



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

**“ESTUDIO DE LA EFICIENCIA BIODEGRADADORA DE
ORGANISMOS FÚNGICOS EN RESINA FENÓLICA”**

TRABAJO DE TITULACIÓN

Previa la obtención del título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORES: MARÍA BELÉN GARCÍA GUZMÁN

MARÍA BELÉN VILLEGAS VÉLEZ

TUTOR: DR. ROBERTO ERAZO

Riobamba – Ecuador

2015

DEDICATORIA

En primer lugar dedico nuestro trabajo a Dios, por permitirme el don de la vida, fuerza y sabiduría para seguir adelante.

A mi madre Efigenia Guzmán quien me ha demostrado un espíritu de lucha en los momentos más difícil de nuestra vida, viendo de la mejor manera los malos momentos, por su espíritu y a mi padre Marco García junto con mi madre me brindaron su apoyo incondicional en cada momento de mi vida y ser ejemplo de lucha y perseverancia para salir adelante llegando alcanzar cada una de las metas propuestas con amor y dedicación.

A mis hermanas Pamela García y Leidy García y mi hermano Jhon García por brindarme confianza incondicional y han sabido guiarme con sus consejos, siempre fueron un gran ejemplo a seguir, me enseñaron el valor de la vida y el significado de una familia, a toda mi familia les amo.

A mi compañera y amiga Ma. Belén por formar parte de mi vida y a todas las personas que me apoyaron en este largo proceso.

María B. García

Va dedicado principalmente a Dios, y de manera muy especial a quienes con su amor incondicional han sabido guiarme y apoyarme en todo momento, acompañándome a la distancia sin dejarme sola, siempre buscando lo mejor para cada uno de sus hijos mis padres Fausto Villegas y Janeth Vélez, los AMO.

A mis hermanos Eduardo Villegas, Evelyn Villegas quienes a la distancia me apoyan dándome palabras de aliento y de manera muy especial a Jessenia Villegas quien ha sido mi confidente y más que mi hermana mi gemela que a pesar de la distancia ha estado junto a mí en todo momento.

A mis amigos que de una u otra forma me han apoyado de manera incondicional, a Mabe García que a más de ser compañera ha sido una gran amiga que ha sabido soportarme, aconsejarme y acolitarme en locuras y a Karlita Guerra una gran amiga que ha sabido alentarme para seguir adelante y de manera muy especial a sus padres.

María B. Villegas V.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar agradecemos a Dios por darnos la sabiduría y fortaleza necesarias para alcanzar nuestras metas.

De forma muy especial al Dr. Roberto Erazo, director de Tesis y a la Dra. Nancy Veloz, asesora de la tesis, por la confianza depositada en nosotras y su valiosa colaboración en el desarrollo del presente proyecto.

A quienes nos apoyaron con el desarrollo de esta investigación con el financiamiento y la colaboración en el Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica ambiental (LAB-CESTTA), principalmente Dr. Roberto Erazo, Ing. Verónica Bravo, Ing. Cristian Chuquín y a todo el personal por sus sabios consejos.

A la docente Dra. Norma Erazo por su inmensa colaboración en el transcurso y el progreso de esta investigación y a la Ing. Paola Chiluisa por su gran aporte.

María B. García G.

María B. Villegas V.

CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: “**Estudio de la eficiencia Biodegradadora de organismos fúngicos en resina fenólica**”, de responsabilidad de las señoritas egresadas María Belén García Guzmán y María Belén Villegas Vélez, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. Roberto Erazo

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Nancy Veloz

ASESORA DE TESIS

Nosotras, María Belén García Guzmán y María Belén Villegas Vélez, somos responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

María Belén García Guzmán

María Belén Villegas Vélez

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO	V
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE CUADROS	IX
INDICE DE GRÁFICOS	X
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
INDICE DE ANEXOS	XIII
INDICE DE ABREVIATURAS	XIV
RESUMEN	XVI
SUMMARY	XVII
INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN.....	3
CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1. Resina Fenólica	5
1.2. Espuma Fenólica.....	7
1.3. Composición de la Espuma Fenólica.....	9
1.3.1. Resinas Fenólicas	9
1.3.2. Surfactantes	12
1.3.3. Agentes de soplado.....	12
1.4. Problema medioambiental de las Resinas Fenólicas.....	12
1.5. Biotecnología	14
1.5.1. Biotecnología Ambiental	14
1.5.2. Biorremediación	15
1.5.3. Biodegradación.....	17
1.5.4. Fundamento bioquímico de la biodegradación	17
1.6. Organismos degradadores	18
1.6.1. Hongos	19
1.6.1.1. Clasificación de los Hongos	19
1.6.2. Curva de crecimiento	22
1.7. Hongos ligninolíticos.....	23
1.7.1. Mecanismo de Biodegradación	23
1.7.2. Sistema lignolítico.....	23

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	28
2.1.	Descripción del área de investigación	28
2.1.1.	<i>Datos generales de la Ciudad de Riobamba</i>	28
2.1.2	<i>Lugar de la Investigación</i>	29
2.2	Materiales utilizados	29
2.2.1	<i>Resina fenólica</i>	29
2.2.2	<i>Material biológico</i>	29
2.3	Muestreo	30
2.3.1	<i>Población</i>	30
2.3.2	<i>Método de Muestreo</i>	30
2.3.3	<i>Tamaño muestral</i>	30
2.4	Diseño experimental	30
2.4.1	<i>Variables de la investigación</i>	31
2.5.	Tipo de Diseño	32
2.5.1.	<i>Diseño Factorial</i>	32
2.5.2.	<i>Lógica del Diseño experimental</i>	34
2.6.	Metodología	35
2.6.1.	<i>Método Científico</i>	35
2.6.2.	<i>Método Hipotético deductivo</i>	36
2.6.3.	<i>Método estadístico</i>	37
2.7.	Técnicas e instrumentos de recolección y análisis de datos	38
2.7.1.	<i>Técnicas e instrumentos de recolección de datos</i>	38
2.7.2.	<i>Técnicas e instrumentos de análisis de datos</i>	38
2.7.3.	<i>Fases de la investigación</i>	39
2.8.	Parte Experimental	40
2.8.1.	<i>Recolección de hongos carpóforos</i>	40
2.8.2.	<i>Recolección de esporas de los HL mediante la técnica del papel celofán</i>	42
2.8.2.1.	<i>Preparación de las Cajas Petri con Papel celofán</i>	42
2.8.3.	<i>Medio de cultivo</i>	43
2.8.4.	<i>Aislamiento de los hongos lignolíticos</i>	43
2.8.5.	<i>Aislamiento de esporas</i>	44
2.8.6.	<i>Selección de las cepas de hongos</i>	46
2.8.7.	<i>Identificación de las cepas de los HL</i>	46
2.8.8.	<i>Prueba de biodegradación de los discos de resina fenólica por los hongos fúngicos</i>	47
2.8.9.	<i>Lógica de comparación de los pesos de las muestras luego de la experimentación</i>	48
2.8.10.	<i>Preservación de hongos</i>	49

CAPITULO III

3.	ANALISIS Y RESULTADOS	50
-----------	------------------------------------	-----------

3.1.	Aislamiento de hongos biodegradadores de resina fenólica.....	50
3.2.	Identificación de las cepas de los Organismos Fúngicos	52
3.3.	Experimentación biodegradadora de Resina Fenólica	56
<i>3.3.1.</i>	<i>Análisis cualitativo y cuantitativo de la experimentación</i>	<i>56</i>
<i>3.3.2.</i>	<i>Diagrama de los organismos fúngicos</i>	<i>61</i>
<i>3.3.3.</i>	<i>Prueba de biodegradación de los discos de resina fenólica por los hongos fúngicos</i>	<i>62</i>
<i>3.3.4.</i>	<i>Análisis estadístico.....</i>	<i>63</i>
<i>3.3.5.</i>	<i>Análisis de la Hipótesis.....</i>	<i>65</i>
<i>3.3.6.</i>	<i>Análisis de Correlación (Probabilidades)</i>	<i>66</i>
3.4.	Porcentaje de biodegradación.....	67
<i>3.4.1.</i>	<i>Discusión de Resultados</i>	<i>68</i>
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	69
4.1.	Conclusiones.....	69
4.2.	Recomendaciones.....	70

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 01 -1	Acontecimientos más Relevantes de los polímeros termoestables.....	09
Tabla 02 -1	Clasificación de la espuma fenólica.....	10
Tabla 03 -1	Capacidad Biodegradadora de los organismos fúngicos.....	19
Tabla 01 -2	Parroquias de la Ciudad de Riobamba.....	30
Tabla 02 -2	Variables de Control.....	33
Tabla 03 -2	Diseño de la Investigación.....	34
Tabla 04 -2	Codificación – Cepas de Hongos.....	35
Tabla 05 -2	Codificación –Resinas Fenólicas.....	35
Tabla 06 -2	Lógica del Diseño Experimental.....	36
Tabla 07 -2	Nomenclatura de la Lógica del Diseño experimental.....	36
Tabla 08 -2	Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	40
Tabla 01 -3	Descripción de Origen y Medio de Aislamiento.....	53
Tabla 02 -3	Caracterización macroscópica y microscópica de las cepas.....	55
Tabla 03 -3	Matriz fotográfica de los hongos lignolíticos.....	56
Tabla 04 -3	Hongos lignolíticos seleccionados.....	57
Tabla 05 -3	Promedio por cepa de hongo lignolítico.....	63
Tabla 06 -3	Análisis de Normalidad.....	65
Tabla 07 -3	Análisis de varianzas.....	66
Tabla 08 -3	Análisis de la Hipótesis General.....	67
Tabla 09 -3	Valores de Test T.....	68
Tabla 10 -3	Análisis de correlación.....	68
Tabla11 -3	Porcentaje de Biodegradación.....	69

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 -2	Método Científico.....	37
Cuadro 2 -2	Método Hipotético Deductivo.....	38
Cuadro 3 -2	Método Estadístico.....	39
Cuadro 4 -2	Primera fase de la Investigación.	41
Cuadro 5 -1	Segunda fase de la Investigación.	41

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 01 -3	Curva de Crecimiento de las Cepas de los HL.....	54
Gráfico 02 -3	Diferencia de Peso seco de <i>Bjerkandera fumosa</i>	58
Gráfico 03 -3	Diferencia de peso seco de <i>Phellinus ferreus</i>	59
Gráfico 04 -3	Diferencia de peso seco de <i>Scutellinia spp</i>	60
Gráfico 05 -3	Diferencia de peso seco de <i>Ganoderma spp</i>	60
Gráfico 06 -3	Diferencia de peso seco de <i>Abortiporus spp</i>	61
Gráfico 07 -3	Diferencia de peso seco de <i>Xilaria polimorfa</i>	62
Gráfico 08 -3	Diferencia de peso seco de <i>Trametes suaveolens</i>	62
Gráfico 09 -3	Degradación de Resina.....	64
Gráfico 10 -3	Relación lineal de correlación.	69

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 01 -2	Lugar de colección de HL (Guía turística de la zona).....	42
Fotografía 02 -2	Hongos Lignolíticos de la zona.....	42
Fotografía 03 -2	Recolección de las esporas en papel celofán.....	43
Fotografía 04 -2	Purificación de los hongos.....	44
Fotografía 05 -2	Corte del cuerpo fructífero del hongo lignolítico.....	45
Fotografía 06 -2	Inoculación del hongo lignolítico.....	45
Fotografía 07 -2	Observación microscópica de las esporas de los hongos lignolíticos	47
Fotografía 08 -2	Muestra con una gota de azul lacto fenol.....	48
Fotografía 09 -2	Parte Experimental.....	49
Fotografía 10 -2	Repeticiones del Grupo Experimental.....	49
Fotografía 11 -2	Preservación de los HL.....	51
Fotografía 1 -3	Técnica de enfrentamiento – invasión de lo HL sobre la RF.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01 -1	Estructura del fenol	08
Figura 02 -1	Clasificación de las Espumas Fenólicas	12
Figura 03 -1	Oxidación del Isopropilbenceno o cumeno.....	13
Figura 04 -1	Formación del hidroperóxido de cumeno HPC.....	13
Figura 05 -1	Métodos de biorremediación.....	18
Figura 06 -1	Esquema de la degradación aerobia.....	20
Figura 07 -1	Esquema de la degradación anaerobia.....	20
Figura 08 -1	<i>Synchytrium endobioticum</i>	22
Figura 09 -1	<i>Mucor sp.</i>	22
Figura 10 -1	<i>Chaetomium sp.</i>	23
Figura 11 -1	<i>Setchelliogaster sp.</i>	23
Figura 12 -1	Estructura de la Lignina	26
Figura 13 -1	Ciclo catalítico de la Lacasa	27
Figura 14 -1	Ciclo catalítico de la lignina peroxidasa (LiP)	28
Figura 15 -1	Ciclo catalítico de la manganeso peroxidasa (MnP)	29

INDICE DE ANEXOS

Anexo A	Toma de muestras de los Hongos Lignolíticos (Puyo).....	79
Anexo B	Hongos Lignolíticos.....	79
Anexo C	Ficha de observación.....	80
Anexo D	Análisis Cualitativo de los Organismos Fúngicos.....	81
Anexo E	Hoja electrónica para la selección de los discos de resina.....	82
Anexo F	Secado de la resina.....	83
Anexo G	Control de temperatura.....	83
Anexo H	Curva de crecimiento de las siete cepas de HL.....	84
Anexo I	Registro fotográfico de la Experimentación con <i>Bjerkandera fumosa</i>	85
Anexo J	Registro fotográfico de la Experimentación con <i>Phellinus ferreus</i>	86
Anexo K	Registro fotográfico de la Experimentación con <i>Scutellinia spp</i>	87
Anexo L	Registro fotográfico de la Experimentación con <i>Ganoderma spp</i>	88
Anexo M	Registro fotográfico de la Experimentación con <i>Abortiporus spp</i>	89
Anexo N	Registro fotográfico de la Experimentación con <i>Xilaria polimorfa</i>	90
Anexo O	Registro fotográfico de la Experimentación con <i>Trametes suaveolens</i>	91
Anexo P	Datos iniciales y la transformación lineal.....	92
Anexo Q	Test t para muestras independientes	93
Anexo R	Valores del coeficiente de r Pearson.....	93
Anexo S	Certificado de Calibración de la Balanza Analítica	94

INDICE DE ABREVIATURAS

AA	Agar –Agar
ATSDR	Agencia de sustancias toxicas t registro de enfermedades
C	Carbono
°C	Grados Centígrados
CH1	Cepa de hongo 1
CH₃	Radical metilo
CH₄	Metano
CO₂	Dióxido de Carbono
EPA	Environmental Protect Agency – Agencia de protección ambiental
ESPOCH	Escuela Superior Politécnica de Chimborazo
Fe³⁺	Ion Hierro
FRP	Polímeros Reforzadores de fibra
g	Gramo
H	Hidrógeno
H1	Hongo 1
H₂O	Agua
H₂O₂	Peróxido de Hidrógeno
HL	Hongo Lignolítico
HPC	Hidróxido de cumeno
INEC	Instituto Nacional de Estadística y Censos
LiP	Lignina Peroxidasa
mm	Milímetro
Msnm	Metros sobre el nivel del mar
MnP	Manganeso Peroxidasa
Mn²⁺	Ion Manganeso

N₂	Nitrógeno
NO³⁻	Ion dióxido de nitrógeno
O₂	Oxígeno
OCDE	Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico
OSHA	Occupational safety and Health administration – Administración de salud y seguridad.
PBs	Phosphate buffer – Tampón fosfato salino
PDA	Potato dextrose agar
Ph	Potencial de Hidrógeno
R1	Repetición 1
RF	Resina Fenólica
S²⁺	Ion azufre
Sp	Especie

RESUMEN

Se estudió la eficiencia Biodegradadora de organismos fúngicos aplicados en resina fenólica, para establecer el mayor potencial biodegradador de los hongos y optimizar su comportamiento. En la primera fase se obtuvo cepas puras de hongos lignolíticos (HL), las mismas que fueron recolectados en la provincia de Pastaza, con un aproximado de 40 cepas se seleccionaron 7 cepas, que fueron identificadas y puestas a experimentación; su conservación se realizó en Glicerol al 20%, el almacenamiento en ultracongelación. En la segunda fase se realizó la interacción de los HL con los discos de Resina Fenólica (RF) en cajas Petri con potato dextrose agar (PDA), se colocó un disco de RF previamente pesado, se inoculo el micelio de cada una de las cepas seleccionadas, a 28 °C por un lapso de 90 días, se llevó un registro visual cada 15 días del cambio de coloración del medio en relación con el grupo control, acotando el crecimiento del micelio a través del disco de RF. Finalmente el lavado de los discos de RF, con ácido clorhídrico 6N durante 6 horas, para remover el micelio de la RF, fueron secados a 110 °C durante 24 horas. Para determinar el peso final de cada uno de los discos de RF y poder realizar el análisis del porcentaje de pérdida de peso seco, incluyendo el grupo control. Se identificó las cepas de HL *Bjerkandera fumosa*, *Phellinus ferreus*, *Scutellinia spp*, *Ganoderma spp*, *Abortiporus spp*, *Xilaria polimorfa* y *Trametes suaveolens*. En el análisis cuantitativo las cepas que presentaron mayor eficiencia de biodegradación son, *Scutellinia spp* y *Trametes suaveolens* con 17.15% y 17,47% respectivamente, seguido de *Ganoderma spp* con un 11.45% y *Xilaria polimorfa* con 11.44%. Se aplicó ANOVA de un factor y test t para muestras individuales teniendo los resultados de 0.0198 y 0.02017 respectivamente, siendo estos menores al nivel de significancia 0.005, representando que el tratamiento aplicado influyó de manera positiva sobre la RF. Se recomienda la aplicación de las cepas de los HL seleccionadas a la biodegradación de materiales similares a la RF, a través de técnicas amigables con el ambiente y con una contribución social, económica y ambiental.

Palabras clave:

<RESINA FENÓLICA><ORGANISMOS FÚNGICOS><HONGOS LIGNOLÍTICOS><EFICIENCIA><BIODEGRADACIÓN><ANÁLISIS CUALITATIVO><ANÁLISIS CUANTITATIVO><PESO SECO><ANOVA DE UN FACTOR><TEST T PARA MUESTRAS INDEPENDIENTES>

SUMMARY

It was studied the biodegradation efficiency of fungal organisms in phenolic resin applied to establish the greatest potential bio degrader fungi and optimize its performance. During the first fungi (LF) was obtained; which were collected in the province of Pastaza, with approximately 40 strains; 7 strains which were identified and placed at the experimentation were selected; preservation was performed in 20% glycerol, stored in deep freeze. In the second phase the interaction of LF was performed with phenolic resin disks (PR) in petri dishes with potato dextrose agar (PDA), a PR pre-weighed disc was placed, the mycelium was inoculated to each of the strains was selected at 28 °C for a period of 90 days, a visual record was every 15 days for the discoloration of the medium in relation to the control group, limiting the growth of mycelium through the PR disk. Finally the washing of PR disks, with 6N hydrochloric acid for 6 hours to remove the mycelium of the PR, they were dried at 110 °C for 24 hours. To determine the end of each PR weight disks, and to perform analysis of the percentage of loss of dry weight, including the control group. LF strains *Bjerkandera fumosa*, *Phellinus ferreus*, *Scutellinia spp*, *Ganoderma spp*, *Abortiporus spp*, *Xilaria polimorfa* and *Trametes suaveolens* were identified. In the quantitative analysis the strains showed higher efficiency of biodegradation are *Scutellinia spp* and *Trametes suaveolens* with 17.15% and 17,47% respectively, followed by *Ganoderma spp* with 11.45% and *Xilaria polimorfa* with 11.44%. It was applied one-way ANOVA and test t for single samples having results of 0,0198 and 0,02017 respectively, this minor significance level of 0,005 representing that the treatment applied positively influenced on the PR. It is recommended, applying strains LF selected, on the biodegradation of similar materials PR, through environmentally friendly and social, economic and environmental contribution techniques.

Keywords:

<PHENOLIC RESIN><FUNGAL ORGANISMS><LIGNOLYTIC
FUNGI><EFFICIENCY><BIODEGRADATION><QUALIITATIVE
ANALYSIS><QUANTITATIVE ANALYSIS><DRY WEIGHT><ONE-WAY ANOVA><TEST
T FOR INDEPENDENT SAMPLES>

INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental junto con el incremento poblacional y el desarrollo de la industria han proporcionado alteraciones negativas en diversos escenarios, lo que viene acompañado de la amplia generación de residuos, que son dispuestos de manera indiscriminada en el ambiente, ocasionando impactos críticos; por la falta de toma de conciencia y un adecuado tratamiento de los diferentes residuos.

Los polímeros sintéticos difícilmente ingresan en el ciclo de degradación, debido que son muy estables, tóxicos con el ambiente y han sido diseñados año a año con el objetivo de mejorar su rendimiento y aumentar su vida útil, además son poco reactivos con otros productos. Teniendo en cuenta la gran variedad de polímeros en relación al calor, los podemos clasificar en: duroplásticos o termoestables y termoplásticos o termo deformables.

Una gran polémica ambiental ocasionada por la resina fenólica es que proviene de industrias petroleras, es aplicable a diversos campos ya que posee las siguientes características: elevada estabilidad térmica, resistencia a: alta tensión, potencial de hidrogeno extremos (pH), alta humedad, a la radiación, a la corrosión; por lo tanto no es reducible, reciclable ni reutilizable; y es urgente y necesario buscar alternativas degradadoras que sean amigables con el medio ambiente.

Por ello se han desarrollado técnicas alternativas de mayor compatibilidad con el ambiente, con el fin de transformar procesos productivos en procesos limpios; así tenemos la Biotecnología Ambiental que hace uso de organismos microscópicos y/o macroscópicos con propiedades de biodegradación y/o biotransformación de diversos contaminantes, como resinas, metales pesados, HAPs, PCBs, provenientes de diversas industrias como las petroleras.

La Resina Fenólica presenta una estructura compleja, es muy resistente a altas temperaturas, pH extremos, elevada humedad, y posee propiedades aislantes, por lo que la descomposición de este material es posible únicamente a través de la incineración, y durante este proceso de incineración también se producen elementos secundarios contaminantes. Por este motivo una alternativa es la biodegradación, que consiste en maximizar el potencial de los microorganismos para transformar elementos complejos en elementos menos complejos.

Los organismos fúngicos pueden dar excelentes resultados, puesto que toman los contaminantes como sustrato, tienden a adaptarse con facilidad en ambientes contaminados, aplicando sus

capacidades para degradar sustancias tóxicas complejas en sustancias menos tóxicas antes de ser dispuestas en el ambiente.

Los hongos de podredumbre blanca o a su vez denominados hongos lignolíticos (HL), tienen la ventajosa capacidad de degradar lignina, posee mecanismos de acción de baja especificidad que le permite oxidar los anillos aromáticos, que al igual que la resina fenólica (RF) posee anillos aromáticos en su estructura. Las enzimas que intervienen en el proceso son la lignina peroxidasa (LiP) y la manganeso peroxidasa (MnP) donde su principal componente en su sitio activo es cobre. La actividad enzimática que presentan los HL le da ventajas con fines ambientales siendo útiles para la biotransformación de elementos contaminantes de difícil degradación.

En la actualidad existen algunas investigaciones en referencia a la biodegradación de RF con la aplicación de microorganismos ya sean hongos o bacterias. **PONCE**, Andrade. G. et al. (2012) realizaron el ensayo con un total de 9 especies de hongos, presentando una biodegradación del 17% aproximadamente por un periodo de 200 días. Los primeros reportes de HL en biodegradación de RF se dio por **GUSSE**, J. et al. (2006) reportando a *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* como organismos con potencial biodegradador.

JUSTIFICACIÓN

Considerando los escasos estudios realizados a nivel nacional, sobre la biodegradación de resina fenólica a través de organismos fúngicos y la necesidad de realizar estrategias que sean amigables con el medio ambiente, surge la importancia de evaluar microorganismos aprovechando al máximo su potencial biotecnológico en ambientes contaminados.

Diversas tecnologías para la remediación ambiental, se han implementado en los últimos años, siendo la biodegradación una de las más eficientes, por tanto la importancia de la investigación consiste en el óptimo aprovechamiento de diversas especies fúngicas a la degradación de compuestos fenólicos, así en el futuro se desarrollen técnicas innovadoras de biorremediación, mitigando la polución ambiental.

Además, la presente investigación pretende ser un aporte práctico y metodológico, puesto que servirá como una guía para la investigación y desarrollo, una vez comprobada la eficiencia de las cepas fúngicas en la biodegradación de resina fenólica, además de ser un aporte para el desarrollo sostenible.

Netamente el tema consiste en la Transferencia de Tecnología ante una necesidad que es el depósito de la resina fenólica, debido a que es altamente toxico y como estudiante de la Facultad de Ciencias Químicas, Carrera de Ingeniería en Biotecnología Ambiental Planteamos una solución, un aporte para alcanzar el desarrollo sostenible de la comunidad, cantón y en general de la Provincia.

La investigación es viable, debido que se cuenta con el apoyo de El Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental (CESTTA – ESPOCH) interesado en desarrollar proyectos de investigación, comprometiéndose con el apoyo y financiamiento para el desarrollo de esta investigación ya que cuenta con la tecnología de punta para el desarrollo investigativo de laboratorio.

Para el estudio de la presente investigación se presentamos los siguientes objetivos:

GENERAL

Estudiar la eficiencia Biodegradadora de organismos fúngicos en resina fenólica

ESPECÍFICOS

- Conseguir organismos fúngicos con mayor potencial para la biodegradación de la resina fenólica.
- Identificar las cepas fúngicas para biodegradar resina fenólica.
- Aplicar el método de enfrentamiento e invasión para biodegradar la resina fenólica.
- Analizar la relación entre la biomasa y disminución de la concentración de resina fenólica en peso seco.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Resina Fenólica

Los polímeros en dependencia al entrecruzamiento de sus cadenas poliméricas se pueden agrupar en tres categorías, que son:

1. Los termoplásticos, constituyen polímeros formados por cadenas independientes, es decir que tienen poco o cero grado de entrecruzamiento de sus cadenas poliméricas (reticulación).
2. Los elastómeros constituyen cadenas ligeramente ligadas entre sí, por lo cual poseen características de elasticidad.
3. Los termoestables, polímeros que presentan un entrecruzamiento total de sus cadenas y se les conoce como resinas. (**MATERIAS PRIMAS**. 2014).

La resina fenólica posee características complejas, en la producción de este polímero intervienen diversos factores como es la relación o proporción de fenol y formaldehído, considerando las condiciones externas como el potencial de hidrogeno (pH), la temperatura, la naturaleza del catalizador, debido los componentes para la producción de resinas existen en gran variedad, tanto los aromáticos así como los aldehídos. (**VALEA**, A. et al. 2006, 329).

Los mecanismos de reacción de dichos polímeros han sido ampliamente estudiados, poseen un campo multidisciplinario de aplicaciones, debido a sus favorables características como son resistencia a la corrosión y a la abrasión, poco peso, excelentes características dieléctricas, baja emisión de humos tóxicos y a su vez bajo coste; dentro de las principales aplicaciones se utiliza a la resina fenólica en espumantes, abrasivos e incluso en fibras naturales, sintéticas o a su vez la reutilización de las mismas, entre otras. (**RODRÍGUEZ**, María; et al. 2009, pp. 7-8)

Las resinas fenólicas han desarrollado un papel muy importante en las industrial que están en continuo desarrollo hasta la actualidad, en la Tabla 1-1 se detalla los acontecimientos de mayor importancia en relación a estos polímeros (resina fenólica) desde su aparición en el año 1872 y su continuo desarrollo, avance e importancia. (**ALONSO**. R., María. V. 2002, pp. 10-15).

Las Resinas fenólicas fueron las primeras comercialmente sintetizadas, partiendo de moléculas de bajo peso molecular, en los procesos de reacción intervienen diversos factores, que influyen en el producto final, como son la concentración de fenol y de formaldehído, potencial de hidrogeno, temperatura, la duración de la transformación, el catalizador, entro otros factores más. (NESTARES. G., Manuel; MENDOZA. R., Janeth. J. &QUISPE. S., Pamela. A. 2012. pp. 18)

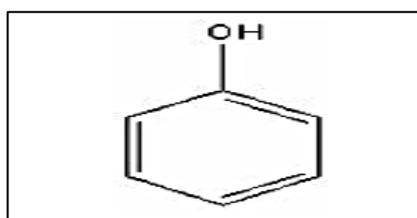
En el transcurso del tiempo, se han venido realizando investigación con el fin de encontrar modificadores o un elemento parcial para sustituir al fenol, que sean amigables con el ambiente y más económicos. Puesto que es un elemento toxico para la salud humana como para el medio ambiente. (MARTÍNEZ, D. et al. 2009. pp. 10).

Actualmente existe una gran producción de materiales sintéticos cada vez más con mayor rendimiento, que refiere a mayor resistencia lo que significa beneficioso en el tema productivo, larga vida útil, difícil biodegradación y poco reactivos; pero a su vez perjudicial en el tema ambiental, debido a que su estructura es muy usualmente compleja y difícilmente se involucra en la biodegradación y los procesos utilizados para degradar, pueden ser costosos o además presenta elementos secundarios con mayor toxicidad. (PONCE, Andrade. G. et al. 2012. pp. 160).

Inicialmente las resinas consisten en moléculas lineales, por intervención del calor se forma una red de enlaces entrecruzados presenta propiedades irreversibles, es decir un producto netamente fuerte y resistente, que posterior a su enfriamiento no es posible recuperarlo por tanto es imposible reciclarlo. (MARTÍNEZ, D. et al. 2009. pp. 11).

Los compuesto fenólicos tienen una estructura básica denominada benceno como se observa en la Figura 1-1, el cual está conformado de un anillo aromático compuesto con 6 átomos de carbono. Influencia de manera significativa en la reactividad de la molécula, la localización de sustituyentes en el anillo de benceno; puesto que dichos cambios o alteraciones en cuanto a estructura y reactividad se involucran de manera significativa en la biodegradación de estos compuestos. (GARCIA. M., JOSE. A. 2007. pp. 3)

Figura 1-1: Estructura del fenol



Fuente: GARCIA. M., JOSE. A. 2007. pp. 3

Tabla 1-1: Acontecimientos más Relevantes de los polímeros termoestables

Año	Responsable	Descripción
1872	Adolph von Baeyer.	Primera producción de fenol – formaldehído condensado
1902	Se sustituyó al “sellac” por la primera resina sintética desarrollada “Laccain”	
1907	L.H. Baekeland.	Calor y Presión se Patento en el curado de la resina fenólica.
1910	Compañía Bakelite	En Berlín se funda la compañía Bakelite, se dedica a la fabricación de resinas a nivel industrial.
1934	Pierre Castan	Desarrollo de las resinas epoxi
1935	Desarrollo de la resina melanina – formaldehido	
1936	C. Ellis.	Se descubre el curado de poliéster en presencia de poliestireno
1948	H. Honel	Primera patente en la producción de resinas termoestables solubles en agua
1964	Desarrollo de componentes de moldeo por inyección.	
1970 – 1975	Industria Aeroespacial (USA)	Producción de resinas resistentes al calor (Resina furano y fenólica)
1982	Ingeniería del automóvil y aeronáutica	Resina fenólica enlazadas a componentes polímeros reforzadores de fibra (FRP).
1990	Industria de transporte	Uso de resina epoxi-fenólica para composites
1993	Industria maderera	En la producción de adhesivos para la madera, el empleo de taninos modificados en resinas
1995	La producción de FRP por extrusión, la introducción de resinas fenólicas	

Fuente: ALONSO. R., María. V. 2002 pp. 10

1.2. Espuma Fenólica

La espuma fenólica es un material constituido de células abiertas que se caracteriza generalmente por ser ligeras y rígidas, pero además son friables, es decir que permite una penetración fácil de las raíces o tallos; y con alta capacidad de absorción y retención de agua. (NESTARES. G., Manuel; MENDOZA. R., Janeth. J. & QUISPE. S., Pamela. A. 2012, 18).

Además las espumas fenólicas son materiales poliméricos celulares versátil con infinidad de aplicación, cuya matriz es de tipo fenólico, por ejemplo para flores frágiles de preferencia se utiliza una espuma de baja densidad, mientras que para tallos más fuertes se utiliza una espuma de mayor densidad. (GARDZIELLA. A., et al. 2000, 3)

El método para la fabricación es conocido, a través de la mezcla y el uso de diversas sustancias que son, resol fenólico, agente de espumado, surfactante, ácido catalizados y otros aditivos opcionales. El equilibrio o balance adecuado de cada uno de estos componentes llevan a la obtención de un excelente polímero. (NESTARES. G., Manuel; MENDOZA. R., Janeth. J. & QUISPE. S., Pamela. A. 2012, 18).

Las espumas fenólicas poseen características adecuadas de acuerdo a su aplicación, dentro de sus características generales permiten la absorción del agua y aireación debido a que posee una estructura de células abiertas. Adicionalmente tienen una conductividad térmica muy baja por lo que presenta características favorables como baja combustión, emisión de humos muy bajos y emisión de humos invisibles. (MATERIAS PRIMAS, 2014).

Las celdas celulares de la espuma fenólica, tiene paredes celulares rotas o perforadas, motivo por el cual se da la absorción del agua. La ruptura de las paredes celulares se da por la presencia de agua, pero a su vez también puede darse por no tener una fuerza de control en la composición de espumado, considerándola a esta como más severa que por presencia de agua. (ESPINOZA. Z., Daniela. Alejandra. 2010, 4-5).

La clasificación de la espuma fenólica de acuerdo a su estructura celular (contenido de células y conductividad térmica) se da en cuatro tipos que se expresa en la **Tabla 2-1**.

Tabla 2-1: Clasificación de la espuma fenólica

Tipo	Característica
A	Alto contenido de células cerradas Baja conductividad térmica
B	Alto contenido de células cerradas Alta conductividad térmica
C	Células abiertas Alta resistencia
D	Células abiertas Baja resistencia

Fuente: ESPINOZA. Z., Daniela. Alejandra. 2010

1.3. Composición de la Espuma Fenólica

1.3.1. Resinas Fenólicas

Las resinas fenólicas son el principal componente de las espumas fenólicas, estos son polímeros se forman a través de la reacción entre fenoles y aldehídos. Son resinas tipo resol líquidas, de manera que se obtengan bajas cantidades de fenol y formaldehído libre. Como catalizadores se utilizan los hidróxidos o hidróxido de sodio, mientras que la condensación debe ser llevada a temperaturas que varían de 60 – 90°C y en la destilación debe definirse la cantidad de sólidos de resina y su viscosidad. (ESPINOZA. Z., Daniela. Alejandra. 2010, 6).

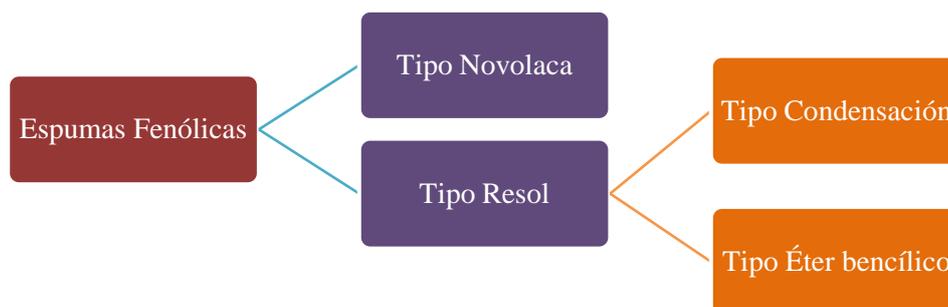
El tiempo de almacenamiento de la resina, está relacionado directamente con la reactividad, debido a que el tiempo de almacenamiento de los resoles es limitado (dos – cuatro meses). Mientras incrementa el tiempo de almacenamiento, entonces la reactividad de la resina decrece. (OROZCO. R., Belén del Saz. 2013. 19).

1.3.1.1. Clasificación

Las resinas fenólicas están divididas en dos grupos amplios como se ilustra en la Figura 2-1. El primer grupo es de tipo novolaca, las cuales en presencia de un catalizador ácido reaccionan el fenol y el formaldehído, así formando un producto de condensación lineal a través de cadenas de metileno.

El segundo grupo es de tipo resol, las cuales en presencia de un catalizador básico reacciona el fenol y el formaldehído, así dando como producto final un resol de tipo líquido, al cual para que forme la espuma se le añade ácido catalizador y un agente soplante. (ESPINOZA. Z., Daniela. Alejandra. 2010, 6).

Figura 2-1: Clasificación de las Espumas Fenólicas



Fuente: ESPINOZA. Z., Daniela. Alejandra. 2010

La Resina tipo Resol, es formado en presencia de un catalizador básico, la reacción entre fenol y formaldehído, considerando las condiciones de temperatura y potencial de hidrogeno, bajo las cuales se lleva a cabo las reacciones debido que tiene importancia en las características finales del producto. Teniendo en cuenta como factores principales en la elaboración de las espumas fenólicas, las condiciones de manufactura y además las propiedades del resol. (VALEA, A. et al. 2006, 329).

1.3.1.2. Composición de las resinas fenólicas

- **Fenol**

El fenol forma parte de la familia de los aromáticos (grupo Hidroxilo unido al anillo aromático) derivada del benceno, es conocida como alcohol monohidroxicilo, posee un olor característico tóxico, fuerte y caustico; además el color de su masa puede llegar a ser ligeramente amarilla-rosada o cristalina incolora. (JARAMILLO, G., 2011, pp. 61)

El fenol es soluble en solventes orgánicos como alcohol, éter y acetona, pero también es soluble en agua. En soluciones diluidas es comúnmente usado como desinfectante general o preservante. Es utilizado en la fabricación de algunos productos como resinas sintéticas, goma, pesticidas, colorantes, entre otros productos más. (JARAMILLO, G., 2011, pp. 61)

El fenol mientras se mantenga a temperatura ambiente es un sólido incoloro, pero se oxida si se le expone al aire, es decir que cambia de color a un rosáceo, en especial si existen trazas de hierro o cobre (ALONSO. R., María. V. 2002, pp. 11).

En el proceso de producción de fenol se denomina proceso de Hock; el proceso sintético de mayor importancia consiste en la oxidación del isopropilbenceno o cumeno (se obtiene a partir de la reacción de alquilación del benceno con propileno, en presencia del ácido fosfórico como catalizador), consecutivamente con una corriente de aire se oxida en fase líquida para formar el hidroperóxido de cumeno (HPC).

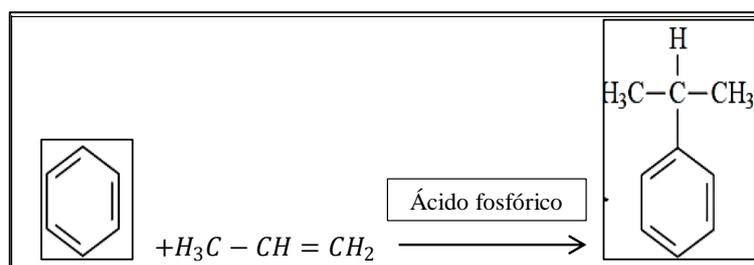
- **Formaldehido**

El formaldehido es un líquido incoloro en fase acuosa, formando hemiformales debido a que es estabilizado con metanol, pero en fase gaseosa es irritante.

Además el formaldehído es el más usado a nivel industrial, teniendo en cuenta que es el único compuesto carbonilo que se emplea para la síntesis de resina fenólica, pero también se pueden utilizar como aldehídos a: furfural, acroleína, alquil-aldehídos y aril-aldehídos. (ALONSO. R., María. V. 2002, pp. 11).

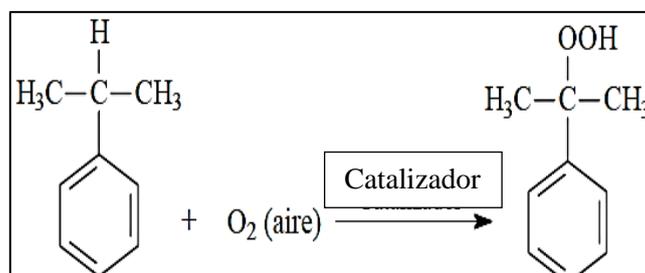
En la Figura 3-1 se ilustra el mecanismo de oxidación del isopropilbenceno y en la Figura 4-1 se presenta la formación del hidropéroxido de cumeno.

Figura 3-1: Oxidación del Isopropilbenceno o cumeno



Fuente: ALONSO. R., María. V. 2002

Figura 4-1: Formación del hidropéroxido de cumeno HPC



Fuente: ALONSO. R., María. V. 2002

- **Catalizadores**

Los catalizadores efectivos durante la catalización de la resina tipo resol en espuma, son los ácidos sulfónicos que son ácidos orgánicos moderadamente fuertes.

Los ácidos sulfónicos que prestan tasas ideales de curado y espumado son; p-tolueno, fenol, cumeno, xileno y ácidos sulfónicos. (MANFREDI., Lilian, B. 2000, pp. 1-9).

1.3.2. Surfactantes

La principal función de los surfactantes es proporcionar una interfase entre dos elementos que son la resina fenólica y el agente soplador, debido a que el primero es altamente polar y el segundo se caracteriza por ser no polar; es decir que debe reducir la tensión superficial, actuando como un agente activo de superficial. Existen varios tipos de surfactantes, siendo los comúnmente usados los no iónicos y que contienen silicón; y el otro tipo de surfactante es de aceite de silicón. (LEMON, P; et al. 1994. Pp. 3-11).

1.3.3. Agentes de soplado

Los agentes de soplado (Blowing agent), cubren la principal función de reducir o disminuir el calor exotérmico que se genera a raíz de la catálisis de la resina tipo resol. Este agente colabora en la expansión uniforme del crecimiento de la red de resina fenólica.

Los agentes de soplado más adecuados son aquellos que son de carácter líquido con un bajo punto de ebullición y bajo calor de vaporización. (ESPINOZA. Z., Daniela. Alejandra. 2010, 17).

1.4. Problema medioambiental de las Resinas Fenólicas

El amplio desarrollo de industrias químicas y petroleras viene acompañado de la generación de residuos, mismos que con el tiempo son dispuestos de manera indiscriminada en el ambiente; los hidrocarburos se encuentra entre uno de los más comunes los cuales presentan configuraciones estructurales dependiendo a la ubicación y número de átomos de la molécula. (AHUMADA, Mauro,; & GOMEZ, Raúl. 2009. pp. 104.)

En la actualidad, han sido diseñadas gran cantidad de materiales sintéticos, con el fin de satisfacer las necesidades, mejorar la calidad, el rendimiento, la vida útil y además que no reaccionen con otros compuestos químicos; por lo que presentan una gran desventaja con el medio ambiente, puesto que son difíciles de degradar y son tóxicos. Poseen características especiales, debido que son termoestables, por lo cual no fácilmente entran a los ciclos de degradación. (JAUREGUI, R. 2012. pp. 164)

La obtención de las resinas fenólicas, se da en condiciones alcalinas a partir de la condensación del fenol y formaldehidos, formando polímeros reticulados mediante el calentamiento. Las

propiedades del producto resultante, es decir de la resina fenólica son dieléctricas y soportan altas temperaturas, además es duro y fuerte. (JAUREGUI, R. 2012. pp. 164)

El fenol debido a sus características tóxicas, es necesario buscar alternativas para remplazarlo de una manera amigable con el ambiente. (MARTÍNEZ, D. et al. 2009. pp. 9). Está en la Lista de Substancias Peligrosas (Hazardous Substance List), está reglamentado por la OSHA y ha sido citado por diferentes entidades como La Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos, quienes han definido al fenol como un compuesto contaminante desde 1979; por otro lado, la Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (ATSDR, por sus siglas en inglés) ha reportado los efectos adversos que presenta la ingestión de fenol en la salud humana. (PRPICH, G. & DAUGULIS, J. 2005. pp. 331.)

Esta sustancia química está en la Lista de Substancias Extremadamente peligrosa para la Salud (Special Health Hazard Substance List), puesto que es mutagénica; además es posible que estos originen cáncer en los seres humanos.

Además de ser un compuesto tóxico, es una amenaza tanto para la vida acuática como para la terrestre, pues su presencia en diversos ambientes impide un desarrollo adecuado de organismos que viven en estos medios, causando alteraciones en el ecosistema.

Existen varios trabajos relacionados con la biodegradación de fenol a nivel mundial y muy escaso a nivel Nacional. Además cuando la resina fenólica se convierte en desecho al culminar su vida útil, no es acumulable por lo que no se puede reciclar, debido a su importancia comercial y al problema ambiental, surge la necesidad de llevar a cabo estudios pertinentes a la degradación de estos polímeros, puesto que se pretende reducir los desechos generados por su uso y el peligro que representen para el ecosistema. (JAUREGUI, R. 2012. pp. 164).

Puesto que este compuesto es de difícil biodegradación, se busca alternativas amigables con el ambiente, las técnicas de biorremediación están desarrollándose a lo largo del tiempo debido que es una técnica innovadora y presenta ciertos beneficios en cuanto a tema costos, además con benéficas para el ambiente. (**BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS TRATAMIENTOS.** 2012.)

1.5. Biotecnología

A nivel internacional según la OCDE (Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico) en el año 2002, la definición de biotecnología moderna es *“La aplicación de la ciencia y la tecnología en organismos vivos, así como en partes de los mismos, sus productos o modelos, para alterar materiales vivos o muertos para la producción de conocimiento bienes y servicios.”* (BIOTECNOLOGÍA. 2010.)

La biotecnología tiene un campo multidisciplinario, se fundamenta básicamente en el estudio y aprovechamiento de la tecnología de los organismos vivos para obtener bienes y servicios específicos. Los procesos biotecnológicos han sido aplicados por el hombre con diversos objetivos desde la fabricación de queso y bebidas; hasta la remediación de entornos altamente contaminados. La manipulación genética de los organismos a través de la utilización de métodos microbiológicos, es por lo que se distingue o se caracteriza la biotecnología. (CAZORLA. M., Evelyn. M. 2014. pp. 29)

1.5.1. Biotecnología Ambiental

La biotecnología ambiental se refiere netamente la solución de problemas ambientales y a la restauración o conservación de la calidad ambiental, a través de la aplicación de procesos biológicos (técnicas biotecnológicas). De acuerdo a la Sociedad Internacional Biotecnológica Ambiental, que define a la Biotecnología Ambiental como *“El desarrollo, uso y regulación de sistemas biológicos para la remediación de entornos contaminados (tierra, aire, agua) y para procesos amigables con el entorno natural (tecnologías "verdes" y desarrollo sustentable)”*. (CAZORLA. M., Evelyn. M. 2014. pp. 30)

La biotecnología ambiental es la aplicación de elementos biológicos como pueden ser organismos vivos o a la vez enzimas, destinados a reducir la contaminación mediante biotransformación o biodegradación de compuestos peligrosos en compuestos poco o cero contaminantes. (GARCÍA, N., 2005)

Los seres humanos intervienen en el ambiente de manera negativa de cuatro maneras que son: la sobreexplotación, la introducción de especies, destrucción de hábitats naturales y la contaminación por diversos factores; enfocándose la biotecnología ambiental al tratamiento de contaminantes, producto de un manejo deficiente de productos peligrosos o a su vez acciones mal intencionadas. (SERRANO. A., Paola. C. 2014. 5)

En la actualidad la principal aplicación de la biotecnología ambiental consiste en disminuir ambientes contaminados empleando técnicas eficientes, más limpias y de menor costo en relación a las tradicionales técnicas físico – químicas. (CAZORLA. M., Evelyn. M. 2014. pp. 28)

1.5.2. Biorremediación

La biorremediación es una técnica innovadora que surge como una rama de la biotecnología con el afán de remediar entornos contaminados. Esta técnica se ha venido desarrollando desde la década de los 80 y 90 aplicándose exitosamente en el tratamiento de agentes contaminantes. (GARCÍA, N., 2005)

Es una tecnología que desarrolla el potencial metabólico de los organismos vivos (principalmente bacterias, hongos y levaduras) con el fin de transformar contaminantes orgánicos en compuestos poco o nada contaminantes. Con el fin de realizar una biotransformación (descomposición de un compuesto orgánico en otro menos tóxico) o una mineralización (descomposición a dióxido de carbono, agua, sales inorgánicas y/o biomasa).

El campo de aplicabilidad es muy extenso, tomando en cuenta a cada uno de los estados de la materia como objeto, así tenemos: (ESCORZA. N., Juan. G. 2007. pp. 36)

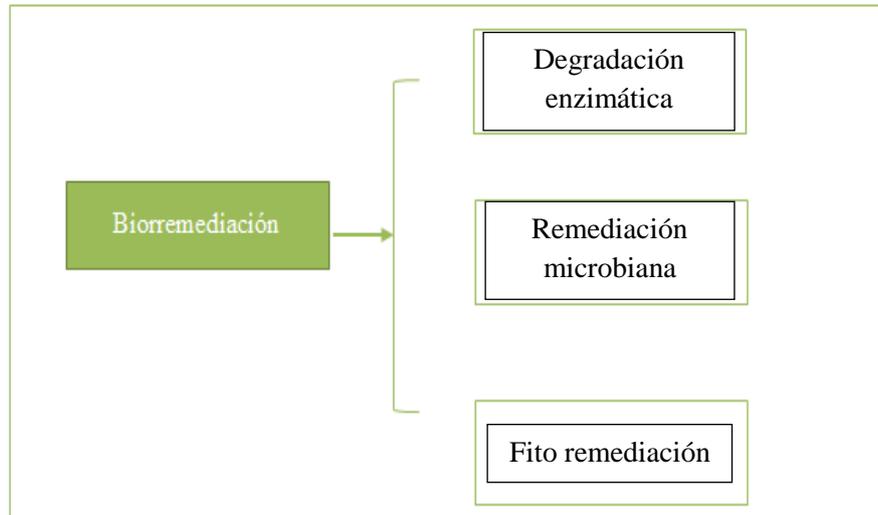
- Hidrocarburos como alifáticos, aromáticos, entre otros.
- Hidrocarburos clorados como PBs, pesticidas, herbicidas, entre otros.
- Metales Pesados.
- Medios contaminados (suelos o sedimentos)
- Otros contaminantes como compuestos organofosforados, fenoles, entre otros.

1.5.2.1. Tipos de Biorremediación

En los procesos de biorremediación se utilizan organismos con capacidad de biodegradar o de acumular contaminantes como compuestos orgánicos derivados de petróleo o sintéticos o a su vez metales pesados. Esencialmente los procesos de biorremediación son tres, en los cuales involucra la utilización de organismos, los cuales pueden trabajar de manera individual o se los puede mezclar.

En la Figura 5-1, se expresan los diferentes métodos de biorremediación. (**BIOTECNOLOGÍA Y BIORREMEDIACIÓN**. 2010).

Figura 5-1: Métodos de biorremediación



Fuente: **RODRIGUEZ**., Rosario. D. 2010

- **Biodegradación Enzimática**

La biodegradación enzimática se fundamenta en la aplicación de enzimas sobre el contaminante con el objetivo de degradar las sustancias tóxicas. La utilización de enzimas se da cuando los organismos no pueden desarrollarse satisfactoriamente debido a la elevada toxicidad de los contaminantes.

- **Remediación Microbiana**

Los organismos utilizados para remediación microbiana, se aplica directamente en el contaminante y estos pueden ser autóctonos, es decir propios de lugar o a su vez introducidos o agregados. La efectividad de esta técnica se deriva de la capacidad de ciertos organismos para transformar sustancias tóxicas en sustancias menos tóxicas.

- **Fitorremediación**

La fitorremediación es la utilización de plantas para remediar ambientes contaminados, aprovechando la capacidad de ciertas especies vegetales de tolerar, acumular y/o absorber altas concentraciones de contaminantes. (**RODRÍGUEZ**., Rosario. D. 2010. pp. 16)

1.5.3. Biodegradación

La biodegradación consiste en la modificación de un compuesto a través de un ser vivo, es decir la biotransformación de la molécula compleja en una menos compleja, sin llegar a ser mineralizada. Incluso en ocasiones el producto puede resultar más tóxico que el inicial. **(BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS TRATAMIENTOS. 2012).**

Los compuestos que llegan a ser mineralizados, se convierten en CO₂, H₂O y formas inorgánicas, por la intervención de los organismos vivos, alterando su estructura y a la vez con la formación de intermediarios metabólicos, estos intermediarios metabólicos pueden servir de combustible al oxidarse o también como elementos estructurales.

El proceso de degradación, es decir la transformación de un compuesto en otro de menor peso, lo que quiere decir la pérdida o el deterioro de sus elementos estructurales o una ordenación de sus átomos. **(JAUREGUI, R. 2012. pp. 65.) (OROSCO. V., Verónica P. &SORIA. G., Mercedes. M. 2008. pp. 40).**

Tabla 3-1: Capacidad Biodegradadora de los organismos fúngicos.

Capacidad	Descripción
Alta Biodegradabilidad	Fracción de alcanos, incluyendo alcanos normales y ramificados.
Intermedia Biodegradabilidad	Compuestos aromáticos e hidrocarburos policíclicos aromáticos, presentan mayor interés, debido a su elevada toxicidad y a su bioacumulación.
Baja Biodegradabilidad	Fracción polar, que comprenden las resinas (piridinas, quinolinas, sulfóxidos y aminas) y los asfaltenos (fenoles, ácidos grasos, cetonas y porfirinas).

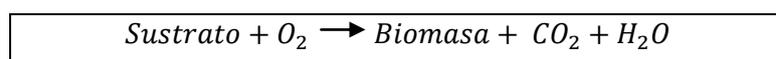
Fuente: OROSCO. V., Verónica P. &SORIA. G., Mercedes. M. 2008. pp. 40

1.5.4. Fundamento bioquímico de la biodegradación

El punto más importante en el fundamento bioquímico de la biodegradación, consiste en la cadena transportadora de las células (cadena respiratoria), consiste en obtener energía a partir de una serie de reacciones (oxido-reducción). Dicha cadena parte del sustrato orgánico (resina fenólica), el cual tiene la función de dador de electrones, concluyendo con la degradación de la sustancia. **(OROSCO. V., Verónica P. &SORIA. G., Mercedes. M. 2008. pp. 39).**

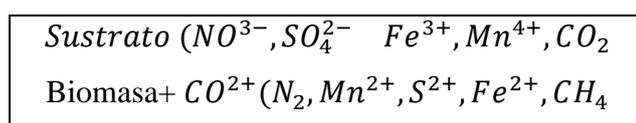
De acuerdo a las condiciones en las que se da el proceso de biodegradación, los microorganismos consumen diferentes aceptores, si se realiza en condiciones aerobias, los aceptores comúnmente utilizados son el oxígeno, los sulfatos, los nitratos y el dióxido de carbono; a diferencia si se realiza en condiciones anaerobias o reductoras, los aceptores utilizados por los organismos, serian el dióxido de carbono o los sulfatos. En la figura 6-1 se expresa la ecuación de la degradación aerobia y en la figura 7-1 representa la ecuación de la degradación anaerobia. (OROSCO. V., Verónica P. &SORIA. G., Mercedes. M. 2008. pp. 39).

Figura 6-1: Esquema de la degradación aerobia



Fuente: OROSCO. V., Verónica P. &SORIA. G., Mercedes. M. 2008. pp. 40

Figura 7-1: Esquema de la degradación anaerobia



Fuente: OROSCO. V., Verónica P. &SORIA. G., Mercedes. M. 2008. pp. 40

1.6. Organismos degradadores

Debido a su toxicidad para los microorganismos y otras formas de vida, los compuestos fenólicos frecuentemente generan problemas operacionales en los sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales, debido a la inhibición del crecimiento microbiano, aún a bajas concentraciones. (LI. J-K &HUMPHREY. A. 1989. pp. 179)

Sin embargo, se ha señalado la presencia en estos sistemas de numerosos microorganismos que degradan el fenol a bajas concentraciones, entre ellos incluidos *Alcaligenes eutrophus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas sp.*, *Rhodococcus sp.* y *Trichosporon cutaneum*, entre otros. (BUSWELL, J.A. et al. 1975.)

Además existe evidencia de la degradación de fenol por parte de microorganismos fúngicos como las cepas de *Bjerkandera adusta*, *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Coriolopsis gallica*, *Sporotricum pulverulentum*, *Trametes hispida* y *Trametes troggi* crecieron sobre la resina y además generaron un halo de color café en el medio alrededor del trozo de resina fenólica. (PONCE, Andrade. G. 2012. pp. 1)

1.6.1. Hongos

Los hongos o también denominados organismos fúngicos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza con una extensa gama de organismos, los cuales tienen un gran interés en diversos ámbitos como son científicos, industriales, económicos y ambientales. (CORTES, Alejandro. 2013.)

Los hongos son organismos unicelulares o pluricelulares, una de sus principales características es que a pesar que tienen cuerpo no forman tejidos, poseen una estructura talóferica formado por una serie de hifas, las cuales en conjunto constituyen el micelio. Su pared celular en algunos casos está formada de quitina y no de celulosa. (MORALES, María L., 2009. pp. 2)

Se pueden desarrollar en medios aerobios facultativos o aerobio con un intervalo de temperatura que va entre 0°C a 55°C. Los hongos presentan características beneficiosas y perjudiciales a la vez, tienen diferentes aplicaciones como en salud y alimentación, pueden utilizarse en procesos para la fabricación de quesos, vinos, producción de enzimas, vitaminas, entre otros. Además son muy eficientes en procesos de biorremediación. (CORTÉS, Alejandro. 2013).

1.6.1.1. Clasificación de los Hongos

Los hongos se encuentran clasificados en phylum Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota y hongos mistoporicos.

- *Phylum Chytridiomycota*

Este tipo de hongos posee zoosporas, que son células flageladas; su clasificación se basa en la ultraestructuración de las mismas. La reproducción se puede dar de manera sexual o asexual. Poseen como principal componente de su pared celular quitina y glicano. En la Figura 8-1 se puede observar una especie de este tipo de hongos. (ARIAS. C., Edna L. &PIÑEROS. E., Paola A. 2008.)

Figura 8-1: *Synchytrium endobioticum*

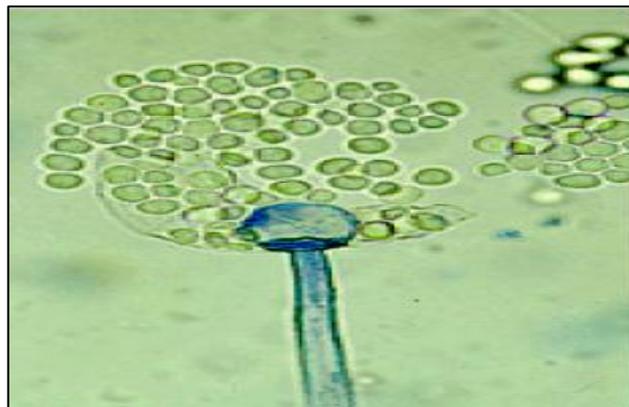


Fuente: ARIAS. C., Edna L. &PIÑEROS. E., Paola A. 2008.

- *Phylum Zygomycota*

Las Phylum Zygomycota se caracterizan por producir esporas sexuales (zigosporas), que se desarrollan en el zigosporangio, Los componentes principales de su pared celular son quitina, quitosano y ácido poligalacturónico. En la Figura 9-1, se ilustra la especie *Mucor sp* que pertenece a esta familia. (ARIAS. C., Edna L. &PIÑEROS. E., Paola A. 2008.).

Figura 9-1: *Mucor sp*

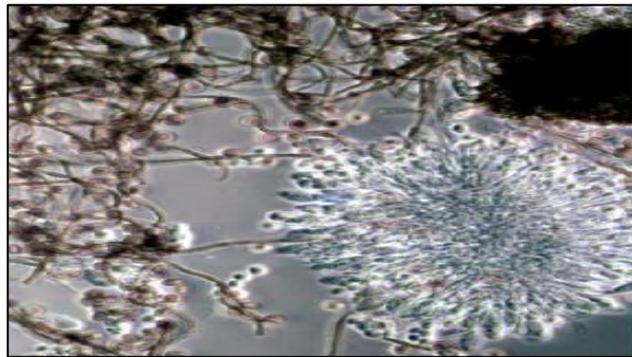


Fuente: ARIAS. C., Edna L. &PIÑEROS. E., Paola A. 2008

- *Phylum Ascomycota*

Las paredes celulares de este tipo de hongos está compuesto esencialmente por quitina, se caracterizan por tener ascosporas dentro de ascas, la cual proviene de un ascogonio, usualmente se encuentra dispuesta en una capa de células similares denominada cleistotecio. En la Figura 10-1 se ilustra una de los especies de esta familia. (ARIAS. C., Edna L. &PIÑEROS. E., Paola A. 2008.)

Figura 10-1: *Chaetomium sp.*



Fuente: ARIAS. C., Edna L. &PIÑEROS. E., Paola A. 2008.

- *Phylum Basidiomycota*

Los *Phylum Basidiomycota* se caracterizan por presentar basidiosporas, los cuales producen basidios. Se denomina basidiocarpio al cuerpo fructífero sexual, presenta hifas septadas y sus septos pueden ser simples o con doliporos. En la Figura 11-1 se ilustra una de las especies de esta familia. (ARIAS. C., Edna L. &PIÑEROS. E., Paola A. 2008.)

Figura 11-1: *Setchelliogaster sp.*



Fuente: ARIAS. C., Edna L. &PIÑEROS. E., Paola A. 2008.

- *Hongos mitospóricos*

Primero fueron conocidos como hongos imperfectos, debido a que en su ciclo de vida no presentan una fase sexual, posteriormente se los conoce como *Deuteromycetes*. Se los denominó mitospóricos debido que sus esporas son producidas por división mitótica.

La mayoría de estos hongos son amorfos, con hifas septadas, además sus conidios se los denomina como conidios, que pueden ser tálco si proviene de la segmentación de hifas o a su vez pueden ser blástico si existe un alargamiento del conidio previo a la septación. (ARIAS. C., Edna L. &PIÑEROS. E., Paola A. 2008.)

1.6.2. Curva de crecimiento

La curva de crecimiento de los organismos fúngicos, presenta tres fases, que son:

1.6.2.1. Primera fase:

En esta fase no presenta crecimiento aparentemente, es decir que el crecimiento del hongo está presente pero no se evidencia y además presenta una fase previa a la germinación de esporas. (CHAPARRO. S., Deisy. F. &ROSAS. W., Diana. F. 2006. pp. 07.)

1.6.2.2. La segunda fase:

Se presenta crecimiento rápido, es decir el desarrollo del micelio a partir de las extremidades de las hifas. Las células al interior del micelio contribuyen con nutrientes a las células periféricas, mas no aportan con el crecimiento neto del hongo. Durante esta fase o al finalizarla pueden aparecer las esporas, además se da la utilización de elementos como carbohidratos, nitrógeno y fosfatos. . (CHAPARRO. S., Deisy. F. &ROSAS. W., Diana. F. 2006. pp. 07.)

1.6.2.3. La tercera fase:

La última fase se caracteriza por que presenta escaso o nulo crecimiento micelial y además hay una disminución de peso del mismo. Adicionalmente se puede dar autólisis que consiste en la ruptura de la quitina, carbohidratos y proteínas producido por enzimas del hongo. (CHAPARRO. S., Deisy. F. &ROSAS. W., Diana. F. 2006. pp. 07.)

El crecimiento es afectado por dos factores principales, que son; la disminución o agotamiento de fuente de carbono y el segundo factor consiste en la acumulación de metabolitos tóxicos en medios con fuerte cantidades de carbohidratos y amoníaco en medios con gran contenido de nitrógeno. (ARIAS. C., Edna L. &PIÑEROS. E., Paola A. 2008. pp. 34).

Existen hongos en las que se observa la curva de crecimiento y cumplen únicamente dos fases, en el cual el crecimiento inicial es consecutivo de la segunda fase y aquí se detiene el crecimiento. Esto se debe a que en esta fase puede presentar síntesis de polisacáridos o a su vez se trate de una movilización de nitrógeno de las hifas más antiguas (crecimiento neto), el cual es utilizado nuevamente posterior a que las fuentes exógenas de nitrógeno se han agotado. (ARIAS. C., Edna L. &PIÑEROS. E., Paola A. 2008. pp. 34).

1.7. Hongos ligninolíticos

Los hongos ligninolíticos o comúnmente conocidos como hongos de podredumbre blanca, debido a su eficiencia en la degradación de lignina en la naturaleza. La canalización de la degradación lo realizan a través del mecanismo enzimático que consiste en radicales libres y además con baja especificidad de sustrato. (**BIORREMEDIACIÓN**. 2012. 30).

La aplicación, beneficios o características importantes que presentan un sistema enzimático único, este tipo de hongos, han sido descritas durante los años 80, el estudio de los hongos de podredumbre blanca y su sistema enzimático ha venido desarrollándose a través del tiempo. EL mecanismo utilizado por este tipo de organismos se basa en la producción de radicales libres. (**FERNANDEZ**., Salvador F. 2012. Pp. 43)

1.7.1. Mecanismo de Biodegradación

Los mecanismos de biodegradación más conocidos a través del empleo de hongos de podredumbre blanca. El primero es el sistema lignolítico, es decir el sistema de degradación de lignina a través de hongos lignolíticos es extracelular, esto quiere decir que pueden degradar sustratos sin la necesidad de internalizarlos, lo que facilita la oxidación de compuestos que son poco solubles en agua, elevando su capacidad de tolerancia a contaminantes relativamente altos.

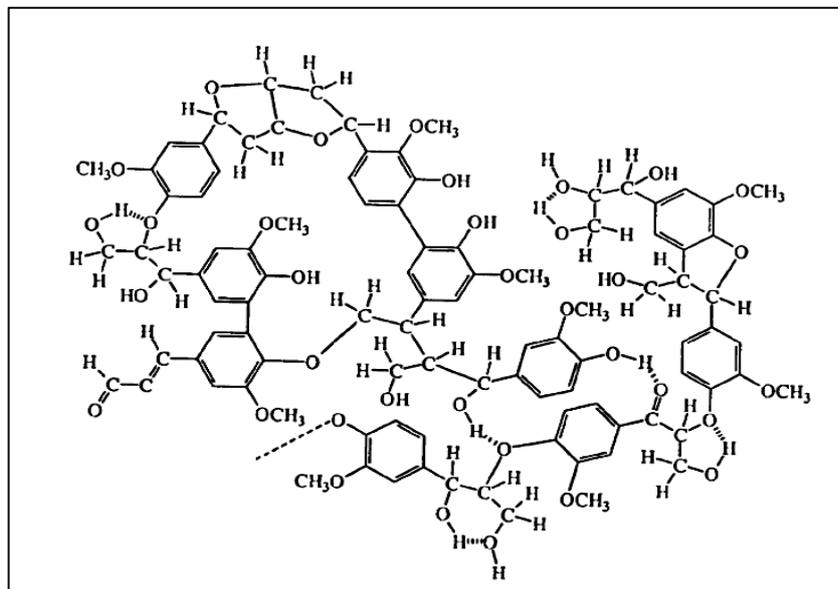
El segundo mecanismo es en el que interviene la enzima citocromo P-450 monooxigenasas, consiste en un sistema intracelular denominado fase I de metabolismo, este sistema intracelular es característico de los organismos eucariotas, el cual consiste en la regulación de hormonas y además la detoxificación de xenobióticos y drogas. Por último tenemos la fase II del metabolismo, el cual consiste en reducir los contaminantes a través de un conjunto de enzimas que cataliza reacciones de conjugación. (**FERNANDEZ**., Salvador F. 2012. pp. 43) (**QUINTERO**, J. 2011. Pp. 5868).

Uno de los factores por el cual se ve limitado el crecimiento de los hongos es el interactuar con poblaciones microbianas autóctonas, existen pruebas que los hongos de podredumbre blanca son capaces de inhibir a las poblaciones autóctonas y viceversa; por tal motivo es esencial el estudio individual de los organismos fúngicos, para una mejor aplicación biotecnológica. (**BIORREMEDIACIÓN**. 2012. 29).

1.7.2. Sistema lignolítico

La lignina es el segundo polímero más abundante, se encuentra en la pared celular de los vegetales, formando una matriz compleja y además aportando ciertas características a los vegetales como rigidez a la pared, protección a las células vegetales y aportando hidrofobicidad, es muy conocido por su resistencia al ataque de los microorganismos. El sistema lignolítico de los hongos de podredumbre blanca, es la más eficiente en relación a otros organismos, produciendo una macromolécula altamente compleja, insoluble en agua y amorfa, debido a que su estructura es heterogénea e irregular, como se muestra en la figura 12-1. (LAURA, J. &CASTELLANOS, P. 2009. pp. 125).

Figura 12-1: Estructura de la Lignina

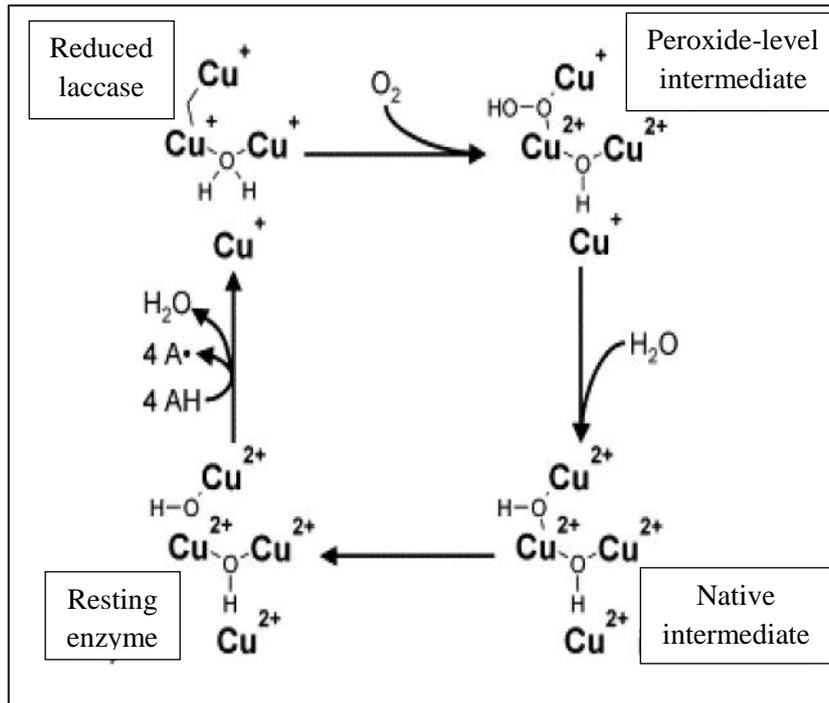


Fuente: FERNANDEZ., Salvador F. 2012. pp. 45

Estos organismos producen esencialmente dos tipos de enzimas lignolíticas (lacasas y peroxidasas), siendo las principales la lignina peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP). Tomando en cuenta su principal diferencia recae en el tipo de aceptor electrónico, debido que la lacasa utiliza O_2 y la peroxidasa utiliza H_2O_2 como aceptor electrónico.

La lacasa, es la enzima lignolítica más estudiada, descrita y distribuida entre los hongos; posee cuatro átomos de cobre por molécula, los cuales están directamente relacionados al ciclo catalítico de la enzima, como se expresa en la figura 13-1. (FERNANDEZ., Salvador F. 2012. Pp. 44)

Figura 13-1: Ciclo catalítico de la Lacasa.



Fuente: FERNANDEZ., Salvador F. 2012. pp. 46

Las lacasas se caracterizan por ser muy poco específicas y a través del ciclo catalítico con capaces de oxidar diferentes compuestos como fenoles, polifenoles, aminas aromáticas, produciendo radicales elevadamente reactivos que pueden llevar a nuevas oxidaciones que se pueden dar de manera espontánea o a través de enzimas. (DELEY. Z., Ángel R. 2010. pp. 25)

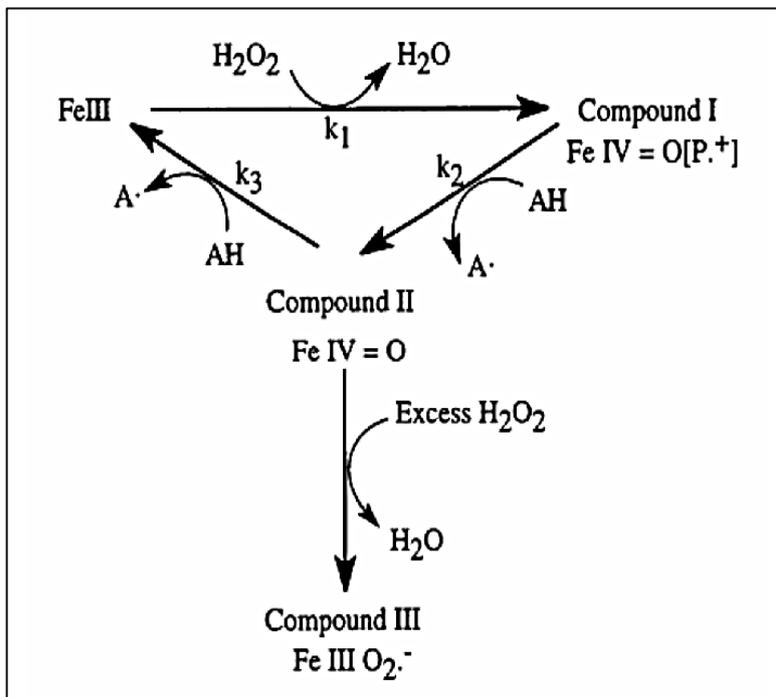
La primera peroxidasa relacionada en la degradación de a lignina que fue descubierta, es la lignina peroxidasa, a pesar que la LiP no es una de los componentes habituales de los sistemas enzimáticos lignolíticos. En la figura 14-1 se puede observar el ciclo catalítico de la LiP. (BIORREMEDIACIÓN. 2012. 34).

El peróxido de hidrógeno durante su ciclo catalítico, oxida con dos electrones la lignina peroxidasa a un compuesto que esta descrito como compuesto I, este a la vez produce un compuesto más reducido, debido a que oxida sustratos por un electrón, como lo describe como compuesto II y por ultimo este compuesto puede reanudar a la Lignina peroxidasa a su estado inicial (similar al compuesto I), con exceso de H₂O₂ y el compuesto II reacción de tal forma que da lugar a un compuesto III inactivo.

Manganeso peroxidasa (MnP), es una peroxidasa extracelular, al igual que la LiP pueden causar la inactivación enzimática a elevadas concentraciones de H₂O₂, debido a que poseen sensibilidad. En

cuanto al ciclo catalítico de la LiP con el ciclo catalítico de la MnP tiene mucha similitud, a diferencia de dos aspectos.

Figura 14-1: Ciclo catalítico de la lignina peroxidasa (LiP)

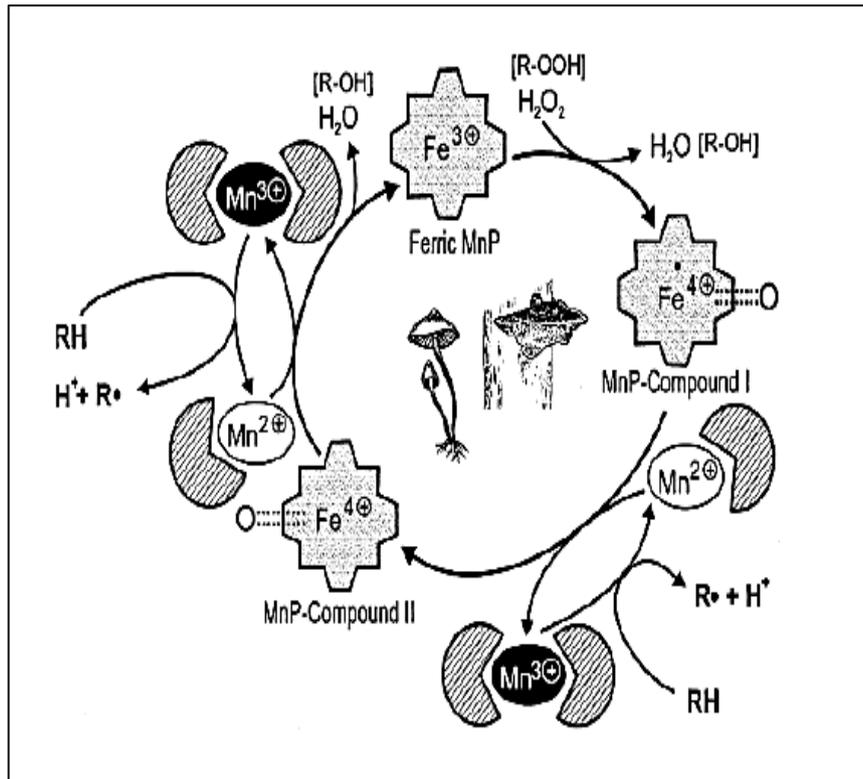


Fuente: FERNANDEZ., Salvador F. 2012. pp. 46

El primer aspecto comprende que el compuesto I oxida Mn^{2+} a Mn^{3+} , estos estabilizados con ácidos orgánicos como oxalato, malonato, malato, tartrato o lactato, produce oxidaciones en varios sustratos, generando radicales libres.

El segundo aspecto comprende que el compuesto II solo a través del ion Mn^{2+} puede ser reducido a su estado original y además está estrictamente relacionado para finalizar su ciclo catalítico. (CHAPARRO. S., Deisy. F. & ROSAS. W., Diana. F. 2006. pp. 15)

Figura 15-1: Ciclo catalítico de la manganeso peroxidasa (MnP)



Fuente: FERNANDEZ., Salvador F. 2012. pp. 49

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Descripción del área de investigación

2.1.1. Datos generales de la Ciudad de Riobamba

La Capital de la Provincia de Chimborazo es la ciudad de Riobamba, reconocida también como Sultana de Los Andes, la cual forma parte de la Región 3, compuesta por las provincias de Chimborazo, Cotopaxi, Pastaza y Tungurahua; siendo este último la sede administrativa o también denominado Capital Regional.

La ciudad de Riobamba se encuentra ubicada al norte de la provincia, con una Latitud de 1.66667 y una longitud de -78.63333 ; además está conformado por cinco parroquias urbanas y once parroquias rurales las cuales se encuentran citadas en la Tabla 1-2.

Tabla 1-2: Parroquias de la Ciudad de Riobamba

PARROQUIAS	
Urbanas	Rurales
Lizarzaburu	Cacha
	Calpi
	Cujibíes
Maldonado	Flores
	Licán
Velasco	Licto
	Pungalá
Veloz	Punín
	Químiag
Yaruquíes	San Juan
	San Luis

Elaborado por: García M. Villegas M

2.1.2 Lugar de la Investigación

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental CESTTA. Se encuentra ubicado en la Facultad de Ciencias de la ESPOCH a 2756 m.s.n.m., con una temperatura que oscila entre 13 a 17 °C, una humedad relativa que oscila entre 30 a 40 % y una presión atmosférica de 540 mm Hg.

La fase microbiológica se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental perteneciente a la Escuela de Ciencias Químicas de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2 Materiales utilizados

2.2.1 Resina fenólica

La resina fenólica proviene de diferentes centros de expendio de flores, ubicados en la ciudad de Riobamba, dicha resina fue analizada cualitativamente previo a su tratamiento experimental. Para mayor confiabilidad de resultados obtuvimos muestras de RF de diferentes lugares

2.2.2 Material biológico

En el desarrollo experimental, se manipularon un aproximado de 40 organismos fúngicos, los cuales fueron colectados en la comunidad de Pomona y El Porvenir en la provincia de Pastaza. De la gran variedad de HL, se seleccionaron un total de siete cepas, analizando su capacidad para biodegradar, su alcance micelial y la invasión del mismo sobre la resina.

Las cepas de los HL fueron sembrados en diferentes medios de cultivos como son Agar-Agar, Agar Sabouraud Dextrose y Potato Dextrose Agar, durante dos meses para definir el medio donde se desarrollen mejor, fueron encubadas a una temperatura de 28°C para su crecimiento micelial.

2.3 Muestreo

2.3.1 Población

Según datos obtenidos en la Cámara de la Pequeña Industria existe un promedio de 30 floristerías, cada una de las cuales expende un promedio de 30 cubos de 3500cm³ de resina fenólica tipo resol por año comercializado como oasis, se caracteriza por poseer celdas abiertas que facilitan la retención del agua, por tal motivo se utiliza como base en los arreglos florales y se expende en distintos lugares provocando un grave problema ambiental, debido que es un material no reciclable, no reducible y no reutilizable.

2.3.2 Método de Muestreo

El método de muestreo utilizado fue aleatorio simple (probabilístico), el cual consta de los siguientes pasos:

- Se definió la población, es decir, la selección de discos de resina fenólica, provenientes de diferentes puntos de la ciudad de Riobamba.
- Cada elemento experimental tuvo su registro correspondiente.
- Se le otorgó un código a cada elemento experimental.
- A cada uno de los discos de la resina fenólica se les codifico a través de hojas electrónicas que se muestra en el Anexo 05.

2.3.3 Tamaño muestral

Equivalente a seis discos de resina fenólica por siete cepas de hongos; siendo el tamaño muestral equivalente a cuarenta y dos unidades experimentales detallado en la Tabla 3-2.

2.4 Diseño experimental

En la presente investigación se utilizaron siete cepas fúngicas; para cada tratamiento se usaron seis discos de resina fenólica, obteniendo un total de cuarenta y dos unidades experimentales.

La investigación se basa en:

- **La repetitividad:** Se realizaron seis ensayos con cada una de las diferentes cepas fúngicas, cada ensayo cuenta con un disco de resina fenólica proveniente de diferentes lugares pero con las mismas características como diámetro, grosor, textura, color, peso específico, entre otras.
- **La reproductividad:** El experimento se realizó bajo condiciones asépticas con cada uno de los ensayos considerando un tiempo específico para el tratamiento de la resina con el fin de aumentar la seguridad aséptica del área, además los ensayos fueron realizados por dos personas.
- **El control:** El experimento se lo realizó bajo una temperatura establecida de 26°C-28°C con el objetivo que el micelio de los organismos fúngicos tengan un mejor desempeño; además corroborando las condiciones asépticas para evitar contaminación como se muestra en Anexo 07.

La investigación se desarrolló con cada organismo fúngico relacionado a los discos de resina fenólica provenientes de diferentes lugares, a los cuales se les mantuvo bajo condiciones controladas por un periodo de 90 días, con una observación diaria durante los primeros 15 días y con una observación cada 15 días a partir de la tercera semana; bajo una temperatura controlada.

2.4.1 Variables de la investigación

- **Variable Dependiente**

Biodegradación de la Resina Fenólica

- **Variable Independiente**

Cepas de los organismos fúngicos.

- **Variable Control**

Tabla 2-2: Variable de Control

Variable	Descripción
Temperatura	Las cepas fúngicas se desarrollan a una temperatura adecuada de aproximadamente 28°C.

Elaborado por: García M. Villegas M

2.5. Tipo de Diseño

2.5.1. Diseño Factorial

Para este tipo de experimento, se trabajó con el Diseño Factorial, que se describe en la tabla 3-2 del diseño de la investigación.

En la Tabla 3-2 se representa las diferentes interacciones entre resina fenólica (RF) y cepas fúngicas de los hongos seleccionados, relacionando de tal manera cada uno de los discos de RF, obtenidos de diferentes lugares con cada una de las cepas de H.

Así tenemos un ejemplo CH1RF1 que representa la relación entre la cepa fúngica del primer hongo con el primer disco de resina fenólica, de la misma manera una sucesión de reacción de las siete cepas fúngicas seleccionadas con cada uno de los discos de resina.

El diseño de la investigación consiste en un diseño de tipo factorial, debido que la elección de los HL y los discos de resina con el fin de sus diferentes interacciones y el análisis de cada uno de los diferentes grupos experimentales.

Tabla 1-2: Diseño de la Investigación

	CH1	CH2	CH3	CH4	CH5	CH6	CH7
RF1	CH1RF1	CH2RF1	CH3RF1	CH4RF1	CH5RF1	CH6RF1	CH7RF1
RF2	CH1RF2	CH2RF2	CH3RF2	CH4RF2	CH5RF2	CH6RF2	CH7RF2
RF3	CH1RF3	CH2RF3	CH3RF3	CH4RF3	CH5RF3	CH6RF3	CH7RF3
RF4	CH1RF4	CH2RF4	CH3RF4	CH4RF4	CH5RF4	CH6RF4	CH7RF4
RF5	CH1RF5	CH2RF5	CH3RF5	CH4RF5	CH5RF5	CH6RF5	CH7RF5
RF6	CH1RF6	CH2RF6	CH3RF6	CH4RF6	CH5RF6	CH6RF6	CH7RF6

Elaborado por: García M. Villegas M

En la tabla 4-2 se presenta la codificación de las cepas de HL y en la Tabla 5-2, representa la codificación de los discos de resina, proveniente de los diferentes lugares de venta.

Tabla 2-2: Codificación-Cepas de Hongos

Código	Especificación	Identificación
CH1	Cepa de hongo 1	<i>Bjerkandera fumosa</i>
CH2	Cepa de hongo 2	<i>Phellinus ferreus</i>
CH3	Cepa de hongo 3	<i>Scutellinia spp</i>
CH4	Cepa de hongo 4	<i>Ganoderma sp</i>
CH5	Cepa de hongo 5	<i>Abortiporus spp</i>
CH6	Cepa de hongo 6	<i>Xilaria polimorfa</i>
CH7	Cepa de hongo 7	<i>Trametes suaveolens</i>

Elaborado por: García M. Villegas M

Tabla 3-2: Codificación-Resinas Fenólicas

Código	Especificación
RF1	Resina Fenólica #1
RF2	Resina Fenólica #2
RF3	Resina Fenólica #3
RF4	Resina Fenólica #4
RF5	Resina Fenólica #5
RF6	Resina Fenólica #6

Elaborado por García M. Villegas M

2.5.2. *Lógica del Diseño experimental*

La Tabla 6-2 trata de la lógica del diseño experimental, la cual consta de un grupo experimental aleatorio, cada uno se encuentra asociado a siete tratamientos, y sus observaciones posteriores, una observación previa a la fase experimental, un grupo control que no está sometido a ningún tipo de tratamiento y con el que podemos relacionar los resultados.

Tabla 4-2: Lógica del Diseño Experimental

Grupo Experimental Aleatorio	Observación Previa	Tratamiento	Observaciones Posteriores
R G1	O1	X1	O2 O3 O4 O5 O6 O7
R G1	O1	X2	O2 O3 O4 O5 O6 O7
R G1	O1	X3	O2 O3 O4 O5 O6 O7
R G1	O1	X4	O2 O3 O4 O5 O6 O7
R G1	O1	X5	O2 O3 O4 O5 O6 O7
R G1	O1	X6	O2 O3 O4 O5 O6 O7
R G1	O1	X7	O2 O3 O4 O5 O6 O7
R G1	O1	-	O2 O3 O4 O5 O6 O7

Elaborado por García M. Villegas M

Las observaciones se realizan de manera visual, el cambio de coloración, el crecimiento micelial, la invasión del mismo sobre la resina fenólica, y finalmente el equivalente al peso seco del disco de resina fenólica posterior al tratamiento, de tal manera que se pueda analizar cuantitativamente mediante la diferencia de peso en porcentaje. La tabla 7.2 nos indica la nomenclatura de la lógica del diseño experimental.

Tabla 5-2: Nomenclatura de la Lógica del Diseño experimental

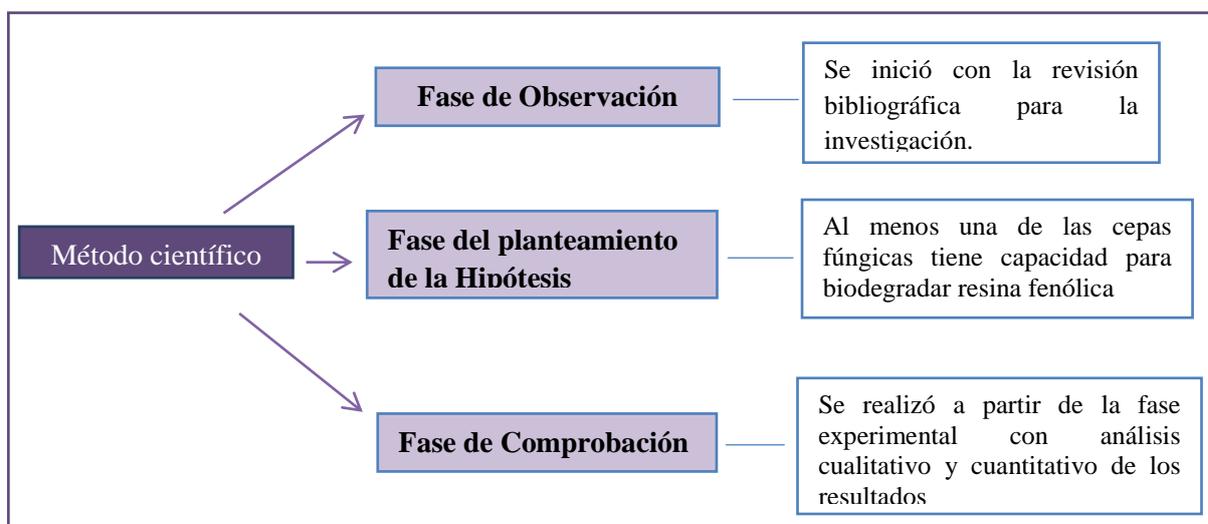
Código	Especificaciones
R	Discos de resina fenólica – Muestreo Aleatorio simple.
G1	Discos de Resina Fenólica.
O1	Análisis cualitativo y cuantitativo de la resina fenólica previo al tratamiento con los hongos.
X1	Tratamiento con la aplicación de la cepa del hongo 1
X2	Tratamiento con la aplicación de la cepa del hongo 2
X3	Tratamiento con la aplicación de la cepa del hongo 3
X4	Tratamiento con la aplicación de la cepa del hongo 4
X5	Tratamiento con la aplicación de la cepa del hongo 5
X6	Tratamiento con la aplicación de la cepa del hongo 6
X7	Tratamiento con la aplicación de la cepa del hongo 7
-	Grupo control, sin tratamiento de la cepas de los hongos
O2–O3–O4–O5–O6–O7	Análisis cualitativo y cuantitativo posterior al tratamiento con las cepas de los hongos.

Elaborado por García M. Villegas M

2.6. Metodología

2.6.1. Método Científico

Cuadro 1-2: Método Científico



Elaborado por García M. Villegas M

El método científico que consta de 3 fases:

- **Fase de Observación**

Mediante revisión bibliográfica se pudo constatar que si existen organismos fúngicos que degradan la resina fenólica y partiendo de ello se desarrolló la investigación para evaluar la eficiencia de cada cepa fúngica.

- **Fase del planteamiento de la Hipótesis**

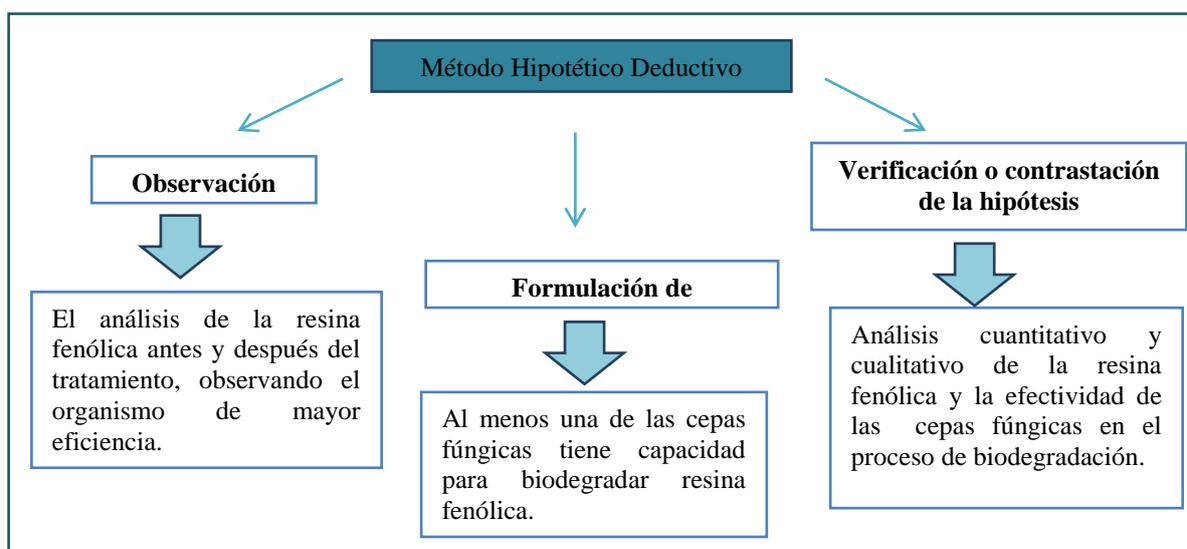
Al menos una de las cepas fúngicas tiene capacidad para biodegradar resina fenólica.

- **Fase de Comprobación**

Para comprobar la hipótesis, se realizó un proceso biotecnológico, con la aplicación de cepas fúngicas por un periodo de tiempo determinado. Se llevó a cabo un análisis cuantitativo, que consiste en la medición del peso seco de la resina fenólica antes y después del tratamiento conociendo el porcentaje de degradación y a su vez un análisis cualitativo analizando características físicas a medida que se desarrolla la investigación.

2.6.2. *Método Hipotético deductivo*

Cuadro 2-2: Método Hipotético Deductivo



Elaborado por García M. Villegas M

El método hipotético deductivo, consta de las siguientes fases:

- **Observación**

Se realizó una observación sistemática ya que cumple con las dos condiciones:

- a. Se efectuó una medición antes y después del tratamiento de discos de resina fenólica.
- b. Se determinó que organismo fúngico tiene mayor potencial para la biodegradación de los discos de resina fenólica.

- **Formulación de hipótesis generales que expliquen los hechos observados**

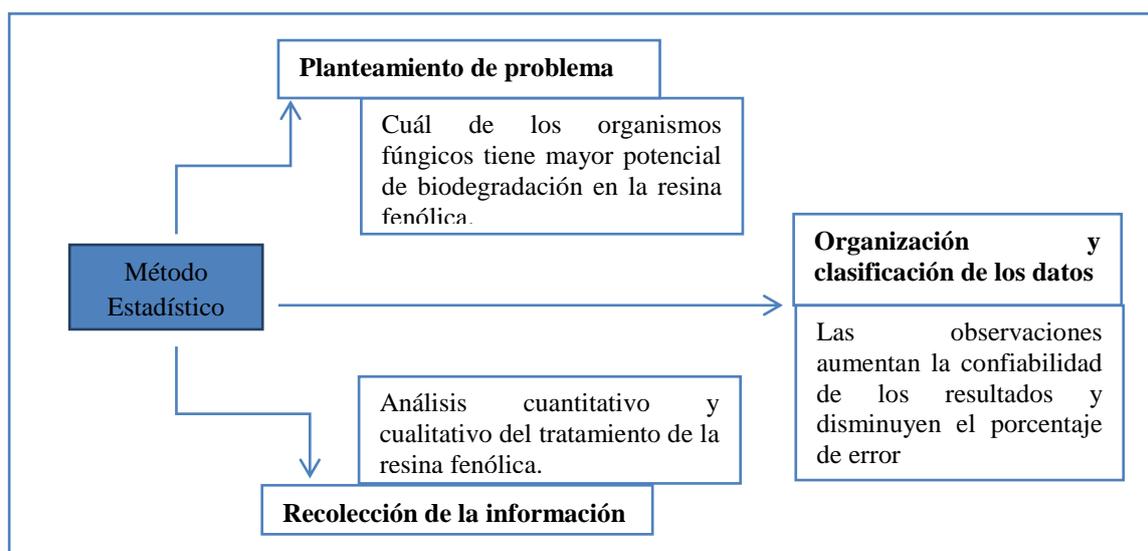
Al menos una de las cepas fúngicas tiene capacidad para biodegradar resina fenólica.

- **Verificación o contrastación de la hipótesis**

La contrastación o verificación de la hipótesis, se la lleva a cabo a través del desarrollo de la investigación mediante un análisis cuantitativo y cualitativo del objeto de estudio que es la resina fenólica y la efectividad de las cepas fúngicas en el proceso de biodegradación.

2.6.3. Método estadístico

Cuadro 3-2: Método Estadístico



Elaborado por García M. Villegas M

Recolección de la información

Para la recolección de la información se realizó pre- prueba y una post- prueba del tratamiento de la resina fenólica con los organismos fúngicos, además un análisis cualitativo realizando varias observaciones.

Organización y clasificación de los datos

Para la organización y clasificación de los datos se procedió de la siguiente manera:

- Análisis cualitativo realizando varias observaciones para la confiabilidad de los datos.
- Análisis cuantitativo realizando mediciones antes y después de la experimentación para comparar los tratamientos de las cepas de hongos con los discos de la resina fenólica.

2.7. Técnicas e instrumentos de recolección y análisis de datos

2.7.1. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Las técnicas e instrumentos utilizados para la recolección de datos, que se involucraron en el desarrollo de la investigación se detallan en la Tabla 8-2.

Tabla 6-2: Técnicas e instrumentos de recolección de datos

TÉCNICA	INSTRUMENTO / RECURSO
Mapeo y Ubicación	Mapa y Croquis de la zona de recolección de organismos fúngicos. Guía Turístico (Nativo)
Matriz de información	Ficha Técnica
Ficha de Observación	Lista de Cotejos
Matriz de datos	Hoja de Registros
Figuras Informativas	Imágenes ilustrativas

Elaborado por García M. Villegas M.

2.7.2. Técnicas e instrumentos de análisis de datos

- **Prueba T-student**

Se usó esta técnica por tratarse de una prueba estadística paramétrica numérica adecuada a la investigación y vinculada a la determinación de relaciones entre los pesos de la resina con la biodegradación.

- **R Pearson**

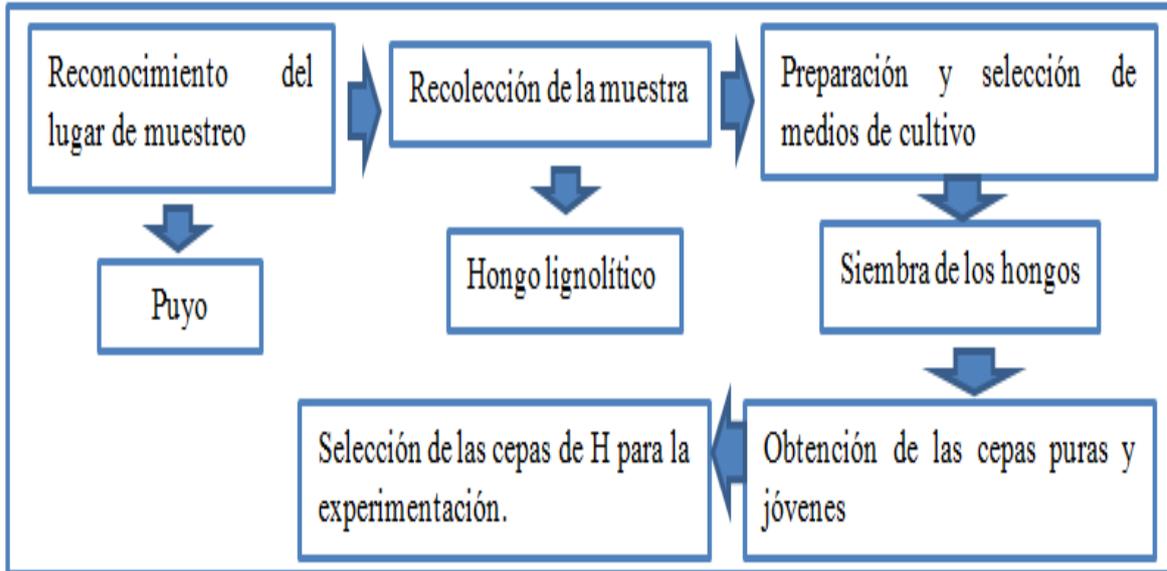
La correlación que existe en los momentos antes y después del tratamiento a la resina.

2.7.3. Fases de la investigación

La investigación se llevó a cabo en dos fases, la primera consiste es la colección de los hongos lignolíticos, la obtención de las cepas puras y la identificación de los mismos. La segunda fase consiste en la parte experimental, es decir la interacción entre los hongos lignolíticos seleccionados y el disco de RF durante un periodo de tres meses, con un análisis de la pérdida de peso del disco antes y después del tratamiento, acotando con una observación diaria y un registro fotográfico cada 15 días.

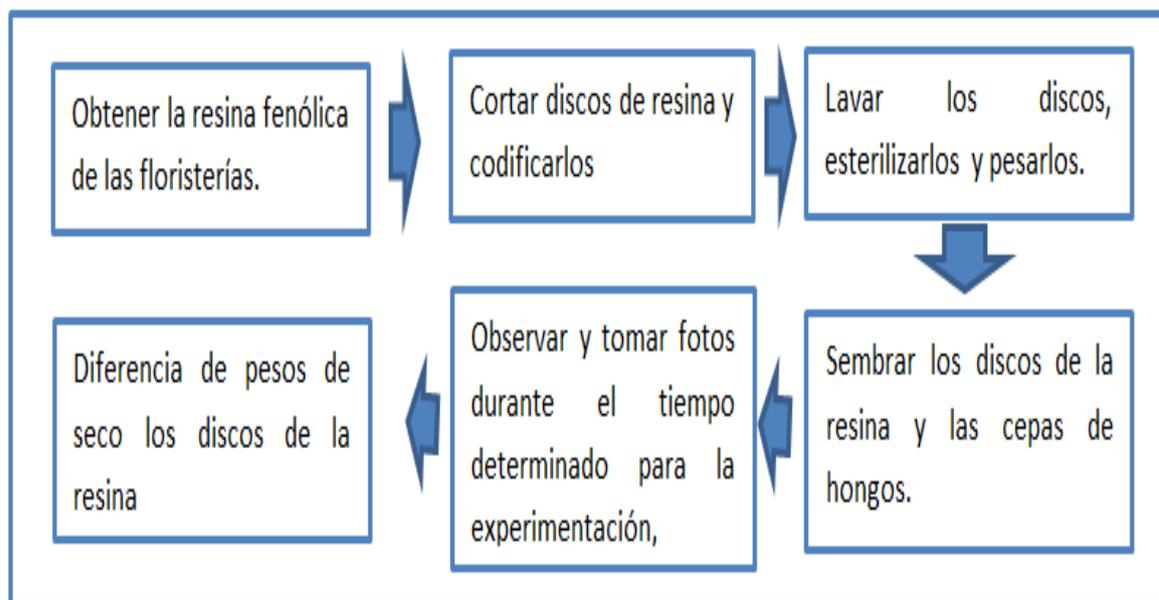
Los diagramas correspondientes a las dos fases en las que se desarrolló la investigación, se ve ilustrada en el Cuadro 5-2 que representa la primera fase de la investigación, cuyo objetivo fue la obtención de cepas puras de hongos lignolíticos. En el cuadro 6-2 se expresa la segunda fase de la investigación, consiste en la biodegradación de la RF, interactuando un total de 90 días.

Cuadro 4-2: Primera fase de la Investigación.



Elaborado por: García M. Villegas M

Cuadro 5-2: Segunda fase de la Investigación.



Elaborado por: García M. Villegas M

2.8. Parte Experimental

2.8.1. Recolección de hongos carpóforos

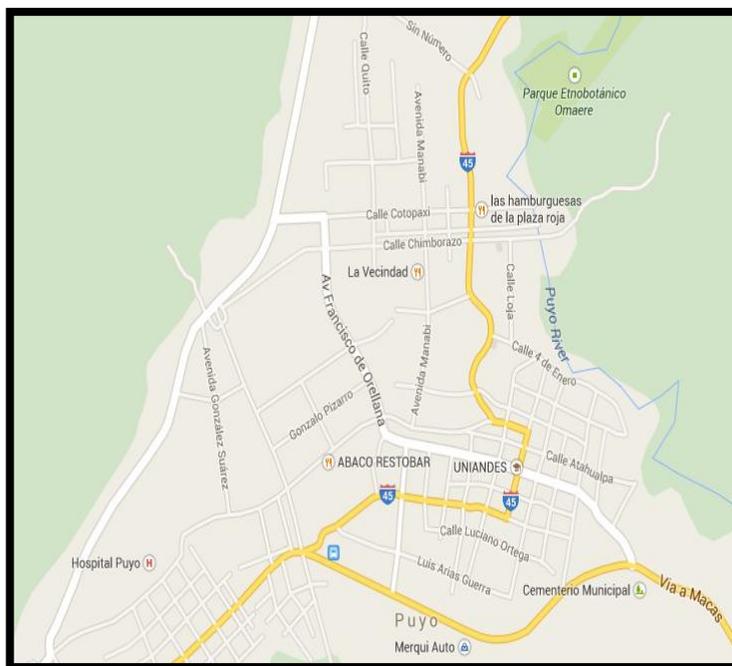
La recolección de los hongos se lo realizó a partir de macrohongos o carpóforos (cuerpos fructíferos), en caso de ser maduros y no esporulados se los recolectó enteros y de tener esporulación se realizó un corte y se los colocó en una caja petri, y se los colocó en un cooler para ser trasladados al laboratorio.

2.8.1.1. Procedimiento para la recolección de Hongos Lignolíticos

- a. Seleccionar el lugar en el cual los HL se desarrollan adecuadamente y exista diversidad de los mismos, como se muestra en las Fotografías 1-2 y 2-2.
- b. Llevar un registro fotográfico de cada una de las especies encontradas en el lugar. Anexo 1 y 2
- c. Remover el hongo mediante un cuchilla teniendo cuidado en introducir la cuchilla más abajo de la madera para no cortar el estípite ni la volva y con la ayuda de una pinza colocarlo en la funda de papel (nunca en bolsas plásticas). Cerrar los extremos sin causar daño a las muestras.
- d. Codificar mediante un formato establecido para la identificación temporal de los organismos.

- e. Transportar las especies recolectadas en refrigeración en un cooler, para evitar alteraciones o daños hasta el área de trabajo.

Fotografía 1-2:Lugar de colección de HL (Guía turística de la zona)



Elaborado por: García M., Villegas M.

Fotografía 2-2:Hongos Lignolíticos de la zona (Ciudad del Puyo)



Elaborado por: García M., Villegas M.

2.8.2. *Recolección de esporas de los HL mediante la técnica del papel celofán*

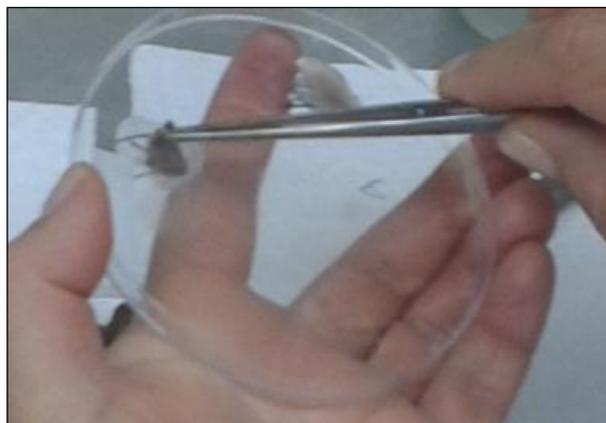
2.8.2.1. *Preparación de las Cajas Petri con Papel celofán*

- a. Cortar la silueta del papel celofán a la misma dimensión de la caja Petri.
- b. Lavar el papel celofán con alcohol al 70%.
- c. Colocar el papel celofán en las cajas Petri y sellarlos.

2.8.2.2. *Recolección de las esporas de los HL*

- a. Seleccionar el hongo del cual queremos obtener sus esporas, añadir vaselina en la tapa de la caja petri.
- b. Tomar el hongo y realizar un pequeño corte aproximado de $0,5\text{cm}^2$ y colocarlo en la vaselina añadida en la tapa de la caja petri, de forma que las esporas puedan caer en el papel celofán como se muestra en la Fotografía 3-2.
- c. Etiquetar la caja petri adecuadamente.
- d. Sellar la caja petri con parafilm para su posterior análisis.
- e. Luego de la germinación, observarlas a través de un microscopio.

Fotografía 3-2: Recolección de las esporas en papel celofán



Elaborado por: García M., Villegas M.

2.8.3. Medio de cultivo

Se seleccionó tres medios de cultivo agar-agar, agar Sabouroud Potato dextrose, agar (PDA), para probar y determinar en qué medio se desarrollaban de mejor manera el micelio.

2.8.3.1. Medio de cultivo Potato dextrose agar PDA

- Preparar 1000mL de PDA.
- Homogenizar la mezcla y esterilizarla por un lapso de 25 minutos.
- Ambientar la mezcla, para poder distribuirlas de manera uniforme.
- Distribuir el agar en las cajas un aproximado de 15 ml en cada una de las cajas petri.
- Dejar solidificar la mezcla de cada una de las cajas Petri, para proceder a sembrar.

2.8.4. Aislamiento de los hongos lignolíticos

2.8.4.1. Purificación de los hongos

- Tomar con precaución los hongos lignolíticos mediante una pinza metálica para su purificación, como se ilustra en la Fotografía 4-2.
- Preparar una solución de cloro al 1% y con una gaza proceder a purificar la superficie del HL para evitar daños y prevenir agentes externos.
- Proceder con la inoculación de los HL para la obtención de las cepas puras.

Fotografía 4-2: Purificación de los hongos



Elaborado por: García M., Villegas M.

2.8.4.2. *Siembra de los hongos lignolíticos*

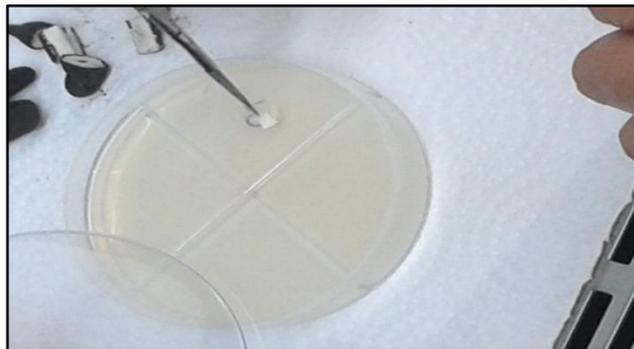
- Realizar un corte de aproximadamente 0,5 cm², como se muestra en la Fotografía 5-2., posterior a la purificación del cuerpo fructífero del hongo.
- Proceder a inocular el corte en el medio de cultivo seleccionado de manera que quede adherido a este, ilustrado en la Fotografía 6-2.
- Sellar la caja petri con parafilm, codificar, y almacenar en una estufa e incubarla.
- Observar el crecimiento micelial y realizar resiembras hasta obtener cultivos puros.

Fotografía 5-2: Corte del cuerpo fructífero del hongo lignolítico



Elaborado por: García M., Villegas M.

Fotografía 6-2: Inoculación del hongo lignolítico



Elaborado por: García M., Villegas M.

2.8.5. *Aislamiento de esporas*

La colección de hongos lignolíticos, fueron tomadas de la Provincia de Pastaza en las comunidades de Pomona y El Porvenir. El aislamiento de las esporas, se lo realizó de manera in situ y ex situ.

2.8.5.1. Aislamiento de las esporas de manera ex situ

- Recolectar los hongos de la zona, colocarlos en una funda de papel para evitar alteraciones en el cuerpo fructífero del hongo, y proceder al aislamiento de las esporas de manera ex situ, (laboratorio).
- Tomar el cuerpo fructífero del hongo en la zona en la que se encuentran las esporas, en un aproximado de 5 cm².
- Colocar una pequeña muestra de vaselina en la tapa de la caja petri, con el objetivo de adherir a la vaselina el pedazo de cuerpo fructífero del hongo, teniendo la precaución que el lugar donde se encuentren las esporas quede frente a frente con el AA, para que estas puedan decantar con facilidad.
- Dejar por un periodo determinado hasta que pueden germinar las esporas y posterior observarlas al microscopio.

2.8.5.2. Siembra de las esporas

- Realizar una observación microscópica, para especificar la presencia de esporas o no y además la ubicación de las mismas, como se ilustra en la Fotografía 7-2
- Identificar el lugar donde se encuentran las esporas, y ubicar las mismas por punteado con la ayuda de un marcador.
- Inocularlas esporas en medio de cultivo PDA.
- Etiquetar y encubar a una temperatura de 28°C.
- Observar diariamente el crecimiento de las esporas y posterior una observación microscópica.

Fotografía 7-2: Observación microscópica de las esporas de los hongos lignolíticos



Elaborado por: García M., Villegas M.

2.8.6. Selección de las cepas de hongos

Durante la investigación, se obtuvieron un aproximado de 40 cepas de HL, incluyendo esporas y micelio, para la selección de las siete cepas puestas a experimentación, se realizó un pre-prueba, la cual consistió en analizar el potencial biodegradador de cada una de las cepas, por lo cual se realizó un pre-experimento a corto tiempo y a través de revisión bibliográfica.

2.8.7. Identificación de las cepas de los HL

La identificación de las cepas de los HL seleccionados, se realizó de manera macroscópica y microscópica. La identificación de los hongos de hongos macroscópicos consiste en un análisis morfológico del esporocarpio del HL acotando el color del mismo. Mientras para la identificación se han considerado diferentes aspectos, como son:

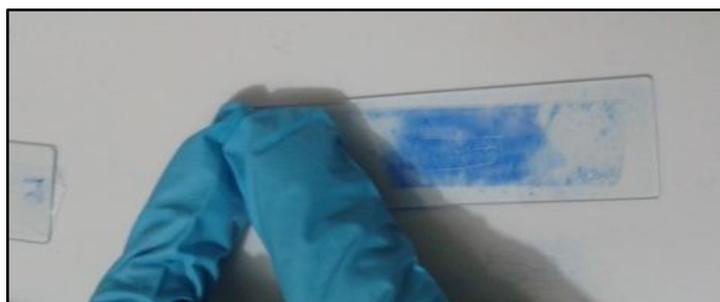
- Color
- Forma
- Tamaño
- Textura

Adicional a estas observaciones, se realizó la técnica de la cinta adhesiva con el fin de identificar las cepas de los hongos lignolíticos seleccionados.

2.8.7.1. Técnica de la cinta adhesiva para la identificación de las cepas de los hongos lignolíticos

- Limpiar y desinfectar con alcohol al 70% las áreas de trabajo.
- Corta cinta adhesiva transparente, y colocar sobre la cepa del HL.
- Colocar una gota de azul lacto fenol sobre el portaobjeto. Ver Fotografía 8-2
- Visualizar la placa con la muestra en el microscopio.

Fotografía 8-2:Muestra con una gota de azul lacto fenol



Elaborado por: García M., Villegas M.

2.8.8. Prueba de biodegradación de los discos de resina fenólica por los hongos fúngicos

2.8.8.1. Discos de resina fenólica

- Realizar cortes de láminas delgadas de RF.
- Proceder a lavar los discos de la RF con ácido clorhídrico al 1%, eliminando las impurezas de la misma.
- Secar los discos a una temperatura de 100°C.
- Pesar de cada uno de los discos de RF.

2.8.8.2. Siembra del disco de resina fenólica y la cepa del HL

- Desinfectar el área de trabajo para cada siembra limpiar con alcohol al 70 % para evitar que exista contaminación cruzada en la experimentación.
- Preparar medio de cultivo PDA.
- Realizar una extracción del medio de cultivo, para poder introducir el micelio del mismo diámetro e invertirlo.
- Introducir el disco de RF no muy distante del micelio inoculado, como se muestra en la Fotografía 9-2.
- Sellar, codificar y colocar en la estufa a una temperatura de 28°C
- Observar diariamente el crecimiento micelial, coloración, enfrentamiento e invasión del micelio sobre la RF.

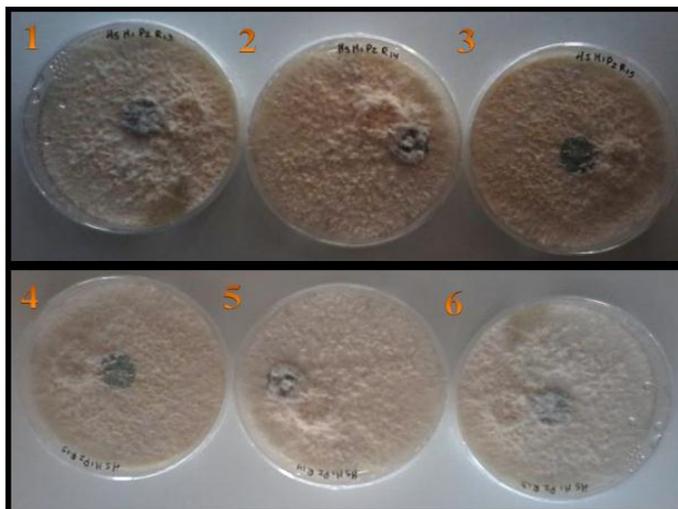
Fotografía: 9-2:Parte Experimental



Elaborado por: García M., Villegas M.

En la Fotografía 10-2 se muestra las repeticiones de cada grupo experimental, consta con seis repeticiones cada una, siguiendo el diseño factorial, lo que relaciona a cada uno de los hongos lignolíticos seleccionados, con cada una de los discos de resinafenólica provenientes de diferentes lugares.

Fotografía 10-2: Repeticiones del Grupo Experimental



Elaborado por: García M., Villegas M.

2.8.9. Lógica de comparación de los pesos de las muestras luego de la experimentación

Posterior a la experimentación, lavar los discos de RF para que quede libre de micelio y poder realizar el análisis de los pesos secos.

2.8.9.1. Lavado y secado de la resina

- Limpiar y desinfectar el área de trabajo con alcohol al 70%.
- Dividir la caja petri en cuatro partes con el papel aluminio y para que no se mueva los trozos de papel colocar un pedazo de cinta adhesiva en el centro.
- Codificar adecuadamente cada uno de estos compartimentos.
- Extraer los discos de resina fenólica delicadamente y colocarlos en un vaso de precipitación con ácido clorhídrico.
- Calentar un poco la solución de manera que al agitar el medio pueda diluirse y el micelio desprenderse del disco de resina.
- Una vez que los discos de RF quede libre de micelio, pasar los discos por agua destilada, para proceder a colocarlos en las cajas petri previamente preparadas y codificadas.
- Colocar las cajas codificadas con los discos a incubar por 24 horas como se muestra en el anexo 06.

- Ambientar las cajas, posterior extraer los discos para continuar con el pesaje de los mismos.

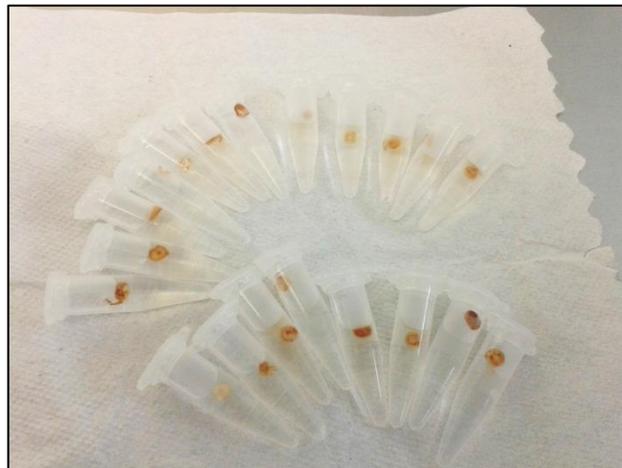
2.8.9.2. Pesado de la resina

- Extraer los discos de RF, de las cajas Petri previamente ambientadas.
- Determinar el peso seco en la balanza analítica calibrada, para calcular el porcentaje de pérdida de peso
- Realizar el mismo procedimiento con los demás discos.

2.8.10. Preservación de hongos

Para la preservación de los hongos utilizamos la crio preservación o congelación en glicerol a -25°C, en donde el metabolismo de los hongos se mantiene virtualmente suspendido, lo que garantiza estabilidad genética, como se ilustra en la Fotografía 11-2.

Fotografía 11-2: Preservación de los HL



Elaborado por: García M., Villegas M.

CAPITULO III

3. ANALISIS Y RESULTADOS

3.1. Aislamiento de hongos biodegradadores de resina fenólica

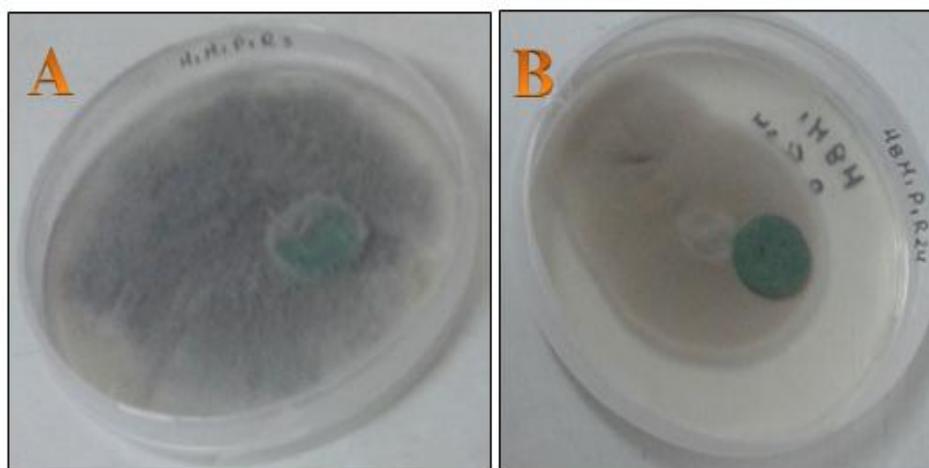
Las cepas fúngicas previamente aisladas en el laboratorio de Biotecnología Ambiental de la ESPOCH, se los sembró en medio PDA, ya que es el medio en el que mejor se desarrollan las cepas fúngicas, por poseer los nutrientes necesarios para que los organismos crezcan.

Se realizó una pre prueba para la selección de estos organismos los cuales tuvieron una diferencia en su coloración por tal motivo se los seleccionó.

La resina fenólica junto con el hongo incubado por un lapso de 15 días se observó a diario, evaluando parámetros como el crecimiento micelial y la técnica de enfrentamiento e invasión del hongo sobre la resina de la siguiente manera:

- Si el hongo lignolítico rodea la resina, significa que no asimila la resina como parte de sus nutrientes, por ende existen bajas probabilidades que degrade la resina fenólica.
- Si el hongo lignolítico cubre la superficie de la resina, significa que éste lo estaba asimilando como nutriente, por consiguiente existe mayor probabilidad de degradación de la resina fenólica. En la fotografía 1-3 se visualiza la técnica de enfrentamiento invasión del hongo.

Fotografía 1-3: Técnica de enfrentamiento – invasión de los HL sobre la RF



Elaborado por: García M., Villegas M.

En la Fotografía 1-3 A, podemos observar que el micelio del HL invade a la RF, mientras que la fotografía 1-3 B el micelio simplemente lo rodeo.

En la Tabla 1-3, se presenta el origen de cada una de las cepas seleccionadas para la investigación, el medio de aislamiento de las cepas y el medio seleccionado. Los hongos lignolíticos seleccionados corresponden a los denominados hongos de podredumbre blanca, debido a que se alimentan de lignina, que es un polímero muy complejo que se encuentra en la corteza de los árboles y que posee características similares a los de la resina, por ende aumenta la probabilidad de degradación del polímero resina fenólica.

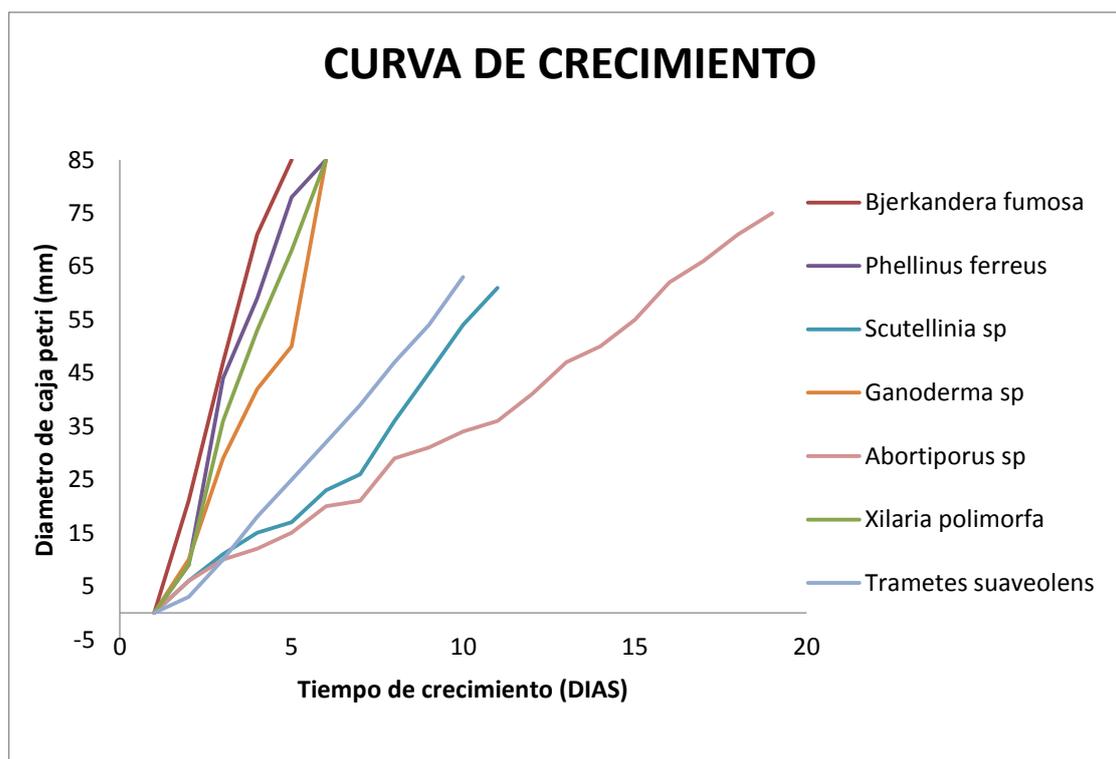
Tabla 1-3: Descripción de Origen y Medio de Aislamiento.

Cepa fúngica	Origen	Medio de aislamiento	Medio seleccionado
PM-EP-15 <i>Bjerkandera fumosa</i>	Provincia de Pastaza, Ciudad de Puyo, parroquia El Porvenir.	PDA, AA y Agar Sabouroud	PDA (Potato Dextrose Agar)
P-EP-10 <i>Phellinus ferreus</i>	Provincia de Pastaza, Ciudad de Puyo, parroquia El Porvenir.	PDA, AA y Agar Sabouroud	PDA (Potato Dextrose Agar)
P-A-E-II <i>Scutellinia spp</i>	Provincia de Pastaza, Ciudad de Puyo, (comunidad Pomona-selva).	PDA, AA y Agar Sabouroud	PDA (Potato Dextrose Agar)
PM-EP-1 <i>Ganoderma sp</i>	Provincia de Pastaza, Ciudad de Puyo, parroquia El Porvenir.	PDA, AA y Agar Sabouroud	PDA (Potato Dextrose Agar)
E-8 (EP) <i>Abortiporus spp</i>	Provincia de Pastaza, Ciudad de Puyo, parroquia El Porvenir.	PDA, AA y Agar Sabouroud	PDA (Potato Dextrose Agar)
PM-EP-12 <i>Xilaria polimorfa</i>	Provincia de Pastaza, Ciudad de Puyo, parroquia El Porvenir.	PDA, AA y Agar Sabouroud	PDA (Potato Dextrose Agar)
PM-RP-21 <i>Trametes suaveolens</i>	Provincia de Pastaza, Ciudad de Puyo, Rio Pomona.	PDA, AA y Agar Sabouroud	PDA (Potato Dextrose Agar)

Elaborado por: García M., Villegas M.

Los organismos seleccionados se caracterizan por tener uniformidad en el tiempo de crecimiento como se visualiza en el Gráfico 1-3. Se expresa la curva de crecimiento en correlación con las siete cepas de los hongos lignolíticos seleccionados, donde en el eje de las “y” se encuentra en diámetro expresado en mm, mientras que en el eje de las “x” el tiempo de crecimiento expresado en días, puesto que a diario se realizaba la medición del diámetro del crecimiento del micelio de las cepas seleccionadas.

Gráfico 1-3: Curva de Crecimiento de las Cepas de los HL.



Elaborado por: García M., Villegas M.

3.2. Identificación de las cepas de los Organismos Fúngicos

La identificación de las diferentes cepas de hongos lignolíticos, fue a través de una caracterización macroscópica y microscópica. La macroscópicamente se llevó a cabo a través del análisis morfológico del endocarpio, tomando en cuenta textura, coloración, forma, textura y dureza. Mientras que microscópicamente, a través de un microscopio como presencia o ausencia de esporas, y la forma de sus esporas.

En la tabla 2-3 se detalla los resultados de la caracterización macroscópica y microscópica de las cepas de HL.

Tabla 2-3: Caracterización Macroscópicas y Microscópicas de las Cepas

N°	Código	Cepa HL	Forma	Textura	Color	Tamaño	Bordes
1	PM-EP-15	<i>Bjerkandera fumosa</i>	Ostra	Dócil	Crema	Pequeño	Regular
2	P-EP-10	<i>Phellinus ferreus</i>	Ostra	Duro	Negro – Crema –Café	Mediano	Regular
3	P-A-E-II	<i>Scutellinia spp</i>	Ostra	Duro	Naranja - crema	Mediano	Regular
4	PM-EP-1	<i>Ganoderma sp</i>	Ostra	Dura	Crema - Naranja	Mediano	Regular
5	E-8 (EP)	<i>Abortiporus spp</i>	Ostra	Algodón	Crema-Blanco	Mediano	Irregular
6	PM-EP-12	<i>Xilaria polimorfa</i>	Alargada	Dura	Negro	Pequeño	Regular
7	PM-RP-21	<i>Trametes suaveolens</i>	Ostra	Duro	Blanco - crema	Mediano	Regular

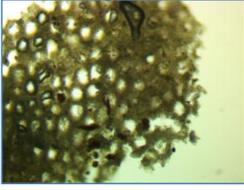
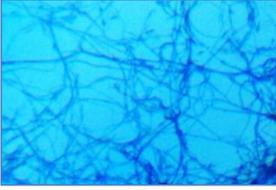
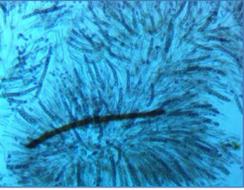
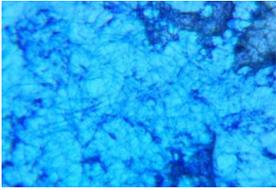
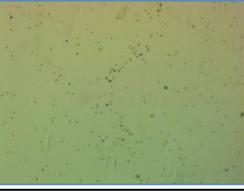
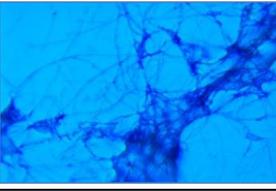
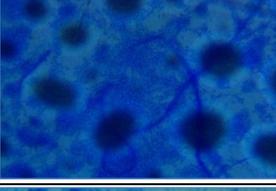
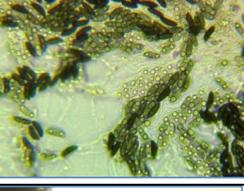
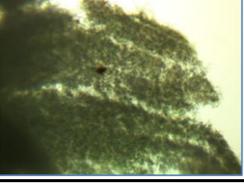
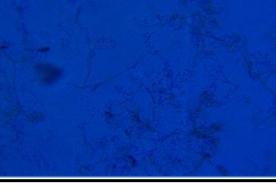
Elaborado por: García M., Villegas M.

En la Tabla 3-3, se expresa la matriz fotográfica de los hongos lignolíticos, donde se puede observar tanto el esporocarpio como las observaciones microscópicas, lo que colabora con la identificación de las diferentes especies de HL.

3.5.1.1. Técnica de la cinta adhesiva para la identificación de las cepas de los HL

Aplicando la Técnica de la cinta pegante (adhesiva) para la identificación de los hongos lignolíticos se tomó el micelio y se lo colocó en una placa porta objeto que contenía una gota de azul lacto fenol y se observó en el microscopio para ver su estructura vegetativa y reproductiva. Las cepas identificadas y seleccionadas se indican en la Tabla 4-3.

Tabla 3-3: Matriz Fotográfica de los hongos lignolíticos

Matriz Fotográfica				
	Hongo Lignolítico	Observaciones Microscópicas		Identificación
G 1				<i>Bjerkandera fumosa</i>
G 2				<i>Phellinus ferreus</i>
G3				Scutellinia sp
G 4				<i>Ganoderma sp</i>
G 5				<i>Abortiporus sp</i>
G 6				<i>Xilaria polimorfa</i>
G 7				<i>Trametes suaveolens</i>

Elaborado por: García M., Villegas M.

Tabla 4-3:Hongos Lignolíticos seleccionados

Gráfico	Genero
	<p><i>Bjerkandera fumosa</i></p>
	<p><i>Phellinus ferreus</i></p>
	<p><i>Scutellinia sp</i></p>
	<p><i>Ganoderma sp</i></p>
	<p><i>Abortiporus sp</i></p>
	<p><i>Xilaria polimorfa</i></p>
	<p><i>Trametes suaveolens</i></p>

Elaborado por: García M., Villegas M.

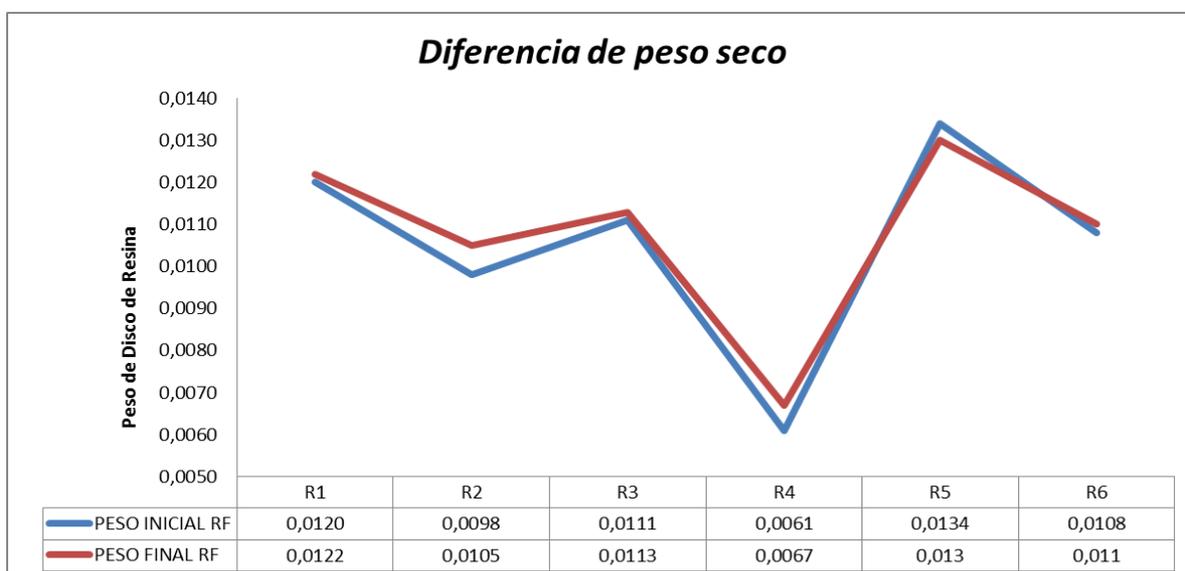
3.3. Experimentación biodegradadora de Resina Fenólica

3.3.1. Análisis cualitativo y cuantitativo de la experimentación

3.3.1.1. *Bjerkandera fumosa* (Hongo 1)

En el Anexo 09 se presenta el análisis cualitativo en las cajas petri durante los tres meses, y realizando un seguimiento fotográfico cada 15 días en donde el micelio cubrió al disco de resina teniendo así una biodegradación mínima como se muestra en Gráfico 2-3.

Gráfico 2-3: Diferencia de Peso seco de *Bjerkandera fumosa*



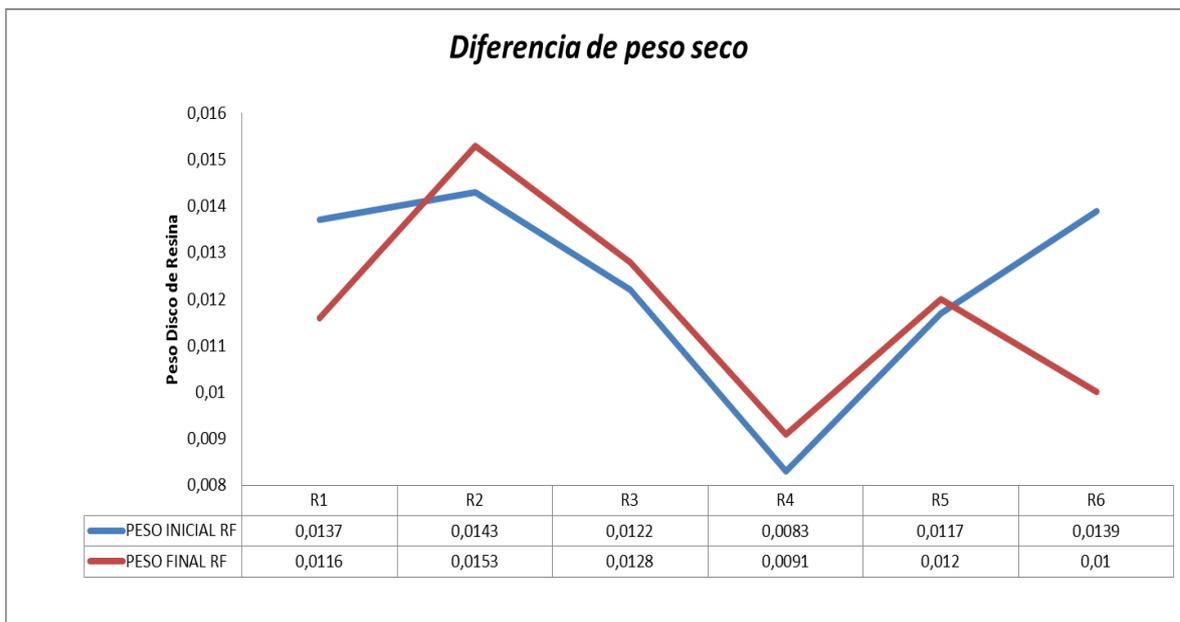
Elaborado por: García M., Villegas M.

En la primera cepa que corresponde a *Bjerkandera fumosa*, en correlación los pesos iniciales y finales, la diferencia es casi nula, lo que significa que el proceso de degradación fue mínimo, de las seis repeticiones todas presentan valores semejantes.

3.3.1.2. *Phellinus ferreus* (Hongo 2)

En el Anexo 10 se observa el análisis cualitativo en las cajas Petri durante los tres meses, y realizando un seguimiento fotográfico cada 15 días en donde el micelio cubrió al disco de resina obteniendo una respuesta no favorable ya que no presento cambio alguno y por algún factor obtuvimos datos mayores, como se puede observar en el gráfico 3-3.

Gráfico 3-3: Diferencia de peso seco de *Phellinus ferreus*



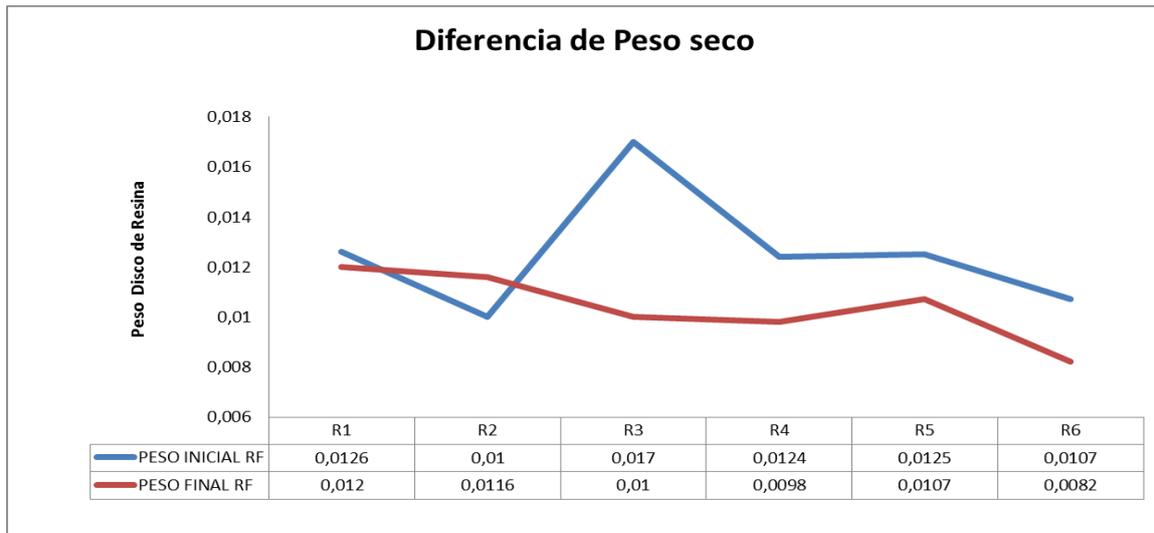
Elaborado por: García M., Villegas M.

Los valores del pesaje posterior a la experimentación son claramente mayor a los valores iniciales, lo que significa que la biodegradación de RF a través de esta cepa fue nula, sin presentar cambio de coloración y el micelio únicamente rodeo a la RF.

3.3.1.3. *Scutellinia spp* (Hongo 3)

En el Anexo 11 se puede observar el análisis cualitativo en la fase experimental, en donde el micelio cubrió totalmente al disco de resina, teniendo así una respuesta satisfactoria en el análisis de los datos como se observa en el Gráfico 4-3 que la línea roja del peso final del disco de la resina se encuentra distanciada del peso inicial.

Gráfico 4-3: Diferencia de peso seco de *Scutellinia spp*



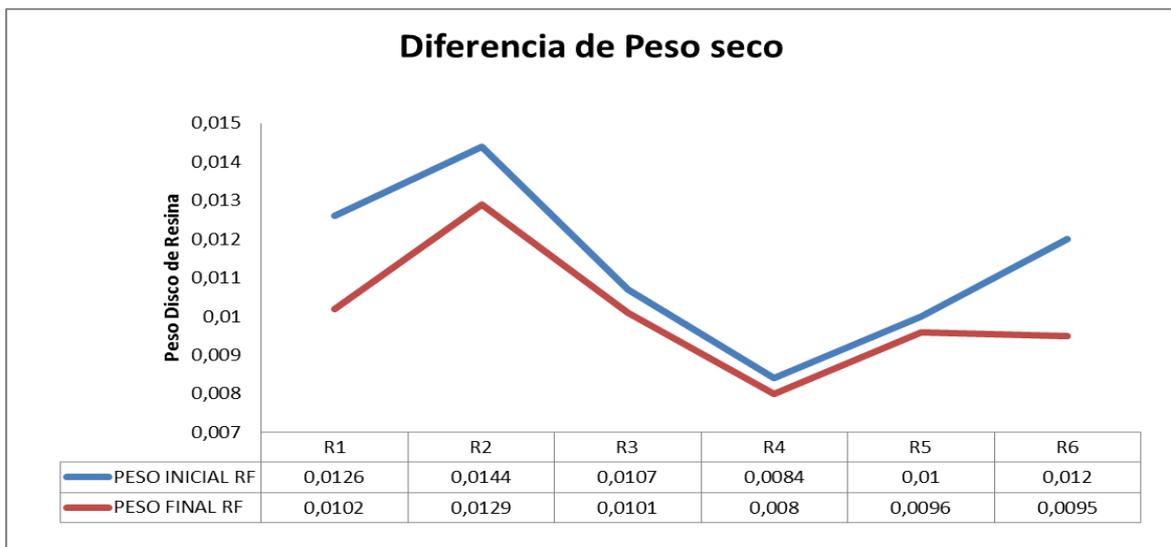
Elaborado por: García M., Villegas M.

En el Gráfico se observa claramente la existencia de una diferencia de peso, especialmente en la repetición 3, 4, 5 y 6, presentando una biodegradación evidente, como valor inicial de 0,0124 g y un valor final de 0,0098 g.

3.3.1.4. *Ganoderma spp* (Hongo 4)

Como se puede observar en el Anexo 12, el disco de RF no presentó cambio de coloración a pesar de que el micelio cubrió la placa, pero en datos reales se muestra que existió una mínima diferencia de peso que se muestra en el Gráfico 5-3.

Gráfico 5-3: Diferencia de peso seco de *Ganoderma spp*



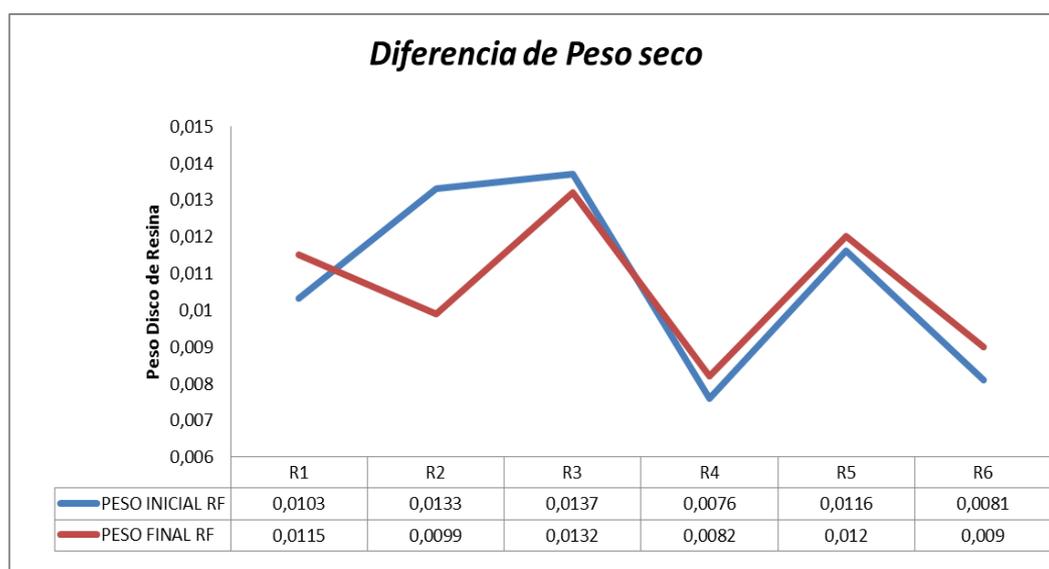
Elaborado por: García M., Villegas M.

En el Gráfico se puede visualizar una evidente disminución del peso en las repeticiones número 1, 2 y 6, presentando degradación evidente.

3.3.1.5. *Abortiporus spp* (Hongo 5)

En el Anexo 13 se muestra que el hongo cubrió la caja Petri pero el disco de resina no tiene un cambio significativo en el color, en cuanto al análisis de datos no existe mucha variación en la diferencia de pesos y el porcentaje de biodegradación es mínimo.

Gráfico 6-3: Diferencia de peso seco de *Abortiporus spp*



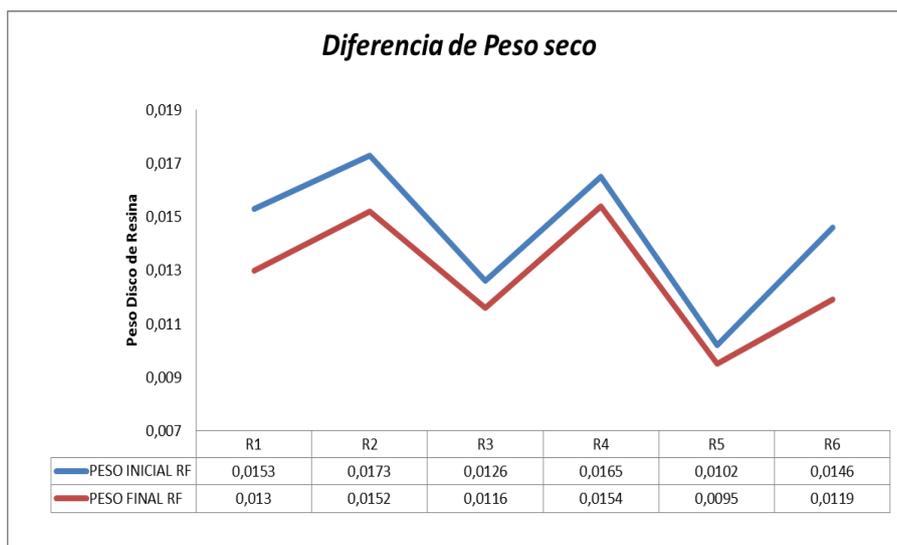
Elaborado por: García M., Villegas M.

En el Gráfico se observa una disminución de peso en la repetición número 2 y 6 preferiblemente, lo que significa que presenta degradación mínima.

3.3.1.6. *Xilaria polimorfa* (Hongo 6)

En el Anexo 14 se observa que el micelio cubre por completo al disco de resina, dándonos resultados favorables en los datos y teniendo una diferencia de en la gráfica 7-3.

Gráfico 7-3: Diferencia de peso seco de *Xilaria polimorfa*



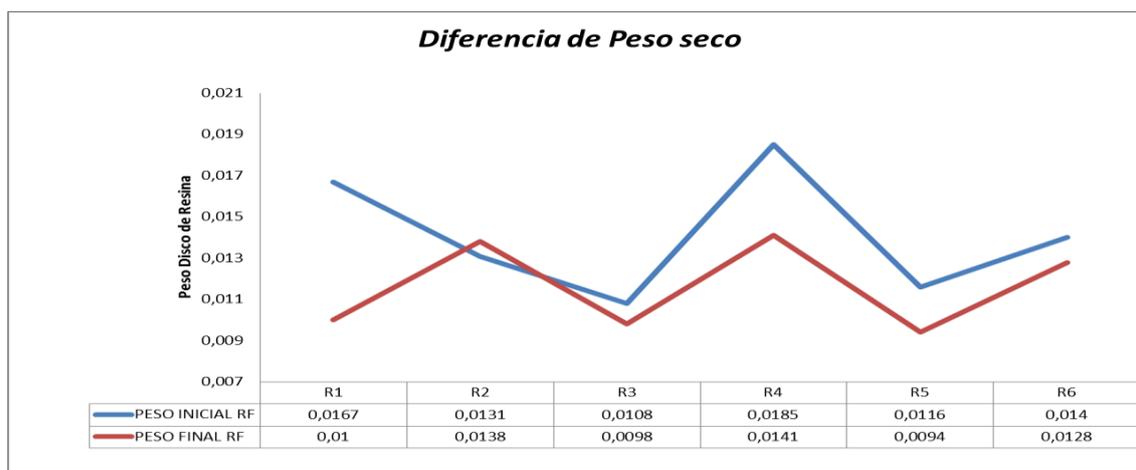
Elaborado por: García M., Villegas M.

El Gráfico muestra en todas la repeticiones una disminución de peso, lo que significa que presenta resultados favorables en cuanto a degradación de RF con este HL.

3.3.1.7. *Trametes suaveolens* (Hongo 7)

En el Anexo 15 se observa detalladamente como el disco de resina es invadido por el micelio siendo así biodegradado dándole unas manchas de coloración muy pequeñas de color café, por otro lado están los datos que como se muestra en la Gráfica 8-3 que se obtuvo una degradación favorable.

Gráfico 8-3: Diferencia de peso seco de *Trametes suaveolens*



Elaborado por: García M., Villegas M.

3.3.2. Diagrama de los organismos fúngicos

Para realizar el diagrama de los organismos fúngicos se calculó el promedio de los datos de las repeticiones de cada uno de los organismos biodegradadores como se muestra en la tabla 5-3, en la cual nos muestra la diferencia del promedio de cada uno de los hongos y su valor real; con estos datos se realizó una gráfica donde se puede observar claramente su diferencia, tanto en los datos como en la gráfica se observa una diferencia en dos organismos los cuales degradan de mejor manera el disco de resina.

Tabla 57-3: Promedio por Cepa de hongo lignolítico

Hongo	Especie	Promedio inicial por especie	Promedio final por especie	Absoluto
H1	<i>Bjerkandera fumosa</i>	0,00995	0,01015	0,0002
H2	<i>Phellinus ferreus</i>	0,01235	0,0118	0,00055
H3	<i>Scutellinia spp</i>	0,012533333	0,010383333	0,00215
H4	<i>Ganoderma spp</i>	0,01135	0,01005	0,0013
H5	<i>Abortiporus spp</i>	0,010766667	0,010633333	0,000133333
H6	<i>Xilaria polimorfa</i>	0,014416667	0,012766667	0,00165
H7	<i>Trametes suaveolens</i>	0,014116667	0,01165	0,002466667

Elaborado por: García M., Villegas M.

Analizando la tabla 5-3, de las siete cepas de hongos lignolíticos seleccionados, los que presentaron mejor rendimiento en la biodegradación de los discos de resina fenólica, tenemos al hongo número 7 que corresponde a la cepa de *Trametes suaveolens*, con un valor absoluto de 0,00246 siendo el grupo experimental con mejor desempeño y mayor degradación de los discos de resina fenólica.

Consecutivo de esta cepa, tenemos el hongo número 3, que corresponde a la cepa de *Scutellinia sp.* presenta un valor absoluto de 0,00215 considerando como el segundo más alto, y por último tenemos el hongo número 6 que corresponde a la cepa de *Xilaria polimorfa* con un valor absoluto de 0,00165, son las tres cepas de mejor desempeño en cuanto a la degradación de los discos de resina fenólica.

En el Gráfico 9-3 se puede observar los dos valores más representativos que pertenecen a los grupos experimentales siete (*Trametes suaveolens*), y tres (*Scutellinia sp*) y que están encerrados en un ovalo negro. Estos dos grupos son los que presentaron mayor biodegradación de los discos de resina fenólica.

Gráfico 9-3: Degradación de Resina



Elaborado por: García M., Villegas M.

3.3.3. Prueba de biodegradación de los discos de resina fenólica por los hongos fúngicos

La metodología de la experimentación se lo realizó en el laboratorio de Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental CESTTA en donde las causas de variabilidad fueron controladas para que no exista ninguna contaminación en la experimentación, se midió el peso en seco los discos de la resina previamente lavada con ácido y después del tratamiento con los hongos se realizó un lavado con ácido para que quede libre de micelio y se lo peso en seco para poder realizar la parte estadística.

En el Anexo 16 se expresan los valores del peso seco de los discos de RF, que comprenden a los siete grupo experimentales, cada uno con sus seis repeticiones y se puede observar que en el grupos número tres y en el siete son los que presentan valores más representativos, es decir son los que han disminuido de manera evidente.

3.3.4. Análisis estadístico

Se calculó primero la normalidad y las varianzas de los datos antes del tratamiento y después para ver si provienen de una distribución normal y si los datos son constantes dándonos los siguientes supuestos de hipótesis:

3.3.4.1. Análisis de Normalidad

Tabla 6-3: Análisis de Normalidad

NORMALIDAD	
PESO DE DISCO DERESINA INICIAL	
PLANTEAMIENTO DE HIPOTESIS	
Ho: Los datos del peso del disco de la resina al iniciar el experimento provienen de una distribución normal.	
H1: Los datos del peso del disco de la resina al iniciar el experimento no provienen de una distribución normal.	
NIVEL DE SIGNIFICANCIA	$\alpha = 0,05$
ESTADISTICO DE PRUEBA	
Se utiliza el prueba de Shapiro Wilks de normalidad	
REGION DE RECHAZO	
si el p valor es menor que 0,05 entonces se rechaza Ho	
si el p valor es mayor que 0,05 entonces no se rechaza Ho	
PESO DE DISCO DE RESINA FINAL	
PLANTEAMIENTO DE HIPOTESIS	
Ho: Los datos del peso de la resina al final del experimento provienen de una distribución normal	
H1: Los datos del peso de la resina al final del experimento no provienen de una distribución normal	
NIVEL DE SIGNIFICANCIA	$\alpha = 0,05$
ESTADISTICO DE PRUEBA	
Se utiliza el prueba de Shapiro Wilks de normalidad	
REGION DE RECHAZO	
si el p valor es menor que 0,05 entonces se rechaza Ho	
si el p valor es mayor que 0,05 entonces no se rechaza Ho	

Elaborado por: García M., Villegas M.

3.3.4.2. Discusión del resultado

Se realizó el test de normalidad de Shapiro Wilks antes y después del tratamiento dándonos los siguientes resultados:

- Antes del tratamiento un valor de 0,2484 mayor que 0,05, por lo tanto los datos provienen de una distribución normal, lo que significa que se debe realizar un test paramétrico.
- Después del tratamiento un valor de 0,02701 menor que 0,05, por lo tanto los datos no provienen de una distribución normal, por lo tanto se tiene que utilizar un test no paramétrico

Se aplicó una transformación lineal a los datos del peso de la resina al inicio y final del experimento para normalizarlos mediante una elevación a la potencia 2 que se muestran en el anexo 16.

3.3.4.3. Análisis de Varianzas

Tabla 78-3: Análisis de Varianzas

VARIANZAS CONSTANTES	
PESO DE DISCO DERESINA INICIAL	
PLANTEAMIENTO DE HIPOTESIS	
Ho:	las varianza de los datos son constantes
H1:	las varianza de los datos no son constantes
NIVEL DE SIGNIFICANCIA $\alpha = 0,05$	
ESTADISTICO DE PRUEBA	
Se utiliza el prueba de barlett para varianzas constantes	
REGION DE RECHAZO	
si el p valor es menor que 0,05 entonces se rechaza Ho	
si el p valor es mayor que 0,05 entonces no se rechaza Ho	
PESO DE DISCO DE RESINA FINAL	
PLANTEAMIENTO DE HIPOTESIS	
Ho:	las varianza de los datos son constantes
H1:	las varianza de los datos no son constantes
NIVEL DE SIGNIFICANCIA $\alpha = 0,05$	
ESTADISTICO DE PRUEBA	
Se utiliza el prueba de barlett para varianzas constantes	
REGION DE RECHAZO	
si el p valor es menor que 0,05 entonces se rechaza Ho	
si el p valor es mayor que 0,05 entonces no se rechaza Ho	

Elaborado por: García M., Villegas M.

3.3.4.4. *Discusión de resultados*

Se realizó la prueba de Barlett para varianzas constantes antes y después del tratamiento obteniendo los siguientes resultados:

- Antes del tratamiento un valor de 0,8829 mayor que 0,05, por lo tanto las varianzas de las muestras son constantes.
- Después del tratamiento un valor de = 0,4342 menor que 0,05, por lo tanto las varianzas de las muestras son constantes.

Una vez obtenido los datos de los supuestos de hipótesis, se realiza un test paramétrico.

3.3.5. *Análisis de la Hipótesis*

Tabla 89-3: Análisis de la hipótesis General

PLANTEAMIENTO DE HIPOTESIS	
H0:	No existe una influencia del tratamiento sobre el peso de los discos de la resina
H1:	Existe una influencia del tratamiento sobre el peso de los discos de la resina
NIVEL DE SIGNIFICANCIA	
	$\alpha = 0,05$
ESTADISTICO DE PRUEBA	
	Se utiliza una prueba anova de un factor
REGION DE RECHAZO	
	si el p valor es menor que 0,05 entonces se rechaza Ho
	si el p valor es mayor que 0,05 entonces no se rechaza Ho

Elaborado por: García M., Villegas M.

El p valor es 0,0198 es menor que 0,05 por lo tanto el tratamiento si influye sobre el peso de los discos de la resina.

Para comprobar los datos del estadístico de prueba se realizó el test T para muestras independientes donde se determinó que existió diferencia significativa en los datos de las medias como se muestra en la Tabla 9-3, el valor de p es 0,02017 es menor que el nivel de significancia 0,005, se rechaza la hipótesis nula y se dice que si existe influencia del tratamiento sobre el peso de los discos de la resina.

Tabla 910-3: Valores de Test T

Test T para muestras independientes		
MEDIA INICIAL	MEDIA FINAL	p-value
0,0001288462	0,0001588876	0,02017

Elaborado por: García M., Villegas M.

3.3.6. Análisis de Correlación (Probabilidades)

La correlación, se refiere al análisis de dos o más variables, con una relación lineal y además una proporcionalidad entre dos o más variables estadísticas, es decir que existe una relación directa de una variable sobre la otra variable. En este caso realizamos con dos variables la influencia de una de ellas sobre la otra.

Tabla 1011-3: Análisis de Correlación

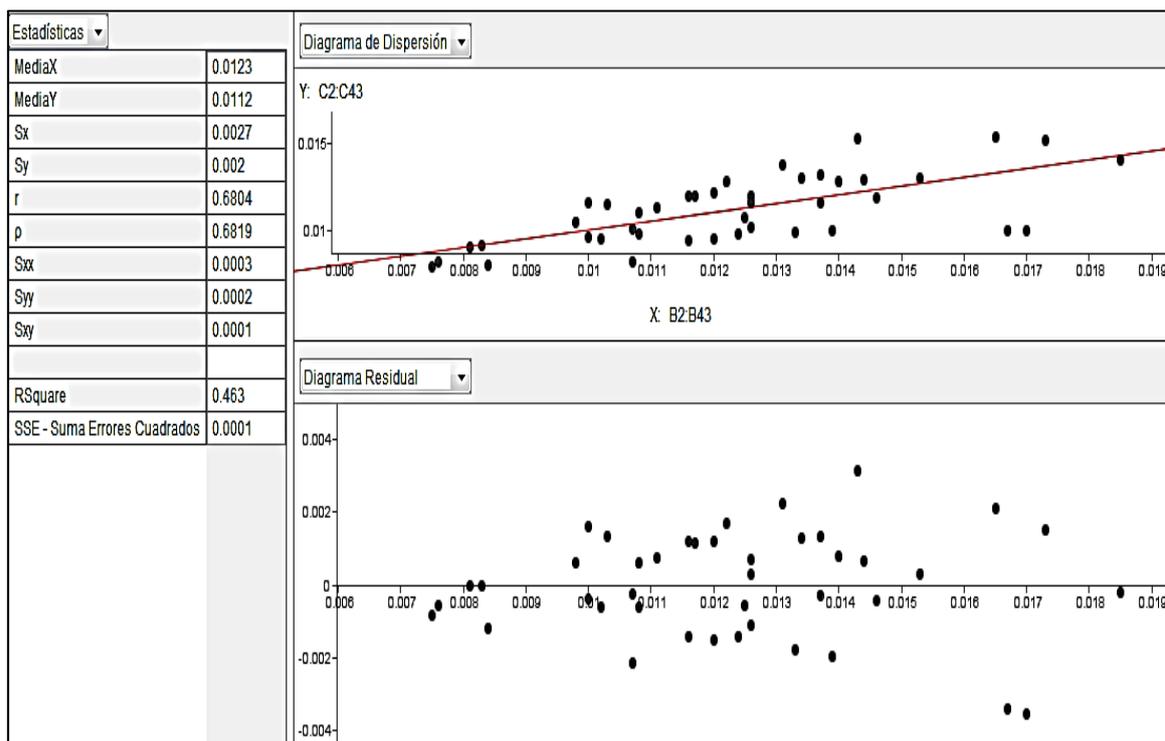
Correlación de Pearson	CUADRADO FINAL	CUADRADO INICIAL
CUADRADO FINAL	1	0,6832
CUADRADO INICIAL	0,6832	1

Elaborado por: García M., Villegas M.

Los valores calculados en ambos programas salieron similares, con valores de 0,6832 y de 0,6827 lo que determinó que las variables están asociadas y que posee una relación lineal como se muestra en la Gráfico 10-3 ya que se aproxima a uno.

Analizando los valores de coeficiente de r Pearson en el anexo 18, el valor calculado es de 0,68 se encuentra en el rango de 0,6 a 0,8 lo que quiere decir que existe una correlación alta. Representa que existe una alta influencia de la biodegradación de los hongos sobre el disco de la RF.

Gráfico 102-3: Relación lineal de correlación



Elaborado por: García M., Villegas M.

3.4. Porcentaje de biodegradación

Se calculó el porcentaje de biodegradabilidad determinando que los organismos que presentan mayor biodegradabilidad (Eficiencia) de la resina fenólica son *Trametes suaveolens* y *Scutellinia sp* teniendo un porcentaje de 17,47% y de 17,15% respectivamente; los hongos *Ganoderma spp* y *Xilaria polimorfa* tienen un potencial de degradación medio con 11,45% aproximadamente en ambos organismos, solo puede observar en la tabla 11-3.

Tabla 112-3: Porcentaje de Biodegradación

Hongo	Especie	Promedio Inicial por especie	Promedio Final por especie	Absoluto	% de biodegradacion
H1	<i>Bjerkandera fumosa</i>	0,00995	0,01015	0,00020	-2,01005
H2	<i>Phellinus ferreus</i>	0,01235	0,01180	0,00055	4,45344
H3	<i>Scutellinia sp</i>	0,01253	0,01038	0,00215	17,15426
H4	<i>Ganoderma sp</i>	0,01135	0,01005	0,00130	11,45374
H5	<i>Abortiporus sp</i>	0,01077	0,01063	0,00013	1,23839
H6	<i>Xilaria polimorfa</i>	0,01442	0,01277	0,00165	11,44509
H7	<i>Trametes suaveolens</i>	0,01412	0,01165	0,00247	17,47344

Elaborado por: García M., Villegas M.

3.4.1. *Discusión de Resultados*

Según PONCE, Andrade. G existe una evidencia de que las cepas *Bjerkandera adusta*, *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Coriolopsis gallica*, *Sporotricum pulverulentum*, *Trametes hispida* y *Trametes troggi*, sin embargo en esta investigación se obtuvo otro tipo de especies de *Bjerkandera* y *Trametes* siendo este último una de las especies con mayor potencial de biodegradación.

Analizando los resultados obtenidos a lo largo de la experimentación, tenemos que las cepas de HL que presentaron un mejor desempeño, en cuanto a la degradación de los discos de RF, la cepa de *Scutellinia sp* y la cepa de *Trametes suaveolens* presentan un aproximado de 17% de biodegradación. *Xilaria polimorfa* con un 11.45% y *Ganoderma spp* con 11.44% y

De acuerdo a los análisis de correlación, el porcentaje de degradación está relacionado con el tiempo de permanencia del hongo con la resina, lo que significa que en un tiempo más prolongado, la biodegradación de los discos de resina podría ser más efectiva, con un índice de biodegradación mayor.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- La metodología desarrollada en la presente investigación es reproducible, fácil de realizar y efectiva para la obtención del micelio.
- Se identificó los siguientes organismos fúngicos *Bjerkandera fumosa*, *Phellinus ferreus*, *Scutellinia spp*, *Ganoderma spp*, *Abortiporus spp*, *Xilaria polimorfa* y *Trametes suaveolens*, mediante la técnica de la cinta adhesiva. Estos hongos llamados “hongos de pudrición blanca y café” producen enzimas lignolíticas específicas que son altamente oxidativas capaces de degradar los componentes de la madera como la lignina un componente con características similares de la resina fenólica.
- Existe un 17% de biodegradación de las cepas lignolíticas con el disco de resina fenólica en base al porcentaje de correlación, lo que quiere decir que el porcentaje de degradación aumenta de manera lineal en relación al tiempo.
- Las cepas fúngicas que presentaron mayor porcentaje de biodegradación son *Trametes suaveolens* con un 17,47% y *Scutellinia spp* con un 17,15%. Las cepas fúngicas con potencial de biodegradación media fueron *Xilaria polimorfa* con un 11,45% y *Ganoderma spp* con 11,44% de eficiencia.
- Los medios de cultivo investigados para el desarrollo de los hongos lignolíticos fueron Agar agar, Sabourand y PDA, concluyendo que el medio de cultivo óptimo para obtener los cultivos puros es PDA.
- Con la prueba paramétrica ANOVA de un factor, se obtuvo un *p* valor de 0,0198 lo que indica que el tratamiento de los hongos sobre el disco de la resina si influye, es decir existe degradación por parte de los hongos lignolíticos realizados a los disco de resina fenólica al obtener un valor menor al nivel de significancia de 0,005.
- Se determinó el análisis de correlación R de Pearson en donde nos dio un valor de 0,68 lo que indica que existe una correlación positiva y alta, sus variables están asociadas y poseen una regresión lineal por lo que tiene una tendencia a la unidad y se encuentran entre 0,6 y 0,8.

4.2. Recomendaciones

- Continuar con la instigación relacionada a determinar el o los procesos biotecnológicos que permitan controlar o disminuir la resina fenólica que comúnmente se le conoce como oasis y se comercializa mucho en el mercado florícola.
- Es importante la toma de muestras de los hongos por lo que recomienda llevar los materiales necesarios para que en el momento de su traslado las características físicas y químicas no sean alteradas por ningún factor.
- La desinfección del carpóforos antes de su utilización es fundamental ya que se obtiene mejores resultados.
- En la toma de muestras, la calificación de un experto tanto en conocimiento, experiencia e intuición garantiza mayor satisfacción de resultados.
- Se debe tomar en cuenta la caracterización macroscópica y microscópica en cuanto a la identificación de las cepas de los organismos fúngicos aumentando el porcentaje de confiabilidad.
- Se recomienda la aplicación de las cepas de los HL seleccionados a la biodegradación de materiales similares a la RF, a través de técnicas amigables con el ambiente como puede ser biopila o landfaming como una aplicación in situ de los microorganismos nocivos junto con los hongos seleccionados, en un mix maximizando su potencial para biodegradar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHUMADAJ., Mauro L.;&**GOMEZ F.,** Raúl A. Evaluación de la disminución de concentración de fenol en agua sintética por medio de dos consorcios bacterianos nativos, aerobio y anaerobio facultativo, a nivel de laboratorio, para su aplicación futura en la biorremediación de efluentes textiles. (Tesis) (Ing. Quim.) Escuela politécnica del ejército, Departamento de Ciencias de la vida, Ingeniería en biotecnología, Sangolquí-Ecuador, 2010, pp. 104.

ALONSO,R., María V. Formulación y curado de resinas fenol-formaldehido tipo resol con sustitución parcial del fenol por lignosulfonatos modificados. (Tesis) (Dr. Ciencias Quím.). Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Ingeniería Química, Madrid, 2002, pp. 8-20

ALVAREZ, P., et al. Actividades Enzimáticas de Hongos para el Pre-tratamiento de Residuos Lignocelulósicos. (Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A. C.). Vol. 18., No. 3. ISSN 0188-4786. México, 2014, pp. 12-29.

http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2014_3/Revista_2014_V18_N3.pdf
2015-02-02

ARIASC., Edna L.;&**PIÑEROSE.,** Paola A. Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz verde. (Tesis) (Microbiol. Industrial). Pontificia universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Carrera de microbiología industrial, Bogotá-Colombia, 2008, pp. 34-38.

BIORREMEDICION. Rosales, Luis. 2012

<http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/12726/biorremediaci%C3%B3n.pdf?sequence=1>
17-03-2015

BIORREMEDICACION DE SUELOS VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS TRATAMIENTOS. Biorremediación Microbiológica. 2012.

<http://microbiologia3bn.blogspot.com/2012/05/ventajas-y-desventajas.html>
2015-03-17

BUSWELL, Alan.;et al. Metabolism of phenol and cresols by Bacillus. *Journal of bacteriology.* No 30, 1975, USA, pp. 77-83.

CARVAJALP.,María B. Degradación de compuestos fenólicos por el hongo causante de pudrición blanca *Trametes versicolor*. (Tesis), (Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas). Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Buenos Aires- Argentina. 2014, pp. 1- 9.

CAZORLA M., Evelyn M. Obtención del consorcio bacteriano nativo del sedimento de la Laguna de San Antonio del Cantón Riobamba. (Tesis) (Ing. Biotec. Amb.) Escuela superior politécnica de Chimborazo, Facultad de ciencias, Escuela de Ciencias Químicas, Riobamba-Ecuador, 2014, pp. 28 – 30.

CHAPARRO S., Deisy F.;&**ROSAS W,** Diana. F. Aislamiento de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera en la reserva natural la montaña del pacaso, Quimbaya-Quindío. (Tesis) (Microbiol. Ind.). Pontificia universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Carrera de microbiología industrial, Bogotá-Colombia, 2006, pp. 06-18.

CHUQUINE., Cristian A. Estudio de la viabilidad de crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* aplicado en inoculo líquido para uso en biorremediación. (Tesis) (Ing. Biotec. Amb.) Escuela superior politécnica de Chimborazo, Facultad de ciencias, Escuela de Ciencias Químicas, Riobamba-Ecuador, 2012, pp. 23 – 31.

CORTES, Alejandro. Una mirada a los organismos fúngicos. Fabricas versátiles de diversos metabolitos secundarios de interés biotecnológico. *Química viva*. No 2. Vol. 12. 20-06-2013, México.

<http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v12n2/cortes.html>

2015-03-14

DAVILA V., Gustavo R. Enzimas lignolíticas fúngicas para fines ambientales. (Tesis) (Ing. Bioquím.). Universidad autónoma de México, Facultad de ciencias, Departamento de bioquímica, Distrito Federal-México, 2006, pp. 31-39

DELEYZ., Ángel R. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo del campamento Sacha 161 utilizando el hongo *Pleurotus ostreatus*. (Tesis) (Ing. Biotecn. Amb.). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Ciencias Químicas, Riobamba-Ecuador, 2010, pp. 20 – 25.

ESCORZAN., Juan G. Estudio de inóculos bacterianos como biorremediadores de suelos contaminados con petróleo. (Tesis) (Ing. Biotecn, Amb.). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Ciencias Químicas, Riobamba-Ecuador, 2007, pp. 35 – 42.

ESPINOZA Z., Daniela A. Elaboración de espumas florales fenólicas que incorporan nutrientes, sustancias inhibidoras de etileno, preservantes y bactericidas para la conservación prolongada de plantas obtenidas in vitro en el laboratorio de cultivo de tejidos. (Tesis) (Ing. en Biotecnología). Escuela Politécnica del Ejercito, Departamento de Ciencias de la Vida, Ingeniería en Biotecnología, Sangolquí-Ecuador, 2010, pp. 4-16

ESTRADA, María. Procedimientos para el registro, aislamiento, mantenimiento, preservación y sistematización de una colección de hongos entomopatógenos. (Manejo Integrado de plagas y Agroecología). Vol. 46., 2003, Costa Rica, p. 99.

FERNANDEZ., Salvador F. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos pesados y caracterización de comunidades microbianas implicadas. (Tesis) (Dr. Microbiología). Universidad de Barcelona, España, 2012, pp. 43-56.

GARCIA M., JOSE A. Biodegradación de fenol en un reactor discontinuo de alimentación secuenciada. (Tesis) (Lic. en Quím.). Universidad autónoma del estado de Hidalgo, Instituto de ciencias básicas e ingenierías, Centro de investigaciones químicas, Pachuca de Soto-México, 2007, pp. 3-7.

GARCÍA, Nelson. Biotecnología Ambiental. 2005
<http://www.portaley.com/biotecnologia/bio3.shtml>
2015-03-10

GARDZIELLA, A.; et al. Phenolic resins. 2. ed. Berlin-Germany. Springer. 2000, pp. 3-12,24

JAUREGUI, R. Evidencia de la biodegradación de resinas fenólicas con hongos ligninolíticos por microscopia electrónica de barrido. *SciELO*. Febrero 2012, México, pp. 160-169.

JARAMILLO, G. Adaptación de bacterias a diferentes concentraciones de fenol en el laboratorio: aspectos esenciales para un proceso de biodegradación. *Ciencias Biomédicas*. Vol. 9. 20-12-2011, pp. 60-68.

LAURA, J., & CASTELLANOS, P. Hongos filamentosos con actividades ligninolíticas aislados de *Calamagrostis nitidula* Pilg. *Ciencias Biológicas*. Vol. 16. Agosto 2009, Perú, pp. 125 – 128.

LEMON, P., et al. Resina fenólica. Madrid-España. Oficinas españolas de patentes y marcas. 1994, pp. 3-11.

LI, J.-K., & HUMPHREY, A. Kinetic and fluorometric behavior of a phenol. *Elsierve*. No. 4. 1989, USA, pp. 177-182

MANFREDI, Lilian B. Materiales compuestos a partir de resoles modificados y su degradación térmica. (Tesis) (Dr. En Ciencias Químicas). Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina, 2000, pp. 1-9.

MARTINEZ, D., et al. Evaluación del curado de resinas fenólicas tipo novolaca modificadas con lignina por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier. *Metalurgia y materiales*. Vol. 39. 29-07-2009. Venezuela, pp. 1-19.

MARTINEZ, J.; et al. Modificación de resinas fenólicas con lignina procedente del pulpeo alcalino del bagazo de caña. *Scientia et technica año XIII*. No 36. Septiembre 2007, Bolivia, pp. 683-688.

MATERIAS PRIMAS. Panelsandwich. 2014

<http://www.panelsandwich.org/PDF-1/LIBRO%20PANELES/02-Materias%20primas.pdf>
201503-12

MORALES, María L., Los Hongos. *Innovación y experiencia*. Vol. 17. 17-04-2009, España. pp. 1-8.

NESTARES G., Manuel.; MENDOZAR., Janeth J.; & QUISPE S., Pamela A. Influencia de la concentración del ácido cítrico en la difusión molecular a través del medio poroso espuma floral. (Tesis) (Ing. Quím.). Universidad Nacional del Centro del Perú, Facultad de Ingeniería Química, Escuela de Ingeniería Química, Huancayo-Perú, 2012, pp. 16 – 20.

OROZCOR., Belén del Saz. Formulación y caracterización de espumas fenólicas tipo resol reforzadas con lignosulfonato cálcico y con partículas de "pinus radiata". (Tesis) (Ing. Quím.).

Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Ingeniería Química, Madrid-España, 2013, pp. 12-28.

OROSCO V., Verónica P.;&**SORIA G.**, Mercedes M. Biorremediación de Vegetación Contaminada con Petróleo por derrames en el campamento Guarumo – Petroproducción. (Tesis) (Ing. Biotecn. Amb.). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Ciencias Químicas, Riobamba-Ecuador, 2008, pp. 29 – 40.

PEÑA R., Cristina. Caracterización y estudio de la reactividad de extractos tánicos condensados e hidrolizables. Análisis de las propiedades físico-químicas y mecánicas de resinas fenólicas de tipo noalaca modificadas con dichos extractos. (Tesis) (Dra. Csc. Quím.) Escuela universitaria politécnica, Facultad de ciencias, Departamento de ingeniería química y medio ambiente, Donostia-España, 2007, pp. 8-30.

PEÑA, D.Análisis de datos multivariantes, Madrid. McGRAW-HILL INTERAMERICANA DE ESPAÑA. 2002, pp. 67-99.

PRPICH, G.,&DAUGULIS, J. Enhanced biodegradation of phenol by a microbial consortium in a solid–liquid two phase partitioning bioreactor. En Enhanced biodegradation of phenol by a microbial consortium in a solid–liquid two phase partitioning bioreactor. *Elsevier*. No. 13. Julio 2005. Canadá. pp. 329-339.

PONCE, Andrade., et al.Identificación de los hongos lignolíticos con capacidad para biodegradar resina fenólica. *Scielo*, No. 21. 2012, Colombia, pp. 160-166.

QUINTERO, J. Degradación de plaguicidas mediante hongos de la pudrición blanca de la madera. *Bioprocesos*. Vol. 64. 22-02-2011. Colombia, pp. 5867-5877.

RODRIGUEZ, María., et al. Factibilidad técnico- económica de una planta de producción de resinas fenólicas (tipo resol). *Ingeniería UC*. Vol. 16, 03-12-2009, Venezuela, pp. 7-13.

RODRIGUEZ., Rosario D. Caracterización y papel biorremediador de la lacasa producida por el hongo ligninolítico *Coriopsis rígida* en alpeorajo. (Tesis) (Dr. Csc. Biolg.) Universidad de Granada, Facultad de Ciencias Biológicas, Granada-Venezuela, 2010, pp. 16-18.

SERRANOA., Paola C. Obtención del consorcio bacteriano nativo del sedimento de la Laguna de Colta del Cantón Colta. (Tesis) (Ing. Biotec. Amb.) Escuela superior politécnica de Chimborazo, Facultad de ciencias, Escuela de Ciencias Químicas, Riobamba-Ecuador, 2014, pp. 5-6, 35-37.

TEST ESTADISTICOS: TEST DE CORRELACION DE PEARSON. Blog Estadístico. 2013
<http://elestadistico.blogspot.com/2013/09/test-estadisticos-test-de-correlacion.html>

VALEA, A., et al. Influencia de la formulación sobre la conducta mecánica de una resina fenólica. *Anales de Mecánica de la Fractura*. 2006, España, pp. 329 – 332.
<http://www.gef.es/Congresos/23/pdf/3-14.pdf>
2015-03-12

VERA, D. Actividades Económicas de la Población. (Fascículo Provincial Chimborazo). Censo 2010. pp. 3-4.

ANEXOS

Anexo A: Toma de muestras de los Hongos Lignolíticos (Puyo)



Anexo B: Hongos Lignolíticos



Anexo C: Ficha de observación.



FORMULARIO PARA LA IDENTIFICACION DE LA MUESTRA



MUESTRA N°:

FECHA:

HORA:

UBICACIÓN:

SUSTRATO:

TIPO DE ENVASE:

TRANSPORTE

CONGELADA:

REFRIGERADA:

T.AMBIENTE:

CARACTERISTICAS SENSORIALES

ASPECTO:

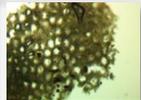
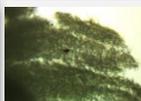
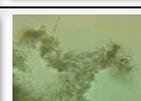
COLOR:

OLOR:

CONSISTENCIA:

OBSERVACIONES: _____

Anexo D: Análisis Cualitativo de los Organismos Fúngicos.

Organismos Fungicos											
Codificacio MedioMielio/ MEspora - Lugar Numeracion	Organismos	Caracteristicas				Observaciones		Imagen			Lugar de muestreo
		Color	Textura	Forma	Sustrato	Microscopi o	Adicionales				
EP - 01	Hongo Lignolitico	Crema-Naranja	Dura	Ostra	Madera		Esporas In situ - Papel celofan				El Porvenir-Puyo
EP - 12	Hongo Lignolitico	Negro	Duro	Alargada	Madera		-				El Porvenir-Puyo
EP - 15	Hongo Lignolitico	Crema	Dosil	Ostra	Madera		-				El Porvenir-Puyo
RP - 21	Hongo Lignolitico	Blanco - crema	Duro	Ostra	Madera	Poros Ovalados	-				El Porvenir-Puyo
EP - 08	Hongo Lignolitico	Blanco	Pegado al Arbol - Esponjoso	-	Madera	Presenta Dientes	Esporas In situ - Papel celofan				El Porvenir-Puyo
EP - 10	Hongo Lignolitico	Blanco-tomate	Dosil		Madera						Comunidad Pomona-Puyo Selva
E - II	Hongo Lignolitico	Tomate	Duro		Madera	Hifas alargadas	Esporas In situ - Papel celofan				Comunidad Pomona-Puyo Selva

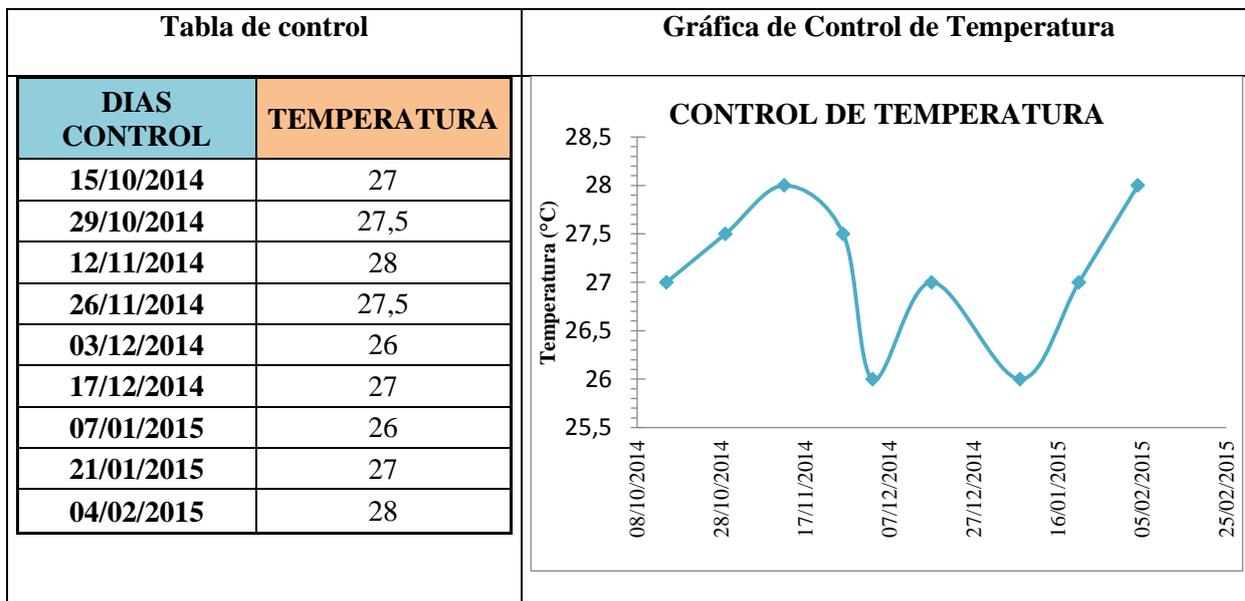
Anexo E. Hoja electrónica para la selección de los discos de resina

FILTRO DE LOS DISCOS DE RESINA							
NÚMEROS	RF 1	RF2	RF3	RF4	RF5	RF6	RF7
1	15	8	8	20	2	19	8
5	16	14	19	7	16	13	9
6	8	4	7	18	9	7	13
3	10	11	11	6	13	10	1
4	13	3	20	13	19	1	3
2	17	15	7	3	2	5	17

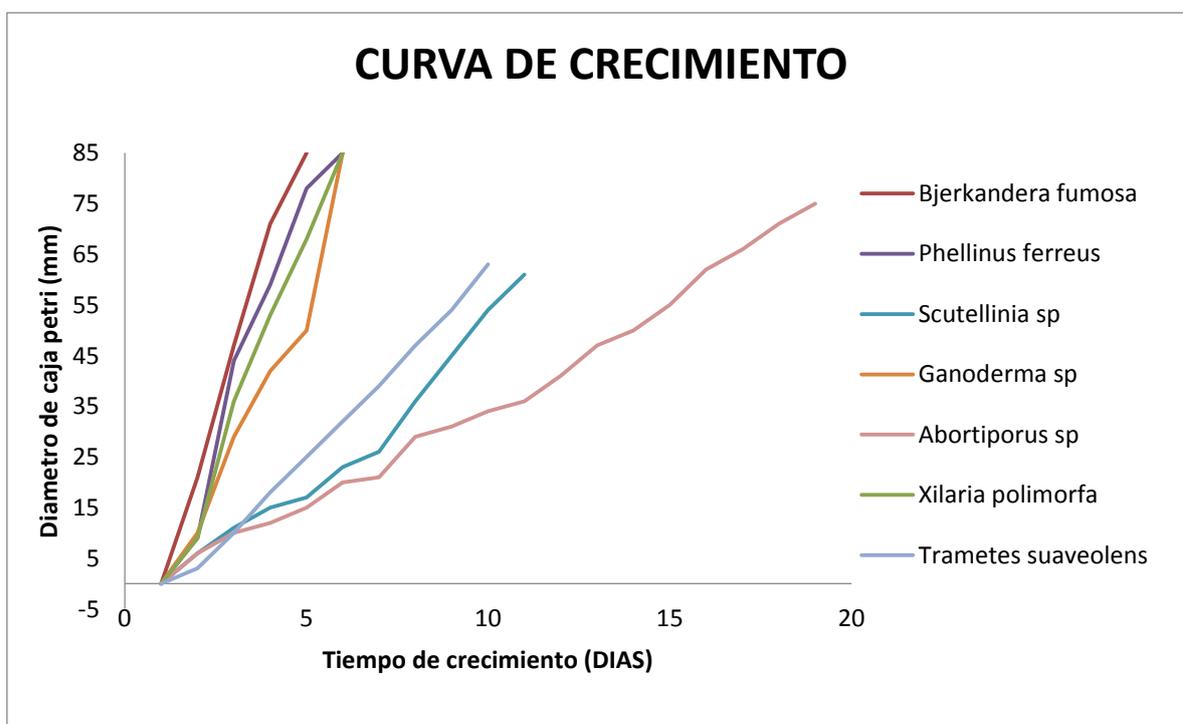
Anexo F:Secado del disco de resina



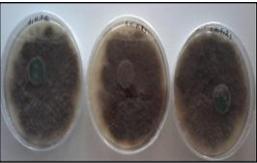
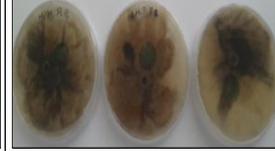
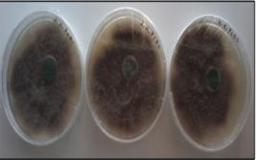
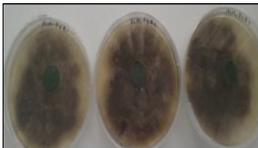
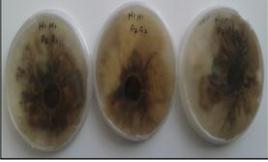
Anexo G: Control de Temperatura



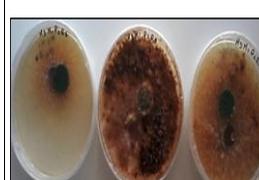
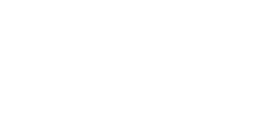
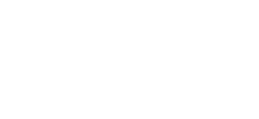
Anexo H: Curva de crecimiento de las siete cepas de HL



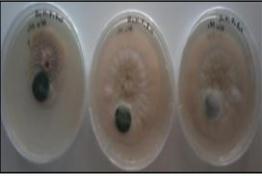
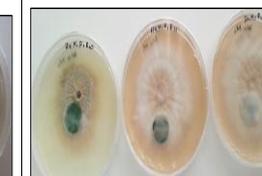
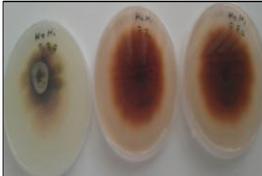
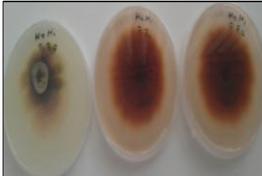
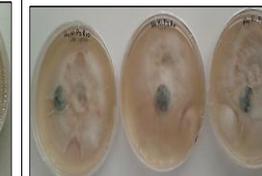
Anexo I: Registro fotográfico de la Experimentación con *Bjerkandera fumosa*

CODIGO	12/11/2014	28/11/2014	15/12/2014	05/01/2015	20/01/2015	04/02/2015	23/02/2015
	SIEMBRA EXPERIMENTAL	OBSERVACIÓN 1	OBSERVACIÓN 2	OBSERVACIÓN 3	OBSERVACIÓN 4	OBSERVACIÓN 5	OBSERVACIÓN 6
H1							
H1							
H1							
H1							
H1							
H1							

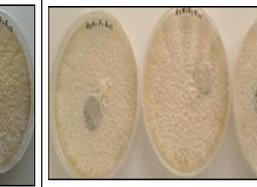
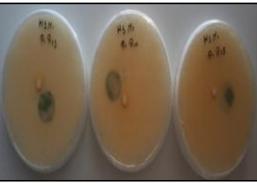
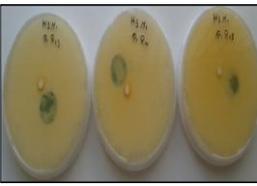
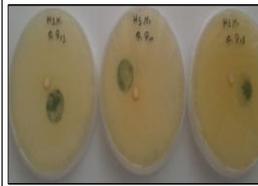
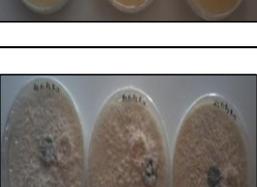
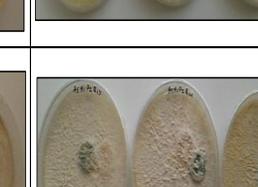
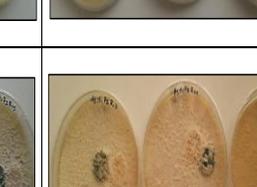
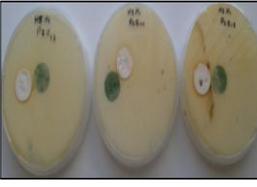
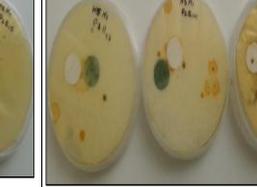
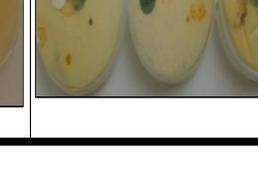
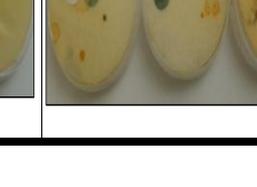
Anexo J: Registro fotográfico de la Experimentación con *Phellinus ferreus*

CODIGO	12/11/2014	28/11/2014	15/12/2014	05/01/2015	20/01/2015	04/02/2015	23/02/2015
	SIEMBRA EXPERIMENTAL	OBSERVACIÓN 1	OBSERVACIÓN 2	OBSERVACIÓN 3	OBSERVACIÓN 4	OBSERVACIÓN 5	OBSERVACIÓN 6
H2							
H2							
H2							
H2							
H2							
H2							

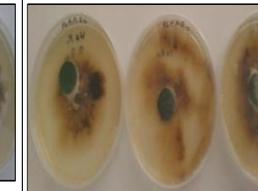
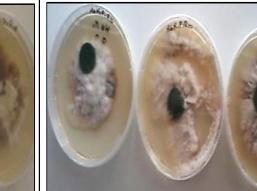
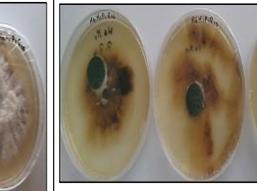
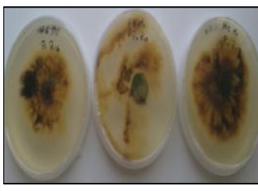
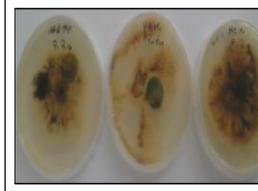
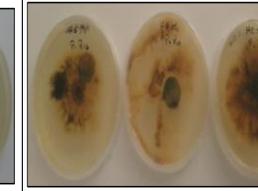
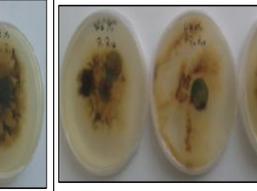
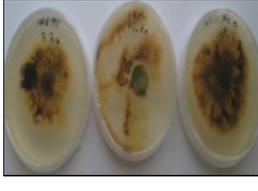
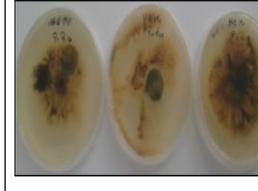
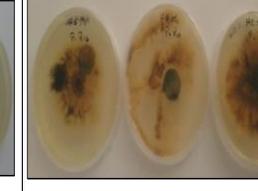
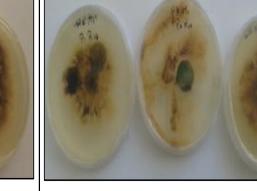
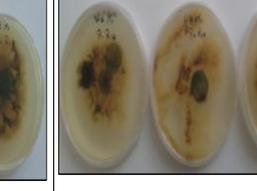
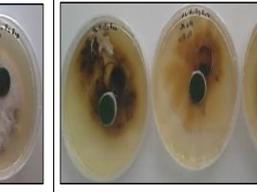
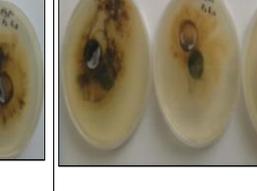
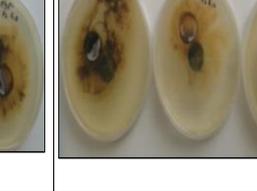
Anexo K: Registro fotográfico de la Experimentación con *Scutellinia* spp

CODIGO	12/11/2014	28/11/2014	15/12/2014	05/01/2015	20/01/2015	04/02/2015	23/02/2015
	SIEMBRA EXPERIMENTAL	OBSERVACIÓN 1	OBSERVACIÓN 2	OBSERVACIÓN 3	OBSERVACIÓN 4	OBSERVACIÓN 5	OBSERVACIÓN 6
H3							
H3							
H3							
H3							
H3							
H3							

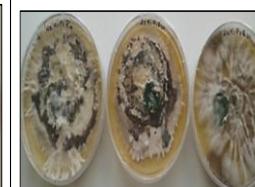
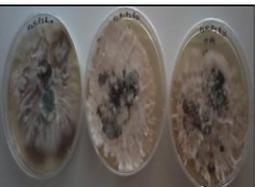
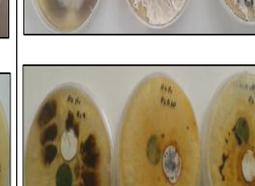
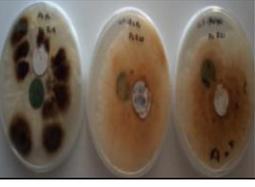
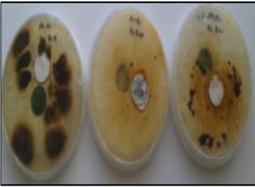
Anexo L: Registro fotográfico de la Experimentación con *Ganoderma spp*

CODIGO	12/11/2014	28/11/2014	15/12/2014	05/01/2015	20/01/2015	04/02/2015	23/02/2015
	SIEMBRA EXPERIMENTAL	OBSERVACIÓN 1	OBSERVACIÓN 2	OBSERVACIÓN 3	OBSERVACIÓN 4	OBSERVACIÓN 5	OBSERVACIÓN 6
H4							
H4							
H4							
H4							
H4							
H4							

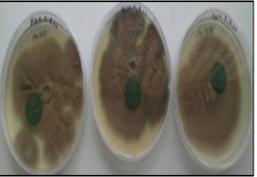
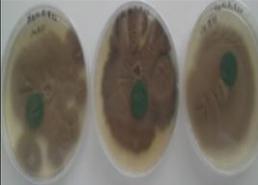
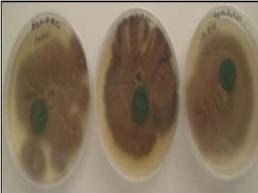
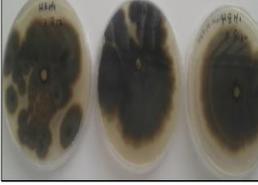
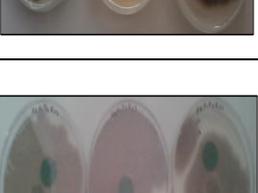
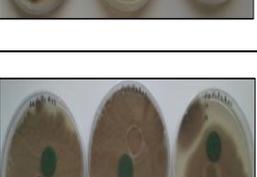
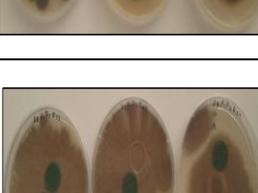
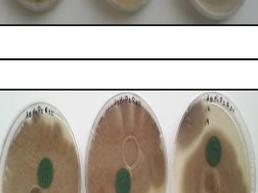
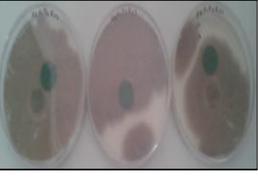
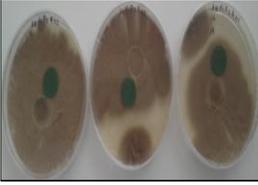
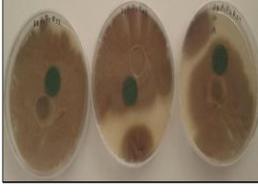
Anexo M: Registro fotográfico de la Experimentación con *Abortiporus* spp

12/11/2014		28/11/2014	15/12/2014	05/01/2015	20/01/2015	04/02/2015	23/02/2015
SIEMBRA EXPERIMENTAL		OBSERVACIÓN 1	OBSERVACIÓN 2	OBSERVACIÓN 3	OBSERVACIÓN 4	OBSERVACIÓN 5	OBSERVACIÓN 6
H5							
H5							
H5							
H5							
H5							
H5							

Anexo N: Registro fotográfico de la Experimentación con *Xilaria polymorfa*

CODIGO	12/11/2014	28/11/2014	15/12/2014	05/01/2015	20/01/2015	04/02/2015	23/02/2015
	SIEMBRA EXPERIMENTAL	OBSERVACIÓN 1	OBSERVACIÓN 2	OBSERVACIÓN 3	OBSERVACIÓN 4	OBSERVACIÓN 5	OBSERVACIÓN 6
H6							
H6							
H6							
H6							
H6							
H6							

Anexo O: Registro fotográfico de la Experimentación con *Trametes suaveolens*

12/11/2014		28/11/2014	15/12/2014	05/01/2015	20/01/2015	04/02/2015	23/02/2015
CODIGO	SIEMBRA	OBSERVACIÓN 1	OBSERVACIÓN 2	OBSERVACIÓN 3	OBSERVACIÓN 4	OBSERVACIÓN 5	OBSERVACIÓN 6
	EXPERIMENTAL						
H7							
H7							
H7							
H7							
H7							

Anexo P: Datos Iniciales y la Transformación Lineal

Código	Especie	Datos Iniciales		Transformación Lineal	
		Peso Inicio RF	Peso final RF	Cuadrado Inicial	Cuadrado Final
UNO	<i>Bjerkandera fumosa</i>	0,01200	0,01220	0,00014	0,00015
		0,00980	0,01050	0,00010	0,00011
		0,01110	0,01130	0,00012	0,00013
		0,00750	0,00790	0,00006	0,00006
		0,01340	0,01300	0,00018	0,00017
		0,01080	0,01100	0,00012	0,00012
DOS	<i>Phellinus ferreus</i>	0,01370	0,01160	0,00019	0,00013
		0,01430	0,01530	0,00020	0,00023
		0,01220	0,01280	0,00015	0,00016
		0,00830	0,00910	0,00007	0,00008
		0,01170	0,01200	0,00014	0,00014
		0,01390	0,01000	0,00019	0,00010
TRES	<i>Scutellinia sp</i>	0,01260	0,01200	0,00016	0,00014
		0,01000	0,01160	0,00010	0,00013
		0,01700	0,01000	0,00029	0,00010
		0,01240	0,00980	0,00015	0,00010
		0,01250	0,01070	0,00016	0,00011
		0,01070	0,00820	0,00011	0,00007
CUATRO	<i>Ganoderma sp</i>	0,01260	0,01020	0,00016	0,00010
		0,01440	0,01290	0,00021	0,00017
		0,01070	0,01010	0,00011	0,00010
		0,00840	0,00800	0,00007	0,00006
		0,01000	0,00960	0,00010	0,00009
		0,01200	0,00950	0,00014	0,00009
CINCO	<i>Abortiporus sp</i>	0,01030	0,01150	0,00011	0,00013
		0,01330	0,00990	0,00018	0,00010
		0,01370	0,01320	0,00019	0,00017
		0,00760	0,00820	0,00006	0,00007
		0,01160	0,01200	0,00013	0,00014
		0,00810	0,00900	0,00007	0,00008
SEIS	<i>Xilaria polimorfa</i>	0,01530	0,01300	0,00023	0,00017
		0,01730	0,01520	0,00030	0,00023
		0,01260	0,01160	0,00016	0,00013
		0,01650	0,01540	0,00027	0,00024
		0,01020	0,00950	0,00010	0,00009
		0,01460	0,01190	0,00021	0,00014
SIETE	<i>Trametes suaveolens</i>	0,01670	0,01000	0,00028	0,00010
		0,01310	0,01380	0,00017	0,00019
		0,01080	0,00980	0,00012	0,00010
		0,01850	0,01410	0,00034	0,00020
		0,01160	0,00940	0,00013	0,00009
		0,01400	0,01280	0,00020	0,00016

Anexo Q: Test t para muestras independientes

Test T para muestras independientes		
MEDIA INICIAL	MEDIA FINAL	p-value
0.0001288462	0.0001588876	0.02017

Anexo R: Valores del Coeficiente de r Pearson

$r = 1$	correlación perfecta.
$0'8 < r < 1$	correlación muy alta
$0'6 < r < 0'8$	correlación alta
$0'4 < r < 0'6$	correlación moderada
$0'2 < r < 0'4$	correlación baja
$0 < r < 0'2$	correlación muy baja
$r = 0$	correlación nula

Anexo S: Certificado de Calibración de la Balanza Analítica.



METROLAB S.A.
Laboratorio de Metrología

5102-10-81
[Handwritten signature]

CC # 0014317-15

Cilente:	LAB. CESTTA - ESPOCH
Fecha de Calibración:	26 de Febrero del 2015
Equipo:	Balanza Analítica Digital, Shimadzu, AUX220, serie: D446501194

1.- ENSAYO DE EXCENTRICIDAD (Exc.)

Pesa (g):	50,0				
Posición 1 (g)	Posición 2 (g)	Posición 3 (g)	Posición 4 (g)	Exc. Max. (mg)	e.m.p. (mg)
50,0002	50,0003	50,0001	50,0002	0,20	± 2,00

2.- ENSAYO DE CARGA

#	Carga Nominal (g)	Lectura Ascend. (g)	Lectura Descend. (g)	Error correg. Ascend. (mg)	Error correg. Descend. (mg)	Histéresis (mg)	e.m.p. (mg)
1	0,0	0,0000	0,0000	0,00	0,00	0,00	± 1,00
2	0,1	0,1000	0,1001	0,01	0,11	0,10	± 1,00
3	1,0	1,0000	1,0001	0,02	0,12	0,10	± 1,00
4	2,0	2,0001	2,0002	0,10	0,20	0,10	± 1,00
5	5,0	5,0001	5,0001	0,16	0,16	0,00	± 1,00
6	20,0	20,0002	20,0003	0,27	0,37	0,10	± 1,00
7	50,0	50,0002	50,0003	0,16	0,26	0,10	± 2,00
8	100,0	100,0001	100,0002	-0,04	0,06	0,10	± 2,00
9	150,0	150,0000	150,0001	-0,17	-0,07	0,10	± 2,00
10	205,0	204,9993	204,9993	-0,50	-0,50	0,00	± 3,00

3.- ENSAYO DE REPETIBILIDAD

Pesa (g):	50% max.	max.						e.m.p. (mg)	
	100,0	200,0	Lect. 1 (g)	Lect. 2 (g)	Lect. 3 (g)	Lect. 4 (g)	Lect. 5 (g)		Lect. 6 (g)
100,0002	100,0003	100,0002	100,0002	100,0002	100,0002	100,0002	100,0003	0,10	± 2,00
0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,00	± 1,00
199,9995	199,9994	199,9994	199,9994	199,9994	199,9994	199,9994	199,9993	0,20	± 3,00
0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,00	± 1,00

Incertidumbre de la calibración: ± 0,40 mg ; k= 2

Observaciones:
Calibrado por:

Ing. Juan Cruz Abril

[Handwritten signature]