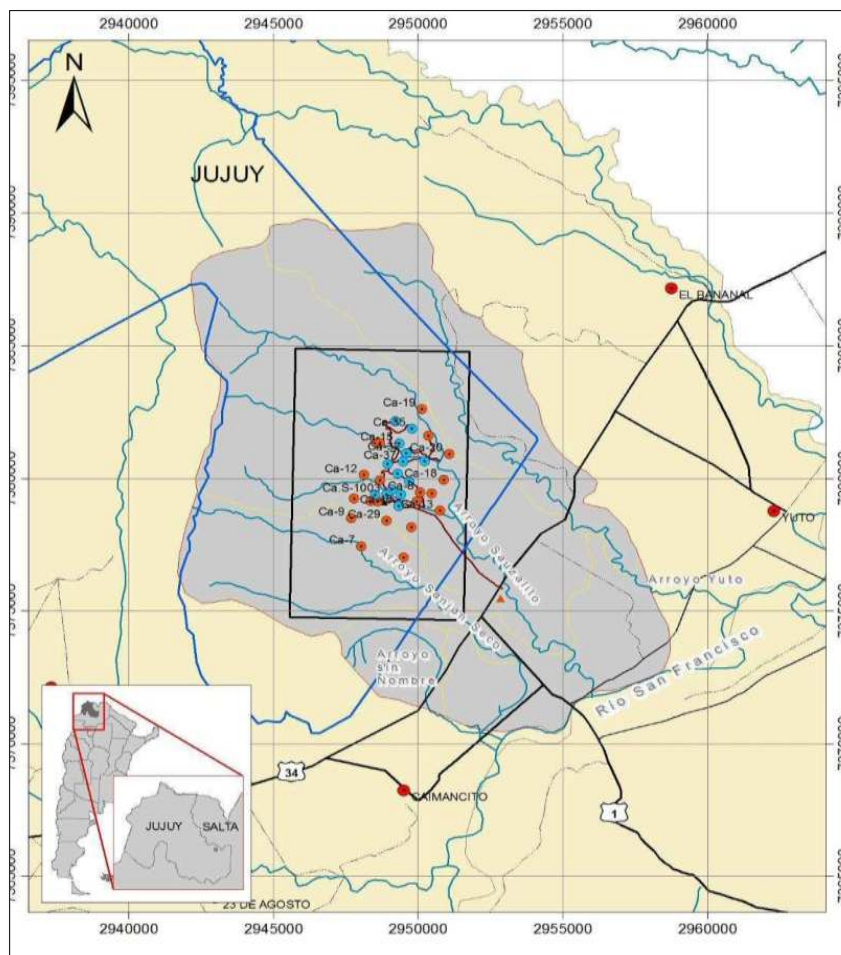
El yacimiento alcanzó a producir 6.000 m³/día y el volumen de petróleo producido históricamente en la Formación Yacoraite es de 9.887.000 m³. En el año 1974 marco un record con un máximo de productividad de 4.700 m³/día en el pozo Ca-3 que se encuentra fuera del PNC.

Se estima que se han descubierto unos 23 millones de m³ en la cuenca, de los que a la fecha han sido prácticamente producidos en más de un 90%. La cuenca, en promedio, se encuentra en un estado bastante avanzado de madurez exploratoria y el valor de las reservas descubiertas está indicando que se trata de una cuenca pobre por la baja disponibilidad de roca madre y porque la madurez térmica no alcanza la ventana de generación (Starck, 2011).



Mapa 3.1. Ubicación del Parque Nacional Calilegua (Plan de Gestión PN Calilegua, 2009).

El yacimiento posteriormente se amplió con la perforación de 36 pozos, 26 en la Formación Yacoraité, 10 en las formaciones Maíz Gordo y Lumbreira. Actualmente existen 32 pozos, 12 pozos se mantienen activos en producción, 20 inactivos de los cuales 3 pozos están inactivos con acceso y 17 pozos inactivos sin acceso en estado de abandono, con rupturas o pérdidas. (JHP, 2014) (**Mapa 3.2**).



Mapa 3.2. Ubicación de los pozos dentro del PNC en el Yacimiento Caimancito. En naranja (pozos inactivos) y en celeste (pozos activos) (JHP, 2014).

En informes realizados por la Administración de Parques Nacionales (APN), se exponen las condiciones de las instalaciones, el deterioro ambiental, la deforestación, la caza furtiva indiscriminada y las evidencias de especies amenazadas como el Yaguareté (*Panthera onca*), Ocelote (*Leopardus pardalis*), Antas (*Tapirus terrestres*), Mayuatos (*Procyon cancrivorus*) entre otros. Ante estos desequilibrios ambientales, sumado a la notable disminución de la producción de petróleo y un compromiso de abandono de la actividad petrolera, se decidió en 1999 incorporar gran parte del área concesionada del Yacimiento Caimancito al Parque Nacional, quedando entonces en jurisdicción y dominio de la APN (DRNOA, 1994; Di Bitetti *et al.*, 2010a; Ojeda *et al.*, 2012).

3.3. Infraestructura del Yacimiento Caimancito.

El Yacimiento Caimancito ocupa una superficie aproximada de 5.700 ha dentro de la Selva Pedemontana de las yungas. Posee una batería central donde se ubica la planta de tratamiento de crudo y la planta de compresión de gas, en la cual se separa el agua de producción y el gas (**Imagen 3.1**). El petróleo es conducido por un sistema de 24.000 m de ductos a la planta de almacenamiento para ser refinado en la localidad de Tartagal, provincia de Salta. El agua de formación es almacenada en piletas API (**Imagen 3.2**), las cuales desagotaban anteriormente en un arroyo cercano, pero actualmente constituyen un sistema cerrado donde se procesa y se reinyecta al subsuelo mediante un pozo inyector. El gas (**Imagen 3.3**) pasa a un gasoducto conformado por 8.000 m de tuberías hasta la planta de despacho que se encuentra sobre ruta nacional N° 34.

La mayoría de estas cañerías se encuentran en mal estado de conservación, apoyadas en árboles, en laderas desestabilizadas con grandes cárcavas (Plan de Gestión PN Calilegua, 2009; Informe, 1999¹).



Imagen 3.1. Batería ubicada en el Yacimiento Caimancito (Informe Greenpeace, 2015).

¹ Informe de la Auditoría General de la Nación. (1999)

http://www.agn.gov.ar/files/informes/1999_125info.pdf

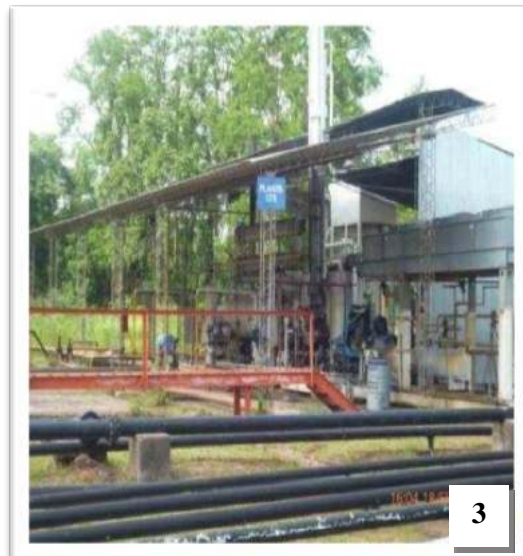


Imagen 3.2. Pileta API de la batería en funcionamiento en el Yacimiento.

Imagen 3.3. Planta de compresión de Gas.

Siete de los pozos cuentan con una pileta o fosa, que almacena petróleo, agua de formación, fluidos de perforación, residuos químicos y sólidos, recintos a cielo abierto los cuales fueron restaurados incorrectamente y solo tapados con tierra (**Imagen 3.4 y 3.5**)



Imagen 3.4. Piletón de pozo con petróleo a cielo abierto de pozo Ca - 39 (Informe, 1999).

Imagen 3.5. Piletón de pozo Ca-30 (aproximadamente 1996), restaurado incorrectamente con cobertura de tierra. Se observa un proceso de regeneración del sistema con gramíneas (2015).

3.4. Sitios de Muestreo

La zona de explotación y la infraestructura del Yacimiento Caimancito se localiza principalmente en el área pedemontana del PNC (Cabrera, 1976).

Distribuida entre los 400 -700 msnm, la selva pedemontana representan el piso de Yungas con mayor porcentaje de especies arbóreas exclusivas (Morales *et al.* 1995), con una condición ecológica diferenciable y un altísimo porcentaje de especies e individuos caducifolios (más del 70%), la que la convierte en uno de los sistemas forestales más estacionales de Sudamérica (Prado, 1995; Brown 1995; Brown *et al.* 2001). Ambientalmente es considerada en estado crítico de conservación, por el deterioro debido a las actividades de explotación ganadera, agrícola e industrial.

Las precipitaciones en el PNC presentan un régimen de distribución monzónico, con una estación lluviosa entre los meses de noviembre y abril, período en el que se registra entre el 80 y 90% de las precipitaciones anuales, con temperaturas medias mensuales que oscilan entre los 13 a 30 °C y con una temperatura media anual de 20 °C.

En los sectores pedemontanos las precipitaciones varían entre los 1.000 y 1.500 mm, con un período seco de seis meses (junio-noviembre), con precipitaciones inferiores a 50mm mensuales, sin aportes adicionales de neblina como ocurre en los restantes pisos ecológicos de las Yungas (Brown y Grau 1993).

Los cinco sitios de muestreo seleccionados en el Yacimiento presentan características topográficas con pendientes suaves a moderadas, drenaje subparalelo y modelado fluvial que favorece los escurrimientos superficiales con potencial lixiviación para transporte y dispersión del residuos a terrenos vecinos, cursos de agua superficial y sitios de acumulación.

Las muestras provenientes de Maimara corresponden a suelos pedregosos, arenosos semiáridos, muy permeables, inmaduros con valles fértiles. Las precipitaciones son menores a los 180 mm/año y casi todas estivales, su temperatura media anual es entre los 10 y 14°C. En cuanto a la vegetación predominan estepas y matorrales arbustivos xerofíticos. Es una zona de cultivo de frutales, hortalizas y ornamentales.

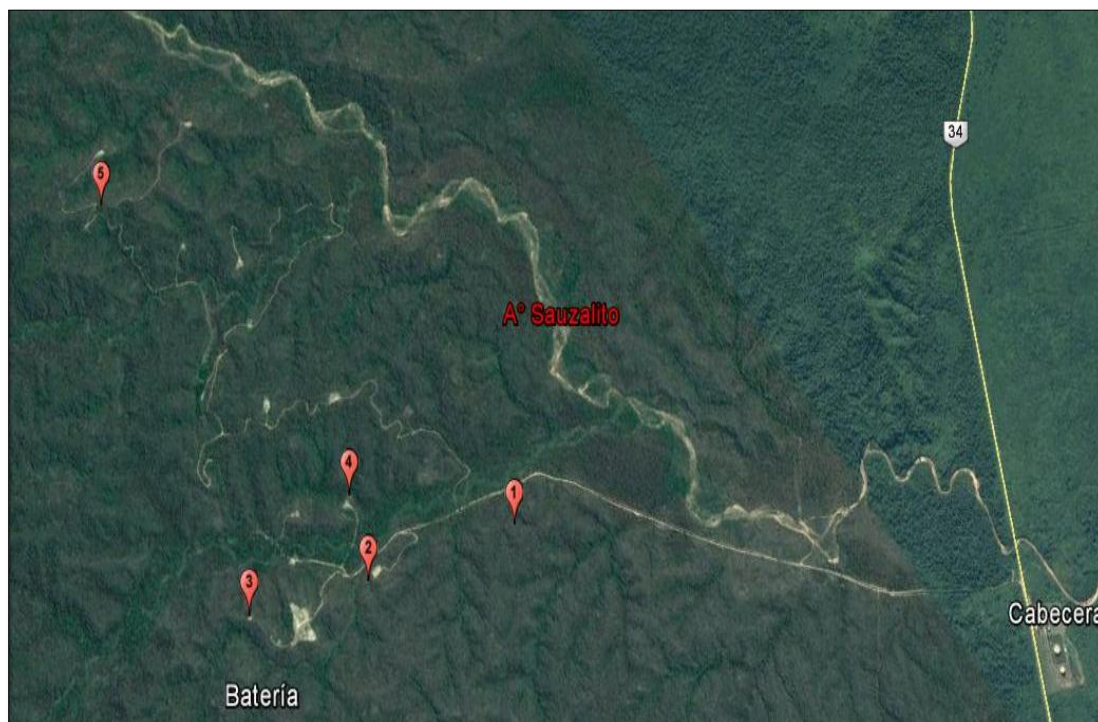
3.5. Metodología de muestreo de suelos y criterio de selección de los sitios de muestreo en las zonas contaminadas del Yacimiento Caimancito.

Para la ubicación de los sitios de muestreo se utilizó un mapa elaborado por la Administración de Parques Nacionales (APN) (**Mapa 3.3**) que detalla la ubicación de los pozos en el yacimiento y la guía de un guardaparque para llegar a los mismos. Las muestras recolectadas del yacimiento fueron trasladadas en una conservadora al Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNJu) donde fueron almacenadas hasta el momento de su procesamiento.



Mapa 3.3. Mapa elaborado por el PNC que se utilizó para ubicar los sitios de muestreo y recorrer el Yacimiento Petrolífero Caimancito.

Los sitios de muestreo seleccionados dentro del yacimiento se tomaron teniendo en cuenta el año del derrame, características del contaminante y el relieve. Todos los sitios fueron georeferenciados (**Mapa 3.4**).



Mapa 3.4. Sitios de muestreo seleccionados dentro del Yacimiento Caimancito.

En el Yacimiento Petrolífero Caimancito se tomaron muestras de cinco sitios. La toma de muestras se llevó a cabo durante el mes de Noviembre de 2014 al final de la estación seca, en la región de Selva Pedemontana.

En total se tomó una muestra compuesta de 5 sub-muestras por sitio con patrones de muestreo a través de diagonales simples y en zig-zag. Antes de tomar cada muestra se removió la hojarasca del suelo y se utilizó una pala jardinera para extraer pequeñas cantidades de suelo de una profundidad de 0 - 20 cm colocándose en bolsas de polietileno hasta completar aproximadamente 1 kg como representativo del lugar, cada una fue rotulada y georeferenciada.

Las cinco situaciones diferentes fueron:

Sitio 1. Derrame ocurrido el 29 de Julio de 2007 por la ruptura del oleoducto principal a causa del mal estado de conservación de las cañerías que va desde la Batería dentro del PNC a la cabecera de Yacimiento sobre ruta Nacional N° 34.

El sitio de muestreo se ubica a 442 msnm con coordenadas 23° 38' 59.13" Sur, 64° 35' 22.04" Oeste. En esta zona se derramaron aproximadamente 40.000 litros de petróleo crudo tratado (sin agua de formación y sin gas) que recorrió a lo largo de unos 7 km sobre un arroyo temporario que desemboca en el Arroyo Sauzalito que es afluente del rio San Francisco. En las medidas que se tomaron para evitar que el contaminante llegue al Arroyo Sauzalito se pusieron trampas de empozamiento, vertido de arena, contenedores y filtros que no fueron suficientes para evitar que el derrame alcance el arroyo y la contaminación del mismo.

El sitio de muestreo seleccionado fue en la parte central del cauce del arroyo temporario por donde se extendió el petróleo y el patrón de muestreo se realizó a través de una diagonal simple con los puntos equidistantes. Se observa una gran cantidad de materia orgánica (hojas, ramas, restos de corteza, frutos) cubriendo el suelo y los alrededores están cubiertos de árboles y arbustos. Retirada la misma, el suelo presenta una estructura arenosa (**Imagen 3.6 y 3.7**).



Imagen 3.6. Sitio 1 cauce de arroyo temporario contaminado en el 2007 por derrame de petróleo crudo por la ruptura del oleoducto principal.

Imagen 3.7. Barrera de contención en el Sitio 1.

Sitio 2: Es un piletón o fosa de depósito donde se vertían todos los desechos de producción generados del pozo Ca – 30 llamado Caimán 30 el cual es activo y surgente.

Contendría hidrocarburos, agua de formación fluidos de perforación, entre otros contaminantes. En el año 1996 se drenó su contenido pero sin extraer ni tratar nada y fue tapado solamente con tierra. El sitio se ubica a 499 msnm con coordenadas 23°38'45.07" Sur y 64°35'57.40" Oeste.

El sitio de muestreo seleccionado se ubica inmediatamente al oeste del pozo Ca-30 y es una zona que fue desmontada y excavada para construir el piletón o fosa. El patrón de muestreo fue en zig-zag con una distancia equidistante entre cada punto. Presenta un estado de regeneración de la vegetación con predominancia de herbáceas, especialmente gramíneas, ciperáceas y totoras (familia *Typhaceae*), y en los bordes del piletón la selva presenta un estado de revegetación natural con especies pioneras como “guaran” (*Tecoma stans*) y “tuscas” (*Acacia spp*). Retirada la cubierta vegetal, el suelo presenta una estructura limoarcillosa con poca materia orgánica (**Imagen 3.8 y 3.9**).



Imagen 3.8. Pozo activo Ca-30 del yacimiento, al fondo se observa una pileta de ensayo desvinculada del pozo que contiene agua y productos.

Imagen 3.9. Piletón o fosa de pozo Ca-30 cubierta con tierra, lugar de vertido de los desechos de perforación.

Sitio 3. El muestreo se realizó en el mechero de venteo (Flare) de Batería en la cabecera del yacimiento, presenta contaminación permanente por derrames de petróleo crudo y agua formación desde el año 1996. El sitio se ubica a 547 msnm con coordenadas 23°38'32.45" Sur y 64°36'24.30" Oeste.

El sitio de muestreo seleccionado se ubica a 300 m de la batería dentro del parque, este sector se encuentra cercado, con un recinto de contención y sin malezas, la toma de muestras se realizó en el lado posterior del mechero con un patrón de muestreo realizado en zig-zag y con puntos equidistantes. En los bordes de la plataforma se observa un estado aparentemente natural de la selva con árboles y arbustos de distintas edades. El suelo presenta una estructura conformada por arena y ripio con poca materia orgánica (**Imagen 3.10 y 3.11**).

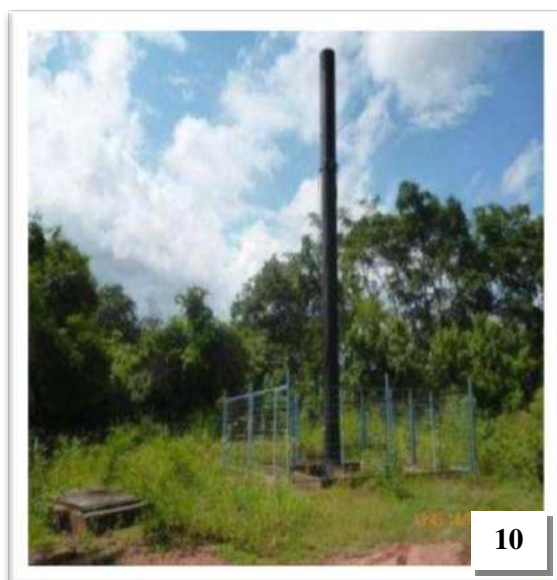


Imagen 3.10. Mechero de venteo (Flare) de Batería del Yacimiento, contaminación permanente desde el año 1996.

Imagen 3.11. Recinto de contención del mechero de venteo.

Sitio 4. Es un piletón o fosa, próximo al Pozo Ca-40 denominado Caimán 40, el cual es activo y surgente. Del piletón no se extrajeron los lodos del fondo de la fosa y se volvió a tapar con tierra en el año 1996, contiene desechos y fluidos de perforación del pozo Ca-40. El sitio de muestreo se ubica a 491 msnm con coordenadas 23°38'30.20" Sur y 64°35'51.64" Oeste a 100 m del pozo, es un claro dentro del bosque con poca vegetación y regeneración del mismo a comparación del piletón del pozo Ca-30. Se realizó un patrón de muestreo en zig-zag y con puntos equidistantes. Es un suelo pobre en materia orgánica de estructura arenosa donde el petróleo crudo se lo encuentra a pocos metros cuando es excavado (**Imagen 3.12 y 3.13**).



Imagen 3.12. Pozo Ca-40 activo del Yacimiento Caimancito.

Imagen 3.13. Piletón o fosa de pozo Ca-40 cubierta con tierra, lugar de vertido de los desechos de perforación.

Sitio 5. Es un área contaminada por un derrame de petróleo crudo, agua de formación y gas, ocurrido por la ruptura de la línea de conducción del Pozo Ca-4 llamado Caimán 4 en el año 2004 clasificado como activo y surgente. No se determinó el volumen pero se estima que se derramó la producción diaria.

Las muestras se tomaron en una pendiente por la que drenó el petróleo derramado. El patrón de muestreo se realizó a través de una diagonal simple con los puntos equidistantes, la primera muestra se extrajo de un costado del oleoducto donde se produjo la ruptura, a 642 msnm con coordenadas 23°37'10.51" Sur y 64°36'9.09" Oeste.

La segunda muestra se tomó a 635 msnm con coordenadas 23°37'11.09" Sur y 64°36'9.28" Oeste, la tercera a 630 msnm con coordenadas 23°37'11.60" Sur, 64°36'9.31" Oeste, la cuarta a 629 msnm con coordenadas 23°37'12.12" Sur, 64°36'9.17" Oeste y la quinta a 628 msnm con coordenadas 23°37'12.87" Sur, 64°36'9.01" Oeste.

El sitio en toda su pendiente muestra un estado de selva aparentemente natural con estructura arbórea de diferentes edades que resaltan la capacidad de regeneración del lugar. El suelo presenta una gran cantidad de materia orgánica y de estructura limoarcillosa (**Imagen 3.14 y 3.15**).



Imagen 3.14. Ruptura de línea de conducción del Pozo Ca-4 llamado Caimán 4

Imagen 3.15. Pendiente por la que drenó el petróleo derramado en el año 2004.

Las muestras de los sitios 6, 7, 8, 9 y 10 de Maimará se corresponden a suelos que no presentan derrames de petróleo crudo ni contaminación con otros tipos de hidrocarburos, para su recolección se siguió la misma técnica descrita para los sitios contaminados y fueron provistas por INQA (Investigación de Química Aplicada) en el marco del proyecto “PACTO 2008: Contaminantes, riesgos y alternativas para el desarrollo sustentable de agricultores entre los valles fértiles andinos de la quebrada de Humahuaca y la baja puna jujeña”.

Bibliografía

- Boll A. & Hernández, R. (1985). Área Tres Cruces. Provincia de Jujuy. Análisis estratigráfico-estructural. Evaluación como objetivo exploratorio. Informe inédito YPF, Buenos Aires.
- Boll A., Gómez Omil, R. & Hernández R. (1989). Síntesis Estratigráfica del Grupo Salta. Informe inédito YPF, Buenos Aires.
- Brown, A. D. (1995). Fitogeografía y conservación de las selvas de montaña del noroeste de Argentina. *Biodiversity and conservation of Neotropical montane forests*, 663-672.
- Brown, A. D., & Grau, H. R. (1993). La naturaleza y el hombre en las selvas de montaña.
- Brown, A. D., & Kappelle, M. (2001). Introducción a los bosques nublados del neotrópico: una síntesis regional. *Bosques nublados del neotrópico*, 27-40.
- Brown, A. D., Blendinger, P. G., Lomáscolo, T., & García Bes, P. (2009). Selva pedemontana de las Yungas: historia natural, ecología y manejo de un ecosistema en peligro. *Buenos Aires: Ediciones del Subtrópico*.
- Cabrera, A. L. A. L. C., Arenas, P., JORGE, V., LOPEZ HUGO, S., & Bertullo, V. H. V. H. (1976). Enciclopedia argentina de agricultura y jardinería. Fascículo 1, Regiones fitogeográficas argentinas.

-
- De Spirito, R. (1980). Estudio en detalle y análisis de cuenca de los subgrupos Balbuena y Santa Bárbara, en el sector centro oriental de la Subcuenca de Lomas de Olmedo y Umbral de Cachipunco. Informe inédito YPF, Buenos Aires.
 - Di Bitetti M.S., Albanesi S. & Foguet M.J. (2010a). La diversidad de mamíferos terrestres en el paisaje productivo protegido de Ledesma SAAI: permeabilidad de la matriz y efectividad de los corredores riparios. Informe científico-técnico a la Fundación Proyungas. 16 pp.
 - DRNOA. Delegación Técnica Regional Noroeste. (1994). Propuesta de Mitigación para el Sector Caimancito del Parque Nacional Calilegua.
 - Grosso, S., López, R., Vergani, G., & O'leary, S. (2013). Reservorios carbonaticos naturalmente fracturados en el Yacimiento Caimancito (Formación Yacoraite), cuenca cretácica del noroeste Argentino. *Revista de la Asociación Geológica Argentina*, 70(1), 53-69.
 - Hernández, R. M., Gómez Omil, R., & Boll, A. (2008). Estratigrafía, tectónica y potencial petrolero del rift Cretácico En la provincia de Jujuy. In B. Coria, & E. O. Zappettini (Eds.), *Actas XVII Congreso Geológico Argentino* (pp. 207-232).
 - Informe (2015) "El lado oscuro de la selva. Explotación petrolera en el Parque Nacional Calilegua".
 - Informe Pluspetrol. 1970. Análisis de Pozo Ca-2 y Ca-3. Yacimiento Caimancito. Jujuy.
 - Morales, J. M., Sirombra, M., & Brown, A. (1995). Riqueza de árboles en las Yungas argentinas.
 - Moreno, J. A. (1970). Estratigrafía y paleogeografía del Cretácico Superior en la cuenca del Noroeste Argentino, con especial mención de los Subgrupos Balbuena y Santa Bárbara, *Bastiaens.*, 24, 9-44.
 - Ojeda, R. A., Chillo, V., & Díaz Isenrath, G. B. (2012). Libro rojo de mamíferos amenazados de la Argentina. Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos (SAREM). Argentina.
 - Plan de Gestión Parque Nacional Calilegua, 2009.

-
- Prado, D. E. (1993). Selva pedemontana: contexto regional y lista florística de un ecosistema en peligro. *Reunión Regional Sobre Selvas de Montañas. Horco Molle, Tucumán (Argentina). 15-17 Abr 1993.*
 - Reyes, F. C., & Salfity, J. A. (1973). Consideraciones sobre la estratigrafía del Cretácico (Subgrupo Pirgua) del noroeste argentino. In *5 Congreso Geológico Argentino* (Vol. 3).
 - Starck, D. (2011). Cuenca Cretácica-Paleógena del Noroeste Argentino. In *VIII Congreso de Exploración y Desarrollo de Hidrocarburos Simposio Cuencas Argentinas: Visión Actual, Instituto Argentino del Petróleo y el Gas* (pp. 407-453).
 - Turner, J.C.M. (1959). Estratigrafía del Cordón de Escaya y de la Sierra de Rinconada (Jujuy). *Revista de la Asociación Geológica Argentina* 12: 15-40, Buenos. Aires.
 - URS. (2014). Evaluación de Impacto Ambiental. Proyecto de desarrollo (3 años) Yacimiento Caimancito. Provincia de Jujuy. Informe técnico para JHP Internantional Petroleum Engineering LTD. 642 págs. (4 Capítulos + Anexos + Resumen Ejecutivo). Estudio de Impacto Ambiental – Proyecto de Desarrollo (3 años) Yacimiento Caimancito – JHP International Petroleum Engineering Ltd.2014.
 - Valencia, I. E., & Hernández, B. A. (2002). Muestreo de suelos, preparación de muestras y guía de campo. *Universidad Autónoma de México. Facultad de estudios Superiores de Cautitlán, México.*
 - Yacimientos Petrolíferos Fiscales, Una empresa al servicio del país. (1972) pag. 68 Buenos Aires.

CAPITULO IV

Aislamiento e Identificación de cepas del genero *Trichoderma* de suelos de Caimancito y Maimara.

Resumen

Durante las maniobras de extracción, procesamiento y transporte de hidrocarburos, los suelos sometidos a derrames accidentales alteran las condiciones ecológicas del suelo, tanto químicas como biológicas. Cuando un suelo prístino es alterado por un derrame de petróleo crudo es considerado un suelo de contaminación aguda y cuando está contaminado desde hace tiempo o de manera constante, como un suelo crónico. El aislamiento de microorganismos (bacterias, hongos y levaduras) a partir de ecosistemas contaminados evidencia la existencia de ciertos microorganismos capaces de biotransformar hidrocarburos en compuestos menos tóxicos o inocuos para el ambiente. El género *Trichoderma* ha sido aislado de la rizósfera de suelos y de pastos contaminados con petróleo crudo en forma aguda o crónica. El presente capítulo tuvo como objetivo aislar cepas de *Trichoderma* a partir de muestras de suelos de sitios contaminados y no contaminados con petróleo crudo. Se aislaron un total de 19 cepas, donde el 74 % correspondieron al Yacimiento Caimancito y el 26 % a Maimara. El sitio 1 del yacimiento presentó el 50 % de las cepas aisladas comparadas a los 4 sitios restantes; mientras que del muestreo de Maimara no se aislaron cepas de los sitios 9 y 10. Estos resultados resaltan la característica cosmopolita del género y la capacidad de adaptarse a condiciones extremas.

Palabras clave: Yacimiento Caimancito, Maimara, petróleo crudo y *Trichoderma*.

Abstract

Isolation and Identification of strains of the genus *Trichoderma* of soils of Caimancito and Maimara.

During the maneuvers of extraction, processing and transportation of hydrocarbons, soils subjected to accidental spills alter the ecological conditions of soil, both chemical and biological. When a pristine soil is altered by a crude oil spill, is considerate a soil of acute pollution and when is contaminated from a long time or constantly, a chronic soil. The isolates of microorganisms (bacterium, fungus and yeasts) from the ecosystems contaminated, evidence the existence of certain microorganisms capable of the hydrocarbons biotransformation in compounds less toxic or innocuous for the ambient. The *Trichoderma* genus has been isolated of the soils rizosphere and grass contaminated with oil crude in acute or chronic form. Were isolated a total of 19 strains, where the 74% they corresponded the deposit Caimancito and the 26 % to Maimara. The site 1 of the deposit Caimancito had the 50% of the isolations, compared to the four remaining sites; while in the sampling of Maimara strains of the sites 9 and 10 were not isolated. These results stand out the characteristic cosmopolite the genus and the capacity of to adapt to extreme conditions.

Keywords: Oilfield Caimancito, Maimara, oil crude, *Trichoderma*

4.1. Introducción

El suelo se define como la parte superior de la corteza terrestre, y está compuesto por componentes minerales (meteorización de las rocas), componentes orgánicos (humus y derivados, biomasa viva y muerta), gas (aire en el espacio existente en los poros) y agua envolviendo partículas y el espacio capilar que permiten desarrollar la actividad metabólica de los microorganismos que lo colonizan (Madigan, 2000).

La ecología, la actividad y la dinámica de los microorganismos del suelo puede ser afectada por varios factores ambientales (fuentes de carbono, energía, nutrientes, T°, pH, entre otros) y biológicos (genética y sus relaciones) (Kästner, 2000b).

Durante las maniobras de extracción, procesamiento y transporte de hidrocarburos, los suelos están continuamente sometidos a derrames accidentales que alteran las condiciones ecológicas del suelo, cambiando sus características, tanto químicas (incremento del contenido de carbono (C) y alterando la relación C:N:P) como biológicas (biodiversidad). Cuando un suelo prístino recibe una contaminación repentina de petróleo crudo se lo considera como un suelo contaminado en forma aguda y si está contaminado hace tiempo o de manera constante como suelos contaminados en forma crónica (Días, 2012).

La presencia de este contaminante impide el intercambio gaseoso con la atmósfera, iniciando una serie de procesos fisicoquímicos simultáneos (evaporación y penetración) que pueden ser más o menos lentos, dependiendo del tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad vertida, ocasionando una mayor toxicidad. Por otro lado, su alto gradiente de salinidad puede destruir la estructura terciaria de las proteínas, desnaturalizar enzimas y deshidratar células, lo cual es letal para muchos microorganismos (De Mesa *et al.*, 2006).

A nivel biológico los hidrocarburos resultan un factor de stress (adicional a los existentes en el suelo) que condiciona el desarrollo de los diferentes componentes de la comunidad microbiana, permitiendo el crecimiento de aquellas poblaciones que desarrollan y utilizan respuestas enzimáticas y fisiológicas especializadas adecuadas, eliminando a aquellos que resultan sensibles (Atlas *et al.*, 1991).

El aislamiento de microorganismos (bacterias, hongos y levaduras) a partir de ecosistemas contaminados o de hábitats extremos ha evidenciado la existencia de ciertos

microorganismos capaces de biotransformar hidrocarburos en compuestos menos tóxicos o inocuos para el ambiente (Pernia *et al.*, 2012).

Entre los hongos el género *Trichoderma* junto a otros importantes como *Aspergillus* y *Penicillium* fue aislado de la rizósfera de suelos y de pastos contaminados con petróleo crudo en forma aguda o crónica (Rivera-Cruz *et al.*, 2002; April *et al.*, 1999). Por su parte Salmanov *et al.* (2007) aisló cepas de *Trichoderma* de suelos y aguas contaminadas e incluso de lagos naturales de asfalto donde crecen sobre crudo extrapesado (Naranjo *et al.*, 2007).

Son hongos cosmopolitas filamentosos, clasificados como *Ascomycetes* con una gran plasticidad adaptativa y es considerado un microorganismo hidrocarbonoclasta por haber sido aislado de suelos y de la rizósfera en cultivos con maíz contaminados con petróleo crudo (Radwan *et al.* 1995; Hernández-Acosta, *et al.*, 2003).

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

- El presente capítulo tuvo como objetivo aislar cepas de *Trichoderma* a partir de muestras de suelos de sitios contaminados y no contaminados con petróleo crudo.

4.2. Materiales y Métodos

4.2.1. Aislamiento y Conservación de cepas de *Trichoderma*.

Las muestras tomadas de cada sitio descrito en el Capítulo III se analizaron independientemente (**Tabla 4.1**). Cada sub-muestra fue tamizada y homogeneizada integrándose en una muestra de 1 kg. Se tomó 1gr por muestra realizando diluciones seriadas de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} μ l de cada suspensión y se distribuyó uniformemente sobre cajas de Petri con medio APG 2%, se incubaron en estufa a 26 ± 1 °C con periodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se realizaron tres repeticiones por dilución.

El género fue detectado por el color de la colonia verde o amarillo verdoso, de crecimiento rápido y abundante esporulación, característico de *Trichoderma*. Las colonias con características morfológicas del tipo *Trichoderma* se replicaron sobre medio APG 2% para la obtención de cultivos puros.

El resto de las muestras se colocaron en bolsas que quedaron abiertas dentro de una cámara con extractor de aire a fin de que pierdan humedad, una vez secas fueron colocadas en bolsas de papel para su almacenamiento.

Tabla 4.1. Sitios de muestro del Yacimiento Caimancito y Maimara.

Lugar de muestreo	Sitio	Coordenadas	Contaminante	Año de Derrame	Categoría
Yacimiento Caimancito	1	23°38'59.13"S 64°35'22.04"O	PC	2007	Agudo
	2	23°38'45.07"S 64°35'57.40"O	PC y DP	1996	Crónico
	3	23°38'32.45"S 64°36'24.30"O	PC y AF	1996	Crónico
	4	23°38'30.20"S 64°35'51.64"O	PC y DP	1996	Crónico
	5	23°37'10.51"S 64°36'9.09"O	PC y AF	2004	Agudo
Maimara	6	23°37'32.16"S 65°24'16.66"O	SC	-	-
	7	23°35'44.88"S 65°24'17.28"O	SC	-	-
	8	23°36'15.52"S 65°24'00.9"O	SC	-	-
	9	23°35'49.02"S 65°24'33.01"O	SC	-	-
	10	23°35'48.72"S 65°24'32.27"O	SC	-	-

*PC: Petróleo Crudo.

*DP: Desechos de perforación.

*AF: Agua de formación.

*SC: Sin contaminación de petróleo crudo.

4.2.2. Identificación del Género *Trichoderma*.

Macroscópicamente las colonias del género *Trichoderma* se identificaron de acuerdo a su aspecto, color y forma según lo descrito por Bisset (1991a).

Para su identificación microscópica se realizaron preparados colocando una gota de lactofenol sobre un portaobjetos y con la ayuda de un asa se puso un fino raspado de la colonia que se cubrió con un cubreobjetos. Las características microscópicas observadas fueron: la morfología de la hifas, los conidióforos con sus ramificaciones, las fialides en forma de botella y la forma de los conidios (Bisset 1991a).

4.2.3. Conservación de Cepas

Las colonias puras de *Trichoderma* fueron repicadas en tubos inclinados con medio de APG al 2%, e incubaron a 26 ± 1 °C con periodos de 12 horas oscuridad y 12 horas de luz en estufa hasta su esporulación (7-8 días aproximadamente). Posteriormente se conservaron en heladera a 4-7 °C.

4.3. Resultados y Discusión

4.3.1. Aislamiento, Identificación y Conservación de cepas

Se aislaron un total de 19 cepas de *Trichoderma*. Las cepas macroscópicamente fueron identificadas por ser colonias de color verde, bordes regulares y crecimiento rápido después de 72-96 horas de incubación a una temperatura de 26 ± 1 °C. Las colonias fueron repicadas e inicialmente eran de color blanco, tornándose posteriormente verdosas, hasta finalmente adoptar un color verde azulado a verde más oscuro (Rifai, 1969).

Microscópicamente presentaban hifas con pocos septos, conidióforos con ramificaciones laterales rectas y con fialides en la punta en forma de botella. Conidios globosos, subglobosos, elipsoidales, ovoides hialinos o verdes amarillentos (Bisset, 1991a). Las cepas puras fueron almacenadas en heladera a 4-7°C. Los aislamientos y codificación de cada cepa de *Trichoderma* se detallan a continuación (**Tabla 4.2**).

Tabla4.2. Numero de cepas aisladas por sitios de muestreo de suelos del Yacimiento Caimancito (CYC) y de Maimara (CQM).

Lugar de muestreo	Sitios	N° de Aislamientos	Cepas
Yacimiento Caimancito	1	7	<i>CYC01, CYC02, CYC03, CYC04, CYC05, CYC06 y CYC07</i>
	2	1	<i>CYC08</i>
	3	1	<i>CYC09</i>
	4	4	<i>CYC10, CYC11, CYC12 y CYC13</i>
	5	1	<i>CYC14</i>
Maimara	6	2	<i>CQM01 y CQM02</i>
	7	1	<i>CQM03</i>
	8	2	<i>CQM04 y CQM05</i>
	9	-	-
	10	-	-

La Localidad con mayor número de cepas aisladas correspondió a las muestras del Yacimiento Caimancito con un total de 14 cepas (74%) a comparación de Maimara con solo 5 cepas (26 %). En cuanto a la distribución de frecuencias en la **Figura 4.1** se ilustra la misma en función de la localidad, sitio y numero de cepas aisladas.

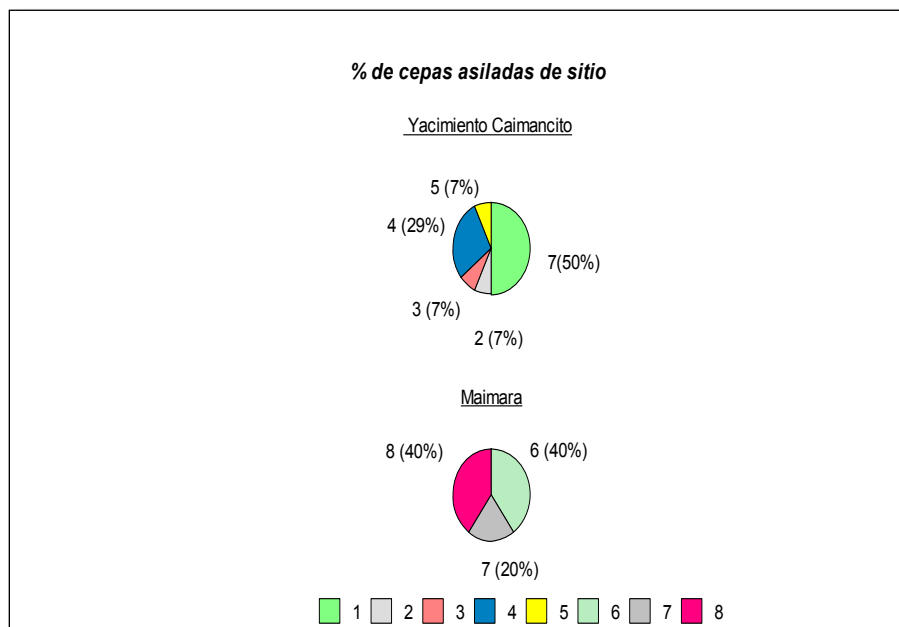


Figura 4.1. Número y porcentaje de cepas aisladas por sitio.

Todas las muestras provenientes del Yacimiento Caimancito aportaron al menos una cepa comparada a las obtenidas de Maimara, donde no se obtuvo cepas de los sitios 9 y 10. Los suelos de Maimara en general menos estructurados, con menor materia orgánica explicarían el menor número de aislamientos. Sin embargo, estos resultados resaltan la característica cosmopolita del género *Trichoderma* (Harman *et al.*, 2004).

La mayor proporción de cepas aisladas correspondieron a las muestras de los sitios contaminados 1 (verde) del Yacimiento Caimancito (**Figura 4.1**), debido posiblemente a la rizósfera aportada por la vegetación en los sitios que dan las condiciones ideales para el desarrollo de *Trichoderma*. Este género junto a otros también fue aislado de la rizósfera del pasto alemán (*Echinochloa polystachia*) y pasto cabezón (*Paspalum virgarum*) contaminados con petróleo crudo (Rivera-Cruz *et al.*, 2002). No obstante el sitio 5 (amarillo) a pesar de tener las mismas características solo presentó un solo aislamiento.

El sitio 1 por el grado, tiempo de exposición (año 2007) y contaminado con petróleo crudo tratado (sin agua de formación y sin gases) tendría una biodisponibilidad de C que no se ha agotado por los procesos naturales de adsorción (Abdel-Shafy & Mansour, 2016), ni por los mecanismos de evaporación y penetración.

Por otro lado, su toxicidad sería menor en comparación a los demás debido a que el contaminante drenó por un arroyo temporario a lo largo de 7 km hasta el arroyo Sauzalito. De acuerdo a lo expresado Bastiaens *et al.* (2000) en nuestro caso la biodisponibilidad de C para los microorganismos sería mayor al resto de los sitios por ser un derrame reciente (menor a diez años).

Los sitios del Yacimiento Caimancito 2, 3 y 4 contaminados desde 1996 (**Tabla 4.1**) y el sitio 5 contaminado desde 2004 debido al grado y tiempo de exposición tendría una mayor toxicidad aportada por el petróleo crudo y el agua de formación con altos contenidos de sal y metales pesados, siendo la causa de la menor cantidad de cepas aisladas de los sitios 2, 3, 4 y 5. Esto podría suceder a lo sostenido por De Mesa *et al.* (2006) en la destrucción de proteínas y enzimas siendo letales para los microorganismos.

En estos sitios del yacimiento, el tiempo de exposición parece no haber sido determinante en los aislamientos, sino la clase de contaminantes presentes.

La recuperación de cepas de *Trichoderma* del Yacimiento Caimancito destaca la capacidad adaptativa *in situ* del género en condiciones extremas (pH, salinidad) (Widden & Scattolin 1988; Jackson *et al.* 1991) y de interactuar con contaminantes orgánicos (petróleo crudo, biocidas) e inorgánicos (metales pesados y cianuro) tal como señala Argumedo *et al.* (2009). El factor de stress adicional causada por el petróleo crudo y sus derivados, sumado a los factores ambientales demuestra que las cepas aisladas están sujetas a condiciones que afectan su ecología, actividad y dinámica indicando posiblemente el desarrollo de respuestas enzimáticas y fisiológicas que las hacen más tolerantes a estas condiciones extremas (Kästner, 2000b; Atlas *et al.*, 1991).

4.4. Conclusión

La contaminación del suelo con petróleo crudo, agua de formación y metales pesados genero un cambio drástico en las condiciones ambientales de los sitios en estudio.

El género *Trichoderma* obtenido de estos sitios contaminados demuestran su capacidad de adaptarse a dichas condiciones y ser considerado un microorganismo hidrocarbonoclastas por haber aislado de la rizósfera de suelos contaminados de forma crónica o aguda.

El aislamiento de las 14 de cepas de *Trichoderma* de suelos contaminados con petróleo crudo y sus componentes demuestra su tolerancia a estos contaminantes los cuales pueden estar siendo usados como fuente de carbono.

El sitio 1 del Yacimiento Caimancito tuvo el mayor número de aislamientos debido quizás a la rizósfera aportada por la vegetación circundante dando las condiciones ideales para su desarrollo y por estar contaminado solo con petróleo crudo tratado sin agua de formación ni metales a comparación de los sitios restantes, teniendo una mayor biodisponibilidad de C al ser un derrame reciente, mientras que el menor número de aislamientos en los sitios 2, 3, 4 y 5 del Yacimiento Caimancito evidencia el efecto letal de los componentes del petróleo crudo.

Solo 5 cepas de *Trichoderma* fueron obtenidas de Maimara y podría deberse a que las condiciones ecológicas del suelo (disponibilidad de nutrientes, condiciones ambientales) no hayan favorecido su crecimiento, sin embargo demuestra su característica cosmopolita.

Bibliografía

- Abdel-Shafy, H. I., & Mansour, M. S. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, 25(1), 107-123.
- April, T. M., Foght, J. M., & Currah, R. S. (1999). Hydrocarbon-degrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada. *Canadian Journal of Microbiology*, 46(1), 38-49.
- Argumedo-Delira R., Alarcón A., Ferrera-Cerrato R., Almaraz J.J. & Peña-Cabriales J.J. (2009). El Genero fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 25 (4) 257-269.
- Atlas, R. M., Horowitz, A., Krichevsky, M., & Bej, A. K. (1991). Response of microbial populations to environmental disturbance. *Microbial Ecology*, 22(1), 249-256.
- Bastiaens, L., Springael, D., Wattiau, P., Harms, H., Verachtert, H., & Diels, L. (2000). Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 1834-1843.

- Benka-Coker, M. O., & Ekundayo, J. A. (1997). Applicability of evaluating the ability of microbes isolated from an oil spill site to degrade oil. *Environmental Monitoring and Assessment*, 45(3), 259-272.
- Bissett, J. (1991a). A revisión of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Can J Bot.* 69, 2357-2372.
- De Mesa, J. B. L., Quintero, G., Vizcaíno, A. L. G., Cáceres, D. C. J., Riaño, S. M. G., & García, J. M. (2006). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*, 4(5).
- Del Carmen Rivera, M., Ferrera, R., Volke, V., Rodríguez, R., & Fernández, L. (2002). Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo. *Terra Latinoamericana*, 20(4), 423-434.
- Dennis, L. & Webster, J. (1971). Antagonistic propeties of species groups of *Trchoderma* III Hyphal interaction. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 57:363-369.
- Días, R. L. (2012). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos en clima frío y templado* (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas).
- Hernández-Acosta, E., Ferrera-Cerrato, R., Gutiérrez-Castorena, M. C., Rodríguez-Vázquez, R., Rubiños-Panta, J. E., & Fernández-Linares, L. (2003). Bacterias y hongos hidrocarbonoclastas de rizósfera frijol y maíz, en un suelo contaminado con petróleo. *Terra Latinoamericana*, 21(4), 493-502.
- Kästner, M. (2000b). "Humification" Process or Formation of Refractory Soil Organic Matter. *Biotechnology Set, Second Edition*, 89-125.
- Madigan, M. T., Martinko, J., M., Parker, J. (2000). Brock biología de los Microorganismos Prentice Hall. 8ª Edition Iberia Madrid.
- Naranjo, L., Urbina, H., Sisto, A. D., & Leon, V. (2007). Isolation of autochthonous non-white rots fungi with potential for enzymatic upgrading of Venezuelan extra-heavy crude oil. *Biocatalysis and biotransformation*, 25(2-4), 341-349.
- Pernía, B., Demey, J. R., Inojosa, Y., & Naranjo-Briceño, L. (2012). Biodiversidad y potencial hidrocarbonoclástico de hongos aislados de crudo y sus derivados: Un meta-análisis. *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal*, 3(1), 1-40.
- Radwan, S., Sorkhoh, N., & Ei-Nemr, I. (1995). Oil biodegradation around roots. *Nature*, 376, 302.

-
- Rifai M A. A revision of the genus *Trichoderma*. *Res Mycol.* 1969; 116:1-56.
 - Rölting, W. F., Milner, M. G., Jones, D. M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R. J., & Head, I. M. (2002). Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Applied and environmental microbiology*, 68(11), 5537-5548.
 - Ros, M., Rodriguez, I., Garcia, C., & Hernandez, T. (2010). Microbial communities involved in the bioremediation of an aged recalcitrant hydrocarbon polluted soil by using organic amendments. *Bioresource Technology*, 101(18), 6916-6923.
 - Salmanov, M., Aliyeva, S., Veliyev, M., & Bekrashi, N. (2008). The study of degradation ability of oil products and oil hydrocarbons by microscopic fungi isolated from polluted coastal areas of Absheron Peninsula of Caspian Sea. *Ekoloji*, 17(68), 59-64.
 - Zengler, K., Toledo, G., Rappé, M., Elkins, J., Mathur, E. J., Short, J. M., & Keller, M. (2002). Cultivating the uncultured. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(24), 15681-15686.

CAPITULO V

Caracterización Morfológica de las 19 cepas de *Trichoderma* aisladas de suelos contaminados y no contaminados y Caracterización molecular de dos cepas Tolerantes a petróleo crudo.

Resumen

La sistemática del genero *Trichoderma* ha pasado por tres etapas. La primera fue el reconocimiento del género *Trichoderma* en su estado anamórfico por Persoon en 1794. La segunda etapa fue realizada por Bissett basado en la morfología de los anamorfismos (fase asexual) de las especies agregadas por Rifai sumando caracteres morfológicos y separándola en cinco secciones: *Longibrachiatum*, *Pachybasium*, *Hypocreanum*, *Trichoderma* y *Saturnisporum* descrita por Doi. Sin embargo la delimitación entre las especies anamórficas de *Trichoderma* por las homoplasias morfológicas y fenotípicas dificultan su identificación, al igual que la delimitación biológica del género *Trichoderma/Hypocrea*. Estas limitaciones en la taxonomía de *Trichoderma* condujeron a complementar con la caracterización molecular, constituyéndose la tercera etapa. El presente capítulo tiene como objetivo la caracterización morfológica de 19 cepas aisladas de sitios contaminados del Yacimiento Caimancito y no contaminados de Maimara complementando con la caracterización molecular para dos cepas clasificadas como altamente tolerantes. De las 19 cepas ocho se incluyeron en la sección *Trichoderma* (*T. atroviride*, *T. viride* y *Trichoderma* sp), cuatro a la sección *Pachybasium* (*T. harzianum* y *T. virens*) y seis a la sección *Longibrachiatum* (*T. citrinoviride*, *T. longibrachiatum*). El análisis molecular realizado a la cepa *CYC01* (*T. longibrachiatum*) fue identificada como *Hypocrea andinensis* y *CQM05* (*T. atroviride*) como *Hypocrea lixii/Trichoderma harzianum*.

Palabras clave: *Trichoderma*, caracterización morfológica, análisis molecular.

Morphological characterization of the 19 *Trichoderma* strains isolated from contaminated and uncontaminated soils and Molecular characterization of two strains tolerant to crude oil.

Abstract

The systematics of the genus *Trichoderma* has gone through three phases. The first was the recognition of the genus *Trichoderma* in its anamorphic state by Persoon in 1794. The second one was based on the morphology of the anamorphisms (asexual phase) studied by Bissett of the aggregate species of Rifai adding morphological characters and separating it into five sections: *Longibrachiatum*, *Pachybasium*, *Hypocreanum*, *Trichoderma* and *Saturnisporum* section described by Doi. However the boundary between the anamorphs *Trichoderma* species by morphological and phenotypic homoplasies represents a complex difficulty for identification, like biological delimitation *Trichoderma/Hypocrea*. The advent of molecular tools or methods led to the taxonomic revision of the genus through analysis of DNA sequences that defined the characteristics of each section. This chapter has for its object morphological characterization of the 19 *Trichoderma* strains isolated from contaminated sites and uncontaminated Caimancito Oilfield Maimara with crude oil and the molecular characterization of two strains classified as highly tolerant. Of the 19 strains four belonged to *T. atroviride*, four to *T. harzianum*, three to *T. citrinoviride*, three to *T. longibrachiatum*, one to *T. virens*, one to *T. viride* and three were identified as *Trichoderma* sp. The molecular analysis of *CYC01* (*T. longibrachiatum*) strain was identified as *Hypocrea andinensis* and *CQM05* (*T. atroviride*) as *Hypocrea lixii* / *Trichoderma harzianum*.

Key words: *Trichoderma*, morphological characterization, analysis molecular.

5.1. Introducción

La sistemática del género *Trichoderma* ha pasado por tres etapas (Samuels & Prakash, 2015). La primera fue el reconocimiento del género *Trichoderma* en su estado anamórfico (fase asexual) por Persoon en 1794 con 4 especies y las describió como colonias de color blanco que se tornan verde oscuro o amarillento y de esporulación densa.

Las cuatro especies de *Trichoderma* descritas originalmente por Persoon en 1794 fueron identificadas como *T. viride* por Bisby (1939). Sin embargo *T. viride* es una especie raramente encontrada, así que la mayor parte de las cepas estudiadas pertenecieron a otros taxos confundiendo su identificación.

La segunda etapa se basó en la observación morfológica. Rifai (1969) agregó 9 especies al género *Trichoderma* en base a diferencias morfológicas y fisiológicas aceptadas hasta la actualidad, aunque con deficiencias. En su estudio realizó una revisión sistemática del género *Trichoderma* e introdujo el concepto de “especie agregada”, una entidad que puede definirse como agregaciones de especies morfológicamente muy similares y con frecuencia apenas separables. Trabajó con caracteres morfológicos, como el tipo y forma de ramificación del conidióforo y el tamaño de los conidios, estableciendo la base fundamental de la sistemática del estado anamórfico del género *Trichoderma*, admitiendo que algunas de las especies, particularmente *T. hamatum* probablemente contienen dos o más especies morfológicamente indistinguibles.

Los estudios más detallados en cuanto a la morfología de los anamorfismos de las especies agregadas por Rifai fueron realizados por Bissett (1984, 1991a, 1991b, 1991c y 1992) determinando que algunas de las especies agregadas de Rifai (1969) pasaran a formar cinco secciones: *Longibrachiatum*, *Pachybasium*, *Hypocreanum*, *Trichoderma* y *Saturnisporum* basadas en la morfología de los conidióforos, la forma del conidio, el crecimiento y coloración de la colonia. En 1987 Doit *et al* introdujeron la sección *Saturnisporum* en alusión a la ornamentación de los conidios, para el género *Trichoderma* con las especies *T. saturnisporum* y *T. ghanense*.

Se diferenciaron 21 taxa dentro de la sección *Pachybasium* y 7 en la sección *Longibrachiatum*. Tanto las especies de la sección *Trichoderma* como *Pachybasium* son cosmopolitas y con una gran variabilidad inter e intraespecífica, mientras que la sección *Longibrachiatum* es la sección más pequeña, evolutivamente alejada del resto por ser

monofiletica con 10 taxa y con fases sexual/asexual en cuatro especies (Bissett 1984; Bissett, 1991b).

La fase sexual (teleomórfa) poco conocida fue propuesta por Fries (1825) y se ubica en la clase *Ascomycetes* orden Hypocreales, genero *Hypocrea* y fue estudiado por Doi (1972) quien estableció una asociación con su estado anamórfico. Sin embargo, Druzhinina & Kubicek (2005) sostienen que el genero *Trichoderma* corresponde a un grupo de derivados clónales que en muchos casos ha perdido su capacidad de completar un ciclo de vida y de acuerdo a Samuels (2006) se clasifica como un hongo anamórfico donde el estado teleomorfo se ha detectado en pocas especies.

A pesar de las exhaustivas descripciones morfológicas reportadas por numerosos investigadores, estos caracteres no son suficientes para la identificación de las especies debido a las homoplasias morfológicas y fenotípicas del género *Trichoderma/Hypocrea* (Kubicek & Harman, 1998, Druzhinina & Kubicek, 2005; Samuels 1996; Samuels, 2006a). Bissett condujo la taxonomía de *Trichoderma* al análisis molecular a mediados de los 90, constituyendo la tercera etapa (Chaverri & Samuels, 2002; Druzhinina *et al.*, 2006). La llegada de métodos o herramientas moleculares llevo a la revisión taxonómica del género a través de las secuencias de ADN que definieron las características de cada sección (Kubicek *et al.*, 2003; Samuels, 1996) y se probó lo expresado por Rifai (1969) que dentro de una especie existen otras que no eran posibles de ser diferenciadas morfológicamente (Samuels & Prakash, 2015), explicando la alta variabilidad inter e intraespecifica de las secciones *Pachybasium* y *Trichoderma* que poseen especies filogenéticamente relacionadas. Actualmente el género *Trichoderma* se clasifica en clados y son considerados como linajes evolutivos independientes (Samuels & Prakash, 2015).

El objetivo de este capítulo es aproximarnos a la identificación morfológica de las cepas de *Trichoderma* aisladas, ubicarlas en la sección y especie a la que pertenecen; y realizar una concordancia molecular con dos de las cepas clasificadas como altamente tolerantes.

5.2. Materiales y Métodos

5.2.1. Reactivación de cepas del genero *Trichoderma*.

Las cepas aisladas y conservadas del Yacimiento Caimancito y Maimara fueron reactivadas con medio Agar Papa Dextrosa Formulado (APG 2 %) a $26^{\circ} \text{C} \pm 1$, por siete días hasta estar completamente esporuladas.

5.2.2. Descripción Macroscópica

Para la descripción de las cepas se preparó el medio de cultivo Agar papa glucosado Britania (APG 2%) y medio SNA. Se esterilizo en autoclave a 121°C durante 15 minutos transfiriendo 10ml en cajas de petri de 9 cm de diámetro hasta gelificar en cámara de flujo laminar.

Para la caracterización macroscópica se realizaron tres repeticiones por cepa de ambos medios de cultivo que fueron incubadas en estufa a temperaturas diferentes: $26 \pm 2^{\circ} \text{C}$, $30 \pm 2^{\circ} \text{C}$, $35 \pm 2^{\circ} \text{C}$ y $40 \pm 2^{\circ} \text{C}$; en todos los casos el fotoperiodo fue de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad durante 7–10 días. A las 72 horas se observaran las características macroscópicas de la colonia y a las 72 y 96 horas se observaron las características microscópicas.

Se tomaron fotos digitales de cada colonia, se midió su diámetro a las 72 horas con calibre pie de rey y las características observadas fueron: la distribución de los conidios, presencia de pigmentación en el reverso de la colonia, color de los conidios y presencia de olores característicos en los medios APG 2% y SNA (**Anexo 1**) (Samuels & Prakash, 2015).

5.2.3. Descripción Microscópica.

Para las observaciones microscópicas se utilizó un microscopio Marca Zeiss Standart 25 acoplado a cámara digital y anexada a un equipo informático con software TSVIEW version7.lnk 2009 – 2012.

Para la observación micromorfológica se realizaron montajes en azul de algodón. Se tomó una porción de colonia con un ansa y con ayuda de una aguja de 7 mm se separaron las hifas lo más posible y se colocó el cubreobjetos. Se observaron las siguientes estructuras: conidios (morfología y ornamentación), conidióforos (tipo), fialides (disposición, forma,

longitud, ancho, ancho de célula de apoyo y las relaciones longitud/ancho de célula de apoyo) y presencia de clamidosporas (ancho, forma y disposición). Se realizaron un promedio de 30 mediciones por tipos de estructuras.

Con ayuda de claves taxonómicas de Bissett (1984, 1991a, 1991b, 1991c y Samuels & Prakash, 2015) se separó con aproximación en sección y especie. Complementariamente se usó clave interactiva *Trichoderma* Home del proyecto PEET (INSF) by: Systematic Mycology & Microbiology, ARS, USDA and Dept. Plant Pathology.

5.2.4. Caracterización Molecular de cepas altamente tolerantes a petróleo crudo.

5.2.4.1. Extracción y cuantificación del ADN.

La extracción de ADN se realizó en el laboratorio de la cátedra de Fitopatología-CIDEFI (UNLP)². Se colectó el micelio de las 8 cepas más tolerantes a petróleo crudo de cultivos en medio APG 2% de una semana de desarrollo y se pesó en eppendorf de 1.5 ml. El protocolo de extracción de ADN aplicado fue el método CTAB de Doyle (1987) modificado por Bornet & Branchard (2001). El micelio recolectado fue molido en mortero con N₂ líquido y se les agregó 0,8 ml de buffer de Lisis (pH 8), 0,2 ml de CTAB y 1 µl de β-mercaptoetanol. Se incubó a 60 °C por 30', en frío se agregó 0.60 ml de cloroformo-isoamilalcohol, se mezcló y se llevó a centrifuga por 5' a 10000 g. El sobrenadante se pasó a un nuevo tubo de microcentrífuga donde se procedió a precipitar el ADN. Para ello se agregaron 0,7 volúmenes de isopropanol frío y se centrifugó por 30' a 10000 g. Posteriormente se lavó el pellet de ADN con etanol 70% y se centrifugó nuevamente durante 5' a 10000 g. Una vez seco, el ADN fue rehidratado con x µl de H₂O_{bd} estéril. Finalmente, a fin de degradar el ARN co-purificado, se adicionaron 3 µl de ARNasa A (4mg/ml) y se incubó a 37°C por 30 minutos. La solución de ADN fue almacenada a - 80 °C hasta su posterior uso. La visualización del ADN se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7 % suplementado con Bromuro de Etidio 10 % (10 µg.ml⁻¹). Para estimar la cantidad y calidad de ADN extraído se sembraron sobre un parafilm y mezclaron 3 µl ADN y 0.1 µl de buffer

² Pasantía realizada en la UNLP (CIDEFI): Herramientas moleculares. Dirigida por el Dr. Pedro Ballati y el Dr. Ernesto Franco.

de corrida. Por otro lado se sembraron 3 µl de marcador de 100-1000 pb y 3 µl de marcador Lambda DNA/HindIII (Inbio Highway® (Tandil, Buenos Aires, Argentina). Para estimar la cantidad y calidad del ADN extraído. La corrida se realizó a 80 Volts aproximadamente y la intensidad de las bandas se analizó en transiluminador con software GenSnap de Syngene Laboratories (Cambridge, United Kingdom).

5.2.4.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para los iniciadores de *Trichoderma*.

La mezcla de reacción consistió de 11,6 µl de H₂O calidad Milli-Q estéril, 3 µl de solución buffer 10 X, 1,8 µl de MgCl₂ 25 mM, 1,2 µl de dNTP 5mM, 1 µl de cada iniciador por ng de ADN molde y 0,4 µl de Taq polimerasa de 5 U con un volumen final de 30 µl por reacción. Los iniciadores que se usaron fueron los cebadores universales ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990). El programa de amplificación inició con una desnaturalización a 94 °C por 1 min, seguido de 33 ciclos de 1 min a 94 °C, 45 seg a 56 °C y 1 min a 72 °C; con una extensión a 72 °C por 5 min. La amplificación se realizó en un termociclador automático (Labnet International®, Mod. Multigene). Los productos de la PCR amplificados se visualizaron en gel de agarosa al 1 % con trasiluminador con software GenSnap de Syngene Laboratories (Cambridge, United Kingdom). Mediante la comparación con los marcadores 100-1000 pb y Lambda DNA/HindIII (Inbio Highway® (Tandil, Buenos Aires, Argentina) se estimó el peso molecular y la cantidad de producto amplificado. La reacción de la PCR se preparó con 1.5 ng de ADN.

5.2.4.3. Purificación y secuenciación de dos cepas de *Trichoderma* altamente tolerantes a petróleo crudo.

Los amplicones se secuenciaron en Macrogen Inc. (Seúl, Corea) de acuerdo al método descrito por Sanger *et al.* (1977). Las secuencias nucleotídicas resultantes fueron editadas empleando el programa BioEdit versión 7.0.9.0 (Hall, 1999) y se analizaron en la base de datos GenBank mediante la herramienta BLAST (Altschul *et al.*, 1990) y para corroborar los resultados se usó la herramienta TrichOKEY www.isth.info (*International Commission*

on the Taxonomy of Fungi subcommission on Trichoderma and Hypocrea) (Druzhinina & Kubicek, 2005).

5.3. Resultados

5.3.1. Identificación Macroscópica y Microscópica

De las 19 cepas aisladas cuatro cepas presentaron características a fines a la especie *T. atroviride*, tres a *T. citrinoviride*, cuatro a *T. harzianum*, tres a *T. longibrachiatum*, una a *T. viride*, una a *T. virens* y tres no pudieron ubicarse hasta el momento a ninguna especie (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Afinidad taxonómica de las 19 cepas aisladas en base a sus características morfológicas. Sección y Clado del genero *Trichoderma* (Bisset *et al.*, 1991; Samuels & Prakash, 2015).

Cepa	Afinidad con la especie	Sección	Clado
CQM03	<i>Trichoderma atroviride</i>	<i>Trichoderma</i>	Viride
CQM04	<i>Trichoderma atroviride</i>	<i>Trichoderma</i>	Viride
CQM05	<i>Trichoderma atroviride</i>	<i>Trichoderma</i>	Viride
CYC09	<i>Trichoderma atroviride</i>	<i>Trichoderma</i>	Viride
CYC03	<i>Trichoderma sp</i>	<i>Trichoderma</i>	-
CYC04	<i>Trichoderma sp</i>	<i>Trichoderma</i>	-
CYC13	<i>Trichoderma sp</i>	<i>Trichoderma</i>	-
CYC14	<i>Trichoderma viride</i>	<i>Trichoderma</i>	Viride
CQM01	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Pachybasium</i>	Harzianum
CQM02	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Pachybasium</i>	Harzianum
CYC10	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Pachybasium</i>	Harzianum
CYC12	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Pachybasium</i>	Harzianum
CYC11	<i>Trichoderma virens</i>	<i>Pachybasium</i>	Virens
CYC02	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	<i>Longibrachiatum</i>	Longibrachiatum
CYC05	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	<i>Longibrachiatum</i>	Longibrachiatum
CYC01	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	<i>Longibrachiatum</i>	Longibrachiatum
CYC06	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	<i>Longibrachiatum</i>	Longibrachiatum
CYC07	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	<i>Longibrachiatum</i>	Longibrachiatum
CYC08	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	<i>Longibrachiatum</i>	Longibrachiatum

A continuación se describen las cepas aisladas:

La cepa **CQM01** presentó afinidad con la sección *Pachybasium* (Bisset *et al.*, 1991) y a la Clado: Harzianum, especie *Trichoderma harzianum* (Samuels & Prakash, 2015; *Trichoderma* Interactive Key).

Sitio de aislamiento: Sitio 6 de Maimara.

Crecimiento de la colonia 25 a 30 °C en APG: 7.91 – 8.30 cm, SNA 5.48 – 6.13 cm.

Crecimiento de la colonia 35 y 40 °C en APG y SNA: la cepa no creció en ninguno de los dos medios.

Características de la colonia:

Colonia con márgenes filamentosos blancos. Sin pústulas, con esporulación verde oscura dispersa, el reverso no mostro pigmentación y sin olor. Micelio aéreo blanco, reducido y difuso. En SNA solo hay crecimiento de micelio hialino, sin pústulas, ni olor.

Características Microscópicas

Conidióforos de tipo piramidal (Samuels y Prakash, 2015) y flexibles, con una, dos o tres ramificaciones fértiles pareadas o no dispuestas en un ángulo menor a 90°; hacia el ápice de cada rama terminal en grupos de 3 a 4 fialides muy cerca una de otras. **Fialides** ampuliformes a langeriformes de 5.1 a 6,8 µm de longitud y de 2.4 a 3,2 µm en su parte más ancha, 2.0 a 2.6 µm de base, ancho de célula de apoyo 2.2 a 3.0 µm, la relación entre long/ancho menor a 2.3 µm; long/célula de apoyo 2.3 a 3.2 µm y ancho de fialide/célula de apoyo 1.1 a 1.3 µm. No hay fialides intercaladas. **Conidios** son subglobosos a ovoides verdes, lisos y secos. Miden de 3.5 a 3.0 µm de longitud y 1.6 a 2.6 µm de ancho. La relación long/ancho 1.2 a 1.5 µm. **Clamidosporas** presentes esféricas de 8.3 a 11.4 µm de ancho, solitarias, terminales o interhifales.

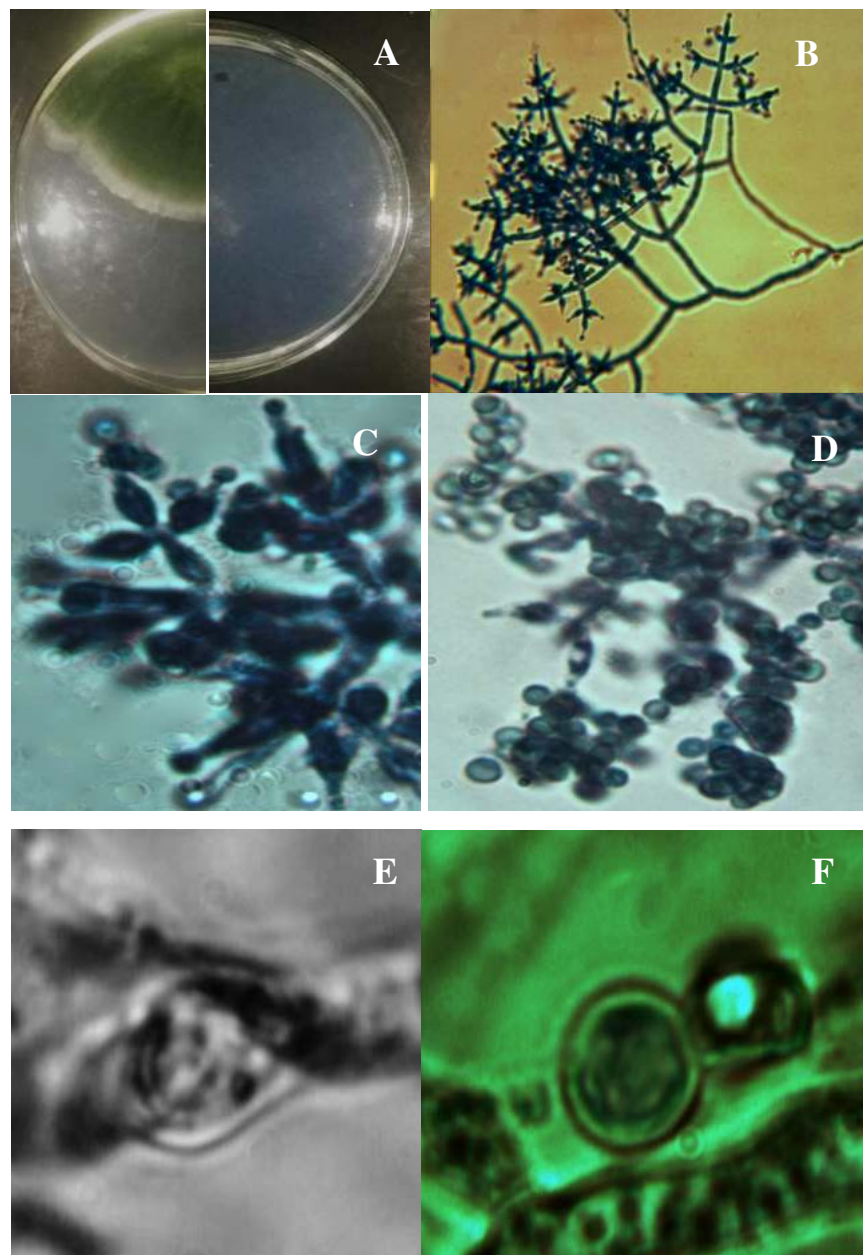


Figura 5.1. *Trichoderma harzianum*. (CQM01) **A-** Crecimiento de la colonia a 26 °C en medio APG y SNA. **B-** Conidioforo con fialides ampuliformes en verticilos de 3 a 4 (40 X). **C-** Fialides. **D-** Conidios. **E y F-** Clamidosporas terminales. **C-D-E:** 100X.

La cepa *CQM02* presentó afinidad con la sección *Pachybasium* (Bisset *et al.*, 1991) y a la Clado: Harzianum, especie *Trichoderma harzianum* (Samuels & Prakash, 2015; *Trichoderma* Interactive Key).

Sitio de aislamiento: Sitio 6 de Maimara.

Crecimiento de la colonia 25 a 30 °C en APG: 6.09 – 7.17 cm, SNA 6.63 – 5.49 cm.

Crecimiento de la colonia 35 y 40 °C en APG y SNA: la cepa no creció en ninguno de los dos medios.

Características de la colonia:

Colonia con márgenes filamentosos blancos. Sin pústulas, con esporulación verde oscura dispersa, sin pigmentación y sin olor. El micelio aéreo es blanco, reducido y difuso. En SNA solo hay crecimiento de micelio hialino, sin pústulas, ni olor.

Características microscópicas:

Los *conidióforos* son de tipo piramidal (Samuels & Prakash, 2015). Flexibles, con ramificaciones fértiles pareadas o no, en ángulo menor de 90° con respecto al eje principal, cada rama terminal presenta grupos 3 a 4 fialides terminales en el ápice. No hay pelos fértiles ni estériles saliendo de pústulas o de conidióforos. *Fialides* ampuliformes a langeriformes 8.5 a 10.2 µm de longitud, 2.4 a 3.2 µm de ancho, base menor de 1.2 µm, ancho de célula de apoyo 2.2 a 3.0 µm. La relación entre long/ancho 2.3 a 4.2 µm, long/célula de apoyo 4.2 a 5.1 µm y ancho de fialide/célula de apoyo 1.1 a 1.3 µm. No hay fialides intercaladas. *Conidios* subglobosos a ovoideos, secos, verdes y lisos, de 3.1 a 4.1 µm de longitud y de 2.2 a 3.0 µm de ancho, la relación entre long/ancho es menor a 1.2 µm. *Clamidosporas* presentes de 5.2 a 8.3 µm de ancho. Son unicelulares, terminales o intercalares.

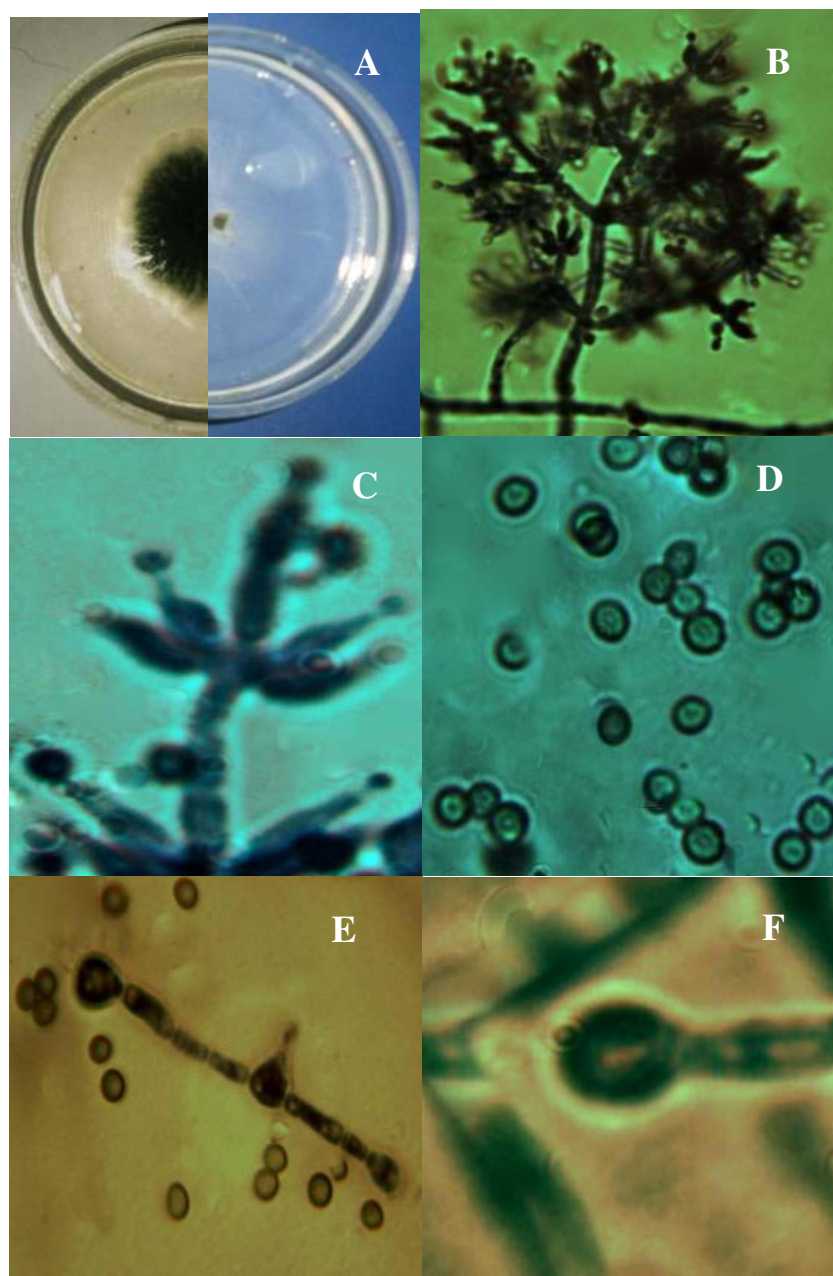


Figura 5.2. *Trichoderma harzianum* (CQM02). **A-** Crecimiento de la colonia a 26 °C en medio APG y SNA. **B-** Conidioforo con fialides ampuliformes en verticilos de 3 a 4 (40X). **C-** Fialides. **D-** Conidios. **E y F-** Clamidosporas terminales **C-D-F:** 100X .

La cepa **CQM03** presentó afinidad con la sección *Trichoderma* (Bisset *et al.*, 1991) y a la Clado: Viride, especie *Trichoderma atroviride* (Samuels & Prakash, 2015; *Trichoderma Interactive Key*).

Sitio de aislamiento: Sitio 7 de Maimara.

Crecimiento de la colonia 25 a 30 °C en APG: 4.75 – 4.68 cm, SNA 4.07 – 5.45 cm.

Crecimiento de la colonia 35 y 40 °C en APG y SNA: la cepa no creció en ninguno de los dos medios.

Características de la colonia:

Colonia de márgenes filamentosos blancos. Micelio con pústulas, con olor, esporulación en anillos verde oscura y sin pigmentación en el reverso de la placa. El micelio aéreo es de color blanco.

Características microscópicas:

Los **conidióforos** son de tipo piramidal (Samuels & Prakash, 2015). Con ramas laterales que son pareadas y flexibles o rectas, cada rama terminal contiene grupos de 3 a 4 fiálides. No hay pelos fértiles ni estériles saliendo de los conidióforos. Las **fiálides** son ampuliformes y langeriformes de 8.5 a 10.2 μm de longitud y de 2.4 a 3.2 μm en su parte más ancha, base 2.0 a 2.6 μm y la célula de apoyo 2.7 a 3.2 μm . La relación entre long/ancho 3.2 a 4.2 μm , long/célula de apoyo 3.2 a 4.2 μm y ancho/célula de apoyo 0.9 a 1.1 μm . No hay fialides intercaladas. **Conidios** globosos a ovoideos, verdes, lisos, de 2.8 a 3.4 μm de longitud por 2.7 a 3.2 μm de ancho, la relación entre long/ancho es menor que 1.2 μm . **Clamidosporas** presentes, globosas, terminales e intercalares de 5.2 a 8.3 μm de ancho.

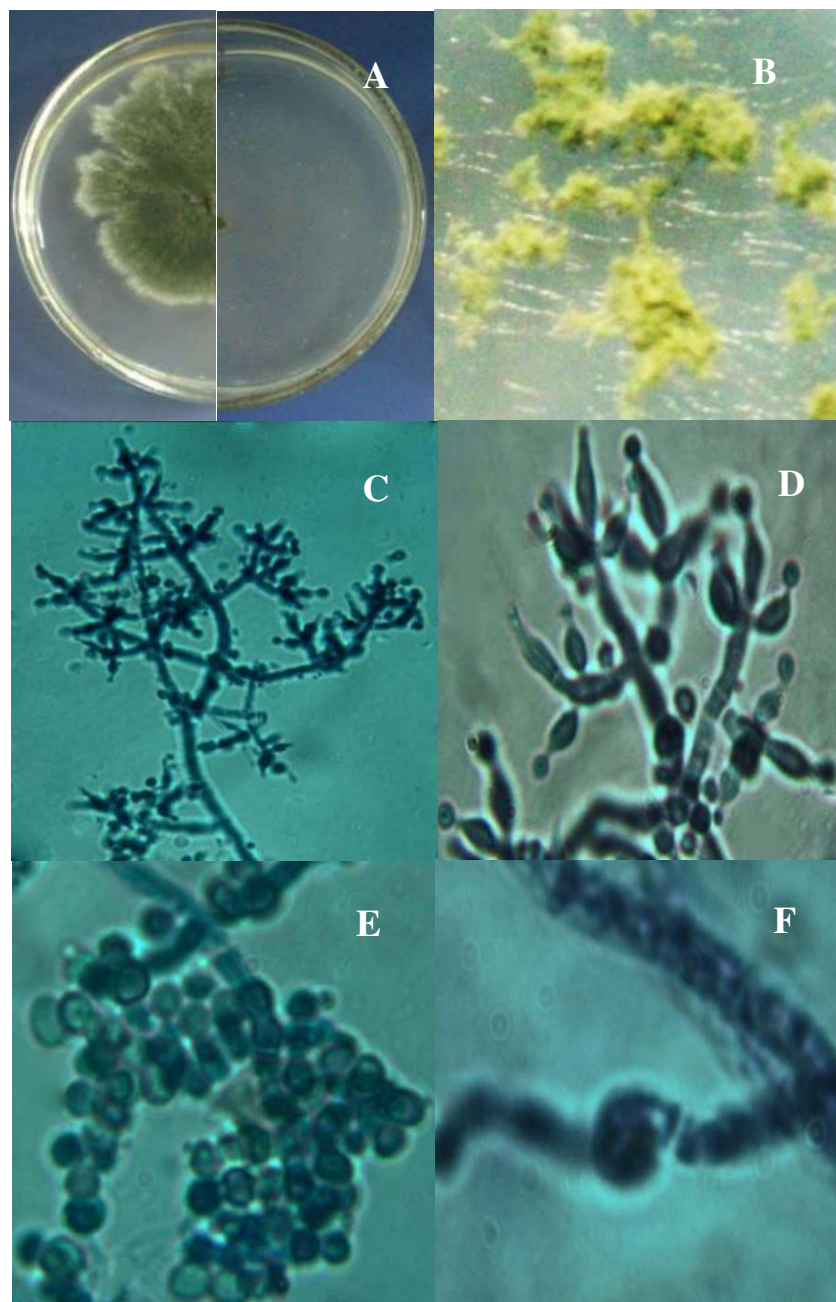


Figura 5.3. *Trichoderma atroviride* (CQM03). **A-** Crecimiento de la colonia a 26 °C en medio APG y SNA. **B-** Pustulas en SNA. **C-** Conidioforo con fialides (40X). **D-** Fialides ampuliformes en verticilos de 3 a 4. **E-** Conidios. y **F-** Clamidospora. **D-E y F:** 100X

La cepa **CQM04** presentó afinidad con la sección *Trichoderma* (Bisset *et al.*, 1991) y a la Clado: Viride, especie *Trichoderma atroviride* (Samuels & Prakash, 2015; *Trichoderma* Interactive Key).

Sitio de aislamiento: Sitio 8 de Maimara.

Crecimiento de la colonia 25 a 30 °C en APG: 8.15 – 8.50 cm, SNA 5.89 – 8.56 cm.

Crecimiento de la colonia 35 °C en APG: 2.68 - 3.01 cm, en SNA 5.12 – 6.01 cm.

Crecimiento de la colonia a 40 °C en APG y SNA: no creció en ninguno de los dos medios.

Características de la colonia

Colonia circular, elevada y esponjosa, con márgenes enteros blancos. Sin pústulas en PDA si en SNA, olor, esporulación verde oscura en anillos, el reverso de la placa no mostro pigmentación. El micelio aéreo es blanco, abundante y se levanta de 0,5 a 1 mm de la superficie del medio.

Características microscópicas:

Los *conidióforos* son de tipo piramidal (Samuels & Prakash, 2015). Conidióforos con ramas pareadas o en verticilos de tres, rectas o flexibles, cada rama terminal presente grupos de 2 a 3 fiálides dispuestas en verticilos cruzados, fialides pareadas antes del ápice. No hay pelos fértiles ni estériles saliendo de pústulas o de conidióforos. Las *fiálides* son ampuliformes a langeriformes de 8.5 a 10.2 μm de longitud y de 2.4 a 3.2 μm de ancho, 2.0 a 2.6 μm de base, ancho de célula de apoyo 2.5, la relación entre long/ancho 2.3 a 4.2 μm ; long/célula de apoyo 3.2 a 4.2 μm ; long/célula de apoyo 0.9 a 1.1 μm . No hay fialides intercaladas. *Conidios* son globosos a subglobosos, verdes, lisos y secos de 4.2 a 4.8 μm de longitud, 3.2 a 3.6 μm de ancho. La relación entre long/ancho 1.2 a 1.5 μm . *Clamidosporas* presentes son solitarias, unicelulares e intercalares de 5.2 a 8.3 μm de ancho.

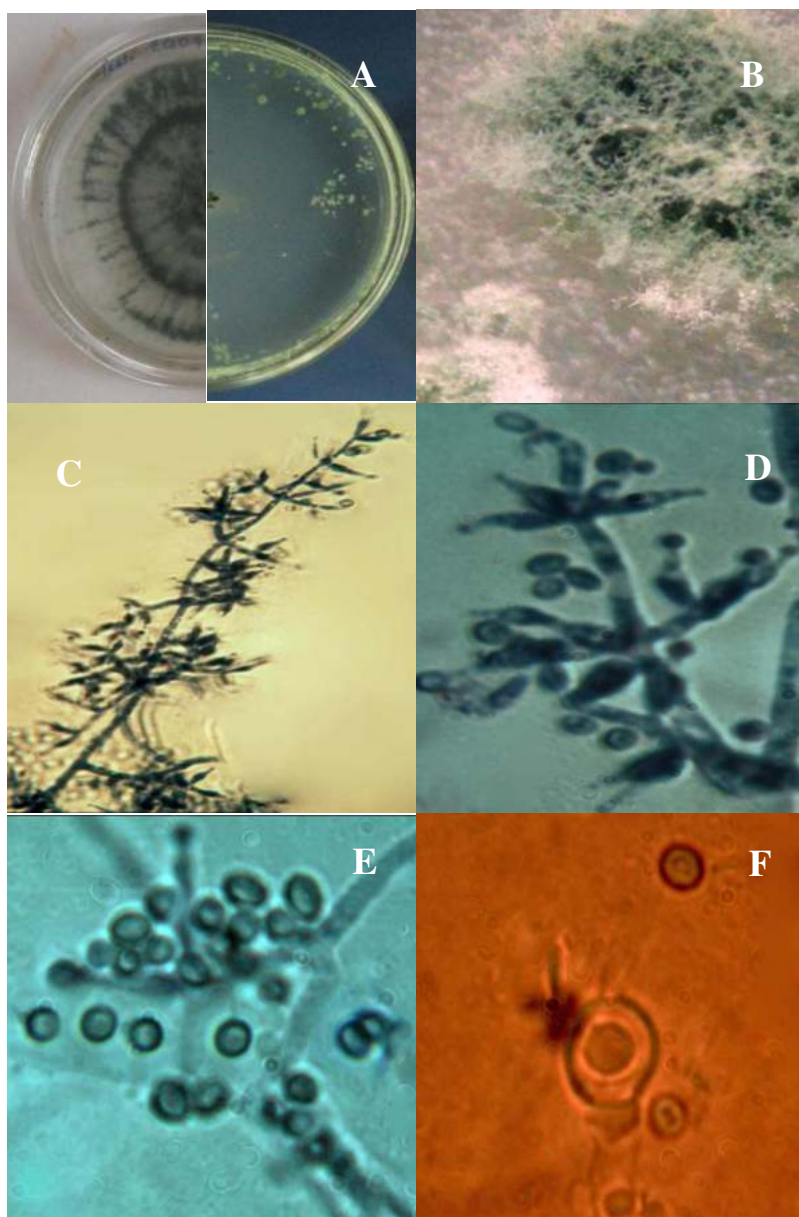


Figura 5.4. *Trichoderma atroviride* (CQM04). **A-** Crecimiento de la colonia a 26 °C en medio APG y SNA. **B-** Pustulas en SNA. **C-** Conidioforo con fialides (40X). **D-** Fialides ampuliformes en verticilos de 3 a 4. **E-** Conidios. y **F-** Clamidospora. **D-E y F:** 100X.

La cepa *CQM05* presentó afinidad con la sección *Trichoderma* (Bisset *et al.*, 1991) y a la Clado: Viride, especie *Trichoderma atroviride* (Samuels & Prakash, 2015; *Trichoderma* Interactive Key).

Sitio de aislamiento: Sitio 8 de Maimara.

Crecimiento de la colonia 25 a 30 °C en APG: 7.01 – 8.15 cm, SNA 5.89 – 7.56 cm.

Crecimiento de la colonia 35°C: 2.70 – 3.21 cm en APG, 1.34 – 1.53 cm en SNA.

Crecimiento de la colonia a 40 °C en APG y SNA: no creció en ninguno de los dos medios.

Características de la colonia: Colonia circular, elevada y esponjosa, con márgenes enteros blancos. Micelio sin pústulas, sin olor, con esporulación verde - amarilla, el reverso de la placa no mostro pigmentación. El *micelio aéreo* es blanco, abundante y se levanta de 0,5 a 1 mm de la superficie del medio.

Características microscópicas:

Los *conidióforos* son de tipo piramidal (Samuels & Prakash, 2015). Ramas pareadas o en verticilos de tres, rectas o flexibles, cada rama terminal contiene grupos de 2 a 3 fiálides dispuestas en verticilos cruzados, fialides pareadas antes del ápice. No hay pelos fértiles ni estériles saliendo de pústulas o de conidióforos. A lo largo del eje principal del conidióforo se observan fialides solitarias e intercaladas. Las *fiálides* son ampuliformes y langeriformes de 10.2 a 10.6 μm de longitud; 2.8 a 3.3 μm en su parte más ancha; 2.2 a 2.8 μm de base, ancho de la célula de apoyo 2.4 a 2.9 μm , la relación entre long/ancho 3.1 a 3.7 μm ; long/célula de apoyo 3.4 a 4.3 μm ; ancho de fialide/célula de apoyo 1.0 a 1.3 μm . Los *conidios* son elipsoidales u ovoides, verdes de a 4.2 a 4.6 μm de longitud y 3.1 a 3.5 μm de ancho. La relación entre long/ancho es 1.2 μm . *Clamidosporas* presentes abundantes de 7.0 a 8.2 μm de ancho, globosas a subglobosas, terminales o intercalares.

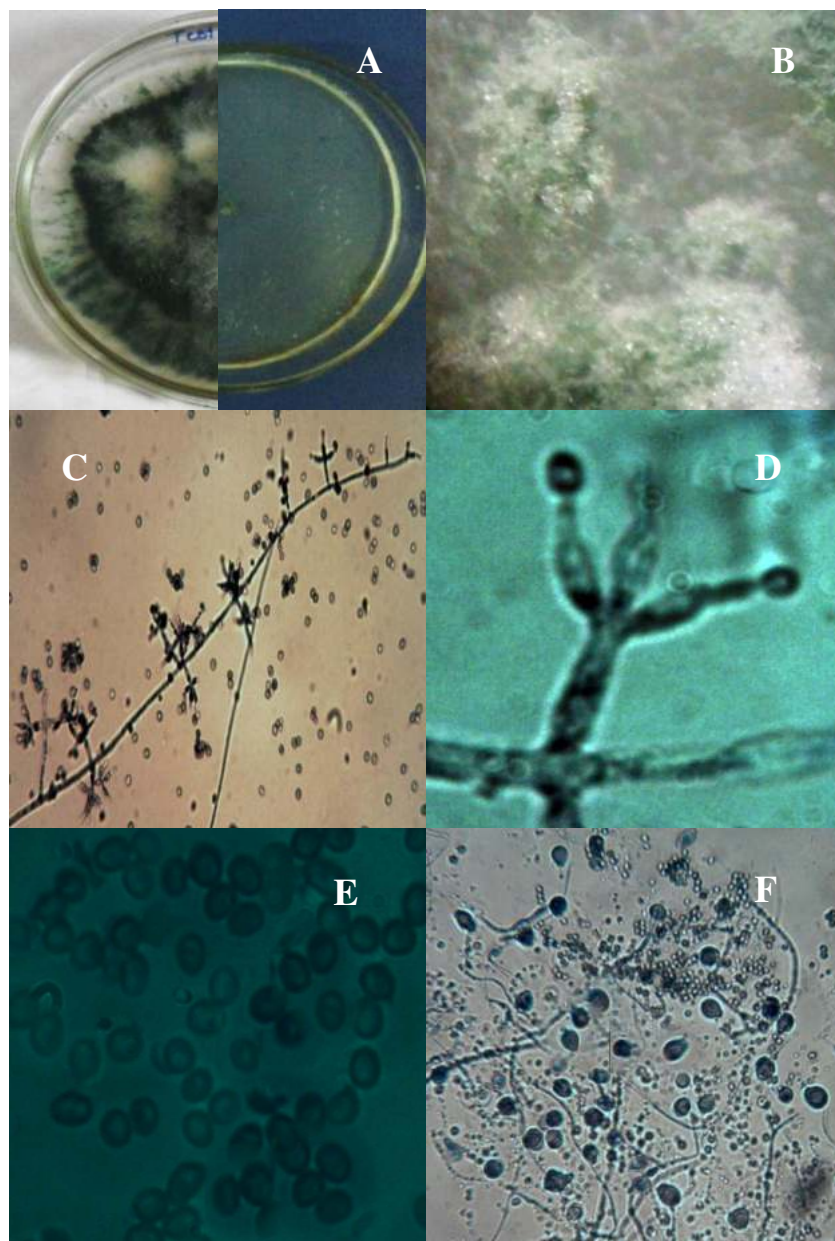


Figura 5.5. *Trichoderma atroviride* (CQM05.) **A-** Crecimiento de la colonia a 26 °C en medio APG y SNA. **B-** Pustulas en SNA. **C-** Conidioforo con fialides 25X. **D-**Fialides ampuliformes en verticilos de 3 a 4. **E-** Conidios. y **F-** Clamidospora (25X). **D-E** : 100X.

La cepa *CYC01* presentó afinidad con la sección *Longibrachiatum* (Bisset *et al.*, 1991) y a la Clado: *Longibrachiatum*, especie *Trichoderma longibrachiatum* (Samuels & Prakash, 2015; *Trichoderma* Interactive Key).

Sitio de aislamiento: cepa aislada de suelo de Sitio 1 del Yacimiento Caimancito.

Crecimiento de la colonia 25 a 30 °C en APG: 6,38 -8,49 cm, SNA 5,38 - 6,54 cm.

Crecimiento de la colonia 35°C: 7.96 – 8.07 cm en APG, 0 cm en SNA.

Crecimiento de la colonia a 40 °C en APG y SNA: no creció en ninguno de los dos medios.

Características de la colonia:

Colonia de crecimiento rápido, micelio blanco, sin olor, esporulación color verde alrededor del punto de siembra, reverso de la caja sin pigmentación. Pústulas color blanco. Micelio aéreo blanco, reducido y difuso.

Características microscópicas:

Los *conidióforos* son de tipo *Longibrachiatum* (Samuels & Prakash, 2015). Presentan un eje principal largo desarrollado, poco ramificado, con ramas laterales que no están pareadas. En el eje principal se ubican de manera irregular fialides individuales y en la punta una fialide solitaria. Las *fialides* son langeriformes de 7.7 a 14.4 µm de longitud; 2.0 a 3.2 µm de ancho y la base es menor a 2.0 µm. Célula de apoyo 1.7 a 3.3 µm. La relación entre long/ancho 2.3 a 4.2 µm; long/célula de apoyo 2.3 a 3.2 µm; ancho de fialide/célula de apoyo 0.9 a 1.1 µm. Se ubican en verticilos de a 2-3 o solitarias sobre ejes primarios y secundarios. *Conidios* son elipsoidales, lisos y verdes, de 3.2 a 5.1 µm de longitud y 2.2 a 3.5 µm de ancho, la relación long/ancho 1.2 a 1.8 µm. *Clamidosporas* presentes abundantes de 6.0 a 12.2 µm de ancho solitarias y terminales. Se observa micelio con clamidosporas terminales, las cuales no son numerosas.

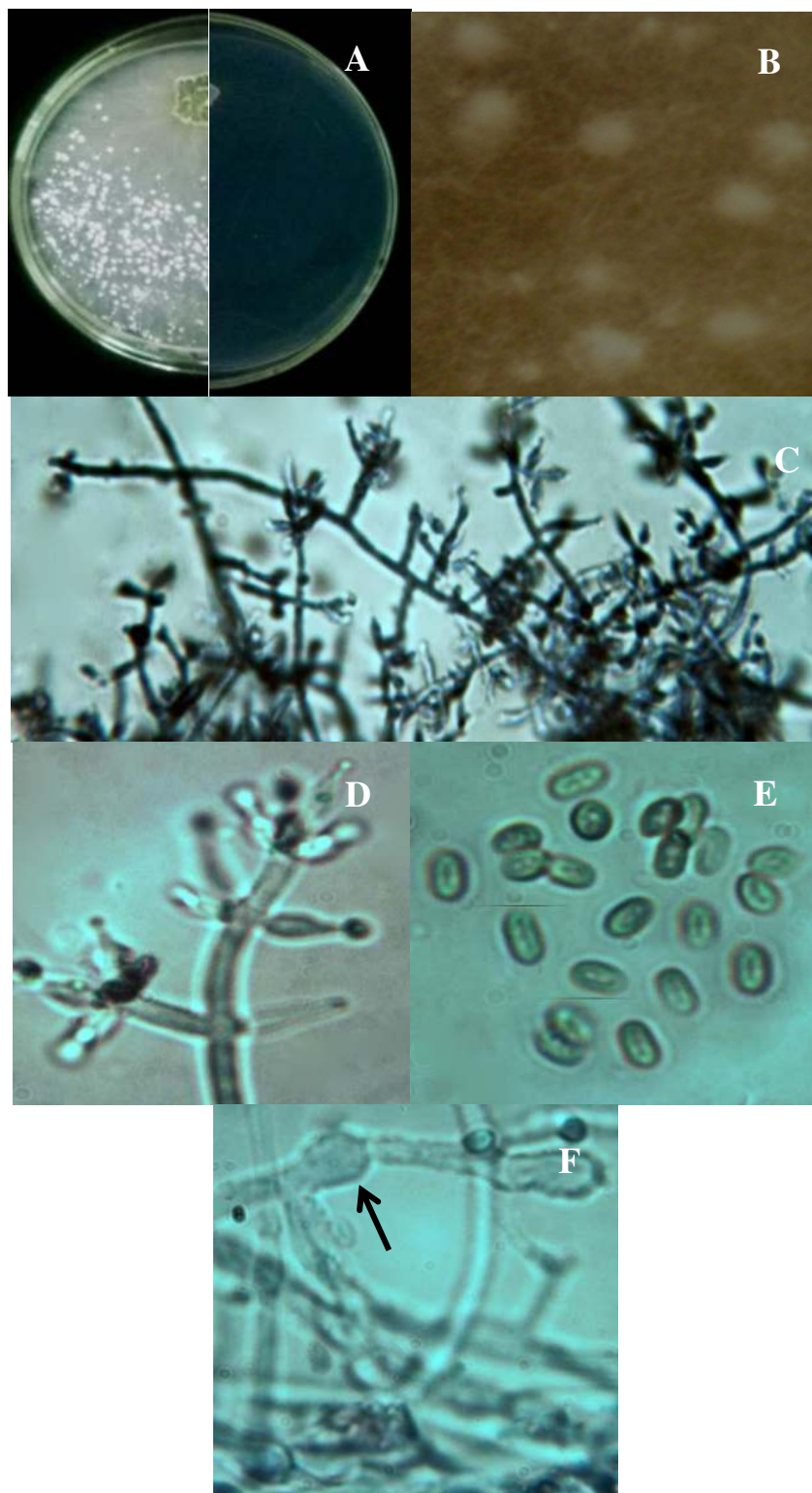


Figura 5.6. *Trichoderma longibrachiautum* (CYC01). **A-** Crecimiento de la colonia a 26 °C en APG y SNA. **B-** Pustulas en SNA. **C-** Conidioforo con fialides solitarias (40X). **D-** Fialides ampuliformes en verticilos de 3 a 4. **E-** Conidios. y **F-** Clamidospora. **D-E y F:** 100X.

La cepa *CYC02* presentó afinidad con la sección *Longibrachiatum* (Bisset *et al.*, 1991) y al Clado: Longibrachiatum, especie *Trichoderma citrinoviride* (Samuels & Prakash, 2015; *Trichoderma* Interactive Key).

Sitio de aislamiento: cepa aislada de suelo de Sitio 1 del Yacimiento Caimancito

Crecimiento de la colonia 25 a 30 °C en APG: 8,8 – 8.9 cm, SNA 7,0 - 7,8 cm.

Crecimiento de la colonia 35°C: 5.3 – 7.5 cm en APG, 3.8 – 4.6 cm en SNA.

Crecimiento de la colonia a 40 °C en APG 0.9 – 1.3 cm y SNA 0.8 – 0.9 cm.

Características microscópicas:

Colonia de crecimiento rápido. Esporulación verde-amarillo, que se vuelven verde oliva al 7 – 10 día de desarrollo. Micelio aéreo reducido hialino o blanco. Pústulas compactas abundantes dispuestas en anillos o uniformemente dispersas. No hay olor.

Características de la colonia:

Los *conidióforos* son de tipo piramidal (Samuels & Prakash, 2015), eje principal largo, no muy ramificado con ramas laterales que no están pareadas y se disponen en un ángulo aproximado de 90° con respecto al eje principal. Eje principal como secundario presentan una sola fialide en la punta. Eje principal frecuentemente nudoso.

Las *fialides* son langeriformes a ampuliformes, solitarias en los ejes o en verticilos de 7.2 a 11.3 µm de longitud, 2.1 a 3.3 µm de ancho y la base es menor a 2.0 µm. Ancho de la célula de apoyo 1.9 a 2.5 µm. La relación entre long/ancho 2.2 a 3.9 µm; long /célula de apoyo 2.8 a 5.9 µm; ancho de fialide/célula de apoyo 0.8 a 1.6 µm. Fialides intercalares no abundantes. *Conidios* son elipsoidales, lisos y verdes, de 3.9 a 4.2 µm de longitud y 2.3 a 2.9 µm de ancho. La relación entre long/ancho es 1.5 a 2.2 µm. *Clamidosporas* de 5.5 a 7.9 µm subglobosas, terminales o intercalares.

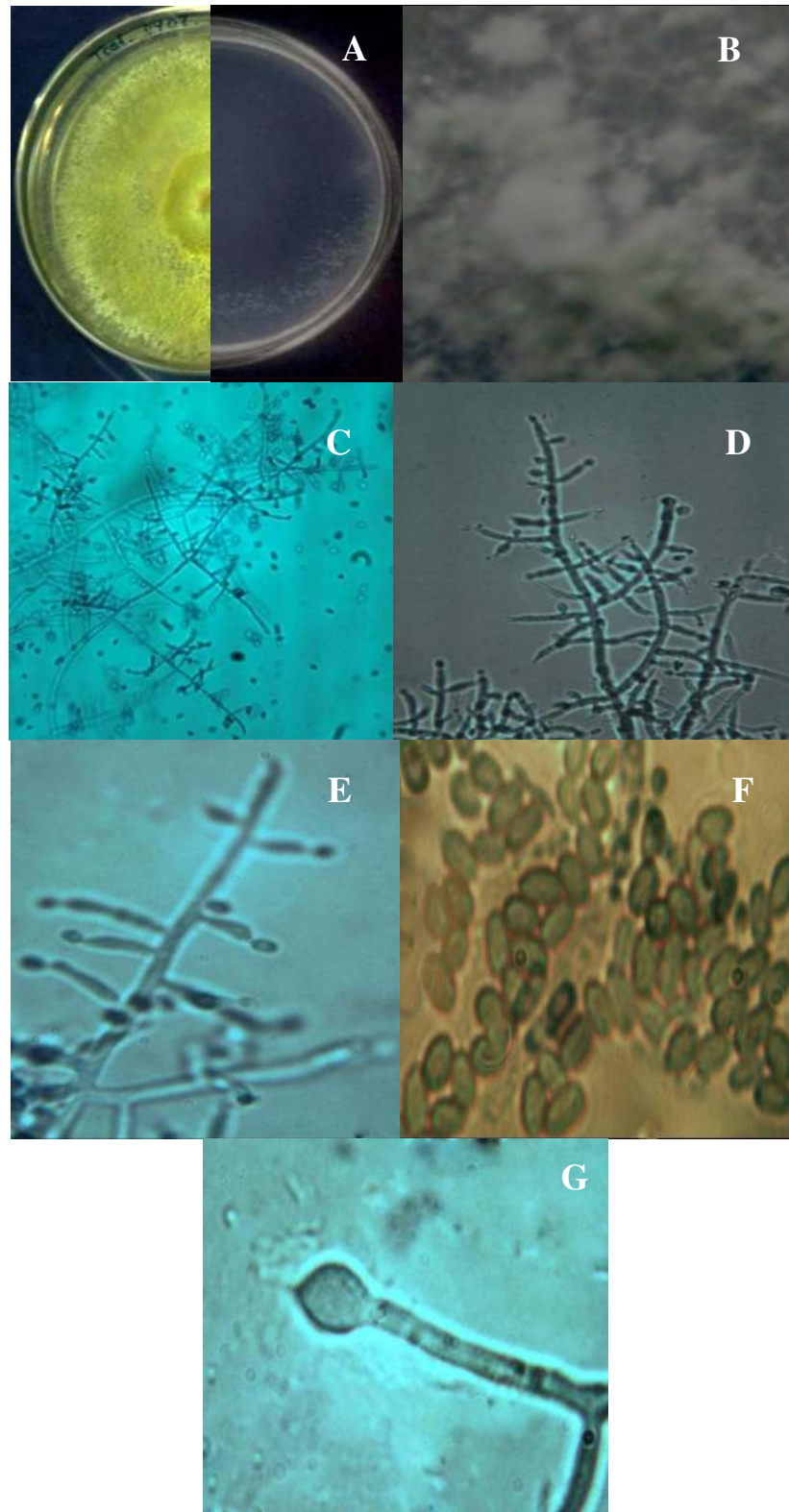


Figura 5.7. *Trichoderma citrinoviride* (CYC02). **A-** Crecimiento de la colonia a 26 °C en medio APG y SNA. **B-** Pustulas en APG. **C-** Conidioforo con fialides solitarias (25X). **D-E** Fialides ampuliformes a langeriformes solitarias (40X). **F-** Conidios. y **G-** Clamidospora. **E-F y G:** 100X.

La cepa *CYC03* presentó afinidad con la sección *Trichoderma* (Bisset *et al.*, 1991) *Trichoderma* sp (Samuels & Prakash, 2015; *Trichoderma* Interactive Key).

Sitio de aislamiento: cepa aislada de suelo de Sitio 1 del Yacimiento Caimancito.

Crecimiento de la colonia 25 a 30 °C en APG: 6,31 - 6,55cm, SNA 3.11 - 4,35 cm.

Crecimiento de la colonia 35 y 40 °C: la cepa no creció en ninguno de los dos medios.

Características de la colonia:

Colonia con bordes definidos, blanca sin esporulación, reverso de la caja sin pigmentación y olor. Se levanta a 0.1 mm sobre el medio de cultivo. A las 96 horas se observa esporulación formando un anillo verde amarillo.

Características microscópicas:

Los *conidióforos* son de tipo piramidal (Samuels & Prakash, 2015), presentan un eje principal corto, con ramas laterales pareadas. Fialides en verticilos en grupos de 2 a 3 que se disponen en la punta de eje principal y secundario. Las *fialides* son ampuliformes de 6.8 a 8.5 μm de longitud, 2.4 a 3.2 μm de ancho y la base de 2.0 a 2.6 μm . Ancho de la célula de apoyo 2.2 a 3.0 μm La relación entre long/ancho 2.3 a 4.2 μm ; long/célula de apoyo 3.2 a 4.2 μm ; ancho de fialide/célula de apoyo 1.1 a 1.3 μm . No hay fialides intercalares. *Conidios* son esféricos, lisos y verdes, de 2.8 a 3.4 μm de longitud y 2.7 a 3.2 μm de ancho. La relación entre long/ancho es menor a 1.2 μm Las pústulas sobre la colonia son blancas, de 1 a 2 mm de diámetro. *Clamidosporas* presentes de 5.2 a 8.9 μm de ancho solitarias, intercalares o terminales.

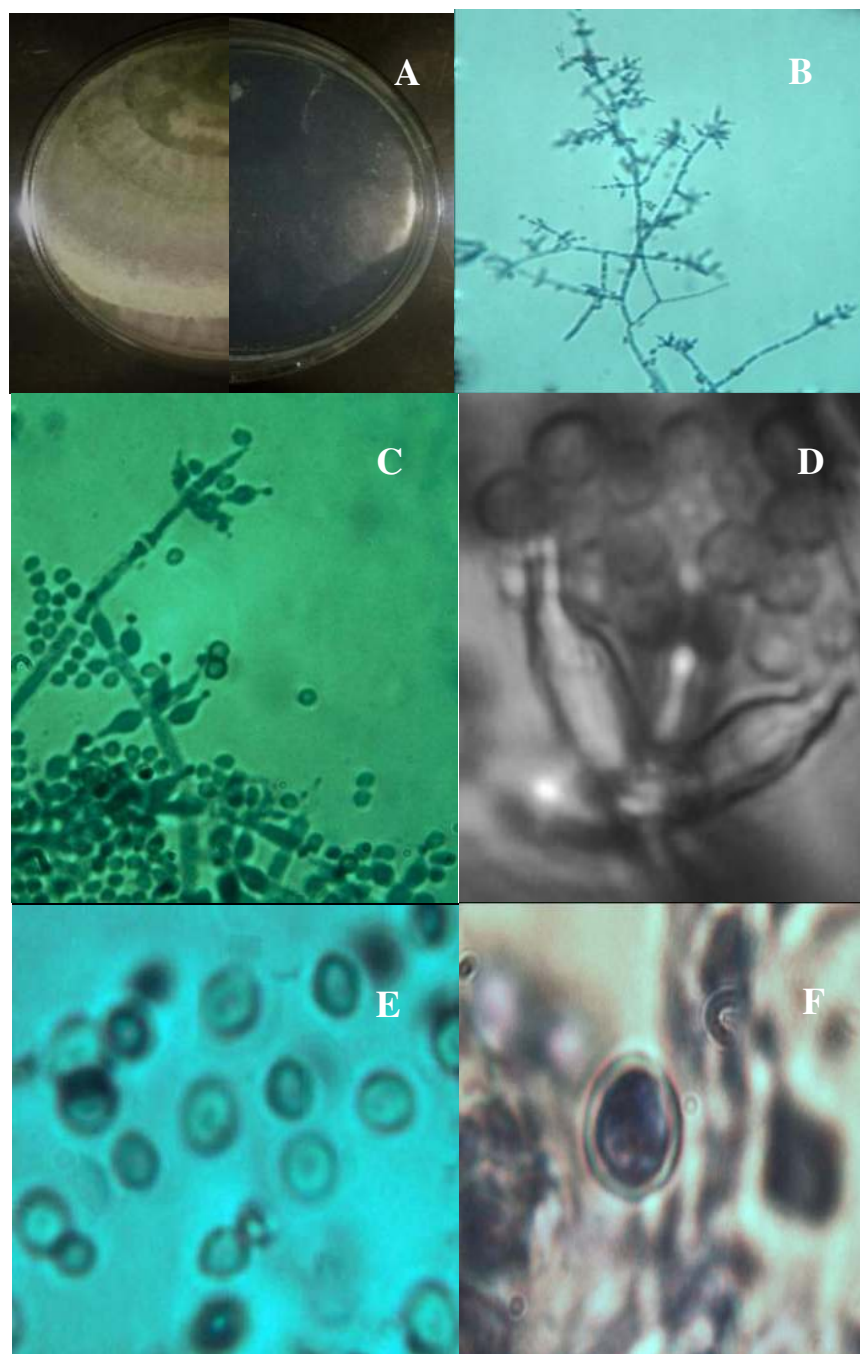


Figura 5.8. *Trichoderma* sp (CYC03) A- Crecimiento de la colonia a 26 °C en medio APG y SNA. B- Conidioforo (25X). C- Fialides D- Fialides y conidios. E- Conidios F-. Clamidospora. C-E y F: 100X.

La cepa *CYC04* presentó afinidad con la sección *Trichoderma* (Bisset *et al.*, 1991), *Trichoderma* sp (Samuels & Prakash, 2015; *Trichoderma* Interactive Key).

Sitio de aislamiento: cepa aislada de suelo de Sitio 1 del Yacimiento Caimancito.

Crecimiento de la colonia 25 a 30 °C en APG: 6.31 – 6.37cm, SNA 4.55 – 4.60 cm.

Crecimiento de la colonia 35 y 40 °C: la cepa no creció en ninguno de los dos medios.

Características de la colonia:

Colonia con bordes definidos. Micelio aéreo que se levanta a 0,1 mm. Es de color blanco sin esporulación, no hay pústulas en APG y el reverso de la caja sin pigmentación, con olor dulce (similar a coco). A las 96 horas se observa esporulación en anillo verde amarillo.

Características microscópicas:

Los *conidióforos* son de tipo piramidal (Samuels & Prakash, 2015), presentan un eje principal corto, con ramas laterales pareadas. Fialides en verticilos en grupos de 2 a 3 que se disponen en la punta de eje principal y secundario. Las *fialides* son ampuliformes de 6.8 a 8.7 μm de longitud; 2.2 a 3.4 μm de ancho y la base de 2.0 a 2.7 μm . Ancho de la célula de apoyo 1.6 a 3.4 μm . La relación entre long/ancho 1.7 a 3.7 μm ; long/célula de apoyo 2.1 a 4.4 μm ; ancho de fialide/célula de apoyo 0.7 a 1.7 μm . No hay fialides intercalares. *Conidios* son globosos o subesféricos, lisos y verdes, de 3.4 a 4.2 μm de longitud y 2.8 a 3.8 μm de ancho. La relación entre long/ancho es menor a 1.2 μm . *Clamidosporas* presentes de 5.4 a 7.6 μm de ancho. Son unicelulares, solitarias, intercalares o terminales.

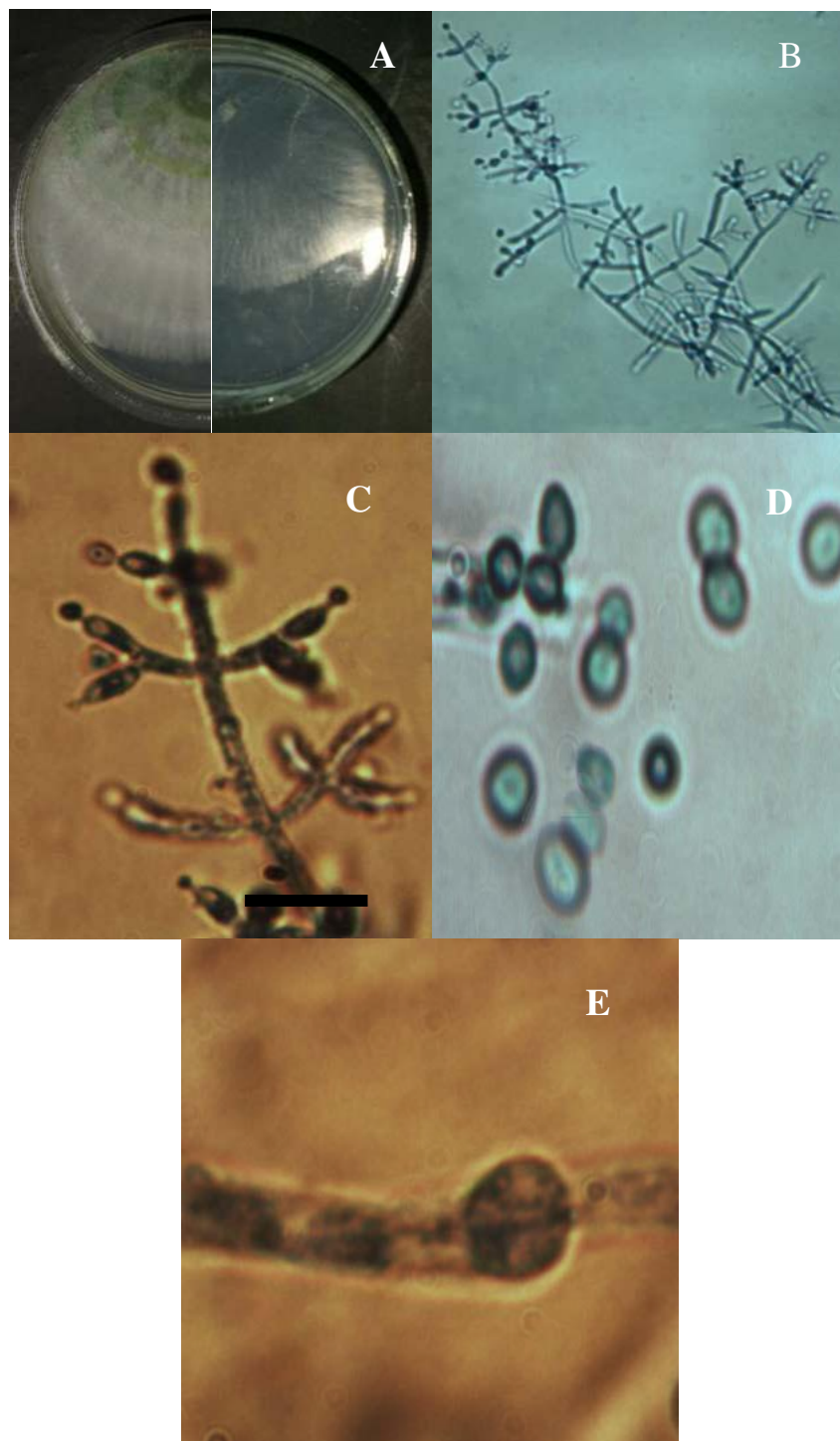


Figura 5.9. *Trichoderma* sp (CYC04). **A-** Crecimiento de la colonia a 26 °C en medio APG y SNA. **B-** Conidioforo (25X). **C-** Fialides **D-** Conidios. **E-** Clamidospora. **C-D-E:** 100X

La cepa *CYC05* presentó afinidad con la sección *Longibrachiatum* (Bisset *et al.*, 1991); Clado: Longibrachiatum, especie *Trichoderma citrinoviride* (Samuels & Prakash, 2015; *Trichoderma* Interactive Key).

Sitio de aislamiento: cepa aislada de suelo de Sitio 1 del Yacimiento Caimancito contaminado con petróleo crudo tratado.

Crecimiento de la colonia 25 a 30 °C en APG: 8.19 - 8.06cm, SNA 5.42 – 7.15 4 cm.

Crecimiento de la colonia 35 °C en APG 5.6 – 7.0 cm, SNA 3.09 – 3.51 cm.

Crecimiento de la colonia 40 °C: APG 0.7 – 1.0 cm y SNA 0.6 – 0.7 cm.

Características de la colonia:

Colonia de crecimiento rápido. Esporulación verde-amarillo, que se vuelven verde oliva al 7 – 10 día de desarrollo. Micelio aéreo reducido hialino o blanco. Pústulas compactas abundantes dispuestas en anillos o uniformemente dispersas. No hay olor.

Características microscópicas:

Los *conidióforos* es de tipo piramidal (Samuels & Prakash, 2015). Eje principal largo, con ramas secundarias cortas, fialides solitarias cerca de la punta del eje principal y ramas secundarias. No hay pelos fértiles ni estériles sobre pústulas y conidióforos. Las *fialides* son langeriformes a ampuliformes de 6.9 a 9.5 μm de longitud, 2.0 a 3.0 μm de ancho y la base menor de 2,0. Ancho de la célula de apoyo 1.8 a 2.8 μm . La relación entre long/ancho 2.4 a 4.5 μm ; long/célula de apoyo 2.6 a 5.0 μm , ancho de fialide/célula de apoyo 0.7 a 1.3 μm . No se observan fialides intercalares. *Conidios* son elipsoidales, lisos y verdes, de 3.4 a 5.1 μm de longitud y 2.0 a 2.8 μm de ancho. La relación entre long/ancho de 1.4 a 2.0 μm . *Clamidosporas* presentes de 6.1 a 10.2 μm de ancho. Son unicelulares, solitarias, terminales.

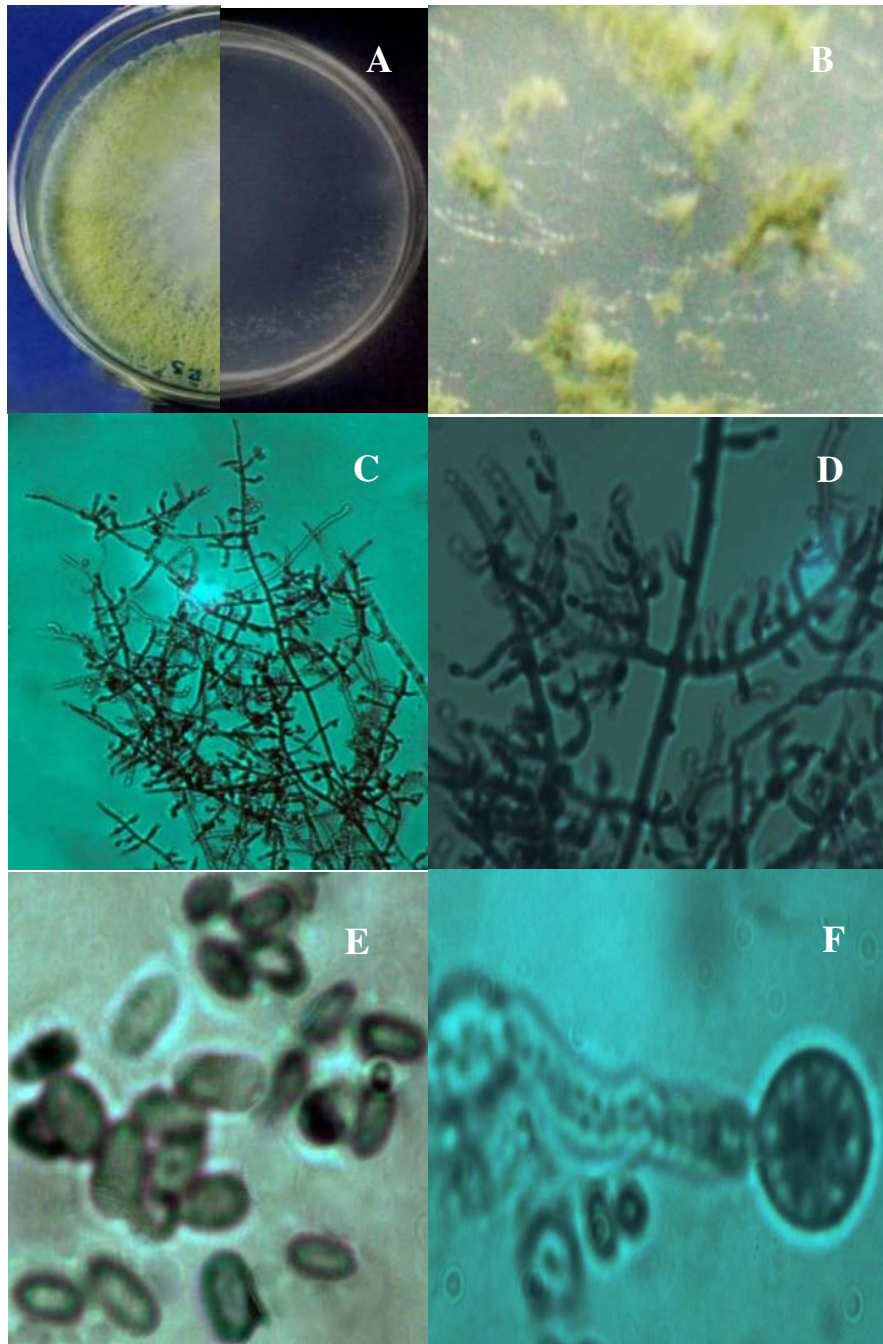


Figura 5.10. *Trichoderma citrinoviride* (CYC05). **A-** Crecimiento de la colonia a 26 °C en medio APG y SNA. **B-** Pustulas en APG. **C-** Conidioforo con fialides solitarias (25X). **D** Fialides langeriformes a ampuliformes, solitarias (40X). **E-** Conidios. **F-** Clamidospora. **E y F:** 100X

La cepa *CYC06* presentó afinidad con la sección *Longibrachiatum* (Bisset *et al.*, 1991); Clado: Longibrachiatum, especie *Trichoderma longibrachiatum* (Samuels & Prakash, 2015; *Trichoderma* Interactive Key).

Sitio de aislamiento: cepa aislada de suelo de Sitio 1 del Yacimiento Caimancito.

Crecimiento de la colonia 25 a 30 °C en APG: 8.06 – 8.18 cm, SNA 6.10 – 6.79 cm

Crecimiento de la colonia 35 °C en APG 8.23 - 8.74 cm, SNA y 3.63 – 3.81 cm.

Crecimiento de la colonia 40 °C: la cepa no creció en ninguno de los dos medios.

Características de la colonia:

Colonia con crecimiento rápido, color blanco sin esporulación, pústulas pequeñas color blanco, el reverso de la caja sin pigmentación y sin olor. A las 96 horas se observa esporulación color verde- amarilla.

Características microscópicas:

Los *conidióforos* es de tipo Longibrachiatum (Samuels & Prakash, 2015) presentan un eje principal largo, con fialides solitarias sobre él eje principal y ramas secundarias. No hay pelos fértiles ni estériles sobre pústulas y conidióforos. Las *fialides* son cilíndricas a langeriformes, rectas o sinuosas de 6.1 a 10.2 µm de longitud, 2.0 a 3.2 µm de ancho y base de 1.7 a 3.0 µm. Ancho de la célula de apoyo 1.8 a 3.0 µm. La relación entre long/ancho 2.3 a 5.5 µm; long/célula de apoyo 2.2 a 8.3 µm; ancho de fialide/célula de apoyo 0.7 a 1.5 µm. Hay fialides intercalares. *Conidios* son elipsoidales, lisos y verdes, de 4.4 a 5.2 µm de longitud; 2.7 a 3.5 µm de ancho. La relación entre long/ancho de 1.4 a 1.8 µm. *Clamidosporas* abundantes de 5.2 a 9.9 µm de ancho. Son unicelulares, subglobosas y terminales.

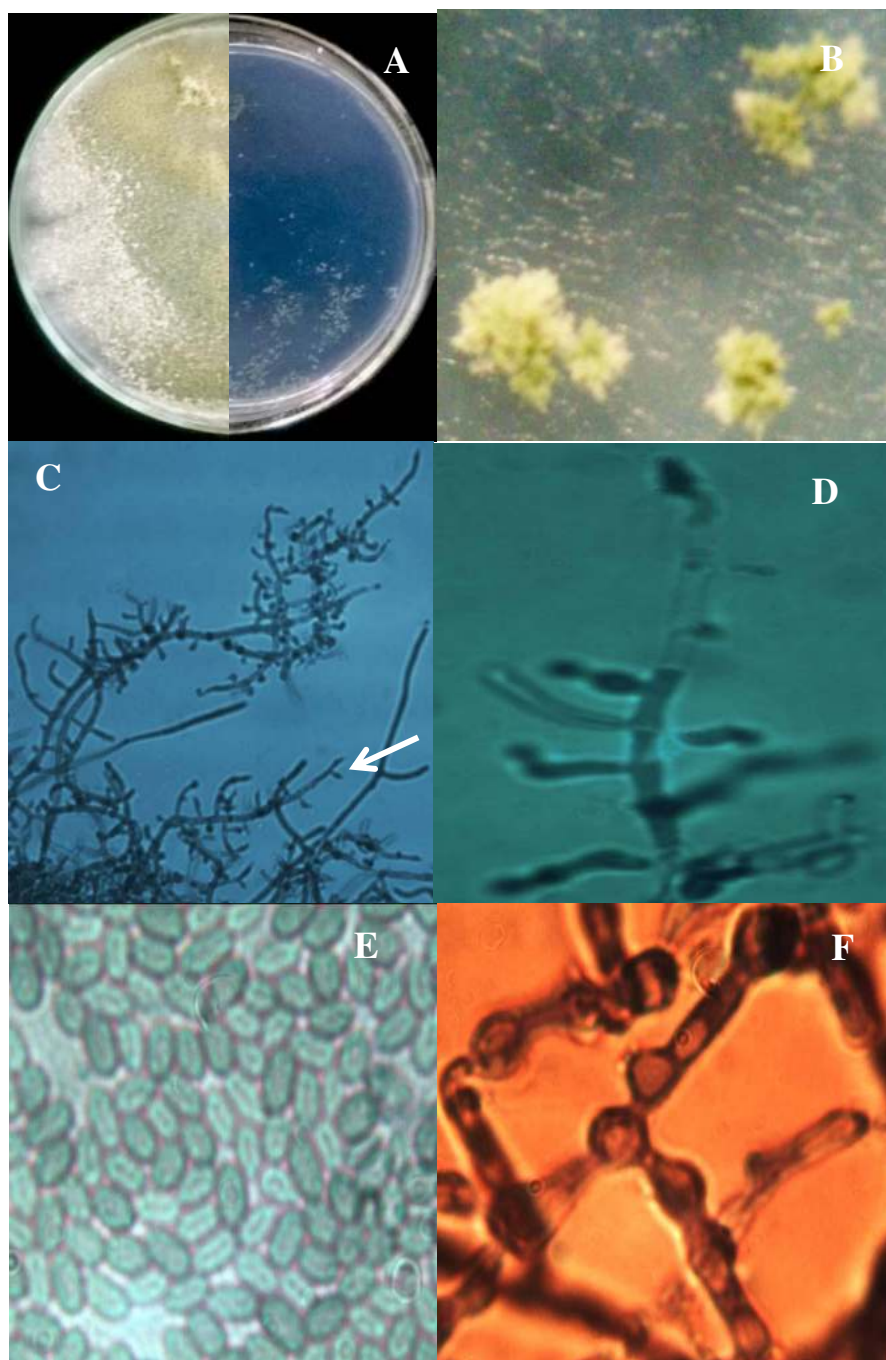


Figura 5.11. *Trichoderma longibrachiatum* (CYC06) **A-** Crecimiento de la colonia a 26 °C en medio APG y SNA. **B-** Pustulas en APG. **C-** Conidioforo con fialides solitarias. Fialide intercalar (25X). **D** Fialides cilíndricas a langeriformes, solitarias. **E-** Conidios. **F-** Clamidospora. **D-E y F:** 100X.

La cepa *CYC07* presentó afinidad con sección *Longibrachiatum* (Bisset *et al.*, 1991); Clado: *Longibrachiatum*, especie *Trichoderma longibrachiatum* (Samuels & Prakash, 2015; *Trichoderma* Interactive Key).

Sitio de aislamiento: cepa aislada de suelo de Sitio 1 del Yacimiento Caimancito contaminado con petróleo crudo tratado.

Crecimiento de la colonia 25 a 30 °C en APG: 8.09 – 8.10 cm, SNA 7.56 – 7.69 cm

Crecimiento de la colonia 35 °C en APG 2.69 - 3.08 cm, SNA y 2.51 – 2.57 cm.

Crecimiento de la colonia 40 °C: la cepa no creció en ninguno de los dos medios.

Características de la colonia:

Colonia de crecimiento rápido, circular, de bordes enteros, color blanco, con esporulación rala cerca de los bordes, pústulas pequeñas color blanco, el reverso no mostro pigmentación. A las 96 horas se observa esporulación verde-amarilla y micelio aéreo blanco en los bordes.

Características microscópicas:

Los *conidióforos* es de tipo *Longibrachiatum* (Samuels & Prakash, 2015), presentan un eje principal largo, con fialides solitarias sobre él eje principal y ramas secundarias. No hay pelos fértiles ni estériles sobre pústulas y conidióforos. Las *fialides* son cilíndricas a langeriformes, rectas o sinuosas de 7.1 a 11.4 μm de longitud, 1.7 a 2.9 μm de ancho y base de 1.2 a 1.9 μm . Ancho de la célula de apoyo 1.6 a 1.7 μm . La relación entre long/ancho 2.7 a 6.4 μm ; long/célula de apoyo 3.3 a 6.8 μm ; ancho de fialide/célula de apoyo 0.6 a 1.7 μm . Fialides intercalares abundantes rectas, en gancho o sinuosas. *Conidios* son elipsoidales u oblongos, lisos y verdes, de 4.5 a 5.2 μm de longitud; 3.0 a 4.0 μm de ancho. La relación entre long/ancho de 1.2 a 1.6 μm . *Clamidosporas* presentes de 4.4 a 5.8 μm de ancho. Son unicelulares, subglobosas y terminales.

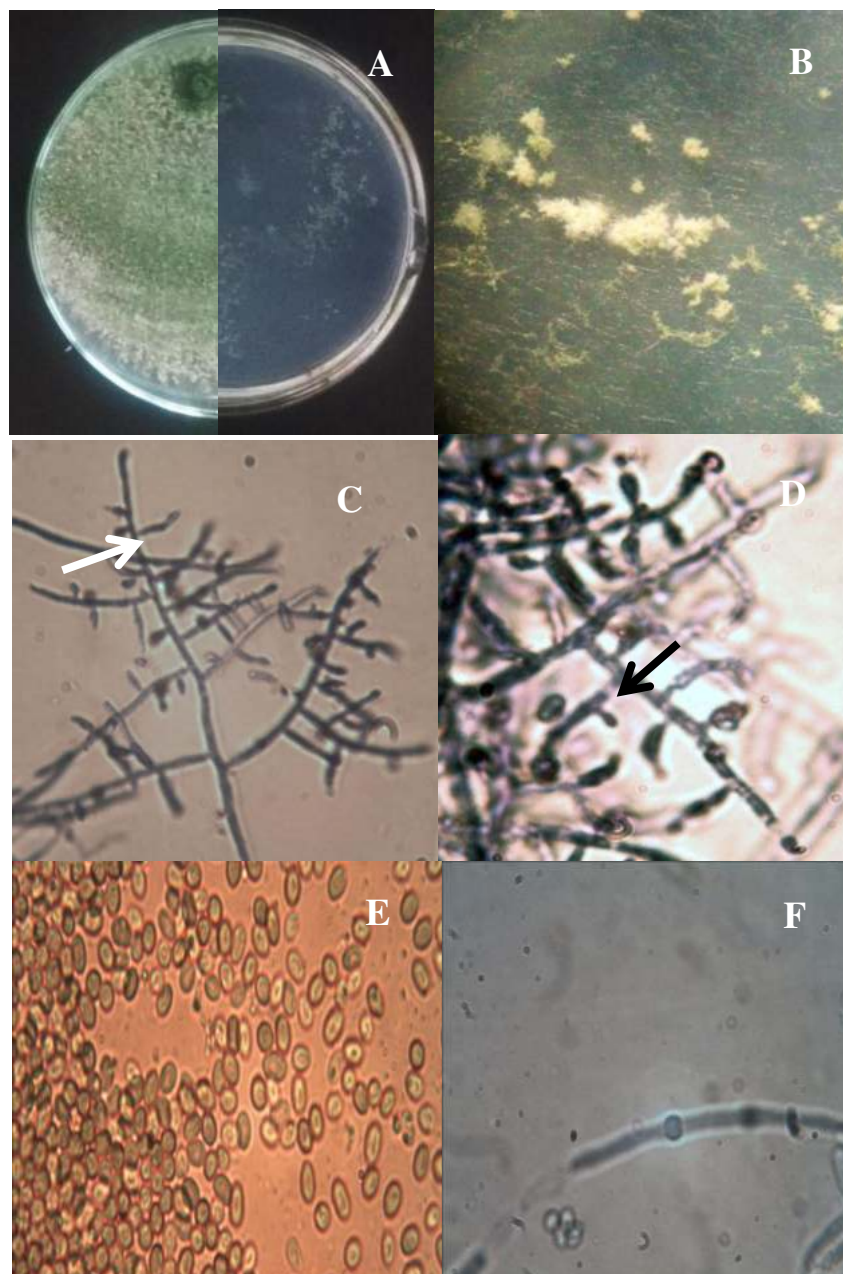


Figura 5.12. *Trichoderma longibrachiatum* (CYC07) **A-** Crecimiento de la colonia a 26 °C en medio APG y SNA. **B-** Pustulas en APG. **C-** Conidioforo con fialides solitarias. Fialide intercalary (40X). **D** Fialides cilíndricas a langeriformes, solitarias. **E-** Conidios. **F-** Clamidospora (25X). **D-E:** 100X.

La cepa *CYC08* presentó afinidad con sección *Longibrachiatum* (Bisset *et al.*, 1991); Clado: *Longibrachiatum* (Samuels & Prakash, 2015) y afín a la especie *Trichoderma citrinoviride* (*Trichoderma* Interactive Key).

Sitio de aislamiento: cepa aislada de suelo de Sitio 2 del Yacimiento Caimancito.

Crecimiento de la colonia 25 a 30 °C en APG 8.15 – 8.90 cm diámetro, SNA 6.92 -7.89 cm.

Crecimiento de la colonia 35 °C en APG: al 7 día 8.12 cm; SNA 0 cm.

Crecimiento de la colonia 40 °C: después de 72 horas en APG 0.7 cm y 0.96 en SNA.

Características de la colonia:

Colonia con pústulas pequeña abundantes de color blanco menores a 0.25 mm, sin olor, parte central amarilla y esporulación verde oscura en forma de anillo con bordes blancos. Placa con pigmentación amarilla-verdosa en APG. El micelio aéreo es blanco, algodonoso con conidióforos visibles. Pelos estériles hialinos en postulas pequeñas menores a 0.2 mm en SNA.

Características microscópicas:

Los *conidióforos* es de tipo *Longibrachiatum* (Samuels & Prakash, 2015), presentan un eje largo, con numerosas ramificaciones cortas. Fiálides solitarias debajo de la punta del eje principal y de ramas secundarias. Ramas secundarias que aumentan en longitud desde la base que termina en un verticilo de tres o más fiálides divergentes. Las *fiálides* son langeriformes a ampuliformes de 7.1 a 10.2 μm de longitud, 2.0 a 3.6 μm de ancho y base de 1.1 a 1.6 μm . Ancho de la célula de apoyo 1.4 a 3.0 μm . La relación entre long/ancho 2.2 a 6.4 μm ; long de fialide/célula de apoyo 2.0 a 3.1 μm ; ancho de fialide/célula de apoyo 0.7 a 2.3 μm . Fialides intercalares ausentes. *Conidios* son elipsoidales u oblongos, lisos y verdes, de 2.0 a 2.8 μm de longitud; 2.0 a 3.0 μm de ancho. La relación entre long/ancho de 1.6 a 2.5 μm . *Clamidosporas* de 5.3 a 9.9 μm de ancho. Son unicelulares, subglobosas, terminales o intercalares.

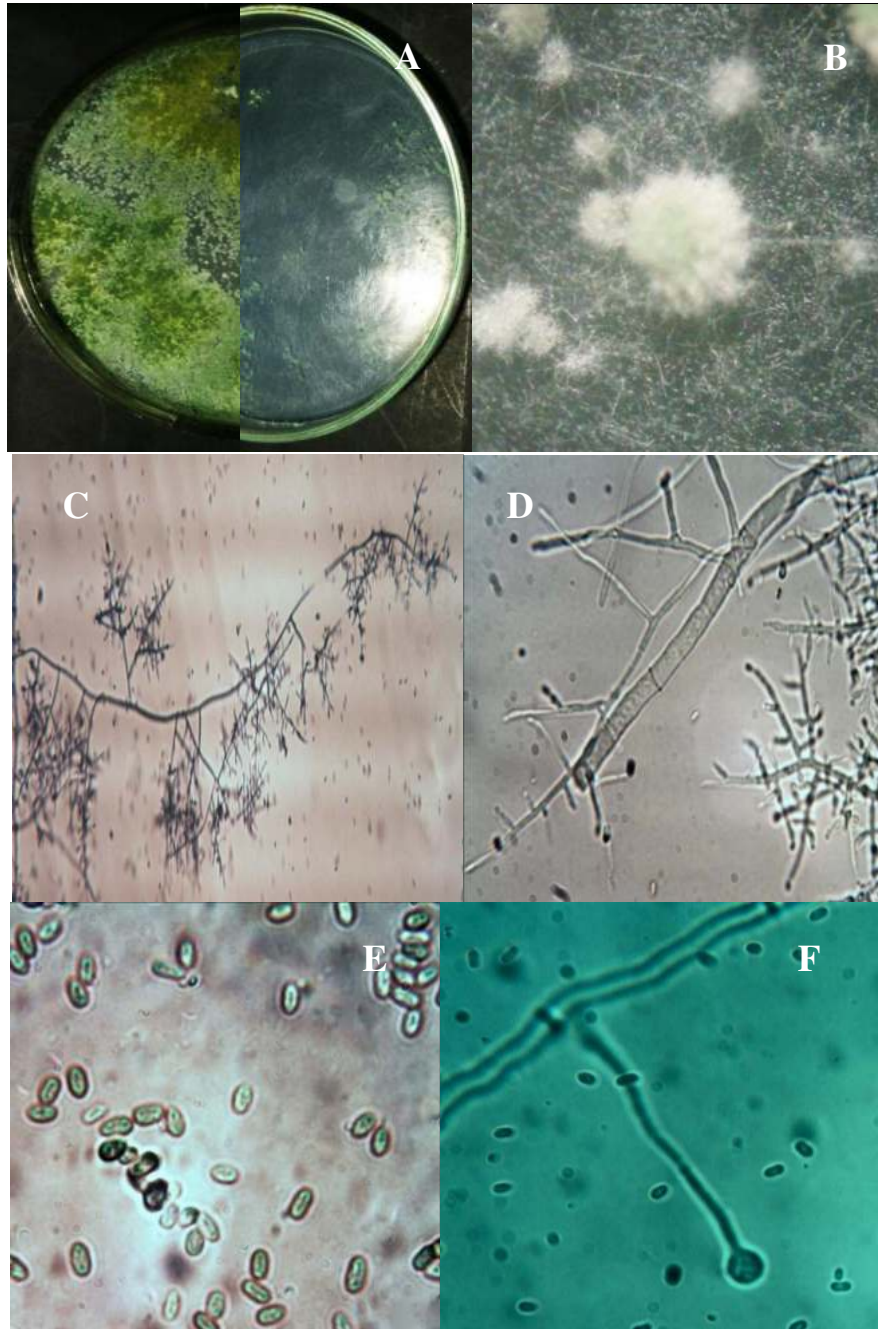


Figura 5.13. *Trichoderma citrinoviride* (CYC08.) **A-** Crecimiento de la colonia a 26 °C en medio APG y SNA. **B-** Pustulas **C-** Conidioforo con numerosas ramificaciones (25X) **D-** Apice de conidioforo con fialides solitarias. **E-** Conidios elipsoidales u oblongos y **F-** Clamidospora. **E-F:** 100X

La cepa *CYC09* presentó afinidad con sección *Trichoderma* (Bisset *et al.*, 1991); Clado: Viride y afín a la especie *Trichoderma atroviride* (Samuels & Prakash, 2015; *Trichoderma* Interactive Key).

Sitio de aislamiento: cepa aislada de suelo de Sitio 3. Batería del Yacimiento Caimancito.

Crecimiento de la colonia 25 a 30 °C en APG 2.79 - 3.61 cm diámetro, SNA 2.61 - 3.49 cm. A 40° C después de 72 horas en APG 0.7 cm y 0.96 en SNA.

Crecimiento de la colonia 35 y 40 °C en APG y SNA: la cepa no creció en ninguno de los dos medios.

Características de la colonia:

Colonia compacta con micelio aéreo mínimo, tomentoso color blanco, con pústulas en anillo (2 - 3), sin olor, con esporulación verde oscura en el centro y con bordes blancos; sin pigmentación.

Características microscópicas:

Los *conidióforos* son de tipo piramidal (Samuels y Prakash, 2015) presentan un eje principal largo, con fialides que se disponen individualmente sobre eje principal en la punta o en verticilos divergentes de 3 a 4 fialides. No hay pelos fértiles ni estériles sobre pústulas y conidióforos. Las *fialides* son ampuliformes en los verticilos o lageriformes, rectas o sinuosas de 7.5 a 13.6 µm de longitud; 2.4 a 3.8 µm de ancho y base de 1.4 a 2.5 µm. Ancho de la célula de apoyo 1.8 a 3.1 µm. La relación entre long/ancho 2.2 a 5.0 µm; long/célula de apoyo 2.2 a 6.7 µm; ancho de fialide/célula de apoyo 0.9 a 1.5 µm. No hay fialides intercalares. *Conidios* son subglobosos a ovoideos, lisos, verde- amarillos, de 3.1 a 4.0 µm de longitud; 2.4 – 3.2 µm de ancho. La relación entre long/ancho de 1.1 a 1.5 µm. *Clamidosporas* presentes de 4.3 a 7.0 µm de ancho. Son unicelulares, subglobosas y terminales.

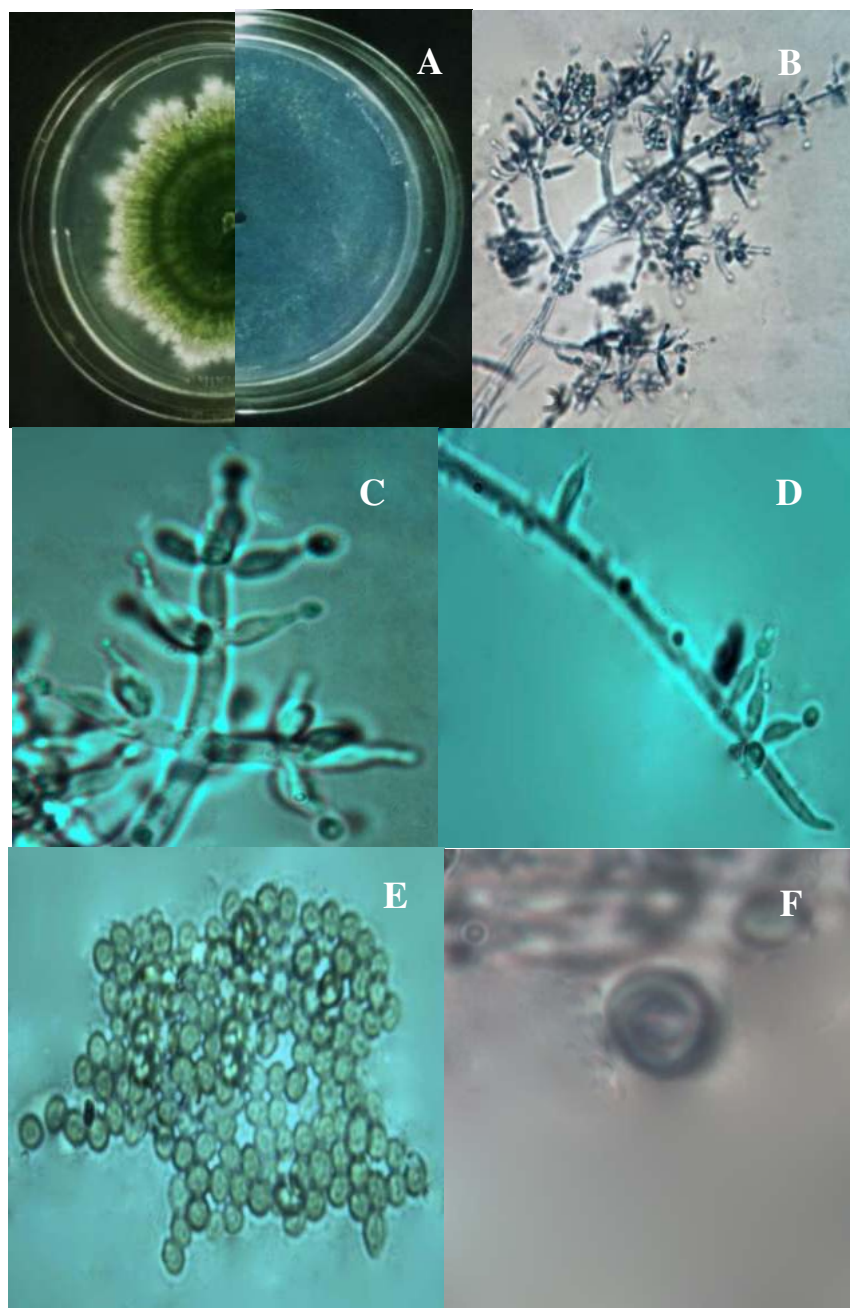


Figura 5.14. *Trichoderma atroviride* (CYC09). **A-** Crecimiento de la colonia a 26 °C en medio APG y SNA. **B-** Conidioforo en forma piramidal (40X). **C-** Conidioforo con fialides ampuliformes en verticilos de 3 a 4. **D-** Apice de conidioforo con fialides solitarias. **E-** Conidios y **F-** Clamidospora. **C-D- E y F:**100X

La cepa *CYCI0* presentó afinidad con sección *Pachybasium* (Bisset *et al.*, 1991) y afín a la Clado: Harzianum, especie *Trichoderma harzianum* (Samuels & Prakash, 2015; *Trichoderma* Interactive Key).

Sitio de aislamiento: cepa aislada de suelo de Sitio 4. Piletón de pozo Ca-40 del Yacimiento Caimancito.

Crecimiento de la colonia 25 a 30 °C en APG 7.87 – 8.05 cm diámetro, SNA 6.80 – 7.79 cm.

Crecimiento de la colonia 35 y 40 °C en APG y SNA: la cepa no creció en ninguno de los dos medios.

Características de la colonia:

Colonia de crecimiento rápido, circular, con micelio aéreo color blanco abundante, esporulación dispersa amarillo-verdosa, con pústulas y reverso de la caja sin pigmentación. A las 96 horas desarrollo completo cubierta completamente de micelio aéreo abundante color blanco, esporulación verde oliva.

Características microscópicas:

Los *conidióforos* son de tipo piramidal (Samuels & Prakash, 2015), presentan un eje principal, con ramas secundarias pareadas o en grupos de tres. Fialides de 3 a 4 que se disponen sobre eje principal y ramas secundarias. No está excesivamente ramificado. No hay pelos fértiles ni estériles sobre pústulas y conidióforos. Las *fialides* son ampuliformes, rectas o sinuosas de 8.6 a 12.5 μm de longitud; 2.2 a 3.9 μm de ancho y base de 1.5 a 2.6 μm . Ancho de la célula de apoyo 1.7 a 2.9 μm . La relación entre long/ancho 2.9 a 5.3 μm ; long/célula de apoyo 3.3 a 7.1 μm ; ancho de fialide/célula de apoyo 0.8 a 1.8 μm . Hay fialides intercalares. *Conidios* son elipsoidales u oblongos, lisos, verdes, de 2.1 a 3.0 μm de longitud; 1.9 a 2.2 μm de ancho. La relación entre long/ancho de 1.0 a 1.3 μm . *Clamidosporas* presentes de 6.8 a 8.8 μm de ancho. Son unicelulares, subglobosas y terminales.

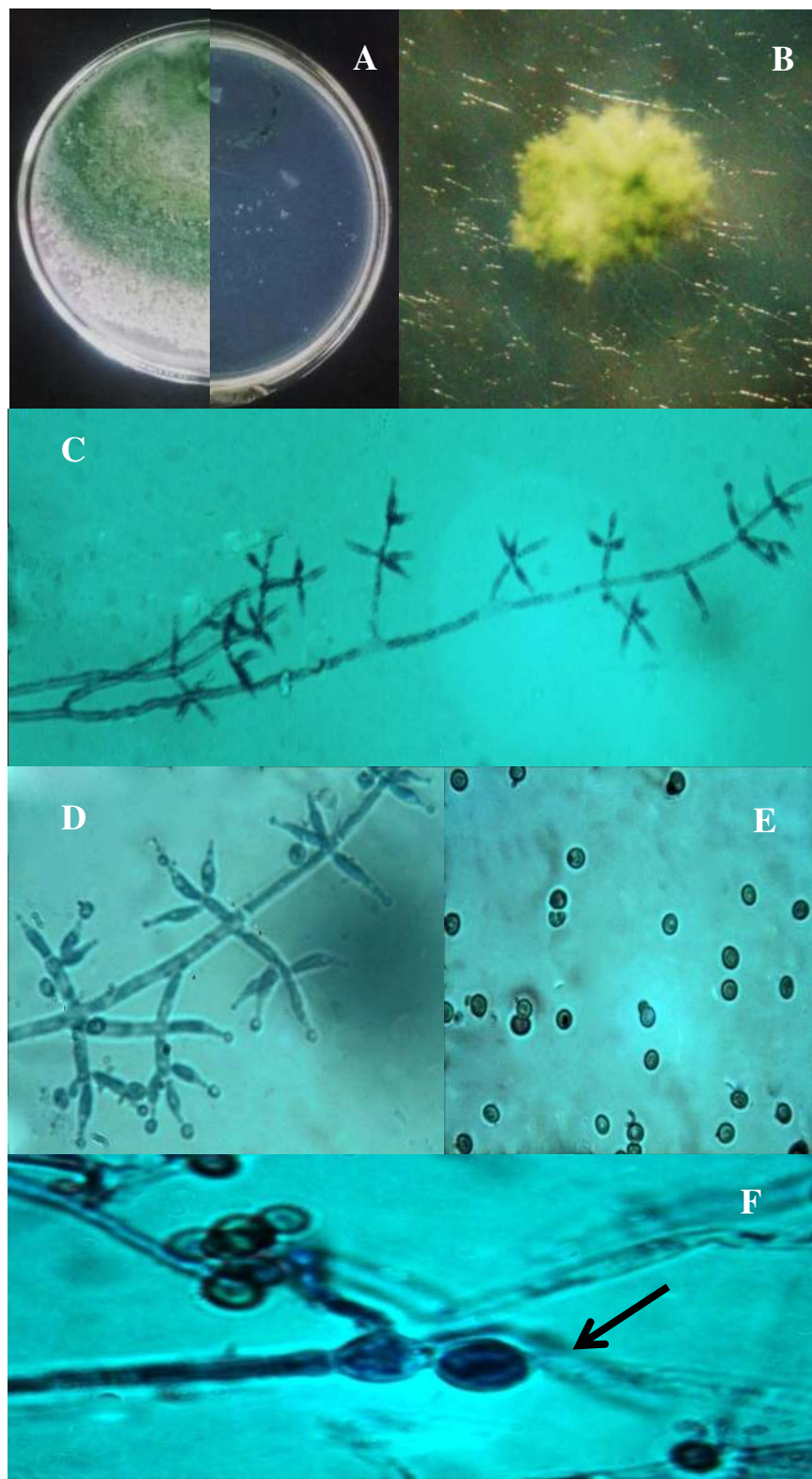


Figura 5.15. *Trichoderma harzianum* (CYC10). **A-** Crecimiento de la colonia a 26 °C en medio APG y SNA. **B-** Pustulas en medio SNA. **C-** Conidioforo con fialides ampuliformes en verticilos de 3 a 4 (25X). **D-** Fialides. **E-** Conidios y **F-** Clamidosporas terminales . **D- E y F-100X.**

La cepa *CYC11* presentó afinidad con la sección *Pachybasium* (Bisset *et al.*, 1991), y afín a al Clado Virens, especie *Trichoderma virens* (Samuels & Prakash, 2015; *Trichoderma* Interactive Key).

Sitio de aislamiento: cepa aislada de suelo de Sitio 4. Piletón de pozo Ca-40 del Yacimiento Caimancito.

Crecimiento de la colonia 25 a 30 °C en APG 3.78 – 4.27 cm, SNA 2.72 – 4.32 cm

Crecimiento de la colonia 35 y 40 °C en APG y SNA: la cepa no creció en ninguno de los dos medios.

Características de la colonia:

Colonia circular y con márgenes enteros blancos. Micelio aéreo reducido, color blanco, con pequeñas gotas de líquido, pústulas compactas, con esporulación verde amarilla, sin olor, el reverso de la placa no mostro pigmentación.

Características microscópicas:

Los *conidióforos* son de tipo Gliocladium (Samuels & Prakash, 2015). El eje principal presenta ramificaciones fértiles cerca de la punta, con fialides que se disponen en la punta de las ramas principales y secundarias; se encuentran ligeramente comprimidas unas con otras en grupos de 3 a 5. No hay pelos fértiles ni estériles sobre pústulas y conidióforos. Las *fialides* son ampuliformes a langeriformes de 8.2 a 13.7 μm de longitud, 2.5 a 4.0 μm de ancho y base de 1.3 a 3.3 μm . Ancho de la célula de apoyo 2.1 a 3.5 μm . La relación entre long/ancho 1.0 a 4.2 μm ; long/célula de apoyo 2.9 a 6.1 μm ; ancho de fialide/célula de apoyo 0.9 a 4.6 μm . Hay fialides intercalares. *Conidios* varían en su forma que van desde elipsoidales u oblongos, lisos, verde- amarillos, de 3.5 a 4.9 μm de longitud; 3.9 a 5.8 μm de ancho. La relación entre long/ancho de 1.0 a 1.5 μm . *Clamidosporas* presentes son abundantes de 5.6 a 9.6 μm de ancho. Son unicelulares, subglobosas, terminales o intercalares.

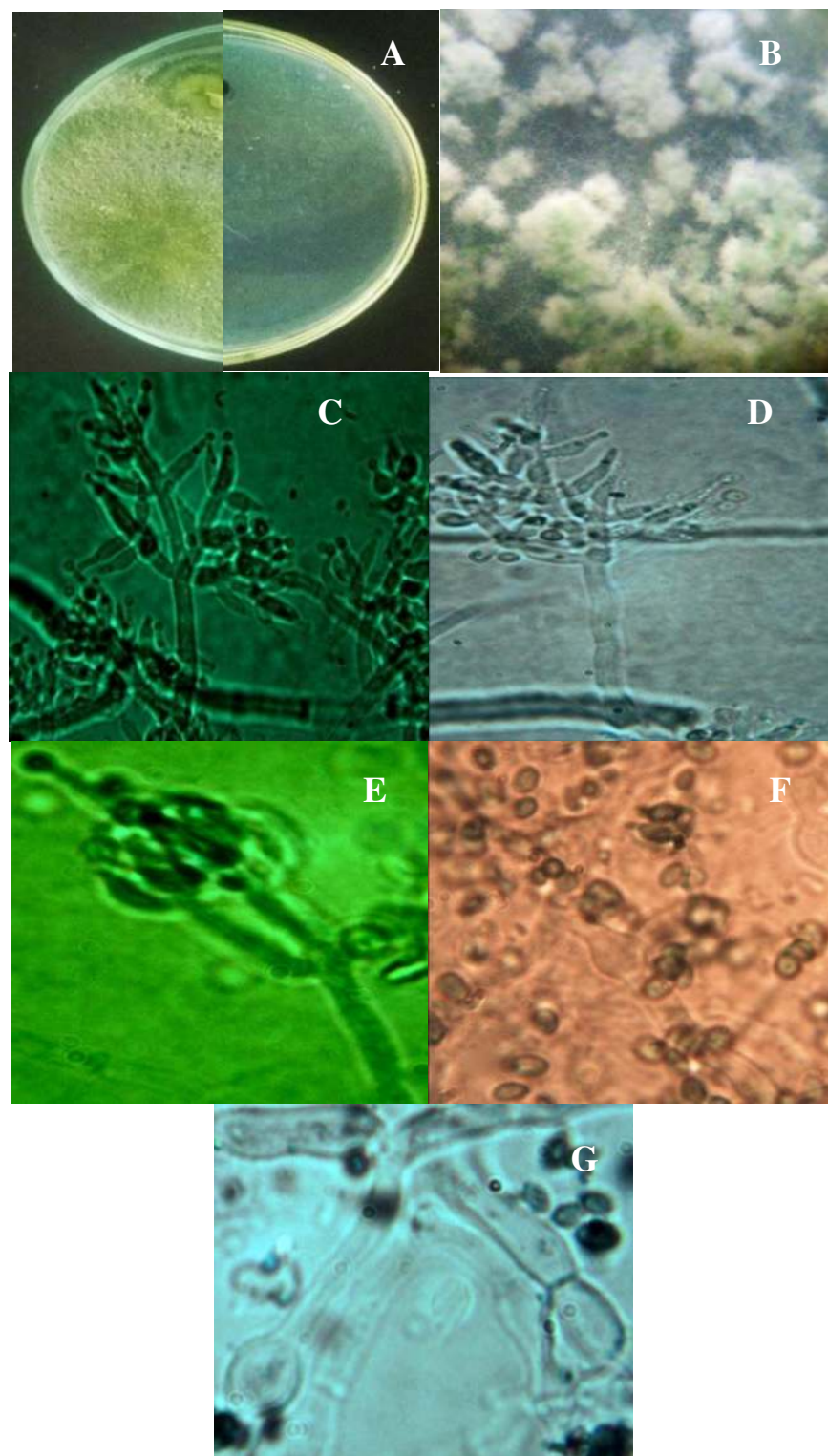


Figura 5.16. *Trichoderma virens* (CYC11). **A-** Crecimietno de la colonia a 26 °C en medioo APG y SNA. **B-** Pustulas en medio SNA. **C-D-E** Conidioforo con fialides en grupos de 3 a 5, ampuliformes y compimidas. **F-** Conidios y **G-** Clamidosporas terminales o intercalares **C-D-E-F** y **G:** 100X.

La cepa *CYCI2* presentó afinidad con la sección *Pachybasium* (Bisset *et al.*, 1991a), y afín a la Clado: Harzianum, especie *Trichoderma harzianum* (Samuels & Prakash, 2015; *Trichoderma* Interactive Key).

Sitio de aislamiento: cepa aislada de suelo de Sitio 4. Piletón de pozo Ca-40 del Yacimiento Caimancito. Suelo contaminado con petróleo crudo, agua de formación y desechos de producción.

Crecimiento de la colonia 25 a 30 °C en APG 7.20 – 8.85 cm, SNA 7.15 – 7.26 cm

Crecimiento de la colonia 35 y 40 °C en APG y SNA: la cepa no creció en ninguno de los dos medios.

Características de la colonia:

Colonia de crecimiento rápido irregular, con márgenes enteros blancos. Micelio aéreo denso, color blanco, con gotas de líquido abundantes, con pústulas, sin olor, esporulación rala dispersa en la parte central, el reverso de la placa no mostro pigmentación. A las 96 horas desarrollo completo cubierta completamente de micelio aéreo abundante color blanco, esporulación verde oliva.

Características microscópicas:

Los *conidióforos* son de tipo piramidal (Samuels & Prakash, 2015) presentan un eje largo, con ramas secundarias pareadas o en grupos de tres. Fialides en grupos de 3 a 4 o solitarias que se disponen sobre eje principal y ramas secundarias. No hay pelos fértiles ni estériles sobre pústulas y conidióforos. Las *fialides* son langeriformes a ampuliformes, rectas o sinuosas de 8.2 a 13.9 μm de longitud; 2.4 a 4.0 μm de ancho y base de 1.5 a 2.7 μm . Ancho de la célula de apoyo 2.0 a 3.8 μm . La relación entre long/ancho 2.3 a 4.4 μm ; long/célula de apoyo 2.9 a 5.9 μm ; ancho de fialide/célula de apoyo 0.9 a 1.8 μm . Hay fialides intercalares. *Conidios* son elipsoidales u oblongos, lisos, verdes, de 2.8 a 3.1 μm de longitud; 1.7 a 2.6 μm de ancho. La relación entre long/ancho de 1.1 a 1.2 μm . *Clamidosporas* presentes de 7.6 a 10.0 μm de ancho. Son unicelulares, subglobosas y terminales.

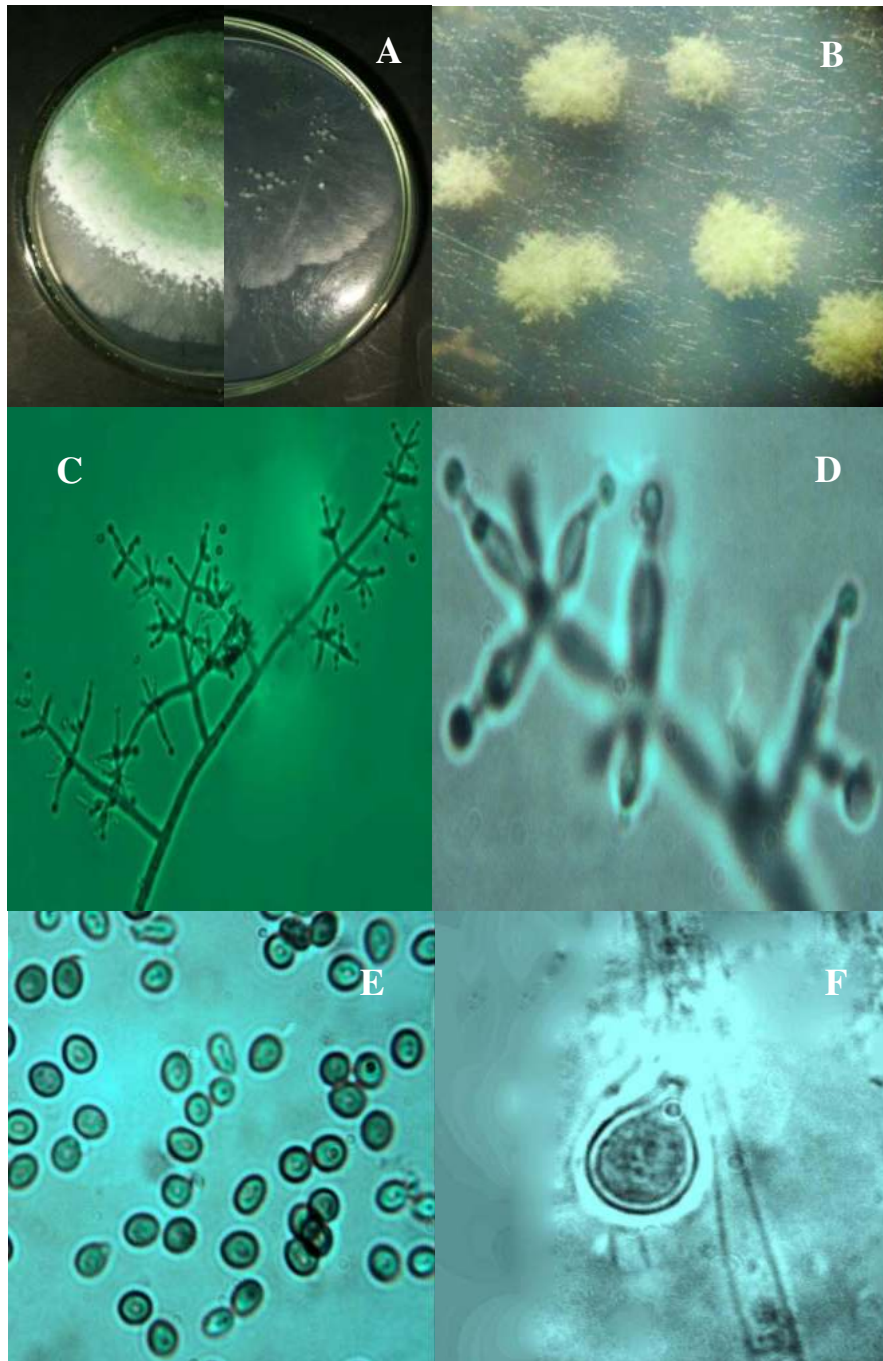


Figura 5.17. *Trichoderma harzianum* (CYC12). **A-** Crecimiento de la colonia a 26 °C en medio APG y SNA. **B-** Pustulas en medio SNA. **C-** Conidioforo con fialides ampuliformes en verticilos de 3 a 4 (40X). **D-** Fialides. **E-** Conidios y **F-** Clamidosporas terminales. **D-E-F:** 100X.

La cepa *CYCI3* presentó afinidad con la sección *Trichoderma* (Bisset *et al.*, 1991a), especie *Trichoderma sp.*

Sitio de aislamiento: cepa aislada de suelo de Sitio 4. Piletón de pozo Ca-40 del Yacimiento Caimancito.

Crecimiento de la colonia 25 a 30 °C en APG 3.14 – 3.34 cm, SNA 3.06 – 3.18 cm

Crecimiento de la colonia 35 y 40 °C en APG y SNA: la cepa no creció en ninguno de los dos medios.

Características de la colonia:

Colonia con márgenes blancos. Micelio aéreo abundante, color blanco, con gotas de líquido abundantes. Pústulas en medios SNA, sin olor, esporulación en anillos color verde oscuro, el reverso de la placa no mostro pigmentación.

Características microscópicas:

Los *conidióforos* presentan forma Piramidal (Samuels & Prakash, 2015), con fialides que se disponen sobre el eje principal y secundario en verticilos de 3 a 4 fialides. Se observan fialides solitarias en eje principal y secundario. No hay pelos fértiles ni estériles sobre pústulas y conidióforos. Las *fialides* son ampuliformes, de 7.8 a 11.8 μm de longitud; 2.7 a 3.7 μm de ancho y base de 1.2 a 2.2 μm . Ancho de la célula de apoyo 2.2 a 2.9 μm . La relación entre long/ancho 2.3 a 3.9 μm ; long/célula de apoyo 2.8 a 4.4 μm ; ancho de fialide/célula de apoyo 1.0 a 1.7 μm . Hay fialides intercalares. *Conidios* son ovoides, lisos, verde- amarillos, de 3.4 a 4.5 μm de longitud y 2.7 a 3.5 μm de ancho. La relación entre long/ancho de 1.0 a 1.3 μm . *Clamidosporas* presentes de 4.9 a 8.7 μm de ancho, no muy abundantes. Son unicelulares, subglobosas y terminales.

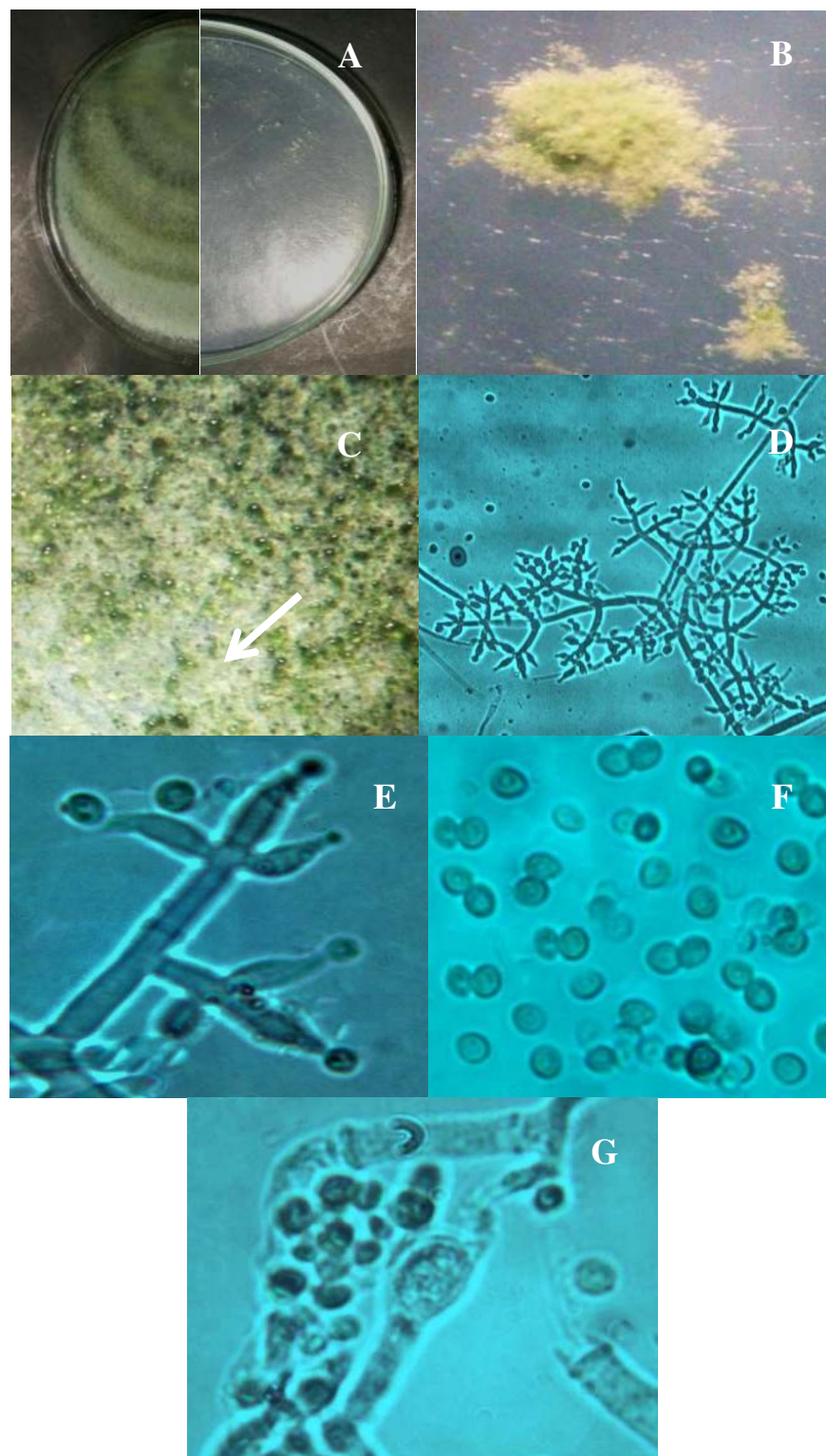


Figura 5.18. *Trichoderma* sp. (CYC13) **A-** Crecimiento de la colonia a 26 °C en medioo APG y SNA. **B-** Pustulas en medio SNA. **C-** gotas de liquido sobre micelio en APG. **D-** Conidioforo con fialides en verticilos de 3 a 4. Se observan fialides pareadas e intercaladas (25X). **E-** Fialides. Ampuliformes. **F-** Conidios y **G-** Clamidospora. **E-F-G:** 100X .

La cepa *CYCI4* presentó afinidad con la sección *Trichoderma* (Bisset *et al.*, 1991a), Clado Viride especie *Trichoderma viride* (Samuels & Prakash, 2015; *Trichoderma* Interactive Key).

Sitio de aislamiento: cepa aislada de suelo de Sitio 5. Ruptura de oleoducto del Pozo Ca- 4 del Yacimiento Caimancito.

Crecimiento de la colonia 25 a 30 °C en APG 3.62 – 5.36 cm, SNA 2.78 - 3.19 cm.

Crecimiento de la colonia 35 y 40 °C en APG y SNA: la cepa no creció en ninguno de los dos medios.

Características de la colonia:

Colonia irregular, con márgenes blancos. Micelio aéreo escaso, color blanco, con pústulas compactas verde claro, sin pelos y sin olor. Esporulación verde–amarilla en el centro, el reverso de la placa con pigmentación amarilla.

Características microscópicas:

Los *conidióforos* son de tipo Longibrachiatum (Samuels & Prakash, 2015), presentan un eje principal largo y poco ramificado. Ramas y fialides se disponen individualmente sobre eje principal y secundario. No hay pelos fértiles ni estériles sobre pústulas y conidióforos. Las *fialides* son ampuliformes a langeriformes rectas de 7.3 a 11.8 µm de longitud; 2.1 a 3.3 µm de ancho y base de 1.1 a 2.0 µm. Ancho de la célula de apoyo 1.3 a 2.6 µm. La relación entre long/ancho 2.7 a 4.7 µm; long de fialide/célula de apoyo 3.0 a 6.2 µm; ancho de fialide/célula de apoyo 0.9 a 1.8 µm. Hay fialides intercalares. *Conidios* son subglobosos, lisos, verdes, de 3.1 a 4.3 µm de longitud; 2.4 a 3.9 µm de ancho. La relación entre long/ancho de 0.9 a 1.6 µm. *Clamidosporas* presentes no muy abundantes de 4.7 a 6.7 µm de ancho. Son unicelulares, subglobosas y terminales.

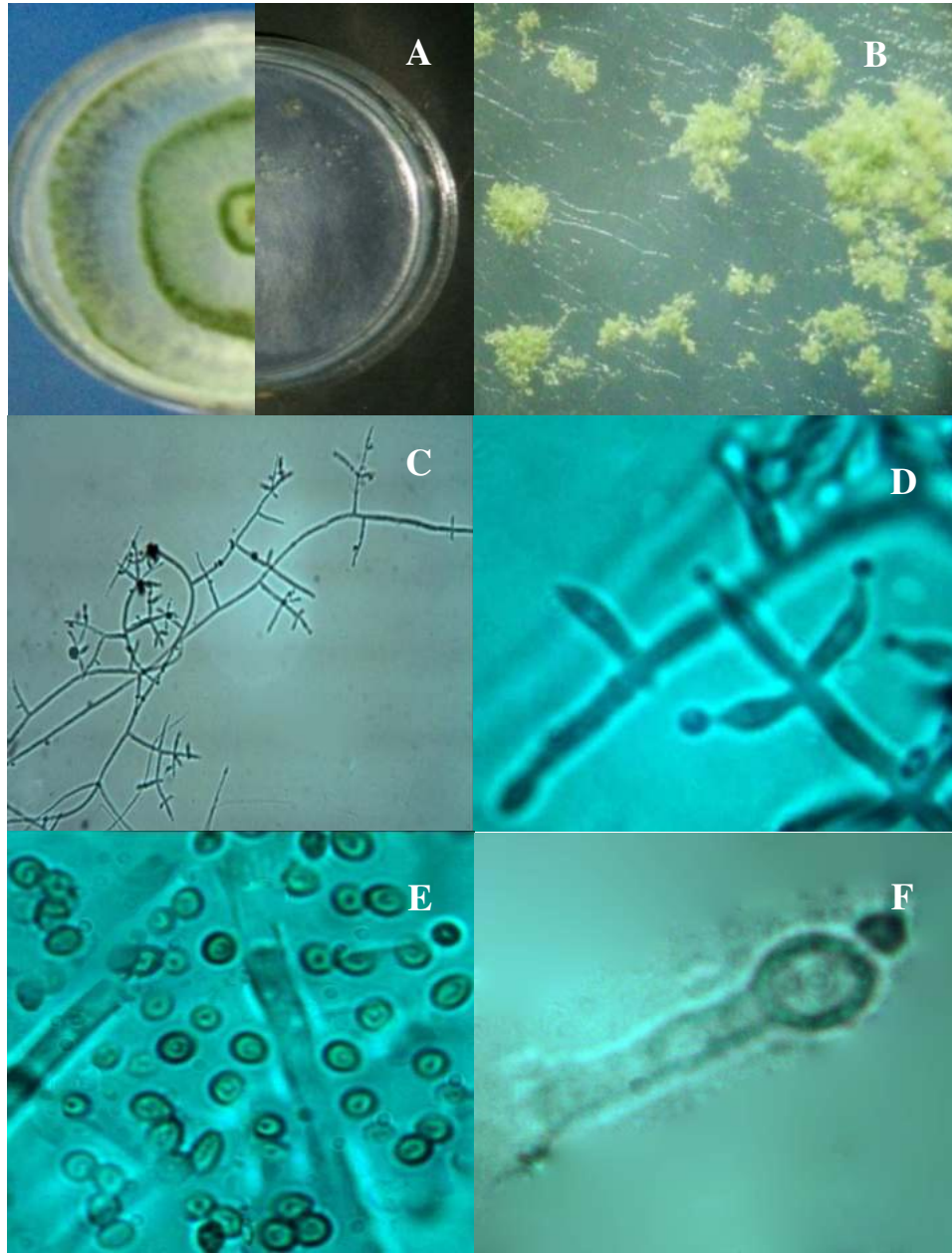


Figura 5.19. *Trichoderma viride*. (CYC14). **A-** Crecimiento de la colonia a 26 °C en medio APG y SNA. **B-** Pustulas en medio SNA. **C** Conidioforo (25X). **D-** Fialides pareadas y solitarias. **E-** Conidios. **F-** Clamidospora. **D-E-F:** 100X

5.3.2. Caracterización Molecular de dos cepas altamente tolerantes a petróleo crudo.

5.3.2.1. Extracción y cuantificación del ADN.

A través del método CTAB de Doyle (1987) modificado por Bornet & Branchard (2001) se aisló el ADN de 8 cepas altamente tolerantes a petróleo crudo, que correspondieron a 5 cepas del Yacimiento Caimancito y 3 de Maimara (Fig. 5.20).

Los productos obtenidos con los iniciadores universales ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990) amplificaron una región conservada aproximada de 500 a 550 pb de una cepa del Yacimiento Caimancito (CYC01) y una cepa de Maimara (CQM05). Figura 5.21 (ANEXO 2).

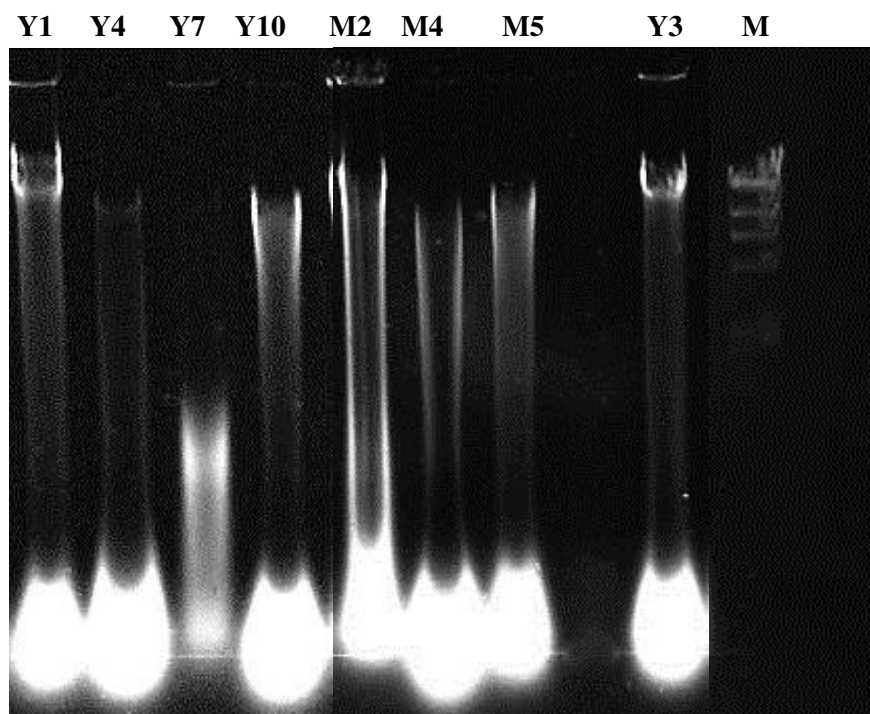


Figura 5.20. Visualización del ADN por electroforesis en gel de agarosa al 0.7 % obtenido de cepas de *Trichoderma* altamente tolerantes a petróleo crudo en transiluminador con software GenSnap de Syngene Laboratories (Cambridge, United Kingdom). Carril 1 al 9 muestras del ADN de aislamientos fúngicos; Carril 9: (M) Marcador Molecular Lambda DNA/HindIII (Inbio Highway®).

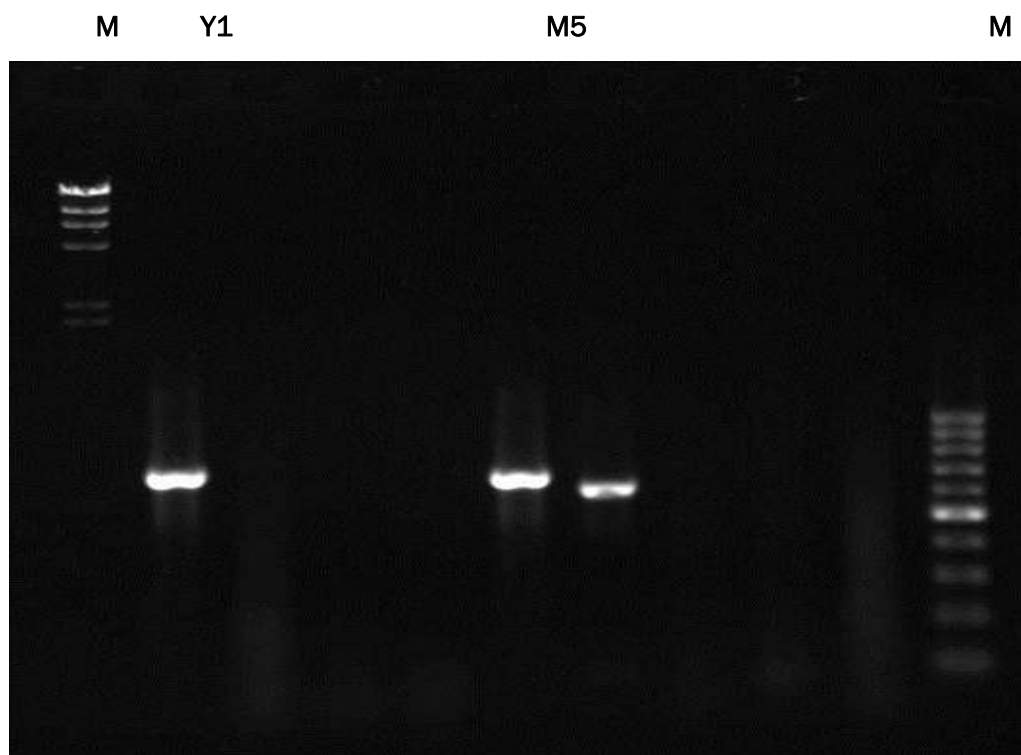


Figura 5.21. Productos de la PCR amplificados con primers ITS4 e ITS5. Carril 1 y 11: Marcador Molecular (M) Lambda DNA/HindIII (Inbio Highway®). Carril 1 al 9: Amplificación de los aislamientos de ADN de *Trichoderma*. Carril 2: *CYC01*; Carril 6: y 7: *CQM05*.

5.3.2.2. Purificación y secuenciación de las cepas de *Trichoderma* seleccionadas

Los amplicones de las cepas *CYC01* y *CQM05* obtenidas, secuenciadas y editadas mostraron una homología mayor al 90% al ser analizadas con la base de datos del GenBank mediante la herramienta BLAST.

En el caso de la cepa *CYC01* aislada del Yacimiento Caimancito presenta una homología del 99% con secuencias reportadas para la especie *Trichoderma andinensis/Hypocrea andinensis* para BLAST pero con una fiabilidad baja con la herramienta *TrichOKEY*. La cepa *CQM05* aislada de la Localidad de Maimara presenta una homología del 99% para la secuencia de la especie *Hypocrea lixii/Trichoderma harzianum* al ser analizadas con BLAST y una fiabilidad alta con *TrichOKEY*. En la tabla se presentan estos resultados, así como la afinidad morfológica realizada para cada cepa.

Tabla 5.2. Afinidad Taxonómica, homología genealógica (GenBank) y fiabilidad (*TrichOKEY*) de las dos cepas analizadas molecularmente.

Cepa	Afinidad Morfológica	Homología Genética	Acceso	Identidad	Fiabilidad
CYC01	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	<i>Trichoderma</i>	KT278891.1	99 %	Alta
		<i>andinensis/Hypocrea andinensis</i>			
CQM05	<i>Trichoderma atroviride</i>	<i>Hypocrea</i>	HQ248196.1	99 %	Baja
		<i>lixii/Trichoderma harzianum</i>			

5.4. Discusión

La taxonomía del genero *Trichoderma* representa un desafío para la sistemática. Con estos resultados se pasó por las tres fases de la sistemática del genero *Trichoderma* tal como lo expresa Samuels & Prakash (2015). La primera fase con la descripción original de Person 1794 y la segunda con los conceptos de especies agregas y secciones han facilitado el reconocimiento y la separación de las cepas analizadas en este trabajo, basándose en sus características fenotípicas y la ramificación de sus conidióforos (Rifai 1969; Bissett 1984, 1991a, 1991b, 1991c y 1992; Gams & Bisset, 1998).

La caracterización morfológica de las 19 cepas dependió de su estado anamórfico resaltando que los taxones del genero *Trichoderma* presentan caracteres convergentes (homoplasias morfológicas y fenotípicas) que dificultan su identificación y la posibilidad de diferenciarlas unas de otras (Kubicek & Harman, 1998, Druzhinina & Kubicek, 2005; Samuels 1996 y 2006; Samuels *et. al.*, 2006ab).

A partir de estos estudios se pudo determinar que la temperatura óptima de crecimiento de las cepas entre los 26 a 30 °C corresponden a la sección *Trichoderma* y *Pachybasium*, 26 a 35 °C a las especies de la sección *Longibrachiatum* con algunas hasta los 40°C. Este carácter contribuye para determinar una clasificación probable en cuanto a la sección y que coinciden con los informados por Chaverri & Samuels, (2003), Samuels *et al.*, (2006a).

De las 8 cepas de la sección *Trichoderma*, 4 cepas: *CQM03*, *CQM04*, *CQM05* y *CYC09* fueron identificadas como *Trichoderma atroviride*. Presentaron características similares a

Trichoderma harzianum, sin embargo la presencia de un olor dulce en el cultivo, conidios verdes oscuros y una gran producción de clamidosporas permitió diferenciarlas (Bissett, 1991a; Samuels & Prakash, 2015).

La cepa *CYC14* tuvo afinidad con la especie *Trichoderma viride*. Esta cepa tuvo un crecimiento lento, sin olor y pigmentación. El patrón de ramificación es muy variable ya que sus conidióforos son más del tipo *Longibrachiatum* pero en algunas observaciones microscópicas mostro un aspecto piramidal. Tanto las mediciones de fialides y conidios son similares a los reportadas por Samuels & Prakash (2015) y la características distintiva de esta especie y el ejemplar analizado mostro fialides solitarias con conidios grandes y subglobosos. Sin embargo la ornamentación verrugosa no fue posible de observar (Bissett, 1991a).

Se identificaron 6 cepas para la sección *Longibrachiatum*. Las cepas *CYC02*, *CYC05* y *CYC08* fueron identificadas como *Trichoderma citrinoviride* por su rápido crecimiento a temperaturas entre los 26 a 40 °C. Los caracteres distinguibles que presentaron estas cepas fueron la pigmentación amarilla sobre el medio de cultivo, las fialides solitarias con disposición irregular sobre los ejes primarios y secundarios y las fialides intercalares no fueron habituales (Bissett 1984; Gams & Meyer 1998).

Las cepas *CYC01*, *CYC06* y *CYC07* morfológicamente se asemejaron a *Trichoderma longibrachiatum*. Las tres cepas presentaron un desarrollo rápido entre los 26 a 35 °C y no hubo pigmentación del medio de cultivo. Morfológicamente sus conidióforos no están extensamente ramificados, presentan fialides solitarias y fialides intercalares (Bissett 1984). Estas 3 cepas presentaron características similares a *Trichoderma ressei*, pero la presencia de fialides sinuosas o en gancho fue la característica que reforzó su identificación (Gams & Meyer, 1998).

Las cepas *CQM01*, *CQM02*, *CYC10* y *CYC12* sección *Pachybasium* desarrollaron colonias de crecimiento rápido. Tanto el aspecto de las colonias, como el patrón de ramificación piramidal de sus conidióforos y la ausencia de pelos estériles mostraron afinidad con la especie *Trichoderma harzianum*. Los conidios son pequeños, subglobosos y la relación long/ancho es menor a 1.2 μm siendo la característica más importante para la identificación de esta especie (Bissett, 1991b; Samuels & Prakash, 2015).

La cepa *CYC11* de la misma sección tuvo afinidad con la especie *Trichoderma virens* por el gran tamaño de sus conidios y el patrón de ramificación de los conidióforos que es de tipo *Gliocladium* con grupos de 4 a 5 fialides apiladas en la punta de las ramificaciones. Se observan sobre el micelio gotas de líquido transparente sobre los cultivos (Bissett, 1991b; Chaverri & Samuels, 2002).

Las 3 cepas que no pudieron ser identificadas fueron: *CYC03*, *CYC04* y *CYC13*. La ausencia de olor en las colonias, la estructura piramidal de sus conidióforos, las fialides ampuliformes y la relación long/ancho menor a 1.2 μm de sus conidios las aproximo al clado Harzianum. Sin embargo, en el caso de la cepa *CYC13* la presencia de gotas de líquido transparente sobre el micelio es una característica determinante que distingue a *Trichoderma virens*, clado Virens (Bissett 1991b; Chaverri & Samuels 2002).

La identificación molecular de las cepas *CYC01* y *CQM05* constituyó la tercera etapa de la taxonomía de *Trichoderma* (Chaverri & Samuels, 2002; Druzhinina *et al.*, 2006). Las dos cepas mostraron una homología del 95 % al ser comparadas con las secuencias del GenBank pero con una fidelidad baja para *CQM05* y alta para *CYC01* con las secuencias específicas de ITS en TrichOKEY, siendo las más confiable para su identificación (Druzhinina *et al* 2012; Kullnig-Gradinger *et al.*, 2002).

La cepa *CQM05* fue aislada del suelo en su estado anamórfico y el análisis de las secuencias indican que *Hypocrea lixii* es el estado teleomorfo de *Trichoderma harzianum*. Esta conexión fue propuesta por Chaverri & Samuell (2002) al obtener cepas morfológicamente idénticas a *Trichoderma harzianum* a partir de ascosporas de *Hipocrea lixii* en cultivos puros, incluso la secuencias de ADN analizadas por Chaverri *et al.* (2003) son idénticas, siendo por lo tanto la misma especie.

La cepa *CYC01* fue identificada como *Trichoderma andinensis/Hypocrea andinensis*. Según Druzhinina *et al.* (2012) y Samuels *et al.* (2012) la consideran como una nueva especie y que responde a una línea evolutiva independiente dentro del clado *Longibrachiatum*. Además postulan que probablemente se tratara de un complejo de especies y que se requiere de un mayor número de aislamientos proveniente de Sudamérica para el análisis taxonómico de esta especie.

Estos análisis demuestran que las diferencias entre una especie y otra no pueden ser identificadas solamente con características morfológicas por la gran variabilidad intra e

interespecifica (Rifai 1969; Bissett, 1991a) y que con el uso de herramientas moleculares se posibilito analizar múltiples genes para reconocer las especies que actualmente se clasifican en clados (Samuels *et al.*, 2015).

5.5. Conclusión

En el presente capítulo ha permitido agrupar a las 19 cepas de *Trichoderma* en secciones teniendo en cuenta los patrones de ramificación de los conidióforos con claves que siguen aplicándose en la actualidad.

La aproximación en la identificación morfológica de las cepas en algunos casos no fue consistente con las características descritas por otros autores y se debe a que presentan caracteres convergentes que dificultan su identificación.

La aplicación de técnicas moleculares permitió identificar dos de las especies para complementar las limitaciones de la caracterización morfológica.

Ninguno de los métodos es excluyente del otro en la taxonomía del género *Trichoderma*.

Bibliografía

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
- Bisby, G. R. 1939. *Trichoderma viride* Pers. ex Fries, and notes on *Hypocrea*. *Transactions of the British Mycological Society* 23: 149-168.
- Bissett, J., (1984). A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. *Can J Bot.* 62, 924-931.
- Bissett, J. (1991a). A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Can J Bot.* 69, 2357-2372.
- Bissett, J. (1991b). A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. *Can J Bot.* 69, 2372-2417.
- Bissett, J. (1991c). A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes of section *Longibrachiatum*. *Can J Bot.* 69, 2418-2420.
- Bissett, J. (1992). *Trichoderma atroviride*. *Can J Bot.* 70, 639-641.

-
- Bornet, B., & Branchard, M. (2001). Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant molecular biology reporter*, 19(3), 209-215.
 - Chaverri, P., & Samuels, G. J. (2002). *Hypocrea lixii*, the teleomorph of *Trichoderma harzianum*. *Mycological Progress*, 1(3), 283-286.
 - Chaverri, P., Castlebury, L. A., Samuels, G. J., & Geiser, D. M. (2003). Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex. *Molecular phylogenetics and evolution*, 27(2), 302-313.
 - Chaverri, P., Castlebury, L.A., Overton, B.E., Samuels, G.J. (2003). *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophores elongations and green conidia. *Mycologia*. 95, 1100-1140.
 - Doit, Y., Abe, Y. & Sugyama, J. (1987). *Trichoderma* sect. *Saturnisporum*, sect. nov. and *Trichoderma ghanense*, sp. nov. *Bull Nat Sci Museum, Ser B (Botany)*. 12, 1-9.
 - Doi Y. (1972). Revision of the Hypocreales with cultural observations IV. The genus *Hypocrea* and its allies in Japan. Enumeration of the species. *Bulletion of the National Science Museum, Tokyo* 15:649-751.
 - Doyle, J. J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem bull*, 19, 11-15.
 - Druzhinina, I., & Kubicek, C. P. (2005). Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 6(2), 100.
 - Druzhinina, I.S., Kopchinskiy, A.G., Kubicek, C.P. (2006). The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience*. 47, 55-64.
 - Druzhinina IS, KomoÅ,,-Zelazowska M, Ismaiel A, Jaklitsch W, Mullaw Tl. (2012). Molecular phylogeny and species delimitation in the section *Longibrachiatum* of *Trichoderma*. *Fungal Genet Biol* 49: 358-368.
 - Fries, E. M. (1825). *Systema Orbis Vegetabilis* Vol. 1. *Typographia Academica, Lund*.
 - Gams, W., Meyer, W. (1998). What exactly is *Trichoderma harzianum* Rifai? *Mycologia*.90, 904-915.

- Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. (1999); 41: 95–98.
- Kubicek, C. P., & Harman, G. E. (1998). *Trichoderma and Gliocladium. Volume 1: Basic biology, taxonomy and genetics*. Taylor & Francis Ltd.
- Kubicek, C.P., Bissett, J., Druzhinina, I., Kullnig-Gradinger, C.M., Szakacs, G. (2003). Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South East Asian isolates. *Fungal Genet Biol.* 38, 310-319.
- Kullnig-Gradinger, C. M., Szakacs, G., & Kubicek, C. P. (2002). Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycological Research*, 106(07), 757-767.
- Persson, C. H. (1974). Neuer Versuch einer Systematischen Eintheilung der Schwämme. *Neues Mag. Bot.* 1:63-80.
- Rifai, M. (1969). A revision of the genus *Trichoderma* (1 edition). Commonwealth *Mycological Institute*. ISBN 0851990002, Kew, Surrey. England.
- Samuels, G.J., Chaverri, P., Farr, D.F., & McCray, E.B. *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved November 29, 2016, from /taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm
- Samuels, G. J. (1996). *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycological Research*, 100(8), 923-935.
- Samuels, G. J., Dodd, S. L., Lu, B. S., Petrini, O., Schroers, H. J., & Druzhinina, I. S. (2006). The *Trichoderma koningii* aggregate species. *Studies in Mycology*, 56, 67-133.
- Samuels, G. (2006a). *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*. Vol. 96, No. 2, (October 2005), pp. 195–206, ISSN 0031-949X.
- Samuels, G. J., Ismaiel, A., Mulaw, T. B., Szakacs, G., Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P., & Jaklitsch, W. M. (2012). The Longibrachiatum clade of *Trichoderma*: a revision with new species. *Fungal diversity*, 55(1), 77-108.
- Samuels, G. L. H., Prakash, K., Arango, U., MauricioMartínez, L., Bustillo, P., de Waard, J. R. H., & Drenth, A. (2015). *Trichoderma: identification and agricultural applications* (No. LC-0862). Drenth, André Guest, David.

- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463-5467.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.

CAPITULO VI

Tolerancia de cepas de *Trichoderma* a petróleo crudo.

Resumen

En el presente capítulo se evaluó el comportamiento de 19 cepas de *Trichoderma* aisladas de suelos contaminados del Yacimiento Caimancito y de suelos testigo sin contaminante de Maimara. Las cepas se sembraron por triplicado en cajas de Petri de 9 cm de diámetro con medio APG 2 % e impregnadas con 1 ml de petróleo crudo sobre su superficie durante 7 días a 26 ± 1 °C. El petróleo crudo fue analizado por GC-MS identificando sus componentes. De cada cepa se midió la velocidad de crecimiento (cm.dia^{-1}), el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (% FI), la velocidad de crecimiento, la producción de esporas (Conidios/ml) y viabilidad (% de Germinación). Las cepas se caracterizaron según la siguiente escala de tolerancia: % FI mayor a 9 = No Tolerante; % FI de 1 a 9 = Moderadamente Tolerante; % FI de 0 a 1 = Tolerante y % FI menores a 0 = Altamente Tolerante. Las 19 cepas de *Trichoderma* aisladas mostraron diferencias en el crecimiento micelial al ser expuestas a petróleo crudo ($p < 0,0391$), siendo algunas más tolerantes que otras, en base a una escala de intervalo. Se consideraron altamente tolerantes (AT) las cepas *CYC04*, *CYC07*, *CYC10*, *CYC01*, *CYC03*, *CQM04*, *CQM02* y *CQM05*; tolerantes (T): *CYC14*, *CYC13* y *CYC11*, moderadamente tolerantes (MT): *CYC06*, *CYC12*, *CYC05* y *CYC08* y no tolerantes (NT): *CYC09*, *CYC02*, *CQM03*, *CQM01*. Las (AT) *CQM04*, *CQM05*, *CYC01*, *CYC03* y *CYC10* no mostraron diferencias significativas con el testigo en cuanto a la velocidad de crecimiento. La velocidad de crecimiento de las cepas (T) y (MT) fue menor a su testigo. El comportamiento de las cepas (NT) fue errático: *CQM03* no presentó diferencias significativas, mientras que *CYC09*, *CQM01* y *CYC02* si tuvieron diferencias significativas con respecto a su testigo, siendo *CYC02* la más inhibida. El recuento de conidios por colonia tuvo diferencias significativas ($p < 0,0001$) al 7 día de crecimiento entre las cepas. Independientemente de su categoría y del sitio de aislamiento 10 cepas no presentaron diferencias en el nivel de esporulación con sus testigos (*CQM04*, *CQM05*, *CYC02*, *CYC03*, *CYC04*, *CYC06*, *CYC07*, *CYC08*, *CYC09* y *CYC14*) frente al petróleo crudo, siendo la *CYC14* la de mayor esporulación. No se observó diferencias significativas ($p < 0,0001$) en cuanto al porcentaje de germinación de conidios de 16 cepas con respecto a sus testigos. Independientemente de su categoría y sitio solo la cepa *CYC04*

tuvo un porcentaje menor a su testigo, mientras que las cepas *CYC03* y *CQM05* presentaron porcentajes de germinación mayores sobre petróleo crudo. La cepa *CYC09* tuvo del porcentaje de germinación mayor entre las tratadas (64 %). Este capítulo representa un avance sobre el estudio de la tolerancia de cepas de *Trichoderma* autóctonas aisladas de ambientes contaminados y no contaminados con crudo.

Palabras claves: Yacimiento Caimancito, Maimara, *Trichoderma*, Petróleo crudo, Tolerancia.

Tolerance of *Trichoderma* strains to crude oil.

Abstract

The present investigation assessed the behavior of 19 strains of *Trichoderma* isolated from contaminated soils of Caimancito site, and of witness non-contaminated of Maimará. Strains were seeded in triplicate in 9 cm diameter Petri dishes with 2% APG medium and impregnated with 1 ml of crude oil on their surface for 7 days at 26 ± 1 ° C. The crude oil was analyzed by GC-MS identifying their components. From each strain the velocity growth ($\text{cm}\cdot\text{day}^{-1}$), the spores production (Conidia/ml) and viability (% Germination) were measured. The strains were characterized according the following scale of tolerance: % FI greater than 9 = non-tolerant; % FI from 1 to 9= moderately tolerant; % FI from 0 to 1= tolerant and % FI less than 0= highly tolerant. The 19 strains of isolated *Trichoderma*, showed differences in the mycelial growth while they were exposed to crude oil ($p < 0,0391$), being some more tolerant than others based on an interval scale: *CYC04*, *CYC07*, *CYC10*, *CYC01*, *CYC03*, *CQM04*, *CQM02* and *CQM05* strains were considered highly tolerant (AT). The *CYC14*, *CYC13* and *CYC11* strains tolerant (T). The *CYC06*, *CYC12*, *CYC05* and *CYC08* strains moderately tolerant (MT). The *CYC09*, *CYC02*, *CQM03*, *CQM01* strains non-tolerant (NT). The (AT) *CQM04*, *CQM05*, *CYC01*, *CYC03* and *CYC10* strains, did not show significant differences with the witness as to the velocity growth. The velocity growth of the (T) and (MT) strains was less to their witness. The behavior of (NT) strains was erratic: *CQM03* didn't present significant differences, while *CYC09*, *CQM01* and *CYC02* did have significant differences respect to their witness, being *CYC02* the most inhibited strains. The recount of conidia by colony showed significant differences ($p < 0,0001$) at 7 day of growing between the strains. Independently from their category and the isolated site or place, 10 strains didn't present differences in sporulation level with their witness (*CQM04*, *CQM05*, *CYC02*, *CYC03*, *CYC04*, *CYC06*, *CYC07*, *CYC08*, *CYC09*, and *CYC14*) against crude oil, being *CYC14* strain the strain which has got the higher level of sporulation. There were no significant differences ($p < 0,0001$) in the percentage of conidia germination of 16 strains with respect to their controls. Independently from its category and site, only the *CYC04* strain had a lower percentage than their control, while *CYC03* and *CQM05* presented higher germination percentages over crude oil. The *CYC09* strain had the higher percentage between the others treated (64%). This chapter

represents an advantage on the studies of the tolerance of *Trichoderma* strains isolated from contaminated environments and non-contaminated environments with crude.

Key words: Caimancito site, Maimara, *Trichoderma*, oil crude, Tolerance.

6.1. Introducción

El petróleo crudo es una mezcla heterogénea de compuestos orgánicos que se produce de manera natural en la Tierra. Sus componentes básicos son carbono e hidrogeno junto a otros en menor proporción como el oxígeno, nitrógeno, azufre y metales integrados. La composición y la proporción de los componentes del crudo puede variar según su origen pero se puede dividir en cuatro clases: 1) saturados, 2) aromáticos, 3) resinas y 4) asfaltenos (Head *et al.*, 2006; Lea

hy & Colwell, 1990). De estas fracciones los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HPA) conforman el 20% del total de hidrocarburos y es la más tóxica para los organismos con efectos mutagénicos, teratogénicos y carcinógenos (Patel *et al.*, 2012; Henkler *et al.*, 2012). Los sitios contaminados con HPA u otros componentes del petróleo plantean un gran problema ambiental (Ros *et al.*, 2010).

Cuando un suelo recibe un derrame cambia sus características físicas, químicas y biológicas. Desde el punto de vista químico, la principal modificación consiste en un incremento del contenido de carbono (C). Este aporte de C altera la relación C:N:P en el suelo (Días, 2012).

En los lugares afectados se unen a las partículas del suelo dependiendo del tipo, contenido de materia orgánica, composición y estructura del contaminante (Tsi bart & Gennadiev, 2013). Esta adsorción llevada a cabo por la fase solida gobierna su movilidad y biodisponibilidad de C para los microorganismos, sobreviviendo aquellos más tolerantes (Bastiaens *et al.*, 2000; Abdel-Shafy & Mansour, 2015).

La biorremediación *in situ* usa microorganismos autóctonos que pueden tolerar y degradar contaminantes orgánicos, pero su eficacia puede ser afectada cuando alguno de los contaminantes se encuentra en elevadas concentraciones (Ander & Mesner, 1998). El uso de bacterias principalmente se debe a que sus vías metabólicas son fáciles de estudiar y de llevar a cabo construcciones genéticas que permiten degradar específicamente determinados contaminantes del petróleo crudo. Se destacan el género *Pseudomona*, *Azoarcus*, *Geobacter*, *Desulfobacterium* y *Metanospinilum* (Widdel & Rabus, 2001), *Pseudomonas plecoglossicida* en la degradación de naftaleno y *Pseudomonas aeruginosa* en la biodegradación de petróleo (Parrellada *et al.*, 2012).

Otra alternativa es la micorremediación como mecanismo de saneamiento de sitios contaminados con hidrocarburos que se centra fundamentalmente en aquellas especies de hongos capaces de adaptarse y crecer en presencia de estos compuestos tóxicos y recalcitrantes. Las especies fúngicas que se han aplicado con éxito son *Cunninghamella elegans* y *Phanerochaete chrysosporium* demostrando su capacidad de degradación de hidrocarburos (Martínez *et al.*, 2012; Cerniglia & Yang, 1984; Bumpus, 1989; Sutherland *et al.*, 1991; Pothuluri *et al.*, 1992; Cerniglia *et al.*, 1994; Moen & Hammel, 1994).

Si bien la mayoría de los géneros de hongos aislados de suelos y aguas contaminados con petróleo crudo corresponden a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, otros microorganismos capaces de tolerar y utilizar los hidrocarburos como fuente de energía pueden considerarse como potenciales para el tratamiento de suelos contaminados (Colombo *et al.*, 1996).

Las especies del género *Trichoderma* son hongos filamentosos clasificados como *Ascomycetes*, muy abundantes en diferentes ecosistemas, sean ambientes antropizados (agrícolas), naturales (bosques, selvas y desiertos) y acuáticos (Harman *et al.*, 2004). Sus necesidades metabólicas son simples y se adaptan fácilmente a condiciones adversas (temperatura, pH, humedad y salinidad) (Widden & Scattolin 1988, Jackson *et al.*, 1991), siendo favorecido su crecimiento por presencia de materia orgánica y humedad. La temperatura óptima de crecimiento es entre los 25 a 30 °C (Papavizas, 1985).

El género *Trichoderma* además de ser aplicado como antagonista de hongos fitopatógenos de programas de control biológico, ha mostrado su capacidad de crecer en presencia de contaminantes orgánicos (hidrocarburos, explosivos, agroquímicos) e inorgánicos (metales pesados y cianuro) (Argumedo *et al.*, 2009) demostrando su potencial como microorganismo biorremediador.

Radwan *et al.* (1995) aislaron, purificaron e identificaron hongos hidrocarbonoclastas de la rizósfera y del suelo no rizosferico contaminados con petróleo crudo cultivados con maíz y comprobaron que *Trichoderma* es capaz de acumular en sus lípidos (ácidos grasos) cadenas largas (alcano) constituyente del petróleo crudo siendo capaces de metabolizarlos una vez asimilados por lo tanto el género *Trichoderma* es considerado un microorganismos hidrocarbonoclastas (Hernández-Acosta, *et al.*, 2003). Por su parte Cookson (1995)

identifico en este género la capacidad de degradación de compuestos orgánicos por el fenómeno de cometabolismo

Los registros científicos sobre la tolerancia y degradación de *Trichoderma* a hidrocarburos datan de fines del siglo XX. Los estudios de tolerancia de *Trichoderma* a petróleo crudo son escasos, pero se comprobó su adaptación cuando son expuestos a petróleo crudo e hidrocarburos aromáticos (naftaleno, fenantreno) desarrollando un crecimiento similar o superior a su testigo (Argumedo, 2011).

El género *Trichoderma*, junto a otros, han sido aislado de suelos contaminados por lo que es posible que estas especies hayan desarrollado un mecanismo de tolerancia a hidrocarburos (Pernia *et al.*, 2012). Chaîneau *et al.* (1999) reportan que especies de *Trichoderma* degradan con mayor facilidad hidrocarburos saturados en comparación con hidrocarburos poliaromáticos (HPA), lo que sugiere que la capacidad de biodegradación está sujeta a la estructura química del hidrocarburo. Especies como *Trichoderma koningii* fueron expuestas a hidrocarburos saturados (dodecano, hexadecano) y aromáticos (tolueno, bifenilo, naftaleno) donde el crecimiento micelial fue inhibido por los hidrocarburos aromáticos en mayor grado que los saturados exhibiendo su toxicidad (Hughes *et al.*, 2007). La selección de bacterias y hongos a través de pruebas sucesivas de crecimiento poblacional en cultivo puro rico en petróleo, es una estrategia eficiente para evaluar la adaptación y sobrevivencia de cepas tolerantes a concentraciones altas de petróleo. Los resultados de las pruebas en laboratorio respaldan la selección de las cepas más tolerantes y adaptadas. El éxito de las etapas subsiguientes, en invernadero y en suelos contaminados en campo, depende de la calidad de la selección y de las condiciones ambientales. De allí la importancia de generar información científica con la perspectiva de llegar a aplicarlos en procesos de biorremediación en suelos contaminados por hidrocarburos.

- El presente capítulo tuvo como objetivo evaluar en ensayos *in vitro* diferentes variables en cepas de *Trichoderma* expuestas a petróleo crudo y clasificarlas por la tolerancia al mismo.

6.2. Materiales y Métodos

6.2.1. Reactivación de cepas del genero *Trichoderma*.

Las cepas aisladas y conservadas del Yacimiento Caimancito y Maimara (**Tabla 3.4**) fueron reactivadas en medio Agar Papa Dextrosa (APG 2 %) y cultivadas a 26° C, por siete días hasta estar esporuladas.

6.2.2. Análisis de la Muestra de Petróleo Crudo del Yacimiento Caimancito.

Con acompañamiento de personal del Parque Nacional Calilegua se tomó una muestra de petróleo crudo de la planta de almacenamiento ubicada en la batería del yacimiento. La misma se acondiciono en un recipiente de vidrio hermético y cubierto para evitar la exposición a la luz del sol (según las norma IRAM-IAP A 6502 - 1*) y se remitieron al Laboratorio de Toxicología del Ministerio Publico de la Provincia de Salta para su caracterización.

6.2.3. Pruebas de Tolerancia

Para los ensayos de tolerancia se preparó el medio de cultivo Agar papa glucosado Britania (APG 2%). Se esterilizo en autoclave a 121 °C durante 15 minutos transfiriendo 10ml en cajas de petri de 9 cm de diámetro hasta gelificar en cámara de flujo laminar.

Para las pruebas se extrajeron discos individuales de cada cepa de *Trichoderma* y se colocaron en cajas de petri con medio APG 2 % impregnadas con 1 ml de petróleo crudo sobre su superficie durante 7 días a 26 ± 1 °C.

Los ensayos de tolerancia consistieron en evaluar las siguientes variables: Porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico, velocidad de crecimiento micelial y producción de conidios; en todos los casos se diseñó un ensayo completamente aleatorizado de 19 cepas con dos tratamientos (Testigo y Crudo) y tres repeticiones por tratamiento. Finalmente se determinó la viabilidad de las cepas mediante la técnica de microcultivos.

6.2.3a Porcentaje de Inhibición del crecimiento fúngico FI % a las 96 horas de incubación.

Para el cálculo de ésta variable se utilizó la siguiente fórmula: (Argumedo, 2011)

$$FG(\%) = \frac{D_{pc}}{D_c} \times 100$$

$$FI(\%) = 100 - FG$$

Donde, *FG* es el porcentaje de crecimiento fúngico, *D_{pc}* representa el diámetro de la colonia expuesta a petróleo crudo, *D_c* corresponde al diámetro del testigo y *FI* es el porcentaje de inhibición fúngica. El diámetro de cada una de las cepas estudiadas se mide con calibre pie de rey (cm).

Se estableció una escala ordinal para clasificar las cepas en categorías de tolerancia: FI % mayor a 9 = no tolerante; FI % de 1 a 9 = Moderadamente tolerantes; FI % de 0 a 1= tolerante y FI % menores a 0 altamente tolerante (crecimiento mayor al testigo, el crudo actuaría como factor promotor de crecimiento del hongo).

6.2.3b Velocidad del crecimiento micelial:

Esta variable se evaluó a partir de las 24 horas de sembradas hasta las 96 horas cada 24 horas utilizando la siguiente fórmula (Argumedo, 2011):

$$V = \frac{C}{t}$$

Donde *V* es la velocidad de crecimiento del micelio, *C* representa el diámetro de crecimiento fúngico y *t* es el tiempo de incubación.

6.2.3c Producción de conidios (conidios/ml)

Al séptimo día de incubación se realizó el recuento en cámara Neubauer. Cada repetición de los tratamientos fue raspada con una espátula transfiriendo el total de los conidios de cada colonia a un tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril. Para facilitar el recuento se realizó diluciones seriadas. Para la estimación de conidios/ml se utilizó la siguiente fórmula (French & Hebert, 1980) y el factor de dilución utilizado fue 10⁻¹.

$$N^{\circ} \text{ de Conidios/ml} = \text{Suma 5 CS} \times 50.000 \times \text{factor de dilución}$$

Donde 5 CS: 5 cuadrados principales.

6.2.3d Viabilidad: Porcentaje de germinación de conidios.

Esta variable tiene como objetivo evaluar el posible efecto de crudo sobre la viabilidad de las esporas de *Trichoderma*. Se realizaron microcultivos en portaobjetos excavados conteniendo APG 2%. Se sembró 20 μ l de las suspensiones de 10^{-1} ml de cada tratamiento con dos repeticiones. Estas se colocaron en estufa a $26^{\circ} \text{C} \pm 1$ durante 16 horas con luz. Cada microcultivo se observó en el microscopio estereoscópico, realizando el recuento de conidios germinados sobre un mínimo de 4 campos. Para el porcentaje final se tomó el promedio de cada repetición de las cepas tratadas y del testigo.

6.2.4. Análisis Estadístico

Los datos de las cuatro variables evaluadas se analizaron mediante el programa estadístico Infostat (análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Duncan, α : 0,05)).

6.3 Resultados

6.3.1. Análisis de la muestra de petróleo crudo.

El análisis de la muestra de petróleo crudo se muestra en el Anexo 3.

6.3.2. Pruebas de Tolerancia.

6.3.2a. Inhibición del crecimiento fúngico (FI %)

Ninguna cepa presentó inhibición total en su crecimiento al ser expuestas a 1 ml de petróleo crudo. Existen diferencias ($p < 0,0391$) entre las cepas de cada región y sitio, siendo algunas más tolerantes que otras. Ninguna de las cepas estudiadas tuvieron FI % (porcentaje de inhibición fúngica) mayores al 30 % señalando su buena capacidad de adaptación en condicione *in vitro* al ser expuestas a 1 ml de petróleo crudo. De acuerdo a los resultados obtenidos con la prueba de Duncan (α : 0,05) la tolerancia según FI % a las 96 horas de crecimiento se definió 8 cepas altamente tolerantes (AT), 3 tolerantes (T), 4 moderadamente tolerantes (MT) y 4 no tolerantes (NT) (**Figura 6.1**). Las cepas con valores negativos de FI % definidas como altamente tolerantes desarrollaron un mayor crecimiento micelial en los tratamientos respecto a su testigo (**Tabla 6.1**).

La **Figura 6.2** muestra el crecimiento de 4 cepas *CYC04* (AT), *CYC14* (T), *CYC12* (MT) y *CYC02* (NT) sobre el medio de cultivo impregnado con petróleo crudo, donde solo se

observaron cambios macroscópicos de la colonia, producción de micelio y esporulación que son más evidentes en los tratamientos.

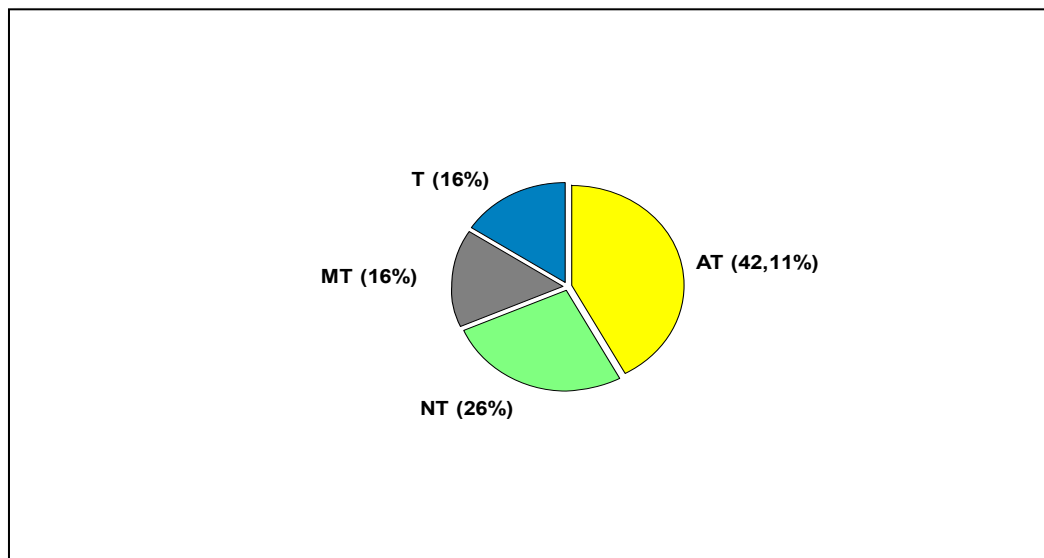


Figura 6.1. Distribución de frecuencias relativas de las cepas que presentaron las distintas categorías de tolerancia evaluadas.

Podemos observar que un gran porcentaje de las cepas se comportaron como Altamente Tolerantes (42 %), frente a las No Tolerantes (26 %) y en menor porcentaje las Tolerantes y las Moderadamente Tolerantes (16 %).

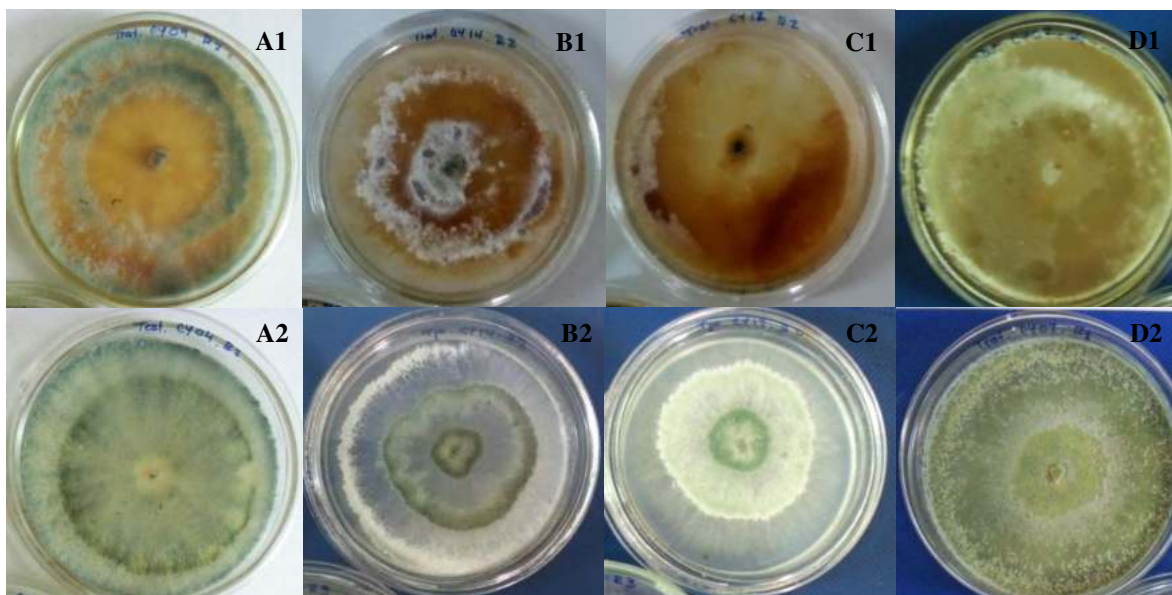


Figura 6.2. Tolerancia de cepas de *Trichoderma* en medio APG 2 % impregnados con 1 ml de petróleo crudo a las 96 hr. AT: CYC04; A1: con petróleo crudo; A2: testigo. T: CYC14; B1: con petróleo crudo; B2: testigo; MT: CYC12; C1: con petróleo crudo; C2: testigo y NT: CYC02: D1: con petróleo crudo, D2: testigo.

Tabla 6.1. Cepas de *Trichoderma* clasificadas en Categorías: altamente tolerantes (AT), tolerantes (T), moderadamente tolerantes (MT) y no tolerantes (NT). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Clase	% FI	Cepa	Sitio	
AT	> 0	CYC04	1	a
		CYC07	1	a
		CQM04	8	ab
		CYC10	4	ab
		CQM02	6	ab
		CQM05	8	ab
		CYC01	1	ab
		CYC03	1	ab
T	0 - 1	CYC14	5	ab
		CYC13	4	ab
		CYC11	4	ab
MT	1 - 9	CYC06	1	ab
		CYC12	4	ab
		CYC05	1	abc
		CYC08	2	abc
NT	< 9	CYC09	3	abc
		CQM03	6	abc
		CQM01	7	bc
		CYC02	1	c

En la **Figura 6.3** el FI % calculado a las 96 horas muestra el efecto inhibitorio del petróleo crudo entre las cepas analizadas, sin embargo ninguna fue inhibida en su crecimiento, comprobándose la tolerancia de todas ellas al ser expuestas al contaminante. Las cepas del sitio 1 (excepto *CYC02* y *CYC05*) contaminado solo con petróleo crudo fueron menos

inhibidas e indica un mayor crecimiento del hongo al ser expuestas al petróleo crudo en condiciones *in vitro* usando posiblemente al contaminante como fuente de energía.

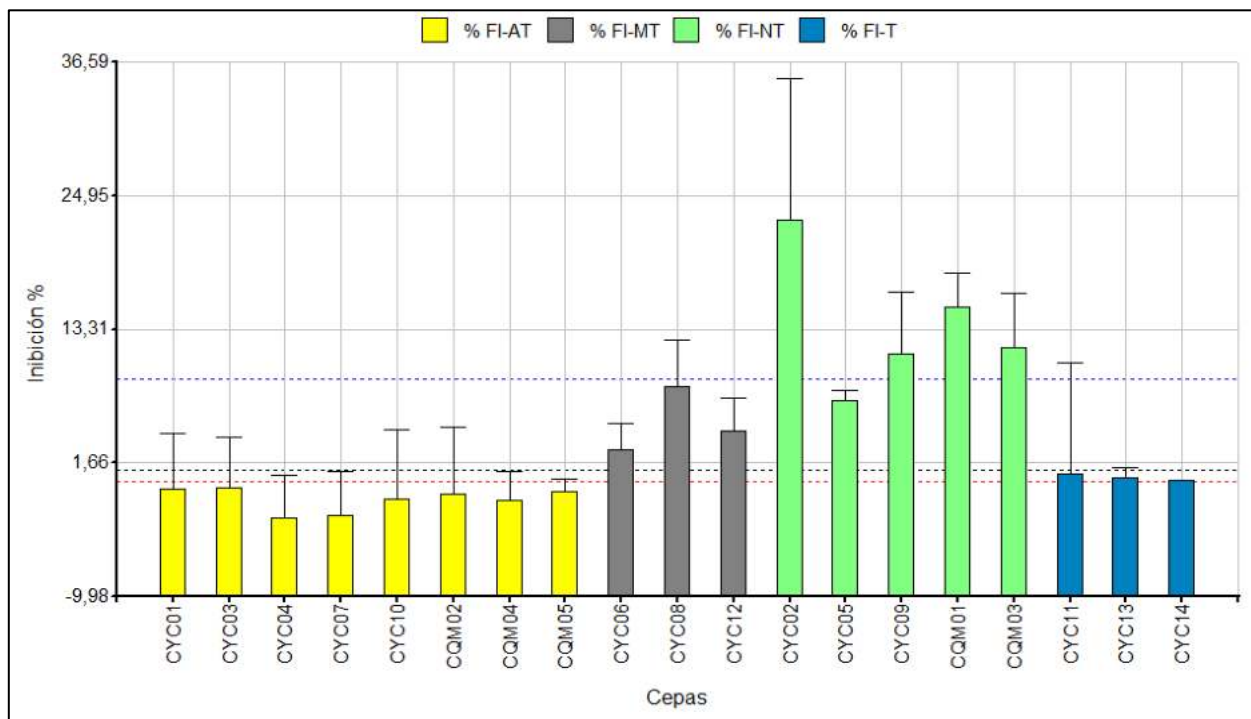


Figura 6.3. Porcentaje de Inhibición fúngica (FI %) a las 96 horas de las 19 cepas de *Trichoderma*. Las líneas de corte (puntos rojo, negro y azul) señalan los intervalos de cada categoría.

6.3.2b. Velocidad del crecimiento micelial.

En la siguiente tabla se observa la velocidad de crecimiento de las cepas tratadas con petróleo crudo (**Tabla 6.2**). Hay diferencias en la velocidad de crecimiento ($p < 0,0001$), presentando una reducción de la misma en las cepas tratadas con un promedio de 0.08 cm/día^{-1} respecto a su testigo con 0.11 cm/día^{-1} durante los 4 días de cultivo (**Figura 6.4**).

Tabla 6.2. Velocidad de Crecimiento ($p < 0,0001$) de las cepas de *Trichoderma* de suelos contaminados y no contaminados expuestas a un medio solido de APG al 2 % contaminado con 1 ml de petróleo crudo. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Cepas de <i>Trichoderma</i>	Categoría	Velocidad de crecimiento (cm.día^{-1})	
<i>CYC11</i>	<i>T</i>	0,04	a
<i>CYC09</i>	<i>NT</i>	0,05	ab
<i>CQM01</i>	<i>NT</i>	0,05	abcd
<i>CYC02</i>	<i>NT</i>	0,05	abcd
<i>CYC13</i>	<i>T</i>	0,06	abcd
<i>CQM02</i>	<i>AT</i>	0,06	bcde
<i>CYC14</i>	<i>T</i>	0,07	bcde
<i>CYC12</i>	<i>MT</i>	0,07	cde
<i>CQM03</i>	<i>NT</i>	0,07	cdef
<i>CYC08</i>	<i>MT</i>	0,08	cdef
<i>CYC06</i>	<i>MT</i>	0,08	def
<i>CYC10</i>	<i>AT</i>	0,09	efg
<i>CYC05</i>	<i>MT</i>	0,09	efg
<i>CYC07</i>	<i>AT</i>	0,09	efg
<i>CYC01</i>	<i>AT</i>	0,09	fgh
<i>CQM04</i>	<i>AT</i>	0,10	gh
<i>CQM05</i>	<i>AT</i>	0,10	gh
<i>CYC04</i>	<i>AT</i>	0,10	gh
<i>CYC03</i>	<i>AT</i>	0,11	h

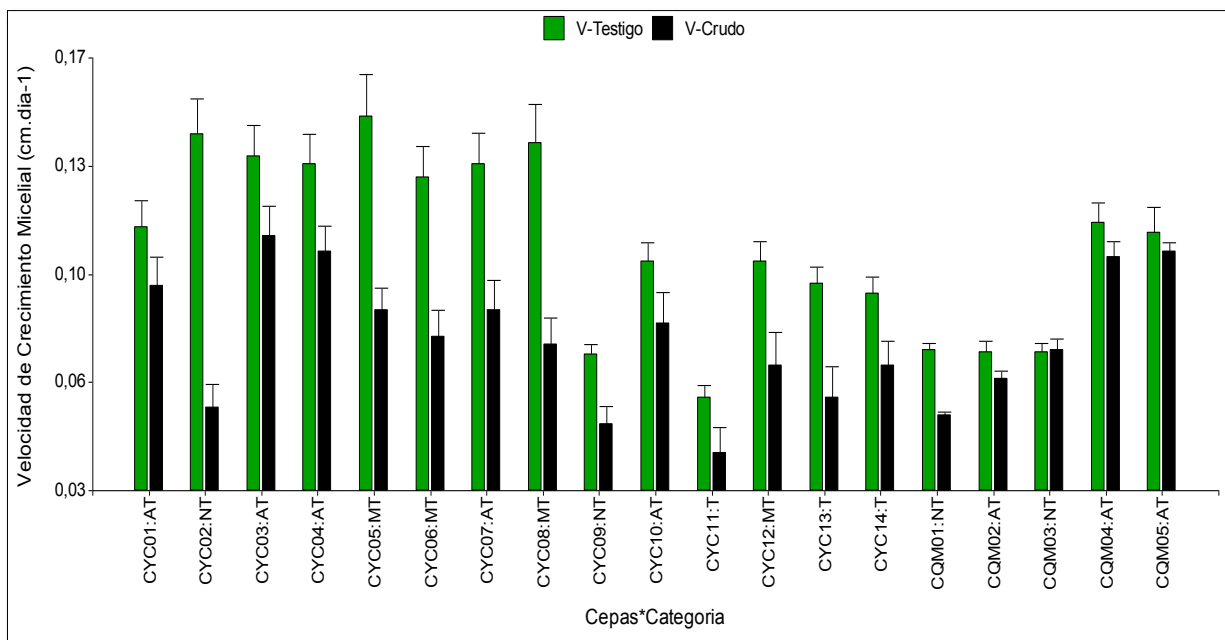


Figura 6.4. Velocidad de crecimiento micelial promedio de las 19 cepas de *Trichoderma* expuestas a 1 ml de petróleo crudo con respecto a su testigo.

Altamente Tolerantes

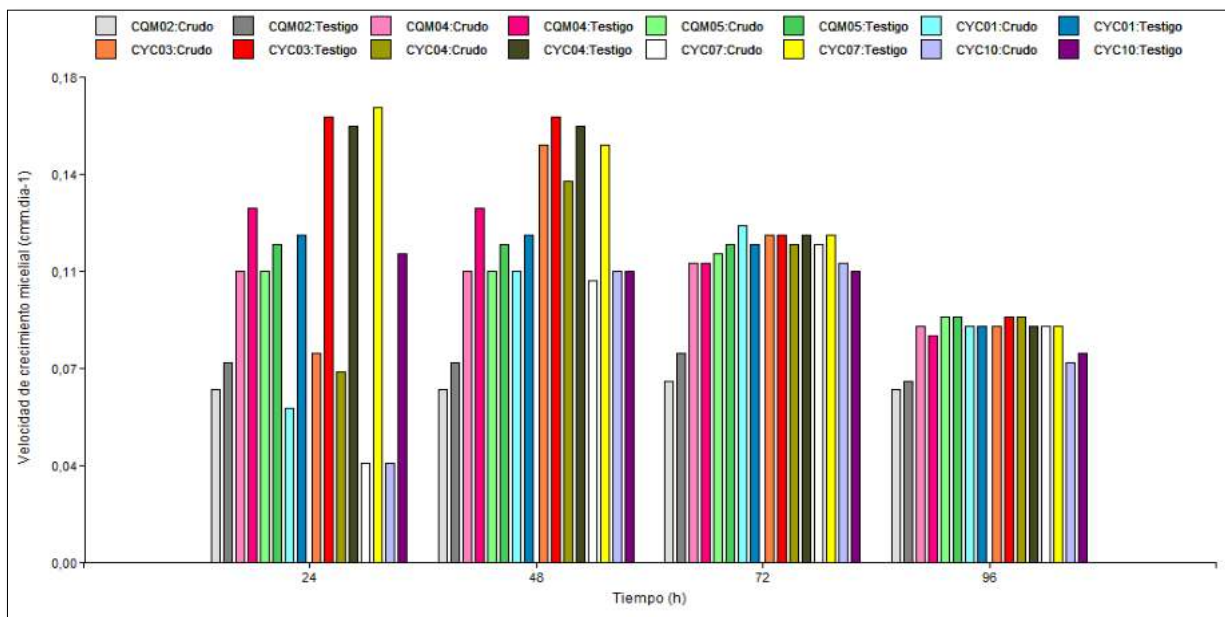


Figura 6.5. Velocidad de crecimiento micelial promedio de cada cepa de *Trichoderma* altamente tolerantes expuestas a 1 ml de petróleo crudo evaluadas a las 24, 48, 72 y 96 horas.

La cepa con mayor velocidad de crecimiento fue *CYC03* a las 24 y 48 horas, mientras que la cepa *CQM02* fue la de menor velocidad (**Figura 6.5**). La velocidad de crecimiento

muestra un comportamiento similar con una colonización rápida de la superficie a las 72 horas de cultivo coincidiendo o superando el diámetro a su testigo (**Figura 6.6**).

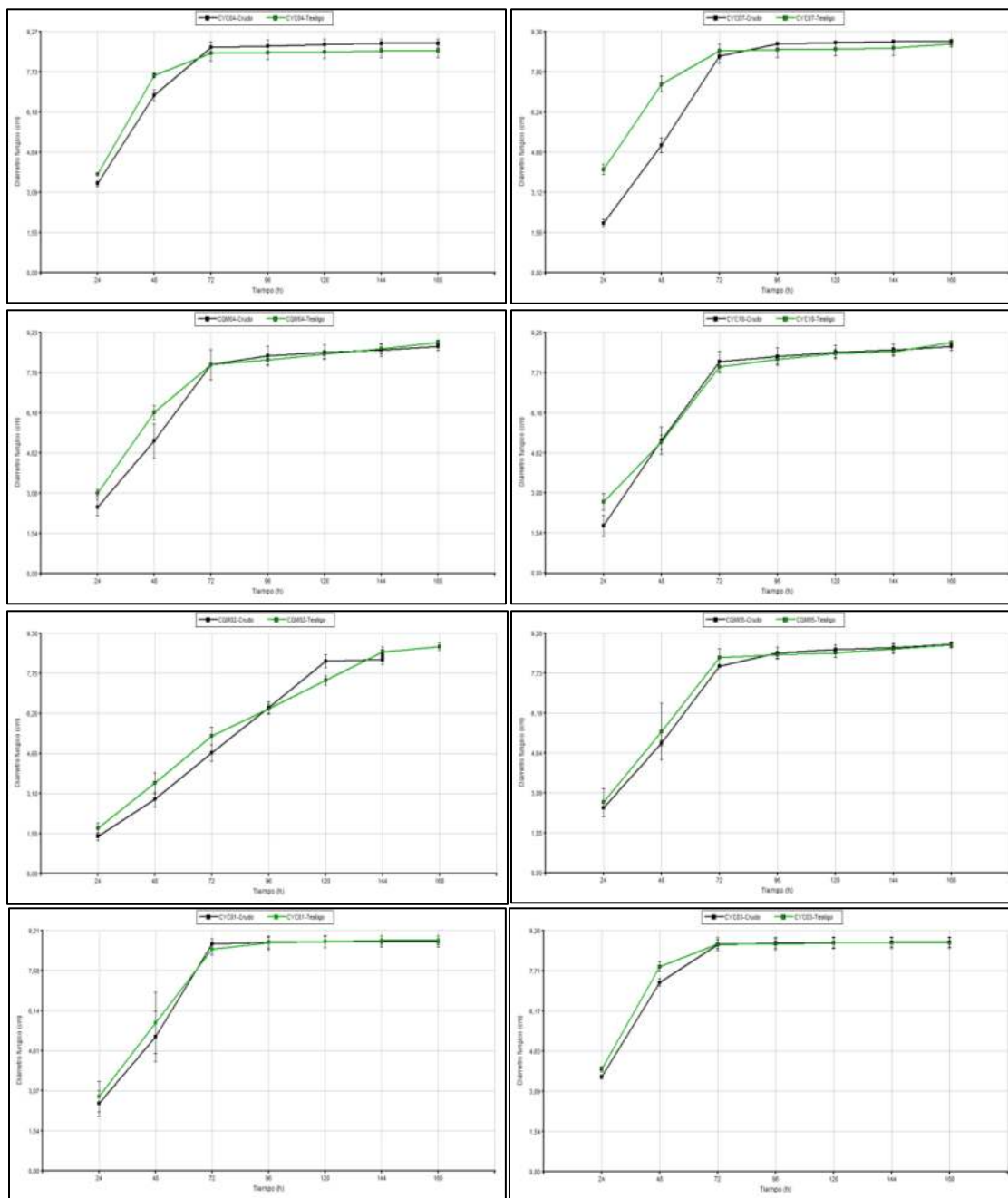


Figura 6.6. Dinámica de crecimiento de ocho cepas fúngicas de *Trichoderma* altamente tolerantes: *CYC04*, *CYC07*, *CQM04*, *CYC10*, *CQM02*, *CQM05*, *CYC01* y *CYC03* expuestas a un medio sólido de APG 2 % contaminado con 1 ml de petróleo crudo. Simbología en color: Verde = Testigo; Negro = Tratamiento.

Tolerantes.

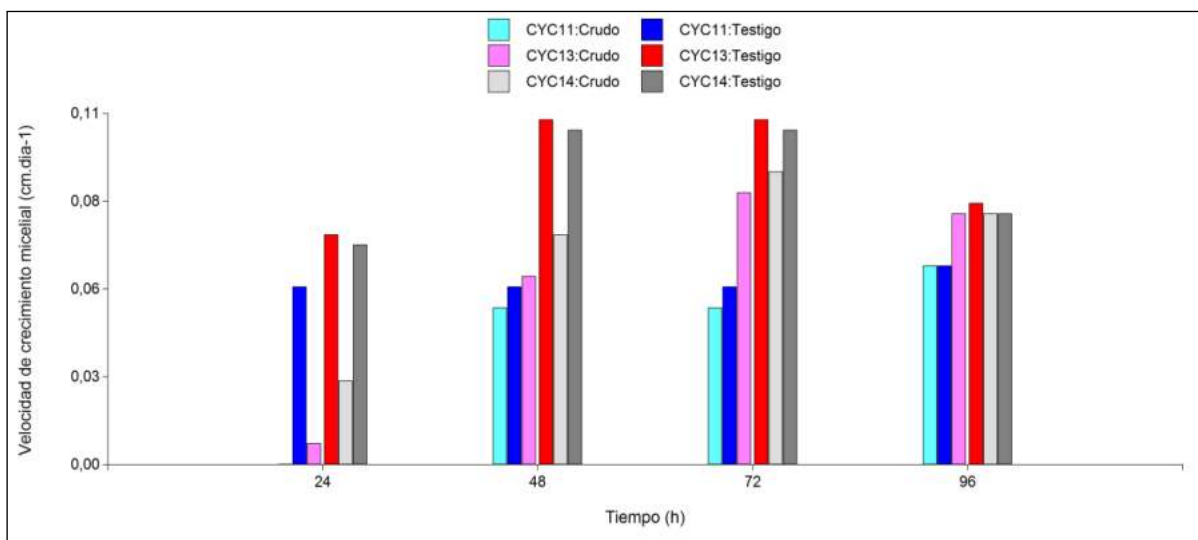


Figura 6.7. Velocidad de crecimiento micelial de cepas de *Trichoderma* tolerantes expuestas a 1 ml de petróleo crudo evaluadas a las 24, 48, 72 y 96 horas.

En la **Figura 6.7** se observa que la velocidad de los testigos es mayor a las 24, 48 y 72 horas. La *CYC14* fue la de mayor velocidad de crecimiento a las 24, 48 y 72 horas seguida de *CYC13*. La cepa más afectada y con menor velocidad fue *CYC11* con una velocidad promedio de 0.04 cm.día^{-1} e inicialmente nula a las 24 horas. Todas mostraron una dinámica de crecimiento menor a su testigo **Figura (6.8)**.

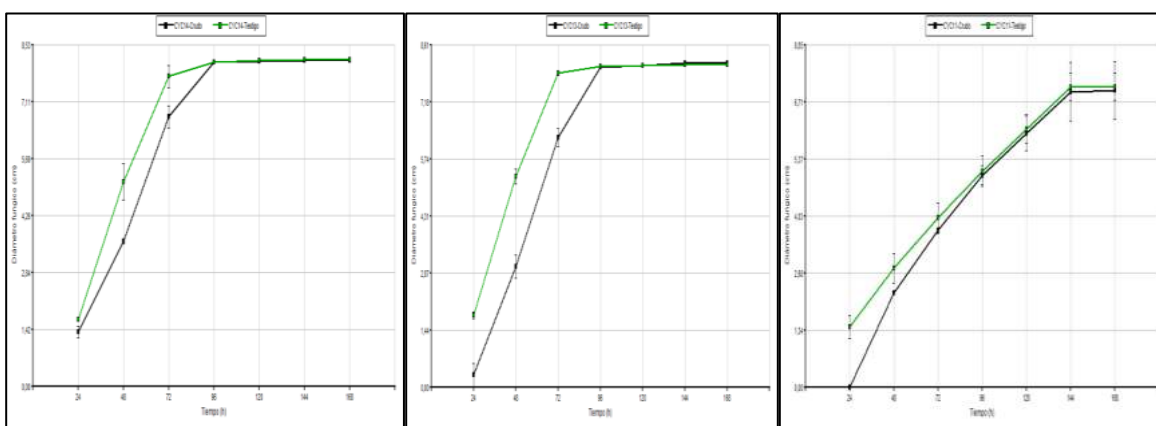


Figura 6.8. Dinámica de crecimiento de tres cepas fúngicas de *Trichoderma* tolerantes: *CYC14*, *CYC13* y *CYC11* expuestas a un medio sólido de APG 2 % contaminado con 1 ml de petróleo crudo. Simbología en color: Verde = Testigo; Negro = Tratamiento.

Moderadamente Tolerantes

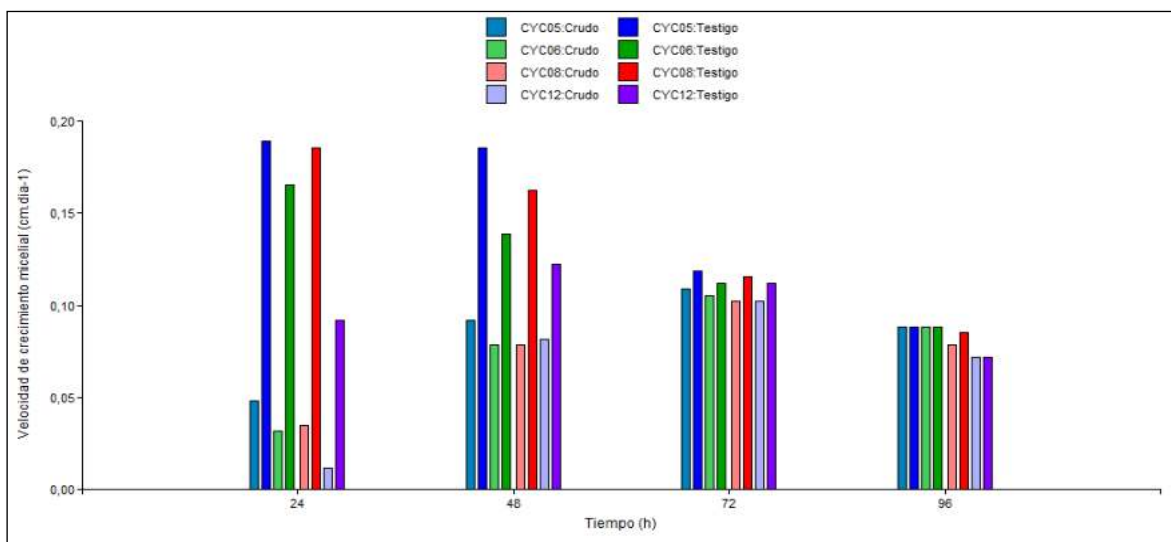


Figura 6.9. Velocidad de crecimiento micelial de las cepas de *Trichoderma* moderadamente tolerantes expuestas a 1 ml de petróleo crudo evaluadas a las 24, 48, 72 y 96 horas.

En la **Figura 6.9** las cepas tuvieron diferencias significativas con su testigo mostrando una velocidad menor de crecimiento con valores menores a los 0.09cm.día^{-1} a las 24 y 48 horas. Ninguna de las 4 cepas supero en diámetro a su testigo (**Figura 6.10**).

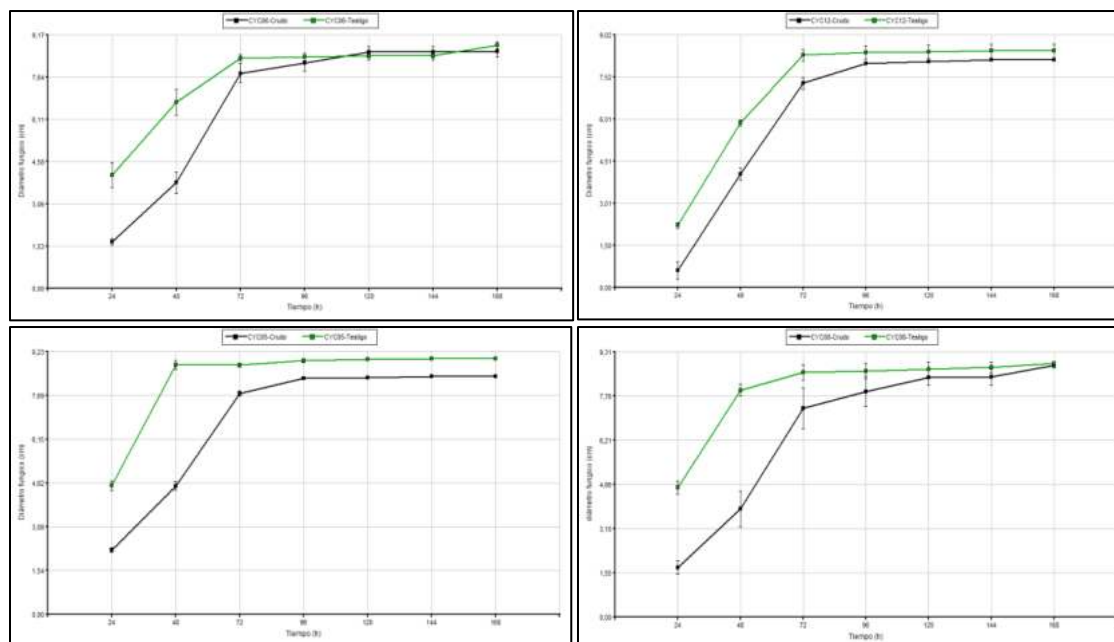


Figura 6.10. Dinámica de crecimiento de cuatro cepas fúngicas de *Trichoderma* moderadamente tolerantes: *CYC06*, *CYC12*, *CYC05* y *CYC08* expuestas a un medio sólido de APG 2 % contaminado con 1 ml de petróleo crudo. Simbología en color: Verde = Testigo; Negro = Tratamiento.

No Tolerantes.

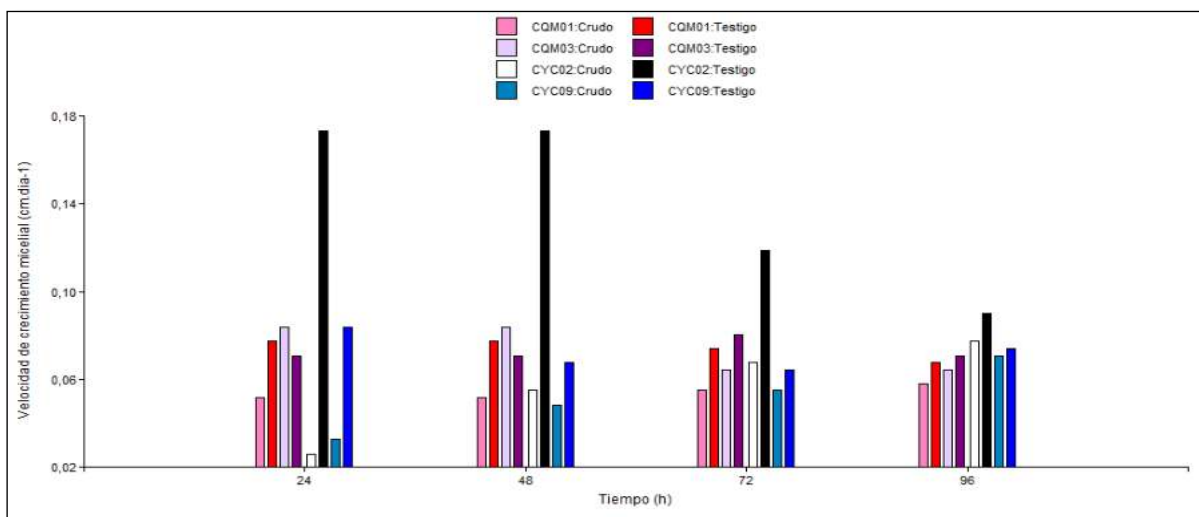


Figura 6.11. Velocidad de crecimiento micelial de las cepas de *Trichoderma* no tolerantes expuestas a 1 ml de petróleo crudo evaluadas a las 24, 48, 72 y 96 horas.

La cepa *CQM03* no presentó diferencias significativas con respecto a su testigo en su velocidad y tuvo un diámetro mayor a las 24 y 48 horas. Las cepas *CYC09*, *CQM01* y *CYC02* presentaron diferencias significativas con respecto a su testigo siendo *CYC02* la más afectada (**Figura 6.11** y **6.12**).

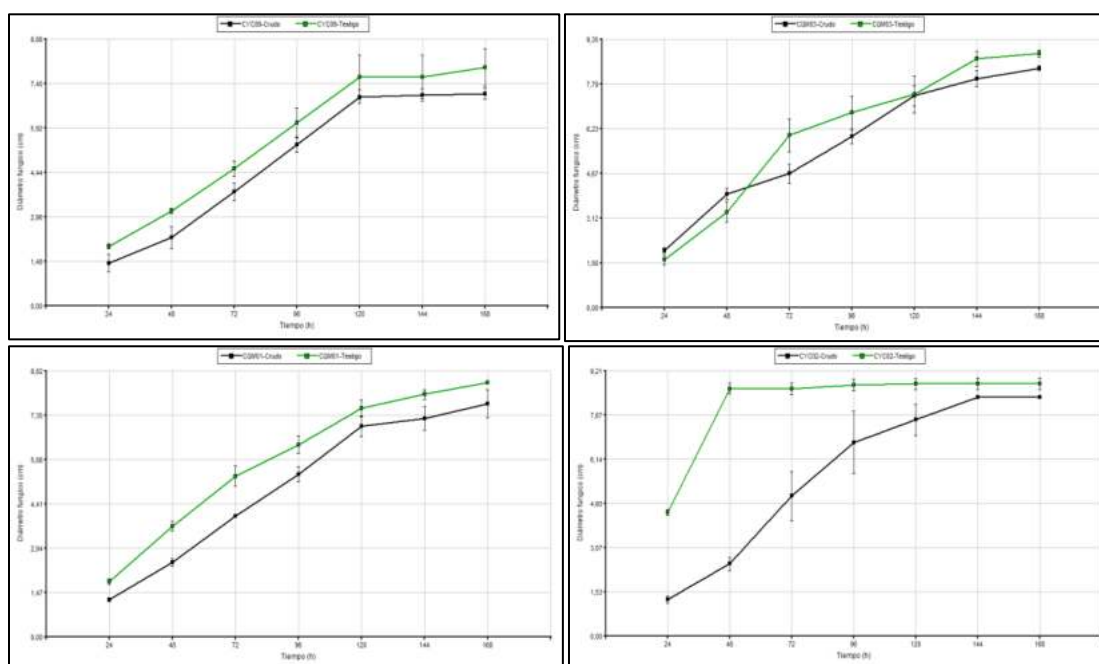


Figura 6.12. Dinámica de crecimiento de cuatro cepas fúngicas de *Trichoderma* no tolerantes: *CYC09*, *CQM03*, *CQM01* y *CYC02* expuestas a un medio sólido de APG 2 % contaminado con 1 ml de petróleo crudo. Simbología en color: Verde = Testigo; Negro = Tratamiento.

6.3.2c Producción de Conidios.

El análisis de varianza indico diferencias significativas en la esporulación ($p < 0,0001$) al séptimo día de crecimiento entre las cepas tanto tratadas con petróleo crudo como en las testigo. De las 19 cepas, 10 no presentaron diferencias con su testigo, en tanto que 9 cepas presentaron diferencias significativas con su testigo, siendo menor la esporulación en los tratamientos (**Tabla 6.3**). Sin embargo, estas diferencias no presentan relación con el sitio de aislamiento ni con las categorías de tolerancia (**Figura 6.13**). Entre las cepas tratadas con petróleo crudo la cepa *CYC14* fue la de mayor esporulación.

Tabla 6.3. Recuento de conidios de *Trichoderma* al 7° día de crecimiento en medio sólido con APG 2 % contaminado con 1 ml de petróleo crudo. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Cepa de <i>Trichoderma</i>	Categoría	(Conidios/ml)	
		Tratam.	
CYC10	AT	1,10E ⁺⁰⁷	a
CYC05	MT	3,12E ⁺⁰⁷	ab
CYC01	AT	4,63E ⁺⁰⁷	ab
CYC11	T	5,16E ⁺⁰⁷	ab
CYC06	MT	5,91E ⁺⁰⁷	ab
CYC12	MT	7,63E ⁺⁰⁷	abc
CYC07	AT	8,59E ⁺⁰⁷	abcd
CQM02	AT	8,83E ⁺⁰⁷	abcd
CQM03	NT	9,29E ⁺⁰⁷	abcd
CQM01	NT	9,56E ⁺⁰⁷	abcd
CYC08	MT	1,01E ⁺⁰⁸	abcd
CQM04	AT	1,12E ⁺⁰⁸	abcd
CYC02	NT	1,25E ⁺⁰⁸	abcd
CYC04	AT	1,32E ⁺⁰⁸	bcd
CYC09	NT	1,76E ⁺⁰⁸	cde
CQM05	AT	1,96E ⁺⁰⁸	def
CYC13	T	2,50E ⁺⁰⁸	ef
CYC03	AT	2,70E ⁺⁰⁸	ef
CYC14	T	2,92E ⁺⁰⁸	f

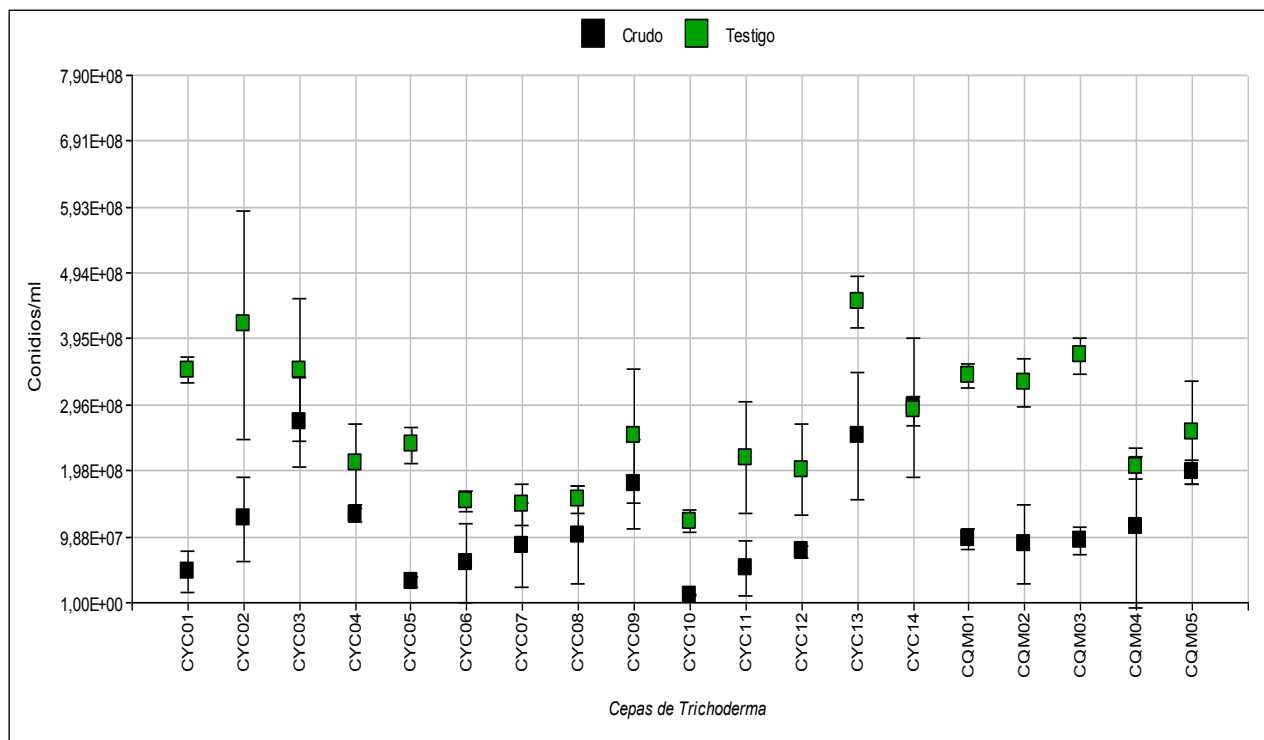


Figura 6.13. Concentración de conidios de cepas de *Trichoderma* expuestas a un medio sólido con APG 2 % contaminado con 1 ml de petróleo crudo y sin petróleo crudo.

6.3.2d. Viabilidad: Porcentaje de germinación de conidios.

El análisis de varianza mostro diferencias significativas con su testigo en 3 cepas la *CQM05* ($p < 0,0099$), la *CYC03* ($p < 0,0014$) con una viabilidad mayor que sus testigos y la cepa *CYC04* ($p < 0,0018$) con una viabilidad menor que su testigo. El resto de las cepas no mostro diferencias con sus testigos. La cepa tratada con petróleo crudo de mayor viabilidad fue *CYC09* ($p < 0,0001$). Al igual que la esporulación, la viabilidad no tuvo relación con el sitio de aislamiento y categoría de tolerancia de las cepas (**Tabla 6.4**) y (**Figura 6.14**).

Tabla 6.4. Viabilidad de conidios de *Trichoderma* al 7° día de crecimiento en medio sólido con APG 2 % contaminado con 1 ml de petróleo crudo. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Cepas de <i>Trichoderma</i>	Categoría	% Germ Tratam.	
<i>CQM04</i>	<i>AT</i>	0,23	a
<i>CYC04</i>	<i>AT</i>	0,24	ab
<i>CQM02</i>	<i>AT</i>	0,27	ab
<i>CYC01</i>	<i>AT</i>	0,29	ab
<i>CYC02</i>	<i>NT</i>	0,35	abc
<i>CQM05</i>	<i>AT</i>	0,36	abc
<i>CQM01</i>	<i>NT</i>	0,39	abcd
<i>CQM03</i>	<i>NT</i>	0,40	abcd
<i>CYC07</i>	<i>AT</i>	0,41	bcd
<i>CYC14</i>	<i>T</i>	0,47	cde
<i>CYC05</i>	<i>MT</i>	0,49	cde
<i>CYC06</i>	<i>MT</i>	0,50	cde
<i>CYC03</i>	<i>AT</i>	0,50	cde
<i>CYC12</i>	<i>MT</i>	0,50	cde
<i>CYC13</i>	<i>T</i>	0,50	cde
<i>CYC08</i>	<i>MT</i>	0,50	cde
<i>CYC10</i>	<i>AT</i>	0,55	de
<i>CYC11</i>	<i>T</i>	0,56	de
<i>CYC09</i>	<i>NT</i>	0,64	e

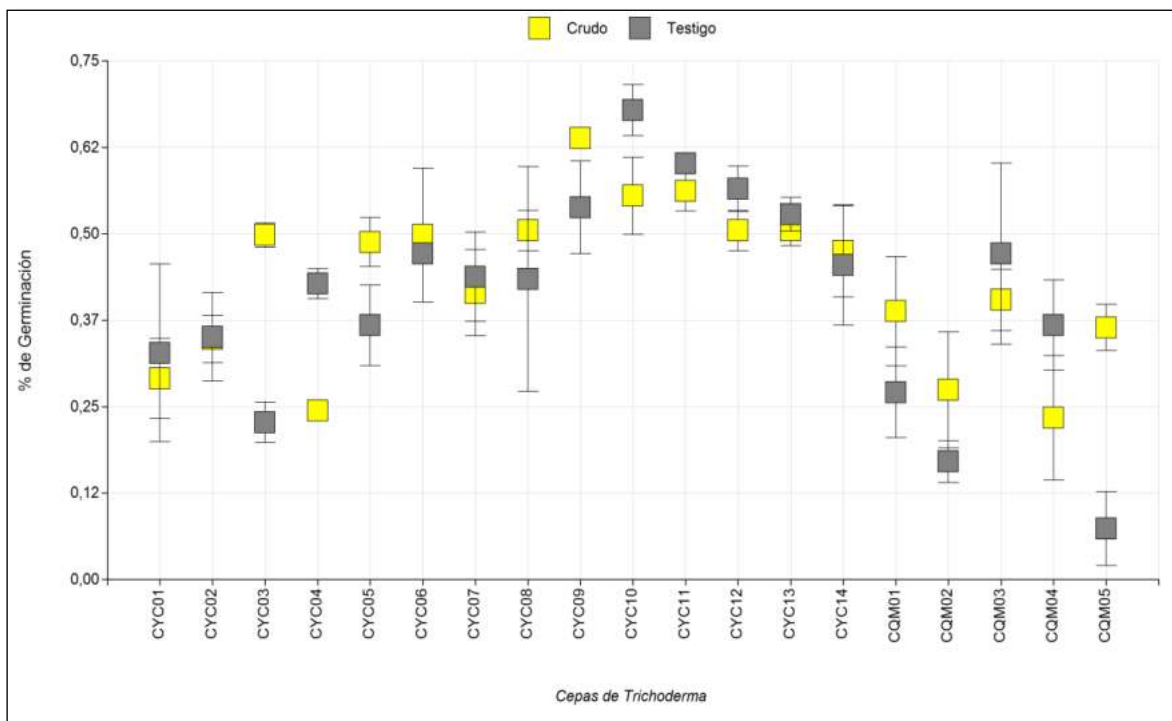


Figura 6.14. Viabilidad de conidios de *Trichoderma* al 7° día de crecimiento en medios de APG 2 % impregnados con 1 ml de petróleo crudo.

6.4. Discusión

Como etapa previa para futuros ensayos de biorremediación, en relación a la metodología empleada en este capítulo, tal como señala Echeverri Jaramillo *et al.* (2016) pruebas sucesivas de crecimiento en cultivos puros enriquecidos con petróleo, es considerada como una estrategia eficiente para evaluar la adaptación, la supervivencia y la potencialidad de las cepas tolerantes.

Por lo tanto en el presente capítulo se pudo evaluar la tolerancia de las cepas de *Trichoderma* a través del FI %, velocidad y dinámica de crecimiento, esporulación y viabilidad.

Las cepas aisladas de suelos contaminados y no contaminados fueron capaces de colonizar el medio de cultivo impregnado con petróleo crudo demostrando su tolerancia y que posiblemente sean capaces de usarlo como fuente de energía y de carbono tal como lo señala Pernia *et al.* (2012) y Rodríguez *et al.* (2012).

Los resultados obtenidos s fueron similares a los de Argumedo (2011), donde las cepas no tuvieron inhibición del crecimiento y solo se observaron cambios macroscópicos como el aspecto de las colonias, producción de micelio y esporulación (**Figura 6.2**).

Si bien no hay trabajos para evaluar y comparar la tolerancia de *Trichoderma* a petróleo crudo se establecieron 4 categorías de tolerancia basándose en sus FI %, donde el 42 % de las cepas estudiadas tienen FI % negativos (*AT*) (**Figura 6.1** y **Tabla 6.1**).

Las cepas *AT* mostraron una mayor tolerancia a los hidrocarburos presentes en el medio de cultivo *in vitro*, desarrollando una velocidad y una dinámica de crecimiento similar a su testigo, probablemente estimuladas por el aporte adicional de componentes orgánicos del petróleo crudo (**Figura 6.5** y **6.6**).

Las cepas (*AT*) del Yacimiento Caimancito en su mayoría del sitio 1 muestran que a nivel biológico poseen una adaptación a un factor de stress adicional generada por el petróleo crudo, de modo que estas posiblemente hayan desarrollado capacidades metabólicas que le permitan asimilar y usar al petróleo crudo como fuente de carbono y energía en condiciones naturales y controladas (Colombo *et. al.*, 1996; Howe – Grant, 1996).

El resto de las categorías tuvieron una velocidad y una dinámica de crecimiento menor al testigo que se corresponde con sus FI % (**Figura 6.7, 6.8, 6.9, 6. 10, 6.11** y **6.12**). Esta inhibición en el desarrollo de las cepas (*T, MT* y *NT*) de *Trichoderma* se deba a la presencia de tolueno y otros componentes, resultado del análisis de la muestra de petróleo crudo del Yacimiento Caimancito por GC-MS (**Anexo 3**) y por ello presentan FI % mayores a cero (**Tabla 6.1**). Tal efecto fue comprobado por Hughes *et al.* (2007) en dos especies: *Trichoderma koningii* y *Trichoderma* sp. que fueron expuestas a hidrocarburos saturados (dodecano, hexadecano) y aromáticos (tolueno, bifenilo, naftaleno) mostrando una mayor inhibición de su crecimiento a causa de los hidrocarburos aromáticos que por los compuestos saturados.

La cepa *CYC10* del sitio 4 (*AT*) con mayores niveles de contaminación mostro una respuesta positiva en su crecimiento frente al petróleo crudo, pudiendo seleccionarse para estudios de tolerancia frente a otros contaminantes de la explotación de hidrocarburos.

En cuanto a la esporulación y la viabilidad de las cepas tratadas con petróleo crudo no presentan relación con el sitio de aislamiento ni con las categorías de tolerancia definidas. La esporulación fue menor solo en el 40 % de las cepas (**Figura 6.13**), sin embargo la

viabilidad no se vio afectada y las cepas *CYC03* y *CQM05 (AT)* presentaron porcentajes de germinación mayores a sus testigos. Solo la cepa *CYC04 (AT)* fue significativamente menor a su testigo (**Figura 6.14**).

Las cepas con menor esporulación y viabilidad podría ser resultado de que hayan acumulado componentes en sus tejidos durante los 7 días de ensayo, afectando el desarrollo de las cepas de *Trichoderma* ya que los HPA están asociados a una gran cantidad de metales pesados como Cu, Hg y Cd que son tóxicos para los hongos (Mandal *et al.*, 1998). Las cepas aisladas del Yacimiento Caimancito demostraron ser microorganismos hidrocarbonoclastas, por ser aisladas de suelos contaminados con petróleo crudo y porque fueron capaces de crecer y formar una red densa de hifas a los 7 días de cultivo en medios con APG 2% impregnados con el contaminante (Hernández-Acosta *et al.*, 2003); resultados similares obtuvieron Ferrara-Cerrato (2002) y April *et al.* (2000) al evaluar el crecimiento en medios minerales enriquecidos con petróleo crudo como única fuente de energía donde el género *Trichoderma* tuvo un desarrollo normal.

El comportamiento de las cepas de Quebrada que fueron aisladas de suelos sin exposición a petróleo crudo y expuestas al mismo sería una respuesta propia de adaptación del género *Trichoderma* a condiciones adversas tal como expresa Widden y Scattolin (1988) y Jackson *et al.* (1991), ya que soportaron condiciones extremas frente al petróleo crudo.

De acuerdo a lo expresado por Perez *et al.* (2008), las comunidades de microorganismos en áreas contaminadas son dominadas por los organismos capaces de utilizar o sobrevivir a compuestos tóxicos, como los contaminados con hidrocarburos, en nuestro caso la tolerancia fue propia del género *Trichoderma*.

Aunque este capítulo no abarco la determinación de enzimas extracelulares ni la presencia de compuestos intermedios en el ensayo realizado, se observó un cambio del estado físico del petróleo en los medios de cultivo a las 144 horas, lo que señala que es probable que *Trichoderma* haya asimilado el petróleo crudo y lo esté metabolizando. Tal como señala Radwan *et al.* (1995) de especies de *Trichoderma* capaces de acumular alcanos de cadena larga en sus lípidos y metabolizarlos; incluso se han reportado especies de *Trichoderma* capaces de degradarlos en medios de cultivo complementados con petróleo crudo (Petit *et al.*, 2013). Estos resultados evidencian la tolerancia de *Trichoderma* al petróleo crudo y hace que sean consideradas como potenciales microorganismos para tratar suelos

contaminados y puedan degradar compuestos orgánicos por procesos de cometabolismo (Cookson, 1995).

6.4. Conclusión

Este capítulo demuestra que las cepas de *Trichoderma* aisladas de suelos contaminados y no contaminados fueron capaces de crecer en medios de cultivo puro enriquecidos con petróleo crudo y permitió realizar una selección preliminar de cepas autóctonas de *Trichoderma* en base a su nivel de tolerancia, primer paso para el avance de una propuesta de biorremediación.

De las 19 cepas de *Trichoderma*, 8 cepas fueron altamente tolerantes (*CYC01*, *CYC03*, *CYC04*, *CYC07*, *CYC10*, *CQM02*, *CQM04* y *CQM05*) a petróleo crudo característica que las hace potenciales para pruebas futuras en procesos biotecnológicos para tratar suelos contaminados con hidrocarburos. La cepa *CYC10* clasificada como altamente tolerante muestra una ventaja adaptativa y evolutiva por coexistir con el petróleo crudo y desechos de producción.

Independientemente de su categoría, nueve cepas fueron afectadas en la producción de conidios, sin embargo la viabilidad solo se vio reducida en una sola la cepa: la *CYC04*. Las cepas *CYC03* y *CQM05* tuvieron una viabilidad mayor a su testigo.

Ninguna de las cepas de *Trichoderma* fue inhibida en su crecimiento, de modo que se puede concluir que la tolerancia es una característica propia del género *Trichoderma* de soportar condiciones extremas y de adaptarse a las mismas.

Bibliografía

- Abdel-Shafy, H. I., & Mansour, M. S. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum* 25(1), 107-123.
- Ander, P., & Messner, K. (1998). Oxidation of 1-hydroxybenzotriazole by laccase and lignin peroxidase. *Biotechnology Techniques*, 12(3), 191-195.

- April, T. M., Foght, J. M., & Currah, R. S. (1999). Hydrocarbon-degrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada. *Canadian Journal of Microbiology*, 46(1), 38-49.
- Argumedo, D. (2011). Respuesta Fisiológica de miembros del genero *Trichoderma* a Hidrocarburos Poliaromáticos.
- Argumedo-Delira R., Alarcón A., Ferrera-Cerrato R., Almaraz J.J. y Peña-Cabriales J.J. (2009). El Genero fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 25 (4) 257-269.
- Bastiaens, L., Springael, D., Wattiau, P., Harms, H., Verachtert, H., & Diels, L. (2000). Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 1834-1843.
- Bumpus, J.A. (1989). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol.* 55, 154-158.
- Castle, D. M., Montgomery, M. T., & Kirchman, D. L. (2006). Effects of naphthalene on microbial community composition in the Delaware estuary. *FEMS microbiology ecology*, 56(1), 55-63.
- Cerniglia, C.E., Gibson, D.T., Dodge, R.H. (1994). Metabolism of benz[α]anthracene by the filamentous fungus *Cunninghamella elegans*. *Appl Environ Microbiol.* 60, 3931-3938.
- Cerniglia, C.E., Yang, S.K. (1984). Stereoselective metabolism of anthracene y phenanthrene by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Appl Environ Microbiol.* 47, 119-124.
- Chaîneau, C.H., Morelb, U.J., Duponta, J., Burya, E., Oudota, J.(1999).Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. *Sci Total Environ.* 227, 237-247.
- Colombo, J. C., Cabello, M. & Arambarri, A. M. (1996). Biodegradation of Aliphatic and aromatics hydrocarbons by natural soil microflora and pure cultures of imperfect and lignolitic fungi. *Environmental Pollution* 94: 355-362.
- Cookson Jr, J. T. (1995). *Bioremediation engineering: design and application*. McGraw-Hill, Inc.

- Del Carmen Rivera, M., Ferrera, R., Volke, V., Rodríguez, R., & Fernández, L. (2002). Adaptación y selección de *microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo*. *Terra Latinoamericana*, 20(4), 423-434.
- Días, R. L. (2012). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos en clima frío y templado* (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas).
- Echeverri Jaramillo, G. E., Manjarrez Paba, G., & Cabrera Ospino, M. (2016). Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en hábitats de ecosistemas costeros en la Bahía de Cartagena, Colombia.
- French, E. R. y Hebert, T. (1980). *Métodos de Investigación Fitopatológica*. Costa Rica: Instituto Interamericano de ciencias Agrícolas
- Harman, G. E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol*. 2, 43-56.
- Head, I. M., Jones, D. M., & Röling, W. F. (2006). Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology*, 4(3), 173-182.
- Henkler, F., Stolpmann, K., & Luch, A. (2012). Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: bulky DNA adducts and cellular responses. *In Molecular, clinical and environmental toxicology* (pp. 107-131). Springer Basel.
- Hernández-Acosta, E., Ferrera-Cerrato, R., Gutiérrez-Castorena, M. C., Rodríguez-Vázquez, R., Rubiños-Panta, J. E., & Fernández-Linares, L. (2003). Bacterias y hongos hidrocarbonoclastas de rizósfera frijol y maíz, en un suelo contaminado con petróleo. *Terra Latinoamericana*, 21(4), 493-502.
- Howe-Grant, M. (1996). *Encyclopedia of chemical technology* 4th ed. New York. pp. 342 – 380.
- Hughes, K. A., Bridge, P., & Clark, M. S. (2007). Tolerance of Antarctic soil fungi to hydrocarbons. *Science of the total environment*, 372(2), 539-548.
- IRAM-IAP A 6502-1*: *Petróleo y Productos del petróleo. Muestro manual de hidrocarburos líquidos a granel*. Primera Edición 1991-04.
- Jackson, A. M., Whipps, J. M., & Lynch, J. M. (1991). Effects of temperature, pH and water potential on growth of four fungi with disease biocontrol potential. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7(4), 494-501.

- Leahy, J. G., & Colwell, R. R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological reviews*, 54(3), 305-315.
- Mandal, T. K., Baldrian, P., Gabriel, J., Nerud, F., & Zadražil, F. (1998). Effect of mercury on the growth of wood-rotting basidiomycetes *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus cinnabarinus* and *Serpula lacrymans*. *Chemosphere*, 36(3), 435-440.
- Martínez-Trujillo, M. A., & García-Rivero, M. (2012). Revisión: Aplicaciones ambientales de microorganismos inmovilizados. *Revista mexicana de ingeniería química*, 11(1), 55-73.
- Moen, M. A., Hammel, K. E. (1994). Lipid peroxidation by the manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* is the basis for phenanthrene oxidation by the intact fungus. *Appl Environ Microbiol.* 60, 1956-1961.
- Papavizas, G. C. (1985). Trichoderma and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual review of phytopathology*, 23(1), 23-54.
- Parellada, E. A., Ramos, A. N., Ferrero, M., Cartagena, E., Bardón, A., & Neske, A. (2012). Effect of the annonaceous acetogenins, squamocin and laherradurin, on the degradation of naphthalene mediated by *Pseudomonas plecoglossicida* J26. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 72, 82-87.
- Patel, V., Jain, S., & Madamwar, D. (2012). Naphthalene degradation by bacterial consortium (DV-AL) developed from Alang-Sosiya ship breaking yard, Gujarat, India. *Bioresource technology*, 107, 122-130.
- Pérez R, Camacho M, Gómez J, Ábalos A, Viñas M, Cantero D. (2008). Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* 39: 44-51.
- Pernía, B., Demey, J. R., Inojosa, Y., & Naranjo-Briceño, L. (2012). Biodiversidad y potencial hidrocarbonoclástico de hongos aislados de crudo y sus derivados: Un meta-análisis. *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal*, 3(1), 1-40.
- Petit, K., Colina, J., Yegres, F., Moran, H., & Richard-Yegres, N. (2013). Biodegradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) por hongos aislados de aguas contaminadas con petróleo, podredumbre blanca, y acíbar de Aloe vera. *Química Viva*, 12(3), 288-304.

-
- Pothuluri, J. V., Freeman, J. P., Evans, F.E., Cerniglia, C.E. (1992). Fungal metabolism of acenaphthene by *Cunninghamella elegans*. *Appl Environ Microbiol.* 58, 3654-3659.
 - Radwan, S., Sorkhoh, N., & Ei-Nemr, I. (1995). Oil biodegradation around roots. *Nature*, 376, 302.
 - Rodríguez, N. J. P., Acevedo, S. C., Gallo, A., & Mesa, G. P. (2012). Comparación entre bioestimulación y bioaumentación para la recuperación de suelos contaminados con diesel. *Producción+ Limpia*, 7(1), 101-108.
 - Ros, M., Rodriguez, I., Garcia, C., & Hernandez, T. (2010). Microbial communities involved in the bioremediation of an aged recalcitrant hydrocarbon polluted soil by using organic amendments. *Bioresource Technology*, 101(18), 6916-6923.
 - Sutherland, J.B., Selby, A.L., Freeman, J.P., Evans, F.E., Cerniglia, C.E. (1991). Metabolism of phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol.* 57, 3310-3316.
 - Tsibart, A. S., & Gennadiev, A. N. (2013). Polycyclic aromatic hydrocarbons in soils: sources, behavior, and indication significance (a review). *Eurasian Soil Science*, 46(7), 728-741.
 - Widdel, F., Rabus, R. (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr Opin Biotechnol.* 12, 259-276.
 - Widden, P., Scattolin, V. (1988). Competitive interactions and ecological strategies of *Trichoderma* species colonizing spruce litter. *Mycologia* 80, 795-803.

Capítulo VII

Control Biológico de *Sclerotium rolfii*. Pruebas de Antagonismo: Cultivos Duales y Metabolitos Difusibles

Resumen

El objetivo de este capítulo fue evaluar el comportamiento antagonista de 19 cepas de *Trichoderma* aisladas de suelos contaminados con petróleo y de suelos no contaminados, frente al fitopatógeno *Sclerotium rolfii* con objetivos biotecnológicos de múltiple funcionalidad: biorremediación y control biológico de enfermedades. El método cuantitativo de evaluación de antagonismo *in vitro*, consistió en evaluar competencia por espacio y antibiosis mediante las técnicas: 1) siembras apareadas, 2) producción de metabolitos difusibles al medio mediante el Método del Papel Celofán. En ambos casos se midió el porcentaje de inhibición del crecimiento radial del patógeno (% ICR) a tiempo cero y evaluación a las 48 horas en el primer caso y al 7° día en el segundo, junto a la producción de esclerocios por cm² al séptimo día. Se realizó un diseño completamente aleatorizado con cuatro repeticiones por tratamiento para ambos ensayos, utilizando el medio de cultivo APG al 2%, cada uno con su testigo. Los resultados se analizaron con el programa InfoStat (Duncan $\alpha=0.05$). Para las siembras apareadas, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, con %ICR mayores al 80% para la cepa (CYC02) *T. citrinoviride*. En cuanto a la producción de metabolitos difusibles al medio, hubo diferencias significativas entre las cepas, siendo la cepa (CYC02) la que ejerció una inhibición del 100% de crecimiento de *Sclerotium rolfii*. En cuanto a la producción de esclerocios a 7° día, el testigo presentó una media de 121 esclerocios por cm², nueve cepas inhibieron totalmente la formación de esclerocios CYC03, CYC08, CYC11, CYC13, CYC04, CYC06, CYC07, CYC01 y CYC02; *Sclerotium rolfii* produjo de 0.5 a 4,5 esclerocios por cm² frente a CYC10, CYC05, CYC14, CQM04, CYC12, CQM05 y CYC09. Finalmente *Sclerotium rolfii* produjo en promedio de 26.5 a 105.0 esclerocios cm² frente a las cepas CQM02, CQM03 y CQM01. La cepa CYC02 fue la mejor antagonista frente a *Sclerotium rolfii*, combinando estrategias de competencia por espacio, producción de metabolitos e inhibición de formación de esclerocios *in vitro*. Estos resultados representan el primer paso para el desarrollo de alternativas biológicas para el control de enfermedades de las plantas en suelos contaminados y no contaminados con petróleo crudo.

Palabras clave: *Trichoderma*, *Sclerotium rolfsii*, biorremediación, control biológico.

Biological Control of *Sclerotium rolfsii*. Tests of Antagonism: Dual Culture and Diffusible Metabolites.

Abstract

The objective of this chapter was to assess the opponent or antagonist behavior of nineteenth (19) of *Trichoderma* strains isolated from contaminated grounds or soils with oil and of non-contaminated soils against the phytopathogen *Sclerotium rolfsii* with biotechnologist objectives of multiple functionality: bioremediation and biological disease control. The quantitative method of assessment of antagonist *in vitro*, consisted of assess competition for space and antibiosis through techniques: 1) Paired plantings, 2) Production diffusible metabolites to the environment by means of the Method of Cellophane Paper. In both cases the percentage of radial growth inhibition of the strains (%ICR) to zero time and the testing at the 48 hours in the first case and at the 7th day in the second case, with the sclerotia productions per cm² on the seventh day. There have done a DCA with four repetitions per treatment for both essays, using the culture APG of 2%. The results have been assessing with the InfoStat (Duncan $\alpha = 0.05$) program. For the paired plantings, significant differences were observed between the treatments, with % ICR older or higher than the 80% for the strain (CYC02). In terms of the production of diffusible metabolites to the environment, there was a significant difference between the isolates and the strains (CYC02) exercised a 100% of growth inhibition of *Sclerotium rolfsii*. As for the production of sclerotia at the 7th day, the control presented a mean of 121 sclerotia per cm², nine (9) strains inhibit totally the sclerotia formation of CYC03, CYC08, CYC11, CYC13, CYC04, CYC06, CYC07, CYC01 y CYC02; *Sclerotium rolfsii* products from 0.5 to 4.5 sclerotia per cm² compared to CYC10, CYC05, CYC14, CQM04, CYC12, CQM05 and CYC09. Finally *Sclerotium rolfsii* products and 26.5 to 105.0 average of sclerotia per cm² against the CQM02, CQM03 and CQM01 strains. The CYC02 strains was selected for its best antagonist answer to *Sclerotium rolfsii*, combining competitions strategies of spaces, metabolites productions, and inhibition of sclerotia formation *in vitro*. These results represent the first step for the biological alternatives development for the disease control of plants in contaminated soils or grounds and non-contaminated with crude oil.

Key words: *Trichoderma*, *Sclerotium rolfsii*, bioremediation, biologic control.

7.1. Introducción

Las Yungas y la Quebrada de Jujuy son dos regiones utilizadas para el cultivo de hortalizas, frutales y ornamentales, siendo ambas regiones potenciales para cultivo (Rivas *et al.*, 2013). La producción agrícola de Yungas se diferencia por dos tipologías de producción: los cultivos agroindustriales de caña azúcar y cítricos con mayor dependencia tecnológica y aquella de pequeños productores, como agricultura de subsistencia, que cultivan papa y maíz principalmente, maní (*Arachis hypogea*) y porotos (*Phaseolus sp.*) considerados cultivos típicos de parcelas agrícolas campesinas e indígenas. En las áreas de pastizales de neblina se cultivan especies de claro abolengo andino como la oca (*Oxalis tuberosa*), ulluco (*Ullucus tuberosus*), quínoa (*Chenopodium quinoa*), añú (*Tropeolum tuberosum*) (Plan Gestión Calilegua, 2009).

Aunque la aplicación de agroquímicos es efectiva y necesaria en muchos casos, pueden tener un efecto negativo para el ambiente y la salud humana, generando preocupación por el deterioro ambiental y el desequilibrio de los ecosistemas, requiriendo en muchos casos su mitigación (Torres & Capote, 2004; Samuels *et al.*, 2015).

El control microbiológico de enfermedades con hongos representa una alternativa sostenible, ya que disminuye el uso de agroquímicos (reduciendo los costos), pudiendo generar un incremento en la producción, reducir la incidencia de la enfermedad y a la vez asegurar la salud de campesinos u operarios que trabajan en los cultivos (Solórzano, 2002). La finalidad del biocontrol es cambiar el equilibrio en las poblaciones de organismos nocivos, normalmente mediante un incremento artificial en la población del enemigo natural, reduciendo así el impacto sobre el ambiente y los riesgos para la salud de los productores y consumidores (Gurr & Wratten, 2000).

En la flora del suelo hay una continua interacción entre los agentes patógenos de las plantas y sus antagonistas. *Sclerotium rolfsii* es un fitopatógeno que provoca enfermedades en tallos y raíces de una gran variedad de cultivos siendo responsables del volcamiento y pudrición de plántulas. Su importancia agrícola se debe a que posee un rango de hospederos de alrededor de 500 especies, a su capacidad de desarrollo como saprofito, a su crecimiento prolífico y producción de grandes cantidades de esclerocios que pueden permanecer viables por muchos años en el suelo (Ruiz Rosales, 2015). Estas características hacen que las

especies del genero *Sclerotium* sean útiles para seleccionar cepas antagonistas de *Trichoderma* en condiciones *in vitro* (Mathivanan *et al.*, 2000).

Las especies del género *Trichoderma* desde 1930 han acaparado la atención por ser agentes de biocontrol de patógenos de suelo como hongos, bacterias, invertebrados (insectos y nematodos) e incluso malezas (Stefanova, 2007; Sarro *et al.*, 2011; Mishra *et al.*, 2014). Se distingue por su rápido crecimiento y gran producción de biomasa, por facilitar nutrientes del suelo a las plantas al degradar celulosas y ligninas (Castro, 2007) y por adaptarse y sobrevivir en condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad (Widden & Scattolin, 1988).

El mecanismo de control que ejerce el género *Trichoderma* va a depender si el antagonismo se produce de manera indirecta o directa sobre el patógeno. Cuando su acción biorreguladora es indirecta induce mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos, como la activación en la planta de compuestos relacionados con la resistencia a enfermedades (inducción) (Harman, 2004), detoxificación de toxinas excretadas por patógenos y la desactivación de sus enzimas durante el proceso de infección, la solubilización de elementos nutritivos y la capacidad además, de crear un ambiente favorable al desarrollo radical que aumenta la tolerancia de la planta al estrés (Harman, 2007). Cuando es directa el patógeno y antagonista comparten el mismo nicho ecológico y la acción puede ser por antibiosis, competencia y parasitismo, las cuales pueden ser ejercida por una misma cepa (Carballo *et al.*, 2004; Harman *et. al.*, 2004; Abdo *et al*, 2008; Sivila & Álvarez, 2013).

La competencia constituye un mecanismo de antagonismo muy importante que en condiciones *in vitro* se evalúa a través de la prueba de cultivos duales. Se ejerce principalmente por espacio y en ella intervienen el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento (sustrato o nutrientes).

Este tipo de antagonismo se ve favorecido por las características del agente de control biológico como plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento y desarrollo (Ahmad & Baker, 1987; Hjeljord & Tronsmo, 1998), las cuales se observan en especies del genero *Trichoderma* que colonizan rápidamente una amplia gama de sustratos debido a la riqueza de las enzimas que poseen y la abundante esporulación hace que sean muy eficientes como saprófitos y aún más como agentes de control biológico (Hjeljord & Tronsmo, 1998; Meza,

2015). Su acción se debe a la producción de compuestos como enzimas líticas tales como las proteinasas, quitinasas y glucanasas que afectan la integridad de las membranas del fitopatógeno y la degradación de su pared celular, todas enzimas involucradas en el control biológico de fitopatógenos (Hoyos-Caravajal *et al.*, 2008; González *et al.*, 2012).

Otro mecanismo que es imprescindible para la selección de aislamientos promisorios para el control de un agente plaga, es la antibiosis. Los metabolitos con actividad antifúngica secretados por *Trichoderma* constituyen un grupo de compuestos volátiles y no volátiles muy diverso en cuanto a estructura y función, algunos de los cuales inhiben a otros microorganismos estableciendo contacto físico que ocasiona la degradación de sus hifas, y la inhibición de la producción y germinación de sus esporas (Martínez *et al.*, 2013). Dennis & Webster (1971), detectaron que la actividad antibiótica de algunos aislamientos de *Trichoderma*, se debía a la producción de compuestos volátiles y notaron que los aislamientos más activos poseían un fuerte olor a coco, posiblemente relacionado con la actividad antagonista.

Debido a que las dos regiones en estudio son zonas productivas, las cepas nativas de *Trichoderma* aisladas de ambos sitios fueron evaluadas mediante pruebas *in vitro* (cultivos duales y metabolitos difusibles al medio) para determinar su potencial como agentes de control biológico sobre *Sclerotium rolfsii*.

- El presente capítulo tuvo como objetivo evaluar si las cepas de *Trichoderma* aisladas son funcionales como antagonistas frente a *Sclerotium rolfsii*, en ensayos *in vitro*.

7.2. Materiales y Métodos.

7.2.1. Preparación de Medio de Cultivo y Materiales

Para los ensayos de control biológico se preparó el medio de cultivo Agar papa glucosado Britania (APG 2%). Se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos transfiriendo 10ml en cajas de petri de 9 cm de diámetro hasta gelificar en cámara de flujo laminar.

Para la prueba de metabolitos difusibles se usaron discos de papel celofán transparentes con un diámetro de 9 cm, que se esterilizaron de la forma arriba descrita.

7.2.2. Cultivo de *Sclerotium rolfsii*

La cepa de *S. rolfsii* fue aislada de pimientos con síntomas de podredumbre, provista por el laboratorio de Fitopatología de FCA (UNJu). La cepa se incubó en APG 2% a 26 ± 1 °C. Para los ensayos se usaron cultivos de 7 días de crecimiento con abundante producción de esclerocios.

7.2.3. Cultivos duales o siembras apareadas.

La técnica consiste en transferir discos de 5 mm^2 de diámetro de *Trichoderma* y de *S. rolfsii*, en los bordes de las cajas de Petri con APG 2%, colocando uno frente al otro y en forma equidistante del centro de la caja. Se incubaron a 26 ± 1 °C evaluándose y registrándose el crecimiento a los 2 días través del calibre pie de rey, como se observa en la **Figura 7.1**. Para el control se inocularon discos de 5 mm^2 diámetro del patógeno en medio APG 2% y se incubaron bajo las mismas condiciones (Rasu *et al.*, 2012).

Para este ensayo se realizaron cuatro repeticiones por cada una de las 19 cepas de *Trichoderma* aisladas. Se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (%ICR) a las 48 horas mediante la fórmula de Denis & Webster (1971) que se muestra a continuación:

$$\% \text{ ICR} = \left\{ \frac{R1 - R2}{R1} \right\} * 100$$

Dónde:

R1= distancia máxima alcanzada por el patógeno (cm) frente al antagonista.

R2= distancia mínima alcanzada por el patógeno (cm) del lado opuesto al antagonista.

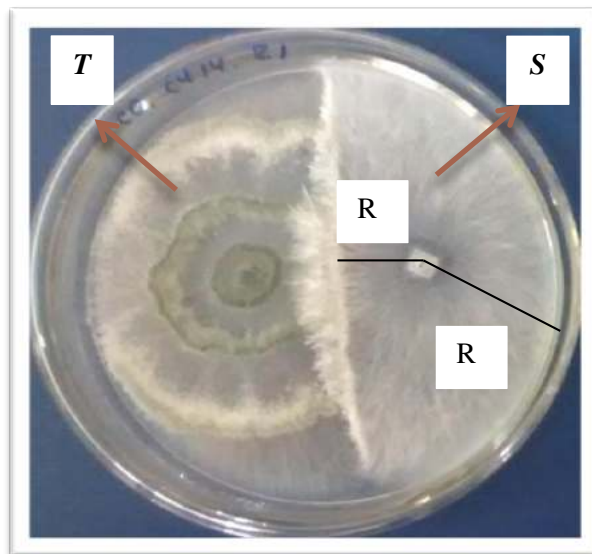


Figura 7.1. Cultivos Duales. R1 y R2 medido con calibre pie de rey para cada tratamiento. *T*: *Trichoderma* (antagonista) y *S*: *S. rolfsii* (patógeno).

El grado de antagonismo en cultivo duales se determinó macroscópicamente, tomándose en cuenta la invasión del antagonista sobre el micelio del patógeno con la escala citada por Bell *et al.* (1982) y Ezziyyani *et al.* (2004) (**Tabla 7.1**).

Tabla 7.1. Escala creada para evaluación la capacidad antagónica de *Trichoderma* de acuerdo a la medida de la invasión de la superficie, colonización y esporulación. (Bell *et al.* 1982; Ezziyyani *et al.* 2004).

Grado	Capacidad Antagónica
1	<i>Trichoderma</i> cubre completamente al patógeno y la superficie del medio de cultivo.
2	<i>Trichoderma</i> cubre al menos 2/3 de la superficie del medio.
3	<i>Trichoderma</i> y patógeno cada uno coloniza aproximadamente a la mitad de la superficie del medio (+ de 1/3 – 2/3). Ninguno domina.
4	Patógeno coloniza por lo menos 2/3 de la superficie del medio y resiste la invasión de <i>Trichoderma</i> .
5	El patógeno cubre totalmente a <i>Trichoderma</i> y ocupa toda la superficie del medio.

7.2.4. Método del Papel Celofán.

Para evaluar la acción de metabolitos difusibles se siguió las técnicas del Papel Celofán descrita por (Rosa de Lima Ramos, 1993; Gibbs, 1967). En condiciones de asepsia de transfieren disco de papel celofán estéril de 9 cm de diámetro sobre placas de petri con APG 2%. Sobre el papel se colocó una sección de 5 mm² de colonia de *Trichoderma* (antagonista). Las cajas se incubaron en estufa a 26 ± 1 °C por tres días, luego se retiró el papel junto al antagonista adherido y se colocó un disco de 5 mm² de colonia de *S. rolfsii* (patógeno) en el centro de la caja de Petri (**Fig. 7.2**).

Como testigo se colocó un disco de 5 mm² de *S. rolfsii* en el centro de las cajas de petri con APG 2% e incubadas en las mismas condiciones.

Se realizaron cuatro repeticiones por cepa de *Trichoderma* y se midió el crecimiento radial calculando el porcentaje de inhibición de crecimiento (% ICR) al séptimo día y la formación de esclerocios por cm².

El % ICR se estableció con la siguiente relación (Worasatit *et. al.*, 1994):

$$\% \text{ ICR} = \left[\left(\frac{D_1 - D_2}{D_1} \right) \right] * 100$$

Dónde:

D₁: es el diámetro alcanzado por el micelio de *S. rolfsii* del testigo.

D₂: es el diámetro del *S. rolfsii* en las placas inoculadas con *Trichoderma*.

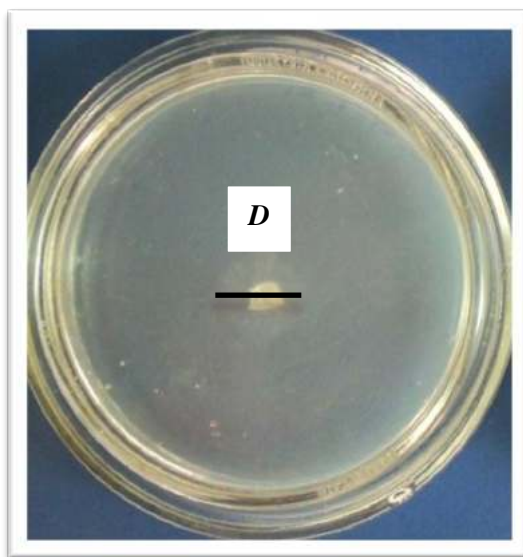


Figura 7.2. Metabolitos difusibles al medio. Diámetro (**D**) de *S. rolfsii* medido en cada tratamiento.

7.2.5. Análisis Estadístico

Los resultados se analizaron por prueba de comparación de medias (Duncan $\alpha=0.05$).con el programa InfoStat.

7.3. Resultados y Discusión

7.3.1. Cultivos duales o siembras apareadas

Los aislamientos de *Trichoderma* evaluados contra *S. rolfsii* mostraron un máximo de 80 % de actividad antagónica reduciendo el crecimiento del fitopatógeno (**Tabla 7.2**). De acuerdo al grado de antagonismo las cepas se clasificaron en 4 clases (**Cuadro 7.1, 7.2, 7.3 y 7.4**).

Tabla 7.2. Efecto de cepas de *Trichoderma* de Caimancito (CYC) y de Maimara (CQM) en pruebas de cultivos duales frente a *S. rofsii*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). (Bell *et. al.* 1982; Ezziyani *et al.* 2004).

Cepas	Especie	% ICR		Grado de antagonismo
CQM01	<i>T. harzianum</i>	14,94	a	5
CQM02	<i>T. harzianum</i>	17,82	ab	5
CYC11	<i>T. virens</i>	18,32	abc	5
CQM03	<i>T. atroviride</i>	21,03	abcd	5
CQM05	<i>T. atroviride</i>	32,18	abcde	3
CYC09	<i>T. atroviride</i>	42,07	abcdef	5
CQM04	<i>T. atroviride</i>	46,43	bcdef	2
CYC06	<i>T. longibrachiatum</i>	46,67	cdef	2
CYC14	<i>T. viride</i>	47,49	def	3
CYC01	<i>T. longibrachiatum</i>	50,10	efg	3
CYC03	<i>Trichoderma sp</i>	57,22	efgh	4
CYC04	<i>Trichoderma sp</i>	57,46	efgh	4
CYC05	<i>T. citrinoviride</i>	58,61	efgh	2
CYC13	<i>Trichoderma sp</i>	60,31	efgh	3
CYC07	<i>T. longibrachiatum</i>	62,52	fgh	2
CYC08	<i>T. citrinoviride</i>	64,45	fgh	2
CYC12	<i>T. harzianum</i>	65,41	fgh	2
CYC10	<i>T. harzianum</i>	76,53	gh	2
CYC02	<i>T. citrinoviride</i>	80,35	h	2

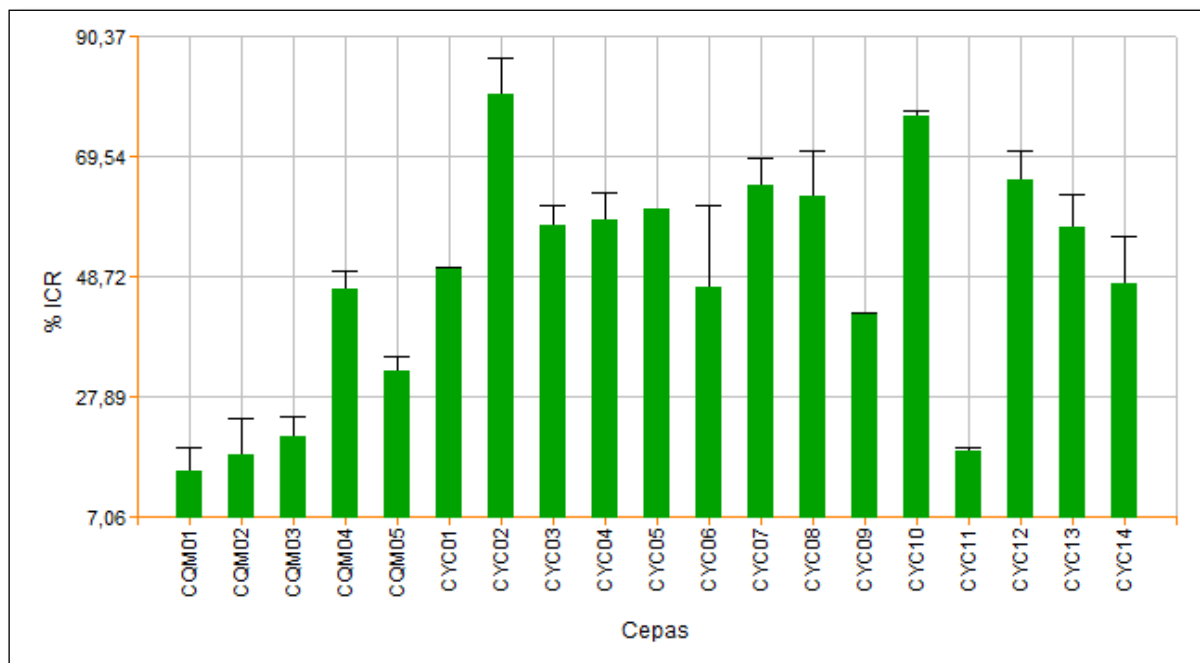
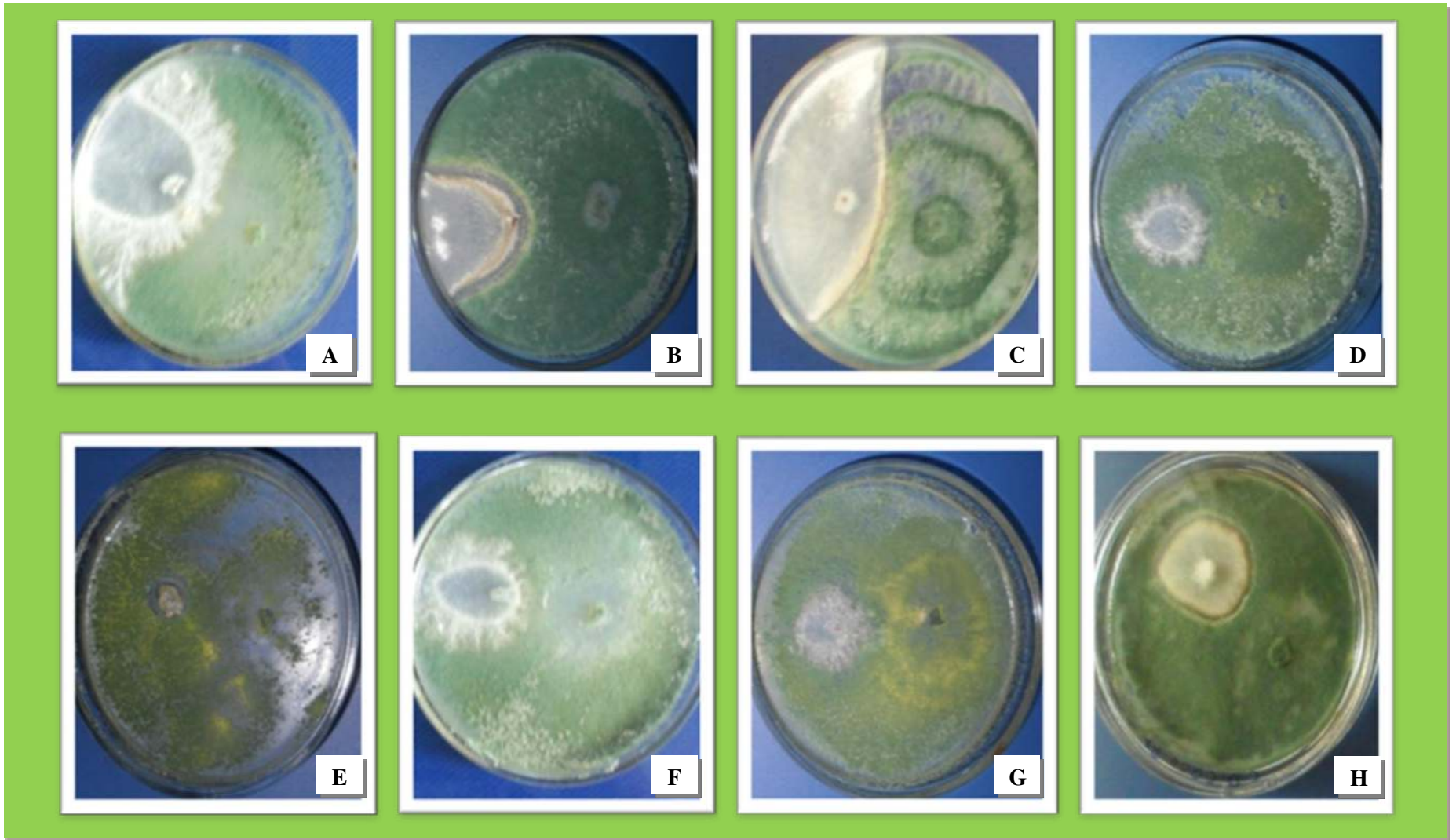


Figura 7.3. Inhibición del crecimiento radial (%ICR) en cultivos duales de *S. rolfsii* con *Trichoderma* evaluado a las 48 horas de ensayo.

La **Figura 7.3** describe el comportamiento de cada cepa evaluada en los medios de cultivo duales con una reducción del crecimiento de *S. rolfsii* observándose que en el segundo día la cepa *CYC02* fue la más agresiva quien tuvo un %ICR de 80,35 % mayor a los demás, seguido por *CYC10* y *CYC12*. De acuerdo al análisis de comparación de medias de Duncan se puede categorizar el efecto de las cepas antagonistas en cuatro grupos según el % ICR, los grupos con alto efecto antagónico (60-80 %), con efecto antagónico medio (50-60 %), efecto antagónico moderado (20-50 %) y bajo efecto antagónico (menor a 20 %) (**Tabla 7.2**).

Cuadro 7.1. Cepas de *Trichoderma* con capacidad antagónica **Grado 2** frente a *S. rolfsii*. A) *CYC02*; B) *CYC10*; C) *CYC12*; D) *CYC07*; E) *CYC06*; F) *CYC05*; G) *CYC08* y H) *CQM04*.



Cuadro 7.2. Cepas de *Trichoderma* con capacidad antagónica **Grado 3** frente a *S. rolfsii*. I) *CYC01*, J) *CYC13*, K) *CYC14* y L) *CQM05*.



I



J



K

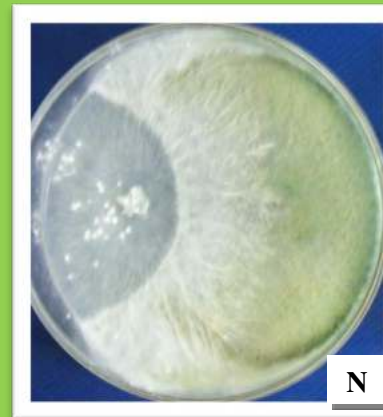


L

Cuadro 7.3. Cepas de *Trichoderma* con capacidad antagónica **Grado 4** frente a *S. rolfsii*. M) *CYC04* y N) *CYC03*.



M



N

Cuadro 7.4. Cepas de *Trichoderma* con capacidad antagónica **Grado 5** frente a *S. rolfsii*. O) *CYC09*; P) *CQM03*; Q) *CQM02*; R) *CYC11* y S) *CQM01*.



La técnica de cultivos es ampliamente utilizada en diferentes estudios científicos Khattabi *et al.* (2004) y Rekha *et al.* (2012). Como expresa (Martinez *et al.*, 2013) un factor esencial para que exista competencia es la escasez o limitación de un requerimiento (espacio y/o nutrientes) y en este ensayo *in vitro* se probó que la acción antagónica de *Trichoderma* fue principalmente por espacio, debido a su rápido crecimiento en el medio de cultivo. Es probable que en condiciones homogéneas y estériles sobre APG haga que los mecanismos implicados en el antagonismo (antibiosis y micoparasitismo) estén reducidos por los factores naturales y nutricionales de este medio influenciando en el tipo de antagonismo observado (Howel, 2003).

Con este ensayo se demostró que de las 19 cepas de *Trichoderma*, 5 cepas tuvieron una capacidad antagónica alta y de grado 2 (*CYC07*, *CYC08*, *CYC12*, *CYC10* y *CYC02*), inhibiendo el crecimiento de *S. rolfsii* y demostrando la capacidad antagónica del género *Trichoderma* (Stefanova, 2007; Sarro *et al.*, 2011; Mishra *et al.*, 2014). Esta inhibición quizá esta generada por la liberación del antagonista de enzimas líticas como proteasas, quitinasas y glucanasas que alteraron la composición de la membrana plasmática del patógeno (Hoyos-Caravajal *et al.*, 2008; González *et al.*, 2012) y tal como lo expresa Elkhatny *et al.*, (2001) donde las glucanasas y las quitinasas liberadas en medios de cultivo inhiben el crecimiento de *S. rolfsii*.

En este grupo, las cepas *CYC02*, *CYC10* y *CYC12* fueron las mejores con un % ICR mayor al 65 %. El comportamiento antagónico de la cepa *CYC02* (*T. citrinoviride*), fue demostrado al actuar en consorcios con *Pseudomonas aeruginosa* (Thankkar & Saraf, 2015) o para el control de fitopatógenos como *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium cepivorum* y *Rhizoctonia solani* (Hernandez, 2012). Por otro lado las cepas *CYC10* y *CYC12* (*T. harzianum*) son las más aplicadas como agente de biocontrol de fitopatógenos al entrar en contacto con *S. rolfsii* (Guédeza, *et al.*, 2009). Rekhat *et al.* (2012) aplicó filtrados de *T. harzianum* que inhiben el crecimiento micelial, la germinación y producción de esclerocios de *S. rolfsii*.

De acuerdo a la escala de Ezziyyani *et al.* (2004) (**Cuadro 7.1, 7.2, 7.3 y 7.4**) ninguna de las cepas fue clasificada con grado 1 porque no invadió, ni esporuló sobre *S. rolfsii*; demostrando a su vez la potencialidad del género *Sclerotium* para seleccionar un agente de control en condiciones *in vitro* (Mathivanan *et al.*, 2000). El grado de antagonismo de las

cepas de *Trichoderma* sobre *S. rolfsii* fue diferente y la respuesta menor de algunas cepas muestra que no todas actúan de la misma manera e intensidad contra el patógeno. Tal como se observa en los **Cuadros 7.2, 7.3 y 7.4** la capacidad competitiva del fitopatógeno fue más agresiva, mostrando mayor crecimiento y cubriendo al antagonista a partir de una banda color crema de donde extendió sus hifas sobre *Trichoderma*. En la confrontación *S. rolfsii-Trichoderma* en APG realizado por Lucena *et al* (2011) observó la característica agresiva del patógeno mostrando un crecimiento micelial rápido y con mayor capacidad de colonización que el antagonista. En un estudio realizado por Barakat *et al.* (2006) al aislar cepas de *Trichoderma* y ser confrontadas con *S. rolfsii* mostró el mismo resultado, con cepas que no crecieron sobre el fitopatógeno y solo limitaron su crecimiento con la formación de una zona clara de inhibición exhibiendo antibiosis entre el patógeno y el antagonista.

Las cepas con efecto antagónico medio con % ICR entre el 50 – 60 %, las moderado y bajo antagonismo con porcentajes menores al 50 % no actúan de la misma manera sobre *S. rolfsii* (**Tabla 7.2**). Martínez *et al.* (2008) expresa que la capacidad de control depende de la especificidad de la cepa y de sus modos de acción existiendo aislamientos que son más eficientes para el control de un patógeno que de otro. Este resultado fue obtenido por Mihuta-Grimm & Rowe (1986) mostrando que al analizar 255 aislamientos de *Trichoderma* de diferentes lugares, solo el 15% fue efectivo en el control del patógeno.

Es posible también, que el origen de los aislamientos de las cepas del Yacimiento Caimancito determine la respuesta antagónica menor frente al patógeno, esto a causa de las condiciones ecológicas del suelo alterando su metabolismo tal como lo expresa (Argumedo, 2012) de cepas de *Trichoderma* expuestas a hidrocarburos como naftaleno y fenantreno.

7.3.2. Metabolitos Difusibles al Medio.

En los cultivos de *S. rolfsii* en medios con metabolitos de las cepas de *Trichoderma* se observó que de las 19 cepas de *Trichoderma* aisladas, la cepa *CYC02* inhibió el crecimiento del patógeno *S. rolfsii* en un 100%. Las cepas que le siguieron fueron *CYC05*, *CYC07*, *CYC08* con porcentajes de inhibición entre 80 y 90 % siendo mayor que en el ensayo de cultivos duales y no existiendo diferencias entre ellas (**Tabla 7.3, Figura 7.4**). Las cepas

CYC04, *CYC06* y *CYC03* presentaron los valores más bajos de % ICR -6.45, -6.25 y 0,67 %.

Tabla 7.3. Efecto de cepas de *Trichoderma* de Caimancito (*CYC*) y de Maimara (*CQM*) sobre el crecimiento de *S. rolfsii*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Cepas	Especie	% ICR	
<i>CYC04</i>	<i>Trichoderma sp</i>	-6,45	a
<i>CYC11</i>	<i>T. virens</i>	-6,25	a
<i>CYC03</i>	<i>Trichoderma sp</i>	0,67	a
<i>CQM01</i>	<i>T. harzianum</i>	6,75	ab
<i>CYC09</i>	<i>T. atroviride</i>	13,58	abc
<i>CQM02</i>	<i>T. harzianum</i>	14,87	abc
<i>CYC10</i>	<i>T. harzianum</i>	18,16	abc
<i>CYC13</i>	<i>Trichoderma sp</i>	37,59	abcd
<i>CYC06</i>	<i>T. longibrachiatum</i>	43,84	abcd
<i>CQM03</i>	<i>T. atroviride</i>	57,14	bcde
<i>CYC12</i>	<i>T. harzianum</i>	58,01	bcde
<i>CQM04</i>	<i>T. atroviride</i>	59,21	bcde
<i>CQM05</i>	<i>T. atroviride</i>	65,62	cde
<i>CYC14</i>	<i>T. viride</i>	67,34	cde
<i>CYC01</i>	<i>T. longibrachiatum</i>	79,55	de
<i>CYC08</i>	<i>T. citrinoviride</i>	81,83	de
<i>CYC07</i>	<i>T. longibrachiatum</i>	85,99	de
<i>CYC05</i>	<i>T. citrinoviride</i>	86,13	de
<i>CYC02</i>	<i>T. citrinoviride</i>	100	e

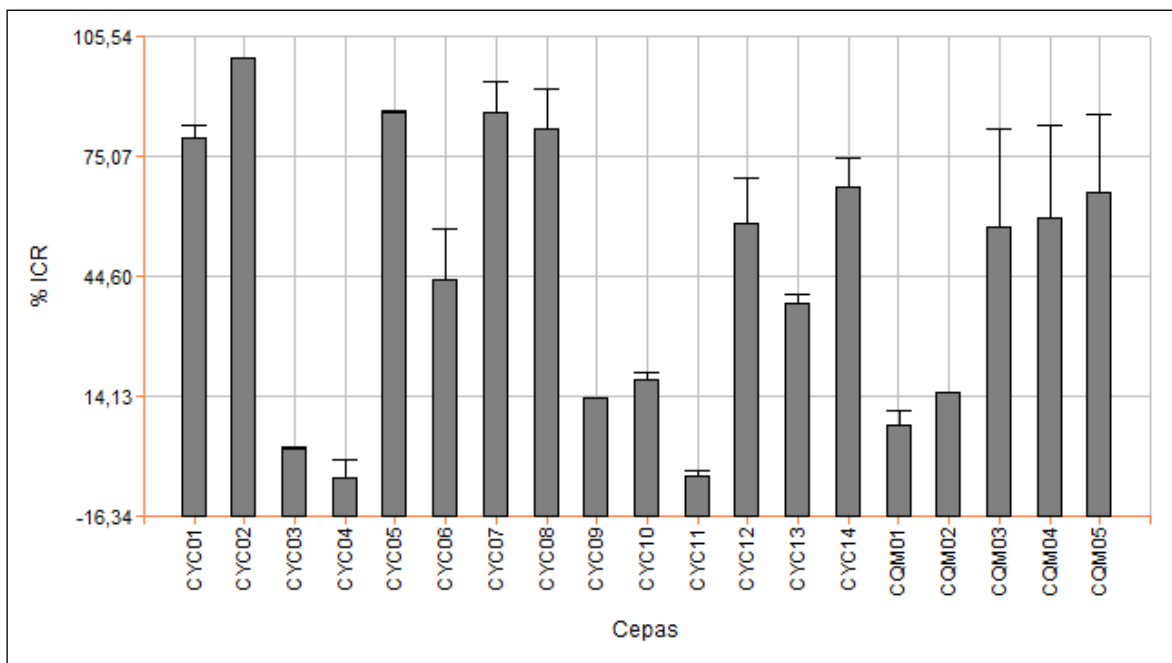


Figura 7.4. Inhibición del crecimiento micelial de *S. rolfsii* por el efecto de las cepas de *Trichoderma* aisladas del Yacimiento Caimancito y Maimara.

La antibiosis es la acción directa de antibióticos o metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo sobre otro sensible a estos. Las cepas de *Trichoderma* producen metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, algunos de los cuales inhiben el desarrollo de otros microorganismos con los que no hacen contacto físico. Como se observa en la **Figura 7.4** la antibiosis generada por la cepa *CYC02* inhibe completamente a *S. rolfsii* e indica que produce metabolitos en gran cantidad lo que aumentan su poder antagonico con 100% de ICR, mayor al obtenido en cultivos duales (Pezet *et al.*, 1999).

La técnica del papel celofán evidenció la capacidad de algunos aislados de producir metabolitos que inhibieron el crecimiento de *S. rolfsii*, en algunos casos coincidentes a la respuesta obtenida en cultivos duales con las cepas *CYC12*, *CYC01*, *CYC08*, *CYC07*, *CYC05* y *CYC02* con % ICR mayores al 50% y con cuatro cepas *CQM03*, *CQM04*, *CQM05* y *CYC14* que mostraron una mejor actividad de antibiosis que en cultivos duales. En el caso de las cepas *CYC11*, *CQM01*, *CYC09*, *CQM02* y *CYC06* con % ICR menores al 50 % las cepas tuvieron el mismo comportamiento que en cultivos duales, sin embargo las cepas *CYC04*, *CYC03*, *CYC10* y *CYC13* mostraron un control menor al observado en cultivos duales (**Tabla 7.2 y 7.3**). Esto podría deberse a que algunas de las cepas antagonistas secretan metabolitos volátiles y no volátiles afectando de manera distinta a *S. rolfsii* y la

antibiosis de estas cepas no sería el principal mecanismo de acción ya que existe el riesgo de que el patógeno sea resistente al antibiótico y que la producción metabólica de los aislamientos de *Trichoderma* presenta, al igual que el micoparasitismo, determinada especificidad (Vero & Mondino, 1999). Por ejemplo Samuels (1996), en sus resultados sobre un grupo de cepas de *Trichoderma* denominado "Q" produce gliotoxina que fue efectiva frente a *R. solani*, pero no frente a *Pythium ultimum*; mientras que otro grupo de cepas denominado "P" que excretan gliovirina mostraron resultados opuestos.

Las especies del género *Trichoderma* producen diversos metabolitos como la gliotoxina, viridina, pacibasina, trichodermina, furanona, trichorziaminas, 6-pentil- α -pirona que tienen efectos antagónicos sobre los fitopatógenos: *Pythium ultimum*, *Sclerotium rolfsii*, y *Rhizoctonia solani*, entre otros (Horvath *et al.*, 1995; Howell *et al.*, 1993; Ordentlich *et al.*, 1992; Pavlovicova, 1998; Wilhite & Straney, 1996). De modo que en las cepas estudiadas excepto las que muestran valores negativos de inhibición (**Tabla 7.3**) han producido algunos de estos metabolitos volátiles que actuaron sobre el patógeno inhibiendo su crecimiento (Yusimy Reyes, *et al.*, 2008). En ninguno de los casos se notó el olor a coco relacionado a la actividad antagónica de *Trichoderma* tal como lo expresa Dennis y Webster (1971). Respecto al porcentaje de inhibición en el método del celofán, Michel-Aceves *et al.* (2005b) reportan resultados similares al evaluar *in vitro* aislados nativos de *Trichoderma* con % ICR entre 13.10 a 94.40 % para *S. rolfsii*.

No obstante, la liberación de compuestos volátiles pudo ser diferente por las características del medio de cultivo, la disponibilidad de nutrientes y las condiciones ambientales en el mecanismo de acción de las cepas de *Trichoderma*, tal como expresa Ruiz (2010) que al trabajar con otros medios de cultivo tuvo una respuesta diferente que en medios con PDA; incluso la influencia de la temperatura en el control de *S. rolfsii* es diferente para cada cepa estudiada (Barakat *et al.*, 2006).

7.3.3. Producción de Esclerocios

El análisis de varianza y prueba de comparación de medias a través de Duncan con una ($p > 0.05$) estableció diferencias significativas entre las cepas evaluadas, destacándose las cepas provenientes del Yacimiento Caimancito que inhibieron completamente la producción de esclerocios, 2 cepas de Maimara y 5 del Yacimiento Caimancito con medias

entre 0 a 4,5 esclerocios por cm² de un promedio de 121 esclerocios por cm² del testigo (Tabla 7.4).

Tabla 7.4. Inhibición en la producción de esclerocios de *S. rolfsii* por cepas de *Trichoderma* al 7° día de desarrollo. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Cepa	Especie	Esclerocios por cm ²	
CYC03	<i>T. citrinoviride</i>	0,00	a
CYC08	<i>T. citrinoviride</i>	0,00	a
CYC11	<i>T. virens</i>	0,00	a
CYC13	<i>Trichoderma sp</i>	0,00	a
CYC04	<i>Trichoderma sp</i>	0,00	a
CYC06	<i>T. longibrachiatum</i>	0,00	a
CYC07	<i>T. longibrachiatum</i>	0,00	a
CYC01	<i>T. longibrachiatum</i>	0,00	a
CYC02	<i>T. citrinoviride</i>	0,00	a
CYC10	<i>T. harzianum</i>	0,50	a
CYC05	<i>T. citrinoviride</i>	0,50	a
CYC14	<i>T. viride</i>	0,50	a
CQM04	<i>T. atroviride</i>	1,50	a
CYC12	<i>T. harzianum</i>	1,50	a
CQM05	<i>T. atroviride</i>	3,50	a
CYC09	<i>T. atroviride</i>	4,50	a
CQM02	<i>T. harzianum</i>	26,50	b
CQM03	<i>T. atroviride</i>	32,00	b
CQM01	<i>T. harzianum</i>	105,00	c

Nuevamente la cepa CYC02 tuvo la mejor capacidad antagónica que incidió sobre la formación de esclerocios. Dicha actividad sería por la liberación de sustancias enzimáticas o antibióticas producidas por la cepa. La respuesta de las cepas de *Trichoderma* en la producción de esclerocios, coincidió con el efecto inhibitorio en el ensayos de metabolitos difusibles (Tabla 7.2 y 7.4). Estos resultados coinciden con cepas de *Trichoderma* que

tuvieron porcentajes de inhibición entre el 90 a 100 % donde los compuestos volátiles no permitieron la formación de esclerocios (Ruiz, 2015).

7.4. Conclusión

Se obtuvieron 19 nuevas cepas de *Trichoderma* de áreas contaminadas y no contaminadas con petróleo crudo que se incorporaron a la colección de hongos para el control biológico de fitopatógenos.

La disparidad en cuanto a modo de acción de los aislados de *Trichoderma* demuestra que no actúan con el mismo efecto. Todas las cepas evaluadas ejercieron inhibición radial frente a *S. rolfsii*, siendo la más agresiva en los dos ensayos la cepa CYC02 (*T. citrinoviride*) que fue clasificada con grado de antagonico de clase 2 por inhibir el crecimiento y producción de esclerocios. Este aislamiento tuvo un modo de acción favorable por competencia de nutrientes, espacio y antibiosis; creciendo rápidamente e impidiendo el desarrollo normal del fitopatógeno probado inhibiéndolo entre el 80 - 100% en los dos ensayos, lo que la diferencio de las cepas restantes.

Las cepas del Yacimiento Caimancito manifestaron una mejor acción antagonica frente a *S. rolfsii* demostrando en estos ensayos una múltiple funcionalidad.

El comportamiento antagonico de las cepas con baja antibiosis no debe ser considerado como un resultado negativo ni ser descartado, por el contrario deben ser probadas con otras pruebas de control y con otros patógenos ya que la respuesta de las cepas de *Trichoderma* no es especifica.

Estos resultados permitirán avanzar en un posible desarrollo de bioinsumos que convine el control biológico de enfermedades en suelos contaminados con petróleo y suelos no contaminados y ser llevados a campo con el fin de conocer su comportamiento frente a las condiciones ambientales.

Recomendaciones

Avanzar con estudios que permitan:

- Evaluar las cepas con porcentajes de inhibición mayores al 60 % ensayos en invernadero y en situaciones de cultivo en campo.
- Realizar estudio de antagonismo de la cepa *CYC02* con otros patógenos de los cultivos de la zona por ser la más eficiente en los dos ensayos llevados a cabo en esta investigación.
- Identificar molecularmente a la cepa *CYC02*.

Bibliografía

- Abdo, G., Álvarez, S., Bonillo, M., Rolle, R., Tapia S. (2008). Producción hortícolas sustentable. Edición INTA: 103, disponible online: www.cedafjujuy.com.ar.
- Ahmad, J. S., & Baker, R. (1987). Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, 77(2), 182-189.
- Argumedo-Delira, R., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R., Almaraz, J. J., & Peña-Cabriales, J. J. (2012). Tolerance and growth of 11 *Trichoderma* strains to crude oil, naphthalene, phenanthrene and benzo [a] pyrene. *Journal of environmental management*, 95, S291-S299.
- Barakat, R. M., Al-Mahareeq, F., & Al-Masri, M. I. (2006). Biological control of *Sclerotium rolfsii* by using indigenous *Trichoderma* spp. isolates from Palestine. *Hebron university research journal*, 2(2), 27-47.
- Bell, D.K., Wells, H.D. and Markham, C.R. (1982). *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*. 72:379-382.
- Carballo, M; Chaput, P; Fernández, O; Gonzales, L; Gruber, A; Guharay, F; Hidalgo, E; Narváez, C; López, J; Rizo, C; Rodríguez, A; Rodríguez, C; Salazar, D. (2004). Control Biológico de Plagas Agrícolas, plaguicidas aspectos ambientales. 1 ed. Nicaragua p. 232-174

-
- Casimiro Michel-Aceves, A., Antonio Otero-Sánchez, M., Rebolledo-Domínguez, O., & Lezama-Gutiérrez, R. (2005). Potencial Antagónico de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen y *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) *in vitro* e Invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(3).
 - Castro, R. (2007). Unidad de producción de microorganismos antagonistas y entomopatógenos. Departamento de Sanidad Vegetal. ESPOCH. Riobamba-Ecuador.
 - Dennis, C., & Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: II. Production of volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, 57(1), 41-IN4.
 - El-Katatny, M., Gudelj, M., Robra, K. H., Elnaghy, M., & Gübitz, G. (2001). Characterization of a chitinase and an endo- β -1, 3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(1-2), 137-143.
 - Ezziyyani, M., Sánchez, C. P., Requena, M. E., Rubio, L., & Castillo, M. E. C. (2004). Biocontrol por *Streptomyces rochei*-Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. In *Anales de Biología* (No. 26, pp. 61-68).
 - Gibbs, J.N. (1967). A study of epiphytic growth habit of *Formes annosus*. *Ann. Bot.* 31: 755-74.
 - González, I., Infante, D., Martínez, B., Arias, Y., González, N., Miranda, I., & Peteira, B. (2012). Inducción de quitinasas y glucanasas en cepas de *Trichoderma* spp. promisorias como agentes para el control biológico. *Bioteconología Aplicada*, 29(1), 12-16.
 - Guédeza, C., Cañizález, L., Castilloa, C., & Olivarb, R. (2009). Artículo original Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria* spp). *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29, 34-38.
 - Gurr, G. & Wratten, S. (2000). Measures of success in biological control. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 448 pp.

-
- Harman, G. (2002). *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum*. Hernández Perales, M. M. (2012). *Búsqueda y caracterización de microorganismos benéficos a plantas de chile poblano (Capsicum annuum L.)*(Doctoral dissertation, Facultad de Agronomía).
 - Harman, G. E. (2000). Changes in perception derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22 (Myths and dogmas of biocontrol). *The Plant Disease*, 84, 377-393.
 - Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology*, 2(1), 43-56.
 - Hjeljord, L., & Tronsmo, A. (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. *Trichoderma and Gliocladium*, 2, 131-151.
 - Howell, C. R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant disease*, 87(1), 4-10.
 - Hoyos-Carvajal, L., Chaparro, P., Abramsky, M., Chet, I., & Orduz, S. (2008). Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones *in vitro* y de invernadero. *Agronomía Colombiana*, 26(3), 451-458.
 - Khattabi, N., Ezzahiri, B., Louali, L., & Oihabi, A. B. D. A. L. L. A. H. (2004). Antagonistic activity of *Trichoderma* isolates against *Sclerotium rolfsii*: screening of efficient isolates from Morocco soils for biological control. *Phytopathologia Mediterranea*, 43(3), 332-340.
 - Lucena, S. A., Osorio, D. U., Chópita, M. S., & Tamayo, M. J. (2011). Compatibilidad *in vitro* de extractos vegetales y *Trichoderma harzianum* y su efecto en el crecimiento de *Sclerotium rolfsii* sacc. y *Sclerotium cepivorum* BERK. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 45(3).
 - Martínez B, Reyes Y, Infante D, González E, Baños H, Cruz A. (2008). Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz. *Rev Protección Veg.* 23(2):118-125.

-
- Martínez, B., Infante, D., & Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*, 28(1), 1-11.
 - Mathivanan, N., Srinivasan, K., & Chelliah, S. (2000). Biological control of soil-borne diseases of cotton, eggplant, okra and sunflower by *Trichoderma viride*/Biologische Bekämpfung bodenbürtiger Krankheiten an Baumwolle, Auberginen, Okra und Sonnenblumen mit *Trichoderma viride*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection*, 235-244.
 - Meza, N., L., T. (2015). Capacidad Antagónica de Hongos Celulolíticos frente a *Fusarium* sp. y *Macrophomina* sp.
 - Mihuta-Grimm L, Rowe C. (1986). *Trichoderma* spp. as biocontrol agents of *Rhizoctonia* damping-off of radish in organic soil and comparison of four delivery systems. *Phytopathology*. 76(3):306-312.
 - Mishra, A., Kumari, M., Pandey, S., Chaudhry, V., Gupta, K.C. & Nautiyal, C.S. (2014). Biocatalytic and antimicrobial activities of gold nanoparticles synthesized by *Trichoderma* sp. *Bioresource Technol.* 166: 235-242.
 - Mónaco, C., & Nico, A. (1999). Efecto de la temperatura sobre la interacción *in vitro* entre especies de *Trichoderma* y *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. minor* y *Sclerotium rolfii*. *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg*, 14, 1-2.
 - Pezet, R., Pont, V., and Tabacchi, R. (1999). Simple analysis of 6-Pentil-alpha-pyrone, a major antifungal metabolite of *Trichoderma* spp., useful for testing the antagonistic activity of these fungi. *Phytochemical Analysis* 10 (5):285-288.
 - Plan de Gestión Parque Nacional Calilegua, 2009.
 - Rasu, T., Sevugapperumal, N., & Ramasamy, S. (2012). Biological control of sugar beet root rot caused by *Sclerotium rolfii*. *Inter. J. Biol., Ecol. and Environ. Sci. (IJBEES)*, 2(1), 7-10.
 - Rekha, D., Patil, M. B., Shridhar Shetty, P., Swamy, K. M., & Rajini, B. G. (2012). *In vitro* screening of native *Trichoderma* isolates against *Sclerotium rolfii* causing collar rot of ground nut. *International Journal of Science and Nature*, 3(1), 117-120.

-
- Rivas, J. C. (2013). *Avances en el cultivo de quinoa (Chenopodium quinoa Wild) en el sur de Argentina*. Buenos Aires, Argentina: INTA.
 - Rosa de Lima, R. M. (1993). Métodos de selección *in vitro* para el control microbiológico de patógenos de plantas. RAPP, V I: 369-401.
 - Ruiz Rosales, A. (2015). Captura, Actividad Biológica e Identificación de Volátiles de la Interacción *Trichoderma asperellum-Sclerotium rolfsii*.
 - Ruiz, R. A. (2010). *Actividad antagónica in vitro de Trichoderma spp. propagadas en medio PDA y cuatro sustratos vegetales sobre doce cepas de Sclerotium rolfsii sacc* (Doctoral disertación, Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma de Morelos).
 - Samuels, G. J. (1996). *Trichoderma: a review of biology and systematics of the genus. Mycological Research*, 100 (8), 923-935.
 - Samuels, G. L. H., Prakash, K., Arango, U., MauricioMartínez, L., Bustillo, P., de Waard, J. R. H., & Drenth, A. (2015). *Trichoderma: identification and agricultural applications* (No. LC-0862). Drenth, André Guest, David.
 - Sarro Baro, A., Lara, J. M., & Fernández, C. (2011). [In vitro evaluation of the antagonistic capacity of *Trichoderma lignorum* FEEP TL0601 against *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici]. *Phytoma España (España)*.
 - Sivila, N., Álvarez, S. (2013). Producción artesanal de *Trichoderma*. Tecnologías agroecológicas para la agricultura familiar. Ed. UNJu, E-book: 48 disponible online: www.cedafjujuy.com.ar.
 - Sivila, N. F. (2016). *Situación sanitaria del cultivo de quinua en zonas productoras de Jujuy- Aislamiento de cepas nativas de Trichoderma spp.: una alternativa para el manejo de enfermedades fúngicas*.
 - Solórzano A. (2002). Uso adecuado de fungicidas protectores en programas para el combate de *Rhizoctonia solani* en el cultivo de papa. *I Congreso Nacional de Agricultura Conservacionista*. San José Costa Rica.
 - Stefanova, M. (2007). *Introducción y eficacia técnica del biocontrol de fitopatógenos con Trichoderma spp. en Cuba*. (No. 3194).

-
- Thakkar, A., & Saraf, M. (2015). Development of microbial consortia as a biocontrol agent for effective management of fungal diseases in *Glycine max* L. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 48(6), 459-474.
 - Torres, D., & Capote, T. (2004). Agroquímicos un problema ambiental global: uso del análisis químico como herramienta para el monitoreo ambiental. *Revista Ecosistemas*, 13(3).
 - Tronsmo, A., & Hjeljord, L. G. (1998). Biological control with *Trichoderma* species. *Plant-microbial interactions and biological control*. New York, NY, USA: Marcel Dekker, 111-126.
 - Vero SM, Mondino P. (1999) Control biológico post-cosecha en Uruguay. *Horticultura Internacional*.7:1-10.
 - Widden, P., Scattolin, V. (1988). Competitive interactions and ecological strategies of *Trichoderma* species colonizing spruce litter. *Mycologia* 80, 795-803.
 - Worasatit, N., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., & Rowland, C. (1994). Variation in pyrone production, lytic enzymes and control of *Rhizoctonia* root rot of wheat among single-spore isolates of *Trichoderma koningii*. *Mycological Research*, 98(12), 1357-1363.

CAPITULO VIII

Conclusiones

A partir de la toma de muestras de suelos contaminados y no contaminados con petróleo se aislaron cepas de *Trichoderma*. Las cepas aisladas demostraron tener una distribución cosmopolita y una plasticidad adaptativa para colonizar suelos con diferentes tipos de contaminantes.

La escala de tolerancia según el % FI permitió clasificar 19 cepas de *Trichoderma* en función de su capacidad de crecer en APG 2 % impregnados con petróleo crudo. Teniendo en cuenta las características del derrame y la clase de contaminantes de cada sitio muestreado del yacimiento, es factible que se haya generado un cambio drástico en las condiciones ambientales del suelo, induciendo probablemente proceso de adaptación de algunas cepas a dichas condiciones. De los sitios contaminados, el sitio 1 presentó el mayor número de aislamientos altamente tolerantes al petróleo crudo, principal factor de contaminación de éste sitio. Sin embargo se aislaron cepas altamente tolerantes de suelos de sitios no contaminados y del sitio 4 con niveles de contaminación mayores (petróleo crudo y desechos de la explotación). Se aislaron cepas tolerantes y moderadamente tolerantes solo de las muestras del yacimiento. En cuanto a las cepas no tolerantes, éstas fueron aisladas tanto de suelos contaminados como no contaminados.

Taxonómicamente se llegó a una aproximación en la identificación de cada una de las cepas aisladas. La sección *Longibrachiatum* solo tuvo representantes en muestras del yacimiento, mientras que las secciones *Trichoderma* y *Pachybasium* tuvieron representantes en suelos contaminados y no contaminados.

La identificación a nivel de especie resultó compleja debido a los pocos caracteres morfológicos a analizar y que son comunes entre las especies. Se complementó con la caracterización molecular para dos cepas seleccionadas por su comportamiento altamente tolerante al crudo y antagonista. El análisis molecular realizado a la cepa *CYC01* (*T. longibrachiatum*) la caracterizó como *Hypocrea andinensis* y de la *CQM05* (*T. atroviride*) como *Hypocrea lixii*/*Trichoderma harzianum*. Resultando conveniente la complementación de ambos tipos de caracterización para definir taxonómicamente a la especie.

Al evaluar la capacidad biológica de cada una de las cepas con los ensayos de tolerancia y de antagonismo *in vitro*, se observó que su potencial no tiene una relación exclusiva con las

condiciones del lugar de aislamiento sino que también puede influir la respuesta propia de la especie de *Trichoderma*. La selección de organismos autóctonos aislados de ambientes contaminados o no, pueden ser útiles en proceso de biorremediación de contaminantes orgánicos presentes en suelos a nivel local.

La respuesta de las variables evaluadas de crecimiento vegetativo y reproducción de las cepas altamente tolerantes frente al crudo, resultaron diversas, en algunos casos solo se observaron diferencias significativas en cuanto al crecimiento vegetativo, en otros solo del reproductivo y en otros no afecto ninguna de las variables. En términos generales la exposición al crudo no afecto la viabilidad de los esporos.

Al evaluar el comportamiento antagonista de éstas cepas, las cepas altamente tolerantes muestran una buena respuesta de antagonismo *in vitro* frente a *Sclerotium rolfsii*, a excepción de una de ellas. Estas cepas mostrando una funcionalidad múltiple siendo posible su selección para ensayos en la producción de bioinsumos para el control de fitopatógenos y en procesos biotecnológicos de biorremediación de suelos contaminados.

La cepa *CYC10 (AT)* podría ser una de las cepas seleccionadas para futuros ensayos de degradación de hidrocarburos, por su adaptación no solo con el petróleo crudo sino también con desechos de la explotación petrolera como metales pesados, sales disueltas, entre otros.

ANEXO 1

Medio de Cultivo

Para las observaciones morfológicas de las cepas en estudio se usaron dos medios de cultivo:

- Agar-papa-dextrosa APG 2%.

Preparación APG 2%:

36 g en 1000 ml de H₂O_d

- Medio mínimo (SNA) Spezieller Nährstoffarmer agar. Se preparó 1000 ml de solución.

Preparación (SNA):

H ₂ PO ₄	1,0 g
KNO ₃	1.0 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5 g
KCl	0.5 g
Glucosa	0.2 g
Sacarosa	0.2 g
Agar	20 g
H ₂ O _d	1000 ml

Los medios de cultivo se esterilizan durante 15 min a 121 ° C.

ANEXO 2

Secuencias obtenidas, con los iniciadores universales ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990) para amplificaron una región conservada aproximada de 500 a 550 pb de una cepa del Yacimiento Caimancito (*CYC01*) y una cepa de Maimara (*CQM05*).

CYC01

tccgtaggtgaacctgcgggggggatcattaacggaagttaaaaattccccaacccaatgtgaacgttaccatctgttgcctcg
 ggggatctctgccccgggcgctgcagccccggatcccatggcgccccggaggaccaacaaactctttttctcctcgc
 gctgcctcgcgcagcggctctgttatacttttttctctgagcctttctcgcgaccctagcgggcgtctcgaatgaatcaaac
 ttcaacaacggatctctgttctggcatcgaagaacgcagcgaatgcgataagtaatgtgaattgcagaattcagtgaatcat
 cgaatctttgaacgcacattgcgccccagctattctggcgggcatgcctgtccgagcgtcattcaacctcgaaccctccgggg
 ggtcggcggtggggatcgccccctaccgggcccggccgaaatacagtgggcgtctcggcgagcctctcctcgcagtagttt
 gcacactcgcaccgggagcgcggcgccgacagccgtaaacaccccaactctgaaatggtgacctcggatcaggttaggaat
 accgctgaactaagcatatcaataagcggagga

CQM05

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCC
 AATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTC
 GCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCCGAGGACCAACCAAACTCTTATTGTAT
 ACCCCCTCGCGGGTTTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGT
 TTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATG
 AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA
 TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTC
 CGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGG
 CCCTCCCTTAGCGGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGC
 CTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGGCGGTCCACAGC
 CGTTAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCG
 CTGAACTAAGCATATCAATAAGCAGGAGGA

ANEXO 3

Análisis de la Muestra de Petróleo por GC-MC

Es un asociación de dos técnicas, GC (“Gas Chromatography”) y MS (“Mass Spectrometry”) que da lugar a una técnica combinada GC-MS que permite la separación e identificación de mezclas complejas. La cromatografía de gases es una técnica en la que los compuestos de una muestra pasa sobre una superficie de material inmóvil (fase estacionaria que puede ser líquida o sólida) que tiene una afinidad particular para los distintos tipos de compuestos de la muestra y su separación está dada por el grado de retención en esta fase. Los compuestos se mueven por la fase estacionaria a través de un fluido adecuado (gas en cromatografía de gases) que se denomina fase móvil. En el análisis de una muestra de hidrocarburos líquidos la fase estacionaria es una película fina de metil silicona, mientras que la fase móvil es un gas inerte normalmente helio. Durante la fase estacionaria los compuestos emergen de manera individual a distintos intervalos y son transportados por la fase móvil (proceso denominado elución) que depende de la presión de vapor (Pto. de ebullición) y de su afinidad por la fase estacionaria (Ej. solubilidad). Una vez fuera de la columna del GC entran en la región de ionización del espectrómetro de masas, donde son bombardeadas por electrones energéticos que liberan iones moleculares positivos y que son acelerados en el sistema de detección (MC). Al ser inestables, se aplican campos electromagnéticos que modifican su trayectoria dependiendo de la relación masa/carga (m/z) de un ion individual; llegando al detector aquellos de un valor determinado m/z produciendo una corriente medible. Modificando estos campos, se barre un rango de valores m/z en un periodo de tiempo, registrando la corriente de iones para cada valor m/z , lo que permite construir un cromatograma y un espectro de masas separando e identificando los compuestos de la muestra analizada.

Procedimiento

En matraces de vidrio de 10 mL (marca IVA) se realizó una dilución de petróleo crudo 1:100, se tomó 100 microlitros de la muestra que se llevó a un volumen final de 10 mililitros con n-heptano calidad P/A (marca Cicarelli) en matraz aforado. Con micropipetas automáticas de volúmenes variables se tomó una alícuota de 1,5 mililitros de la solución, se filtró en equipos de acero inoxidable y se trasvaso a viales de 2,0 mililitros. Se usó gas carrier helio (He) como fase móvil.

La muestra se analizó por medio de cromatografía de gases en equipo Agilent Technologies con inyector automático modelo 7890 y por los componentes se identificaron por espectrometría de masas con detector de Masas modelo 5975 marca Agilent Technologies perteneciente al laboratorio químico según las siguientes características:

- Columna cromatográfica HP5 de 30 metros de longitud.
- Volumen de Inyección: 1,0 microlitros
- Temperatura del Inyector: 150°C

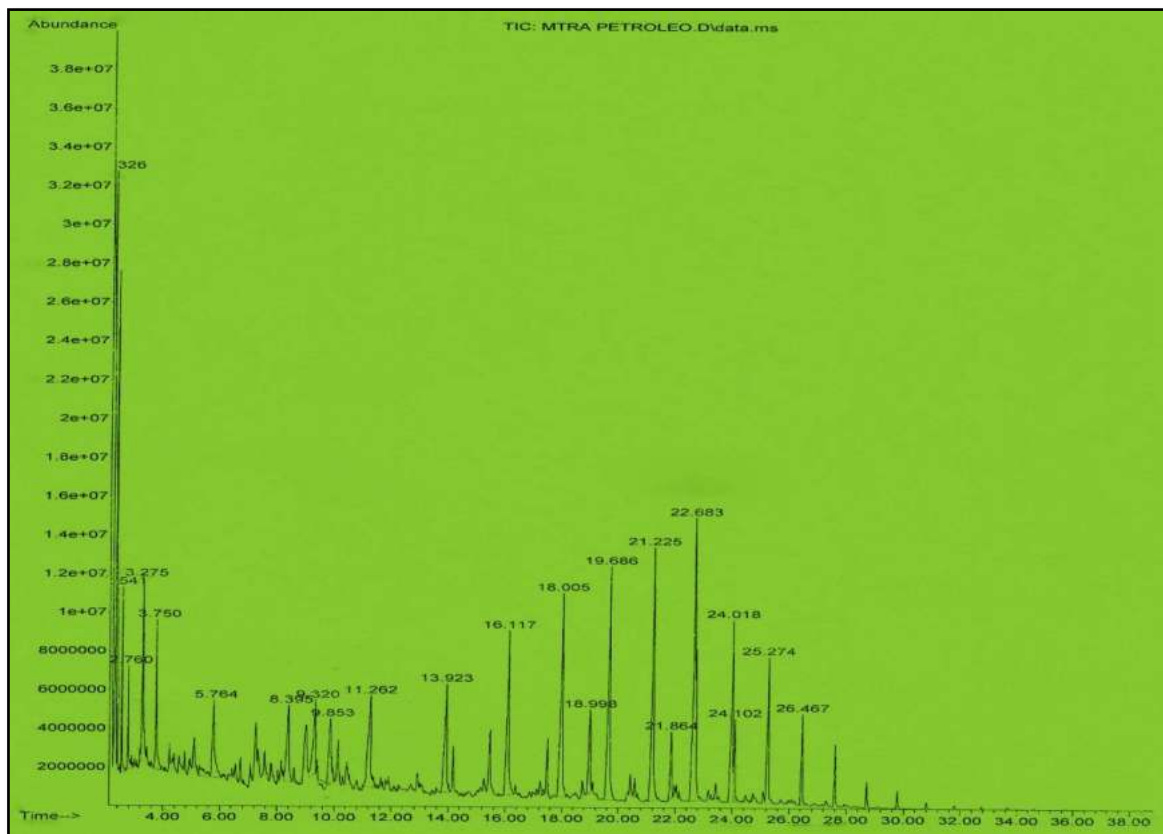
La programación de la temperatura fue la siguiente:

- Rampa 1: 60°C hasta 5 minutos
- Rampa 2: 42°C/minuto hasta 270°C
- Rampa 3: 270°C durante 10 minutos

Tiempo final de corrida: 20 minutos.

Análisis de la muestra de petróleo crudo.

En el análisis cualitativo a través GC-MS de la muestra de petróleo crudo proveniente del Yacimiento Caimancito permitió detectar, separar, cuantificar e identificar de manera aproximada los componentes individuales de la muestra.



Cromatograma obtenido del análisis de petróleo crudo del Yacimiento Caimancito.

Se recopila la información relativa a dicho cromatograma donde figura: los compuestos volátiles detectados, sus tiempos de retención y los factores de identificación correspondientes a cada uno de ellos. Se observa que estos compuestos volátiles o semivolátiles identificados son en la mayoría alcanos o hidrocarburos saturados de cadena lineal y solo un hidrocarburo aromático.

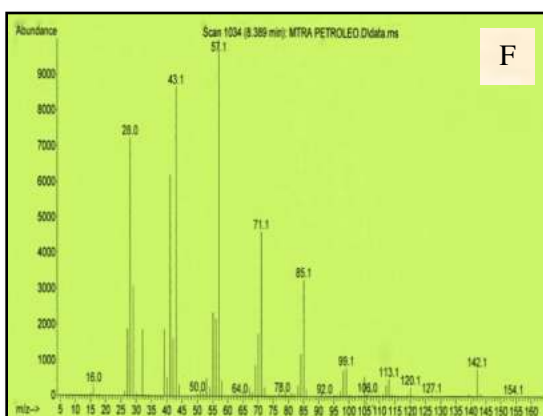
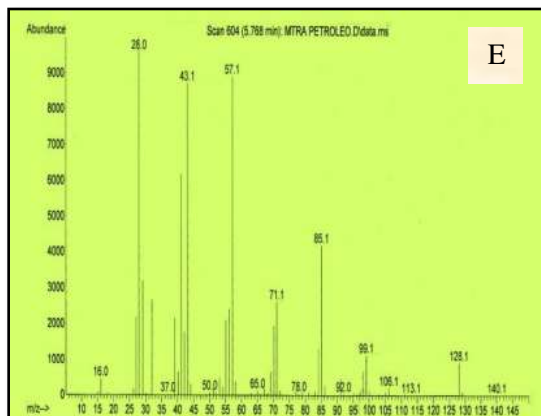
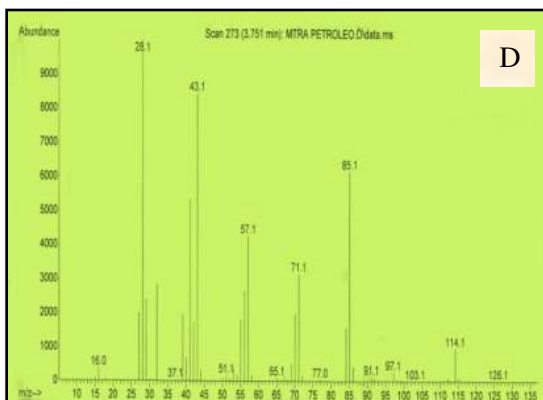
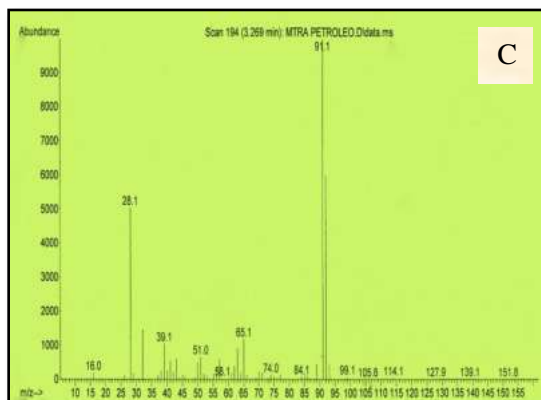
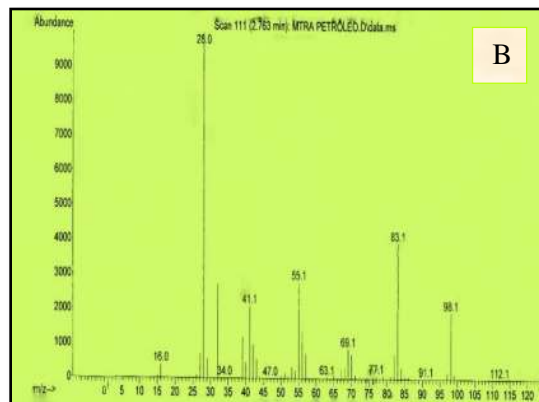
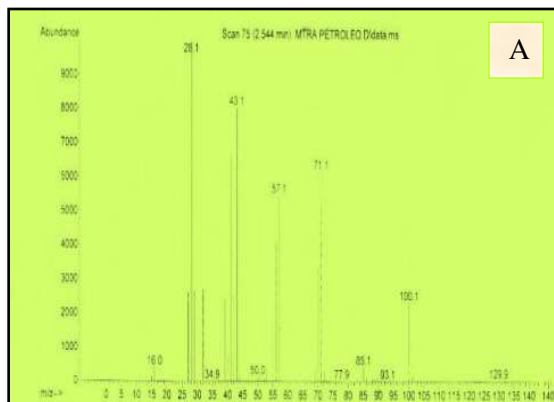
Compuestos volátiles o semivolátiles identificados a partir del cromatograma de la muestra de petróleo crudo, calidad, fórmula molecular.

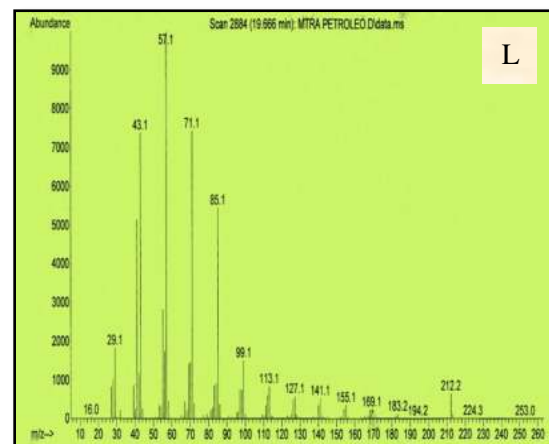
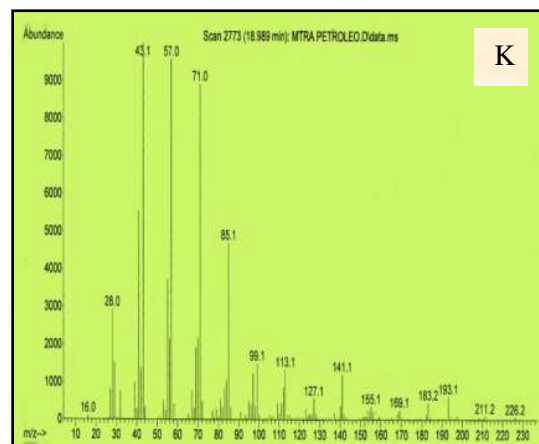
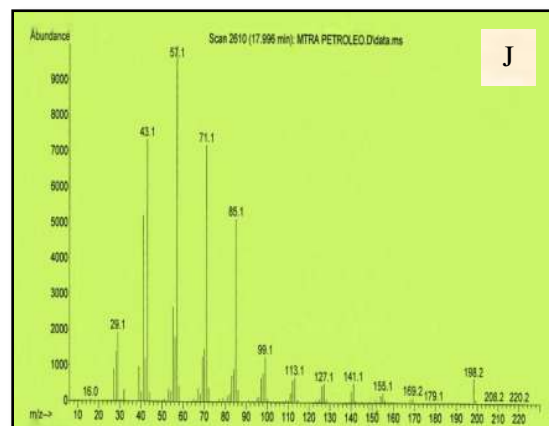
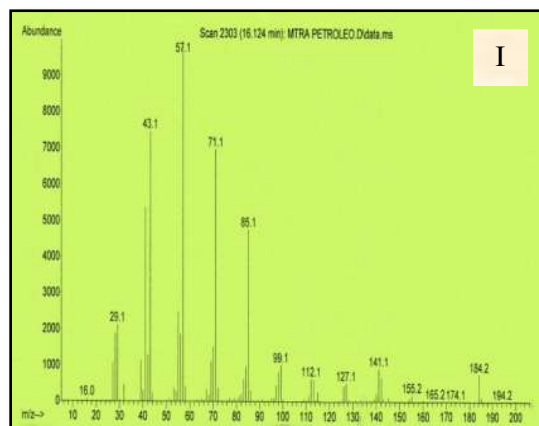
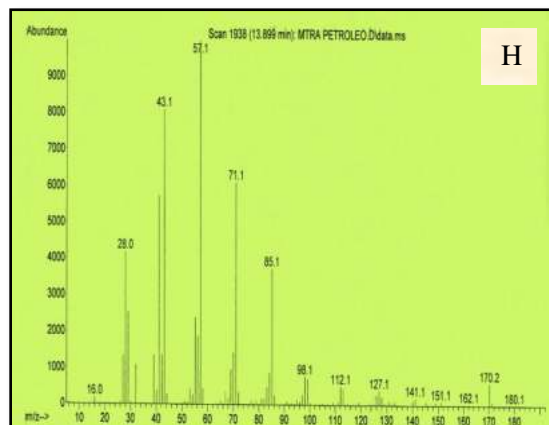
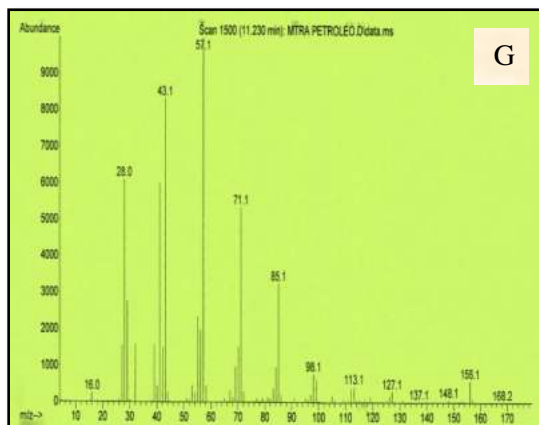
Tiempo de retención (min)	Compuesto Identificado	Calidad	FM
2.544	Heptano	80	C ₇ H ₁₆
2.763	Metil-ciclohexano	94	C ₇ H ₁₄
3.269	Tolueno	93	C ₇ H ₈
3.751	Octano	91	C ₈ H ₁₈
5.768	Nonano	90	C ₉ H ₂₀
8.389	Decano	97	C ₁₀ H ₂₂
11.230	Undecano	97	C ₁₁ H ₂₄
13.899	Dodecano	96	C ₁₂ H ₂₆
16.124	Tridecano	97	C ₁₃ H ₂₈
17.996	Tetradecano	98	C ₁₄ H ₃₀
18.989	Hexadecano	86	C ₁₆ H ₃₄
19.666	Pentadecano	98	C ₁₅ H ₃₂
21.208	Hexadecano	98	C ₁₆ H ₃₄
21.860	Heneicosano	87	C ₂₁ H ₄₄
22.658	Heptadecano	98	C ₁₇ H ₃₆
24.005	Octadecano	98	C ₁₈ H ₃₈
25.255	Nonadecano	97	C ₁₉ H ₄₀
26.450	Eicosano	98	C ₂₀ H ₄₂

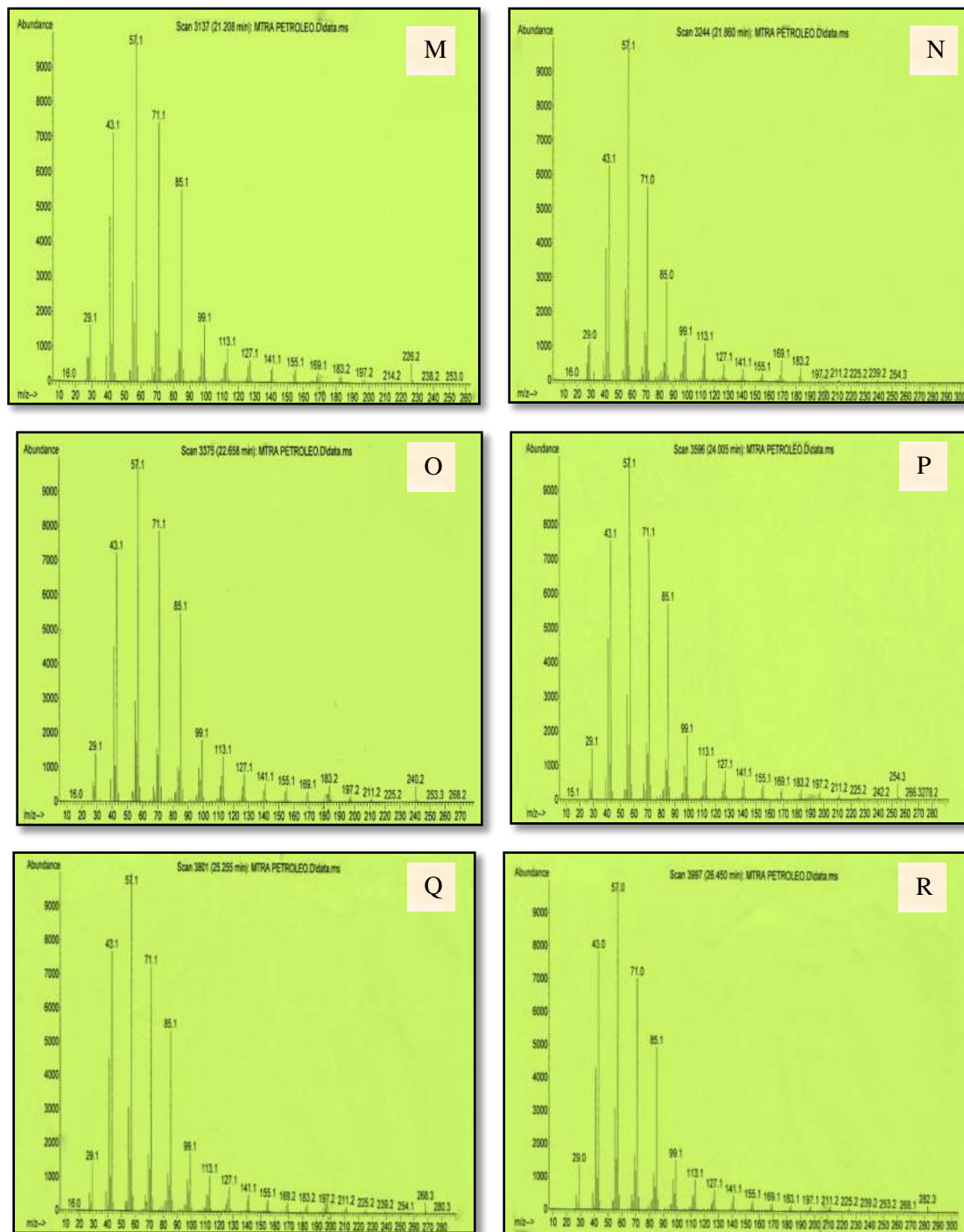
El análisis del espectrómetro de masas de los compuestos presentes en la muestra se confirmó por la comparación de los espectros de masas (obtenidos en los tiempos de retención correspondientes) con los espectros almacenados en la librería con un rango del 80 al 99 % que aproxima a su identificación individual.

Los espectros de masas de cada uno de los componentes de la muestra de petróleo crudo analizada es el resultado de la ionización de las moléculas presentes en la muestra al pasar de la columna del GC a la región de ionización del espectrómetro de masas MC donde los

iones cargados positivamente pasan a través de un campo magnético con una relación masa/carga individual (m/z).







Espectro de masas de los componentes individuales de petróleo crudo provenientes del yacimiento caimancito: A) *Heptano* B) *Ciclotetrahidropentano*; C) *Tolueno*; D) *Octano*; E) *Nonano*; F) *Decano*; G) *Undecano*; H) *Dodecano*; I) *Tridecano*; J) *Tetradecano*; K) *Hexadecano*; L) *Pentadecano*; M) *Hexadecano*; N) *Heneicosano*; O) *Heptadecano*; P) *Octadecano*; Q) *Nonadecano* y R) *Eicosano*.