



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**“DETERMINACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE AGENTES  
MICROBIANOS PARA LA DEGRADACIÓN DE TENSOACTIVOS  
DODECIL BENCEN SULFONATO DE SODIO LINEAL PRESENTE  
EN DETERGENTES”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**  
**TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

Presentado para optar el grado académico de:  
**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL**

**AUTORA:** MARÍA DE LOURDES MENESES CALI  
**DIRECTORA:** Dra. Cs. ROSA DEL PILAR CASTRO GÓMEZ

**RIOBAMBA – ECUADOR**

2018

**2018, María de Lourdes Meneses Cali**

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARRERA DE CIENCIAS QUÍMICAS**

El Tribunal del trabajo de titulación certifica que: El trabajo de investigación: **“DETERMINACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE AGENTES MICROBIANOS PARA LA DEGRADACIÓN DE TENSOACTIVOS DODECIL BENECEN SULFONATO DE SODIO LINEAL PRESENTE EN DETERGENTES”**, de responsabilidad de la señorita MARÍA DE LOURDES MENESES CALI, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Ing. César Puente  
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Dr. Cs Rosa Castro  
**DIRECTORA**  
**TRABAJO DE TITULACION**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Ing. Rafaela Pacurucu  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## **DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo, María de Lourdes Meneses Cali, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

María de Lourdes Meneses Cali

0603913583

Yo, MARÍA DE LOURDES MENESES CALI soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación le pertenece a la Escuela Superior Politécnica De Chimborazo.

María De Lourdes Meneses Cali

## **DEDICATORIA**

A nuestro Padre Dios, por bendecirme en cada momento de mi vida, a mis padres Carmen y Antonio por ser mis guías, mis consejeros en todo tiempo y por su amor incondicional que siempre me han demostrado, a mi hija Alisson Estefanía porque me permites ser mejor persona, y me inspiras a seguir adelante, por ser mi fortaleza en mis días difíciles, y a mis hermanos y hermanas por el apoyo que siempre me han brindado.

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios y a la Virgencita por bendecirme con todo lo que tengo, mi familia, maestros y amigos por darme la alegría de disfrutar junto a ellos.

A mis maestros de vida, mis padres quien con su ejemplo y paciencia he logrado pasar cualquier obstáculo y toda mi hermosa familia porque gracias a su apoyo e todas las etapas de mi vida he podido culminar una de mis metas

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, por haberme permitido crecer como persona y profesional a todos mis docentes por aportar con sus conocimientos en mi formación académica y de manera muy especial a mis maestras y guías en este trabajo Dra. Rosita Castro y Dra. Marcita Pesántez por compartir sus conocimientos y su dedicación convirtiéndose parte muy importante en la culminación de mi carrera y sobre todo por el cariño y humildad que me han demostrado.

A Dennys por ser un buen padre para mi hija y demostrarme hasta hoy que ella es lo más importante en su vida.

A mis amigos que con sus consejos formaron parte importante de mi vida, y en momentos de oscuridad me mostraron su verdadera amistad.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>TABLA DE CONTENIDO</b> .....	viii
<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS</b> .....	xii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	xiii
<b>ÍNDICE DE GRÁFICOS</b> .....	xiv
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	xv
<b>RESUMEN</b> .....	xvi
<b>ABSTRACT</b> .....	xvii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1

### CAPÍTULO I

1.1.	<b>ANTECEDENTES</b> .....	5
1.2.	<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	8
1.2.1.	<i>Principales componentes de los detergentes</i> .....	8
1.2.2.	<i>Agentes tensoactivos</i> .....	8
1.2.3.	<i>Propiedades de un agente tensoactivo</i> .....	9
1.2.4.	<i>Principales familias de los tensoactivos</i> .....	10
1.2.4.1.	<i>Tensoactivos Aniónicos</i> .....	10
1.2.5.	<b>Biodegradación</b> .....	11
1.2.5.1.	<i>Biodegradabilidad primaria</i> .....	12
1.2.5.2.	<i>Biodegradabilidad final o mineralización</i> .....	12
1.2.5.3.	<i>Biodegradabilidad ambientalmente aceptable</i> .....	12
1.2.6.	<b>Crecimiento microbiano</b> .....	12
1.2.6.1.	<i>La fase de latencia</i> .....	13
1.2.6.2.	<i>La fase exponencial o logarítmica</i> .....	13
1.2.6.3.	<i>La fase estacionaria</i> .....	13
1.2.6.4.	<i>La fase de muerte</i> .....	14



1.2.7.	<b>Métodos de medición del crecimiento</b> .....	14
1.2.7.1.	<i>Conteo microscópico directo</i> .....	14
1.2.7.2.	<i>Conteo de células viables</i> .....	15
1.2.8.	<b>Agentes Microbianos</b> .....	15
1.2.8.1.	<i>Trichoderma</i> .....	16
1.2.8.2.	<i>Clasificación taxonómica</i> .....	16
1.1.8.2.1.	<i>Características de Trichoderma harzianum</i> .....	17
1.2.8.3.	<i>Bacillus</i> .....	18
1.2.8.3.1.	<i>Características</i> .....	19
1.2.8.3.2.	<i>Clasificación taxonómica</i> .....	20
1.2.8.3.3.	<i>Mecanismos de acción</i> .....	20
1.2.8.4.	<i>Microorganismos eficientes (EM)</i> .....	21
1.2.8.4.1.	<i>Características</i> .....	21
1.2.8.5.	<i>Microorganismos del (EM)</i> .....	21
1.2.8.5.1.	<i>Bacterias del ácido láctico</i> .....	22
1.2.8.5.2.	<i>Levaduras</i> .....	22
1.2.8.5.3.	<i>Bacterias fotosintéticas</i> .....	22

## CAPITULO II

2.	<b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....	24
2.1.	<b>Tipo y diseño de la investigación</b> .....	24
2.1.1.	<i>Por el tipo de investigación</i> .....	24
2.1.2.	<i>Por la temporalidad</i> .....	24
2.1.3.	<i>Por el tipo de enfoque</i> .....	24
2.1.4.	<i>Por el diseño de investigación</i> .....	24
2.1.5.	<i>Lugar de la investigación</i> .....	24
2.1.6.	<i>Población de estudio</i> .....	25
2.1.7.	<i>Tamaño de la muestra</i> .....	25

2.1.8.	<i>Selección de la muestra</i> .....	25
2.1.9.	<i>Material biológico</i> .....	25
2.1.10.	<i>Diseño experimental</i> .....	25
2.1.11.	<i>Unidad de análisis</i> .....	27
2.2.	<b>Técnicas de recolección de datos</b> .....	27
2.2.1.	<i>Fase de laboratorio</i> .....	27
2.2.2.	<i>Tratamientos estadísticos</i> .....	27
2.2.3.	<i>Mecanismos</i> .....	28
2.2.3.1.	<i>Preparación de las diferentes concentraciones del detergente</i> .....	28
2.2.3.2.	<i>Inoculación de <i>Trichoderma harzianum</i>, <i>Bacillus subtilis</i> y microorganismos eficientes(EM), en las diferentes concentraciones</i> .....	28
2.2.3.3.	<i>Cuantificación de esporas mediante la cámara de Neubauer</i> .....	29
2.2.3.4.	<i>Determinación de la concentración del tensoactivo en el detergente</i> .....	30

### CAPÍTULO III

3.	<b>MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN</b> .....	31
3.1.	<b>Análisis de la concentración inicial del tensoactivo dodecil bencen sulfonato de sodio lineal presente en detergentes</b> .....	31
3.2.	<b>Evaluación a nivel del laboratorio de la tolerancia de <i>Trichoderma harzianum</i>, <i>Bacillus subtilis</i>, y microorganismos eficientes</b> .....	32
3.2.1.	<i>Evaluación a nivel del laboratorio de la tolerancia de <i>Trichoderma harzianum</i> en la degradación del tensoactivo</i> .....	32
3.2.2.	<i>Evaluación a nivel del laboratorio de la tolerancia de <i>Bacillus subtilis</i> en la degradación del tensoactivo</i> .....	35
3.2.3.	<i>Evaluación a nivel del laboratorio de la tolerancia de microorganismos eficientes en la degradación del tensoactivo</i> .....	37
3.3.	<b>Análisis de varianza para la cuantificación de <i>Trichoderma harzianum</i>, <i>Bacillus subtilis</i>, y microorganismos eficientes a los 8, 16, 24 y 32 días</b> .....	40

3.3.1.	<i>Análisis de varianza para la cuantificación <i>Trichoderma harzianum</i>, <i>Bacillus subtilis</i>, y microorganismos eficientes a los 8 días</i>	40
3.3.2.	<i>Análisis de varianza para la cuantificación <i>Trichoderma harzianum</i>, <i>Bacillus subtilis</i>, y microorganismos eficientes a los 16 días</i>	41
3.3.3.	<i>Análisis de varianza para la cuantificación <i>Trichoderma harzianum</i>, <i>Bacillus subtilis</i>, y microorganismos eficientes a los 24 días</i>	44
3.3.4.	<i>Análisis de varianza para la cuantificación de <i>Trichoderma harzianum</i>, <i>Bacillus subtilis</i>, y microorganismos eficientes a los 32 días</i>	46
3.4.	<b>Evaluación de los agentes microbianos en la degradación del tensoactivo dodecil bencen sulfonato de sodio lineal</b>	47
3.4.1.	<i>Determinación de <i>Trichoderma harzianum</i> en la degradación del tensoactivo en diferentes concentraciones</i>	48
3.4.2.	<i>Determinación de <i>Bacillus subtilis</i> en la degradación del tensoactivo en diferentes concentraciones</i>	49
3.4.3.	<i>Determinación de microorganismos eficientes en la degradación del tensoactivo en diferentes concentraciones.</i>	50
3.5.	<b>Análisis de varianza para la determinación del agente microbiano más eficiente en la degradación del tensoactivo</b>	51
<b>CONCLUSIONES</b>		53
<b>RECOMENDACIONES</b>		54
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		
<b>ANEXOS</b>		

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>FRN</b>	Facultad de Recursos Naturales
<b>mg/l</b>	miligramos por litros
<b>UFC/ml</b>	Unidades formadoras de colonias por mililitro
<b>C1</b>	Concentración de la cantidad de detergente recomendada por el fabricante
<b>C2</b>	Concentración doble de la cantidad de detergente a la recomendada por el fabricante
<b>C3</b>	Concentración promedio del doble de la cantidad de detergente recomendada por el fabricante
<b>C4</b>	Concentración media de la cantidad detergente a la recomendada por el fabricante
<b>C5</b>	Concentración de la cuarta parte de la cantidad detergente a la recomendada por el fabricante
<b>TTEST</b>	Testigo <i>T. harzianum</i> sin detergente
<b>BTEST</b>	Testigo <i>B. subtilis</i> sin detergente
<b>METEST</b>	Testigo microorganismos eficientes sin detergente.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-1:</b> Consumo de tensoactivos por regiones.....	5
<b>Figura 2-1:</b> Componentes de las formulaciones detergentes.....	8
<b>Figura 3-1:</b> Disposición de un tensoactivo en el agua.....	8
<b>Figura 4-1:</b> Estructura de una micela.....	9
<b>Figura 5-1:</b> Álquilbenceno sulfonato lineal.....	11
<b>Figura 6-1:</b> Curva de crecimiento microbiano.....	13
<b>Figura 7-1:</b> Cámara de Neubauer.....	15
<b>Figura 8-1:</b> Estructura de <i>Trichoderma harzianum</i> .....	17
<b>Figura 9-1:</b> Morfología de colonias <i>Bacillus subtilis</i> .....	19
<b>Figura 10-1:</b> Especies de microorganismos eficientes.....	21
<b>Figura 1-2:</b> Cuantificaciones de esporas (Cámara Neubauer).....	30
<b>Figura 1-3:</b> Fotografías de la cámara de Neubauer lectura primera semana de su inoculación (A) y después de 2 semanas de su inoculación (B).....	39

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-3.</b> Comportamiento de la población de <i>T. harzianum</i> frente a 5 concentraciones de tensoactivo.....	33
<b>Gráfico 2-3.</b> Comportamiento de la población de <i>B. subtilis</i> frente a 5 concentraciones de tensoactivo.....	35
<b>Gráfico 3-3.</b> Comportamiento de la población de microorganismos eficientes frente a 5 concentraciones de tensoactivo.....	37
<b>Gráfico 4-3.</b> Acción de <i>Trichoderma harzianum</i> sobre el tensoactivo.....	48
<b>Gráfico 5-3.</b> Acción de <i>Bacillus subtilis</i> sobre el tensoactivo.....	49
<b>Gráfico 6-3.</b> Acción del consorcio de microorganismos eficientes sobre el tensoactivo.....	50

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1:</b> Resultados de biodegradación de tensoactivos aniónicos en ensayos con medio sintético.....	6
<b>Tabla 2-1:</b> Acrónimos de las principales familias de los tensoactivos.....	10
<b>Tabla 3-1:</b> Clasificación taxonómica del género <i>Trichoderma</i> .....	16
<b>Tabla 4-1:</b> Clasificación taxonómica del género <i>Bacillus</i> .....	20
<b>Tabla 1-2:</b> Tratamientos a nivel de laboratorio para determinar el crecimiento y estabilidad de los agentes microbianos.....	26
<b>Tabla 2-2:</b> cantidad de detergente en diferentes concentraciones.....	28
<b>Tabla 1-3:</b> Concentraciones superiores e inferiores de detergente.....	31
<b>Tabla 2-3:</b> concentración inicial del tensoactivo sin tratamiento.....	32
<b>Tabla 3-3:</b> Análisis de varianza para la variable de cuantificación de esporas a los 8 días.....	40
<b>Tabla 4-3:</b> Prueba de Tukey al 5% para la cuantificación de esporas a los 8 días.....	40
<b>Tabla 5-3:</b> Análisis de varianza para la variable de cuantificación de esporas a los 16 días.....	41
<b>Tabla 6-3:</b> Prueba de Tukey al 5% para la cuantificación de esporas a los 16 días.....	42
<b>Tabla 7-3:</b> Análisis de varianza para la variable de cuantificación de esporas a los 24 días.....	44
<b>Tabla 8-3:</b> Prueba de tukey al 5% para la cuantificación de esporas a los 24 días.....	44
<b>Tabla 9-3:</b> Análisis de varianza para la variable de cuantificación de esporas a los 32 días.....	46
<b>Tabla 10-3:</b> Prueba de Tukey al 5% para la cuantificación de esporas a los 32 días.....	46
<b>Tabla 11-3:</b> análisis de varianza para la variable de disminución de porcentaje a los 32 días del tratamiento.....	51
<b>Tabla 12-3:</b> Prueba de Tukey al 5% para el porcentaje de disminución a los 32 días del tratamiento.....	52

## RESUMEN

En esta investigación se determinó la eficiencia de *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis* y Microorganismos eficientes, para la degradación del tensoactivo dodecil bencen sulfonato de sodio lineal presente en detergentes siendo éste, utilizado como sustrato para los microorganismos. Se aplicaron cinco tratamientos por cada uno de los microorganismos a concentraciones diferentes del tensoactivo, dos superiores (C2 y C3), dos inferiores (C4 y C5) y uno igual a la cantidad que recomienda el fabricante (C1) y un testigo sin detergente (TEST), por triplicado. Cada una de las concentraciones fueron aforadas a 1000 ml de agua y agitadas hasta homogenizarlas. Posteriormente cada unidad experimental fue inoculada con 100 ml del bioproducto. Se determinó el número de esporas mediante cuantificación con la cámara de Neubauer cada 4 días durante 32 días. Se conoció la concentración de tensoactivo contenido en los ensayos a los 32 días por el método HACH 8028. Existió mayor concentración de esporas en el tratamiento MEC2 (*representa el doble de la cantidad de detergente a la recomendada por el fabricante*) con  $6.537 \times 10^7$  UFC/ml a los 32 días. El análisis estadístico ANOVA determinó un coeficiente de variación de 8.34%. Transcurridos los 32 días de los ensayos el mayor porcentaje de degradación del tensoactivo se presentó en los tratamientos MEC2 (*representa el doble de la cantidad de detergente a la recomendada por el fabricante*) y MEC4 (*representa la mitad de la cantidad de detergente a la recomendada por el fabricante*) con valores de (75.02% y 73.59%). Se concluye que la mayor eficiencia dieron los (EM) Microorganismos eficientes para la degradación del tensoactivo, por lo que se recomienda su aplicación en concentraciones elevadas de tensoactivos.

**Palabras claves:** <AGENTES MICROBIANOS>, <DEGRADACIÓN DE TENSOACTIVOS>, <CUANTIFICACIÓN CONIDIAL>, <MICROORGANISMOS EFICIENTES>, <HONGO (*Trichoderma harzianum*)>, <BACTERIA (*Bacillus subtilis*)>



## ABSTRACT

In this research, the efficiency of *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis* and efficient Microorganisms was determined for the degradation of the linear sodium dodecylbenzene sulfonate surfactant present in detergents, being this one used as a substrate for microorganisms. Five treatments were applied for each of the microorganisms at different concentrations of the surfactant, two higher (C2 and C3), two lower (C4 and C5) and one equal to the amount recommended by the manufacturer (C1) and a control without detergent (TEST), in triplicate. Each one of the concentrations was calibrated to 1000 ml of water and agitated until homogenized. Subsequently, each experimental unit was inoculated with 100 ml of the bioproduct. The number of spores was determined by quantification with the Neubauer chamber every 4 days for 32 days. The concentration of surfactant contained in the tests at 32 days was known by the HACH 8028 method. There was a higher concentration of spores in the MEC2 treatment (*it represents twice the amount of detergent recommended by the manufacturer*) with  $6.537 \times 10^7$  CFU/ml at 32 days. The ANOVA statistical analysis determined a coefficient of variation of 8.34%. After the 32 days of the test, the highest percentage of degradation of the surfactant occurred in the MEC2 treatments (*it represent twice the amount of detergent recommended by the manufacturer*) and MEC4 (*represent half the amount of detergent recommended by the manufacturer*) with values of (75.02% and 73.59%). It is concluded that the highest efficiency gave the (EM) efficient microorganisms for the degradation of the surfactant, so its application is recommended in high concentrations of surfactants.

**Keywords:** <MICROBIAL AGENTS> <DEGRADATION OF SURFACTANTS>  
<CONIDIAL QUANTIFICATION> <EFFICIENT MICROORNISMS> <FUNGUS  
(*Trichoderma harzianum*)> <BACTERIA (*Bacillus subtilis*)>

## INTRODUCCIÓN

### IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

En la actualidad la contaminación de los ecosistemas acuáticos se ha incrementado de manera alarmante debido a las descargas de aguas residuales no tratadas de origen urbano. Asociados a estos vertidos se encuentran contaminantes orgánicos como los detergentes, cuya presencia en el medio receptor puede ocasionar problemas de toxicidad a la biota acuática (Peraza y Delgado, 2012. p.138).

El ingrediente principal de los detergentes son los agentes tensoactivos; los tensoactivos aniónicos, se encuentran entre los contaminantes de naturaleza orgánica de mayor trascendencia a nivel mundial (Lewis, 1986, citado en Lannacone & Alvaríño, 2002. p.82) señala que los detergentes causan problemas de espuma en aguas superficiales, lagos, plantas de aguas residuales, o bien se infiltran bajo la tierra, contaminando las aguas subterráneas.

Uno de los problemas con mayor impacto en el agua de carácter tóxico y carcinógeno, se destacan los alquilbenceno sulfonatos lineales (LAS), o también conocido como dodecibenceno sulfonato de sodio lineal que se encuentra dentro del grupo de los tensoactivos aniónicos, compuesto principal del detergente (Scott y Jones, 2000, citado en Martínez, 2005), ocasionando varios impactos sobre el ambiente como es la eutrofización; este proceso de progresiva concentración de materia orgánica y nutriente como el fósforo, causa la contaminación de algunos lagos y embalses identificándose por el tono verdoso que tiene el agua. Las aguas eutrofizadas no son aptas para el consumo humano si no reciben un costoso tratamiento.

La producción mundial de tensoactivos en detergentes estimó un incremento anual de 500.000 toneladas y casi todo llega al medio acuático, los detergentes con tensoactivos aniónicos son los que más se acumulan en este medio (Ríos, 2014. p. 35).

En Ecuador, la información revela que el mercado de productos para lavado de prendas creció entre 2010 y 2015 en un 13,1%. Los detergentes en polvo aún tienen la mayor preferencia del público en el país porque solo el 34% de la población tiene una lavadora. El 55% lava a mano y prefiere usar este tipo de productos frente a los jabones (Estrella, 2016).

## **Formulación del problema**

Con el enunciado planteado, esta investigación conlleva a la formulación de la pregunta central del problema:

¿Cuál de los agentes microbianos empleados es más eficiente en la degradación de dodecil bencen sulfonato de sodio lineal presentes en detergentes?

## **JUSTIFICACIÓN**

La actividad antrópica ha generado una serie de productos químicos extraños para la naturaleza (xenobioticos), donde los ecosistemas actúan como receptores de dichos compuestos, sufriendo procesos de degradación, transformación y acumulación (Sánchez, 2007, p.1-2).

Los detergentes son de mayor uso a nivel mundial provocando cada vez más efectos negativos con altos niveles de contaminación en recursos hídricos, ya que estos poseen compuestos con tensoactivos aniónicos como dodecil bencen sulfonato de sodio lineal.

Dodecil bencen sulfonato de sodio lineal son uno de los tensoactivos de mayor interés de estudio, sobre todo en aspectos relacionados con su biodegradabilidad primaria y total. Algunos de los motivos por los que han alcanzado tanta importancia son, entre otros: la preocupación acerca del anillo bencénico de la molécula puede ser bioresistente y acumularse en el agua, y por lo tanto que el compuesto no sea totalmente biodegradable, y además el elevado volumen de este tensoactivo alcance en el medio natural (Ríos, 2010, p.165).

El desarrollo de esta investigación contribuirá a la recuperación de aguas contaminadas con tensoactivos aniónicos entre los cuales se encuentra dodecil bencen sulfonato de sodio lineal, mediante la aplicación de tratamientos microbiológicos que son una alternativa ambiental, además es responsable de la mayoría parte de los procesos de degradación, reciclado de materia orgánica y compuestos químicos (Atlas & Bartha, 2002, citado en Sánchez, 2007, p.2).

Los tratamientos que se proponen son, 1) *Trichoderma harzianum*, 2) *Bacillus subtilis* y 3) microorganismos eficientes (EM), donde se comparará qué tratamiento con estos agentes microbianos es el más eficiente en la degradación de estos tensoactivos.

Una vez identificado la eficiencia de los agentes microbianos, más adelante permitirá profundizar la investigación, permitiendo enfocarnos en un tratamiento microbiano específico, para posteriormente aplicar en tratamientos de aguas residuales, lo que permitirá que esta mantenga mejor su calidad. Así mismo, se beneficiará directa e indirecta a todas las personas que se encuentren cercas de estas aguas tratadas, se protegerá los suelos, las fuentes de agua y la biodiversidad de la zona.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Determinar la efectividad de agentes microbianos para la degradación de tensoactivos dodecil bencen sulfonato de sodio lineal presentes en detergentes.

### **Objetivos Específicos**

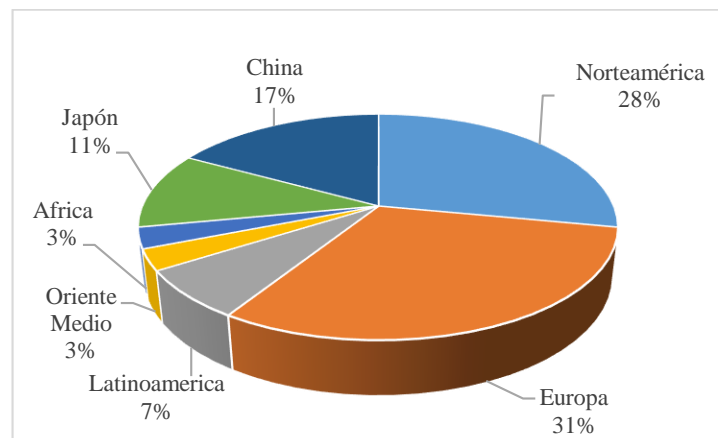
- Analizar la concentración inicial del tensoactivo dodecil bencen sulfonato de sodio lineal presente en detergentes.
- Evaluar a nivel del laboratorio la tolerancia de una cepa de *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, y microorganismos eficientes (EM).
- Determinar el agente microbiano más eficiente para la degradación de tensoactivos dodecil bencen sulfonato de sodio lineal presente en detergentes

# CAPÍTULO I

## 1.1. ANTECEDENTES

Los detergentes son formulaciones diseñadas para tener propiedades de limpieza. Estas formulaciones constan de agentes tensoactivos aniónicos como dodecil bencen sulfonato de sodio (Martínez, 2005).

La fig. 1.1 muestra el consumo de tensoactivos por regiones en 2012, considerando la producción total de tensoactivos, alrededor del 60% corresponde a tensoactivos utilizados en detergentes domésticos, mientras que un 30% es empleado en aplicaciones técnicas e industriales, un 7% en limpieza industrial y el resto en productos de higiene corporal (Velásquez, 2016, p.34).



**Figura 1-1** Consumo de tensoactivos por regiones

**Fuente:** Velásquez, 2016, p.34

**Realizado por:** Meneses, L. 2018

La toxicidad que presentan los tensoactivos en aguas limpias resulta ser mayor que en aguas contaminadas, debido a la adsorción de los tensoactivos sobre la materia orgánica en suspensión de estas últimas, con lo que se reduce la cantidad del tensoactivo en disolución (Sánchez, 1995, citado en Ríos, 2010, p.47).

El principal agente tensoactivo que se usa en los detergentes de lavandería y de productos de limpieza es el dodecibencensulfonato de sodio lineal ( $C_{12}H_{25}-C_6H_4-SO_3Na$ ) siendo uno de los tensoactivos más utilizados en la fabricación de detergentes comerciales (Perales, 2001, citado en Velásquez, 2016, p.20).

Se han desarrollado numerosos métodos para la investigación y vigilancia de numerosos compuestos, entre ellos los tensoactivos. Aunque la eliminación de estos productos del medio ambiente acuático puede ocurrir mediante procesos abióticos tales como la absorción, hidrólisis y fotólisis, la conversión total de la materia orgánica en productos inorgánicos es debida a procesos de biodegradación microbiana (Swisher, 1987, citado en Lechuga, 2005, p.52).

La biodegradación constituye uno de los principales procesos de transformación de los compuestos xenobióticos en el medio acuático. Durante dicho proceso, los microorganismos utilizan los tensoactivos como fuente de energía (procesos catabólicos) y/o sustrato (procesos anabólicos) (Ying, 2002, p.218).

En el proceso de biodegradación de compuestos orgánicos intervienen numerosas variables tales como las características físico-químicas del medio (oxígeno disuelto, temperatura, concentración de nutrientes, etc.), las características físico-químicas del compuesto (solubilidad, concentración, etc.) y/o los microorganismos presentes (tipos, concentración, etc.).

En la tabla 1-1 se recogen los resultados por diversos autores para ensayos de biodegradabilidad en los que se emplean medios sintéticos con concentraciones de inóculos ( $10^2 - 10^3$  bacterias/ ml) (Perales, 2001, citado en Ríos, 2010, p.165).

**Tabla 1-1 :** Resultados de biodegradación de tensoactivos aniónicos en ensayos con medio sintético.

Compuesto	So (mg/L)	% Biodeg.	t, días	Referencia
LAS	5	100	7	Swisher (1966)
LAS	5	100	21	Sengul (1980)
LAS	(2-5)	91-96	5-10	Hrsak (1981)
C <sub>12</sub> -LAS	30	95	5	Kravetz (1982)
C <sub>13</sub> -LAS	30	95	28	Kravetz (1982)
LAS	5.5	95	28	Gerike (1987)
LAS	32	99	4	Boatman (1986)

**Fuente:** Ríos (2010).

**Realizado por:** Meneses, L. 2018

La mayoría de los conocimientos ha sido ganado a través de la investigación de los caminos Dodecilbenzeno sulfonato. La biodegradación se ha estudiado en *Bacillus sp.* esta cepa oxida la cadena lateral y el anillo aromático de Dodecilbenzeno Sulfonato (Van Ginkel, 1996, p.156).

Estudios realizados por científicos alemanes Swisher y Schöber, determinaron la biodegradabilidad del Dodecil Benzeno Sulfonato de sodio (SDBS), e indican que su degradación

en el agua, inicia con la oxigenación de un grupo metilo terminal de la cadena alquílica y la conversión del alcohol a un grupo carboxílico, originando el sulfonilcarboxilato como intermediario de biodegradación. Estos compuestos intermedios poseen una toxicidad mucho menor que la molécula madre (Baltodano & Moreno, 2013, p.17).

La degradación del dodecil benceno sulfonato de sodio (SDBS), inicia con una  $\omega$ -oxidación que es provocada por la interacción de los microorganismos y enzimas presentes en el agua, subsecuentemente ocurren sucesivas etapas de oxidación que van promoviendo la fragmentación de la cadena alquílica eliminando dos carbonos a la vez, proceso conocido como  $\beta$ -oxidación, hasta que esta cadena queda muy corta (Baltodano & Moreno, 2013, p.18).

Las especies de *Trichoderma* pueden potencialmente contribuir en la degradación de compuestos orgánicos contaminantes. Los microorganismos pueden transformar los contaminantes orgánicos en compuestos que presenten menor o mayor toxicidad, con respecto al compuesto original.

En contraste, algunos microorganismos pueden degradar completamente los contaminantes orgánicos, lo que implica su completa mineralización hasta compuestos inocuos como agua y dióxido de carbono (Alexander 1981, citado en Argumedo *et. al.*, 2009, p. 259).

Estudios exponen el potencial de algunas especies del género *Trichoderma* para ser utilizados como elemento de biorremediación en la destoxificación de contaminantes orgánicos e inorgánicos tanto en suelos como en agua (Argumedo, *et al.*, 2009, p.259).

La tecnología del producto EM (del inglés *efficient microorganisms*), basada en la actividad sinérgica de consorcios de microorganismo eficientes, ha sido reportado como una alternativa para el tratamiento de aguas contaminadas.

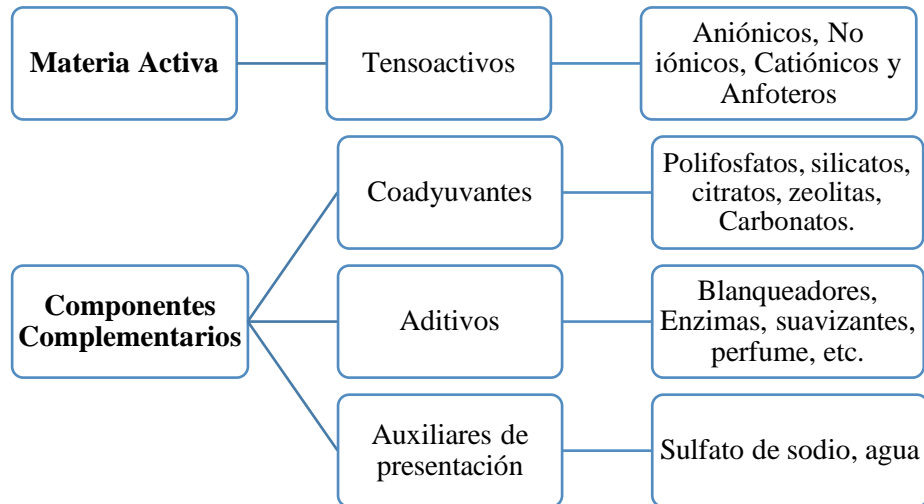
EM (microorganismos eficientes) ha sido aplicado, ya que incrementa las densidades de microorganismos que pueden utilizar los compuestos presentes en el agua como fuente de carbono y energía para su metabolismo y crecimiento, con características metabólicas diferentes y complementarias entre sí, la cantidad y variedad de los compuestos que pueden ser degradados será mayor y los procesos a su vez, serán más eficientes (Cardona & García, 2008, p.2).



## 1.2. MARCO TEÓRICO

### 1.2.1. Principales componentes de los detergentes

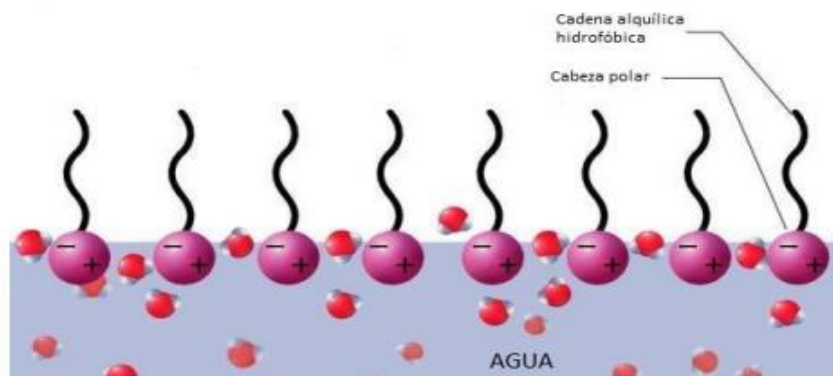
Un detergente está formado por materia activa y una serie de componentes que lo complementan, tales como aditivos, coadyuvantes y auxiliares de presentación como lo muestra la fig. 2-1, Proporcionando un producto de limpieza eficiente (Altmajer, 2004, p.21-22).



**Figura 2-1:** Componentes de las formulaciones detergentes  
**Fuente:** Altmajer, 2004, p.21-22

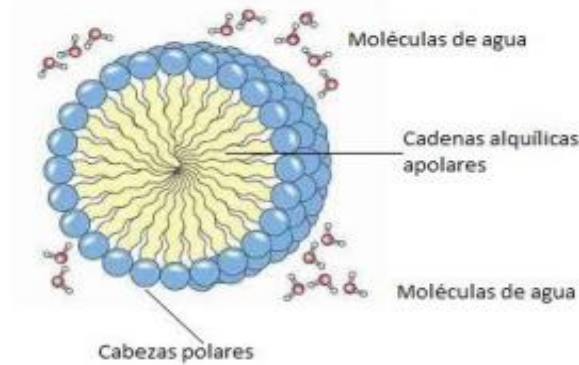
### 1.2.2. Agentes tensoactivos

Son sustancias que poseen la característica de modificar las interacciones interfaciales mediante fenómenos de adsorción (Perales, 2001, citado en Velásquez, 2016, p.22). En la fig. 3-1. Su composición molecular, consta de una parte hidrofóbica compuesta por cadenas alquílicas, y otra hidrofílica constituida por un grupo polar (iónico o no).



**Figura 3-1:** Disposición de un tensoactivo en el agua  
**Fuente:** Perales, 2001, citado en Velásquez, 2016, p.22

A medida que aumenta la concentración de tensoactivo, las moléculas tienden a colocarse en forma de monocapa superficial con la cabeza polar hacia el agua y la cadena hidrofóbica orientada hacia la otra fase formando una concentración micelar crítica, las moléculas de tensoactivo se organizan formando micelas. En la fig. 4-1 que se muestra a continuación se pueden observar tanto la estructura de una micela, como la orientación de las moléculas de surfactante en el agregado (Gil, 2014, p.17).



**Figura 4-1:** Estructura de una micela

**Fuente:** Gil, 2014, p.17

### 1.2.3. *Propiedades de un agente tensoactivo*

**Detergencia:** Capacidad de ciertos tensoactivos o mezcla de tensoactivos de eliminar la mugre de una superficie sólida. En este proceso las suciedades son separadas del sustrato en que estaban retenidas y puestas en estado de disolución o dispersión. La espuma controlada actúa como lubricante y facilita la aplicación de solución limpiadora (Morales, 1998, citado en Lin, 2014, p.5).

**Formación de espuma:** la disminución de la tensión superficial entre un líquido y el aire hace que la superficie del líquido pueda deformarse con extrema facilidad y provocar la inclusión de multitud de burbujas de aire (Hedreul, 2001, citado en Ríos, 2010, p.16).

**Solubilización:** si la cantidad de tensoactivo es suficientemente elevada, pueden llegarse a solubilizar de forma completa sustancias normalmente inmiscibles entre sí. En el tránsito, pueden darse no sólo disoluciones verdaderas sino que pueden formarse estructuras complejas tipo gel. En perfumería, esta propiedad es fundamental para hacer que los perfumes puedan estabilizarse en multitud de productos comerciales que deben estar perfumados como cosméticos, detergentes, plásticos y otros objetos en general (Friberg, 1999, citado en Fernández, 2006, p.17).

#### 1.2.4. Principales familias de los tensoactivos

Los agentes tensoactivos se dividen en cuatro familias:

- **Tensoactivo aniónico**, Compuesto que posee uno o varios grupos funcionales que se ionizan en disolución acuosa originando iones orgánicos que presentan **carga negativa**.
- **Tensoactivo catiónico**, Compuesto que posee uno o varios grupos funcionales que se ionizan en disolución acuosa originando iones orgánicos que presentan **carga positiva**.
- **Tensoactivo no iónico**, en disolución acuosa no originan iones.
- **Tensoactivo anfotérico**, de carácter aniónico o catiónico, según las condiciones del medio, no se utilizan mucho como materias primas para detergentes (Lechuga, 2005, p.29).

**Tabla 2-1 :** Acrónimos de las principales familias de los tensoactivos.

Clase	Nombre común	Acrónimo
<b>Tensoactivos aniónicos</b>	Lineal alquilbenceno sulfonatos	LAS
	sulfonato de alquil benceno	ABS
<b>Tensoactivos no iónicos</b>	Alquilfenoles etoxilados	APE ó APEO
	Nonilfenoles etoxilados	NPE ó NPEO
	Octilfenoles etoxilados	OPE ó OPEO
	Alcoholes etoxilados	AE ó AEO
<b>Tensoactivos catiónicos</b>	Sales de amonio cuaternario	QAC
	Haluros de alquil trimetil amonio	TMAC
	Haluros de alquil dimetil amonio	DMAC
	Haluros de alquil bencil dimetil amonio	BDMAC

**Fuente:** Sibila (2008).

**Realizado por:** Meneses, L. 2018

Los tensoactivos constituyen la materia activa de los detergentes. La familia más utilizada de los tensoactivos son los de tipo aniónico.

##### 1.2.4.1. Tensoactivos Aniónicos

Los tensoactivos aniónicos son sales de sodio que al ionizarse producen iones negativos (surfactante activo).

Son los más utilizados en formulaciones **detergentes en polvo** para lavado de ropa y en productos líquidos para uso en lavavajillas. Los más comunes son:

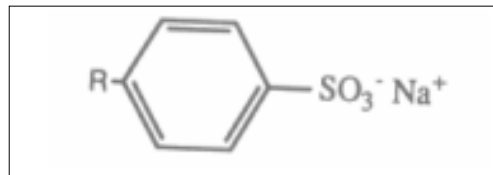
- sulfonato de alquil benceno (ABS).
- Lineal alquilbenceno sulfonatos (LAS).

**ABS**, posee una estructura molecular ramificada y es poco biodegradable.

**LAS** posee estructura lineal, es más biodegradable pero mucho más tóxico. Están compuestos por una cadena de tipo alquílica. Las principales sustancias de este grupo de tensoactivos son derivadas del ión sulfato que se ubica en el extremo polar de la molécula como dodecil benceno sulfonato de sodio lineal (Carvajal, 2011, p.94).

#### 1.2.4.2. *Dodecil bencen sulfonato de sodio lineal*

Pertenecen a la familia de tensoactivos aniónicos, son los más importantes tensoactivos o surfactantes sintéticos empleados en los detergentes domésticos. Las mezclas comerciales están constituidas por conjuntos de homólogos en los que la longitud de la cadena alquílica unida al grupo fenilo oscila entre C10 y C14 (Díaz, 2008, p. 144-167).



**Figura 5-1 :** Álquilbenceno sulfonato lineal  
**Fuente:** Díaz, 2008, p. 144-167

#### 1.2.5. *Biodegradación*

La biodegradación puede definirse de un modo simple como la “destrucción de un compuesto químico por la acción biológica de microorganismos vivos” (Swisher, 1987, citado en Lechuga, 2005, p.52).

Según Sánchez (2007, p.39) Estos procesos se pueden llevar a cabo bajo diferentes tensiones de oxígeno:

Condiciones aerobias, donde el flujo de oxígeno excede a la demanda de este gas que la actividad bacteriológica puede requerir.

Condiciones anaerobias, de las que se distinguen dos tipos:

- 1) Aquellas donde la velocidad de consumo de oxígeno excede a la velocidad de difusión.

2) Aquellas donde el oxígeno es totalmente excluido, esto es en condiciones estrictamente anaerobias.

#### *1.2.5.1. Biodegradabilidad primaria*

Se entiende como el proceso que ocurre en la estructura de la molécula que implica la pérdida de las propiedades del tensoactivo, de forma que vayan desapareciendo sus propiedades, es decir, la estructura de la molécula original es alterada por la acción microbiana.

La utilización de microorganismos para la descontaminación de suelos y aguas se basan en la absorción de las sustancias orgánicas por parte de dichos microorganismos, los cuales las utilizan como la fuente de carbono necesaria para su crecimiento y de energía para sus funciones metabólicas (Torres, 2003, p. 1).

#### *1.2.5.2. Biodegradabilidad final o mineralización*

Es aquella donde la molécula del tensoactivo es destruida y convertida en gases ( $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$ ) sales inorgánicas y otros productos asociados al metabolismo normal de las microorganismos.

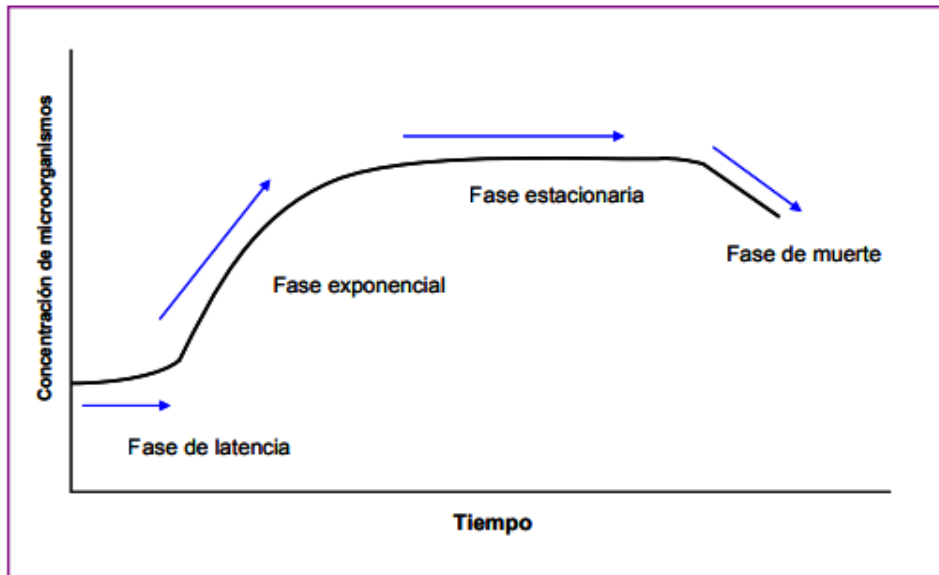
#### *1.2.5.3. Biodegradabilidad ambientalmente aceptable*

La biodegradabilidad ambientalmente aceptable es un tipo de biodegradabilidad primaria en la que los metabolitos resultantes del proceso de biodegradación son ambientalmente inocuos, es decir, presentan una baja ecotoxicidad.

Además la extensión y velocidad resultante del proceso degradativo, debe igualar desde el punto de vista cuantitativo, la degradación de la materia orgánica residual normal en plantas de tratamiento o cauces receptores (Piguave & Gutiérrez, 2010).

#### *1.2.6. Crecimiento microbiano*

En microbiología, se define como un incremento del número de células o de la masa celular por unidad de tiempo de una población microbiana. El crecimiento ocasiona un incremento del número de células cuando los microorganismos se multiplican por gemación o fisión binaria (Agatangelo & Santos, 2007, p.26-27).



**Figura 6-1:** Curva de crecimiento microbiano

**Fuente:** Agatangelo & Santos, 2007, p.26-27

La curva de crecimiento de un cultivo microbiano se distingue en 4 fases:

#### 1.2.6.1. *La fase de latencia*

Es el período de ajuste que las células experimentan al acceder de un entorno a otro, antes de iniciar su crecimiento.

Durante la fase de retraso, el crecimiento es relativamente plano y la población parece no crecer o crecer con bastante lentitud. Durante esta fase, las células recién inoculadas se adaptan a su nuevo entorno y sintetizan las moléculas que necesitarán para crecer rápidamente (Kaiser, 2017).

#### 1.2.6.2. *La fase exponencial o logarítmica*

Es aquella durante la cual los microorganismos se multiplican hasta el máximo nivel posible, en función de su potencial genético, tipo de medio y las condiciones en que crece. Los microorganismos se dividen y duplican su número en intervalos regulares (Rodríguez, 2016, p.62).

#### 1.2.6.3. *La fase estacionaria*

Es el resultado del agotamiento de los nutrientes disponibles o del efecto de acumulación de productos tóxicos del metabolismo microbiano, que tienen como consecuencia la disminución de

la velocidad de crecimiento. La transición entre la fase exponencial y la fase estacionaria se caracteriza por un crecimiento desequilibrado, durante el cual los diversos componentes celulares son sintetizados a diferentes velocidades (Neelesh, 2016).

El número total de células aumenta a un ritmo lento, pero el recuento viable permanece casi constante. La duración de esta fase es variable, que varía desde pocos días hasta algunas horas.

#### *1.2.6.4. La fase de muerte*

Es consecuencia de diversos factores, siendo uno de los más importantes el agotamiento de las reservas de energía de las células. Al igual que el crecimiento, la muerte también asume una función exponencial que puede representarse por una disminución lineal del número de las células viables a lo largo del tiempo (Madigan y col., 1997; Prescott y col., 1999, citado en Rodríguez, 2016, p.62).

#### **1.2.7. Métodos de medición del crecimiento**

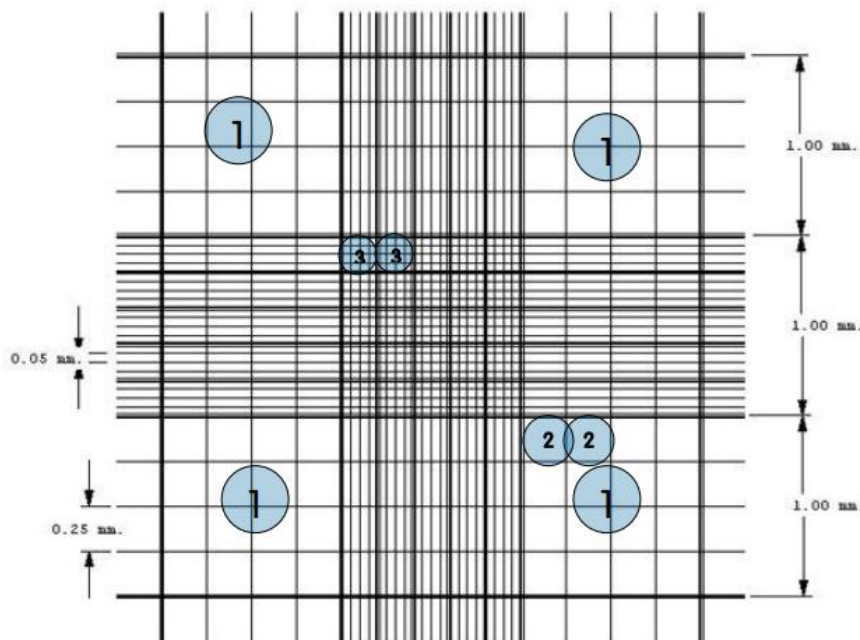
El crecimiento se evalúa haciendo mediciones sucesivas en tiempos determinados de la población en estudio. En cada momento se evalúa cual es la población en ese instante. Existen diversas formas de evaluar una población bacteriana:

##### *1.2.7.1. Conteo microscópico directo*

Es una técnica que se utiliza un equipamiento en un laboratorio de microbiología, ya que consiste en contar con un microscopio la cantidad de células presentes en un volumen determinado. Para estos recuentos se utilizan generalmente cámaras de recuentos (cámara de Petroff Hauser, cámara de Neubauer).

Una de las mayores ventajas del recuento microscópico es brindar información adicional sobre el tamaño y la morfología de los objetos contados. La muestra puede utilizarse directamente en tal cual medio líquido o puede prepararse una dilución (Bikandi, J& San MillaN, R, 2016).

En la fig. 7-1 la cuadrícula de recuento muestra 9 cuadrados grandes, cada uno de 1 mm<sup>2</sup>. Los 4 cuadrados grandes de las esquinas están divididos en 16 cuadrados con aristas de 0,25 mm. El cuadrado grande central está dividido en 16 cuadrados medianos con aristas de 0,2 mm estando cada cuadrado mediano subdividido en 16 cuadrados pequeños con aristas de 0,05 mm y una superficie de 0,0025 mm<sup>2</sup> (Brand, 2018, p.254 ).



**Figura 7-1:** Cámara de Neubauer  
**Fuente:** Brand, 2018, p.254

#### 1.2.7.2. *Conteo de células viables*

El método se basa en la consideración que el crecimiento implica el aumento de los microorganismos capaces de formar colonias. Este método puede hacerse con medios sólidos o líquidos.

El método más frecuentemente empleado es el conteo en placas (medios sólidos) formando colonias. Por lo tanto se determinan por este método sólo las células microbianas VIABLES.

En un medio sólido cada bacteria se multiplicará formando una colonia visible a simple vista que puede ser contada. Como las colonias pueden originarse tanto de una célula como de un grupo de células, se utiliza el término: UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC), y esto puede constituir una desventaja ya que si dos bacterias no se separan darán una sola colonia, subestimando de esta forma el número de microorganismos en la suspensión (Dávila & Hernández, 2006, p.5).

#### 1.2.8. *Agentes Microbianos*

El uso de agentes microbianos benéficos no afecta ni a la salud humana ni el ambiente (Mazón, 2001, p.95). Para el tratamiento de aguas residuales ha sido exitosamente utilizado en diversos



estudios, ya que los microorganismos que contienen, segregan ácidos orgánicos, enzimas, antioxidantes y quelantes metálicos, los cuales crean un ambiente antioxidante que ayuda al proceso de separación sólido/líquido, el cual es el fundamento de la depuración del agua.

La limpieza y depuración de las aguas residuales, implica operaciones unitarias como son la sedimentación y la filtración, pero los procesos biológicos y/o de lodos activados que se llevan a cabo en el proceso de tratamiento son los de mayor importancia ya que son los microorganismos los que realizan el proceso de depuración (Bejarano & Escobar, 2015, p.28).

#### 1.2.8.1. *Trichoderma*

Desde hace décadas el género *Trichoderma* ha sido estudiado ampliamente; se encuentra de manera natural y abundante en suelos agrícolas. También se lo puede encontrar en diferentes zonas y hábitats, es un hongo anaerobio facultativo microscópico. Posee efectos antagónicos, formando parte de los organismos benéficos.

*Trichoderma harzianum* se caracteriza por sus conidióforos terminados en fiálides, esporas lisas, hialinas, con un solo núcleo, verdosas, subglobosas u ovoides y colonias de crecimiento rápido (7-9 cm). Los conidióforos están muy ramificados teniendo cada ramificación forma de ángulo recto con la pequeña rama que la soporta. Cada conjunto de ramificaciones tiene forma piramidal semejante a un pequeño arbusto, morfología característica y típica de este hongo (Alexopoulos, 1962, citado en Vázquez, 2009, p.38).

#### 1.2.8.2. *Clasificación taxonómica*

Clasificación taxonómica del género *Trichoderma* se expone en la tabla 3-1.

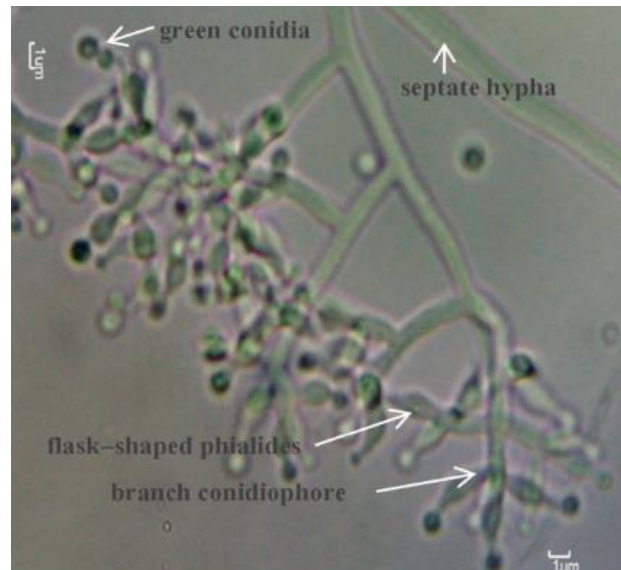
**Tabla 3-1:** Clasificación taxonómica

Reino	Fungí.
División	Mycota
Subdivisión	Eumycota
Clase	Hyphomycetes.
Orden	Moniliales.
Familia	Moniliaceae.
Género	<i>Trichoderma</i>
Especie	<i>harzianum</i>

**Fuente:** Infante, *et al.*, 2009, p.15

#### 1.1.8.2.1. Características de *Trichoderma harzianum*

Son hongos microscópicos que se encuentran en ambientes terrestres, la fig. 8-1 muestra la estructura de *Trichoderma harzianum* (Suriyagamon, 2018, p.26).



**Figura 8-1:** Estructura de *Trichoderma harzianum*  
**Fuente:** Suriyagamon, 2018, p.26

#### a) Colonia

Colonias flojas o compactas, presentan estas dos características sobre una misma colonia, dicha compactación está relacionada con la estructura de los conidióforos. Su color se debe a la pigmentación de las fialosporas y la cantidad de esporas producidas. Su color típico es el verde oscuro (Baungh, 2017).

#### b) Micelio

“Está constituido por hifas hialinas, septadas, de paredes lisas y abundante ramificación”

#### c) Clasmidosporas

Están presentes en muchas especies; son intercaladas ocasionalmente terminales o sobre una ramificación lateral de una hifa corta, globosa, elipsoidal, incolora de pared lisa.

d) Conidióforos

Tienen estructura compleja por su abundante ramificación son cónicos y piramidales. Sobre las ramificaciones principales de los conidióforos se producen ramificaciones laterales, cortas, individuales o en grupos de tres (Iza, 2010, p. 29).

e) Fiálides

Las fiálides son estructuras que se parecen a un frasco o a una pera reducida en su base hinchada en su parte media angosto en el ápice y cuello subcilíndrico. Se disponen en grupos irregulares de hasta cinco alrededor del extremo de las penúltimas células de las ramificaciones u originarse a lo largo de las mismas en forma individual.

f) Esporas

Son fialosporas que se producen individual o sucesivamente acumuladas en el ápice de los fiálides que conforman una cabeza de esporas con un diámetro menor a 15u, o pueden estar en cadenas cortas, son lisas o rugosas, verde amarillentas u oscuras, de forma subglobosa, ovoide o elíptica (Iza, 2010, p. 30).

Los hongos tienen la propiedad de adaptarse y desarrollarse en diferentes medios debido a que múltiples agentes de tipo genético asexuales como la recombinación parasexual, la mutación y otras transformaciones intervienen en la modificación entre los núcleos de un mismo microorganismo (Romero *et. al.*, 2009, p. 147).

Estos hongos se caracterizan por predominar en los ecosistemas terrestres y acuáticos. Los requerimientos nutrimentales de estos hongos filamentosos son pocos, aunque su crecimiento es favorecido por la materia orgánica, y su humedad y temperatura óptimas de crecimiento se encuentran en un rango de 25 a 30 °C. Sin embargo, se pueden adaptar y sobrevivir en condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad (Widden & Scattolin 1988, citado en Argumedo, 2009, p.261).

### 1.2.8.3. *Bacillus*

Las especies de *Bacillus* son bacterias Gram positivas aeróbicas o facultativamente anaeróbicas formadoras de endosporas; en algunas especies, las culturas pueden volverse Gram-negativas con la edad. Las muchas especies del género exhiben una amplia gama de habilidades fisiológicas que

les permiten vivir en cualquier entorno natural. Solo se forma una endospora por célula. Las esporas son resistentes al calor, al frío, a la radiación, a la desecación y a los desinfectantes (Baron, 1996).

*Bacillus subtilis* es una especie bacteriana notablemente diversa, capaz de crecer en diversos ambientes, tiene la habilidad para formar una resistente endospora protectora, permitiendo al organismo tolerar condiciones ambientalmente extremas (Lastras, 2009, citado en Aguavil, 2012, p.24).

#### 1.2.8.3.1. Características

*Bacillus subtilis* se caracteriza por ser un bacilo, Gram-positivo, se encuentra en todo el ambiente, sobre todo en el suelo, productor de endospora, de antibióticos y matriz extracelular. El potencial de *B. subtilis* se basa en su capacidad para producir una amplia gama de moléculas bioactivas, muestra una marcada acción bactericida y fungicida por lo que se ha aprobado su uso como biopesticida en plantas. No muestra toxicidad hacia vertebrados, alta biodegradabilidad y características amigables con el medio ambiente. *B. subtilis* es un ingrediente común en las mezclas de probióticos recomendadas para el uso en animales acuáticos (Günther & Jiménez, 2004, p.938).



**Figura 9-1:** Morfología de colonias *B. subtilis*  
**Fuente:** Günther & Jiménez, 2004, p.938

*Bacillus subtilis* se puede aislar de una variedad de entornos, terrestres y acuáticos, lo que hace que parezca que esta especie es ubicua y está ampliamente adaptada para crecer en diversos entornos dentro de la biosfera. Sin embargo, como todos los miembros del género *Bacillus*, *B. subtilis* es capaz de formar endosporas latentes altamente resistentes en respuesta a la privación de nutrientes y otras tensiones ambientales. La figura 9-1 muestra la morfología de colonias de esta cepa (Earl, *et. al.*, 2008, p.270).

#### 1.2.8.3.2. Clasificación taxonómica

*Bacillus subtilis* se clasifica de la siguiente manera:

**Tabla 4-1:** Clasificación taxonómica

Reino:	Bacteria
Filo:	Firmicutes
Clase:	Bacilli
Orden:	Bacillales
Familia:	Bacillaceae
Género:	<i>Bacillus</i>
Especie	<i>subtilis</i>

**Fuente:** Cuervo, 2010

#### 1.2.8.3.3. Mecanismos de acción

a. Competencia por nutrientes: La competencia más común es por nutrientes esenciales para el desarrollo de las funciones microbianas vitales; reproducción, nutrición, respiración y/o metabolismo, de esta manera se delimita la colonización de otras especies patógenas (Hernández., *et, al*, 2007).

b. Competencia por espacio: El desarrollo de un microorganismo sobre determinada área, inhibe de cierto modo la invasión de otros.

c. Interacción directa con el patógeno: Se destaca la interacción directa entre los antagonistas y los patógenos, considerada por varios autores como; una simbiosis antagónica, que es la capacidad que posee uno de ellos (antagonista) de alimentarse de otro microorganismo, que en el contexto del biocontrol es un agente patógeno.

Este mecanismo esta mediado básicamente por la lisis enzimática, la cual permite la degradación de las estructuras fúngicas parasitadas para su utilización como fuente de factores (Tejera., *et, al*, 2011).

d. La predación: consiste en la utilización de materia orgánica como fuente nutricional por parte del antagonista, de la que puede hacer parte el patógeno, lo cual es muy ocasional.

#### 1.2.8.4. Microorganismos eficientes (EM)

Es un cultivo mixto de microorganismos no modificados genéticamente, con diversos tipos de metabolismo, que al encontrarse juntos presentan relaciones sinérgicas, de cooperación y cometabolismo (Higa y Parr, 1994, citado en Cardona & García, 2008, p.14).

##### 1.2.8.4.1. Características

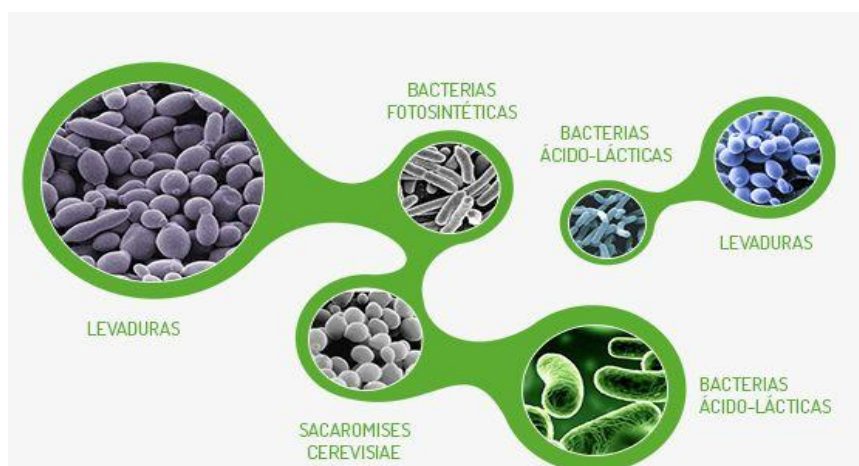
Los microorganismos del EM poseen varias características útiles en procesos de biorremediación, entre las cuales se encuentran la fermentación de la materia orgánica sin la liberación de malos olores y su capacidad de convertir los desechos tóxicos ( $H_2S$ ) en sustancias no tóxicas ( $SO_4$ ) (García, 2006, p.75).

##### 1.2.8.5. Microorganismos del (EM)

Principales especies de microorganismos eficientes:

- Bacterias del ácido láctico: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus lactis*
- Bacterias Fotosintéticas: *Rhodospseudomonas palustris*.
- Levaduras: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*

La fig. 10-1 muestra las especies de microorganismos eficientes conformadas por bacterias y levaduras, que se organiza en comunidades creando biotopos estables (Natura, 2015).



**Figura 10-1:** Especies de microorganismos eficientes  
**Fuente:** Natura, 2015

#### 1.2.8.5.1. Bacterias del ácido láctico

Estos microorganismos están contenidos en los EM y son las más abundantes de las cuales son los *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus lactics*. Las bacterias están conformadas por un amplio grupo de bacterias no esporuladas, Gram positivas producen ácido láctico a partir de azúcares y otros carbohidratos generados por bacterias fotosintéticas y levaduras, como parte de su metabolismo (Estela *et. al.*, 2007, p.271).

Son cocos y bacilos de longitud variable y de un grosor de 0.5 – 0.8 um, son anaerobias facultativas, a pesar de su metabolismo anaerobio, son anaerobios tolerantes y en medios de cultivos sólidos forman colonias en presencia de aire (Parra, 2016, p.95).

#### 1.2.8.5.2. Levaduras

Este segundo grupo dentro de los microorganismos presentes en EM son las levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*. Las sustancias bioactivas, como hormonas y enzimas, producidas por las levaduras, promueven la división celular activa. Sus secreciones son sustratos útiles para otros microorganismos eficientes como bacterias ácido lácticas y actinomicetos (Silva, 2009).

Todos los miembros de *Saccharomyces* emplean diversas fuentes de carbono y energía. En primer lugar se encuentran la glucosa y la sacarosa, aunque también pueden emplearse fructuosa, galactosa, maltosa y suero hidrolizado, ya que *Saccharomyces* no puede asimilar lactosa. También puede utilizarse etanol como fuente de carbono.

Las levaduras son hongos microscópicos, o sea organismos unicelulares del reino vegetal, que suelen medir de 5 a 10 micras, se consideran como organismos facultativos anaeróbicos, lo cual significa que pueden sobrevivir y crecer con o sin oxígeno. La propagación de las levaduras es un proceso mediante el cual la levadura convierte al oxígeno y al azúcar, mediante un proceso denominado metabolismo oxidativo.

#### 1.2.8.5.3. Bacterias fotosintéticas

Dentro del gremio de los microorganismos fotosintéticos que hacen parte de EM se encuentra *Rhodopseudomonas palustris*. Estas bacterias fototróficas facultativas clasificadas dentro de las bacterias púrpura no del azufre, el cual comprende un grupo variado, tanto en morfología, filogenia y su tolerancia a diferentes concentraciones de azufre.

Se encuentra entre las bacterias más versátiles metabólicamente conocidas. Utiliza luz, compuestos inorgánicos o compuestos orgánicos para obtener energía. Adquiere carbono de muchos tipos de compuestos derivados de plantas verdes o mediante la fijación de dióxido de carbono, y repara el nitrógeno (Larimer, *et. al.*, 2004, p.55).

Estos tres grupos de microorganismos no son nocivos, ni tóxicos, ni genéticamente modificados por el hombre; por el contrario son naturales, benéficos y altamente eficientes.



## CAPITULO II

### 2. MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1. Tipo y diseño de la investigación

##### 2.1.1. *Por el tipo de investigación*

- **Aplicada**, porque se persiguió un fin directo e inmediato. Se propuso determinar la efectividad de agentes microbianos para la degradación de tensoactivos dodecil bencen sulfonato de sodio lineal presente en detergentes.
- **Correlacional**, porque se mide la relación entre dos variables y la relación que estas establecen entre los agentes biológicos y los tensoactivos.

##### 2.1.2. *Por la temporalidad*

Longitudinal, ya que se recolectó datos a través del tiempo en periodos específicos para realizar el conteo y la determinación de esporas en las diferentes concentraciones.

##### 2.1.3. *Por el tipo de enfoque*

Cuantitativo, porque se recolectó datos a través de la cámara de Neubauer, para la obtención de resultados de estabilidad y crecimiento de los agentes microbianos.

##### 2.1.4. *Por el diseño de investigación*

Experimental

##### 2.1.5. *Lugar de la investigación*

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de fitopatología de la Facultad De Recursos Naturales De La Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, se utilizó cepas de *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, y consorcio de cepas microorganismos eficientes (EM), procedentes del mercado.

#### **2.1.6. Población de estudio**

La población de estudio correspondió a agentes microbianos que degraden tensoactivos dodecil bencen sulfonato de sodio lineal presentes en detergentes en el agua, *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, Microorganismos eficientes (EM).

#### **2.1.7. Tamaño de la muestra**

- 15 tratamientos a 5 concentraciones con *Trichoderma harzianum*
- 15 tratamientos a 5 concentraciones con *Bacillus subtilis*
- 15 tratamientos a 5 concentraciones con Microorganismos eficientes (EM)
- 9 muestras de testigo con los microorganismos propuestos

#### **2.1.8. Selección de la muestra**

De las unidades almacenadas a diferentes concentraciones C1, C2, C3, C4, C5, se tomó cada 4 días una muestra para el conteo de esporas hasta los 32 días, mediante la cámara de Neubauer que corresponde una gota de 0.01 ml con pipeta estéril para el conteo de las esporas.

#### **2.1.9. Material biológico**

El material biológico estaba conformada por una cepa de *Trichoderma harzianum*, una cepa de *Bacillus subtilis*, Microorganismos eficientes (EM).

#### **2.1.10. Diseño experimental**

Se enfocó principalmente empleando un diseño completamente al azar (DCA) utilizando como sustrato al tensoactivo dodecil bencen sulfonato de sodio lineal presentes en detergentes en tres agentes microbianos diferentes, cada uno de estos se realizó con 5 concentraciones diferentes por triplicado con sus respectivos testigos, en el laboratorio se determinó el crecimiento, la estabilidad poblacional y los niveles de degradación en cada uno de los tratamientos.

**Tabla 1-2:** Tratamientos a nivel de laboratorio para determinar el crecimiento y estabilidad de los agentes microbianos

<b>Nº de tratamiento</b>	<b>Códigos</b>	<b>Descripción</b>
1	TC1R (1, 2, 3)	<i>T. harzianum</i> + agua potable + detergente a concentración recomendada por el fabricante (R1, R2, R3)
2	TC2R (1, 2, 3)	<i>T. harzianum</i> + agua potable + detergente a concentración superior 1 (R1, R2, R3)
3	TC3R (1, 2, 3)	<i>T. harzianum</i> + agua potable + detergente a concentración superior 2 (R1, R2, R3)
4	TC4R (1, 2, 3)	<i>T. harzianum</i> + agua potable + detergente a concentración inferior 1 (R1, R2, R3)
5	TC5R (1, 2, 3)	<i>T. harzianum</i> + agua potable + detergente a concentración inferior 2 (R1, R2, R3)
6	BC1R (1, 2, 3)	<i>B. subtilis</i> + agua potable + detergente a concentración recomendada por el fabricante (R1, R2, R3)
7	BC2R (1, 2, 3)	<i>B. subtilis</i> + agua potable + detergente a concentración superior 1 (R1, R2, R3)
8	BC3R (1, 2, 3)	<i>B. subtilis</i> + agua potable + detergente a concentración superior 2 (R1, R2, R3)
9	BC4R (1, 2, 3)	<i>B. subtilis</i> + agua potable + detergente a concentración inferior 1 (R1, R2, R3)
10	BC5R (1, 2, 3)	<i>B. subtilis</i> + agua potable + detergente a concentración inferior 2 (R1, R2, R3)
11	MEC1R (1, 2, 3)	Microorganismos Eficientes (EM) + agua potable + detergente a concentración recomendada por el fabricante (R1, R2, R3)
12	MEC2R (1, 2, 3)	Microorganismos Eficientes (EM) + agua potable + detergente a concentración superior 1 (R1, R2, R3)
13	MEC3R (1, 2, 3)	Microorganismos Eficientes (EM) + agua potable + detergente a concentración superior 2 (R1, R2, R3)
14	MEC4R (1, 2, 3)	Microorganismos Eficientes (EM) + agua potable + detergente a concentración inferior 1 (R1, R2, R3)
15	MEC5R (1, 2, 3)	Microorganismos Eficientes (EM) + agua potable + detergente a concentración inferior 2 (R1, R2, R3)
16	TEST. C1	Testigo (agua potable + detergente a concentración recomendada por el fabricante)
17	TEST. TR (1, 2, 3)	Testigo (agua potable + <i>T. harzianum</i> ) R1, R2, R3
18	TEST. BR (1, 2, 3)	Testigo (agua potable + <i>B. subtilis</i> ) R1, R2, R3
19	TEST. ME (1, 2, 3)	Testigo (agua potable + microorganismos eficientes (EM)) R1, R2, R3

Realizado por: Meneses, L. 2018

### **2.1.11. Unidad de análisis**

En la presente investigación se tomó como unidad de análisis:

- Como sustrato al tensoactivos dodecil bencen sulfonato de sodio lineal presente en detergentes.
- Cepa de *Trichoderma harzianum*.
- Cepa de *Bacillus subtilis*
- Consorcio de microorganismos eficientes (EM).

Estos microorganismos fueron adquiridos en el mercado se encuentran a una concentración de  $2.5 \times 10^9$  UFC/ml de producto.

## **2.2. Técnicas de recolección de datos**

### **2.2.1. Fase de laboratorio**

- Preparación de las diferentes concentraciones del detergente que contiene el tensoactivo dodecil bencen sulfonato de sodio lineal.
- Inoculación de *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis* y microorganismo eficientes, en las diferentes concentraciones.
- Cuantificación de esporas de las diferentes concentraciones líquidas mediante la cámara de Neubauer.
- Determinación de la concentración del tensoactivo en los tratamientos. (Método de cristal violeta - HACH método 8028).

### **2.2.2. Tratamientos estadísticos**

- Curvas de crecimiento para la determinación del comportamiento de los agentes microbianos frente al tensoactivo.
- Análisis de varianza para la determinación de cuantificaciones de los microorganismos cada 8 días.
- Análisis de varianza para la determinación del porcentaje de disminución del tensoactivo a los 32 días.

### 2.2.3. Mecanismos

#### 2.2.3.1. Preparación de las diferentes concentraciones del detergente

**Tabla 2-2:** cantidad de detergente en diferentes concentraciones

Concentración del detergente	
Concentraciones:	Concentración correspondiente al ingrediente activo:
Recomendada por el fabricante (C1)	5430 mg/l
Concentración superior a 1 (C2)	10860 mg/l
Concentración superior a 2 (C3)	8145 mg/l
Concentración inferior a 1 (C4)	2715 mg/l
Concentración inferior a 2 (C5)	1358 mg/l

Realizado por: Meneses, L. 2018

Para preparar las concentraciones ensayadas se realizó de la siguiente manera:

**C1** se pesó 5.430 g, **C2** se pesó 10.860 g, **C3** se pesó 8.145 g, **C4:** 2.715 g y **C5:** 1.358g de detergente y se aforo a un volumen final de 1000 ml.

Se realizó las preparaciones del sustrato a diferentes concentraciones aforadas a 1000 ml, en recipientes de capacidad de 2000 ml y por triplicado, también se empleó un testigo con la cantidad recomendada de detergente. Luego con una varilla de vidrio se agitó hasta homogenizar el detergente, se etiquetó cada uno de los tratamientos.

Posteriormente se procedió a colocarlas en una cámara de crecimiento con condiciones de asepsia.

#### 2.2.3.2. Inoculación de *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis* y microorganismos eficientes (EM), en las diferentes concentraciones

Para la inoculación de estos agentes microbianos, su concentración fue obtenida en base líquida. Con una probeta se midió el volumen del bioproducto de las diferentes poblaciones, de acuerdo a las especificaciones de la etiqueta, en cada una de las 5 concentraciones y en sus respectivas repeticiones (triplicado).

Se ubicó 3 testigos como referencia, en cada recipiente se colocó 1000 ml de agua potable con 100 ml del bioproducto.

### 2.2.3.3. Cuantificación de esporas mediante la cámara de Neubauer

Para la evaluación a nivel del laboratorio la tolerancia de una cepa de *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, y microorganismos eficientes (EM), todos los tratamientos se llevaron a cabo por triplicado a diferentes concentraciones de tensoactivos. Los recuentos celulares se determinaron directamente usando la cámara de Neubauer en un medio estéril.

Para la determinación del número de esporas por ml se tomó submuestras de las 5 diferentes concentraciones de los formulados líquidos a temperatura ambiente, a intervalos regulares, cada 4 días se realizó el conteo de las esporas de los formulados, hasta los 32 días.

Para obtener la muestra del recipiente se agitó vigorosamente.

Se tomó la muestra de 10  $\mu$ l (0.01 ml) con una pipeta automática para ser depositado en la cámara. Se dejó reposar medio minuto antes de proceder al conteo.

El mismo procedimiento se repitió varias veces, y en cada cambio de muestra se limpió completamente con alcohol tanto la lámina de vidrio como la varilla, y se cambió las puntas de la pipeta, se aprovechó que la lámina tiene dos cámaras de 0.1 mm<sup>2</sup> para utilizarla.

Luego se llevó la cámara al microscopio, cubriéndole con un cubre objetos y se procedió a realizar el conteo respectivo con el objetivo de 40X, utilizando un contador automático para no levantar la vista.

La concentración de esporas por ml de producto se calculó multiplicando la suma del número de esporas contadas en los 5 cuadrados secundarios, y por el factor de la cámara.

Según Castro (2015) para el cálculo del número de esporas por mililitro se emplea la siguiente fórmula:

$$\text{Número de esporas /ml} = \text{Suma de } 5C.S * 50.000$$



**Figura: 1-2:** Cuantificaciones de esporas (Cámara Neubauer)  
**Realizado por:** Meneses, L. 2018

#### 2.2.3.4. *Determinación de la concentración del tensoactivo en el detergente*

##### **Método de cristal violeta - HACH método 8028**

- Se llenó una probeta graduada limpia de 500 ml hasta 300 ml de la muestra.
- Con el regulador del embudo cerrado; se vertió la muestra en un embudo de separación limpio de 500 ml.
- Luego se agregó 10 ml de solución tampón de sulfato. Tapamos el embudo, agitamos el embudo por cinco segundos.
- Se agregó el contenido del reactivo de detergentes dentro del embudo, se cerró el embudo de separación y se invirtió hasta disolver completamente el polvo.
- Se agregó 30 ml de benceno al embudo. Se agitó suavemente durante un minuto.
- Se colocó el embudo de separación en un soporte, dejando reposar 30 minutos.
- Después de los 30 min. Se abrió el regulador del embudo y se drenó la capa de agua del fondo, descartando la capa.
- Se drenó la parte superior del benceno en un vaso de precipitación la cual constituyó la muestra.
- No se debe filtrar el benceno para la medición del color, ya que la misma removerá el color azul.
- **Simple preparado:** se drenó la capa superior de benceno en una celda simple limpia de 25 ml y se tapó la celda.
- **Preparación en blanco:** se llenó otra celda simple hasta la marca de 10 ml con benceno puro y se tapó la celda.
- Se limpió e insertó la celda en blanco en el soporte de la celda.
- Limpiar e insertar la celda simple en el soporte de la celda leer los resultados en mg / l (LAS).

## CAPÍTULO III

### 3. MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Análisis de la concentración inicial del tensoactivo dodecil bencen sulfonato de sodio lineal presente en detergentes

Para preparar las cinco concentraciones ensayadas se partió de la información proporcionada por el fabricante en la funda de detergente x en la que indica para lavado a mano que se debe tomar ½ taza de detergente (200 ml) y disolver en 12 litros de agua.

Para conocer la equivalencia del peso de detergente con relación al volumen:

Equivalencia del peso de detergente con relación al volumen

$$1 \text{ taza} = 200 \text{ ml}$$

$$\frac{1}{2} \text{ taza} = 100 \text{ ml} = 65.2 \text{ g}$$

Los 65.2 g de detergente se disolvió en 12 litros de agua por tanto la concentración determinada por el fabricante corresponde:

$$C1 = \frac{m}{v} = \frac{65.2\text{g}}{12\text{l}} = 5.43 \frac{\text{g}}{\text{l}} = 5430 \text{ ppm}$$

Para preparar las cuatro concentraciones para los diferentes ensayos se tomó como referencia la indicada por el fabricante y se preparó:

Dos concentraciones superiores y dos concentraciones inferiores a las indicadas por el fabricante

**Tabla 1-3:** Concentraciones superiores e inferiores de detergente

Concentraciones	
Superiores	Inferiores
C2 = 10860 ppm	C4 = 2715 ppm
C3 = 8145 ppm	C5 = 1358 ppm

Realizado por: Meneses, L. 2018



Una vez realizado el ensayo se envió una muestra de cada una de las concentraciones al laboratorio de control de calidad (EP-EMAPA-A) para determinar la concentración de tensoactivos, obteniendo los valores que se muestran (Tabla 2-3).

**Tabla 2-3:** Concentración inicial del tensoactivo sin tratamiento

Concentración	Concentración del detergente (mg/l)	Concentración Inicial del tensoactivo (mg/l)	Método
C2	10860	420	HACH 8028
C3	8145	315	HACH 8028
C1	5430	210	HACH 8028
C4	2715	105	HACH 8028
C5	1358	52.5	HACH 8028

**Fuente:** Laboratorio de control de calidad (EP-EMAPA-A)

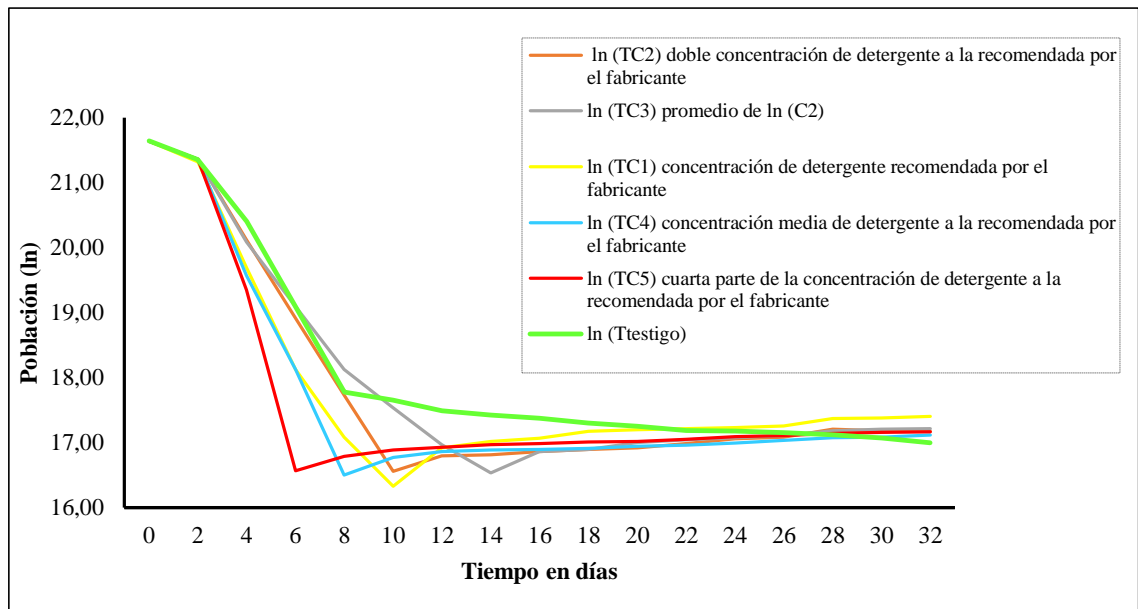
**Realizado por:** Meneses, L. 2018

### 3.2. Evaluación a nivel del laboratorio la tolerancia de *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, y microorganismos eficientes

Los gráficos (1-3, 2-3, 3-3) muestran la comparación de todos los comportamientos de las poblaciones frente a al tensoactivo, incluidos los testigos sin tensoactivos en medio líquido. Específicamente las tasas de crecimiento y los tiempos de generación se calcularon a partir de curvas de crecimiento con logaritmo natural (ln)-transformado.

#### 3.2.1. Evaluación a nivel del laboratorio de la tolerancia de *Trichoderma harzianum* en la degradación del tensoactivo

El gráfico (1-3) muestra el comportamiento de la población de *Trichoderma harzianum* frente a cinco concentraciones de tensoactivo, todos los tratamientos parten de una población de  $2.5 \times 10^9$  UFC/ ml del bioproducto formulado a base de *Trichoderma harzianum*. En las cinco concentraciones hubo un descenso progresivo de la población en los primeros días que probablemente corresponde a la fase de adaptación, seguida de una fase estacionaria que se extiende hasta los 32 días que duró el ensayo.



**Gráfico 1-3.** Comportamiento de la población de *Trichoderma harzianum* frente a 5 concentraciones de tensoactivo.

**Realizado por:** Meneses, L. 2018

Los resultados obtenidos en el comportamiento de la población de *T. harzianum* frente a la concentración de tensoactivo más alta TC2 (*corresponde a la cantidad doble de detergente a la recomendada por el fabricante*), indica un descenso lento de su población hasta el décimo día que llega a un valor de  $1.56 \times 10^7$  UFC/ ml, lo cual se puede deber a que quizá la población se encuentra en su fase de adaptación, las esporas del hongo experimentan el cambio de un entorno a otro, continuando con la fase estacionaria que se extiende hasta el final del ensayo que duró 32 días, se pudo observar que su población permanece constante con mínimas variaciones de crecimiento donde se obtuvo una población final de  $2.87 \times 10^7$  UFC/ ml.

El comportamiento de la población de *T. harzianum* frente a la otra concentración de tensoactivo alta TC3 (*corresponde a la cantidad promedio de la cantidad más alta de detergente a la recomendada por el fabricante*), el gráfico (1-3) deja ver el descenso lento de la población hasta los 14 días del ensayo debido a la fase de adaptación donde su decremento más bajo fue de  $1.52 \times 10^7$  UFC/ ml, continuando después posiblemente con su fase estacionaria se observa en la figura que su población comienza a incrementar después del décimo día manteniéndose casi de manera constante hasta los 32 días con una población final de  $2.99 \times 10^7$  UFC/ ml.

El resultado de la población de *T. harzianum* frente a la concentración de tensoactivo TC1 (*corresponde a la cantidad de detergente recomendada por el fabricante*), presenta una disminución lineal del número de la población a lo largo de 10 días con una concentración de esporas de  $1.24 \times 10^7$  UFC/ ml, en la fase que se consideró como estacionaria se observa un aumento progresivo de la población debido posiblemente a la división celular mediante el cual se

asume que los microorganismos utilizan el tensoactivo como fuente de nutriente y energía para su desarrollo la concentración máxima se presenta a los 32 días que se realizó el ensayo fue de  $3.61 \times 10^7$  UFC/ ml.

La población de *T. harzianum* frente a la concentración de tensoactivo (TC4 corresponde a la mitad de la cantidad de detergente recomendada por el fabricante), su fase de adaptación se extiende hasta el octavo día su población disminuye hasta una concentración de  $1.47 \times 10^7$  UFC/ ml, posteriormente esta empieza a aumentar de forma progresiva su población hasta el día 32 con una concentración de  $2.71 \times 10^7$  UFC/ ml.

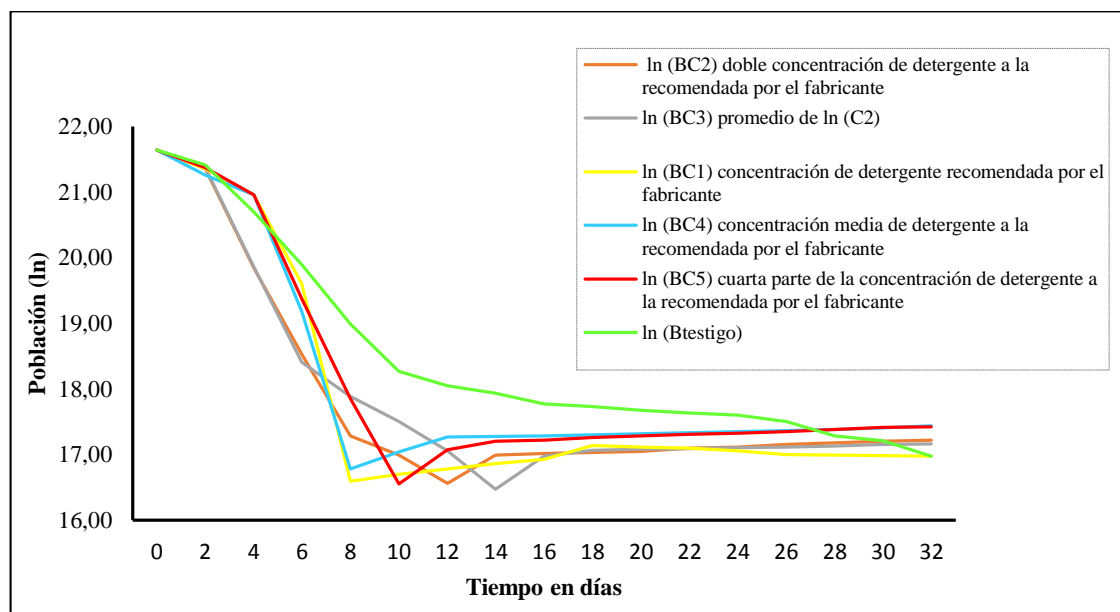
El efecto de la población de *T. harzianum* frente a la concentración (TC5 corresponde a la cuarta parte de la cantidad de detergente recomendada por el fabricante), se observó que su población disminuye de manera progresiva hasta el sexto día con una concentración de  $1.57 \times 10^7$  UFC/ ml, una vez que los microorganismos se adaptan al entorno su población aumenta lentamente hasta mantener un concentración casi constante de  $2.86 \times 10^7$  UFC/ ml.

Con respecto al comportamiento del testigo en ausencia del tensoactivo presentó un decremento monofásico de la población desde su inoculación hasta el último día que duró el ensayo, se asume que se dio debido a que en su entorno no existía ningún tipo de nutriente que le ayudase a desarrollarse y como se puede observar en la figura hasta el octavo día su descenso se da una manera rápida, aunque su descenso continua este sigue lentamente la cual se tuvo una población de  $2.41 \times 10^7$  UFC/ ml.

Todos los comportamientos de la población de *Trichoderma harzianum* frente a los cinco concentraciones de tensoactivo muestran un comportamiento difásico, inicialmente las cepas se inhibieron progresivamente hasta que estas se adaptaran al entorno que las rodea y ninguna presenta una disminución significativa de su población, seguida con la fase estacionaria, según Montero, 2010, citado en Osuna *et al.*, 2012, p.554, estas cepas tienen habilidad para adaptarse a condiciones de estrés, en altas o bajas temperaturas, son altamente resistentes a sustancias tóxicas debido a la gran actividad de sistemas de transportes ABC, ya que producen enzimas que lo degradan, existe una amplia gama de enzimas quitinolíticas y glucanolíticas que produce *Trichoderma* con posibles funciones en el control biológico y en la degradación de contaminantes (Harman, 2006, p. 192-193).

### 3.2.2. Evaluación a nivel del laboratorio de la tolerancia de *Bacillus subtilis* en la degradación del tensoactivo

En general, la densidad de la población bacteriana de *B. subtilis* presenta un decremento a lo largo del periodo de aclimatación, y después presenta un ligero aumento que permanece prácticamente constante hasta el final del ensayo (gráfico 2-3). Excepto por el testigo, presenta un decremento continuo de su densidad poblacional hasta el final del ensayo. Por tanto, se asume que la capacidad de degradación se debe a la presencia de cepas capaces de degradar el tensoactivo, más que al aumento o pérdida de la densidad microbiana. De hecho (Vives-Rego *et al.*, 1992, citados en León, 2001, p.117) observaron que la degradación de tensoactivo estaba correlacionada con la actividad bacteriana más que con la densidad de microorganismos presentes en el sistema.



**Gráfico 2-3.** Comportamiento de la población de *Bacillus subtilis* frente a 5 concentraciones de tensoactivo.

**Realizado por:** Meneses, L. 2018

El gráfico (2-3) muestra el comportamiento de la población de *B. subtilis* frente a cinco concentraciones de tensoactivo, y su comportamiento sin tensoactivo (testigo) los tratamientos parten de una población de  $2.5 \times 10^9$  UFC/ ml del bioproducto formulado a base de *B. subtilis*. En los primeros días existió un descenso de la población en las cinco concentraciones lo cual se asume que corresponde a la fase de adaptación, después se mantienen de forma casi constante en una fase estacionaria que se observó hasta el final del ensayo.

En el comportamiento de (BC2 corresponde a la cantidad doble de detergente a la recomendada por el fabricante), su población empezó a disminuir desde el primer día que se lo inoculó se observó que los microorganismos se adaptan a los 12 días donde detiene el decremento de la

población con una concentración de  $1.56 \times 10^7$  UFC/ ml una vez que estas se adaptan mantienen su población casi de manera constante en los días posteriores hasta los 32 días con mínimo incremento con una concentración final de  $3.01 \times 10^7$  UFC/ ml.

La acción de (BC3 *corresponde a la cantidad promedio de la cantidad más alta de detergente a la recomendada por el fabricante*), frente al tensoactivo se puede observar la población a esta concentración de tensoactivo tarda más en adaptarse que el resto de concentraciones el descenso de su población se detiene en el día 14 con  $1.42 \times 10^7$  UFC/ ml, al día siguiente la población empieza a incrementarse llegando quizás a su fase estacionaria hasta que dura el ensayo con una concentración final de  $2.83 \times 10^7$  UFC/ ml.

El estudio de la aclimatación de (BC1 *corresponde a la cantidad de detergente recomendada por el fabricante*), se observó que su fase de adaptación es mucho más rápida que al resto de concentraciones se da en el octavo día, su población disminuye hasta una concentración de  $1.61 \times 10^7$  UFC/ ml, posteriormente tiene un incremento lento de su población a medida que transcurren los días, donde se asume que llegó a una fase estacionaria con una concentración final a sus 32 días de  $2.36 \times 10^7$  UFC/ ml.

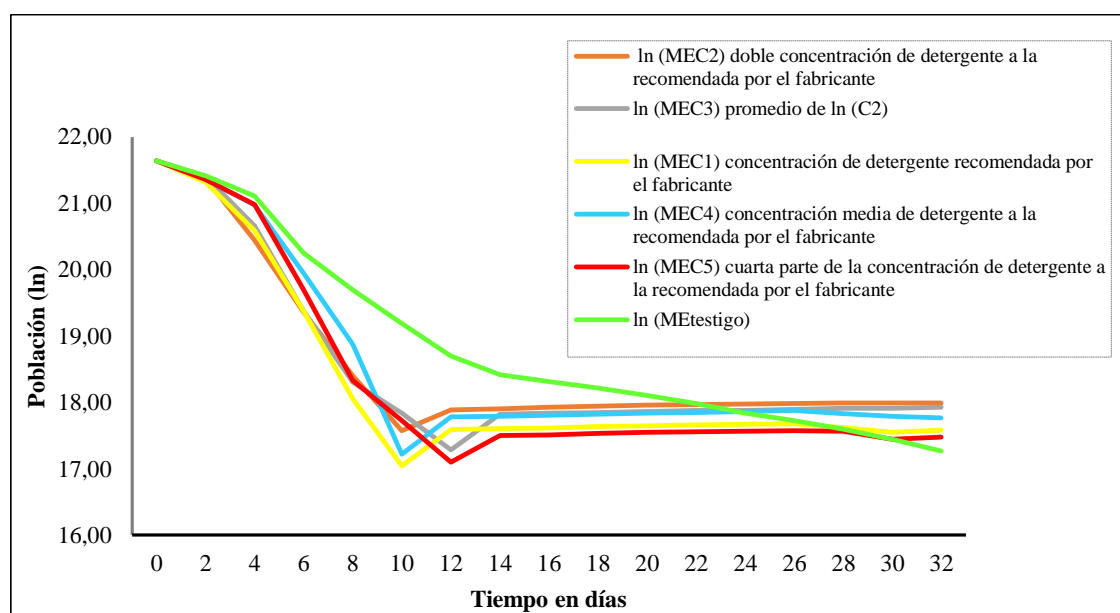
El Comportamiento de (BC4 *corresponde a la mitad de la cantidad de detergente recomendada por el fabricante*), presenta una disminución lineal del número de su población a lo largo de 8 días al igual que el anterior su adaptación es más rápida que es resto, con una concentración de la población de  $1.93 \times 10^7$  UFC/ ml, en la fase que se considera estacionaria se observa un aumento progresivo de la población con una concentración de  $3.74 \times 10^7$  UFC/ ml.

La adaptación frente al tensoactivo de (BC5 *corresponde a la cuarta parte de la cantidad de detergente recomendada por el fabricante*), su población disminuye de manera progresiva hasta el décimo día con una concentración de  $1.54 \times 10^7$  UFC/ ml, una vez que los microorganismos se adaptan al entorno su población empezó un aumento lento concentración de  $3.67 \times 10^7$  UFC/ ml a sus 32 días de su inoculación.

Los resultados del testigo en ausencia del tensoactivo presentó un decremento de la población desde su inoculación hasta el último día que duró el ensayo, se asume que se dio debido a que en su entorno no existía ningún tipo de nutriente que le ayudase a desarrollarse y como se puede observar en la figura hasta el octavo día su descenso se da una manera rápida, después sigue lentamente su descenso obteniendo una población a los 32 días de  $2.36 \times 10^7$  UFC/ ml.

### 3.2.3. Evaluación a nivel del laboratorio de la tolerancia de microorganismos eficientes en la degradación del tensoactivo

Para observar el efecto de la concentración del tensoactivo sobre el crecimiento del consorcio de microorganismos eficientes, se analizaron cinco diferentes concentraciones. Todos los tratamientos parten de una población de  $2.5 \times 10^9$  UFC/ ml del bioproducto formulado a base de una mezcla EM (microorganismos eficientes). El gráfico (3-3) muestra cómo el crecimiento se inhibió progresivamente a medida que avanzaban los días. A bajas y altas concentraciones de tensoactivo, el consorcio mostró una disminución de su población hasta que alcanzó probablemente la fase estacionaria después de aproximadamente 10 a 12 días de inoculación, como se detalla a continuación:



**Gráfico 3-3.** Comportamiento de la población de microorganismos eficientes frente a 5 concentraciones de tensoactivo.

**Realizado por:** Meneses, L. 2018

La codificación (MEC2 corresponde a la cantidad doble de detergente a la recomendada por el fabricante), se puede observar en el gráfico (3.3) de color marrón que tiene un comportamiento bifásico, donde comienza decremento progresivo a medida que transcurren los días donde su fase de adaptación llega hasta el décimo día con una población de  $4.29 \times 10^7$  UFC/ ml después de que estos se adaptaron a su entorno pasaron probablemente a una fase estacionaria donde se puede observar que hubo un pequeño crecimiento después del décimo día y en los siguientes días que duró el ensayo se mantiene su población de una manera casi constante llegando a una población final de  $6.54 \times 10^7$  UFC/ ml.

La adaptación en el medio (tensoactivo) de (MEC3 *Corresponde al promedio de la cantidad más alta de detergente con la recomendada por el fabricante*), su descenso de la población dura hasta el día 12 con una concentración de  $3.21 \times 10^7$  UFC/ ml donde termina su fase de adaptación, y posiblemente después continua con su fase estacionaria hasta el día que duro el ensayo donde logra estabilizar su población con una concentración final de  $6.10 \times 10^7$  UFC/ ml.

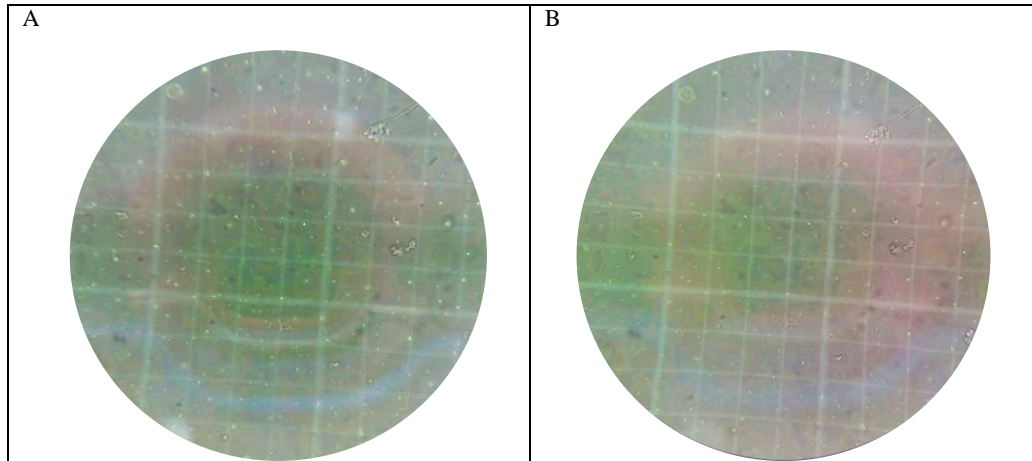
El tratamiento codificado (MEC1 *Corresponde a la cantidad de detergente recomendada por el fabricante*), se observó que su población tiene un comportamiento bifásico posiblemente en su fase de adaptación mantiene una disminución lineal hasta el décimo día con una población de  $2.53 \times 10^7$  UFC/ ml continuando después con la con la siguiente fase que tal vez corresponde a la estacionaria se pudo observar en el gráfico (3.3) que después del décimo día la población tiene un incremento mínimo para luego mantenerse casi de manera constante hasta el último día del ensayo con  $4.34 \times 10^7$  UFC/ ml de la población.

En la apreciación de (MEC4 *representa mitad de la cantidad de detergente recomendada por el fabricante*), su población se adapta hasta el décimo día que es donde termina su disminución lineal donde la concentración de la población llego hasta  $3.07 \times 10^7$  UFC/ ml después de este día la población pasa posiblemente a una fase estacionaria que se mantiene hasta que duro el ensayo con una población final de  $5.21 \times 10^7$  UFC/ ml.

En la evaluación de la codificación de (MEC5 *representa la cuarta parte de la cantidad de detergente recomendada por el fabricante*), mostró que aunque la concentración del tensoactivo sea mucho menor a la recomendada por el fabricante la población de estos microorganismos también tienen un comportamiento bifásico, donde inicialmente pasan por una fase de adaptación del medio que los rodea donde esta termina día 12 con una población de  $2.68 \times 10^7$  UFC/ ml , al día siguiente los microorganismos sufren una división celular lo que les permite que la población se incremente donde se asume que el tensoactivo fue usado como su fuente de energía para sus respectivas divisiones llegando probablemente a su fase estacionaria que se mantiene hasta que termina el ensayo con una concentración de  $3.89 \times 10^7$  UFC/ ml.

El testigo tiene un comportamiento monofásico a lo largo del ensayo se observó que a medida que transcurrían los días la población presentaba una disminución lineal progresiva, se asume que la población fue muriendo debido a que en su entorno no existía ningún tipo de sustrato (tensoactivo) como en las anteriores poblaciones que pudieron utilizarlo como fuente de energía para sus divisiones o supervivencia, llegando a una población a los 32 días de  $3.15 \times 10^7$  UFC/ ml.

Al igual que las anteriores todas las poblaciones que se expusieron a diferentes concentraciones tuvieron un comportamiento difásico, excepto con la población que se usó como testigos donde su comportamiento fue un decremento progresivo a lo largo de todo el ensayo, se asume que existió una influencia positiva del tensoactivo para que las poblaciones puedan estabilizarse y sobrevivir.



**Figura 1-3:** Fotografías de la cámara de Neubauer lectura primera semana de su inoculación (A) y después de 2 semanas de su inoculación (B).

**Realizado por:** Meneses, L. 2018

En este sentido, se ha apreciado un cambio cuantitativo en la población de microorganismos a lo largo del ensayo como se puede comprobar en la (fig. 1-3), donde se muestran las fotografías de dos lecturas mediante la cámara de Neubauer, una correspondiente a la población en su primera semana de inoculación (fig. 1-3a), y la otra de la población transcurridas 2 semanas de ensayo (fig. 1-3b).

La lectura realizada en la primera semana del ensayo muestra una mayor concentración de esporas (UFC/ml) que el correspondiente a la segunda semana donde se observa un decremento de sus esporas. Esta reducción en la concentración se debe probablemente a los efectos tóxicos del tensoactivo que puede tener sobre los microorganismos, o por la incapacidad de muchos de ellos de utilizar el tensoactivo como fuente de carbono.

Sin embargo es necesario destacar que aunque su concentración disminuyó su población final de acuerdo a las casas comerciales que las venden todavía es eficiente para su uso.



**3.3. Análisis de varianza para la cuantificación de *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, y microorganismos eficientes a los 8, 16, 24 y 32 días**

**3.3.1. Análisis de varianza para la cuantificación de *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, y microorganismos eficientes a los 8 días**

**Tabla 3-3:** Análisis de varianza para la variable cuantificación de esporas a los 8 días.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F- calculado
Tratamientos	17	3.4948x10 <sup>17</sup>	2.0557 x10 <sup>17</sup>	4107.570**
Error	36	1.8017x10 <sup>14</sup>	5.0048 x10 <sup>12</sup>	
Total	53	3.4966x10 <sup>17</sup>		

Realizado por: Meneses, L. 2018

Según el análisis de varianza (Tabla 3-3), se determinó que existieron diferencias altamente significativas entre los tratamientos, su media general fue 8.1031x10<sup>7</sup> UFC/ml y su coeficiente de variación 2.76%, por lo que se realiza una prueba de separación de medias mediante Tukey al 5%, lo que reveló la existencia de 18 rangos (Tabla 4-3).

**Tabla 4-3:** Prueba de Tukey al 5% para la cuantificación de esporas a los 8 días.

Tratamientos	Media (UFC/ml)	Rango
METEST	3.576X10 <sup>8</sup>	A
BTEST	1.767X10 <sup>8</sup>	B
MEC4	1.568X10 <sup>8</sup>	C
MEC2	9.783X10 <sup>7</sup>	D
MEC5	9.133X10 <sup>7</sup>	E
MEC3	8.930X10 <sup>7</sup>	F
TC3	7.448X10 <sup>7</sup>	G
MEC1	6.968X10 <sup>7</sup>	H
BC3	5.868X10 <sup>7</sup>	I
BC5	5.548X10 <sup>7</sup>	J
TTEST	5.262X10 <sup>7</sup>	K
TC2	5.013X10 <sup>7</sup>	L
BC2	3.205X10 <sup>7</sup>	M
TC1	2.630X10 <sup>7</sup>	N
TC5	1.955X10 <sup>7</sup>	O
BC4	1.930X10 <sup>7</sup>	P
BC1	1.612X10 <sup>7</sup>	Q
TC4	1.468X10 <sup>7</sup>	R

Realizado por: Meneses, L. 2018

Al comparar los testigos con EM (microorganismos eficientes), *T. harzianum* y *B. subtilis* codificado como (METEST, BTEST, TTEST) respectivamente, se observó que mantienen la mayor concentración de esporas incluso con los tratamientos con tensoactivos encontrándose en los rangos superiores con  $3.576 \times 10^8$  UFC/ml para METEST y  $1.767 \times 10^8$  UFC/ml para BTEST, excepto con TTEST que se encuentra en un rango intermedio con  $5.262 \times 10^7$  UFC/ml.

La evaluación a nivel del laboratorio la tolerancia de una cepa de *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, y microorganismos eficientes (EM) frente al tensoactivo a los 8 días de su inoculación presentaron al igual que los testigos un decremento de su población (Tabla 4-3), sin embargo se determinó que la cepa de microorganismos de *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, y microorganismos eficientes (EM) toleran al tensoactivo a los 8 días en cinco diferentes concentraciones suministradas porque, aunque se haya disminuido su población estos siguen manteniendo concentraciones elevadas de esporas, en el caso del tratamiento con microorganismos eficientes (MEC4 *representa la mitad de la cantidad de detergente a la recomendada por el fabricante*) es el que más tolera al tensoactivo con una concentración de  $1.568 \times 10^8$  UFC/ml, en el tratamiento con *T. harzianum* la cepa que más tolera es (TC3 *representa el promedio del doble de la cantidad de detergente a la recomendada por el fabricante con T. harzianum*) con una concentración de  $7.448 \times 10^7$  UFC/ml y el tratamiento con *B. subtilis* el que más tolera es (BC3 *representa el promedio del doble de la cantidad de detergente a la recomendada por el fabricante con B. subtilis*) con una concentración de  $5.868 \times 10^7$  UFC/ml.

En general, se encontró en el testigo codificado como (METEST *Testigo con microrganismos eficientes sin tensoactivo*) equivalente a  $3.576 \times 10^8$  ubicándose en el rango (A) contiene el mayor número de poblaciones con respecto a los demás tratamientos y en cuanto con el tratamiento (TC4) (*representa la mitad de la cantidad de detergente a la recomendada por el fabricante con T. harzianum*) se encuentra en el último rango (R) con la menor población de  $1.468 \times 10^7$  UFC/ml.

### 3.3.2. Análisis de varianza para la cuantificación de *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, y microorganismos eficientes a los 16 días

**Tabla 5-3:** Análisis de varianza para la variable cuantificación de esporas a los 16 días.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F- calculado
Tratamientos	17	$1.7936 \times 10^{16}$	$1.0550 \times 10^{15}$	351.982**
Error	36	$1.0791 \times 10^{14}$	$2.9975 \times 10^{12}$	
Total	53	$1.8044 \times 10^{16}$		

Realizado por: Meneses, L. 2018

De acuerdo con el análisis de varianza (Tabla 5-3), se determinó que existieron diferencias altamente significativas entre los tratamientos, su media general fue  $3.7852 \times 10^7$  UFC/ml y su coeficiente de variación 4.57%, por lo que se realiza una prueba de separación de medias mediante Tukey al 5%, lo que reveló la existencia de 17 rangos (Tabla 6-3).

**Tabla 6-3:** Prueba de Tukey al 5% para la cuantificación de esporas a los 16 días.

Tratamientos	Media (UFC/ml)	Rango
METEST	$9.013 \times 10^7$	A
MEC2	$6.120 \times 10^7$	B
MEC3	$5.575 \times 10^7$	C
MEC4	$5.430 \times 10^7$	D
BTEST	$5.237 \times 10^7$	E
MEC1	$4.465 \times 10^7$	F
MEC5	$4.005 \times 10^7$	G
TTEST	$3.527 \times 10^7$	H
BC4	$3.208 \times 10^7$	I
BC5	$3.007 \times 10^7$	J
TC1	$2.587 \times 10^7$	K
TC5	$2.525 \times 10^7$	L
BC2	$2.468 \times 10^7$	M
BC3	$2.360 \times 10^7$	N
BC1	$2.235 \times 10^7$	O
TC4	$2.178 \times 10^7$	P
TC3	$2.098 \times 10^7$	Q
TC2	$2.097 \times 10^7$	Q

Realizado por: Meneses, L. 2018

La densidad de las poblaciones ha variado a los 16 días, por lo que probablemente han podido influir en la evolución del proceso de degradación en cada una de las muestras de acuerdo a la prueba de Tukey al igual que en los 8 días (METEST) muestra testigo con microorganismos eficientes sigue predominando con el mayor número de población  $9.013 \times 10^7$  UFC/ml, sin embargo existió una disminución de su población a los 16 días, mientras que el testigo (BTEST) y (TTEST), su población disminuyó de forma progresiva.

En cambio los tratamientos que se enfrentan al tensoactivo tenemos a los microorganismos eficientes con mayor número de propágulos que las cepas de *T. harzianum* y *B. subtilis*, pues son ellos los que más toleran a los 16 días de su inoculación (MEC2) (representa el doble de la cantidad de detergente a la recomendada por el fabricante con microorganismos eficientes) con una concentración de  $6.120 \times 10^7$  UFC/ml.

El tratamiento con *T. harzianum* la población que mejor tolera es TC1 (*representa la cantidad de detergente recomendada por el fabricante con T. harzianum*) igual a  $2.587 \times 10^7$  UFC/ml y por último los tratamientos con *B. subtilis* el que mejor tolera es con la concentración C4 codificada como BC4 (*representa la mitad de la cantidad de detergente a la recomendada por el fabricante*) con una población de  $3.208 \times 10^7$  UFC/ml.

Al comparar la cuantificación de los 8 días respecto a los 16 días todas las poblaciones han cambiado de rangos y su concentración de esporas disminuyó en todos los tratamientos, lo que se asume que las poblaciones al afrontar un medio con tensoactivo se encuentran en una fase de adaptación por lo que disminuye su población. Sin embargo se puede mencionar que estos microorganismos toleran al tensoactivo ya que sus concentraciones siguen siendo elevadas, en torno a  $10^6$  UFC/ml.

La presencia de una fase de adaptación de los microorganismos responsables de la degradación del tensoactivo (fase de latencia, aclimatación o inducción) ha sido también puesta de manifiesto por diversos autores para otros tensoactivos y medios de ensayo (Manzano y col., 1998; Staples y col., 2001; García y col., 1999; Wiggings y Alexander., 1988a, 1988b citado en Sibila (2008). Así, Manzano y col. (1998) establecieron que la presencia de esta fase puede ser debida bien a una baja concentración de microorganismos con capacidad para degradar el tensoactivo en el medio o bien a que la microbiota presente en el medio empleado no ha estado expuesta anteriormente al tensoactivo en cuestión, y por tanto, a de aclimatar su sistema enzimático a la nueva fuente de sustrato (inducción enzimática).

Otros autores defienden que este comportamiento puede ser consecuencia del efecto tóxico o bacteriostático generado por la presencia de altas concentraciones de sustrato sobre las poblaciones bacterianas presentes en el medio (García y col., 1999). Por otro lado, Wiggings y Alexander (1988a, 1988b) establecieron como posibles causas, además de las ya mencionadas, la falta de nutrientes. En nuestro caso, la presencia de esta fase de aclimatación puede ser debida al efecto bacteriostático generado por la presencia del tensoactivo o la falta de nutrientes.

En el caso de la cuantificación a los 16 días, el testigo (METEST) con microorganismos eficientes continua entre el rango superior (A) con la mayor concentración de esporas con una equivalencia igual a  $9.013 \times 10^7$  UFC/ml. En cuanto a los tratamientos con menor población se encuentran en un mismo rango (Q) son (TC3) (*representa el promedio del doble de la cantidad de detergente a la recomendada por el fabricante con T. harzianum*) y (TC2) (*representa el doble de la cantidad de detergente a la recomendada por el fabricante con T. harzianum*), con una equivalencia de ( $2.098 \times 10^7$  y  $2.097 \times 10^7$ ) UFC/ml respectivamente.

3.3.3. *Análisis de varianza para la cuantificación de Trichoderma harzianum, Bacillus subtilis, y microorganismos eficientes a los 24 días*

**Tabla 7-3:** Análisis de varianza para la variable cuantificación de esporas a los 24 días.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F- calculado
Tratamientos	17	9.351x10 <sup>15</sup>	5.500x10 <sup>14</sup>	460.856**
Error	36	4.297x10 <sup>13</sup>	1.192x10 <sup>12</sup>	
Total	53	9.394x10 <sup>15</sup>		

Realizado por: Meneses, L. 2018

Según el análisis de varianza (Tabla 7-3), se determinó que existieron diferencias altamente significativas entre los tratamientos, su media general fue 3.769x10<sup>7</sup> UFC/ml y su coeficiente de variación 2.90%, por lo que se procedió a realizar una prueba de separación de medias empleando Tukey al 5%, la cual reveló la existencia de 18 rangos (Tabla 8-3).

**Tabla 8-3:** Prueba de Tukey al 5% para la cuantificación de esporas a los 24 días.

Tratamientos	Media (UFC/ml)	Rango
MEC2	6.432X10 <sup>7</sup>	A
MEC3	5.815X10 <sup>7</sup>	B
MEC4	5.705X10 <sup>7</sup>	C
METEST	5.612X10 <sup>7</sup>	D
MEC1	4.712X10 <sup>7</sup>	E
BTEST	4.387X10 <sup>7</sup>	F
MEC5	4.245X10 <sup>7</sup>	G
BC5	3.432X10 <sup>7</sup>	H
BC4	3.410X10 <sup>7</sup>	I
TC1	3.045X10 <sup>7</sup>	J
TTEST	2.877X10 <sup>7</sup>	K
BC2	2.713X10 <sup>7</sup>	L
BC3	2.675X10 <sup>7</sup>	M
TC5	2.648X10 <sup>7</sup>	N
TC3	2.612X10 <sup>7</sup>	O
TC2	2.573X10 <sup>7</sup>	P
BC1	2.548X10 <sup>7</sup>	Q
TC4	2.405X10 <sup>7</sup>	R

Realizado por: Meneses, L. 2018

Se obtuvo al Tratamiento (MEC2 *representa el doble de la cantidad de detergente a la recomendada por el fabricante con microorganismos eficientes*) con la mayor concentración de esporas equivalente a  $6.432 \times 10^7$  UFC/ml perteneciente al rango (A) y (TC4 *representa la mitad de la cantidad de detergente a la recomendada por el fabricante con T. harzianum*) con la menor concentración de esporas  $2.405 \times 10^7$  UFC/ml ubicado en el último rango que pertenece al (R).

Al tener en cuenta los valores de los testigos (METEST, BTEST y TTEST) (Tabla 8-3), en comparación con las tablas anteriores de las cuantificaciones, se observó que la concentración de las esporas cada vez van disminuyendo, a diferencia de los tratamientos con tensoactivo, se observó que en todas las concentraciones (C1, C2, C3, C4, C5), hubo un incremento de la población. Entonces, transcurrido los 24 días los microorganismos posiblemente pasaron de una fase de adaptación a una estacionaria, excepto los testigos ya que siguen disminuyendo su densidad poblacional.

Se evaluó la tolerancia de microorganismos eficientes frente al tensoactivo a los 24 días, donde el que predomina con la mayor concentración de esporas es (MEC2 *representa el doble de la cantidad de detergente a la recomendada por el fabricante con microorganismos eficientes*) con  $6.432 \times 10^7$  UFC/ml, en cuanto a la tolerancia de los tratamientos con *T. harzianum* el tratamiento que mejor tolera es TC1 (*representa la cantidad de detergente recomendada por el fabricante con T. harzianum*) con una concentración de  $3.045 \times 10^7$  UFC/ml y finalmente los tratamientos con *B. subtilis* se encontró que tiene mayor concentración el tratamiento (BC5 *representa a la cuarta parte de la cantidad de detergente recomendada por el fabricante*) con una concentración de  $3.432 \times 10^7$  UFC/ml.

Atendiendo a los resultados obtenidos se asume que los microorganismo entran a fase muy importante para el ensayo como es la estacionaria debido a que en esta fase debe existir el mayor consumo de tensoactivo debiendo ser utilizado como su fuente de nutrientes y energía para desarrollar sus actividades metabólicas. Según Corrales *et. al.*, (2015, p.57) sobre los aspectos degradativos, obtención de energía y nutrientes los microorganismos desempeñan procesos dentro de su metabolismo para la descomposición de macromoléculas, realizado varios procesos: hidrólisis, acetogénesis y metanogénesis, entre otros, cobija reacciones que se realizan dependiendo de sus características y de las funciones que cumplen dentro del ciclo degradativo.

3.3.4. *Análisis de varianza para la cuantificación de Trichoderma harzianum, Bacillus subtilis, y microorganismos eficientes a los 32 días*

**Tabla 9-3:** Análisis de varianza para la variable cuantificación de esporas a los 32 días.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F- calculado
Tratamientos	17	7.6735x10 <sup>15</sup>	4.5138x10 <sup>14</sup>	466.305**
Error	36	3.4848x10 <sup>13</sup>	9.6801x10 <sup>11</sup>	
Total	53	7.7084x10 <sup>15</sup>		

Realizado por: Meneses, L. 2018

Según el análisis de varianza para la variable cuantificación de esporas a los 32 días (tabla 9-3), se determinó que existieron diferencias altamente significativas entre los tratamientos, su media general fue 3.661x10<sup>7</sup> UFC/ml y su coeficiente de variación 2.69%, por lo que se realizó una prueba de separación de medias utilizando Tukey al 5%, lo cual reveló la existencia de 17 rangos (Tabla 10-3).

**Tabla 10-3:** Prueba de Tukey al 5% para la cuantificación de esporas a los 32 días.

Tratamientos	Media(UFC/ml)	Rango
MEC2	6.537X10 <sup>7</sup>	A
MEC3	6.097X10 <sup>7</sup>	B
MEC4	5.213X10 <sup>7</sup>	C
MEC1	4.343X10 <sup>7</sup>	D
TC5	4.040X10 <sup>7</sup>	E
MEC5	3.890X10 <sup>7</sup>	F
BC4	3.742X10 <sup>7</sup>	G
TC1	3.678X10 <sup>7</sup>	H
BC5	3.665X10 <sup>7</sup>	I
METEST	3.153X10 <sup>7</sup>	J
BC2	3.010X10 <sup>7</sup>	K
TC3	2.993X10 <sup>7</sup>	L
TC2	2.868X10 <sup>7</sup>	M
BC3	2.825X10 <sup>7</sup>	N
TC4	2.713X10 <sup>7</sup>	O
TTEST	2.410X10 <sup>7</sup>	P
BTEST	2.362X10 <sup>7</sup>	Q
BC1	2.360X10 <sup>7</sup>	Q

Realizado por: Meneses, L. 2018

La tabla (10-3) muestra el rango (A) donde se encuentra el Tratamiento (MEC2 *representa el doble de la cantidad de detergente a la recomendada por el fabricante con microorganismos eficientes*) con mayor concentración de esporas equivalente a  $6.537 \times 10^7$  UFC/ml, y los tratamientos (BTEST Testigo con *B. subtilis*)  $2.362 \times 10^7$  UFC/ml y (BC1 *representa a la cantidad de detergente a la recomendada por el fabricante*)  $2.360 \times 10^7$  UFC/ml) presentan menor concentración de esporas ubicándose en el último rango (Q).

En cuanto a los testigos (METEST, TTEST, BTEST), a medida que pasa el tiempo su densidad cada vez sufre un decremento desde el octavo día hasta el día 32 con una población final de ( $3.153 \times 10^7$ ,  $2.410 \times 10^7$ ,  $2.362 \times 10^7$ ) UFC/ml, respectivamente. Los tratamientos que se enfrentan al tensoactivo codificados como (MEC2, MEC3, TC5, BC4, TC1, BC5, BC2, TC3, TC2, BC3, TC4) comparándoles con la cuantificación del día 24 han incrementado su población, mientras que los tratamientos codificados como (MEC4, MEC1, MEC5, BC1) también con tensoactivo se observa que existió una disminución mínima de sus poblaciones como lo indica la tabla (10-3).

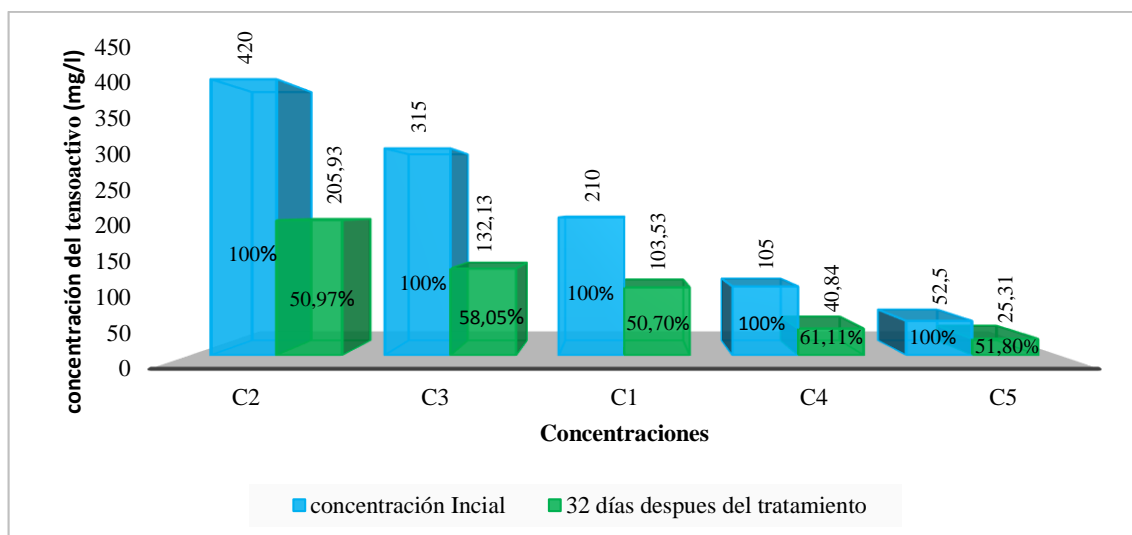
Sin embargo las poblaciones a los 32 días permanecieron casi constantes al igual que a los 24 días, lo cual se asumió que aún se encuentran en una fase estacionaria, a diferencias de los testigos que posiblemente ya presentan una fase de muerte ya que en su medio no existió un sustrato para su supervivencia, Entonces probablemente los microorganismos a los 32 días toleran al tensoactivo asumiéndose que se convirtió en su principal fuente de energía.

### **3.4. Evaluación de los agentes microbianos en la degradación del tensoactivo dodecil bencen sulfonato de sodio lineal**

La concentración del tensoactivo dodecil bencen sulfonato de sodio lineal con la cual iniciaron los tratamientos (*Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis* y Microorganismos eficientes) fueron (420, 315, 210, 105, 52.5) mg/l para (C2: *representa la concentración doble de la cantidad de detergente a la recomendada por el fabricante*, C3: *concentración promedio del doble de la cantidad de C2*, C1: *Concentración de la cantidad de detergente recomendada por el fabricante*, C4: *Concentración media de la cantidad detergente de C1*, C5: *Concentración de la cuarta parte de la cantidad detergente a la recomendada por el fabricante*) respectivamente, como se puede observar en los gráficos (4-3, 5-3 y 6-3), las barras de color azul representan las concentraciones iniciales del tensoactivo sin ningún tipo de tratamiento biológico, las barras de color verde corresponde al tensoactivo que se le dio un tratamiento biológico a lo largo de 32 días.



### 3.4.1. Determinación de *Trichoderma harzianum* en la degradación del tensoactivo en diferentes concentraciones



**Gráfico 4-3.** Acción de *Trichoderma harzianum* sobre el tensoactivo.

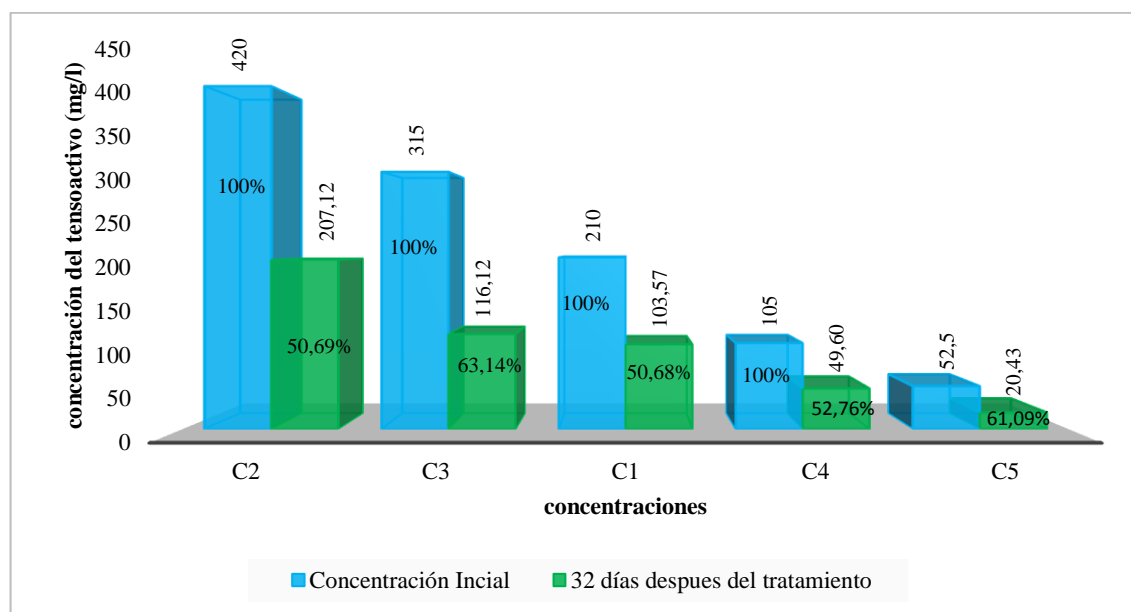
Realizado por: Meneses, L. 2018

Se observó en el gráfico (4-3) que la biodegradación utilizando *Trichoderma harzianum*, alcanzó más de la mitad de reducción del tensoactivo en cada una de las concentraciones. Costa (2017), menciona el uso de hongos en tratamientos de efluentes que contienen tensoactivos puede ser considerada una alternativa viable en comparación con otras alternativas, una vez que los microorganismos pueden alcanzar altos porcentajes de eliminación de estas sustancias sintéticas y el proceso tiene un costo relativamente bajo.

La degradación en los tratamientos C4 (*representa la mitad de la cantidad de detergente a la recomendada por el fabricante*) y C3 (*cantidad promedio al de la doble de detergente recomendada por el fabricante*) corresponden a los de mayor porcentaje de disminución del tensoactivo (61.12% y 58.06%) respectivamente.

En cambio las concentraciones (C2: 50.97%, C1: 50.70%, C5: 51.80%) (*Representan el doble, la cantidad recomendada y la cuarta parte*) de las concentraciones a las recomendadas por el fabricante, estas presentan menores porcentajes de disminución del tensoactivo.

### 3.4.2. Determinación de *Bacillus subtilis* en la degradación del tensoactivo en diferentes concentraciones



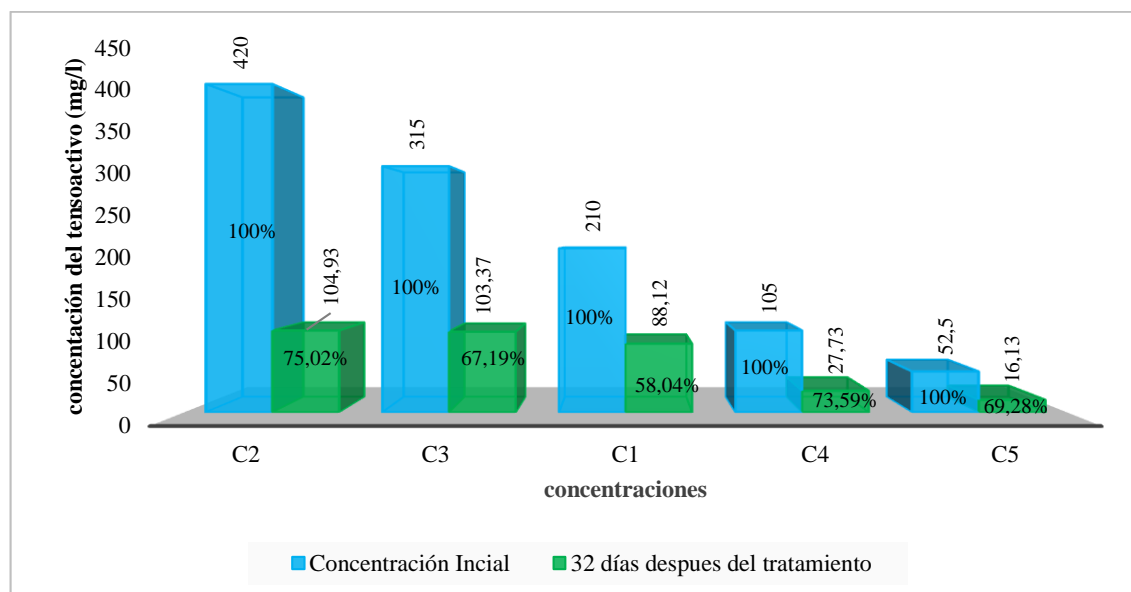
**Gráfico 5-3.** Acción de *Bacillus subtilis* sobre el tensoactivo.

Realizado por: Meneses, L. 2018

El gráfico (5-3) muestra que el mejor tratamiento con *B. subtilis* a nivel de laboratorio para disminuir la concentración de tensoactivo se obtuvo en C3 (representa la cantidad promedio al de la doble de detergente recomendada por el fabricante) un porcentaje de disminución de 63.14% y C5 (corresponde a la cuarta parte de la concentración recomendada por el fabricante) una disminución de 61.09% y respecto a los tratamientos con concentraciones C2 (representa el doble de la cantidad de detergente a la recomendada por el fabricante) y C1 (representa la cantidad de detergente que recomienda el fabricante) con porcentajes de disminución de (50.69% y 50.68%) respectivamente.

Se puede observar que *B. subtilis* a pesar de que en C2 tenga la mayor concentración de tensoactivo se adapta al medio, al igual que C1, degradándose en las dos concentraciones prácticamente con la misma eficiencia que en las otras, finalmente C4 (representa la mitad de la cantidad de detergente a la recomendada por el fabricante) presentó una degradación de 52.76% del tensoactivo. Se corrobora en León (2001) la importancia de *Bacillus sp* en la degradación del tensoactivo, este compuesto se inicia por la liberación del grupo sulfonato como sulfito y por la utilización de unidades de acetil-CoA que separa la cadena de alquilo por una secuencia desconocida.

### 3.4.3. Determinación de microorganismos eficientes en la degradación del tensoactivo en diferentes concentraciones.



**Gráfico 6-3.** Acción del consorcio de microorganismos eficientes sobre el tensoactivo.  
Realizado por: Meneses, L. 2018

En la evaluación de la degradación del tensoactivo en el gráfico (6-3), las combinaciones de una bacteria ácido láctica, una bacteria fototrófica y una levadura también conocida como EM (effective microorganisms), se le reconoce por su capacidad sinérgica, sintrópica y metabiologica lo que permite disminuir la capacidad contaminante del tensoactivo en el agua alcanzando valores elevados de reducción del tensoactivo a nivel de laboratorio la concentración de 420 ppm (C2: *representa el doble de la cantidad de detergente a la recomendada por el fabricante*) y 105 ppm (C4: *representa la mitad de la cantidad de detergente a la recomendada por el fabricante*) obtuvieron mayor porcentaje de degradación con una disminución de (75.02% y 73.59%) respectivamente, estos resultados coinciden con lo que menciona *Van gilkel* (1996) la degradación completa de los tensoactivos se logra mediante cultivos mixtos de microorganismos construidos sobre la base de relaciones sinérgicas y comensalísticas.

Entonces se asume que EM (effective microorganisms), al ser un conjunto de varios microorganismos actúan sobre el tensoactivo como su única fuente de carbono y han demostrado que pueden degradarlo ya sea a concentraciones mayores o menores que a las recomendadas por el fabricante.

### 3.5. Análisis de varianza para la determinación del agente microbiano más eficiente en la degradación del tensoactivo

**Tabla 11-3:** análisis de varianza para la variable disminución de porcentaje a los 32 días del tratamiento.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F- calculado
Tratamientos	14	3080.454	220.032	8.913 **
Error	30	740.637	24.688	
Total	44	3821.091		

Realizado por: Meneses, L. 2018

De acuerdo con el análisis de varianza para la variable disminución de porcentaje a los 32 días del tratamiento, se determinó que existieron diferencias altamente significativas entre los tratamientos, su media general fue 59.6 % y su coeficiente de variación 8.34%, por lo que se realizó una prueba de separación de medias mediante Tukey al 5%, donde se obtuvieron 7 rangos (Tabla 12-3).

La Tabla (12-3), mostró que los Tratamientos con microorganismos eficientes con el doble y la mitad de detergente a la recomendada por el fabricante codificada como (MEC2 y MEC4) se ubican en un mismo rango (A), con una media de 75.02% y 73.59% respectivamente, estos mostraron mayor porcentaje de degradación del tensoactivo, y los tratamientos con menor porcentaje de disminución del tensoactivo se ubican en el rango (D) que se encuentran codificados como (TC5, TC2, TC1, BC2 y BC1), estas codificaciones representan (la cuarta parte de detergente con *T. harzianum*, el doble de detergente con *T. harzianum*, la cantidad de detergente recomendada con *T. harzianum*, el doble de detergente con *B. subtilis* y la cantidad de detergente recomendada con *B. subtilis*) a las recomendadas por el fabricante respectivamente con una media de (51.8, 50.97, 50.7, 50.69, 50.68)%.

En general los resultados mostrados en la tabla (12-3) indicaron que el consorcio con microorganismos eficientes (EM), produjeron mayor degradación del tensoactivo contenido en el detergente, lo que demuestra una ventaja competitiva sobre las otras dos especies de cultivos puros investigadas que cuando se cultiva como consorcio.

**Tabla 12-3:** Prueba de Tukey al 5% para el porcentaje de disminución a los 32 días del tratamiento.

Tratamientos	código	Media (% disminución)	Rango			
11	MEC2	75.02	A			
14	MEC4	73.59	A			
15	MEC5	69.28	A	B		
12	MEC3	67.18	A	B	C	
7	BC3	63.14	A	B	C	D
4	TC4	61.12	A	B	C	D
10	BC5	61.09	A	B	C	D
2	TC3	58.06		B	C	D
13	MEC1	58.03		B	C	D
9	BC4	52.76			C	D
5	TC5	51.8				D
1	TC2	50.97				D
3	TC1	50.7				D
6	BC2	50.69				D
8	BC1	50.68				D

**Nota:** Medias seguidas de la misma letra no difieren estadísticamente al 5%.

**Realizado por:** Meneses, L. 2018

Sin embargo, las cepas (*T. harzianum* y *B. subtilis*) también demostraron eficiencia degradativa en todos los ensayos a diferentes concentraciones del tensoactivo que fue añadida como sustrato. Pero no se observó una degradación completa en ninguna de las concentraciones con ningún microorganismo. En todas las concentraciones del tensoactivo se logró una biodegradación que supera más del 50%. En general, se sabe que los tensoactivos xenobióticos comprende un grupo importante de compuestos potencialmente tóxicos que promueven la alteración del ambiente, y una degradación que alcance más del 50% favorece significativamente al equilibrio de los ecosistemas.

## CONCLUSIONES

- Se determinó la concentración inicial del tensoactivo dodecil bencen sulfonato de sodio lineal presente en detergentes en mg/l en cada una de los tratamientos, obteniendo como resultado para: **C1:** representa la concentración de la cantidad de detergente recomendada por el fabricante 210 mg/l, **C2:** representa la concentración doble de la cantidad de detergente a la recomendada por el fabricante 420 mg/l, **C3:** representa la concentración promedio del doble de la cantidad de detergente recomendada por el fabricante 315 mg/l, **C4:** representa la concentración media de la cantidad detergente a la recomendada por el fabricante 105 mg/l, **C5:** representa la concentración de la cuarta parte de la cantidad detergente a la recomendada por el fabricante 52.5 mg/l.
- A nivel de laboratorio la prueba de tolerancia de la cepa de *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, y microorganismos eficientes (EM) frente al tensoactivo, mostraron resistencia en todas sus concentraciones, sin embargo la cepa de *Trichoderma harzianum* y de *Bacillus subtilis* toleran mejor a concentraciones de tensoactivos que se encuentran por debajo de la cantidad de detergente a la recomendadas por el fabricante (TC5 representa la cuarta parte de la cantidad detergente a la recomendada por el fabricante con *T. harzianum* y BC4 representa la cantidad media de detergente a la recomendada por el fabricante con *B. subtilis* ) con una población final de ( $4.040 \times 10^7$  y  $3.742 \times 10^7$  ) UFC/ml respectivamente, en cuanto a los microorganismos eficientes toleran altas concentraciones de tensoactivos, indicando mejor tolerancia en (MC2 representa el doble de la cantidad de detergente a la recomendada por el fabricante con microorganismos eficientes) manteniendo una población final de  $6.537 \times 10^7$  UFC/ml.
- Se determinó que el agente microbiano más eficiente para la degradación de tensoactivos dodecil bencen sulfonato de sodio lineal presente en detergentes fueron los microorganismos eficientes (EM) ya que se observó un mayor porcentaje de degradación del tensoactivo en todas las concentraciones suministradas que en las cepas de *Trichoderma harzianum* y de *Bacillus subtilis*, teniendo el mejor porcentaje de degradación en (MC2 representa el doble de la cantidad de detergente a la recomendada por el fabricante con microorganismos eficientes) con 75.02%, lo que sugiere que las cepas involucradas en el consorcio se complementan entre sí en su actividad de biodegradación.

## RECOMENDACIONES

- Se recomienda utilizar consorcios de microorganismos eficientes (EM) a nivel de campo en tratamientos de efluentes que contengan concentraciones elevadas de tensoactivos para su degradación, ya que la introducción de un agente tensoactivo en los ecosistemas naturales puede dar como resultado una formación transitoria de un metabolito.
- Realizar más ensayos sobre la cantidad de degradación de tensoactivos con tiempos más prolongados.
- Implementar estos agentes microbianos en tratamientos de agua residuales en plantas operadas con tiempos de retención de lodo que son adecuados para mantener todos los microorganismos del consorcio o también en fosas sépticas.
- profundizar estudios con diferentes microorganismos que tengan la capacidad de degradar contaminantes orgánicos como los tensoactivos para que en un futuro pueden ser aprovechados.

## BIBLIOGRAFÍA

**AGATANGELO J & SANTOS E.** Estudio del comportamiento cinético de microorganismos de interés en seguridad alimentaria con modelos matemáticos (tesis). (Doctoral) Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de veterinaria, Departamento de ciencia animal y de los alimentos área de nutrición y bromatología, Lugar (Madrid –España). 2007. pp. 26-27. [Consultado: 11 de mayo del 2018]. Disponible en: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/5691/ajse1de1.pdf>

**Aguavil, J.** Evaluación del efecto de un probiótico nativo elaborado en base a *Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis* sobre el Sistema gastrointestinal en pollos broiler Ross-308 en santo domingo de los Tsáchilas. (Informe Técnico Del Proyecto De Investigación), Escuela Politécnica Del Ejército. 2012. pp. 24-25. [Consulta: 18-06-2018]. Disponible en: <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/5213/1/T-ESPE-IASA%20II%20-20002399.pdf>

**ALTMAJER VAZ, Deisi.** Formulaciones detergentes biodegradables: Ensayos de lavado [En línea] (tesis). (Doctoral) Universidad de Granada, Facultad de ciencias, Departamento de ingeniería química. Lugar (Granada-España). 2004. pp. 21-22. [Consulta: 09/05/2018]. Disponible en: <https://hera.ugr.es/tesisugr/15847093.pdf>

**Argumedo, R., Alarcón, Alejandro., Ferrera, Ronald., Peña, Juan.** “El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos”. *Rev. Int. Contam. Ambient. (Review)*, [en línea], 2009, (México) 25(4), pp. 257-269. [Consulta: 21 mayo 2018]. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v25n4/v25n4a6.pdf>

**Baltodano, A. & Moreno, K.** Evaluación De Capacidad Adsorptiva Del Carbón Activado Industrial Darco En Agente Surfactante Dodecil Benceno Sulfonato De Sodio Lineal, Presentes En Detergentes. (Tesis) (Doctorado), Universidad Nacional Autónoma De Nicaragua, Managua, Nicaragua. 2013. pp. 17-18. [Consulta: 2018-07-21]. Disponible en: <http://repositorio.unan.edu.ni/4621/1/94369.pdf>

**Baron, S.** *Medical Microbiology* [En línea]. Fourth edition. Texas- USA: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. [Consulta: 29 de mayo del 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7699/>



**Baugh Bill.** *Trichoderma harzianum* benefits. *Garden & greenhouse* (2017). [Consultado: 21/06/2018]. Disponible en: <http://www.gardenandgreenhouse.net/articles/january-february-2018/trichoderma-harzianum-benefits/>

**Bejarano, María & Escobar Mauricio.** Agentes microbianos eficientes Para El Tratamiento De Aguas Residuales Domésticas En Una Planta De Tratamiento De Agua Residual. UNIVERSIDAD DE LA SALLE. (Lugar Colombia – Bogotá). 2015, pp. 35-38.

**Bikandi, J& San MillaN, R.** Cuantificación de levaduras en cámara de recuento Neubauer improved o Thoma. Universidad del País Vasco (2016). Dpto. Inmunología, Microbiología y Parasitología.

**Brand.** Cámaras de recuento. “*Laboratory instruments and consumables: BRAND GMBH + COKG*”, 2018, pp. 254. [Consulta: 26 junio 2018]. Disponible en: [https://www.brand.de/fileadmin/user/pdf/GK900/Zaehlkaammern/GK900\\_05\\_Clinical\\_Lab\\_Zaehlkaammern\\_s.pdf](https://www.brand.de/fileadmin/user/pdf/GK900/Zaehlkaammern/GK900_05_Clinical_Lab_Zaehlkaammern_s.pdf).

**Cardona, Juanita & García, Luisa.** Evaluación del efecto de los microorganismos eficientes (EM) sobre la calidad de un agua residual doméstica. (Tesis) (Ingeniería), Pontificia Universidad Javeriana, Cali, Colombia. 2008. pp. 1-15. [Consulta: 2018-07-20]. Disponible en: <http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis204.pdf>

**Carvajal, J.** “Fotocatálisis heterogénea para el abatimiento de tensoactivos aniónicos en aguas residuales”. *Rev. Int. Contam. Ambient. (Review)*, [en línea], 2011, (Colombia) 6(2), pp. 92-107. [Consulta: 08 mayo 2018]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/pml/v6n2/v6n2a09.pdf>

**CASTRO, R.** “Efecto de la cepa ecuatoriana de *Trichoderma harzianum* Rifai como antagonista de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en condiciones de casa de cultivo” *Revista de protección vegetal*, (2015), (Cuba) 30 (2), pp. 130- 139.

**Corrales, L; Antolinez, D; Bohórquez, J & Corredor A.** “Anaerobic bacteria: processes they perform and their contribution to life sustainability on the planet”. *Nova* [online]. 2015 (Colombia), 13 (24), pp.55-81. ISSN 1794-2470. [Consultado: 21/06/2018]. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1794-24702015000200007](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702015000200007)

**Costa, Mayara; Oliveira, Junior & Oliveira, Ana.** Biodegradation Of Linear Alkyl Benzene Sulfonate (Las) By Filamentous Fungi, *Xxi Simpósio Nacional De Bioprocessos Xii Simpósio De*

*Hidrólise Enzimática De Biomassa*. 2017 (Brasil) Universidade Federal de São João del Rei. [Consultado: 28/06/2018]. Disponible en: <https://proceedings.science/sinaferm/sinaferm-2017/trabalhos/biodegradation-of-linear-alkyl-benzene-sulfonate-las-by-filamentous-fungilang>

**Cuervo, J.** Aislamiento y caracterización de *Bacillus spp* como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras biofertilizantes comerciales. (Tesis). (Ingeniería), Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá – Colombia. 2010.

**Dávila, Nuria & Hernández, Juan.** “Métodos de ensayos rápidos de detección de microorganismos”. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria* [en línea], 2006, (España) 7 (7), pp. 1-18. [Consulta: 19 junio 2018]. ISSN 1695-7504.

**Díaz, J.** Eliminación del surfactante dodecilbencensulfonato de sódico de las aguas mediante adsorción en carbones activados, ozonización catalizada y fotooxidación (tesis). (Doctoral), universidad de granada. Granada, España. 2008. pp. 144-167.

**Earl, A.; Losick, R.; Kolter R.** “Ecology and genomics of *Bacillus Subtilis*”. *Trends in Microbiology (Review)*, [En línea], 2008, (United State of America) 16(6), pp 269-275. [Consulta: 29 de mayo del 2018]. doi: 10.1016 / j.tim.2008.03.004. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2819312/>

**Estela, W., Rychtera, M., Melzoch, K., Quillama, E., Egoavil, E.**”Production of lactic acid by *Lactobacillus plantarum* L10 on batch and continuous cultivation”. *Revista Peruana de Biología* [En línea], 2007, (Perú) 14(2). pp. 271-275 [Consulta: 11/05/2018]. ISSN 1727-9933. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1727-99332007000300014](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332007000300014)

**Estrella, J.** “El detergente en polvo es el preferido en el mercado nacional”. *Revista Líderes* [en línea], 2016, (Ecuador). [Consulta: 6 junio 2018]. Disponible en: <http://www.revistalideres.ec/lideres/detergente-polvo-ecuador-limpiezaproduccion.html>.

**FERNÁNDEZ ARTEAGA, Alejandro.** Preparacion, caracterización y estabilidad de emulsiones y microemulsiones O/W [En línea] (tesis). (Doctoral) Universidad de Granada, Facultad de ciencias, Departamento de ingeniería química, Lugar (Granada- España). 2006. pp. 16-18. [Consultado: 11/05/2018]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/A\\_Arteaga/publication/46590023\\_Preparacion\\_caracterizacion\\_y\\_estabilidad\\_de\\_emulsiones\\_y\\_microemulsiones\\_OW/links/00b49525f98e7b9b1e.pdf](https://www.researchgate.net/profile/A_Arteaga/publication/46590023_Preparacion_caracterizacion_y_estabilidad_de_emulsiones_y_microemulsiones_OW/links/00b49525f98e7b9b1e.pdf)

**García, J.** “Comparación de la fertilidad orgánica y convencional a partir del uso de microorganismos eficientes y químicos tradicionales sobre la producción de biomasa durante un ciclo de cosecha en un cultivo de rábano gordo”. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 2006, (México) 42(2), pp.73-82.

**GIL MUÍÑO, Ana.** Análisis y caracterización de agentes tensoactivos, polímeros y química fina en un laboratorio de control [En línea] (tesis). (Maestría) Universidad da Coruña, Máster en Ciencias, Tecnologías y Gestión Ambiental. Lugar (Caruña-España). 2014. pp. 17-18. [consultado: 09/05/2018]. Disponible en: [https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/13628/GilMuino\\_Ana\\_TFM\\_2014.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/13628/GilMuino_Ana_TFM_2014.pdf?sequence=2&isAllowed=y)

**Günther, J & Jiménez-Montealegre, R.** “Efecto del probiótico *Bacillus subtilis* sobre el crecimiento y alimentación de tilapia (*Oreochromis niloticus*) y langostino (*Macrobrachium rosenbergii*) en laboratorio”. *Revista de biología tropical* [en línea], 2004, (Costa Rica) 52(4), pp. 937-943. [Consulta: 12 mayo 2018]. ISSN-0034-774. Disponible en: <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/view/15588/14953>

**Harman, G.** “Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp.” *The American Phytopathological Society*, Cornell University, Geneva, NY 14456, 96, 2 (2006), (United State of America) pp. 190-194.

**Hernández, Ana Niurka; Bautista, Silvia; Velázquez, Miguel; Hernández, Annia.** “Uso de Microorganismos Antagonistas en el Control de Enfermedades Postcosecha en Frutos”. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25 (1), 2007, pp. 66-74 Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. Texcoco, México. ISSN: 0185-3309.

**Infante, D. Martínez, B. Gonzalez, N y Reyes, Y.** “*Trichoderma* mechanisms of action against phytopathogen fungi”. *Revista de Protección Vegetal* [en línea], 2009, (Cuba) 24 (1), pp. 14-21. [Consulta: 20 junio 2018]. ISSN 2224-4697. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522009000100002](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100002)

**Iza, R.** Interacción de cuatro fosfonatos mas *trichoderma harzianum* para el control de la lancha de papa (*Phytophthora infestans*) a nivel de laboratorio. [En línea] (Tesis). (Ingeniería) ESPOCH. 2010. pp. 25-30. [Consulta: 11-06-2018]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/657>

**Kaiser, Gary.** Bacterial Growth. *Biology, libretxts*. 2017 (United State of America) 17, (1). The California State University. [Consultado: 25/06/2018]. Disponible en: [https://bio.libretxts.org/TextMaps/Microbiology/Book%3A\\_Microbiology\\_\(Kaiser\)/Unit\\_7%3A\\_A\\_Microbial\\_Genetics\\_and\\_Microbial\\_Metabolism/17%3A\\_Bacterial\\_Growth\\_and\\_Energy\\_Production/17.1%3A\\_Bacterial\\_Growth](https://bio.libretxts.org/TextMaps/Microbiology/Book%3A_Microbiology_(Kaiser)/Unit_7%3A_A_Microbial_Genetics_and_Microbial_Metabolism/17%3A_Bacterial_Growth_and_Energy_Production/17.1%3A_Bacterial_Growth)

**Lannacone, J & Alvarino, L.** “Efecto Del Detergente Doméstico Alquil Aril Sulfonato De Sodio Lineal (Las) Sobre La Mortalidad De Tres Caracoles Dulceacuicolas En El Perú”. *Ecología aplicada* [en línea], 2002, (Perú) 1 (1), pp. 81-87. [Consulta: 28 junio 2018]. ISSN 1726-2216. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=34100113>

**Larimer, F., Chain, P., Hauser, L., Lamerdin, J., Malfatti, S., Do, L., Land, M., Pelletier, D., Beatty, J., Lang, A., Tabita, F., Gibson, J., Hanson, T., Gibson, J & Harwood, C.** “Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*”. *Nature biotechnology*, 2004, (Estados Unidos) 22(1), pp. 55-61. [Consulta: 11 mayo 2018]. Doi: 10.1038/nbt 923. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nbt923>

**Lechuga, M.** Biodegradación y Toxicidad de Tensoactivos Comerciales [En línea]. (Tesis). (Doctorado), Universidad de Granada. Granada, España. 2005. pp. 29-55 [Consulta: 2018-07-17]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/\\_Biodegradacion\\_y\\_toxicidad\\_de\\_tensioactivos](https://www.researchgate.net/_Biodegradacion_y_toxicidad_de_tensioactivos)

**León, Víctor.** Reactividad y mecanismos de transporte de y mecanismos de transporte de alquilbenceno alquilbenceno lineal sulfonatos sulfonatos (LAS) y sus intermedios de degradación (LAS) y sus intermedios de degradación en sistemas marinos litorales (Tesis). (Doctoral) Universidad de Cádiz, Lugar (Cádiz –España). 2001. pp. 117. [Consultado: 18/06/2018]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/Victor\\_Leon2/publication/235780199\\_Reactividad-y-mecanismos-de-transporte-de-alquilbenceno-lineal-sulfonatos-y-sus-intermedios-de-degradacion-en-sistemas-marinos-litorales.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Victor_Leon2/publication/235780199_Reactividad-y-mecanismos-de-transporte-de-alquilbenceno-lineal-sulfonatos-y-sus-intermedios-de-degradacion-en-sistemas-marinos-litorales.pdf)

**LIN ESCUDERO, Liza.** Tratamiento biológico para la contaminación por tensoactivos de la planta de tratamiento de aguas residuales del cantón salcedo- chipaló [En línea] (tesis). (Ingeniería) Escuela superior politécnica de Chimborazo, Facultad de ciencias, Escuela de ciencias químicas. Lugar (Riobamba- Ecuador). 2014. pp. 4-5. [consultado: 11/05/2018]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/3644/1/236T020UDCTFC.pdf>

**Martínez, J.** Utilización de  $\alpha$ -Amilasas en la formulación de detergentes industriales. (Tesis). (Doctorado), Universidad de Granada, Granada, España. 2005. [Consulta: 2018-07-23]. Disponible en: [http://www.academia.edu/29983586/Utilización\\_de\\_alfa-amilasas\\_en\\_la\\_formulación\\_de\\_detergentes\\_industriales](http://www.academia.edu/29983586/Utilización_de_alfa-amilasas_en_la_formulación_de_detergentes_industriales)

**Monzón, A.** “Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua”. *Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos* [en línea], 2001, Manejo integrado de plagas (Costa Rica), (63), pp. 95-103. [Consulta: 18 mayo 2018]. Disponible en: <http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/6723/A2107e.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

**Natura.** Especies de microorganismos eficientes. “*Revista mercanatura*”. 2015. [Consulta: 29 junio 2018]. Disponible en: [http://www.mercanatura.com/es/revista/95\\_-MICROORGANISMOS-BENEFICIOSOS-PARA-LOS-CULTIV.html](http://www.mercanatura.com/es/revista/95_-MICROORGANISMOS-BENEFICIOSOS-PARA-LOS-CULTIV.html)

**Neelesh, T.** Growth Curve of Bacteria: 4 Phases. *Biology Discussion*. 2016. [Consultado: 19/06/2018]. Disponible en: <http://www.biologydiscussion.com/bacteria/growth-curve-of-bacteria-4-phases/47009>

**Osuna-Canizalez, F.; Moreno-López, M.; García- Pérez, F.; Ramirez- Rojas, S.; Canul-Ku, J.** “Root rot biocontrol for indoor poinsettia with *trichodrema* spp”. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3,3 (2012), (México) pp. 553-564.

**Parra, R.** “Review lactic acid bacteria: functional role in the foods”. *Review article scielo* [en línea], 2016, (Colombia) 8(1), pp. 94-105. [Consulta: 11 mayo 2018]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n1/v8n1a12.pdf/>

**Peraza, R & Delgado, V.** “Determinación De La Concentración Letal Media (Cl50) De Cuatro Detergentes Domésticos Biodegradables En *Laeonereis Culveri* (Webster 1879) (Polychaeta: Annelida)”. *Revista Internacional De Contaminación Ambiental* [en línea], 2012, (México) 28 (2), pp. 137-144. [Consulta: 20 junio 2018]. ISSN 0188-4999. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0188-49992012000200004](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992012000200004)

**Piguave, Z., & Gutiérrez, C.** Eficacia, Toxicidad Y Biodegradabilidad De Los Dispersantes De Petróleo Comercializados En El Ecuador [En línea] (tesis). (Ingeniería) Universidad De Guayaquil, Guayaquil, Ecuador. 2010. [Consulta: 11 de julio 2018]. Disponible en: <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/1964>

**Ríos, F.** Comportamiento ambiental de tensoactivos comerciales aniónicos y no aniónicos. (Tesis). (Maestría), Universidad de Granada. Granada, España. 2010. pp. 16-166 [Consulta: 2018-06-21]. Disponible en: [www.researchgate.net/publication/50369190](http://www.researchgate.net/publication/50369190)

**Ríos, F.** Comportamiento ambiental de tensoactivos comerciales: Biodegradabilidad, toxicidad y ozonización [En línea]. (Tesis). (Doctorado), Universidad de Granada. Granada, España. 2014. pp. 35-37 [Consulta: 2018-06-28]. Disponible en: <https://hera.ugr.es/tesisugr/24452968.pdf>

**Rodríguez, María Rosa.** Variabilidad de la inactivación microbiana y de la fase de latencia de los microorganismos supervivientes a un proceso de acidificación (Tesis). (Doctoral) Universidad Complutense De Madrid, Lugar (Madrid –España). 2016. pp. 62. [Consultado: 11/06/2018]. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/38768/1/T37612.pdf>

**Romero, Omar; Huerta, Manuel; Arellano Victoria, Daniel Alfonso.** “Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles”. *Rev. Colomb. Biotecnol*, [en línea], 2009, (Colombia) 11 (2), pp. 143-151. [Consulta: 30 junio 2018]. ISSN 0123-3475. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77613172015>

**Sánchez, M.** Efectos biológicos de los sulfonatos de alquilbenceno lineales (LAS) en suelo agrícola: biotransformación y estudios de biodiversidad [En línea]. (Tesis). (Doctorado), Universidad de Granada. Granada, España. 2007. pp. 1-40 [Consulta: 2018-06-28]. Disponible en: <https://hera.ugr.es/tesisugr/16728117.pdf>

**SIBILA LORES, Miguel A.** Evaluación De La Biodegradabilidad Y Ecotoxicidad De Tensioactivos En El Medio Acuático Marino [En línea] (tesis). (Doctoral) Universidad de Cádiz, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y Tecnologías del Medio Ambiente. Lugar (Cádiz- España). 2008. pp. 2-3. [Consulta: 08-05-2018]. Disponible en: [http://minerva.uca.es/publicaciones/asp/tesis/sibila\\_lores.pdf](http://minerva.uca.es/publicaciones/asp/tesis/sibila_lores.pdf)

**Silva, M.** Microbiología general. 2009 (en línea). [Consulta: 21 agosto 2018]. Disponible en: <http://microbiologia-general.blogspot.com/2009/05/microorganismos-eficientes.html>.

**Tejera, Berto; Rojas, Marcia M.; Heydrich, Mayra.** “Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos”. *Revista*

*CENIC. Ciencias Biológicas.* 42 (3), 2011, pp. 131-138 Centro Nacional de Investigaciones Científicas Ciudad de La Habana, Cuba. ISSN: 0253-5688.

**Torres, D.** “El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos”. *Revista científica y técnica de ecología y medio ambiente.* (2003), (Alicante - España) 12 (2), pp. 1-5. ISSN: 1132-6344.

**Van Ginkel.** “Complete degradation of xenobiotic surfactants by consortia of aerobic microorganisms”, *Kluwer Academic Publishers* [en línea], 1996, (United State of America) 7 (151), pp.151–164. [Consulta: 22 junio 2018]. ISSN 0923-9820.

**VÁZQUEZ VÁZQUEZ, Jesús Jorge.** Determinación in vitro de las Propiedades Fungicidas de los Ácidos Fúlvicos en *Fusarium moniliforme* (Sheldon) y *Trichoderma harzianum* (Rifai) [En línea] (tesis). (Ingeniería) Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, Coahuila, México. 2009. pp. 38-39. [Consulta: 08-05-2018]. Disponible en: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/6390/T17583%20VAZQUEZ%20VAZQUEZ,%20JESUS%20JORGE%20%20TESIS.pdf?sequence=1>

**Velásquez, M.** Comparación teórica del uso de un compuesto activo en un detergente líquido lavavajillas de alta biodegradabilidad y baja toxicidad a partir de tensoactivos aniónicos y no iónicos. (Tesis). (Ingeniería), Universidad de Pereira. Pereira, Colombia. 2016. pp. 20-24.

**Ying, G., Williams, B., y Kookana, R.** “Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates. *Environment International*”, *National Center for Biotechnology information* [en línea], 2002, (United State of America) 28 (3), pp. 215-226. [Consulta: 22 junio 2018]. PMID: 12222618. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12222618>

## ANEXOS

### Anexo A. cuantificación de esporas *Trichoderma harzianum* a los 32 días.

Cuantificación de esporas (cámara de Neubauer)							
TC1							
	cuadrante 1	cuadrante 2	cuadrante 3	cuadrante 4	cuadrante 5	suma	Núm. esporas /ml
R1	103	101	148	171	198	721	3,61E+07
R2	114	108	189	114	218	743	3,72E+07
R3	121	135	117	212	118	703	3,52E+07
TC2							
	cuadrante 1	cuadrante 2	cuadrante 3	cuadrante 4	cuadrante 5	suma	Núm. esporas /ml
R1	131	125	123	102	113	594	2,97E+07
R2	105	113	128	125	92	563	2,82E+07
R3	116	104	120	107	117	564	2,82E+07
TC3							
	cuadrante 1	cuadrante 2	cuadrante 3	cuadrante 4	cuadrante 5	suma	Núm. esporas /ml
R1	109	116	114	145	125	609	3,05E+07
R2	122	129	118	115	106	590	2,95E+07
R3	105	120	114	132	126	597	2,99E+07
TC4							
	cuadrante 1	cuadrante 2	cuadrante 3	cuadrante 4	cuadrante 5	suma	Núm. esporas /ml
R1	115	103	106	113	101	538	2,69E+07
R2	112	98	109	115	105	539	2,70E+07
R3	121	109	104	113	104	551	2,76E+07
TC5							
	cuadrante 1	cuadrante 2	cuadrante 3	cuadrante 4	cuadrante 5	suma	Núm. esporas /ml
R1	131	196	172	104	192	795	3,98E+07
R2	186	120	174	112	197	789	3,95E+07
R3	188	116	168	177	191	840	4,20E+07
TESTIGOS							
	cuadrante 1	cuadrante 2	cuadrante 3	cuadrante 4	cuadrante 5	suma	Núm. esporas /ml
R1	95	91	89	92	113	480	2,40E+07
R2	85	96	94	96	103	474	2,37E+07
R3	99	89	104	109	91	492	2,46E+07

TC1 (corresponde a la cantidad de detergente recomendada por el fabricante con *T. harzianum*)

TC2 (corresponde a la cantidad doble de detergente a la recomendada por el fabricante con *T. harzianum*)

TC3 (corresponde a la cantidad promedio de la cantidad más alta de detergente a la recomendada por el fabricante con *T. harzianum*)

TC4 (corresponde a la mitad de la cantidad de detergente recomendada por el fabricante con *T. harzianum*)

TC5 (corresponde a la cuarta parte de la cantidad de detergente recomendada por el fabricante con *T. harzianum*)

TTEST (corresponde al blanco con *T. harzianum* sin tensoactivo)



**Anexo B:** Cuantificación de esporas *Bacillus subtilis* a los 32 días

Cuantificación de esporas (cámara de Neubauer)							
BC1							
	cuadrante 1	cuadrante 2	cuadrante 3	cuadrante 4	cuadrante 5	suma	Núm. esporas /ml
R1	86	95	101	110	88	480	2,40E+07
R2	96	98	103	84	105	486	2,43E+07
R3	72	101	84	89	104	450	2,25E+07
BC2							
	cuadrante 1	cuadrante 2	cuadrante 3	cuadrante 4	cuadrante 5	suma	Núm. esporas /ml
R1	110	125	98	125	136	594	2,97E+07
R2	109	159	107	92	128	595	2,98E+07
R3	102	101	178	113	123	617	3,09E+07
BC3							
	cuadrante 1	cuadrante 2	cuadrante 3	cuadrante 4	cuadrante 5	suma	Núm. esporas /ml
R1	94	98	110	131	164	597	2,99E+07
R2	161	112	99	86	122	580	2,90E+07
R3	144	86	101	89	98	518	2,59E+07
BC4							
	cuadrante 1	cuadrante 2	cuadrante 3	cuadrante 4	cuadrante 5	suma	Núm. esporas /ml
R1	117	126	114	189	196	742	3,71E+07
R2	128	148	135	145	178	734	3,67E+07
R3	175	181	163	136	114	769	3,85E+07
BC5							
	cuadrante 1	cuadrante 2	cuadrante 3	cuadrante 4	cuadrante 5	suma	Núm. esporas /ml
R1	176	112	123	170	141	722	3,61E+07
R2	124	145	162	133	173	737	3,69E+07
R3	186	115	169	116	154	740	3,70E+07
TESTIGOS							
	cuadrante 1	cuadrante 2	cuadrante 3	cuadrante 4	cuadrante 5	suma	Núm. esporas /ml
R1	89	79	102	78	106	454	2,27E+07
R2	93	91	98	110	89	481	2,41E+07
R3	94	103	92	96	97	482	2,41E+07

**BC1** (corresponde a la cantidad de detergente recomendada por el fabricante con *B. subtilis*)

**BC2** (corresponde a la cantidad doble de detergente a la recomendada por el fabricante con *B. subtilis*)

**BC3** (corresponde a la cantidad promedio de la cantidad más alta de detergente a la recomendada por el fabricante con *B. subtilis*)

**BC4** (corresponde a la mitad de la cantidad de detergente recomendada por el fabricante con *B. subtilis*)

**BC5** (corresponde a la cuarta parte de la cantidad de detergente recomendada por el fabricante con *B. subtilis*)

**BTEST** (corresponde al blanco con *B. subtilis* sin tensoactivo)

## Anexo C. cuantificación de Microorganismos eficientes a los 32 días

Cuantificación de esporas (cámara de Neubauer)							
MEC1							
	cuadrante 1	cuadrante 2	cuadrante 3	cuadrante 4	cuadrante 5	suma	Núm. esporas /ml
<b>R1</b>	173	185	194	229	118	899	4,50E+07
<b>R2</b>	182	153	183	191	112	821	4,11E+07
<b>R3</b>	162	109	203	171	241	886	4,43E+07
MEC2							
	cuadrante 1	cuadrante 2	cuadrante 3	cuadrante 4	cuadrante 5	suma	Núm. esporas /ml
<b>R1</b>	234	258	263	288	261	1304	6,52E+07
<b>R2</b>	231	286	269	261	261	1308	6,54E+07
<b>R3</b>	221	286	289	245	269	1310	6,55E+07
MEC3							
	cuadrante 1	cuadrante 2	cuadrante 3	cuadrante 4	cuadrante 5	suma	Núm. esporas /ml
<b>R1</b>	213	261	243	238	264	1219	6,10E+07
<b>R2</b>	220	262	212	261	259	1214	6,07E+07
<b>R3</b>	234	256	212	242	281	1225	6,13E+07
MEC4							
	cuadrante 1	cuadrante 2	cuadrante 3	cuadrante 4	cuadrante 5	suma	Núm. esporas /ml
<b>R1</b>	232	225	238	164	194	1053	5,27E+07
<b>R2</b>	261	172	251	230	143	1057	5,29E+07
<b>R3</b>	210	253	119	277	159	1018	5,09E+07
MEC5							
	cuadrante 1	cuadrante 2	cuadrante 3	cuadrante 4	cuadrante 5	suma	Núm. esporas /ml
<b>R1</b>	154	181	140	120	183	778	3,89E+07
<b>R2</b>	167	162	125	131	191	776	3,88E+07
<b>R3</b>	125	197	165	181	112	780	3,90E+07
TESTIGOS							
	cuadrante 1	cuadrante 2	cuadrante 3	cuadrante 4	cuadrante 5	suma	Núm. esporas /ml
<b>R1</b>	118	146	108	145	115	632	3,16E+07
<b>R2</b>	110	169	110	146	112	647	3,24E+07
<b>R3</b>	124	121	118	118	132	613	3,07E+07

**MEC1** (corresponde a la cantidad de detergente recomendada por el fabricante con microorganismos eficientes)

**MEC2** (corresponde a la cantidad doble de detergente a la recomendada por el fabricante con microorganismos eficientes)


**MEC3** (corresponde a la cantidad promedio de la cantidad más alta de detergente a la recomendada por el fabricante con microorganismos eficientes)

**MEC4** (corresponde a la mitad de la cantidad de detergente recomendada por el fabricante con microorganismos eficientes)

**MEC5** (corresponde a la cuarta parte de la cantidad de detergente recomendada por el fabricante con microorganismos eficientes)

**METEST** (corresponde al blanco con microorganismos eficientes sin detergente)

Anexo D. Análisis del tensoactivo sin tratamiento (cantidad recomendada por el fabricante)

	<b>LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD</b> <b>INFORME DE RESULTADOS ANALISIS FISICO QUIMICOS Y MICROBIOLÓGICOS</b> 17025-RG-CC-71-04	 EP- EMPRESA MUNICIPAL DE AGUA POTABLE Y ALCANTARILLADO DE AMBATO		
Pág 1 de 1				
<b>DATOS DEL CLIENTE</b>	<b>DATOS GENERALES</b>			
CLIENTE: LOURDES MENESES DIRECCIÓN: Canónimo Ramos y Leonidas Proaño PERSONA DE CONTACTO: Lourdes Meneses TELÉFONO DE CONTACTO: 03 2608890 PROCEDENCIA DE LA MUESTRA: Tratamiento Tesis LUGAR DONDE SE TOMÓ LA MUESTRA: Muestra Original FECHA Y HORA DE TOMA DE MUESTRA: 12 de marzo de 2018; 11H56 TIPO DE TOMA DE MUESTRA: (Puntual/compuesta): Puntual	CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: 1803217 TIPO DE MUESTRA (MATRIZ): Agua Residual RESPONSABLE DE TOMA DE MUESTRA: Lourdes Meneses FECHA Y HORA DE LLEGADA AL LABORATORIO: 12 de marzo de 2018; 09H00 FECHA DE INICIO DE ANÁLISIS: 12 de marzo de 2018 FECHA DE EMISIÓN DEL INFORME: 20 de marzo de 2018; 15H00 CONDICIONES AMBIENTALES: Humedad (%): 45 Temperatura (°C): 19,6			
<b>ANÁLISIS REALIZADOS</b>				
<b>PARÁMETROS</b>	<b>UNIDADES</b>	<b>MÉTODO UTILIZADO</b>	<b>Tabla 8.Límites de descarga al Sistema de Alcantarillado Público. TULAS. LIBRO VI. ANEXO I (2015)**</b>	<b>RESULTADOS</b>
TENSOACTIVOS (DETERGENTES)*	mg/L	HACH 8028	2,0	210
* Ensayos fuera del alcance de acreditación del SAE. ** Los límites permisibles de la Norma de referencia descrita en el presente informe están fuera del alcance de acreditación del SAE.				
NOTA: ESTE INFORME SOLO AFECTA A LA MUESTRA QUE SE HA SOMETIDO A ENSAYO. EL LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD DE LA EP-EMAPA-A NO SE RESPONSABILIZA DEL ORIGEN DE LA MUESTRA, TRANSPORTACIÓN DE LA MISMA Y VERACIDAD DE LOS DATOS DADOS POR EL CLIENTE. NO SE PERMITE A LOS USUARIOS EL USO DEL LOGOTIPO DEL SAE NI DE LA CONDICIÓN DE ACREDITADO (CR GAR 04) NO SE DEBE REPRODUCIR EL INFORME DE ENSAYO, EXCEPTO EN SU TOTALIDAD, SIN LA APROBACIÓN ESCRITA DEL LABORATORIO. PARA LOS PARÁMETROS BASADOS EN EL STANDARD METHODS ED22 SE INDICA QUE LA EDICIÓN UTILIZADA NO CORRESPONDE A LA ÚLTIMA VERSIÓN PUBLICADA.				
OBSERVACIONES: Ninguna PROFESIONALES RESPONSABLES:				
 Ing. Andrea Tirado ANALISTA DE LABORATORIO		 Ing. Verónica Cashabamba RESPONSABLE TÉCNICO		
Laboratorio de Control de Calidad, EP - EMAPA - A, Vía Ecológica a Santa Rosa - Ambato Telf. 2585991 Ext. 101, 102, 103				
				
Antonio Clavijo e Isaias Sánchez, Cdla. Miñerica Telf.: 032 997700 Ambato • Ecuador www.emapa.gob.ec				

Anexo E. Análisis del tensoactivo a los 32 días del tratamiento con microorganismos eficientes



**LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD**  
**INFORME DE RESULTADOS ANALISIS FISICO QUÍMICOS Y MICROBIOLÓGICOS**

17025-RG-CC-71-05



EP-EMPRESA MUNICIPAL DE AGUA POTABLE Y ALCANTARILLADO DE AMBATO

Pág 1 de 1

DATOS DEL CLIENTE		DATOS GENERALES	
CLIENTE:	LOURDES MENESES	CODIGO DE IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA:	1804379
DIRECCIÓN:	Canónimo Ramos y Canónimo Ramos	TIPO DE MUESTRA (MATRIZ):	Agua Residual
PERSONA DE CONTACTO:	Lourdes Meneses	RESPONSABLE DE TOMA DE MUESTRA:	Lourdes Meneses
TÉLEFONO DE CONTACTO:	0987260100	FECHA Y HORA DE LLEGADA AL LABORATORIO:	23 de abril de 2018; 10H50
PROCEDENCIA DE LA MUESTRA:	Tesis Tratamiento de Tensoactivos	FECHA DE INICIO DE ANÁLISIS:	23 de abril de 2018
LUGAR DONDE SE TOMÓ LA MUESTRA:	MEC 2	FECHA DE EMISIÓN DEL INFORME:	02 de mayo de 2018
FECHA Y HORA DE TOMA DE MUESTRA:	23 de abril de 2018; 09H30	CONDICIONES AMBIENTALES:	
TIPO DE TOMA DE MUESTRA: (Puntual/compuesta):	Puntual	Humedad (%):	41
		Temperatura (°C):	20.4

ANÁLISIS REALIZADOS				
PARÁMETROS	UNIDADES	MÉTODO UTILIZADO	Norma de referencia: TABLA 8. LÍMITES DE DESCARGA AL SISTEMA DE ALCANTARILLADO PÚBLICO. TULSMA. LIBRO VI. ANEXO 1 (2015) **	RESULTADOS
TENSOACTIVOS (DETERGENTES) *	mg/L	HACH 8028	2.0	104.93

\* Ensayos fuera del alcance de acreditación del SAE.  
 \*\* Los límites permisibles de la Norma de referencia descrita en el presente informe están fuera del alcance de acreditación del SAE.

**NOTA:** ESTE INFORME SOLO AFECTA A LA MUESTRA QUE SE HA SOMETIDO A ENSAYO. EL LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD DE LA EP-EMAPA-A NO SE RESPONSABILIZA DEL ORIGEN DE LA MUESTRA, TRANSPORTACIÓN DE LA MISMA Y VERACIDAD DE LOS DATOS DADOS POR EL CLIENTE.  
 NO SE PERMITE A LOS USUARIOS EL USO DEL LOGOTIPO DEL SAE NI DE LA CONDICIÓN DE ACREDITADO (CR GAR 04)  
 NO SE DEBE REPRODUCIR EL INFORME DE ENSAYO, EXCEPTO EN SU TOTALIDAD, SIN LA APROBACIÓN ESCRITA DEL LABORATORIO.  
 PARA LOS MÉTODOS BASADOS EN EL STANDARD METHODS LA EDICIÓN NO CORRESPONDE A LA ÚLTIMA VERSIÓN PUBLICADA.  
 LA INFORMACIÓN COMPLETA RELATIVA A LOS ENSAYOS EMITIDOS EN EL PRESENTE INFORME ESTÁ A DISPOSICIÓN DEL CLIENTE.

OBSERVACIONES: Ninguna

PROFESIONALES RESPONSABLES:



Ing. Marcelo Tirado  
ANALISTA DE LABORATORIO





Ing. Jaqueline Avila  
RESPONSABLE TÉCNICO (S)

Laboratorio de Control de Calidad, EP - EMAPA - A, Vía Ecológica a Santa Rosa - Ambato Telf. 2585991 Ext. 101, 102, 103

Antonio Clavijo e Isaías Sánchez, Cda. Miñarica  
 Telf.: 032 997700  
 Ambato • Ecuador  
[www.emapa.gob.ec](http://www.emapa.gob.ec)

MEC2 (representa el doble de la cantidad de detergente a la recomendada por el fabricante)

Anexo F. Análisis del tensoactivo a los 32 días del tratamiento con microorganismos eficientes

	<b>LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD</b> <b>INFORME DE RESULTADOS ANALISIS FISICO QUIMICOS Y</b> <b>MICROBIOLOGICOS</b>			
17025-RG-CC-71-05				
Pág 1 de 1				
<b>DATOS DEL CLIENTE</b>	<b>DATOS GENERALES</b>			
<b>CLIENTE:</b> LOURDES MENESES <b>DIRECCIÓN:</b> Canónimo Ramos y Canónimo Ramos <b>PERSONA DE CONTACTO:</b> Lourdes Meneses <b>TELÉFONO DE CONTACTO:</b> 0987260100 <b>PROCEDENCIA DE LA MUESTRA:</b> Tesis Tratamiento de Tensoactivos <b>LUGAR DONDE SE TOMÓ LA MUESTRA:</b> MEC 4 <b>FECHA Y HORA DE TOMA DE MUESTRA:</b> 23 de abril de 2018; 09H30 <b>TIPO DE TOMA DE MUESTRA: (Puntual/compuesta):</b> Puntual	<b>CODIGO DE IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA:</b> 1804381 <b>TIPO DE MUESTRA (MATRIZ):</b> Agua Residual <b>RESPONSABLE DE TOMA DE MUESTRA:</b> Lourdes Meneses <b>FECHA Y HORA DE LLEGADA AL LABORATORIO:</b> 23 de abril de 2018; 10H50 <b>FECHA DE INICIO DE ANÁLISIS:</b> 23 de abril de 2018 <b>FECHA DE EMISIÓN DEL INFORME:</b> 02 de mayo de 2018 <b>CONDICIONES AMBIENTALES:</b> Humedad (%): 41 Temperatura (°C): 20,4			
<b>ANÁLISIS REALIZADOS</b>				
<b>PARÁMETROS</b>	<b>UNIDADES</b>	<b>MÉTODO UTILIZADO</b>	<b>Norma de referencia: TABLA 8. LÍMITES DE DESCARGA AL SISTEMA DE ALCANTARILLADO PÚBLICO. TULSMA. LIBRO VI. ANEXO 1 (2015)**</b>	<b>RESULTADOS</b>
TENSOACTIVOS (DETERGENTES) *	mg/L	HACH 8028	2,0	27,73
<p>* Ensayos fuera del alcance de acreditación del SAE.                  ** Los límites permisibles de la Norma de referencia descrita en el presente informe están fuera del alcance de acreditación del SAE.</p>				
<p><b>NOTA:</b> ESTE INFORME SOLO AFECTA A LA MUESTRA QUE SE HA SOMETIDO A ENSAYO. EL LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD DE LA EP-EMAPA-A NO SE RESPONSABILIZA DEL ORIGEN DE LA MUESTRA, TRANSPORTACIÓN DE LA MISMA Y VERACIDAD DE LOS DATOS DADOS POR EL CLIENTE. NO SE PERMITE A LOS USUARIOS EL USO DEL LOGOTIPO DEL SAE NI DE LA CONDICIÓN DE ACREDITADO (CR GAR 04) NO SE DEBE REPRODUCIR EL INFORME DE ENSAYO, EXCEPTO EN SU TOTALIDAD, SIN LA APROBACION ESCRITA DEL LABORATORIO. PARA LOS METODOS BASADOS EN EL STANDARD METHODS LA EDICION NO CORRESPONDE A LA ÚLTIMA VERSIÓN PUBLICADA. LA INFORMACION COMPLETA RELATIVA A LOS ENSAYOS EMITIDOS EN EL PRESENTE INFORME ESTA A DISPOSICIÓN DEL CLIENTE.</p>				
<b>OBSERVACIONES:</b> Ninguna				
<b>PROFESIONALES RESPONSABLES:</b>				
 Ing. Marcelo Tirado ANALISTA DE LABORATORIO		 Ing. Jaqueline Avila RESPONSABLE TÉCNICO (S)		
Laboratorio de Control de Calidad, EP - EMAPA - A, Vía Ecológica a Santa Rosa - Ambato Telf. 2585991 Ext. 101, 102, 103				
<p>Antonio Clavijo e Isaías Sánchez, Cda. Miñarica                  Telf.: 032 997700                  Ambato • Ecuador                  www.emapa.gob.ec</p>				

MEC4 (representa la mitad de la cantidad de detergente a la recomendada por el fabricante)



Anexo G. Registros fotográficos.



pesaje del detergente



Aforado de los ensayos



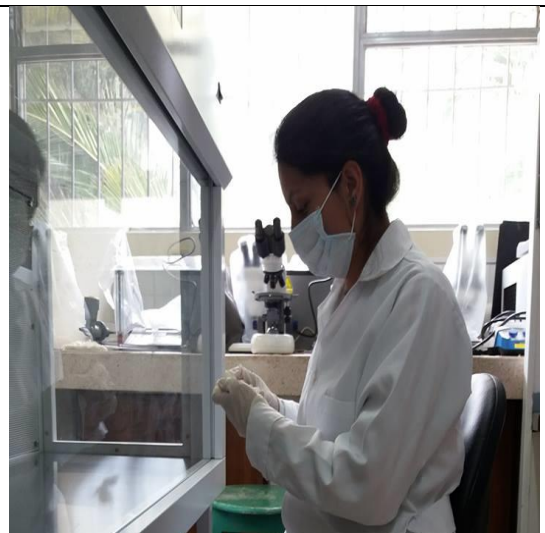
Ensayos para *T. harzianum*



Ensayos para *B. subtilis*



Ensayos para microorganismos eficientes



Obtención de la muestra (cuantificación)



Inoculación de microorganismos



Limpieza de los materiales



limpieza de los materiales



Etiquetados de las muestras