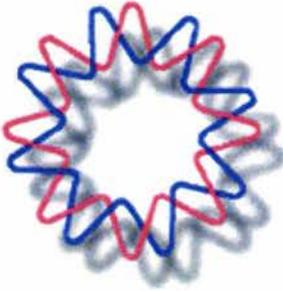


00551 D



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**“Producción de conidios de *Trichoderma harzianum*
en cultivo sumergido”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A :
IQ HEBER GAMBOA MELÉNDEZ

CUERNAVACA, MOR.

MAYO 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Leobardo Serrano Carreón. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos al Personal Académico (DGAPA-UNAM) a través del proyecto IN226202, así como del proyecto Z-001 y de la beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

A la eterna memoria de mis padres:

Hermelinda y Alberto

Con todo mi cariño y admiración

Gracias por todo

A mi familia:

**César, Sandra, Ulises, Lorena, Janeth, Marco,
Oscar, Martín, Yolanda, Aldo, Alain, Martincito,
Lorenita, Aritzel y Doña Mary**

Gracias por su invaluable apoyo

A Robert Moore

Gracias

A mis amigos:

**Lucio, Gina, Alina, Vane, Mary, Juan, César R.,
Jorge L., Rubén, Nancy, Toño R., Nuria, Edgar
M., Juan Manuel, Miguel, Abelardo, Ricardo,
Brenda, Armando, Guillermo, Yola, etc.**

Gracias por brindarme su amistad y apoyo

A todos y cada uno de mis amigos
del verano de la investigación científica

Reconocimientos:

Al Dr. Leobardo Serrano Carreón y Dr. Enrique Galindo Fentanes por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo y su apoyo en la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado, por la revisión de la tesis y comentarios:

Dra. Alejandra Bravo de la Parra

Dr. Jorge Luis Folch Mallol

Dr. Alfredo Martínez Jiménez

Dr. Ernesto Favela

Dr. Leobardo Serrano Carreón

Al Dr. Noé Herrera Pacheco, Dra. Mayra de la Torre Martínez y Dr. Octavio Loera Corral por brindarme su apoyo académico, confianza y amistad durante mis estudios.

A Karla de León Becerra, Vanessa Millán y personal de Planta Piloto por el apoyo técnico durante la realización de este trabajo.

Al M.C. José Antonio Rocha Valadez por sus comentarios y amistad.

A mis amigos y compañeros : Edgar, Milena, Gaby, Víctor, Karina, Vanessa , Luz, Keylor, José Luis, Jimmy, Argel, Rol, Alfonso, Luis, Daniela, Sandino, Celia, Sol, Adrián, Germán, Angélica, Paul, Javier, Mayra, Lorena, Edith, etc.

Índice General

	Página
Índice General	i
Índice de figuras	iii
Índice de tablas	v
Resumen	1
1. Introducción	3
2. Antecedentes	6
2.1 Importancia de <i>Trichoderma spp.</i>	7
2.1.1 Metabolitos de interés industrial	7
2.1.2 <i>Trichoderma spp.</i> como agente de control biológico	8
2.1.3 <i>Trichoderma spp.</i> favorece el crecimiento en plantas	10
2.2 Mecanismo de acción de <i>Trichoderma spp.</i> sobre hongos fitopatógenos	10
2.2.1 Antibiosis	11
2.2.2 Competencia	11
2.2.3 Micoparasitismo	11
2.3 Propágulos producidos por <i>Trichoderma spp.</i> para su aplicación como agente de control biológico	13
2.3.1 Micelio	13
2.3.2 Clamidosporas	14
2.3.3 Conidios	15
2.4 Aspectos generales sobre la esporulación asexual en hongos filamentosos	17
2.5 Producción de esporas en fermentación en sustrato sólido y sus características	19
2.6 Producción de esporas en fermentación en cultivo sumergido	20
2.6.1 Efectos nutricionales en la producción de esporas	21
2.6.2 Efectos fisicoquímicos en la producción de esporas	23
2.7 Estudios previos en el laboratorio	25
Justificación	27
3. Objetivos	28
4. Materiales y métodos	29
4.1 Materiales	29
4.1.1 Microorganismo	29
4.1.2 Preparación del inóculo y conteo de esporas	29
4.1.3 Medio de cultivo	30
4.2 Cultivos en fermentador	30
4.2.1 Condiciones de cultivo estándar	31
4.2.2 Determinación teórica del suministro de potencia volumétrica inicial al sistema	31
4.3 Métodos analíticos	32
4.3.1 Estimación de la biomasa	31
4.3.2 Cuantificación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC)	33
4.3.3 Determinación de glucosa residual	34
4.3.4 Determinación de NH ₄ residual	34

4.3.5 Determinación de la actividad de agua (A_w) en los cultivos	35
4.4 Diseños experimentales para la evaluación de los medios de cultivo en la producción de conidios de <i>Trichoderma harzianum</i>	36
4.4.1 Evaluación de la concentración de la fuente de carbono, relación C:N y temperatura	37
4.4.2 Evaluación de la adición de extracto de levadura y de la actividad de agua	38
4.4.3 Evaluación en dos etapas (Crecimiento micelial-esporulación)	39
4.5 Análisis estadístico	40
5. Resultados y discusión	42
5.1 Primera etapa	42
5.1.1 Análisis de varianza del efecto de la concentración de glucosa, la relación C:N y la temperatura en la producción de conidios de <i>Trichoderma harzianum</i>	42
5.1.1.1 Producción máxima de conidios	42
5.1.1.2 Esporulación máxima	43
5.1.1.3 Biomasa máxima	45
5.1.1.4 Productividad máxima	45
5.1.2 Cinética de crecimiento y consumo de sustratos de <i>Trichoderma harzianum</i>	46
5.1.2.1 Efecto de la temperatura	49
5.2 Segunda etapa	53
5.2.1 Análisis de varianza del efecto de la actividad de agua y del extracto de levadura en la producción de conidios de <i>Trichoderma harzianum</i>	54
5.2.1.1 Producción máxima de conidios	54
5.2.1.2 Esporulación máxima	55
5.2.1.3 Biomasa máxima	56
5.2.1.4 Productividad máxima	57
5.2.2 Efecto del extracto de levadura (EL) y de la actividad de agua (a_w)	58
5.3 Crecimiento micelial-esporulación	65
5.3.1 Efecto de la agitación y medio de cultivo en la producción de conidios de <i>Trichoderma harzianum</i>	70
5.3.2 Comparación de la producción de conidios de <i>Trichoderma harzianum</i> en las 3 etapas evaluadas	72
6. Conclusiones	75
7. Perspectivas	77
8. Bibliografía	79
9. Apéndice	88

Índice de figuras

	Página
Figura 2.1. Micelio de <i>Trichoderma harzianum</i> cultivado en medio líquido	13
Figura 2.2. Clamidosporas de <i>Trichoderma harzianum</i>	14
Figura 2.3. Conidios de <i>Trichoderma harzianum</i> producidos en medio líquido	15
Figura 2.4. Micrografía de las etapas de conidiación en <i>Apergillus nidulans</i> . (A) Tallo temprano del conidióforo. (B) Formación de la vesícula en la punta del tallo. (C) Desarrollo de la métula. (D) Desarrollo de las fiálides. (E) Conidióforo maduro con cadenas de conidios. Adaptado de Adams <i>et al</i> , 1998.	18
Figura 4.1. Curva de potencia volumétrica para un sistema de fermentación con capacidad de 10 litros de volumen de trabajo.	32
Figura 4.2. Estrategia experimental para la producción de conidios de <i>Trichoderma harzianum</i>	37
Figura 4.3. Diseño experimental para evaluar la concentración de glucosa, la relación C:N y la temperatura sobre la esporulación y la producción de conidios de <i>Trichoderma harzianum</i> .	38
Figura 4.4. Diseño experimental para evaluar el efecto de la adición de extracto de levadura y la actividad de agua (mediante la adición de glicerol al 9 % v/v) sobre la esporulación y la producción de conidios de <i>Trichoderma harzianum</i> .	39
Figura 4.5. Diseño experimental en 2 etapas (crecimiento-esporulación), para evaluar el efecto del cambio de medio de cultivo y la potencia volumétrica sobre la esporulación y la producción de conidios de <i>Trichoderma harzianum</i> .	40
Figura 5.1. Perfil cinético del crecimiento, consumo de glucosa y sulfato de amonio en cultivos de <i>Trichoderma harzianum</i> a 30 g/L de glucosa	47
Figura 5.2. Perfil cinético del crecimiento, consumo de glucosa y sulfato de amonio en cultivos de <i>Trichoderma harzianum</i> a 10 g/L de glucosa	47
Figura 5.3. Perfil cinético de la producción de conidios y esporulación en cultivos de <i>Trichoderma harzianum</i> a 30 g/L de glucosa	49
Figura 5.4. Perfil cinético de la producción de conidios y esporulación en cultivos de <i>Trichoderma harzianum</i> a 10 g/L de glucosa	49
Figura 5.5. Evolución de la actividad de agua en cultivos de <i>Trichoderma harzianum</i> .	54

Figura 5.6.	Evolución de la concentración de biomasa en cultivos de <i>Trichoderma harzianum</i> adicionados con extracto de levadura y glicerol, 400 rpm.	59
Figura 5.7.	Evolución de la concentración de glucosa y de sulfato de amonio en cultivos de <i>Trichoderma harzianum</i> adicionados con extracto de levadura y glicerol.	61
Figura 5.8.	Perfil cinético de la producción de conidios y esporulación (rendimiento) en cultivos de <i>Trichoderma harzianum</i> adicionados con extracto de levadura y glicerol.	62
Figura 5.9.	Cinética de crecimiento de cultivos de <i>Trichoderma harzianum</i> durante el proceso crecimiento-esporulación.	66
Figura 5.10.	Cinéticas de consumo de glucosa y de sulfato de amonio en cultivos de <i>Trichoderma harzianum</i> durante el proceso crecimiento-esporulación.	69
Figura 5.11.	Evaluación de la producción de conidios y esporulación en cultivos de <i>Trichoderma harzianum</i> durante el proceso crecimiento-esporulación.	71
Figura 9.1.	Cinéticas de tensión de oxígeno disuelto durante el proceso crecimiento-esporulación.	91

Índice de tablas

	Página
Tabla 4.1. Composición del medio de cultivo definido estándar para cultivos de <i>Trichoderma harzianum</i> .	30
Tabla 5.1. Análisis de varianza en la producción de conidios de <i>Trichoderma harzianum</i> (diseño factorial 2 ³)	43
Tabla 5.2. Análisis de varianza en la esporulación de <i>Trichoderma harzianum</i> (diseño factorial 2 ³)	44
Tabla 5.3. Análisis de varianza en la producción de biomasa de <i>Trichoderma harzianum</i> (diseño factorial 2 ³)	45
Tabla 5.4. Análisis de varianza en la productividad de conidios de <i>Trichoderma harzianum</i> diseño (factorial 2 ³)	46
Tabla 5.5. Producción máxima de conidios, esporulación, UFC y productividad de <i>Trichoderma harzianum</i> , (diseño factorial 2 ³ , 500 rpm)	51
Tabla 5.6. Análisis de varianza sobre la producción de conidios de <i>Trichoderma harzianum</i> (diseño factorial 2 ²)	55
Tabla 5.7. Análisis de varianza sobre la esporulación de <i>Trichoderma harzianum</i> (diseño factorial 2 ²)	56
Tabla 5.8. Análisis de varianza sobre la concentración de biomasa de <i>Trichoderma harzianum</i> (diseño factorial 2 ²)	57
Tabla 5.9. Análisis de varianza sobre la concentración de biomasa de <i>Trichoderma harzianum</i> (diseño factorial 2 ²)	58
Tabla 5.10. Producción máxima de conidios, esporulación, UFC y productividad de <i>Trichoderma harzianum</i> , (diseño factorial 2 ²)	64
Tabla 5.11. Comparación en la producción de conidios, esporulación, UFC y productividad en cultivos de <i>Trichoderma harzianum</i> bajo diferentes condiciones evaluadas en las tres etapas.	73

Resumen

Trichoderma harzianum es un hongo micoparásito que antagoniza una gran variedad de fitopatógenos que atacan cultivos de interés comercial y que ha sido utilizado como agente de control biológico. Debido a las características de los conidios (forma natural de sobrevivencia, resistente a procesos de secado y otras condiciones adversas), se propone como un propágulo interesante para su uso como agente de control biológico.

En el presente trabajo se realizó un estudio en tres etapas variando factores nutricionales y de proceso, con el propósito de incrementar la producción de conidios de *Trichoderma harzianum* en cultivo sumergido llevados a cabo en biorreactores de tanque agitado de 10 litros de volumen operacional.

En la primera etapa se estudió el efecto de la concentración de glucosa, la relación carbono-nitrógeno y la temperatura, a una agitación de 500 rpm (P/V de 6 W/L), sobre la producción de conidios y esporulación de *Trichoderma harzianum*. Los resultados mostraron que el medio de cultivo favoreció la esporulación en todas las condiciones evaluadas. Sin embargo, el crecimiento de biomasa fue limitado (menor a 2 g/L). Por otra parte, la concentración de la fuente de carbono (glucosa) y la relación C:N, no tuvieron un efecto significativo en las variables evaluadas. Por su parte, una temperatura de 29 °C ejerció un efecto significativo favoreciendo una mayor producción de conidios, esporulación y productividad del proceso.

En la segunda etapa del proyecto se estudió el efecto de la adición de extracto de levadura (0.5 g/L) y la disminución de la actividad de agua (mediante la adición de glicerol al 9 % v/v) a una agitación de 400 rpm (P/V de 3 W/L). Los resultados mostraron que la adición de extracto de levadura mejora el crecimiento de *Trichoderma harzianum* significativamente, alcanzando concentraciones de hasta 6 g/L de biomasa. Por otra parte, bajo esta condición también se observó una esporulación temprana (36 horas de cultivo), llegando a una concentración

máxima de 1.7×10^8 conidios/mL a las 72 horas de cultivo, mejorando la productividad del proceso (2.27×10^9 conidios/L.h). La adición de glicerol disminuyó la actividad de agua del medio de cultivo a 0.95, la cual se mantuvo a lo largo de todo el tiempo de cultivo. La disminución de la actividad de agua retrasó la germinación de los conidios y el crecimiento de la biomasa, además, no tuvo un efecto positivo sobre la esporulación de *Trichoderma harzianum*.

En la tercera etapa del proyecto se evaluó un proceso que consistió en el crecimiento de micelio mediante la adición de 5 g/L de extracto de levadura a una agitación de 200 rpm (P/V de 0.35 W/L). Posteriormente, se transfirió el micelio a un medio de cultivo definido (Control) que corresponde a la condición evaluada en la primera etapa del proyecto (30 g/L de glucosa, C:N de 30 y 29 °C). Los resultados mostraron un incremento en la producción de conidios entre un 350 y 600 % comparado con las condiciones máximas alcanzadas en las etapas uno y dos, respectivamente, alcanzando una concentración máxima de 5.62×10^8 conidios/mL. Se demostró que a una agitación de 400 rpm (P/V de 3 W/L), así como el agotamiento de la fuente de carbono (glucosa) favorecen la esporulación de *Trichoderma harzianum*.

De los factores evaluados en este estudio, la temperatura, el extracto de levadura y la agitación suministrada al sistema, influyeron positivamente en la producción y productividad de conidios en cultivos de *Trichoderma harzianum*. Por otro lado, el medio de cultivo definido utilizado en la primera etapa, así como la agitación favorecen la esporulación, no siendo así la adición de extracto de levadura.

Este trabajo permitió establecer un proceso para la producción de conidios de *Trichoderma harzianum* en cultivo sumergido en donde se incrementó la producción y productividad de este proceso.

Capítulo I

Introducción

La agricultura en México y otros países sufre grandes pérdidas anualmente debido a plagas y enfermedades que atacan diferentes cultivos de interés comercial. Dichas plagas y enfermedades, han sido controladas mediante el uso de agentes químicos para incrementar los rendimientos de las cosechas. Sin embargo, los agentes químicos tienen efectos no deseados en el medio ambiente cuando son utilizados indiscriminadamente, promoviendo el desarrollo de resistencia de estos organismos. Además, son responsables de causar graves daños a la salud humana debido a su toxicidad, ya que son de difícil degradación y que se acumulan en los productos agrícolas (Charnley, 1991; Herrera-Estrella y Chet, 1998; Thomas, 1999).

Debido a esto, surge el control biológico de plagas y enfermedades como una alternativa para reducir el uso o eliminación de estos compuestos químicos. El control biológico se ha definido como el uso de enemigos naturales con el fin de reducir o eliminar el desarrollo de plagas y enfermedades. El uso de agentes biológicos ofrece grandes ventajas debido a su especificidad antagónica, logrando reducir o eliminar la plaga o enfermedad, además de ser biodegradables e inoocuos para el ser humano (Thomas y Willis, 1998; Viterbo *et al*, 2002).

Los hongos del género *Trichoderma* han sido estudiados como agentes de control biológico que antagonizan una gran variedad de hongos fitopatógenos, tales como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium cepivorum*, *Sclerotium rolfsii*, entre otros, que atacan cultivos de fresa, cebolla, ajo, tomate, trigo, col, etc. (Papavizas, 1985; Chet, 1987). El mecanismo de acción de este género ha sido descrito en términos de la producción de antibióticos, competencia por nutrientes y espacio, así como micoparasitismo, que involucra el ataque directo de *Trichoderma* contra el fitopatógeno.

Trichoderma harzianum produce tres tipos de estructuras durante su cultivo: micelio, clamidosporas y conidios (Papavizas, 1985). El micelio, a pesar de ser el propágulo mediante el cual *Trichoderma* realiza su mecanismo antagónico sobre el patógeno, es sensible al proceso de secado. En consecuencia, el uso de micelio como agente de control biológico para fines prácticos no es viable. Por su parte, las clamidosporas requieren mayor tiempo de fermentación para su maduración y solo el 8 % de éstas son capaces de germinar después de ser sometidas a secado (Agosin y Aguilera, 1998). Finalmente, la producción de conidios requiere un menor tiempo de fermentación, además, son producidos en mayor cantidad que las clamidosporas y son más resistentes a condiciones ambientales adversas ya que es la forma natural de supervivencia. Por tanto, el uso de esporas parece ofrecer una opción interesante para su uso como un agente de control biológico eficaz.

El proceso de esporulación involucra la formación de conidios, un tipo de espora asexual, que se forman en estructuras hifales diferenciadas, denominadas conidióforos. Tal proceso es particularmente afectado por factores nutricionales (fuente de carbono, fuente de nitrógeno, minerales y vitaminas) y factores fisicoquímicos como el pH, temperatura, luz y actividad de agua, entre otros (Moore-Landdecker, 1996).

La producción de esporas en hongos filamentosos se ha realizado tanto en cultivo en medio sólido y en cultivo en medio líquido. En el cultivo en medio sólido se ha reportado que se favorece la esporulación, es fácil de llevar a cabo a nivel laboratorio, además de costos de producción reducidos y altas productividades. Sin embargo, los tiempos de cultivo son prolongados, es difícil el control de parámetros de gran importancia como temperatura, pH, humedad relativa y oxígeno. Por otro lado, el escalamiento y automatización del proceso es complicado por lo que los costos de producción pueden elevarse considerablemente (Fernández *et al*, 1996; Jackson, 1997b).

Por su parte, en el cultivo en medio líquido es posible mantener un estricto control de los parámetros antes mencionados. Asimismo, su escalamiento implica criterios bien definidos

como el coeficiente de transferencia de masa (k_La), suministro de potencia, entre otros (Jackson, 1997b). Por tanto, el criterio para producir esporas ya sea en cultivo sólido o líquido, dependerá en gran medida de las características que se deseen tener del producto, así como los costos de producción que puedan estar involucrados.

Hasta el momento, la mayoría de los estudios enfocados a la producción de esporas en cultivo líquido han sido llevados a cabo en matraces agitados. Sin embargo, si el objetivo es obtener un producto como agente de control biológico para su uso comercial, es necesario llevar a cabo estudios en fermentadores, de tal forma que, en base a los resultados obtenidos se pueda escalar el proceso a nivel de planta piloto y posteriormente a nivel industrial.

Finalmente, es necesario contar con un agente de control biológico (a base de esporas) eficaz, que sea producido rápidamente, así como ser resistente a condiciones ambientales adversas (Agosin y Aguilera, 1998). Por tanto, es de gran importancia encontrar las condiciones de cultivo que garanticen la obtención de un producto con las características deseadas.

El presente trabajo consistió en llevar a cabo estudios sobre el efecto de parámetros nutricionales y de proceso en cultivos en medio líquido de *Trichoderma harzianum* sobre producción de conidios (conidios/mL), la esporulación (conidios/g biomasa), productividad del proceso (conidios/mL.h) y productividad específica (conidios/g biomasa.h) en biorreactores de 14 litros con el fin de desarrollar un proceso de producción de conidios para su uso potencial como agente de control biológico.

Capítulo II

Antecedentes

El control químico (pesticidas, herbicidas, antibióticos, etc.) ha sido utilizado durante los últimos 50 años con el fin de controlar plagas y enfermedades que atacan una gran variedad de productos agrícolas de importancia a nivel mundial. Se han estimado pérdidas globales hasta de 300 mil millones de dólares anualmente, equivalente al 30-40 % de la producción total de productos alimenticios, causadas por plagas y enfermedades. Si adicionamos los daños causados durante la poscosecha, las pérdidas figuran alrededor del 60-70 % de la producción global (Charnley, 1991; Thomas, 1999).

Además, el uso continuo e indiscriminado de estos productos en la agricultura ha contribuido a la contaminación del medio ambiente, debido a que son de difícil degradación, acumulándose como residuos tóxicos en frutos, suelos y mantos freáticos. Por otra parte, se ha seleccionado resistencia por parte de los organismos a dichos productos. En consecuencia, el control de las plagas y enfermedades se hace cada vez más difícil. La toxicidad de los agentes de control químico ha repercutido enormemente en la salud humana, debido a la exposición prolongada a estos productos durante su aplicación o en el consumo de productos agrícolas con residuos de estas sustancias. Estudios realizados por la EPA (Environmental Protection Agency) demuestran que la exposición prolongada a algunos químicos pueden provocar irritación de los ojos y piel, daños en el sistema endócrino e inducción de cáncer (Herrera-Estrella y Chet, 1998)

Debido al deterioro del medio ambiente y daños a la salud humana, causados por el uso del control químico de plagas y enfermedades, se ha hecho un esfuerzo para reducir o

eliminar el uso de estos productos. Para tal efecto, ha surgido como una alternativa interesante el *Control Biológico de Plagas y Enfermedades*.

El control biológico se ha definido como la actividad en la cual son utilizados organismos, enemigos naturales o productos producidos por estos, con el objetivo de reducir o eliminar el desarrollo de plagas y enfermedades (Thomas y Willis, 1998; Viterbo *et al*, 2002). Dentro de los enemigos naturales que pueden ser utilizados como agentes de control biológico podemos encontrar a las bacterias, hongos, nemátodos y virus (Charnley, 1991).

Dentro de las ventajas que ofrecen los agentes de control biológico sobre los agentes químicos, destaca la de su especificidad antagonista sobre determinado espectro de organismos patógenos, lo que hace que no se eliminen otro tipo de organismos que pueden ser benéficos para el desarrollo de los cultivos. Además, por su naturaleza biológica, son degradados naturalmente sin dejar residuos tóxicos que afecten la salud humana.

2.1 Importancia de *Trichoderma spp.*

2.1.1 Metabolitos de interés industrial

Trichoderma spp. es un hongo filamentoso micoparásito que tiene una variedad de aplicaciones, dentro de las cuales destacan su uso para la producción de metabolitos de interés industrial como lactonas, que son utilizadas en la industria alimentaria y farmacéutica y la producción de enzimas (celulasas, α y β -glucanasas) para la industria del papel y textil (Buchert *et al*, 1998; Galante *et al*, 1998a; Galante *et al*, 1998b).

2.1.2 *Trichoderma spp* como agente de control biológico

Otra aplicación importante del género *Trichoderma*, es como agente de control biológico. Esto es debido al alto grado de adaptabilidad ecológica bajo diferentes condiciones ambientales, por lo que puede ser encontrado en casi todo tipo de suelo. Además, como colonizador secundario, puede ser encontrado en la superficie de raíces de plantas y en cortezas que han sido dañadas por otros hongos (Papavizas, 1985; Hjeljord y Tronsmo, 1998). *Trichoderma spp.* puede ser cultivado en sustratos de bajo costo, utilizando un amplio rango de fuentes de carbono (monosacáridos, disacáridos, polisacáridos complejos, ácidos orgánicos, entre otros) y nitrógeno (aminoácidos, urea, nitratos, amonio, entre otros). Estas características hacen a los hongos del género *Trichoderma* candidatos atractivos para su aplicación como agentes de control biológico (Papavizas, 1985; Hjeljord y Tronsmo, 1998).

Se ha observado que en diferentes hábitats la distribución y el crecimiento de *Trichoderma spp.* se ven fuertemente afectados por factores ambientales abióticos como la temperatura, la humedad relativa y el pH, afectando su actividad antagónica (Hjeljord y Tronsmo, 1998).

Se ha demostrado que *Trichoderma spp.* tiene una amplia actividad antagónica sobre gran número de hongos fitopatógenos como *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium spp.*, *Fusarium spp.*, *Sclerotium cepivorum*, *Botrytis spp.*, entre otros. Dichos fitopatógenos infectan cultivos de interés comercial tales como fresa, algodón, chícharo, cebolla, tomate, pepino, frijol, papa, algodón, entre los más importantes (Papavizas, 1985; Chet, 1987).

La pudrición del cultivo es una de las enfermedades más frecuentes en plantaciones de algodón y que es causada por *Rhizoctonia solani* y *Phytium ultimum*, la cual ha sido controlada con fungicidas químicos. Sin embargo, el uso prolongado de estos compuestos ha repercutido en el desarrollo de resistencia por parte del patógeno hacia estos fungicidas. Como alternativa, *Trichoderma viride* ha sido evaluado sobre estos cultivos infectados,

observándose un decremento de la enfermedad y el establecimiento de *Trichoderma viride* en el suelo (Papavizas, 1985; Lumsdem y Locke, 1989).

Trichoderma harzianum 1295-22 fue evaluado tanto en pruebas de laboratorio como de campo (Lo et al, 1996), logrando reducir enfermedades como la mancha café (*Rhizoctonia solani*), mancha de dólar (*Sclerotinia homoeocarpa*) y pudrimiento de la raíz (*Phytophthora graminicola*) en césped.

Hanson y Howell (2002) realizaron una fusión protoplasmática con dos cepas: una de ellas fue *Trichoderma virens* (con una gran capacidad y efectividad en el control de enfermedades) y la otra fue *Trichoderma koningii* (con cualidades adecuadas de almacenamiento). Como resultado se obtuvo una cepa con características superiores a las cepas nativas tanto en la actividad antagónica sobre *Rhizoctonia solani* como en su estabilidad de almacenamiento.

La “pudrición blanca” es una de las enfermedades más serias en cultivos de cebolla y que es causada por *Sclerotium cepivorum*. Para contrarrestar esta enfermedad se evaluó a *Trichoderma koningii* en cultivos infectados por este hongo. Como resultado se observó que - cuando *Trichoderma koningii* colonizaba el tejido afectado- las hifas de *Sclerotium cepivorum* se separaban del tejido afectado, y sus paredes celulares se degradaban, así como su ápice (Metcalf y Wilson, 2001).

Sclerotinia sclerotium y *Sclerotium rolfisii* producen estructuras de gran resistencia llamadas esclerocios. Tales estructuras se forman por ramificaciones y entrelazamientos hifales, incrementando su tamaño y compactamiento, lo que permite su supervivencia durante muchos años. Dichas estructuras pueden germinar en forma de micelio o mediante la formación de ascocarpos cuando se encuentran bajo condiciones adecuadas. Al respecto, se ha demostrado que la adición de *Trichoderma spp.* disminuyen la formación de estas estructuras, así como su viabilidad (Inbar et al, 1996; García-Garza et al, (1997).

2.1.3 *Trichoderma spp.* favorece el crecimiento en plantas

Estudios realizados con *Trichoderma spp.* han mostrado que la adición de conidios de este género favorece el crecimiento de varios cultivos como melón, tomate, pepino, pimienta, rábano y frijol. Se ha reportado el incremento en la velocidad de germinación de las semillas, de la longitud de la planta, del área de las hojas y del peso seco de la misma. Por otra parte, se ha reportado también una temprana floración en algunas plantas, un parámetro valioso para la plantas ornamentales (Chet, 1987).

También se ha reportado que al tratar semillas de chícharo con extractos obtenidos del medio de cultivo inoculados con *Trichoderma harzianum*, *T. viride* y *T. pseudokoningii*, se incrementó la velocidad de germinación de las semillas, la altura de la planta y la elongación de la raíz (Zheng y Shetty, 2000).

El mecanismo por el cual *Trichoderma spp* puede estimular el crecimiento de algunos cultivos no ha sido estudiado a fondo. Sin embargo, se ha sugerido que *Trichoderma spp* puede afectar a patógenos menores en la rizósfera, penetrar y vivir en la raíz de la planta en forma similar a un hongo micorriza, solubilizando micronutrientes o estimulando a la planta mediante la excreción de hormonas reguladoras, que a su vez, incrementan la velocidad de crecimiento y el consumo de nutrientes (Chet, 1987; Kleifeld y Chet, 1992; Altomare *et al*, 1999).

2.2 Mecanismo de acción de *Trichoderma spp.* sobre hongos fitopatógenos

Las interacciones entre las especies del género *Trichoderma* y otros hongos han sido clasificadas de acuerdo a tres mecanismos de acción: antibiosis, competencia y micoparasitismo. A continuación se describen brevemente cada una de ellas.

2.2.1 Antibiosis

Trichoderma spp. produce metabolitos secundarios con actividad antifúngica y antibacteriana. Dentro de éstos metabolitos se encuentra la 6-pentil- α -pirona, compuesto con aroma de coco, cuya actividad antibiótica ha sido probada contra esclerocios producidos por *Sclerotium rolfsii*, suprimiendo la enfermedad. Dicha molécula ha sido aislada de *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *T. koningii* y *T. hamatum* (Howell, 1998; Dodd *et al*, 2000). Se han identificado otras moléculas como isonitrilos, policétidos, sesquiterpenos, esteroides, gliotoxinas, viridina y gliovirina, todas con capacidad antibiótica.

2.2.2 Competencia

Otro modo de acción antagonista de este hongo es la competencia por interferencia, que involucra un mecanismo químico (secreción de metabolitos) por el cual limita el acceso de otro microorganismo al sustrato. Así también, mediante el agotamiento de fuentes nutricionales por este organismo, sin limitar directamente el acceso de otro microorganismo a los sustratos (Howell, 1998).

2.2.3 Micoparasitismo

El principal mecanismo de acción antagónica de *Trichoderma spp.* es el micoparasitismo, el cual consiste en el ataque directo sobre el hongo fitopatógeno. Se han propuesto cuatro etapas de este mecanismo: crecimiento quimitrófico, reconocimiento específico, unión y enrollamiento y, finalmente, la secreción de enzimas líticas, causando la muerte del hongo huésped (Chet *et al*, 1998).

Se piensa que el micoparasitismo comienza con el crecimiento y ramificación de las hifas en forma atípica, las cuales crecen hacia el hongo blanco. Las bases bioquímicas de este fenómeno no son muy claras, pero parece ser un fenómeno de crecimiento quimiotrófico, es

decir, una respuesta a gradientes nutricionales, químicos o bien a un estímulo por parte del hongo hospedero (Chet, 1987; Goldman *et al*, 1994; Chet *et al*, 1998).

Posteriormente, sigue la etapa de reconocimiento, la cual ha sido relacionada con la interacción de lectinas y carbohidratos específicos. Elad *et al* (1983), aislaron una lectina de las hifas de *Rhizoctonia solana* y encontraron que se unía a la galactosa contenida en las paredes celulares de *Trichoderma spp*. Por otra parte, también se ha reportado la unión entre una lectina aislada de *Sclerotium rolfsii* a un residuo de L-fucosil de *Trichoderma harzianum*, indicando que este residuo podría funcionar como receptor para la lectina de este hongo (Chet, 1987; Goldman *et al*, 1994; Chet *et al*, 1998).

Las evidencias anteriores fueron reforzados por Inbar *et al* (1996), cuando *Trichoderma harzianum* fue crecido en fibras de nylon tratadas con una lectina purificada a partir de *Sclerotium rolfsii*. En ese caso se observó que las hifas de *Trichoderma harzianum* se enrollaron sobre las fibras de nylon (formándose ganchos), tal y como sucede cuando *Trichoderma harzianum* encuentra las hifas del patógeno.

Una vez realizado el proceso de reconocimiento del hospedero, *Trichoderma* se adhiere a él y crece alrededor de sus hifas, formando cuerpos tipo apresorios que ayudan a la penetración de la pared celular del hospedero. Posterior a esto, *Trichoderma spp* comienza a degradar las paredes celulares de estos hongos, mediante la excreción de enzimas líticas como celulasas, quitinasas, proteasas, glucanasas y xilanasas (Goldman y Harman, 1994; Lorito *et al*, 1994; Chet, 1998; Viterbo *et al*, 2002).

Los mecanismos antagonistas de *Trichoderma spp*. sobre hongos fitopatógenos involucran el crecimiento de *Trichoderma* y la colonización del patógeno, por tanto, es de suma importancia el contar con un propágulo competente, es decir, que sea viable y capaz de realizar tanto la antibiosis, como la competencia y el micoparasitismo, eficientemente.

2.3 Propágulos producidos por *Trichoderma spp.* para su aplicación como agente de control biológico

Trichoderma spp. produce tres tipos de propágulos, los cuales pueden ser utilizados como agentes de control biológico: micelio, clamidosporas y conidios. A continuación se describen las características de cada uno de los propágulos.

2.3.1 Micelio

Las hifas son filamentos multinucleados, rodeados de una pared celular, que en su conjunto forman a lo que se conoce como micelio, el cual representa la forma vegetativa en hongos filamentosos (Moore-Landecker, 1996). El micelio de *Trichoderma spp.* ha sido evaluado como agente de control biológico.

Estudios reportados por Papavizas *et al* (1984), describen el establecimiento del micelio de *Trichoderma viride* y *T. harzianum* en el suelo. Los resultados indicaron que se incrementó la densidad de población de estos organismos en suelo a las 3 semanas de inoculación. Tal proliferación de la población se dio cuando el micelio estuvo en contacto íntimo del sustrato. Por otra parte, el incremento de la población de estos dos hongos dependió de la edad de cultivo. Por otro lado, no se observó un incremento de la población de estos hongos cuando se evaluó la adición de conidios al suelo.

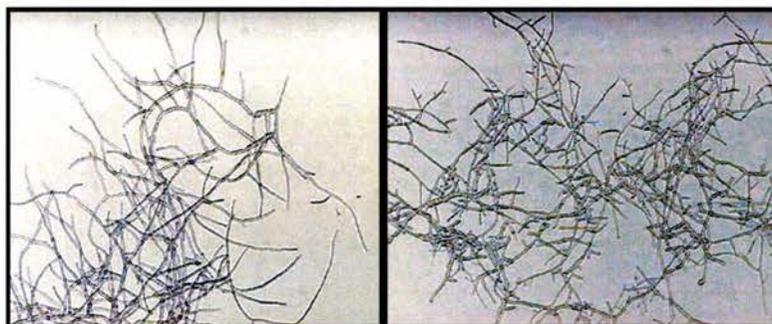


Figura 2.1. Micelio de *Trichoderma harzianum* cultivado en medio líquido

De forma similar, Lewis y Papavizas (1985) evaluaron el micelio de 14 cepas de *Trichoderma spp*, las cuales, redujeron en al menos un 50 % la población de *Rhizoctonia solani*. También se evaluaron preparaciones de conidios con éstas cepas. Sin embargo, estas no redujeron la supervivencia de *Rhizoctonia solani* o su crecimiento en el suelo.

2.3.2 Clamidosporas

Las clamidosporas son estructuras producidas asexualmente, con pared celular gruesa y que surgen de la modificación de segmentos de hifas y que usualmente tienen la habilidad de resistir condiciones ambientales adversas (Lewis and Papavizas, 1983).

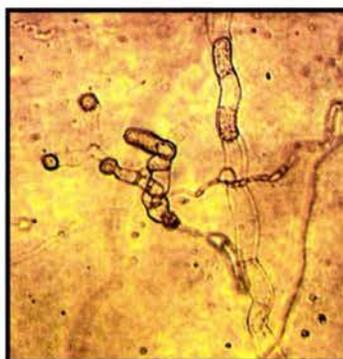


Figura 2.2. Clamidosporas de *Trichoderma harzianum*

Al respecto estos autores evaluaron 3 cepas (*Trichoderma viride*, *harzianum* y *hamatum*) para la producción de clamidosporas con un medio de cultivo a base de avena. Todas las especies evaluadas produjeron clamidosporas a concentraciones adecuadas (de 1 a 38×10^7 clamidosporas/g de soporte) después de 3 semanas de incubación, observado que las clamidosporas frescas germinaban adecuadamente (75 %); sin embargo, solo el 8 % de las clamidosporas sometidas a un proceso de secado presentaron germinación (Lewis and Papavizas, 1984).

2.3.3 Conidios

Los conidios son un tipo de esporas, que se producen asexualmente y que son la forma natural de resistencia y dispersión de los hongos. Se caracterizan por tener una pared celular gruesa, aunque no mayor que las clamidosporas, pero mayor que la de micelio. Tienen una forma ovoide, un bajo contenido de agua y son resistentes a condiciones ambientales adversas.

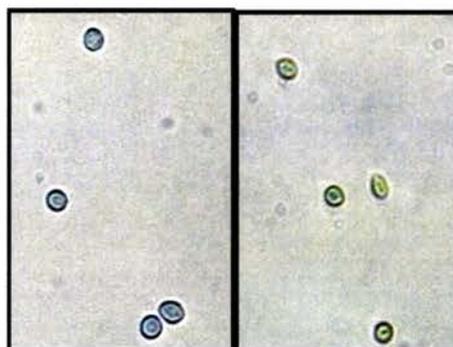


Figura 2.3. Conidios de *Trichoderma harzianum* producidos en medio líquido

Papavizas (1985) evaluó la adición de conidios de *Trichoderma hamatum*, *T. harzianum* y *T. viride* sobre semillas de chícharo y rábano infectadas con *Rhizoctonia solani* y *Pythium spp.* observando la disminución de la población de estos patógenos. Asimismo, la adición de conidios de *Trichoderma pseudokoningii* incrementaron los rendimientos en cultivos de soja infestados con *Rhizoctonia solani*.

Por otro lado, Tronsmo y Dennis, (1977), fueron capaces de proteger frutos de fresa en almacenamiento contra *Botrytis cinerea* y *Mucor mucedo* con suspensiones de conidios de *Trichoderma ciride* y *T. polysporum*, además de observar una temprana floración de estos cultivos. Los estudios realizados hasta el momento han mostrado que cualquier tipo de propágulo podría utilizarse como agente de control biológico, sin embargo, las características que debe tener un agente de control biológico eficaz repercuten enormemente en el potencial de dichos propágulos.

Dentro de éstos, la forma micelial ha tenido mayor éxito sobre las clamidosporas y los conidios, en relación a la supresión de enfermedades y en su establecimiento en el suelo. Además, se ha observado que el micelio y las clamidosporas son menos susceptibles a la fungistasis y a la presencia de nutrientes exógenos que aquellos mostrados por los conidios. Sin embargo, el micelio es una estructura muy sensible al proceso de secado, por lo que disminuye considerablemente su viabilidad y su vida de anaquel no es prolongada en comparación con las clamidosporas y los conidios cuando es sometido a este proceso. Lo anterior también se ha atribuido a su sensibilidad a procesos de filtrado y al molido del micelio (Papavizas *et al*, 1984). Por otro lado, se ha podido suprimir o disminuir la fungistasis sobre los conidios mediante la adición de nutrientes adecuados o productos químicos como fungicidas compatibles que puedan minimizar al patógeno o debilitarlo, permitiendo la germinación de los conidios, así como el crecimiento y el establecimiento de *Trichoderma spp* (Papavizas, 1985).

Las clamidosporas, por su parte, han mostrado una mayor capacidad de supervivencia por periodos de tiempo prolongados. Sin embargo, las clamidosporas que han sido formuladas y sometidas a secado, a pesar de ser viables, tienen un porcentaje de germinación muy bajo, menor al 10 %. Finalmente, los conidios son producidos más abundantemente que las clamidosporas, también son resistentes al proceso de recuperación y secado, y se ha reportado un porcentaje de germinación por arriba del 30 % (Jin *et al*, 1991; Agosin, *et al* 1997).

Tomando en cuenta las características con las que debe contar un agente de control biológico y de los propágulos producidos por *Trichoderma harzianum*, es evidente que los conidios ofrecen una alternativa interesante y presentan ventajas sobre las clamidosporas y el micelio, ya que son estructuras que se producen con mayor rapidez y en grandes cantidades, son resistentes al proceso de secado, tienen un porcentaje de germinación mucho mayor que las clamidosporas y una mayor vida de anaquel que el micelio. Por tanto, los conidios parecen

ofrecer la mejor opción para producir y aplicar a *Trichoderma harzianum* como agente de control biológico.

Finalmente, las características necesarias con las que debe contar un agente de control biológico a base de esporas para su uso efectivo son: 1) eficacia antagónica, 2) ser producido en grandes cantidades rápidamente ($>1 \times 10^7$ esporas/mL y en tiempos no mayores a 2 semanas), 3) ser resistente al proceso de secado ($>50\%$), 4) tener un alto nivel de germinación y propagación, y 5) conservar las cualidades de un lote a otro (Agosin y Aguilera, 1998).

2.4 Aspectos generales sobre la esporulación asexual en hongos filamentosos

El proceso de esporulación asexual es una forma muy común en hongos filamentosos y ha sido estudiado principalmente en *Aspergillus nidulans* y *Neurospora crassa* (Adams *et al*, 1998).

Este proceso comienza con el crecimiento del tallo del conidióforo -que se elonga por extensión apical- a partir de una ramificación aérea semejante al crecimiento de las hifas. Posteriormente, la punta del tallo comienza a hincharse, formando una estructura denominada vesícula. Posteriormente, se forma una capa de esterigma en la superficie de la vesícula, denominada métula. La métula, por su parte, brota dos veces produciendo una capa de esterigmas uninucleados denominados fiálides, que son producidos al final de la métula. La fiálide difiere de la métula, en que la fiálide permite el desarrollo de cadenas de esporas uninucleadas llamadas conidios (figura 2.1) (Adams *et al*, 1998).

En aspectos de la regulación genética de este fenómeno, se han identificado tres genes (*brlA*, *abaA* y *wetA*) en *Aspergillus nidulans* que han sido propuestos como la vía central de regulación genética del proceso de conidiación, tanto en la etapa de la formación del conidióforo como en la maduración de las esporas (Adams *et al*, 1998; Calvo *et al*, 2002).

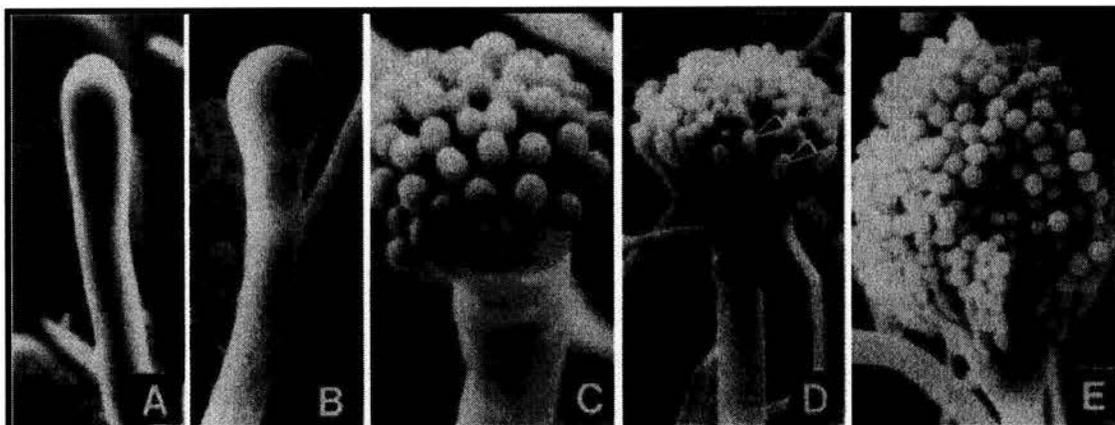


Figura 2.4. Micrografía de las etapas de conidiación en *Aspergillus nidulans*. (A) Tallo temprano del conidióforo. (B) Formación de la vesícula en la punta del tallo. (C) Desarrollo de la métula. (D) Desarrollo de las fiálides. (E) Conidióforo maduro con cadenas de conidios. Adaptado de Adams *et al*, 1998.

El gen *brlA* expresa dos reguladores transcripcionales en condiciones de limitación de glucosa y nitrógeno en cultivo sumergido, cuya función es mediar la transición del crecimiento del tallo del conidióforo a la formación de la vesícula y activar la expresión de *abaA*, entre otros genes específicos de ésta vía (Skromne *et al*, 1995; Adams *et al*, 1998). Por su parte, *abaA*, gene intermedio de esta vía, se expresa cuando la métula se forma y dirige la diferenciación de las fiálides, así como la activación de *wetA*, *brlA* y otros genes (Sewall *et al*, 1990; Han y Adams, 2001). Finalmente, *wetA* es responsable de la maduración de los conidios, mediante la síntesis de componentes cruciales de la pared celular que hacen impermeables a los conidios y que al mismo tiempo regula la expresión de otros genes específicos de esta vía (Marshall *et al*, 1991).

Por otro lado, se sabe que *Trichoderma spp.* tiene este tipo de mecanismo de esporulación en cultivo en medio sólido y líquido (Elad *et al*, 1993; Rocha-Ramírez *et al*, 2002). Sin embargo, poco se conoce acerca de la regulación de la expresión génica que pueda inducir la esporulación y también la formación del conidióforo y los conidios.

Dentro de los pocos estudios hechos con *Trichoderma* y que se han relacionado de alguna manera al proceso de esporulación podemos nombrar la identificación de un gen, *srh1*, el cual se expresa bajo condiciones de limitación de nutrientes tanto en cultivo sólido como líquido. El gene *srh1* codifica para una proteína cuya secuencia es similar a la familia de las hidrofobinas clase II, contribuyendo a la hidrofobicidad en la superficie de los conidios (Muñoz *et al*, 1997).

Por otra parte, se aisló un gen de *Trichoderma harzianum*, cuya secuencia mostraba similitud con genes que codifican para una fotoliasa clase I, tipo I, que era expresado rápidamente con pulsos de luz azul, induciendo la esporulación en micelio (Berrocal-Tito *et al*, 1999 y 2000).

Finalmente, se aisló un gen, *cmp1*, de *Trichoderma harzianum* que codifica para un péptido, el cual incrementa su expresión abundantemente durante la esporulación fotoinducida. La proteína para la que codifica dicho gen se localizó en la superficie celular y por su estructura modular, se sugiere que tiene una función en la interacción célula-célula (detección de la pared celular o en el anclamiento de la membrana plasmática a la pared en los conidios) (Puyesky *et al*, 1999).

2.5 Producción de esporas de hongos filamentosos en cultivo sólido

La producción de esporas de hongos filamentosos se ha llevado a cabo en medio de cultivo sólido y en medio de cultivo líquido. Existen diferencias importantes relacionadas con la fisiología y la estructura de las esporas entre éstas dos formas de producción.

La fermentación en medio de cultivo sólido permite tanto el crecimiento como la conidiación de hongos filamentosos (Papavizas *et al*, 1984). Además, es fácil de llevarla a cabo en el laboratorio y las esporas producidas tienden a ser más tolerantes a la desecación y más

estables como preparaciones secas (formulado) que las esporas producidas en sustrato líquido (Jackson, 1997b).

También se ha observado en *Trichoderma harzianum*, *Penicillium oxalicum* y *Verticillium lecanii*, que las esporas aéreas tienen una pared celular más gruesa, son más resistentes a los rayos UV, presentan una alta viabilidad, tienen una vida de anaquel prolongada, un citoplasma denso, diferente morfología y una hidrofobicidad mayor que las esporas producidas en medio líquido (Muñoz *et al*, 1995; Feng *et al*, 2000; Pascual *et al*, 2000). Por su parte, las esporas producidas en medio líquido tienen un tiempo de germinación más corto que las esporas provenientes del cultivo sólido. Esto a sido atribuido a una mayor capacidad de interacción con el ambiente externo, facilitando el consumo de nutrientes e interacción con el agua (Muñoz *et al*, 1995).

La principal ventaja que presenta el cultivo en sustrato sólido son los bajos costos de operación y productividades altas (Fernández *et al*, 1996). Sin embargo, este tipo de proceso presenta algunas desventajas para su producción a nivel comercial, ya que resulta difícil controlar parámetros muy importantes como la temperatura, humedad, pH, además de presentar problemas para la recuperación del producto y la esterilización por lo que el escalamiento del proceso resulta muy difícil pudiendo incrementar los costos de producción (Fernández *et al*, 1996; Jackson, 1997b; López-y-López *et al*, 2000).

2.6 Producción de esporas de hongos filamentosos en cultivo sumergido

Si el objetivo es la producción a nivel comercial de esporas de *Trichoderma harzianum* u otros agentes de control biológico a base de esporas, se deben considerar etapas que incluyan: a) la optimización del medio de cultivo, b) el proceso de formulación y secado, c) la experimentación a nivel planta piloto con el fin de determinar las variables del proceso que podrían limitar el proceso (transferencia de masa y energía), d) la selección de las técnicas de separación y criterios de escalamiento para mantener los rendimientos y cualidades obtenidas

a nivel de laboratorio, e) la integración de las operaciones unitarias dentro de un proceso único y f) su producción a nivel industrial (Agosin y Aguilera, 1998).

En base a lo anterior, se han llevado a cabo diversos estudios en cultivo sumergido sobre la producción de esporas de *Trichoderma harzianum* y otros hongos que pueden ser utilizados como agentes de control biológico. Tales como la optimización del medio de cultivo, el estudio de parámetros fisicoquímicos que afectan la esporulación y las características de las esporas producidas (ultraestructura y propiedades en su pared celular).

En el cultivo sumergido se puede mantener un ambiente nutricional homogéneo, además, es más fácil controlar parámetros como la temperatura, aireación y pH comparado con el cultivo en sustrato sólido. Así, con las condiciones nutricionales y ambientales controladas, aseguramos las cualidades del producto de interés obtenido (Jackson, 1997b).

2.6.1 Efectos nutricionales en la producción de esporas

La mayoría de los estudios sobre el proceso de esporulación en hongos filamentosos se han llevado a cabo con *Aspergillus niger*, como ya se había mencionado anteriormente. En fermentaciones en cultivo *batch* (en matraces agitados) utilizando un medio de cultivo con glucosa y nitrato como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente, la esporulación dio inicio una vez que fue consumida en su totalidad la glucosa (Griffin, 1994).

En estudios realizados con *Schizopillium commune* se encontró que la limitación de la fuente de nitrógeno (pero no su completo agotamiento) inició la diferenciación de este hongo, requiriendo aún de la fuente de carbono y nitrógeno (y de polisacáridos acumulados) para el crecimiento del primordio. Finalmente, la formación de cuerpos fructíferos, no requirió de ninguna fuente exógena más que de polisacáridos acumulados (Griffin, 1994).

Agosin *et al* (1997) evaluaron tres concentraciones iniciales de glucosa (2.7, 12 y 53 g/L) obteniendo relaciones C:N de 3, 14 y 60, respectivamente, en cultivos de *Trichoderma*

harzianum P1 llevados a cabo en matraces agitados. En los cultivos llevados a cabo usando una concentración de 2.7 g/L de glucosa (C:N=3), se observó su agotamiento rápidamente, disparando la esporulación, lo que hizo que se alcanzaran los mayores rendimientos y productividades (2×10^{10} conidios/g biomasa y 1×10^9 conidios/L.h, respectivamente). Por otra parte, los conidios producidos a una relación C:N de 14 (glucosa, 12 g/L), presentaron una vida de anaquel más prolongada que aquellos producidos en las condiciones restantes. Finalmente, estos autores, observaron que una alta concentración de glucosa (53 g/L) incrementaba la producción de biomasa, sin embargo; no se mejoraron los rendimientos en la producción de conidios.

Estudios realizados con *Colletotricum truncatum* demostraron que la composición del medio de cultivo influye en la producción, composición y atributos de los conidios producidos por este micoherbicida. Así, una vez que la glucosa y los aminoácidos se agotaron, se disparó la esporulación de *C. truncatum*. Por un lado, la más alta producción de conidios se alcanzó a una relación C:N de 30, mientras que, los conidios obtenidos a una relación C:N de 10 presentaron un alto contenido de proteína y un bajo contenido en lípidos. Además, éstos conidios presentaron un mayor porcentaje de germinación, formación de apresorios y una mayor eficacia en causar la enfermedad en *Sesbania exaltata* que los conidios obtenidos a una relación C/N de 30 y 80. Finalmente, estudios posteriores para optimizar el medio de cultivo sugirieron que a una relación C:N entre 15 y 20 podría ser la óptima ya que los rendimientos en la concentración de conidios fueron similares a los obtenidos a una relación C:N de 30 y en su contenido proteínico, germinación y formación de apresorios fueron comparables con aquellos obtenidos a una relación C:N de 10 (Jackson y Bothast, 1990; Jackson y Schisler, 1992).

Yu *et al* (1998) realizaron estudios con el hongo *Colletotricum coccode* bajo diferentes concentraciones de la fuente de carbono (5, 10 y 20 g/L) y relación C:N (5 a 40). Los autores observaron que los rendimientos en la producción de esporas disminuía al incrementar la

concentración de la fuente de carbono y la relación C:N. Por otro lado, la producción de esporas se incrementó cuando los cultivos se llevaron a cabo a una relación C:N de 7.5 y 10, independientemente de la concentración de la fuente de carbono.

Finalmente, estudios hechos con *Paecilomyces fumosoroseus* cultivado en un medio mineral complementado con vitaminas, mostraron que altas concentraciones de glucosa (80 g/L) y nitrógeno (13.2 g/L de casaminoácidos) favorecían la producción de concentraciones altas de blastoesporas (5.8×10^8 esp/mL). Por otra parte, a una concentración constante de casaminoácidos (13.2 g/L), a diferentes concentraciones de glucosa (10-80 g/L), mostraron que la producción de blastoesporas fue mayor a concentraciones de glucosa por arriba de 20 g/L. La producción de blastoesporas en estos cultivos inició antes de agotarse la glucosa y los aminoácidos. Una vez agotados los aminoácidos, se alcanzó la máxima esporulación (Jackson *et al*, 1997a).

Los estudios mencionados anteriormente han demostrado que la limitación de la fuente de carbono y de nitrógeno inducen la esporulación. Además, concentraciones elevadas de la fuente de carbono y relaciones C:N altas, no favorecen altas tasas de esporulación. Por otra parte, la relación C:N es un factor importante que determina la calidad de su vida de anaquel (medida ésta a través de la viabilidad), su eficacia antagónica, etc.

2.6.2 Efectos fisicoquímicos en la producción de esporas

También se han realizado estudios (que se describen más adelante) con el fin de incrementar la producción de esporas, esporulación y su resistencia al secado mediante la disminución de la actividad de agua en el medio de cultivo.

Pascual *et al* (1997) realizaron estudios con *Penicillium oxalicum* y reportaron un incremento significativo en la producción de esporas cuando se adicionando 400 g/L de PEG 6000 o CaCl_2 (40 mM) comparado con cultivo control.

Por otra parte, Harman *et al* (1991) modificaron un medio de cultivo a base de sacarosa y minerales adicionando Jugo V8 y PEG 8000 (para disminuir la actividad de agua) en el cultivo de *Trichoderma harzianum* ATCC 20847. Estos autores observaron que la concentración de conidios viables por gramo de biomasa se incrementaron alrededor de 10 veces (1×10^{11}) comparada con el cultivo control (1×10^{10}). Además, los conidios obtenidos bajo estas condiciones presentaron un porcentaje de germinación (después del secado) del 71 %, mientras que aquellos conidios obtenidos sin la adición de PEG 8000 solo presentaron un 12 % de germinación después del proceso de secado.

En estudios posteriores con *Trichoderma harzianum* ATCC 20847, mostraron que al adicionar PEG 200 al inicio o en las primeras 24 horas de cultivo a una concentración del 6% (v/v) se incrementó la densidad de conidios y la esporulación (1.07×10^{11} conidios/g de biomasa), comparada con el cultivo control. Además, la viabilidad de los conidios se incrementó hasta catorce veces más que a los que no se adicionó el PEG 200. (Sin, embargo, la adición de esta sustancia disminuyó hasta en un 39 % la biomasa (Jin *et al*, 1991).

Para fines prácticos, el PEG presenta algunas desventajas, sobre todo debido a que su alto peso molecular hace viscoso el medio de cultivo, disminuyendo la transferencia de oxígeno. Por otra parte, es muy costoso para un proceso industrial y contribuye a la disminución significativa de la concentración de la biomasa, lo que no es deseable ya que es a partir de ésta de donde se generan los conidióforos que a su vez darán paso a la formación de los conidios. Debido a esto, Jin *et al* (1996) evaluaron diferentes concentraciones de glicerol como una alternativa interesante (0, 3, 6, 9 y 12 % v/v). La mejor concentración resultó ser la de 9 %, con lo cual se duplicó la producción de conidios con respecto al cultivo control, además de incrementar la biomasa en un 24 %. Por otro lado, el porcentaje de germinación de los conidios obtenidos (con glicerol) fue del 67.3 %, mientras que sin la adición de éste, solo fue del 4%.

Estudios llevados a cabo con *Ulocladium atrum* mostraron que la producción de conidios se incrementó de 2×10^6 conidios/mL a 1.4×10^7 conidios/mL cuando se le adicionó glicerol. Por otra parte, la viabilidad después de 12 meses de almacenamiento fue dos veces mayor en aquellos conidios cultivados con glicerol (Frey y Magan, 2001).

Otros factores como la temperatura y el pH han sido evaluados para la producción de esporas en *Trichoderma harzianum* ATCC 20847, de tal forma que a una temperatura de 32°C, valor en el que se obtuvieron las mayores concentraciones de esporas aunado a la resistencia y germinación de éstas (Jin *et al*, 1996). El pH en el cual se favorece el crecimiento de *Trichoderma harzianum* P1 y ATCC 20847 se ha reportado a un valor de 4, mientras que a un pH en un rango entre 5.5 y 7, se favorece la esporulación (Agosin *et al*, 1997).

2.7 Estudios previos en el laboratorio

En estudios previos realizados por Flores (2002) 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) con el fin de incrementar la producción de biomasa micelial en cultivos de *Trichoderma harzianum* IMI206040. Dichos experimentos fueron llevados a cabo en un biorreactor de 14 litros a 200 rpm.

Los resultados mostraron que a un pH de 5.6 (sin la adición de extracto de levadura e independiente de la concentración de sulfato de amonio), el crecimiento micelial fue pobre. Además, se observó que los cultivos bajo estas condiciones presentaron esporulación evidente a partir de las 60 horas de cultivo (observada a microscopio y a que el cultivo presentó una coloración verde que es característica de este fenómeno).

En base a estos resultados, se llevó a cabo un estudio preliminar con el fin de determinar si el medio de cultivo utilizado en el grupo de trabajo era adecuado para inducir la

esporulación en cultivos de *Trichoderma harzianum*. Se estudiaron a dos niveles: la temperatura (29 y 32 °C) y la agitación (500 y 700 rpm), de tal forma que se evaluaron cuatro condiciones diferentes. Dichas variables (temperatura y agitación) han sido reportadas como determinantes de los niveles de esporulación en otras cepas de *Trichoderma harzianum* (Jin *et al*, 1996; Felse and Panda, 2000).

Los resultados del estudio anteriormente mencionado mostraron que la mayor producción de esporas se obtuvo a 500 rpm, para ambas temperaturas. Por otro lado, se observó que a 700 rpm se obtuvieron las más bajas concentraciones de esporas, así como una baja esporulación del hongo.

La temperatura jugó un papel importante, ya que a 32°C y 500 rpm, se obtuvo la mayor esporulación de *T. harzianum*, habiendo un efecto combinado de éstos dos parámetros. Caso contrario a 32°C y 700 rpm, donde posiblemente el estrés hidrodinámico extremo inhibieron en cierto grado la esporulación.

Finalmente, la fuente de carbono (glucosa) no fue agotada en su totalidad bajo todas las condiciones estudiadas, existiendo al menos 10 g/L de éste sustrato al finalizar la fermentación. Esto nos sugiere que podemos utilizar una menor concentración de este sustrato con el fin de limitar el cultivo y poder favorecer en mayor grado la esporulación.

Justificación

Los resultados anteriores del grupo de investigación y los reportados en otros trabajos (Agosin *et al*, 1997; Jin *et al*, 1996), nos permiten concluir que el tipo de nutrientes que contiene el medio de cultivo utilizado en el estudio favorecen la esporulación en *Trichoderma harzianum* IMI206040, ya que bajo todas las condiciones estudiadas se presentó la esporulación en un rango de 1.1×10^{10} a 8.8×10^{10} conidios/g biomasa. En consecuencia, se pueden evaluar parámetros tanto nutricionales como fisicoquímicos para establecer las condiciones adecuadas para la producción de conidios de *Trichoderma harzianum*.

Finalmente, es necesario realizar un estudio más detallado y profundo sobre el efecto que ejerce la temperatura, el estrés hidrodinámico sobre la producción de conidios, esporulación y crecimiento de *Trichoderma harzianum*, así como la agitación que se suministra en el sistema.

En este trabajo se llevó a cabo un estudio sobre factores nutricionales (concentración de la fuente de carbono, relación carbono-nitrógeno y adición de una fuente de nitrógeno compleja), ambientales (temperatura y actividad de agua) y de proceso (potencia volumétrica, manipulando la agitación del sistema) que puedan mejorar la producción y la viabilidad de los conidios obtenidos en cultivo sumergido de *Trichoderma harzianum*.

Capítulo III

Objetivos

General

Determinar el efecto del medio de cultivo y de parámetros de operación sobre la producción de conidios de *Trichoderma harzianum* en fermentación sumergida.

Particulares

- ◆ Evaluar el efecto de la concentración de la fuente de carbono (glucosa), relación C:N y temperatura en la producción de conidios de *Trichoderma harzianum*.

- ◆ Evaluar el efecto de la actividad de agua y del extracto de levadura en la producción de conidios de *Trichoderma harzianum*.

- ◆ Evaluar un proceso en dos etapas mediante el cambio de medio de cultivo y manipulado la agitación para incrementar la producción de conidios de *Trichoderma harzianum*

Capítulo IV

Materiales y Métodos

4.1 Materiales

4.1.1 Microorganismo

Se utilizó la cepa *Trichoderma harzianum* de la colección del *International Mycological Institute* (IMI 206040). La cepa fue preservada en tubos inclinados (*slants*), en medio de agar de papa y dextrosa (PDA; Bioxon), inoculándose aproximadamente 1 cm² del medio con la cepa preservada, a otro tubo inclinado con medio fresco. Una vez inoculado el medio, se incubó durante 96 horas a 29°C y finalmente fue conservado a 4°C durante un mes antes de realizar una nueva resiembra.

4.1.2 Preparación del inóculo y conteo de esporas

Para la preparación del inóculo se tomó aproximadamente 1 cm² del medio sólido con micelio (*slant*) y se colocó en cajas Petri con medio fresco (PDA). Posteriormente, se incubaron a 29°C durante 6 días. Una vez al día y durante 1 hora, las cajas Petri inoculadas fueron expuestas a la luz del día para inducir la esporulación. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las esporas se recuperaron adicionando 10 mL de solución Tween 80 al 0.05 % realizando un lavado. Finalmente, de la suspensión de esporas, se realizó el conteo de éstas en una cámara de Neubauer, utilizando el objetivo 10x de un microscopio compuesto (Nikon

Optiphot-2) y ajustando el volumen de la suspensión necesario para iniciar los cultivos con una concentración inicial de 1×10^5 conidios/mL

4.1.3 Medio de Cultivo

La composición del medio de cultivo estándar para la producción de conidios se muestra en la **Tabla 4.1**. A partir de este medio de cultivo se realizaron las modificaciones convenientes para llevar a cabo los diseños experimentales planteados para el estudio de los factores.

Tabla 4.1. Composición del medio de cultivo definido estándar para

Compuesto	Fórmula	Concentración (g/L)
Glucosa	$C_6H_{12}O_6$	30
Sulfato de amonio	$(NH_4)_2SO_4$	5.6
Fosfato de potasio monobásico	KH_2PO_4	7
Fosfato de sodio dibásico	Na_2HPO_4	2
Sulfato de magnesio heptahidratado	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.5
Cloruro de calcio dihidratado	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.0671
Cloruro férrico hexahidratado	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0.008
Sulfato de zinc heptahidratado	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.0001

cultivos de *Trichoderma harzianum*.

4.2 Cultivos en fermentador

Los cultivos se realizaron en biorreactores de 14 L (modelo Microferm, New Brunswick Scientific). El reactor fue equipado con 3 turbinas Rushton de 10.5 cm de diámetro ($D/T = 0.5$

) con un volumen de trabajo de 10 L. La tensión de oxígeno disuelto (TOD) fue monitoreada con un electrodo polarográfico de oxígeno esterilizable (Ingold, modelo A420) conectado a un amplificador de TOD. El monitoreo de pH del medio de cultivo se realizó mediante un electrodo esterilizable (Ingold, modelo 2300), conectado a un transmisor/controlador de pH. El pH fue controlado a un valor de 5.6 mediante la adición automática de una solución de NaOH al 2 N mediante una bomba peristáltica (Cole-Palmer, modelo 7014-20).

El control de espuma se realizó mediante la adición de antiespumante (Clerol y AF, Dow Corning, al 20 % P/V), mediante un sistema constituido por un sensor de nivel por conductividad conectado a una bomba peristáltica.

4.2.1 Condiciones de cultivo estándar

Las condiciones estándares a las cuales se llevaron a cabo los cultivos fueron: pH 5.6, 0.5 vvm de aireación inicial, que en su caso, se incrementó hasta 1 vvm cuando la TOD se encontraba por debajo del 10 % de saturación. Finalmente, se muestreó a lo largo de la fermentación cada 12 horas, con un total de 9 muestras por fermentación, para realizar las determinaciones analíticas de interés.

4.2.2 Determinación del suministro de potencia volumétrica inicial al sistema

El suministro de potencia inicial al sistema se determinó a partir de una curva de potencia (**figura 4.1**). La medición de la potencia fue llevada a cabo en línea a través de un torquímetro de celda de carga Himmelstein modelo 66032 y controlado -a través de cambios de velocidad de agitación- con un motor de corriente directa acoplado a un tacómetro para un sistema geoméricamente similar al utilizado en éste trabajo (3 impulsores Rushton, $D/T = \frac{1}{2}$, aireación = 1 vvm)(Rocha J.A., información personal).

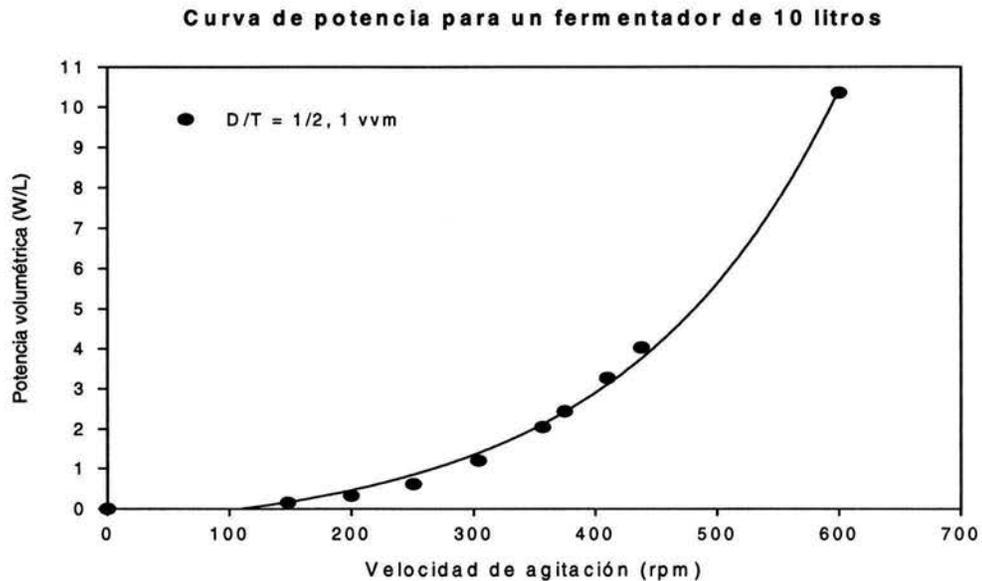


Figura 4.1. Curva de potencia volumétrica para un sistema de fermentación con capacidad de 10 litros de volumen de trabajo.

4.3 Métodos Analíticos

4.3.1 Estimación de la biomasa

La evaluación del crecimiento de biomasa micelial fue llevada a cabo mediante la determinación gravimétrica de ésta. Una vez tomada la muestra, se pesaron 10 gramos del caldo de cultivo conteniendo micelio, esporas y medio de cultivo. Posteriormente, se procedió a filtrar la muestra al vacío en papel Whatman (No. 1), el cual fue llevado previamente a peso constante en un horno (Hoffman-Pinther&Bosworth, modelo HA223) durante 24 horas a una temperatura de 85°C. Durante el proceso de filtración se adicionó agua destilada para lavar las células. Una vez finalizado el proceso de filtración, la muestra (micelio) contenida en el papel filtro fue secada en un horno durante 24 horas a una temperatura de 85°C. Transcurrido

éste tiempo, la muestra fue transferida a un desecador con sílica gel por un periodo aproximado de 2 horas, tiempo en el cual las muestras alcanzaban la temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se pesaron en una balanza analítica (Ohaus GA110). La concentración final de biomasa se obtuvo mediante la ecuación 4.1 considerando una densidad (ρ) de 1000 g/L.

$$X\left(\frac{g}{L}\right) = \frac{\text{Peso seco}_{\text{membrana+micelio}} - \text{Peso seco}_{\text{membrana}}}{\text{Peso muestra}} \times \rho \quad [4.1]$$

4.3.2 Cuantificación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) y viabilidad

La cuantificación de las UFC se realizó a partir de los conidios cosechados a lo largo de la fermentación como a continuación se describe:

1.- Se tomó una muestra del caldo de cultivo, el cual fue filtrado a través una malla de acero inoxidable No. 100 (en condiciones estériles), con el fin de eliminar completamente el micelio.

2.- Una vez filtrada la muestra se procedió a realizar las diluciones en tubos de vidrio 13x150 mm correspondientes (10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7}), en una solución de Tween 80 al 0.05 %.

3.- Se tomaron 100 μ L de las diluciones y se colocaron en cajas Petri con medio PDA. Se homogenizó la muestra con perlas de vidrio sobre toda el área de la caja con el medio.

4.- Una vez inoculadas las cajas Petri, se incubaron durante 48 horas a 29°C, posteriormente se cuantificó el número de colonias formadas. La cuantificación de las UFC se realizó por triplicado (ecuación 4.2).

$$X\left(\frac{UFC}{mL}\right) = \frac{\text{conidios germinados}}{\text{Dilución} \times \text{volumen muestra (mL)}} \quad [4.2]$$

La viabilidad fue cuantificada mediante el cociente entre la concentración de las UFC y la concentración de conidios cuantificados en la cámara de Neubauer, multiplicado por cien (Ecuación 4.3).

$$Viabilidad (\%) = \frac{\frac{UFC}{mL}}{\frac{conidios}{mL}} \times (100) \quad [4.3]$$

4.3.3 Determinación de glucosa residual

La cuantificación de glucosa se llevó a cabo mediante un analizador YSI, cuyo método se basa en la oxidación de la glucosa, mediante la enzima glucosa-oxidasa, la cual se encuentra inmovilizada en una membrana en el sensor y cuyo producto de reacción (H_2O_2), es cuantificado y es proporcional a la concentración de glucosa.

Para la lectura de las muestras, fue necesario realizar una dilución 1:1 para aquellas que rebasaran una concentración de 25 g/L de glucosa. Además, fueron filtradas previamente para eliminar residuos sólidos.

4.3.4 Determinación de NH_4 residual

La técnica para la cuantificación de amonio se basa en el método del indofenol propuesto por Kaplan (1965), donde el amonio reacciona con el hipoclorito de sodio, formándose cloramina. Posteriormente, la cloramina reacciona con el fenol para formar el cromógeno p-hidroxifenil imino benzoquinona, el cual es cuantificado colorimétricamente a 635 nm.

Para el análisis de las muestras fue necesario filtrarlas con el fin de eliminar las partículas sólidas. El procedimiento es el siguiente:

- Se prepararon dos soluciones con agua desionizada: una solución A (fenol 0.106 M y nitroferriicianuro de sodio 0.17 mM) y una solución B (hidróxido de sodio 0.125 N e hipoclorito de sodio 11 mM)
- Se preparan estándares a concentraciones de 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 mM de sulfato de amonio a partir de una solución patrón (6 mM).
- Se adiciona 1 mL de la solución A en un tubo con rosca y se colocan 25 μ L de la muestra problema (estándares o caldo de fermentación filtrado). Posteriormente se tapa y se agita en un vórtex. Finalmente se adiciona 1 mL de solución B, se tapa y se agita nuevamente.
- El tiempo de reacción de la mezcla es de 30 minutos, una vez transcurrido este tiempo, las muestras se leen en un espectrofotómetro a 635 nm. La solución utilizada como blanco para ajustar la absorbancia a cero consta de 1 mL de la solución A, 25 μ L de agua desionizada y 1 mL de la solución B.
- Una vez realizadas las lecturas de absorbancia de los estándares, éstos datos se grafican contra la concentración de los estándares y se construye la curva de calibración mediante el ajuste de estos puntos por el método de mínimos cuadrados. Con ello se obtiene la pendiente y la ordenada de origen, con lo que se calculan las concentraciones de amonio de las muestras problema.

4.3.5 Determinación de la actividad de agua (A_w) en los cultivos

La determinación se realizó con un medidor de actividad de agua marca Novasina AW SPRINT, de la siguiente forma:

- Se enciende el aparato y se fija la temperatura de la cámara a la cual será medida la muestra (caldo de cultivo). Esto se realiza con el preselector de temperatura de acuerdo con el panel frontal del equipo. Dejar estabilizar el equipo.

- Colocar aproximadamente 10 mL de la sustancia problema en una charola de la muestra e introducirla a la cámara de medición. Finalmente, cerrar perfectamente la cámara.
- Para dar inicio a la medición de la muestra se oprime el botón *start* unos segundos hasta que la luz *analyzing* encienda.
- La lectura de la muestra finaliza cuando el equipo se estabiliza desplegando la palabra *Stable* en la pantalla, además de dar señal de alarma y la luz *ok* se encienda.
- Una vez finalizado, se oprime el botón *stop*, se abre la cámara de medición y se remueve la charola con la muestra. Finalmente se seca la cámara y el sensor para dar lectura a una segunda muestra.

Es importante verificar la calibración del equipo antes de comenzar con la medición de las muestras, para tal efecto, se utilizan soluciones estándar que acompañan el equipo, haciendo la determinación de ellos a 25°C.

4.4 Diseños experimentales para el estudio del medio de cultivo y parámetros de proceso en la producción de conidios de *Trichoderma harzianum*

En la figura 4.2 se muestra un esquema general de las etapas que se desarrollaron en este trabajo. Las respuestas evaluadas en las diferentes etapas fueron la esporulación (conidios/g biomasa), producción de conidios (conidios/mL), la viabilidad, la biomasa (g/L) y la productividad (conidios/L.h). La primera etapa involucró el estudio de tres factores: la concentración de glucosa, la relación C:N y la temperatura. De los experimentos llevados a cabo en la primera etapa, se eligió una condición que fue tomada como base para desarrollar la segunda etapa, la cual involucró el estudio de la adición de extracto de levadura y la actividad de agua. Finalmente, la tercera etapa involucró el estudio de la agitación (potencia volumétrica inicial) y el cambio del medio de cultivo.

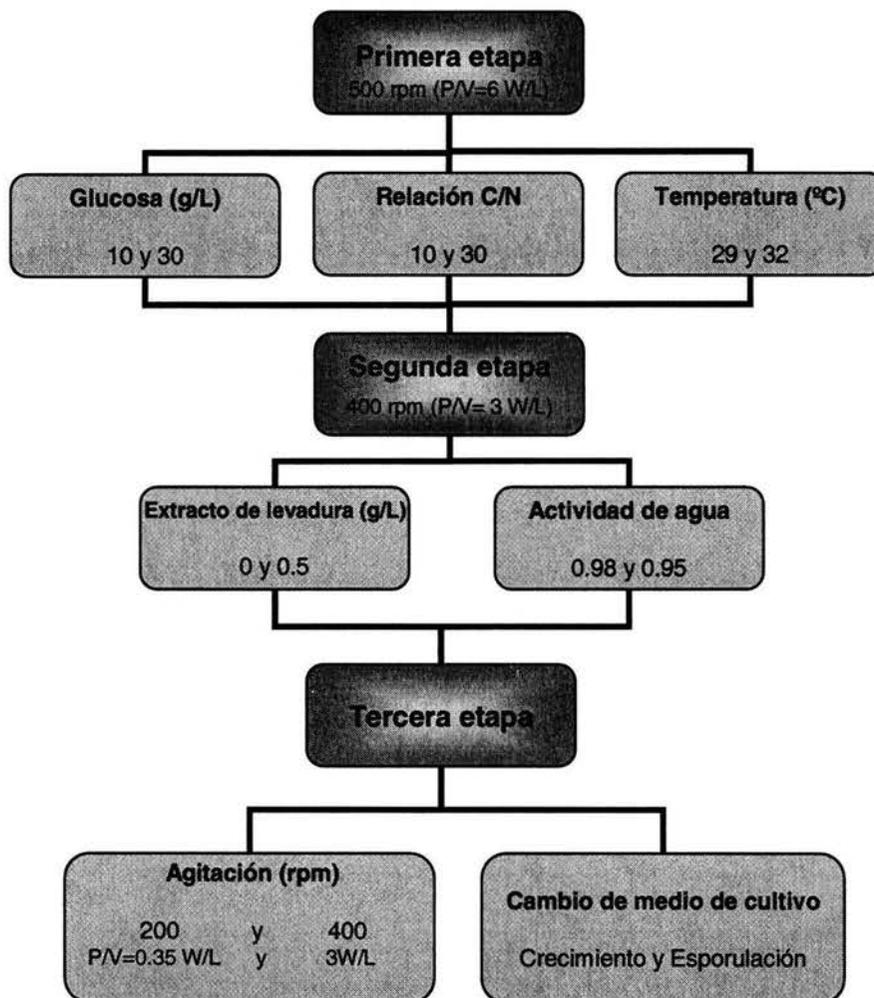


Figura 4.2. Estrategia experimental para la producción de conidios de *Trichoderma harzianum*.

4.4.1 Evaluación de la concentración de la fuente de carbono, relación C:N y temperatura

Se planteó un diseño factorial 2^3 , donde se evaluaron: a) el efecto de la concentración de carbono (glucosa, 10 y 30 g/L), b) relación carbono-nitrógeno (C/N, 10 y 30) y c) la

temperatura (29 y 32 °C). Todos los experimentos fueron llevados a cabo a 500 rpm (6 W/L) por duplicado. El diseño factorial se presenta en la figura 4.3.

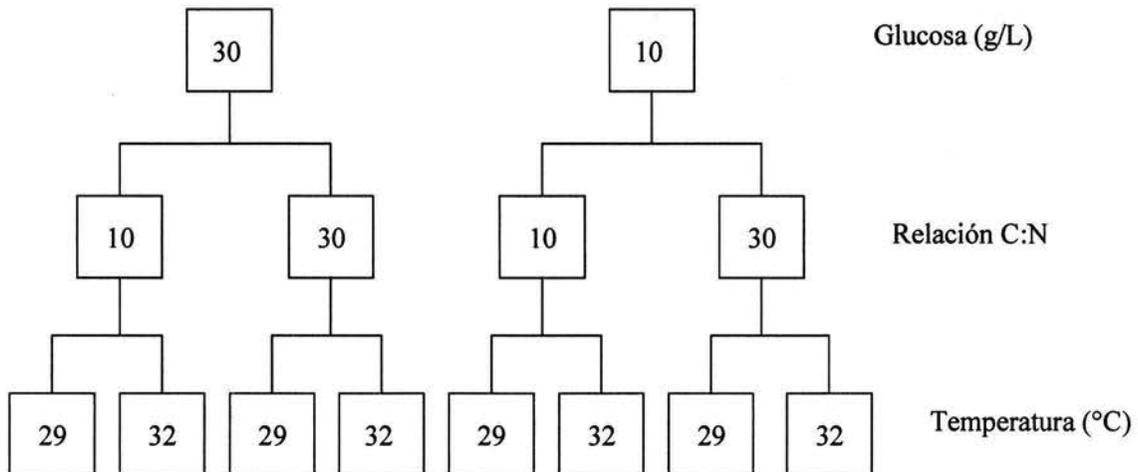


Figura 4.3 Diseño experimental para evaluar la concentración de glucosa, la relación C:N y la temperatura sobre la esporulación y la producción de conidios de *Trichoderma harzianum*.

4.4.2 Evaluación de la adición de extracto de levadura (EL) y de la actividad de agua (a_w)

Se planteó un diseño factorial 2^2 , donde se evaluaron el efecto de la adición de extracto de levadura (EL; 0 y 0.5 g/L) y la actividad de agua (mediante la adición de glicerol, 0 y 9% v/v). Para tal efecto se tomó como condición base aquella en la cual se obtuvieron los mejores resultados de la parte evaluada en el diseño factorial 2^3 descrita en la sección 4.4.1. Todos los experimentos fueron llevados a cabo a 400 rpm (6 W/L) debido a limitaciones del equipo de fermentación (motor que suministra la agitación), por lo cual se decidió disminuir la agitación, dichos experimentos se realizaron por duplicado. El diseño factorial se presenta en la figura 4.4.

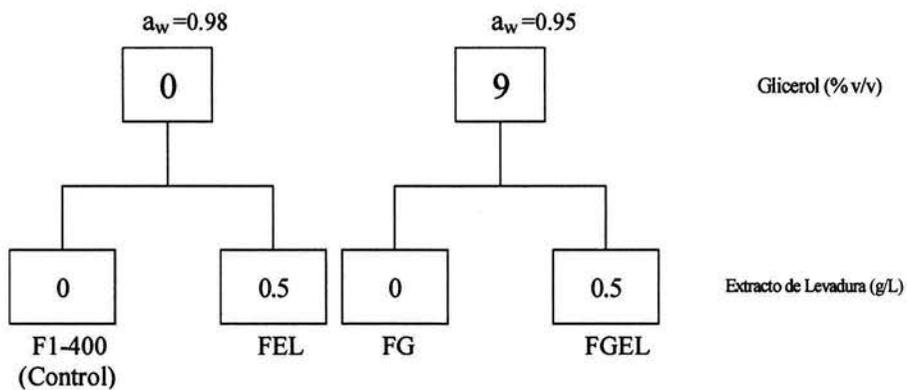


Figura 4.4. Diseño experimental para evaluar el efecto de la adición de extracto de levadura y la actividad de agua (mediante la adición de glicerol al 9 % v/v) sobre la esporulación y la producción de conidios de *Trichoderma harzianum*.

4.4.3 Estudio en dos etapas (crecimiento micelial-esporulación)

Finalmente, con los resultados obtenidos en los diseños experimentales 2^3 y 2^2 y con el fin de incrementar la biomasa micelial e inducir la esporulación, se diseñaron 3 experimentos en los cuales se evaluó el efecto de la potencia volumétrica suministrada al sistema (manipulando la agitación) y el cambio de medio de cultivo. Ésta última etapa involucró, en primera instancia, el crecimiento del micelio hasta una concentración de 5 g/L a las 36 horas de cultivo a 200 rpm (0.35 W/L). El caldo de cultivo fue centrifugado en una ultracentrífuga (Beckman modelo J2-21) a 10000 x g durante 10 minutos. Posteriormente, el sobrenadante fue eliminado por decantación. El micelio recuperado se inoculó a un nuevo reactor con el medio de cultivo equivalente a la fermentación F1-400 (que equivale a la condición "Control" de la segunda etapa, figura 4.2) para inducir esporulación a dos diferentes agitaciones (200 y 400 rpm), que corresponden a una potencia volumétrica inicial de 0.35 y 3 W/L, respectivamente. Finalmente, se llevó a cabo una última condición por duplicado en la cual no se realizó el cambio de medio, sino que únicamente se incrementó la agitación a 400 rpm (3 W/L) por

duplicado. La estrategia general se muestra en la figura 4.5 (y se le asignan claves para su posterior identificación).

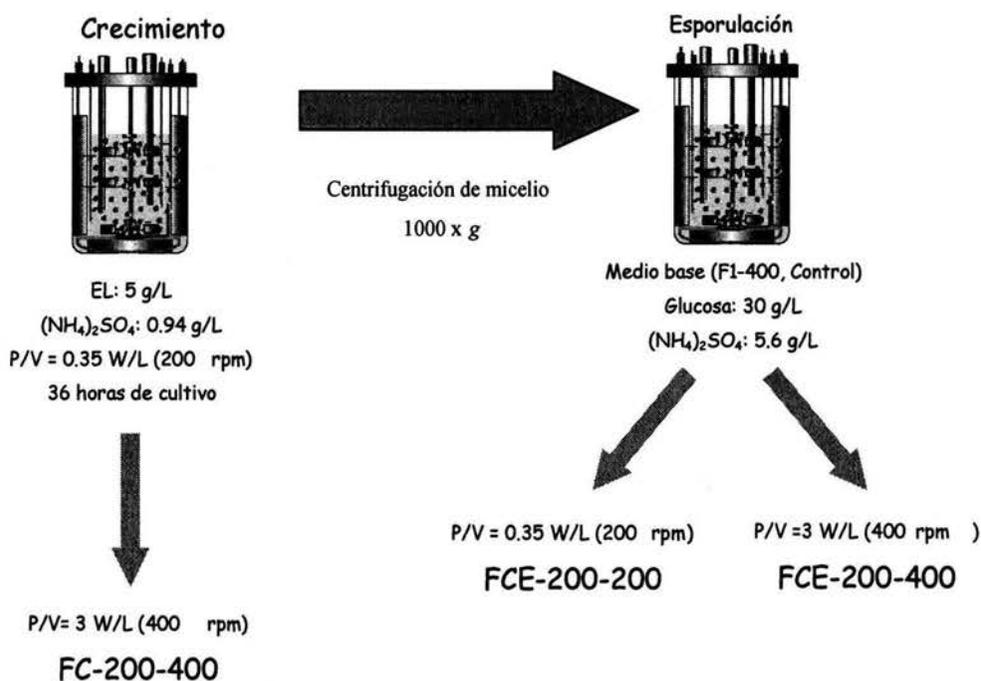


Figura 4.5. Diseño experimental en 2 etapas (crecimiento-esporulación), para evaluar el efecto del cambio de medio de cultivo y la potencia volumétrica sobre la esporulación y la producción de conidios de *Trichoderma harzianum*.

4.5 Análisis estadístico

En el análisis estadístico se evaluaron las siguientes respuestas: la producción máxima de conidios (conidios/mL), esporulación máxima (conidios/g biomasa), biomasa máxima (g/L),

productividad volumétrica máxima (conidios/L.h) y productividad. Para tal efecto, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de los factores evaluados para las respuestas mencionadas anteriormente, con el fin de establecer si existieron efectos significativos de los factores estudiados.

El análisis de varianza fue aplicado a los resultados obtenidos en cada diseño factorial propuesto en este trabajo. Un diseño factorial es una estrategia experimental que nos permite evaluar parámetros o variables de un experimento a diferentes niveles que nos pueden indicar tendencias del efecto de parámetros evaluados con el fin de establecer si existe un cambio en la(s) respuesta(s) de interés (Box et al, 1988). Por otro lado, el análisis de varianza aplicado a un diseño factorial nos permite establecer si el cambio en la respuesta evaluada es significativa, basándose en el análisis de la prueba t y prueba F (Zar, 1999). Finalmente, el análisis de varianza de los diseños factoriales fue llevado a cabo con el *software* Design Expert, versión 5.0.

En el **Anexo 1** se muestra un ejemplo de un ANOVA con la tabla de resultados, así como la definición de cada uno de los términos que contiene dicha tabla.

Capítulo V

Resultados y Discusión

Los resultados del presente trabajo se mostrarán de acuerdo a las tres etapas en las cuales se desarrolló el proyecto. La primera etapa consistió en el estudio de la concentración de la fuente de carbono (glucosa), la relación carbono-nitrógeno y la temperatura. En una segunda etapa se llevó a cabo el estudio del efecto de la actividad de agua (mediante la adición de glicerol) y la adición de extracto de levadura. Finalmente, en la tercera etapa se estudió el efecto del cambio del micelio de un medio de cultivo rico en nutrientes (que promovía el crecimiento) a otro medio de cultivo definido (que promovía la esporulación) y el efecto de la agitación suministrada al sistema.

5.1 PRIMERA ETAPA

5.1.1 Análisis de varianza del efecto de la concentración de glucosa, la relación C:N y la temperatura en la producción de conidios de *Trichoderma harzianum*

5.1.1.1 Producción máxima de conidios

El análisis de varianza (tabla 5.1) mostró que bajo las condiciones evaluadas, la concentración de la fuente de glucosa y la relación carbono nitrógeno no tuvieron un efecto significativo en la producción de conidios (conidios/mL) de *Trichoderma harzianum*. Sin embargo, la temperatura sí tuvo un efecto significativo en este parámetro. La tabla 5.1 muestra el análisis de varianza donde se consigna el valor de probabilidad de F (0.0565), que

indica que se puede rechazar la hipótesis nula (la diferencia observada debido a los tratamientos sea igual a la diferencia observada por el error experimental). Con una confiabilidad del 94.35%, es posible afirmar que existe un efecto significativo de la temperatura en la producción de conidios. Asimismo, el valor de probabilidad t (0.0565), confirma lo anterior. Finalmente, el signo negativo del coeficiente estimado del factor indica que la temperatura debe disminuirse para incrementar la respuesta estudiada (conidios/ mL), lo cual es válido únicamente para el rango evaluado.

Tabla 5.1. Análisis de varianza en la producción de conidios de *Trichoderma harzianum* (diseño factorial 2^3)

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de F	Probabilidad de F
Modelo	37.76	1	37.76	4.32	0.0565
Residuos	122.36	14	8.74		

Factor	Coficiente estimado	Grados de libertad	Error estándar	t para Ho Coef.=0	Probabilidad de t
Media general	7.56	1	0.74		
Temperatura	-1.54	1	0.74	-2.08	0.0565

Ecuación final en términos de los factores actuales:

$$\text{Conidios} = + 7.56 - 1.54 * \text{Temperatura}$$

5.1.1.2 Esporulación máxima

La tabla 5.2 muestra el análisis de varianza para la respuesta de la función objetivo relacionada con la esporulación máxima (conidios/g biomasa). En un principio y de acuerdo al análisis pareciera que los factores que presentaron efecto en la esporulación fue la temperatura, la relación C:N, la concentración de glucosa y la interacción de estos dos últimos factores en función del valor de probabilidad F obtenido (0.0351. Sin embargo, la

importancia relativa de los efectos por parte de las variables evaluadas puede ser establecida a través del coeficiente estimado de los factores y por el valor de probabilidad t. De tal forma que, aquellas variables cuyo valor absoluto es mucho mayor que cero, tendrán mayor influencia en la respuesta evaluada. En este caso, el coeficiente estimado para los factores de glucosa, relación C:N y la interacción de estos dos, es de 2.5 a 3.5 veces menor que el de la temperatura y, el valor de probabilidad de t para estos mismos es muy alto, por tanto, la probabilidad de que estos factores hayan tenido un efecto significativo (de manera individual o interactuando) se considera nula, siendo la temperatura el único factor que tiene un efecto significativo debido a su coeficiente estimado (-1.73) y su valor de probabilidad de t (0.0067).

Tabla 5.2. Análisis de varianza en la esporulación de *Trichoderma harzianum* (diseño factorial 2³)

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de F	Probabilidad de F
Modelo	66.07	4	16.52	3.81	0.0351
Residuos	47.65	11	4.33		

Factor	Coficiente estimado	Grados de libertad	Error estándar	t para Ho Coef.=0	Probabilidad de t
Media general	5.94	1	0.52		
Glucosa	0.66	1	0.52	1.26	0.2337
Relación C:N	0.67	1	0.52	1.29	0.2247
Temperatura	-1.73	1	0.52	-3.33	0.0067
Glucosa- C:N	-0.49	1	0.52	-0.95	0.3636

Ecuación final en términos de los factores actuales:

$$\begin{aligned}
 \text{Esporulación} = & + 5.94 \\
 & + 0.66 \cdot \text{Glucosa} + 0.67 \cdot \text{C:N} \\
 & - 1.73 \cdot \text{Temperatura} \\
 & - 0.49 \cdot \text{Glucosa} \cdot \text{C:N}
 \end{aligned}$$

5.1.1.3 Biomasa máxima

Los factores evaluados para ésta respuesta no tuvieron ningún efecto sobre la producción de biomasa (tabla 5.3) ya que, en el análisis de varianza, el valor de probabilidad de F obtenido es muy alto (0.6565), lo cual indica que la probabilidad de que el efecto sea debido a los factores estudiados es de solo el 34.35 %. Por tanto, la hipótesis nula se toma como verdadera (la diferencia en la respuesta evaluada debida a los factores es igual a la del error experimental).

Tabla 5.3. Análisis de varianza en la producción de biomasa de *Trichoderma harzianum* (diseño factorial 2³)

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de F	Probabilidad de F
Modelo	0.056	1	0.056	0.21	0.6565
Residuos	3.82	14	0.27		

5.1.1.4 Productividad máxima

La productividad (conidios/L.h) del proceso fue afectada únicamente por la temperatura. El análisis estadístico mostró que, de acuerdo a los valores de probabilidad de F y t (0.0381), la temperatura ejerce un efecto significativo en la respuesta estudiada. Así, podemos afirmar con una confiabilidad del 96.19 % que dichas diferencias se deban a éste factor (tabla 5.4). Al igual que en la producción de conidios la temperatura debe disminuirse para incrementar ésta respuesta.

Tabla 5.4. Análisis de varianza en la productividad de conidios de *Trichoderma harzianum* diseño (factorial 2³)

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de F	Probabilidad de F
Modelo	52.85	1	52.85	5.24	0.0381
Residuos	141.17	14	10.08		

Factor	Coficiente estimado	Grados de libertad	Error estándar	t para Ho Coef.=0	Probabilidad de t
Media general	8.58	1	0.79		
Temperatura	-1.82	1	0.79	-2.29	0.0381

Ecuación final en términos de los factores actuales:

$$\text{Productividad} = + 8.58 - 1.82 * \text{Temperatura}$$

El análisis de varianza mostró que el factor de mayor importancia (y que ejerció un efecto significativo) en todas las respuestas evaluadas -a excepción de la biomasa-, fue una temperatura de 29 °C. Por su parte, la concentración de la fuente de carbono (glucosa) y la relación C:N, no tuvieron ningún efecto significativo sobre las respuestas evaluadas.

5.1.2 Cinética de crecimiento y consumo de sustratos de *Trichoderma harzianum*

La caracterización cinética de cada una de las condiciones se llevó a cabo hasta un tiempo de 120 horas de cultivo. Los parámetros cuantificados en cada cinética fueron la biomasa, el consumo de sustratos (glucosa y sulfato de amonio), la producción total de conidios (conidios/mL), la esporulación (conidios/g biomasa) y la viabilidad de los conidios.

La cinética de crecimiento y consumo de sustratos se muestra en las figuras 5.1 y 5.2. Todos los cultivos bajo estas condiciones presentaron un período aproximado de 24 horas para la germinación de las esporas viables inoculadas en el medio de cultivo (figura 5.1A y 5.2A). Como se mostró en el análisis de varianza, ningún factor evaluado tuvo un efecto significativo

en la producción de biomasa, de tal forma que el crecimiento en todas las condiciones evaluadas no fue mayor a 2 g/L de biomasa, a pesar de que no hubo limitación de la fuente de carbono y de nitrógeno.

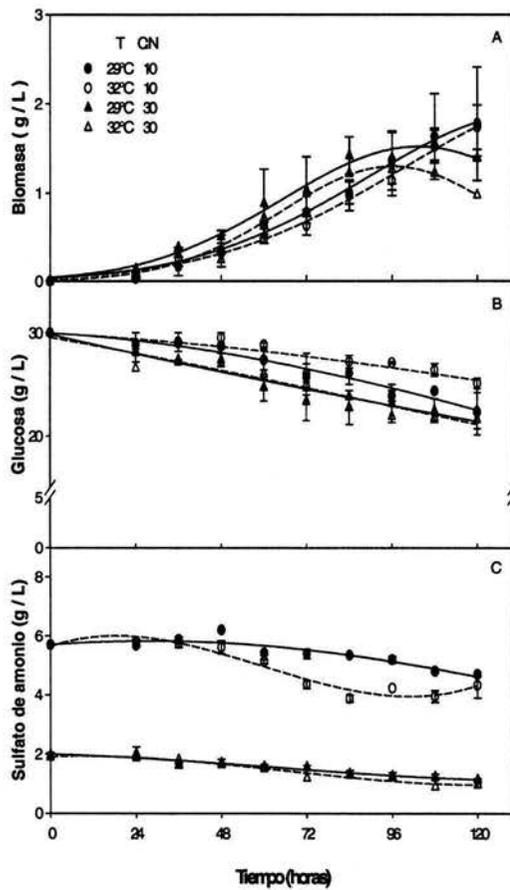


Figura 5.1. Perfil cinético del crecimiento, consumo de glucosa y sulfato de amonio en cultivos de *Trichoderma harzianum* a 30 g/L de glucosa.

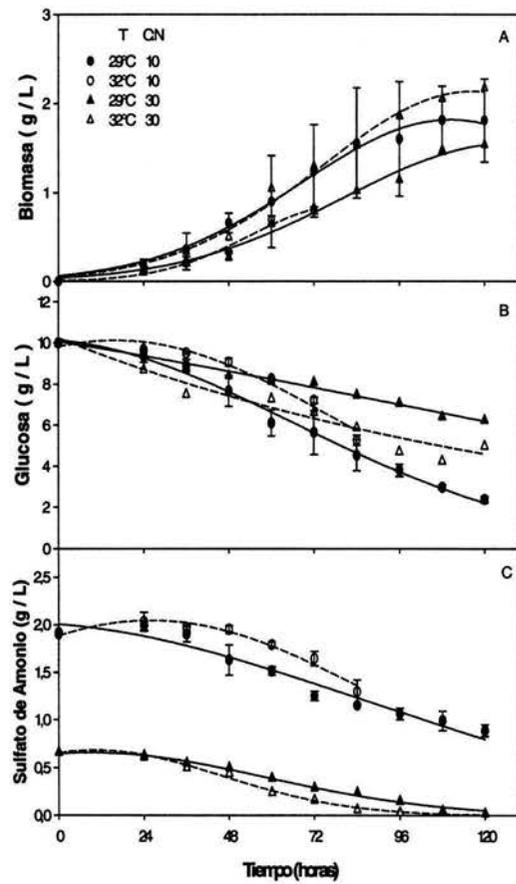


Figura 5.2. Perfil cinético del crecimiento, consumo de glucosa y sulfato de amonio en cultivos de *Trichoderma harzianum* a 10 g/L de glucosa.

Estudios realizados por Flores (2002), con el fin de incrementar la biomasa micelial de *Trichoderma harzianum* IMI206040 a una agitación de 200 rpm (potencia volumétrica de 0.35 W/L), mostraron un crecimiento menor a 2 g/L, presentándose esporulación a las 60 horas de cultivo, dichos resultados son comparables con los que se obtuvieron en esta primera etapa ya que los componentes del medio de cultivo utilizado en ambos trabajos fueron los mismos. Por otra parte, estudios previos llevados a cabo con *Trichoderma harzianum* ATCC20847 (Harman *et al*, 1991) con un medio de cultivo cuya composición fue muy similar a la utilizada en este trabajo, pero utilizando sacarosa como fuente de carbono y minerales, también obtuvieron una biomasa menor a 0.5 g/L. Esto podría explicarse ya que algunas especies de hongos requieren de vitaminas y cofactores de crecimiento exógenos que promueven un mejor crecimiento (Moore-Landecker, 1996).

En la caracterización del consumo de glucosa se encontró que este nutriente no fue agotado en su totalidad bajo todas las condiciones estudiadas (figura 5.1B y 5.2B). Por su parte, el sulfato de amonio tampoco fue agotado, a excepción del experimento en que se usó 10 g/L de glucosa, una relación C:N de 30 (a las 96 horas de cultivo). A pesar de esto, no hubo un efecto en el crecimiento del cultivo (figura 5.1A y 5.2A).

Con estos resultados podemos concluir que los factores estudiados no tuvieron un efecto significativo en el crecimiento de *Trichoderma harzianum*, presentando un crecimiento pobre. Por otro lado, en los cultivos evaluados no se encontraron en condiciones de limitación de la fuente de carbono y de nitrógeno. A pesar de esto, todas las condiciones evaluadas presentaron esporulación, lo cual nos hace inferir que pudo existir una limitación debido a otro nutriente (micronutriente, vitaminas, cofactores de crecimiento, etc.), que pudo haber iniciado la esporulación o posiblemente al estrés hidrodinámico ejercido sobre el hongo.

5.1.2.1 Efecto de la temperatura

Con lo que respecta a la producción de conidios y la esporulación, todas las condiciones estudiadas (durante las primeras 24 horas de cultivo) presentaron una disminución en la concentración de conidios con respecto a aquellos del inóculo (1×10^5 conidios/mL). Tal comportamiento podría atribuirse a la germinación de los conidios del inóculo (posterior al crecimiento micelial e inicio de la esporulación) adquiriendo una tonalidad color verde que ha sido atribuida a la síntesis de melanina por parte de las esporas (Agosin *et al*, 1997). Después de éste período se observó un incremento de casi tres órdenes de magnitud en la concentración de conidios entre las 36 y 60 horas de cultivo (figura 5.3 y 5.4).

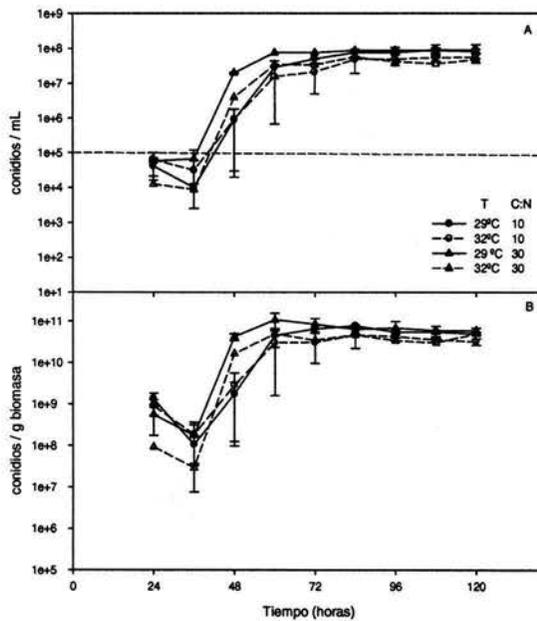


Figura 5.3. Perfil cinético de la producción de conidios y esporulación en cultivos de *Trichoderma harzianum* a 30 g/L de glucosa

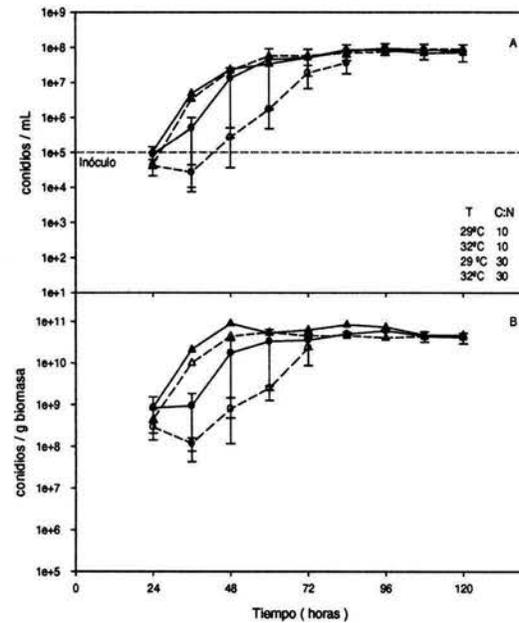


Figura 5.4. Perfil cinético de la producción de conidios y esporulación en cultivos de *Trichoderma harzianum* a 10 g/L de glucosa

En los experimentos evaluados en esta primera etapa, la esporulación se inició entre las 36 y 48 horas de cultivo, mientras que en los cultivos de Flores (2002), fue hasta las 60 horas. Ésta diferencia en el tiempo de esporulación puede ser atribuida a la diferencia en la agitación suministrada al sistema, ya que fueron las mismas condiciones de operación y los componentes del medio de cultivo también fueron los mismos. Esto podría explicarse desde el punto de vista que el micelio a 500 rpm se encontró con un estrés hidrodinámico mayor que aquellos a 200 rpm, por lo cual se promovió una esporulación más temprana en los cultivos. Este punto se discutirá con mayor detalle con los resultados de la tercera etapa de este trabajo.

El análisis de varianza mostró que la temperatura tuvo un efecto significativo en la concentración máxima de conidios (conidios/ mL), en la esporulación (conidios/g biomasa) y en la productividad (conidios/L.h). De tal forma que a una temperatura de 29 °C se favorece una mayor producción de conidios y una mayor esporulación (40% y 80 % mayor, respectivamente) independientemente de la concentración inicial de glucosa y relación C:N.

De manera general, es sabido que el rango de temperatura en hongos, en el cual se favorece la esporulación es más estrecho que para su crecimiento. Asimismo, la temperatura puede afectar la velocidad y magnitud de la esporulación en cultivos de hongos (Griffin, 1994). De tal forma que, es posible que la temperatura a la cual se favorece más la esporulación en los cultivos llevados a cabo en esta etapa es de 29 °C.

En la **tabla 5.5** se muestran los valores máximos alcanzados en las respuestas estudiadas. Es clara la tendencia de las respuestas llevadas a cabo a 29 °C, respecto a aquellas a 32 °C. En cuanto a la producción de conidios, la concentración máxima fue superior a 8.55×10^7 conidios/mL a 29 °C, mientras que a 32 °C solo aquella con una relación C:N de 30 y una concentración de glucosa de 10 g/L fue semejante y las restantes por debajo de este valor.

Agosin *et al* (1997) realizaron estudios sobre el impacto de la relación C:N (3-60) y la concentración de glucosa (3-48 g/L) en la producción de conidios de *Trichoderma harzianum* P1 en cultivo líquido (medio mineral) en matraces cultivados a 28°C. Los resultados demostraron que a una relación C:N de 14 se obtuvo la mayor concentración de conidios (5.75×10^6 conidios/mL) con una viabilidad del 95 %, no teniendo un efecto significativo la concentración de glucosa. Por otro lado, Harman *et al* (1991) obtuvieron concentraciones de 1.43×10^7 y 5.61×10^7 conidios/mL, respectivamente al utilizar el medio de Czapek Dox y Richard. Sin embargo, en estudios posteriores por estos mismos autores observaron que al adicionar un medio de cultivo rico (jugo V8, 15 % v/v), incrementaron hasta en un orden de magnitud los rendimientos, así como la concentración de biomasa. Tal efecto es atribuido a la composición del medio complejo (jugo V8). Por otra parte, las concentraciones de conidios que se lograron en esta primera etapa del proyecto fueron entre 5 y 10 veces menores a las obtenidas en los estudios realizados por estos autores.

Tabla 5.5. Producción máxima de conidios, esporulación, UFC y productividad de *Trichoderma harzianum*, (diseño factorial 2^3 , 500 rpm)

Condición			Conidios (10^7 /mL)	Esporulación (10^{10} conidios/g biomasa)	UFC (10^7 /mL)	Productividad (10^8 conidios/L.h)	Productividad específica (10^8 conidios/g biomasa.h)
Glucosa (g/L)	C:N	Temperatura °C					
30	10	29	9.15	7.72	6.91	9.38	9.18
30	30	29	9.37	8.67	7.7	12.1	17.745
10	10	29	9.32	5.95	6.37	10.2	6.2
* 10	30	29	8.55	8.36	6.3	10.2	9.95
30	10	32	6.03	5.13	3.96	6.62	5.4
30	30	32	5.6	4.88	4.46	6.67	8.04
* 10	10	32	5.39	3.7	3.33	6.41	3.18
* 10	30	32	8.86	4.54	6.66	9.48	9.0

*Condiciones reportadas con un solo experimento debido a limitaciones del equipo de fermentación

El mismo comportamiento se observó respecto a la esporulación. Los valores máximos alcanzados correspondieron a las condiciones llevados a cabo a 29°C que se encuentran por debajo de los máximos reportados por Harman *et al* (1991), quienes obtuvieron rendimientos de hasta 1.26×10^{11} conidios/g biomasa, los cuales son superiores al 45 % con respecto al máximo obtenido en esta primera etapa.

Las UFC también fueron superiores en los cultivos desarrollados a 29 °C, alcanzando cifras superiores a 6.3×10^7 UFC/mL. A 32 °C se encontraron UFC menores. Finalmente, hubo una diferencia significativa en la productividad, ya que a 29 °C también se lograron las mayores productividades, mientras que a 32 °C estuvieron por debajo del 50 %. Las productividades máximas alcanzadas son muy semejantes a las reportadas por Agosin *et al*, (1997), quienes reportaron hasta 10^8 conidios/L.h.

En cuanto a la productividad específica (conidios/g biomasa.h), parece ser que la relación C:N de 30 favorece esta respuesta ya que en todos los experimentos a esta C:N se presentaron las mayores productividades específicas las cuales se encontraron por arriba de 8×10^8 conidios/g biomasa.h, mientras que a una relación C:N de 10 tendieron a estar por debajo de 9×10^8 conidios/g biomasa.

De manera general, podemos mencionar que el factor que ejerció un efecto significativo en la producción de conidios, esporulación y productividad, fue la temperatura. Por otra parte, la concentración de la fuente de carbono y la relación C:N, no tuvieron efecto alguno en las respuestas estudiadas. Además, los resultados muestran que el medio de cultivo favorece la esporulación y se alcanzan concentraciones comparables de conidios a las reportadas cuando utilizan medios de cultivo definidos como en este caso (Harman *et al*, 1991; Agosin *et al*, 1997). Sin embargo, el crecimiento de *Trichoderma harzianum*, bajo éstas condiciones, fue muy pobre. Por tanto, se decidió estudiar el efecto que tiene la adición de un nutriente complejo, en este caso, el extracto de levadura sobre los parámetros antes

mencionados. Se estudió también la adición de glicerol con el fin de disminuir la actividad de agua y poder incrementar la esporulación.

5.2 SEGUNDA ETAPA

Una vez finalizada la primera etapa del proyecto y de acuerdo con los resultados obtenidos bajo las 8 condiciones estudiadas, se seleccionó una condición “estándar” para evaluar la adición de extracto de levadura (0.5 g/L) y de glicerol (9 % v/v) en la producción de esporas y en la esporulación de *Trichoderma harzianum* IMI204060. Dicha condición “estándar” inicial (llamada en esta sección **Control**) correspondió a una concentración de 30 g/L de glucosa, una relación C:N de 10 y una temperatura de 29° C. Bajo estas condiciones se logró una esporulación cercanos a los máximos reportados por Jin *et al*, 1996 (1×10^{11} conidios/g biomasa). Por otra parte, se aseguraba que no hubiera una limitación de la fuente de nitrógeno y carbono con el fin de observar el efecto real de los factores estudiados en esta etapa (extracto de levadura y actividad de agua). Con base en estas condiciones se hicieron las modificaciones pertinentes para esta segunda etapa. Todas las fermentaciones fueron llevadas a cabo a una agitación de 400 rpm (P/V de 2.83 W/L) debido a limitaciones del equipo de fermentación (motor que suministra la agitación).

Los cultivos a los cuales no se les adicionó glicerol tuvieron una actividad de agua promedio durante toda la fermentación de 0.98 (que corresponden al cultivo **control** y al cultivo únicamente con extracto de levadura). Por otra parte, los cultivos con glicerol (denominados “EL+Glicerol” y “Glicerol”) tuvieron una actividad de agua promedio de 0.95 durante todo el cultivo (**figura 5.5**).

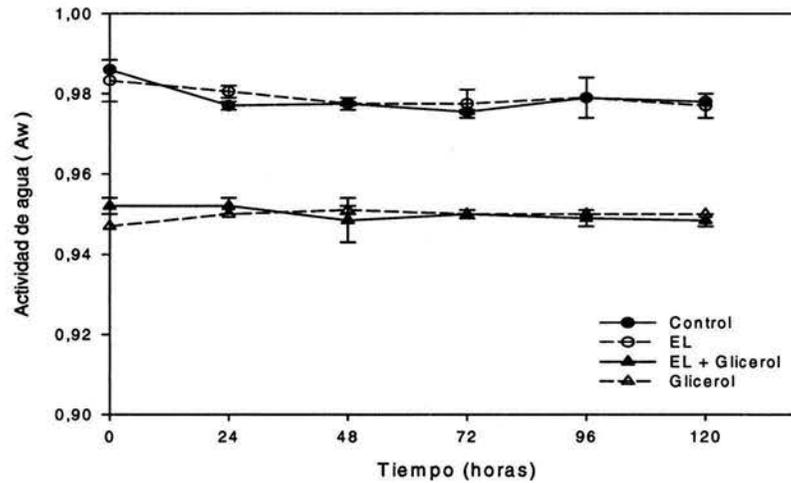


Figura 5.5. Evolución de la actividad de agua en cultivos de *Trichoderma harzianum*.

5.2.1 Análisis de varianza del efecto de la actividad de agua y del extracto de levadura en la producción de conidios de *Trichoderma harzianum*

5.2.1.1 Producción máxima de conidios

El análisis de varianza de los resultados de este diseño experimental mostró que la adición de extracto de levadura (EL) tuvo un efecto significativo en la producción de conidios. La disminución de la actividad de agua (a_w) y la interacción de estos dos factores no tuvieron un efecto significativo, ya que, de acuerdo a los coeficientes estimados y el valor de probabilidad de t, se puede atribuir éste efecto exclusivamente al extracto de levadura. El valor de probabilidad de F (0.0014), confirma -con un 99.86 % de confiabilidad- que existe una diferencia significativa en la producción de conidios de *Trichoderma harzianum* al adicionar el extracto de levadura (tabla 5.6). Finalmente, el signo correspondiente al coeficiente estimado sugiere que el incremento de la concentración de extracto de levadura (dentro del rango evaluado) incrementará ésta respuesta.

Tabla 5.6. Análisis de varianza sobre la producción de conidios de *Trichoderma harzianum* (diseño factorial 2²)

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de F	Probabilidad de F
Modelo	95.99	3	32.00	47.85	0.0014
Residuos	2.68	4	0.67		

Factor	Coefficiente estimado	Grados de libertad	Error estándar	t para Ho Coef.=0	Probabilidad de t
Media general	15.01	1	0.29		
EL	3.34	1	0.29	11.54	0.0003
a _w	-0.56	1	0.29	-1.95	0.1236
EL- a _w	-0.74	1	0.29	-2.55	0.0633

Ecuación final en términos de los factores actuales:

$$\begin{aligned} \text{Conidios} = & + 15.01 \\ & + 3.34 \cdot \text{EL} - 0.56 \cdot a_w \\ & - 0.74 \cdot \text{EL} \cdot a_w \end{aligned}$$

5.2.1.2 Esporulación máxima

El análisis de varianza mostró que la actividad de agua tuvo un efecto significativo en ésta respuesta. En base al signo del coeficiente estimado, se sugiere que debemos elevar la actividad de agua para incrementar la respuesta (tabla 5.7). De acuerdo a este análisis, la condición ideal en éstos experimentos corresponde al cultivo Control (sin extracto de levadura y a_w=0.98).

Tabla 5.7. Análisis de varianza sobre la esporulación de *Trichoderma harzianum* (diseño factorial 2²)

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de F	Probabilidad de F
Modelo	9.29	2	4.64	5.34	0.0574
Residuos	4.35	5	0.87		

Factor	Coefficiente estimado	Grados de libertad	Error estándar	t para Ho Coef.=0	Probabilidad de t
Media general	4.73	1	0.33		
EL	-0.68	1	0.33	-2.05	0.0955
a _w	0.84	1	0.33	2.54	0.0516

Ecuación final en términos de los factores actuales:

$$\text{Conidios} = + 4.73$$

$$- 0.68 \cdot \text{EL} + 0.84 \cdot a_w$$

5.2.1.3 Biomasa máxima

La adición del extracto de levadura (EL) tuvo una influencia significativa en la concentración máxima de biomasa, ya que por el coeficiente estimado (+1.52) y el valor de probabilidad de t (0.0124), podemos afirmarlo. Finalmente, todo lo anterior es confirmado por el valor de probabilidad de F (0.0219), lo que permite concluir que hubo un efecto significativo en esta respuesta al adicionar el extracto de levadura con una confiabilidad del 97.81 % (tabla 5.8).

Tabla 5.8. Análisis de varianza sobre la concentración de biomasa de *Trichoderma harzianum* (diseño factorial 2²)

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de F	Probabilidad de F
Modelo	22.97	2	11.49	9.02	0.0219
Residuos	6.37	5	1.27		

Factor	Coefficiente estimado	Grados de libertad	Error estándar	t para Ho Coef.=0	Probabilidad de t
Media general	4.58	1	0.40		
EL	1.52	1	0.40	3.82	0.0124
a _w	-0.74	1	0.40	-1.86	0.1223

Ecuación final en términos de los factores actuales:

$$\text{Conidios} = + 4.58$$

$$- 1.52 \cdot \text{EL} - 0.74 \cdot a_w$$

5.2.1.4 Productividad máxima

La productividad máxima obtenida en este diseño experimental fue afectada significativamente por la adición de extracto de levadura, y la actividad de agua con un 99.17 % de confiabilidad. (Tabla 5.9). Así, la adición de extracto y una actividad de agua de 0.98 mejoran la productividad del proceso.

Tabla 5.9. Análisis de varianza sobre la concentración de biomasa de *Trichoderma harzianum* (diseño factorial 2²)

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de F	Probabilidad de F
Modelo	1.56	3	0.52	18.49	0.0083
Residuos	0.11	4	0.028		

Factor	Coefficiente estimado	Grados de libertad	Error estándar	t para Ho Coef.=0	Probabilidad de t
Media general	1.64	1	0.059		
EL	0.36	1	0.059	6	0.0039
a _w	0.26	1	0.059	4.40	0.0117
EL- a _w	6.125x10 ⁻³	1	0.059	0.10	0.9228

Ecuación final en términos de los factores actuales:

$$\begin{aligned} \text{Conidios} = & + 1.64 \\ & + 0.36 \cdot \text{EL} + 0.26 \cdot a_w \\ & + 6.125 \times 10^{-3} \cdot \text{EL} \cdot a_w \end{aligned}$$

De manera global podemos mencionar que el extracto de levadura fue el factor más importante ya que ejerció un efecto significativo en la producción de conidios, biomasa y productividad del proceso. Por otro lado, al disminuir la actividad de agua, no se observó efecto significativo en la esporulación. En el caso contrario, una actividad de agua alta (0.98), mejora la productividad del proceso.

5.2.2 Efecto del extracto de levadura (EL) y de la actividad de agua (a_w)

En la figura 5.6 se muestran las cinéticas de crecimiento del hongo para las diferentes condiciones estudiadas. El cultivo control, como era de esperarse, tuvo un crecimiento micelial limitado, alcanzando una concentración máxima de solo 2.5 g/L. Esto puede ser

atribuido a que los componentes del medio de cultivo son los mismos que aquellos que se usaron en la primera etapa del estudio (factorial 2^3), únicamente variando la agitación (por tanto, también la potencia volumétrica inicial), sin tener un efecto sobre el crecimiento del hongo y que ya fueron discutidos.

Por otra parte, la adición del extracto de levadura (EL) redujo el tiempo de germinación de las esporas, el cual fue aproximadamente de 12 horas. El análisis de varianza mostró que el EL tuvo un efecto significativo en el crecimiento de la biomasa ya que se alcanzó un máximo de hasta 5.2 g/L, lo que representa un aumento de un poco más del 100 %, comparado con el cultivo control. Con extracto de levadura y glicerol (FGEL) se lograron 6.6 g/L, atribuyendo esto fundamentalmente a la adición de extracto de levadura más que a la adición del glicerol. Como se muestra en la figura 5.6, a pesar del retraso en la germinación de los conidios, parece ser que el hongo adapta su metabolismo para asimilar estos nutrientes y crecer a condiciones bajo esta actividad de agua (0.95).

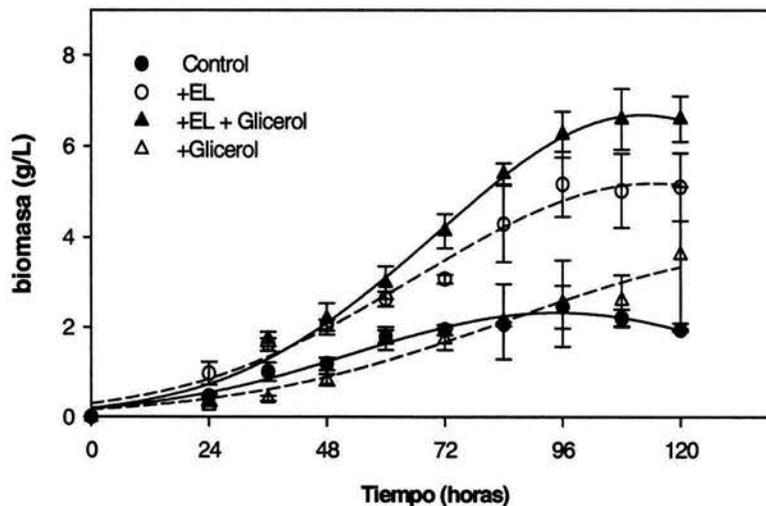


Figura 5.6. Evolución de la concentración de biomasa en cultivos de *Trichoderma harzianum* adicionados con extracto de levadura y glicerol, 400 rpm.

Efectos similares han sido reportados al adicionar el extracto de levadura con el fin de incrementar la producción de celulosa en cultivos de *Trichoderma reesei* RUT-C30 (Marten *et al*, 1996 y Domínguez *et al*, 2000). Estos autores observaron que, al adicionar éste nutriente, se incrementó la velocidad de crecimiento debido a la presencia de cofactores de crecimiento, vitaminas, polipéptidos y otros compuestos característicos de nutrientes complejos. Por otra parte, en estudios realizados por Harman *et al* (1991), se reporta un incremento de un orden de magnitud en la concentración de la biomasa producida en cultivos de *Trichoderma harzianum* ATCC 20847, al adicionar jugo V8 (15% v/v). El efecto principal se atribuye a los nutrientes que se encuentran en éste nutriente particularmente complejo.

En los cultivos adicionados con glicerol (FG y FGEL), se observó un retraso en la germinación de las esporas por más de 24 horas comparadas con las que no se adicionó glicerol. Esto podría atribuirse a que se sabe que los organismos requieren agua como solvente en altas concentraciones. Y sabiendo que los sustratos y enzimas se encuentran en solución acuosa, el hecho de no tener la suficiente disponibilidad de agua puede tener como consecuencia que los sustratos no se encuentren del todo solubles en el medio de cultivo y las enzimas que catalizan reacciones para el transporte de nutrientes dentro de la célula disminuyan su actividad (Griffin, 1994).

Estudios realizados por Inch *et al* (1987) mostraron que al disminuir la actividad de agua por debajo de 0.966, se observó un decremento en la velocidad específica de crecimiento y los rendimientos ($Y_{x/s}$).

Por otra parte, la disminución de la actividad de agua no tuvo efecto significativo en la concentración máxima de biomasa de *Trichoderma harzianum*, posiblemente debido a su adaptación a esta actividad de agua (0.95). De acuerdo al análisis de varianza, a pesar de mostrar una ligera diferencia en la concentración de biomasa para el cultivo adicionado con el extracto de levadura y glicerol (FGEL) -respecto al adicionado solo con extracto de levadura (FEL)-, podemos eliminar el efecto de este factor. Este comportamiento pudiera ser atribuido

a que una pequeña cantidad de glicerol se adhirió al micelio ó que haya sido asimilada como fuente de carbono (Jin *et al.*, 1996).

La glucosa y el sulfato de amonio no fueron consumidos totalmente en todas las condiciones evaluadas, lo que indicó que no hubo limitación de estos nutrientes en los cultivos (figura 5.7).

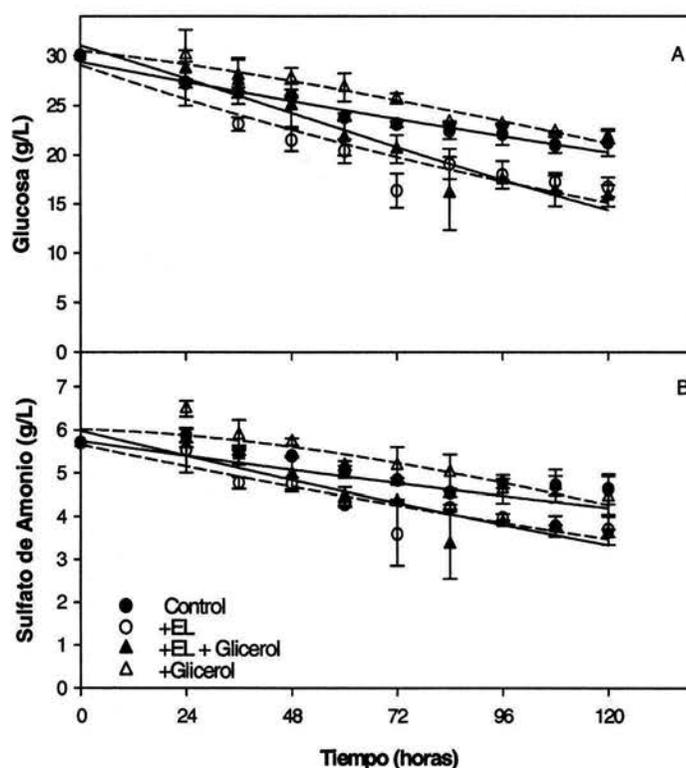


Figura 5.7. Evolución de la concentración de glucosa y de sulfato de amonio en cultivos de *Trichoderma harzianum* adicionados con extracto de levadura y glicerol.

La velocidad de consumo de glucosa fue mayor en los cultivos con extracto de levadura (FEL y FGEL), con valores de 0.11 y 0.139 g/L.h, respectivamente. Sin este nutriente (Control y FG), fue de solo 0.075 y 0.079 g/L.h, respectivamente. Este comportamiento podría atribuirse a que el EL no solo cuenta con los nutrientes esenciales (fuente de carbono y nitrógeno), sino también contiene cofactores de crecimiento, vitaminas y polipéptidos que

pueden acelerar las reacciones para asimilar las fuentes nutricionales presentes en el medio de cultivo, promoviendo una mayor velocidad de crecimiento y de consumo de sustratos (Moore-Landecker, 1996).

De igual forma, la velocidad de consumo del sulfato de amonio fue mayor para aquellos cultivos con extracto de levadura (FEL y FGEL): 0.0177 y 0.0217 g/L.h, respectivamente. Sin extracto de levadura (Control y FG), este parámetro fue de solo 0.00114 y 0.0148 g/L.h.

La adición de extracto de levadura únicamente (FEL), permite alcanzar concentraciones considerables de conidios a solo 36 horas de cultivo (figura 5.8).

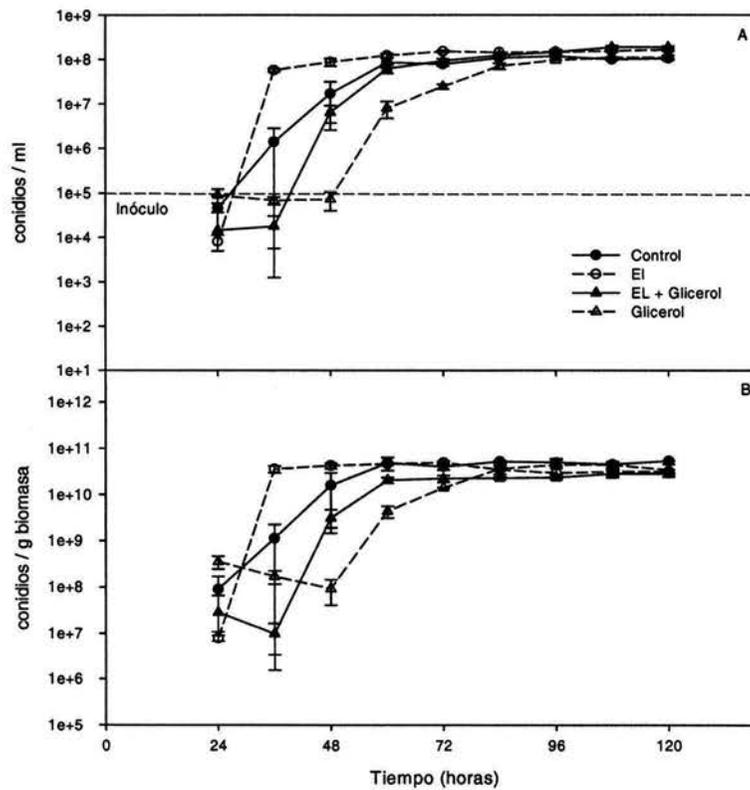


Figura 5.8. Perfil cinético de la producción de conidios y esporulación (rendimiento) en cultivos de *Trichoderma harzianum* adicionados con extracto de levadura y glicerol.

Este comportamiento podría ser atribuido a que la adición de este nutriente permitió un menor tiempo de germinación del inóculo y mayor velocidad de crecimiento sin inhibir la esporulación, y por lo tanto, el punto para alcanzar este nivel de esporulación es más corto que las condiciones restantes que tienen un tiempo de germinación más largo y una velocidad de crecimiento menor debida a una actividad de agua de 0.95.

El análisis de varianza mostró que la adición de extracto de levadura tuvo un efecto significativo en la concentración máxima de conidios y en la productividad volumétrica. En la **tabla 5.10** se muestran los valores máximos alcanzados en las respuestas de las variables estudiadas. Los cultivos adicionados con extracto de levadura (FEL y FGEL) presentaron las más altas concentraciones de conidios (respecto a las condiciones evaluadas en la primera etapa y las restantes de ésta etapa). Esto podría atribuirse a que el hecho de haber una mayor concentración de biomasa y la inducción de la esporulación en ésta, existe una mayor capacidad de formar un número mayor de conidióforos y por lo tanto se vea reflejada en dichas concentraciones alcanzadas.

Algo similar sucede con la productividad del proceso. Las condiciones evaluadas con extracto de levadura representan las más altas obtenidas. Sin embargo, la productividad del cultivo en el que además se adicionó glicerol (FGEL) fue menor que aquella únicamente con extracto de levadura. Esto podría explicarse ya que a una actividad de agua de 0.95 hubo un retraso en la germinación y en el crecimiento del hongo afectando directamente la productividad del proceso.

En cuanto al favorecimiento de la esporulación, se observa que la adición de extracto de levadura y glicerol tienen un efecto negativo en la esporulación. Por lo tanto, los valores máximos alcanzados en estos cultivos se encontraron por debajo del cultivo control, también por debajo de los logrados en la primera etapa de éste estudio (diseño factorial 2³) y las máximas reportadas en la literatura (Harman *et al*, 1991; Jin *et al*, 1991; Jin *et al*, 1996).

Tabla 5.10. Producción máxima de conidios, esporulación, UFC y productividad de *Trichoderma harzianum*, (diseño factorial 2²)

Condición	Conidios (10 ⁷ /mL)	Esporulación (10 ¹⁰ conidios/g biomasa)	UFC (10 ⁷ /mL)	Productividad (10 ⁸ conidios/L.h)	Productividad específica (10 ⁸ conidios/g biomasa.h)
Control (Glucosa: 30 g/L, C:N 10, 29°C)	11.9	5.97	8.43	15.4	8.16
Control+glicerol (FG)	11.5	4.85	6.5	10.3	4.62
Control+EL (FEL)	17.05	5.18	9.68	22.7	8.85
Control+glicerol+EL (FGEL)	19.7	2.94	12.07	17.3	3.45

Con respecto a la productividad específica (conidios/g biomasa.h), se puede observar claramente que las condiciones donde se favorece esta es en aquellas con una actividad de agua de 0.98 (Control y FEL; sin glicerol), que casi duplican a aquellas con una actividad de agua de 0.95 (FG y FGEL).

A pesar de no haber limitación de sustratos (glucosa y sulfato de amonio), nuevamente surge la interrogante sobre qué podría estar induciendo la esporulación. Al respecto, se podría inferir que probablemente algún micronutriente o factor de crecimiento se esté agotando a las concentraciones utilizadas en los cultivos, también podría deberse a la formación de un metabolito o al estrés hidrodinámico, que puedan estar induciendo la esporulación.

Podemos concluir que, los cultivos con extracto de levadura incrementan la biomasa y se incrementa la concentración de los conidios, a pesar de no incrementar la esporulación. Esto debido a que al tener una mayor biomasa e inducir su esporulación se cuenta con una mayor capacidad de la formación de conidióforos y, por lo tanto, un incremento en la producción de conidios es reflejada, lo cual ya ha sido reportado (Harman *et al*, 1991; Jin *et al*, 1996), cuando se adicionó jugo V8 se incrementó la biomasa micelial, incrementando también la producción de conidios en cultivos de *Trichoderma harzianum* ATCC 20847. Por otro lado, la disminución de la actividad de agua no tuvo un efecto en la esporulación de

Trichoderma harzianum IMI 204060, posiblemente por una adaptación por parte del hongo que le permite su crecimiento bajo éstas condiciones.

5.3 Crecimiento micelial - esporulación

Los resultados de la segunda etapa del proyecto indican que al incrementar la biomasa micelial se aumenta tanto la producción de conidios como la productividad del proceso a pesar de que la esporulación sobre el hongo es menor. Además, se observa que el hongo se adapta para crecer a una actividad de agua de 0.95. Con base en lo anterior, se propuso una estrategia, en la cual, en una primera etapa del cultivo, se tuvieran las condiciones ideales para el crecimiento de micelio y, en una segunda etapa, eliminar completamente el medio de crecimiento y promover -en mayor medida-, la esporulación mediante el cambio del medio de cultivo y de las condiciones de agitación. Para tal efecto, las condiciones de crecimiento fueron las del cultivo estándar, adicionado con 5 g/L de EL y 0.94 g/L de sulfato de amonio y a una agitación de 200 rpm (P/V de 0.324W/L). Dichas condiciones de cultivo corresponden a aquellas establecidas por Flores (2002), para el crecimiento de micelio de este hongo, solo que en este caso se adicionó una mayor cantidad de extracto de levadura para promover el crecimiento del micelio a una mayor velocidad. Por su parte, las condiciones de esporulación corresponden al cultivo control (glucosa 30 g/L, C:N 10, 29 °C).

Durante la etapa de crecimiento, se obtuvieron alrededor de 6 g/L de biomasa a las 36 horas cultivo (**figura 5.9**), tiempo en el cual la TOD cayó al 0 %, el sulfato de amonio fue agotado y se presentó la formación de cavidades (mezclado ineficiente), por lo que se decidió realizar el cambio de medio de cultivo a éste tiempo (36 horas), tratando de evitar que la viabilidad del micelio se viera afectada por las condiciones limitantes ya mencionadas. Posterior a esto, el micelio fue centrifugado a 10,000x g y fue eliminado por completo el medio de cultivo inicial. El micelio lavado fue resuspendido en el medio de cultivo

correspondiente a las condiciones del cultivo control (esporulación), alcanzándose una concentración inicial de 5 g/L.

Como se puede observar (figura 5.9), la producción de biomasa máxima se obtuvo bajo las condiciones de crecimiento de micelio y la transferencia al medio de esporulación y al que se incrementó de la agitación a 400 rpm (potencia volumétrica inicial a 3 W/L, FCE-200-400). Bajo estas condiciones, la biomasa del cultivo alcanzó una concentración de 15.3 g/L a las 96 horas de cultivo, posteriormente, el cultivo entró en fase estacionaria.

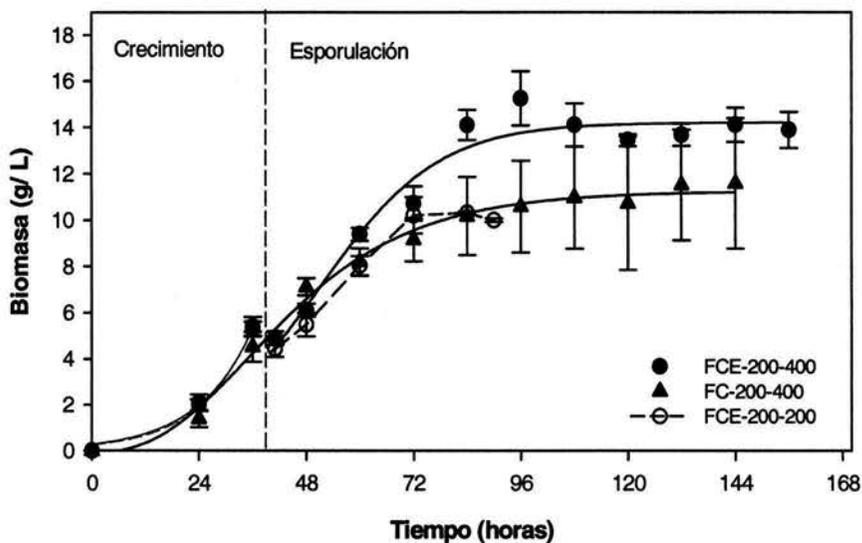


Figura 5.9. Cinética de crecimiento de cultivos de *Trichoderma harzianum* durante el proceso crecimiento-esporulación.

Por otra parte, el cultivo bajo las mismas condiciones anteriores pero sin el incremento de la agitación (FCE-200-200) solo alcanzó una biomasa máxima de aproximadamente 10 g/L a las 72 horas de cultivo. En éste cultivo, se observó la formación de zonas muertas en regiones del tanque con el micelio y el medio de cultivo casi estático, sin mostrar evidencias de esporulación. Finalmente, el cultivo al cual únicamente se incrementó

la agitación sin cambiarlo de medio de cultivo alcanzó 11.5 g/L de biomasa (FC-200-400) a las 96 horas de cultivo, para entrar posteriormente en fase estacionaria.

El comportamiento observado en el aumento de la biomasa en función de la agitación ha sido reportado por varios autores en la producción de metabolitos de interés. Por su parte, Jüsten *et al*, (1998) y Mantzouridou *et al*, (2002), obtuvieron la mayor producción de biomasa a niveles de agitación elevados (1400 rpm; P/V = 5.6 W/L) y 500 rpm, respectivamente en fermentadores de tanque agitado con un volumen de trabajo entre 3 y 6 litros. Sin embargo, la producción del metabolito de interés (penicilina y β -caroteno) fue mayor a tasas de agitación bajas. Este mismo fenómeno ha sido observado también en cultivos de *Cordyceps militaris* y *Trichoderma harzianum* NCIM 1185, para la obtención de un exobiopolímero (Park *et al*, 2002) y una quitinasa (Felse y Panda *et al*, 2000), respectivamente. En estos trabajos se reporta que altas tasas de agitación incrementan la biomasa del hongo (300 rpm y 224 rpm, respectivamente). Para explicar este fenómeno se ha propuesto que existe un número mayor de zonas apicales, así como puntas nuevas de crecimiento causadas por tasas de agitación elevadas que fragmentan el micelio. Por otro lado, disminuyen los problemas difusionales ya que se incrementa el $k_L a$ y el oxígeno disuelto en el sistema, así como una disminución de la viscosidad, con un sistema más homogéneo (Jüsten *et al*, 1998).

El incremento sustancial en la biomasa de los cultivos a los cuales se hizo el cambio de medio de cultivo (FCE-200-400 y FCE-200-200) comparado con aquellos llevados a cabo en la primera etapa se podría explicar lo siguiente:

- 1) El micelio producido en la etapa de crecimiento y que sirvió como inóculo en la segunda parte del experimento (etapa de esporulación), creció en un medio rico en nutrientes (aminoácidos, vitaminas, minerales y factores de crecimiento) aportados por el extracto de levadura, lo cual nos hace inferir

que el micelio se encontraba en un estado metabólico muy activo, además de que fue recuperado en la fase exponencial de crecimiento.

- 2) Para la síntesis de enzimas necesarias para llevar a cabo diversas funciones metabólicas (enzimas para la digestión y transporte de nutrientes) es necesario muchas veces de vitaminas o micronutrientes (Griffin, 1994). Por lo que el micelio que fue crecido en el medio rico de la tercera etapa del proyecto pudo haber sintetizado otras enzimas que en el caso del micelio producido en el medio mineral (definido) en la primera etapa del proyecto no pudo hacerlo.
- 3) Finalmente, el cultivo (Glucosa: 30 g/L, C:N 10, 29°C) control realizado en la primera etapa del proyecto (factorial 2³) obtenemos un rendimiento alrededor de 0.3 g biomasa/g glucosa. Por otro lado, el rendimiento aparente en la etapa de crecimiento (tercera etapa del proyecto, crecimiento-esporulación) fue de aproximadamente 0.55, atribuido a la adición de extracto de levadura. Ya en la etapa de esporulación se obtiene un rendimiento de aproximadamente 0.33 g biomasa/g glucosa. Este último resultado concuerda con el obtenido en el cultivo control de la primera etapa del proyecto, y esto puede ser fundamentado en el hecho de que el medio de cultivo utilizado fue el mismo. Sin embargo, en esta última etapa nos permitió alcanzar una mayor concentración de biomasa.

En las figuras 5.10A y 5.10B se muestra la cinética del consumo de sustratos. Durante la etapa de crecimiento micelial se consumieron alrededor de 10 g/L de glucosa y el sulfato de amonio fue agotado. Sin embargo, podemos afirmar que no hubo limitación de nitrógeno, ya que es sabido que en el extracto de levadura se encuentran fuentes de nitrógeno orgánico. Una vez que fue transferido el micelio (producido en la etapa de crecimiento), al medio de

esporulación (Control), la glucosa se agotó entre las 84 y 96 horas de cultivo, lo cual coincide con el inicio de la fase estacionaria del cultivo y se debe al agotamiento de este nutriente (para los cultivos llevados a cabo a una agitación de 400 rpm, P/V de 3 W/L; FCE-200-400). Además, se observó que el consumo del sulfato de amonio se detuvo cuando inició la fase estacionaria.

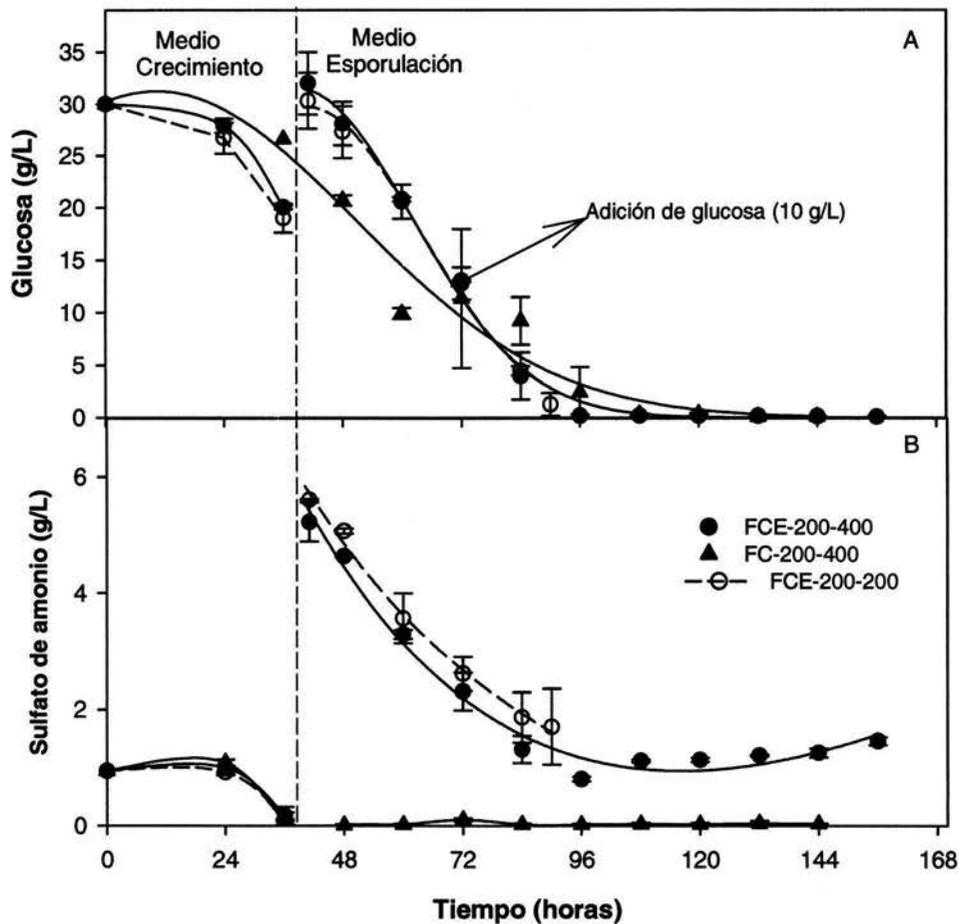


Figura 5.10. Cinéticas de consumo de glucosa y de sulfato de amonio en cultivos de *Trichoderma harzianum* durante el proceso crecimiento-esporulación.

El cultivo llevado a cabo bajo las condiciones anteriores (pero sin el aumento en la agitación; FCE-200-200), entró a la fase estacionaria a las 72 horas de cultivo. Sin embargo,

aun contaba con aproximadamente 10 g/L de glucosa y 3 g/L de sulfato de amonio. Esto podría atribuirse a la alta viscosidad del medio de cultivo, la formación de zonas muertas dentro del biorreactor (condiciones heterogéneas), lo que condujo a que el micelio pudo encontrarse en condiciones de limitación de nutrientes. Adicionalmente a esto, la tensión de oxígeno disuelto -una vez transferido el micelio- disminuye por debajo del 3 % casi inmediatamente por lo que el micelio se encontró en condiciones de limitación de oxígeno (Apéndice 2), contribuyendo muy posiblemente a la entrada temprana de la fase estacionaria y por lo tanto un menor crecimiento de la biomasa (figura 5.9).

Finalmente al medio al cual se incrementó la agitación a 400 rpm (sin transferir el micelio; FC-200-200), se le adicionaron 10 g/L de glucosa alrededor de las 60 horas, con el fin de que el cultivo no se encontrara en condiciones de limitación de sustrato y observar el efecto del suministro de potencia. Sin embargo, la concentración máxima de biomasa fue menor que aquella obtenida en el cultivo al cual se incrementó la agitación. Esto podría atribuirse a la formación y acumulación de metabolitos tóxicos que se pudieron haber formado durante el crecimiento del hongo y que posiblemente inhibieron su crecimiento (Calvo *et al*, 2002). Ello sugiere que, a pesar de contar con nutrientes, el hongo los utilizó para el metabolismo de mantenimiento.

5.3.1 Efecto de la agitación y medio de cultivo en la producción de conidios de *Trichoderma harzianum*

Los cultivos que presentaron esporulación fueron aquellos llevados a cabo a una agitación de 400 rpm (P/V de 3 W/L), con o sin la transferencia del micelio al medio de esporulación. El cultivo llevado a cabo en la etapa crecimiento-esporulación (cambio de medio de cultivo e incremento la agitación de 200 rpm a 400 rpm), fue la condición que presentó la mayor producción de conidios. Entre las 96 y 108 horas de cultivo se presentó un incremento

sustancial (100 %) en la concentración de conidios (figura 5.11A). Este incremento en la concentración de conidios podría atribuirse al agotamiento de la fuente de carbono (glucosa) en el medio de cultivo, incrementando en mayor grado la esporulación. En esta condición se alcanza un máximo de 5.39×10^8 conidios/mL a las 132 horas de cultivo, que representa la mayor concentración de conidios (comparada con las máximas obtenidas en la etapa uno y dos de este trabajo) y comparable con aquellas obtenidas por Jin *et al*, 1996.

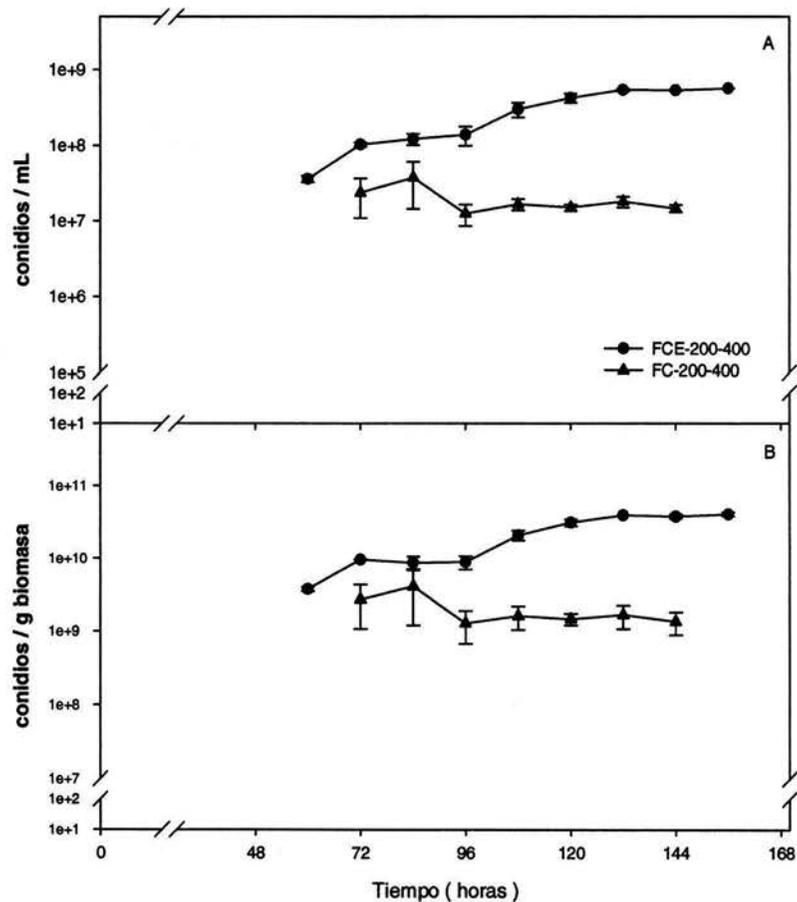


Figura 5.11. Evaluación de la producción de conidios y esporulación en cultivos de *Trichoderma harzianum* durante el proceso crecimiento-esporulación.

También se observó que el pH del medio de cultivo se incrementó de 5.6 hasta 6.2 aproximadamente. Este fenómeno también lo observaron Jin *et al* (1996), esto es, un incremento en el pH atribuido al uso de aniones durante ésta etapa del cultivo y cuando la fuente de carbono es agotada.

Por otro lado, el cultivo al cual únicamente se incrementó la agitación (de 200 a 400 rpm; FC-200-400), presentó esporulación a las 72 horas de cultivo, alcanzando una concentración máxima de conidios de sólo 3.71×10^7 conidios/mL a las 84 horas, posterior a este tiempo se observó una disminución en la concentración de conidios, posiblemente a que la adición de la glucosa haya reprimido en cierto grado la esporulación del hongo o que algunos conidios germinaran. Este resultado demuestra que no basta con el incremento de la agitación para favorecer la esporulación en *Trichoderma harzianum*, también la composición del medio de cultivo es un factor importante para la esporulación del hongo. Sin embargo, es evidente que el efecto principal fue el cambio en la potencia volumétrica sobre la esporulación de *Trichoderma harzianum*.

La esporulación presenta el mismo perfil que la cinética de producción de conidios para ambas condiciones, observando un incremento de esta a partir de las 96 horas de cultivo debido precisamente al agotamiento de la glucosa en el cultivo transferido (figura 5.11B, FCE-200-400). Por otra parte, el máximo rendimiento alcanzado a estas condiciones fue de 3.94×10^{10} conidios/g biomasa. En el cultivo FC-200-400, se obtuvo una esporulación máxima de 1.67×10^9 conidios/ g biomasa.

5.3.2 Comparación de la producción de conidios de *Trichoderma harzianum* en las 3 etapas evaluadas

Bajo las condiciones de crecimiento-esporulación, la producción máxima de conidios fue de 5.62×10^8 conidios/mL (tabla 5.11), es decir, el cambio del medio de cultivo e

incremento en la agitación (FCE-200-400), representó un aumento de aproximadamente el 600 % con respecto a la condición control y un 350 % con respecto a la condición que reportó los mejores resultados en la etapa 2 (adición de extracto de levadura, FEL). La producción máxima obtenida mediante esta estrategia es comparable con las máximas producciones reportadas en la literatura (Jin *et al*, 1996).

Tabla 5.11. Comparación en la producción de conidios, esporulación, UFC y productividad en cultivos de *Trichoderma harzianum* bajo diferentes condiciones evaluadas en las tres etapas.

Condición	Conidios (10 ⁷ /mL)	Esporulación (10 ¹⁰ conidios/g biomasa)	UFC (10 ⁷ /mL)	Productividad (10 ⁸ conidios/L.h)	Productividad específica (10 ⁸ conidios/g biomasa.h)	N (rpm)
Glucosa: 30 g/L, C:N 10, 29°C	9.2	7.7	6.9	9.38	9.18	500
Control + EL (FEL)	17.1	5.2	9.7	22.7	8.85	400
FCE-200-400	56.2	3.9	34.8	40.8	2.98	200-400

Esta estrategia también permitió incrementar la productividad (4.08x10⁹ conidios/L.h) del proceso, duplicando la máxima obtenida en la condición en la que se adicionó el extracto de levadura (2.27x10⁹ conidios/L.h). Sin embargo, en términos de productividad específica, es claro que es menor en esta tercera etapa, esto nos quiere decir que la esporulación llevada a cabo por el hongo fue más eficiente en las condiciones evaluadas en la primera etapa. Debido tal vez al tipo de medio de cultivo y el estrés hidrodinámico ejercido en el sistema.

Por otro lado, la condición que presentó la mayor esporulación fue en los cultivos llevados a cabo en la primera etapa, como ya se había mencionado, el tipo de medio de cultivo (definido) y el estrés hidrodinámico favorecieron esto. Los cultivos en los que hubo un mayor crecimiento de biomasa tendieron a disminuir la esporulación. Estos resultados sugieren

la importancia de tener un equilibrio en donde por un lado se promueva el crecimiento micelial, y por el otro, se favorezca la esporulación, de tal forma que podamos incrementar sustancialmente la producción de conidios a pesar de no alcanzar los mayores índices de esporulación posibles.

Capítulo VI

Conclusiones

- A una temperatura de 29 °C se favoreció y hubo un efecto significativo en la producción de conidios, esporulación y productividad del proceso (>40 %). Sin embargo, la concentración de glucosa y la relación C:N no tuvieron un efecto significativo en los parámetros antes mencionados. Por otro lado, la productividad específica (conidios/g biomasa.h) se ve favorecida a una C:N de 30.
- El medio de cultivo utilizado (definido) favoreció la esporulación en todas las condiciones evaluadas (factorial 2³). Sin embargo, no favoreció el crecimiento de *Trichoderma harzianum* (menor de 2 g/L), muy posiblemente por el tipo de nutrientes utilizados que no permitieron un mejor crecimiento del hongo.
- La adición de extracto de levadura (0.5 g/L), favoreció el crecimiento de *Trichoderma harzianum*, debido al tipo de nutrientes (vitaminas y cofactores de crecimiento, principalmente) aportados por este medio. De tal forma que se incrementó en casi un 100 % la producción de conidios (1.71×10^8 conidios/mL) y la productividad del proceso (2.27×10^9 conidios/L.h),
- La disminución de la actividad de agua en el medio de cultivo (0.95) retrasó la germinación de los conidios sin mejorar la producción y esporulación de *Trichoderma harzianum*, posiblemente a la adaptación del hongo a estas condiciones.
- La concentración final de biomasa (15.3 g/L) se favoreció mediante la estrategia crecimiento-esporulación, donde se hizo el cambio de medio de cultivo e incremento de la agitación.

- El incremento de la agitación (potencia volumétrica) favoreció la esporulación de *Trichoderma harzianum*, debido al estrés hidrodinámico ejercido sobre el micelio.
- La limitación de la fuente de carbono incrementó la esporulación, observándose un incremento sustancial (100%) en la concentración de conidios al agotarse por completo la glucosa.
- Se incrementó la producción de conidios hasta un 350 % a 600 % más con la estrategia crecimiento-esporulación (tercera etapa), comparada con las obtenidas de la primera y segunda etapa respectivamente. Además, se mejoró también la productividad del proceso. Sin embargo, la esporulación y productividad específica no fueron favorecidas. Estos resultados igualan en producción de conidios a los máximos obtenidos hasta el momento.
- Finalmente, si la función objetivo es incrementar la producción de conidios así como la productividad del proceso, es recomendable por un lado, incrementar sustancialmente la biomasa y al mismo tiempo inducir la esporulación como se demostró en la tercera etapa de este trabajo.

Capítulo V I I

Perspectivas

A continuación se exponen algunas recomendaciones para la posible mejora de un proceso para la producción de conidios, así como para promover la esporulación en cultivos de *Trichoderma harzianum*.

- Hasta el momento no es bien documentado si el oxígeno ejerce un papel importante en la esporulación de *Trichoderma harzianum*. Por un lado, sería interesante llevar a cabo cultivos de *Trichoderma harzianum* a diferentes tensiones de oxígeno disuelto (limitantes y no limitantes) y evaluar su efecto en la esporulación del hongo. Por otro lado, también podría estudiarse desde el punto de vista de un estrés oxidativo como ha sido reportado en otros hongos (*Aspergillus spp.*) mediante el monitoreo de la formación de especies reactivas (H_2O_2) que pudieran inducir este fenómeno.
- Podría realizarse un arreglo experimental de cultivo en lote alimentado en donde se favoreciera el crecimiento de la biomasa y posteriormente limitar este cultivo mediante la adición regulada de glucosa, con el fin de favorecer la esporulación, así como un microciclo de conidiación.
- Realizar un estudio detallado sobre el efecto que tiene el estrés hidrodinámico en la esporulación de *Trichoderma harzianum* manteniendo la potencia volumétrica constante y realizando un barrido de diferentes valores de este parámetro con el fin de

establecer un valor de potencia volumétrica que mejor favorezca la esporulación de este hongo.

- Finalmente, demostrar si la glucosa juega un papel importante en este fenómeno desde el punto de vista si la concentración de este nutriente puede inhibir la esporulación de *Trichoderma harzianum*.

Capítulo VIII

Bibliografía

- Adams, T.H., Wieser, J. K. and Yu, J-H. 1998. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 62: 35-54.
- Agosin, E. and Aguilera, J.M. 1998. Industrial production of active propagules of *Trichoderma* for agricultural uses. En: *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 2. (Harman, G.E., and Kubicek, eds), Taylor and Francis, London, pp. 205-227.
- Agosin, E., Volpe, D., Muñoz, G., San Martín, R. and Crawford A. 1997. Effect of culture conditions on spore shelf life of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 13: 225-232.
- Altomare, C., Norvell, W.A., Björkman, T. and Harman, G.E. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. **Applied and Environmental Microbiology**, 65(7): 2926-2933.
- Berrocal-Tito, G., Sametz-Baron, L., Eichenberg, K., Horwitz, B.A. and Herrera-Estrella, A. 1999. Rapid blue light regulation of a *Trichoderma harzianum* photolyase gene. **Journal of Biological Chemistry**, 20(14): 14288-14294.
- Berrocal-Tito, G., Rosales-Saavedra, T., Herrera-Estrella, A. and Horwitz, B.A. 2000. Characterization of blue-light and developmental regulation of the photolyase gene *phr1* in *Trichoderma harzianum*. **Photochemistry and Photobiology**, 71(5): 662-668.
- Box, G. E. P., Hunter, W. and Hunter, J. S. 1988. **Estadística para Investigadores**. Editorial Reverté, S. A. Barcelona, España.

- Buchert, J., Oksanen, T., Pere, J., Siika-aho, M., Suurnäkki, A. and Viikari, L. 1998. Application of *Trichoderma reesei* enzymes in the pulp and paper industry. En: *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 2. (Harman, G.E., and Kubicek, eds), Taylor and Francis, London, pp. 343-363.
- Calvo, A.M., Wilson, R.A., Bok, J.W. and Keller, N. P. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3): 447-459.
- Caro, M.A., Rocha-Valadez, J.A., Aguilar-Águila, A., Galindo, E. y Serrano-Carreón, L. 2001. Control independiente del suministro de potencia y de la tensión de oxígeno disuelto en un cultivo miceliar reológicamente complejo. *Memorias del IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*. Veracruz, México.
- Charnley, A.K. 1991. Microbial pathogens and insect pest control. *Letters in Applied Microbiology*, 12: 149-157.
- Chet, I. 1987. *Trichoderma*-application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: *Innovative Approaches to Plant Disease Control* (Chet, ed.), John Wiley, New York, pp. 137-157.
- Chet, I., Benhamou, N. and Haran, S. 1998. Mycoparasitism and lytic enzymes. En: *Trichoderma and Gliocladium*, Vol 2. (Harman, G.E., and Kubicek, eds), Taylor and Francis, London, pp 311-325
- Dodd, S.L., Hill, R.A. and Stewart, A. 2000. Control of *Athelia rolfsii* disease on lentil seedlings using 6-pentyl- α -pyrone. *Soil Biology and Biochemistry*, 32: 1033-1034.
- Domingues, F.C., Queiroz, J.A., Cabral, J.M.S. and Fonseca, L.P. 2000. The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulose production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme and Microbiology Technology*, 26:394-401.

- Elad, Y., Chet, I., Boyle, P., and Henis, Y. 1983. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*-SEM studies and fluorescence microscopy. **Phytopathology**, 7: 85-88.
- Elad, Y., Zimand, G., Zaqs, Y., Zuriel, S. and Chet, I. 1993. Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mold (*Botrytis cinerea*) under comercial greenhouse conditions. **Plant Pathology**, 42: 324-332.
- Felse, P.A. and Panda, T. 2000. Submerged culture production of chitinase by *Trichoderma harzianum* in stirred tank bioreactors-influence of agitator speed. **Biochemical Engineering Journal**, 4:115-120.
- Feng, K.C., Liu, B.L. and Tzeng, Y.M. 2000. *Verticillium lecanii* spore production in solid-state and liquid-state fermentation. **Bioprocess Engineering**, 23: 25-29.
- Fernández, M., Pérez-Correa, J.R., Solar, I. and Agosin, E. 1996. Automation of a solid substrate cultivation pilot reactor. **Bioprocess Engineering**, 16: 1-4.
- Flores, C. Estudio de factores nutricionales y de proceso que determinan la producción de biomasa micelial de *Trichoderma harzianum* y su viabilidad. Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias Bioquímicas, 2002, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Frey, S. and Magan, N. 2001. Production of the fungal biocontrol agent *Ulocladium atrum* by submerged fermentation: accumulation of endogenous reserves and shelf-life studies. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 56: 372-377.
- Galante, Y.M., De Conti, A. and Monteverdi, R. 1998a. Application of *Trichoderma* enzymes in the textile industry. En: *Trichoderma and Gliocladium*, Vol 2. (Harman, G.E., and Kubicek, eds), Taylor and Francis, London, pp. 311-325
- Galante, Y.M., De Conti, A. and Monteverdi, R. 1998b. Application of *Trichoderma* enzymes in the food and feed industries. En: *Trichoderma and Gliocladium*, Vol 2. (Harman, G.E., and Kubicek, eds), Taylor and Francis, London, pp. 327-342.

- García-Garza, J.A., Reeleder, R.D. and Paulitz, T.C. 1997. Degradation of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* by fungus gnats (*Bradysia coprophila*) and the biocontrol fungi *Trichoderma* spp. *Soil Biology and Biochemistry*, 29(2): 123-129.
- Goldman, G.H., Hayes, Ch. and Harman, G.E. 1994. Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. *Trends in Biotechnology*, 12: 478-482.
- Griffin, D.A. 1994. **Fungal Physiology**. John Wiley and Sons Publications, Second Edition, pp. 130-157.
- Han, S. and Adams, T.H. 2001. Complex control of the development regulatory locus *bria1* in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Genetic and Genomics*, 266:260-270
- Hanson, L.E. and Howell, Ch. R. 2002. Biocontrol efficacy and other characteristics of protoplast fusant between *Trichoderma Koningii* and *T. virens*. *Mycological Research*, 106(3): 321-328.
- 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 *Gliocladium* in biological control: an overview. En: *Trichoderma and Gliocladium*, Vol 2. (Harman, G.E., and Kubicek, eds), Taylor and Francis, London, pp. 131-151.
- Howell, C.R. 1998. The role of antibiosis in biocontrol. En: *Trichoderma and Gliocladium*, Vol 2. (Harman, G.E., and Kubicek, eds), Taylor and Francis, London, pp. 173-184.
- Inbar, J., Menendez, A. and Chet, I. 1996. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. *Soil Biology and Biochemistry*, 28(6): 757-763.

- Inch J.M.M. and Trinci, A.P.J. 1987. Effects of water activity on growth and sporulation of *Paecilomyces farinosus* in liquid and solid media. **Journal of General Microbiology**, 133: 247-252.
- Jackson, M.A. 1997b. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 19: 180-187.
- Jackson, M.A. and Bothast, R.J. 1990. Carbon concentration-to-nitrogen influence submerged-culture conidiation by the potential bioherbicide *Colletotrichum truncatum* NRRL 13737. **Applied and Environmental Microbiology** 56(11): 3435-3438.
- Jackson, M.A. and Schisler, D.A. 1992. The composition and attributes of *Colletotrichum truncatum* spores are altered by the nutritional environment. **Applied and Environmental Microbiology**, 58 (7): 2260-2265.
- Jackson, M.A., Mcguire, M.R., Lacey, L.A. and Wraight, S.P. 1997a. Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsectidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. **Mycological Research**, 101(1): 35-41.
- 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., Taylor A.G. and Harman, G.E. 1996. Development of media and automated liquid fermentation methods to produce desiccation-tolerant propagules of *Trichoderma harzianum*. **Biological Control**, 7: 267-274.
- Jüsten, P., Paul, G.C., Nienow, A.W. and Thomas, C.R. 1998. Dependence of *Penicillium chrysogenum* growth, morphology, vacuolation, and productivity in fed-batch fermentations on impeller type and agitation intensity. **Biotechnology and Bioengineering**, 59(6): 762-775.

- Kaplan, A. 1965. Urea nitrogen and urinary ammonia. **Standard Methods in Clinic Chemistry**, 5:245-256.
- Kleifeld, O. and Chet, I. 1992. *Trichoderma harzianum* - interaction with plants and effect on growth response. **Plant Soil**, 144: 267-272.
- Lewis, J.A. and Papavizas, G.C. 1983. Production of chlamydospores and conidia by *Trichoderma spp.* in liquid and solid growth media. **Soil Biology and Biochemistry**, 15(3): 351-357.
- Lewis, J.A. and Papavizas, G.C. 1984b. Chlamydospore formation by *Trichoderma spp.* in natural substrates. **Canadian Journal of Microbiology**, 30: 1-7.
- Lewis, J.A. and Papavizas, G.C. 1985. Effect of mycelial preparations of *Trichoderma* and *Gliocladium* on populations of *Rhizoctonia solani* and the incidence of damping-off. **Disease Control and Pest Management**, 75(7): 812-821.
- Lo, C.T., Nelson, E.B. and Harman, G.E. 1996. Biological control of turfgrass diseases with a rhizosphere competent strain of *Trichoderma harzianum*. **Plant Disease**, 8 (7): 736-741.
- López-y-López, E.V., Chavarría-Hernández, N., Fernández-Sumano, P. and De la Torre, M. 2000. Fermentation process for bioinsecticide production. An Overview. **Recent Research Development Biotechnology and Bioengineering.**, 3: 1-20.
- Lorito, M., Peterbauer, C., Hayes, Ch.K. and Harman, G.E. 1994. Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. **Microbiology**, 140: 623-629.
- Lumsden, R.D. and Locke, J.C. 1989. Biological control of damping-off caused by *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* with *Gliocladium virens* in soilless mix. **Phytopathology**, 79(3): 361-366.
- Mantzouridou, F., Roukas, T. and Kotzekidou, P. 2002. Effect of the aeration rate and agitation speed on β -carotene production and morphology of *Blakeslea trispora* in

- stirred tank reactor: mathematical modeling. *Biochemical Engineering Journal*, 10:123-135.
- Marshall, M.A. and Timberlake, W.E. 1991. *Aspergillus nidulans wetA* activates spore-specific gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, 11(1):55-62
- Marten, M.R., Velkovska, S., Khan S.A. and Ollas, D.F. 1996. Rheological, mass transfer, and mixing characterization of cellulose-producing *Trichoderma reesei* suspensions. *Biotechnology Progress*, 12:602-611.
- Metcalf, D.A. and Wilson, C.R. 2001. The process of antagonism of *Sclerotium cepivorum* in white rot affected onion roots by *Trichoderma koningii*. *Plant Pathology*, 50: 249-257.
- Moore-Landecker, E. 1996. Sporulation. En: *Fundamentals of the Fungi*. Prentice Hall (ed), Upper Saddle River, New Jersey, pp. 311-331.
- Muñoz, G., Nakari-Setälä, T. and Agosin E. 1997. Hydrophobin gene *srh1*, expressed during sporulation of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Current Genetics*, 32: 225-230.
- Muñoz, G.A., Agosin, E., Cotoras, M., San Martin, R. and Volpe, D. 1995. Comparison of aerial and submerged spore properties for *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters*, 125: 63-70.
- Papavizas, G.C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 23: 23-54.
- Papavizas, G.C., Dunn, M.T., Lewis, J.A. and Beagle-Ristaino. 1984. Liquid fermentation technology for experimental production of biocontrol fungi. *Phytopathology*, 74(10): 1171-1175.
- Park, J.P., Kim, Y.M., Hwang, H.J, Cho, Y.J., Lee, Y.S., Song, C.H. and Yun, J.W. 2002. Effect of agitation intensity on the exo-biopolymer production and mycelial morphology in *Cordyceps militaris*. *Letters in Applied Microbiology*, 34:433-438.

- Pascual, S., De Cal, A., Magan, N. and Melgarejo, P. 2000. Surface hydrophobicity, viability and efficacy in biological control of *Penicillium oxalicum* spore produced in aerial and submerged culture. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 847-853.
- Pascual, S., Melgarejo, P. and Magan, N. 1997. Induction of submerged conidiation of the biocontrol agent *Penicillium oxalicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48: 389-392.
- Puyesky, M., Benhamou, N., Ponce Noyola, P., Bauw, G., Ziv, T., Van Montagu, M., Herrera-Estrella, A. and Horwitz, B.A. 1999. Developmental regulation of *cmp1*, a gene encoding a multidomain conidiospore surface protein of *Trichoderma*. *Fungal Genetics and Biology*, 27: 88-99.
- Rocha-Ramírez, V., Omero, C., Chet, I., Horwitz, B.A. and Herrera-Estrella, A. 2002. *Trichoderma atroviride* G-protein α -subunit gene *tga1* is involved in mycoparasitic coiling and conidiation. *Eukariotic Cell*, 1(4): 594-605.
- Sewall, T.C., Mims, Ch.W. and Timberlake, E. 1990. *abaA* controls phialide differentiation in *Aspergillus nidulans*. *The Plant Cell*, 2:731-739.
- Skromne, I., Sanchez, O. and Aguirre, J. 1995. Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans* *brlA* regulatory gene. *Microbiology*, 141:21-28
- Thomas M.B. 1999. Ecological approaches and the development of "truly integrated" pest management. *Proceeding of the National Academy of Sciencies*, 96: 5944-5951.
- Thomas, M.B. and Willis, A.J. 1998. Biocontrol-risky but necessary? *Perspectives*, 13(8): 325-329.
- Tronsmo, A and Dennis, C. 1977. The use of *Trichoderma* species to control strawberry fruit rots. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 83: 449-455.
- Viterbo, A., Ramot, O., Chernin, L. and Chet, I. 2002. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma spp.* in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81: 549-556.

- Yu, X., Hallett, S.G., Sheppard, J. and Watson, A.K. 1998. Effects of carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio on growth, conidiation, spore germination and efficacy of the potential bioherbicide *Colletotrichum coccodes*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 20: 333-338.
- Zar, J. H. 1999. **Biostatistical Analysis**, Fourth edition, Upper Saddle River, New Jersey.
- Zheng, Z. and Shetty, K. 2000. Enhancement of pea (*Pisum sativum*) seedling vigour and associated phenolic content by extract of apple pomace fermented with *Trichoderma* spp. **Process Biochemistry**, 36: 79-84.

Apéndice 1

La siguiente tabla muestra los datos típicos que se generan al realizar un análisis de varianza de un arreglo experimental (factorial).

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de F	Probabilidad de F
Modelo	228.00	3	76.00	13.57	0.0001
Residuos	112.00	20	5.60		

Factor	Coefficiente estimado	Grados de libertad	Error estándar	t para Ho Coef.=0	Probabilidad de t
Media general	72.25	1	0.46		
Catalizador	-4.00	1	0.46	-8.66	0.0001
Temperatura	12.00	1	0.46	25.99	0.0001
Concentración	-2.75	1	0.46	-5.96	0.0001

Ecuación final en términos de los factores actuales:

- **Modelo:** Términos que estiman el efecto del tratamiento (entre la variación de tratamientos).

Suma de cuadrados: Suma de la varianza de la media del tratamiento de la media global.

$$\text{Suma de cuadrados} = \sum(\text{número de puntos en tratamiento } t)(\text{media de cada tratamiento} - \text{media global})^2$$

$$= (4)(-3^2) + (6)(4^2) + (8)(-3^2)$$

$$= 36 + 24 + 96 + 72$$

$$= 228$$

Grados de libertad: Grados de libertad. La desviación de la media del tratamiento del promedio global debe sumar cero. Dada tres desviaciones medias, la otra desviación puede ser determinada. Los grados de libertad para las desviaciones es, por tanto, uno menos que el número de medias.

$$= 4 \text{ tratamientos} - 1 = 3$$

Cuadrado medio: Es el valor del cociente entre el valor de la suma de cuadrados_{modelo} y los grados de libertad.

$$\text{Cuadrado medio} = 228/3 = 76$$

- **Residuos:** Término que estima el error experimental (dentro de la variación del tratamiento).

Suma de cuadrados: Suma de la varianza de los datos de respuesta individual de su media del tratamiento.

Grados de Libertad: Grados de libertad. La desviación de los puntos individuales en un tratamiento del promedio del tratamiento debe sumar cero.

$$\text{Grados de libertad} = N - t$$

Donde N es el número de datos

$$\text{Grados de libertad} = 24 - 4 = 20$$

Cuadrado medio: Es el valor del cociente entre el valor de la suma de cuadrados_{residuos} y los grados de libertad.

$$\text{Cuadrado medio} = 112/20 = 5.6$$

Valor "F": Prueba para comprobar la varianza del tratamiento con la varianza del error.

$$= \text{Cuadrado medio del modelo} / \text{Cuadrado medio de residuos}$$

$$= 76/5.6 = 13.5714$$

Prob > F: Probabilidad de ver el valor de F observado si la hipótesis nula (H_0) es verdadera. Valores de probabilidad pequeños determinan el rechazo de la hipótesis nula.

= 0.0001 o menor de las tablas de distribución F para 3 y 20 grados de libertad.

- **Factor:** Variables experimentales seleccionadas e incluidas en el modelo predictivo.

Coefficiente estimado: Términos en el modelo predictivo.

Grados de libertad: Igual a 1 en este caso

Error estándar: La desviación estándar asociada con el coeficiente estimado.

t para H_0 Coef. = 0: El número de desviaciones estándar donde el coeficiente esta lejos de ser cero.

= (Coeficiente estimado)/(Error estándar).

= $-4/0.46170 = -8.664$

Prob > |t|: Probabilidad de ver el valor absoluto del valor de t observado si la hipótesis nula (H_0) es verdadera. Valores pequeños de probabilidad determinan el rechazo de la hipótesis nula.

Debajo de la tabla de coeficientes, el programa muestra ecuaciones predictivas de los factores actuales.

Apéndice 2

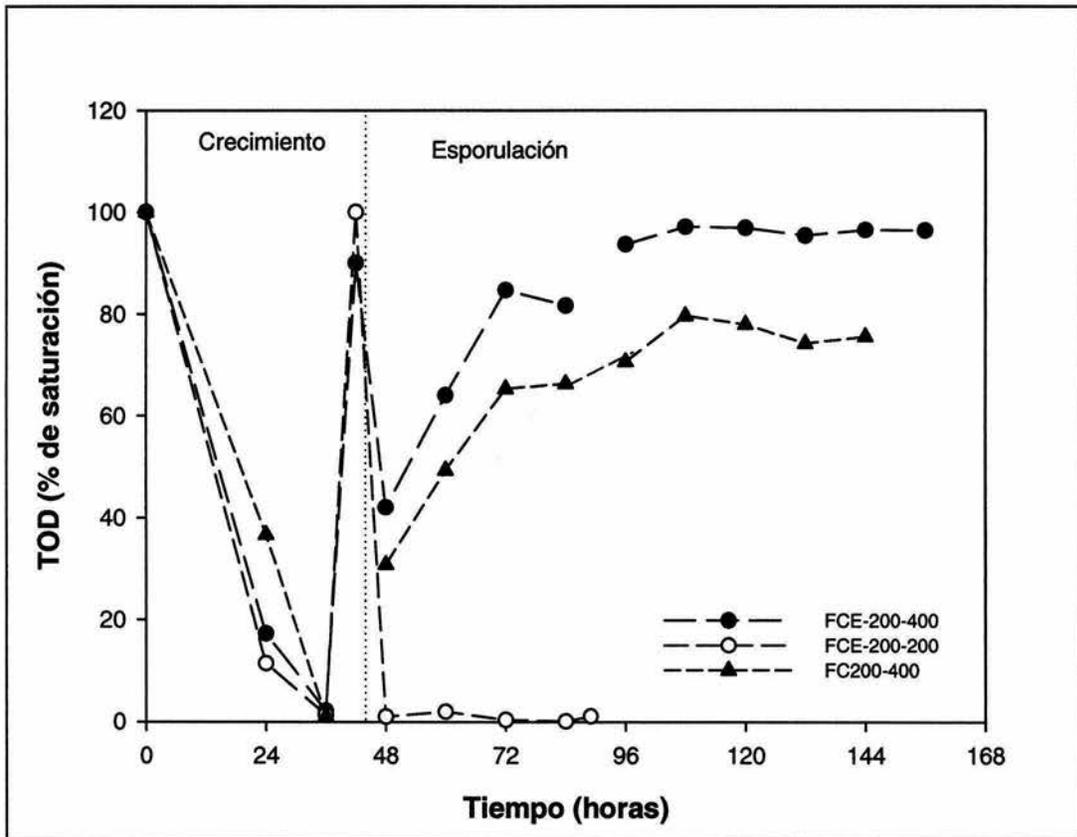


Figura 9.1. Cinéticas de tensión de oxígeno disuelto durante el proceso crecimiento-esporulación.