



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS  
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA**



---

**“Aprovechamiento de residuos Agroindustriales, cascarilla de arroz  
(*Oriza sativa*) y residuos de papa (*Solanum tuberosum*) para la  
producción de *Trichoderma* spp.”**

---

*Trabajo de Graduación, modalidad: Seminario presentado como requisito previo a la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico otorgado por la Universidad Técnica de Ambato a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.*

**AUTORA:**

Silvana Gabriela Ramírez Bayas

**TUTORA:**

Ing. Gladys Navas Miño

**Ambato – Ecuador  
2012**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR DE TESIS**

En mi calidad de Tutor del trabajo de investigación sobre el tema: “**Aprovechamiento de residuos Agroindustriales, cascarilla de arroz (*Oriza sativa*) y residuos de papa (*Solanum tuberosum*) para la producción de *Trichoderma spp.*”**”, por la egresada Silvana Gabriela Ramírez Bayas; considero que dicho informe investigativo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la evaluación del jurado examinador designado por el H. Consejo Directivo de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Ambato, Junio de 2012

.....  
Ing. Gladys Navas Miño  
**TUTORA DEL PROYECTO**

## **AUTORÍA DEL TRABAJO DE GRADO**

Los contenidos y criterios emitidos en el trabajo de investigación: “**Aprovechamiento de residuos Agroindustriales, cascarilla de arroz (*Oriza sativa*) y residuos de papa (*Solanum tuberosum*) para la producción de *Trichoderma spp.*” son de exclusiva responsabilidad de mi persona, como autora de este trabajo de grado.**

Ambato, Junio de 2012

.....  
Silvana Gabriela Ramírez Bayas  
**AUTORA**

**APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO**  
**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS**  
**CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

Los miembros del Tribunal de Grado aprueban el presente Trabajo de Graduación de acuerdo a las disposiciones emitidas por la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, Junio 2012

Para constancia firman:

.....  
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

Ing. M. Sc. Romel Rivera C.

.....  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

Dr. Ramiro Velasteguí

.....  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

Dr. Homero Vargas

## ***AGRADECIMIENTO***

A la Ingeniera Cecilia Carpio, Directora del Seminario de Graduación, por su respaldo y colaboración.

A la Ingeniera Gladys Navas Miño, por su orientación, apoyo y paciencia durante el desarrollo de este trabajo.

A William, Santiago, Bryan, Lorena, Belén, y Cristina, por brindarme su amistad y ser un apoyo en todo momento.

## ***DEDICATORIA***

A Dios, quien me ha servido de guía durante todo este tiempo

A mis padres, Héctor y Violeta, quienes de una manera dedicada, cariñosa y responsable, me colaboraron y otorgaron todas las facilidades para mi progreso educativo y personal.

## ÍNDICE GENERAL

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>EL PROBLEMA</b>	
<b>1.1 Tema de Investigación</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2 Planteamiento del problema</b> .....	<b>2</b>
1.2.1 Contextualización.....	2
1.2.2 Análisis crítico.....	5
1.2.3 Prognosis.....	6
1.2.4 Formulación del problema.....	6
1.2.5 Preguntas directrices.....	7
1.2.6 Delimitación.....	7
<b>1.3 Justificación</b> .....	<b>7</b>
<b>1.4 Objetivos</b> .....	<b>8</b>
General.....	8
Específicos.....	9
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>MARCO TEÓRICO</b>	
<b>2.1 Antecedentes Investigativos</b> .....	<b>10</b>
2.1.1 <i>Trichoderma spp.</i> Clasificación Taxonómica.....	12
2.1.2 Condiciones de Crecimiento.....	13
2.1.3 Aspecto Macroscópico.....	15
2.1.4 Aspecto Microscópico.....	15
2.1.5 Fermentación.....	16
2.1.6 Fermentación Sólida.....	17
<b>2.2 Fundamentación Filosófica</b> .....	<b>20</b>
<b>2.3 Fundamentación legal</b> .....	<b>21</b>
<b>2.4 Categorías Fundamentales</b> .....	<b>23</b>
2.4.1 Marco Teórico de la Variable Independiente.....	24
2.4.1 Marco Teórico de la Variable Dependiente.....	25

<b>2.5 Hipótesis</b> .....	<b>26</b>
Hipótesis nula (H0):.....	26
Hipótesis alternativa (H1): .....	26
<b>2.6 Señalamiento de variables de la hipótesis</b> .....	<b>26</b>
Variable dependiente:.....	26
Variable independiente: .....	26

## **CAPÍTULO III**

### **METODOLOGÍA**

<b>3.1 Enfoque</b> .....	<b>27</b>
<b>3.2 Modalidad básica de la investigación</b> .....	<b>27</b>
<b>3.3 Nivel o tipo de investigación</b> .....	<b>28</b>
<b>3.4 Población y muestra</b> .....	<b>28</b>
3.4.1 Diseño Experimental.....	30
<b>3.5 Operacionalización de las variables</b> .....	<b>32</b>
<b>3.6 Plan de recolección de la información</b> .....	<b>33</b>
<b>3.6.1</b> Obtención y mantenimiento de la cepa de interés.....	<b>33</b>
3.6.3 Obtención del inóculo.....	33
3.6.4 Cuantificación del inóculo (expresada en conidios/g).....	33
3.6.5 Preparación del sustrato sólido. ....	34
3.6.6 Selección de las condiciones de fermentación.....	34
3.6.7 Inoculación del sustrato sólido.....	35
3.6.8 Evaluación del crecimiento.....	35
<b>3.7 Plan de procesamiento de la información</b> .....	<b>36</b>

## **CAPÍTULO IV**

### **ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

<b>4.1 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>
4.1.1 Obtención del inóculo.....	38
4.1.2 Fermentación sólida.....	38
4.1.2.1. Inoculación del sustrato sólido.....	38
4.1.3 Evaluación del crecimiento.....	38
4.1.3.1 Observación macroscópica. ....	38
4.1.3.2 Aspecto microscópico. ....	39

4.1.4 Efecto de la temperatura.....	40
4.1.5 Efecto del tipo de sustrato.....	40
<b>4.2 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
4.2.1 Cuantificación de Biomasa.....	42
4.2.2 Cinética de Crecimiento en medio sólido.....	43
4.2.2.1 Modelo Cinético de Fermentación Solida.....	43
4.2.5 Análisis Estadístico.....	44
<b>4.3 VERIFICACIÓN DE LA HIPÓTESIS.....</b>	<b>45</b>

## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

<b>5.1 Conclusiones.....</b>	<b>46</b>
<b>5.2 Recomendaciones.....</b>	<b>47</b>

## **CAPÍTULO VI**

### **PROPUESTA**

<b>6.1 Datos Informativos.....</b>	<b>49</b>
6.1.1 Título: .....	49
6.1.2 Institución Ejecutora: .....	49
6.1.3 Ubicación: .....	49
6.1.4 Beneficiarios.....	49
6.1.5 Tiempo estimado de ejecución: .....	49
6.1.5 Equipo técnico responsable: .....	49
<b>6.2 Antecedentes de la propuesta.....</b>	<b>49</b>
<b>6.3 Justificación.....</b>	<b>51</b>
<b>6.4 Objetivos.....</b>	<b>51</b>
6.4.1 General.....	51
6.4.2 Específicos.....	52
<b>6.5 Análisis de factibilidad.....</b>	<b>52</b>
<b>6.6 Fundamentación.....</b>	<b>53</b>
6.6.1. Fermentador sólido de bandejas.....	53
6.6.2. Descripción del biorreactor.....	53
6.6.3. Protocolo para realizar la prueba de Viabilidad.....	54
<b>6.7 Metodología Modelo Operativo.....</b>	<b>55</b>

<b>6.8 Administración.....</b>	<b>56</b>
<b>6.9 Previsión de la evaluación.....</b>	<b>56</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>57</b>

## **ANEXOS**

**ANEXO A.- Metodologías**

**ANEXO B.- Datos Obtenidos**

**ANEXO C.- Modelo Cinético de Fermentación**

**ANEXO D.- Cinética de Crecimiento**

**ANEXO D.- Cálculos Estadísticos**

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 2.1:</b> Clasificación Taxonómica de <i>Trichoderma spp</i> .....	<b>12</b>
<b>Tabla 2.2.</b> Cuadro comparativo entre los sistemas de fermentación líquida y sólida...	<b>19</b>
<b>Tabla 3.1.</b> Factores y niveles de estudio.....	<b>31</b>
<b>Tabla 3.2</b> Formato para lecturas de Crecimiento y Desarrollo de <i>Trichoderma spp</i> .....	<b>31</b>
<b>Tabla 3.3.</b> Operacionalización de Variables.....	<b>32</b>
<b>Tabla 3.4.</b> Parámetros y Criterios de Evaluación.....	<b>35</b>
<b>Tabla 5.1</b> Composición química de la cascarilla de arroz.....	<b>41</b>
<b>Tabla 5.2</b> Composición química de la papa.....	<b>41</b>
<b>Tabla 6.1.</b> Modelo operativo Implementación de un Fermentador de Bandejas.....	<b>55</b>
<b>Tabla 6.2.</b> Actividades de Administración para un proyecto.....	<b>56</b>
<b>Tabla 6.3.</b> Previsión de la Evaluación.....	<b>56</b>

## ANEXOS

<b>Tabla A-1.</b> Formulación de los Medios de Cultivo	
<b>Tabla B-1.</b> Lecturas de Crecimiento de <i>Trichoderma spp</i> . Expresado en Conidios/ml	
<b>Tabla B-2.</b> Lecturas de Crecimiento de <i>Trichoderma spp</i> . Expresado en Conidios/g de sustrato	
<b>Tabla B-3.</b> Promedio del Recuento de conidios en las fermentaciones sólidas al cabo de los 14 días de fermentación	
<b>Tabla C-1.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma spp</i> . Tratamiento#1. R1	
<b>Tabla C-2.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma spp</i> . Tratamiento#1. R2	
<b>Tabla C-3.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma spp</i> . Tratamiento#1. R3	
<b>Tabla C-4.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma spp</i> . Tratamiento#2. R1	
<b>Tabla C-5.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma spp</i> . Tratamiento#2. R2	
<b>Tabla C-6.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma spp</i> . Tratamiento#2. R3	
<b>Tabla C-7.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma spp</i> . Tratamiento#3. R1	
<b>Tabla C-8.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma spp</i> . Tratamiento#3. R2	
<b>Tabla C-9.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma spp</i> . Tratamiento#3. R3	
<b>Tabla C-10.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma spp</i> . Tratamiento#4. R1	
<b>Tabla C-11.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma spp</i> . Tratamiento#4. R2	
<b>Tabla C-12.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma spp</i> . Tratamiento#4. R3	
<b>Tabla C-13.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma spp</i> . Tratamiento#5. R1	
<b>Tabla C-14.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma spp</i> . Tratamiento#5. R2	

**Tabla C-15.** Crecimiento de *Trichoderma* spp. Tratamiento#5. R3

**Tabla C-16.** Crecimiento de *Trichoderma* spp. Tratamiento#6. R1

**Tabla C-17.** Crecimiento de *Trichoderma* spp. Tratamiento#6. R2

**Tabla C-18.** Crecimiento de *Trichoderma* spp. Tratamiento#6. R3

**Tabla C-19.** Coeficientes de Correlación de los Tratamientos al finalizar la fermentación

**Tabla C-20.** Comportamiento del hongo *Trichoderma* durante el proceso de Fermentación

**Tabla D-1.** Cinética de Crecimiento de *Trichoderma* spp

**Tabla E-1. Análisis de la varianza** para la Cuantificación de Biomasa de *Trichoderma* spp

**Tabla E-2. Prueba de Tukey** para el Factor A.- Tipo de sustrato

**Tabla E-3. Prueba de Tukey** para el Factor B.- Temperatura

**Tabla E-4. Prueba de Tukey** para la Interacción de Factores

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig.1.1</b> Árbol de Problemas.....	<b>5</b>
<b>Fig. 2.1</b> Aspecto macroscópico del hongo <i>Trichoderma</i> spp.....	<b>15</b>
<b>Fig. 2.2</b> Características microscópicas de <i>Trichoderma</i> spp.....	<b>15</b>
<b>Fig. 2.3</b> Categorías Fundamentales.....	<b>23</b>
<b>Fig. 6.1.</b> Aspecto externo de un fermentador de bandejas empleado en Fermentación sólida.....	<b>53</b>
<b>Fig. 6.2.</b> Ubicación de toma de muestras en las bandejas de acero inoxidable del fermentador sólido.....	<b>54</b>

## ANEXOS

<b>Fig. B-1.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. al finalizar el proceso de Fermentación	
<b>Fig. C-1.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. Tratamiento#1. R1	
<b>Fig. C-2.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. Tratamiento#1. R2	
<b>Fig. C-3.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. Tratamiento#1. R3	
<b>Fig. C-4.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. Tratamiento#2. R1	
<b>Fig. C-5.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. Tratamiento#2. R2	
<b>Fig. C-6.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. Tratamiento#2. R3	
<b>Fig. C-7.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. Tratamiento#3. R1	
<b>Fig. C-8.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. Tratamiento#3. R2	
<b>Fig. C-9.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. Tratamiento#3. R3	
<b>Fig. C-10.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. Tratamiento#4. R1	
<b>Fig. C-11.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. Tratamiento#4. R2	
<b>Fig. C-12.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. Tratamiento#4. R3	
<b>Fig. C-13.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. Tratamiento#5. R1	
<b>Fig. C-14.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. Tratamiento#5. R2	
<b>Fig. C-15.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. Tratamiento#5. R3	
<b>Fig. C-16.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. Tratamiento#6. R1	
<b>Fig. C-17.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. Tratamiento#6. R2	
<b>Fig. C-18.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. Tratamiento#6. R3.	
<b>Fig. C-19.</b> Representación gráfica del Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. A los 6 días de fermentación	

**Fig. C-20.** Representación gráfica del Crecimiento de *Trichoderma* spp. A los 8 días de fermentación

**Fig. C-21.** Representación gráfica del Crecimiento de *Trichoderma* spp. A los 14 días de fermentación

**Fig. D-1. Número de Generaciones** al colonizar todo el sustrato, en los tratamientos en Estudio

**Fig. D-2. Tiempo de duplicación** al colonizar todo el sustrato, en los tratamientos en Estudio

**Fig. D-3. Velocidad Específica** de Crecimiento al colonizar todo el sustrato, en los tratamientos en Estudio

**Fig. D-4. Concentración final (conidios/ g. de Sustrato)** al colonizar todo el sustrato, en los tratamientos en Estudio

**Fig. E-1.** Promedios e Intervalos al 95% de Biomasa (**Tipo de Sustrato**)

**Fig. E-2.** Cuantificación de Biomasa en los Sustratos Empleados

**Fig. E-3.** Promedios e Intervalos al 95% de Biomasa (**Temperatura**)

**Fig. E-4.** Cuantificación de Biomasa a distintas Temperaturas

**Fig. E-5.** Representación gráfica de los efectos de las interacciones de los factores evaluados sobre la concentración de biomasa durante la fermentación Solida

## RESUMEN

Las especies del género *Trichoderma* spp., son los microorganismos antagonistas más utilizados para el control de enfermedades en plantas ocasionadas por fitopatógenos. *Trichoderma* spp., ha sido estudiado como agente de control biológico durante más de 70 años, pero solo hasta hace poco tiempo, las cepas de este microorganismo han comenzado a adquirir un valor comercial importante debido a que sus sistemas de producción han sido escalados a nivel piloto y semi-industrial.

El objetivo del presente trabajo ha sido darle una utilidad y un mayor valor agregado a los residuos agroindustriales, representando una posibilidad de expansión para las industrias y apoyando también a la solución de un problema medioambiental. La investigación se basó en un estudio experimental comparativo para encontrar el residuo agroindustrial, que represente un sustrato económico y de fácil adquisición, en el cual *Trichoderma* spp., tenga un buen desarrollo y una elevada producción de esporas viables.

Las condiciones óptimas de crecimiento y desarrollo de *Trichoderma* spp., se establecieron de acuerdo a un diseño experimental AxB y un análisis estadístico en el programa Infostat, la variable que se estudió fue la producción de biomasa en Conidios/g de sustrato en fermentación sólida; utilizando la técnica de conteo de conidios en la cámara de Neubauer. Los factores a considerar fueron, el tipo de sustrato, con tres niveles, Cascarilla de arroz (*Oriza sativa*), residuos de cáscara de papa (*Solanum tuberosum*) y la mezcla de los dos sustratos en estudio; cincuenta por ciento de cascarilla de arroz y cincuenta por ciento de residuos de papa. Se eligió además, la Temperatura debido a que es un factor clave dentro del proceso de fermentación sólida, puesto que está directamente relacionado con la actividad metabólica del microorganismo y la velocidad de crecimiento; con dos niveles, 25 y 30°C.

La mayor producción de biomasa ( $4,92 \times 10^{11}$  Conidios/g de sustrato) se obtuvo en la fermentación  $a_1b_2$  (Sustrato- Cascarilla de arroz; Temperatura- 30°C). Mientras que las más bajas concentraciones se presentaron en los sustratos a base de residuos de cáscara de papa.

## INTRODUCCION

Durante los procesos agroindustriales se generan subproductos o residuos, los cuales al no ser reciclados o procesados apropiadamente, generan diversos problemas ambientales. Su eliminación supone un problema de gestión para las empresas y establecimientos productores. Sin embargo, estos materiales son fuentes especialmente atractivos por su contenido en compuestos químicos (azúcares, pigmentos, fibra alimentaria, proteína, polifenoles, lignina, etc.) y pueden ser potencialmente útiles cuando se les transforma mediante tratamientos químicos o microbiológicos en productos de elevado valor añadido (Valencia, 2011).

Los hongos del género *Trichoderma* spp. Son un grupo de microorganismos que habitan naturalmente en un número importante de suelos agrícolas, con abundante materia orgánica en descomposición y altas densidades de raíces. (Harman, 1990). *Trichoderma* spp., se desarrolla bajo diferentes condiciones ambientales y de nutrientes; su producción se realiza de forma artesanal o industrial, implementando técnicas de fermentación líquida y sólida. Uno de los sustratos más utilizados es el grano entero de arroz, el cual tiene un costo relativamente alto, por lo cual se pretende incorporar el uso de residuos agroindustriales para su reproducción, tales como; cascarilla de arroz, paja de arroz, trigo, etc. (Fernández y Vega, 2001).

El interés científico despertado por los hongos de este género, se debe a las características antagónicas que presentan frente a hongos fitopatógenos. Entre los mecanismos de control referenciados para *Trichoderma* spp., está la competencia por nutrientes o espacio, el micoparasitismo y la antibiosis. Estos tres mecanismos no son excluyentes sino que actúan sinérgicamente en el control de los patógenos. (Harman y Kubicek, 1998). También produce una gran cantidad de enzimas capaces de degradar a otros organismos.

El presente trabajo de investigación propone mejorar la eficiencia en la producción de *Trichoderma* spp., demostrando la factibilidad del uso de residuos agroindustriales y reemplazando los sustratos convencionales que representan costos elevados de producción.

## CAPITULO I

### EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

#### 1.1 TEMA DE INVESTIGACIÓN

“Aprovechamiento de residuos Agroindustriales, cascarilla de arroz (*Oriza sativa*) y residuos de papa (*Solanum tuberosum*) para la producción de *Trichoderma spp.*”

#### 1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los residuos agroindustriales constituyen un problema serio de residuos debido a dos factores principales: un aumento en la producción y al surgimiento de leyes ambientales más estrictas. Por ello, surge la necesidad de conversión de los mismos en un producto útil y de mayor valor agregado (Jurado, 2003).

##### 1.2.1 CONTEXTUALIZACIÓN

En la actualidad a nivel mundial, el alto desarrollo de la industria conlleva a la generación de residuos, de igual forma que al perfeccionamiento e implementación de nuevas técnicas o métodos para el aprovechamiento de éstos. En el proceso productivo de los alimentos, además del producto deseado, se generan subproductos, residuos y productos fuera de norma (Méndez, 1995), cada uno de los cuales pueden servir para consumo humano o animal y aplicación industrial, lo que traería beneficios económicos. Sin embargo, la mayoría de este tipo de industrias no tiene algún plan para estos residuos, debido al alto costo de su reutilización y por el contrario, los ubican junto con la basura en los vertederos o rellenos sanitarios.

En países como, Colombia; la inadecuada disposición final de los residuos agroindustriales, es alarmante, esto debido a la gran cantidad de residuos que se generan y a la manera como las empresas del sector disponen actualmente de ellos. Casi en su mayoría son llevados al relleno sanitario sin considerar la posibilidad de diferentes alternativas para aprovechar el valor económico que puede obtenerse de ellos. Los gastos de su disposición y el impacto ambiental podrían reducirse si se implementan

diferentes técnicas de valorización. Actualmente, las técnicas más empleadas por las empresas para la recuperación de sus residuos son el compostaje y la lombricultura con miras siempre en que sean rentables económicamente (Castaño, 2002).

El sector agroindustrial ha sido históricamente determinante en la economía ecuatoriana y en los últimos años ha experimentado un importante crecimiento. Este último se explica por el aumento de la demanda de productos alimenticios a partir de los años setenta, producto del auge petrolero, del ingreso de una mayor cantidad de divisas, del incremento de habitantes y del cambio de hábitos de la población. Pero, no se realiza procesos de aprovechamiento de residuos generados (Alvarado, 2005).

En el mundo; la utilización de microorganismos como *Trichoderma* spp., es una de las alternativas actuales para combatir hongos fitopatógenos. La versatilidad, adaptabilidad y fácil manipulación lo han convertido como uno de los antagonistas más utilizados para el control fitosanitario (Fernández, 2001).

En la actualidad, Cuba es uno de los países que produce 250 toneladas de biopreparados por año, mediante capacidad instalada, que permiten proteger más de 100.000 ha (Fernández, 2001). La multiplicación de *Trichoderma* spp, se realiza de forma artesanal o industrial, implementando técnicas de fermentación líquida y sólida, en la fermentación sólida se utilizan sustratos de arroz y residuos agroindustriales tales como cascarilla de arroz, paja de arroz, trigo, entre otros medios compuestos por subproductos de la industria azucarera como la melaza (Fernández y Vega, 2001).

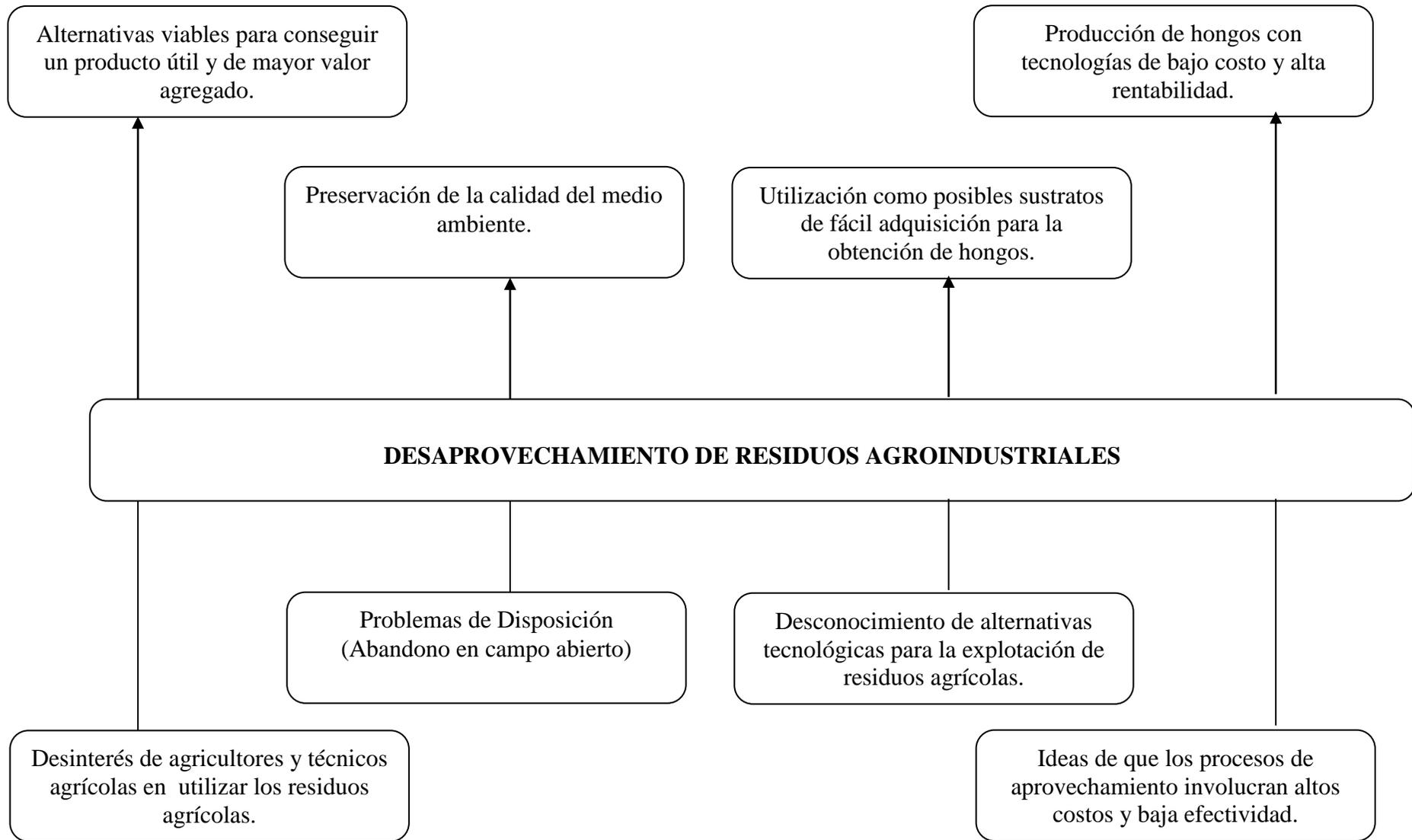
En Colombia, según Castro (2003), el arroz es el sustrato más utilizado para la producción de biopreparados de *Trichoderma* spp., a partir de procesos de fermentación artesanal e industrial. En la actualidad la empresa Sanatrade S.A. elabora un producto llamado Tricho-D el cual tiene como ingrediente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

La utilización de otro tipo de sustratos naturales para la producción de esporas de *Trichoderma* spp., ha sido poco estudiada en Ecuador. En países vecinos como

Colombia, empresas como Natural Control ubicada en Cali, producen toneladas de estos biopreparados utilizando arroz como sustrato base para el desarrollo y esporulación del hongo, trabajos realizados por Fernández y Vega (2001), probaron la eficiencia y viabilidad de la producción de esporas de *Trichoderma* spp., con subproductos de la industria azucarera, con soportes sólidos como materiales celulósicos, atendiendo a la alta capacidad celulítica de este hongo.

La Fundación para la Innovación Agraria, en Chile; sostiene que *Trichoderma* spp., actualmente se encuentra disponible en el mercado a través de diversas empresas. El Centro de Educación y Tecnología CET abastece del biocontrolador a agricultores que suman más de 1.500 ha de cultivos orgánicos, principalmente frutales (viñas, manzanos, kiwis, arándanos y perales, principalmente). Vende alrededor de 7.000 kg de pasta y 10.000 litros de suspensión. Entre los proveedores también se encuentra Bio Insumos Nativa, empresa establecida a partir de un proyecto ejecutado por la Universidad de Talca, financiado por la Fundación para la Innovación Agraria FIA. La empresa opera bajo un convenio con dicha Universidad, en el que la empresa es responsable de la comercialización de las cepas y la Universidad realiza el control de calidad de los productos. Las dos entidades desarrollan conjuntamente nuevas líneas de investigación en biocontroladores. Los productos, deben registrarse en el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG).

### 1.2.2.- ANALISIS CRÍTICO



**Fig.1.1** Árbol de Problemas

### **1.2.3 PROGNOSIS**

Los productos obtenidos a partir de residuos de la Industria, han merecido un interés creciente, debido a que permiten aminorar los costos en el tratamiento y disposición de dichos desechos. El aprovechamiento de residuos agroindustriales es una alternativa que impulsa el desarrollo de tecnologías orientadas hacia una transformación sustentable de los recursos naturales.

La búsqueda de materias primas de bajo costo y fácil adquisición que puedan ser utilizados como sustratos fermentables (fuentes de C o N) constituye uno de los retos más interesantes de la biotecnología actual. Si no se realiza un estudio de Investigación sobre el aprovechamiento de residuos agroindustriales, se puede desperdiciar posibles materias primas que representen altos niveles de rentabilidad para la obtención de productos de interés, en este caso la producción del hongo *Trichoderma* spp.

### **1.2.4 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

Gran parte de los residuos agroindustriales que generan las Industrias y establecimientos; son eliminados por las alcantarillas o dispuestos en la basura común lo que genera un agudo problema de contaminación de agua y suelo, alterando el ecosistema y los ciclos de vida.

Existe un gran número de subproductos de la agroindustria que podrían ser utilizados como sustratos no convencionales para la producción de *Trichoderma* spp.; entre estos subproductos destacan los del sector agrícola.

La utilización de subproductos agrícolas con altos contenidos celulósicos plantea la posibilidad de reemplazar los sustratos utilizados como el arroz y el trigo, los cuales actualmente encuentran limitado su utilización por los altos costos.

## **1.2.5 PREGUNTAS DIRECTRICES**

**1.2.5.1** ¿Se puede cultivar el hongo *Trichoderma spp.*, utilizando cascarilla de arroz y residuos de papa como sustratos; bajo condiciones controladas de temperatura?

**1.2.5.2** ¿Cómo se evalúa el crecimiento y desarrollo de *Trichoderma spp.*, en los sustratos utilizados?

**1.2.5.3** ¿De qué manera se establece los factores de operación óptimos para un buen desarrollo y una elevada producción de conidios de *Trichoderma spp.*?

## **1.2.6 DELIMITACIÓN**

**Área:** Biotecnología Ambiental.

**Sub-área:** Tratamiento de Residuos.

**Sector:** Producción de Agentes Reguladores

**Sub-sector:** *Trichoderma spp.*

**Delimitación espacial:** La investigación se realizará en los laboratorios de la Facultad Ciencia e Ingeniería Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato

**Delimitación temporal:** Octubre 2011 /Junio del 2012

## **1.3 JUSTIFICACIÓN**

El tratamiento y aprovechamiento de derivados agroindustriales y la formulación de nuevos productos es una manera de incidir en el mejoramiento ambiental. Por este motivo es que en la actualidad se está dando gran importancia a la agricultura orgánica que no es más que producir alimentos sin el uso de productos químicos, sino mediante la implementación de productos naturales que permitan el control de plagas y la fertilización del suelo, para obtener mejores productos y mejorar la producción.

Con base en la problemática presentada, la finalidad de esta investigación es aprovechar desechos agroindustriales manejándolos como medios de cultivo para la producción de metabolitos de interés tanto industrial como ambiental; se

conseguirá entonces sustratos económicos y de fácil adquisición, que permitirán un buen desarrollo y una elevada producción del hongo *Trichoderma* spp.

La utilización de desechos agroindustriales como residuos de cáscara de papa y cascarilla de arroz, como sustrato para la producción de *Trichoderma* spp. un hongo con un sin número de aplicaciones, es una alternativa viable para dar valor agregado a estos residuos de la industria, además de ser un valioso producto para mejorar la calidad de los alimentos, ya que puede ser utilizado en una gran diversidad de cultivos en la prevención de daños provocados por plagas fúngicas. La utilización del *Trichoderma* spp., resulta una herramienta importante, de bajo costo y de alta eficacia para el control biológico de patógenos de plantas.

Además, con los resultados de esta investigación se contribuye con información útil para la consecución de herramientas que permitan la obtención de posibles productos agroecológicos con aislados nativos de *Trichoderma* spp., los cuales en futuras investigaciones se puedan experimentar en varios campos de aplicación.

## **1.4 OBJETIVOS**

### **1.4.1.- OBJETIVO GENERAL**

- Realizar un estudio experimental comparativo de aprovechamiento de residuos agroindustriales; cascarilla de arroz (*Oriza sativa*) y residuos de papa (*Solanum tuberosum*) para la producción del hongo *Trichoderma* spp.

### **1.4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Cultivar el hongo *Trichoderma* spp. mediante fermentación sólida utilizando cascarilla de arroz y residuos de papa como sustrato, bajo condiciones controladas de temperatura.

- Evaluar el crecimiento y desarrollo de *Trichoderma* spp. en los sustratos utilizados, mediante la cuantificación de Biomasa expresada en conidios/ g de sustrato.
- Establecer los factores de operación óptimos para un buen desarrollo y una elevada producción de conidios de *Trichoderma* spp.

## CAPITULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Los hongos del género *Trichoderma* spp. Son un grupo de microorganismos que habitan naturalmente en un número importante de suelos agrícolas, se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo en diferentes zonas de vida, además también se suelen hallar asociados a la superficie de plantas y cortezas de madera descompuesta, en diferentes zonas de vida y hábitat (Harman, 1990).

El género *Trichoderma* fue identificado en 1871 y ha sido ampliamente estudiado; es un hongo anaerobio facultativo microscópico, que se encuentra de manera natural en un número importante de suelos agrícolas y otros tipos de medios. Integran el género más de 30 especies ampliamente distribuidas en el mundo, en diferentes zonas y hábitats, especialmente donde existe materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, así como en residuos de cultivos, principalmente en aquellos que son atacados por otros hongos. Su desarrollo se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, las cuales coloniza rápidamente (Papavizas 1985).

*Trichoderma* spp., muestra diversas ventajas como agente de control biológico, debido a su rápido crecimiento y desarrollo; también produce una gran cantidad de enzimas capaces de degradar a otros organismos, cuya secreción se induce con la presencia de hongos fitopatógenos. Puede desarrollarse en una amplia gama de sustratos, lo cual facilita su producción masiva para uso en la agricultura. Su gran tolerancia a condiciones ambientales extremas y hábitats donde otros hongos son causantes de diversas enfermedades, le permiten ser un eficiente agente de control; de igual forma puede sobrevivir en medios con contenidos significativos de pesticidas y otros químicos. Además, su gran variabilidad se constituye en un

reservorio de posibilidades de control biológico bajo diferentes sistemas de producción y cultivos (Papavizas 1985).

Agosín (1997), afirma que *Trichoderma* extrae nutrientes de los hongos que degrada y de otros materiales orgánicos, ayudando a su descomposición, por lo que se ve favorecido con la adición de materia orgánica y compostaje. También requiere de humedad para germinar; su velocidad de crecimiento es bastante alta, lo que lo faculta para establecerse en el suelo y controlar enfermedades. Adicionalmente, este hongo presenta aislamientos con poderes antibióticos, los cuales actúan contra varios microorganismos fitopatógenos. Se comporta como saprófito en la rizófora, por lo que es capaz de destruir residuos de plantas infectadas por patógenos. Se considera que su acción es antagonista, y es capaz de sacar el mejor provecho dado su alta adaptación al medio y su competencia por el sustrato y espacio.

Harman y Kubicek (1998), Indican que entre los mecanismos de control referenciados para *Trichoderma* spp., está la competencia por nutrientes o espacio, el micoparasitismo y la antibiosis. Estos tres mecanismos no son excluyentes sino que actúan sinérgicamente en el control de los patógenos. La importancia relativa de cada uno de ellos depende de cada pareja de antagonismo-patógeno y de las condiciones ambientales.

Las necesidades nutricionales de *Trichoderma* spp., son bien conocidas, es capaz de degradar sustratos muy complejos como almidón, pectina y celulosa entre otros, y emplearlos para su crecimiento gracias al gran complejo enzimático que posee (enzimas hidrolíticas como amilasas, pectinasas, celulasas y quitinasas entre otras). Así mismo, *Trichoderma* asimila como fuente de nitrógeno compuestos tales como aminoácidos, urea, nitritos, amoníaco y sulfato de amonio (Moore, 1996). Por otra parte los microelementos, sales y vitaminas en grandes cantidades no son indispensables para el desarrollo de *Trichoderma* (Papavizas, 1985). Los elementos traza requeridos para el crecimiento de los hongos en general incluyen hierro zinc, cobre molibdeno y manganeso en concentraciones muy pequeñas

cercanas a 10<sup>-9</sup> M. Dentro de las vitaminas necesarias se encuentran tiamina (B6), piridoxina (B6), ácido nicotínico (B3), ácido pantoténico (B5), riboflavina (B2), cianocobalina (B12) y ácido aminobenzoico.

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

La utilización de subproductos agrícolas con altos contenidos celulósicos plantea la posibilidad de reemplazar los sustratos utilizados como el arroz y el trigo. Así mismo, existen semillas de árboles con alto contenido de nutrientes que pueden ser utilizadas para enriquecer los sustratos, como es el caso de las semillas del árbol del pan (*Artocarpus incisa*), es una especie perteneciente al género de los *Artocarpus*, dentro de la tribu de las *Artocarpeae*, de la familia de las *Moraceae* con cientos de variedades de árboles distribuidas en zonas tropicales de Asia y Suramérica. Las semillas de los frutos del pan producidas abundantemente por el árbol son muy nutritivas. Son ricas en azúcares contienen entre un 20 y 37% de carbohidratos, calcio, hierro, fósforo y niacina, y en vitaminas C y B1 (Zerega, 2005).

### 2.1.1 *Trichoderma spp.* CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

**Tabla 2.1** Clasificación Taxonómica de *Trichoderma spp.*

SUPER REINO	Eucariota
REINO	Fungi
FILUM	Ascomycota
SUBFILUM	Pezizomycotina
CLASE	Sordariomycetes
SUBCLASE	Hypocreomycetidae
ORDEN	<i>Hypocreales</i>
FAMILIA	<i>Hypocreaceae</i>
GENERO	<i>Trichoderma</i>

(NCBI, 2006)

### 2.1.2 CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Dentro de los factores que afectan el crecimiento *Trichoderma* spp., se encuentran los de tipo físico y de tipo nutricional como:

- **FOTOTROFÍA:** La mayoría de especies del género *Trichoderma* spp., son fotosensibles, puesto que presentan una mayor esporulación al ser expuestas a la luz. Sin embargo, cuando se someten a períodos alternados de luz y oscuridad, se favorece la colonización del hongo sobre diferentes sustratos sólidos (Domsch, 1980).
- **ESPORULACIÓN:** *Trichoderma* spp., esporula fácilmente sobre muchos sustratos naturales y artificiales en un patrón concéntrico circular en respuesta a la alternación de luz diurna y oscuridad, donde los conidios se producen durante el período de luz. La exposición de los cultivos en agar durante 20 a 30 segundos a la luz es suficiente para inducir la esporulación. La mayor foto inducción de la conidiogénesis se obtiene con la exposición a la luz del día por 3 minutos o cerca de la radiación ultravioleta tipo A (366nm) de 10 a 30 segundos (Fonseca, 1998).
- **GERMINACIÓN:** La germinación de los conidios de *Trichoderma* spp., depende del tipo de enlace que presenta la fuente de carbono, la cual puede ser un disacárido o un polisacárido. Para su aprovechamiento el hongo emplea enzimas como amilasas,  $\alpha$ -glucosidasas, endo y exocelulasas que realizan la hidrólisis de los azúcares simples para dar inicio a la germinación en los diferentes medios de cultivo; mientras que para iniciar el proceso de infección, se debe tener en cuenta la composición química de la pared celular de los conidios (Astudillo, 1999).
- **SALINIDAD:** *Trichoderma* spp., se ve inhibido en su crecimiento con altas concentraciones de cloruro de sodio (80g/l aproximadamente), aunque tolera hasta una concentración de 60g/l de cloruro de sodio, éstas condiciones pueden ocasionar mutaciones perjudicando el proceso de conidiogénesis, al disminuir notablemente la producción de esporas (Moore, 1996).

- **pH:** *Trichoderma* spp., tiene un rango de pH relativamente amplio para su crecimiento. Presenta crecimiento a valores de pH comprendidos entre 2.0 y 9.0, con un pH óptimo que se encuentra entre 4.0 y 7.0. A pH ácido, la asimilación de nutrientes como glucosa ejerce una influencia importante sobre el crecimiento del hongo y su posterior esporulación. Además, procesos como la germinación, se ven afectados por la escasez de nutrientes y por niveles de pH por encima de 9.0 (Domsch, 1980).

- **TEMPERATURA:** El rango de temperatura para el crecimiento de *Trichoderma* spp., se encuentra entre los 10°C a los 40°C, considerándose una óptima de 25°C (Alexopoulos, 1996).

- **HUMEDAD:** el contenido de humedad que favorece el crecimiento saprofito de *Trichoderma* spp., se encuentra alrededor del 70% y el 80% (Wakelin, 1999).

- **NECESIDADES NUTRICIONALES:** *Trichoderma* spp., es capaz de degradar sustratos muy complejos tales como almidón, pectina y celulosa entre otros, y emplearlos como fuente de carbono para su crecimiento gracias a la variada maquinaria enzimática que posee (enzimas hidrolíticas tales como amilasas, pectinasas, celulasas y quitinasas, entre otras), aunque puede emplear también ácidos orgánicos y monosacáridos como fuente de carbono. Así mismo, *Trichoderma* spp., asimila como fuente de nitrógeno compuestos tales como aminoácidos, urea, nitritos, amoníaco y sulfato de amonio (Moore, 1996). Adicionalmente, se ha demostrado que la adición de nitrógeno en forma de sulfato de amonio al medio estimula e incrementa el crecimiento de este hongo, mientras que la adición de nitrógeno como nitrato de calcio genera un efecto supresivo en el crecimiento de *Trichoderma* spp. (Wakelin, 1999).

Por otra parte, los microelementos, sales y vitaminas en grandes cantidades no son indispensables para el desarrollo de *Trichoderma* spp. (Papavizas, 1985). Los elementos traza requeridos para el crecimiento de hongos en general incluyen

hierro, zinc, cobre, manganeso y molibdeno en concentraciones muy pequeñas cercanas a  $10^{-9}$ M. Dentro de las vitaminas necesarias se encuentran tiamina (B1), biotina (B7), piridoxina (B6), ácido nicotínico (B3), ácido pantoténico (B5), riboflavina (B2), cianocobalamina (B12) y ácido aminobenzoico (Moore, 1996).

### 2.1.3 ASPECTO MACROSCOPICO



**Fig. 2.1.** Aspecto macroscópico del hongo *Trichoderma* spp.

*Trichoderma* spp., se distingue por sus colonias, inicialmente se ven como una superficie lisa, pero la formación de esporas aéreas a través del tiempo, permite observarlas ligeramente algodonosas (Rifai, 1969). El color de las colonias cambia gradualmente de blanco a blanco verdoso por la formación de fialosporas que en última instancia se tornan de un color verde oscuro opaco (Domsch , 1980) (Figura 2.1).

### 2.1.4 ASPECTO MICROSCÓPICO

*Trichoderma* spp., es un hongo imperfecto que posee hifas hialinas septadas y ramificadas a ambos lados sin ser paralelas, conidióforos, fiálides, y conidios; aunque también pueden producir clamidosporas. Sus estructuras de reproducción son los conidios, mientras que sus estructuras de resistencia son las clamidosporas.



**Fig. 2.2** Características microscópicas de *Trichoderma* spp.

Los conidióforos son hialinos, al inicio de su desarrollo se observan ramificados pero cuando maduran comienzan a separarse por su formación aérea, son rectos y pueden llegar a presentar un aspecto piramidal (Rifai, 1969). Las fiálides son hialinas, en forma de frasco o botella, e infladas en la base y están unidas a los conidióforos en ángulo recto. Los conidios tienen de 2  $\mu\text{m}$  a 3  $\mu\text{m}$  de diámetro en promedio, son redondeados o de forma ovoide, lisos y se observan hialinos o de color verde brillante al microscopio (Figura 6.2) (Rifai, 1969).

### **2.1.5 FERMENTACIÓN**

El proceso conocido como fermentación implica el empleo de microorganismos para llevar a cabo transformaciones de la materia orgánica, catalizadas por enzimas. Los productos comercialmente importantes de las fermentaciones industriales pertenecen a cuatro categorías principales: células microbianas, moléculas grandes como enzimas y polisacáridos, productos básicos y metabolitos secundarios que no son necesarios para el crecimiento celular. Las células utilizadas para obtener estos productos tienen una gran variedad de propiedades bioquímicas y fisiológicas. La producción comercial de productos de fermentación ha empleado principalmente diversas especies de bacterias, levaduras y hongos (Ward, 1989).

Para que un proceso de fermentación se desarrolle adecuadamente se debe establecer inicialmente el medio óptimo para el crecimiento de los microorganismos. Esto incluye la determinación de parámetros como pH, temperatura, oxígeno disuelto y nutrientes, entre otros; con el fin de que el microorganismo ya sea hongo, bacteria o levadura, desarrolle apropiadamente su metabolismo y obtener de esta manera la base para un producto de interés comercial (Forero, 2002).

En cualquier proceso de fermentación que sea objeto de estudio se deben evaluar una serie de variables para conocer, controlar y manipular el curso de la fermentación; estas variables se suelen dividir entre las que se pueden medir

continuamente (temperatura, velocidad de agitación, presión, formación de espuma, oxígeno disuelto y pH principalmente) y las que típicamente se miden a ciertos intervalos de tiempo (formación de biomasa y de producto y consumo de sustrato básicamente) (Montoya, 1989).

Los microorganismos implicados en los procesos de fermentación son principalmente quimiorganótrofos, es decir, que pueden obtener su energía y su fuente de carbono por la oxidación de compuestos orgánicos. Los hongos más importantes implicados en las fermentaciones industriales se clasifican principalmente en dos grupos: los Zygomycotina, con hifas aseptadas como los géneros *Mucor* y *Rhizopus*, y los Deuteromicotina, septados u hongos imperfectos, por ejemplo los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. 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).

### **2.1.6 FERMENTACIÓN SÓLIDA**

La fermentación sólida es un proceso que involucra sólidos en ausencia parcial o total de agua libre; sin embargo, el sustrato debe tener la humedad suficiente para permitir el crecimiento del microorganismo y que lleve a cabo todos sus procesos metabólicos (Pandey, 2003); además, sirve como fuente de nutrientes y como soporte para que los microorganismos crezcan sobre él (Demain, 2000). Este tipo de procesos tienen bajos requerimientos de energía y producen una menor cantidad de aguas residuales en comparación con los procesos de fermentación líquida (Pandey, 2003).

Otro de los aspectos importantes a tener en cuenta para la fermentación sólida es la elección de los parámetros del proceso y su optimización. Estos incluyen parámetros fisicoquímicos y bioquímicos como: el tamaño de partícula, la humedad inicial, el pH, el pre tratamiento del sustrato, la humedad relativa, la temperatura de incubación, la agitación, la aireación, el volumen y la edad del

inoculo, la composición del medio de cultivo, la suplementación con microelementos como sales e inductores de crecimiento así como de elementos traza, la extracción del producto y su posterior purificación, etc. Dependiendo de la clase, el nivel y la aplicación del experimento, una sola o varias variables pueden ser usadas como parámetros de optimización del proceso (Pandey, 2003).

Dentro de los parámetros mencionados anteriormente, la selección de un sustrato adecuado es un factor clave en los procesos de fermentación sólida. Generalmente se utilizan residuos agroindustriales debido a que suplen la demanda de nutrientes requerida por los microorganismos a un bajo costo. Algunos ejemplos son: bagazo de caña, trigo, melaza, arroz, maíz, residuos de té, café, pulpa de remolacha y harina de trigo, entre otros (Krishna, 2005). Adicionalmente, es necesario mantener un nivel óptimo de humedad, ya que una baja humedad tiende a reducir la difusión de nutrientes, el crecimiento del microorganismo, la estabilidad enzimática y la degradación del sustrato. En general, los contenidos de humedad encontrados en los procesos de fermentación sólida se encuentran entre el 30% y el 85%. Para cultivos bacterianos, la humedad del sustrato debe ser superior al 70%, mientras que en el caso de los hongos filamentosos, ésta podría encontrarse en un rango que oscila entre el 20% y el 70% (Raimbault, 1998).

De esta manera, los hongos filamentosos constituyen el grupo de microorganismos de mayor utilización en los procesos de fermentación sólida ya que su crecimiento en forma de micelio e hifas, así como su tolerancia ante condiciones tales como baja actividad de agua y una alta presión osmótica, les proporcionan ventajas sobre otros microorganismos en la colonización de sustratos sólidos y su utilización como fuente de nutrientes (Krishna, 2005).

Frente a la fermentación líquida, la fermentación sólida presenta unos rendimientos más altos, esto se atribuye probablemente a la semejanza que presenta la matriz sólida al hábitat natural de algunos microorganismos, lo que permite que su actividad metabólica se incremente (Pandey, 2003). En la Tabla 1 se presenta una comparación entre los dos sistemas de fermentación.

**Tabla 2.2.** Cuadro comparativo entre los sistemas de fermentación líquida y sólida.

<b>FACTOR</b>	<b>FERMENTACION LIQUIDA</b>	<b>FERMENTACION SOLIDA</b>
<b>TIPO DE SUSTRATOS EMPLEADOS</b>	Sustratos solubles (azúcares)	Sustratos económicos de carácter agroindustrial y poliméricos insolubles (almidón, celulosa, pectina, lignina)
<b>AGUA</b>	Elevado consumo de agua	Consumo limitado de agua y baja actividad de agua
<b>TEMPERATURA</b>	Fácil control de la temperatura, alta transferencia de calor	Difícil control de la temperatura, baja capacidad de transferencia de calor en la matriz
<b>AIREACION</b>	Se requiere la inyección de altos volúmenes de aire, el oxígeno soluble es limitado	Fácil aireación y alto intercambio de gases en la superficie de la matriz
<b>CONTROL DE pH</b>	Fácil control del pH por la homogeneidad del sistema	Difícil control de pH. Se deben emplear sustancias o sustratos con propiedades amortiguadoras
<b>AGITACION MECANICA</b>	Se requiere para lograr una buena homogenización	No es necesaria, por tal razón se opera bajo condiciones estáticas.
<b>ESCALAMIENTO</b>	Disponibilidad de equipos a nivel industrial	Necesita el diseño de nuevos equipos y de un desarrollo ingenieril
<b>INOCULACION</b>	Fácil inoculación	Fácil inoculación, el peligro de contaminación es menor
<b>CONTAMINACIÓN</b>	Alto riesgo de contaminación bacteriana	El bajo contenido de humedad hace menos probable la contaminación por bacterias
<b>GASTO ENERGETICO</b>	Genera un elevado consumo energético	Los requerimientos de energía son bajos
<b>TAMAÑO Y VOLUMEN DEL EQUIPO</b>	Se manejan altos volúmenes y la inversión en equipos y tecnología es elevada	Se manejan volúmenes más bajos y el costo de los equipos es mucho menor
<b>EFLUENTES Y POLUCION</b>	Altos volúmenes de efluentes y contaminantes	Bajos volúmenes de efluentes y contaminantes
<b>CONCENTRACION DEL PRODUCTO</b>	Dependiendo del producto de interés	Fácil producción de propágulos y esporas fúngicas

**Fuente:** Raimbault, M. 1998.

## 2.2 FUNDAMENTACIÓN FILOSÓFICA

Thomás S. Kuhn (1962) en su libro “La Estructura de las Revoluciones Científicas”, considera que el paradigma es un ejemplo o un esquema básico de interpretación de la realidad, que ha sido verificado por un proceso de investigación científica, es decir aplicando leyes, teorías, modelos, métodos y técnicas, aplicando e instrumentando; y, sobre la base de este ejemplo se proporcionan modelos científicos. Además menciona que si un investigador comparte un paradigma con otro es obvio que ambos estarán regidos por los mismos patrones en la práctica científica.

Un paradigma es un modelo que tiene un marco delimitado, que es el punto de vista, y enseña como desenvolverse dentro de ese marco; ó, un modo particular de ver el mundo, de interpretar la realidad, a partir de una determinada concepción filosófica. Los paradigmas actúan como filtros fisiológicos, de manera que nosotros literalmente vemos el mundo a través de nuestros paradigmas. En el contexto del paradigma, significa que todo dato que existe en el mundo real y no se ajusta a su paradigma tiene dificultades para pasar por sus filtros. Por tanto, lo que en realidad percibimos en esencia está determinado por nuestros paradigmas. Lo que a una persona con un paradigma puede resultar muy notorio, perfectamente obvio, puede ser casi imperceptible para otra persona con un paradigma diferente. En esto consiste el efecto paradigma.

Existen dos tipos de paradigmas en la Investigación; Investigación cuantitativa llamada clásica o tradicional, dentro de lo cual se ubica la mayoría (si no todos) los tipos de investigación, se manifiestan entre otros, varias características como los objetivos y el proceso de investigación solo es conocido por los técnicos y los investigadores; además los resultados del estudio son destinados exclusivamente a los investigadores y al organismo o centro de investigación. La población no tiene que conocerlos ni discutirlos. La investigación cualitativa, por su parte, se ha concebido últimamente como aquel tipo de investigación en el cual participan los individuos y comunidad para solucionar sus propias necesidades y problemas,

bajo la guía de técnicos al respecto, pero con la participación directa de todos los interesados en su desarrollo.

La presente investigación se fundamenta en la búsqueda de nuevos sustratos para la producción del hongo *Trichoderma* spp., aprovechando residuos agroindustriales como la cascarilla de arroz y residuos de papa, por lo tanto se pretende establecer teorías que sustenten las posibilidades de optar por medios de cultivo alternativos que optimicen la producción de *Trichoderma* spp.

Desde el punto de vista cualitativo se pretende establecer las posibilidades de sustratos para la producción del hongo de interés, con la eventualidad de encontrar un sustrato que brinde ventajas, como, bajo costo, fácil adquisición, rentable y que cumpla con todas las condiciones para la producción óptima y buen desarrollo de *Trichoderma* spp.

La investigación se basará en esquemas determinados para el análisis y evaluación de cultivo de *Trichoderma* spp., en condiciones diferentes de temperatura, estableciendo cual es el mejor sustrato y temperatura óptima para su producción.

## **2.3 FUNDAMENTACIÓN LEGAL**

### **LEYES GENERALES Y ESPECÍFICAS PARA LA AGROINDUSTRIA**

En Ecuador, las actividades de producción, industrialización y comercialización de los productos agropecuarios están reguladas por leyes generales y específicas, reglamentos y ordenanzas. Las leyes generales son las siguientes: Ley de Desarrollo Agrario; Ley de Sanidad Vegetal, Ley de Aguas; Ley de Semillas; Ley Constitutiva del INIAP; y Ley de Centros Agrícolas. Cámaras de Agricultura y Asociaciones de Productores.

- **Ley Básica de Salud Animal y Sanidad Vegetal y su Reglamento**

En el aspecto técnico, ésta es la ley más estrechamente vinculada a los lácteos y a temas agropecuarios, acuícolas, pesqueros, forestales y de agroforestería en

general. Regula lo concerniente a los organismos vivos genéticamente modificados y define las competencias institucionales que sobre este tema tiene el Ministerio de Agricultura y Ganadería, que es la autoridad competente para aplicar la Ley.

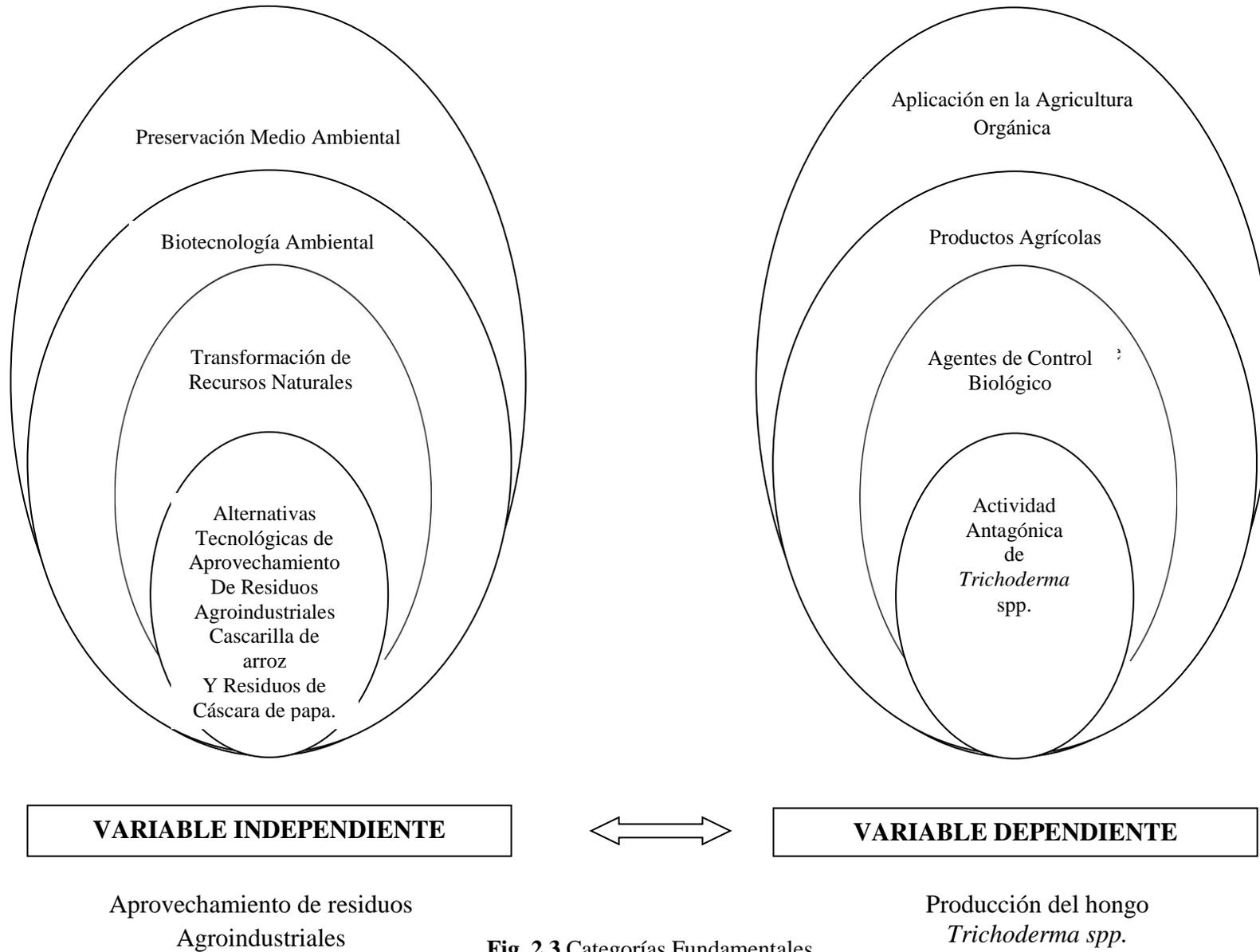
- **Ley de Desarrollo Agrario. Decreto N° 55**

En cuanto a la prevención y control de la contaminación, el Art. 2 el literal j) establece como función del CNRH “... normar el control de la calidad del agua que corresponde a las Agencias de aguas y a las Corporaciones Regionales de Desarrollo”. El literal k) le otorga la responsabilidad para autorizar todo vertido de fluidos y ejercer el control de su calidad, en coordinación con los organismos e instituciones competentes en la materia

- **Reglamento General de Plaguicidas y Productos Afines de Uso Agrícola**

Que los plaguicidas son un componente importante en los procesos de producción agrícola e implican además riesgos para la salud humana y el ambiente; que el costo de dichos insumos es un elemento determinante en los precios agrícolas y en la capacidad competitiva de los agricultores nacionales tanto en el mercado nacional como internacional.

**2.4.- CATEGORIAS FUNDAMENTALES**



**Fig. 2.3** Categorías Fundamentales

#### **2.4.1.- MARCO TEORICO DE LA VARIABLE INDEPENDIENTE**

En la superficie de nuestro planeta alrededor de 155 billones de toneladas de materia orgánica son producidas mediante el proceso fotosintético, cada año (Rajaratnam, 1991). Sin embargo solamente una porción de esta materia orgánica es directamente comestible por el hombre y por los animales, la mayoría de ella, tomando diversas formas, no es comestible y en muchos casos se convierte en una gran fuente de contaminación ambiental. Las pocas alternativas, desde el punto de vista económico, social y nutricional, que en la actualidad se presentan para el aprovechamiento de los residuos agroindustriales, asociado a la falta de conciencia en la protección del medio ambiente provocan que estos sean mal manejados y se conviertan en fuentes de contaminación de los recursos naturales (suelo, agua y aire).

Si analizamos los residuos que se producen en las diferentes agroindustrias, encontramos, por ejemplo, que en la industria del fique se utiliza solamente el 2% de la biomasa producida, en la industria de la cerveza solamente el 8% de los nutrientes del grano, y en las industrias del aceite de palma y de la celulosa se utiliza menos del 9% y 30%, respectivamente, de la biomasa producida (Zeri, 1997).

Para Calle, (1977), no se oculta que convertir un residuo en un producto comercial, requiere un arduo trabajo, pero un material de desperdicio puede convertirse en valioso gracias a un nuevo aparato o descubrimiento, a la adaptación de los procesos o debido al encarecimiento de los materiales a los cuales puede sustituir.

Entre los trabajos que se han desarrollado en el Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé, relacionados con la valorización de los subproductos del café, se tiene la utilización de la pulpa de café para el cultivo de hongos comestibles del género *Pleurotus* (Rodríguez y Zuluaga, 1994), el ensilaje de la pulpa de café para su posterior utilización (Rodríguez, 1992), la transformación de la pulpa en abono orgánico utilizando la lombriz roja (Dávila y Ramírez, 1996), la utilización de los subproductos en la preparación de medios de cultivo para microorganismos (Castañeda y Rodríguez, 1995), la utilización de la borra de café como soporte de microorganismos anaerobios en el tratamiento de las aguas residuales (Rodríguez, 1994), la utilización del mucílago en la alimentación de porcinos (Garavito y Puerta, 1998) y los trabajos que actualmente

se están desarrollando para el aprovechamiento de los subproductos, como son la obtención de pectinas a partir de la pulpa y el mucílago del café (Rodríguez, 1994) y cultivo de hongos tropicales sobre residuos agroindustriales presentes en la zona cafetera (Jaramillo, Rodríguez y Gómez, 1999).

#### **2.4.2.- MARCO TEORICO DE LA VARIABLE DEPENDIENTE**

El género *Trichoderma* es un hongo cosmopolita, habitante natural del suelo y algunas de sus especies tienen la habilidad de producir enzimas que atacan o inhiben a hongos fitopatógenos y que lo hacen un excelente agente de biocontrol (Aceves, 2001). Gran parte del potencial de este hongo radica en el hecho de que presenta un amplio espectro de antagonismo con la capacidad de controlar muchos fitopatógenos como *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Sclerotium* y *Phytophthora* entre otros, que afectan muchos cultivos de interés comercial como maíz, cebolla, tomate, frijón, trigo, etc.

La necesidad de reducir el uso de fungicidas en el control fitosanitario hace necesario desarrollar tecnologías que permitan de forma fácil, económica y efectiva obtener productos a partir de microorganismos, con la calidad y cantidad suficiente para su aplicación masiva en las áreas de cultivo. *Trichoderma* spp., se desarrolla bajo diferentes condiciones ambientales y de nutrientes; para su producción masiva en condiciones *in vitro* tiene la capacidad de cultivarse sobre diferentes sustratos de bajo costo (Aceves, 2001). Los hongos antagonistas poseen características que definen muy bien sus posibilidades como biocontroladores, por su alto poder patogénico y capacidad de producir epífitas; sin embargo, su producción a escala comercial e industrial presenta algunos inconvenientes como el desconocimiento de sustratos alternativos eficientes, infraestructura y equipo mínimo necesario; situación que ha limitado su desarrollo y utilización a mayor escala. Existen diferentes métodos para reproducir a *Trichoderma*; sin embargo, tienen un costo elevado. Uno de los sustratos más utilizados es el grano entero de arroz, el cual tiene un costo relativamente alto, por lo cual se pretende incorporar el uso de sustratos regionales para su reproducción (Fernández, 2004).

Por su parte Michel Aceves (2001), en sus estudios con el sustrato que tradicionalmente se utiliza en la reproducción masiva de hongos entomopatógenos (grano entero de arroz) obtuvo  $4.01 \times 10^8$  esporas ml<sup>-1</sup>, el cual es superado ligeramente por el olote en esta

investigación, a pesar de utilizar 150 g, lo cual puede deberse a la mayor superficie de contacto. *Trichoderma* spp., es un hongo muy versátil, de fácil manipulación (Fernández, 2001), que presenta la versatilidad de cultivarse y desarrollarse sobre muchos y diferentes sustratos (Hjeljord y Tronsmo, 1998).

## **2.5 HIPOTESIS**

### **Hi:**

Se puede aprovechar los residuos agroindustriales (Cascarilla de arroz y Residuos de cáscara de papa) para la producción del Hongo *Trichoderma* spp.

### **Ho:**

No se puede aprovechar los residuos agroindustriales (Cascarilla de arroz y Residuos de cáscara de papa) para la producción del Hongo *Trichoderma* spp.

## **2.6 SEÑALAMIENTO DE VARIABLES**

### **Variable Independiente:**

Aprovechamiento de residuos agroindustriales cascarilla de arroz (*Oriza sativa*) y residuos de papa (*Solanum tuberosum*).

### **Variable Dependiente:**

Producción del hongo *Trichoderma* spp.

## **CAPÍTULO III**

### **METODOLOGÍA**

#### **3.1 ENFOQUE DE LA INVESTIGACIÓN**

El enfoque de la presente investigación fue cuantitativo, ya que utiliza la recolección y el análisis de datos para probar, formular, fortalecer y revisar hipótesis establecidas y confiar en los datos numéricos obtenidos utilizando la estadística para establecer con exactitud patrones de comportamiento de una población. De esta forma, estos enfoques explican la relación entre las variables por medio de datos numéricos sin necesidad de atender a las cualidades del contexto.

El enfoque cuantitativo trata de determinar la fuerza de asociación o correlación entre variables, la generalización y objetivación de los resultados a través de una muestra para hacer inferencia a una población de la cual toda muestra procede. Tras el estudio de la asociación o correlación pretende, a su vez, hacer inferencia causal que explique por qué las cosas suceden o no de una forma determinada.

#### **3.2 MODALIDAD BÁSICA DE INVESTIGACIÓN**

Dentro del trabajo propuesto se utilizó las siguientes modalidades de investigación:

##### **Investigación Documental.**

Como una variante de la investigación científica, cuyo objetivo fundamental es el análisis de diferentes, utiliza técnicas muy precisas, de la documentación existente, que directa o indirectamente, aporte la información documental como parte esencial de un proceso de investigación científica, constituyéndose en una estrategia donde se observa y reflexiona sistemáticamente sobre realidades (teóricas o no) usando para ello diferentes tipos de documentos. Indaga, interpreta, presenta datos e informaciones sobre un tema determinado de cualquier ciencia, utilizando para ello, una metódica de análisis; teniendo como finalidad obtener resultados que pudiesen ser base para el desarrollo de la creación científica.

### **Investigación Experimental.**

Es la investigación en la que se obtiene la información por medio de la observación de los hechos, y que se encuentra dirigida a modificar la realidad con el propósito de estudiarla en circunstancias en las que normalmente no se encuentran, con el fin de describir y analizar lo que ocurriría en determinadas condiciones.

### **Investigación Descriptiva**

Mediante este tipo de investigación, que utiliza el método de análisis, se logra caracterizar un objeto de estudio o una situación concreta, señalar sus características y propiedades. Combinada con ciertos criterios de clasificación sirve para ordenar, agrupar o sistematizar los objetos involucrados en el trabajo indagatorio.

## **3.3 NIVEL O TIPO DE INVESTIGACIÓN**

Para la realización del trabajo investigativo en mención se acudió al siguiente tipo de investigación:

### **Investigación Explicativa**

Se encarga de buscar el porqué de los hechos mediante el establecimiento de relaciones causa-efecto. En este sentido, los estudios explicativos pueden ocuparse tanto de la determinación de las causas, como de los efectos (investigación experimental), mediante la prueba de hipótesis. Sus resultados y conclusiones constituyen el nivel más profundo de conocimientos.

## **3.4 POBLACIÓN Y MUESTRA**

### **Población:**

La Población corresponde al número total de conidios contenidos en el medio de cultivo patrón, de donde se obtuvo el inóculo del hongo *Trichoderma* spp., la cepa fue

suministrada por el Laboratorio de Biotecnología, cultivada en 50 g de arroz pre cocido como sustrato, incubada durante siete días a una temperatura de 25°C.

Para la determinación de conidios, se preparó una suspensión madre tomando 0.1g del hongo esporulado, se suspendió en 10 ml de agua destilada con Tween 80 al 0.1% (v/v) y se determinó la concentración inicial (conidios/ml) mediante recuento de los conidios en cámara de Neubauer.

**Volumen de la Cámara de Neubauer**

$$V = Axb$$

$$V = 0.2mm \times 0.2mm \times 0.1mm$$

$$V = 4 * 10^{-3} mm^3 \times \frac{1cm^3}{1000mm^3} = 4 \times 10^{-6} ml$$

**Número de conidios contenidos en 1 ml**

$$47.4 \text{ conidios} \rightarrow 4 \times 10^{-6} ml$$

$$x \rightarrow 1ml$$

$$x = 11.850.000 \text{ Conidios / ml}$$

**Número de conidios contenidos en 1 gramo de sustrato**

$$N. \text{ conidios / g de sustrato} = \frac{\bar{x} \text{ conidios / ml} * vol.}{w \text{ muestra}}$$

$$N. \text{ conidios / g de sustrato} = \frac{11.850.000 \text{ conidios / ml} * 10 ml.}{0.1 g}$$

$$N. \text{ conidios / g de sustrato} = 1.185.000$$

**Población= Número Total de conidios contenidos en el Medio de Cultivo Patrón**

$$\begin{aligned} 1.185.000 \text{ Conidios} &\rightarrow 1g \\ x &\rightarrow 50g \\ x = N &= 59.250.000 \text{ Conidios} \end{aligned}$$

**Muestra:**

El tamaño de muestra se calculó con la siguiente fórmula:

$$n = \frac{Z^2 PQN}{Z^2 PQ + Ne^2}$$

En donde:

**n**= Tamaño de la Muestra.

**Z**= Nivel de confiabilidad  $95\%/2=0.4750 \rightarrow 1.96$

**P**= Probabilidad de Ocurrencia 0.5

**Q**= Probabilidad de no Ocurrencia  $1-0.5=0.5$

**N**= Población.

**e**= Error de Muestreo 0.05 (5%)

$$n = \frac{1.96^2 \cdot 0.5 \cdot 0.5 \cdot 59.250.000}{1.96^2 \cdot 0.5 \cdot 0.5 + 59.250.000 \cdot 0.05^2}$$

$$n = 3841.35 \text{ Conidios}$$

El valor del tamaño de la muestra, es el valor que tomamos como referencia para el proceso de inoculación en el sustrato sólido. Se inoculo 0.5ml del inoculo preparado que contenía  $5.92 \times 10^6$  Conidios.

### **3.4.1 DISEÑO EXPERIMENTAL**

Se aplicó un Diseño Experimental **AxB**; el Factor A con tres niveles y el Factor B con dos niveles detallados en la siguiente Tabla:

**Replicas:** 3

**Tratamientos:** 6

**Total de unidades experimentales:** 18

**Tabla 3.1.** Factores y niveles de estudio

Factores	Niveles
<b>A. Sustrato</b>	<b>a<sub>1</sub></b> : Cascarilla de arroz <b>a<sub>2</sub></b> : Residuos de papa <b>a<sub>3</sub></b> : 50% Cascarilla de arroz 50%residuos de cáscara de papa
<b>B. Temperatura</b>	<b>b<sub>1</sub></b> : 25°C <b>b<sub>2</sub></b> : 30°C

Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**TOMA DE DATOS****Tabla 3.2** Formato para lecturas de Crecimiento y Desarrollo de *Trichoderma* spp.

FACTOR A	FACTOR B	Tratamiento	Replicas		
			R1	R2	R3
Cascarilla de arroz	25°C	a1b1			
Cascarilla de arroz	30°C	a1b2			
Residuos de cáscara de papa	25°C	a2b1			
Residuos de cáscara de papa	30°C	a2b2			
50% Cascarilla de arroz y 50% Residuos de papa	25°C	a3b1			
50% Cascarilla de arroz y 50% Residuos de papa	30°C	a3b2			

Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

### 3.5 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

**Tabla 3.3.** Operacionalización de Variables.

HIPÓTESIS	VARIABLES	CONCEPTO	INDICADOR	INDICE	INSTRUMENTO
Se puede aprovechar los residuos agroindustriales para la producción del Hongo <i>Trichoderma</i> spp.	Variable Independiente	Residuos Agroindustriales	Cascarilla de Arroz.	g	Balanza
			Residuos de Cáscara de Papa.	g	Balanza
			50% Cascarilla de Arroz y 50% de Residuos de Papa.	g	Balanza
	Variable Dependiente	Producción de <i>Trichoderma</i> spp.	Temperatura.	°C	Termómetro
			Concentración de Conidios.	Conidios/g	Cámara de Neubauer

Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

### 3.6 PLAN DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

#### 3.6.1 Obtención y mantenimiento de la cepa de interés.

Para este trabajo se empleó la cepa del hongo *Trichoderma* spp, suministrada por el Laboratorio de Biotecnología, en arroz pre cocido como medio de cultivo, incubada durante siete días a una temperatura de 25°C.

#### 3.6.2 Obtención del inóculo

Para la obtención del inóculo, se preparó una suspensión madre de conidios a partir del raspado superficial del hongo esporulado. Los conidios se suspendieron en 10 ml de agua destilada con Tween 80 al 0.1% (v/v) y se determinó la concentración inicial del inóculo (conidios/ml) mediante recuento de los conidios en cámara de Neubauer.

#### 3.6.3 Cuantificación del inóculo (expresada en conidios/ml)

La cuantificación del inóculo se realizó mediante la técnica de recuento de conidios en cámara de Neubauer. Para esto, se tomaron 0.1g de muestra homogeneizada (conidios + sustrato) y se adicionaron a 10ml de agua destilada con Tween 80 al 0.1% (v/v), estimando el número de conidios/ml.

#### VOLUMEN DEL HEMATOCITOMETRO

$$V = Axb$$

$$V = 0.2mm \times 0.2mm \times 0.1mm$$

$$V = 4 * 10^{-3} mm^3 \times \frac{1cm^3}{1000mm^3} = 4 \times 10^{-6} ml$$

#### N. DE CONIDIOS CONTENIDOS EN 1 ML

$$\text{Número de conidios observados} \rightarrow 4 \times 10^6 ml$$

$$x \rightarrow 1ml$$

$$x = X \quad \text{Conidios / ml}$$

El número de conidios/g de sustrato se obtuvo multiplicando el promedio del número de conidios/ml por el volumen empleado en la suspensión inicial y dividiendo por el peso de la muestra.

$$N. \text{ conidios / g de sustrato} = \frac{\bar{x} \text{ conidios / ml} * \text{vol.}}{w \text{ muestra}}$$

#### **3.6.4 Preparación del sustrato sólido.**

El medio de cultivo sólido compuesto de los sustratos en estudio, cascarilla de arroz y Residuos de papa, codificados según el tratamiento dispuesto en el Diseño Experimental AxB; como a<sub>1</sub>b<sub>1</sub>, a<sub>1</sub>b<sub>2</sub>, a<sub>2</sub>b<sub>1</sub>, a<sub>2</sub>b<sub>2</sub>, a<sub>3</sub>b<sub>1</sub>, a<sub>3</sub>b<sub>2</sub>. Se prepararon colocando cada uno de los sustratos en botellas de vidrio de 500ml; con agua destilada. (Anexo A-1). Detallado de la siguiente manera:

##### **a) Cascarilla de arroz.**

Se colocó 28g de éste sustrato en botellas de vidrio de 500ml y se adicionó 18ml de agua.

##### **b) Residuos de papa**

Se colocó 56g de éste sustrato en botellas de vidrio de 500ml y se adicionó 10ml de agua.

##### **c) Mezcla de Cascarilla de papa y Residuos de papa**

Se colocó 16g de cascarilla de arroz y 16g de residuos de papa en botellas de vidrio de 500ml y se adicionó 15ml de agua.

Las botellas con sustrato se sometieron a un proceso de esterilización a una temperatura de 121°C durante 20 minutos y posteriormente se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

#### **3.6.5 Selección de las condiciones de fermentación**

Se realizaron 18 fermentaciones sólidas empleando el tratamiento establecido por Diseño Experimental utilizado. Se eligió la **TEMPERATURA** debido a que es un

factor clave dentro del proceso de fermentación sólida, puesto que está directamente relacionado con la actividad metabólica del microorganismo y la velocidad de crecimiento de éste (Krishna, 2005).

### 3.6.6 Inoculación del sustrato sólido

El sustrato sólido obtenido en la etapa anterior se inoculó con 0.5ml del inóculo obtenido mediante recuento de los conidios en cámara de Neubauer. Posteriormente, las botellas de vidrio con los medios de cultivo inoculados se distribuyeron de acuerdo con el tratamiento a emplear ajustando la temperatura de fermentación establecida por el Diseño Experimental.

### 3.6.7 Evaluación del crecimiento

Para evaluar la producción de conidios se tomaran muestras de cada botella al final de la fermentación a los 6, 8 y 14 días de incubación. Para la toma de muestras se tomó 0.1g de cada sustrato utilizado, con el hongo en el esporulado. Después se determinó en ellas el número de conidios por ml y por conversión el número de conidios por gramo de sustrato empleado. La variable respuesta escogida fue Crecimiento y desarrollo de *Trichoderma* spp; Cuantificación de Biomasa, expresado en conidios/g puesto que este indicador determina el rendimiento del producto biotecnológico de interés.

**Tabla 3.4.** Parámetros y Criterios de Evaluación

<b>INDICADOR</b>	<b>INDICE</b>
Cuantificación de Biomasa	Conidios/g
Cinética de Crecimiento	
Número de Generaciones	n
Tiempo de Generación	g
Velocidad Especifica	$\mu$

**Elaborado por:** Silvana Ramírez, 2012

### 3.6.8 Cinética de crecimiento en medio sólido

El tiempo de fermentación fue de 14 días, ya que éste fue el tiempo requerido por el hongo *Trichoderma* spp., para llevar a cabo la colonización del sustrato sólido.

### **I. Número de Generaciones.**

En donde:

N= Número de conidios/g final.

No= Número de conidios/g inicial.

$$n = \frac{\ln N - \ln N_0}{\ln 2}$$

### **II. Tiempo de Generación o Duplicación. (h<sup>-1</sup>)**

En donde:

t= Intervalo de Tiempo

n= Número de Generaciones

$$g = \frac{t}{n}$$

### **III. Velocidad Especifica de Crecimiento (Conidios/h<sup>-1</sup>)**

En donde:

g= Tiempo de Generación o Duplicación

$$\mu = \frac{\ln 2}{g}$$

## **3.7.- PLAN DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS**

Un modelo que conduzca al mejoramiento de los procesos fermentativos debe empezar por la medición del rendimiento del producto de interés como una respuesta a la influencia de factores tales como la composición del medio de cultivo (balance nutricional, fuentes adecuadas de carbono y nitrógeno), temperatura, pH, aireación, entre otros (Demain, 2000).

El desarrollo y el comportamiento de los procesos fermentativos han sido modelados y explicados frecuentemente usando los métodos clásicos de experimentación, con un solo factor que cambia o varía en el tiempo, mientras que los demás se mantienen constantes. Sin embargo, las técnicas de diseño de experimentos presentan una alternativa más equilibrada para lograr el modelamiento de este tipo de procesos. Idealmente, el diseño de experimentos es un proceso secuencial (Haaland, 1989 citado por Demain, 2000) en el que los factores más importantes son estudiados inicialmente

para determinar las condiciones nutricionales y físicas que ejercen una mayor influencia sobre la variable de respuesta clave y posteriormente se van eliminando en orden de significancia, hasta obtener una lista más manejable y real de los factores para optimizar el proceso.

La respuesta experimental para el diseño planteado fue Concentración final de conidios, Cuantificación de Biomasa, el análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó empleando el software estadístico Infostat. Los datos obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza ANOVA a un nivel de confianza del 95%; para determinar el efecto de los factores evaluados sobre la variable de respuesta. Las medias fueron comparadas con el test de medias de Tukey con  $\alpha = 0,05$ .

## CAPÍTULO IV

### ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

#### 4.1 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

##### 4.1.1 Obtención del inóculo

Para la obtención de los inóculos de *Trichoderma* spp., se preparó una suspensión de 10 ml de conidios. Se ajustó la en la cámara de Neubauer una concentración inicial del inóculos a  $1,185 \times 10^7$  conidios/ml. (Anexo E).

##### 4.1.2 Fermentación sólida

###### 4.1.2.2. Inoculación del sustrato sólido

La inoculación se realizó en cada una de las botellas, suministrando 0.5ml de la suspensión de conidios preparada, el inóculo contenía  $5.92 \times 10^6$  conidios/ml. (Anexo E), según el tratamiento dispuesto en el Diseño Experimental AxB aplicado. Se incubaron durante 14 días en donde se observó la colonización completa del sustrato. La concentración final se determinó por recuento en cámara de Neubauer (Anexo D; Fig. D-4).

##### 4.1.3 Evaluación del crecimiento

###### 4.1.3.1 Observación macroscópica.

*Trichoderma spp* por fermentación de estado sólido mostro macroscópicamente un crecimiento y desarrollo en forma de una capa fina de micelio blanco, más o menos asentado a los seis días de incubación (Anexo F.) y de un color verde homogéneo (que correspondió a la fase de esporulación) desde el octavo día hasta los catorce días en que se dio término a la incubación.

#### 4.1.3.2 Aspecto microscópico.

Para la fermentación sólida, el crecimiento del hongo *Trichoderma* spp., se evaluó mediante el recuento de conidios en la cámara de Neubauer, expresado en conidios/ ml y su posterior transformación a conidios/g de Sustrato. En el Anexo B; se observan los resultados sobre producción de biomasa de *Trichoderma* spp. La producción de conidios se alcanzó entre ocho y catorce días de incubación. Se encontró una alta concentración de conidios que logro un valor de  $4,92 \times 10^{11}$  conidios/g en el Tratamiento codificado como  $a_1b_2$  (Cascarilla de Arroz a 30°C); mientras que el valor mínimo se registró en el Tratamiento  $a_2b_1$  (Residuos de papa a 25°C) con  $1.75 \times 10^{11}$  conidios/g. En la Tabla B-2 se observa, que en todas las corridas experimentales, la concentración de conidios estuvo en el orden de  $10^8$  conidios/g y  $10^{11}$  conidios/g.

El crecimiento de *Trichoderma* spp., fue óptimo al observarse desarrollo y esporulación favorable en los sustratos empleados, principalmente en cascarilla de arroz, cabe considerar q el tiempo de fermentación fue de catorce días, tiempo que requirió *Trichoderma* para la colonización del Sustrato.

En el tratamiento  $a_1b_1$  (Cascarilla de arroz a 25°C) y  $a_2b_2$  (Cascarilla de arroz a 30°C), el desarrollo fue favorable con micelio denso y presencia de esporulación a los ocho días de inoculación. El crecimiento fue mediado, con formación de conidios a las 144 horas, alcanzando a cubrir toda la superficie del medio a las 336 horas, con producción de gran cantidad de esporas (color verde claro). A los ocho días presentó concentraciones que van desde los  $1,20 \times 10^{08}$  conidios/g hasta los  $8,38 \times 10^{08}$  conidios/g, esta última obtenida en el medio  $a_1b_2$ .

Los medios a base del sustrato residuos de papa ( $a_2b_1$ ,  $a_2b_2$ ) presentaron las concentraciones más bajas, el crecimiento fue lento y poco denso no llevo a cabo la colonización de todo el medio, la esporulación fue muy escasa en comparación con los otros tratamientos, formación de un micelio fino y la esporulación se presentó de forma irregular en pequeños brotes.

El inóculo inicial utilizado presentó una concentración de  $5.92 \times 10^6$  conidios/ml. y se incrementó al cabo de 14 días de fermentación alcanzando  $4,92 \times 10^{11}$  conidios/g en el Tratamiento a<sub>1</sub>b<sub>2</sub>.

#### **4.1.4 Efecto de la temperatura**

Se determinó que el factor temperatura individualmente ejerció un efecto positivo significativo sobre la esporulación del hongo *Trichoderma* spp.; ya que se presentó mayor esporulación a los 30°C.

Los resultados obtenidos durante el proceso de fermentación sólida (expresados como concentración de conidios/g) fueron confirmados por los estudios descritos por Astudillo (1999) y Peña (2002), quienes determinaron que una temperatura cercana a los 30°C se encuentra dentro del rango aceptable para el crecimiento de hongos filamentosos como *Trichoderma* spp. Además, en otros estudios han establecido que el exceso de la temperatura en un proceso de fermentación favorece aspectos negativos como la desaceleración o detención de la actividad microbiana, la deshidratación del medio sólido y por último, el metabolismo es desviado como un mecanismo de defensa ante el calor o ante la deshidratación (Gervais & Molin, 2003).

De ahí que se pueda decir entonces, que la temperatura más adecuada para llevar a cabo un proceso de fermentación sólida usando el hongo *Trichoderma* spp., es la que se encuentra alrededor de los 30°C, un valor reportado como cercano a la temperatura óptima de crecimiento establecida para este microorganismo (Peña, 2002).

#### **4.1.5 Efecto del tipo de sustrato**

Respecto al sustrato, se presentaron diferencias significativas entre los tres medios de cultivo, evidenciándose que el medio de Cascarilla de arroz representa una mejor opción para la producción de este hongo (Anexo B; Figura B-1).

En el medio de cultivo con cascarilla de arroz, *Trichoderma* spp., creció de manera abundante y uniforme sobre la superficie del sustrato; inicialmente se evidenció la

formación de micelio de color blanco y posteriormente, se observó un cambio gradual en la coloración a verde oscuro debido a la generación de conidios.

La relación carbono (C): nitrógeno (N) es esencial para las fermentaciones de hongos, de este balance en lo fundamental dependerá el que se logre la formación de los propágulos deseados. En los hongos, se necesita que la fuente C esté en exceso en el medio y el contenido de N sea el factor limitante del crecimiento, lo que desencadena el proceso esporulativo (Elósegui, 2006).

### **Caracterización química de la cascarilla de arroz y papa.**

**Tabla 5.1** Composición química de la cascarilla de arroz

Constituyente	Contenido %
Carbono	39,1
Hidrógeno	5,2
Nitrógeno	0,25
Oxígeno	37,2
Azúfres	0,43
Cenizas (Sílice 94.5%)	17,8
Humedad (H <sub>2</sub> O)	8,9

UTP. ISSN 0122-1701

**Tabla 5.2** Composición química de la papa.

Constituyente	Contenido
Agua	76,70%
Materia seca	23,30%
Proteínas	1,90%
Grasa	0,10%
Carbohidratos	19,30%
Fibra	1,00%
Cenizas	1,00%
Calorías (100 g)	34
Calcio (mg)	4,0
Fósforo (mg)	26,0
Hierro (mg)	1,1
Tiamina (mg)	0,08
Riboflavina (mg)	0,09
Niacina (mg)	1.0

UTP. ISSN 0122-1701

La alta producción de conidios pudo deberse a que la cascarilla de arroz es un sustrato rico en carbono, aproximadamente 39.10% (Fenda, 2003), proteínas y todos los elementos traza (Mg, Zn y Cu) que requiere *Trichoderma* spp., para su crecimiento (Moore, 1996).

## 4.2 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

### 4.2.1 Cuantificación de Biomasa

En el Anexo B, en las Tablas B-1, B-2, B-3; se observan los resultados sobre producción de biomasa de *Trichoderma* spp. Se muestra que todos los tratamientos lograron producir biomasa del hongo a partir de seis días.

La que presentó mejor producción fue  $a_1b_2$ , seguida del tratamiento  $a_1b_1$  y  $a_3b_2$ ; estas mismas alcanzaron la colonización mayoritaria del sustrato en solo ocho días, mientras que los tratamientos  $a_2b_1$ ,  $a_2b_2$ ,  $a_3b_1$  necesitaron catorce días. En los medios de cultivo donde se ha hecho desarrollar a *Trichoderma* spp., han estado presentes fuentes de carbono, de nitrógeno, de energía, minerales y factores de crecimiento (Castillo C. 2001.). La cascarilla de arroz, presenta todas estas fuentes en mayor composición que los residuos de papa, como se muestra en la Tabla 5.1 y 5.2; motivo por el cual, *Trichoderma* spp, alcanza una mayor concentración de conidios/g, en los medios que contenían cascarilla de arroz.

La fermentación de estado sólido es un proceso de transformación de material biológico sólido en otros productos biológicos. Requiere que el sustrato tenga un contenido de agua total de 8-35%, esté en estado particulado con un tamaño pequeño y en forma alargada, como más recomendable (Stefanova N. 1998). La cascarilla de arroz tiene un 8.9% de agua además que su tamaño beneficia la colonización del hongo, condiciones que favorecen el crecimiento y desarrollo de *Trichoderma* spp.

La producción de *Trichoderma* spp., a nivel industrial y semiindustrial se considera como un sistema, la humedad y tamaño de partícula en el material juega un papel fundamental (Pandey, 2003), así como otros parámetros como luz y temperatura, sabiendo que *Trichoderma* spp., es fotosensible (Domsch, 1980) y se comporta mejor con condiciones de luz día o UV tipo A 366 nm (Fonseca, 1998), y temperaturas cercanas a los 30°C, aunque todos estos parámetros pueden variar de acuerdo con los aislamientos. En la Tabla B-3, se observan los promedios de la concentración final de Conidios/g alcanzados en cada uno de los tratamientos y los valores más altos corresponden a los sometidos a una temperatura de 30°C.

Esto nos indica que la cascarilla de arroz es un sustrato bastante apropiado para la producción de conidios de *Trichoderma* spp.; esto se debe sobre todo a la composición química del arroz que en cantidad y variedad corresponde con las necesidades nutricionales de *Trichoderma* spp. En los medios de cultivo donde se ha hecho desarrollar al *Trichoderma* spp., han estado presentes fuentes de carbono, de nitrógeno, de energía, minerales y factores de crecimiento. La cascarilla de arroz presenta todas estas fuentes (Agapito, T. 2001).

#### **4.2.2 Cinética de Crecimiento en medio sólido**

El tiempo de fermentación fue de 14 días. La evaluación del proceso de esporulación del hongo se realizó durante los días 6, 8 y 14. (Tabla B-1). Los valores obtenidos al realizar los cálculos de los parámetros, Número de Generaciones, Tiempo de Generación, y Velocidad Especifica de Crecimiento se muestran en el Anexo D; los valores más altos corresponden al tratamiento a<sub>1</sub>b<sub>2</sub>; el número de Generaciones obtenida fue de 16, el tiempo de duplicación fue de 8.81 h<sup>-1</sup> y la Velocidad Especifica de Crecimiento fue de 0.08 Conidios/h<sup>-1</sup>.

##### **4.2.2.1 Modelo Cinético de Fermentación Solida**

En general, el comportamiento cinético del hongo *Trichoderma* spp. Obedeció a un modelo de orden exponencial (Anexo C; Tabla C-19) ya que al realizar el análisis de los datos obtenidos, este modelo presentó un coeficiente de correlación aceptable (95%) (Figuras C1-C18). Además, después de realizar el análisis estadístico de los datos empleando la prueba de Tukey a un nivel de confianza del 95%, se demostró que sí se presentaron diferencias significativas de la concentración de conidios entre los tratamientos al final del proceso de fermentación sólida (336 horas). (Anexo C; Fig. C-20).

#### 4.2.5 Análisis Estadístico

El Análisis de Varianza (Anexo E-1) mostró efectos estadísticos altamente significativos entre los sustratos evaluados ( $P \leq 0.0001$ ); el rango de producción fue muy heterogéneo, varió desde  $1.11 \times 10^{11}$  a  $4.92 \times 10^{11}$  Conidios/g de sustrato. Indicando que uno de los tratamientos estudiados presentó un valor promedio estadísticamente diferente; Tratamiento a<sub>1</sub>b<sub>2</sub>.

De acuerdo con el Anexo E; el Análisis Estadístico, los factores evaluados durante el proceso de fermentación sólida tuvieron diferentes efectos sobre la concentración de conidios obtenida. Como se observa en la Figura E-1 y E-2, el tipo de sustrato utilizado presentó diferente concentración de conidios al finalizar el proceso de fermentación, se registró que en la cascarilla de arroz fue el que tuvo mayor influencia sobre la variable de respuesta. En segundo lugar se encontró que el factor temperatura, Figura E-3 y E-4 presentó un efecto positivo sobre la concentración de conidios; ya que a 30°C existió mayor esporulación del hongo.

La interacción de los factores evaluados se presenta en la Figura E-5, donde se puede observar gráficamente que el efecto más importante lo tiene la combinación de los factores Sustrato (Cascarilla de arroz) – Temperatura (30°C), las otras combinaciones no presentaron altos rendimientos.

La prueba de Tukey de separación de medias (Tabla E-2) indicó que el sustrato con mayor producción de esporas fue a<sub>1</sub>b<sub>2</sub>, el cual se diferenció significativamente con respecto a los demás. Las otras variantes probadas a partir del sustrato Residuos de papa (a<sub>2</sub>b<sub>1</sub>, a<sub>2</sub>b<sub>2</sub>) y mezcla de sustratos a 25°C (a<sub>3</sub>b<sub>1</sub>) arrojaron concentraciones bajas en comparación a los otros tratamientos. Entre éstos no se encontraron diferencias significativas. (Tabla E-4).

La utilización de este tipo de materiales naturales ratifica lo dicho por Miller (1986), quienes afirmaron que los sustratos derivados de la agricultura, pueden ser utilizados para la producción de esporas de *Trichoderma* spp. Como se puede observar en los resultados obtenidos con el medio a<sub>1</sub>b<sub>2</sub> (cascarilla de arroz a 30°C) confirmando la

actuación de los nutrientes de este material en la esporulación del aislado de *Trichoderma* spp.

Las concentraciones obtenidas con los sustratos de cascarilla de arroz en los diferentes sustratos probados, son similares a las obtenidas en investigaciones de reproducción de cepas de *Trichoderma* spp., como las realizadas por Lorenzo et ál. (2000), en las cuales, con base del sustrato de cascarilla de arroz al 30% más paja de arroz 70%, se obtuvieron concentraciones de hasta  $9,3 \times 10^{11}$  conidios/g.

#### **4.6 VERIFICACIÓN DE LA HIPÓTESIS**

Tras haber realizado el procesamiento, análisis e interpretación de los resultados obtenidos, se rechaza la hipótesis de nula ( $H_0$ ), ya que si se puede utilizar residuos agroindustriales como sustratos para la producción de *Trichoderma* spp., ya que presenta altos rendimientos en la concentración final de conidios/g de sustrato, aunque el periodo de colonización del sustrato se llevó a cabo en 14 días.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 CONCLUSIONES

- Mediante fermentación sólida, se cultivó *Trichoderma* spp., en tres medios de cultivo; cascarilla de arroz, residuos de papa y uno, compuesto de los dos sustratos, cincuenta por ciento de cascarilla de arroz y cincuenta por ciento de residuos de papa, en el proceso de incubación se ajustó la temperatura a 25 y 30°C. La fermentación se llevó a cabo durante catorce días, tiempo en el cual se observó la colonización total del sustrato en el caso de la cascarilla de arroz. En el inicio del proceso se observó un crecimiento y desarrollo en forma de una capa fina de micelio blanco, a los seis días de incubación y de un color verde homogéneo (que correspondió a la fase de esporulación) desde el octavo día hasta los catorce días en que se dio término a la incubación. Los residuos agroindustriales empleados mostraron crecimiento del hongo *Trichoderma* spp., debido a que suplen la demanda de nutrientes requerida por los microorganismos. *Trichoderma* spp., es un hongo filamentosos y se constituye a un grupo de microorganismos de mayor utilización en los procesos de fermentación sólida, debido a su crecimiento en forma de micelio e hifas, así como su tolerancia ante condiciones tales como baja actividad de agua y una alta presión osmótica, dichas características les proporcionan ventajas sobre otros microorganismos en la colonización de sustratos sólidos y su utilización como fuente de nutrientes.
- Al finalizar el proceso de fermentación. En todas las corridas experimentales, la concentración de conidios estuvo en el orden de  $10^8$  conidios/g y  $10^{11}$  conidios/g. Se encontró una alta concentración de conidios de  $4,92 \times 10^{11}$  conidios/g en el Tratamiento codificado como  $a_1b_2$  (Cascarilla de Arroz a 30°C); mientras que el valor mínimo se registró en el Tratamiento  $a_2b_1$  (Residuos de papa a 25°C) con  $1.75 \times 10^{11}$  conidios/g. El desarrollo en cascarilla de arroz, fue favorable con micelio denso y esporulación abundante a las 192 horas de inoculación. Alcanzando a cubrir toda la superficie del medio a las 336 horas. Los medios a base del sustrato residuos de papa ( $a_2b_1$ ,  $a_2b_2$ ) presentaron las concentraciones más bajas, el crecimiento fue

lento y poco denso no llevo a cabo la colonización de todo el medio, la esporulación fue muy escasa en comparación con los otros tratamientos, formación de un micelio fino y la esporulación se presentó de forma irregular en pequeños brotes. Esto nos indica que la cascarilla de arroz es un sustrato bastante apropiado para la producción de conidios de *Trichoderma* spp.; debido a la composición química de la cascarilla de arroz que en cantidad y variedad corresponde con las necesidades nutricionales de *Trichoderma* spp.

- Según el análisis de los resultados, los factores de operación óptimos para el desarrollo del hongo *Trichoderma* spp., respecto al sustrato, fue el medio compuesto de cascarilla de arroz. Estadísticamente se presentaron diferencias significativas entre los tres medios de cultivo, evidenciándose que el medio de Cascarilla de arroz representa una mejor opción para la producción de este hongo. Se determinó además, que el factor temperatura individualmente ejerció un efecto positivo significativo sobre la esporulación del hongo *Trichoderma* spp.; ya que se presentó mayor esporulación a los 30°C. La temperatura más adecuada para llevar a cabo un proceso de fermentación sólida usando el hongo *Trichoderma* spp., es la que se encuentra alrededor de los 30°C. Los factores de operación en combinación, fueron cascarilla de arroz a 30°C; en donde se evidencio la mayor concentración de conidios/g de sustrato.

## 5.2 RECOMENDACIONES

- Efectuar estudios posteriores que permitan evaluar y establecer si la relación C/N presente en los medios de cultivo a base de residuos agroindustriales para la producción del hongo *Trichoderma* spp., es la más adecuada para llevar a cabo la producción masiva de este hongo.
- Llevar a cabo estudios que permitan establecer los ciclos de luz y oscuridad a los cuales el hongo *Trichoderma* spp., debe ser expuesto para inducir su proceso de esporulación de manera más eficiente.
- Se requiere estudiar el escalamiento a nivel piloto de la producción masiva del hongo *Trichoderma* spp.

- Realizar la optimización de las condiciones fisicoquímicas tanto en la fermentación líquida como en la fermentación sólida.
- Estandarizar el proceso de fermentación sólida del hongo *Trichoderma* spp. en fermentadores a escala piloto.
- Implementar una técnica para la cuantificación de biomasa fúngica del hongo *Trichoderma* spp.

## CAPÍTULO VI

### PROPUESTA

#### 6.1 DATOS INFORMATIVOS

##### 6.1.1 Título:

Implementación a nivel piloto de un fermentador de bandejas, para la producción masiva del hongo *Trichoderma spp.*

##### 6.1.2 Institución Ejecutora:

Universidad Técnica de Ambato - Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Bioquímica.

##### 6.1.3 Ubicación:

Universidad Técnica de Ambato

##### 6.1.4 Beneficiarios:

Facultad de Agronomía de la Universidad Técnica de Ambato

##### 6.1.5 Tiempo estimado de ejecución:

8 meses

##### 6.1.6 Equipo técnico responsable:

Ing. Gladys Navas – Silvana Ramírez

#### 6.2 ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA

Las especies del género *Trichoderma spp.*, son los microorganismos antagonistas más utilizados para el control de enfermedades en plantas ocasionadas por fitopatógenos. *Trichoderma spp.*, ha sido estudiado como agente de control biológico durante más de 70 años, pero solo hasta hace poco tiempo, las cepas de este microorganismo han comenzado a adquirir un valor comercial importante debido a que sus sistemas de producción han sido escalados a nivel piloto y semi-industrial.

La práctica tradicional más común para la disminución y eliminación de los efectos perjudiciales ocasionados por los agentes fitopatógenos mencionados se basa en el empleo de plaguicidas, práctica conocida como control químico. Sin embargo, el aumento de la conciencia social que se tiene ante el enorme deterioro medioambiental que supone la utilización indiscriminada de estos compuestos químicos, ha provocado un gran interés en la búsqueda de sistemas ambientalmente sostenibles para el control de plagas y enfermedades. En este sentido, una estrategia promisorio es la utilización de microorganismos antagonistas de los agentes infecciosos y que desplazan a éstos de una manera natural, denominada control biológico (Benítez, 2004). Como consecuencia de esto, existe un creciente interés por la explotación y utilización de los microorganismos para el control de plagas.

En general, las especies de *Trichoderma* spp. producen enzimas extracelulares, sustancias antibióticas de naturaleza volátil y no volátil y compuestos antifúngicos, pero también son fuertes competidores por espacio y nutrientes frente a otros fitopatógenos, además promueven el crecimiento de las plantas e inducen la resistencia sistémica en éstas (Hermosa, 2000). Por tal razón, los hongos del género *Trichoderma* spp., han sido los microorganismos antagonistas más utilizados para el control de enfermedades en plantas producidas por hongos durante más de 70 años, pero sólo hasta hace poco tiempo estas cepas han comenzado a adquirir un valor comercial importante; debido a los efectivos resultados obtenidos durante su aplicación y a la aparición de nuevas tecnologías para la producción masiva y el desarrollo de productos a base de este hongo (Clavijo, 1998).

De ahí que se hayan desarrollado diferentes estrategias o sistemas de producción masiva de este hongo biocontrolador sobre varios sustratos usando técnicas de fermentación tanto líquida como sólida para la obtención de conidios en rendimientos que alcanzan rendimientos hasta  $10^{15}$  conidios/g (Peña, 2002).

Por lo tanto, la estandarización e implementación de una técnica de fermentación en sustrato sólido a nivel piloto, se ha convertido en una etapa tecnológica crítica para la obtención de forma simple, económica y efectiva de las estructuras infectivas y de propagación a partir del hongo biocontrolador *Trichoderma* spp., en cantidades

suficientes para su utilización como principio activo de un bioplaguicida a nivel de campo.

### **6.3 JUSTIFICACIÓN**

La búsqueda, caracterización y producción a nivel de laboratorio e industrial de un producto biotecnológico, depende del microorganismo usado, del tipo de metabolito de interés y de los procesos involucrados en su obtención. La utilización de procesos con un alto desarrollo tecnológico tales como la fermentación líquida o sumergida y la fermentación en sustrato sólido, se han constituido en herramientas indispensables para la obtención comercial de este tipo de productos.

*Trichoderma* spp., es un habitante natural del suelo que se caracteriza por su comportamiento saprofita, propiedad que le proporciona ventajas antagónicas, tales como antibiosis, competencia por nutrientes y espacio y micoparasitismo, entre otros y que permiten su selección y uso para la producción de bioplaguicidas. El hongo *Trichoderma* spp., se ha convertido en uno de los microorganismos que aparece como una alternativa promisorio para ser empleado como agente de control biológico frente a diferentes especies de fitopatógenos, tales como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Fusarium oxysporum*, en el marco de un programa de manejo integrado de plagas eficaz para una agricultura más sana y productiva.

Por ello, es necesario llevar a cabo un proceso de producción masiva de conidios del hongo *Trichoderma* spp., a escala de laboratorio y estandarizar los niveles de producción a escala piloto, mediante la implementación de un proceso de fermentación sólida para posteriormente realizar la evaluación de su efectividad en pruebas a nivel de campo.

### **6.4 OBJETIVOS**

#### **6.4.1 General**

- Implementar un fermentador de bandejas a escala piloto, para la producción masiva del hongo *Trichoderma* spp.

#### 6.4.2 Específicos

- Desarrollar el dimensionamiento y montaje del equipo en base a las características detalladas en el presente trabajo.
- Establecer las condiciones fisicoquímicas (temperatura y caudal de aire), adecuadas para la optimización en la producción del hongo *Trichoderma* spp.
- Evaluar la viabilidad del hongo *Trichoderma* spp., mediante la técnica de recuento en placa sobre agar Saboureaud-Rosa de Bengala.

#### 6.5 ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD

Con el propósito de producir masivamente las cantidades de conidios del hongo *Trichoderma* spp., necesarias para llevar a cabo la aplicación en campo de un bioplaguicida para el control de diversos fitopatógenos, es necesario establecer una homogeneidad dentro del proceso de producción masiva de un bioplaguicida que tiene como principio activo los conidios del hongo *Trichoderma* spp.; por lo tanto, se considera necesario llevar a cabo la estandarización del proceso de producción masiva del hongo mediante fermentación sólida a escala piloto. Dentro de sus ventajas se encuentran: bajo costo de inversión en equipos, facilidad de aireación debido al aumento del área de transferencia, manejo de altos volúmenes de material, aunque no permite un control estricto del proceso de fermentación (Durand, 2003).

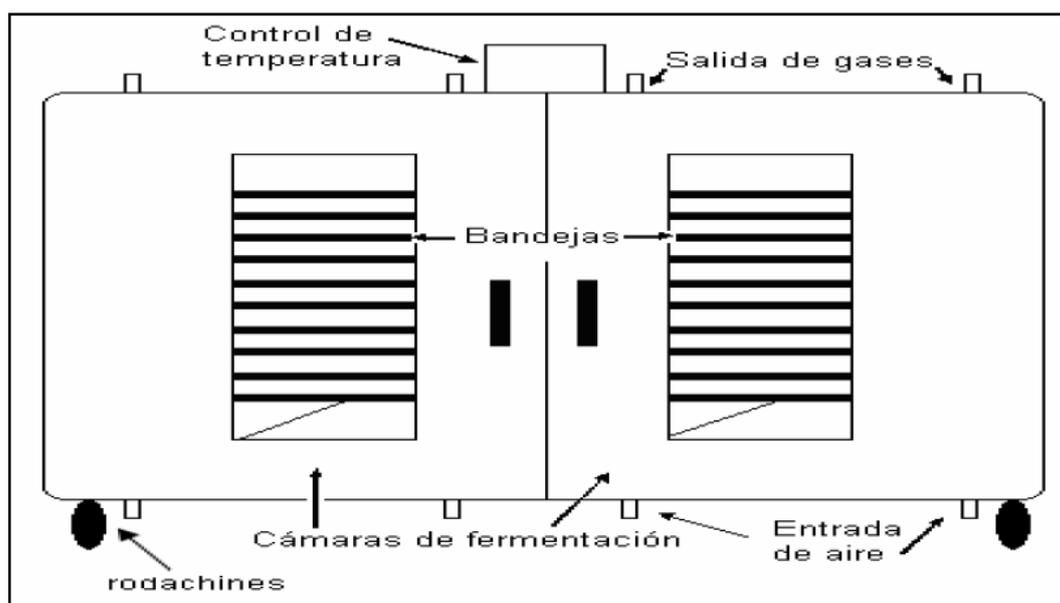
Las ventajas más relevantes de esta tecnología:

- Aumenta la competitividad del hongo de colonizar el sustrato sólido y reducir la proporción de microorganismos contaminantes.
- La colonización y conidiación del sustrato sólido por el crecimiento activo del microorganismo es más rápida.
- Al utilizar las bandejas para distribuir el medio sólido, se facilita la cobertura del sustrato sólido y un crecimiento homogéneo del hongo sobre éste.

## 6.6 FUNDAMENTACIÓN

### 6.6.1. FERMENTADOR SÓLIDO DE BANDEJAS

Los fermentadores usados para llevar a cabo procesos de fermentación en sustrato sólido se pueden clasificar de acuerdo a sus características y aplicaciones (Durand, 2003). En el fermentador de bandejas (Figura 6.1), el sustrato inoculado se distribuirá en bandejas inmóviles formando un lecho de altura inferior a 2cm. Las bandejas se colocaran consecutivamente en hileras una sobre otra, con algunos centímetros de espacio entre ellas para permitir el flujo de aire y gases, y serán colocadas en una cámara de acero inoxidable bajo condiciones controladas de temperatura y humedad durante cierto tiempo (Durand, 2003).



**Figura 6.1.** Aspecto externo de un fermentador de bandejas empleado en Fermentación sólida (Pinzón, 2001).

### 6.6.2. Descripción del biorreactor

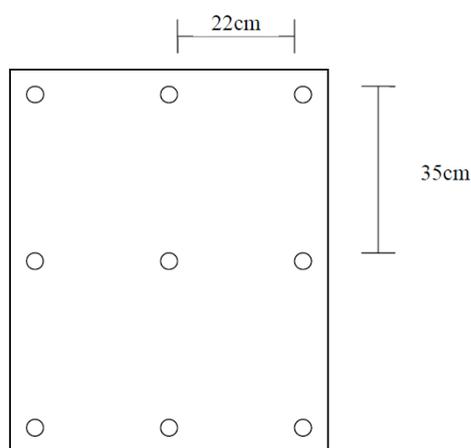
El fermentador de bandejas constara de dos cámaras independientes, cada una de las cuales contara con un escabiladero en acero inoxidable que sirve como soporte a 60 bandejas de 70 cm de largo por 44 cm de ancho y 1 cm de profundidad. Adicionalmente, el equipo tendrá un sistema de distribución de aire interno tipo flauta entre bandejas, que permite la adecuada distribución de aire sobre el sustrato y un control de

temperatura PID mediante un pirómetro digital que controla una resistencia eléctrica. El proceso de esterilización del fermentador se realizara in situ con calor seco a una temperatura de 100°C durante 4 horas.

El equipo tendrá una capacidad volumétrica por cámara de 48.000cm<sup>3</sup> y por bandeja de 1.680cm<sup>3</sup>.

### 6.6.3. Protocolo para realizar la prueba de viabilidad

La viabilidad del hongo se evaluará realizando siembras en agar Saboureaud-Rosa de Bengala.



**Figura 6.2.** Ubicación de toma de muestras en las bandejas de acero inoxidable del fermentador sólido.

Se tomara 0.1g de sustrato esporulado en un tubo de ensayo con 10ml de Tween 80 al 0.1%. La suspensión se homogenizará en vortex, y posteriormente se tomará 1 ml de la suspensión inicial y se pasó a otro tubo de ensayo con 9ml de Tween 80 al 0.1% (dilución 10<sup>-3</sup>). Posteriormente se inoculará 0.1ml de la dilución en cajas de agar Saboureaud-Rosa de bengala por triplicado, estas cajas serán incubadas durante 48 horas a 25°C y la lectura se reportará como UFC/ml.

## 6.7 METODOLOGÍA MODELO OPERATIVO

**Tabla 6.1.** Modelo operativo para la implementación de un Fermentador de Bandejas.

<b>Etapas</b>	<b>Actividades</b>	<b>Tiempo Estimado</b>
<b>FORMULACION DE LA PROPUESTA</b>	Revisión de la Bibliografía para establecer la propuesta.	1 mes
<b>DESARROLLO PRELIMINAR DE LA PROPUESTA</b>	Cronograma de la Propuesta	2 meses
<b>IMPLEMENTACION</b>	Ejecución de la propuesta	2 meses
<b>EVALUACION DE LA PROPUESTA</b>	Comprobación de la viabilidad del hongo <i>Trichoderma spp.</i>	1 mes
<b><u>Desarrollo Preliminar de la Propuesta</u></b>		
Preparación del sustrato sólido	El sustrato sólido se coloca en bolsas de polietileno de alta densidad. Dejar enfriar a temperatura ambiente. Esterilización a una temperatura de 121°C durante 20 minutos	1 Semana
Montaje del biorreactor	Este equipo consta de dos cámaras independientes, cada una de acero inoxidable que sirve como soporte a 60 bandejas de 70cm de largo por 44cm de ancho y 1cm de profundidad.	2 Semana
Condiciones de fermentación sólida	Temperatura, Volumen del inóculo inicial, Número de Bandejas	1 Día
Inoculación del sustrato sólido	El sustrato inoculado se distribuyó de manera uniforme sobre las bandejas de acero inoxidable. Finalmente, el equipo se cerró herméticamente y se ajustaron la temperatura y el caudal de aire según las condiciones de fermentación establecidas.	4 Día
Fermentación	Es el tiempo requerido por el hongo <i>Trichoderma spp.</i> , para llevar a cabo la colonización del sustrato sólido.	8 Días
Viabilidad del hongo	Se evaluó realizando siembras en agar Saboureaud-Rosa de Bengala.	1 Día

**Elaborado por:** Silvana Ramírez, 2012

## 6.8 ADMINISTRACIÓN

**Tabla 6.2.** Actividades de Administración para un proyecto.

ACTIVIDAD		DESCRIPCION
P L A N E A C I O N	PROYECTO	Es indispensable que el trabajo está entendido y que los responsables tengan una visión clara de los resultados esperados
	TRABAJO	Elaboración de un plan para el trabajo.
A D M I N I S T R A C I O N	CONTRATOS	El contrato es el documento que rige las condiciones bajo las cuales se adquiere un bien y/o servicio.
	PLAN DE TRABAJO	Representa el mejor estimado de cómo completar el trabajo que queda por hacer en un momento dado de un proyecto.
	COMUNICACIÓN	Comunicar el estado del mismo.
	DOCUMENTACION	Para proyectos pequeños no hay necesidad de establecer todo un sistema administrativo, pero en la medida que el alcance del proyecto aumenta, se hace necesario tenerlo
	CALIDAD	La calidad de un proyecto se mide por qué tan cerca están de cumplirse las expectativas, por lo tanto el objetivo central del equipo del proyecto es tratar de cumplir y exceder los objetivos iniciales

**Elaborado por:** Silvana Ramírez, 2012

## 6.9 PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN

**Tabla 6.3.** Previsión de la Evaluación.

Preguntas	Definición
¿Por qué evaluar?	Contribuye con información útil para la consecución de herramientas que permitan la obtención de posibles productos agroecológicos con aislados nativos de <i>Trichoderma spp.</i>
¿Para qué evaluar?	Promover la reproducción masiva y viabilidad de esporas de <i>Trichoderma spp.</i>
¿Qué evaluar?	Concentración final de Conidios/g de Sustrato y Viabilidad del hongo.
¿Quién evalúa?	Laboratorio de Biotecnología, UTA-FCIAL

**Elaborado por:** Silvana Ramírez, 2012

## BIBLIOGRAFÍA

Aceves, M. 2001. Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con mango afectados por “Escoba de bruja” y su potencial inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*. Revista Mexicana de Fitopatología 19(2): 154-160.

Alvarado, F. 2005. Desarrollo y caracterización microbiológica y física de pre formulados en polvo a base del hongo *Trichoderma koningii* para el control de fitopatógenos. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Pp. 6-43.

Alexopoulos, M. 1996. Introductory Mycology. Fourth edition. Editorial Willey. New York. 237 p.

Agosin, E. 1997. Effect of culture conditions and spore shelf life of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. [version electronica]. World Journal Microbiol Biotechnoly 13, (4), 225-232. Pág. de Internet: <http://isjd.pdii.lipi.go.id/admin/jurnal/61073540.pdf>

Astudillo, A. 1999. Establecimiento de los parámetros de producción semi-industrial del hongo *T. harzianum*, utilizado en control biológico. Tesis de pregrado. Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Pp 7-11. 14. 20.

Benítez, T. 2004. Biocontrol mechanisms *Trichoderma* strains. International Microbiology. Vol 7: 249-260.

Calle, H. 1977. Subproductos del café. Chinchiná (Colombia). (Boletín Técnico N°6). Consultada 19-Noviembre-2011. Pág. de Internet: [http://www.fao.org/ag/agn/agns/Projects\\_SQP\\_Santiago/Documentos/Estudios%20de%20caso/Cafe\\_COLOMBIA.pdf](http://www.fao.org/ag/agn/agns/Projects_SQP_Santiago/Documentos/Estudios%20de%20caso/Cafe_COLOMBIA.pdf)

Castro, A. 2003. Manejo sostenible de la llaga macana en cafetales renovados por zoca. Avances técnicos Cenicafé. Obtenida el 12 de Noviembre del 2011, Pág. de Internet: <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A1738E/A1738E.PDF>

Castaño, 2002. Las fermentaciones como soporte de los procesos biotecnológicos. Instituto de biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Pp. 1-11.

Clavijo, G. 1998. Estudio de la actividad quitinolítica en procesos de control biológico de *Rhizoctonia solani* Kuhn en tomate (*Lycopersicon esculentum*), mediante tratamientos de pregerminación controlada de semillas en presencia de *Trichoderma koningii* Oudemans. Tesis de pregrado. Biología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Pp 29-32, 56-57.

Demain, A., Hilton, M. 2000. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Second edition. ASM Press. Washington, pp 49-93, 221-239.

Domsch, 1980. Compendium of soil fungi. Revision of the genus *Trichoderma*. Academic Press. London. Pp 136-139, 794-810.

Dávila; Ramírez, 1996 . Effect of solid substrate, liquid supplement, and harvest time on 6-n-pentyl-2h-pyran-2-one (6PAP) production by *Trichoderma spp.* Journal of Agriculture and Food Chemistry 45: 531-534.

Durand, A. 2003. Bioreactor designs for solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal. Vol 13: 113-125.

Ecuador, Reglamento General de Plaguicidas y Productos Afines de Uso Agrícola, Consultada 19-Noviembre-2011. Pág. de Internet:  
<http://faolex.fao.org/docs/pdf/ecu5457.pdf>

Ecuador, Asociación Ecuatoriana De Ingeniería Sanitaria Y Ambiental (2001). Desarrollo Agrario. Consultada 19-Noviembre-2011. Pág. de Internet:  
[http://www.aeisa.org.ec/revista/edicion10/Ecuambiente10\\_2parte.pdf](http://www.aeisa.org.ec/revista/edicion10/Ecuambiente10_2parte.pdf)

Ecuador, Ley De Sanidad Vegetal, Codificación 8 Registro Oficial Suplemento 315 de 16-abr-2004 Estado: Vigente. Consultada 19-Noviembre-2011. Pág. de Internet:  
<http://www.agrocalidad.gov.ec/agrocalidad/images/Agrocalidad/Contenido/Juridico/Sanidad%20Vegetal/Ley%20de%20Sanidad%20Vegetal.pdf>

Ecuador, Ley De Prevención y Control de la Contaminación Ambiental. Codificación 20, Registro Oficial Suplemento 418 de 10 de Septiembre del 2004. H. Congreso Nacional la Comisión de Legislación y Codificación. Consultada 19-Noviembre-2011. Pág. de Internet:  
<http://blog.espol.edu.ec/ricardomedina/files/2009/03/leydeprevencionycontroldecontaminacion-ambiental.pdf>

Endara, M. 2009. “Reproducción del hongo *Trichoderma harzianum* (biofungicida) aprovechando desechos agroindustriales (tamo de fréjol, bagazo de caña).” Tesis de Ingeniería Agroindustrial, Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias Y Ambientales, Universidad Técnica Del Norte. Ibarra – Ecuador.

Fernández, O. y Vega, L. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Revista manejo integrado de plagas. Costa rica.62: 96-100.

Fernández-Larrea, V. O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 62: 96-100.

Fernández-Larrea, V. O. 2004. Tecnologías para la producción de biopesticidas a base de hongos entomopatógenos y su control de la calidad. Laboratorio de Hongos Entomopatógenos. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV). La Habana Cuba. 10 p.

Fonseca, A. 1998. Estudio preliminar sobre la dinámica poblacional del biocontrolador *Trichoderma spp.* en el suelo. Tesis de Pregrado. Bacteriología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Pp 29-32.

Forero, M. 2002. Producción masiva de microorganismos biocontroladores. Programa de Manejo Integrado de Plagas MIP. Centro de Investigación Tibaitatá. Corpoica. Publicación.

Harman, G. 1990. Production of cellulase and xylanase by *Trichoderma reesei* (QM 9414 mutant), *Aspergillus niger* and mixed culture by solid state fermentation (SSF) of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). [Versión electrónica]. Indian Journal of Chemical Technology, 15, 449-456. Pág. de Internet:  
[http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/2855/1/IJCT%2015\(5\)%20449-456.pdf](http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/2855/1/IJCT%2015(5)%20449-456.pdf)

Harman, G.; Kubicek, C. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Optimization of the medium for the production of cellulose by the *Trichoderma viride* using submerged fermentation. [version electronica]. International Journal Of Environmental Sciences, 1 (4), 656-665. Disponible en: <http://ipublishing.co.in/jesvol1no12010/EIJES2022.pdf>  
HERMOSA, M.R. 2000. Molecular Characterization and Identification of Biocontrol Isolates of *Trichoderma* spp. Applied and Environmental Microbiology. Vol 66 (5).

Hjeljord; Tronsmo, 1998. Isolation and sequence of an endochitinase-encoding gene from a cDNA library of *Trichoderma harzianum*. Gene 138: 143-148.

Jurado, 2003. Diseño de un Proceso de Aprovechamiento integral de residuos agroindustriales Grupo de Investigación para la utilización de Cascara de Arroz – GICA Universidad Tecnológica Nacional Facultad Regional Concepción del Uruguay Ing. Pereira 676 - (3260) Concepción del Uruguay. Entre Ríos – Argentina.

Krishna, C. 2005. Solid-State Fermentation Systems-An Overview. Critical Reviews in Biotechnology. Vol 25: 1-30.

López, A. 2007. Pruebas de eficiencia in vitro y bajo invernadero de cepas de *Trichoderma* spp., para control de *phytophthora infestans* en el cultivo de papa *solanum tuberosum* para establecer un banco de microorganismos. Tesis de ingeniero agropecuario, ESPE (Ecuador).

Liu, Chun-Zao. 2003. Comparison of various bioreactors on growth and aitemisinin biosynthesis of *Artemisia annua* L. shoot cultures. Process Biochemistry. Vol 39: 45-49.

Méndez, 1995. Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con mango afectados por “Escoba de bruja” y su potencial inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*. Revista Mexicana de Fitopatología 19(2): 154-160.

Montoya, D. 1989. Las fermentaciones como soporte de los procesos biotecnológicos. Instituto de biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. Bogota. Pp. 1-11.

Moore, E. 1996. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo integrado de plagas. Costa rica: Universidad Nacional Agraria de Nicaragua. 63, 95-103. Pág. de Internet:  
<http://web.catie.ac.cr/informacion/Rmip/rev63/pag95-103.pdf>

Pandey, A. 2003. Solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal. Vol 13: 81-84.

Papavizas, G. 1983. Chlamydospore formation by *Trichoderma* spp. In natural substrates. [version electronica]. Journal. Microbial 12, (2), 1-6. Pág. de Internet:

<http://www.ymf.ynu.edu.cn/SCI/2005SCI/2005/Induction%20of%20Chlamydolespores%20in%20Trichoderma%20harzianum%20and%20Gliocladium%20roseum%20by%20Antifungal%20Compounds%20Produced%20by%20Bacillus%20subtilis%20C2.pdf>

Peña, V. 2002. Efecto de diferentes sustratos sobre la producción de conidios de *Trichoderma koningii* en medio sólido. Tesis de pregrado. Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. 153p.

Pinzón, Y. 2001. Diseño de un fermentador para la producción del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* en medio sólido. Tesis de pregrado. Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería. Universidad de América. Pp 51-54.

Rajaratnam, S. 1991. Biological Utilization of Edible Fruiting Fungi. In: Arora, D.; Mukerji, K.; Math, E. (Eds). Handbook of Applied Mycology. Foods and Feeds. Volume 3. Marcel Dekker, Inc. New York. USA.

Rlaimoait, M. 1998. General and Microbiological aspects Solid Substrate Fermentations. Electronic Journal of Biotechnology. Vol. 1 (3): 174-188.

Rodríguez, E. Zuluaga, J. 2005. Effects of pellet morphology on broth rheology in fermentations of *Aspergillus terreus*. Biochemical Engineering Journal. Vol 26: 139-144.

Roma, Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas (Versión Revisada) Adoptado por el 123º periodo de sesiones del Consejo de la FAO, noviembre 2002. Consultada 19-Noviembre-2011. Pág. de Internet: [http://www.chem.unep.ch/DDT/documents/ICOC\\_es1.pdf](http://www.chem.unep.ch/DDT/documents/ICOC_es1.pdf)

Rifai, M. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. Mycological Paper. Bogoriense, Bogor. Java-Indonesia, pp 30-34.

Thomás S. Kuhn. 1962. La estructura de las revoluciones científicas. Editorial de la Universidad de Chicago. Consultada 19-Noviembre-2011. Pág. de Internet: [http://biblioteca.itam.mx/estudios/estudio/estudio02/sec\\_11.html](http://biblioteca.itam.mx/estudios/estudio/estudio02/sec_11.html)

Valencia, N. 2011 Manejo De Residuos En La Agroindustria Seminario Internacional Gestión Integral de Residuos sólidos y peligrosos, siglo XXI. ). Consultada 19-Noviembre-2011. Pág. de Internet: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/acodal/xxx.pdf>

Wakelin, S.A. 1999. Saprophytic growth in soil of a strain of *Trichoderma koningii*. New Zeland Journal of Agricultural Research. Vol 42: 37-345.

Ward, O. 1989. Biotecnología de las fermentaciones. Editorial Acríbia S. A. Zaragoza-España. Pp. 173-185.

Zerega, N. 2005. Systematics and species limits of breadfruit (*Artocarpus*, Moraceae). [version electronica]. Journal Systematic Botany 30, (5), 603-615. Pág. de Internet: <http://www.plantbiology.northwestern.edu/Zerega/Zeregaetal2005SysBot.pdf>

Zeri. 1997. Curso para postgraduados en cero emisiones. Fundación Universitaria de Manizales. Manizales, Colombia. Consultada 19-Noviembre-2011. Pág. de Internet: <http://www.fondoemprender.com/BancoMedios/Documentos%20PDF/separata.pdf>

***ANEXOS***

***ANEXO A.***  
**METODOLOGÍAS**

## Medios de Cultivo

**Tabla A-1. Formulación de los Medios de Cultivo.**

N.	CODIGO	COMPOSICION	PESO (g)	AGUA DESTILADA (ml)
1	<b>a1b1</b>	Cascarilla de arroz	28	18
2	<b>a1b2</b>	Cascarilla de arroz	28	18
3	<b>a2b1</b>	Residuos de papa	56	10
4	<b>a2b2</b>	Residuos de papa	56	10
5	<b>a3b1</b>	50% Cascarilla de arroz 50% Residuos de Papa	16 C. 16P.	15
6	<b>a3b2</b>	50% Cascarilla de arroz 50% Residuos de Papa	16 C. 16P.	15

**Elaborado por:** Silvana Ramírez, 2012

La formulación del medio de cultivo de la Tabla A-1; es para cada una de las 18 botellas en donde se llevó a cabo la experimentación.

### **ANEXO A-2. Formulación de *SOLUCIÓN DE TWEEN 80 AL 0.1%*:**

- De la formulación comercial, se realiza una dilución al 10%. Tomando 10 ml de Tween 80 y agregando 90 ml de agua destilada. Esta solución se puede mantener en stock en refrigeración (10°C).
- Para la preparación del Tween al 0.1%, se tomó 1 ml de la solución al 10% y se agregó 99 ml de agua destilada. Esta solución se esteriliza en el autoclave durante 20 minutos.

# ***ANEXO B.***

**DATOS**

**OBTENIDOS**

### Cuantificación de Biomasa

**Tabla B-1.** Lecturas de Crecimiento de *Trichoderma spp.* Expresado en Conidios/ml.

CRECIMIENTO DE <i>Trichoderma spp.</i>				6 DIAS conidios/ml			8 DIAS conidios/ml			14 DIAS conidios/ml		
N.	CODIGO	COMPOSICION (Factor A)	Temperatura °C (Factor B)	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1	a1b1	Cascarilla de arroz	25	4,70E+06	4,08E+06	2,06E+06	5,10E+06	4,68E+06	3,00E+06	3,74E+09	3,53E+09	3,31E+09
2	a1b2	Cascarilla de arroz	30	7,92E+06	7,00E+06	7,10E+06	8,38E+06	7,48E+06	7,40E+06	5,18E+09	4,92E+09	4,67E+09
3	a2b1	Residuos de papa	25	1,80E+06	2,50E+06	1,40E+06	2,30E+06	3,04E+06	1,84E+06	1,92E+09	1,86E+09	1,48E+09
4	a2b2	Residuos de papa	30	2,10E+06	2,35E+06	3,90E+05	2,93E+06	2,56E+06	1,20E+06	2,10E+09	2,42E+09	1,98E+09
5	a3b1	50% Cascarilla de arroz 50% Residuos de Papa	25	3,72E+06	4,69E+06	1,78E+06	4,25E+06	5,10E+06	2,25E+06	2,48E+09	2,20E+09	2,96E+09
6	a3b2	50% Cascarilla de arroz 50% Residuos de Papa	30	5,65E+06	6,19E+06	5,49E+06	6,18E+06	6,60E+06	5,98E+06	4,82E+09	4,25E+09	4,02E+09

Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Tabla B-2.** Lecturas de Crecimiento de *Trichoderma spp.* Expresado en Conidios/g de sustrato.

CRECIMIENTO DE <i>Trichoderma spp.</i>				6 DIAS conidios/g de sustrato			8 DIAS conidios/g de sustrato			14 DIAS conidios/g de sustrato		
N.	CODIGO	COMPOSICION (Factor A)	Temperatura °C (Factor B)	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1	a1b1	Cascarilla de arroz	25	4,70E+08	4,08E+08	2,06E+08	5,10E+08	4,68E+08	3,00E+08	3,74E+11	3,53E+11	3,31E+11
2	a1b2	Cascarilla de arroz	30	7,92E+08	7,00E+08	7,10E+08	8,38E+08	7,48E+08	7,40E+08	5,18E+11	4,92E+11	4,67E+11
3	a2b1	Residuos de papa	25	1,80E+08	2,50E+08	1,40E+08	2,30E+08	3,04E+08	1,84E+08	1,92E+11	1,86E+11	1,48E+11
4	a2b2	Residuos de papa	30	2,10E+08	2,35E+08	3,90E+07	2,93E+08	2,56E+08	1,20E+08	2,10E+11	2,42E+11	1,98E+11
5	a3b1	50% Cascarilla de arroz 50% Residuos de Papa	25	3,72E+08	4,69E+08	1,78E+08	4,25E+08	5,10E+08	2,25E+08	2,48E+11	2,20E+11	2,96E+11
6	a3b2	50% Cascarilla de arroz 50% Residuos de Papa	30	5,65E+08	6,19E+08	5,49E+08	6,18E+08	6,60E+08	5,98E+08	4,82E+11	4,25E+11	4,02E+11

Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

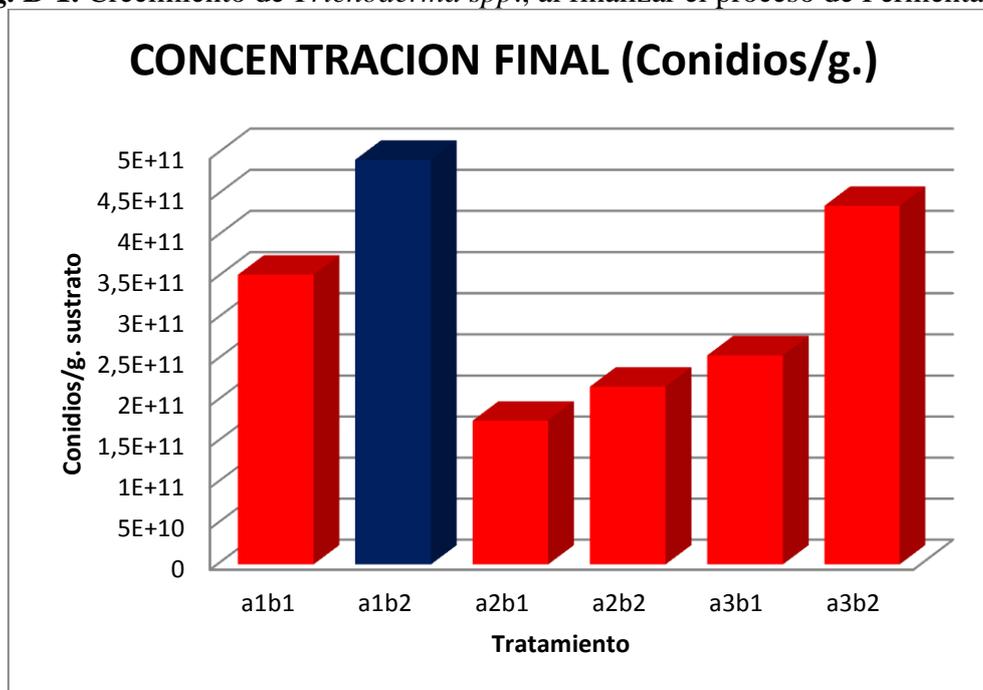
### Crecimiento de *Trichoderma spp.*

**Tabla B-3.** Promedio del Recuento de conidios en las fermentaciones sólidas al cabo de los 14 días de fermentación.

CRECIMIENTO DE <i>Trichoderma spp.</i>				PROMEDIO
N.	CODIGO	COMPOSICION (Factor a)	Temperatura °C (Factor B)	Conidios/g
1	a1b1	Cascarilla de arroz	25	3,52667E+11
2	a1b2	Cascarilla de arroz	30	4,92333E+11
3	a2b1	Residuos de papa	25	1,75333E+11
4	a2b2	Residuos de papa	30	2,16667E+11
5	a3b1	50% Cascarilla de arroz 50% Residuos de Papa	25	2,54667E+11
6	a3b2	50% Cascarilla de arroz 50% Residuos de Papa	30	4,36333E+11

Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Fig. B-1.** Crecimiento de *Trichoderma spp.*, al finalizar el proceso de Fermentación.



Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

# ***ANEXO C.***

## **MODELO CINÉTICO FERMENTACIÓN SÓLIDA**

## ANEXO C

### MODELO CINÉTICO FERMENTACIÓN SÓLIDA

**Exponential model:**  $Y = \exp(a + b \cdot X)$

**Y:** Log concentración de conidios/g

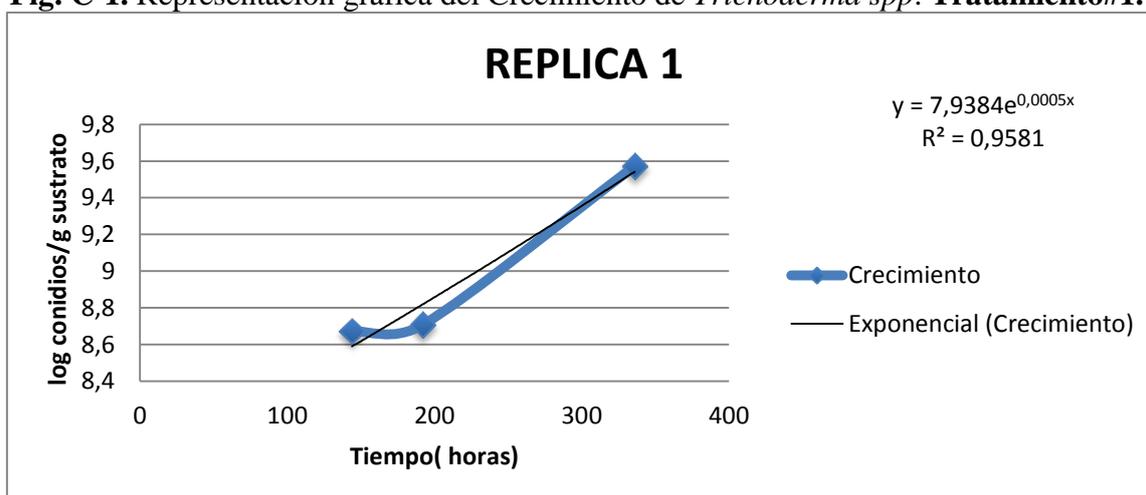
**X:** Tiempo de fermentación (horas)

**Tabla C-1.** Crecimiento de *Trichoderma spp.* Tratamiento#1.

<b>a1b1 Cascarilla de arroz a 25°C</b>			
<b>REPLICA 1</b>			
<b>Tiempo (Días)</b>	<b>Tiempo (h)</b>	<b>Crecimiento(Conidios/g de sustrato)</b>	<b>log (conidios/g de sustrato)</b>
6	144	4,70E+08	8,672097858
8	192	5,10E+08	8,707570176
14	336	3,74E+09	9,572871602

**Elaborado por:** Silvana Ramírez, 2012

**Fig. C-1.** Representación gráfica del Crecimiento de *Trichoderma spp.* Tratamiento#1.



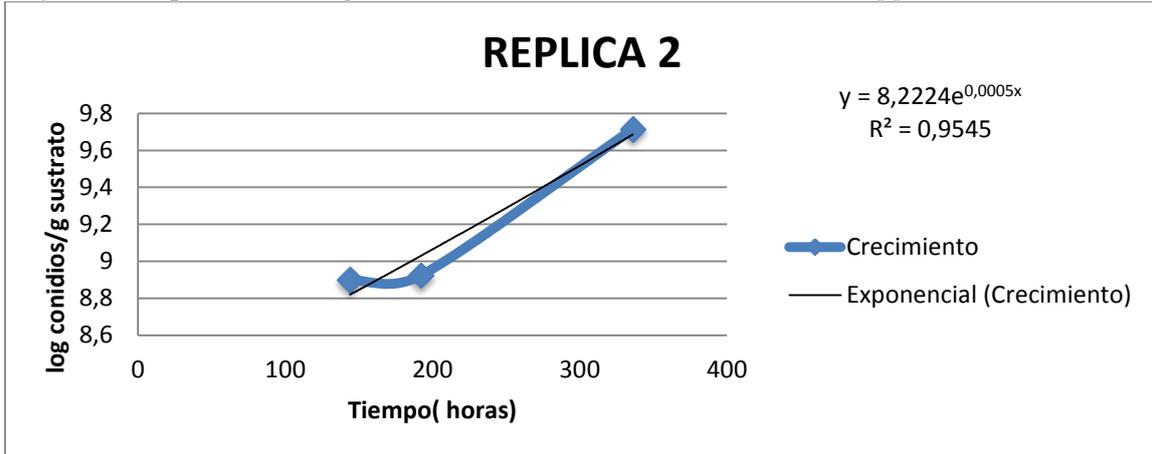
**Elaborado por:** Silvana Ramírez, 2012

**Tabla C-2.** Crecimiento de *Trichoderma spp.* Tratamiento#1.

<b>a1b1 Cascarilla de arroz a 25°C</b>			
<b>REPLICA2</b>			
<b>Tiempo (Días)</b>	<b>Tiempo (h)</b>	<b>Crecimiento(Conidios/g de sustrato)</b>	<b>log (conidios/g de sustrato)</b>
6	144	7,92E+08	8,898725182
8	192	8,38E+08	8,923244019
14	336	5,18E+09	9,71432976

**Elaborado por:** Silvana Ramírez, 2012

**Fig. C-2.** Representación gráfica del Crecimiento de *Trichoderma spp.* **Tratamiento#1.**



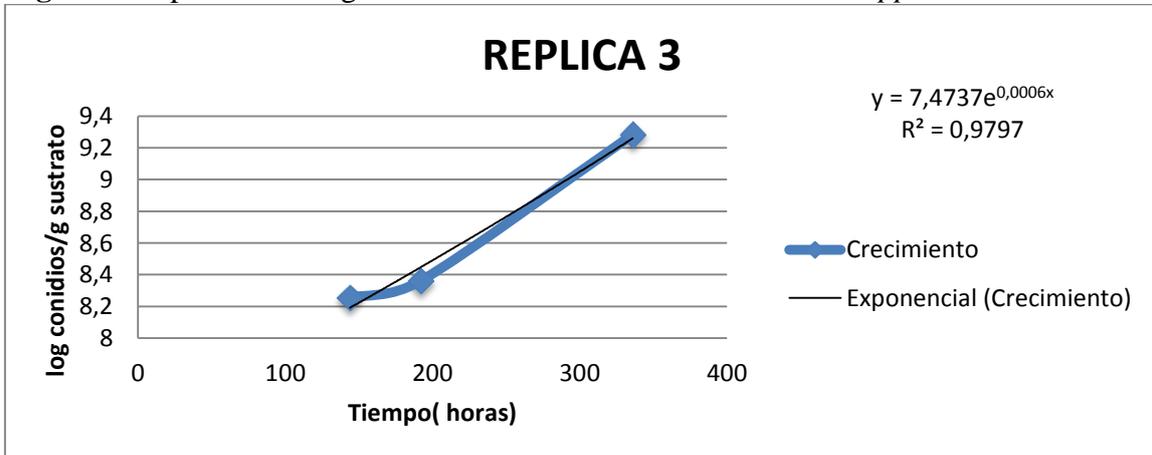
Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Tabla C-3.** Crecimiento de *Trichoderma spp.* **Tratamiento#1.**

a1b1 Cascarilla de arroz a 25°C			
REPLICA 3			
Tiempo (Días)	Tiempo (h)	Crecimiento(Conidios/g de sustrato)	log (conidios/g de sustrato)
6	144	1,80E+08	8,255272505
8	192	2,30E+08	8,361727836
14	336	1,92E+09	9,283301229

Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Fig. C-3.** Representación gráfica del Crecimiento de *Trichoderma spp.* **Tratamiento#1.**



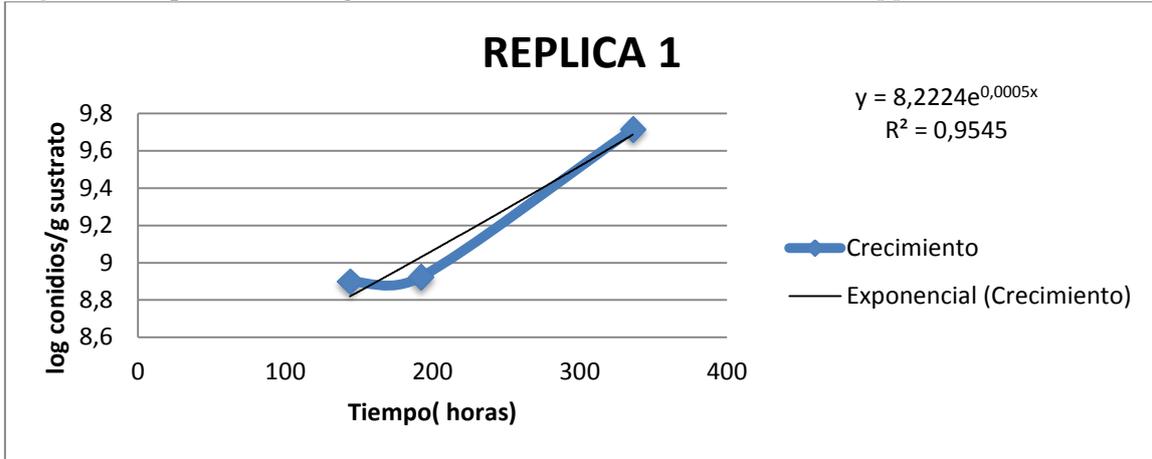
Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Tabla C-4.** Crecimiento de *Trichoderma spp.* **Tratamiento#2.**

a1b2 Cascarilla de arroz a 30°C			
REPLICA 1			
Tiempo (Días)	Tiempo (h)	Crecimiento(Conidios/g de sustrato)	log (conidios/g de sustrato)
6	144	7,92E+08	8,898725182
8	192	8,38E+08	8,923244019
14	336	5,18E+09	9,71432976

Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Fig. C-4.** Representación gráfica del Crecimiento de *Trichoderma spp.* **Tratamiento#2.**



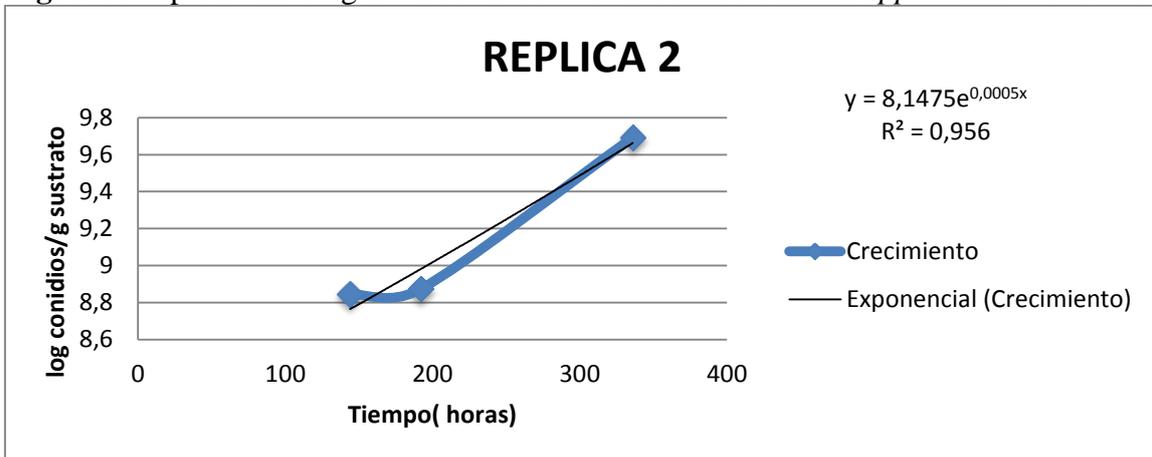
Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Tabla C-5.** Crecimiento de *Trichoderma spp.* **Tratamiento#2.**

a1b2 Cascarilla de arroz a 30°C			
REPLICA2			
Tiempo (Días)	Tiempo (h)	Crecimiento(Conidios/g de sustrato)	log (conidios/g de sustrato)
6	144	7,00E+08	8,84509804
8	192	7,48E+08	8,873901598
14	336	4,92E+09	9,691965103

Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Fig. C-5.** Representación gráfica del Crecimiento de *Trichoderma spp.* **Tratamiento#2.**



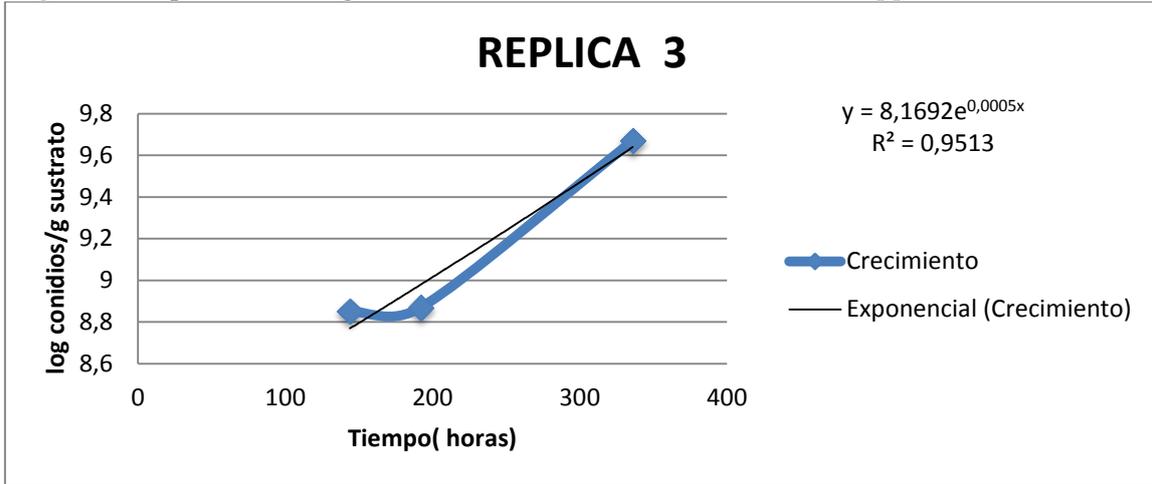
Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Tabla C-6.** Crecimiento de *Trichoderma spp.* **Tratamiento#2.**

a1b2 Cascarilla de arroz a 30°C			
REPLICA 3			
Tiempo (Días)	Tiempo (h)	Crecimiento(Conidios/g de sustrato)	log (conidios/g de sustrato)
6	144	7,10E+08	8,851258349
8	192	7,40E+08	8,86923172
14	336	4,67E+09	9,669316881

Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Fig. C-6.** Representación gráfica del Crecimiento de *Trichoderma spp.* **Tratamiento#2.**



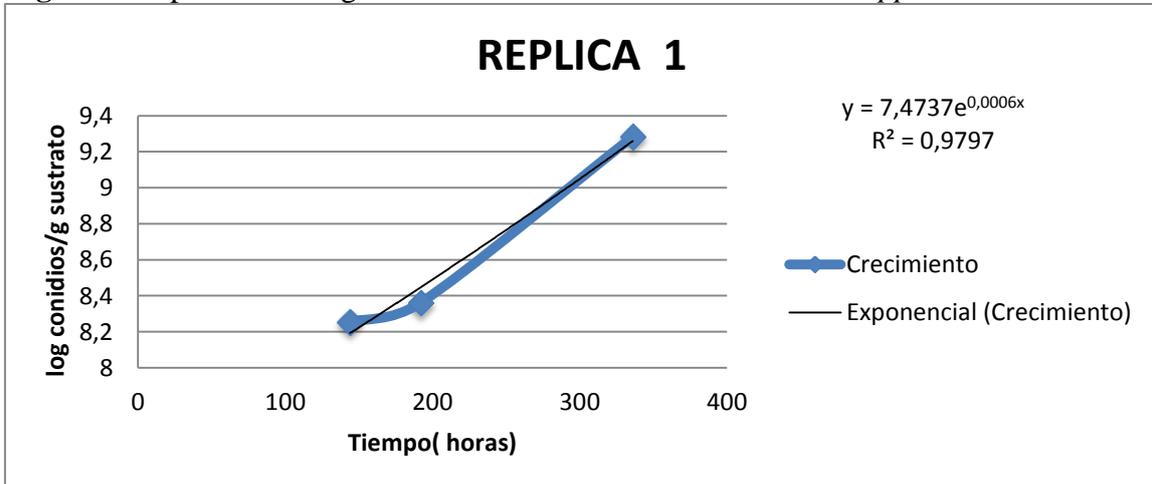
Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Tabla C-7.** Crecimiento de *Trichoderma spp.* **Tratamiento#3.**

a2b1 Residuos de papa a 25°C			
REPLICA 1			
Tiempo (Días)	Tiempo (h)	Crecimiento(Conidios/g de sustrato)	log (conidios/g de sustrato)
6	144	1,80E+08	8,255272505
8	192	2,30E+08	8,361727836
14	336	1,92E+09	9,283301229

Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Fig. C-7.** Representación gráfica del Crecimiento de *Trichoderma spp.* **Tratamiento#3.**



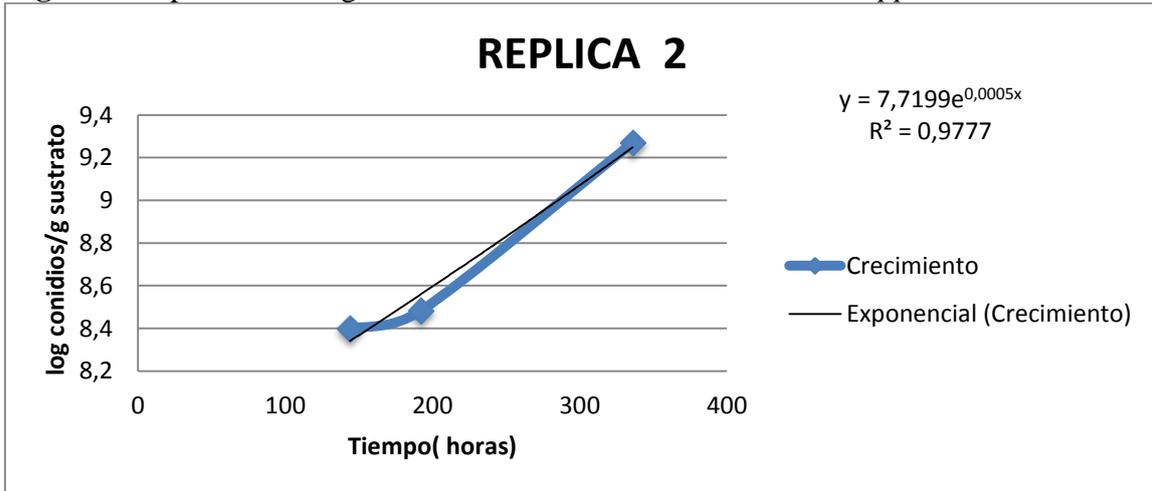
Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Tabla C-8.** Crecimiento de *Trichoderma spp.* **Tratamiento#3.**

a2b1 Residuos de papa a 25°C			
REPLICA2			
Tiempo (Días)	Tiempo (h)	Crecimiento(Conidios/g de sustrato)	log (conidios/g de sustrato)
6	144	2,50E+08	8,397940009
8	192	3,04E+08	8,482873584
14	336	1,86E+09	9,269512944

Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Fig. C-8.** Representación gráfica del Crecimiento de *Trichoderma spp.* **Tratamiento#3.**



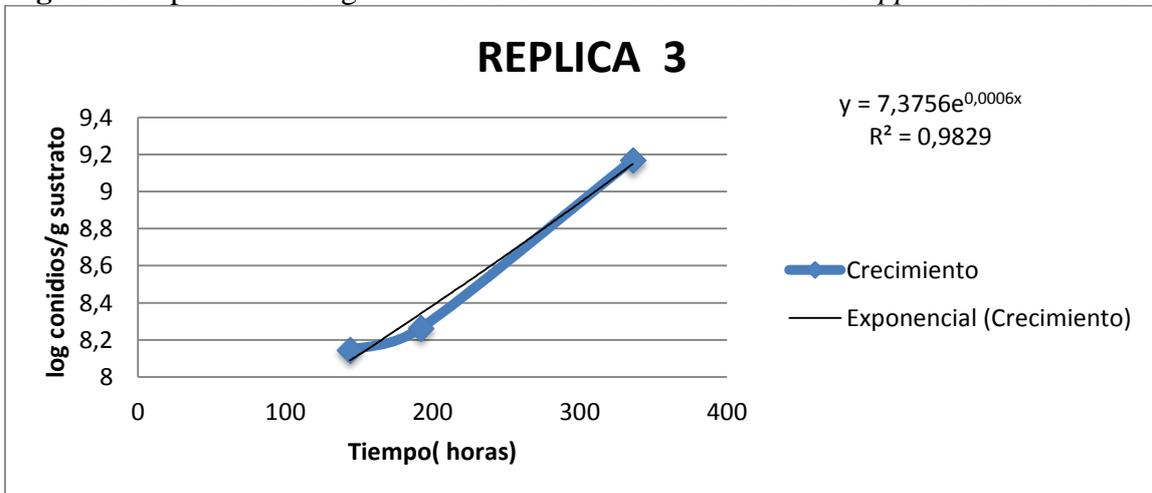
Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Tabla C-9.** Crecimiento de *Trichoderma spp.* **Tratamiento#3.**

a2b1 Residuos de papa a 25°C			
REPLICA 3			
Tiempo (Días)	Tiempo (h)	Crecimiento(Conidios/g de sustrato)	log (conidios/g de sustrato)
6	144	1,40E+08	8,146128036
8	192	1,84E+08	8,264109156
14	336	1,48E+09	9,170261715

Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Fig. C-9.** Representación gráfica del Crecimiento de *Trichoderma spp.* **Tratamiento#3.**



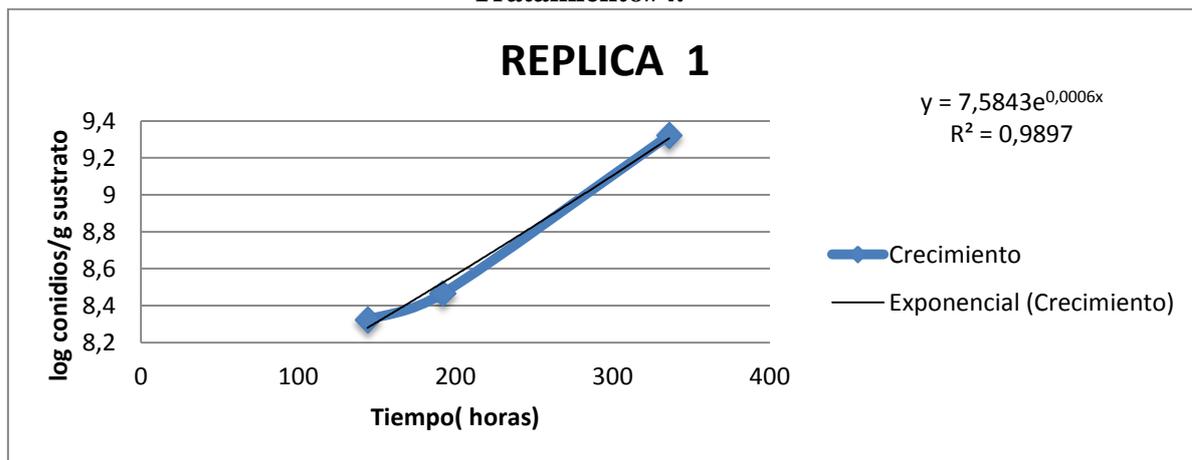
Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Tabla C-10. Crecimiento de *Trichoderma spp.* Tratamiento#4.**

a2b2 Residuos de papa a 30°C			
REPLICA 1			
Tiempo (Días)	Tiempo (h)	Crecimiento(Conidios/g de sustrato)	log (conidios/g de sustrato)
6	144	2,10E+08	8,322219295
8	192	2,93E+08	8,466422722
14	336	2,10E+09	9,322219295

Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Fig. C-10. Representación gráfica del Crecimiento de *Trichoderma spp.* Tratamiento#4.**



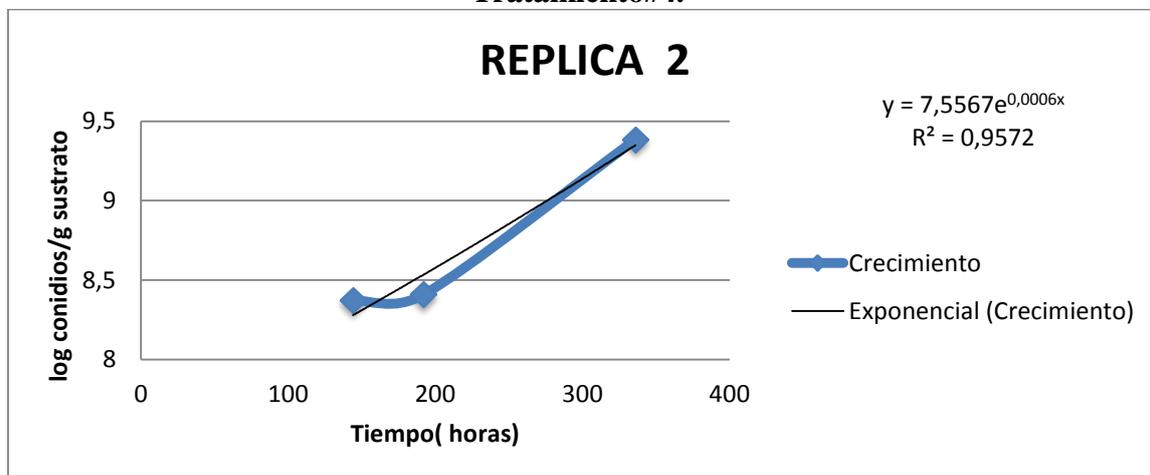
Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Tabla C-11. Crecimiento de *Trichoderma spp.* Tratamiento#4.**

a2b2 Residuos de papa a 30°C			
REPLICA2			
Tiempo (Días)	Tiempo (h)	Crecimiento(Conidios/g de sustrato)	log (conidios/g de sustrato)
6	144	2,35E+08	8,371067862
8	192	2,56E+08	8,408239965
14	336	2,42E+09	9,383815366

Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Fig. C-11. Representación gráfica del Crecimiento de *Trichoderma spp.* Tratamiento#4.**



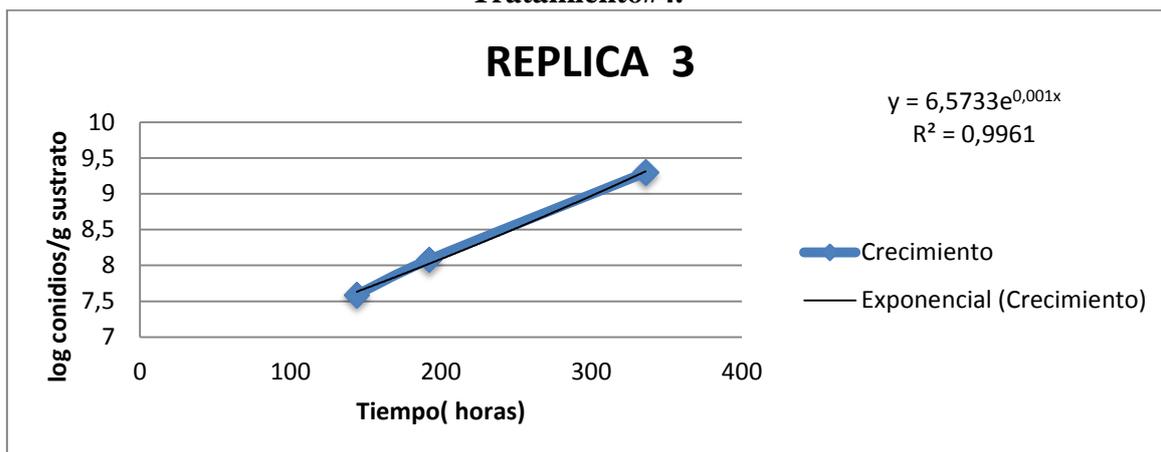
Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Tabla C-12. Crecimiento de *Trichoderma spp.* Tratamiento#4.**

a2b2 Residuos de papa a 30°C			
REPLICA 3			
Tiempo (Días)	Tiempo (h)	Crecimiento(Conidios/g de sustrato)	log (conidios/g de sustrato)
6	144	3,90E+07	7,591064607
8	192	1,20E+08	8,079181246
14	336	1,98E+09	9,29666519

Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Fig. C-12. Representación gráfica del Crecimiento de *Trichoderma spp.* Tratamiento#4.**



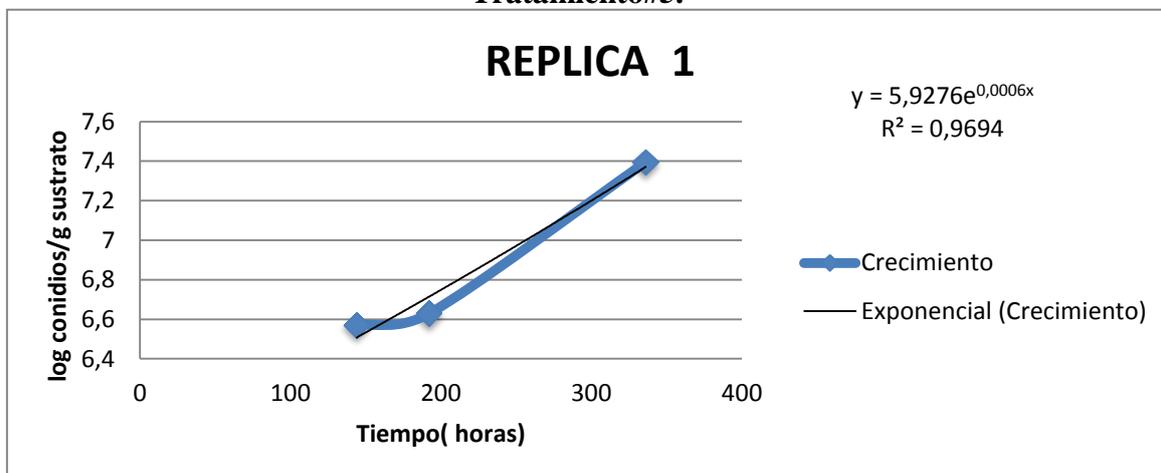
Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Tabla C-13. Crecimiento de *Trichoderma spp.* Tratamiento#5.**

a3b1 Cascarilla y Residuos de papa a25°C			
REPLICA 1			
Tiempo (Días)	Tiempo (h)	Crecimiento(Conidios/g de sustrato)	log (conidios/g de sustrato)
6	144	3,72E+06	6,57054294
8	192	4,25E+06	6,62838893
14	336	2,48E+07	7,394451681

Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Fig. C-13. Representación gráfica del Crecimiento de *Trichoderma spp.* Tratamiento#5.**



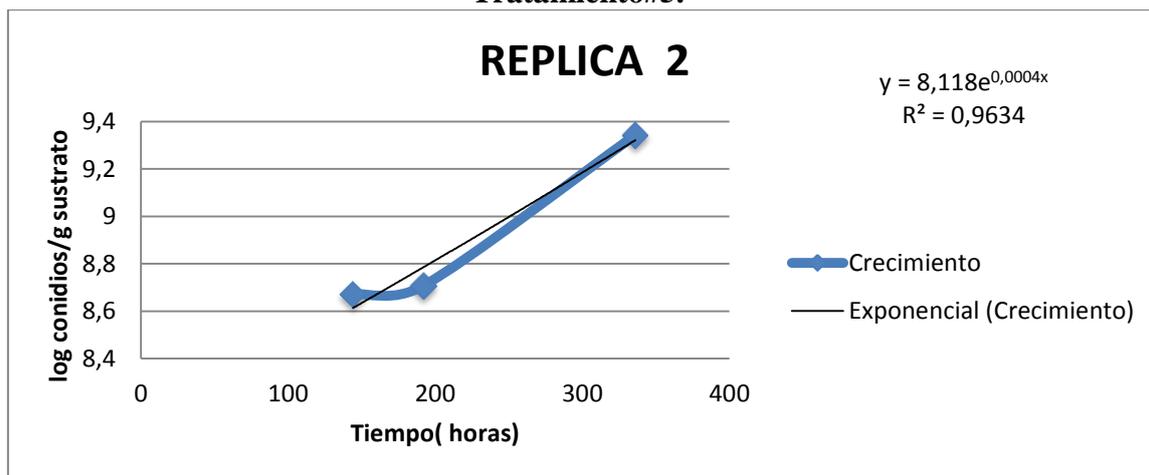
Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Tabla C-14. Crecimiento de *Trichoderma spp.* Tratamiento#5.**

a3b1 Cascarilla y Residuos de papa a25°C			
REPLICA2			
Tiempo (Días)	Tiempo (h)	Crecimiento(Conidios/g de sustrato)	log (conidios/g de sustrato)
6	144	4,69E+08	8,671172843
8	192	5,10E+08	8,707570176
14	336	2,20E+09	9,342422681

Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Fig. C-14. Representación gráfica del Crecimiento de *Trichoderma spp.* Tratamiento#5.**



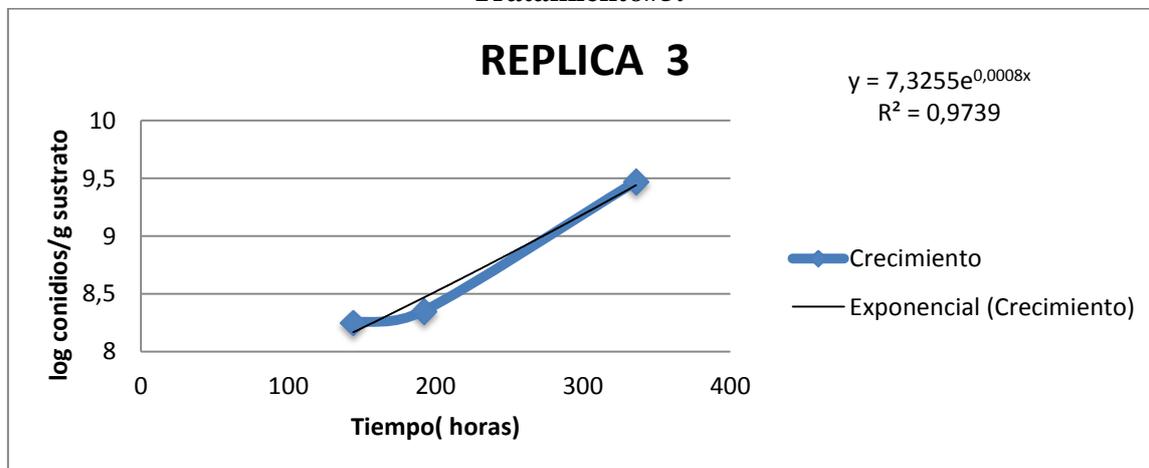
Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Tabla C-15. Crecimiento de *Trichoderma spp.* Tratamiento#5.**

3b1 Cascarilla y Residuos de papa a25°C			
REPLICA 3			
Tiempo (Días)	Tiempo (h)	Crecimiento(Conidios/g de sustrato)	log (conidios/g de sustrato)
6	144	1,78E+08	8,250420002
8	192	2,25E+08	8,352182518
14	336	2,96E+09	9,471291711

Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Fig. C-15. Representación gráfica del Crecimiento de *Trichoderma spp.* Tratamiento#5.**



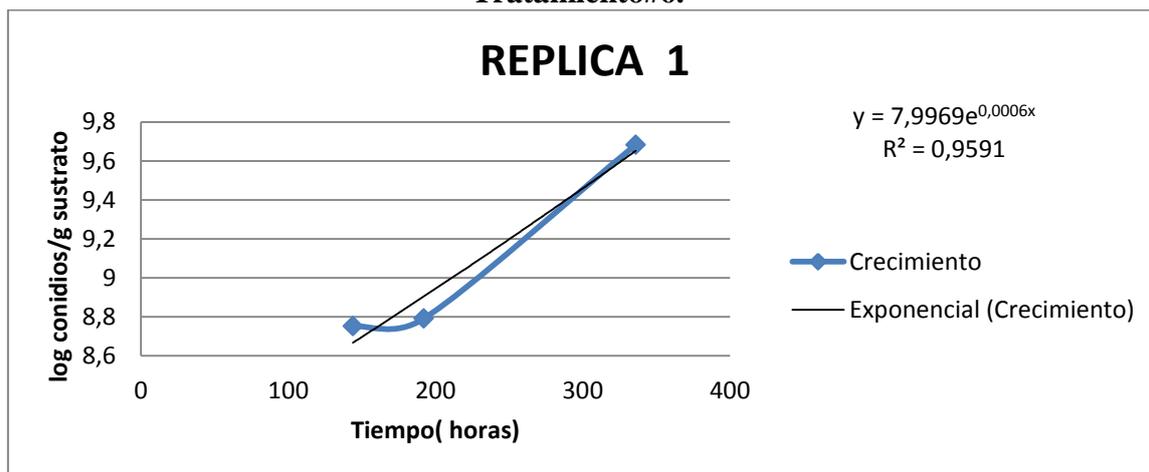
Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Tabla C-16. Crecimiento de *Trichoderma spp.* Tratamiento#6.**

a3b2 Cascarilla y Residuos de papa a 30°C			
REPLICA 1			
Tiempo (Días)	Tiempo (h)	Crecimiento(Conidios/g de sustrato)	log (conidios/g de sustrato)
6	144	5,65E+08	8,752048448
8	192	6,18E+08	8,790988475
14	336	4,82E+09	9,683047038

Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Fig. C-16. Representación gráfica del Crecimiento de *Trichoderma spp.* Tratamiento#6.**



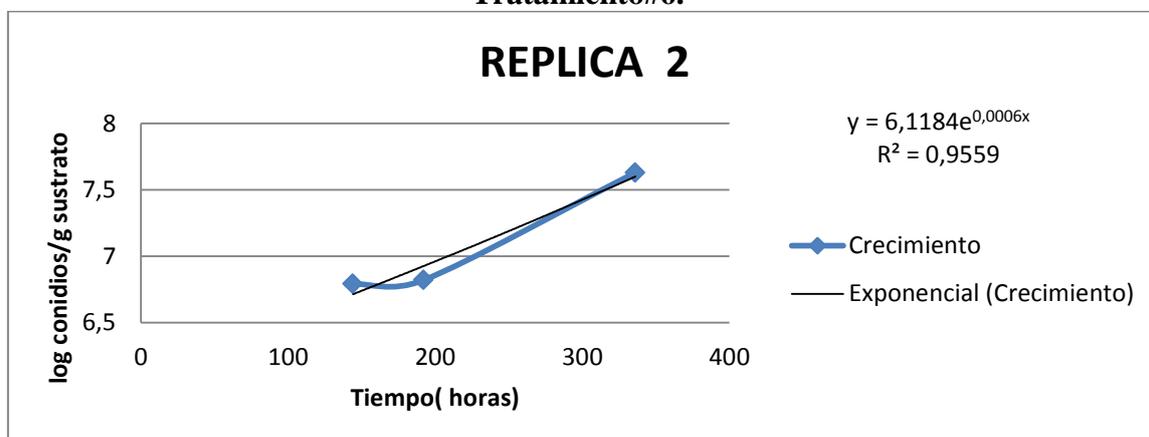
Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Tabla C-17. Crecimiento de *Trichoderma spp.* Tratamiento#6.**

a3b2 Cascarilla y Residuos de papa a 30°C			
REPLICA2			
Tiempo (Días)	Tiempo (h)	Crecimiento(Conidios/g de sustrato)	log (conidios/g de sustrato)
6	144	6,19E+06	6,791690649
8	192	6,60E+06	6,819543936
14	336	4,25E+07	7,62838893

Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Fig. C-17. Representación gráfica del Crecimiento de *Trichoderma spp.* Tratamiento#6.**



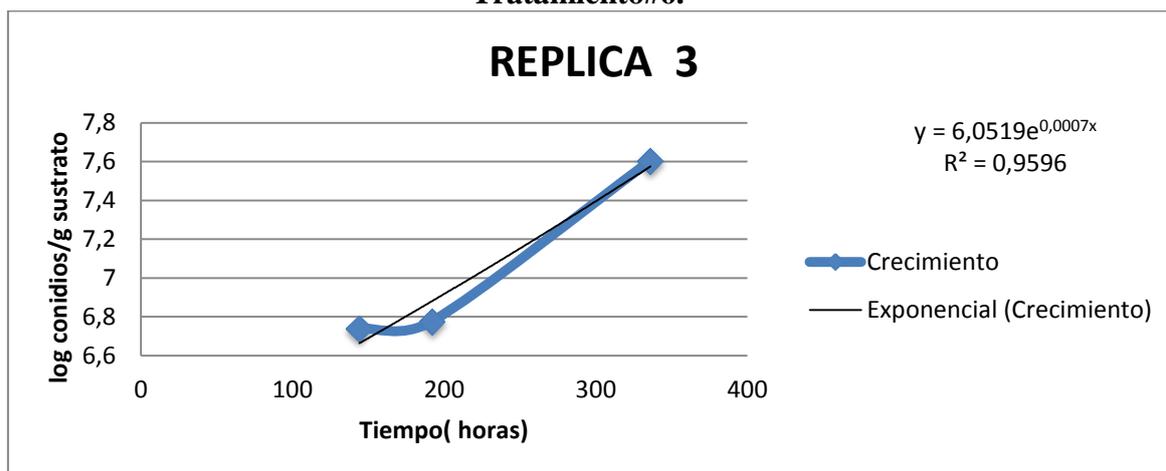
Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Tabla C-18. Crecimiento de *Trichoderma spp.* Tratamiento#6.**

a3b2 Cascarilla y Residuos de papa a 30°C			
REPLICA 3			
Tiempo (Días)	Tiempo (h)	Crecimiento(Conidios/g de sustrato)	log (conidios/g de sustrato)
6	144	5,49E+06	6,739572344
8	192	5,98E+06	6,776701184
14	336	4,02E+07	7,604226053

Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Fig. C-18. Representación gráfica del Crecimiento de *Trichoderma spp.* Tratamiento#6.**



Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Tabla C-19. Coeficientes de Correlación de los Tratamientos al finalizar la fermentación.**

FERMENTACIÓN	REPLICA	R^2
a1b1	R1	0,9581
	R2	0,9545
	R3	0,9797
a1b2	R1	0,9545
	R2	0,956
	R3	0,9513
a2b1	R1	0,9797
	R2	0,9777
	R3	0,9829
a2b2	R1	0,9897
	R2	0,9572
	R3	0,9961
a3b1	R1	0,9694
	R2	0,9634
	R3	0,9739
a3b2	R1	0,9591
	R2	0,9559
	R3	0,9596

Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Tabla C-20.** Comportamiento del hongo *Trichoderma* durante el proceso de Fermentación.

Tiempo (h) / Tratamiento	144	192	336	144	192	336
a1b1	4,81E+08	1,58E+09	3,61E+09	8,68184401	8,88948846	9,55790803
a1b2	7,34E+08	7,75E+08	4,92E+09	8,86569606	9,198107	9,69225924
a2b1	1,90E+08	2,39E+08	1,75E+09	8,2787536	8,37882169	9,24386449
a2b2	1,61E+08	2,23E+08	2,17E+09	8,20772411	8,34811007	9,3357921
a3b1	2,17E+08	2,46E+08	1,73E+09	8,3362729	8,39167008	9,23761075
a3b2	1,92E+08	2,10E+08	1,63E+09	8,28381364	8,32261894	9,21331406

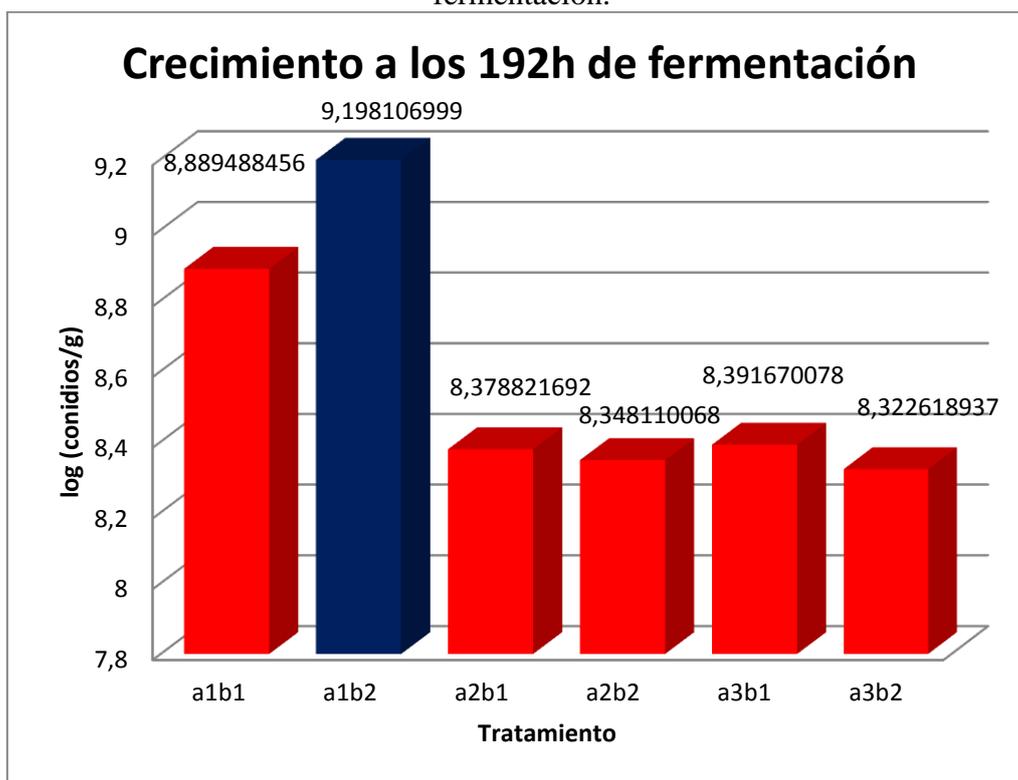
Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Fig. C-19.** Representación gráfica del Crecimiento de *Trichoderma spp.* A los 6 días de fermentación.



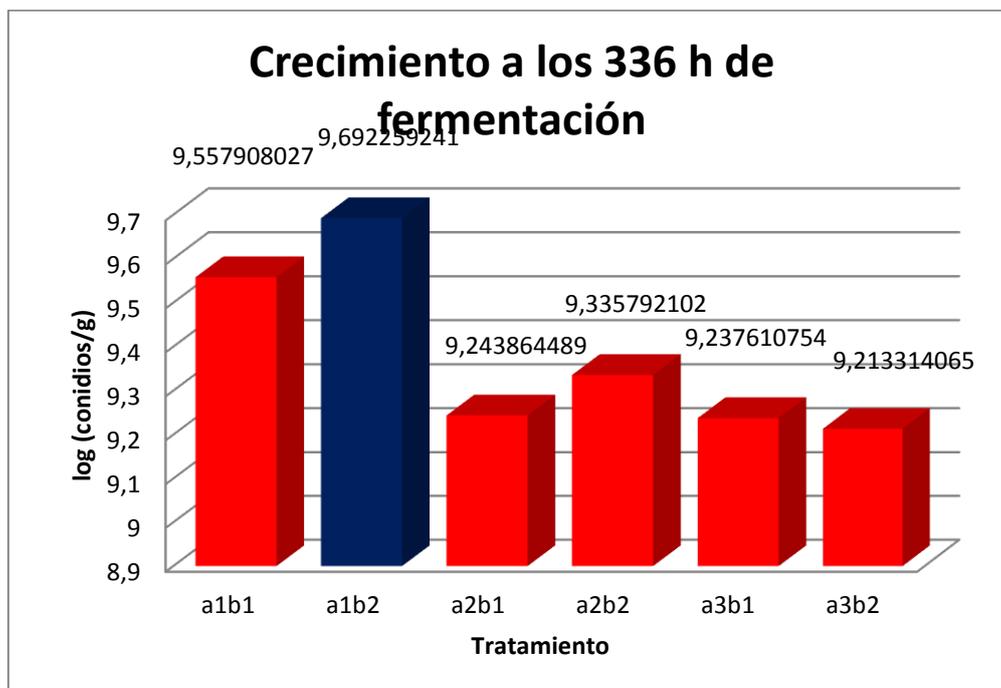
Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Fig. C-20.** Representación gráfica del Crecimiento de *Trichoderma spp.* A los 8 días de fermentación.



Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Fig. C-21.** Representación gráfica del Crecimiento de *Trichoderma spp.* A los 14 días de fermentación.



Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

# ***ANEXO D.***

## **CINETICA DE CRECIMIENTO**

## CINETICA DE CRECIMIENTO

**n**= Número de Generaciones.

**g**= Tiempo de Generación.

**μ**= Velocidad Especifica de Crecimiento

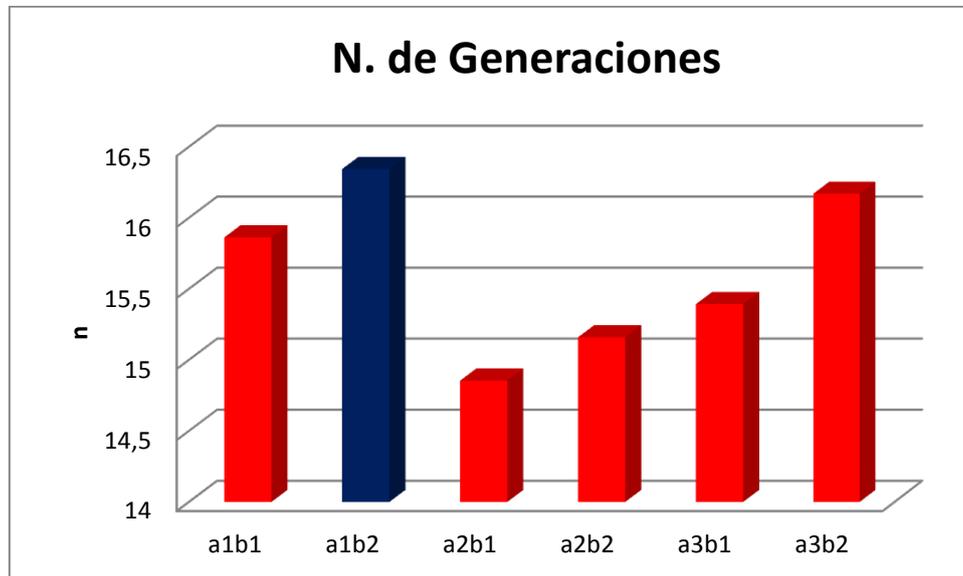
**Tabla D-1.** Cinética de Crecimiento de *Trichoderma spp.*

CRECIMIENTO DE <i>Trichoderma spp.</i>				14 DIAS conidios/g de sustrato			CINETICA DE CRECIMIENTO			
N.	CODIGO	COMPOSICION (Factor A)	Temperatura °C (Factor B)	R1	R2	R3	PROMEDIO	n	g(h <sup>-1</sup> )	μ Conidios (h <sup>-1</sup> )
1	a1b1	Cascarilla de arroz	25	3,74E+11	3,53E+11	3,31E+11	3,52667E+11	15,86234852	9,078101	0,076353765
2	a1b2	Cascarilla de arroz	30	5,18E+11	4,92E+11	4,67E+11	4,92333E+11	16,34367872	8,810746	0,078670658
3	a2b1	Residuos de papa	25	1,92E+11	1,86E+11	1,48E+11	1,75333E+11	14,8541436	9,694265	0,071500748
4	a2b2	Residuos de papa	30	2,10E+11	2,42E+11	1,98E+11	2,16667E+11	15,15952052	9,498981	0,072970687
5	a3b1	50% Cascarilla de arroz 50% Residuos de Papa	25	2,48E+11	2,20E+11	2,96E+11	2,54667E+11	15,39265344	9,355112	0,074092877
6	a3b2	50% Cascarilla de arroz 50% Residuos de Papa	30	4,82E+11	4,25E+11	4,02E+11	4,36333E+11	16,16947399	8,905670	0,07783212

**Elaborado por:** Silvana Ramírez, 2012

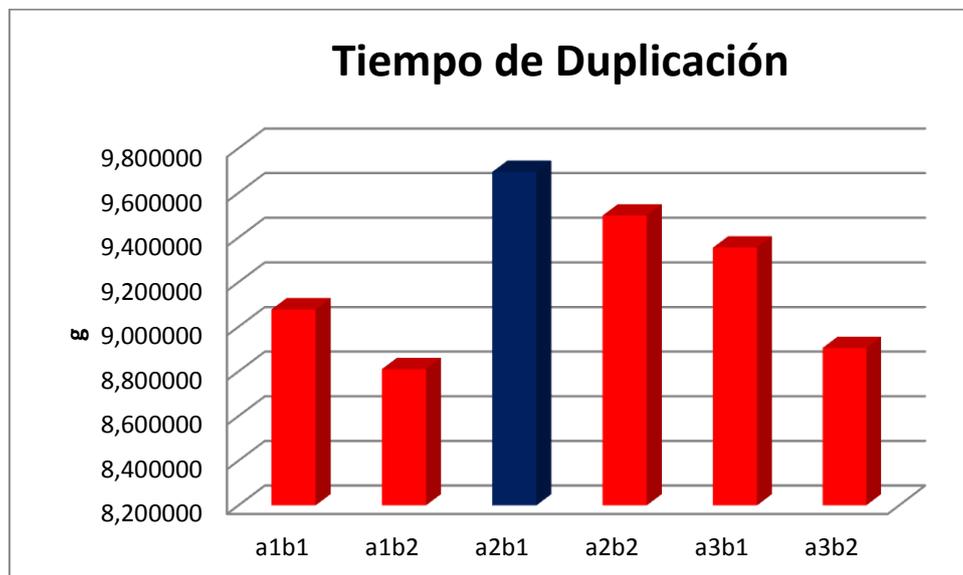
## GRAFICOS DE BARRAS

**Fig. D-1. Número de Generaciones** al colonizar todo el sustrato, en los tratamientos en Estudio.



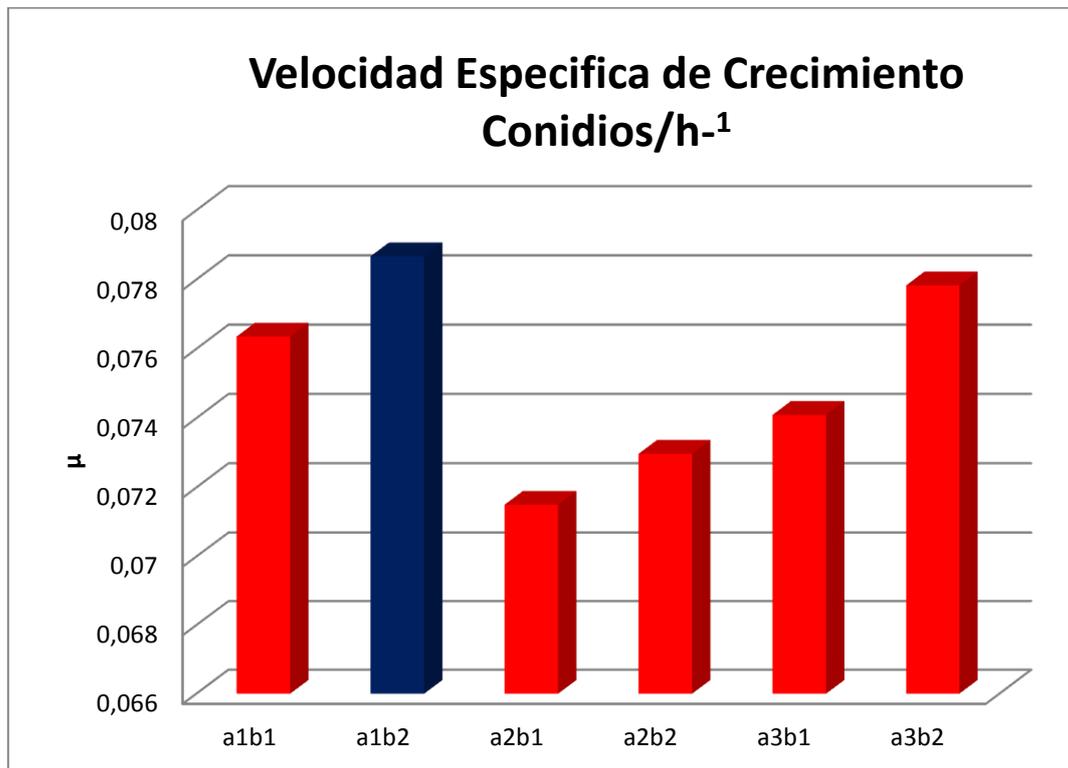
Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Fig. D-2. Tiempo de duplicación** al colonizar todo el sustrato, en los tratamientos en Estudio.



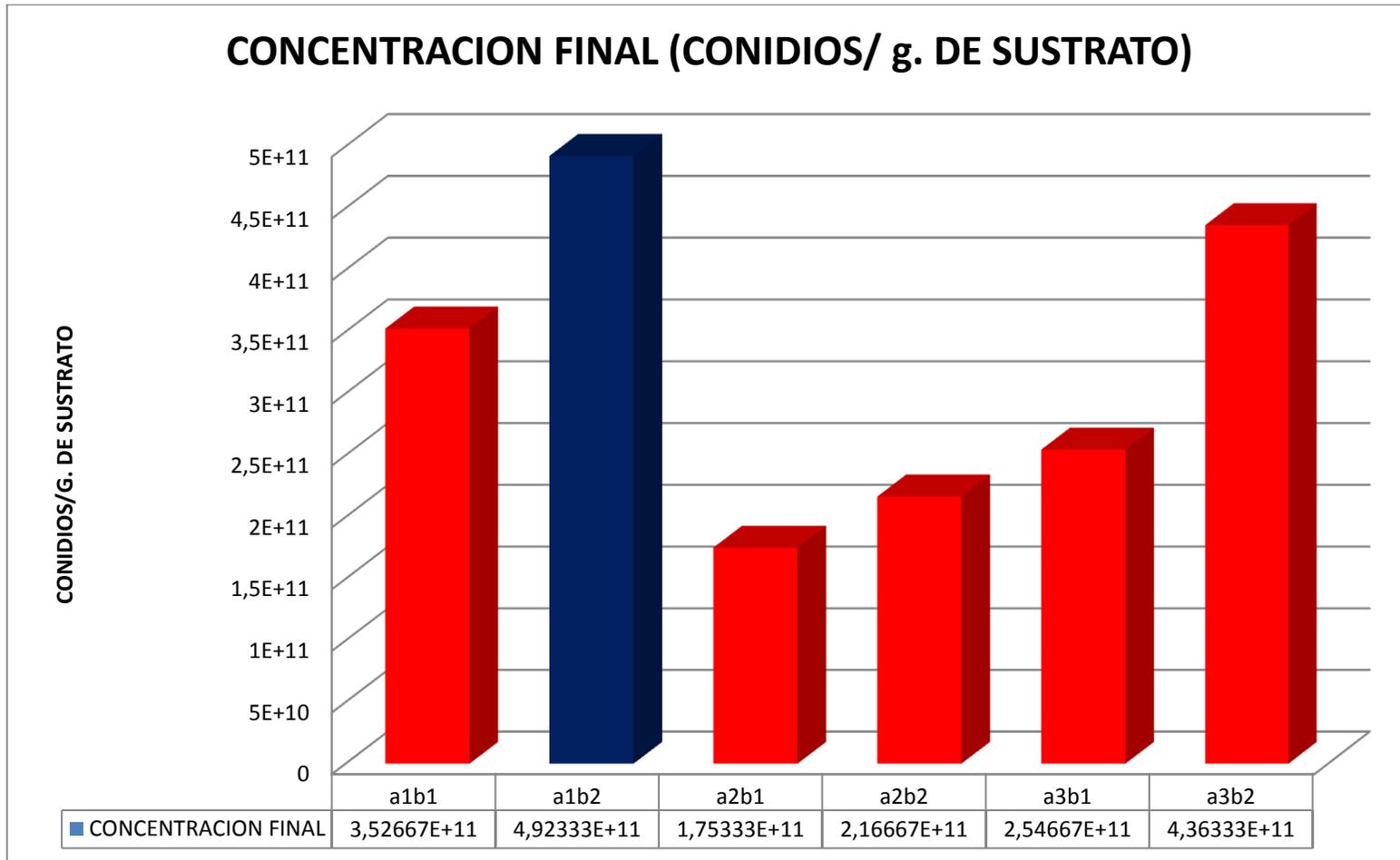
Elaborado por: Silvana Ramírez, 2012

**Fig. D-3. Velocidad Especifica de Crecimiento** al colonizar todo el sustrato, en los tratamientos en Estudio.



**Elaborado por:** Silvana Ramírez, 2012

**Fig. D-4. Concentración final (conidios/ g. de Sustrato) al colonizar todo el sustrato, en los tratamientos en Estudio.**



**Elaborado por:** Silvana Ramírez, 2012

# ***ANEXO E.***

## **CÁLCULOS ESTADÍSTICOS**

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO INFOSTAT (Aplicado a los 14 días de Crecimiento.)**

**Tabla E-1. Análisis de la varianza para la Cuantificación de Biomasa de *Trichoderma spp.***

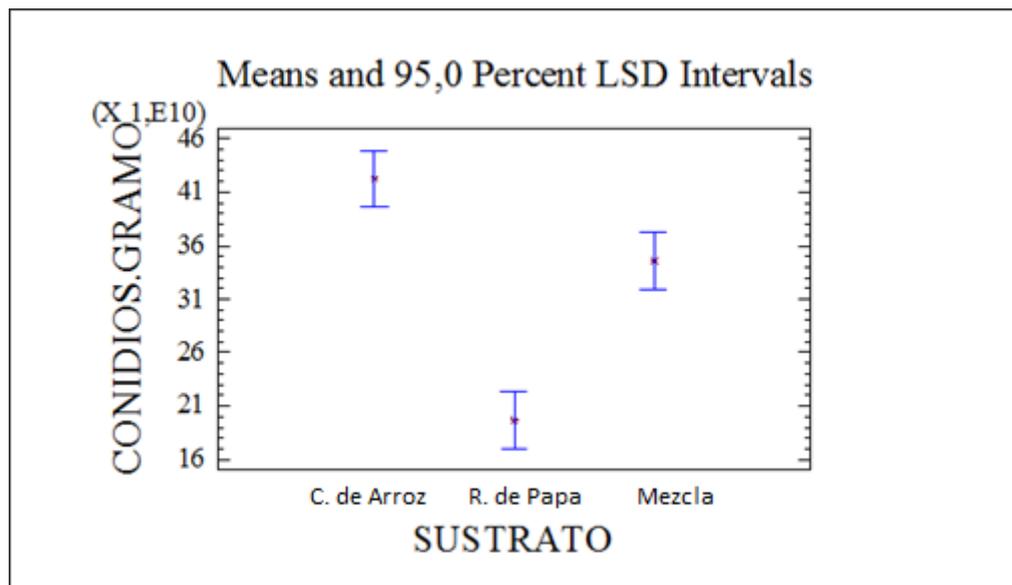
Variable	N	R <sup>2</sup>	CV
Biomasa	18	0,91	13,78

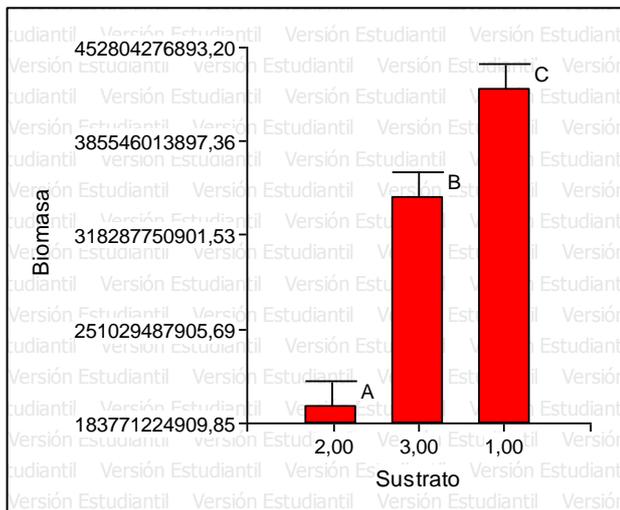
F.V.	SUMA DE CUADRADOS	GL	CM	F	p-valor
Modelo.	2,277 E23	5	4,554 E22	23,23	<0,0001
Réplica	2,785 E21	2	1,392 E21	0,71	0,5110
Sustrato	1,591E23	2	7,958 E22	40,60	<0,0001
Temperatura	6,576 E22	1	6,576 E22	33,55	0,0001
Error	2,352 E22	12	1,960 E21		
Total	2,512 E23	17			

**Tabla E-2. Prueba de Tukey para el Factor A.- Tipo de sustrato.**

Sustrato	Medias (Conidios/g)	n	E.E.	
Cascarilla de arroz	196000000000,00	6	18075501803,05	<b>A</b>
Mezcla dos Sustratos	345500000000,00	6	18075501803,05	<b>B</b>
Residuos de papa	422500000000,00	6	18075501803,05	<b>C</b>



**Fig. E-1. Promedios e Intervalos al 95% de Biomasa (Tipo de Sustrato)**

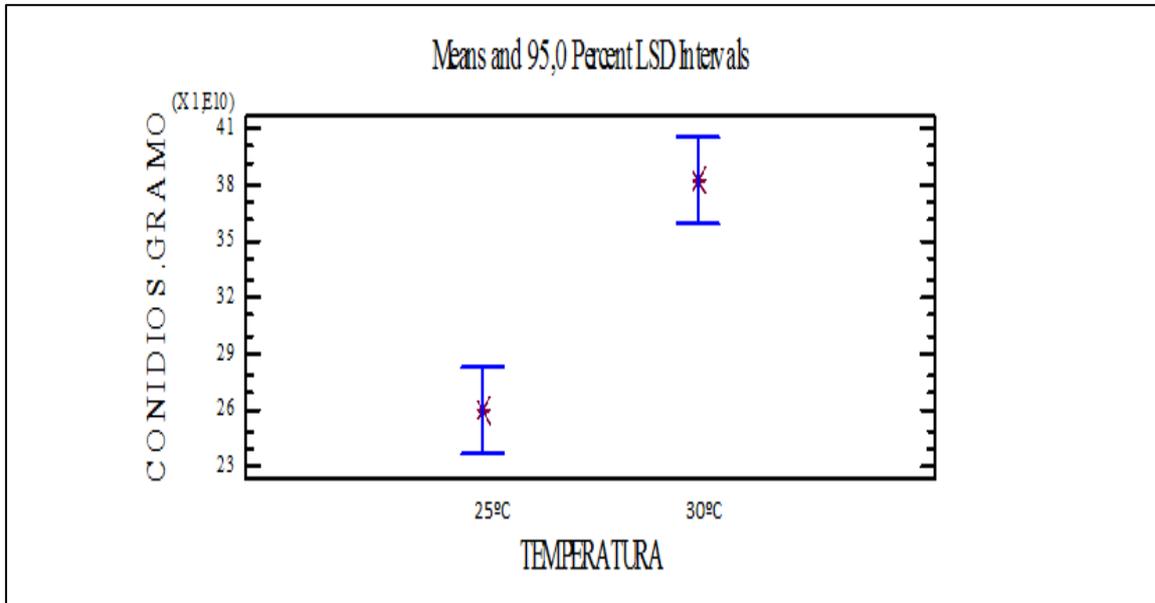


**Fig. E-2. Cuantificación de Biomasa en los Sustratos Empleados.**

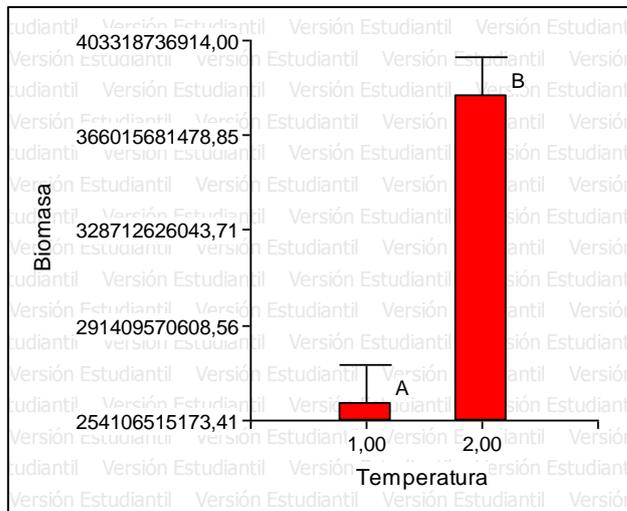
- 1.-Cascarilla de Arroz
- 2.- Residuos de papa.
- 3.- Mezcla

**Tabla E-3. Prueba de Tukey para el Factor B.- Temperatura.**

Temperatura	Medias (Conidios/g)	n	E.E.	
30°C	260888888888,89	9	14758585420,74	A
25°C	381777777777,78	9	14758585420,74	B



**Fig. E-3. Promedios e Intervalos al 95% de Biomasa (Temperatura)**



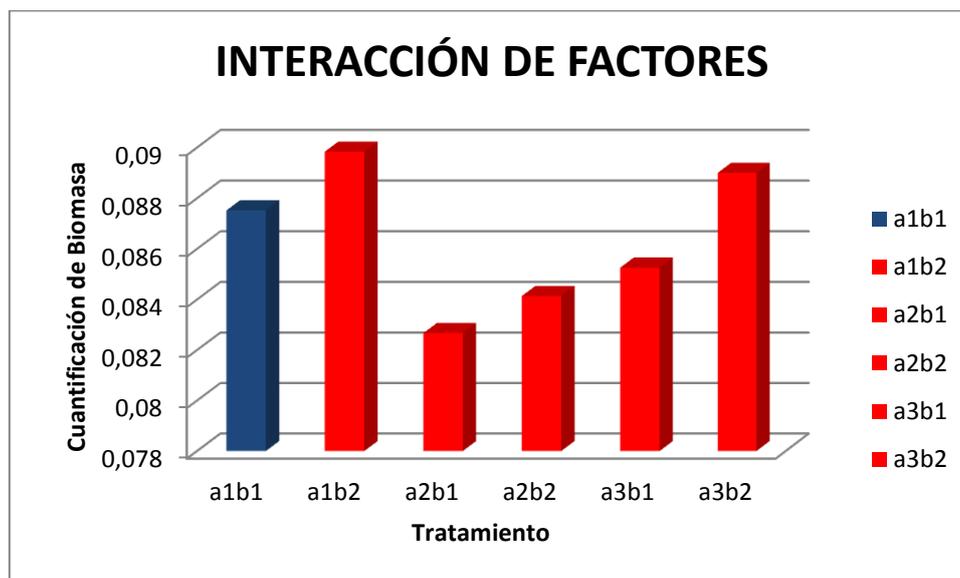
**Fig. E-4. Cuantificación de Biomasa a distintas Temperaturas.**

- 1.-25°C
- 2.-30°C

**Tabla E-4. Prueba de Tukey para la Interacción de Factores.**

Sustrato	Temperatura(°C)	Media Con/ml	n	S.E.	
Cascarilla Arroz	30	492333333333,33	3	17277152543,17	A
Mezcla	30	436333333333,33	3	17277152543,17	A
Cascarilla Arroz	25	352666666666,67	3	17277152543,17	B
Mezcla	25	254666666666,67	3	17277152543,17	C
Residuos Papa	30	216666666666,67	3	17277153543,17	C
Residuos Papa	25	175333333333,67	3	17277152543,17	C

**Fig. E-5.** Representación gráfica de los efectos de las interacciones de los factores evaluados sobre la concentración de biomasa durante la fermentación Solida.



***ANEXO F.***

**FOTOGRAFIAS**

## OBTENCION DEL INOCULO



Fig.2.- Raspado superficial del hongo *Trichoderma spp.*



Fig.3 y 4.- Inoculo del hongo *Trichoderma spp.*

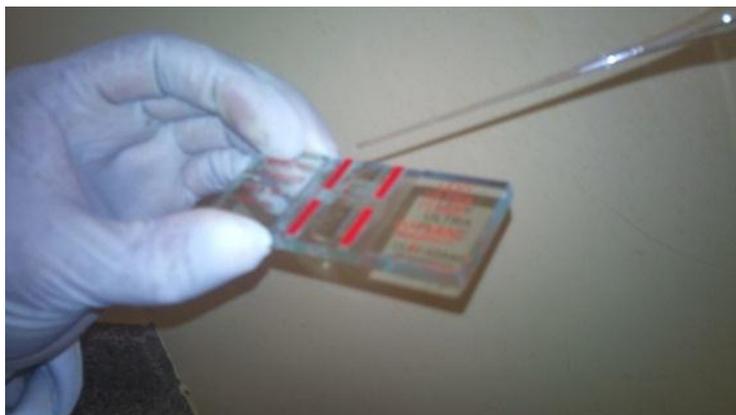
## CUANTIFICACIÓN DE LA BIOMASA



**Fig.5.-** Cámara de Neubauer.



**Fig.6.-** Obtención de la muestra.

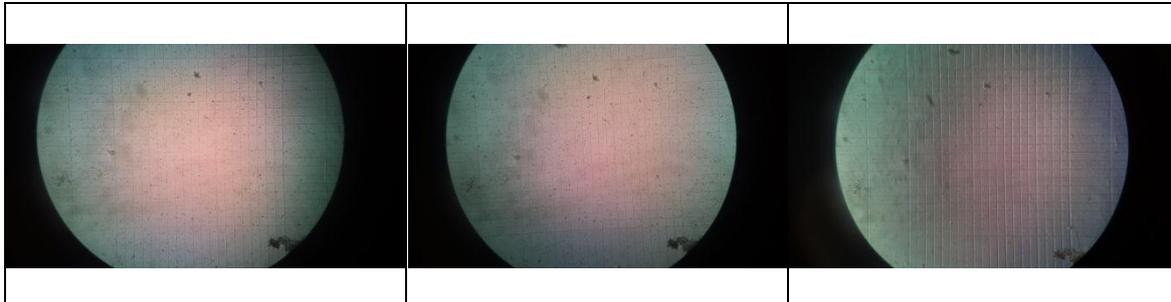


**Fig.7.-** Colocación de la muestra en la Cámara de Neubauer.

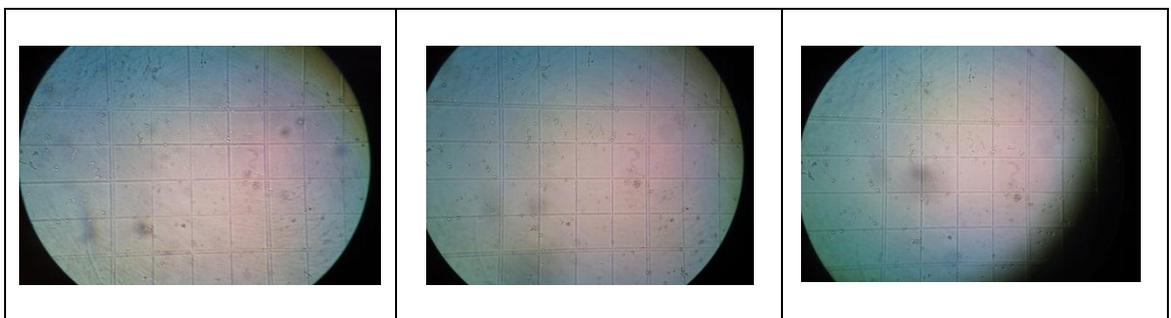


**Fig.8.-** Observación en el Microscopio.

**CONIDIOS OBSERVADOS EN EL LENTE 10x**



**CONIDIOS OBSERVADOS EN EL LENTE 40x**



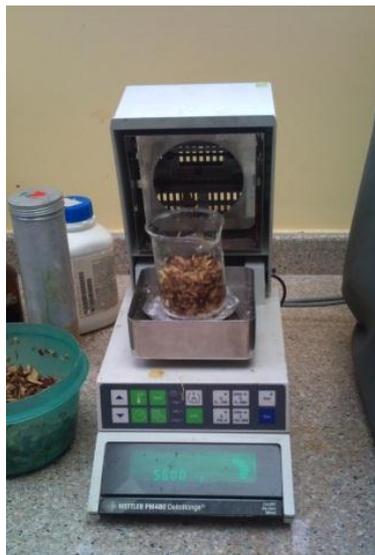
**PREPARACIÓN DEL SUSTRATO SÓLIDO**



**Fig.9.-** Cascarilla de arroz y Residuos de papa.



**Fig.10.-** Pesaje Cascarilla de arroz.



**Fig.11.-** Pesaje Residuos de papa.



**Fig.12.-** Pesaje Residuos de papa y Cascarilla de arroz



**Fig.13.-** Sustratos en botellas de vidrio.



**Fig.14.-** Medición del volumen de agua destilada.



**Fig.15.-** Botellas con medios de cultivo.



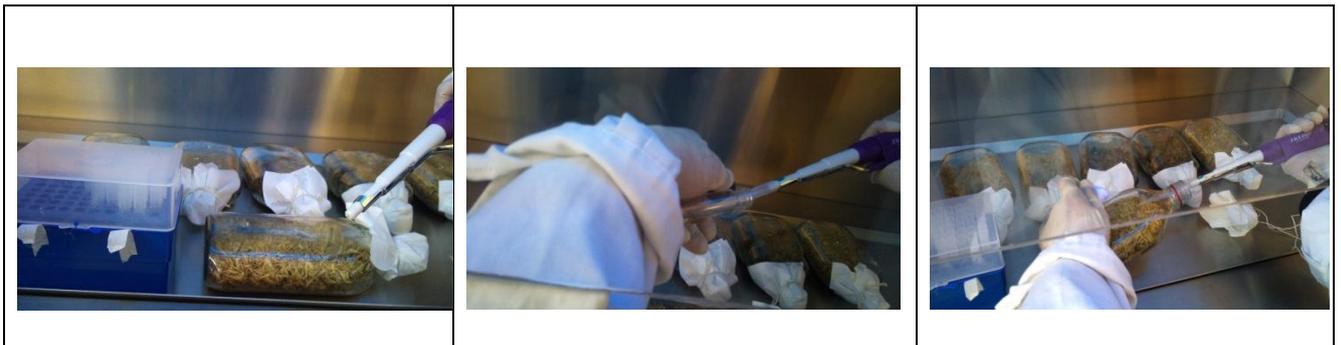
**Fig.16.-** Esterilización.

## *INOCULACIÓN DEL SUSTRATO SÓLIDO*



**Fig.17.-** Medios de Cultivo en Cámara de Flujo Laminar.

## *INOCULACION*



**Fig.12.-** Ajuste de Temperatura en estudio.

<b>Cascarilla de Arroz</b>	<b>Residuos de papa</b>	<b>Mezcla</b>
		
		
		