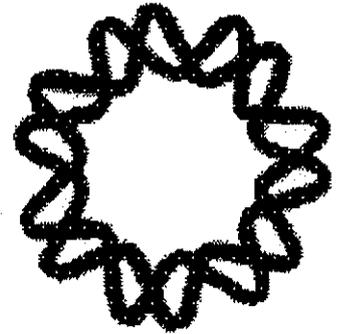


00551
7



Universidad Nacional Autónoma
de México



Instituto de Biotecnología

Estudio de factores nutricionales y de proceso que
determinan la producción de biomasa micelial de
Trichoderma harzianum y su viabilidad

T E S I S

que para obtener el grado de
Maestría en Ciencias

Boquinta

Presenta

Q. I. Celia Flores Ocampo

Cuernavaca, Morelos, 2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio del Dr. Enrique Galindo, del departamento de Bioingeniería del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en la ciudad de Cuernavaca, Morelos, bajo la asesoría del Dr. Leobardo Serrano Carreón.

Para la realización de este trabajo se contó con financiamiento del CONACyT (proyecto Z-001).

A mis tres amores:

Jorge, Jorge André y Axel Iván

por ser el tesoro más hermoso que pueda tener

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Leobardo Serrano, por el apoyo, la confianza y su valiosa dirección para realizar este trabajo y, por ser amigo.

Al Dr. Enrique Galindo, por compartir sus conocimientos y su experiencia. Por su invaluable apoyo para lograr esta meta y por que ha sido un honor colaborar con él.

Al personal de la Unidad de Escalamiento y Planta Piloto del instituto de Biotecnología. Especialmente al T. L. I. Mario alberto Caro, por su valiosa colaboración en el desarrollo de las fermentaciones.

Al Dr. Mainul Hassan, por su importante participación en el desarrollo de la técnica de viabilidad.

A los miembros del jurado, por sus críticas y sugerencias.

Dr. Jorge Nieto Sotelo

Dr. Leobardo Serrano Carreón.

Dr. Gabriel Corkidi Blanco

Dr. Alfredo Martínez Jimenez

Dra. Brenda Valderrama Blanco

A mis compañeros y amigos del grupo Galindo, OTR y Planta piloto. Ha sido un placer compartir esos días y noches de trabajo.

Indice general

No.		Página
	Indice de figuras	iv
	Indice de tablas	vi
	Resumen	1
1	Introducción	2
2.	Antecedentes	5
2.1	Cepas del género <i>Trichoderma</i> como agentes de control biológico	6
2.2	<i>Trichoderma</i> y su interacción con hongos fitopatógenos	7
2.3	<i>Trichoderma</i> como estimulador del crecimiento en plantas	9
2.4	Aplicación de hongos en suelo como agentes de control biológico	9
2.5	Ventajas de la aplicación de biomasa micelial con respecto a esporas de <i>Trichoderma</i> como agente de control biológico	10
2.6	Producción de biomasa micelial por fermentación líquida	11
2.6.1	Características y repercusiones del crecimiento de hongos filamentosos en fermentación líquida	11
2.7	Cultivos de <i>Trichoderma sp.</i>	13
2.7.1	Aspectos nutricionales y de proceso en el cultivo de <i>Trichoderma sp.</i> cultivado en matraces	13
2.7.2	Aspectos nutricionales y de proceso en el cultivo de <i>Trichoderma sp.</i> cultivado en biorreactores	16
2.8	Viabilidad de hongos filamentosos	19
3	Objetivos	21
4	Materiales y métodos	22
4.1	Microorganismo	22
4.1.1	Obtención y conteo de esporas	22
4.2	Medio de cultivo líquido “estándar” para la producción de la biomasa micelial	23
4.2.1	Diseño experimental para la evaluación de medios de cultivo en la producción de biomasa micelial de <i>Trichoderma harzianum</i>	23
4.2.2	Análisis estadístico del diseño factorial	24

4.3	Cultivos en biorreactores de 14 L	25
4.3.1	Geometría de los biorreactores de 14 L	25
4.3.2	Condiciones de los cultivos	26
4.4	Técnicas analíticas	26
4.4.1	Crecimiento micelial	26
4.4.2	Consumo del sustrato (glucosa)	27
4.4.3	Determinación de amonio	27
4.4.4	Determinación de la viabilidad del micelio de <i>Trichoderma harzianum</i> por tinciones fluorescentes en combinación con análisis de imágenes	29
4.4.4.1	Tinción de las células con diacetato de fluoresceína	30
4.4.4.2	Adquisición y procesamiento de muestras por análisis de imágenes	31
4.4.4.2.1	Sistema de análisis de imágenes	31
4.4.4.2.2	Adquisición y procesamiento de imágenes	31
5	Resultados y Discusión	33
5.1	Análisis de varianza para el estudio del efecto de factores nutricionales sobre el crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i>	33
5.1.1	Concentración de biomasa máxima	34
5.1.1.1	Efecto de los factores	34
5.1.1.2	Análisis del modelo	36
5.1.1.3	Predicción de respuestas por el modelo	37
5.1.2	Productividad del proceso (en términos de biomasa)	38
5.1.2.1	Efecto de los factores	38
5.1.2.2	Análisis del modelo	40
5.1.2.3	Predicción de respuestas por el modelo	41
5.1.3	Velocidad de crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i>	41
5.1.3.1	Efecto de los factores	41
5.1.3.2	Análisis del modelo	43
5.1.3.3	Predicción de respuestas por el modelo	44
5.1.4	Análisis global de las respuestas	44
5.2	Evaluación cinética de los factores sobre la producción de biomasa micelial de <i>Trichoderma harzianum</i>	46
5.2.1.	Cultivos realizados a pH 3.	47

5.2.1.1	Efecto del extracto de levadura	47
5.2.1.2	Efecto del sulfato de amonio	50
5.2.2	Cultivos realizados a pH 5.6	52
5.2.2.1	Efecto del extracto de levadura	52
5.2.2.2	Efecto del sulfato de amonio	54
5.2.3	Efecto del pH	55
5.2.3.1	Posibles efectos del pH sobre el crecimiento	55
5.2.3.2	Posibles efectos del pH sobre la esporulación del hongo	56
5.3	Cultivos alimentados	59
5.4	Viabilidad del micelio de <i>Trichoderma harzianum</i> cultivado bajo diferentes condiciones en biorreactores de 14 L.	66
6	Conclusiones	70
7	Recomendaciones	71
8	Bibliografía	72
A1	Diseños factoriales a dos niveles	78
A2	Cálculos de los parámetros cinéticos y rendimiento de <i>T. harzianum</i> presentados en este trabajo	85
A3	Estudios previos para la selección de fluorocromos	86
A.3.1	Selección de los fluorocromos y de su concentración	86
A.3.2	Evaluación de la fluoresceína en células en diferente estado fisiológico	86
A.3.2.1	Evaluación de anaranjado de acridina	87
A.3.2.2	Evaluación del diacetato de fluoresceína	87
A4	Procedimiento para la adquisición de imágenes en la computadora	89
A.4	Cuantificación de áreas	93
A.1.3	Manuscrito en <i>Biotechnology and Bioengineering</i>	95

Indice de figuras

No.		Página
4.1	Imágenes de <i>Trichoderma harzianum</i> adquiridas con luz visible y con luz ultravioleta. a) Imagen fotografiada con luz visible. b) Imagen fotografiada con luz ultravioleta. Objetivo 10x.	32
5.1	Gráfico normal del los efectos de los factores sobre la concentración de biomasa micelial de <i>T. h.</i>	35
5.2	Concentraciones de biomasa estimadas en la interacción del sulfato de amonio y el extracto de levadura a diferentes pH. a) pH = 3. b) pH = 5.6	38
5.3	Gráfico normal del los efectos sobre la productividad de biomasa micelial de <i>T. h.</i>	39
5.4	Productividades esperadas con la interacción del extracto de levadura y del sulfato de amonio a pH 3 (a) y pH 5.6 (b)	41
5.5	Gráfico normal del los efectos sobre la velocidad de crecimiento del <i>T. h.</i>	42
5.6	Predicción de las velocidades de crecimiento con la interacción del sulfato de amonio y del extracto de levadura en los cultivos a pH 3 y 5.6. a) pH 3. b) pH 5.6	45
5.7	Cinéticas de biomasa micelial, sustrato, amonio y TOD en el cultivo de <i>Trichoderma harzianum</i> a pH 3 y a diferentes concentraciones de sulfato de amonio y de extracto de levadura	48
5.8	Cinéticas de biomasa micelial, sustrato, amonio y TOD en el cultivo de <i>Trichoderma harzianum</i> a pH 5.6 y diferentes concentraciones de sulfato de amonio y de extracto de levadura	53
5.9	Visualización de las limitaciones de mezclado en el cultivo de <i>Trichoderma harzianum</i> , en medio 0.94 g/L de sulfato de amonio, 1.5 g/L de extracto de levadura a pH5.6	59
5.10	Cinéticas de biomasa, glucosa residual, amonio y TOD en el cultivo alimentado comparado con el cultivo en lote	61

5.11	Biomasa total, área teñida con FDA, viabilidad de <i>Trichoderma harzianum</i> y evolución de amonio, en función de las condiciones de cultivo	68
5.12	Correlación entre la biomasa no viable y la concentración del ion amonio en el cultivo de <i>Trichoderma harzianum</i>	69
A1.1	Representación gráfica de los efectos	81
A1.2	Representación de los efectos de los factores. a) en una distribución normal, b) en papel cuadrulado ordinario, c) representación en papel probabilístico normal	82
A1.3	Gráfico normal de los efectos	82
A3.1	Estabilidad de la fluorescencia de <i>Trichoderma harzianum</i> al teñirse con anaranjado de acridina. a) micelio esterilizado. b) micelio fresco.	88
A3.2	Fluorescencia del micelio de <i>Trichoderma harzianum</i> . a) Teñido con anaranjado de acridina. b) Teñido con diacetato de fluoresceína. Obj. 10x	88
A5.1	Conversión a grises de las imágenes para su posterior cuantificación. a) foto tomada con luz visible. b) foto tomada con luz ultravioleta	94

Indice de tablas

No.		Página
2.1	Producción de biomasa de diferentes cepas de <i>Trichoderma</i> y <i>Gliocadium virens</i>	17
2.3	Evaluación de algunos parámetros que influyen en la producción de la biomasa y de metabolitos de interés por <i>Trichoderma</i> spp.	18
4.1	Medio de cultivo estándar para el crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i>	23
4.2	Diseño experimental para la evaluación de la composición del medio de cultivo y del pH en la producción de biomasa micelial de <i>Trichoderma harzianum</i>	24
5.1	Matriz del diseño factorial y resultados experimentales de las respuestas	34
5.2	Análisis de los factores sobre la concentración máxima de biomasa	36
5.3	Análisis de varianza para la producción máxima de biomasa micelial de <i>T. harzianum</i> .	37
5.4	Análisis del efecto de los factores sobre la productividad de la producción de biomasa de <i>T. harzianum</i> .	39
5.5	Análisis de varianza de la productividad del proceso en la producción de biomasa micelial de <i>T. h.</i>	40
5.6	Análisis del efecto de los factores sobre la velocidad de crecimiento de <i>T. harzianum</i> .	43
5.7	Análisis de varianza de la velocidad de crecimiento de <i>T.harzianum</i> .	44
5.8	Condiciones de cultivo para obtener los valores más altos en las respuestas	45
5.9	Parámetros cinéticos y rendimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> como función de la concentración de sulfato de amonio y del extracto de levadura a pH 3.	49
5.10	Parámetros cinéticos y rendimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> como función de la concentración de sulfato de amonio y del extracto de	54

	levadura a pH 5.6.	
5.11	Concentraciones relativas de CO_2 , H_2CO_3 y HCO_3 en función del pH.	57
5.12	Comparación de la sensibilidad al estrés mecánico –medido como potencia volútrica) para diferentes cepas de <i>Trichoderma</i>	64
A1	Datos de un diseño factorial 2^3 , ejemplo de una planta piloto	79
A2	Signos para calcular los efectos del diseño factorial 2^3	80
A3	Cálculo de la probabilidad del efecto de un factor	82

Resumen

La agricultura depende importantemente de los pesticidas químicos para el control de plagas y enfermedades. El uso indiscriminado de ellos ha ocasionado daños a la salud y al ambiente, por lo que se han buscado alternativas para reducir o eliminar las dosis requeridas de los pesticidas. El control biológico es una alternativa con potencial. Los hongos del género *Trichoderma* están clasificados entre los agentes de control biológico más potentes debido al amplio espectro antagonista que presentan. Además, presentan la ventaja de estimular el crecimiento de algunas plantas. Para la aplicación de hongos como agentes de biocontrol, se ha estudiado el uso de esporas, micelio o ambos. Las esporas han sido las más utilizadas debido a su fácil producción y manejo. Con *Trichoderma*, la aplicación del micelio presenta claras ventajas sobre las esporas: el micelio es el que efectúa el micoparasitismo, principal mecanismo antagonista de *Trichoderma*; presenta una menor dependencia de la adición de nutrientes exógenos y de la humedad para su crecimiento en suelo; y es menos sensible a la fungitaxis. De lo anterior, destaca la importancia de desarrollar un proceso para la producción masiva de micelio viable de *Trichoderma* para su uso como agente de control biológico.

El objetivo del presente trabajo fue el evaluar el efecto de algunos factores nutricionales y de proceso sobre la producción de micelio y la viabilidad de *Trichoderma harzianum* cultivado en biorreactores de 14 L.

En hongos filamentosos, la determinación de la viabilidad es compleja debido a la también compleja estructura micelial (pluricelular) que presentan. En este trabajo se montó y validó una técnica basada en tinciones fluorescentes (utilizando diacetato de fluoresceína) y en el análisis de imágenes para la cuantificación de la viabilidad del micelio generado en cultivo sumergido. Se demostró una correlación entre la velocidad de crecimiento del hongo y el área teñida con FDA ($r= 0.96$). La técnica propuesta es una herramienta rápida y confiable, en relación a las metodologías comúnmente utilizadas para cultivos miceliales. Mediante ésta, es posible cuantificar la concentración de biomasa viable generada en el cultivo sumergido de *Trichoderma harzianum*.

Mediante un diseño factorial se evaluó el efecto del pH (3 y 5.6), la concentración de sulfato de amonio (0.94 y 5.6 g/L) y la adición de extracto de levadura (0 y 1.5 g/L) sobre la concentración de biomasa, la velocidad del crecimiento y la productividad del proceso del hongo cultivado en biorreactores de 14 L. El análisis de varianza del factorial demostró que el extracto de levadura y el pH son los factores que más impacto tienen sobre las respuestas evaluadas. En ésta primera etapa se obtuvieron 9.2 g/L de biomasa en 96 horas de cultivo, con una productividad de 95 mg de biomasa/L·h y un rendimiento ($\frac{\text{g}_{\text{biomasa producida}}}{\text{g}_{\text{sustrato consumido}}}$) del 42.8 %. Sin embargo, el proceso presentó limitaciones en la fuente de nitrógeno (proporcionada como sulfato de amonio), en el mezclado y en el oxígeno disuelto del caldo de fermentación. Para superar estas limitaciones se realizaron adiciones intermitentes de hidróxido de amonio al caldo de cultivo, una adición de glucosa, se utilizó un difusor de anillo y se emplearon turbinas de mayor diámetro. Con estos cambios se obtuvieron hasta 13 g/L de biomasa, con una productividad de 154.7 mg de biomasa/L·h, y un rendimiento del 39.3% ($\frac{\text{g}_{\text{biomasa producida}}}{\text{g}_{\text{sustrato consumido}}}$). Los resultados sugieren posibles efectos inhibitorios del ion amonio sobre el crecimiento del hongo y la posible influencia del CO₂ sobre la esporulación del hongo.

Se logró obtener hasta 8 g/L de biomasa micelial viable de *Trichoderma harzianum* en 84 horas de cultivo. Este resultado es importante y significativo dado que se refiere a biomasa micelial útil (viable) para su uso en control biológico.

Capítulo I

Introducción

En la actualidad, el control de plagas y enfermedades en la agricultura depende en gran medida de los pesticidas químicos. Sin embargo, el control de las enfermedades y plagas ha sido insuficiente debido a la resistencia que se ha inducido en los fitopatógenos, además de los efectos nocivos que su uso ocasiona (contaminación del ambiente y daños a la salud). El control biológico de plagas o enfermedades es una alternativa interesante al control químico ya que involucra el uso de un microorganismo o de microorganismos cuya actividad biológica antagoniza el desarrollo de la plaga o enfermedad en la planta. Debido a este antagonismo se logra reducir o eliminar la incidencia de la plaga o enfermedad. Por ello, el control biológico representa una alternativa con potencial para el control de depredadores o infecciones en plantas.

Los hongos del género *Trichoderma* se clasifican entre los agentes de control biológico (ACB) más potentes. Son eficaces contra una gran variedad de fitopatógenos de diferentes cultivos de interés comercial como fresa, papa, jitomate, cebolla, ajo, trigo (Chet, 1987), algodón, uva, lechuga, chícharo, ciruela, manzana, zanahoria y maíz (Hjeljord y Tronsmo, 1998). Además, inducen e incrementan la respuesta al crecimiento de varias especies de vegetales y plantas de ornato (Chet, 1987). *Trichoderma* es también uno de los pocos ACB que presentan la capacidad de degradar los esclerocios –cuerpos de gran resistencia y longevidad- producidos por microorganismos como *Sclerotium rolfsii* (Elad *et al*, 1984). En México, se han presentado graves pérdidas en el cultivo del ajo por la infección de microorganismos como *Sclerotium cepivorum*, que producen la enfermedad denominada “pudrición blanca”. La incidencia de la enfermedad está relacionada con la capacidad de *S. cepivorum* de producir los esclerocios que presentan una muy alta resistencia al ataque microbiano y pueden sobrevivir por largos periodos de tiempo en el suelo (Benhamou y Chet, 1996). Los agentes químicos han resultado insuficientes y su uso se ha limitado también por la dificultad de eliminar o degradar los químicos del suelo (Whipps y Budge, 1990).

En la aplicación de *Trichoderma* como ACB, se ha estudiado el uso de esporas, micelio o mezclas de ambos. Las esporas han sido las más utilizadas debido, probablemente, a su fácil producción y manejo. Sin embargo, se ha demostrado que la forma micelial presenta ventajas importantes que hacen más eficiente su uso en suelo. Éstas incluyen:

- a) el micelio es el que efectúa el micoparasitismo, principal mecanismo antagonista de *Trichoderma*. El parasitismo de *Trichoderma* es destructivo, causando la muerte del hongo huésped (Chet *et al*, 1998)*.
- b) presenta una menor dependencia de la adición de nutrientes exógenos y de la actividad de agua para su crecimiento (la germinación de las esporas requiere una alta disponibilidad de agua)
- c) es menos sensible a la fungitaxis, consecuentemente, es capaz de colonizar rápidamente el suelo, incrementando su densidad de población

En pruebas de laboratorio, invernadero y campo, el micelio de diferentes cepas de *Trichoderma* ha mostrado efectividad como agente de control biológico. Para la aplicación comercial de éste hongo, con este fin, es necesaria su producción masiva, siendo la fermentación líquida, en biorreactores, el sistema más apropiado y donde resulta importante caracterizar los parámetros relevantes del proceso.

Existen diversos reportes sobre el cultivo sumergido de *Trichoderma spp.* El hongo se ha utilizado para la producción de enzimas como celulasas y xilanasas (Lejeune y Baron, 1995), compuestos de aroma como 6-pentil- α -pirona (Serrano-Carreón *et al*, 1992) y γ -decalactona (Serrano-Carreón *et al*, 1997) y la aplicación de la biomasa misma para control biológico (Lewis y Papavizas, 1984). En el cultivo de este hongo para la producción de biomasa y/o de un determinado metabolito de interés, se han evaluado diferentes aspectos del proceso como la composición del medio de cultivo (Jackson *et al*, 1991a; Lejeune y Baron, 1995; Marten *et al*, 1996), el oxígeno disuelto (Marten *et al*, 1996), la agitación (Lejeune y Baron, 1995; Felse y Panda, 2000), diferentes geometrías de impulsores (Godoy-Silva *et al*, 1997), combinación impulsor-difusor (Rocha-Valadez *et al*, 2000). Sin embargo, la viabilidad del microorganismo no se ha evaluado específica y rigurosamente, a pesar de la fundamental importancia que presenta en cualquier proceso.

*En la literatura, tradicionalmente se ha aplicado el término micoparasitismo al antagonismo destructivo de *Trichoderma*. Sin embargo, dado el efecto destructivo que ejerce, este micoparasitismo bien podría definirse como un micoantagonismo o bien una micodepredación. Para utilizar los mismos términos, en este trabajo utilizaremos el término micoparasitismo.

En el área del control biológico, la determinación de la viabilidad del antagonista adquiere especial interés. En el caso de *Trichoderma spp.*, se ha demostrado que uno de los principales mecanismos de antagonismo es el micoparasitismo, por lo que una alta viabilidad del mismo es una característica indispensable. Sin embargo, en hongos filamentosos, la determinación de la viabilidad es compleja debido a la también compleja estructura micelial (pluricelular) que presentan. En ellos, existe una amplia distribución de edades celulares (a diferencia de lo que ocurre con organismos unicelulares) debido a que el crecimiento se localiza en las puntas de la hifa. Por ello, desde etapas tempranas del cultivo, se presentan diferentes grados de diferenciación celular.

El caldo de fermentación de *Trichoderma* desarrolla características no-Newtonianas como consecuencia del crecimiento micelial. Por ello, frecuentemente se presentan deficiencias en el mezclado y consecuentemente en la transferencia de masa y calor del proceso. El incremento en la agitación y el uso de diferentes impulsores es una forma comúnmente utilizada para el mejoramiento del proceso. Sin embargo, debe considerarse que cada microorganismo presenta un umbral de tolerancia al estrés mecánico y depende de la resistencia de las hifas a éste estrés mecánico. El excederse en éste nivel de tolerancia puede provocar efectos adversos a las células, que a su vez ocasionen un detrimento en la productividad del proceso. Por ello, resulta indispensable establecer las condiciones de agitación óptimas para cada microorganismo y/o metabolito de interés (Justen *et al*, 1996).

El objetivo principal de éste trabajo fue estudiar el efecto de factores nutricionales y de proceso sobre el crecimiento y la viabilidad de *Trichoderma harzianum* cultivado en biorreactores de 14 L. Para lograr lo anterior, fue necesario en primer término desarrollar una metodología confiable para cuantificar la viabilidad del hongo.

Capítulo II

Antecedentes

El uso indiscriminado de los pesticidas químicos en la agricultura ha ocasionado la contaminación de los suelos y de los mantos freáticos. Además, la variabilidad genética de los fitopatógenos es tal, que eventualmente surgen cepas resistentes, por lo que se deben incrementar las dosis de los pesticidas requeridos. Sin embargo, a pesar de este incremento, se sabe que, a nivel mundial, más del 50 % de la producción agrícola se pierde debido a plagas y/o enfermedades (Van Loon, 2000). La mayoría de estas enfermedades son producidas por hongos (Pelczar *et al*, 1982). Una estrategia para abatir estas pérdidas ha sido el desarrollo de nuevos fungicidas. Sin embargo los efectos a la salud son alarmantes. En la última década, en 38 estados de los Estados Unidos se ha detectado la presencia de 70 pesticidas en muestras de agua de desecho. Entre los pesticidas encontrados se incluyen fumigantes de suelo. Un estudio publicado por la agencia de protección al ambiente de los Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés) señaló que tan sólo en los Estados Unidos, de 3000 a 6000 casos anuales de cáncer son inducidos por residuos de pesticidas en alimentos y de entre 50 y 100 casos anuales son inducidos por la exposición a los pesticidas durante su aplicación (Herrera-Estrella y Chet, 1998).

Los daños ocasionados a la salud han promovido la búsqueda y desarrollo de nuevas estrategias para el control de plagas y enfermedades, con los cuales se reduzcan o eliminen las dosis de pesticidas químicos requeridos. En este sentido, el control biológico es una alternativa de gran potencial para reducir el daño causado por los patógenos de plantas (Herrera-Estrella y Chet, 1998).

El control biológico es el uso de organismos vivos como agentes de control de plagas y enfermedades (Thomas y Wills, 1998). Involucra el uso de un microorganismo o de microorganismos cuya actividad biológica antagoniza el desarrollo de la plaga o enfermedad en la planta. Debido a este antagonismo se logra reducir o eliminar la incidencia de la plaga o infección. Independientemente de la actividad antagonista, un agente de control biológico

efectivo implica la capacidad del agente de sobrevivir en el hábitat donde es aplicado (Elad y Shtienberg, 1995).

2.1 Cepas del género *Trichoderma* como agentes de control biológico

Las cepas del género de *Trichoderma* se han clasificado como los agentes de control biológico más potentes debido a que reúnen varias características especialmente importantes. Por un lado, se encuentra el alto grado de adaptación ecológica que presentan y que se refleja en el hecho de que estos hongos son comunes en suelos de todo el mundo, manteniéndose bajo diferentes condiciones ambientales y diferentes nutrientes (Hjeljord y Tronsmo, 1998). Además, para su producción masiva en condiciones *in vitro* presentan la facilidad de cultivarse sobre diferentes sustratos de bajo costo (Hjeljord y Tronsmo, 1998).

Gran parte del potencial de las cepas del género *Trichoderma* radica en el hecho de que presentan un gran espectro de antagonismo ya que son capaces de atacar una gran variedad de fitopatógenos como *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Sclerotinia*, *Phytophthora*, que infectan cultivos de interés comercial como maíz, algodón, uva, lechuga, cebolla, chícharo, ciruela, manzana, zanahoria, pepino, tomate, frijol, trigo, rábano. Los trabajos de Chet (1987), de Hjeljord y Tronsmo (1998) y de Chet *et al* (1998) incluyen una revisión sobre el espectro antagonista de *Trichoderma*. Entre los fitopatógenos que antagoniza *Trichoderma*, existen algunos de especial importancia, por un lado, por el amplio espectro patogénico que presentan y por el otro, por la resistencia que han generado a los fungicidas químicos. Por ejemplo, *Botrytis cinerea* causa severas pérdidas en cosechas de frutas (uva, manzana y fresa), vegetales (tomate, berenjena, pimiento, pepino) y plantas ornamentales. El control químico ha sido muy utilizado para reducir los daños de éste patógeno; sin embargo, las aplicaciones repetidas de fungicidas potentes como el benzimidazol y dicarboximidas, han generado la resistencia del patógeno (Elad y Shtienberg, 1995). Un método alternativo para el control de *B. cinerea* es por medio de Agentes de Control Biológico (ACB). Se ha reportado el control de *B. cinerea* por *Trichoderma harzianum* (Elad y Shtienberg, 1995).

Trichoderma ha demostrado efectividad para controlar hongos patógenos que forman esclerocios (Inbar *et al*, 1996). Los esclerocios -cuerpos de resistencia de gran dureza y longevidad-, tienen

una muy alta resistencia al ataque microbiano (Benhamou y Chet, 1996), y son característicos de microorganismos del género *Sclerotium* y *Esclerotinia*. Los suelos contaminados por esclerocios son difícilmente explotables agrónomicamente. Los microorganismos que producen esclerocios se distinguen por el amplio espectro de patogenicidad que presentan hacia diferentes cultivos. El hongo *Sclerotinia sclerotiorum* infecta 361 especies de 225 géneros que incluyen cultivos importantes como frijol, chícharo, lechuga, cacahuete, jitomate, apio y girasol (Whipps y Budge, 1990). *Sclerotium rolfii* es considerado como uno de los patógenos más ampliamente distribuido y destructivo de varios cultivos económicamente importantes. Infecta alrededor de 500 especies de plantas (Mukherjee y Raghu, 1997). El control químico de la enfermedad causada por patógenos de este género ha resultado insuficiente debido a que los esclerocios tienen una fuerte resistencia a la degradación química. El uso de químicos se ha limitado también por la dificultad de eliminar o degradar los químicos del suelo (Whipps y Budge, 1990), así como por su alto costo (Inbar *et al*, 1996). Se ha observado que al aplicar *Trichoderma* en el suelo, se reduce la densidad de población de *Sclerotium rolfii* (Benhamou y Chet, 1996). *S. rolfii*, se caracteriza también por infecciones que ocasiona en etapas de postcosecha (almacenamiento y tránsito) de vegetales y frutas. En éste caso, los fungicidas químicos no son aplicables debido a los daños a la salud, provocados por los residuos de los pesticidas en los productos. La aplicación de ACB es una alternativa viable para evitar infecciones en éstas etapas. El trabajo reportado por Mukherjee y Raghu (1997) muestra el potencial de *Trichoderma* en la inhibición de *S. rolfii* para evitar infecciones en vegetales y frutas en la postcosecha.

2.2 *Trichoderma harzianum* y su interacción con hongos fitopatógenos

La actividad antagonista de las especies de *Trichoderma* hacia hongos fitopatógenos fue reportada por primera vez en 1932 (Weindling, 1932). Sin embargo, sólo hasta hace poco, con el creciente interés del uso de sistemas de control biológico (relacionado con aspectos ecológicos y económicos) ha permitido el desarrollo de estudios relacionados con la biología de la interacción *Trichoderma*-huésped. Existen diferentes mecanismos implicados en el antagonismo de las cepas de *Trichoderma* hacia hongos fitopatógenos. En general, son principalmente tres: micoparasitismo, antibiosis y competencia por nutrientes.

El micoparasitismo es el ataque directo de un hongo sobre otro y es uno de los mecanismos principales de las interacciones antagonistas entre microorganismos (Chet, 1987). El parasitismo de *Trichoderma* es destructivo, causando la muerte del hongo huésped (Chet *et al.*, 1998). *Trichoderma* puede detectar a distancia a su huésped e iniciar un crecimiento focalizado hacia el hongo fitopatógeno (Goldman *et al.*, 1994). Las bases bioquímicas de éste fenómeno aún no han sido bien establecidas, pero se especula que éste crecimiento focalizado es inducido por gradientes nutricionales provocados por el hospedero (Chet, 1987). Algunas cepas de *Trichoderma*, además de crecer en forma focalizada, producen antibióticos volátiles que inhiben y, probablemente, predisponen a las hifas del hospedero para la infección, aún antes de que exista contacto físico entre los microorganismos. Después del reconocimiento del hospedero, el micelio de *Trichoderma* se adhiere al mismo y crece alrededor de sus hifas (Benhamou y Chet, 1996). El micelio de *Trichoderma* produce cuerpos de adhesión tipo apresorio y comienza a segregar proteasas, quitinasas y β -glucanasas, con lo cual penetra dentro del hospedero y, finalmente, lo colapsa y mata (Chet *et al.*, 1981).

Los efectos letales producidos durante el proceso micoparasítico es la forma principal en que *Trichoderma* efectúa el control de las enfermedades en plantas. Otro hecho interesante es que tanto las enzimas líticas, como algunos antibióticos volátiles (Schimbock *et al.*, 1994; Cooney and Lauren, 1998) son sobreproducidos en presencia de paredes celulares del fitopatógeno. De hecho, las proteasas, quitinasas y β -glucanasas son inducidas durante la interacción parasítica de *Trichoderma* y poca o nula expresión genética se presenta cuando *Trichoderma* crece sin la presencia del patógeno (Carsolio *et al.*, 1994; Flores *et al.*, 1997) Por ejemplo, se han reportado altos niveles de expresión del gen *prb1* –que codifica para una proteinasa- durante la interacción de *T. harzianum* con *R. solani* (Flores *et al.*, 1997) y del gen *ech -42*, que codifica para una quitinasa (Carsolio *et al.*, 1994). Estas evidencias permiten afirmar que las condiciones indispensables para el uso eficaz de *Trichoderma* como agente de control biológico es el contar con una cepa micoparasítica formulada y acondicionada de tal forma que pueda crecer (esto es, se encuentre viable) una vez inoculada en el suelo.

2.3 *Trichoderma* como estimulador del crecimiento en plantas

Las cepas de *Trichoderma* presentan también actividad de estimulación de crecimiento en plantas (Altomare *et al*, 1999). Éste fenómeno puede atribuirse al biocontrol de patógenos menores en la rizosfera con lo que se mejora el consumo de nutrientes, libera nutrientes desde el suelo y estimula la -producción de hormonas, lo que podría explicar –parcialmente-, el incremento del crecimiento de las plantas en las que se aplicó *Trichoderma* (Yedidia *et al*, 1999). Por otra parte, *Trichoderma* solubiliza compuestos (rocas de fosfato, MnO_2 , Fe_2O_3 y zinc metálico) que la planta no puede asimilar y que son importantes para el control de enfermedades y para el crecimiento de las plantas.

2.4 Aplicación de hongos en suelo como agentes de control biológico

Uno de los aspectos importantes a considerar en la aplicación de hongos filamentosos como agentes de control biológico es el tipo de propágulo a utilizar. Dependiendo de las condiciones de cultivo, *Trichoderma* crece en tres tipos de propágulos: micelio, clamidiosporas y esporas (Agosin y Aguilera, 1998).

El micelio, que constituye la estructura vegetativa de un hongo, está constituido por un conjunto de hifas. Las hifas son filamentos tubulares microscópicos. Las esporas son unidades reproductivas especializadas, generalmente esféricas. Las características de éstas se utilizan como criterio taxonómico por su variación en tamaño, aspecto, color, etc. (Deacon, 1980). Las esporas de *Trichoderma harzianum* son típicamente verdes y ovoides. Su tamaño va de 2.7-3.5 μm x 2.1-2.6 μm (Gams y Bissett, 1998). Las clamidiosporas son un tipo de taloesporas. Son redondas, de pared más gruesa y se les encuentra en las hifas en forma terminal, lateral o intercalada (Deacon, 1980). En la mayoría de las especies, las clamidiosporas son más grandes que las esporas (de 6 a 15 μm de diámetro). En el género *Trichoderma*, las clamidiosporas están presentes en forma abundante en las hifas producidas por fermentación líquida, en forma intercalada o terminal (Gams and Bisett, 1998).

Hasta éste momento, se ha dado poca atención a la evaluación del tipo de propágulo a aplicar en control biológico, a pesar de que ésto implica aspectos importantes de considerar tanto en la producción masiva del ACB, como en el antagonismo que ejerza en suelo.

2.5 Ventajas de la aplicación de biomasa micelial con respecto a esporas de *Trichoderma* como agente de control biológico

Las clamidiosporas no son utilizadas en control biológico debido a que los tiempos de fermentación requeridos para su producción son muy largos -de 2 a 3 semanas- y la cantidad de propágulos viables es muy bajo (aproximadamente 8 %) (Jin *et al*, 1991). Además, se producen en menor proporción que las esporas (Harman *et al*, 1991).

Las esporas son el tipo de propágulo más estudiado debido principalmente a que se producen abundantemente en medio sólido y a que son fáciles de manejar (Lewis y Papavizas, 1985). Sin embargo, existen diferentes estudios que demuestran una baja efectividad en control biológico al usar éste tipo de propágulo. Lewis y Papavizas (1984) evaluaron el uso de micelio y de esporas de cepas de *Trichoderma*, *Gliocadium* y *Talaromyces* en invernadero. En la evaluación de las cepas de *Trichoderma*, la forma micelial redujo significativamente la enfermedad ocasionada por *Rhizoctonia solani* en cultivos de jitomate y algodón. Además, la reducción de la enfermedad correlacionó, por un lado, con la disminución en la densidad de población del patógeno en el suelo y por el otro, con un incremento en la densidad de población del antagonista. Las esporas inoculadas en suelo no germinaron, por el contrario, la viabilidad de la población disminuyó hasta en un 50 %. Esto es importante ya que para obtener un control biológico efectivo, una característica importante es la proliferación del antagonista después de introducirlo en el suelo o en la rizosfera (Lewis y Papavizas, 1984; Elad y Shtienberg, 1995).

En 1985, éstos mismos autores (Lewis y Papavizas, 1985) reportaron la evaluación de diez cepas de *Trichoderma* y cuatro de *Gliocadium*. Evaluaron la forma micelial y las esporas en cultivos de algodón, remolacha y rábano. El micelio de ambas cepas fue más efectivo que las esporas en la reducción de la sobrevivencia de *R. solani*. La población del antagonista -inoculada en su forma micelial- se incrementó significativamente respecto de la concentración inoculada inicialmente. Las esporas no fueron efectivas, con excepción de su aplicación en semillas. Los autores sugieren que las hifas (al contrario de las esporas) parecen ser insensibles a fungistáticos que están

frecuentemente presentes en suelo. En general, las hifas y clamidiosporas son menos sensibles que las esporas a los fungistáticos presentes en suelo (Hjeljord y Tronsmo, 1998).

Existen factores fisicoquímicos (humedad, adición de nutrientes exógenos, temperatura, pH) que repercuten también en la eficacia del tipo de propágulo en biocontrol. La germinación de esporas es dependiente de la humedad. En el micoparasitismo, las esporas tienen que germinar y formar el micelio, siendo ésta germinación especialmente dependiente de la humedad (Chet *et al*, 1998). La dependencia de nutrientes para la germinación y/o crecimiento es también diferente dependiendo del tipo de propágulo. Las hifas y clamidiosporas de *Trichoderma* son menos dependientes de la adición de nutrientes exógenos con respecto a las esporas.

Una vez demostrado que una cepa o microorganismo muestra características potenciales para el control de enfermedades –mediante pruebas de laboratorio, invernadero y campo-, la siguiente etapa es la producción de una biomasa efectiva. Se han usado para éstos propósitos sistemas de fermentación líquida y sólida (Jackson, 1997). El mejor sistema es la fermentación líquida en biorreactores, en donde es importante evaluar los parámetros nutricionales y de proceso que influyan en el crecimiento y la viabilidad del microorganismo. En el caso de cepas del género *Trichoderma*, en la literatura no se han realizado estudios en los que se evalúen las condiciones de cultivo y su repercusión –si la hubiera-, sobre la viabilidad de la biomasa micelial de *Trichoderma* producida. Como se ha mencionado, la viabilidad es una característica de crucial importancia para el éxito de *Trichoderma* como ACB.

2.6 Producción de biomasa micelial por fermentación líquida

2.6.1 Características y repercusiones del crecimiento de hongos filamentosos en fermentación líquida

En el crecimiento micelial de hongos filamentosos pueden desarrollarse dos tipos extremos de morfología: agregados celulares compactos (“pellets”) o la forma filamentosa –generalmente referidos como micelio disperso- (Justen, 1996; Gibbs *et al*, 2000). La morfología desarrollada depende de las condiciones de cultivo y del microorganismo utilizado (Justen, 1996; Gibbs *et al*, 2000). Los “pellets” consisten en una masa compacta de hifas, que producen caldos con características Newtonianas y de baja viscosidad. El mezclado del proceso no se ve limitado y los

problemas de transferencia de masa son menores respecto a cuando se genera la forma filamentosa (Vanags *et al*, 1995). Sin embargo, a medida que el tamaño de los “pellets” se incrementa, se generan limitaciones difusionales de los nutrientes hacia el centro del mismo. El tamaño y la compactabilidad de los “pellets” puede ser influenciado por parámetros como el pH del cultivo, la concentración del inóculo, y las condiciones de agitación (Schügerl *et al*, 1998).

La forma filamentosa genera redes tridimensionales que transforman los caldos de fermentación en fluidos altamente viscosos, con características no-Newtonianas y una alta demanda de oxígeno, donde la transferencia de masa y homogeneización del sistema se ven drásticamente limitados (Vanags *et al*, 1995), afectando la viabilidad del microorganismo y su crecimiento (Domingues *et al*, 2000). Las limitaciones en la transferencia de masa pueden contrarrestarse con el incremento en la velocidad de agitación; sin embargo, existe un límite superior de agitación, determinado por los efectos adversos del estrés mecánico sobre el microorganismo (ruptura de células, vacuolización, autólisis, cambios en el estado morfológico y en el crecimiento del microorganismo, que se reflejan importantemente en la productividad del proceso (Felse y Panda, 2000). En los procesos de fermentación líquida de cultivos miceliales, la velocidad de agitación óptima depende de la resistencia de las hifas al estrés mecánico, de la morfología, de la composición del medio de cultivo, del pH y otras (Felse y Panda, 2000). Así, el mezclado de cultivos miceliales en el que pueda mantenerse una alta concentración celular viable, requieren de especial atención.

En procesos de fermentación líquida con hongos filamentosos, se ha reportado la interrelación de diferentes factores tales como la concentración y naturaleza de la fuente de carbono, la relación carbono/nitrógeno, la concentración de inóculo, agitación, pH, oxígeno disuelto, temperatura, fuerza iónica y adición de tensoactivos sobre la morfología, la producción de biomasa y la producción de metabolitos (Schügerl *et al*, 1998).

Entre los estudios que han evaluado el efecto de parámetros nutricionales y de proceso sobre la morfología y producción de metabolitos por hongos, uno de los más representativos es el de Schügerl y colaboradores (1998), quienes realizaron un estudio exhaustivo de la influencia de este tipo de parámetros sobre la morfología y la producción de la enzima xilanasas de *Aspergillus awamori*. Los autores evaluaron el efecto del pH, la temperatura, la concentración de inóculo, la

velocidad de agitación y el uso de *baffles* (en matraces), diferentes medios de cultivo y precultivo y dos tipos de biorreactores. Observaron que utilizando bajas concentraciones de esporas, se generan “pellets” grandes, mientras que al incrementar la concentración de esporas, el tamaño del “pellet” disminuye, e inclusive, se genera la forma filamentosa. La más alta actividad de la enzima se obtenía al utilizar las más altas concentraciones de esporas en el inóculo, concentraciones con las que se generaron “pellets” pequeños y micelio filamentoso. Los autores estudiaron también en forma cualitativa -mediante tinciones fluorescentes-, la actividad metabólica de las diferentes morfologías observadas en el hongo. Comparando “pellets” pequeños y grandes, encontraron que, en el caso de los pequeños, en el centro de ellos, podían distinguirse zonas metabólicamente inactivas. En “pellets” más grandes, la zona metabólicamente inactiva era mayor, de tal forma que sólo la periferia del “pellet” se encontraba activa. Estas observaciones son importantes porque sugieren una relación entre la morfología y la viabilidad de los cultivos miceliales.

2.7 Cultivos de *Trichoderma sp*

Trichoderma sp. es un microorganismo de interés industrial. Se ha utilizado para la producción de enzimas como celulasas y xilanasas (Lejeune y Baron , 1995), compuestos de aroma como 6-pentil- α -pirona (Serrano-Carreón *et al*, 1992) y γ -decalactona (Serrano-Carreón *et al*, 1997) y la aplicación de la biomasa misma para control biológico (Lewis y Papavizas, 1984). Durante el proceso de fermentación con este hongo, se desarrollan características no-Newtonianas en el caldo de cultivo, lo que puede ocasionar limitaciones en la transferencia de masa en el caldo de cultivo y, por consecuencia, afectar drásticamente la viabilidad del micelio.

2.7.1 Aspectos nutricionales y de proceso en el cultivo de *Trichoderma sp* cultivado en matraces

En la producción de biomasa micelial de *Trichoderma*, los aspectos nutricionales han sido estudiados principalmente a nivel matraz. Jackson y colaboradores (1991a) evaluaron la relación carbono/nitrógeno (C/N), diferentes concentraciones de Fe, Mg, K, P, S, así como algunas vitaminas, sobre la producción de biomasa micelial de *Gliocadium virens*, *Trichoderma pseudokoningi* y dos cepas de *Trichoderma viride* (IMI 322659 e IMI 322663). Se obtuvo un incremento significativo en la producción de biomasa para todos los hongos, al incrementar la

relación C/N de 5 a 155. La adición de Fe incrementó significativamente el crecimiento de los hongos evaluados. Al evaluar diferentes concentraciones de Fe (3.28, 32.8 y 164.3 mg/L), la concentración óptima fue de 3.28 mg/L. De igual forma, la adición de Mg, P, K, y S ejercieron un efecto importante en el crecimiento de *G. virens* y de *T. viride* (IMI 322659). El crecimiento de *T. pseudokoningii* y de *T. viride* (IMI 322663) se redujo sólo en la ausencia de Mg y P. En la evaluación de las vitaminas, los requerimientos de cada una de ellas fue también diferente: el crecimiento de *G. virens* fue significativamente mayor con la adición de biotina. *T. pseudokoningii* creció más con tiamina, *T. viride* (IMI 322663) con el ácido p-aminobenzoico y *T. viride* (IMI 322659) no presentó diferencias con la adición de ninguna de las tres vitaminas. Este estudio demuestra que los requerimientos nutricionales son específicos para cada cepa. Las concentraciones de biomasa más altas obtenidas en éste trabajo estuvieron en el rango de entre 15 y 18 g /L (para los cuatro hongos estudiados). Sin embargo, no se consideró (al menos explícitamente) la posible evaporación del medio de cultivo en el matraz (la biomasa se evaluó después de 7 días de cultivo.)

En otro estudio, Jackson y colaboradores (1991b) reportaron los efectos de la temperatura (entre 5 y 40°C), del pH (entre 2.5 y 7.4) y el potencial de agua sobre el crecimiento de las cuatro cepas utilizadas en el estudio anterior (Jackson *et al*, 1991a). La mayor velocidad de extensión lineal (en medio sólido) se observó a 25°C para todas las cepas. El pH se evaluó en cultivo líquido, estático, en matraces. La máxima producción de biomasa se obtuvo a pH de 4.6 para todas las cepas. Sin embargo, *T. viride* (IMI 322659) mostró una tendencia a crecer mejor a pH más neutros. Por el contrario, *T. viride* (IMI 322663) tendió a crecer mejor a pH más ácidos. La disminución del potencial de agua (ajustado con polietilenglicol 6000, NaCl, o glicerol) de 0.7-MPa a 14-MPa en general afectó la velocidad de extensión de las hifas de todos los hongos.

Serrano-Carreón *et al* (1992) reportaron la influencia de la fuente de carbono y de nitrógeno sobre el crecimiento y acumulación lipídica de dos cepas de *Trichoderma* (*viride*, aislado no. 26 y *harzianum* IMI 206040) a partir de tres diferentes fuentes de carbono (glucosa, xilosa y sacarosa) y de tres diferentes fuentes de nitrógeno (sulfato de amonio, fosfato de amonio y nitrato de sodio). En general, ambas cepas consumieron preferencialmente la glucosa y la sacarosa. Respecto de las fuentes de nitrógeno, las sales de amonio fueron más favorables para el crecimiento de los dos hongos. El mayor crecimiento micelial y la mayor producción de lípidos

se generó en el medio constituido por glucosa y sulfato de amonio (para ambas cepas). Sin embargo, el crecimiento micelial entre ambos microorganismos fue significativamente diferente (la concentración de biomasa fue de dos a tres veces mayor en el cultivo de *T. harzianum*).

Domínguez *et al* (2000) evaluaron la concentración de inóculo (10^5 y 10^7 esporas/mL) y la composición del medio de cultivo (*Tween* 80 -por sí solo-, la reducción -a la mitad de la concentración inicial-, de iones metálicos utilizada en el medio, la combinación de *Tween* 80-extracto de levadura-peptona y la combinación de *Tween* 80-extracto de levadura-peptona y *solka floc* -éste último en lugar de lactosa-) sobre la morfología micelial y la producción de celulasas por *Trichoderma reesei* cultivado en matraces. El efecto de la concentración de inóculo sobre la morfología del hongo fue claro. Al utilizar 10^7 esporas/mL, el hongo creció en forma de agregados laxos en todos los casos (no importando la composición del medio de cultivo). Con 10^5 esp/mL la composición del medio sí influyó sobre la morfología desarrollada por el hongo, creciendo como “pellets” (para el caso en que se redujeron las concentraciones de los iones metálicos y para el cultivo control) y como agregados laxos para el resto de las condiciones. La concentración de proteína extracelular y la actividad de la enzima variaron con las condiciones evaluadas. En general, las condiciones que indujeron la formación de “pellets” mostraron un decremento de la concentración de proteína y de la actividad de la enzima. Los autores no reportaron las concentraciones de biomasa generadas en éstos cultivos.

Estos trabajos demuestran la importancia de evaluar los requerimientos nutricionales para cada microorganismo. Por otro lado, es necesario también realizar estudios en biorreactores. Si bien es cierto que el uso de matraces presenta ventajas (se han considerado como la manera más rápida y barata para realizar la optimización de un medio de cultivo, Kennedy *et al*, 1994), las desventajas de utilizar estos sistemas son aún más importantes: el pH del cultivo no es controlado, se carece de un mezclado adecuado, la capacidad de transferencia de oxígeno es en general pobre y los resultados en biorreactores no son reproducibles con lo obtenido en matraces. Otro aspecto importante es el fenómeno de evaporación del medio de cultivo, especialmente cuando se requieren tiempos largos de cultivo, como en el caso del cultivo de microorganismos eucariotes. Por otro lado, se ha observado que en el cultivo de microorganismos miceliales, la morfología desarrollada puede ser diferente en el matraz comparada con la obtenida en biorreactores (Kennedy *et al*, 1994). Es importante mencionar que cada cepa tiene sus requerimientos

nutricionales muy específicos y condiciones de proceso también particulares (Justen, 1996). De ahí la importancia de evaluar específicamente estos aspectos para cada cepa.

2.7.2 Aspectos nutricionales y de proceso en el cultivo de *Trichoderma* sp. cultivado en biorreactores

Los estudios realizados en fermentadores sobre la evaluación de la influencia de las condiciones de cultivo en la producción de biomasa micelial para su aplicación en control biológico son -por un lado- escasos y -por el otro-, en los que existen, no se ha realizado una evaluación completa en términos de la concentración de la biomasa y de la viabilidad de ésta. Por ejemplo, Papavizas y colaboradores (1984) realizaron cinéticas de crecimiento micelial de *Gliocadium virens*, *T. harzianum*, *T. viride* y *T. flavus* en un medio a base de melaza y levadura para pan en biorreactores de 20 L. Los autores reportaron que el tiempo de cultivo necesario para obtener la mayor concentración de biomasa (que en éste caso fueron clamidiosporas) fue de entre 10 y 15 días (**tabla 2.1**). Si bien los autores resaltan el uso de materia prima barata (melaza y levadura para pan), los tiempos de fermentación fueron muy largos. Ésto es importante ya que se sabe que tiempos prolongados de fermentación y bajos rendimientos se traducen en altos costos de producción. El reducir los tiempos de fermentación puede ser el factor más importante en la reducción de los costos de producción para éste tipo de procesos (Jackson, 1997). Sin embargo, en ese trabajo no se realizó una evaluación de los parámetros de proceso que pudieran influir sobre la producción de la biomasa. Como se presenta en la **tabla 2.1** y como podrá compararse con otros estudios que se citan posteriormente, las concentraciones de biomasa no son muy altas si consideramos que los tiempos de fermentación fueron muy largos (entre 10 y 15 días) y lo que es más importante, la viabilidad de la biomasa generada en el proceso de fermentación no se evaluó.

El cultivo de *Trichoderma* en biorreactores se ha estudiado principalmente para la producción de enzimas como celulasas (Mukataka *et al*; 1988, Lejeune y Baron, 1995; Marten 1996), quitinasas (Felse y Panda, 2000), de compuestos de aroma como la 6-pentil- α -pirona y γ -decalactona (Godoy-Silva *et al*, 1997) y de antibióticos como trichodermina (Apsite *et al*, 1998).

Tabla 2.1 Producción de biomasa de diferentes cepas de *Trichoderma* y *Gliocadium virens.**

Cepa	Conc. de biomasa (g/L)	Tiempo de cultivo (días)
<i>Trichoderma hamatum</i>	8	10
<i>Trichoderma harzianum</i>	9	15
<i>Gliocadium virens</i>	12	15
<i>Trichoderma viride</i>	12	15

Medio constituido por melaza y levadura para pan

*(adaptado de Papavizas *et al*, 1984)

Se ha estudiado también la morfología desarrollada por el hongo (Lejeune y Baron, 1995) y el crecimiento micelial (Rocha-Valadez *et al*, 2000). En estos trabajos se han evaluado aspectos como la composición del medio de cultivo, el pH, la agitación, diferentes geometrías de impulsores y la combinación impulsor-difusor, sobre la producción de la biomasa y/o de un determinado metabolito de interés. En la **tabla 2.2** se presenta un resumen de los principales aspectos evaluados en éstos trabajos. Para fines comparativos con el presente estudio, se muestran también las concentraciones de biomasa más altas obtenidas en estos cultivos y los tiempos de cultivo requeridos.

Destacan los trabajos realizados por Mukataka *et al* (1988), Marten y colaboradores (1996) y Rocha-Valadez y colaboradores (2000), en los que se generaron las concentraciones de biomasa más altas. Sin embargo, en los procesos de fermentación para la producción de las más altas concentraciones de biomasa, existen aspectos importantes a considerar. Por ejemplo, Mukataka *et al* (1988) obtuvieron 10 g/L de biomasa en dos días de cultivo, manteniendo la concentración de oxígeno disuelto en 3 ppm (presurizando el biorreactor y/o adicionando oxígeno puro al medio), y utilizando una velocidad de agitación de 300 rpm. El medio de cultivo utilizado en este trabajo no se menciona explícitamente; sin embargo, el mantener el oxígeno en un nivel de 3 ppm con la adición de oxígeno puro representa un alto costo para el proceso.

Tabla 2.2 Evaluación de algunos parámetros que influyen en la producción de biomasa y de metabolitos de interés por *Trichoderma spp.*

Microorganismo	Parámetro evaluado	Conc. de biomasa y tiempo de cultivo	Metabolito producido	Referencia
<i>Trichoderma reesei</i>	Vel. de agitación a TOD constante	10 g/L (2 días)	Celulasas	Mukataka <i>et al</i> , 1988
<i>Trichoderma reesei</i>	Vel. de agitación Fuente de carbono	6 g/L (3 días)	Prod. de enzimas (β -glucanasas, xilanasas, carboximetilcelulasas.)	Lejeune y Baron, 1995.
<i>Trichoderma reesei</i>	Comp. del medio de cultivo Requerimientos de oxígeno (TOD)	22 g/L (6 días)	Celulasas	Marten <i>et al</i> , 1996.
<i>Trichoderma harzianum</i>	Configuración de impulsores	11 g/L (4 días)	Moléculas de aroma (6PP y γ -decalactona)	Godoy-Silva <i>et al</i> , 1997.
<i>Trichoderma harzianum</i>	Vel. de agitación	15.3 g/L (9 días)	Quitinasas	Felse y Panda, 2000
<i>Trichoderma harzianum</i>	Config. Impulsor-difusor a TOD constante.	11 g/L (3.5 días)		Rocha-Valadez <i>et al</i> , 2000
<i>Trichoderma reesei</i>	Comp. del medio de cultivo	No reportada	Celulasas	Domingues <i>et al</i> , 2000

Marten y colaboradores (1996) obtuvieron hasta 22 g/L en 6 días, utilizando un medio de cultivo con 10 g/L de extracto de levadura. Ésta es una concentración muy elevada de un componente de alto costo. Realizaron además una alimentación de oxígeno puro para mantener la TOD por arriba del 20 %. Estos aspectos elevan el costo del proceso ya que tanto el oxígeno como el extracto de levadura son componentes de alto costo. Godoy-Silva y colaboradores (1997) y Rocha-Valadez y colaboradores (2000) utilizaron aceite de ricino como fuente de carbono. Definitivamente, en la producción de biomasa para aplicar en control biológico, no sería conveniente el uso de éste nutriente por la dificultad que ello implica en las etapas de recuperación y secado del hongo.

Por otro lado, como podrá compararse en los estudios citados en la **tabla 2.2**, en la mayoría de ellos, uno de los aspectos que se evaluó fue la agitación. En cultivo sumergido, la agitación es importante para un buen mezclado y transferencia de masa y calor en el proceso. En fermentaciones aeróbicas, el mezclado se requiere para asegurar una adecuada transferencia de oxígeno en el biorreactor (Makagiansar *et al*, 1993). Incrementar la agitación puede mejorar el mezclado y la transferencia de masa en el proceso, pero también puede provocar efectos

negativos sobre el microorganismo, como la ruptura de células, vacuolización, autólisis, y disminución de la productividad del proceso (Felse y Panda, 2000).

A pesar de lo anterior, en esos trabajos (Mukataka *et al*, 1988; Lejeune y Baron, 1995; Marten *et al*, 1996; Godoy-Silva, 1997; Felse y Panda, 2000; Rocha-Valadez *et al*, 2000) donde se realizaron estudios de la agitación y aspectos relacionados (como la configuración de impulsores), los cuales ejercen efectos importantes sobre el crecimiento y la producción de un metabolito, la viabilidad del hongo no se evaluó.

2.8 Viabilidad en hongos filamentosos

Una célula viable es comúnmente definida como una célula que es capaz de dividirse y de formar una colonia. Breeuwer y Abee (2000), además de concordar con la definición anterior, proporcionan un concepto más específico de células viables, definiéndolas como células que son capaces de desarrollar todas las funciones necesarias para sobrevivir bajo condiciones dadas, definiendo la sobrevivencia como la existencia continua de las especies.

En control biológico, la cuantificación de la viabilidad adquiere especial interés debido a que es de crucial importancia asegurar que los microorganismos aplicados se encuentren viables. Específicamente para *Trichoderma* se ha demostrado que uno de los principales mecanismos antagonistas es el micoparasitismo. En el micoparasitismo, la viabilidad es la característica principal para que el antagonismo se lleve a cabo. Por el contrario, si el microorganismo antagonista no estuviera viable, su aplicación en suelo es contraproducente ya que serviría como fuente alimenticia para los patógenos, contribuyendo aún más a la infección del cultivo (Jin *et al*, 1996).

La determinación de la viabilidad en hongos filamentosos es compleja debido a la también compleja estructura micelial que presentan, debida a su naturaleza pluricelular. El crecimiento se localiza en las puntas de la hifa, por lo que existe una amplia distribución de edades celulares con respecto a los organismos unicelulares (Gibbs *et al*, 2000). Las diferentes regiones de la hifa pueden encontrarse en diferentes estados fisiológicos y mostrar varias formas de diferenciación (como la vacuolización). Éstas características estructurales se relacionan con el estado fisiológico

de la hifa y con la producción de metabolitos secundarios (Paul *et al*, 1992). Tales aspectos hacen aún más compleja la determinación de la viabilidad en estos microorganismos. Con microorganismos unicelulares, la técnica para la determinación de viabilidad más utilizada es el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) en placa. Esta técnica, al utilizarse en la biomasa micelial, implica una serie de aspectos (por ejemplo el número de puntas involucrados en una partícula micelial, ya sea filamentosos o “pellet”), repercuten en los resultados (debido a que un fragmento pequeño es suficiente para desarrollar una colonia, Pelczar, 1982). Por otro lado, el tiempo necesario para la formación de colonias visibles es relativamente prolongado y la técnica es muy laboriosa (Breeuwer y Abee, 2000). En consecuencia, hay un interés creciente en el desarrollo de métodos rápidos para la determinación de la viabilidad en los que se exploten otros criterios, además de la capacidad de reproducción.

Uno de los objetivos del presente trabajo fue el de proponer una técnica para determinar cuantitativamente la viabilidad del micelio de *Trichoderma harzianum*. Esta parte del proyecto se desarrolló en colaboración con el Dr. Mainul Hassan. Los resultados constituyeron un manuscrito que fue aceptado en la revista **Biotechnology and Bioengineering** para su publicación. El artículo se presenta en el **anexo 6**.

Trichoderma spp. es un hongo muy importante en el desarrollo de procesos biotecnológicos y en la agricultura como ACB. El estudio de factores involucrados en la productividad de los procesos de fermentación, así como el desarrollo de estudios metodológicos mediante los que se evalúe -de manera rápida y confiable- la viabilidad del hongo son fundamentales. Por ello, en el presente trabajo se propone el estudio de aspectos nutricionales y de proceso que favorezcan el crecimiento y la viabilidad del hongo. Para ello, resulta indispensable el análisis de los efectos fisiológico que los nutrientes y las condiciones de proceso ejerzan sobre el hongo. El entendimiento de éstos, conducirá a un mejoramiento en su crecimiento micelial y en su viabilidad.

Capítulo III

Objetivos

GENERAL:

Evaluar el efecto de la composición del medio de cultivo y de algunos parámetros de proceso sobre la producción de biomasa micelial de *Trichoderma harzianum* y su viabilidad durante el proceso de fermentación en biorreactores de 14 L.

ESPECIFICOS:

- 1) Montar y validar una técnica para la determinación cuantitativa de la viabilidad del micelio generado en cultivo sumergido, demostrando que la técnica corresponde a una actividad funcional de las células (como su crecimiento en medio líquido).
- 2) Mediante un diseño factorial 2^3 , evaluar el efecto del pH, la concentración de sulfato de amonio y la adición de extracto de levadura, a fin de incrementar la producción de biomasa micelial de *Trichoderma harzianum* en biorreactores de 14 L.
- 3) Evaluar la viabilidad de la biomasa micelial de *Trichoderma harzianum* en función de las condiciones de proceso y de la edad del cultivo, en biorreactores de 14 L.

Capítulo IV

Materiales y Métodos

4.1 Microorganismo

Se utilizó la cepa *Trichoderma harzianum* var. *rifaii*, obtenida (en forma liofilizada) de la colección del *International Mycological Institute* (IMI 206040). El microorganismo liofilizado fue recuperado cultivándolo durante 72 h a 29°C y 200 rpm en un matraz Erlenmeyer de 250 mL que contenía 50 mL de medio líquido constituido por extracto de malta (20 g/L, Bioxon) y dextrosa (10 g/L, J.T. Baker), con un pH de 5.6 y esterilizado previamente en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Una vez recuperado, el hongo fue preservado en tubos inclinados (“slants”), como se describe a continuación.

Preservación de la cepa

La cepa se preservó mediante resiembras mensuales en tubos inclinados, en agar de papa y dextrosa (PDA, Bioxon). La constitución del PDA (en g/L), es la siguiente: infusión de papa, 4.0; dextrosa, 20; agar, 15. El pH final de medio es de 5.6. Para la preparación del medio de preservación en los tubos inclinados, se resuspendieron 39 g de medio PDA, en un litro de agua destilada. La suspensión se esterilizó en autoclave a 121°C, durante 20 minutos. Una vez estéril, 20 mL de éste se distribuyeron en tubos de ensayo estériles de 2.3 x 21 cm. Los tubos con el medio se dejan solidificar en posición inclinada.

Para realizar las resiembras se inoculó aproximadamente 1 cm² del medio con la cepa preservada sobre el tubo inclinado con medio fresco. Los tubos inclinados se incubaron a 29°C durante 4 días. Posteriormente se preservaron a 4°C, hasta la siguiente resiembra. Las resiembras en los tubos inclinados se realizaron como máximo durante un año.

4.1.1 Obtención y conteo de esporas

Se inoculó aproximadamente 1 cm² del medio sólido con células, sobre cajas Petri con medio PDA. Las cajas se incubaron a 29°C, durante 6 días. Dos veces al día y durante 15 minutos, las cajas se expusieron a la luz del día para inducir la esporulación. Las esporas de cada caja se

recuperaron con 8 mL de solución salina (NaCl 0.9% con *Tween* 40 al 0.05 %). El conteo de esporas se realizó en una cámara de Neubauer, utilizando el objetivo 20x de un microscopio compuesto (Nikon Optiphot-2). Para el desarrollo de los cultivos se utilizó una concentración de 1×10^5 esporas/mL de medio de cultivo. NOTA: se recuperan aproximadamente 3×10^8 esporas por caja.

4.2 Medio de cultivo líquido “estándar” para la producción de biomasa micelial

La composición del medio de cultivo “estándar” sobre el que se realizaron las modificaciones pertinentes (de acuerdo al diseño experimental que se mostrará posteriormente), se muestra en la tabla 4.1.

4.2.1 Diseño experimental para la evaluación de medios de cultivo en la producción de biomasa micelial de *Trichoderma harzianum*

Se realizó un diseño factorial 2^3 , en el que se llevó a cabo la evaluación del efecto del pH (3 y 5.6), de la concentración de sulfato de amonio (0.94 y 5.6 g/L) y de la adición de extracto de levadura al medio de cultivo (0 y 1.5 g/L). En la tabla 4.2 se presenta esquemáticamente el diseño experimental.

Tabla 4.1 Medio de cultivo “estándar” para el crecimiento de *Trichoderma harzianum*.

Reactivo	Concentración (g/L)	Tipo
Glucosa	30	Grado industrial (Arancia, S. A. de C. V.)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.94	Grado industrial (Droguería Cosmopolita S. A. de C. V.)
KH ₂ PO ₄	7	Grado reactivo (Productos Químicos Monterrey, S.A)
Na ₂ HPO ₄	2	Grado industrial (Droguería Cosmopolita S. A. de C. V.)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.5	Grado industrial (Droguería Cosmopolita S. A. de C. V.)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.0671	Grado reactivo (J. T. Baker)
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.008	Grado reactivo (J. T. Baker)
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.0001	Grado reactivo (J. T. Baker)

Tabla 4.2 Diseño experimental para la evaluación de la composición del medio de cultivo y del pH en la producción de biomasa micelial de *Trichoderma harzianum*

Inóculo: 1×10^5 esporas/mL							
pH = 3				pH = 5.6			
5.6 g/L de Sulfato de amonio		0.94 g/L de Sulfato de amonio		5.6 g/L de Sulfato de amonio		0.94 g/L de Sulfato de amonio	
1.5 g/L Ext. lev.	0 g/L Ext. lev.	1.5 g/L Ext. lev.	0 g/L Ext. lev.	1.5 g/L Ext. lev.	0 g/L Ext. lev.	1.5 g/L Ext. lev.	0 g/L Ext. lev.
Proceso 1	Proceso 2	Proceso 3	Proceso 4	Proceso 5	Proceso 6	Proceso 7	Proceso 8

El extracto de levadura utilizado fue grado industrial (Marcor, Development Corporation).

4.2.2 Análisis estadístico del diseño factorial

Un diseño factorial es una estrategia experimental para el estudio de factores (parámetros o variables independientes que van a evaluarse en un experimento) evaluados a diferentes niveles para estudiar su efecto sobre las respuestas (el parámetro de interés, variable dependiente). Por efecto de un factor se entiende el cambio en la respuesta de ir de un nivel bajo (-) a un nivel alto (+) de ese factor. En los experimentos se utilizan repeticiones para tener suficientes grados de libertad (residuos), necesarios para poder validar un modelo lineal. El modelo proporciona coeficientes de regresión (en nuestro caso son 8), que representan la media, los efectos principales y las interacciones entre los factores (Box *et al*, 1988).

Se aplicó un **análisis de varianza** (ANOVA) a los resultados con el fin de establecer efectos significativos (si los hubiera) de los factores evaluados sobre las respuestas de interés. El análisis de varianza se basa en el análisis de la prueba de t, la prueba de F y la probabilidad de cada una de ellas. La **Prueba de t** sirve para evaluar la significancia de una diferencia entre dos medias (promedios). La **Prueba de F** sirve para evaluar la diferencia que hay entre la variabilidad de una serie de datos en comparación con otra. Ambas pruebas arrojan una probabilidad p, que indica la probabilidad de que la diferencia que se evalúa entre dos o más grupos se deba al azar. Todas las pruebas estadísticas se consideran significativas cuando las probabilidades de que la diferencia se deba al azar sea baja (Box *et al*, 1988). A continuación se presenta una breve explicación del significado de los parámetros que proporciona el análisis estadístico. Para más información se recomienda el texto de Box *et al*, 1988. En el **anexo 1** se muestra un ejemplo de cómo se realiza el análisis estadístico de un diseño factorial.

Obtención del modelo empírico: Una vez que se encontraron factores con influencia significativa sobre la respuesta se procede el estudio del modelo empírico obtenido. El modelo empírico (obtenido por regresión lineal) nos permite predecir la respuesta en función de los factores estudiados. La calidad del modelo puede ser evaluada mediante dos análisis: coeficiente de correlación y la falta de ajuste del modelo (*lack of fit*).

Coefficiente de correlación (r^2): Es una medida de la variación de la respuesta sobre el valor de la media explicada por el modelo. Indica en qué medida una ecuación explica, de forma adecuada, la relación entre variables. En el análisis de varianza el coeficiente de correlación se obtiene de la siguiente fórmula.:

$$r^2 = 1 - \left[\frac{\text{suma de cuadrados de los residuos}}{\text{suma de cuadrados del modelo} + \text{suma de cuadrados de los residuos}} \right]$$

Falta de ajuste del modelo (*lack of fit*): Este parámetro es importante para comparar la variación en la predicción del modelo. En el análisis de varianza la falta de ajuste (*lack of fit*) representa el error experimental más cualquier contribución de la posible falta de ajuste del modelo. En el ANOVA la falta de ajuste se obtiene a partir de la suma de cuadrados de los residuos corregida por la suma de cuadrados del error puro.

Falta de ajuste = suma de cuadrados de los residuos - suma de cuadrados del error puro

Error puro: Es el error experimental. Es la variación que se obtiene cuando un experimento se repite, de ahí que se obtiene al hacer réplicas de los experimentos.

Para el análisis de estadístico se utilizó el software Desing Expert® versión 5.0 (Stat.Ease Inc.). Como texto de consulta se recomienda Box *et al*, 1988 y el manual del usuario del programa Desingn-Expert, versión 5.0.

4.3 Cultivos en biorreactores de 14 L

4.3.1 Geometría de los biorreactores de 14 L

La evaluación de los parámetros propuestos en el diseño experimental se realizó en biorreactores de 14 L, modelo MicroFerm (New Brunswick Scientific). El biorreactor tiene una altura de 45 cm

y un diámetro interno de 21 cm, con cuatro baffles de 2.1 cm de ancho. Se utilizó un volumen de trabajo de 10 L.

Los biorreactores estuvieron equipados con tres turbinas Rushton de 7.0 cm de diámetro ($D/T = 0.33$). La separación entre impulsores fue de 0.3 el diámetro del tanque. Se usó un difusor de punto. En la parte superior de la flecha se colocó un rompedor de espuma metálico.

El oxígeno disuelto fue medido con un electrodo polarográfico esterilizable de 420 mm de longitud (Ingold, modelo A420), acoplado a un amplificador digital (Ingold, tipo 170). Para el control de pH se utilizó un electrodo combinado de gel (Ingold, modelo 405-DPAS-K8S) de 325 mm, acoplado a un transmisor/controlador de pH (Ingold, modelo 2300). El control de pH se realizó mediante la adición automática de hidróxido de sodio 2N (con una bomba peristáltica Cole-Parmer) o de solución de hidróxido de amonio al 30 %. El control de la espuma se realizó mediante un sensor de nivel por conductividad, acoplado a un controlador New Brunswick Scientific (modelo 2300) y con la adición de una suspensión de antiespumante AF (Dow Corning) al 20 % (P/V).

4.3.2 Condiciones de los cultivos

Las condiciones “estándar” a las que se realizaron los cultivos para la evaluación del diseño experimental fueron: 29°C, 0.5 vvm (volumen de aire suministrado por volumen de medio por minuto) de aireación inicial, la cual se incrementó de manera escalonada (0.25 vvm) hasta 1 vvm, cuando la tensión de oxígeno disuelto (TOD) caía por debajo del 10 % de saturación. La agitación utilizada en la evaluación del diseño experimental fue de 200 rpm.

4.4 Técnicas analíticas

El coeficiente de variación en la reproducibilidad de las técnicas utilizadas en el presente trabajo fue menor al 10 %.

4.4.1 Crecimiento micelial

El crecimiento micelial se evaluó mediante la determinación gravimétrica de la biomasa (peso seco). Se pesó un volumen conocido de muestra (en éste caso fue de 10 gramos de caldo de

cultivo, considerando una densidad de 1 g/mL). Se adicionaron 30 mL de agua destilada y la suspensión se agitó vigorosamente para lavar las células. El micelio se filtró al vacío sobre papel filtro Whatman (No. 1) previamente tarado (en un horno a 85°C, durante 24 horas). En ésta etapa de filtración se adicionó agua destilada de manera abundante (aproximadamente 200 mL) para realizar un mejor lavado a las células. La muestra se secó en un horno (Hoffman-Pinther & Bosworth, modelo HA223) a 85°C, por 24 horas, hasta la obtención de un peso constante. Las muestras se colocaron en un desecador (que contenía sílica gel como deshumidificador) durante 1.5 horas para llevarlas a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). Posteriormente se pesaron. El cálculo de biomasa se realizó por diferencia de pesos y se expresó como gramos de células por litro de caldo de cultivo.

4.4.2 Consumo de sustrato (glucosa)

Se determinó en un analizador automático YSI (Yellow Springs Instruments Co., Yellow Springs, OH) mediante un método enzimático. El analizador cuenta con un sensor que contiene la enzima glucosa-oxidasa inmovilizada en una membrana de policarbonato, la cual, en presencia de oxígeno, oxida la glucosa, generándose la siguiente reacción:



La presencia de H₂O₂ es detectado a través de una sonda electroquímica, en donde se genera una señal eléctrica que es proporcional a la concentración de glucosa. El rango de detección del aparato es de hasta 25 g/L. La calibración del instrumento se corroboró mediante la lectura de una muestra estándar de concentración conocida (10 g/L).

Las muestras del proceso de fermentación se filtraron previamente (en un portafiltro Swinnex, modelo SX0002500, con un papel filtro cualitativo de velocidad de filtración rápida), para eliminar los sólidos suspendidos, principalmente el micelio. Para las muestras con concentración superior a 25 g/L, fue necesario realizar una dilución 1:1 con agua destilada.

4.4.3 Determinación de amonio

Se cuantificó utilizando el método del indofenol, propuesto por Kaplan (1965). La reacción que se lleva a cabo en éste método es la transformación del amonio a cloramina mediante la acción

del hipoclorito. Posteriormente, la cloramina reacciona con el fenol originando el cromógeno p-hidroxifenil imino benzoquinona.

El método fue modificado para intensificar la sensibilidad a concentraciones de 0 a 10 mM (de ión amonio). Se realizó una curva de calibración de 0 a 10 mM. El método utiliza las siguientes soluciones preparadas con agua desionizada.

Solución A:	Fenol 0.106 M
	Nitroferricianuro de sodio 0.17mM
Solución B:	Hidróxido de sodio 0.125 N
	Hipoclorito de sodio 11 mM

Estándares para la curva de calibración

A partir de una solución de sulfato de amonio 6 mM (correspondiente a 12 mM de ión amonio), se hacen las diluciones correspondientes para preparar los estándares de 0.5, 1, 2, 3, 4, y 5 mM (correspondiente a 1, 2, 4, 6, 8 y 10 mM de ión amonio). El análisis se realiza por duplicado (tanto para estándares como para las muestras del proceso).

El procesamiento de los estándares es el siguiente:

- Se coloca 1 mL de la solución A en un tubo con tapa de rosca. Tapar
- Adicionar 25 μ L de muestra del estándar. Tapar y agitar vigorosamente en un vortex (Maxi mix II, modelo M37615) durante aproximadamente 4 segundos.
- Adicionar 1 mL de la solución B. Este reactivo se adiciona de manera secuencial cada 30 segundos a cada una de las muestras. Tapar y agitar vigorosamente. A partir de que se adiciona la solución B se cuentan 30 minutos de reacción. Así, las muestras deben leerse cada 30 segundos, en el orden en que se adicionó la solución B, para que todas las muestras tengan los 30 minutos de reacción. Durante este tiempo, las muestras desarrollan el color “azul de prusia”, característico de la reacción.
- Leer en un espectrofotómetro a 635 nm. Ajustar a cero la absorbancia previamente, utilizando un blanco constituido por 1 mL de solución A, 1 mL de solución B y 25 μ L de agua desionizada.

Las lecturas de absorbancia y los valores correspondientes a cada concentración de ión amonio se ajustan a una línea recta por el método de mínimos cuadrados, determinándose los valores de la pendiente y de la ordenada al origen para caracterizar la curva de calibración.

Análisis de las muestras de fermentación

Las muestras del proceso de fermentación se filtraron previamente al análisis descrito, para la eliminación de partículas sólidas. 5 mL de muestra se filtraron (en un portafiltro Swinnex, modelo SX0002500) con un filtro de papel de velocidad de filtración rápida), utilizando papel filtro cualitativo de velocidad de filtración rápida. El caldo filtrado se utilizó para la determinación de amonio, realizándose el mismo procedimiento descrito para los estándares.

4.4.4 Determinación de la viabilidad del micelio de *Trichoderma harzianum* por tinciones fluorescentes en combinación con análisis de imágenes

Como se ha mencionado, uno de los objetivos del presente trabajo fue el de montar una técnica para cuantificar la viabilidad de la biomasa micelial de *Trichoderma harzianum* producida en biorreactores. Los resultados generados durante el montaje y validación de ésta, se integraron en un manuscrito que fue aceptado en la revista **Biotechnology and Bioengineering** para su publicación. En el **Anexo 3** se presentan los experimentos previos a la selección del fluorocromo para el desarrollo de la técnica. El **anexo 4 y 5** detallan el procedimiento la adquisición de imágenes y su posterior cuantificación, respectivamente. Todo ello, en conjunto con el protocolo que se describe a continuación constituyen la técnica implementada para la cuantificación de la viabilidad de *Trichoderma harzianum* cultivado en medio líquido. Finalmente, en el **anexo 6** se presenta el manuscrito. A continuación se presenta sólo el protocolo para realizar la técnica implementada.

La técnica es una combinación del uso de tinciones fluorescentes y de análisis de imágenes. El fluorocromo seleccionado fue el diacetato de fluoresceína (FDA, por sus siglas en inglés). El FDA es una sustancia no polar que atraviesa la membrana y es hidrolizado por esterasas intracelulares en células viables, produciéndose la fluoresceína, que exhibe fluorescencia al excitarse a 490 nm. Es necesaria una integridad de membrana para la retención intracelular de la fluoresceína. Células no viables son incapaces de hidrolizar el FDA y/o de retener la fluoresceína.

Las células fueron primero teñidas con FDA y posteriormente analizadas por análisis de imágenes.

4.4.4.1 Tinción de las células con diacetato de fluoresceína

En la técnica de tinción con FDA se utiliza una solución *stock* y una solución de trabajo que se prepararon de la siguiente manera:

Solución *stock*: se preparó a una concentración de 1 mg de diacetato de fluoresceína (Sigma) por mL de acetona (J.T. Baker). La solución se almacenó en un frasco ámbar para protegerla de la luz. Se almacenó a -20°C .

Solución de trabajo: 10 μL de la solución *stock* se colocaron en un tubo Eppendorf de polipropileno de 1.5 mL de capacidad. Se adicionaron 990 μL de agua destilada y se agitó vigorosamente en un vortex (Maxi mix II, modelo M37615). La solución de trabajo se preparó justo antes de realizar la tinción.

Tinción

- Se tomaron 100 μL de la muestra (con puntas de 200 μL recortadas de la punta) y se colocaron en un tubo Eppendorf de polipropileno de 1.5 mL de capacidad. Se adicionaron 300 μL de solución de trabajo, obteniéndose una relación de volúmenes 1:3 (volumen de muestra: volumen de trabajo).
- La muestra se agitó manualmente de manera suave e intermitentemente durante 5 minutos.
- Se colocaron aproximadamente 200 μL de la muestra teñida en un portaobjetos (limpiado previamente con etanol industrial) y se cubrió con un cubreobjetos de 22 x 40 mm (Corning, también previamente limpiado con etanol industrial). Al colocar la muestra, se dispersó el micelio sobre el área que cubriría el cubreobjetos. El cubreobjetos se colocó evitando que quedaran atrapadas burbujas de aire, para evitar así que la muestra se secase rápidamente. Se analizaron entre 4 y 5 preparaciones por muestra del proceso.
- El exceso de muestra se absorbió con papel absorbente.

- La muestra estuvo lista para el análisis de imágenes.

Una muestra se analizó en un tiempo de entre 15-20 minutos. En general, después de este tiempo, la muestra se secaba y las imágenes obtenidas eran muy difusas, por lo que era necesario preparar otra muestra.

4.4.4.2 Adquisición y procesamiento de muestras por análisis de imágenes.

4.4.4.2.1 Sistema de análisis de imágenes

El sistema de análisis de imágenes consiste de un microscopio óptico (Nikon Optiphot-2) con un sistema epifluorescente. El microscopio tiene instalada una cámara de video digital a color (CCD RGB modelo KP-D50 color digital, Hitachi, Japan), acoplados a una computadora personal (Hewlett Packard).

Las imágenes observadas en el microscopio se adquirieron en la computadora por medio de una tarjeta digitalizadora de imágenes Flash point® 128 (Integral Technologies) con la entrada de video RGB. Se utilizó el programa Image Pro® Plus, versión 4.1 (Media Cybernetics, USA) para crear los *macros* necesarios que permitieran llevar a cabo la digitalización y almacenaje de las imágenes en la computadora.

4.4.4.2.2 Adquisición y procesamiento de imágenes

A) Adquisición de imágenes

Por cada muestra del proceso se adquirieron 50 imágenes. Por cada imagen se tomaron dos fotografías: una con luz visible y otra con luz ultravioleta. La foto con luz visible proporciona el área total de las hifas que conforman la imagen (hifas viables y no viables). La foto con luz ultravioleta proporciona el área teñida con FDA, que corresponde al área metabólicamente activa de las hifas (área viable).

Antes de iniciar la adquisición de imágenes, es importante realizar la calibración de la luz visible y de la luz ultravioleta en el microscopio, con el fin de que el campo visual esté uniformemente iluminado. El detalle de la calibración se presenta en el **anexo 4**.

Para el análisis de una muestra del proceso de fermentación, se tomaron 50 imágenes (100 fotografías: 50 en luz visible y 50 en luz ultravioleta). En la figura 4.1 se muestra un ejemplo de la imagen fotografiada con luz visible (foto en blanco y negro) y con luz ultravioleta (foto fluorescente). El detalle del proceso para la adquisición de imágenes se presenta en el anexo 4. Posteriormente se cuantificó el área total y el área teñida con FDA, de las imágenes tomadas con luz visible y con luz UV, respectivamente.

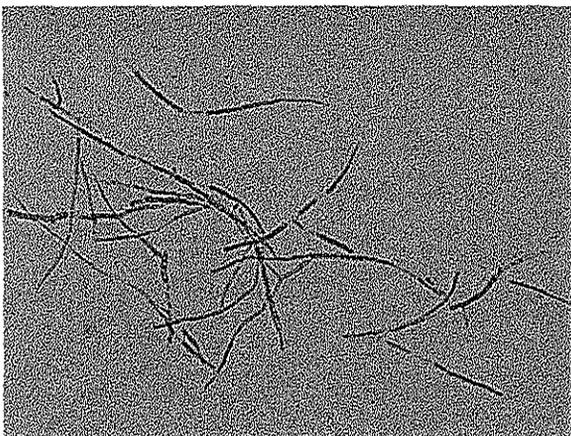
B) Cuantificación de áreas

Para la cuantificación de las áreas se crearon dos *macros*: uno para la cuantificación de las áreas totales (cuantificada en las fotografías tomadas con luz visible) y otro para la cuantificación del área teñida con FDA (cuantificada en fotografías tomadas con luz ultravioleta). El detalle del proceso para la cuantificación de áreas se presenta en el anexo 5.

Obtenida el área total y el área fluorescente de la imagen, se calcula el porcentaje del área teñida con FDA de esa imagen, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de área teñida con FDA} = \frac{\text{área teñida con FDA}}{\text{área total}} \times 100$$

a)



b)

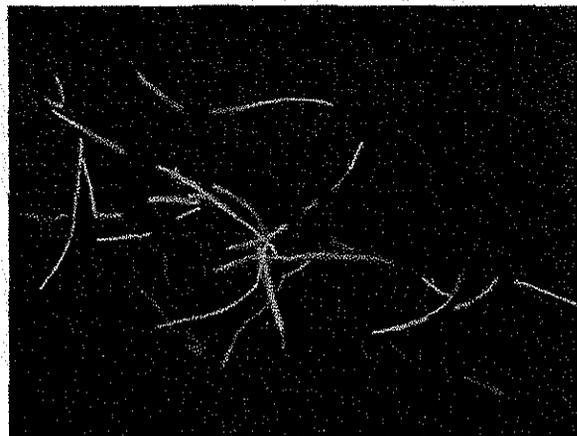


Figura 4.1 Imágenes de *Trichoderma harzianum* adquiridas con luz visible y con luz ultravioleta. a) Imagen fotografiada con luz visible. b) Imagen fotografiada con luz ultravioleta. Objetivo 10x.

Capítulo V

Resultados y discusión

5.1 Análisis de varianza para el estudio del efecto de factores nutricionales sobre el crecimiento de *Trichoderma harzianum*

En la **tabla 4.2** se muestran los factores y los niveles evaluados para cada factor. Con el objetivo de evaluar de una manera más completa el efecto de los factores sobre el proceso, se evaluaron 3 respuestas importantes en la producción de biomasa micelial de *Trichoderma harzianum*. Las respuestas evaluadas fueron:

- 1) Concentración de biomasa máxima (g/L)
- 2) Productividad máxima (g/L·h)
- 3) Velocidad de crecimiento (g/L·h)

Uno de los objetivos centrales del presente trabajo fue maximizar la concentración de biomasa. La productividad máxima de formación de biomasa y la velocidad de crecimiento se evaluaron dada su influencia en la economía del proceso. La velocidad de crecimiento del hongo se expresa en unidades de g/L·h, ya que *Trichoderma harzianum* presenta un crecimiento de carácter lineal. Se realizó un análisis de varianza para las 3 respuestas con el fin de establecer los posibles efectos significativos de los factores evaluados. En la **tabla 5.1** se presentan las respuestas para cada uno de los experimentos del diseño factorial (por duplicado). Los resultados se presentan en el mismo orden y clasificación que experimentos mostrados en la **tabla 4.2** (correspondiente al desarrollo del diseño experimental).

Tabla 5.1 Matriz del diseño factorial y resultados experimentales de las respuestas

FACTORES (variables independientes)			RESPUESTAS (variables dependientes)			
pH	Sulfato de amonio (g/L)	Extracto de levadura (g/L)	Biomasa máxima (g/L)	Productividad max. de biomasa micelial (mg de biomasa/L/h)	Velocidad de crecimiento (g/Lh)	No de proceso
3	5.6	1.5	5.3	89	0.097	1
3	5.6	1.5	5.4	91	0.096	
3	5.6	0	5.4	52	0.073	2
3	5.6	0	5.2	57	0.075	
3	0.94	1.5	5.7	112	0.15	3
3	0.94	1.5	4.9	108	0.15	
3	0.94	0	2.5	26	0.054	4
3	0.94	0	2.3	28	0.050	
5.6	5.6	1.5	6.2	65	0.06	5
5.6	5.6	1.5	6.2	64	0.06	
5.6	5.6	0	2.3	48	0.069	6
5.6	5.6	0	2.3	44	0.065	
5.6	0.94	1.5	8.9	97	0.071	7
5.6	0.94	1.5	9.3	93	0.068	
5.6	0.94	0	1.5	25	0.028	8
5.6	0.94	0	1.4	23	0.040	

Experimentos realizados en orden aleatorio.

5.1.1 Concentración máxima de biomasa

5.1.1.1 Efecto de los factores

En la **figura 5.1**, se representa la importancia relativa de los efectos (como un % de la probabilidad de efecto del factor en la respuesta) en función del valor absoluto del coeficiente del factor. Todos aquellos coeficientes cuyo valor absoluto sea mucho mayor que cero y no se ajusten a la línea recta de los residuos, tienen influencia sobre la respuesta, mientras que el resto no influye en ella (su coeficiente no se considera significativamente diferente de cero y se ajustan

a la línea recta de los residuos) por lo que sirve para estimar el error experimental. Es de resaltar la importancia del extracto de levadura (C) en el proceso, ya que por sí sólo, es el factor que presenta el mayor efecto sobre la concentración de biomasa máxima producida. Le siguen en orden decreciente: la interacción de este factor con el pH (AC), la interacción extracto de levadura-sulfato de amonio (BC) y finalmente, la combinación pH-sulfato de amonio (AB). Los factores que no ejercieron un efecto significativo y por lo tanto se consideraron parte del error experimental fueron: el pH, el sulfato de amonio y la interacción de los tres factores. En el **anexo 1** se presenta un ejemplo ilustrativo del proceso que se realiza en el análisis estadístico de un experimento realizado mediante un diseño factorial.

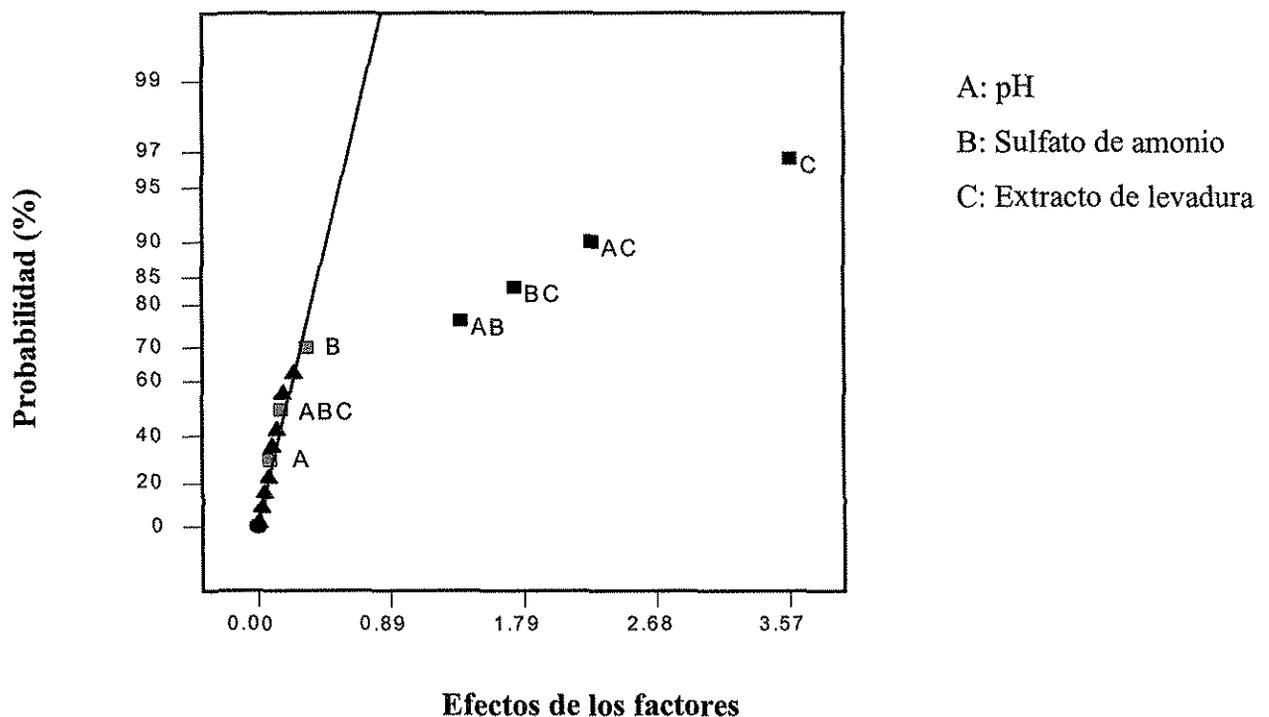


Figura 5.1 Gráfico normal de los efectos de los factores sobre la concentración de biomasa micelial de *T. harzianum*.

Leyendas: ■ factores que presentan efecto sobre la respuesta, ▣ factores que no presentan efecto sobre la respuesta, ▲ residuos.

En la **tabla 5.2** se analiza el efecto de los factores sobre la concentración de biomasa máxima. Los valores de probabilidad de t son muy bajos (menores a 0.0001), indicando que los factores considerados (extracto de levadura y las interacciones pH-extracto de levadura, sulfato de amonio-extracto de levadura y pH-sulfato de amonio) ejercen un efecto importante sobre la

producción de biomasa. La probabilidad de que el efecto de los factores sobre la respuesta se deba al error experimental es muy baja (0.01%).

Tabla 5.2 Análisis de los factores sobre la concentración máxima de biomasa

Factor	Coefficiente estimado	Prob > t
Extracto de levadura	1.79	< 0.0001
pH-extracto de levadura	1.12	< 0.0001
Sulfato de amonio-ext. de lev.	-0.86	< 0.0001
pH-sulfato de amonio	-0.68	< 0.0001

5.1.1.2 Análisis del modelo

En la **tabla 5.3** se muestra el análisis de varianza que incluye la evaluación del modelo. El análisis muestra que la probabilidad de que la varianza en la respuesta se deba al error experimental es muy baja (0.01%). Ello indica que la varianza en la respuesta se debe al efecto de los factores. El error experimental observado en la repetición de los experimentos (*error puro*) es muy bajo (0.54), indicando que los procesos son reproducibles. Por otro lado, el cociente del cuadrado medio de la falta de ajuste y el error puro (2.81) no representa una falta de ajuste del modelo. Box *et al* (1988) señalan que para comprobar el ajuste del modelo se comparan los cuadrados medios de la falta de ajuste y del error puro. Cocientes iguales o mayores de 1.2 aparecen alrededor del 45 % de las veces, de manera que no son significativos (Box *et al*, 1988).

El valor del coeficiente de correlación (r^2) indica que sólo el 1.2 % de la variación total no fue explicada por el modelo. El coeficiente de variación en estos procesos fue de 6.68 %, que representa un valor aceptable en el caso específico de nuestro estudio. En nuestro proceso,

coeficientes de variación menores al 10 % son aceptables. La ecuación del modelo para maximizar la producción de biomasa en nuestro proceso es la siguiente:

$$\text{Biomasa máxima (g/L)} = 4.74 + (1.79 \text{ extracto de levadura}) + (1.12 \text{ pH-extracto de levadura}) - (0.86 \text{ sulfato de amonio-extracto de levadura}) - (0.68 \text{ pH-sulfato de amonio}) + \text{error experimental.}$$

Tabla 5.3 Análisis de varianza para la producción máxima de biomasa micelial de *T. harzianum*.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de F	Probabilidad de F
Modelo	90.54	4	22.63	225.95	<0.0001
Residuos	1.10	11	0.1		
Falta de ajuste del modelo	0.57	3	0.19	2.81	
Error puro	0.54	8	0.067		
Correlación total	91.64	15			

Coefficiente de correlación r^2 : 0.9880

Coefficiente de variación : 6.68 %

5.1.1.3 Predicción de respuestas por el modelo

En la **figura 5.2** se muestran (en una gráfica de superficie de respuesta) las concentraciones máximas de biomasa estimadas como función de la interacción de la concentración del sulfato de amonio con el extracto de levadura para cada pH evaluado. La máxima concentración de biomasa que podría obtenerse sería de 9.2 g/L, cuando el proceso se realice con un pH de 5.6, una concentración de sulfato de amonio 0.94 g/L y una concentración de extracto de levadura de 1.5 g/L (**figura 5.2b**). La concentración de biomasa máxima esperada en el caso del cultivo a pH = 3 sería de 5.4 g/L (**figura 5.2a**).

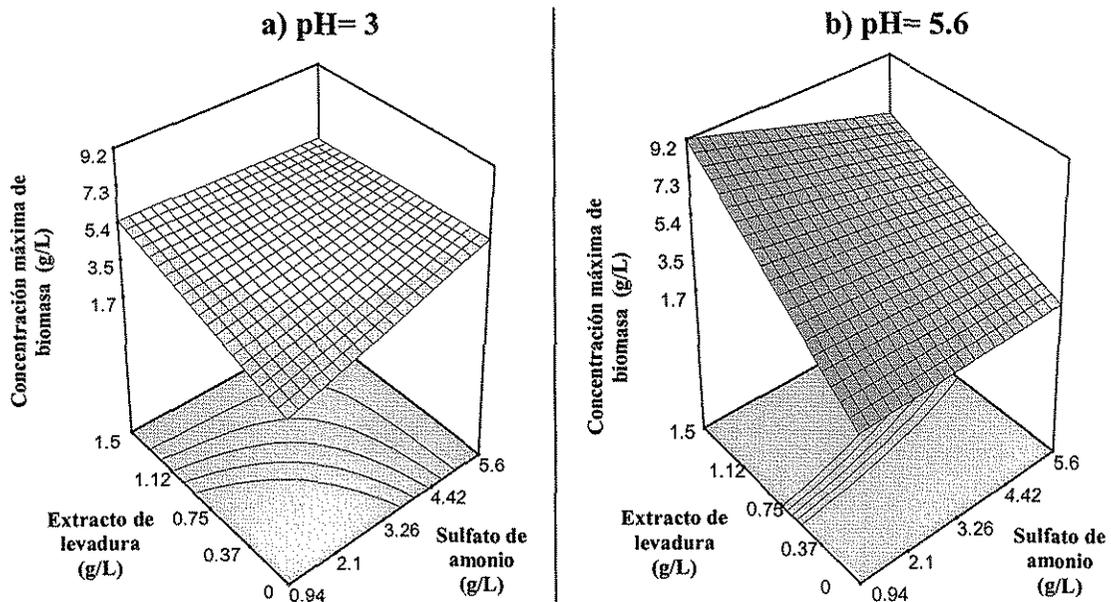


Figura 5.2 Concentraciones de biomasa estimadas en la interacción del sulfato de amonio y el extracto de levadura a pH= 3 (a) y pH = 5.6 (b).

5.1.2 Productividad del proceso (en términos de biomasa)

5.1.2.1 Efecto de los factores

En la **tabla 5.4** se presenta el análisis del efecto de los factores sobre la productividad. Al igual que lo encontrado para la concentración máxima de biomasa, el extracto de levadura ejerce el efecto principal en la productividad del proceso para la producción de biomasa. Le siguen en orden decreciente la interacción sulfato de amonio-extracto de levadura, el pH (que a diferencia de lo encontrado en la producción de biomasa, en este caso, sí ejerce un efecto importante) y finalmente la interacción pH-extracto de levadura (**figura 5.3**). Los valores de probabilidad de t (para todos los factores considerados) son muy bajos (menores a 0.0001, **tabla 5.4**), indicando que la probabilidad de que la varianza en la respuesta se deba al error experimental es muy baja (0.01%). Ello indica que tales factores influyen significativamente en la productividad del proceso para la producción de biomasa. Los factores que no ejercieron efecto sobre la productividad fueron el sulfato de amonio, la interacción pH-sulfato de amonio y la interacción de los tres factores.

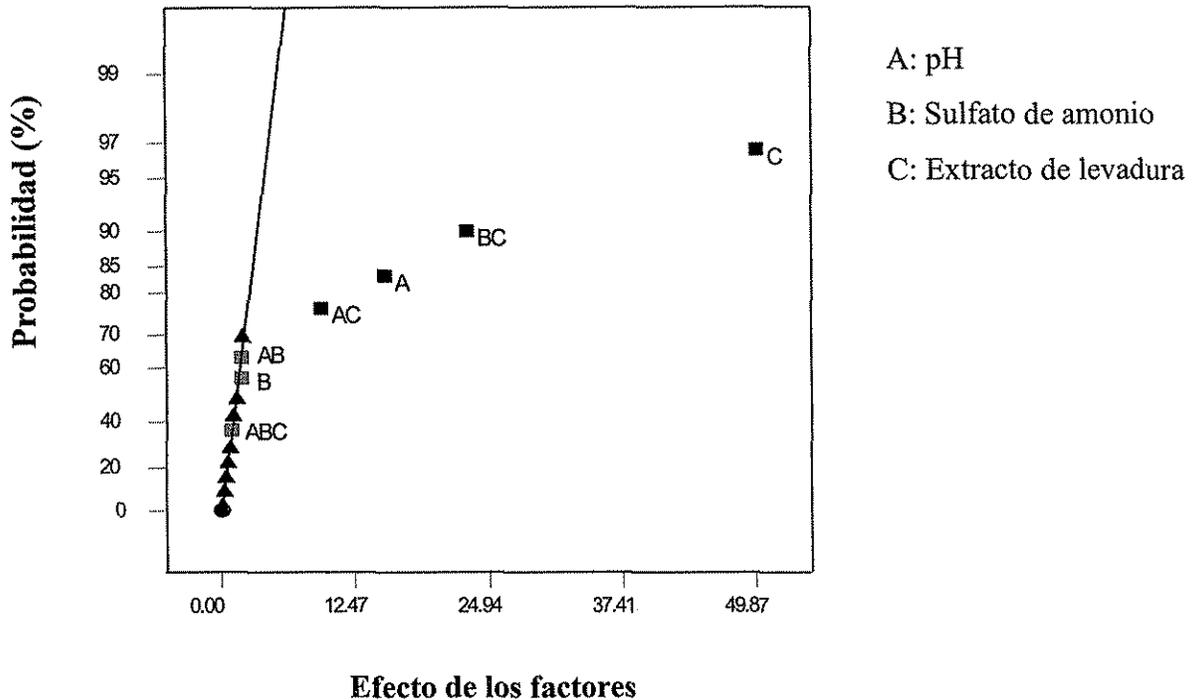


Figura 5.3 Gráfico normal de los efectos sobre la productividad de biomasa micelial de *T. harzianum*.

Leyendas: ■ factores que presentan efecto sobre la productividad, □ factores que no presentan efecto sobre la productividad, ▲ residuos.

Tabla 5.4 Análisis del efecto de los factores sobre la productividad de la producción de biomasa de *T. harzianum*.

Factor	Coefficiente estimado	Prob > t
Extracto de levadura	24.94	< 0.0001
Sulfato de amonio-ext. de lev.	-11.44	< 0.0001
PH	-7.56	< 0.0001
pH-extracto de levadura	-4.69	< 0.0001

5.1.2.2 Análisis del modelo

En la **tabla 5.5** se muestra el análisis de varianza que incluye la evaluación del modelo propuesto. Como lo demuestra el análisis, la probabilidad de que la varianza en la respuesta se deba al error experimental es muy baja (0.01%). Esto indica que la varianza en la respuesta se debe al efecto de los factores. El error experimental observado en la repetición de los experimentos (*error puro*) es muy baja (35.5, comparado con la suma de cuadrados del modelo), indicando que los procesos son reproducibles

El coeficiente de correlación (r^2) indica que sólo el 0.50 % de la variación total no fue explicada por el modelo. El coeficiente de variación fue de 3.9 %, valor aceptable en el desarrollo de nuestro proceso. El modelo presenta un buen ajuste (el valor de F es de 2.34, el cual se considera aceptable, Box *et al*, 1988). Así, la ecuación del modelo para obtener la mayor productividad en la producción de biomasa en nuestro proceso es la siguiente:

$$\text{Productividad máxima (mg biomasa/L medio \cdot h)} = 62.81 + (24.94 \text{ extracto de levadura}) - (11.44 \text{ sulfato de amonio-extracto de levadura}) - (7.56 \text{ pH}) - (4.69 \text{ pH-extracto de levadura}) + \text{error experimental}$$

Tabla 5.5 Análisis de varianza de la productividad del proceso en la producción de biomasa micelial de *T. harzianum*.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de F	Probabilidad de F
Modelo	13309.75	4	3327.44	548.86	<0.0001
Residuos	66.69	11	6.06		
Falta de ajuste del modelo	31.19	3	10.40	2.34	
Error puro	35.50	8	4.44		
Correlación total	13376.44	15			

Coeficiente de correlación r^2 : 0.9950

Coeficiente de variación : 3.9 %

5.1.2.3 Predicción de respuestas por el modelo

Las productividades estimadas por el modelo en la interacción del extracto de levadura con el sulfato de amonio a diferentes pH se muestra en la **figura 5.4**. La mayor productividad que podría obtenerse es de 111.5 mg/L·h (**figura 5.4a**), realizando el proceso a un pH de 3, con una concentración de sulfato de amonio de 0.94 g/L y 1.5 g/L de extracto de levadura. El proceso a pH 5.6 presentaría una productividad máxima de 87 mg/L·h, (**figura 5.4b**).

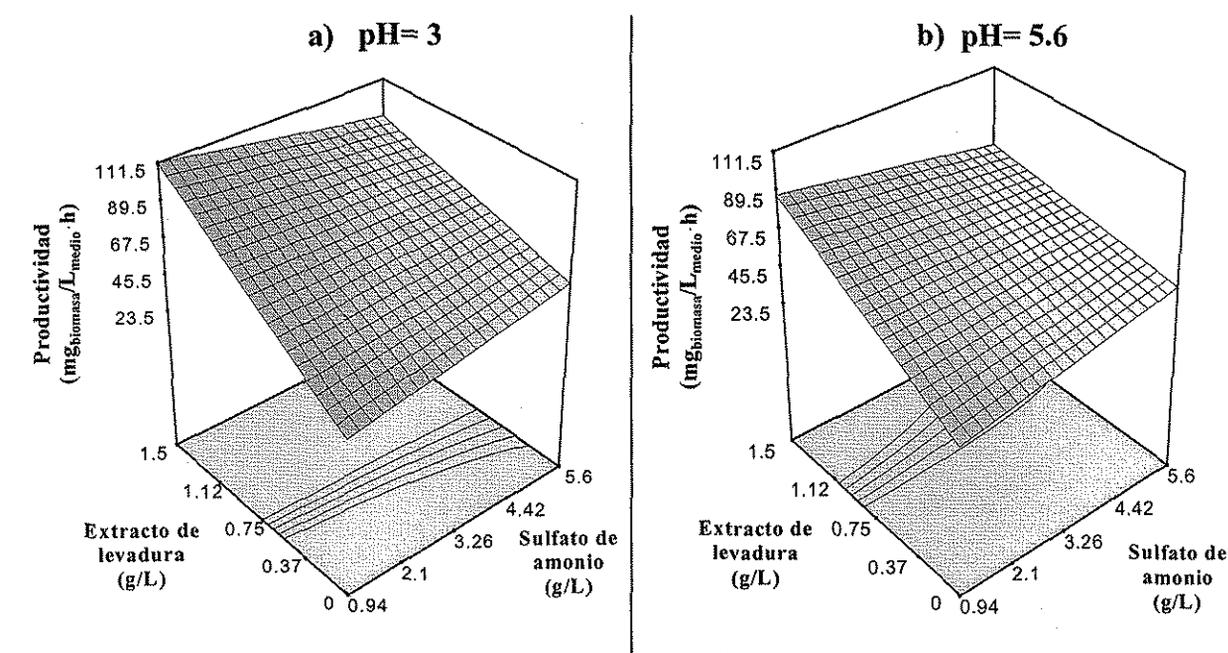


Figura 5.4 Productividades esperadas con la interacción del extracto de levadura y del sulfato de amonio a pH 3 (a) y pH 5.6 (b).

5.1.3 Velocidad de crecimiento de *Trichoderma harzianum*

5.1.3.1 Efecto de los factores

En la velocidad de crecimiento se observaron efectos de un mayor número de factores (6), En los casos anteriores (producción de biomasa y productividad) el ANOVA indicó efectos sólo de 4 factores. El extracto de levadura y el pH son los factores que presentan el mayor efecto en la

velocidad de crecimiento del hongo. El efecto de ambos factores es muy similar (tabla 5.6). Le siguen (en orden decreciente) la interacción sulfato de amonio-extracto de levadura, pH-extracto de levadura, pH-sulfato de amonio y por último, la interacción de los tres factores (pH-sulfato de amonio-extracto de levadura). El sulfato de amonio no presentó un efecto importante, su valor absoluto se encontró entre los residuos (figura 5.5).

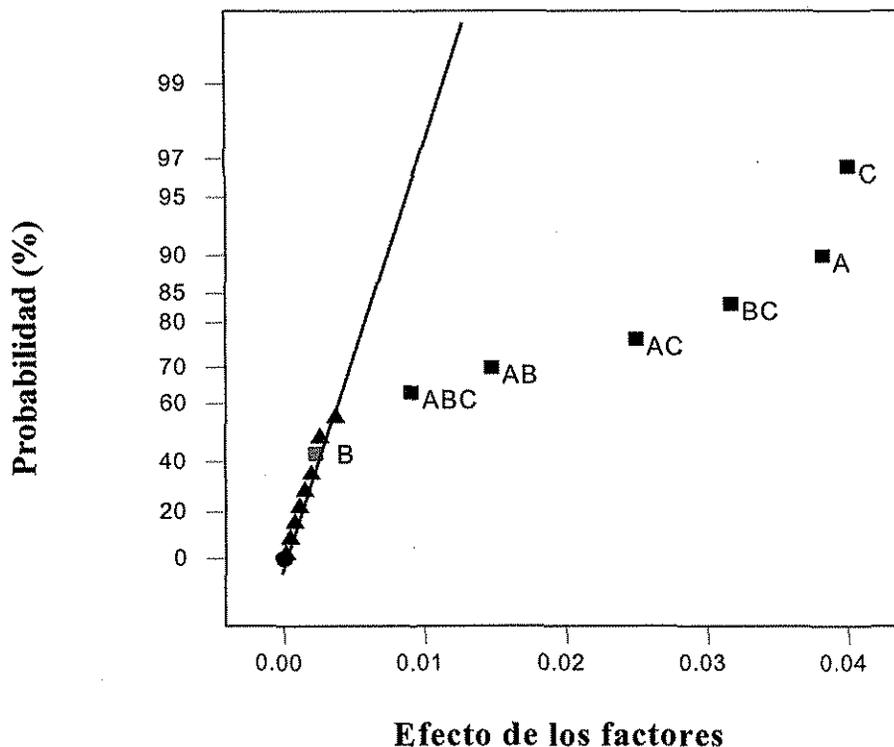


Figura 5.5 Gráfico normal de los efectos sobre la velocidad de crecimiento de *T. harzianum*.
 Leyendas: ■ factores que presentan efecto, □ factores que no presentan efecto, ▲ residuos.

En la tabla 5.6 se presenta el análisis del efecto de los factores. Los valores de probabilidad de t (para todos los factores considerados) son muy bajos, indicando que la probabilidad de que la varianza en la respuesta se deba al error experimental es muy baja (0.01%). Un aspecto interesante es la implicación del pH en los tiempos de fermentación del proceso, ya que demostró un efecto significativo sobre la productividad en la producción de biomasa y en la velocidad de crecimiento del hongo. Como se demostró en esos análisis, por sí sólo el pH presenta efectos importantes en esas respuestas.

Tabla 5.6 Análisis del efecto de los factores sobre la velocidad de crecimiento de *T. harzianum*.

Factor	Coefficiente estimado	Prob > t
Extracto de levadura	0.019	< 0.0001
pH	-0.018	< 0.0001
Sulfato de amonio-ext. de lev.	-0.015	< 0.0001
pH-extracto de levadura	-0.012	< 0.0001
pH- sulfato de amonio	0.0068	< 0.0001
pH-sulfato de amonio-ext. de lev.	+0.0041	< 0.0001

5.1.3.2 Análisis del modelo

En la **tabla 5.7** se muestra el análisis de varianza que incluye la evaluación del modelo propuesto. La probabilidad de que la varianza en la respuesta sea debida al error experimental es muy baja (0.01 %). Lo que indica que la varianza en la respuesta es debida al efecto de los factores. El error experimental observado en la repetición de los experimentos (*error puro*) indica que los procesos son reproducibles. El modelo presenta un buen ajuste (el valor de F es de 1.34, que se considera aceptable, Box *et al*, 1988)

El coeficiente de correlación (r^2) indica que sólo el 0.73 % de la variación total no fue explicada por el modelo. El coeficiente de variación fue de 4.9 %, que representa un valor aceptable en el desarrollo de nuestro proceso. Así, la ecuación del modelo para maximizar la producción de biomasa en nuestro proceso es la siguiente:

$$\text{Velocidad de crecimiento (g/L}\cdot\text{h)} = 0.075 + (0.019 \text{ extracto de levadura}) - (0.018 \text{ pH}) - (0.015 \text{ sulfato de amonio-extracto de levadura}) - 0.012 (\text{pH-extracto de levadura}) + (0.0068 \text{ pH-sulfato de amonio}) + (0.0041 \text{ pH-sulfato de amonio-extracto de levadura}) + \text{error experimental.}$$

Tabla 5.7 Análisis de varianza de la velocidad de crecimiento de *T. harzianum*.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de F	Probabilidad de F
Modelo	0.017	6	2.8×10^{-3}	204.67	<0.0001
Residuos	1.25×10^{-4}	9	1.39×10^{-5}		
Falta de ajuste	1.806×10^{-5}	1	1.8×10^{-5}	1.34	
Error puro	1.075×10^{-4}	8	1.34×10^{-5}		
Correlación total	0.017	15			

Coefficiente de correlación r^2 : 0.9927

Coefficiente de variación : 4.9 %

5.1.3.3 Predicción de respuestas por el modelo

La figura 5.6 muestra las velocidades de crecimiento estimadas por el modelo en la interacción del sulfato de amonio y del extracto de levadura a los diferentes pH evaluados. La mayor velocidad de crecimiento que se obtendría es de 0.15 g/L·h utilizando un pH de 3, una concentración de sulfato de amonio de 0.94 g/L y una concentración de extracto de levadura de 1.5 g/L. (figura 5.6a). A pH de 5.6 las velocidades de crecimiento serían menores (la máxima sería de 0.07 g/L·h, figura 5.6b).

5.1.4 Análisis global de las respuestas

En la tabla 5.8 se resumen las condiciones requeridas en los procesos para obtener los valores más altos en las tres respuestas evaluadas. La diferencia básica fue el efecto del pH. Para obtener las mayores productividades y velocidades de crecimiento se debe utilizar un pH de 3. Sin embargo, para obtener la más alta concentración de biomasa micelial se debe utilizar un pH de 5.6.

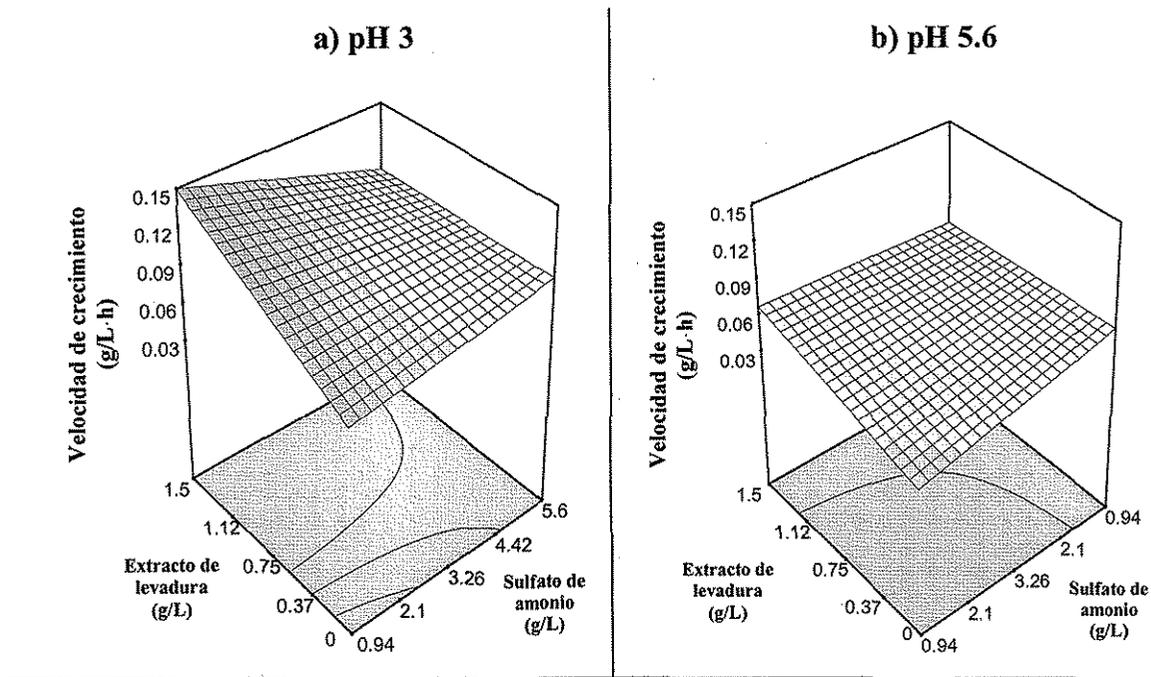


Figura 5.6. Predicción de las velocidades de crecimiento con la interacción del sulfato de amonio y del extracto de levadura en los cultivos a pH= 3 (a) y pH= 5.6 (b).

Tabla 5.8 Condiciones de cultivo para obtener los valores más altos en las respuestas.

RESPUESTA	CONDICIONES		
	pH	Sulfato de amonio (g/L)	Extracto de levadura (g/L)
Concentración máxima de biomasa	5.6	0.94	1.5
Productividad	3	0.94	1.5
Velocidad de crecimiento	3	0.94	1.5

En nuestro caso, el objetivo central fue el de incrementar la concentración de biomasa micelial, siendo importante también, considerar los tiempos requeridos para ello, que determinan la productividad del proceso. Las condiciones de proceso necesarias para lograr la combinación de ambos aspectos (la mayor producción de biomasa en el menor tiempo) difieren en el pH del medio de cultivo. Sin duda ésta diferencia es importante de analizar con el fin de determinar que aspectos o que otros factores (ya sea del cultivo o fisiológicos, si los hubiera), influyen en el

proceso. Con ello podría determinarse que aspectos repercuten y hacen que las condiciones de cultivo requeridas para obtener la mayor respuesta en los tres parámetros evaluados sean diferentes (**tabla 5.8**). Como se observa en la **tabla 5.8**, la mayor productividad y velocidad de crecimiento del hongo se obtiene a pH 3; sin embargo, las concentraciones de biomasa generadas en los cultivos desarrollados a este pH no superaron los 6 g/L. Es probable que otros factores estén limitando el crecimiento del hongo. Como se mostrará posteriormente, en las cinéticas de los procesos es evidente el mejoramiento en la productividad del proceso y en la velocidad de crecimiento del hongo al cultivarlo a pH 3, con respecto de lo observado al cultivarlo a pH 5.6. Sin embargo, éste mejoramiento sólo sucede durante un tiempo corto de cultivo, es decir, la fase de crecimiento lineal del hongo cultivado a pH 3 es menos prolongada que la observada en los cultivos a pH 5.6. Es posible atribuir éstos comportamientos a la producción de metabolitos tóxicos que afecten la fisiología del hongo.

En ésta sección se presentó el análisis de varianza del diseño factorial llevado a cabo en el presente trabajo. Se demostraron los efectos del pH, del extracto de levadura y del sulfato de amonio, sobre tres respuestas de importancia en el proceso. Mediante el análisis de varianza pueden señalarse y diferenciarse efectos estadísticamente significativos en un proceso (si los hubiera). Sin embargo, los efectos fisiológicos que puedan presentarse en el microorganismo, son de fundamental importancia y deben analizarse y considerarse para proponer alternativas que resulten en una mejora en el proceso. Por ello, en la siguiente sección se presentan y analizan - desde el punto de vista cinético y fisiológico-, las cinéticas de crecimiento de *Trichoderma harzianum*, correspondientes a los procesos llevados a cabo en el diseño factorial.

5.2 Evaluación cinética de los factores sobre la producción de biomasa micelial de *Trichoderma harzianum*

Para clasificar los experimentos se utilizó la numeración mostrada en la **tabla 4.2** (de la sección de Materiales y métodos). Como se demostró en el análisis de varianza, el error experimental observado al realizar las réplicas de los experimentos, se encontró entre los residuos, indicando la reproducibilidad de los experimentos. Por ello, se omitió presentar la desviación estándar de los procesos.

5.2.1 Cultivos realizados a pH 3

En la **figura 5.7** se presenta el primer bloque de experimentos realizados a pH 3 (procesos 1 al 4, **tabla 4.2**). Se muestran las cinéticas correspondientes a la concentración de biomasa, concentración de glucosa residual, consumo de amonio y tensión de oxígeno disuelto (TOD) en el proceso de producción de biomasa micelial de *Trichoderma harzianum*.

5.2.1.1 Efecto del extracto de levadura

Las concentraciones de biomasa generadas en los cultivos a pH= 3 no rebasaron los 6 g/L, en ningún caso de las condiciones evaluadas (**figura 5.7a**). El efecto de la adición del extracto de levadura (EL) se observa principalmente en una reducción (de 12 horas) de la etapa de germinación del hongo en el medio de cultivo, independientemente de la concentración de sulfato de amonio utilizada. Con EL la fase de germinación del hongo fue de 24 horas. Sin éste nutriente, los cultivos presentaron una fase de germinación de 36 horas. Otro efecto importante del EL se observó en las velocidades de crecimiento del hongo, en la productividad y en el rendimiento de los procesos. Las velocidades de crecimiento del hongo al adicionar EL al medio de cultivo fueron superiores (0.097 y 0.15, para 5.6 y 0.94 g/L de sulfato de amonio, respectivamente, **tabla 5.9**), respecto a los cultivos que no contenían este nutriente, cuyas velocidades fueron de 0.074 y 0.052 g/L·h (para 5.6 y 0.94 g/L de sulfato de amonio, respectivamente **tabla 5.9**). El incremento en la velocidad de crecimiento por el uso de extracto de levadura ha sido reportada para *Lactobacillus helveticus* (Amrane y Prigent, 1998) y para *Trichoderma reesei* (Marten *et al*, 1996; Domingues *et al*, 2000).

Como se mostró en el análisis de varianza correspondiente a la evaluación de la producción de la biomasa máxima, el factor más importante en esta respuesta es el extracto de levadura. Con la adición de éste nutriente al medio de cultivo redujo la fase de germinación del hongo y se incrementó importantemente la concentración de biomasa. Efectos similares han sido reportados por Amrane y Prigent (1998), Marten *et al*, (1996) y Domingues *et al*, (2000). La característica del extracto de levadura para incrementar la concentración de biomasa es principalmente la presencia de vitaminas, polipéptidos, cofactores y otros compuestos característicos de nutrientes complejos (Domingues *et al*, 2000). En el caso del extracto de levadura utilizado en éste trabajo,

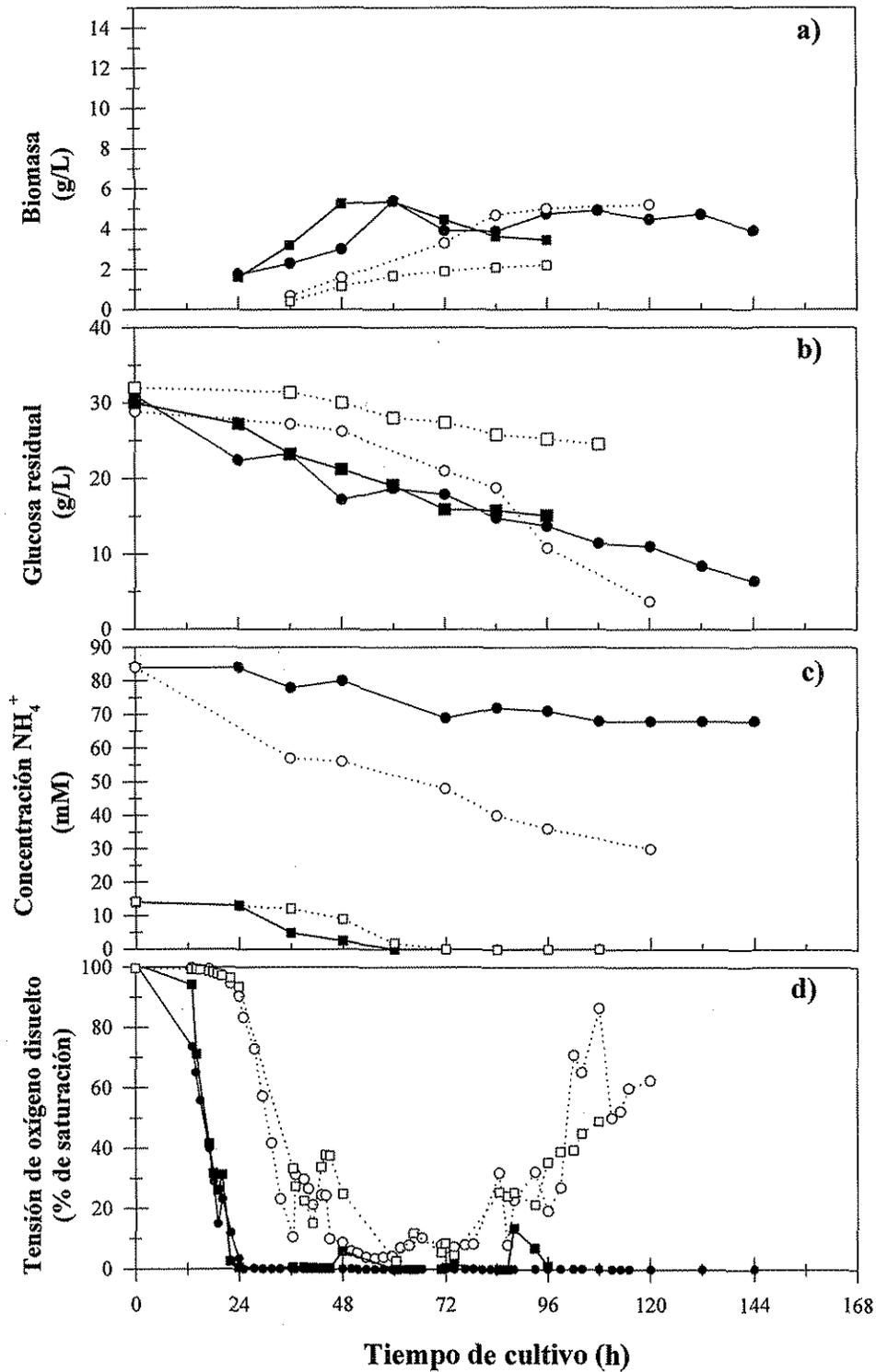


Figura 5.7 Cinéticas de biomasa micelial, sustrato, amonio y TOD en el cultivo de *Trichoderma harzianum* a pH = 3 y diferentes concentraciones de sulfato de amonio y extracto de levadura. Leyendas:

Símbolo y número de proceso	Sulfato de amonio (g/L)	Extracto de levadura (g/L)
—●—, 1	5.6	1.5
··○··, 2	5.6	0
—■—, 3	0.94	1.5
··□··, 4	0.94	0

el análisis químico (proporcionado por el proveedor) indica la presencia de proteínas, péptidos, aminoácidos libres, vitaminas y minerales.

Las mayores productividades y rendimientos se obtuvieron al utilizar extracto de levadura (tabla 5.9). Los rendimientos fueron cercanos a los rendimientos reportados para hongos (como *Penicillium chrysogenum*) en cultivo *batch* y utilizando glucosa como fuente de carbono (Doran, 1998).

Tabla 5.9 Parámetros cinéticos y rendimiento de *Trichoderma harzianum* como función de la concentración de sulfato de amonio y del extracto de levadura (a pH = 3).

No. proceso, símbolo y condiciones	Velocidad de crecimiento (g/L/h)	Productividad (mg/L/h)	Rendimiento* (g biomasa/g sust.)
1, —●— Con extracto de levadura y 5.6 g/L de sulfato de amonio	0.097	90	0.45
2, ...○... Sin extracto de levadura y 5.6 g/L de sulfato de amonio	0.074	54	0.41
3, —■— Con extracto de levadura y 0.94 g/L de sulfato de amonio	0.15	110	0.58
4, ...□... Sin extracto de levadura y 0.94 g/L de sulfato de amonio	0.052	27	0.4

* El rendimiento se calculó en base a la concentración de sustrato consumido.

Al cultivar el hongo con EL, los requerimientos de oxígeno fueron también mayores: los niveles de oxígeno disuelto de los cultivos suplementados con extracto de levadura decayeron desde el 100 % de TOD hasta un nivel del 0 % en 24 horas de cultivo (figura 5.7d), a pesar de los incrementos en la aireación. Esta observación coincidió con la fase lineal de crecimiento del hongo. Considerando las concentraciones críticas de oxígeno (C_{crit}) reportadas para *Trichoderma harzianum* cultivado bajo diferentes condiciones, las cuales van desde alrededor del 4 % de TOD, que corresponde a 0.010 mM O₂/L (para cultivos con 4 fases, Rocha-Valadez *et al*, 2000), 15 % para *Trichoderma viride* (en medio suplementado con celulosa como sustrato, Marten *et al*, 1996)

y 3.6 % (0.010 mM O₂/L para *Penicillium chrysogenum*, Atkinson y Mavituna, 1983), es probable que durante estos cultivos el hongo sufriera limitaciones de oxígeno.

En los cultivos sin EL, la TOD decayó hasta un nivel del 5 %, hasta las 48 h de cultivo (independientemente de la concentración de sulfato de amonio utilizada en el medio de cultivo), debido probablemente a las bajas concentraciones de biomasa generadas en éstos procesos como consecuencia de posibles efectos del ión amonio sobre el hongo y que se discutirán a continuación.

5.2.1.2 Efecto del sulfato de amonio

La evaluación de las diferentes concentraciones de sulfato de amonio (SA) en el cultivo de *Trichoderma*, demostraron dos efectos importantes: la limitación de este nutriente a edad temprana del cultivo (60 horas) cuando se utilizan concentraciones de 0.94 g/L y sin extracto de levadura. Por otro lado, al adicionar 5.6 g/L de SA al medio se observó un efecto inhibitorio, parcial, del amonio sobre el crecimiento del hongo. La velocidad de crecimiento del hongo cultivado con 5.6 g/L de SA (y con extracto de levadura para no implicar limitaciones de nitrógeno en la comparación), fue menor (0.097 g/L·h) con respecto de cuando se cultiva con 0.94 g/L de SA (0.15 g/L·h). Consecuentemente, para lograr la misma concentración de biomasa (5.3 g/L), en el cultivo realizado con 5.6 g/L de SA presenta un retraso de 12 horas respecto del que se realizó con 0.94 g/L de SA (**figura 5.7a**). Además, la concentración de biomasa micelial no aumentó al adicionar 5.6 g/L de SA con respecto a la biomasa generada con 0.94 g/L de SA (en ambos cultivos se generaron 6 g/L como máximo). Es importante mencionar que durante los cultivos el hongo no estuvo limitado en la fuente de carbono (glucosa) durante todo el proceso (**figura 5.7b**).

Comparando la velocidad de crecimiento del hongo y las concentraciones de biomasa de los cultivos desarrollados con y sin extracto de levadura y 5.6 g/L de SA, no se observan diferencias importantes: la velocidad de crecimiento no es muy diferente, cuando se cultiva con EL y 5.6 g/L de SA (0.097 g/L·h) respecto de 0.074 g/L·h al cultivarlo sin extracto de levadura y 5.6 g/L de SA. Las concentraciones de biomasa fueron de 5.3 g/L para los cultivos con y sin extracto de

levadura, Si consideramos, además, que durante el cultivo del hongo utilizando 5.6 g/L de amonio, éste no se consume en su totalidad. Las observaciones mencionadas indican en el cultivo del hongo, el extracto de levadura proporciona nutrientes importantes para el crecimiento del hongo como pueden ser factores de crecimiento y/o vitaminas.

Finalmente, en los cultivos sin EL y 0.94 g/L de SA el hongo presentó la menor velocidad de crecimiento (0.052 g/L·h, **tabla 5.9**), debido a la limitación de nitrógeno que se observa a partir de las 60 horas en el caldo (**figura 5.7c**). Esta limitación de sulfato de amonio en los cultivos desarrollados con 0.94 g/L de SA sin extracto de levadura, coincidió con el incremento en la TOD y con el detenimiento en el crecimiento del hongo (**figura 5.7 a, c, y d**).

Al adicionar extracto de levadura, no se presentan limitaciones en la fuente de nitrógeno, ya que al consumirse el ión amonio, el hongo tiene disponible el nitrógeno contenido en el extracto de levadura. Al existir limitaciones en la fuente de nitrógeno inorgánico (con 0.94 g/L de SA), no se están satisfaciendo las necesidades esenciales del hongo. Por otro lado, al proporcionarse 5.6 g/L de SA en el medio de cultivo, se presentan efectos inhibitorios, parciales, del ion amonio.

La toxicidad del ion amonio ha sido ampliamente documentada para células de eucariotes superiores (Ramírez, 1996). Sin embargo, la toxicidad y otros efectos del amonio pueden ser muy variados y dependerán fuertemente de la línea celular (Martinelle y Häggström, 1993). Se han propuesto los siguientes mecanismos para explicar la toxicidad del amonio: la alteración de gradientes electroquímicos en la célula, la inhibición de reacciones enzimáticas, cambios de pH intracelular y el incremento en la demanda de la energía de mantenimiento (Martinelle y Häggström, 1993). En el caso de hongos filamentosos, los estudios sobre la toxicidad del amonio son escasos. Se ha estudiado el mecanismo de transporte del ion amonio utilizando amonio metilado y marcado (^{14}C), sin embargo los resultados no han sido convincentes (por diferentes dificultades que se han presentado en los estudios, Griffin, 1994). Específicamente para *Trichoderma*, hasta este momento y hasta nuestro conocimiento, los efectos de inhibición del ion amonio no han sido reportados.

5.2.2 Cultivos realizados a pH 5.6

5.2.2.1 Efecto del extracto de levadura

Los efectos del EL en los cultivos desarrollados a pH 5.6 fueron similares a los observados en los cultivos desarrollados a pH 3. Esto es, con EL, las concentraciones de biomasa generadas en los cultivos fueron mayores y se observó también una reducción de 12 horas en la fase de germinación del hongo (**figura 5.8a**). Sin embargo, es de considerar que en este caso la mayor concentración de biomasa fue de 9.2 g/L (utilizando 0.94 g/L de SA y 1.5 g/L de EL, respecto de 5.3 g/L obtenida con esta concentración de SA, 1.5 g/L de EL y pH 3). Las ventajas de utilizar el extracto de levadura fueron también evidentes al comparar la velocidad de crecimiento del hongo, la productividad y los rendimientos de los procesos, que en general fueron más altas en los cultivos suplementados con EL (**tabla 5.10**).

Los niveles de oxígeno disuelto de los cultivos suplementados con extracto de levadura decayeron desde el 100 % de TOD, hasta un nivel del 0 % en 24 horas de cultivo (**figura 5.8d**), debido al crecimiento del hongo. Como se ha mencionado, considerando la C_{crit} del hongo, es probable que durante estas etapas el hongo sufriera limitaciones de oxígeno.

Sin extracto de levadura, las concentraciones de biomasa fueron muy bajas, no rebasando los 2 g/L (independientemente de la concentración de sulfato de amonio utilizada). Consecuentemente, la TOD de los cultivos se mantuvo en niveles superiores al 5 %.

Las velocidades de crecimiento del hongo en los cultivos con EL no cambiaron importantemente respecto de los cultivos sin EL. Con EL el hongo presentó una velocidad de crecimiento de 0.06 g/L·h y 0.070 g/L·h para 5.6 y 0.94 g/L de sulfato de amonio, respectivamente. Los cultivos sin EL presentaron una velocidad de crecimiento de 0.067 y 0.034 para 5.6 y 0.94 g/L de SA, respectivamente. Sin embargo, las concentraciones de biomasa alcanzadas en los cultivos desarrollados con y sin EL fueron significativamente diferentes. De nuevo, los resultados de estos cultivos sugirieron efectos inhibitorios del SA y posibles efectos del pH sobre el crecimiento del hongo, que se discutirán a continuación.

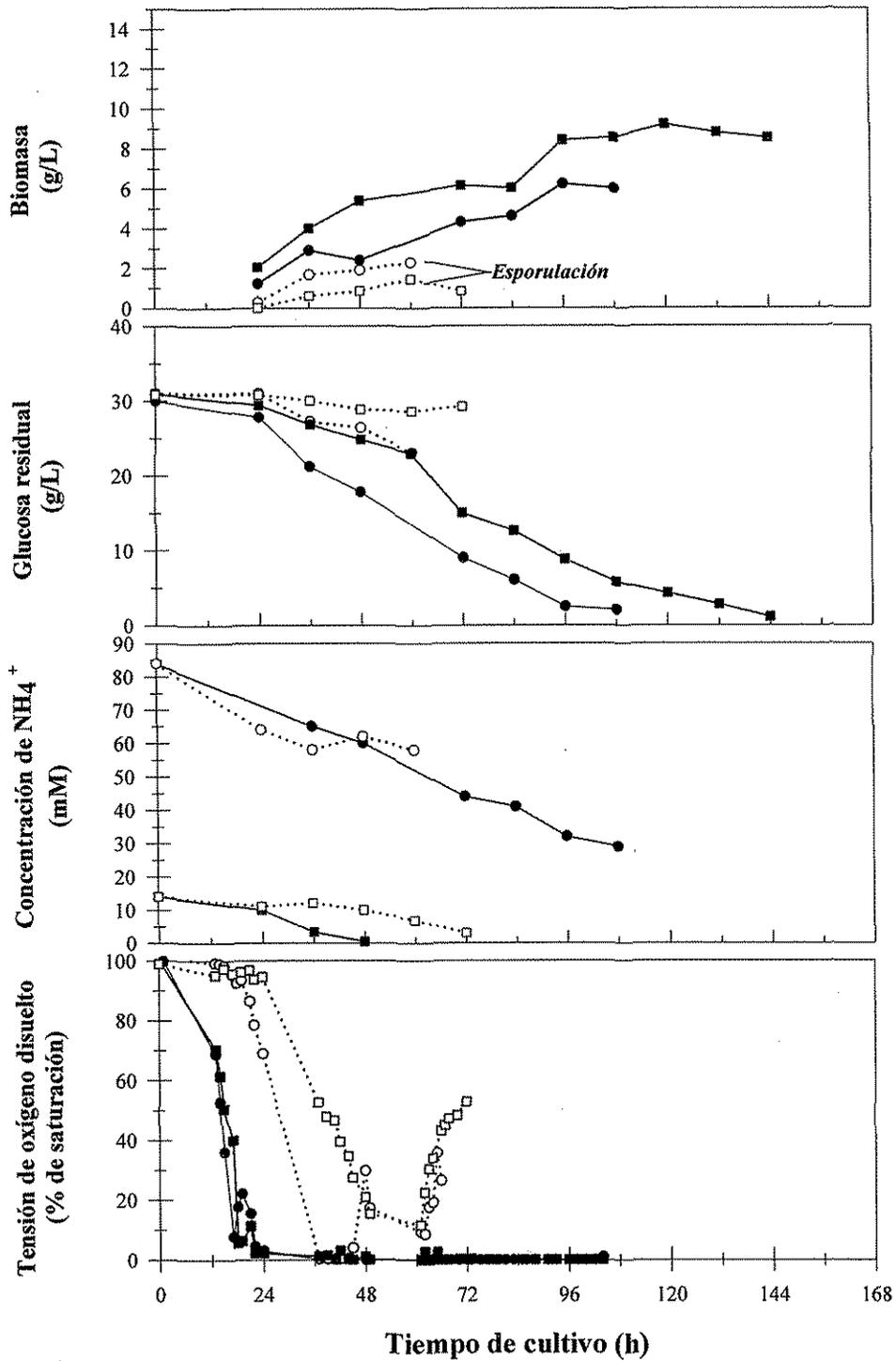


Figura 5.8 Cinéticas de biomasa micelial, sustrato, amonio y TOD en el cultivo de *Trichoderma harzianum* a pH 5.6 y diferentes concentraciones de sulfato de amonio y extracto de levadura. Leyendas:

Símbolo y número de proceso	Sulfato de amonio (g/L)	Extracto de levadura (g/L)
—●—, 5	5.6	1.5
··○··, 6	5.6	0
—■—, 7	0.94	1.5
··□··, 8	0.94	0

Tabla 5.10 Parámetros cinéticos y rendimiento de *Trichoderma harzianum* como función de la concentración de sulfato de amonio y del extracto de levadura (a pH 5.6).

No. Proceso, símbolo y condiciones	Velocidad de crecimiento (g/L·h)	Productividad (mg/L·h)	Rendimiento (g biomasa/g sust.)
5, -●- Con extracto de levadura y 5.6 g/L de sulfato de amonio	0.06	64.5	0.22
6, ...○... Sin extracto de levadura y 5.6 g/L de sulfato de amonio	0.067	46	0.29
7, -■- Con extracto de levadura y 0.94 g/L de sulfato de amonio	0.070	95	42.8
8, ...□... Sin extracto de levadura y 0.94 g/L de sulfato de amonio	0.034	24	0.58

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

5.2.2.2 Efecto del sulfato de amonio

Al igual que en los cultivos realizados a pH 3, al adicionar 0.94 g/L de SA, sin EL, los niveles del amonio empezaban a ser indetectables a partir de las 48 horas (**figura 5.8c**), sugiriendo -nuevamente-, posibles limitaciones de esta fuente de nitrógeno. Sin embargo, al adicionar 5.6 g/L de SA, no se observó un incremento en la concentración de biomasa micelial (**figura 5.8a**). Así mismo, la velocidad de crecimiento del hongo con EL y 5.6 g/L de SA (0.06 g/L·h) no fue diferente respecto de cuando se cultivó con 0.94 g/L de SA (0.070 g/L·h). Este comportamiento puede atribuirse a posibles efectos inhibitorios del ion amonio sobre el hongo. El hongo presentó la menor velocidad de crecimiento (0.034 g/L·h) al cultivarlo con 0.94 g/L de SA, sin extracto de levadura, debido a la limitación de nitrógeno en el cultivo y probablemente a efectos inhibitorios de metabolitos que se describen a continuación.

5.2.3 Efecto del pH

Comparando ahora los datos para las mismas condiciones (i.e. EL y SA) a los dos valores de pH probados, es posible indicar que, el pH ejerció efectos importantes principalmente en dos aspectos:

- 1) **Sobre el crecimiento:** la concentración de biomasa más alta se obtuvo a pH 5.6 (9.2 g/L, en los cultivos con 0.94 g/L de sulfato de amonio y 1.5 g/L de extracto de levadura, (**figura 5.8a**). A pH 3, las concentraciones de biomasa no rebasaron los 6 g/L, bajo ninguna de las condiciones (**figura 5.7a**).
- 2) **Sobre la esporulación del hongo:** a pH 5.6, en los cultivos desarrollados sin extracto de levadura e independientemente de la concentración de sulfato de amonio, el crecimiento micelial fue muy pobre (no rebasó los 2 g/L) y, a partir de las 60 horas de cultivo, la esporulación del hongo fue evidente .

5.2.3.1. Posibles efectos del pH sobre el crecimiento

Respecto a los efectos del pH sobre el crecimiento del hongo se observaron algunos aspectos importantes. De acuerdo al análisis de varianza, el pH ejerce un efecto muy importante en la productividad y en la velocidad de crecimiento del hongo. El pH sugerido para obtener los valores más altos en estos dos parámetros es el pH 3, con 1.5 g/L de extracto de levadura y 0.94 g/L de sulfato de amonio (**figuras 5.4 y 5.6**). Sin embargo, como ya se mencionó, las concentraciones de biomasa de los cultivos realizados a este pH fueron menores que las generadas a pH 5.6, pudiendo parecer estos resultados contradictorios. Como se observa en la **figura 5.7**, la fase lineal de crecimiento del hongo a pH 3 (con extracto de levadura) presenta una velocidad de crecimiento más alta que la observada pH 5.6 (**tabla 5.9 y 5.10**). La diferencia radica en que esta fase lineal de crecimiento es menos prolongada, finalizando a una edad temprana del cultivo (entre las 48 y las 60 horas). Es probable que en el cultivo del hongo a pH 3 se generen metabolitos tóxicos que afecten la fisiología del hongo. Se sabe que el pH afecta otros factores, incluyendo la permeabilidad de la membrana y la disociación de moléculas a iones (Deacon, 1980; Griffin 1994). Por lo tanto, un hongo puede ser incapaz de consumir nutrientes esenciales a cierto pH o puede encontrar niveles tóxicos de algunos compuestos, dependiendo de si éstos son más tóxicos en su forma disociada o no disociada (Deacon, 1980). En este caso, el

efecto del pH y del ion amonio pueden estar relacionados. El amonio en la célula es transportando en forma de amoniaco liberándose el ion hidrógeno, por lo que el pH del medio puede acidificarse hasta un nivel que no sea tolerable por el hongo (Griffin, 1994). En el caso de los cultivos desarrollados a pH 5.6, éstos efectos fueron contrarrestados por el control automático del pH —que se realizó con NaOH— y seguramente por ello, el crecimiento del hongo fue mayor.

5.2.3.2 Posibles efectos del pH sobre la esporulación del hongo

La esporulación del hongo observada en los cultivos a pH 5.6 (sin extracto de levadura e independientemente de la concentración de sulfato de amonio) sugiere por un lado, que a pH 5.6, el extracto de levadura es aún más importante tanto para disminuir posibles efectos tóxicos del sulfato de amonio, como para utilizarse como fuente de nitrógeno (cuando el amonio se proporcione en bajas concentraciones). Por otro lado, debido a que la esporulación del hongo no se observó en los cultivos realizados a pH 3, existe la posibilidad de que el efecto del pH sea específicamente sobre las especies disociadas del CO_2 y éstas a su vez sobre la esporulación del hongo. Los efectos del CO_2 varían dependiendo del pH utilizado en el cultivo. Un hongo puede sufrir efectos tóxicos de algunos compuestos, dependiendo de si éstos compuestos se encuentran en forma disociada o no disociada (esto en función del pH). Dependiendo del pH del medio de cultivo, el CO_2 puede presentar efectos tóxicos, dependiendo de las especies disociadas (H^+ , HCO_3^- , CO_3^{2-}). En varios estudios se ha demostrado que el CO_2 es tóxico para un amplio rango de tipos de líneas celulares, entre los que se incluyen bacterias, levaduras y hongos.

Ha existido la duda sobre los mecanismos y las especies particulares que determinan los efectos del CO_2 . En agua, más del 99 % del CO_2 disuelto existe como gas disperso. Menos del 1 % existe como gas carbónico (H_2CO_3), el cual se disocia para generar iones hidrógeno (H^+), iones bicarbonato (HCO_3^-) y una pequeña cantidad de iones carbonato (CO_3^{2-}) (Seañez, 1999). Estudios sobre los efectos del CO_2 a diferentes pH sugieren que los hongos son más sensibles al ion bicarbonato que al CO_2 . En otras palabras, el CO_2 es más tóxico a niveles altos de pH (Deacon, 1980). En la **tabla 5.11** se presentan las concentraciones relativas (en kmol) de CO_2 , H_2CO_3 , HCO_3^- en función del pH. Como se observa, a pH 5.5, en la disolución de 1 kmol de CO_2 , se encuentran presentes 0.08 kmol del ion bicarbonato. A pH 3, el CO_2 disuelto es el principal componente y la concentración de las especies disociadas es mínima. Es probable que el HCO_3^-

ejerza un efecto tóxico sobre *Trichoderma harzianum* cultivado a pH 5.6 y sin extracto de levadura, el cual, aunado con los efectos del ión amonio inhiba el crecimiento micelial del hongo y se favorezca además, la esporulación. Existen estudios que demuestran efectos importantes del CO₂ sobre la morfología de hongos miceliales cultivados en fermentación sumergida (McIntyre and McNeil, 1997).

Tabla 5.11 Concentraciones relativas de CO₂, H₂CO₃ y HCO₃ en función del pH.

pH	CO ₂	H ₂ CO ₃	HCO ₃
6.0	1	0.001	0.25
5.5	1	0.001	0.08
5.0	1	0.001	0.03
4.5	1	0.001	0.008
4.0	1	0.001	0.003

Tomada de McIntyre and McNeil (1997).

Los efectos del CO₂ sobre el crecimiento de hongos, su esporulación y la producción de metabolitos ha sido reportada para cultivos de *Aspergillus niger* y *Trichoderma*, cultivados en medio sólido (Desgranges y Durand, 1990). Los autores reportaron un incremento en la velocidad de crecimiento radial y una inhibición de la esporulación a bajas presiones de CO₂. Sin embargo, existe una gran discrepancia de los efectos del CO₂ dependiendo del microorganismo y en función del metabolito evaluado (Desgranges y Durand, 1990). En nuestro trabajo, es probable que el CO₂ (por sí mismo, o probablemente en combinación con efectos del ión amonio) inhiba el crecimiento micelial de *Trichoderma harzianum* e induzca esporulación (esto último a pH 5.6).

Es importante hacer notar que en el presente trabajo no se realizaron experimentos específicos con el fin de evaluar los efectos del CO₂, y desde luego valdría la pena profundizar en estos estudios.

De los datos de concentraciones de biomasa de los experimentos incluidos en el diseño factorial, se observó que al cultivar al hongo bajo las condiciones que generaron la mayor concentración de biomasa (9.4 g/L, pH= 5.6, 0.94 g/L de sulfato de amonio y 1.5 g/L de extracto de levadura), esta concentración de biomasa probablemente no podría incrementarse más, dado que el rendimiento obtenido (42.8 %) es cercano al reportado para cultivos con hongos en cultivo *batch* y con glucosa como sustrato (Doran, 1998). Por otro lado, los perfiles de TOD y de consumo de amonio demostraron que después de las 24 y 40 horas de cultivo, respectivamente, era muy probable que el hongo estuviera limitado por éstos sustratos. Aunado a esto, se observaron deficiencias en el mezclado del caldo de cultivo como consecuencia de la concentración de biomasa generada. Como se muestra en la **figura 5. 9**, el micelio se acumuló principalmente entre los *baffles* y la pared del biorreactor, generando zonas muertas (mal mezcladas). Estas zonas fueron más grandes a medida que el proceso avanzaba (como consecuencia del incremento en la biomasa).

En resumen, a partir de los resultados y observaciones mostrados en la **sección 5.2** y con el objetivo de incrementar la concentración de biomasa micelial (respecto al proceso mediante el cual se obtuvo la mayor concentración de biomasa: 9.2 g/L, proceso realizado a pH 5.6, con 0.94 g/L de sulfato de amonio y 1.5 g/L de extracto de levadura), se propuso la siguiente estrategia:

- Realizar cultivos en los que se alimente amonio al caldo de cultivo (a partir de las 36 horas de cultivo cuando la concentración de amonio es mínima).
- Utilizar impulsores de mayor diámetro y/o otro tipo de difusores, para mejorar la transferencia de oxígeno e incrementar la TOD en el caldo de cultivo.
- Incrementar la agitación en el proceso para abatir las deficiencias en el mezclado.

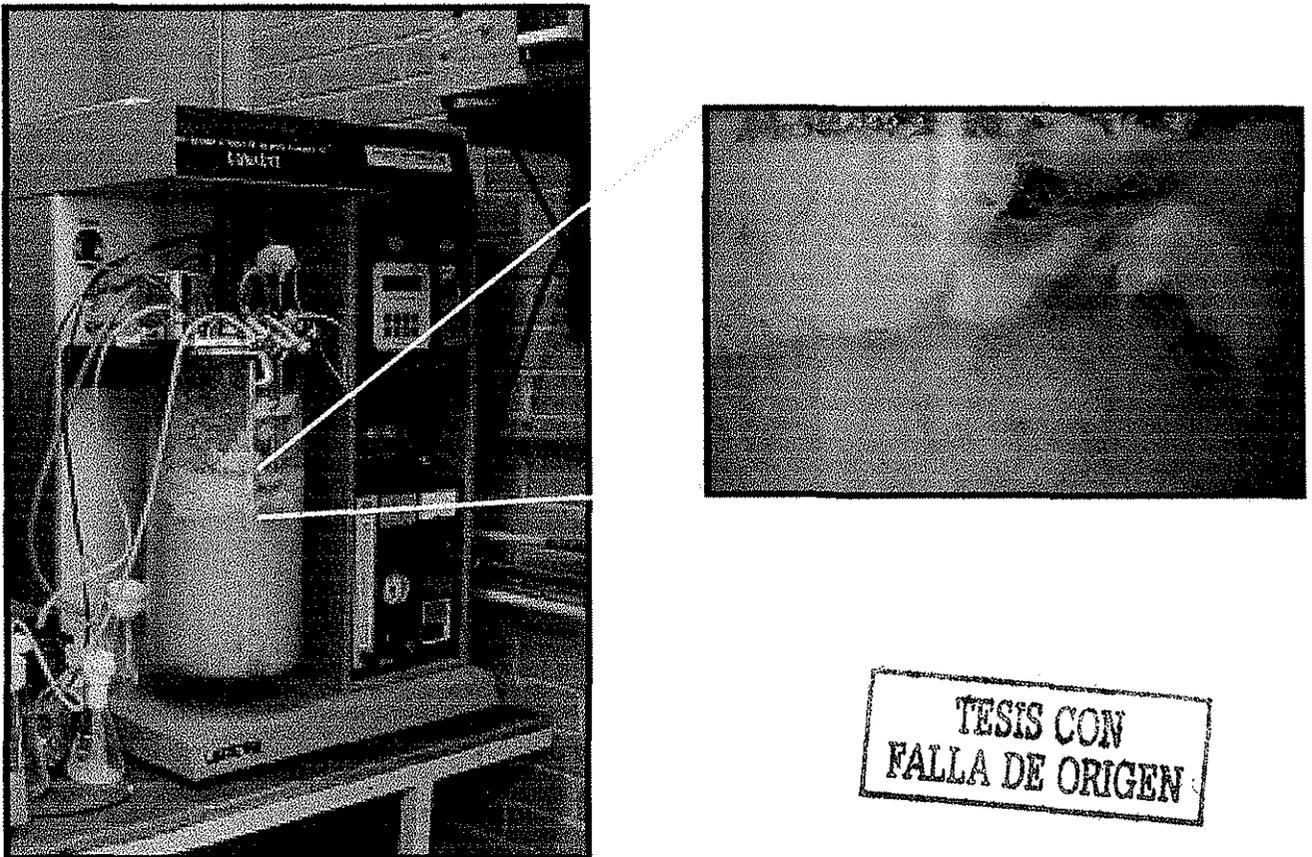


Figura 5.9 Visualización de las limitaciones de mezclado en el cultivo de *Trichoderma harzianum* en el medio con 0.94 g/L de sulfato de amonio, 1.5 g/L de extracto de levadura y a pH 5.6.

5.3 Cultivos alimentados

Con las propuestas surgidas del análisis de las cinéticas de los procesos en lote, se realizó un proceso con las siguientes características:

- Adición intermitente de solución de hidróxido de amonio como sistema de control de pH, con el objeto de evitar limitaciones de la fuente de nitrógeno.
- Para abatir las limitaciones en la transferencia de oxígeno, se utilizó un difusor de anillo e impulsores de mayor diámetro (de 10.5 cm de diámetro, $D/T=0.5$).
- A las 72 horas de cultivo, se realizó también una adición de glucosa a manera de incrementar su concentración en 10 g/L de medio de cultivo. A esta edad del cultivo, la

concentración de glucosa se encontraba en un rango de entre 5 y 10 g/L. En conjunto con esta adición de glucosa se incrementó la agitación del biorreactor a 350 rpm.

En lo sucesivo, este cultivo se denominará cultivo alimentado

En la **figura 5.10** se muestran las cinéticas del proceso alimentado y se comparan con el cultivo en el que se obtuvo la mayor concentración de biomasa bajo las condiciones (en lote) evaluadas del diseño factorial (considerado como control para la comparación de estos procesos, proceso 7 de la **figura 5.8**) y a partir del cual se realizaron los cambios mencionados.

En este proceso se logró incrementar la concentración de biomasa hasta 13 g/L a las 84 horas de cultivo, respecto de 9.2 g/L que se generaron en el cultivo control (**figura 5.10a**). Las diferencias entre los dos procesos son notables a partir de las 48 horas de cultivo, debido probablemente a que la alimentación del amonio se inició desde las 36 horas (**figura 5.10c**), con lo que se evitó la limitación de este nutriente. La concentración de biomasa obtenida bajo estas condiciones representa un mejoramiento importante y significativo en el proceso. Fue evidente el incremento en los niveles de la tensión de oxígeno disuelto en el cultivo, debido seguramente al uso de los impulsores más grandes para la agitación del proceso ($D/T=0.5$), así como al uso del difusor de anillo con que se equipó el biorreactor. Considerando las C_{crit} (TOD crítica) reportadas para diferentes cepas de *Trichoderma* (cuyos niveles señalan un nivel de TOD por encima de 3.6 % (ver Rocha Valadez *et al*, 2000 quienes reportaron una comparación de las C_{crit} para *Trichoderma harzianum* y *Penicillium chrysogenum*), podemos inferir que el hongo no estuvo limitado por oxígeno durante el proceso, por lo menos hasta las 36 horas de cultivo. Como se observa en la **figura 5.10d**, la TOD se mantuvo por encima del 10 % hasta las 36 horas. A partir de este tiempo y hasta las 72 horas de cultivo, se mantuvo un nivel aproximado del 3 %. Si bien la concentración de oxígeno no es superior a la C_{O_2crit} (mencionada para diferentes cultivos de *Trichoderma* y *Penicillium*), el perfil lineal de crecimiento observado en el cultivo (**figura 5.10a**) no sugiere limitación de este nutriente.

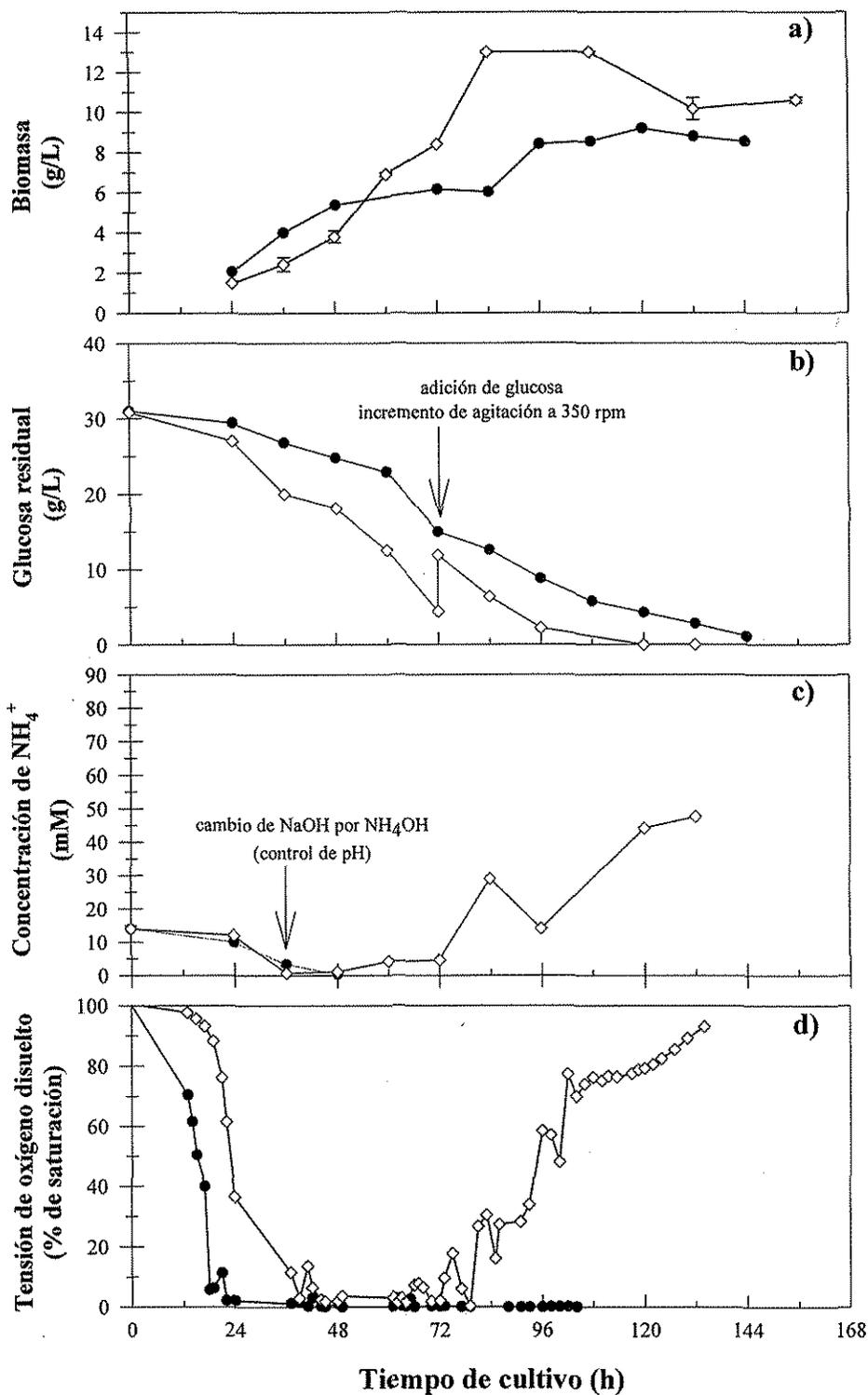


Figura 5.10 Cinéticas de biomasa, glucosa residual, amonio y TOD en el cultivo alimentado, comparado con el cultivo en lote.

- ◇ Cultivo alimentado
- Cultivo en lote (proceso 7)

Para el caso del cultivo control, como se había destacado con anterioridad, la limitación en el oxígeno disuelto es evidente a partir de las 24 horas de cultivo (**figura 5.10d**). Sin embargo, en el proceso alimentado, la TOD se incrementó importantemente a partir de las 72 horas de cultivo. Esto coincidió con el incremento en la concentración de amonio, que inició en el mismo periodo de cultivo. Considerando que no se observaron limitaciones en la glucosa presente en el caldo de cultivo (**figura 5.10b**), estos resultados sugirieron nuevamente posibles efectos inhibitorios del del amonio sobre el crecimiento del hongo.

Respecto del mezclado del proceso, se sabe que en fermentaciones miceliales, los aspectos de mezclado son particularmente críticos debido a las características no Newtonianas del caldo y a una alta demanda de oxígeno (Vanags *et al*, 1995). En ellos, intervienen diferentes características (la transferencia de masa, las propiedades reológicas del caldo, la sensibilidad de las células al estrés, por mencionar algunos) que influyen el desarrollo de fermentaciones miceliales (Vanags *et al*, 1995). Por ello, las condiciones de agitación requieren de gran atención. Por ejemplo, la selección de la geometría del impulsor, su posición y el número de ellos utilizados en el sistema de agitación y la potencia aplicada, determinan las fuerzas mecánicas que podrían afectar al microorganismo en un fermentador e influyen el crecimiento y/o la formación de producto. Estos efectos se dan por cambios en la morfología y por la inducción de la diferenciación de las hifas (Justen *et al*, 1996). Así, para cada microorganismo las condiciones óptimas de agitación deben establecerse (Justen *et al*, 1996).

Sobre este aspecto, para *Trichoderma sp*, se han realizado diversos estudios relacionados con aspectos de la agitación del proceso. El objetivo de ellos fue el incrementar la concentración de biomasa y/o algún metabolito de interés. Mukataka y colaboradores (1988) estudiaron la actividad de la celulasa (complejo multienzimático) producida por *Trichoderma reesei*, cultivado a diferentes velocidades de agitación (200, 300, 400 y 500 rpm) con turbinas Rushton ($D/T= 0.5$; relación diámetro del impulsor-diámetro del tanque) y manteniendo la concentración de oxígeno del cultivo en niveles superiores a 3 ppm. Cada componente del complejo multienzimático que constituye la enzima requirió diferentes niveles de agitación, que en general fueron 200 y 300 rpm (con excepción de la β -glucosidasa que requirió de 400 rpm). Los autores observaron también el efecto de la agitación sobre la morfología del hongo: de 100 a 300 rpm observaron la formación de “pellets”, mientras que al incrementar la agitación los “pellets” no se formaron. Sin

embargo, estos incrementos en la agitación produjeron rompimiento micelial y baja productividad de la enzima. Esta baja productividad es probablemente debida al daño ocasionado al micelio (Mukataka *et al*, 1988). Felse y Panda (2000) han evaluado también los efectos de la agitación sobre cultivos de *Trichoderma* (cepa NCIN 1185) y la producción de quitinasas por éste hongo. Esos autores evaluaron velocidades de agitación de 150 a 300 rpm (con turbinas Ruhston D/T= 0.18). Observaron un incremento en el crecimiento celular y en la producción de la enzima hasta a 224 rpm. Reportaron una disminución en el crecimiento a partir de los 270 rpm.

Considerando las relativamente bajas velocidades de agitación y la baja relación D/T utilizada en este estudio (comparada con otros estudios, v.g. Lejeune y Baron, 1995; Marten *et al*, 1996) podría pensarse que *T. harzianum* NCIM 1185 fuera más sensible al estrés mecánico que otros microorganismos, por ejemplo, que *T. reesei* QM 9414 y *T. reesei* RUT-C30, como podrá observarse a continuación. En el caso de la cepa *T. reesei* QM 9414, Lejeune y Baron (1995) evaluaron el efecto de la agitación sobre el crecimiento y la producción de celulasas y xilanasas. En este estudio se utilizaron turbinas Ruhston con una D/T = 0.58, evaluándose agitaciones de 130, 200, 300 y 400 rpm. El crecimiento del hongo no se afectó al cultivar el hongo a 400 rpm, sin embargo, la actividad de las enzimas fue mayor a 200 rpm. Para la cepa *T. reesei* RUT-C30, Marten y colaboradores (1996) evaluaron diferentes velocidades de agitación (250, 400 y 550 rpm) sobre el crecimiento del hongo. En general, la concentración de biomasa fue similar para todas las velocidades de agitación. La diferencia fue el tiempo de cultivo requerido para ello: a mayor velocidad de agitación, menor tiempo de cultivo requerido. Otra característica importante fue que el micelio fue más corto a medida que se incrementó la velocidad de agitación. Los efectos de la agitación sobre el micelio se ha estudiado también para el caso de otros hongos como *Penicillium chrysogenum*, en donde se observaron comportamientos similares: el largo de la hifa principal decreció dependiendo del incremento en la velocidad de agitación (Makagiansar *et al*, 1993).

Para comparar la sensibilidad al estrés mecánico de las cepas estudiadas en los reportes anteriores se calculó la potencia gaseada suministrada al caldo de fermentación (Pg/V) de cada estudio. Se utilizaron los datos proporcionados en cada uno de los artículos. Los números de potencia gaseada Pg para cada implusor se tomaron de Justen *et al*, 1996.

En la **tabla 5.12** se presenta la potencia suministrada en los caldos de fermentación en las condiciones que fueron óptimas para la función objetivo del estudio realizado.

Tabla 5.12 Comparación de la sensibilidad al estrés mecánico –medido como potencia volumétrica gaseada - para diferentes cepas de *Trichoderma*.

Cepa y referencia	Función objetivo	Potencia volumétrica gaseada óptima (Pg/V, w/L)	Observaciones a niveles superiores de la Pg/V óptima
<i>T. reesei</i> QM 9414 (Mukataka <i>et al</i> , 1988)	Producción de celulasas	0.64	Rompimiento micelial y la producción de la enzima disminuyó
<i>T. harzianum</i> NCIN 1185 (Felse y Panda, 2000)	Producción de quitinasas	0.0018	La producción de la enzima disminuyó
<i>T. harzianum</i> NCIN 1185 (Felse y Panda, 2000)	Crecimiento micelial	0.0025	El crecimiento micelial decreció
<i>T. reesei</i> QM 9414 (Lejeune y Baron <i>et al</i> , 1995)-	Actividad de celulasas y xilanasas	0.57	la actividad de la enzima disminuyó
<i>T. reesei</i> QM 9414 (Lejeune y Baron <i>et al</i> , 1995)-	Crecimiento micelial	1.95	La concentración de biomasa disminuyó

Como se observa en la **tabla 5.12** la producción de quitinasas por *T. harzianum* NCIN 1185 fue más sensible al estrés mecánico que la cepa de *T. reesei* QM 9414. Por otro lado, se demuestra que existen diferencias en los requerimientos del hongo dependiendo de la función objetivo. Por ejemplo, para *T. reesei* QM 9414, la producción de celulasa y xilanasas debe realizarse a potencias volumétricas menores a 0.57 w/L. Sin embargo, el crecimiento del microorganismo puede realizarse utilizando potencias de hasta 1.95 w/L. La diferencia en las condiciones mencionadas es atribuible a la sensibilidad de la enzima al estrés mecánico (Lejeune y Baron, 1995). Para el caso de la cepa de *T. harzianum* NCIN 1185 las potencias óptimas para el crecimiento y la producción de quitinasa es muy similar. Además, se observa que la cepa de *T. harzianum* NCIN 1185 fue más sensible al estrés mecánico que *T. reesei* QM 9414.

Los reportes anteriores demuestran la importancia de evaluar las condiciones de agitación para cada microorganismo y para cada función objetivo. Por otro lado, es necesario evaluar los efectos de la agitación también en términos de la viabilidad de microorganismo, aspecto escasamente considerado en la literatura.

En nuestro estudio el incremento en la agitación a 350 rpm ($Pg/V = 1.6 \text{ w/L}$) se realizó como respuesta a la observación de zonas muertas en el biorreactor. Este incremento se llevó a cabo en la fase lineal de crecimiento. Si bien los efectos de la agitación no fueron evaluados independientemente de los efectos del ión amonio (inferidos en este estudio), la evaluación de la viabilidad de los cultivos (que se muestran en la siguiente sección) sugieren que la agitación no ejerció efectos significativos sobre la viabilidad del hongo.

El rendimiento (en términos de gramos de biomasa producido por gramo de sustrato consumido, $Y_{X/S}$) de los procesos alimentado y en lote fueron similares: 39.3 % y 42.8 % respectivamente. La diferencia fue el tiempo de cultivo requerido para ello, lo cual se refleja en la productividad. El proceso alimentado presentó una productividad de 154 mg de biomasa/L·h y el proceso en lote de 95 mg/L·h. Ello corresponde a una productividad mayor en un 61 %.

Comparando la concentración de biomasa generada en el cultivo alimentado con las concentraciones de biomasa generadas en otros cultivos de *Trichoderma sp.* (Mukataka *et al.*, 1988; Marten *et al.*, 1996; Felse y Panda 2000) se demuestran ventajas importantes en nuestro proceso. Por un lado, la concentración de extracto de levadura utilizada en este estudio es baja con respecto a las utilizadas en otros procesos (p. ejem. Marten *et al.* (1996) utilizó 10 g/L de extracto de levadura en el medio de cultivo. Por otro lado, podemos establecer que el costo de nuestro proceso es también menor con respecto al proceso reportado por Marten y colaboradores (1996), si consideramos que esos autores obtuvieron 22 g/L de biomasa micelial en un medio de cultivo constituido por 10 g/L de extracto de levadura y aireado con aire enriquecido con oxígeno puro). El uso de las altas concentraciones de éstos nutrientes (extracto de levadura y oxígeno puro) pueden ser una limitante en el escalamiento del proceso a nivel industrial.

Por su parte, Mukataka y colaboradores (1988) que obtuvieron 10 g/L en dos días de cultivo; sin embargo, en vista de que los autores no reportaron la composición del medio de cultivo utilizado,

no fue posible hacer estas comparaciones. Felse y Panda (2000) reportaron la producción de 15 g/L de biomasa micelial en un medio complejo utilizando peptona y quitina. Debe destacarse que la viabilidad del microorganismo en función de las condiciones de cultivo y de la agitación no fue evaluada específicamente en ninguno de los casos citados. En ellos, los autores evaluaron solamente el tamaño de las hifas y la morfología desarrollada. En nuestro estudio, uno de los objetivos fue el de implementar y validar una técnica mediante la que fuera posible estimar cuantitativamente la viabilidad de *Trichoderma harzianum*. Esta parte del proyecto se desarrolló en colaboración con el Dr. Mainul Hassan y de ello, se integró un manuscrito que fue aceptado por la revista *Biotechnology and Bioengineering* para su publicación (ver **anexo 6**). La técnica propuesta se basa en tinciones fluorescentes (utilizando diacetato de fluoresceína) y análisis de imágenes. Lo referente a la implementación y validación de la técnica así como al uso del sistema de análisis de imágenes se presenta en los **anexos 3, 4 y 5**.

A continuación se muestran los resultados de la aplicación de esta técnica para la evaluación de la viabilidad del hongo en función de las condiciones y de la edad del cultivo.

5.4 Viabilidad del micelio de *Trichoderma harzianum* cultivado bajo diferentes condiciones en biorreactores de 14 L

Se evaluó la viabilidad de la biomasa (% de área teñida con FDA) en función de las condiciones y la edad del cultivo. Debido a que el montaje y validación de la técnica se realizó simultáneamente con el desarrollo de las fermentaciones, la viabilidad del micelio se evaluó sobre tres diferentes condiciones de cultivo, que en general representan las concentraciones mínimas y máximas de biomasa generadas en el desarrollo del presente trabajo (diseño factorial y proceso alimentado). Las condiciones fueron:

- 1) pH = 3, 0.94 g/L de sulfato de amonio, sin extracto de levadura (biomasa final = 2.4 g/L).
- 2) pH = 5.6, 0.94 g/L de sulfato de amonio, con 1.5 g/L de extracto de levadura (biomasa final = 9.2 g/L).
- 3) pH = 5.6, 0.94 g/L de sulfato de amonio, con 1.5 g/L de extracto de levadura, adición intermitente de solución de hidróxido de amonio como sistema de

control de pH, difusor de anillo, impulsores de 10.5 cm de diámetro ($D/T=0.5$). A las 72 horas de cultivo, se realizó una adición de glucosa para incrementar su concentración en 10 g/L de medio de cultivo. A esta edad del cultivo, la concentración de glucosa se encontraba en un rango de entre 5 y 10 g/L. Simultáneamente con esta adición de glucosa se incrementó la agitación del biorreactor a 350 rpm.

En la **figura 5.11c** se muestra la evolución de la biomasa viable respecto del tiempo de cultivo. La biomasa viable fue fuertemente influenciada por las condiciones particulares del proceso. El cultivo alimentado generó la más alta concentración de biomasa viable. A las 84 horas de cultivo, el 77 % de la biomasa total se encontraba viable (**figura 5.11 a y b**). Por otra parte, en los cultivos en lote, los posibles efectos de limitación de amonio (al utilizar 0.94g/L de SA) sobre la viabilidad del hongo sugeridos en la sección 5.2 se corroboraron en estos cultivos. En el caso del cultivo realizado a pH 3, con 0.94 g/L de SA concentración de sulfato de amonio la concentración de biomasa viable fue muy baja: 1.3 g/L a las 60 horas de cultivo, lo que equivale a un 60 % de la biomasa total. En el cultivo desarrollado a pH 5.6, se generaron hasta 4 g/L de biomasa viable a las 108 horas de cultivo.

Asimismo, si analizamos los datos consignados en la **figura 5.11** con el objetivo de verificar los posibles efectos inhibitorios del amonio sobre la viabilidad del hongo. Para el caso del proceso alimentado, observamos que los valores del área teñida con FDA (**figura 5.11b**), en términos generales presentan dos perfiles lineales: uno desde el inicio del y hasta las 84 horas de cultivo, (pendiente 1= -0.22, representado por una línea sólida) y otro a partir de este tiempo (84 h) y hasta el término del cultivo (pendiente 2 = 0.87, representado por una línea punteada). El cambio en la pendiente (que indica una pérdida de viabilidad del hongo muy drástica) correlaciona con la acumulación de amonio en el cultivo (El perfil de acumulación de amonio en el cultivo alimentado está representado también por una línea punteada, **figura 5.11d**). La acumulación de amonio en el caldo de cultivo coincidió con el término de la fase lineal de crecimiento del hongo (**figura 5.11a**). Como una manera de relacionar la acumulación del amonio en el caldo de cultivo y el posible efecto inhibitorio sobre el crecimiento del hongo, se graficó la acumulación de biomasa no viable con respecto de la concentración de amonio. Como se muestra en la **figura**

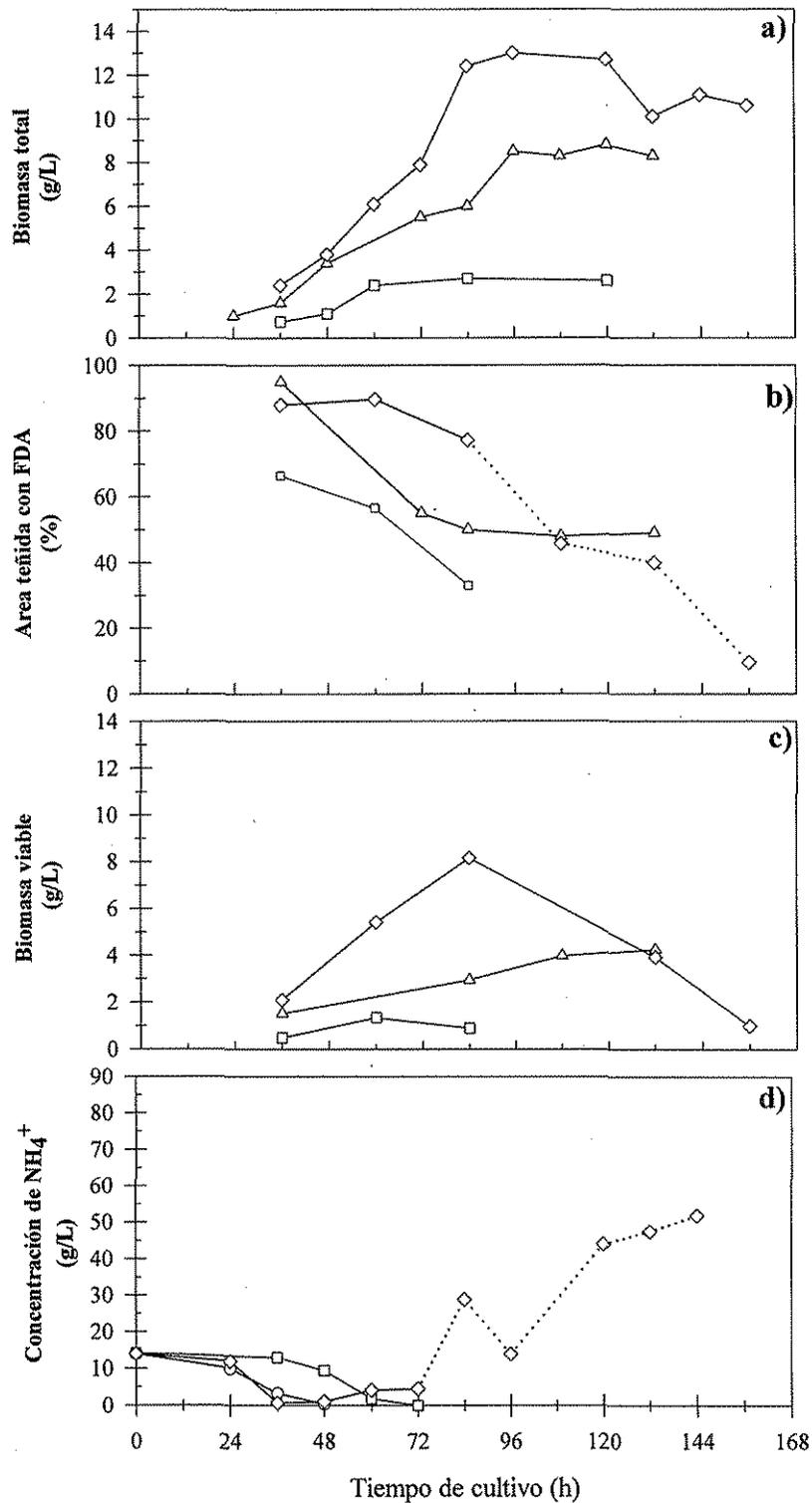


Figura 5.11. Biomasa total, área teñida con FDA, viabilidad de *Trichoderma harzianum* y evolución de amonio, en función de las condiciones de cultivo. Leyendas: -□- cultivo en lote, pH 3, (-△-) cultivo en lote pH 5.6, (-◇-) cultivo alimentado.

5.12, existe una correlación entre ambos parámetros.

Hasta donde sabemos, los efectos inhibitorios del amonio sobre *Trichoderma harzianum* no han sido reportados. Los resultados del presente trabajo sugieren que existe un límite de tolerancia de *Trichoderma harzianum* hacia el ion amonio y probablemente también para el CO₂.

Es de especial importancia realizar estudios más profundos sobre las concentraciones críticas del amonio para el hongo, para establecer el nivel de concentración máximo que no afecte al hongo.

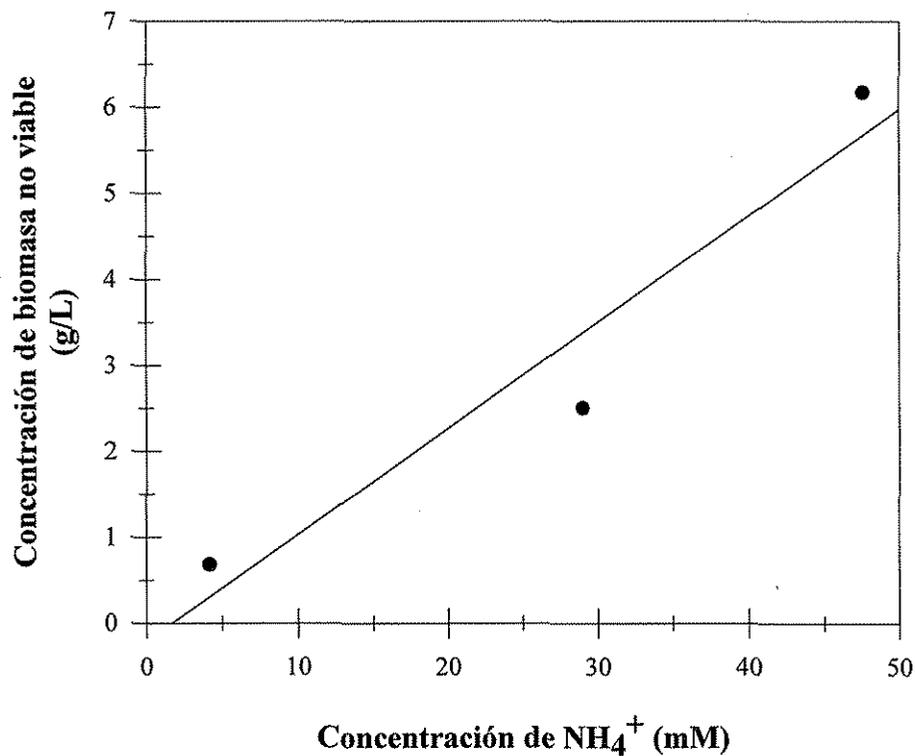


Figura 5.12 Correlación entre la biomasa no viable y la concentración del ión amonio en el cultivo de *Trichoderma harzianum*.

Capítulo VI

Conclusiones

- El extracto de levadura, el sulfato de amonio y el pH son factores muy importantes en la producción de biomasa micelial de *Trichoderma harzianum* y en la productividad del proceso. El crecimiento micelial del hongo es influenciado importantemente por el pH.
- En el proceso realizado bajo las condiciones con que se obtuvieron los mejores resultados en el diseño factorial (0.94 g/L de sulfato de amonio, 1.5 g/L de extracto de levadura y pH de 5.6) se obtuvieron hasta 9.2 g/L de biomasa total en 96 horas de cultivo, con una productividad de 9.4 mg de biomasa /L·h y un rendimiento del 42.8 %. En este proceso fueron evidentes deficiencias en el mezclado así como posibles limitaciones en la fuente de nitrógeno inorgánico y en el oxígeno disuelto.
- Mediante estrategias simultáneas (adición intermitente de NH_4OH al caldo de cultivo, alimentación de glucosa, uso de impulsores de 10.5 cm de diámetro, uso de un difusor de anillo e incremento de la velocidad de agitación) se superaron las limitaciones mencionadas, lográndose hasta 13 g/L con un rendimiento del 39 %.
- En el cultivo alimentado se lograron producir hasta 8 g/L de biomasa viable en 84 horas de cultivo.
- Se sugiere que el ion amonio ejerce un efecto inhibitorio, parcial, sobre el crecimiento del hongo.
- Se montó y validó una técnica (a base de tinciones fluorescentes y análisis de imágenes) para la cuantificación de la viabilidad del micelio de *Trichoderma harzianum* cultivado en cultivo sumergido.

Capítulo VII

Recomendaciones

- Realizar estudios para evaluar la concentración adecuada del ion amonio en el medio de cultivo, a fin de evitar su limitación y /o exceso. Esto permitiría mantener la viabilidad del hongo y consecuentemente incrementaría la concentración de biomasa viable en el proceso.
- Evaluar los efectos del CO₂ sobre la fisiología del hongo.
- La formulación y secado del producto es otra etapa que tiene influencia sobre la viabilidad del producto que se aplica en control biológico. Es recomendable realizar evaluaciones de este aspecto. En estas evaluaciones puede aplicarse la técnica de cuantificación de la viabilidad del micelio propuesta en este trabajo.

Capítulo VIII

Bibliografía

- Agosin, E. and Aguilera, J. M. 1998. Industrial production of active propagules of *Trichoderma* for agricultural uses. In: *Trichoderma and Gliocadium*, vol. 2 (Harman and Kubicek, eds), Tylor & Francis, pp 205-233.
- Altomare, C., Norvell, W. A., Bjorkman, T. and Harman, G. E. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai –1295-22. **Applied and Environmental Microbiology**, 7 65: 2926-2933.
- Amrane, A. and Prigent, Y. 1998. Influence of yeast extract concentration on batch cultures of *Lactobacillus helveticus*: growth and production coupling. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 14: 529-534
- Apsite, A., Viesturs, U., Steinberga, A. and Toma, M. 1998. Morphology and antifungal action of the genus *Trichoderma* cultivated in geometrically dissimilar bioreactors. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 14: 23-29.
- Atkinson, B. and Mavituva, F. 1983. Biochemical engineering and Biotechnology handbook. The nature Press. New York. USA:
- Benhamou, N. and Chet, I. 1996. Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. **Phytopathology**, 86(4): 405-416
- Box, G. E. P., Hunter, W. and Hunter, J. S. 1988. **Estadística para investigadores**. Editorial Reverté, S. A. Barcelona, España.
- Breeuwer, P. and Abee, T. 2000. Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. **International Journal of Food Microbiology**, 55: 193-200.
- Carsolio, C. A., Gutiérrez, B., Jiménez, M., Van, Montagu and Herrera-Estrella, A. 1994. Characterization of *each-42*, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. **Proceedings of the National Academis Science**, 91: 1093-1097.
- Chet, I. 1987. *Trichoderma* –aplication, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: **Innovative Approaches to Plant Disease Control** (I. Chet, ed.), John Wiley, New York, pp. 137-157.

- Chet, I., Bhenamou, N. and Haran, S. 1998. Mycoparasitism and lytic enzymes. In: *Trichoderma and Gliocadium*, vol. 2. (Harman and Kubicek, eds), Tylor & Francis, pp. 153-169.
- Chet, I., Harman, G.E. and Baker R. 1981. *Trichoderma hamatum*: its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. **Microbial Ecology**, 7: 29-38.
- Cooney, J. M. and Lauren, D. R. 1998. *Trichoderma*/pathogen interactions: measurement of antagonistic chemicals produced at the antagonist/pathogen interface using a tubular bioassay. **Letters in Applied Microbiology**, 27: 283-286.
- Deacon, J. W. 1980. In: **Basic Microbiology**. (J.F. Wilkinson, ed.). Blackwell Scientific Publications, London, pp. 91-92.
- Desgranges, C. and Durand, A. 1990. Effect of CO₂ on growth, conidiation, and enzyme production in solid state culture on *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride* TS. **Enzyme and Microbial Technology**, 12: 546-551.
- Domingues, F. C., Queiroz, J. A., Cabral, J. M. S. and Fonseca, L. P: 2000. The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme and Microbial Technology**, 26: 394-401.
- Doran, M. P. 1998. **Principios de Ingeniería de los Bioprocesos**. Editorial Acribia, España.
- Elad, Y., 2000. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action, **Crop Protection**, 19: 709-714.
- Elad, Y., Barak, R. and Chet, I. 1984. Parasitism of *Sclerotium rolfsii* sclerotia by *Trichoderma harzianum*. **Soil Biology and Biochemistry**, 16: 381-385.
- Elad, Y. and Shtienberg, D. 1995. *Trichoderma harzianum* T39 (Trichodex) integrated with fungicides for the control of grey mould of strawberry, vegetable greenhouse-crops and grapes. **Integrated Control of Grey Mould**, 310-319.
- Felse, P. A. and Panda, T. 2000. Submerged culture production of chitinase by *Trichoderma harzianum* in stirred tank bioreactors –the influence of agitator speed. **Biochemical Engineering Journal**, 4: 115-120.
- Flores, A., Chet, I. and Herrera-Estrella, A. 1997. Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over –expression of the proteinase encoding gene prbl. **Current Genetics**, 31: 30-37
- Gams, W. and Bisset, J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. In *Trichoderma and Gliocadium*, vol. 1 (Harman and Kubicek, eds), Tylor & Francis, pp. 3-34.

- Gibbs, P. A., Seviour, R. J. and Schmid, F. 2000. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. **Critical reviews in Biotechnology**, 20 (1):17-48.
- Godoy-Silva, R. D., Serrano-Carreón, L., Ascanio, G. and Galindo, E. 1997. Effect of impeller geometry on the production of aroma compounds by *Trichoderma harzianum*. **Procc. 4th International Conference on Bioreactor & Bioprocess Fluid Dynamics** (A. W. Nienow, ed.), BHR Group Conference series , 25: 61-71.
- Goldman, G. H., Hayes, C. and Harman, G. E. 1994. Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma spp.* **TIBTECH**, 12:478-483.
- Griffin David H. 1994. **Fungal Physiology**. Second edition. Wiley-Liss, Inc. New York.
- Harman, G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol- changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, 84(4): 377-393.
- Harman, G. E., Jin, X., Stasz, T. E., Peruzzotti, G. Leopold, A. C. and Taylor, A. G. 1991. Production of conidial biomass of *Trichoderma harzianum* for biological control. **Biological Control**, 1: 23-28.
- Herrera-Estrella, A. and Chet, I. 1998. Biocontrol of bacteria and phytopathogenic fungi. In: **Agricultural Biotechnology**, (A. Altman, ed), Marcel Dekker, Inc., pp 263-283.
- Hjeljord, L. and Tronsmo, A. 1998. *Trichoderma* and *Gliocadium* in biological control: an overview. In: **Trichoderma and Gliocadium**, vol. 2 (Harman and Kubicek, eds), Tylor & Francis, pp 131-145.
- Inbar, J., Menendez, A. and Chet, I. 1996. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. **Soil Biology and Biochemistry**, 28(6): 757-763.
- Inbar, J., Abramsky, M., Cohen, D. and Chet, I. 1994. Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings grown under commercial conditions, **European Journal of Plant Pathology**, 100: 337-346.
- Jackson, A.M. 1997. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 19: 180-187.
- Jackson, A.M., Whipps, J.M. and Lynch, J.M. 1991a. Nutritional studies of four fungi with disease biocontrol potential. **Enzyme and Microbial Technology**, 13:456-461.

- Jackson, A.M., Whipps, J.M. and Lunch, J.M. 1991b. Effects of temperature, pH and water potential on growth of four fungi with disease biocontrol potential. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 7: 494-501.
- Jin, X. Harman, G. E. and Taylor, A. G. 1991. Conidial biomass and desiccation tolerance of *Trichoderma harzianum* produced at different medium water potentials. **Biological Control**, 1: 237-243.
- Jin, X. Harman, G. E., Taylor, A. G. and Harman, G. E. 1996. Development of media and automated liquid fermentation methods to produce desiccation-tolerant conidial biomass and desiccation-tolerant propagules of *Trichoderma harzianum*. **Biological Control**, 7: 267-274.
- Justen, P., Paul, G. C., Nienow, A. W. and Thomas, C. R. 1996. Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity. **Biotechnology and Bioengineering**, 52: 672-684.
- Kaplan, A. 1965. Urea nitrogen and urinary ammonia. **Standard Methods in Clinic Chemistry**, 5: 245-256.
- Kennedy, J. M, Reader, L. S., h.R., Davies, R. J., Rhoades, A. D. and Silby, H. W.1994. The scale up of mycelial shake flask fermentations: a case study of gamma linolenic acid production by *Mucor hiemalis* IRL 51. **Journal of Industrial Microbiology**, 13: 212-216.
- Lejeune, R. and Baron, G. V. 1995. Effect of agitation on growth and enzyme production of *Trichoderma reesei* in batch fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 43: 249-258.
- Lewis, J. A. and Larkin, R. P. 1997. Extruded granular formulation with biomass of biocontrol *Gliocadium virens* and *Trichoderma spp.* to reduce damping-off of eggplant caused by *Rhizoctonia solani* and saprophytic growth of the pathogen in soil-less mix. **Biocontrol Science and Technology**, 7: 49-60
- Lewis, J. A. and Papavizas, G. C. 1984. A new approach to stimulate population proliferation of *Trichoderma* species and other potential biocontrol fungi introduced into natural soils. **Phytopathology**, 74(10): 1240-1244.
- Lewis, J. A. and Papavizas, G. C. 1985. Effect of mycelial preparations of *Trichoderma* and *Gliocadium* on populations of *Rhizoctonia solani* and the incidence of damping-off. **Phytopathology**, 75: 812-817.

- Makagiarsar, H. Y., Shamlou, P. A., Thomas, C. R. and Lilly, M. D. 1993. The influence of mechanical forces on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. **Bioprocess Engineering**, 9: 83-90.
- Martinelle, K. and Häggström, L. 1993. Mechanisms of ammonia and ammonium ion toxicity in animal cells: transport across cell membranes. **Journal of Biotechnology**, 30: 339-350.
- McIntyre, M. and McNeil, B. 1997. Effect of carbon dioxide on morphology and product synthesis in chemostat cultures of *Aspergillus niger* 60. **Enzyme and Microbial Technology**, 21: 479-483.
- Marten, M. R., Velkovska, S., Khan, S. A. and Ollis, D. F. 1996. Rheological, mass transfer and mixing characterization of cellulase-producing *Trichoderma reesei* suspensions. **Biotechnology Progress**, 12(5): 602-611.
- Mukataka, S., Kobayashi, N., Sato, S. and Takahashi, Joji. 1988. Variation in cellulase-constituting components from *Trichoderma reesei* with agitation intensity. **Biotechnology and Bioengineering**, 32: 760-763.
- Mukherjee, P. K. and Raghu K. 1997. *Trichoderma sp.* as a microbial suppressive agent of *Sclerotium rolfii* on vegetables., **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 13: 497-499.
- Papavizas, G. C., Dunn, M. T., Lewis, J. A., and Beagle-Ristaino J. 1984. Liquid fermentation technology for experimental production on biocontrol fungi. **Phytopathology**, 74 (10): 1171-1175.
- Pelczar, M., J., JR., Reid, R., D. and Chan, E. C. S. 1982. Microbiología. Editorial McGrawHill. 2a. edición. México.
- Ramírez, O. T. 1996. Alternativas para contender el problema de la toxicidad del amonio en cultivos de células de eucariotes superiores. En: **Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería**. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C., E. Galindo (ed), pp. 219-232.
- Rocha-Valadez, J. A., Serrano-Carreón, L. and Galindo, E. 2000. Effect of the impeller-sparger configuration over *Trichoderma harzianum* growth in four-phases cultures under constant dissolved oxygen. **Bioprocess Engineering**, 23: 403-410.
- Schügerl, K. Gerlach, S. R. and Siedenbergl, S. 1998. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**, vol. 1 pp. 195-266.
- Seañez, G. 1999. Efecto del CO₂ sobre la producción de alginatos por *Azotobacter vinelandii*. **Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas**. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

- Serrano-Carreón, L., Hathout, Y., Bensoussan, M. and Belin, J-M. 1992. Lipid accumulation in *Trichoderma* species. **FEMS Microbiology Letters**, 93: 181-188.
- Serrano-Carreón, L., Flores, C. and Galindo, E. 1997. γ -decalactone production by *Trichoderma harzianum* in stirred bioreactors. **Biotechnology Progress**. 13 (2): 205-208.
- Shirmböck, M., Lorito, M., Wang, Y. L., Hayes, C. K., Arsian-Atac, I., Scala, F., Harman, G. E. and Kubicek, C. P. 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics: molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, 60: 4364-4370.
- Thomas, M. B., and Willis, A. J. 1998. Biocontrol –risky but necessary?. **Perspectives**, 13 (8): 325-329.
- Vanags, J. J., Priede, M. A. and Viesturs, U. E. 1995. Studies of the mixing character and flow distribution in mycelial fermentation broths. **Acta Biotechnology**, 4: 355-366.
- Van Loon, L.C. 2000. In: **Biotechnological Approaches in Biocontrol of Plant Pathogens**, Mekerji K. G., Chamola, B. P., Upadhyay, R. K. (eds), pp. 445-446.
- Weindling, R. 1932. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. **Phytopathology**, 22: 837-845.
- Whipps, J. M. and Budge, S. P., 1990. Screening for sclerotial mycoparasites of *Sclerotinia sclerotiorum*, **Mycology Research**, 94 (5): 607-612
- Yedidia, I., Benhamou, N. and Chet, I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*, **Applied and Environmental Microbiology**, 65(3): 1061-1070.

Anexo 1

Diseños factoriales a dos niveles

En esta sección se muestra un ejemplo del análisis de varianza para un diseño factorial 2^3 (8 experimentos). El ejemplo fue tomado de Box *et al* (1988) y corresponde a una investigación realizada en una planta piloto (no detallan el proceso). Se evaluaron dos variables cuantitativas (temperatura y concentración) y una cualitativa (catalizador). La respuesta es la cantidad de producto (no se especifica que producto). En la tabla A1 se muestran los valores evaluados de cada factor, el orden en que deben integrarse en una matriz de diseño en variables originales (tabla A1a), su correspondiente representación en variables codificadas (tabla A1b) y los valores de la respuesta en cada experimento. Para las variables cuantitativas un menos (-) representa el valor bajo y un más (+) representa el valor alto. Para variables cualitativas los dos tipos de catalizador se pueden codificar también por el signo menos y más. En éste caso, no importa como sea la asignación, mientras ésta sea coherente.

Cálculo de efectos

Existen varios métodos para calcular los efectos de los factores, entre ellos se encuentra el método que emplea la tabla de los contrastes (tabla A2). Otro método es el del algoritmo de yates. A continuación se muestra un ejemplo del cálculo de los efectos de los factores y de la media partir de la tabla de coeficientes de los contrastes. Para el caso de un factorial 2^4 Box *et al* (1988) proporciona la tabla de constastes correspondiente.

La estimación de la media se calcula con la primera columna

$$\frac{+60 + 72 + 54 + 68 + 52 + 83 + 45 + 80}{8} = 64.25$$

El efecto principal T se calcula con la segunda columna, considerando los símbolos correspondientes a ella.

$$\frac{-60 + 72 - 54 + 68 - 52 + 83 - 45 + 80}{4} = 23$$

La interacción TK se calcula con la sexta columna

$$\frac{+60 - 72 + 54 - 68 - 52 + 83 - 45 + 80}{4} = 10$$

De manera similar se calculan los efectos restantes hasta completar las estimaciones indicadas en la tabla A2. Los signos de las interacciones se obtienen multiplicando los signos de las variables correspondientes.

Tabla A1.- Datos de un diseño factorial 2³. Ejemplo de una planta piloto.

No. del experimento	Temperatura °C T	Concentración (%) C	Catalizador (A ó B) K	Respuesta (gramos)
<i>a) Representación de las unidades originales de las variables</i>				
1	160	20	A	60
2	180	20	A	72
3	160	40	A	54
4	180	40	A	68
5	160	20	B	52
6	180	20	B	83
7	160	40	B	45
8	180	40	B	80
<i>b) Representación de las unidades codificadas de las variables</i>				
+	-	-	-	60
+	+	-	-	72
+	-	+	-	54
+	+	+	-	68
+	-	-	+	52
+	+	-	+	83
+	-	+	+	45
+	+	+	+	80

temperatura		concentración		catalizador	
Nivel bajo	Nivel alto	Nivel bajo	Nivel alto	Nivel bajo	Nivel alto
-	+	-	+	-	+
160	180	20	40	A	B

En el análisis de los factores es necesario decidir que factores o interacciones de ellos son despreciables y pueden considerarse parte del error experimental. Esto se realiza mediante una representación gráfica del efecto de los factores. Para ilustrar el proceso por el que podemos diferenciar efectos significativos de los no significativos, Box *et al* (1988) recomiendan el método propuesto por Daniel (1959), en el que los efectos de los factores se representan gráficamente en papel probabilístico normal. A continuación se muestra el proceso común y el método de Daniel (1959) para estimar gráficamente el efecto de los factores.

Tabla A2.- Signos para calcular los efectos del diseño factorial 2^3 .

	Media	T	C	K	TC	TK	CK	TCK	Promedio en la producción
	+	-	-	-	+	+	+	-	60
	+	+	-	-	-	-	+	+	72
	+	-	+	-	-	+	-	+	54
	+	+	+	-	+	-	-	-	68
	+	-	-	+	+	-	-	+	52
	+	+	-	+	-	+	-	-	83
	+	-	+	+	-	-	+	-	45
	+	+	+	+	+	+	+	+	80
Divisor	8	4	4	4	4	4	4	4	

Representación gráfica del efecto de factores.

Para ejemplificar con un mayor número de factores utilizaremos el ejemplo de un factorial 2^4 , proporcionado por Box *et al.*, (1988). El ejemplo está constituido por 4 factores principales (representados por números del 1 al 4) y las interacciones entre ellos, obteniéndose 15 efectos, cuyos valores se muestran a continuación:

Efectos	Efectos estimados
Media	72.25
1	-8
2	24
3	-2.25
4	-5.5
1,2	1
1,3	0.75
1,4	0
2,3	-1.25
2,4	4.5
3,4	-0.25
1,2,3	-0.75
1,2,4	0.5
1,3,4	-0.25
2,3,4	-0.75
1,2,3,4	-0.25

La representación gráfica de estos efectos se muestra en la **figura A1**. Se muestran con una distribución t de referencia (mostrada en la parte superior de la figura). Pareciera que los efectos principales 1, 2, 4 y la interacción 2,4 son distinguibles del error experimental, es decir, presentan un efecto significativo sobre la respuesta. Posiblemente el efecto 3 pueda considerarse también dentro de ésta categoría.

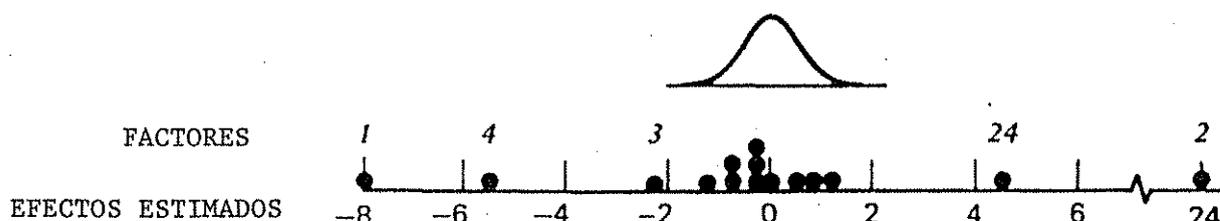


Figura A1.- Representación gráfica de los efectos

Cálculo de Probabilidades de los efectos

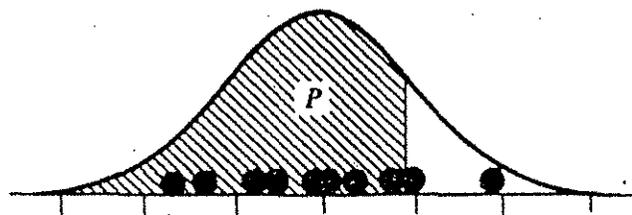
Para definir si un factor ejerce un efecto significativo sobre la respuesta, se calcula la probabilidad de ello, para cada factor. Para el ejemplo del experimento 2^4 , se procede a ordenar los efectos de acuerdo su valor calculado. En orden ascendente se asigna una identidad de efecto a cada factor. Este procedimiento se muestra en la **tabla A3**. El cálculo de la probabilidad del efecto de los factores se realiza con la fórmula que se incluye en la **tabla A3**. El cálculo de probabilidad considera el efecto (calculado) de los factores. Obtenida la probabilidad se procede a graficar.

La distribución normal de la probabilidad de los efectos de los factores representada en papel ordinario se observaría como en la **figura A2a**.

La representación gráfica -en papel probabilístico normal- se presenta en la **figura A2b**. En esta representación se utilizó papel cuadrículado normal. Finalmente, se grafica en papel probabilístico normal. En este tipo de representación se ajusta la escala del eje vertical de manera que el gráfico de P frente a X se convierta en una línea recta como se muestra en la **figura A2c**. Es importante mencionar que existen tablas con escalas de representaciones probabilísticas normales de acuerdo al número de experimentos involucrados en el diseño (ver Box *et al*, 1988 y la su representación en papel probabilístico normal se muestra en la **figura A3**.

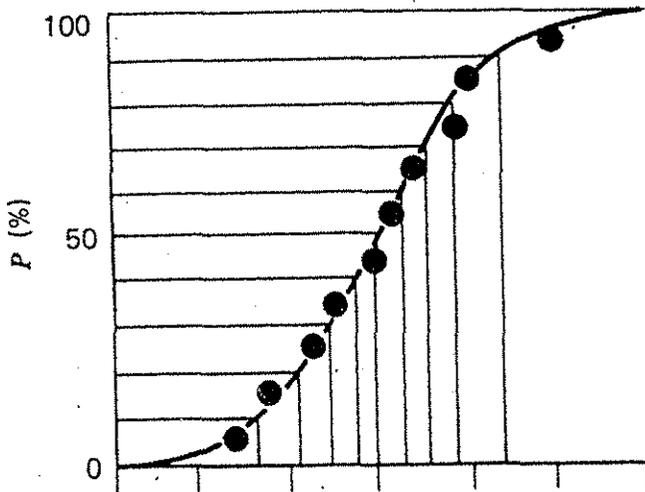
Número de orden i	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Efecto	-8.0	-5.5	-2.25	-1.25	-0.75	-0.75	-0.25	-0.25	-0.25	0.00	0.50	0.75	1.00	4.50	24.00
Identidad de los efectos	1	4	3	23	123	234	34	134	1234	14	124	13	12	24	2
$P = 100 (i - \frac{1}{2})/15$	3.3	10.0	16.7	23.3	30.0	36.7	43.3	50.0	56.7	63.3	70.0	76.7	83.3	90.0	96.7

Tabla A3.- Cálculo de la probabilidad del efecto de un factor.

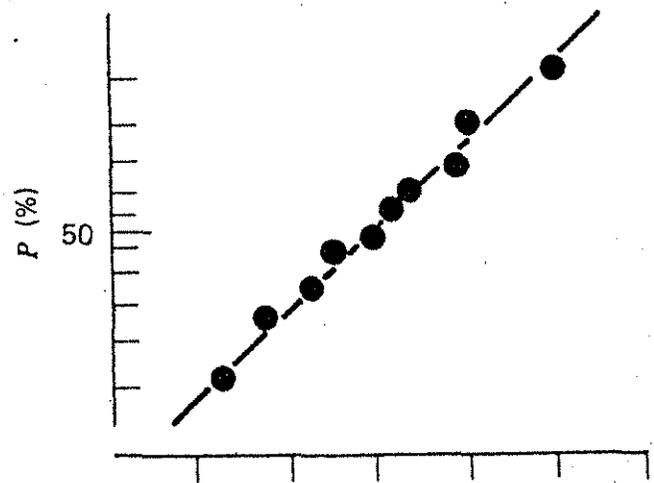


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

(a) Distribución normal



(b) Papel cuadrículado ordinario



(c) Papel probabilístico normal

Figura A2.- Representación de los efectos de los factores. a) en una distribución normal, b) representación en papel cuadrículado ordinario, c) representación en papel probabilístico normal

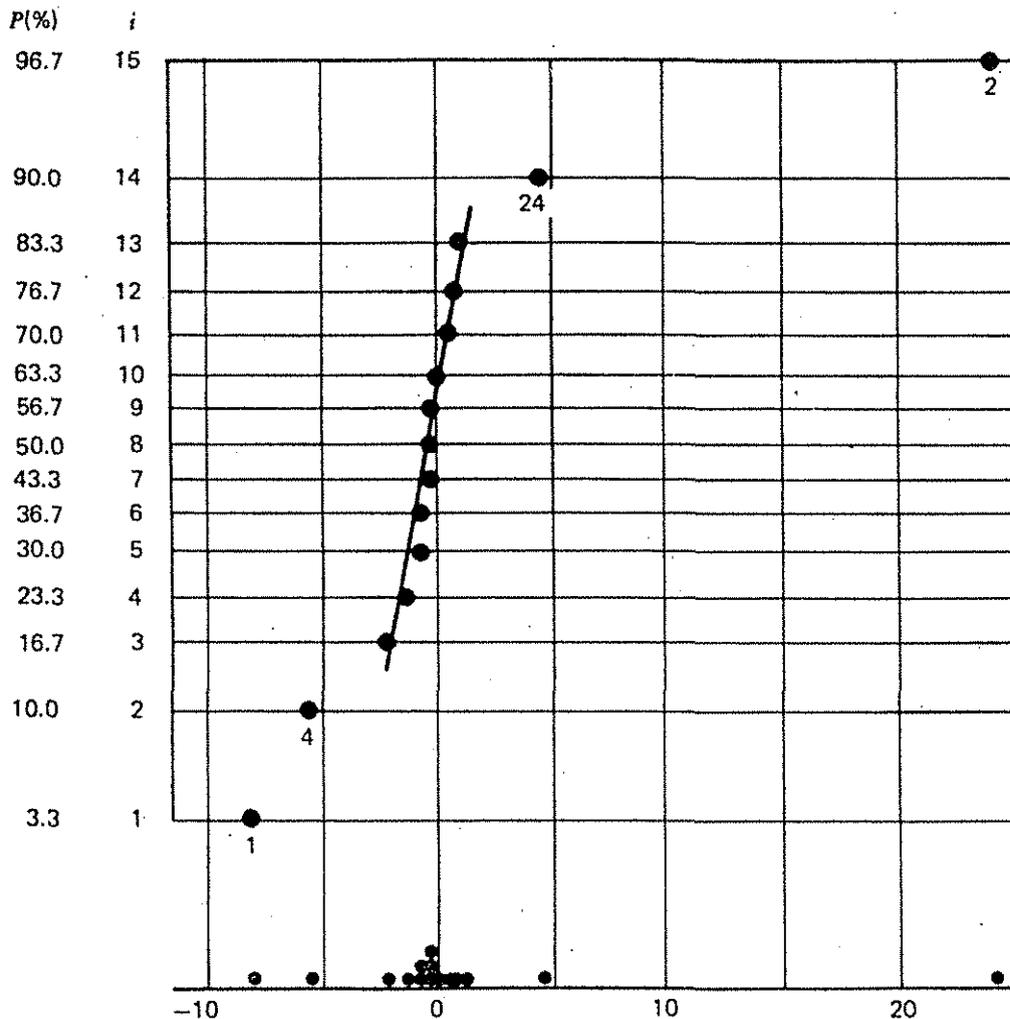


Figura A3.- Gráfico normal de los efectos

De acuerdo a la **figura A3**, 11 de esos efectos se ajustan a una línea recta. Los factores 1, 4, 2, 4, y 2 no. Se concluye que los efectos de esos factores no se pueden explicar por el azar o el error experimental.

Análisis de varianza

Todas las pruebas estadísticas arrojan una cifra numérica. Toda prueba tiene además un cierto número de grados de libertad. Presentan además una tabla de la que se obtiene un valor que se llama probabilidad p , que representa una cierta probabilidad. La probabilidad depende de un valor numérico (que se obtiene de comparar las medias de diferentes tratamientos, para el caso de la prueba de t ; o de comparar varianza para el caso de la prueba de F) y de los grados de libertad de la prueba. Así, toda prueba estadística arroja una probabilidad como producto

final importante., y se interpreta como la probabilidad de que la diferencia encontrada en un análisis se deba al error experimental. Todas las pruebas se consideran significativas cuando las probabilidades sean muy bajas. En otras palabras, la diferencia será más significativa mientras más pequeña sea la p .

En los libros de estadística se proporcionan tablas correspondientes para calcular las probabilidades de la pruebas realizadas (t y F). En ellas deben señalarse el valor de t (que corresponde a una diferencia entre medias) y los correspondientes grados de libertad. Tanto t como F dan valores numéricos que van de cero a cifras que teóricamente pueden llegar a ser infinitas. Las tablas de t y F de los libros ofrecen hasta una p de 0.001, o sea que basta que la probabilidad de que la diferencia por puro error experimental sea menor de uno en mil experimentos. Pueden reportarse valores de p mucho menores que 0.001, lo que obedece a que actualmente hay programas estadísticos que calculan cualquier p .

El análisis estadístico correspondiente a los experimentos realizados en el presente trabajo se realizó con el Software Design Expert, versión 5.0. El desarrollo de un análisis de varianza con este programa es ejemplificado a detalle en el manual de usuario del programa y en la ayuda propia del software.

Anexo 2

Cálculo de los parámetros cinéticos y rendimiento de *T. harzianum* presentados en el presente trabajo.

Para ejemplificar los cálculos de cada parámetro, nos referiremos al caso del experimento 1, mostrado en la sección 5.2 de este trabajo.

Biomasa máxima.- Los valores representados corresponden al valor máximo obtenido en cada experimento. En el ejemplo 1, la máxima concentración de biomasa fue de 5.35 g/L a las 60 horas de cultivo.

Productividad máxima de biomasa.- Se obtiene al dividir la concentración máxima de biomasa del proceso entre el tiempo de cultivo requerido. Por ejemplo para el proceso 1 mostrado en la sección 5.2, en el que se obtuvieron 5.35 g de biomasa en un tiempo de 60 horas de cultivo, la productividad fue:

$$\frac{5.35 \text{ g/L}}{60 \text{ h}} = 0.089 \text{ g/L}\cdot\text{h} = 89 \text{ mg/L}\cdot\text{h}$$

Velocidad de crecimiento.- Debido a que el hongo presenta un crecimiento lineal, la velocidad de crecimiento del hongo se calculó mediante una regresión lineal de los valores observados en la fase lineal de crecimiento del hongo. Por ejemplo, para el caso del experimento 1, se consideraron los 4 primeros puntos de la cinética (obtenidos entre las 24 y las 60 horas de cultivo). Se realizó una regresión lineal a estos cuatro valores y el valor de la pendiente corresponde a la velocidad de crecimiento del hongo (en g/L·h)

Rendimiento.- El rendimiento calculado en cada experimento corresponde al cociente de dividir la concentración máxima de biomasa entre la concentración de sustrato consumido hasta el tiempo de cultivo en que se generó esa concentración de biomasa. Para el proceso 1 en que se produjeron 5.3 g/L de biomasa a las 60 horas de cultivo, se habían consumido 11.8 g/L de glucosa.

$$\text{Rendimiento} = \frac{5.35 \text{ g}}{11.8 \text{ g}} = 0.45 \text{ g}_{\text{biomasa}} / \text{g}_{\text{glucosa consumida}}$$



Anexo 3

Estudios previos para la selección de fluorocromos

La técnica propuesta para cuantificar la viabilidad del micelio de *Trichoderma harzianum* fue aceptada para su publicación en la revista *Biotechnology and Bioengineering*. A continuación se presentan algunos aspectos preliminares a la selección del fluorocromo.

A3.1 Selección de los fluorocromos y de su concentración

Debido a que existe un límite en la tolerancia de las células a las concentraciones de los fluorocromos, se evaluaron diferentes concentraciones de éstos con el procedimiento que se discute a continuación.

Sobre un cultivo en medio líquido cosechado en fase exponencial de crecimiento, se aplicaron diferentes concentraciones de los colorantes sobre las células. La concentración adecuada se seleccionó en base a la estabilidad de la fluorescencia emitida por las células con respecto al tiempo. La concentración óptima para el anaranjado de acridina fue de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y para el FDA fue de 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La fluorescencia emitida por el anaranjado de acridina fue altamente estable, manteniendo el 70 % de la intensidad de la fluorescencia inicial durante por lo menos 5 horas de iluminación con la luz ultravioleta. Las células teñidas con el FDA mostraron una marcada reducción en la intensidad de fluorescencia (del 55%, respecto de la intensidad inicial) después de 30 segundos de exposición a la luz ultravioleta (ver manuscrito). Así, después de 25 segundos de exposición de las células a la luz UV, fue imposible capturar imágenes de calidad debido a la falta de contraste entre el fondo de la imagen y las células fluorescentes. Sin embargo, en el sistema de captura de imágenes, 5 segundos son suficientes para realizar la captura de éstas (ver manuscrito).

A3.2 Evaluación de la fluorescencia en células en diferente estado fisiológico

Para evaluar la relación entre la fluorescencia emitida por las células y el estado fisiológico –en términos de viabilidad– de las células de *Trichoderma harzianum*, células frescas (cultivadas en medio líquido y cosechadas a mitad de fase exponencial) y células esterilizadas (121°C, 20

minutos) se tiñeron, de forma independiente, con los fluorocromos. Se analizó la fluorescencia emitida por las células y su crecimiento en medio sólido (placas con PDA).

A3.2.1 Evaluación del anaranjado de acridina

Con el anaranjado de acridina, las células frescas no mostraron diferencias en su fluorescencia con respecto a las células esterilizadas. Se observó una mezcla de colores fluorescentes (naranja, amarillo, verde) tanto en las células frescas como en las células esterilizadas. Al sembrar las células en medio sólido, las células frescas crecieron y las células esterilizadas no mostraron crecimiento (indicando la pérdida de viabilidad por el tratamiento aplicado). Así, el anaranjado de acridina fue descartado por dos razones: por un lado, al teñir con éste fluorocromo las células exhiben una fluorescencia multicolor: verde, amarilla y de diferentes tonos de naranja (**figura A3.1**). Este gama de colores representaba también una desventaja para el procesamiento de las imágenes, haciendo más compleja la cuantificación de la fluorescencia en las células y consecuentemente, su viabilidad. La gama de colores emitida en la fluorescencia de las células y captada por el software del sistema de análisis de imágenes se muestra en la parte inferior de la **figura A3.1a**. Por otro lado, y aún más importante, ésta fluorescencia emitida por las células no correlacionó con la viabilidad del hongo, haciendo imposible la diferenciación entre células vivas y muertas de *Trichoderma harzianum*.

A.3.2.2 Evaluación del diacetato de fluoresceína

Al teñir las células (frescas y esterilizadas) con diacetato de fluoresceína (FDA), las diferencias en la fluorescencia emitida fueron evidentes. Las células esterilizadas no acumularon y/o retuvieron la fluoresceína después del tratamiento de esterilización y no crecieron en medio sólido. Las células frescas (cultivo control) emitieron fluorescencia verde y presentaron crecimiento en medio sólido. Estos resultados sugerían la factibilidad de aplicar éste fluorocromo para evaluar la viabilidad de las células de *Trichoderma harzinaum*. Por otro lado, la fluorescencia emitida por las células al aplicar el FDA es monocromática (verde) sobre un fondo negro (**figura A3.2**), lo que representó una ventaja en el procesamiento de la imagen para la posterior cuantificación de áreas. Además, fue posible distinguir entre partes de las hifas metabólicamente inactivas de aquellas activas. Consecuentemente, el FDA se seleccionó como fluorocromo vital para continuar con el desarrollo de la técnica.

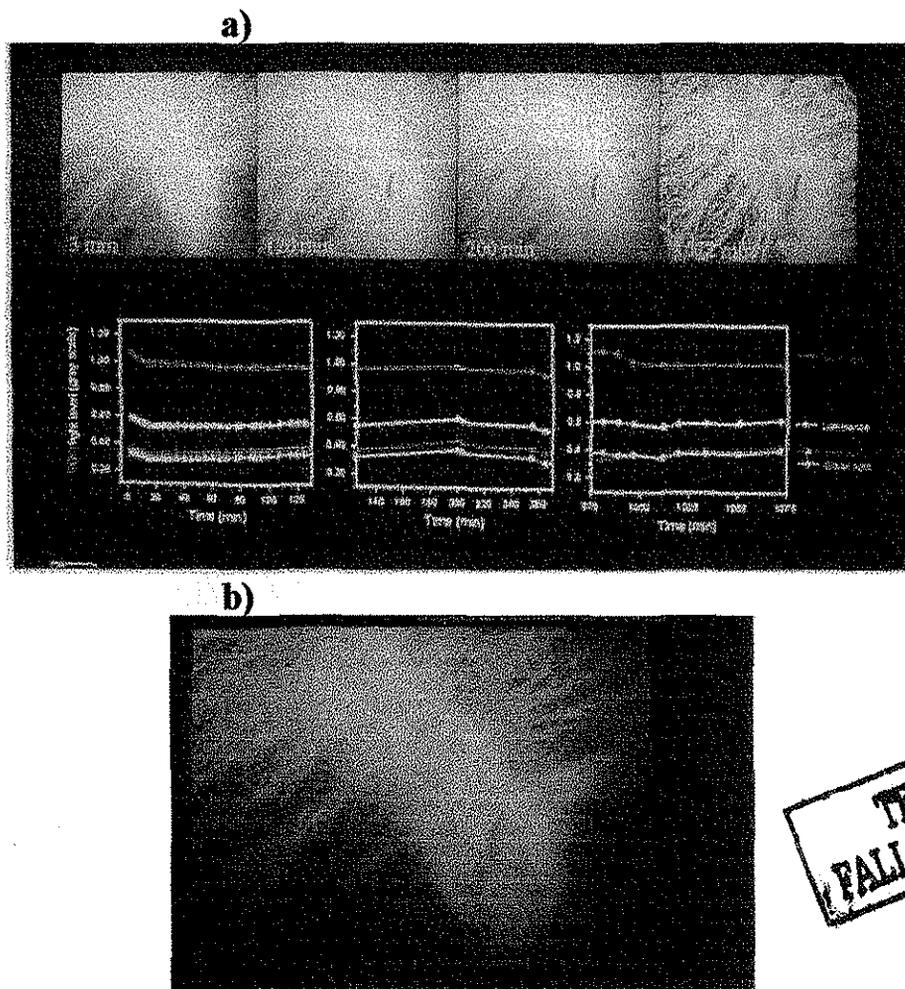


Figura A3.1 Estabilidad de la fluorescencia de *Trichoderma harzianum* al teñirse con anaranjado de acridina. a) micelio esterilizado b) micelio fresco.

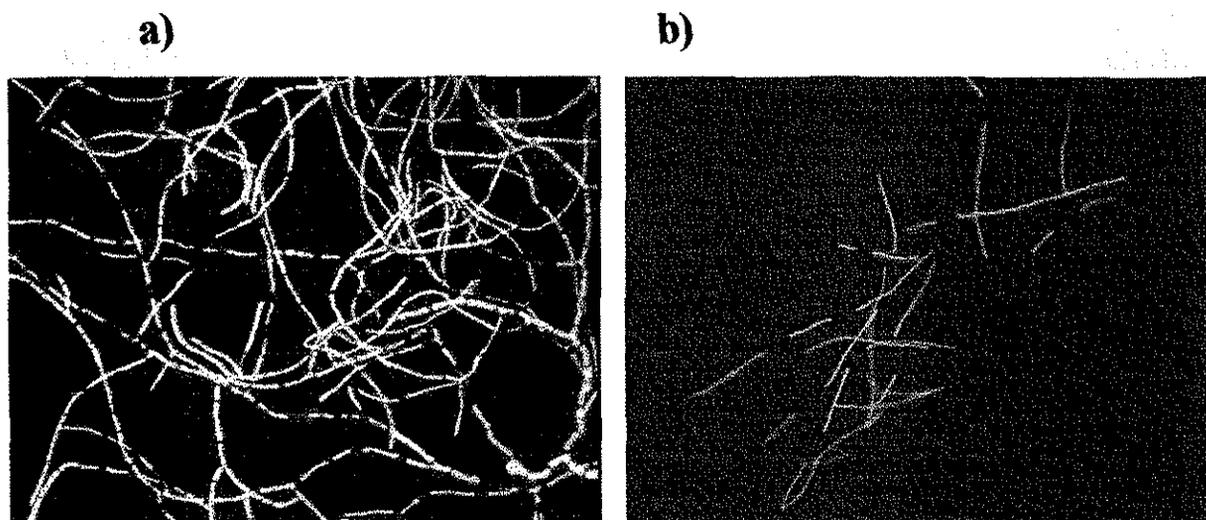


Figura A3.2. Fluorescencia del micelio de *Trichoderma harzianum*. a) teñido con anaranjado de acridina, b) teñido con diacetato de fluoresceína. Objetivo 10x.

Anexo 4

Procedimiento para la adquisición de imágenes en la computadora

Debido a las características de sensibilidad de la cámara de video, la adquisición de imágenes se realiza utilizando el objetivo 10x.

Antes de iniciar la adquisición de imágenes es importante obtener un campo visual uniformemente iluminado. Para ello, debe realizarse la calibración de la luz visible y de la luz ultravioleta. A continuación se detalla el procedimiento para dicha calibración.

A) Calibración de la luz visible (calibración de Köhler)

- Encender el microscopio
- Seleccionar el objetivo 4x
- Cerrar completamente el diafragma de campo del microscopio. Debe observarse un polígono (en la pantalla de la computadora o en el microscopio, según sea el caso para el dispositivo seleccionado).
- Afinar los bordes de los polígonos ajustando la altura del foco condensador del microscopio.
- Centrar el polígono de luz en el campo visual con los tornillos centradores del condensador del microscopio.
- Una vez centrado el polígono, abrir totalmente el diafragma de campo del microscopio.

B) Calibración de la luz ultravioleta

- Colocar el centrador de la lámpara de luz UV en la posición del objetivo 4x. Cerciorarse que la ventana con los ejes quede de frente al usuario.
- Prender la fuente de luz ultravioleta

- Colocar el selector de filtros en la posición G2A (que contiene el filtro de excitación de 510-565 nm, el filtro barrera de 590 nm, y los espejos dicróicos de 575 nm).
- Cerrar el diafragma de campo del sistema epifluorescente, hasta observar el paso del haz de luz bien definido.
- Centrar el haz de luz con los tornillos centradores de la luz UV del sistema epifluorescente.
- Abrir totalmente el diafragma de campo del sistema epifluorescente.
- Colocar el “shutter” del sistema epifluorescente.
- Regresar el selector de filtros a la posición DIA ILL. En esta posición debe estar siempre ubicado el selector, que es el indicado para trabajar con luz visible.
- Quitar el centrador de la lámpara de luz UV y colocar el objetivo 4x.

Adquisición de fotografías con luz visible

- Quitar el centrador de la lámpara de luz UV y colocar el objetivo 4x.
- Seleccionar el objetivo 10x.
- Enfocar en el microscopio la muestra en luz visible
- En la computadora, activar el programa Image Pro plus® 4.1.
- Presionar el botón de adquisición de imágenes para iniciar la captura de imágenes en línea del microscopio a la computadora (representado por la imagen de una cámara de video, en la barra de herramientas). Al activar ésta función, automáticamente se abre una ventana cuyo encabezado es *Integral Flash Point 128* (que es la tarjeta digitalizadora de las imágenes), en donde se encuentran las funciones necesarias para la adquisición de imágenes en línea. En esta ventana se realizan las funciones posteriores de la adquisición.
- Encender la fuente poder de la cámara del microscopio que se va a utilizar. En nuestro laboratorio contamos con dos microscopios: el estereomicroscopio y el microscopio compuesto, en éste caso utilizamos el microscopio compuesto. En el programa debe especificarse también el microscopio utilizado. Esto se realiza en la ventana de captura en línea, en la sección de *Set up*. El estereomicroscopio está identificado como *composite* y el microscopio compuesto como *RGB*. Seleccionar *RGB*.

- Para activar la adquisición en línea, presionar el botón de *start preview* en la sección de *Image*. Automáticamente abre una ventana donde se observarán las imágenes de la muestra. Esta ventana tiene como encabezado *Live preview*.
- Girar los oculares del microscopio hacia el lado izquierdo, para transmitir la señal a la computadora. Después de girarlos en la pantalla de la computadora debe observarse la imagen que se observó en el microscopio.
- El nivel de brillo y contraste que se utiliza en el programa es de 35. Seleccionarlo en la sección de *signal*.
- Para detener la adquisición en una imagen de interés, presionar *snap* en la ventana de adquisición en línea, en la sección *Image*. Inmediatamente después presionar *stop*. Con esto, la imagen adquirida está lista para guardarla en el disco duro de la computadora. Tendrá como encabezado *untitled 1*.
- Dar la instrucción de grabar la imagen, en el encabezado principal del programa, en *File*, activar *save as*, e indicar la unidad donde se va a grabar y el nombre con que se va a identificar, especificando que es una fotografía tomada con luz visible. Generalmente las identificamos como BN (imagen en blanco y negro) al final del nombre asignado, el cual no debe contener más de 8 caracteres. Automáticamente se graba como tipo JPEG y asigna la extensión jpg

Con este procedimiento se finalizó la adquisición de la imagen fotografiada con luz visible. A continuación se presenta el procedimiento para la toma de foto de ésta imagen con luz ultravioleta (imagen fluorescente). Esta foto debe tomarse inmediatamente después de tomarse la foto con luz visible.

Adquisición de fotografías con luz ultravioleta

- Apagar el microscopio.
- Colocar el selector de filtros del microscopio en la posición B-2A (que contiene el filtro excitador de 420-490 nm, un filtro barrera de 520 nm y espejo dichroico de 505 nm).
- Desactiva el “shutter” para dejar pasar la luz ultravioleta hacia la muestra. Automáticamente se observará la imagen fluorescente.

- Adquirir la imagen con el mismo procedimiento señalado en los dos últimos puntos para las fotos con luz visible.

Es importante que una vez que se haya tomado la foto con luz UV, el selector de filtros se regrese inmediatamente a la posición DIA-ILL y se active el “shutter” para evitar que se siga radiando la muestra.

Los procedimientos citados anteriormente corresponden a la adquisición de una imagen fotografiada con luz visible y con luz ultravioleta. Para la selección de otra imagen, se debe cambiar de posición en la muestra, moviéndose (manualmente, con los tornillos del movimiento de los ejes X y Y, ubicados en la platina) hacia una nueva imagen, de la cual nuevamente se tomarán dos fotografías: una con luz visible y otra con luz ultravioleta.

- Finalizada la adquisición de imágenes, se apaga la lámpara de luz UV, el microscopio y la fuente de poder.

Es importante que para apagar la lámpara UV, ésta haya estado encendida por lo menos 15 minutos. Si su uso no cubrió este tiempo, esperar a que transcurra y entonces se puede apagar.

Anexo 5

Cuantificación de áreas

A) Cuantificación del área total (imágenes en B y N, tomadas con luz visible)

- Activar el programa *Image Pro Plus 4.1*.
- Abrir la imagen que se va a analizar.
- Seleccionar la calibración adecuada. La calibración corresponde al objetivo que se utilizó para adquirir las imágenes. En este caso es el objetivo 10x.
- Seleccionar los parámetros predefinidos para la cuantificación del área total (“settings”) de la foto. Para este caso los “settings” se cargan seleccionando el que fue implementado de acuerdo a las necesidades del modelo de estudio.
- Convertir la imagen a niveles de grises. Esto se realiza presionando el botón para el procesamiento de objetos en B y N, representado por una imagen de barras de colores, ubicado en la barra de herramientas del *Image Pro Plus*. Automáticamente la imagen se convierte a grises y se abre una ventana cuyo encabezado es *count-size*. La conversión a grises de las fotos mostradas en la **figura 4.1** de la sección de Materiales y Métodos, se presentan en la **figura A4.1**. El proceso consistió en que el fondo de la imagen se cambia a color blanco y los objetos oscuros que conforman la imagen (que son las hifas) se convierten a tonos de grises a negros.

Si existieran áreas no delimitadas, éstos pueden marcarse utilizando los botones de rangos. Por otro lado, si existieran partículas no características de las muestras (*i.e.* polvo, pelusa) éstas deben ocultarse para no alterar la cuantificación. Para ocultarlas, hacer doble *click* en el objeto y se abre automáticamente una ventana, seleccionar *Hide*.

- Enviar los datos a *Excel*. Automáticamente se envía el área de todos los objetos que conforman la imagen.
- En *Excel*, accionar la operación de sumatoria, para obtener el área total de todos los objetos de la imagen.

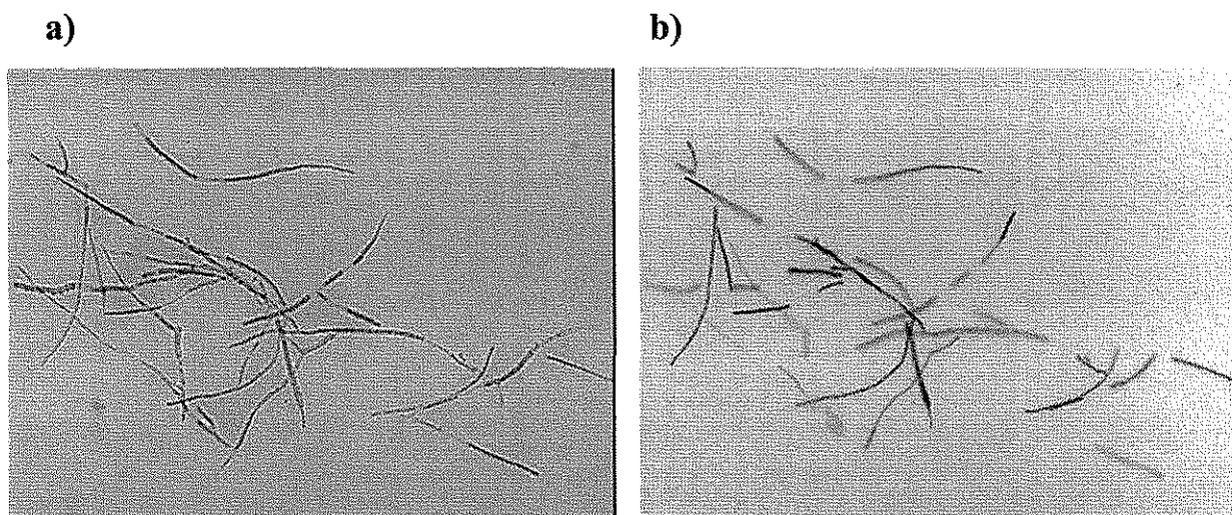


Figura A4.1. Conversión a grises de las imágenes para su posterior cuantificación. a) foto tomada con luz visible, b) foto tomada con luz ultravioleta.

B) Cuantificación del área fluorescente (imágenes fluorescentes, tomadas con luz ultravioleta)

- Convertir la imagen fluorescente a tonos de grises. Se realiza presionando el botón correspondiente a objetos fluorescentes representado por dos rectángulos, uno iluminado con tonos grises y otro en blanco y negro, en la barra de herramientas del *Image Pro Plus*. Con ello se cuantifica el área fluorescente de la imagen.
- Enviar los datos a Excel, de la misma forma que en el caso de la cuantificación de área en las fotos tomadas en B y N.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Anexo 6

Manuscrito

Date: Thu, 23 May 2002 14:38:59 -0400
To: leobardo@ibt.unam.mx, leoserranoc@hotmail.com
Subject: 02-174.R1 - Biotechnology and Bioengineering Editorial Decision
From: biotechbioeng@wiley.com
Cc:
X-Mailer: Manuscript Central by ScholarOne

Production #: 02-174

Dear Dr. Serrano-Carreón:

Biotechnology and Bioengineering is pleased to accept your manuscript:

02-174.R1 entitled Accurate and Rapid Viability Assessment of *Trichoderma harzianum* Using Fluorescence-based Digital Image Analysis.

Your manuscript has now been assigned a production number, which is listed above. Please refer to this production number in all future correspondence regarding your manuscript. It has been sent to our production office at the following address where it will be prepared for publication.

ATTN: Jen Peachey
Journal Production Editor
The Sheridan Press
450 Fame Avenue
Hanover, PA 17331

Phone: 717-632-8448 ext. 8056
Fax: 717-633-8928
E-mail: jpeachey@tsp.sheridan.com

Page proofs will be sent directly to you as soon as they are available. Please allow at least two months for their receipt.

Your prompt review and return of these page proofs will facilitate publication of your work.

We look forward to publishing your work in the Journal.

Sincerely,

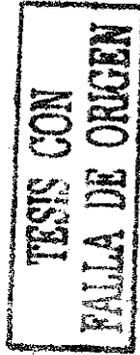
Douglas Clark
Professor and Editor

Accurate and Rapid Viability Assessment of *Trichoderma harzianum* Using Fluorescence-based Digital Image Analysis

Mainul Hassan¹, Gabriel Corkid², Enrique Galindo¹, Celia Flores¹,
Leobardo Serrano-Carreón¹

¹Departamento de Biotecnología, Instituto de Biotecnología, 'Laboratorio de Procesamiento de Imágenes, Centro de Instrumentos, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, 62250 Morelos, México.

Phone: 52 777 329 16 17; Fax: 52 777 317 23 88; e-mail: leobardo@ibt.unam.mx



Abstract: Fluorescence microscopy and image analysis were evaluated in order to assess the viability of *Trichoderma harzianum*, an economically important filamentous fungus. After the evaluation of the two most commonly used fluorochromes, acridine orange (AO) and fluorescein diacetate (FDA) as metabolic indicator stains, AO turned out to give ambiguous results and therefore FDA was chosen. The lower stability at room temperature and fast fluorescence intensity decay (50 % after only 30 seconds of illumination in UV light) could be overcome by the use of a digital image acquisition by a frame grabber and a computer controlled video camera. Fresh (live) fungal hyphae emitted bright green fluorescence when stained with this dye (7.5 µg/L) whereas a total absence of fluorescence was observed when using sterilized (dead) fungal cells. Fresh cells were subjected to different lethal and sub-lethal treatments and the percentage of FDA stained fluorescent hyphae was then measured over the total hyphal area (% of FDA-stained area) by image analysis. At the same time, samples were cultivated in shake flasks in order to correlate this % of FDA-stained area with its growth rate, a functional indicator of viability. The linear correlation ($r = 0.979$) was: growth rate (g/L.h) = 2.25×10^{-3} (% of FDA-stained area). This method was used to evaluate the viability of the fungus under two different fermentation conditions in a 10 L bioreactor. Estimated viable biomass during fermentation was strongly influenced by the process conditions. The use of FDA, with computer-aided quantitative image analysis has made it possible to rapidly and reliably quantify the viability of *T. harzianum*.

Key words: Fluorescence microscopy, *Trichoderma harzianum*, fluorescent diacetate, acridine orange, viability, image analysis

Correspondence to: L. Serrano-Carreón

INTRODUCTION

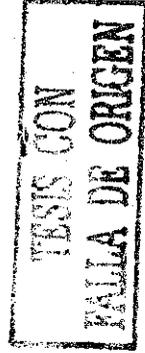
Traditional techniques for quantifying biomass such as dry weight or turbidity provide no information about the quality, activity, or viability of the microorganisms. This is a disadvantage for biochemical engineers since they are primarily interested in the biocatalytic activity of the biomass in a reactor. Accurate viability assessment can help largely for improving fermentation process design, as well as for physiological studies and those involving monitoring and control of these bioprocesses. However, a first problem is to properly define "viability". Viable cells can be generally defined as those cells which are capable of performing all cell functions necessary for survival under given conditions. As stated by Barer and Harwood (1999), culturability is the only secure functional definition of viability. Furthermore, *biomass quality* is used to indicate the specific level of one cell component (such as ATP, RNA, DNA or protein) of a group of cell components; while *biomass activity* is used to indicate the ability of biomass to metabolise a particular substrate, and so describes the biocatalytic potential of biomass (Gikas and Livingston, 1998).

Currently, there is no quantitative, fast and reliable method for the determination of fungal viability, especially for those of the filamentous type. The most frequently used methods are those measuring the culturability as the colony forming unit, CFU (Muñoz et al., 1995; Jolicoeur et al., 1999) and the growth performance test, i.e., capacity of reproduction in liquid cultivation (Granade et al., 1985). The use of dilution and incubation in the CFU method increases the probability of error, especially in the case of filamentous organisms where the particle size is not well defined. Furthermore, high osmotic stresses

affect cellular viability in solid culture medium (Raynal et al., 1994). On the other hand, the growth performance test is reliable but time-consuming and labour-intensive.

Modern staining procedures extensively use fluorescein diacetate (3',6'-diacetylfluorescein; FDA), a non-polar, nonfluorescent substance that is hydrolysed by intracellular non-specific esterases in live cells to produce fluorescein, which then exhibits bright green fluorescence at 490 nm. Esterase activity is required for the accumulation of intracellular fluorescein and cell membrane integrity is required for the intracellular retention of these fluorescent products (Jones and Senft, 1985; Huang et al., 1986). The labelling with fluorescein is based in the assumption that only the cells which have intact membrane and esterase activity are able to accumulate the fluorescent probe (Breeuwer and Abee, 2000). Indeed, the measurement of FDA hydrolysis has been used to estimate *biomass activity*, as referred to cell esterase activity. In the case of unicellular microorganisms, this activity has been compared with other cellular activities such as biomass growth (Granade et al., 1985) and substrates (glucose, O₂) utilization (Ingham and Klein, 1982; Desgranges et al., 1991) as well as to measure "microbial activity" in soil (Schnürer and Rosswall, 1982) and water samples (Hoizapfel-Pschorn et al., 1987; Ziglio et al., 2002). This technique was also used for the differentiation of live and dead/unhealthy cells of microalgae (Gilbert et al., 1992), as well as mammalian (Ross et al., 1989), bacterial (Blunthof et al., 1999) and plant cell cultures (Thomas and Gina, 1997; Steward et al., 1999).

Biomass activity is particularly important when a certain microbial culture is used as a biocontrol agent. Barak and Chet (1986) have qualitatively reported the viability of



Trichoderma harzianum using FDA staining. Thrane et al (1999) have used epifluorescent staining (using FDA) to monitor how bacterial antibiotics affect the viability of phytopathogenic fungi, such as *Phytophthora ultimum* and *Rhizoctonia solani*.

Image analysis together with fluorescence methods have been reported for the characterisation of the physiology of fungi (Vanhoufte et al., 1995), studies of growth and product formation (Agger et al., 1998) and the differentiation of actinomycetes (Reichl et al., 1990, Droum et al., 1997). Pauli et al., (1993) used imaging techniques to assess the viability (defined as the percentage of germination) of *Penicillium chrysogenum* spores on the basis of their morphometry during germination. In this case, prediction of spore viability before germination was not possible. More recently, Sebastine et al. (1999) reported the characterization of the "percentage of viability" of *Streptomyces clavuligerus* through the use of a two-colour fluorescence assay. They defined "percentage of viability" as the ratio between the area of hyphae presenting intact membranes -considered as viable regions- and the total mycelial area. The procedure was used to monitor the evolution of the "percentage of viability" during culture without evaluating if this parameter is related to the culturability of the microorganism. Furthermore, this conceptual approach has been restricted to *Streptomyces* and no similar reports exists for filamentous fungi.

In this study, for the first time, culturability (as the best indicator of cell viability) of the biological control agent *Trichoderma harzianum* has been correlated with the percentage of active biomass (as measured by the % of FDA-stained area in the hyphae). Therefore, a rapid and reliable method for the estimation of the viability of *Trichoderma harzianum* and its application in cultures conducted in bioreactors, has been developed.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism and its Maintenance

Trichoderma harzianum IMI 206040 was used throughout this investigation. Stock cultures were maintained by monthly transfer on inclined potato dextrose agar (PDA) slants.

Culture Conditions

Shake Flask Cultures

The culture medium consisted of (g/L of distilled water): glucose, 30.0; (NH₄)₂SO₄, 0.94; yeast extract, 1.5; KH₂PO₄, 7; Na₂HPO₄, 2; MgSO₄·7H₂O, 1.5; CaCl₂·2H₂O, 0.067; FeCl₃·6H₂O, 0.008; ZnSO₄·7H₂O, 0.0001. The initial pH of the culture broth was 5.6. Batch cultures were performed for cell preparation in 2 L Erlenmeyer flask with a working volume of 500 mL, incubated at 29° C on an orbital shaker (200 rpm) for 45 h. The inoculum size was 10⁷ spores / mL from 6 day old cultures on PDA plates. Spores from the plates were recovered with a 5 mL solution of NaCl, 0.9 % (w/v) and Tween 40, 0.05 % (w/v), by mild agitation. Spores counting was performed under an optical microscope (x 20) using an improved Neubauer bright-line chamber (Martenfeld, Germany).

Cultures in Bioreactor

Bench scale fermentations (10 L) were carried out in order to evaluate growth and fungal viability as a function of process conditions. A 14 L bioreactor (New Brunswick Sci., MF14) with 10 L working volume equipped with 3 Rushton turbines and with pH and dissolved oxygen probes (Ingold, USA) located near to the middle impeller, was used. The culture was kept at 29° C and the broth was sparged with air at an initial flow rate of 0.5 vvm and increased (when necessary) in order to keep the dissolved oxygen above 10 % of

saturation (when possible and with 1 vvm as maximal airflow rate). pH was automatically controlled by the addition of NaOH (2 N). Bioreactors were inoculated at a rate of 10^7 spores/mL of culture medium. Two different sets of process conditions were used:

Batch process: The culture medium was as in shake flasks but without yeast extract. pH was controlled at 3. Rushton turbines of 7.3 cm of diameter ($D/T = 0.33$) were used in combination with a point sparger. Agitation speed was kept constant at 3.33 s^{-1} .

Fed-batch process: The culture medium was as in shake flasks. pH was controlled at 5.6 by the addition of NaOH (2 N) during the first 36 h. After that, pH was controlled with $(\text{NH}_4)\text{OH}$ (30% v/v). Rushton turbines of 10.5 cm of diameter ($D/T = 0.50$) were used in combination with a ring sparger. Agitation speed was set at 3.33 s^{-1} until 72 h of culture, and later increased to 5.83 s^{-1} . Glucose was added at 72 h of culture to increase the medium concentration by 10 g/L.

Cell Sample Preparation

In order to obtain different expected degrees of initial biomass activity, cells were produced, harvested and subjected to some damaging treatments. Cells were harvested from 2 L (0.5 L working volume) Erlenmeyer flasks after 45 h of batch culture. A 70 mL sample of culture broth, containing $3.7 \pm 0.2 \text{ g cells/L}$, was then poured in an autoclavable 80 mL polypropylene tube, in which different types of physically damaging treatments were conducted. These included: heating in a water bath, milling in a high-speed blender (Orenei, Moto-Tool, model 275, USA) and electromagnetic shock in a microwave oven (Samsung, model MW8610T, Japan). In the case of heat treatment at $65 \text{ }^\circ\text{C}$, cells were

harvested after 65 h of cultivation and 60 mL of culture broth containing 7.5 g/L cells was taken in each tube for treatment.

Culturability of *T. harzianum*

After a given physical treatment, batch cultures were started in 500 mL Erlenmeyer flask with a working volume of 100 mL at $29 \text{ }^\circ\text{C}$ with an agitation rate of 200 rpm. 10 mL of treated broth (mainly composed of loose aggregates of mycelia) were sampled with a automatic pipette (throughout an edge-cutted disposable tip) and used as inoculum for 100 mL of culture medium. Cells were harvested at 21, 30 and 48 h. Culture medium composition was the same as that described above. As the most significant differences in the biomass growth of the different samples was found at 30 h, the growth rate of treated samples was calculated from the biomass content at this time of cultivation.

Estimation of Biomass Growth

Mycelial growth was determined by biomass dry weight. This was done by filtering the culture broth through a pre-dried, pre-weighed Whatman (Maidstone, UK) GF/A glass microfibre paper. The material was dried to a constant weight at $60\text{-}65 \text{ }^\circ\text{C}$ and expressed as g/L of culture medium. All samples were analysed in quadruplicate - yielding a maximum variation index of 5 % - and averages are quoted in the figures.

Staining

AO (Sigma Scientific Co., St. Louis, MO, USA) was stored in the dark at 4°C as a 1 mg/mL stock solution in sterile distilled water. The sample (160 μL) was diluted in 0.1 M phosphate buffer solution (800 μL) of pH 7.0 and stained with AO (40 μL) for 5 min before

microscopic observation. FDA (Molecular Probes, OR, USA) was stored at -20°C , protected from light as a 1 mg/L stock solution in acetone. One volume of the sample was stained with three volumes of FDA working solution (10 μL FDA solution/mL phosphate buffer solution) for 5 min with mild agitation. Final concentration of FDA was 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dilution (5-10 fold) with phosphate buffer solution was used to disperse the hyphal elements on the slide in order to minimize overlap of hyphae. The dilution had to be adjusted to yield uniform suspensions of mycelia between 0.1 - 0.6 g/L. The staining was done at room temperature ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$).

Image Analysis System

Equipment and software

Cells were examined under a microscope Optiphot 2 (Nikon, Japan) using an epifluorescence system, with an illumination wavelength of 490 nm and a fluorescence wavelength of 520 nm. A charged-coupled device (CCD) video camera (model KP-D50 Color digital, Hitachi, Japan) was fitted onto the microscope. Image acquisition and analysis was performed with a FlashPoint 128 frame grabber (Integral Technologies), controlled by personal computer based software package Image-Pro® Plus, Version 4.0 (Media Cybernetics, MD, USA).

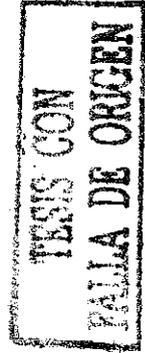
Image acquisition and processing

Video images from the CCD camera were digitized in TIFF format (640 x 480 pixels, coded on 256 gray levels [8 bits]). Using this image analysis system, each frame was grabbed twice. The first one, under white light so as to detect the total (i.e., stained and not stained) hyphal area. The second, under ultra-violet (UV) light, detecting only the

fluorescent area (FDA active). The microscopic slide was then manually moved to a new position and another set of images was acquired. On average, 30 sets of images were taken from each slide. This procedure was conducted for 90 to 120 different objects (i.e., mycelial aggregates) per sample (taking approximately 60 min) yielding a maximal variation index of 16 % for the average percentage of FDA-stained area. These images were stored for further processing and analysis.

Two main macro files were created for processing the images (one for normal light and the other for fluorescent images):

- a. Light microscopic images were first processed by correcting for uneven background intensities using a flatten filter with a 20-pixel feature width. A median filter with a (3 x 3) kernel size was then applied for the removal of impulse noise. This median filter produces a convenient blurring of the image for further segmentation (i.e. finding the outline of objects). The gray-level threshold that gave the best segmentation of the image was founded interactively. Firstly, the Between Class Variance (BCV) criterion was applied for automatic threshold selection from gray-level histograms (Otsu, 1979). This method can often adequately detect the outline of the fungus since it maximizes the separability of the resultant classes in gray levels (dark pixels for the fungus and bright pixels for the background, i.e. binodal distribution). Nevertheless, if a tightening exists in some branches of the fungus, the threshold level must be modified. Six buttons corresponding to 3, 6, 9, 18, 23 and 28 % over the automatic threshold level were implemented for fast interactive finding of the optimal value.



b. The pixel values of the fluorescent images were reversed by applying a negative slope linear function to the output lookup table of the image. By this method, the dark background of the image becomes white and the fungus dark, as in the case of the light microscopic images. Since fluorescent images do not present uneven background intensities, flatten filter was not necessary. The median filter and the same segmentation procedure mentioned in a) were then applied. Ultimately, objects of interest were detected and selected for final measurement and calculation using a spreadsheet (Microsoft Excel' 97).

% of FDA-stained area (% of active biomass) was then calculated as:

$$\% \text{ of FDA-stained area} = \frac{\text{FDA stained hyphal area}}{\text{Total hyphal area}} \times 100$$

RESULTS AND DISCUSSION

As shown in figure 1, AO fluorescence was found to be stable under UV light exposition for a considerable period of time (5 h); however, this dye was not found to be reliable for the definition of cell viability/activity, although this dye might be useful for cell detection and counting. On the other hand, FDA fluorescence fade over short exposure times to UV light as reported previously by other authors (Ingtham and Klein, 1982; Stewart and Deacon, 1995; Yang et al., 1998). However, because of the swiftness and sensitivity of the digitizing process, this was not a problem and 3-5 sec were enough for image acquisition.

It was observed that AO fluorescence colour of the fungal cells and cell viability, have no significant correlation. Fresh *T. harzianum* emitted orange, yellow and green with AO staining; however, after autoclaving, the presence of green fluorescence was still observed. Differential staining with AO, where green fluorescing microbial cells were thought to be "active" and orange fluorescing cells "inactive" has been reported (Cootes and Johnson, 1980; Yeh et al., 1987). However, this concept does not apply in other works with bacteria (Petitpierre et al., 1980; Rodrigues and Kroll, 1986). There are many proposed explanations for AO colour changes for particular situations; however, no universal interpretation exists and therefore, AO was not used for further experiments.

Metabolically active fungal cells produced bright green (monochrome) fluorescence when stained with FDA (Fig. 2), unlike sterilized cell which did not fluoresce and a complete black picture (not shown) was obtained. FDA stained cells made it easy to

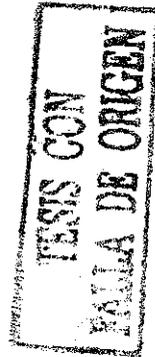
distinguish metabolically active portions from metabolically inactive fragments of fungal hyphae. As an example, figures 3A and 3B shows the fluorescence area and the total area of hyphae, respectively, for a given sample. Using image analysis, a 73.6 % of FDA-stained area, defined as the percentage of FDA labelled area (Fig. 3A) to total fungal area (Fig. 3B), was measured. It should be pointed out that FDA-stained percentage areas less than 100 % were obtained as the result of large separate hyphae which were not stained as well as the result of sections in the same hyphae not being stained. Therefore, FDA can be considered as a vital stain for fungal cell activity. Ziegler et al., (1975) and Söderström (1977) have described membrane properties in active, passive and dead microorganisms with respect to FDA fluorescence activity and were confident that this dye only stains metabolically active cells. The results obtained in the present study are in line with that indication as could be observed in Figures 3A and 3B.

Initial % of FDA-stained area of *Trichoderma harzianum* was manipulated applying various lethal and sub-lethal treatments. *T. harzianum* cells were subjected to different deteriorating treatments such as milling, electromagnetic wave shock in a microwave oven and immersion in a hot water bath. Initial % of FDA-stained area (control) was near to 100 % as sampled cells were in the balanced growth phase. As a result of the different damaging treatments, % of FDA-stained area was significantly affected as treatment time increased and also as a function of the type of damaging treatment (Fig. 4). The different treatments selected allowed to cover the entire range of percentage of active biomass (extent of % of FDA-stained area) from non fluorescent hyphae (0 % in area) to totally fluorescent ones (100 % in area). Milling of *Trichoderma* cells in a blender did not have a drastic effect such as that observed when microwaves or heat treatment were used (Fig. 4).

Only a 28 % reduction in FDA-stained hyphal area was observed after 2 min of milling at 28,000 rpm. A similar effect (20 % reduction) has been previously observed under milling conditions described in other studies with some soil born fungi including *Trichoderma* spp. (Ingham and Klein, 1982; Söderström, 1979). It can be proposed that the fungal cell walls as well as the hyphal septa have a high resistance to this type of mechanical stress, protecting the cellular protoplasm. Therefore, esterase was able to remain intact and active up to a particular duration of time after a given intensity of the milling treatment. At the other hand, microwaves had a very pronounced effect on fungal cells. It can be assumed that this type of stress is highly effective for denaturing the protein content of the cells causing drastic cell death.

Biomass growth performance is one of the known procedures (Granade et al., 1985) to estimate microbial viability. In our experiments, the inocula were quantitatively the same but qualitatively different: i.e., damaged to different extents. The best way of measuring this difference (associated with viability) was to measure biomass dry weights of treated samples at 30 h of cultivation (as the differences in biomass concentration were more pronounced, figure 5) to estimate differences in growth rate. Thus, differences in growth rate (estimated at 30 h of cultivation) are likely due to the differences in active biomass (measured as % of FDA-stained area) resulting from the different damaging treatments.

In previous studies (Söderström, 1977), soil born fungal hyphae of 50 different species (including 3 species of *Trichoderma*) stained with FDA, were considered to be "viable". This consideration was then confirmed qualitatively with growth and substrate utilization capacity studies (Ingham and Klein, 1982). "Percentage of viability" of



Streptomyces clavuligerus cells stained with a commercial dye (BacLight) has been reported (Sebastine et al., 1999) using image analysis of stained/non-stained ratios of the hyphae, with no link, however, to culturability.

In this study, a correlation between biomass growth performance of physically treated cells and % of FDA-stained area was established. Growth rate of treated *T. harzianum* cells was taken as a functional indicator of viability and it was found that this parameter exhibited a high correlation with % of FDA-stained area as measured by the image analysis system (Fig. 6). The regression equation ($r = 0.979$) calculated for this relationship, was: growth rate (g/L h) = 2.25×10^{-4} (% of FDA-stained area). It should be pointed out that the relationship between the % of FDA-stained area and the biomass growth rate was totally independent of the type of physical treatment applied.

In theory, inoculation with a single element (spore, viable fragment or compartment) should result in growth, and therefore, the particle size of mycelial aggregates is expected to influence growth rate. In this work, it has been shown that milled samples (i.e. applying high hydrodynamic stress) constitute a good example of how % of FDA-stained area correlates with growth rate, independently of the particle size. Milled samples (in which more biomass particles per mass of total biomass is expected) presented not less than 70 % of FDA-stained area after 2 min at 28,000 rpm (Fig. 4A). The septed nature of this fungus and the possible balance between mechanical damage and the formation of new tips, could explain this finding.

It should be mentioned that this methodology only distinguishes between active and inactive parts of the biomass by associating the presence or the absence of fluorescence within the hyphae, without considering its intensity (or esterase specific activity). Although fluorescence intensity quantification potentially gives a real measure of the degree of activity in a certain region of the hyphae, it does not allow to measure how spread this activity is along the mycelia. As fungal growth is a function of the elongation growth rate as well as the branching frequency rate, a measure of the percentage of active biomass is a better parameter than the degree of activity to characterize the growth potential of *Trichoderma*.

The methodology described here was able to quantify the evolution of the viability of *Trichoderma harzianum* in a 10 L bioreactor cultivation. We chose two extremely different conditions in order to be sure to obtain significant differences in the viability of the cultures. Our results showed that *Trichoderma harzianum* viability was strongly influenced by process conditions. For example, significant differences were found between fed-batch and batch processes (Fig. 7). The fed-batch process allowed (as expected) considerably higher total biomass concentration than the batch process. Differences in biomass growth performance were evident even before nitrogen (through pH control) or carbon source (glucose) feeding started in the fed-batch process (36 h). Indeed, at this time, the culture was actively growing in the fed-batch process while in the batch process, the culture was at the end of the lag phase. After 60 h of cultivation, end of fungal growth was evident in the batch culture, reaching only 3 g/L of biomass (as estimated by dry weight). In fed-batch cultures, the growth phase was extended until 108 h as a result of feeding and aeration policies. Maximal biomass dry weight concentration reached about 13 g/L at 108 h. After that, biomass content decreased to 11 g/L at 144 h. Taking into account the total

biomass and the % of active biomass, expected viable biomass can be estimated. As shown in Figure 7, the maximal viable biomass concentration reached in batch process was less than 2 g/L (60 h) while 6.5 g/L of viable biomass were obtained in fed-batch process (84 h). After maximal viable biomass concentrations were attained, as % of active biomass activity continued to drop, expected viable biomass concentrations sharply decreased while total biomass remained nearly constant. From these results, and from the practical point of view, the fed-batch culture should be stopped at 84 h of culture if viable biomass production is the main objective of the process (*i.e.* for biogas control uses). Clearly, if the viable biomass is what matters the most, obtaining high biomass concentration does not assure to obtain the highest viable biomass. Having a method like the one described here would allow to design process conditions to maximize the amount of viable biomass obtainable in fermentation.

CONCLUSIONS

Fluorescence-based image analysis was, for the first time, successfully applied for the quantitative, rapid and accurate assessment of the viability of *Trichoderma harzianum*. The technique links the fungus culturability (as determined by the ability to grow) with the percentage of active of its biomass (as determined by FDA staining). Biomass growth rate correlated linearly with biomass activity (% of FDA-stained area) regardless of the method to deliberately damage the cells. Although the technique was tested only for *Trichoderma harzianum*, the ability to hydrolyse FDA seems widespread and thus, it could be potentially useful for other septate fungi. The methodology is simple, sensitive, rapid, reliable and also labour-saving as compared to any other presently known method. Only one fluorescence

colour (monochrome) was used for detecting the percentage of active biomass and simple light microscopy was sufficient to detect total mycelial area.

Acknowledgements. Grants from CONACyT (25310-B), DGAPA-UNAM (IN-231398 & IN105500) and IFS (E/2548-2) are acknowledged. The assistance of M. Patiño, M. Ortiz, and M. Caro in conducting the bioreactor culture is acknowledged with thanks. We appreciate the critical reading of this manuscript by P. Larraide and S. Bellara.

References

- Agger T, Spohr AB, Carlsen M, Nielsen J. 1998. Growth and product formation of *Aspergillus oryzae* during submerged cultivation: verification of a morphologically structured model using fluorescent probes. *Biotechnol Bioeng* 57(3): 321-329.
- Barak R. and Chet I. 1986. Determination, by fluorescein diacetate staining, of fungal viability during mycoparasitism. *Soil Biol and Biochem* 18(3): 315-319.
- Barer, MR, Harwood, CR. 1999. Bacterial viability and culturability. *Adv Microb Phys* 41: 93-137.
- Breuer P and Abee T. 2000. Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *Int J Food Microbiol* 55: 193-200.
- Bunthof CJ, van den Braak S, Breuer P, Rombouts FM and Abee T. 1999. Rapid fluorescence assessment of the viability of stressed *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 65(8): 3681-3689.
- Cootes RL, Johnson R. 1980. A fluorescent staining technique for determination of viable and non-viable yeasts and bacteria in wmeries. *Food Technol in Australia* 23: 522-524.
- Desgranges C, Vergoignan C, Georges M, Durand A. 1991. Biomass estimation in solid state fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 35: 200-205.
- Drouin JF, Louvel L, Vanhoutte B, Vivier H, Pons MN, Germain P. 1997. Quantitative characterization of cellular differentiation of *Streptomyces ambifaciens* in submerged culture by image analysis. *Biotechnol Tecn* 11 (11): 819-824.
- Gilbert F, Galgani F, Cadiou Y. 1992. Rapid assessment of metabolic activity in marine microalgae: application in ecotoxicological tests and evaluation of water quality. *Mar Biol* 112: 199-205.
- Gikas, P, Livingston, AG. 1998. Use of specific ATP concentration and specific oxygen uptake rate to determine parameters of a structured model of biomass growth. *Enzyme Microb Technol* 22: 500-510.
- Granade TC, Helmmann MF, Artis WM. 1985. Monitoring of filamentous fungal growth by *in situ* microspectrophotometry, fragmented mycelium absorbance density, and ¹⁴C incorporation: alternatives to mycelial dry weight. *Appl Environ Microbiol* 49(1): 101-108.
- Holzappel-Pschorn A, Obst U, Haberer K. 1987. Sensitive methods for the determination of microbial activities in water samples using fluorogenic substrates. *Fresenius Z Analyt Chem* 327: 521-523.
- Huang CN, Cornejo MJ, Bush DS, Jones RL. 1986. Estimating viability of plant protoplasts using double and single staining. *Protoplasma* 135: 80-87.
- Ingham ER, Klein DA. 1982. Relationship between fluorescein diacetate-stained hyphae and oxygen utilization, glucose utilization, and biomass growth of submerged fungal batch cultures. *Appl Environ Microbiol* 44(2): 363-370.
- Jolicoeur M, Williams RD, Chavarre C, Fortin JA, Archambault J. 1999. Production of *Glomus intraradices* propagules, an arbuscular mycorrhizal fungus, in an airlift bioreactor. *Biotechnol Bioeng* 63: 224-232.
- Jones KH, Senft JA. 1985. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate and propidium iodide. *Histochem Cytochem* 33: 77-79.
- Muñoz GA, Agosin E, Cotoras M, Martun RS, Volpe D. 1995. Comparison of aerial and submerged spore properties for *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiol Lett* 125: 63-70.

- Otsu N. 1979. A threshold selection method from gray-level histograms, IEEE Transactions on Systems Man and Cybernetics 9 (1): 62-66.
- Paul GC, Kent CA, Thomas CR. 1993. Viability testing and characterization of germination of fungal spores by automatic image analysis. Biotechnol Bioeng 42: 11-23.
- Pettipher GL, Mansell R, McKinnon CH, Cousins C.M. 1980. Rapid membrane filtration-epifluorescent microscopy technique for direct enumeration of bacteria in raw milk. Appl Environ Microbiol 39: 423-429.
- Raynal L, Barnwell O, Gervais P. 1994. The use of epi-fluorescence to determine the viability of *Saccharomyces cerevisiae* subjected to osmotic shifts. J Biotechnol 36: 121-127.
- Reichl, U, Yang, H, Gilles, ED, Wolf, H. 1990. An improved method for measuring the interseptal spacing in hyphae of *Streptomyces tendae* by fluorescence microscopy coupled with image-processing. FEMS Microbiol Lett 67: 207-210.
- Rodrigues UM, Kroll RG. 1986. Use of the direct epifluorescent filter technique for the enumeration of yeasts. J Appl Bacteriol 61: 139-144.
- Ross DD, Joneckis CC, Ordóñez IV, Sisk AM, Wu RK, Hamburger AW, Nora RE. 1989. Estimation of cell survival by flow cytometric quantification of fluorescein diacetate / propidium iodide viable cell number. Cancer Res 49: 3776-3782.
- Schnürer J, Rosswall T. 1982. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. Appl Environ Microbiol 43: 1256-1261.
- Sebastine IM, Stocks SM, Cox PW, Thomas CR. 1999. Characterisation of percentage viability of *Streptomyces clavuligerus* using image analysis. Biotechnol Tech 13: 419-423.
- Söderström BE. 1977. Vital staining of fungi in pure cultures and in soil with fluorescein diacetate. Soil Biol Biochem 9: 59-63.
- Söderström BE. 1979. Some problems in assessing the fluorescence diacetate-active fungal biomass in the soil. Soil Biol Biochem 11: 147-148.
- Stewart A, Deacon JW. 1995. Vital fluorochromes as tracers for fungal growth studies. Biotechnol Biochem 70 (2): 57-65.
- Steward N, Martin R, Engasser JM, Goergen JL. 1999. A new methodology for plant cell viability assessment using intracellular esterase activity. Plant Cell Reports 19: 171-176.
- Thomas LN, Gina HM. 1997. Fluorescein diacetate as a viability stain for tree roots and seeds. New Forests 14 (3): 221-232.
- Thrane C, Olsson S, Harder-Nielsen T, Sørensen J. 1999. Vital fluorescent for detection of stress in *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* challenged with viscosinamide from *Pseudomonas fluorescens*. FEMS Microbiol Ecol 30: 11-23
- Vanhoutte B, Pons MN, Thomas CR, Louvel L, Vivier H. 1995. Characterization of *Penicillium chrysogenum* physiology in submerged cultures by color and monochrome image analysis. Biotechnol Bioeng 48: 1-11.
- Yang H, Acker J, Chen A, McGann L. 1998. In situ assessment of cell viability. Cell Transplant 7 (5): 443-451.
- Yeh TY, Godshalk JR, Olsan GJ, Kelly RM. 1987. Use of epifluorescence microscopy for characterizing the activity of *Thiobacillus ferrooxidans* on iron pyrite. Biotechnol Bioeng 30: 138-146.

Ziegler GB, Ziegler E, Witzentansen R. 1975. Nachweis der stoffwechsellaktivität von mikroorganismen durch vital-fluorochromierung mit 3', 6'-Diacetylfluorescein. Zentbl

Bakt Hyg Abt I Orig A. 230: 252-264.

Ziglio G, Andreottola G, Barbesti S, Boschetti G, Bruni L, Foladori P and Villa R. 2002.

Assessment of activated sludge viability with flow cytometry. Water Res 36: 460-

468.

Figure captions

Figure 1. Fluorescence intensity (%) of AO (O) and FDA (●) labelled *Trichoderma harzianum* as a function of exposure time to UV light.

Figure 2. Photomicrograph (magnification x 10) of cells of *Trichoderma harzianum* stained with fluorescein diacetate (FDA).

Figure 3. Photomicrographs (magnification x 10) of *Trichoderma harzianum* stained with fluorescein diacetate (FDA); (A) only the active regions can be seen by the fluorescent image and (B) the total fungal area can be seen in light microscopy.

Figure 4. The effects of physical treatments on the % of FDA-stained area of *Trichoderma harzianum*. (A) Influence of electromagnetic shock in a microwave oven at 1,400W (▲), and milling at 28,000 rpm (□). (B) Effect of heat treatment at 55° C (●) and 65° C (○) in a hot water bath. All as function of time of treatment.

Figure 5. Biomass growth of *Trichoderma harzianum* treated with electromagnetic stress in a microwave oven at 1,400 W for 0 (●), 10 (Δ), 12 (◆), 14 (□), 16 (■), 18 (▼) and 20 (○) seconds.

Figure 6. Correlation between the biomass growth rate and the % of FDA-stained area as measured by image analysis. The symbols correspond to heat treatment at 55° C (◆), 65° C (●), milling at 28,000 rpm (○) and microwave treatment at 1,400 W (△) for various lengths of time.

Figure 7. Influence of process conditions on viability (□), total (●) and viable (○) biomass concentration of *Trichoderma harzianum* during batch and fed-batch fermentation in a 10 L bioreactor. BDW: Biomass dry weight.

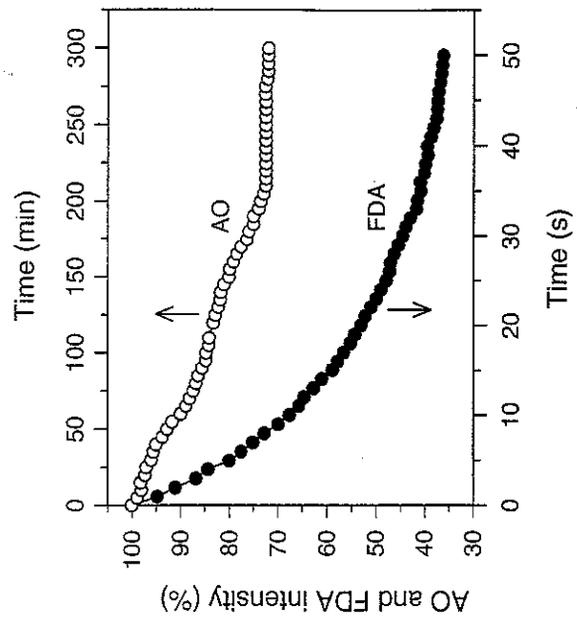


Fig. 1

Hassan *et al.*, 2002



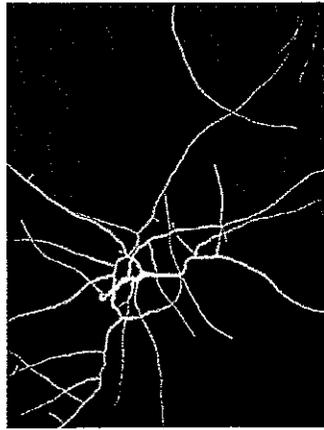
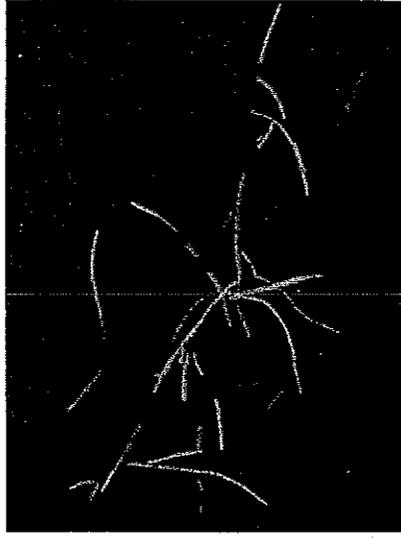


Fig. 2

Hassan *et al.*, 2002



A



B

Fig. 3

Hassan *et al.*, 2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

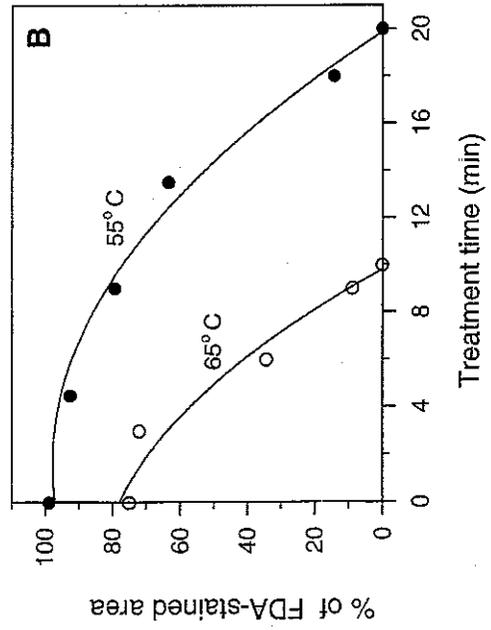
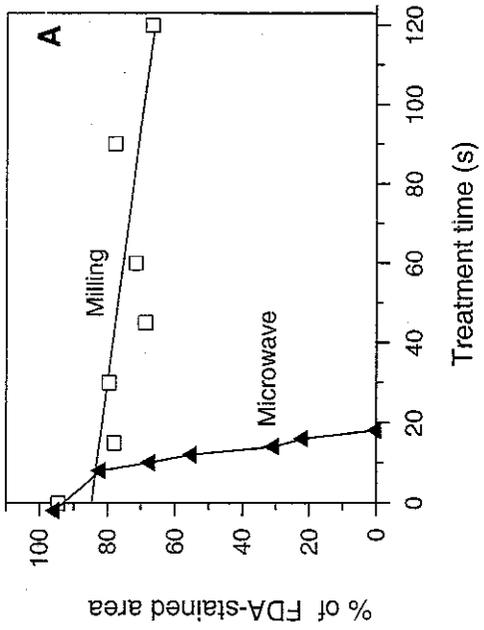


Fig. 4, Hassan *et al.*, 2002

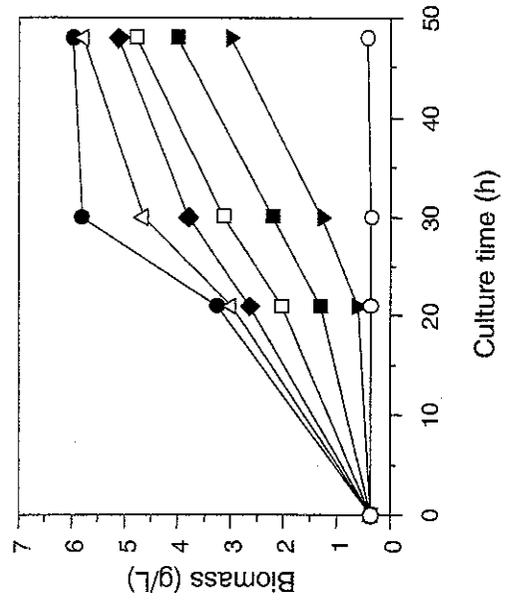


Fig. 5
Hassan *et al.*, 2002

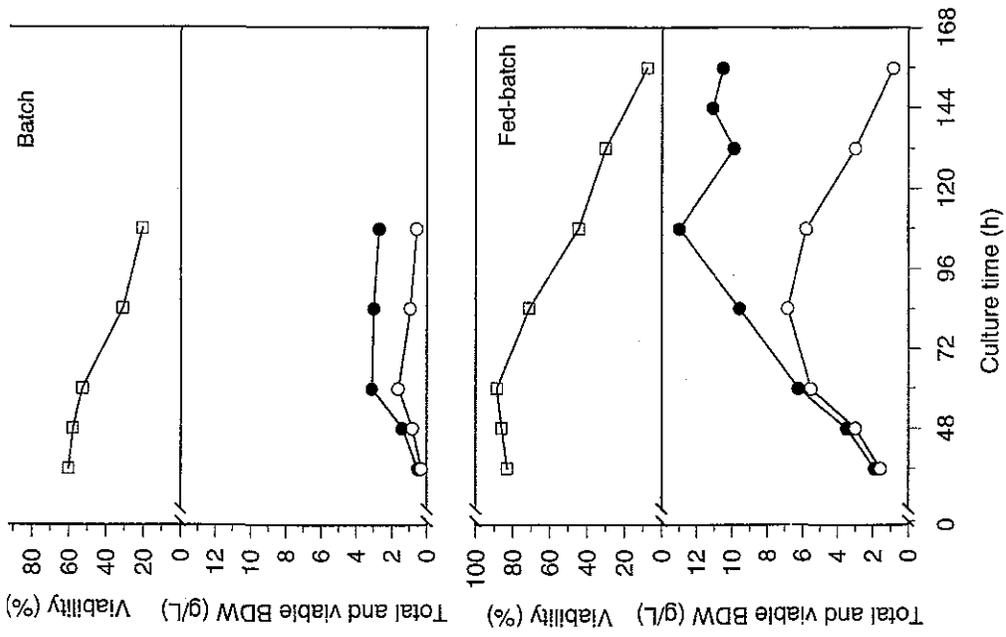


Fig. 7, Hassan *et al.*, 2002

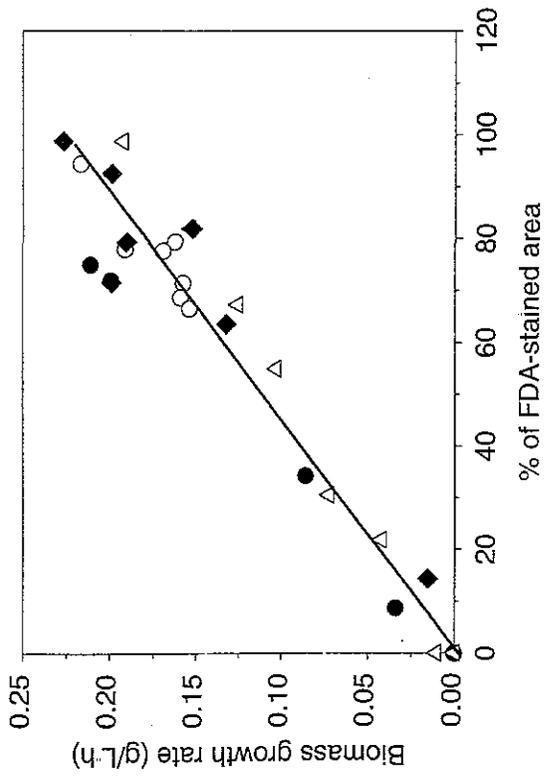


Fig. 6
Hassan *et al.*, 2002