

Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp.

Evaluating solid fermentation processes and substrates for producing *Trichoderma* sp. spores

Elkin Yabid Agamez Ramos¹, Raúl Ignacio Zapata Navarro²,
Luis Eliécer Oviedo Zumaqué³, José Luis Barrera Violeth⁴.

Resumen

Se evaluó un aislado nativo del hongo *Trichoderma* sp. en 13 sustratos y dos procesos de fermentación sólida. Se utilizaron sustratos sólidos a base de semillas de *Artocarpus incisa* (fruta de pan) y desechos agroindustriales como cascarilla de arroz y algodón. La mejor producción de esporas se registró en el sustrato compuesto por cascarilla de algodón (enriquecida con soluciones de melaza) y semillas de *Artocarpus incisa* con valores de concentración de esporas entre $2,1 \times 10^8$ conidios/g, y $8,38 \times 10^8$ conidios/g. Mientras que las más bajas concentraciones se presentaron en cascarilla de arroz. Los sustratos EA-5 (cascarilla de algodón enriquecida con solución de melaza 1% - Urea 1% (5:1)) y E-FP-1 (cascarilla de algodón al 60% - semillas de *Artocarpus incisa*, al 40%) se diferenciaron significativamente del resto de los sustratos probados por presentar las más altas concentraciones. Se seleccionaron estos dos sustratos para evaluar dos procesos de producción masiva de esporas de *Trichoderma* sp. utilizando los procesos de fermentación sólida: artesanal y semi-industrial, este último caracterizado por suministro de aire con presión de 2L/min. Mediante conteos de conidias/g. del polvo cosechado en cámara de Neubauer, se determinó la concentración de esporas en cada uno de los sustratos, obteniéndose concentraciones para los procesos artesanal y semi-industrial de $2,53 \times 10^9$ y $2,31 \times 10^9$ conidios/g, respectivamente. Para estos procesos estadísticamente no se encontraron diferencias significativas, indicando que la aireación aplicada para el proceso semi-industrial no tuvo incidencia relevante para mejorar la esporulación con respecto al proceso artesanal.

Palabras clave: *Trichoderma* sp., producción de esporas, fermentación sólida.

Abstract

A native *Trichoderma* sp. fungus strain was evaluated in 13 substrates and two solid fermentation processes. Solid substrates based on *Artocarpus incisa* seed (breadfruit) were used as well as agro-industrial waste, such as rice and cotton husks. The best spore production was recorded in substrate consisting of cotton

-
- 1 Biólogo, Investigador del Grupo de Investigación: Agricultura Sostenible, Universidad de Córdoba- Montería, elkinagamez28@yahoo.com.
 - 2 Biólogo, Investigadores del Grupo de Investigación: Agricultura Sostenible, Universidad de Córdoba- Montería, ralnacho@yahoo.com.
 - 3 Docente investigador, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Córdoba-Montería, jbarraera11@sinu.unicordoba.edu.co.
 - 4 Docente investigador, Facultad de Ciencias Básicas e Ingenierías, Universidad de Córdoba-Montería. loviedo@sinu.unicordoba.edu.co.

husks (enriched with molasses solution and 40% *Artocarpus incisa* seeds) returning $2,1 \times 10^8$ spore/g to $8,38 \times 10^8$ spore/g spore concentration values. While that lowest spore concentrations were presented in rice husks, EA-5 (cotton husks enriched with 1% molasses -1% urea solution (5:1) and E-FP-1 substrates (60% cotton husks - 40% *Artocarpus incisa* seeds) significantly differed from the other substrates tested as they presented the highest concentrations. These two substrates were thus selected for evaluating two solid fermentation-based *Trichoderma* sp. spore mass production processes: artisanal and semi-industrial; the latter was characterised by air being supplied at 1,6 lb/min pressure. Spore concentration was determined in each substrate by counting conidia/g. harvested dust in a Neubauer chamber, obtaining $2,53 \times 10^9$ spore/g concentration for the artisanal process and $2,3 \times 10^9$ spore/g concentration for the semi-industrial one. No statistically significant differences were found for these processes, indicating that the air applied for the semi-industrial process had no outstanding effect on improving sporulation regarding the artisanal process.

Key words: *Trichoderma* sp., spores production, solid fermentation.

Recibido: marzo 28 de 2008

Aprobado: octubre 23 de 2008

Introducción

Los hongos del género *Trichoderma* sp. son un grupo de microorganismos que habitan naturalmente en un número importante de suelos agrícolas, con abundante materia orgánica en descomposición y altas densidades de raíces. Su desarrollo se ve favorecido por la presencia de otros hongos que atacan a los cultivos. *Trichoderma* sp. se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo en diferentes zonas de vida, además también se suelen hallar asociados a la superficie de plantas y cortezas de madera descompuesta, en diferentes zonas de vida y hábitat (Harman, 1990).

El interés científico despertado por los hongos de este género, se debe a las características antagónicas que presentan frente a hongos fitopatógenos. Entre los mecanismos de control referenciados para *Trichoderma* sp. está la competencia por nutrientes o espacio, el micoparasitismo y la antibiosis. Estos tres mecanismos no son excluyentes sino que actúan sinérgicamente en el control de los patógenos. La importancia relativa de cada uno de ellos depende de cada pareja de antagonismo-patógeno y de las condiciones ambientales (Harman y Kubicek, 1998; Chet et ál., 1997; Belanger et ál., 1995).

El hongo *Trichoderma* sp. produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y

esporas (conidias) (Papavizas, 1985). Las esporas son los más viables de los propágulos empleados en programas de biocontrol (Elad et ál., 1993). Estos cuerpos especializados se caracterizan por poseer una gruesa pared exterior, constituida por tres capas (endospora, epispora y perispora) que protegen el interior de la espora (protoplasto). Esta gruesa pared se diferencia de la pared celular de las células vegetativas del hongo (hifas y clamidosporas), las cuales son mucho más delgadas y no está formada por capas constitutivas como las esporas. La ventaja para la espora de poseer una pared celular gruesa es aislarla del medio ambiente y permitir que sobreviva a condiciones adversas, manteniéndola en dominancia hasta que las condiciones sean propicias para la germinación. En consecuencia, las conidias son verdaderas semillas que utiliza el hongo para colonizar nuevos sustratos y, en el caso de *Trichoderma* sp., es la principal forma de producción comercial. La biomasa de esporas puede ser obtenida por medio de cultivos sumergidos (Elad y Kirshner, 1993), o cultivos en sustratos sólidos (Lewis y Papavizas, 1983).

Las necesidades nutricionales de *Trichoderma* sp. son bien conocidas, es capaz de degradar sustratos muy complejos como almidón, pectina y celulosa entre otros, y emplearlos para su crecimiento gracias al gran comple-

jo enzimático que posee (enzimas hidrolíticas como amilasas, pectinasas, celulasas y quitinasas entre otras). Así mismo, *Trichoderma* asimila como fuente de nitrógeno compuestos tales como aminoácidos, urea, nitritos, amoníaco y sulfato de amonio (Moore 1996).

Por otra parte los microelementos, sales y vitaminas en grandes cantidades no son indispensables para el desarrollo de *Trichoderma* (Papavizas 1985). Los elementos traza requeridos para el crecimiento de los hongos en general incluyen hierro zinc, cobre molibdeno y manganeso en concentraciones muy pequeñas cercanas a 10^{-9} M. Dentro de las vitaminas necesarias se encuentran tiamina (B6), piridoxina (B6), ácido nicotínico (B3), ácido pantoténico (B5), riboflavina (B2), cianocobalina (B12) y ácido aminobenzoico (Moore, 1996).

La bioprospección de microorganismos antagonistas como *Trichoderma* sp. es una de las alternativas actuales para combatir hongos fitopatógenos. La versatilidad, adaptabilidad y fácil manipulación lo han convertido como uno de los antagonistas más utilizados para el control fitosanitario (Lorenzo et ál., 2000). En la actualidad Cuba es uno de los países que produce 250 toneladas de biopreparados por año, mediante capacidad instalada, que permiten proteger más de 100.000 ha (Fernández y Vega 2001).

La multiplicación de *Trichoderma* sp, se realiza de forma artesanal o industrial, implementando técnicas de fermentación líquida y sólida, en la fermentación sólida se utilizan sustratos de arroz y residuos agroindustriales tales como cascarilla de arroz, paja de arroz, trigo, entre otros medios compuestos por subproductos de la industria azucarera como la melaza (Fernández y Vega, 2001). En trabajos realizados por Stefanova, M. (1995), se señala el flujo de producción de un biopreparado de *Trichoderma* en cultivo bifásico líquido-líquido y líquido-sólido, utilizando como medio melaza-levadura, obteniendo concentraciones de conidios de $2-3 \times 10^8$ /ml, en la fermentación líquida, y con la sólida de $2-3 \times 10^9$ conidios/g.

La producción semi-industrial e industrial de *Trichoderma*, es una alternativa tecnológica muy eficiente desde el punto de vista productivo y económico para la obtención de biofungicidas de alta calidad, involucra procesos estandarizados con el control de variables como humedad temperatura y flujo de aireación. Este último muy importante puesto que puede mejorar la cantidad y calidad de las esporas producidas (Agosin et ál., 1997).

En Colombia, el arroz es el sustrato más utilizado para la producción de biopreparados de *Trichoderma* sp. a partir de procesos de fermentación artesanal e industrial. En la actualidad la empresa Sanatrade S.A. elabora un producto llamado Tricho-D el cual tiene como ingrediente activo al hongo *Trichoderma harzianum*, conocido como un bio-regulador y antagonista natural de los fitopatógenos, este producto es utilizado en Colombia en investigaciones para la protección de zocas del café frente al ataque de *Cerotocystis fimbrata*. (Castro y Rivillas, 2003).

La utilización de otro tipo de sustratos naturales para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. ha sido poco estudiada en el país sólo empresas como Natural Control ubicada en la Ceja, Antioquia y Laverlam S.A., en Cali, producen toneladas de estos biopreparados utilizando arroz como sustrato base para el desarrollo y esporulación del hongo, trabajos realizados por Fernández y Vega (2001), probaron la eficiencia y viabilidad de la producción de esporas de *Trichoderma* sp. con subproductos de la industria azucarera de Cuba, con soportes sólidos como materiales celulósicos, atendiendo a la alta capacidad celulítica de este hongo.

La utilización de subproductos agrícolas con altos contenidos celulósicos plantea la posibilidad de reemplazar los sustratos utilizados como el arroz y el trigo, los cuales actualmente encuentran limitado su utilización por los altos costos. Así mismo, existen semillas de árboles con alto contenido de nutrientes que pueden ser utilizadas para enriquecer los sustratos, como es el caso de las

semillas del árbol del pan (*Artocarpus incisa*), es una especie perteneciente al género de los *Artocarpus*, dentro de la tribu de las *Artocarpeae*, de la familia de las *Moraceae* con cientos de variedades de árboles distribuidas en zonas tropicales de Asia y Suramérica. Las semillas de los frutos del pan producidas abundantemente por el árbol son muy nutritivas. Son ricas en azúcares contienen entre un 20 y 37% de carbohidratos, calcio, hierro, fósforo y niacina, y en vitaminas C y B1 (Zerega et ál., 2005).

En el departamento de Córdoba, Colombia, se producen gran cantidad de residuos agrícolas como la cascarilla de algodón (*Gossypium hirsutum*) y cascarilla de arroz (*Oryza sativa*) que pueden ser utilizados para evaluar la producción de esporas del hongo *Trichoderma* sp. mediante procesos de fermentación sólida artesanal y semi-industrial.

A fin de evaluar la posibilidad de producir esporas de *Trichoderma* sp. se planteó la necesidad de realizar ensayos con el objetivo de evaluar la viabilidad de sustratos locales y procesos de producción artesanal y semi-industrial. Con los resultados de esta investigación se contribuye con información útil para la consecución de herramientas que permitan la obtención de posibles productos agroecológicos con aislados nativos de *Trichoderma* sp. los cuales en futuras investigaciones se puedan experimentar en el campo para el control de plagas fúngicas en el departamento.

Materiales y métodos

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Córdoba, ubicada geográficamente en el norte del municipio de Montería (Córdoba), localizada a 08° 45' 27" latitud norte y con 75° 53' 24" longitud oeste, a 49 msnm, temperatura promedio de 28,3 °C, precipitación anual de 1249 mm, y una humedad relativa anual que oscila entre 80 y 85% (Borrero et ál., 1996).

Obtención del aislado de *Trichoderma* sp.

Se utilizó un aislado de *Trichoderma* sp. codificado como T₁ proveniente de la colección de cepas del Laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Córdoba, el cual fue aislado en cultivos de plátano en el municipio de San Juan de Urabá (Antioquia), preservado en refrigeración a 4 °C. El aislado fue activado en medio agar papa dextrosa ((PDA) 20 gramos de D(+) glucosa, 22 gramos de extracto de papa, 15 gramos de agar), durante siete días e incubado a una temperatura de 25-28 °C.

Evaluación *in vitro* de sustratos sólidos para la producción de esporas

Sustratos empleados. Para evaluar la producción de esporas de *Trichoderma* sp. en sustratos sólidos, se utilizaron desechos agrícolas tales como: cascarilla de arroz (*Oryza sativa*), cascarilla de algodón (*Gossypium hirsutum*) y semillas del árbol fruta de pan (*Artocarpus incisa*), provenientes de los cultivos presentes en los lotes de la Universidad de Córdoba.

Preparación de los sustratos. Los sustratos se trituraron hasta obtener partículas de 0,5-3,0 mm de diámetro, se colocaron en recipientes de 4 L llenos con soluciones de urea y melaza con diferentes concentraciones o humedecidos en agua destilada, manteniéndose en remojo por 2 horas, el pH se ajustó con ácido acético 10%, en un rango de 5,5-6,5 con la ayuda de un potenciómetro. Luego se eliminó el exceso de solución con la ayuda de un tamiz de 0,1 mm. Los sustratos se colocaron en fundas plásticas de 3 mm de grosor y se esterilizaron en autoclave a 115 °C a 0,75 PSI, por un periodo de 15 min; posteriormente se ajustó la humedad en un 70-80%, mediante el secado en un horno a temperatura de 70°C por un periodo de 48 horas (tabla 1). La determinación de la humedad de los sustratos se realizó con base en la pérdida de peso de la muestra.

Se utilizó el sustrato arroz precocido como control, triturado en partículas con el mismo tamaño y humedecido con agua destilada en el mismo rango de humedad de los sustratos mencionados.

Preparación de inóculos. Para la obtención de los inóculos, se trabajó con cultivos puros del aislado T₁ de *Trichoderma* sp. de 72 horas de incubación en agar PDA bajo luz blanca para favorecer la esporulación, posteriormente fueron extraídas las colonias miceliales en discos de PDA con el hongo esporulado con una concentración aproximada de 1,0-3,0 x 10⁷ conidios/disco (tabla 1).

Bioensayos *in vitro*. A partir de los cultivos puros se tomaron discos del aislado T₁ de 0,5 cm de diámetro, para inocular cada uno de los distintos sustratos en cajas de Petri con una concentración de 1,0-3,0 x 10⁷ conidios/

ml, la concentración se determinó mediante el recuento de esporas en cámara de Neubauer (improved 0,100 mm), tomando los discos con esporas y agregándolos en un tubo de ensayo con 10 ml de agua destilada esteril que contenía Tween 80 al 0,1%, esta solución madre se homogeneizó en un agitador vibratorio durante 30 segundos, se realizaron diluciones seriadas decimales con la adición de Tween 80 al 0,1% (Fernández y Vega, 1997).

Las cajas se incubaron a temperatura ambiente en fotoperiodo luz-oscuridad (12:12 horas durante) durante 7 días. Al cabo de 7 días se realizó el conteo de esporas en cámara de Neubauer siguiendo la metodología propuesta por Monzón (2001), y Fernández y Vega (1997) para el control de calidad de biopreparados de *Trichoderma* sp. Para esto se tomó 1,0 gramo del sustrato colonizado por el hongo (conidios más sustrato) y se adicionaron a 10 ml de agua

Tabla 1. Sustratos empleados para realización de los ensayos *in vitro*, para la producción de esporas de *Trichoderma* sp.

Tratamiento N°	Código	Composición
1	FP-1	Semillas cocidas de <i>Artocarpus incisa</i>
2	CA-1	Cascarilla de arroz humedecida con agua destilada
3	CA-2	Cascarilla de arroz enriquecida con solución de melaza al 1%
4	CA-3	Cascarilla de arroz enriquecida con solución de melaza 1% - urea 0,1% (1:1)
5	EA-1	Cascarilla de algodón humedecida con agua destilada
6	EA-2	Cascarilla de algodón enriquecida con solución de urea al 0,1%
7	EA-3	Cascarilla de algodón enriquecida con solución de melaza al 1%
8	EA-4	Cascarilla de algodón enriquecida con solución de melaza 0,1% - urea 0,1% (1:1)
9	EA-5	Cascarilla de algodón enriquecida con solución de melaza 1% - urea 1% (5:1)
10	EA-6	Cascarilla de algodón enriquecida con solución de melaza 2% - urea 1% (1:1)
11	C-FP-1	Cascarilla de arroz al 60% - semillas de <i>Artocarpus Incisa</i> , al 40%
12	E- FP-1	Cascarilla de algodón al 60% - semillas de <i>Artocarpus incisa</i> , al 40%
13	Control	Arroz precocido humedecido con agua destilada.

destilada estéril con Tween 80 al 0,1%, esta suspensión se homogenizó en un agitador vibratorio durante 10 segundos y posteriormente se realizaron diluciones seriadas decimales hasta obtener la dilución apropiada (10^{-3}) usando agua destilada con Tween 80 al 0,1%.

Diseño estadístico. Se aplicó un diseño completamente aleatorio (DCA), con cinco repeticiones. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y prueba de Tukey, utilizando el software estadístico SAS versión 5,0 y con $\alpha = 0,05$. Seleccionando de esta forma los dos mejores medios sólidos que favorecieran a la producción de esporas, para realizar los ensayos a fin de implementar los procesos de producción masiva de esporas de *Trichoderma* sp. mediante un método artesanal y semi-industrial.

Producción de esporas de *Trichoderma* sp. por los procesos artesanal y semi-industrial

Para la evaluación de los procesos de producción de esporas se seleccionaron los dos mejores sustratos en los cuales el hongo tuviera una concentración de esporas alta y seguidamente se procedió a realizar el montaje para la producción artesanal y semi-industrial de esporas de *Trichoderma* sp.

Procesos utilizados para la producción de esporas. Para la producción de esporas del aislado de *Trichoderma* sp. se siguió la tecnología orientada por Fernández y Vega (1997), utilizando la variante de la bandeja con algunas modificaciones. Se utilizaron bandejas plásticas rectangulares de 30 x 15 cm. con capacidad para 4 kg de sustrato.

Producción artesanal. Para la producción de esporas mediante el proceso artesanal se modificaron las bandejas con orificios de 2,0 cm. de diámetro en la parte superior de uno de los lados laterales de la bandeja, en donde se insertó un tubo de PVC de 5,0 cm. de longitud acondicionado con algodón y gasa humedecida con alcohol al 95%.

Producción semi-industrial. Las bandejas del proceso semi-industrial se modificaron con un conducto de aireación también realizado con tubos de PVC de media pulgada situado en la parte inferior de la bandeja y con conexión para el suministro de aire a una bomba de acuario HIGH QUALITY modelo AC-1000 con capacidad de 2 L/min a una presión $> 0,024$ Mpa.

Preparación de inóculos madres (Matriz). A partir del aislado de *Trichoderma* sp. seleccionado y cultivado en agar PDA, se tomaron discos de 0,5 cm de diámetro y se sembraron en los sustratos seleccionados en cajas de Petri, los medios se incubaron por tres a cinco días hasta obtener colonias de buen aspecto y esporulación, de cada caja se tomaron alrededor de 2,0 a 3,0 g y se diluyeron en 50 ml de agua destilada estéril, obteniendo inóculos con concentraciones de esporas de $1,0 - 3,0 \times 10^7$ ufc/ml, lo cual se verificó mediante el conteo de esporas en cámara de Neubauer de 0,100 mm. A cada bandeja se le agregaron 200 g de sustrato previamente esterilizado y con una humedad del 70%. Posteriormente se inoculó cada bandeja con un volumen de 20 ml y una concentración de $1-2 \times 10^7$ ufc/ml, esparciendo el inóculo con una pipeta de Pasteur por todo el medio. Las bandejas se cubrieron con plásticos herméticos y sellados por los extremos con cinta adhesiva.

Incubación y obtención de esporas. El montaje se realizó en columna ubicando tres bandejas por cada una de ellas, todo el montaje se desarrolló en un cuarto de crecimiento a temperatura ambiente (26-28 °C) durante 8 días, una vez que el micelio hubiera cubierto y esporulado en todo el sustrato se hizo el conteo de esporas utilizando cámaras de Neubauer de 0,100 mm, para esto se tomó un gramo de sustrato fermentado en cada proceso, siguiendo la técnica propuesta por Monzón (2001) y Fernández y Vega (2003).

Evaluación estadística de los tratamientos de la fermentación sólida. Para la evaluación de los procesos implementados

para la producción de esporas se aplicó un diseño completamente aleatorizado y distribuido a una prueba factorial 2x3 (dos procesos con tres medios sólidos) con tres repeticiones. Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza, las medias fueron comparadas con el test de medias de Tukey con $\alpha = 0,05$, utilizando el software estadístico SAS versión 5,0.

Resultados y discusión

Evaluación *in vitro* de medios sólidos para la producción de esporas

Se inoculó el aislado T₁ en diferentes sustratos o medios a base de cascarilla de algodón, cascarilla de arroz enriquecidos con soluciones de melaza-urea y semillas de *Artobocarpus incisa*. El crecimiento del aislado (T₁) de *Trichoderma* sp. fue óptimo al observarse desarrollo y esporulación favorable en la mayoría de estos sustratos, principalmente en cascarilla de algodón. El crecimiento fue rápido, con formación de hifas a las 48 horas, alcanzando a cubrir toda la superficie del medio a las 120 horas, micelio denso con producción de gran cantidad de esporas (color verde claro). A los 8 días presentó concentraciones que van desde los $2,1 \times 10^8$ conidios/g hasta los $8,4 \times 10^8$ conidios/g, esta última obtenida en el medio EA-5 (cascarilla de algodón con solución de melaza 1% - urea 1%, 5:1). En el medio EA-2 (cascarilla de algodón con solución de urea 0,1%) no se presentó un buen crecimiento, el desarrollo del micelio fue muy lento y poco denso cubriendo todo el medio al cabo de los 10 días de inoculación, la esporulación fue muy escasa.

Los medios a base del sustrato cascarilla de arroz (CA-1, CA-2, y CA-3) presentaron las concentraciones más bajas, el crecimiento fue lento, detallándose la formación de hifas a las 96 horas con cubrimiento total de todo el medio a los 10 días, formación de un micelio fino poco denso y la esporulación no cubrió totalmente la caja de Petri, presentándose de forma

irregular en pequeños brotes. En los sustratos FP-1 (semillas cocidas de *Artobocarpus incisa*), E-FP-1 (cascarilla de algodón más semillas cocidas de *Artobocarpus incisa* 3:2) y C-FP-1 (cascarilla de arroz más semillas cocidas de *Artobocarpus incisa* 3:2), el desarrollo fue favorable con formación de hifas a las 48 horas, micelio denso y esporulación abundante a los 6 días de inoculación.

Entre los medios que tenían semillas de *Artobocarpus incisa* el medio E-FP-1, se obtuvieron las más altas concentraciones de esporas ($7,4 \times 10^8$ ufc/g.) (tabla 2). En el medio de control, con arroz, el crecimiento también fue rápido, con formación de hifas a las 48 horas, micelio denso, registrándose concentraciones de esporas de $5,1 \times 10^9$ ufc/g.

Tabla 2. Concentración de esporas en medios sólidos evaluados mediante cultivos *in vitro* con el aislado (T₁) de *Trichoderma* sp.

Tratamiento	Medio	Concentración de esporas x 10 ⁸ conidios/g.
9	EA-5	8,38A
8	EA-4	7,48AB
12	E- FP-1	7,4AB
1	FP-1	6,6AB
10	EA-6	6,18AB
7	EA-3	5,10BC
13	Control	5,10BC
5	EA-1	4,68BC
11	C-FP-1	3,00CD
4	CA-3	2,30CD
6	EA-2	2,10CD
3	CA-2	1,60D
2	CA-1	1,20D
C.V. %		29,6
F (tratamiento)		**

Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes, según la prueba de Tukey (P<0,05)

** Prueba F significativa (P< 0,01)

Los resultados del análisis de varianza muestran diferencias estadísticas altamente significativas (P<0,01) entre los medios evaluados, indicando que al menos uno de los tratamientos estudiados presentó un valor promedio es-

tadísticamente diferente. La prueba de Tukey de separación de medias (tabla 2) indicó que el sustrato con mayor producción de esporas fue EA-5, el cual se diferenció significativamente con respecto a los demás.

Las otras variantes probadas a partir del sustrato cascarilla de algodón enriquecidos con soluciones de melaza-úrea (EA-4 y EA-6) y semillas de *Artocarpus incisa* (FP-1, EA-1) arrojaron también concentraciones altas. Entre éstos no se encontraron diferencias significativas, no obstante, en relación con el medio de control (arroz) existen diferencias significativas. Los medios EA-1 y EA-3 presentaron valores de concentraciones de esporas intermedias entre los medios evaluados; con relación al control no hubo diferencias significativas.

Los medios con el sustrato de cascarilla de arroz presentaron las concentraciones más bajas de esporas en los ensayos *in vitro*, indicando estadísticamente que no existieron diferencias significativas.

La utilización de este tipo de materiales naturales ratifica lo dicho por Miller y Churchill (1986), quienes publicaron una lista completa de sustratos derivados de la agricultura y que pueden ser utilizados para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. como se puede observar en los resultados obtenidos con el medio EA-1 (cascarilla de algodón humedecido con agua destilada) confirmando la actuación de los nutrientes de este material en la esporulación del aislado (T₁) de *Trichoderma* sp. La adición de melaza y urea al sustrato de cascarilla de algodón tuvo un efecto importante al estimular considerablemente la esporulación del aislado T₁ de *Trichoderma* sp. ratificando a estas sustancias como buenas fuentes de carbono y nitrógeno.

La relación carbono (C): nitrógeno (N) es esencial para las fermentaciones de hongos, de este balance en lo fundamental dependerá el que se logre la formación de los propágulos deseados. En los hongos, se necesita que la fuente C esté en exceso en el medio y el contenido de

N sea el factor limitante del crecimiento, lo que desencadena el proceso esporulativo (Elósegui, 2006).

En efecto, las concentraciones de melaza al 2% en los medios como fuente de carbono sobre *Trichoderma* sp. ejercieron el resultado que se esperaba, es decir, una mayor esporulación; así mismo, la urea como fuente de nitrógeno en concentraciones de 1% frenó el proceso de crecimiento para dar paso a una mayor esporulación que la obtenida en los medios que presentaban concentraciones de urea al 0.1%.

Nutricionalmente la melaza presenta un altísimo contenido en azúcares e hidratos de carbono, además de vitaminas del grupo B y abundantes minerales, entre los que se destacan el hierro, el cobre y el magnesio, elementos esenciales para los requerimientos nutricionales de estos hongos como lo plantea Moore (1996).

Las concentraciones obtenidas con los sustratos de cascarilla de arroz y algodón en los diferentes sustratos probados, son similares a las obtenidas en investigaciones de reproducción de cepas de *Trichoderma* sp. como las realizadas por Lorenzo et ál. (2000), en las cuales, con base del sustrato de cascarilla de arroz al 30% más paja de arroz 70%, se obtuvieron concentraciones de hasta $2,3 \times 10^8$ conidios/g. No obstante el sustrato de cascarilla de arroz no parece ser el más indicado para el desarrollo de estructuras reproductivas para la generación de conidióforos y conidios (esporas), como lo plantea Panazo (2001), quien en pruebas realizadas con distintos sustratos para la reproducción de *Trichoderma* sp. encontró que el sustrato de cascarilla de arroz resultó ser el menos indicado por su incapacidad de mantener condiciones de humedad durante el ciclo de desarrollo del hongo.

La utilización de semillas cocidas de fruta de pan (*Artocarpus incisa*) en los sustratos evaluados se convierte en una buena forma de mejorar la esporulación de *Trichoderma* sp.; la presencia de posibles sustancias como azú-

cares, proteínas y minerales en determinadas concentraciones estimuló considerablemente el desarrollo y la esporulación del aislado T₁ de *Trichoderma* sp. a tal punto que en aquellas pruebas realizadas con el sustrato de cascarilla de arroz sin aditivo, se obtuvieron concentraciones más bajas de esporas que las que se obtuvieron con el medio C-FP-1 (sustrato de cascarilla de arroz con semillas de *Artocarpus incisa*).

A partir de los ensayos *in vitro* se seleccionaron los medios EA-5 y E-FP1, por presentar las concentraciones de esporas más altas, para llevar a cabo el proceso de producción de esporas por el método artesanal y semi-industrial.

Producción de esporas por los métodos artesanal y semi-industrial

El aislado (T₁) de *Trichoderma* sp. se desarrolló rápidamente en las bandejas de los procesos artesanal y semi-industrial. A partir de las 24 horas se observó la formación de hifas en ambos procesos, con un micelio denso el cual cubrió toda la superficie del sustrato después de 120 horas de inoculación (figura 1), a esta instancia la esporulación alcanzó a cubrir el sustrato en un 80%. Al transcurrir los 8 días de la incubación se observó gran producción de esporas. En el proceso artesanal la producción promedio de esporas fue de $2,5 \times 10^9$ ufc/g. Mientras que para el proceso semi-industrial la concentración de esporas fue de $2,3 \times 10^9$ ufc/g.

El pH de los sustratos osciló entre valores de 5 a 7,3 en ambos procesos, la aireación no afectó considerablemente el pH de los medios en el proceso semi-industrial, y éstos a su vez fueron muy similares a los encontrados en los medios del proceso artesanal. Al cabo de los 8 días de fermentación en el proceso semi-industrial la humedad varió ya que el sustrato sólido por medio de la aireación se deshidrató permitiendo así extraer el gramo de esporas con mayor facilidad. La colonización completa del micelio sobre el sustrato, la textura de este, así como la coloración de las esporas fue la misma para ambos procesos. No se observaron diferencias morfológicas en cuanto al aspecto micelial producido por los dos procesos.

El análisis de varianza resultó no significativo en la concentración de esporas obtenidas entre los sustratos ($P < 0,05$), tampoco para los procesos implementados para la producción de esporas ($P < 0,05$), ni en la interacción de estos dos factores (tabla 3); en relación con el sustrato control tampoco se encontraron diferencias significativas con los dos sustratos experimentales en ambos procesos.

En lo que se refiere al análisis estadístico entre el proceso artesanal y el proceso semi-industrial y los sustratos sólidos donde se desarrolló y esporuló el hongo no se encontró diferencia significativa entre ellos, indicándonos que ambos procesos obtienen un buen rendimiento en cuanto a concentración de esporas, esto pudo ser debido al tipo de nutrientes implementados para estos procesos.



Figura 1. Desarrollo y esporulación del aislado T₁ empleando los procesos de producción de esporas, **A:** producción de esporas de *Trichoderma* sp. mediante el proceso artesanal; **B:** producción de esporas de *Trichoderma* sp. mediante el proceso semi-industrial.

Tabla 3. Concentración promedio de esporas $\times 10^9$ ufc/g de *Trichoderma* sp. según los tratamientos (sustratos y procesos).

Ensayos	Tratamientos (Sustratos frente a Procesos)	Concentración promedio de esporas $\times 10^9$ conidios/g
1	E-FP-1 - Artesanal	2,833
2	E-FP-1 - Semi-industrial	3,043
3	EA-5 - Artesanal	2,927
4	EA-5 - Semi-industrial	2,910
5	Control - Artesanal	1,837
6	Control - Semi-industrial	0,993
F (tratamiento)		n.s.
Ensayos	Procesos de fermentación sólida-sustrato	Concentración promedio de esporas $\times 10^9$ conidios/g
1	Artesanal / (EA-5 / E-FP-1)	2,5622
2	Semi-industrial / (EA-5 / E-FP-1)	2,3156

Prueba de Tukey ($P < 0,05$): prueba F no significativa.

Por consiguiente en esta investigación se determinó que el aislado T_1 de *Trichoderma* sp. no requirió de aireación forzada para su crecimiento, puesto que ante la ausencia de esta variable en el proceso artesanal se obtuvieron rendimientos más altos en cuanto a la concentración de conidios ($2,5622 \times 10^9$ conidios/g). Estos resultados obtenidos son similares a los registrados en otros trabajos como los realizados por Cruz (2007) para la estandarización de procesos de fermentación bifásica de *Trichoderma* sp., en el cual se evaluaron diferentes caudales de aire en fermentaciones sólidas con sustrato de arroz, encontrando que al utilizar caudales de 0,5, 1,0 y 0,25 wm , no se presentó diferencia significativa con respecto a las fermentaciones realizadas con ausencia de esta variable (0 wm), en donde se obtuvieron algunos de los rendimientos más altos en cuanto a la concentración de conidios ($8,44 \times 10^9$ y $6,86 \times 10^9$ conidios/g).

La adición de ventilación forzada a un sistema de producción generalmente mejora el producto, acelerando el proceso de esporula-

ción (Bradley et ál., 1992). La aireación suministrada al proceso semi-industrial influyó lo suficiente para producir un buen rendimiento de producción de esporas similar al obtenido con el proceso artesanal. Sin embargo, la ventilación forzada pudo haber tenido un efecto positivo en la fermentación al eliminar o disipar el calor metabólico producido en el sistema. La aireación en la producción de esporas es un parámetro que determina la calidad de las producciones partiendo de que todos los hongos mitospóricos (hifomicetos) son aerobios y requieren oxígeno para el crecimiento y la conidiación. En los sistemas de producción artesanales es difícil determinar el requerimiento de oxígeno de un determinado hongo y la evaluación se hace cualitativamente. La mayoría de los sistemas de producción de América Latina, China y del programa internacional LUBILOSA, están basados en el intercambio del aire entre la cámara de crecimiento y el ambiente externo (Elósegui, 2006).

La pérdida de humedad registrada en los medios del proceso semi-industrial no pareció

ser relevante como para que pudiera haber incidido considerablemente en la producción de esporas, por efecto de una deshidratación más acelerada que en el proceso artesanal, debido a que los parámetros claves para una mayor producción de esporas como lo plantean Agosin et ál. (1997); Jin et ál. (1991), son la temperatura, el pH y el tiempo de cultivo.

Conclusiones

A partir de las evaluaciones realizadas se encontró que el mejor sustrato para la producción de esporas *in vitro* de *Trichoderma* sp. fue el de cascarilla de algodón, el cual presentó las concentraciones de esporas más altas, con valores de hasta $8,38 \times 10^8$ conidios/g. La adición de melaza estimuló considerablemente en este sustrato una mayor producción de esporas de *Trichoderma* sp. La utilización de semillas de *Artocarpus incisa* tuvo un efecto importante e innovador al observar una alta esporulación de esporas ($7,4 \times 10^8$ conidios/g), presentando una diferencia altamente significativa con respecto a los medios de cascarilla de arroz.

El crecimiento y la esporulación de *Trichoderma* sp. en los sustratos con cascarilla de arroz fueron muy lentos y desfavorables para la producción de esporas, resultando ser el menos apropiado por su incapacidad de permitir el desarrollo micelial del hongo y por consiguiente la generación de estructuras reproductivas que permitieran la obtención de una buena producción de esporas.

En la producción de esporas mediante los procesos artesanal y semi-industrial no se presentaron diferencias significativas, sugiriendo que la aireación aplicada al proceso semi-industrial no tuvo una ventaja relevante en la esporulación de *Trichoderma* sp. Los resultados obtenidos en la producción artesanal de esporas sugieren que la aireación natural es suficiente para obtener un buen rendimiento en la producción de esporas de *Trichoderma* sp.

La información generada con esta investigación, constituye un primer aporte para la

iniciación de estudios que permitan la implementación de sustratos locales como la cascarilla de algodón de gran abundancia y bajo costo en el departamento de Córdoba para la producción a gran escala de biopreparados de cepas nativas de *Trichoderma* sp. utilizando procesos artesanales con aireación natural con el cual se puede obtener una suficiente concentración de esporas de *Trichoderma* sp.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó en el marco del proyecto: "Evaluación e implementación de alternativas de producción orgánica en Plátano y Banano en zonas productoras de Córdoba y Urabá antioqueño" gracias al apoyo prestado por el Centro de Investigaciones de la Universidad de Córdoba (CIUC).

Referencias bibliográficas

- Agosin, E.; Volpe, D.; Muñoz, G.; San Martín, R.; Crawford, A. 1997. Effect of culture conditions and spore shelf life of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *World J Microbiol Biotechnol* 13, 225-232.
- Belanger, R.; Dufour, N.; Caron, J.; Benhamou, N. 1995. Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: Indirect evidence for sequential role of antibiosis and parasitism. *Biocontrol Sci Technol* 5, 41-54.
- Borrero, S. 1996. Diccionario Geográfico de Colombia. Instituto Geográfico Agustín Codazzi. 3 edición. Colombia.
- Bradley, C.; Kearns, R.; Wood, P. 1992. Solid state culture of whiterotfungi. *International Patent* WO 92/13960.
- Castro, A.; Rivillas, Carlos. 2003. Manejo sostenible de la llaga macana en cafetales renovados por zoca. *Avances técnicos Cenicafé* 312, 2-7.
- Chet I.; Ibar J.; Hadar I. 1997. Fungal antagonistic and mycoparasites. In: Wick Low, D.T. y Soderstrom, B. (eds.). *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships*. New York: Springer Verlag. pp 165-192.
- Cruz, L. 2007. Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de

- ciencias. Programa de Microbiología Industrial. Colombia. pp 62-97.
- Elad, I.; Kirshner, B. 1993. Survival in the phylloplane of an introduced biological control agent (*Trichoderma harzianum*) and populations of the plant pathogen *Botrytis cinerea* as modified by abiotic conditions. *Phytoparasitica* 21, 303-313.
- Elad, I.; Zimand, G.; Zaqs, I.; Zuriel, S.; Chet, I. 1993. Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mould (*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse conditions. *Plant pathology (oxford)* 42, 324-332.
- Fernández, O.; Vega, L. 1997. Microorganismos en el control fitosanitario en Cuba: tecnologías de producción. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), Centro de La Habana. Habana, Cuba. III Encuentro Nacional de Agricultura Orgánica – ACAO. Universidad Central de Las Villas, Villa Clara-Cuba.
- Fernández, O.; Vega L. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Revista manejo integrado de plagas*. Costa rica. 62, p. 96-100.
- Elósegui, O. 2006. Métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas. En: Memorias del Curso Internacional "Producción y uso de Bioplaguicidas en Diferentes Agroecosistemas". INISAV, La Habana, Cuba.
- Harman, G. 1990. *The Rhizosphere*. New York: Willey and Sons. pp. 259-280.
- Harman, G.; Kubicek, C. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*. London: Taylor and Francis. Vol. 1, pp. 25-40.
- Lewis, J.; Papavizas, G. 1983. Chlamydospore formation by *Trichoderma spp.* In natural substrates. *Can. J. Microbial* 30, 1-6.
- Moore, E. 1996. *fundamentals of the Fungi*. Fourth edition. Prentice Hall. New jersey. 574p.
- Monzón, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo integrado de plagas. Costa rica: Universidad Nacional Agraria de Nicaragua. 63, 95-103.
- Miller, T.; Churchill, B. 1986. Substrates for large scale fermentations. In A. L. Demain and biotechnology. American Society for Microbiology. pp. 122-137.
- Panazo, J. 2001. Reproducción de *Trichoderma sp.* en diferentes sustratos con fines de control biológico. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias. Universidad Mayor de San Simón. Bolivia.
- Papavizas, G. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Annu Rev Phytopathol.* 23, 23-54.
- Stefanova, M. 1995. Producción y aplicación de *Trichoderma spp.* como antagonista de hongos fitopatógenos. Informe técnico de investigación, INISAV.
- Zerega, N.; Ragone, D.; Motley, T. 2005. Systematics and species limits of breadfruit (*Artocarpus*, Moraceae). *Systematic Botany* 30, 603-615.