

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**TESIS DE BACHILLERATO
EN INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**EVALUCIÓN DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES PARA
LA PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE *TRICHODERMA SPP* MEDIANTE
FERMENTACIÓN EN LÍQUIDO Y SÓLIDO**

Tania María Gómez Bolívar

Cartago, 2017

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**TESIS DE BACHILLERATO
EN INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES
PARA LA PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE *TRICHODERMA SPP* MEDIANTE
FERMENTACIÓN EN LÍQUIDO Y SÓLIDO**

Tania María Gómez Bolívar

Cartago, 2017

EVALUACIÓN DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES PARA LA PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE *TRICHODERMA SPP* MEDIANTE FERMENTACIÓN EN LÍQUIDO Y SÓLIDA.

Tania Gómez Bolívar

RESUMEN

Los hongos son conocidos como saprofitos de alimentos y patógenos, sin embargo, algunos son beneficiosos debido a su gran capacidad de producir enzimas y metabolitos. Existen biocontroladores los cuales son de gran interés agrícola por su capacidad de controlar fitopatógenos. *Trichoderma spp.* es uno de los más versátiles y polifacéticos que existen en los suelos, su característica principal es la capacidad de antagonizar patógenos, además de formar asociaciones con las raíces de las plantas de forma que mejora la absorción de nutrientes y por otro lado activa la respuesta de defensa de las plantas ante el ataque de patógenos. El objetivo de este trabajo es evaluar distintos sustratos y condiciones para la producción de conidios de *Trichoderma spp.* mediante la fermentación en líquido y en sólido. Para esto primeramente se evaluó en la fermentación líquida distintos medios de cultivo, donde el mejor resultado se obtuvo con el medio de cebada con $2,0 \times 10^8$ conidios/ml al tercer día de fermentación y al presentar numerosas complicaciones, como contaminación bacteriana y producción de otras estructuras, se decidió continuar con la fermentación sólida y optimizar las condiciones bajo estos otros sistemas de cultivo. Los sustratos evaluados en la fermentación sólida fueron: arroz, puntilla-granza, puntilla-granza-linaza y puntilla-broza, bajo diferentes condiciones: distintas concentraciones de inóculo ($2,0 \times 10^5$ y $2,0 \times 10^6$ conidios/ml), temperaturas de 25°C y 30°C, fotoconidiación (luz azul y luz blanca), tiempo de apertura de la bolsa e inóculo micelial. Resultando como mejores sustratos la puntilla-granza-linaza y la puntilla-granza con el mayor inóculo, y por otro lado el inóculo micelial o fermentación bifásica logra acortar los tiempos de fermentación. Mientras que la utilización de la temperatura de 30°C permite usar el sustrato Puntilla-Broza, además de mejorar el proceso de secado sin afectar la germinación.

Palabras clave: Fermentación, conidiación, sustratos, Luz.

**EVALUACIÓN DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES
PARA LA PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE *TRICHODERMA SPP* MEDIANTE
FERMENTACIÓN EN LÍQUIDO Y SÓLIDA.**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica
como requisito parcial para optar al título de Bachillerato en Ingeniería en
Biotecnología**

Miembros del tribunal

X

Lic. Alexander Schmidt Durán
Profesor Asesor- ITCR

X

Lic. Alejandra Robles Chaves
Asesor-ICAFE

X

M.Sc. Catalina Rosales López
Lector

DEDICATORIA

A mis padres, por siempre creer en mí y apoyarme en todo lo que necesité, gracias a ellos es que logré realizar este proyecto.

A mi hermana María por acompañarme, aconsejarme y ser mi sostén en los momentos más difíciles.

A mi sobrina Natalia, que viene en camino y es una gran motivación y esperanza para lo que se avecina.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, Lic. Alejandra Robles por sus consejos, recomendaciones y esfuerzo a lo largo de todo el proyecto.

A mi tutor, Lic. Alexander Schmidt por siempre atender a mis consultas y brindarme apoyo y recomendaciones para la realización del proyecto de la mejor forma.

A mi lectora, M.Sc. Catalina Rosales por sus recomendaciones y buenos deseos en la última etapa del proyecto.

Al personal del Laboratorio de Fitoprotección del CICAPE, por su ayuda y apoyo moral que me dieron durante la realización de las pruebas.

INDICE GENERAL

RESUMEN.....	3
DEDICATORIA.....	5
AGRADECIMIENTOS.....	6
INDICE GENERAL.....	7
INDICE DE CUADROS.....	9
INDICE DE FIGURAS.....	9
INTRODUCCIÓN.....	13
REVISIÓN DE LITERATURA.....	15
1. Hongos.....	15
2. Hongos Fitopatógenos.....	17
2.1. Ceratocystis sp.....	19
3. Hongos benéficos.....	20
4. Trichoderma.....	21
4.1. Generalidades.....	21
4.2. Clasificación Taxonómica.....	21
4.3. Características Macroscópicas.....	22
4.4. Características Microscópicas.....	22
4.5. Conidiogénesis.....	23
4.6. Factores que afectan el crecimiento.....	23
4.7. Control biológico.....	26
5. Fermentación.....	28
5.1. Fermentación líquida.....	28
5.2. Fermentación sólida.....	29
5.3. Procesos fermentativos con Trichoderma.....	30
OBJETIVOS.....	32
Objetivo General.....	32
Objetivos Específicos.....	32
MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
1. Localización.....	33
2. Microorganismo.....	33
3. Inóculo.....	33

4.	Fermentación Líquida.....	33
4.1.	Medios de cultivo líquido.....	33
4.2.	Condiciones de fermentación líquida.....	34
4.3.	Fermentadores	34
4.4.	Sistema de aireación.....	35
5.	Fermentación Sólida.....	35
5.1.	Evaluación de sustratos	36
5.2.	Condiciones de cultivo.....	36
5.3.	Otros parámetros evaluados	38
5.3.1.	Diferentes concentraciones de inóculo.....	38
5.3.2.	Fotoconidiación	38
5.3.3.	Tiempo de aireación (apertura de bolsa)	38
5.3.4.	Temperatura.....	38
5.3.5.	Inoculo micelial	39
	RESULTADOS	39
1.	Fermentación Líquida.....	39
2.	Fermentación Sólida.....	42
2.1.	Evaluación de sustratos	42
2.2.	Otros parámetros evaluados:	44
2.2.1.	Diferentes concentraciones de inóculo.....	44
2.2.2.	Fotoconidiación-Luz Azul:.....	46
2.2.3.	Fotoconidiación-Luz Blanca	48
2.2.4.	Tiempo de aireación (apertura de la bolsa)	50
2.2.4.1.	Primer Día.....	50
2.2.4.2.	Segundo día.....	52
2.2.5.	Temperatura.....	52
2.2.5.1.	Temperatura de 25°C	52
2.2.5.2.	Temperatura de 30°C	54
2.3.	Inoculo micelial.....	56
3.	Imágenes obtenidas de la Fermentación Sólida.....	58
	DISCUSIÓN.....	60
1.	Fermentación líquida	60

1.1.	Justificación de los medios de cultivo utilizados	60
1.2.	Dificultades del sistema de cultivo líquido	62
2.	Fermentación Sólida.....	64
2.1.	Justificación de los sustratos utilizados.....	65
2.2.	Evaluación de sustratos	67
2.3.	Otros parámetros evaluados	67
2.3.1.	Diferentes concentraciones de inóculo	67
2.3.2.	Fotoconidiación.	68
2.3.3.	Tiempo de aireación.	69
2.3.4.	Temperatura.....	71
2.3.5.	Inóculo micelial	72
2.4.	Comparación de fermentación líquida con respecto a la fermentación sólida. ..	73
	CONCLUSIONES.....	75
	RECOMENDACIONES	76
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	77

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	División principal de los phyllos de los hongos con sus características principales	13
Cuadro 2.	Clasificación taxonómica del género Trichoderma	20
Cuadro 3.	Descripción de los medios de cultivo evaluados	32
Cuadro 4.	Diferentes sustratos probados para el crecimiento de Trichoderma	34
Cuadro 5.	Agrupación de las medias de la concentración de conidios de Trichoderma utilizando método de Tukey y una confianza de 95%	41
Cuadro 6.	Agrupación de las medias de la concentración de conidios de Trichoderma utilizando método de Tukey y una confianza de 95%	43
Cuadro 7.	Porcentaje de Germinación de esporas, antes y después del proceso de secado.	43
Cuadro 8.	Porcentaje de humedad contenido en cada medio, antes y después del proceso de secado	44
Cuadro 9.	Agrupación de las medias de la concentración de conidios de Trichoderma utilizando método de Tukey y una confianza de 95%	45

Cuadro 10. Porcentaje de Germinación de esporas, antes y después del proceso de secado.	48
Cuadro 11. Porcentaje de humedad contenido en cada medio, antes y después del proceso de secado.....	48
Cuadro 12. Agrupación de las medias de la concentración de conidios de Trichoderma utilizando método de Tukey y una confianza de 95%.....	49
Cuadro 13. Porcentaje de germinación de esporas antes y después del secado	50
Cuadro 14. Porcentaje de humedad contenido en cada medio, antes y después del proceso de secado.....	50
Cuadro 15. Agrupación de las medias de la concentración de conidios de Trichoderma utilizando método de Tukey y una confianza de 95%.	51
Cuadro 16. Porcentaje de Germinación de esporas, antes y después del proceso de secado.	52
Cuadro 17. Porcentaje de humedad contenido en cada medio, antes y después del proceso de secado.....	52
Cuadro 18. Agrupación de las medias de la concentración de conidios de Trichoderma utilizando método de Tukey y una confianza de 95%.....	53
Cuadro 19. Porcentaje de Germinación de esporas, antes y después del proceso de secado.	54
Cuadro 20. Porcentaje de humedad contenido en cada medio, antes y después del proceso de secado.....	54
Cuadro 21. Agrupación de las medias de la concentración de conidios de Trichoderma utilizando método de Tukey y una confianza de 95%	55
Cuadro 22. Porcentaje de Germinación de esporas, antes y después del proceso de secado.	56
Cuadro 23. Porcentaje de humedad contenido en cada medio, antes y después del proceso de secado.....	56
Cuadro 24. Agrupación de las medias de la concentración de conidios de Trichoderma utilizando método de Tukey y una confianza de 95%.....	57
Cuadro 25. Porcentaje de germinación de esporas de Trichoderma.....	58
Cuadro 26. Porcentaje de humedad contenido en cada medio, antes y después del proceso de secado.....	58
Cuadro 27. Información nutricional de los sustratos utilizados en la fermentación líquida.	61
Cuadro 28. Información nutricional de macro y micronutrientes presentes en los sustratos utilizados.....	65

Cuadro 29. Comparación detallada de la fermentación sólida con respecto a la fermentación líquida.....	73
--	----

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Beneficios y desventajas de los hongos.	17
Figura 2. Placa Petri de Trichoderma esporulada.	22
Figura 3. Fermentador acoplado al sistema de aireación.	35
Figura 4. Esporas de Trichoderma germinadas y sin germinar en un aumento de 40X en microscopio óptico.	37
Figura 5. Concentración de conidios de Trichoderma spp producidos en diferentes medios de cultivo.	40
Figura 6. Concentración de conidios producidos a través del tiempo por Trichoderma spp.	40
Figura 7. Agregación de micelio en medio de cultivo líquido, aumento 10X.....	41
Figura 8. Clamidósporas de Trichoderma en medio líquido.	41
Figura 9. Conidios de Trichoderma en medio líquido, aumento 40X en microscopio óptico.	42
Figura 10. Conidiación de Trichoderma sp. con respecto al tiempo en fermentación sólida con diferentes sustratos.....	43
Figura 11. Curva de conidiación de Trichoderma spp, a partir de la utilización de cuatro..	44
Figura 12. Comportamiento de la producción de conidios, en los diferentes sustratos, aplicando luz azul como variante..	46
Figura 13. Comportamiento de la producción de conidios ante la exposición de luz blanca, en los diferentes sustratos.	49
Figura 14. Comportamiento de producción de conidios, en los diferentes sustratos, abriendo la bolsa al primer día de inoculado.....	51
Figura 15. Curva de conidiogénesis de Trichoderma, ante la utilización de cuatro sustratos a 25 °C de temperatura.	53
Figura 16. Logaritmo de la concentración de conidios, de Trichoderma, durante 7 días a una temperatura de 30°C.....	55
Figura 17. Concentración de conidios de Trichoderma spp. utilizando inóculo fermento líquido (A: azúcar más extracto de levadura; B: melaza más extracto de levadura).....	57
Figura 18. Conidios de Trichoderma en cámara de Neubauer crecidos en sustrato sólido. Aumento de 10X en microscopio óptico.	59

Figura 19. Vista macroscópica de Trichoderma después del proceso de secado de la fermentación sólida en el sustrato P-G.	59
Figura 20. Vista macroscópica de Trichoderma después del proceso de secado de la fermentación sólida en el sustrato P-B.	60
Figura 21. Señalización de las células vecinas ante un daño mecánico para inducir la conidiación	70

INTRODUCCIÓN

El café representa una de las cinco exportaciones más valiosas de los países en desarrollo (FAO, 2015). Además, le genera empleo a más de 25 millones de personas en todo el mundo (O'Brien & Kinnaird, 2003). De hecho, el mayor exportador de café en el mundo corresponde a Brasil con 17 699 sacos de 60 kg, seguido por Vietnam con 12 463 sacos de 60 kg, esto en el segundo semestre del 2016 (Organización Internacional del Café, 2017).

En Costa Rica 84 133,1 hectáreas corresponden al cultivo de café, es decir un 3,5% del total de las fincas agropecuarias del país se dedican a la siembra de dicho cultivo (INEC, 2014). Según el Banco Central de Costa Rica para el primer semestre del 2016 se exportó un total de 5 634,5 quintales de café, siendo el café una actividad económica de gran importancia en el país.

Una de las enfermedades que afectan este cultivo es conocida como “Llaga Macana” la cual es causada por el hongo *Ceratocystis fimbriata*, el cual provoca la muerte completa de la planta antes de que se perciban síntomas ocasionando pérdidas económicas considerables. Es una enfermedad que se encuentra en gran parte del país, pero se presenta con mayor frecuencia en zonas de altura y cafetales antiguos. Con el fin de combatir y prevenir ésta enfermedad, el Centro de Investigaciones en Café (CICAFE) produce el hongo *Trichoderma spp.* para distribuirlo a los caficultores que presenten el problema o bien pretenden prevenirlo (ICAFE, 2011).

Orrala (2013) refiere que varias cepas de *Trichoderma spp* tienen la capacidad de colonizar la superficie de la raíz a partir de las semillas previamente tratadas y de las plantas adultas existentes en el suelo, resguardando a las mismas de enfermedades fungosas. Así las semillas reciben una cobertura protectora cuyo efecto se muestra cuando la misma es plantada en el sustrato correspondiente. Las semillas agrícolas, tratadas con *Trichoderma* protegen eficientemente las plántulas en el semillero sin necesidad de tratamiento del suelo previo a la siembra.

Actualmente el Centro de Investigación en Café (CICAFE) perteneciente al Instituto del Café de Costa Rica (ICAFE) produce *Trichoderma spp.* mediante fermentación sólida, sin embargo, este presenta desventajas como problemas de abastecimiento de la materia prima

(arroz) por fluctuaciones de su precio y competencia por consumo humano. Asimismo, demanda un gran espacio físico para desarrollar una capacidad de producción media, así como mucha mano de obra.

Dada la situación, producir el biocontrolador bajo una fermentación líquida o bien optimizar el proceso de producción en matriz sólida, determinando el medio y condiciones más favorables es de suma importancia para el CICAPE y para el país, ya que permitirá otorgarle al agricultor una herramienta para el tratamiento de enfermedades fúngicas como lo es la llaga macana.

REVISIÓN DE LITERATURA

1. Hongos

Los hongos comprenden una gran variedad de microorganismos, de hecho, son los eucariotas más abundantes sobre la biosfera de la Tierra. Dichos organismos son, originalmente, microorganismos eucariotas heterotróficos que albergan quitina en sus paredes celulares y carecen de plastidios en su citoplasma. La distribución de hongos entre los diversos nichos ecológicos de la biosfera, parece ser infinito. Las estimaciones sugieren un total de 1,5 millones de especies de hongos, sólo menos de la mitad ha sido descrito aún (Newcombe & Dugan, 2010).

El reino de hongos contiene un subreino, siete filos y diez subfilos. El reino hongos contiene los siguientes filos: Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Incertae sedis y Zygomycota. Filo también puede ser referido como divisiones (Buller, 2014).

Cuadro 1. División principal de los phylos de los hongos con sus características principales.

Filos	Características y observaciones
Basidiomycota	Este grupo contiene las setas y hongos con cuerpos fructíferos. Las esporas se producen en una célula característica llamada basidio.
Ascomycota	Son hongos filamentosos. El mayor número de especies se encuentra en este grupo, como los hongos de copa y los hongos en frasco. Las esporas se producen en una estructura parecida a un saco llamada asca).
Zygomycota	En su mayoría especies microscópicas, los moldes pin con hifas cenocíticas.
Incertae sedis	Especies a las que no se les puede clasificar taxonómicamente de forma temporal, por información insuficiente.

Chytridiomycota	Parásitos microspóricos, micelio cenocítico, presentan hifas simples elongadas o micelio bien desarrollado. Son poco evolucionados.
Glomeromycota	Sin reproducción sexual, son simbioses obligados de plantas conocidos como micorrizas, infectan alrededor del 90% de las especies de plantas del planeta, se dividen en endomicorrizas y eptomicorrizas. Su especie más conocida es <i>Glomus sp.</i>

Fuente: (Goyal *et al.*, 2016, Buller, 2014)

Los hongos pueden ser encontrados en casi todos los tipos de hábitats. Sus especies son muy diversas en caracteres morfológicos con una plétora de metabolitos secundarios. Estos metabolitos hacen que algunos de los hongos sean beneficiosos, como también patógenos. Muchos de estos metabolitos secundarios presentan efectos nocivos como las micotoxinas. Los hongos son notoriamente conocidos como saprofitos de alimentos, causando daños a los alimentos cocidos y granos, y como patógeno de las plantas, causando varias enfermedades graves. Sin embargo, los hongos son beneficiosos para la humanidad como productores de antibióticos, colorantes alimentarios, enzimas y como alimento nutritivo (Stoppacher *et al.*, 2010). (Ver figura 1).

Crecen rápidamente en la superficie de la planta /huésped para evitar que otros competidores lleguen a su fuente de nutrientes. Algunos viven en simbiosis con el huésped y algunos de los organismos muertos. Para sobrevivir, los hongos han desarrollado una serie de estrategias de protección y comunicación, una de las cuales es la producción de diferentes tipos de metabolitos secundarios (Stoppacher *et al.*, 2010).



Figura 1. Beneficios y desventajas de los hongos. Fuente: Stoppacher *et al.*, 2010.

Los efectos benéficos de los hongos son relativamente recientes (excepto las aplicaciones en la elaboración de quesos), como productores de varias enzimas (celulasa, lipasa, enzimas ligninolíticas), alcaloides (alcaloides del cornezuelo de centeno de *Claviceps*), pigmentos (antraquinona, betalainas), aroma y sabores, también en el control biológico de los patógenos, y con beneficios para la salud, como los hongos comestibles (fuente de selenio, potasio, riboflavina, niacina, vitamina D, proteínas) (Velišek & Cejpek, 2011; Beckmann & Barrow, 2014).

2. Hongos Fitopatógenos

Se debe tomar en consideración la posición geográfica del país, ya que, al encontrarse en una zona tropical, favorece el crecimiento de los hongos, ya sean beneficiosos o no (Jiménez & Valerín, 2012).

Los patógenos de suelo son por definición residentes del suelo, por etapas extensas o cortas de tiempo. Los órganos subterráneos de las plantas son afectados directamente y las partes aéreas son afectadas indirectamente por estos patógenos. Las enfermedades por hongos de suelo por lo general son más difíciles de controlar que las provocadas por patógenos foliares (Calle, 2006).

Dentro de los principales hongos fitopatógenos presentes en Costa Rica se encuentran: *Fusarium oxysporum*, *Mycosphaerella sp.*, *Eryshipe sp*, *Stromatinia cepivora*, *Uromyces appendiculatus*, *Collectotrichum lindemuteanum*, *Phytium sp*, *Rhizoctonia sp*, *Hemileia vastatrix*, *Mycena citricolor*, *Mycosphaerella fijiensis* entre otros (Rivera, 2014).

Por ejemplo el patógeno que infecta las raíces *Fusarium oxysporum* (agente causante de la enfermedad de marchitez de *Fusarium*) causa pérdidas generalizadas en muchas especies vegetales. Las esporas de este patógeno sobreviven en el suelo durante largos períodos de tiempo; por lo tanto, es difícil de erradicar después de que el suelo se encuentra contaminado y provocan el bloqueo del transporte de agua y solutos, causando la marchitez de la planta (Tratcher *et al.*, 2016).

Mycosphaerella fijiensis es el agente causal de la sigatoka negra, una enfermedad foliar devastadora del banano que puede causar 20-80% de pérdida de rendimiento en ausencia de fungicidas. Ha sido difícil de controlar debido a la falta de resistencia efectiva en las plantas huésped y por el desarrollo de la insensibilidad fungicida en las poblaciones de los patógenos (Goodwin & Kema, 2014).

Mycena citricolor es el agente causal de la enfermedad conocida como “ojo de gallo” la cual afecta la parte aérea de la planta tal como hojas y frutos. El principal problema de esta enfermedad es que, al afectar hojas y frutos, causa la defoliación de la planta y la caída de los frutos de forma rápida y severa (Otiniano *et al.*, 2015).

La roya de la hoja del café, causada por el hongo biotrófico *Hemileia vastatrix* es la enfermedad más devastadora que afecta a las plantas de café en Brasil y puede causar pérdidas de rendimiento del 35 al 50% (Zambolim *et al.*, 2002). Las pústulas de las hojas adaxiales de hojas reducen drásticamente la fotosíntesis y provocan una intensa defoliación, lo que reduce el rendimiento (Zambolim *et al.*, 2002).

Ya sea que los hongos fitopatógenos ataquen las partes subterráneas o las partes aéreas de una u otra forma causan numerosas pérdidas económicas en los cultivos. Por lo que es necesario prevenirlos, atacarlos y erradicarlos de forma que las alternativas biológicas se convierten en una opción llamativa, evitando la toxicidad de los compuestos químicos.

2.1. *Ceratocystis sp*

Este hongo, a pesar de no ser uno de los principales fitopatógenos del país, causa una enfermedad en el cultivo de café, la cual es de particular interés para el CICAFFE.

Ceratocystis sp. es un género de hongos filamentosos que incluye patógenos agresivos de cultivos económicamente importantes en todo el mundo. Este hongo es el agente causal de la enfermedad de marchitez y es comúnmente conocida como el “cáncer” de los cultivos que ataca. Frecuentemente provoca la muerte de la planta que coloniza, lo que causa grandes pérdidas en la producción agrícola. En las últimas dos décadas, las enfermedades relacionadas con las infecciones por *Ceratocystis* han incrementado considerablemente (Cabrera, 2016).

La enfermedad del cáncer de café se ha convertido en una de las amenazas más importantes para la producción de café en Colombia, causando pérdidas equivalentes a US \$ 174 por hectárea y disminuyendo la densidad de árboles de café de 1 000 árboles por hectárea a 950 árboles por hectárea (Castro, 1998). También en Colombia, la enfermedad de la *Ceratocystis* en los cítricos ha causado pérdidas significativas, estimadas entre 1 y 10% de la producción total (Capera-Borja *et al.*, 1995).

Los síntomas en las plantas no son visibles, hasta que ya es demasiado tarde para aplicar algún producto como fungicidas de carácter químico, dado que cuando la planta ya está infectada, no detienen el avance del patógeno. Por otro lado, los tratamientos preventivos solo retrasan la aparición de la enfermedad. Erradicar la enfermedad sólo es posible aplicando buenas prácticas agrícolas como remover todos los árboles infectados, vendaje de heridas y aplicación de productos regularmente en el sitio afectado (Cabrera, 2016).

Las características de *Trichoderma* constituyen una alternativa biológica contra esta enfermedad, de modo que es el método preventivo más efectivo, como también por su capacidad antagonista controla la enfermedad ya que, al estar en asociación directa, a largo plazo, con la planta sus metabolitos y señales se activan en presencia del patógeno con el fin de proteger a su huésped. Algo que no es posible con productos químicos como triazoles por su movimiento limitado en el sistema radicular y su poca retención dentro de la planta (Cabrera, 2016).

3. Hongos benéficos

El Micoparasitismo es el ataque directo de un hongo a otro, proceso complejo que involucra eventos secuenciales: reconocimiento, ataque, penetración subsecuente y muerte del huésped (Chavez, 2006). La utilización de micoparacitos así como cepas del género *Trichoderma*, constituyen una alternativa eficaz en el control biológico para combatir enfermedades causadas por hongos, en la actualidad son una alternativa para sustituir el control químico, que además de su elevado costo, desarrolla resistencias por parte de los fitopatógenos, como también trae consigo problemas de contaminación y toxicidad (Torres *et al.*, 2008).

El antagonismo directo es la inhibición del crecimiento del patógeno por medio de una confrontación en cultivo dual (Chakraborty & Chatterjee, 2008). La competencia se define como el comportamiento similar de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, de modo que el uso de este por uno de los organismos, disminuya la disponibilidad de espacio para los demás. Este tipo de antagonismo se ve aventajado por las particularidades del agente de control biológico como lo su velocidad de crecimiento y desarrollo (Martínez *et al.*, 2009).

Un ejemplo de ello son las especies de *Gliocladium* que tienen un efecto antagonista similar al de las especies *Trichoderma* (Mazzola, 2004). *Gliocladium catenulatum* causa distorsión de las células de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium equiseti*, *F. oxysporum*, *F. poae* y *F. sporotrichoides* (Huang *et al.*, 2000; Thomashow, 2002).

El género, *Gliocladium*, ha sido explotado como agente biológico para el control de patógenos vegetales en el suelo. Se sabe que el *Gliocladium* tiene una amplia gama de huéspedes. Algunas de las especies de *Gliocladium* tales como *G. catenulatum*, *G. virens*, *G. roseum* y *G. deliquescens* han sido explotadas por su potencial antagonista contra una variedad de hongos patógenos (Papavizas, 1985, Tesfaye y Kapoor, 2004).

Beuveria bassiana (Bb) por su parte, es bien conocido por producir una gran variedad de metabolitos secundarios biológicamente activos que incluyen pigmentos no peptídicos y policétidos (por ejemplo, oosporeína, bassianina y tenellina), péptidos sin síntesis ribosómica (por ejemplo, beauvericina, bassianolides y beauveriolides) y metabolitos secretados implicados en la patogénesis. Y la virulencia (por ejemplo, ácido oxálico) que tienen usos industriales, farmacéuticos y agrícolas potenciales o realizados (Xu *et al.*, 2009).

El papel importante del Bb como endófito vegetal y antagonista de los hongos patógenos de las plantas sólo se ha hecho evidente en los últimos 20 años (Ownley *et al.*, 2008).

4. Trichoderma

4.1. Generalidades

En la naturaleza existe un conjunto de hongos y bacterias, que exhiben efecto antagónico sobre otros microorganismos. Este efecto es utilizado por el ser humano para diversas aplicaciones, como lo son: la regulación, tanto de patógenos cuyo hábitat es el suelo, como de aquellos que se desarrollan en la parte foliar de las plantas (Martínez, 2012).

El género *Trichoderma* (Ascomycota, Hipocreales) es un hongo cosmopolita, habitante natural del suelo que se presenta en diferentes zonas, especialmente en aquellas que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, así mismo en residuos de cultivos, especialmente en aquellos que son atacados por otros hongos (Carreras, 2011).

Trichoderma es un tipo de hongo anaerobio facultativo que se encuentra de manera natural en un número importante de suelos agrícolas y otros tipos de medios. Es probablemente el hongo beneficioso más versátil y polifacético que abunda en los suelos, que además es capaz de aportar numerosos beneficios que demuestran su valor desde el punto de vista agrícola (Ríos, 2014).

4.2. Clasificación Taxonómica

Cuadro 2. Clasificación taxonómica del género *Trichoderma*

Reino:	Fungi
División	Ascomycota
Subdivisión:	Pezizomycota
Clase:	Sordariomycetes
Orden:	Hypocreales
Familia:	Hypocreaceae
Género:	<i>Trichoderma</i>

Fuente: Rifai (1969)

4.3. Características Macroscópicas

Las colonias son fácilmente reconocibles por su rápido crecimiento y sus coloraciones son: blancas – verdes o amarillo – verdosas; las áreas con colonias se presentan con anillos concéntricos. Los reverses de las colonias son usualmente de colores, amarillo, ámbar o amarillo – verde. En la siguiente figura se muestran las características que presenta *Trichoderma* (Cruz, 2007).

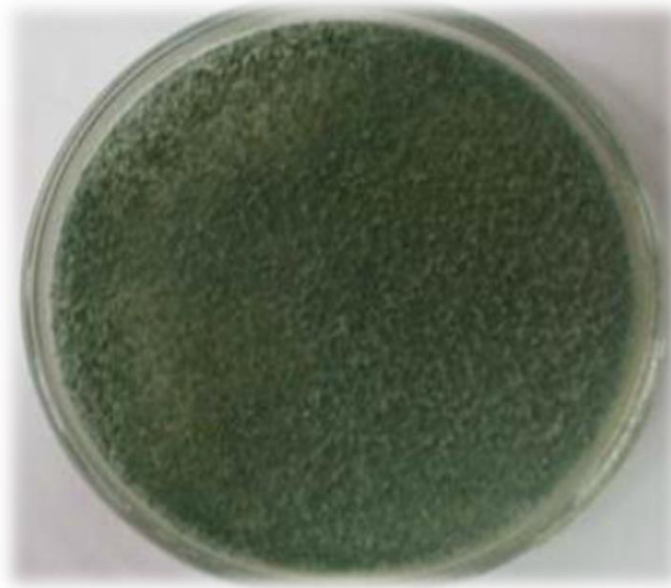


Figura 2. Placa Petri de *Trichoderma* esporulada. (Cruz, 2007).

4.4. Características Microscópicas

El género *Trichoderma* en su estado vegetativo presenta hifas septadas. Las especies son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucano. Se reproducen asexualmente a través de estructuras conocidas como conidios. Presentan conidióforos hialinos ramificados, fiálides simples o en grupos, conidios de 3 a 5 μm de diámetro, usualmente ovalados, unicelulares y coloreados (usualmente verdes). Tiene la capacidad de producir clamidosporas unicelulares, pero pueden unirse entre dos o más. Estas estructuras son producidas bajo condiciones de estrés y son de vital importancia para la sobrevivencia. El organismo crece y se ramifica desarrollando típicas hifas, de 5 a 10 μm de ancho (Harman, 2001).

En respuesta a los estímulos apropiados, *Trichoderma spp* produce abundantes conidios pulverulentos y enteroblásticos (Samuels, 1996, Gams y Bissett, 1998, Steyaert *et al.*, 2010b). Los conidios maduros son de forma elíptica y el tamaño varía entre especies de aproximadamente $2,6 \times 2,0$ a $5,3 \times 4,0$ μm (Samuels, 1996). Se pueden describir cinco estados de conidios: aparecen hifas verticales y luego forman conidióforos, se forman filácidos en los conidióforos y se producen dentro de los fialides conidios hialinos que posteriormente se desarrollan de blanco a amarillo y luego verde para formar la fialoconidia madura (Gressel y Galun , 1967, Betina y Zajacová, 1978, Horwitz et al, 1990, Betina, 1995, Chaverri *et al.*, 2003, Jaklitsch *et al.*, 2006, Samuels & Ismaiel, 2009, Steyaert *et al.*, 2010).

4.5. Conidiogénesis

La conidiogénesis en *Trichoderma* es estimulada por una cascada de señales ambientales, que interactúan entre sí para resultar en una reproducción exitosa. La relación entre estos factores es extremadamente compleja y, a pesar de más de 60 años de investigación sobre el tema, la comprensión de cómo estos factores se interrelacionan está en sus inicios. De hecho, cualquier investigador de conidiación bajo condiciones controladas de laboratorio puede atestiguar hasta qué punto el proceso sigue siendo impredecible (Steyaert *et al.*, 2013).

La conidiación es esencial para la supervivencia de muchas especies de *Trichoderma* en el ambiente y por lo tanto se podría esperar un alto grado de conservación en cómo funcionan los genes de conidiación y se regulan. Sin embargo, se ha demostrado que las respuestas conidiales bajo las mismas condiciones controladas varían mucho entre especies. Puede ser que los genes mismos funcionen de la misma manera, pero las adaptaciones metabólicas específicas de la especie al ambiente alteran los umbrales de la respuesta y por lo tanto la respuesta conidial, enmascara la semejanza en la regulación (Steyaert *et al.*, 2013).

4.6. Factores que afectan el crecimiento

4.6.1. Temperatura

Sun y colaboradores (2010), encontraron que la temperatura de 32°C es la óptima para la síntesis de enzimas. La incubación a una temperatura más baja dio como resultado más tiempo hasta la actividad enzimática máxima. La incubación a temperatura más alta afectó

negativamente al hongo, lo que se reflejó en la síntesis enzimática. Dado que la enzima (celulasa) es un metabolito secundario producido durante la fase de crecimiento exponencial, la incubación a alta temperatura podría conducir a un crecimiento deficiente y, por tanto, a una reducción en el rendimiento enzimático (Sabu *et al.*, 2002). Por otro lado, Chandra y colaboradores (2010) encontraron que para la producción de celulastas la temperatura óptima fue de 28°C, esto utilizando otra especie de *Trichoderma*, evidenciando que el rango de temperatura óptimo va a depender de la especie de *Trichoderma* que se trabaje.

Todas las especies de *Trichoderma* producen suficiente biomasa en diferentes temperaturas siendo estas: 20°C, 25°C, 30°C y 35°C. Aunque se ha encontrado que las temperaturas óptimas para el crecimiento están dentro del rango de 25°C a 30°C (Singh *et al.*, 2014).

4.6.2. Humedad

Uno de los factores más importantes que limitan e influyen fuertemente en el crecimiento de los hongos es la presencia y disponibilidad de agua, que se caracteriza por la humedad relativa del aire y la actividad del agua (*aw*) (Ponizovskaya *et al.*, 2011).

El agua es un componente clave de las células vivas, necesarias para las actividades enzimáticas de los microorganismos y esenciales para su estabilidad y supervivencia (Pitt & Hocking, 2009).

Generalmente, la actividad mínima de agua para la germinación de estos hongos es menor que la del crecimiento micelial. Sin embargo, la actividad de agua mínima para la actividad biológica varía, dependiendo del pH y la temperatura. Además, se reporta que la disponibilidad de agua en el suelo influye en la actividad de biocontrol de diferentes especies aisladas de *Trichoderma* con respecto al parasitismo de *Sclerotinia*, con la actividad de aislamientos variando en diferentes rangos de potencial de agua (Jones *et al.*, 2015).

Tiene la capacidad de adaptarse en medios con humedades de 20-90% pero crece óptimamente en humedades entre 70-80% (Vásquez, 2010).

4.6.3. pH

La adaptación ambiental de los hongos filamentosos al pH permite que estos hongos crezcan en amplios rangos de pH (Peñalva & Arts, 2004). *Trichoderma spp* como muchos otros

microorganismos, puede adaptarse a diferentes pH ambientales cambiando el pH del ambiente circundante para proporcionar condiciones óptimas para la producción de metabolitos (Moreno-Mateos et al., 2007).

Los estudios sobre la variación del pH por diferentes investigadores, revelaron que las especies de *Trichoderma* mostraron un crecimiento óptimo y una tasa de esporulación en un amplio rango de valores de pH entre 2 y 7, aunque el rango de pH más favorable es de 5,5 y 7,5 para producir micelio (Singh et al., 2014).

4.6.4. Luz

La decisión de reproducirse sexual o asexualmente depende de la luz en muchos hongos, aunque la influencia de la luz puede ser positiva o negativa (Debuchy et al., 2010; Rodriguez et al., 2010). En *T. reesei*, el desarrollo sexual es fuertemente potenciado por la luz, pero en contraste con el informe inicial (Seidl et al., 2009) también ocurre en la oscuridad, aunque con retraso significativo (Seibel et al., 2012). Sin embargo, la luz constante también contrarresta el desarrollo sexual (Chen et al., 2012).

La primera descripción del efecto de la luz sobre la conidiación de *Trichoderma* se hizo en 1951 (Lilly & Barnett, 1951). En su trabajo, Lilly y Barnett describieron que, en un medio rico en nutrientes en la oscuridad, este género crece indefinidamente como micelio y que un breve pulso de luz aplicado a la zona de crecimiento activo del micelio conduce a la formación de conidios maduros verde oscuro, formando un anillo en lo que era el borde de la colonia cuando se aplica luz.

El espectro de acción de la fotoconidiación, que muestra la longitud de onda de la luz que se utiliza más eficazmente en esta respuesta fisiológica específica, incluye un pico agudo en la UV cercana a 350- 380 nm y un pico más ancho en el azul con un máximo de 440-450 nm (Gressel & Hartmann, 1968, Kumagai & Oda, 1969).

4.6.5. Nutrición

En el proceso de esporulación de *Trichoderma spp* la fuente de carbono presente en el sustrato es el reactivo en exceso, mientras que el contenido de nitrógeno es el factor limitante de crecimiento. La relación carbono: nitrógeno es esencial ya que de este balance dependerá la formación de las esporas deseadas. Generalmente se utilizan compuestos procedentes de

la agricultura, subproductos de la agroindustria, aunque se prefiere el desecho de compuestos orgánicos debido a que suplen la demanda de nutrientes requeridos por los microorganismos a un bajo costo (Sandoval, 2015, Centeno & Pavone, 2015).

Además, es un organismo capaz de degradar compuestos complejos como, por ejemplo: almidón, pectina, celulosa entre otros. Esto debido al gran complejo enzimático que posee (enzimas hidrolíticas como amilasas, pectinasas, celulasas y quitinasas entre otras) (Kataoka & Takagi, 2013). En cuanto a las fuentes de nitrógeno que puede consumir es muy variado ya que compuestos nitrogenados como aminoácidos, urea, nitritos, amoníaco y sulfato de amonio es capaz de asimilarlos (Baroncelli, *et al*, 2015).

Las necesidades nutricionales de *Trichoderma* sp son poco exigentes debido a que sus requerimientos en cuanto a microelementos, sales y vitaminas son bajos (Sandoval, 2015).

4.7. Control biológico

Druzhinina y colaboradores (2011) señalan que el género *Trichoderma* es un grupo de hongos filamentosos comunes en la rizosfera, donde manifiestan una notable gama de estilos de vida e interacciones con otros hongos, animales y plantas. Sus características más valiosas son su capacidad para antagonizar hongos patógenos, también estimular el crecimiento de las plantas y respuestas de defensa de las mismas, es por lo anterior que algunas cepas se usan para el control biológico de enfermedades de plantas.

Las formulaciones basadas en *Trichoderma* dominan el mercado de los biofungicidas, ya que este microorganismo es comúnmente conocido como supresor de enfermedades de las plantas. Sin embargo, investigaciones identificaron muchos rasgos en *Trichoderma* que extienden las aplicaciones más allá de la protección a la planta. Diversas especies de este género son capaces de aumentar el crecimiento y desarrollo de las raíces, impartir tolerancia a los estreses abióticos y mejorar la absorción y la eficiencia de uso de los micro y macronutrientes, culminando en la mejora de la productividad de los cultivos (Mehetre & Mukherjee, 2015).

La mejora mediada por microorganismos que aumentan la eficiencia en el uso de nutrientes, está adquiriendo mucha importancia, en el contexto de la pérdida gradual de fertilidad /

productividad del suelo que ha resultado de la agricultura intensiva. Además, puede mejorar la productividad de los cultivos, en virtud tanto de la mejor descomposición de la biomasa como de la mejora de la captación de fertilizantes inorgánicos (Mehetre & Mukherjee, 2015).

Inicialmente se pensó que su capacidad de control biológico se basaba en sus efectos supresores directos sobre los patógenos de las plantas, siendo la mayoría de las cepas con potencial micoparasítico y produciendo una gran variedad de enzimas y metabolitos secundarios (Martínez *et al.*, 2016). Pero se encontró que este bioagente, también forma asociaciones con micorrizas, aumentando de manera significativa la rizosfera del suelo, permitiéndole a las plantas hacer una mayor extracción de nutrientes y con un alto grado de asimilación (Ríos, 2014; Aceves *et al.*, 2013).

Se cree que el micoparasitismo es el estilo de vida ancestral de *Trichoderma*, pero también producen una cantidad impresionante de compuestos antimicrobianos y enzimas (Kubicek *et al.*, 2011) Estos comprenden tanto compuestos volátiles como no volátiles, incluyendo pironas, tricotecenos y terpenoides, así como péptidos no ribosómicos tales como peptaiboles, que son capaces de matar a los patógenos de plantas (Mukherjee *et al.*, 2013).

Más recientemente, sin embargo, se demostró que *Trichoderma* también puede proteger la planta huésped contra la infección incluso cuando no hay contacto directo entre ella y el patógeno, lo que indica que puede ocurrir a través de mecanismos mediados por plantas (Vos *et al.*, 2014).

Por otro lado, este hongo también fue reconocido como un colonizador oportunista de la raíz de la planta que puede desencadenar la resistencia sistémica inducida (ISR) en la planta, típicamente llevando a una activación sistémica más rápida y robusta de defensas después del ataque del patógeno. *Trichoderma* es inicialmente también percibido por la planta huésped como un potencial invasor. Por lo tanto, necesita encontrar una forma de tratar con la respuesta de defensa de la planta, ya sea evitándola o suprimiéndola, con el fin de establecer una interacción duradera con su huésped (Martínez *et al.*, 2016).

Estos hongos son altamente oportunistas y pueden adaptarse a una amplia gama de condiciones climatológicas y ecológicas. Esto se ilustra por el hecho de que las cepas de *Trichoderma* no sólo pueden encontrarse en suelos de todo el mundo, sino que también son

capaces de colonizar las raíces de las plantas, las partes de las plantas sobre el terreno y muchos otros sustratos como la madera e incluso otros hongos (Druzhinina *et al.*, 2011).

Un estudio de 1100 cepas de este hongo encontró que todas las cepas poseen potencial de micoparasitismo, lo que ilustra la importancia de este rasgo en el género (Druzhinina *et al.*, 2011).

Trichoderma, posee aislamientos con poderes antibióticos, los cuales actúan contra varios microorganismos fitopatógenos. Se comporta como saprofito en la rizósfera, siendo capaz de destruir residuos de plantas infectadas por patógenos. Se considera que su acción es antagonista, siendo capaz de sacar el mejor provecho por su alta adaptación al medio y por competir por el sustrato y por espacio (Vallejo, 2014).

5. Fermentación

Chen (2013), define la fermentación como el proceso mediante el cual los microorganismos catalizan nutrientes, sintetizan metabolitos secundarios y completan otras actividades fisiológicas en condiciones anaeróbicas o aeróbicas. Durante el proceso, se acumulan los microorganismos o metabolitos microbianos deseados. Por lo tanto, hay tres elementos de la investigación de fermentación: el producto blanco, la cepa productora y el ambiente deseado (nutrientes, temperatura, humedad, oxígeno, etc.).

Los microorganismos implicados en este proceso de fermentación, logran conseguir su energía y su fuente de carbono a través de la degradación de los compuestos orgánicos. La comercialización de fermentados, ha utilizado especialmente especies de bacterias, levaduras y hongos. En general, la producción masiva de microorganismos biocontroladores puede llevarse a cabo mediante dos técnicas: fermentación líquida o sumergida y fermentación sólida o en superficie (Ward, 1989).

5.1. Fermentación líquida

En el proceso de fermentación discontinua, se inocula asépticamente un lote de medio de cultivo con el microorganismo deseado, que se denomina generalmente cultivo de semilla o de arranque. Dónde en condiciones óptimas de fermentación, se mantienen durante una

duración definida para la formación máxima del producto, en un recipiente cerrado denominado fermentador o biorreactor (Saxena, 2015).

La duración para la formación máxima del producto en el fermentador se denomina tiempo de lote o tiempo de fermentación que se extiende desde unas pocas horas hasta 6 días. En algunos casos, más específicamente fermentaciones de alimentos tradicionales, el tiempo de fermentación puede durar un mes o más (Saxena, 2015).

Generalmente, el proceso de fermentación comienza con un cultivo de arranque puro que se cultiva en placas de Petri o en medio líquido en un matraz de agitación. El inóculo se construye a través de etapas sucesivas hasta un 5-10% del volumen de trabajo total del fermentador de producción. Esto ayuda en la reducción del tiempo del lote. Una de las principales ventajas de la fermentación líquida recae en el contacto directo con el medio de cultivo, como también un mayor control de las condiciones de fermentación (Saxena, 2015).

5.2. Fermentación sólida

La fermentación en estado sólido (FSS), se define como el cultivo microbiano sobre la superficie y el interior de una matriz sólida con suficiente humedad para permitir el crecimiento de los microorganismos (Hölker *et al.*, 2004; Rodríguez y Sanromán, 2006; Singhania *et al.*, 2009).

Después de la década de 1940, la enorme demanda de acetona, butanol y penicilina hizo que la industria de fermentación líquida aumentara rápidamente. La industria de la fermentación en estado sólido comenzó a declinar, y las ventajas de la fermentación en estado sólido fueron opacadas por el rápido desarrollo de la fermentación líquida. En consecuencia, la fermentación en estado sólido sólo constituye una pequeña parte de la industria de fermentación en su conjunto. En la actualidad, los problemas de la fermentación líquida, como el alto consumo de energía y la contaminación grave, son cada vez más prominentes, lo que limita significativamente el desarrollo sostenible de la fermentación. Se está de nuevo tomando nota de las ventajas de la fermentación de estado sólido, como su ahorro de agua, ahorro de energía, y las propiedades de bajo costo (Chen, 2013).

La FSS ha comenzado a desempeñar un papel importante en los campos químico, farmacéutico y medioambiental, que señala una dirección clara para el desarrollo sostenible de toda la industria biológica y química. Así, los principios y aplicaciones de la fermentación en estado sólido se han convertido en un nuevo foco de investigación en los últimos años (Chen, 2013).

El sustrato se puede dividir en dos categorías basadas en su digestibilidad: sustrato portador nutricional o sustrato portador inerte. El portador nutricional son cultivos (salvado de trigo, harina de soja, etc.) o residuos agrícolas y forestales (paja, bagazo, serrín, etc.). Este no sólo funciona como una estructura física para el crecimiento de microorganismos, sino que también proporciona una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y factores de crecimiento de los mismos (Singhania *et al.*, 2010).

En comparación con la fermentación líquida, la ventaja principal de la FSS es un suministro suficiente de oxígeno. Hay menos aguas residuales orgánicas y mayor producción de compuestos en la fermentación de estado sólido. El ambiente sólido es más similar al hábitat natural de los hongos filamentosos. Los productos de alto valor agregado podrían ser sintetizados por FSS usando residuos industriales y agrícolas de bajo costo como base. Por consiguiente, la FSS es la tecnología más prometedora que puede utilizar exhaustivamente los recursos renovables (Chen, 2013).

5.3. Procesos fermentativos con *Trichoderma*

En cuanto a la fermentación líquida, Jin y colaboradores (1996) señalan que el uso de glicerol como el osmótico es particularmente eficaz en el inicio de la conidiación de microorganismos; a 32 ° C sólo 30 h de fermentación se requiere para iniciar la producción de nuevos conidios. Utilizando inóculo de cultivo de crecimiento activo, se produjo una conidiación extensiva desde el comienzo de la operación de fermentación. Se produjeron altos niveles de conidios en las 24 h de fermentación y alcanzaron su nivel máximo en 68 h de fermentación ($6,31 \times 10^3$ conidios/ml o bien 8,75 logaritmo de conidios/ml). Sin embargo, el peso seco de la biomasa continuó aumentando hasta las 96 h sin aumento adicional en el número de conidios.

Kolombet y colaboradores (2008), encontraron que las clamidósporas y conidios sumergidos pueden obtenerse durante el almacenamiento reduciendo el pH de la biomasa de micelio, introduciendo cobre para reducir las tasas de respiración y añadiendo carbohidratos para una fuente de energía, además *T. asperellum* convirtió la biomasa fúngica en una etapa de reposo (clamidosporas y, en menor medida, conidios) cuando los nutrientes y el oxígeno se hicieron limitantes. También mencionan que es clave conocer la tasa de consumo de oxígeno de las formulaciones con el fin de maximizar su competitividad y vida útil. Otro dato que proporcionan es que la supervivencia de una formulación líquida de biomasa fúngica, no se pueden almacenar en tarros bien tapados más de 1 semana a + 30 °C. El micelio en la formulación líquida se puede almacenar durante mucho tiempo (hasta medio año y más) sólo si la reposición continua de nutrientes y el libre acceso de oxígeno se proporcionan.

En lo que respecta a la fermentación sólida Chávez-García y colaboradores (2008) reportan que utilizando como sustrato arroz más agua destilada a una temperatura de 25°C en conjunto con una exposición constante a la luz, dio como resultado $4,5 \times 10^9$ conidios/ml con un 96% de germinación a 24 horas y una pureza estimada de 92,1%. En cambio, en la fermentación líquida la pureza fue de un 76,8 % y a germinación fue de un 91,2%, demostrando que la fermentación líquida presenta claras desventajas ante la fermentación sólida.

Por otra parte, García y colaboradores (2014), desarrollaron una formulación de un biofungicida a base de *Trichoderma* el cual se produjo mediante el uso de fermentaciones artesanales en estado sólido, alcanzando una concentración de 2×10^{12} UFC en un peso total de 150 g, para una proporción de 25% de ingrediente activo y un 75% material inerte, lo cual basta para aplicarse sobre una hectárea de cultivo, contando con una pureza de 100% y una viabilidad de esporas del 95%.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar diferentes medios de cultivo y condiciones para la producción de conidios de *Trichoderma* mediante fermentación en líquido y sólido.

Objetivos Específicos

- Valorar distintos sustratos para una fermentación sólida y una fermentación líquida que permitan una mayor producción de conidios de *Trichoderma spp.*
- Determinar cuáles condiciones de cultivo permiten obtener mejor producción de conidios de *Trichoderma spp.*

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Localización

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitoprotección del CICAPE, en San Pedro de Barva, Heredia, durante el periodo de julio a noviembre del 2016.

2. Microorganismo

La cepa de *Trichoderma spp.* empleada a lo largo de la investigación se obtuvo del CICAPE, de la cual aún no se ha identificado la especie, sin embargo, es la que se utiliza rutinariamente en el proceso de producción en sustrato sólido.

3. Inóculo

Se utilizaron placas de PDA con 15 días de crecimiento de *Trichoderma* con abundante esporulación, las cuales se seccionaron con ayuda de un asa micológica. Se realizó un conteo de la concentración de esporas en cámara de Neubauer en el microscopio y se ajustó la concentración requerida.

4. Fermentación Líquida

4.1. Medios de cultivo líquido

Se evaluaron 7 medios de cultivo, las concentraciones y compuestos se indican en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Descripción de medios de cultivo evaluados.

Número de tratamiento	Composición del medio	
	Fuente de Carbono	Fuente de nitrógeno y otras sustancias*
1	15 g/L de Sacarosa	8 g/l de Linaza
2	15 g/L de Sacarosa	16 g/l de Cebada
3	15 g/L de Sacarosa	12,5 g/l de Girasol
4	15 g/L de Sacarosa	5,72 g/l de Leche
5	15 g/L de Sacarosa	15,38 g/l de Avena

6*	15 g/L de Sacarosa	35 g/l de Arroz
7*	15 g/L de Sacarosa	35 g/l de Puntilla de Arroz

*Los tratamientos 6 y 7 correspondientes al uso del arroz y puntilla de arroz como medio de cultivo, se realizaron por separado de los demás tratamientos y se le denominó “medio semi-sólido” en los siguientes apartados

4.2. Condiciones de fermentación líquida

En botellas de vidrio de 500 ml de capacidad se prepararon 200 ml de cada tratamiento (Cuadro 1). Se esterilizaron mediante autoclave y se utilizó una probeta estéril, se agregaron 20 ml (10% v/v) del inóculo. Se prepararon 3 botellas por medio de cultivo (cada medio de cultivo se preparó por triplicado).

Los fermentadores se mantuvieron a temperatura ambiente con fotoperiodo de 12 horas luz solar y 12 horas oscuridad, con aireación constante. Se realizaron muestreos diarios donde, en cámara de flujo laminar, se removía el tapón de cada fermentador, se tomaban 2 ml aproximadamente de cada fermentador en un tubo de centrifugación de 50 ml estéril, hasta completar 6 ml de muestra compuesta de cada tratamiento. Una vez tomada la muestra se sellaban nuevamente los fermentadores con papel parafilm, y se regresaban al cuarto de fermentación para aplicarles nuevamente la aireación. Los muestreos se realizaron diariamente durante 5 días. Se realizó un conteo de conidios en cámara de Neubauer de cada muestra compuesta y con estos datos se graficaron curvas de crecimiento en Excel® mediante gráficos de dispersión determinando de esta forma las fases de latencia, exponencial, estacionaria y muerte.

4.3. Fermentadores

Los fermentadores consistieron en botellas de vidrio Pyrex de 500 ml, con un tapón de hule #9 con dos perforaciones para entrada y salida del aire, en ambos agujeros se insertó una varilla de cobre, apropiada con mangueras de plástico, donde a una de ellas se le ajustaba el filtro de entrada de aire, mientras que la manguera de salida de aire no contenía ningún filtro (Figura 3).

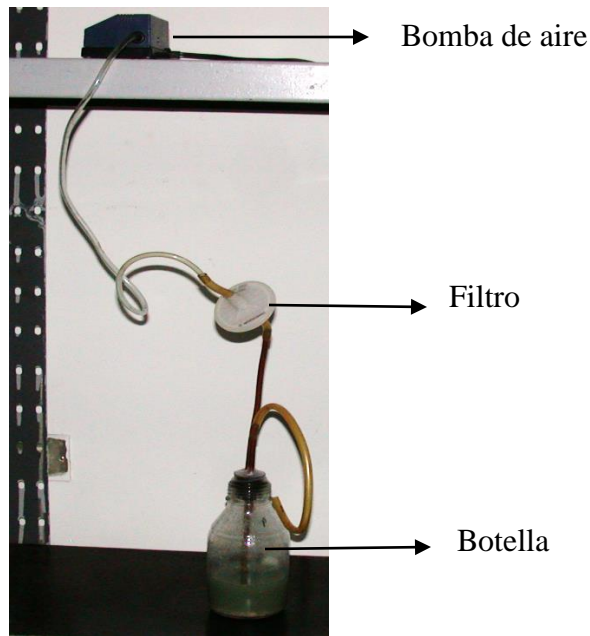


Figura 3. Fermentador acoplado al sistema de aireación.

4.4. Sistema de aireación

Se utilizó para cada fermentador una bomba de aire ELITE® 801 (marca HAGEN) con una salida de aire de 2500 cc/minuto y una presión de trabajo de 3,0 psi. El aire se inyectó al sistema a través de un filtro Midisart® 2000 de 0,2 μ m y 25 mm. La aireación proporcionada a lo largo de la fermentación fue constante.

5. Fermentación Sólida

La fermentación sólida se realizó en bolsas plásticas autoclavables con 100 g de sustrato en sus distintas combinaciones (Cuadro 4). Se agregaron 30 ml de agua (30% v/v) y se agitaron vigorosamente las bolsas, después se cerraron doblando el extremo de las bolsas y grapándolas. Cada tratamiento se preparó por triplicado. Los sustratos se esterilizaron mediante autoclave.

Posterior a la esterilización, se agregaron 10 ml (10% v/v) del inóculo utilizando una jeringa estéril. Las bolsas se agitaron vigorosamente cada después de inyectar el inóculo tratando de distribuir uniformemente el microorganismo. Dos días después de la inoculación las bolsas se abrieron con una tijera, de forma que la parte superior de la bolsa quedara totalmente

descubierta. Cada dos días se agitaban las bolsas con el fin de distribuir el microorganismo por todo el interior de la bolsa.

5.1. Evaluación de sustratos

Inicialmente se ejecutó una prueba exploratoria para determinar los mejores sustratos, los sustratos evaluados se indican en la Cuadro 4.

Cuadro 4. Diferentes sustratos probados para el crecimiento de *Trichoderma*

Sustrato	Siglas	Proporción utilizada
Arroz	A	100A
Puntilla-Granza	P-G	80P/20G
Puntilla-Granza-Linaza	P-G-L	80P/16G/4L
Puntilla-Broza	P-B	80P/20B
		50P/50B
Puntilla-Broza-Cascarilla	P-B-C	80P/20BC
		50P/50BC
Broza	B	100B

5.2. Condiciones de cultivo

Los sustratos evaluados se observan en el Cuadro 4, descrita anteriormente, en esta prueba cada uno de los sustratos se sometieron a las mismas condiciones.

Las condiciones de cultivo fueron: fotoperiodo de 12 horas luz ambiental, temperatura ambiente, agitación cada dos días, 30% de humedad inicial, 10% v/v inóculo, concentración de inóculo inicial $2,0 \times 10^6$ conidios/ml. Desde iniciado el ensayo, los días 0, 2, 5 y 7 se tomaba una muestra compuesta de cada tratamiento, tomando en total 4 g de cada bolsa.

Cumplidos los 7 días de crecimiento, se daba inicio el proceso de secado el cual consistió en transferir el arroz inoculado con *Trichoderma spp.* a bandejas de plástico con dimensiones de 20 cm de largo por 10,5 cm de ancho, donde se mantuvieron por 7 días moviendo las bandejas cada dos días, para evitar aglomerados.

Al final del proceso de secado, se procedió a tomar 1 g de muestra de cada uno de los tratamientos. En cámara de flujo laminar se realizaron diluciones seriadas 1/10 hasta llegar a una concentración aproximada de $5,0 \times 10^4$ conidios/ml. Para la primera dilución de utilizaron tubos de centrifuga estériles (1 gramo de muestra y aforando hasta llegar a la marca de 10 ml utilizando agua destilada estéril), para las siguientes diluciones se utilizaban tubos de microcentrífuga de 2 ml. Se sembraron 15 μ l de la última dilución en placas Petri desechables con medio PDA, se realizaron movimientos circulares con la placa para permitir su mejor distribución. Las placas se incubaron 18 horas a una temperatura de 27°C. Transcurridas las 18 horas de crecimiento se contó el número de conidios germinados y no germinados, hasta contar un total de 100 conidios, en el microscopio óptico en el aumento 40X, determinando así el porcentaje de germinación.

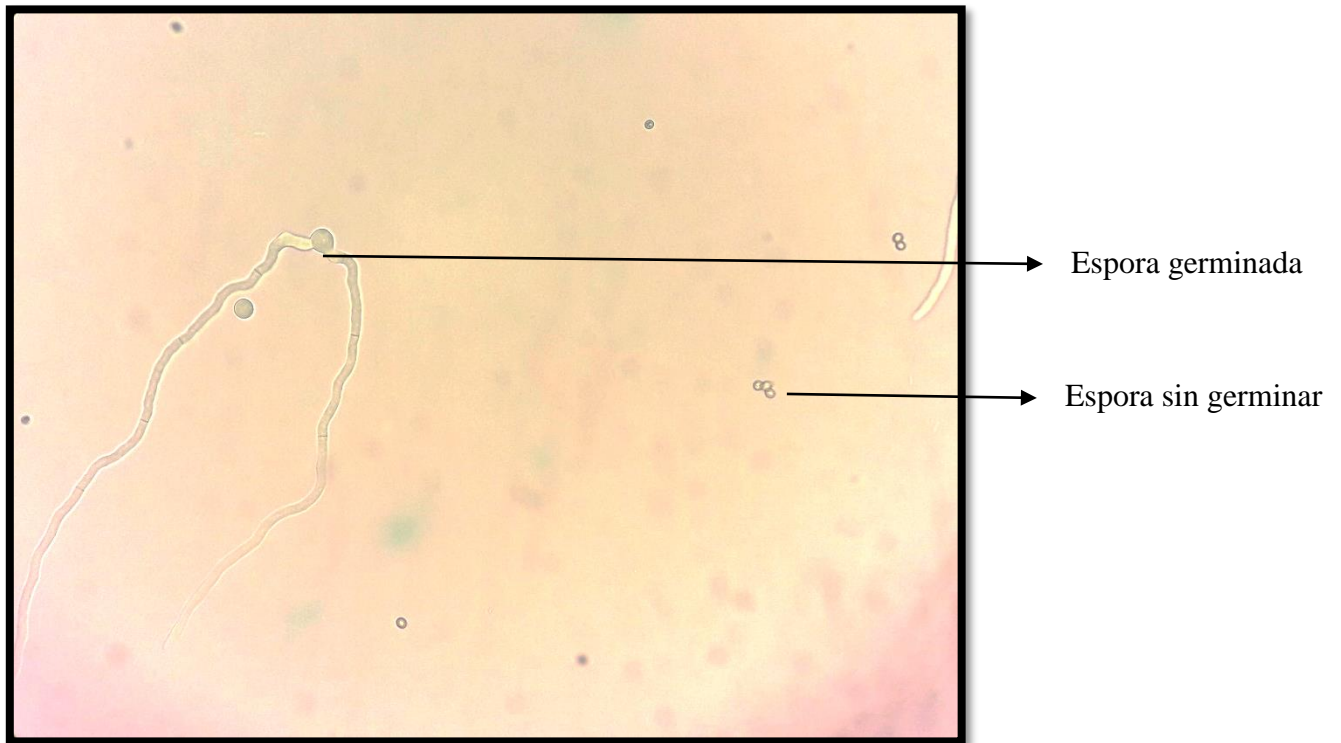


Figura 4. Esporas de *Trichoderma* germinadas y sin germinar en un aumento de 40X en microscopio óptico.

El porcentaje de humedad se determinó mediante el uso de la relación del peso fresco y el peso seco, se pesaron 5 g de cada uno de los tratamientos, se colocaron en platos Petri en una estufa a 110°C durante 24 horas.

Utilizando los datos obtenidos del conteo de conidios en cámara de Neubauer, en Excel® se plasmaron los datos para la obtención de los gráficos de dispersión. En el programa Minitab® (2017), donde se realizaron ANOVA y pruebas de Tukey

5.3. Otros parámetros evaluados

Una vez seleccionados los mejores sustratos se procedió a probar diferentes parámetros descritos seguidamente:

5.3.1. Diferentes concentraciones de inóculo.

Con los sustratos seleccionados: A, P-G, P-G-L y P-B se utilizaron diferentes concentraciones de inóculo inicial, un tratamiento con menor concentración ($2,5 \times 10^5$ conidios/ml) y otro tratamiento con mayor concentración ($2,5 \times 10^6$ conidios/ml).

5.3.2. Fotoconidiación

Los sustratos seleccionados A, P-G, P-G-L y P-B se sometieron a dos condiciones de luz: blanca y azul, con un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad. Asimismo, se evaluaron bajo ambas condiciones de luz, dos concentraciones de inóculo: $2,50 \times 10^5$ conidios/ml (menor) y $2,50 \times 10^6$ conidios/ml (mayor).

5.3.3. Tiempo de aireación (apertura de bolsa)

Para determinar el tiempo exacto para abrir la bolsa para promover la conidiación, se realizaron las pruebas de abrir la bolsa el día 1 y el día 2.

5.3.4. Temperatura

Se probaron dos temperaturas además de la ambiental: 25°C y 30°C. Cada una de las temperaturas a dos concentraciones de inóculo: $2,50 \times 10^5$ conidios/ml (menor) y $2,50 \times 10^6$ conidios/ml (mayor).

5.3.5. Inoculo micelial

Se realizó una fermentación líquida para obtener abundante crecimiento de micelio de *Trichoderma spp.* y utilizarlo como inóculo para los sustratos sólidos. Para la fermentación líquida se manejaron dos alternativas de medios de cultivo la primera compuesta por 32,5 g/l de melaza más 5 g/l de extracto de levadura y la segunda compuesta por 15 g/l de sacarosa más 5 g/l de extracto de levadura, para un volumen total de trabajo de 200 ml, en botellas de vidrio de 500 ml con inyección constante de aire con 2500 cc/minuto, las cuales se autoclavaron, luego en cámara de flujo laminar, se inocularon los medios, esto con ayuda de un asa micológica se tomó una sección del hongo contenido en una placa Petri de Agar Papa Dextrosa (PDA) y posteriormente se sumergió en cada uno de los medios a evaluar. Una vez sellados los fermentadores se incubaron durante 48 h a temperatura ambiente. Transcurridas las 48 horas se tomó el fermento como inóculo para la fermentación en sustrato sólido.

Los sustratos sólidos utilizados fueron A, P-G, P-G-L y P-B preparados en bolsas de 100 g totales, donde cada uno de estos sustratos fue inoculado con 10 ml (10% v/v) del fermento líquido.

RESULTADOS

1. Fermentación Líquida

En el siguiente gráfico se puede observar la curva de producción de conidios de *Trichoderma spp.* durante 4 días de crecimiento en medio líquido.

La cebada resulta el mejor medio de cultivo obteniendo $2,40 \times 10^8$ conidios/ml a los 3 días de crecimiento, para el cuarto día, en todos los medios de cultivo, la producción de conidios decrece. Se observó que en este momento se promueve el crecimiento de micelio y se agrega. Por otra parte, en los medios de cultivo de semillas de girasol y avena, se alcanza el máximo crecimiento al segundo día, no obstante, no se obtiene mayor concentración que con el medio de cebada y ésta concentración disminuye para el tercer día (Ver figura 5).

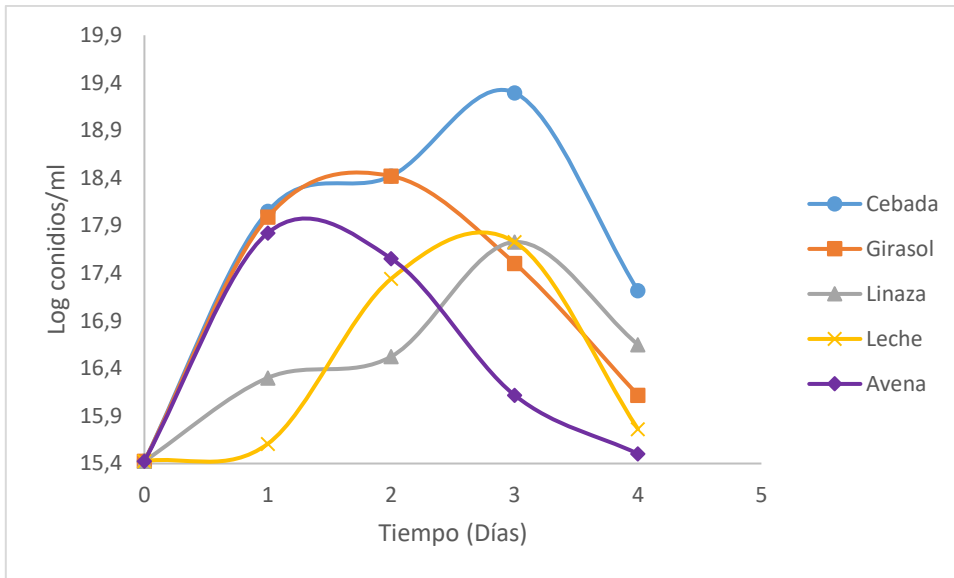


Figura 5. Concentración de conidios de *Trichoderma* spp producidos en diferentes medios de cultivo.

Los sustratos compuestos por arroz y puntilla de arroz, se evaluaron de forma independiente, ya que al no disolverse completamente en el medio se les llamó “medio semi-sólido”. Los resultados obtenidos al evaluar estos sustratos se muestran en la Figura 6. El mayor número de conidios alcanzados fue en el medio de cultivo Arroz al tercer día con $3,90 \times 10^7$ conidios/ml.

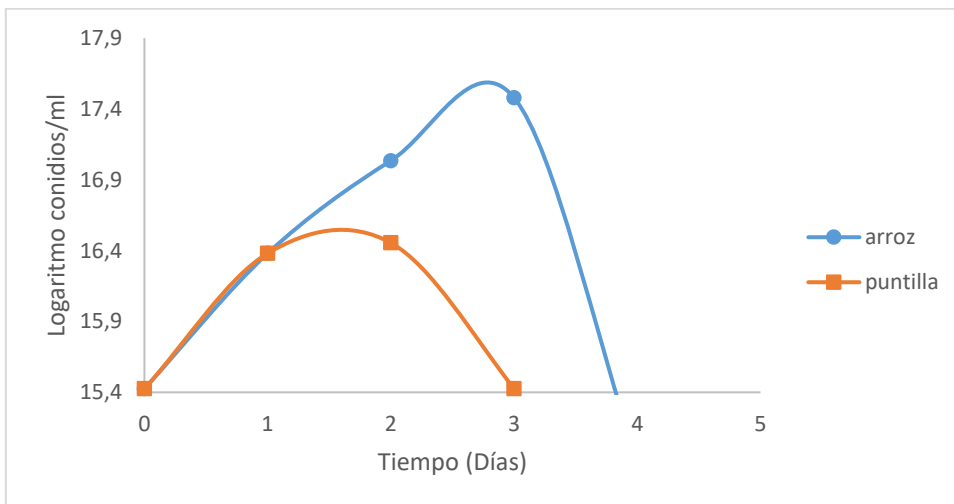


Figura 6. Concentración de conidios producidos a través del tiempo por *Trichoderma* spp.

Uno de los principales problemas que presenta la fermentación líquida es la agregación del micelio, dificultando así el conteo de conidios (Ver figura 7).

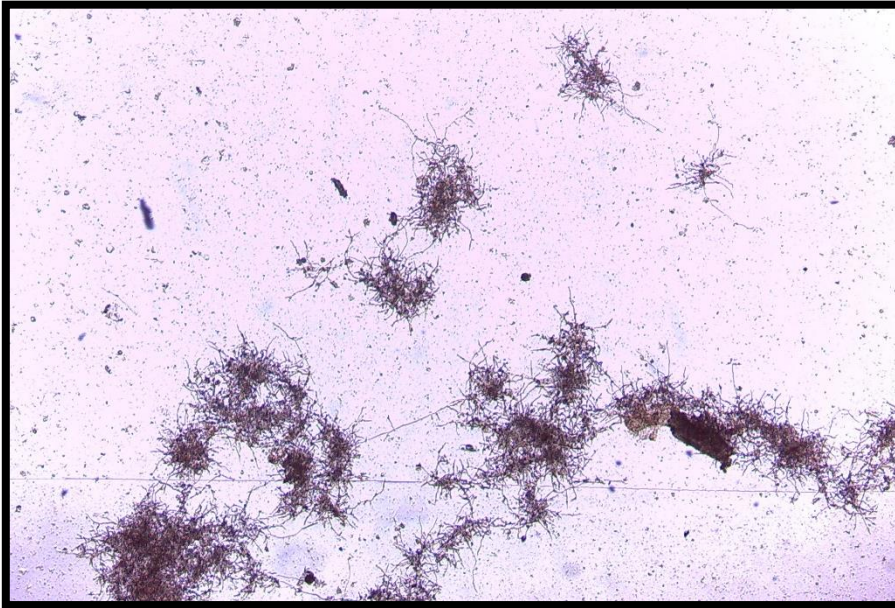


Figura 7. Agregación de micelio en medio de cultivo líquido, aumento 10X.

Otra de las problemáticas es la formación de otras estructuras como clamidosporas,

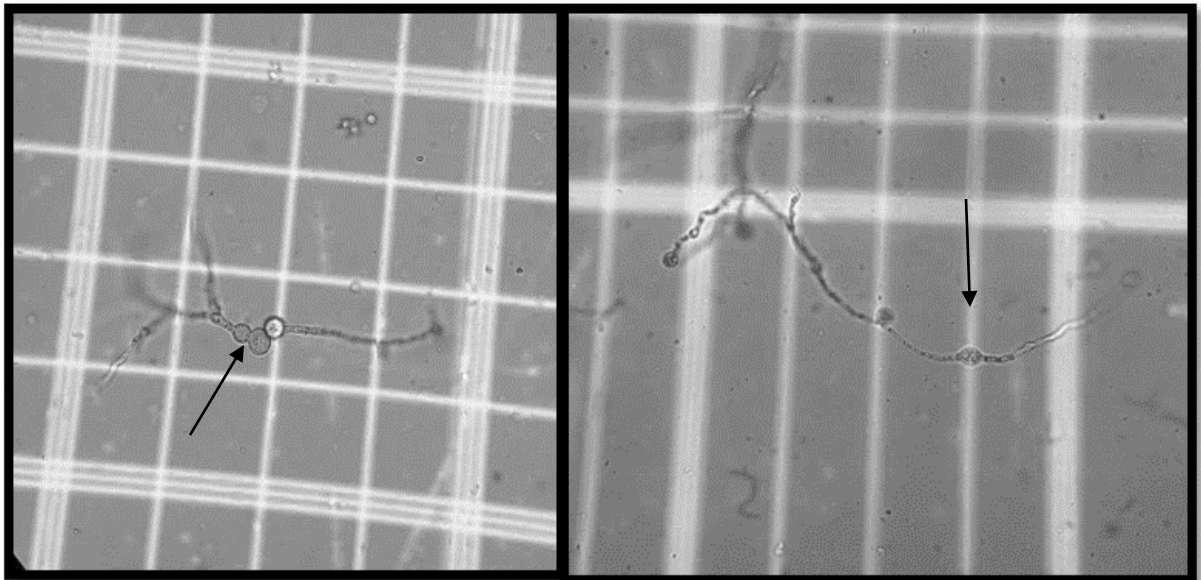


Figura 8. Clamidosporas de *Trichoderma* en medio líquido. Flechas indican donde se encuentra la estructura.

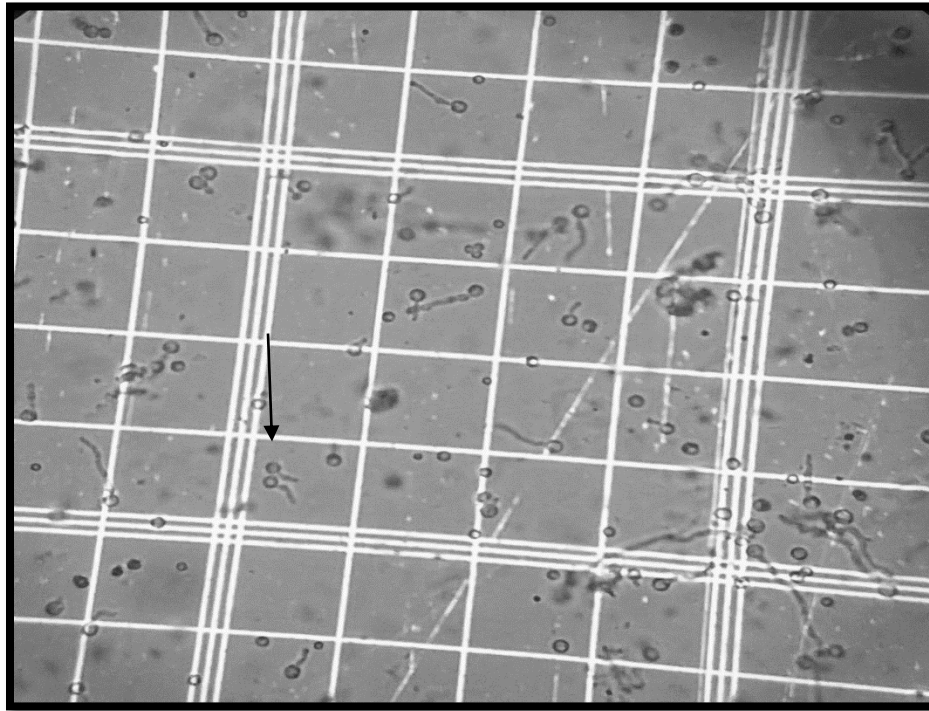


Figura 9. Conidios de *Trichoderma* en medio líquido, aumento 40X en microscopio óptico. Flechas indican los conidios

2. Fermentación Sólida

2.1. Evaluación de sustratos

Los sustratos evaluados que mostraron mejor producción de conidios a los 7 días de crecimiento fueron el A y P-G-L, los cuales alcanzaron una concentración de $2,4 \times 10^9$ conidios/ml.

En la Figura 10 se muestra la curva de conidiación que presenta *Trichoderma spp* bajo los distintos sustratos explorados.

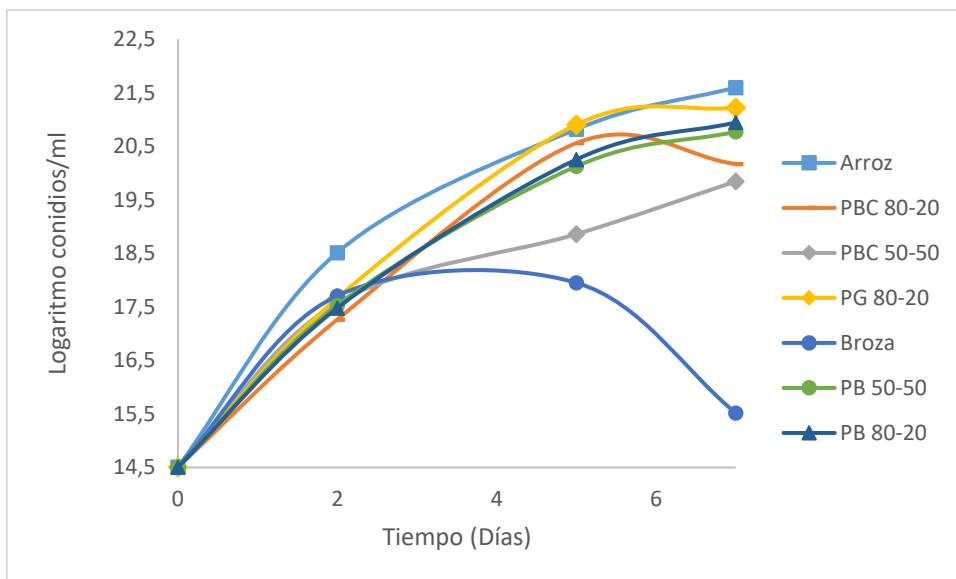


Figura 10. Conidiación de *Trichoderma spp.* con respecto al tiempo en fermentación sólida con diferentes sustratos

En el programa Minitab® se comprobó que los datos se comportan de manera normal y los resultados del análisis de Tukey se muestran en el cuadro 5.

Cuadro 5. Agrupación de las medias de la concentración de conidios de *Trichoderma* utilizando método de Tukey y una confianza de 95%

Prueba de Tukey		
Medio	Media (Conidios/ml)	Agrupación
PGL	$2,40 \times 10^9$	A
Arroz	$2,40 \times 10^9$	A
PG 80/20	$1,65 \times 10^9$	B
PB 80/20	$1,25 \times 10^9$	BC
PB 50/50	$1,05 \times 10^9$	C
PBC 80/20	$5,75 \times 10^8$	D
PBC 50/50	$4,15 \times 10^8$	DE
Broza	$5,50 \times 10^6$	E

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

2.2. Otros parámetros evaluados:

2.2.1. Diferentes concentraciones de inóculo

Utilizando un inóculo de $2,50 \times 10^6$ conidios/ml a los 7 días se obtiene como valor máximo de $2,8 \times 10^9$ conidios/ml en el sustrato de P-G, en el grafico (Figura 11-A) se observa que tan sólo el sustrato P-B resulta ser no óptimo para la producción de esporas con una concentración de $4,15 \times 10^8$ conidios/ml.

Por otro lado, utilizando un inóculo de $2,50 \times 10^5$ conidios/ml (Figura 11-B), a los 7 días se obtiene una concentración máxima de $1,90 \times 10^9$ conidios/ml en el sustrato P-G, siendo un comportamiento similar al del Arroz y el de la P-G-L, resultando también el peor sustrato el de P-B con una concentración final a los 7 días de $9,00 \times 10^8$ conidios/ml.

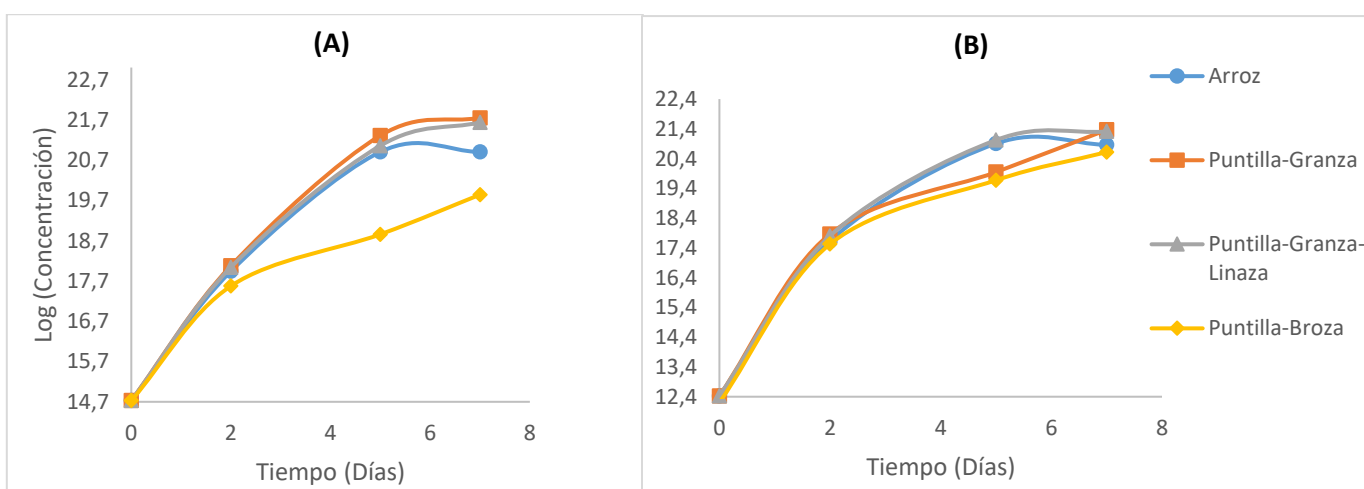


Figura 11. Curva de conidiación de *Trichoderma spp.*, a partir de la utilización de cuatro sustratos. A: mayor inóculo. B: Menor inóculo.

En el siguiente cuadro se aprecia cuales sustratos son significativamente diferentes, en este caso los que no comparten una letra en la agrupación son significativamente diferentes, viendo los mejores resultados, el sustrato P-G es el mejor, sin embargo, el sustrato P-G-L es estadísticamente igual.

Cuadro 6. Agrupación de las medias de la concentración de conidios de *Trichoderma* utilizando método de Tukey y una confianza de 95%

Prueba de Tukey			
Medio	Inóculo	Media	Agrupación
Puntilla-Granza	Mayor	2,80 x 10 ⁹	A
Puntilla-Granza-Linaza	Mayor	2,50 x 10 ⁹	AB
Puntilla-Granza	Menor	1,90 x 10 ⁹	BC
Puntilla-Granza-Linaza	Menor	1,80 x 10 ⁹	CD
Arroz	Mayor	1,20 x 10 ⁹	DE
Arroz	Menor	1,15 x 10 ⁹	DE
Puntilla-Broza	Menor	9,00 x 10 ⁸	EF
Puntilla-Broza	Mayor	4,15 x 10 ⁸	F

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

En el siguiente (Cuadro 7) se visualiza el porcentaje de germinación de las esporas de *Trichoderma* tanto antes como después del proceso de secado obteniendo que en el medio P-G-L un mayor porcentaje de germinación, esto en el tratamiento con mayor inóculo. Por otra parte, cuando se utiliza una menor concentración de inóculo, se observa que después del proceso de secado, tanto el Sustrato A como el P-G-L obtienen el mayor porcentaje (90%) y todos se mantienen por encima del 80 %.

Cuadro 7. Porcentaje de Germinación de esporas, antes y después del proceso de secado.

Tiempo	Germinación (%)							
	Inóculo mayor				Inóculo menor			
	Arroz	PG	PGL	PB	Arroz	PG	PGL	PB
7 días	85	87	92	82	94	84	87	80
14 días	83	87	90	85	90	89	90	84

La cantidad de humedad contenida en cada uno de los medios de este tratamiento se puede apreciar en el siguiente cuadro, resultado que a los 14 días (luego del secado) se logra reducir

la humedad llegando a valores de 18% en A y en P-G y a 22% de humedad en P-G-L y en P-B.

Cuadro 8. Porcentaje de humedad contenido en cada medio, antes y después del proceso de secado

Tiempo	Humedad (%)							
	Inóculo mayor				Inóculo menor			
	Arroz	PG	PGL	PB	Arroz	PG	PGL	PB
7 días	30	34	34	56	32	28	34	58
14 días	18	18	22	22	18	18	22	22

2.2.2. Fotoconidiación-Luz Azul:

Manejando la luz azul como estimulante, se obtuvo que con un inóculo de $2,5 \times 10^5$ conidios/ml, no se produce en ninguno de los sustratos, una concentración que alcance al menos $1,0 \times 10^9$ conidios/ml a los 7 días de crecimiento. Mientras que, utilizando como inóculo $2,5 \times 10^6$ conidios/ml y aplicando la luz azul como variante, se obtienen $2,7 \times 10^9$ conidios/ml en el medio puntilla-granza-linaza (PGL) siendo éste el máximo valor, mientras que el medio puntilla-broza es el único que obtiene una concentración menor a $1,0 \times 10^9$ conidios/ml (Ver Figura 12).

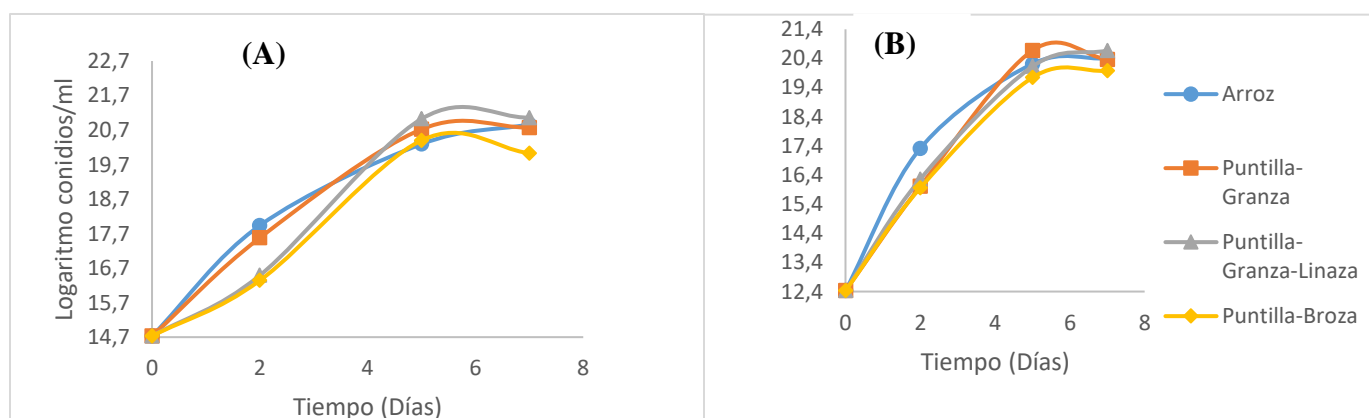


Figura 12. Comportamiento de la producción de conidios, en los diferentes sustratos, aplicando luz azul como variante. A: mayor inóculo. B: Menor inóculo.

Estadísticamente, los sustratos: P-G-L, A y P-G, son iguales y son los que cumplen con la concentración mínima necesaria, además esto se da, bajo la utilización del mayor inóculo $2,5 \times 10^6$ conidios/ml (Ver Cuadro 9).

En la siguiente tabla se visualiza la prueba de Tukey y sus comparaciones.

Cuadro 9. Agrupación de las medias de la concentración de conidios de *Trichoderma* utilizando método de Tukey y una confianza de 95%

Prueba de Tukey			
Medio	Inóculo	Media	Agrupación
Puntilla-Granza-Linaza	Mayor	$1,40 \times 10^9$	A
Arroz	Mayor	$1,15 \times 10^9$	AB
Puntilla-Granza	Mayor	$1,05 \times 10^9$	ABC
Puntilla-Granza-Linaza	Menor	$9,50 \times 10^8$	BC
Arroz	Menor	$7,25 \times 10^8$	BCD
Puntilla-Granza	Menor	$7,00 \times 10^8$	CD
Puntilla-Broza	Mayor	$5,00 \times 10^8$	D
Puntilla-Broza	Menor	$4,75 \times 10^8$	D

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

La germinación de las esporas con un mayor inóculo, se observan en el siguiente cuadro, aumentado de forma considerable el porcentaje germinado a los 14 días en el medio P-G-L, por otro lado, en los sustratos P-G y en P-B, el porcentaje disminuye a los 14 días (con proceso de secado). En el sustrato A se mantuvo el porcentaje. Por otra parte, utilizando un menor inóculo, la germinación de las esporas fue mayor en el medio P-G-L a los 14 días, mientras que para el resto de sustratos se mantuvo alrededor de 70 % de germinación (Ver Cuadro 10).

Cuadro 10. Porcentaje de Germinación de esporas, antes y después del proceso de secado.

Germinación (%)								
Tiempo	Inóculo mayor				Inóculo menor			
	Arroz	PG	PGL	PB	Arroz	PG	PGL	PB
7 días	89%	92%	62%	75%	11%	80%	76%	72%
14 días	88%	80%	91%	37%	72%	70%	88%	76%

El proceso de secado logra disminuir de forma notable el porcentaje de humedad contenido en todos los sustratos, tanto en el inóculo mayor como en el menor (Ver Cuadro 11).

Cuadro 11. Porcentaje de humedad contenido en cada medio, antes y después del proceso de secado.

Humedad (%)								
Tiempo	Inóculo mayor				Inóculo menor			
	Arroz	PG	PGL	PB	Arroz	PG	PGL	PB
7 días	30%	32%	34%	56%	32%	32%	34%	72%
14 días	18%	22%	20%	28%	20%	24%	20%	26%

2.2.3. Fotoconidiación-Luz Blanca

Con inóculo de $2,5 \times 10^6$ conidios/ml, se obtienen en los sustratos: A y P-G-L, más de $1,0 \times 10^9$ conidios/ml a los 7 días de crecimiento. Se puede observar en la Figura 13 que en el sustrato P-G los 5 días de crecimiento se obtienen $1,35 \times 10^9$ conidios/ml, mostrando una reducción a los 7 días de crecimiento con $5,0 \times 10^8$ conidios/ml.

Por otra parte, con un inóculo de $2,5 \times 10^5$ conidios/ml, la máxima concentración alcanzada se concretó en el medio P-G-L, mientras que solo el medio P-B no logró la concentración mínima requerida consiguiendo tan solo $7,75 \times 10^8$ conidios/ml.

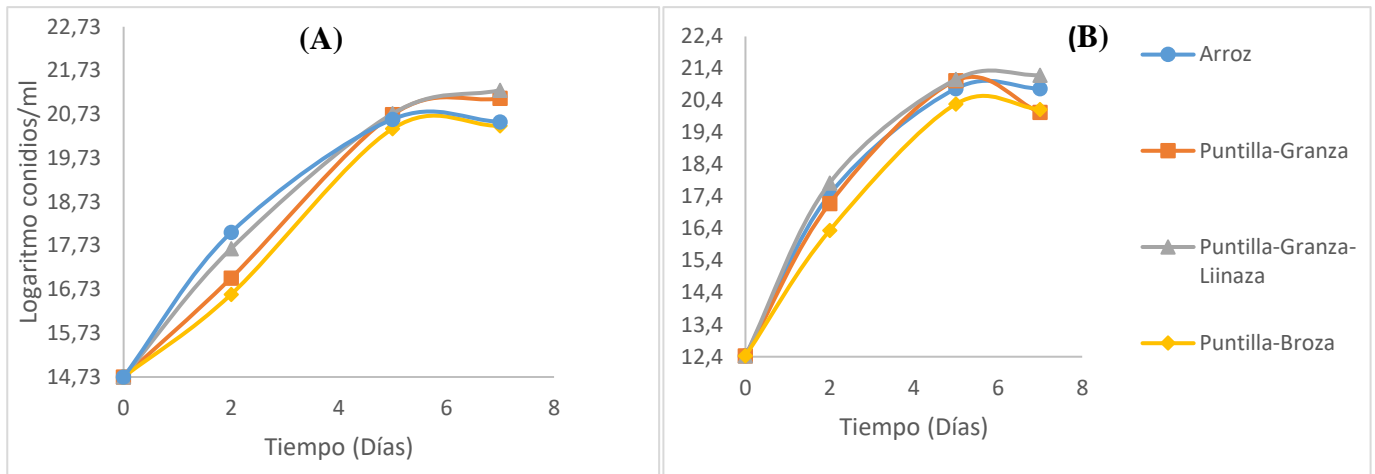


Figura 13. Comportamiento de la producción de conidios ante la exposición de luz blanca, en los diferentes sustratos.

En el siguiente cuadro se aprecia que los sustratos puntilla-granza-linaza y puntilla granza utilizando el mayor inóculo, y el sustrato puntilla-granza-linaza utilizando un menor inóculo, son estadísticamente iguales como también son los tres sustratos con mayor producción de conidios bajo la exposición a la luz blanca.

Cuadro 12. Agrupación de las medias de la concentración de conidios de *Trichoderma* utilizando método de Tukey y una confianza de 95%.

Prueba de Tukey			
Medio	Inóculo	Media	Agrupación
Puntilla-Granza-Linaza	Mayor	$1,75 \times 10^9$	A
Puntilla-Granza-Linaza	Menor	$1,60 \times 10^9$	A
Puntilla-Granza	Mayor	$1,45 \times 10^9$	A
Arroz	Menor	$1,05 \times 10^9$	B
Arroz	Mayor	$8,50 \times 10^8$	BC
Puntilla-Broza	Mayor	$7,75 \times 10^8$	BCD
Puntilla-Broza	Menor	$5,50 \times 10^8$	CD
Puntilla-Granza	Menor	$5,00 \times 10^8$	D

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

Cuando se utiliza un mayor inóculo los conidios germinados luego del proceso de secado, son mayores al 90% en todos los sustratos exceptuando el de P-B con un 79%, también se observa un aumento de la germinación en los 14 días (con secado) en contraste con la germinación evaluada a los 7 días.

Cuando se utiliza un menor inóculo la germinación, aumenta considerablemente a los 14 días (con secado), se alcanza el mayor porcentaje en el medio P-G-L.

Cuadro 13. Porcentaje de Germinación de esporas, antes y después del proceso de secado.

Germinación (%)								
Tiempo	Inóculo mayor				Inóculo menor			
	Arroz	PG	PGL	PB	Arroz	PG	PGL	PB
7 días	68%	38%	21%	20%	70%	56%	40%	40%
14 días	91%	93%	90%	79%	84%	95%	88%	73%

El porcentaje de humedad después del proceso de secado se logra disminuir satisfactoriamente (Ver Cuadro 14).

Cuadro 14. Porcentaje de humedad contenido en cada medio, antes y después del proceso de secado

Humedad (%)								
Tiempo	Inóculo mayor				Inóculo menor			
	Arroz	PG	PGL	PB	Arroz	PG	PGL	PB
7 días	30%	30%	34%	64%	30%	30%	34%	56%
14 días	18%	20%	20%	32%	20%	20%	20%	24%

2.2.4. Tiempo de aireación (apertura de la bolsa)

2.2.4.1. Primer Día

El sustrato de Puntilla-Granza-Linaza resultó ser el mayor, con $1,50 \times 10^9$ conidios/ml mientras que el sustrato de puntilla-broza fue el peor sustrato con $5,95 \times 10^8$ conidios/ml.

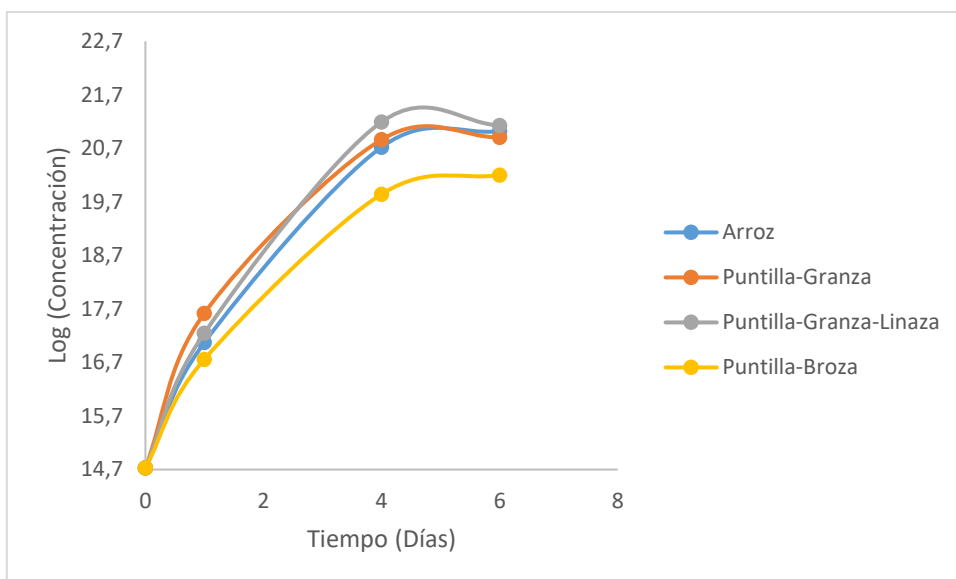


Figura 14. Comportamiento de producción de conidios, en los diferentes sustratos, abriendo la bolsa al primer día de inoculado.

Los sustratos: P-G-L, P-G y A; son estadísticamente iguales, como se ve en el cuadro 15 comparten una misma letra.

Cuadro 15. Agrupación de las medias de la concentración de conidios de *Trichoderma* utilizando método de Tukey y una confianza de 95%

Prueba de Tukey		
Medio	Media	Agrupación
Puntilla-Granza-Linaza	$1,50 \times 10^9$	A
Arroz	$1,35 \times 10^9$	A
Puntilla-Granza	$1,20 \times 10^9$	AB
Puntilla-Broza	$5,95 \times 10^8$	B

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

El porcentaje de germinación de esporas fue menor al 80%, antes y después del proceso de secado, (Ver Cuadro 16) a los 14 días el mayor porcentaje de germinación se obtuvo en el sustrato PB.

Cuadro 16. Porcentaje de Germinación de esporas, antes y después del proceso de secado.

Tiempo	Germinación (%)			
	Arroz	PG	PGL	PB
7 días	75	70	68	77
14 días	70	58	55	72

La humedad contenida en los sustratos llega a un 16% (Ver Cuadro 17).

Cuadro 17. Porcentaje de humedad contenido en cada medio, antes y después del proceso de secado

Tiempo	Humedad (%)			
	Arroz	PG	PGL	PB
7 días	30%	30%	34%	56%
14 días	18	16	16	18

2.2.4.2. Segundo día

Los resultados de la apertura de la bolsa el segundo día de crecimiento, bajo condiciones ambientales se pueden observar en la sección anterior de “Otros parámetros evaluados-diferentes concentraciones de inóculo”

2.2.5. Temperatura

2.2.5.1. Temperatura de 25°C

Con un mayor inóculo, en el sustrato P-G-L se consiguió la máxima producción de conidios $1,45 \times 10^9$ conidios/ml, y como se aprecia en el gráfico la menor producción fue en puntilla-broza con $6,75 \times 10^8$ conidios/ml.

En la figura 15-B, todos los sustratos son estadísticamente iguales, siendo todos mayores a $1,00 \times 10^9$ conidios/ml exceptuando al medio P-B con $9,00 \times 10^8$ conidios/ml.

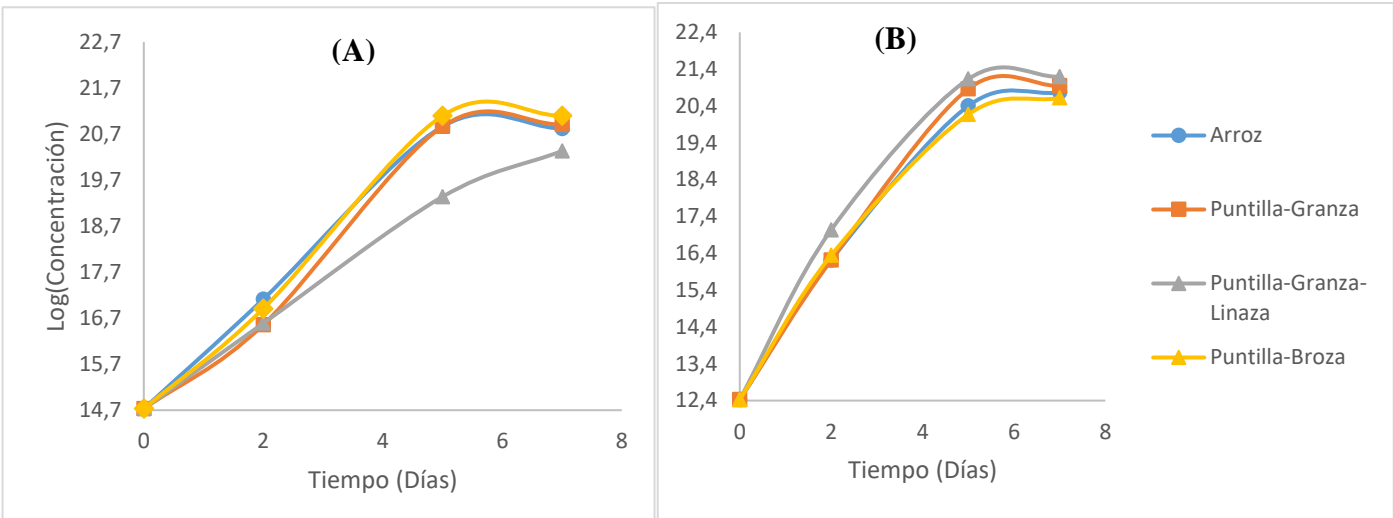


Figura 15. Curva de conidiogénesis de *Trichoderma*, ante la utilización de cuatro sustratos a 25 °C de temperatura.

Cuadro 18. Agrupación de las medias de la concentración de conidios de *Trichoderma* utilizando método de Tukey y una confianza de 95%.

Prueba de Tukey			
Medio	Inóculo	Media	Agrupación
Puntilla-Granza-Linaza	Menor	1,65 x 10 ⁹	A
Puntilla-Granza-Linaza	Mayor	1,45 x 10 ⁹	AB
Puntilla-Granza	Menor	1,38 x 10 ⁹	AB
Puntilla-Granza	Mayor	1,20 x 10 ⁹	ABC
Arroz	Mayor	1,10 x 10 ⁹	ABC
Arroz	Menor	1,08 x 10 ⁹	ABC
Puntilla-Broza	Menor	8,75 x 10 ⁸	BC
Puntilla-Broza	Mayor	6,75 x 10 ⁸	C

*Las medias que no comparten una misma letra son significativamente diferentes.

A los 7 días el mayor porcentaje de germinación fue en el sustrato P-G, mientras que a los 14 días los mayores porcentajes fueron en P-G (85%) y la puntilla-broza (86%) (Ver Cuadro 19). Mientras que utilizando un menor inóculo la germinación resulta ser mayor a los 7 días que a los 14 días ya cuando termina el proceso de secado.

Cuadro 19. Porcentaje de Germinación de esporas, antes y después del proceso de secado.

Germinación (%)								
Tiempo	Inóculo mayor				Inóculo menor			
	Arroz	PG	PGL	PB	Arroz	PG	PGL	PB
7 días	86	90	87	86	87	84	91	81
14 días	80	85	82	86	78	79	82	77

El porcentaje de humedad se disminuye hasta llegar a un 14% en todos los sustratos.

Cuadro 20. Porcentaje de humedad contenido en cada medio, antes y después del proceso de secado

Humedad (%)								
Tiempo	Inóculo mayor				Inóculo menor			
	Arroz	PG	PGL	PB	Arroz	PG	PGL	PB
7 días	34	32	32	52	30	32	30	52
14 días	14	14	14	14	14	14	14	14

2.2.5.2. Temperatura de 30°C

Utilizando una temperatura de 30°C y un inóculo de $2,50 \times 10^5$ conidios/ml, se logra en el medio P-B una concentración de $9,00 \times 10^8$ conidios/ml, mientras que a los 14 días de crecimiento se obtienen $1,30 \times 10^9$ conidios/ml, sólo bajo estas condiciones de temperatura se logra que este medio (PB) llegue a superar la concentración mínima requerida. Por otra parte, el medio P-G consigue una concentración de $1,60 \times 10^9$ conidios/ml (Ver figura 16-B).

Utilizando un mayor inóculo ($2,5 \times 10^6$ conidios/ml) a una temperatura de 30°C, en el medio P-B se consigue una concentración de $1,08 \times 10^9$ conidios/ml a los 7 días de crecimiento. Por otra parte, el medio puntilla-granza no llega a la concentración mínima requerida bajo estas condiciones (Ver figura 16-A).

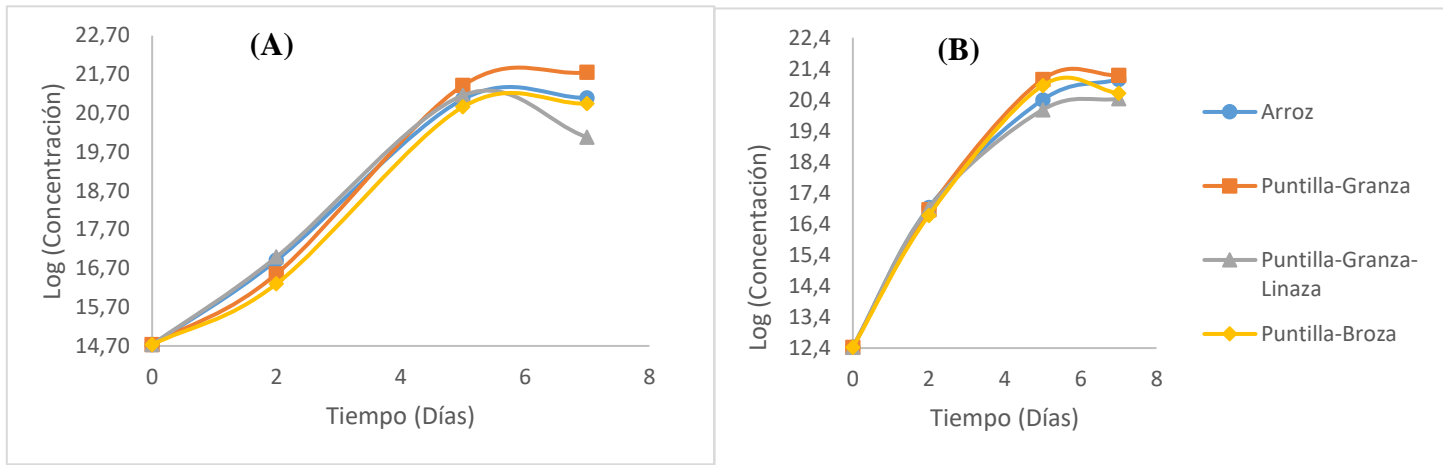


Figura 16. Logaritmo de la concentración de conidios, de *Trichoderma*, durante 7 días a una temperatura de 30°C. A: mayor inóculo; B: Menor inóculo.

Mediante la prueba de Tukey se determina que el mejor sustrato es el P-G con el mayor inóculo, siendo este estadísticamente distinto al resto de sustratos y con mayor concentración de conidios (Ver Cuadro 21). En la Figura se observa lo anterior de forma más representativa.

Cuadro 21. Agrupación de las medias de la concentración de conidios de *Trichoderma* utilizando método de Tukey y una confianza de 95%

Prueba de Tukey			
Medio	Inóculo	Media	Agrupación
Puntilla-Granza	Mayor	$2,80 \times 10^9$	A
Puntilla-Granza	Menor	$1,60 \times 10^9$	B
Arroz	Mayor	$1,45 \times 10^9$	BC
Arroz	Menor	$1,40 \times 10^9$	BC
Puntilla-Broza	Mayor	$1,25 \times 10^9$	BCD
Puntilla-Broza	Menor	$9,00 \times 10^8$	BCD
Puntilla-Granza-Linaza	Menor	$7,50 \times 10^8$	CD
Puntilla-Granza-Linaza	Mayor	$5,25 \times 10^8$	D

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Independientemente del inóculo que se utilice, la germinación aumenta a los 14 días (después del secado, obteniendo valores muy similares.

Cuadro 22. Porcentaje de Germinación de esporas, antes y después del proceso de secado.

Germinación (%)								
Tiempo	Inóculo mayor				Inóculo menor			
	Arroz	PG	PGL	PB	Arroz	PG	PGL	PB
7 días	80	75	79	82	64	79	74	40
14 días	75	94	94	83	76	93	95	84

El porcentaje de humedad bajo esta temperatura llega a valores mínimos de 4-6%, después del proceso de secado, con ambos inóculos (Ver Cuadro 23).

Cuadro 23. Porcentaje de humedad contenido en cada medio, antes y después del proceso de secado

Humedad (%)								
Tiempo	Inóculo mayor				Inóculo menor			
	Arroz	PG	PGL	PB	Arroz	PG	PGL	PB
7 días	26	16	16	32	16	16	16	18
14 días	6	4	4	6	4	4	6	4

2.3. Inoculo micelial

En la siguiente figura se muestra la curva de conidiación a partir de la utilización de un inóculo producto de un fermento líquido en el cual se utilizó como medio azúcar y extracto de levadura (Figura 15-A) como también se utilizó melaza más extracto de levadura (Figura 15-B). El comportamiento de la producción de conidios en los cuatro sustratos es similar en ambos tratamientos, por su parte el sustrato P-G-L alcanza la mayor concentración a los 7 días con $1,75 \times 10^9$ conidios/ml, mientras que el sustrato P-B alcanza la menor concentración con $9,25 \times 10^8$ conidios/ml, esto en el que se utiliza azúcar como fuente de carbono mientras que en el que se utiliza melaza como fuente de carbono tan sólo los sustratos P-G y P-G-L alcanzan una concentración mayor a $1,00 \times 10^9$ conidios/ml.

Es importante destacar que bajo este tipo de inóculo se alcanzan las concentraciones ideales a los 5 días de crecimiento.

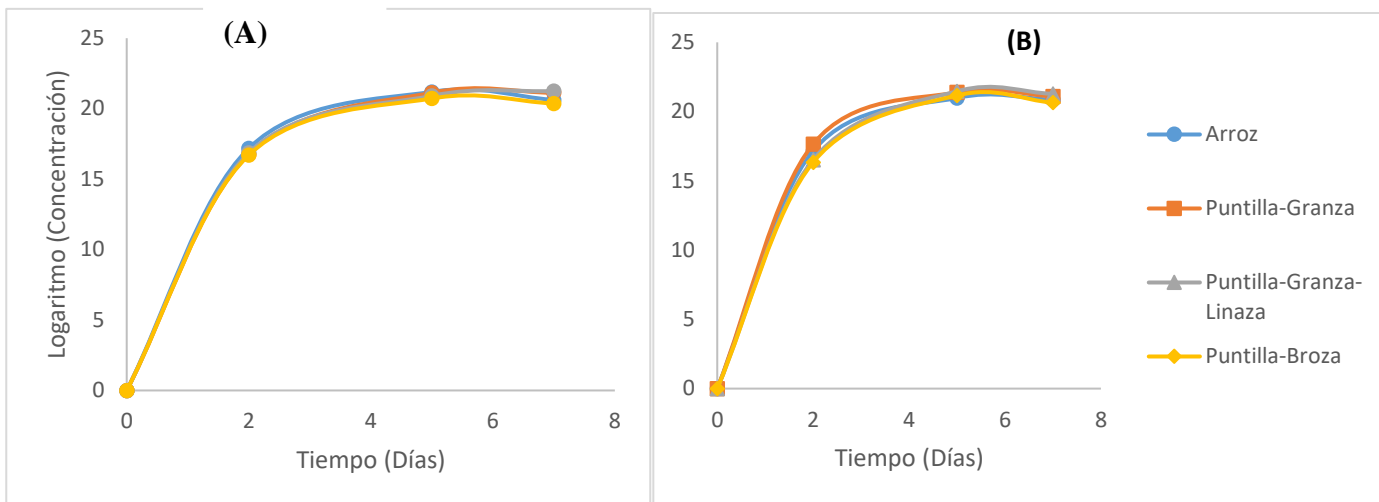


Figura 17. Concentración de conidios de *Trichoderma spp.* utilizando inóculo fermento líquido (A: azúcar más extracto de levadura; B: melaza más extracto de levadura).

Mediante la aplicación de la prueba de Tukey es posible determinar cuáles medios son estadísticamente iguales (Ver Cuadro 24)

Cuadro 24. Agrupación de las medias de la concentración de conidios de *Trichoderma spp.* utilizando método de Tukey y una confianza de 95%.

Prueba de Tukey			
Medio	Inóculo	Media	Agrupación
P-G-L	Azúcar	$1,75 \times 10^9$	A
P-G	Melaza	$1,5 \times 10^9$	AB
P-G	Azúcar	$1,45 \times 10^9$	AB
P-G-L	Melaza	$1,40 \times 10^9$	AB
A	Azúcar	$1,15 \times 10^9$	AB
A	Melaza	$9,5 \times 10^8$	AB
P-B	Azúcar	$9,25 \times 10^8$	AB
P-B	Melaza	$7,0 \times 10^8$	B

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

El máximo porcentaje de germinación a los 14 días, se alcanzó en el sustrato arroz con 84%, utilizando azúcar en el medio para el inóculo (Ver Cuadro 25).

Cuadro 25. Porcentaje de germinación de esporas de *Trichoderma*

Germinación (%)								
Tiempo	Azúcar				Melaza			
	Arroz	PG	PGL	PB	Arroz	PG	PGL	PB
7 días	76	72	70	82	54	89	87	84
14 días	84	78	80	75	72	83	82	76

El porcentaje de humedad final tiene los valores habituales (14-16%). bajo estas condiciones (Ver Cuadro 26).

Cuadro 26. Porcentaje de humedad contenido en cada medio, antes y después del proceso de secado.

Humedad (%)								
Tiempo	Azúcar				Melaza			
	Arroz	PG	PGL	PB	Arroz	PG	PGL	PB
7 días	30	32	38	52	30	32	32	52
14 días	14	14	16	14	14	14	14	14

3. Imágenes obtenidas de la Fermentación Sólida

En las siguientes figuras se observa *Trichoderma* en fermentación sólida

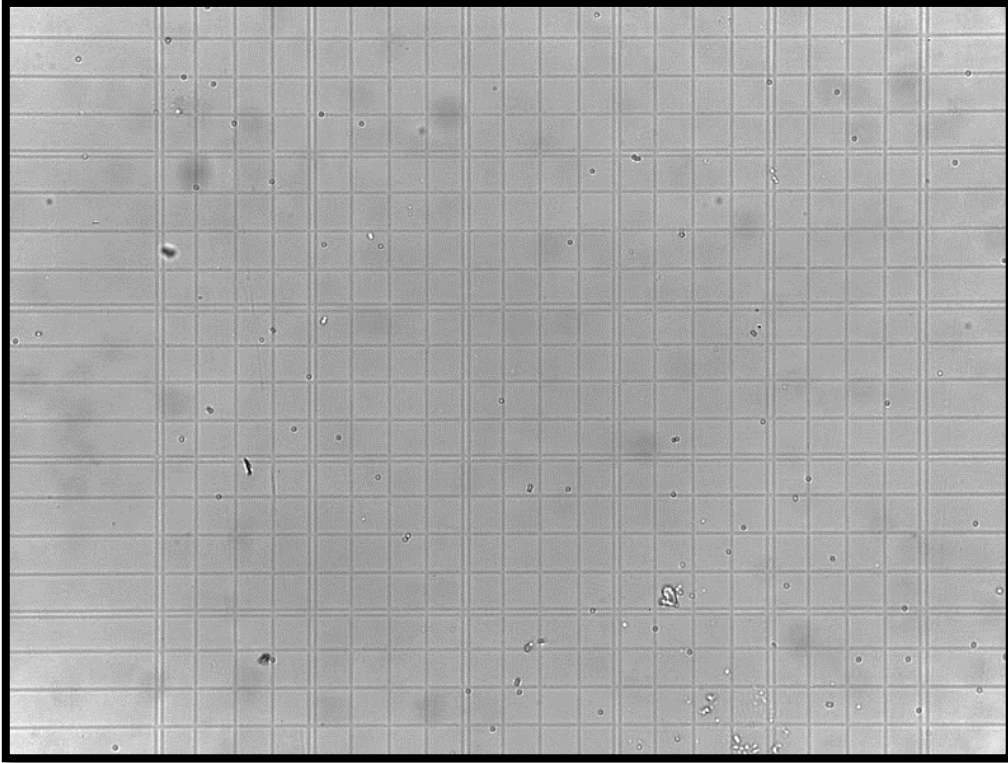


Figura 18. Conidios de *Trichoderma* en cámara de Neubauer crecidos en sustrato sólido. Aumento de 10X en microscopio óptico.



Figura 19. Vista macroscópica de *Trichoderma* después del proceso de secado de la fermentación sólida en el sustrato P-G.



Figura 20. Vista macroscópica de *Trichoderma* después del proceso de secado de la fermentación sólida en el sustrato P-B.

DISCUSIÓN

1. Fermentación líquida

1.1. Justificación de los medios de cultivo utilizados

En la mayoría de investigaciones, reportan la utilización de medios de cultivos sintéticos, como lo son el glicerol y el manitol (Seidl *et al.*, 2004), los cuales son de un alto costo, y para efectos de este trabajo la idea es reducir costos con la utilización de medios de menor precio y sobre todo de fácil acceso. Se eligieron la cebada, linaza, leche, avena y las semillas de girasol, ya que son de fácil acceso (se pueden comprar en cualquier centro de venta) por otra parte contienen gran cantidad de nutrientes como se ve en el siguiente cuadro.

Cuadro 27. Información nutricional de los sustratos utilizados en la fermentación líquida.

Sustrato	Azúcares %	N %	K %	Ca %	Mg %	P %	Cu mg/kg	Zn mg/kg	Mg mg/kg	Fe mg/kg
Linaza	4,40	2,65	1,02	0,36	0,34	0,37	11	77,6	98	147
Avena	1,22	2,02	0,36	0,28	0,13	0,21	5	154,5	48	64
Cebada	2,41	1,40	0,37	0,12	0,07	0,13	4	25,9	8	38
Girasol	1,43	1,57	0,83	0,19	0,20	0,24	10	29,9	19	75
Leche	26,73	5,04	1,55	1,15	0,12	0,48	2	50,6	0	101

Fuente: Laboratorio Químico del ICAFE (2016)

En el CICAPE para la producción de *Beauveria bassiana* en medio líquido se utiliza como fuente de nitrógeno, la linaza que en investigaciones anteriores se determinó que era el mejor sustrato por lo que, estando disponible el mismo en el centro de investigación se decidió evaluar para la producción de conidios de *Trichoderma*, sin embargo, no resultó ser el sustrato ideal.

Chegwin y colaboradores (2013), reportan la utilización de harina de cebada y harina de avena para el crecimiento de hongos comestibles, lo que da indicios de que este sustrato además de ser de fácil acceso es óptimo para el crecimiento de hongos.

Asimismo, en el presente trabajo, el mejor sustrato para la producción de conidios fue la cebada con $2,4 \times 10^8$ conidios/ml, esto a pesar de no ser el que contiene la mayor cantidad de nutrientes, indicando que otros factores son más importantes en el proceso de conidiogénesis en *Trichoderma*. O bien, indica que la esporulación se ve estimulada por el agotamiento de nutrientes, ya que el sustrato cebada, es el que contiene el menor porcentaje de macro y microelementos.

El género *Trichoderma* es poco exigente en cuanto a necesidades nutricionales, y si bien el proceso de conidiación no es bien conocido, se desencadena por varios factores como la luz, pH, temperatura, oxígeno disuelto, falta de nutrientes y daño mecánico (Horwitz, 1985; Casa-Flores *et al.*, 2004; Casa-Flores *et al.*, 2006)

1.2. Dificultades del sistema de cultivo líquido

La producción de conidios fúngicos en granos humedecidos sufre numerosas limitaciones, incluyendo altos costos de mano de obra, control de calidad deficiente, tiempos de fermentación prolongados, preocupaciones ambientales para los trabajadores y dificultades en el aumento de escala. Se han investigado métodos de producción de cultivos líquidos y se han enfocado en la producción de conidios sumergidos y clamidosporas de *Trichoderma* (Lewis & Papavizas, 1983, Papavizas *et al.*, 1984, Tabachnik, 1989, Harman *et al.*, 1991, Jin *et al.*, 1996, Sriram *et al.*, 2011).

Aunque la tecnología de fermentación líquida ha sido adoptada por algunas empresas biopesticidas alrededor del mundo para la producción de conidios sumergidos, no se proporcionan informes sobre los rendimientos, el tiempo de fermentación, los costos de producción y la comparación con los conidios aéreos en términos de bioeficacia (Kobori *et al.*, 2015).

Los estudios de formulación se han centrado en los procesos de estabilización de la biomasa de *Trichoderma*, conidios aéreos y clamidosporas que proporcionaron una estabilidad de almacenamiento y una bioeficacia adecuadas (Lewis & Papavizas 1985, Jin & Custis 2010, Yonsel & Batum 2010, Sriram *et al.*, 2011).

Kobori y colaboradores (2015), destacan que a pesar de estos intentos de producir *Trichoderma* en cultivo líquido, los bajos rendimientos, los largos tiempos de fermentación y la mala tolerancia a la desecación y la estabilidad al almacenamiento han perjudicado la adopción a gran escala de esta metodología de producción por la industria.

La tecnología de fermentación líquida tiene el potencial de soportar altos rendimientos de propágulos estables, eficaces *Trichoderma* producidos bajo el control de calidad riguroso y asegurar un producto consistente y uniforme. Aunque los micelios de conidios sumergidos y las clamidosporas de *T. harzianum* pueden producirse mediante fermentación líquida, estas formas fúngicas se producen a menudo con bajo rendimiento, falta de estabilidad al almacenamiento o persisten mal en el suelo. Si bien estudios previos con otros hongos de biocontrol han demostrado que los microsclerocios (MS) de *Colletotrichum truncatum*,

Mycleptodiscus terrestris y *Metarhizium brunneum* pueden producirse rápidamente en cultivo líquido (Jackson & Schisler 1995; Jackson & Jaronski 2009, 2012; Behle & Jackson 2014), no se habían encontrado informes de formación de esclerocios en el género *Trichoderma*, hasta una reciente investigación, donde Kobori y colaboradores (2015), reportan éstas estructuras en cultivos líquidos de *Trichoderma*.

Los MS fúngicos son propágulos preferibles para su aplicación en el suelo ya que son estructuras resistentes a hibernación, con la capacidad intrínseca de sobrevivir a condiciones de estrés, tales como la desecación y la fungistasis del suelo (es decir, la competencia con otros microorganismos del suelo) (Kobori *et al.*, 2015).

Además, reportan que los cultivos de *T. harzianum* crecieron en medios líquidos con una alta concentración de carbono y fuentes apropiadas de nitrógeno y carbono diferenciadas para formar MS y que estos gránulos secos de MS produjeron altas concentraciones de conidios aéreos cuando se rehidrataron. Asimismo, MS de *T. harzianum* fueron altamente eficaces como un tipo de propágulo para introducir el antagonista en la mezcla de envasado con el fin de reducir la enfermedad (Kobori *et al.*, 2015).

Los agentes fúngicos de control biológico destinados a ser utilizados como biopesticidas deben sobrevivir al secado y tienen una vida útil prolongada a temperatura refrigerada y, preferiblemente, a temperatura ambiente. Como propágulo de hibernación, se espera que los MS de hongos filamentosos tenga la capacidad de sobrevivir más tiempo que los conidios producidos asexualmente en condiciones naturales (Kobori *et al.*, 2015).

Jin y colaboradores (1996) encontraron que la conidiación en medio líquido se intensifica a las 68 horas de fermentación y el incremento en biomasa se da a partir de las 96 horas.

Vásquez (2010), utilizando harina de arroz como medio de cultivo con un inóculo 1×10^8 conidios/ml, obtuvo una producción de $1,35 \times 10^9$ conidios/ml para *T. harzianum* y $2,21 \times 10^9$ conidios/ml para *T. viride* como máxima esporulación al octavo día de fermentación, evidenciando que la esporulación va a ser afectada también por la especie con la que se trabaje.

Dado que no se alcanzaron las concentraciones requeridas de conidios y que la fermentación líquida, tanto con los medios líquidos y los medios semi-sólido, no favorece la producción de los conidios, sino más bien la producción de biomasa o micelio y clamidósporas (Ver figuras 7 y 8), es recomendable utilizar este tipo de fermentación para la producción de metabolitos o bien MS. Otra problemática es la contaminación bacteriana que la hace poco viable para la producción a gran escala.

Por otro lado, ya que la fermentación líquida no fue exitosa se decidió continuar con la fermentación sólida y enfocarse por completo en la misma con el fin de optimizar las condiciones de cultivo en la misma.

2. Fermentación Sólida

Los métodos de control de plagas que utilizan la fermentación en estado sólido para cultivar patógenos de insectos y hongos parásitos están aumentando la atención. Los costos de producción podrían ser grandemente reducidos y la virulencia a las plagas de insectos aumentó grandemente. El cultivo de hongos como *Beauveria bassiana* o *Colletotrichum truncatum* con capacidad insecticida es una de las formas más eficaces. La tecnología de fermentación de doble estado dinámico de gas inventada por el Instituto de Ingeniería de Procesos de la Academia China de Ciencias, se ha aplicado con éxito en la producción industrial de plaguicidas mediante el cultivo de *Bacillus thuringiensis* y la virulencia podría alcanzar 10.000 IU / mg (Chen & He, 2012).

Otra aplicación importante de la fermentación en estado sólido en la protección del medio ambiente, es la biotransformación de cultivos y residuos para mejorar su valor nutricional (Chen & He, 2012).

Las características del sustrato portador nutricional de fermentación en estado sólido se pueden reconocer tanto desde aspectos macro como microscópicos. Macroscópicamente, los pesos secos y la permeabilidad al aire del sustrato son dinámicos durante el proceso de fermentación. Los aspectos microscópicos incluyen principalmente el crecimiento de microorganismos, la adhesión sobre la superficie del sustrato, así como la descomposición por el microbio (Chen, 2013).

Desde el punto microscópico de crecimiento de hongos en el sustrato sólido, éste está limitado por la tensión superficial del agua, por lo que el crecimiento se concentra principalmente en el poro y el borde de la película líquida. Un tamaño de poro grande es adecuado para un suministro de oxígeno adecuado, pero al mismo tiempo, los contactos con nutrientes estarían impedidos por el gran impedimento estérico. Las pequeñas partículas tienen un pequeño impedimento estérico, que es adecuado para el contacto total del microorganismo y el nutriente, pero la difusión del oxígeno se ve afectada (Chen, 2013).

El tamaño de la partícula del sustrato P-G y P-G-L era mucho menor visiblemente que el tamaño del Arroz y del P-B, resultado ser mejor un menor tamaño de partícula con poco impedimento estérico de forma que el contacto entre el hongo y los nutrientes sea más efectivo que el mayor suministro de oxígeno que se proporciona con un tamaño de poro más grande.

2.1. Justificación de los sustratos utilizados

La fermentación en estado sólido es importante para resolver la crisis energética y la contaminación ambiental (Chen & Qiu 2010, Chen & He 2012). Los residuos agrícolas son a menudo ricos en nutrientes, proporcionando un hábitat ideal para el crecimiento de microorganismos. Por lo tanto, la gente tiende a utilizar residuos agrícolas para producir productos de alto valor. La fermentación en estado sólido se ha aplicado con éxito para biocombustibles, biopesticidas, biotransformación, desintoxicación biológica y biorremediación (Chen, 2013).

El sustrato es un elemento importante de la fermentación en estado sólido. Como se ha descrito, el sustrato sólido no sólo sirve como soporte para la fijación de microorganismos, sino que también proporciona una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, factores de crecimiento y otros nutrientes.

En el siguiente cuadro se observa el contenido de nutrientes que presenta cada uno de los sustratos que se utilizaron en la fermentación sólida.

Cuadro 28. Información nutricional de macro y micronutrientes presentes en los sustratos utilizados.

Sustrato	Azúcares %	N %	K %	Ca %	Mg %	P %	Cu mg/kg	Zn mg/kg	Mg mg/kg	Fe mg/kg
Arroz	0,56	1,10	0,17	0,07	0,03	0,06	4	26,2	15	32
Puntilla	1,28	1,19	0,20	0,07	0,04	0,08	5	28,3	11	37
Granza	0	0,31	0,16	0,07	0,02	0,02	2	7,4	66	72
Linaza	4,40	2,65	1,02	0,36	0,34	0,37	11	77,6	98	147
Broza	0,96	1,74	3,74	0,41	0,14	0,10	13	13,8	38	255
Puntilla- Broza- Cascarilla	1,37	1,54	2,62	0,43	0,13	0,08	14	17,7	62	728

Fuente: Laboratorio Químico del ICAFE (2016)

La mayoría de los biopesticidas basados en *Trichoderma* se compone principalmente de conidios aéreos que se producen utilizando fermentación de sustrato sólido sobre granos humedecidos (Bettiol 2011, Woo *et al.*, 2014).

En el ICAFE cuentan con grandes cantidades de desechos de broza de café, por lo que se decidió evaluar el desecho como sustrato para darle una utilidad al mismo y además sustituir al arroz como sustrato principal para la producción de *Trichoderma*.

Jackson y colaboradores (1991), reportan que 3,28 mg/L de Fe, en un medio basal son suficientes para un óptimo crecimiento de biomasa, mientras que más de 164 mg/L resultan ser tóxicos para el crecimiento de *Trichoderma spp.*

Un dato importante del cuadro 28 es la cantidad de Hierro que contiene la Broza y la PBC, lo que indica que altas cantidades de hierro pueden inhibir la conidiación de *Trichoderma*, dado que los resultados en estos sustratos a lo largo de la investigación fueron menores a $1,0 \times 10^9$ conidios/ml, exceptuando el tratamiento donde se utilizó una temperatura de 30°C.

La puntilla de arroz, tiene un costo menor al arroz 80/20, además que, por consecuente, tiene un tamaño de partícula más pequeño lo que implica una menor porosidad dificultado la aireación, no así la conducción del agua por la cercanía de las partículas. Ésta puntilla,

siempre se complementó de forma que 80% del sustrato era puntilla y 20% granza o ya bien broza.

La granza por su parte, tiene la función principal de soporte y fijación, como se aprecia en el cuadro 28, su contenido de macronutrientes es bajo, mientras que sí tiene cantidades considerables de magnesio y hierro, lo que hacen de la granza, un sustrato que también complementa la parte nutricional con los micronutrientes.

Otra combinación de sustratos que resultó ser óptima, fue la de 80% puntilla, 16% granza y 4% linaza, donde la linaza juega un papel fundamental en el aporte de nitrógeno al medio, como se muestra en el Cuadro 28.

2.2. Evaluación de sustratos

En una primera etapa se evaluaron siete tipos de combinaciones de sustratos, de los cuales cuatro fueron seleccionados como los mejores, para las siguientes etapas de la investigación, tomando en cuenta ya otras variables. Al realizar la prueba de Tukey (Ver Cuadro 5) el sustrato A como el P-G-L fueron los mejores sin presentar diferencias significativas entre sí, seguido de estos dos sustratos se encuentra el P-G y el P-B 80/20, siendo ambos estadísticamente iguales; mientras que el P-B 80/20 y el P-B 50/50 comparten también una letra sin presentar diferencias estadísticas. Aunque el sustrato P-B 80/20 alcanzó una mayor concentración, se eligió el sustrato P-B en proporción 50/50 ya que de esta forma se utilizaría una mayor cantidad de broza y una menor cantidad de puntilla reduciendo así los costos de producción. En consecuencia, los cuatro sustratos seleccionados para las siguientes etapas fueron: A, P-G-L, P-G, P-B.

2.3. Otros parámetros evaluados

2.3.1. Diferentes concentraciones de inóculo

Un menor inóculo requiere más tiempo para que las células se multipliquen en número suficiente para utilizar el sustrato. Un aumento en el número de esporas en el inóculo aseguraría una rápida proliferación y síntesis de biomasa. Después de un cierto límite, la actividad metabólica podría disminuir debido al agotamiento de nutrientes debido a la

biomasa mejorada, lo que daría como resultado una disminución de la actividad (Kashyap *et al.*, 2002).

Se determinó que utilizando un mayor inóculo ($2,50 \times 10^6$ conidios/ml) se alcanza una mayor concentración, siendo los mejores sustratos P-G y P-G-L (estadísticamente iguales). El hecho de utilizar una mayor cantidad de conidios a la hora de inocular influye en el crecimiento y conidiación de *Trichoderma*, bajo condiciones ambientales. Al ser una mayor cantidad de conidios los del inicio, fomenta que una vez que se adapten al medio y sus condiciones, el hongo cuente con más estructuras para iniciar su reproducción por medio de conidios.

2.3.2. Fotoconidiación.

Es importante remarcar que, la conidiación es esencial para la supervivencia de muchas especies de *Trichoderma* en el ambiente y por lo tanto se podría esperar un alto grado de conservación en cómo funcionan los genes de conidiación y se regulan. Sin embargo, se ha demostrado que las respuestas conidiales bajo las mismas condiciones controladas varían mucho entre especies. Puede ser que los genes mismos funcionen de la misma manera, pero las adaptaciones metabólicas específicas de la especie al ambiente alteran los umbrales de la respuesta y por lo tanto la respuesta conidial, enmascarando la semejanza en la regulación (Steyaert *et al.*, 2013).

La exposición a la luz puede estimular la reproducción asexual y sexual en múltiples especies de hongos. En *Trichoderma*, la conidiogénesis es estimulada por la energía luminosa desde el ultravioleta cercano (UVA) a la parte azul del espectro (320-500 nm), lo que define a este género como hongos de "luz azul" (Betina y Farkaš, 1998).

Horwitz y colaboradores registraron corrientes eléctricas en la membrana plasmática de *Trichoderma*, de 60 a 150 minutos después de la aplicación de un pulso de luz azul (Horwitz *et al.*, 1984c); Gresik *et al.* (1988) detectó hiperpolarización de la membrana plasmática después de la aplicación de luz, así como un aumento en el nivel intracelular de ATP y una rápida disminución de adenosina monofosfato cíclico (cAMP), seguido de un segundo pulso de AMPc que disminuyó lentamente. Estas observaciones sugirieron la participación de una proteína de membrana, probablemente asociada con proteínas G (Gresik *et al.*, 1988).

En total oscuridad este género crece solamente como micelio, sin embargo, si se le aplica luz azul induce una cascada de respuesta que conduce a la conidiación (Horwitz *et al.*, 1985).

Muñoz (2012) reporta que al aplicar luz azul se estimula la conidiación encontrando la expresión de proteínas relacionadas con este proceso.

En este trabajo viendo el cuadro 9 y el cuadro 12, no se estimula en gran medida la producción de conidios, tanto en la luz azul como en la luz blanca, esto puede deberse a varias razones. Primero no se conocía la longitud de onda aplicada, tan solo se utilizó una lámpara que visiblemente era luz azul, segundo se utilizó un fotoperiodo de 12 horas luz-12 horas oscuridad, según Muñoz (2012) es posible que aplicando unos minutos un impulso de luz azul sea suficiente, mientras que la luz constante puede llegar a inhibir la conidiación.

Por otra parte, se refleja en los resultados que la germinación se ve afectada negativamente por la presencia de luz, siendo mucho menor a los 7 días que a los 14 días donde se dio el proceso de secado en ausencia de la luz directa. Como se ha descrito la luz constante puede ser inhibitorio para la conidiación Muñoz (2012), siéndolo también para la germinación de las esporas, de forma que el estrés es tal que impide la aparición del tubo germinativo de forma que el porcentaje de germinación disminuye, una vez que se elimina la exposición directa de la luz, durante 7 días, el porcentaje de germinación aumenta.

2.3.3. Tiempo de aireación.

Se determinó que el tiempo ideal para abrir la bolsa es al segundo día de fermentación, lo cual indica que el hongo necesita primeramente adaptarse a las condiciones de cultivo y colonizar el sustrato durante los primeros dos días, a partir del día dos, es necesario que la fase gaseosa se expanda, de modo que se abre la bolsa permitiendo una mayor oxigenación para así empezar el proceso de conidiación.

Hernández-Oñate y colaboradores (2012), señalan que la conidiación es inducida por una lesión mecánica, sugiriendo que las hifas filamentosas surgen de las células vecinas y las puntas de las nuevas hifas se diferencian en conidióforos. Siendo de este modo la agitación de la bolsa de vital importancia para la conidiación.

La diferenciación en las células vecinas sugiere la liberación de moléculas de señalización desde el sitio de daño, que es percibido por un receptor hipotético en las células adyacentes (Ver figura 21). El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es una molécula de vida moderada que es capaz de difundirse a través de las membranas celulares, una característica que es consistente con su papel como molécula de señalización (Vandenbroucke *et al.*, 2008). Se ha propuesto que el H_2O_2 actúa como la supuesta molécula de señalización de lesiones y se cree que activa diferentes cascadas de señalización, incluyendo las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) implicadas en la adaptación al estrés (Hernández-Oñate *et al.*, 2012). Por lo anterior es necesario que el oxígeno procedente de la fase gaseosa este en contacto con el hongo para permitir la producción de H_2O_2 .

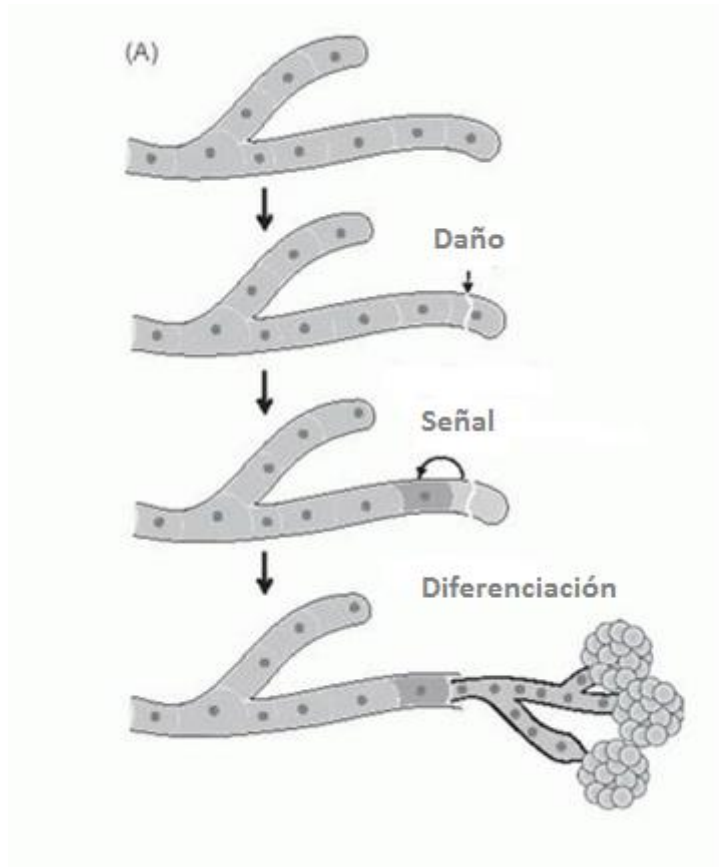


Figura 21. Señalización de las células vecinas ante un daño mecánico para inducir la conidiación. Fuente: (Steyaert *et al.*, 2013)

Aunque la mayoría de los hongos de crecimiento aeróbico usan oxígeno molecular como aceptor de electrones terminal durante la respiración, se ha reconocido que el oxígeno puede ser potencialmente tóxico, principalmente debido a la producción de radicales libres colectivamente referidos a especies reactivas de oxígeno (ROS) (Li *et al.*, 2009). A nivel celular, los efectos de ROS pueden variar desde la muerte celular a efectos más sutiles en el metabolismo celular, la morfología o vías de señalización. En las células fúngicas, la producción de ROS es inducida por múltiples factores ambientales como la inanición, la luz, el daño mecánico, así como la interacción con otros organismos vivos (Aguirre & Lambeth, 2010).

Otro factor importante, es que, al abrir la bolsa al primer día es posible que el hongo no haya colonizado la mayoría del sustrato, permitiendo de este modo que otros microorganismos interactúen y compitan por espacio y nutrientes.

2.3.4. Temperatura.

La temperatura es uno de los factores más influyentes que afectan el crecimiento y a la supervivencia de microorganismo. Los valores absolutos de las temperaturas mínimas o máximas varían mucho entre los organismos y sus especies. La temperatura a medida que se eleva las reacciones químicas y enzimáticas de la célula son más rápidas y por ende el crecimiento se acelera. Sin embargo, por encima de cierta temperatura algunas proteínas particulares se desnaturalizan o sufren daños, afectando el metabolismo de forma irreversible. La temperatura óptima de un microorganismo está siempre más cerca de la máxima que de la mínima, en una fermentación se busca de encontrar la temperatura óptima, donde las reacciones enzimáticas se den a velocidades en constante aumento, promoviendo el crecimiento o en dado caso metabolitos (Madigan *et al.*, 2004).

En el cuadro 18 se aprecia que la temperatura de 25°C no estimula en gran medida la conidiación, por otro lado, en el cuadro 21 se muestra que la temperatura de 30°C aumenta considerablemente la producción de conidios en el medio P-B alcanzado $1,08 \times 10^9$ conidios/ml, concentración que tan solo se logra en este sustrato que contiene broza, con la utilización de la temperatura de 30 °C y un inóculo de $2,5 \times 10^6$ conidios/ml. El contenido de humedad es alrededor del 4% mejorando el proceso de secado con respecto al resto de tratamientos. Esto sin afectar la germinación de las esporas (Ver cuadro 22).

Al utilizar una temperatura de 30°C la humedad contenida en los sustratos se evaporaba con gran facilidad, una de las razones por las que el sustrato P-B se vio favorecido es porque contenía más humedad que el resto de los sustratos, por el tratamiento previo que se le realizaba con agua.

Según Madigan y colaboradores (2004), la temperatura óptima no es completamente fija, puede ser modificada por otros factores ambientales, en particular la composición del medio de cultivo.

2.3.5. Inóculo micelial

García y colaboradores (2006), recomiendan la producción de biomasa en fermentación líquida, para ser utilizado posteriormente como inóculo, además reportan una gran cantidad de estructuras producidas en la fermentación líquida, que permiten la colonización posterior en el sustrato en la fermentación sólida. Entre las principales ventajas destacan la reducción de tiempos en la obtención del inóculo.

La fermentación de inóculo micelial o bifásica, tiene la principal ventaja de acortar tiempos, ya que para llegar a producir el inóculo conlleva sembrar en la placa Petri el hongo y esperar durante 8 días para que esté completamente esporulada. En cambio, si se inocula micelio, este se fermenta en un medio de cultivo líquido durante dos días reduciendo así los tiempos de producción de en 6 días, esto en caso de no contar con placas esporuladas de *Trichoderma*.

En esta investigación se encontró que realizar la producción de conidios en dos fases, una líquida y otra sólida es la mejor alternativa, ya que a los 2 días de crecimiento en medio líquido como micelio (biomasa), se puede proceder con la otra fase en sustrato sólido que, a los 5 días de fermentación, alcanza las concentraciones ideales, acortando los tiempos de producción y reduciendo la mano de obra.

Por otro lado, se encontró que el mejor sustrato es el P-G-L (Ver cuadro 24) alcanzando $1,75 \times 10^9$ conidios/ml a los 7 días, esto utilizando el medio líquido azúcar y extracto de levadura de la primera fase, lo anterior puede ser debido a que la melaza, según Vásquez (2010), contiene sustancias que inhiben el crecimiento de *Trichoderma*.

En los demás tratamientos se alcanzaban las máximas producciones de conidios en el día 7 de fermentación en sustrato sólido, mientras que en el que se implementa la metodología de inóculo micelial, las máximas concentraciones se alcanzan en el día 5, en el mejor sustrato P-G-L se consigue una concentración de $2,10 \times 10^9$ conidios/ml a los 5 días de fermentación en sustrato sólido, por lo que se recomienda que al utilizar la fermentación bifásica, a los 5 días de la segunda fase, se pase al proceso de secado.

2.4. Comparación de fermentación líquida con respecto a la fermentación sólida.

Chavés-García y colaboradores (2008), comparan la fermentación sólida con la líquida y obtienen una mayor cantidad de conidios, pureza y germinación en la fermentación sólida, demostrado que la fermentación líquida presenta claras desventajas.

En este trabajo las características de la fermentación sólida y la fermentación líquida hacen de la primera un sistema óptimo para la producción de conidios tal y como lo demuestran los resultados, en el siguiente cuadro se muestran las características principales de cada fermentación de modo que a forma de comparación la fermentación sólida presenta las ventajas de poco consumo de energía, menos contaminación, menos desperdicio de materia orgánica, alta tasa de producción entre otros.

Cuadro 29. Comparación detallada de la fermentación sólida con respecto a la fermentación líquida

Fermentación Sólida	Fermentación líquida
No hay agua libre, y el agua contenida en el sustrato es poca.	El agua es el máximo componente del cultivo.
Los microorganismos absorben nutrientes del sustrato sólido humedecido; existe un gradiente de concentración de nutrientes.	Los microorganismos absorben nutrientes del cultivo líquido, no hay un gradiente de concentración.

El sistema de cultivo consiste de tres fases (gaseosa, líquida y sólida), y el gas es la fase continua.	El sistema de cultivo consiste de líquido, y el líquido es la fase continua.
El requerimiento de oxígeno se obtiene de la fase gaseosa, poco consumo de energía.	Se requiere de un dispositivo que inyecte aire al medio, y que el oxígeno del aire se disuelva en el medio.
Los microorganismos adsorben o penetran el sustrato sólido	Los microorganismos se distribuyen en el sistema de cultivo
Al final de la fermentación, el medio es un sustrato de estado húmedo, y las concentraciones de productos son altas	Al final de la fermentación, el medio es líquido y las concentraciones de productos son bajas
Alta tasa de producción y alto rendimiento del producto	Baja tasa de producción y bajo rendimiento del producto
La mezcla es difícil y el crecimiento de microorganismos está restringido por la difusión de nutrientes	La mezcla es fácil y el crecimiento de microorganismos no está restringido por la difusión de nutrientes
La eliminación del calor metabólico es difícil.	El control de la temperatura es fácil.
Heterogeneidad	Homogeneidad
El proceso de extracción es simple y controlable; hay poco desperdicio de materia orgánica	El proceso de extracción suele ser complejo; Hay una gran cantidad de residuos de agua orgánica
Simple contenedor de fermentación	Bioreactor de fermentación sellado

Fuente: Chen and Xu (2004)

CONCLUSIONES

La fermentación en sustrato sólido favorece el proceso de conidiación, además es una alternativa más limpia, evitando el desperdicio de agua y materia orgánica.

Usando como inóculo micelio de *Trichoderma spp.* se reducen los tiempos de fermentación, alcanzando la máxima concentración a los 5 días de la inoculación, consiguiendo hasta $2,10 \times 10^9$ conidios/ml en el sustrato puntilla-granza-linaza.

La puntilla-granza y la puntilla-granza-linaza predominan como los mejores sustratos en todas las condiciones evaluadas.

Cuando la FSS se mantiene a 30°C se logra una deshidratación mayor del sustrato puntilla-broza, lo que promueve una buena producción de conidios.

RECOMENDACIONES

Realizar un análisis de costos-beneficios con el fin de determinar cuál sustrato es el menos costoso, valorando también cual es el óptimo.

Probar aplicar mayores porcentajes al 30% de humedad, cuando se manejan temperaturas de 30°C con el fin de evaporación temprana.

Evaluar si la fermentación en medio líquido promueve la producción de metabolitos de *Trichoderma* evaluando al mismo tiempo la bioeficacia de los mismos, con el propósito de lograr un mayor control de las enfermedades que afectan el café.

Acelerar el proceso de secado mediante la utilización de los calentadores para conseguir temperaturas de entre 25°C a 30°C, ya que se comprobó que las mismas no afectan la germinación de las esporas, además de que los sustratos contienen menos porcentaje de humedad lo que aumenta la vida útil del producto.

Verificar la longitud de onda aplicada con la luz azul, con el fin conocer si la longitud de onda que se utilizaba era la recomendada por la literatura.

Evaluar la bioeficacia de los conidios u otras estructuras producidos, bajo la fermentación líquida a nivel de campo para poder realizar una comparación con respecto a los conidios producidos en la fermentación sólida.

Estandarizar el tratamiento previo realizado al medio puntilla-broza de modo que siempre sea el mismo porcentaje de humedad aplicado.

Optimizar la fermentación bifásica de modo que se ajusten las condiciones para la máxima producción de conidios, siendo una metodología prometedora, acortando tiempos de fermentación y evitando la utilización de placas petri como inóculo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aceves, A. C., Sánchez, M. A. Flores, R., Ayala, A., & Cruz, N. (2013). Eficiencia biológica de cepas nativas de *Trichoderma* spp., en el control de *Sclerotium rolfsii* Sacc., en cacahuete. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 17(3), 89-107.
- Aguirre, J., & Lambeth, J. D. (2010). Nox enzymes from fungus to fly to fish and what they tell us about Nox function in mammals. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(9), 1342-1353.
- Banco Central de Costa Rica. (2016). Exportaciones FOB por principales productos, Dirección General de Aduanas. Obtenido el 06 de noviembre del 2016 de la dirección web:<http://indicadoreseconomicos.bccr.fi.cr/indicadoreseconomicos/Cuadros/fmVerCatCuadro.aspx?idioma=1&CodCuadro=%20479>
- Baroncelli, R., Piaggieschi, G., Fiorini, L., Bertolini, E., Zapparata, A., Pè, M. E., ... & Vannacci, G. (2015). Draft whole-genome sequence of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* T6776. *Genome announcements*, 3(3), e00647-15.
- Beekman, A. M., & Barrow, R. A. (2014). Fungal metabolites as pharmaceuticals. *Australian Journal of Chemistry*, 67(6), 827-843.
- Behle, R. W., & Jackson, M. A. (2014). Effect of fermentation media on the production, efficacy, and storage stability of *Metarhizium brunneum* microsclerotia formulated as a prototype granule. *Journal of economic entomology*, 107(2), 582-590.
- Betina, V. (1995) Photoinduced conidiation in *Trichoderma viride*. *Folia Microbiologica*, 40, 219-224.
- Betina, V., & Farkas, V. (1998). Sporulation and light-induced development in *Trichoderma*. *Trichoderma and Gliocladium Volume*, 75.
- Betina, V., & Zajacová, J. (1978). Regulation of periodicity and intensity of photo-induced conidiation of *Trichoderma viride*. *Folia Microbiologica*, 23, 453-459.
- Bettiol, W. (2011). Biopesticide use and research in Brazil. *Outlooks on Pest Management*, 22(6), 280-283.

- Buller, N. B. (2014). *Bacteria and Fungi from Fish and other Aquatic Animals: a practical identification manual*. Cabi.
- Cabrera, O., López, E., José, J. Correa, J., & Amarante, G. (2016). *Ceratocystis* Wilt Pathogens: History and Biology—Highlighting *C. cacaofunesta*, the Causal Agent of Wilt Disease of Cacao. In Bailey, B., & Meinhardt, L. (Eds.), *Cacao diseases*. (pp. 307-337). New York, USA: Springer International Publishing Switzerland.
- Calle Bellido, J. (2006). Caracterización morfológica y molecular de hongos fitopatógenos de suelo e identificación de bacterias foliares en el cultivo de cebolla (Order No. 1431312). Available from ProQuest Dissertations & Theses Global. (304934786).
- Capera-Borja, D., Leguizamon-Caycedo, J. E., & Lopez- Ríos, A. (1995). El secamiento de los cítricos en la zona cafetera central. *Cenicafé Avances Técnicos*, 212, 1-8.
- Castro, B. L. (1998). Incidencia de llaga macana (*Ceratocystis fimbriata*, Ell. Halst. Hunt.) en la práctica de poda de ramas bajas del café. *Avances Técnicos Cenicafé*, 252, 1–8.
- Centeno, R., & Pavone, D. (2015). Producción de celulasas y biomasa del hongo *Trichoderma reesei* utilizando lodo papelerero como fuente de carbono. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 35(1), 35-38.
- Chakraborty, M. R., N. C. Chatterjee. (2008). Control of Fusarium Wilt of Solanum melongena by *Trichoderma* spp. *Biología Plantarum* 52, 582-586, Holanda.
- Chandra, M., Kalra, A., Sharma, P. K., Kumar, H., & Sangwan, R. S. (2010). Optimization of cellulases production by *Trichoderma citrinoviride* on marc of *Artemisia annua* and its application for bioconversion process. *Biomass and Bioenergy*, 34(5), 805-811.
- Chaverri, P., Castlebury, L. A., Overton, B. E., & Samuels, G. J. (2003). *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. *Mycologia*, 95(6), 1100-1140.
- Chavez, M. (2006). Producción de *Trichoderma* spp. y Evaluación de su efecto en cultivo de Crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Licenciatura. Universidad Javeriana de Bogotá.

- Chávez-García, M., Quevedo-Hidalgo, B., Martínez-Salgado, M. M., Mercado-Reyes, M., Rodríguez-Bocanegra, M. X., & Montaña-Lara, J. S. (2009). Efecto del sustrato y la exposición a la luz en la producción de una cepa de *Trichoderma* sp. *Universitas Scientiarum*, 13(3), 245-251.
- Chen, H. (2013). *Modern solid state fermentation: theory and practice*. Beijing, China: Springer Science & Business Media.
- Chen, H. Z., & He, Q. (2012). Value-added bioconversion of biomass by solid-state fermentation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 87(12), 1619-1625.
- Chen, H., & Qiu, W. (2010). Key technologies for bioethanol production from lignocellulose. *Biotechnology Advances*, 28(5), 556-562.
- Chen, H., & Xu, J. (2004). *Modern solid state fermentation: theory and practice*. Beijing: Chemical Industry Press.
- Couto, S. R., & Sanromán, M. A. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry—a review. *Journal of Food Engineering*, 76(3), 291-302.
- Cruz, L. (2007). *Estandarización del proceso de producción masiva del hongo Trichoderma koningii Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto*. (Tesis Microbiología Industrial). Pontificia Universidad Javeriana, Ecuador. Recuperado de: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis23.pdf>.
- Debuchy, R., Berteaux-Lecellier, V., & Silar, P. (2010) Mating systems and sexual morphogenesis in ascomycetes. In: Borkovich, K.A. & Ebbole, D.J. (Eds.) *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi* 33 (pp 501-535). Washington DC, USA: ASM Press.
- Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., Monte, E., ... & Kubicek, C. P. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology*, 9(10), 749-759.
- Fang, W., Pei, Y., & Bidochka, M. J. (2007). A regulator of a G protein signalling (RGS) gene, *cag8*, from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is involved in conidiation, virulence and hydrophobin synthesis. *Microbiology*, 153(4), 1017-1025.

- FAO. (2015). FAO Statistical Pocketbook Coffee. Obtenido el 06 de noviembre del 2016 de la dirección web: <http://www.fao.org/3/a-i4985e.pdf>
- Faria, M. R., & Wraight, S. P. (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43(3), 237-256.
- Gams, W., & Bissett, J. (1998). Morphology and identification of *Trichoderma*. In Harman, G.E. and Kubicek, C.P. (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium, Vol (1), Basic Biology, Taxonomy and Genetics*. (pp. 3-34). London, England: Taylor and Francis Ltd.
- García, R., Durán, M. A., & Riera, R. (2006). Producción de biomasa de *Trichoderma harzianum* por fermentación líquida. *Fitosanidad*.
- García, R., Riera, R., Zambrano, C., & Gutiérrez, L. (2014). Desarrollo de un fungicida biológico a base de una cepa del hongo *Trichoderma harzianum* proveniente de la región andina venezolana. *Fitosanidad*, 10(2), 115-121.
- Goodwin, S. B., & Kema, G. H. (2014). The genomes of *Mycosphaerella graminicola* and *M. fijiensis*. In *Genomics of Plant-Associated Fungi: Monocot Pathogens* (pp. 123-140). Springer Berlin Heidelberg.
- Goyal, S., Ramawat, K. G., & Mérillon, J. M. (2016). Different Shades of Fungal Metabolites: An Overview.
- Gresik, M., & Kolarova, N. (1988). Membrane potential, ATP, and cyclic AMP changes induced by light in *Trichoderma viride*. *Experimental mycology*, 12(4), 295-301.
- Gressel, J., & Galun, E. (1967). Morphogenesis in *Trichoderma*: Photoinduction and RNA. *Developmental Biology*, 15, 575-598.
- Gressel, J.B., & Hartmann, K.M. (1968) Morphogenesis in *Trichoderma*: Action spectrum of photoinduced sporulation. *Planta*, 79, 271-274.
- Harman G. (2001). *Trichoderma* spp., including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* and other sp. Deuteromycetes, Moniliales (asexual classification system). Recuperado de <http://www.Biocontrol.entomology.cornell.edu/pathogens/trichoderma.html>

- Harman, G. E., Jin, X., Stasz, T. E., Peruzzotti, G., Leopold, A. C., & Taylor, A. G. (1991). Production of conidial biomass of *Trichoderma harzianum* for biological control. *Biological control*, 1(1), 23-28.
- Hernández, A. (2003). *Microbiología Industrial*. San José, Costa Rica: Universidad Estatal a Distancia de Costa Rica.
- Hernández-Oñate, M. A., Esquivel-Naranjo, E. U., Mendoza-Mendoza, A., Stewart, A., & Herrera-Estrella, A. H. (2012). An injury-response mechanism conserved across kingdoms determines entry of the fungus *Trichoderma atroviride* into development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(37), 14918-14923.
- Hölker, U., Höfer, J., & Lenz. 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology. Biotechnology*, 64(2), 175–186.
- Horwitz, B.A., Perlman, A., & Gressel, J. (1990). Induction of *Trichoderma* sporulation by nanosecond laser pulses: Evidence against cryptochrome cycling. *Photochemistry and Photobiology*, 51, 99-104.
- Huang, H. C., Bremer, E., Hynes, R. K., & Erickson, R. S. (2000). Foliar application of fungal biocontrol agents for the control of white mold of dry bean caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biological Control*, 18(3), 270-276.
- ICAFE. (2011). Guía Técnica del Cultivo del Café. 1a ed. Heredia, Costa Rica. 72pp. Obtenido el 06 de noviembre del 2016 de la dirección web: <http://www.icafe.cr/wp-content/uploads/cicafe/documentos/GUIA-TECNICA-V10.pdf>
- INEC. (2014). Censo Nacional Agropecuario. San José, Costa Rica. Obtenido el 06 de Noviembre del 2016 de la dirección web: <http://www.inec.go.cr/sites/default/files/documentos/agropecuario/publicaciones/reagropeccenagro2014-tii-007.pdf>
- Jackson, A. M., Whipps, J. M., & Lynch, J. M. (1991). Nutritional studies of four fungi with disease biocontrol potential. *Enzyme and microbial technology*, 13(6), 456-461.
- Jackson, M. A., & Jaronski, S. T. (2009). Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. *Mycological research*, 113(8), 842-850.

- Jackson, M. A., & Schisler, D. A. (1995). Liquid culture production of microsclerotia of *Colletotrichum truncatum* for use as bioherbicide propagules. *Mycological Research*, 99(7), 879-884.
- Jaklitsch, W. M., Samuels, G. J., Dodd, S. L., Lu, B. S., & Druzhinina, I. S. (2006). *Hypocrea rufa/Trichoderma viride*: A reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. *Studies in Mycology*, 56, 135-177.
- Jarrold, S.L., Moore, D., Potter, U., Charnley, A.K., 2007. The contribution of surface waxes to pre-penetration growth of an entomopathogenic fungus on host cuticle. *Mycol. Res.* 111, 240e249
- Jiménez-Rodríguez, F., & Valerín-Berrocal, K. (2012). Determinación del efecto antimicrobiano in vitro de nanopartículas de plata, cobre y nanotubos de carbono en fitopatógenos aislados del cultivo de Gerberas (*Gerbera jamesonii*) en la zona de Llano Grande de Cartago. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Vicerrectoría de Investigación y Extensión .
- Jin, X., & Custis, D. (2011). Microencapsulating aerial conidia of *Trichoderma harzianum* through spray drying at elevated temperatures. *Biological Control*, 56(2), 202-208.
- Jin, X., Taylor, A. G., & Harman, G. E. (1996). Development of Media and Automated Liquid Fermentation Methods to Produce Desiccation-Tolerant Propagules of *Trichoderma harzianum*. *Biological Control*, 7(3), 267-274.
- Jones, E.E., Bienkowski, D., Stewart, A., 2015. Effect of water potential on growth, germination and parasitism of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Trichoderma* species. *Ann. Appl. Biol.*
- Kashyap, P., Sabu A., Pandey, A., Szakacs, G. (2002). Extra-cellular Lglutaminase production by *Zygosaccharomyces rouxii* under solidstate fermentation. *Process Biochem.* 38: 307–312
- Kobori, N. N., Mascarín, G. M., Jackson, M. A., & Schisler, D. A. (2015). Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. *Fungal biology*, 119(4), 179-190.

- Kolombet, L. V., Zhigletsova, S. K., Kosareva, N. I., Bystrova, E. V., Derbyshev, V. V., Krasnova, S. P., & Schisler, D. (2008). Development of an extended shelf-life, liquid formulation of the biofungicide *Trichoderma asperellum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *24*(1), 123-131.
- Kubicek, C. P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D. A., Druzhinina, I. S., Thon, M., ... & Mukherjee, M. (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome biology*, *12*(4), R40.
- Kumagai, T., & Oda, Y. (1969). An action spectrum for photoinduced sporulation in fungus *Trichoderma viride*. *Plant and Cell Physiology*, *10*, 387-392.
- Lewis, J. A., & 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.
- Li, Q., Harvey, L. M., & McNeil, B. (2009). Oxidative stress in industrial fungi. *Critical reviews in biotechnology*, *29*(3), 199-213.
- Lilly, V.G., & Barnett, H.L. (1951) *Physiology of the Fungi*. USA: McGraw-Hill Book Company Inc.
- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. (2004). Brock, biología de los microorganismos. Pearson education. 1011pp.
- Martínez, B., Infante, D., González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismo de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Protección vegetal*, *24* (1), pp.14-21
- Martinez-Medina, A., Pozo, M. J., Cammue, B. P., & Vos, C. M. (2016). Belowground Defence Strategies in Plants: The Plant–*Trichoderma* Dialogue. In Vos, C. M. F. & Kazan, L. (Eds.) *Belowground Defence Strategies in Plants* (pp. 301-327). Kirschallee, Germany: Springer International Publishing.
- Mehetre, S. T., & Mukherjee, P. K. (2015). *Trichoderma* Improves Nutrient Use Efficiency in Crop Plants. En Rakshit, A., Bahadur, H., & Sen, A. (Eds.), *Nutrient Use Efficiency: from Basics to Advances* (pp 173-180). New Delhi, India: Springer India.

- Moreno-Mateos, M.A., Delgado-Jarana, J., Codón, A.C., Benítez, T., 2007. PH and Pac1 control development and antifungal activity in *Trichoderma harzianum*. *Fungal Genet. Biol.* 44, 1355–1367.
- Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Herrera-Estrella, A., Schmoll, M., & Kenerley, C. M. (2013). *Trichoderma* research in the genome era. *Annual review of phytopathology*, 51, 105-129.
- Muñoz Centeno, T. (2012). Obtención del epigenoma de *Trichoderma atroviride* en respuesta a la luz azul. (Tesis de Maestría en Biología Molecular). Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, México. Recuperado de: <http://repositorio.ipicyt.edu.mx/handle/11627/244>
- Newcombe, G., & Dugan, F.M. (2010). Fungal pathogens of plants in the homogene. En Gherbawy, Y., & Voight, K. (Eds.), *Molecular Identification of Fungi* (pp. 3-34). Heidelberg, Germany: Springer Berlin Heidelberg.
- O'Brien, T. Kinnaird, M. (2003). Caffeine and Conservation. American Association for the Advancement of Science. 578 pp. Obtenido el 06 de noviembre del 2016 de la dirección web: <http://science.sciencemag.org/content/300/5619/587.abstract>
- Organización Internacional del Café. (2016). Monthly Export Statistics. Obtenido el 06 de noviembre del 2016 de la dirección web: http://www.ico.org/trade_statistics.asp
- Orrala, M. (2013). Control biológico de oídio (*Podosphaera fusca* F.) y fusarium (*Fusarium oxysporum* F.) en el cultivo de sandía (*Citrullus lanatus* T.) en la comuna río verde, provincia de santa elena. (Proyecto de tesis de grado previa a la obtención del Título de: Ingeniero agropecuario). Facultad de Ciencias Agrarias Escuela de Agropecuaria, La Libertad, Ecuador.
- Otiniano, A. J., Bello, S., Cruz, R., Borjas, R., & Gamboa, R. (2015). Efecto de seis fungicidas sobre el crecimiento in vitro de *Mycena citricolor* (Berk & Curt). *Saber y Hacer*, 2(1), 9-16.
- Ownley, B. H., Griffin, M. R., Klingeman, W. E., Gwinn, K. D., Moulton, J. K., & Pereira, R. M. (2008). *Beauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease control. *Journal of invertebrate pathology*, 98(3), 267-270.

- Pandey, A., Fernandes M., Larroche C. (2008). Current Developments in Solid-state Fermentation. Springer, New York, US 517.
- Papavizas, G. C., Dunn, M. T., Lewis, J. A., & Beagle-Ristaino, J. (1984). Liquid fermentation technology for experimental production of biocontrol fungi. *Phytopathology*, 74(10), 1171-1175.
- Papavizas, G.C. 1985. Trichoderma and Gliocladium: Biology, ecology and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 23(1), 23-54
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., 2009. The ecology of fungal food spoilage. In: Fungi and Food Spoilage, Springer, pp. 3–9
- Ponizovskaya, V. B., Antropova, A. B., Mokeeva, V. L., Bilanenko, E. N., & Chekunova, L. N. (2011). Effect of water activity and relative air humidity on the growth of *Penicillium chrysogenum* Thom, *Aspergillus repens* (Corda) Sacc., and *Trichoderma viride* Pers. isolated from living spaces. *Microbiology*, 80(3), 378-385.
- Ramanujam, B., Prasad, R. D., Sriram, S., & Rangeswaran, R. (2010). Mass production, formulation, quality control and delivery of *Trichoderma* for plant disease management. *J Plant Protect Sci*, 2(2), 1-8.
- Rifai, M.A. (1969). *A revision of the genus Trichoderma*. Mycological Papers.
- Ríos, L. V. (2014). Caracteres principales, ventajas y beneficios agrícolas que aporta el uso de *Trichoderma* como control biológico. *Agroecosistemas*, 2(1), 254-264.
- Rivera, W. (2014). Enfermedades estudiadas en el curso de análisis y aplicación de sistemas de producción agrícola. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 18 pp.
- Rodriguez-Romero, J., Hedtke, M., Kastner, C., Müller, S., & Fischer, R. (2010). Fungi, hidden in soil or up in the air: light makes a difference. *Annual Reviews of Microbiology*, 64, 585-610.
- Sabu A, Sarita S, Pandey A, Bogar B, Szakacs G, Soccol CR (2002). Solid-State Fermentation for Production of Phytase by *Rhizopus oligosporus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 102-103: 251-260.
- Samuels, G.J. (1996) *Trichoderma*: A review of biology and systematics of the genus. *Mycological Research*, 100, 923-935.

- Samuels, G.J., & Ismaiel, A. (2009) *Trichoderma evansii* and *T. lieckfeldtia*: Two new *T. hamatum*-like species. *Mycologia*, *101*, 142-156.
- Sandoval, S. (2015). *Evaluación de la Curva de Crecimiento, Cuatro Sustratos, Dos Métodos de Esporulación, Tres Portadores Inertes para Trichoderma spp. y su Comportamiento Frente a Ocho Fungicidas y Cuatro Hongos Patógenos en Laboratorio* (Tesis de Maestría). Escuela Superior Politécnica, Ecuador.
- Saxena, S. (2015). *Applied Microbiology*. Punjab, India: Springer India.
- Seibel, C., Tisch, D., Kubicek, C. P., & Schmoll, M. (2012a) ENVOY is a major determinant in regulation of sexual development in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Eukaryotic Cell*, *11*(7), 885-895.
- Seidl, V., Seibel, C., Kubicek, C.P., & Schmoll, M. (2009). Sexual development in the industrial workhorse *Trichoderma reesei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, *106*, 13909-13914.
- Seidl, V., Seiboth, B., Karaffa, L., & Kubicek, C. P. (2004). The fungal STRE-element-binding protein Seb1 is involved but not essential for glycerol dehydrogenase (*gld1*) gene expression and glycerol accumulation in *Trichoderma atroviride* during osmotic stress. *Fungal genetics and biology*, *41*(12), 1132-1140.
- Shearer, J. F., & Jackson, M. A. (2006). Liquid culturing of microsclerotia of *Mycoleptodiscus terrestris*, a potential biological control agent for the management of hydrilla. *Biological Control*, *38*(3), 298-306.
- Singh, A., Shahid, M., Srivastava, M., Pandey, S., Sharma, A, ... & Kumar, V. (2014). Optimal physical parameters for growth of *Trichoderma* species at varying pH, temperature and agitation. *Virol Mycol*, *3*(1), 1-7.
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, *44*(1), 13-18.
- Sriram, S., Roopa, K. P., & Savitha, M. J. (2011). Extended shelf-life of liquid fermentation derived talc formulations of *Trichoderma harzianum* with the addition of glycerol in the production medium. *Crop Protection*, *30*(10), 1334-1339.

- Steyaert, J. M., Weld, R. J., Mendoza-Mendoza, A., & Stewart, A. (2010). Reproduction without sex: conidiation in the filamentous fungus *Trichoderma*. *Microbiology*, *156*(10), 2887-2900.
- Steyaert, J., Weld, R., Mendoza, A., Kryštofová, S., Šimkovič, M., Varečka, L., ... & Stewart, A. (2013). Capther 5: Asexual Development in *Trichoderma*: From Conidia to Chlamydospores. En Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Herrera, A., Schmoll, M., ... & Kenerley, C. M. *Trichoderma biology and applications*. (pp. 88-98). India: CABI.
- Stoppacher, N., Kluger, B., Zeilinger, S., Krska, R., & Schuhmacher, R. (2010). Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. *Journal of Microbiological Methods*, *81*(2), 187-193.
- Sun, H., Ge, X., Hao, Z., & Peng, M. (2010). Cellulase production by *Trichoderma* sp. on apple pomace under solid state fermentation. *African Journal of Biotechnology*, *9*(2).
- Tabachnik, M. (1989). *U.S. Patent No. 4,837,155*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Tesfaye, A. and Kapoor, I.J. 2004. In Vitro evaluation of *Trichoderma* and *Gliocladium* spp against *Botrytis corm rot* (*Botrytis gladiolorum*) of *Gladiolus*. *Pest Management Journal of Ethiopia* *8*:97-103
- Thatcher, L. F., Kidd, B. N., & Kazan, K. (2016). Belowground Defence Strategies Against *Fusarium oxysporum*. In *Belowground Defence Strategies in Plants* (pp. 71-98). Springer International Publishing.
- Thomashow, L. S. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, *40*(1), 309-348
- Torres, E., Iannaccone, J., & Gómez, H. (2008). Biocontrol del moho foliar del tomate *Cladosporium fulvum* empleando cuatro hongos antagonistas. *Bragantia*, *67*(1), 169-178.
- Vandenbroucke, K., Robbens, S., Vandepoele, K., Inzé, D., Van de Peer, Y., & Van Breusegem, F. (2008). Hydrogen peroxide-induced gene expression across kingdoms: a comparative analysis. *Molecular Biology and Evolution*, *25*(3), 507-516.

- Vásquez, J. (2010). Caracterización Microbiológica Y Producción De *Trichoderma Harzianum* y *Trichoderma Viride* En Cultivo Artesanal. (Tesis de Bachillerato). Pontificia Universidad Javeriana. Colombia.
- Vásquez, J. (2010). *Caracterización Microbiológica Y Producción De Trichoderma Harzianum Y Trichoderma Viride En Cultivo Artesanal*. (Tesis de grado). Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- Velišek, J., & Cejpek, K. (2011) Pigments of higher fungi: a review. *Czech J Food Sci*, 29, 87-102.
- Vos, C. M., De Cremer, K., Cammue, B., & De Coninck, B. (2015). The toolbox of *Trichoderma* spp. in the biocontrol of *Botrytis cinerea* disease. *Molecular plant pathology*, 16(4), 400-412.
- Ward, O. (1989). *Biotecnología de la fermentación*. Zaragoza, España: Acribia, S.A.
- Woo, S. L., Ruocco, M., Vinale, F., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., ... & Lorito, M. (2014). *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. *The Open Mycology Journal*, 8(1).
- Xu, Y., Orozco, R., Wijeratne, E. K., Espinosa-Artiles, P., Gunatilaka, A. L., Stock, S. P., & Molnár, I. (2009). Biosynthesis of the cyclooligomer depsipeptide bassianolide, an insecticidal virulence factor of *Beauveria bassiana*. *Fungal Genetics and Biology*, 46(5), 353-364.
- Yonsel, Ş., & Batum, M. S. (2010). *Trichoderma granule production*. PCT/IB2008/054757, 13.11.
- Zambolim, L., Vale, F. D., Costa, H., Pereira, A. A., Chaves, G. M., & Zambolim, L. (2002). Epidemiologia e controle integrado da ferrugem-do-cafeeiro. *O Estado da Arte de Tecnologias de Produção de Café*. UFV-Viçosa, MG, Brasil, 369-450.