

## PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *TRICHODERMA HARZIANUM* POR FERMENTACIÓN LÍQUIDA

Rosaima García,<sup>1</sup> María A. Durán<sup>1</sup> y Ramón Riera<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Mérida, Venezuela, AP 25, teléf. 0251-2630090, rgrespo@inia.gov.ve.

<sup>2</sup> Servicio Autónomo de Sanidad Agropecuaria. Mérida, Venezuela

### RESUMEN

Con el objeto de mejorar la eficiencia en la producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai se evaluó la metodología de producción por fermentación líquida estática en forma artesanal. Para ello se utilizó como sustrato melaza de trapiche de caña panelera fresca y levadura panadera granulada (*Saccharomyces cerevisiae*). Se usaron frascos de vidrio transparente de 500 mL donde se colocaron 100 mL de solución de melaza a 5%, se llevó a 200 mL con agua destilada y se ajustó el pH a 5.5. Se esterilizaron en autoclave a 121°C y 15 PSI por 20 min, se dejaron reposar 24 h y luego se agregó 10 g de levadura (5%). Se inoculó con 5 mL de suspensiones de conidios de *Trichoderma harzianum* ( $1 \times 10^{10}$  ufc), se agitaron e incubaron en forma estática inclinada durante 14 días hasta obtener la producción completa de conidios. Se encontró desarrollo de diferentes estructuras o biomasa del hongo (micelio, conidios y clamidosporas) a partir de dos días. La producción de conidios se completó entre 8-14 días, de acuerdo con la cepa  $T_{12} = 1,8 \times 10^9$  ufc,  $T_3 = 5,8 \times 10^8$  ufc, IUTE =  $5,4 \times 10^8$  ufc, Natibiol =  $4,2 \times 10^8$  ufc,  $T_6 = 5,8 \times 10^8$  ufc, Inprodica =  $6,4 \times 10^8$  ufc,  $T_2 = 3,0 \times 10^8$  ufc,  $T_{11} = 2,8 \times 10^8$  ufc,  $T_1 = 2,6 \times 10^8$  ufc y Bioagícola =  $5 \times 10^7$  ufc. Con este proceso se acelera la obtención de inóculo del hongo para el proceso de producción, lo que se logra antes de tres días en relación con la producción normal de conidios por fermentación sólida usados para resuspender y aplicar como inóculo, el cual se alcanza entre seis y siete días.

Palabras claves: biomasa, *Trichoderma*, fermentación líquida

### ABSTRACT

In order to improve the efficiency of *Trichoderma harzianum* massive production a methodology by static liquid fermentation in handmade form was evaluated. French brown sugar loaf cane molasses and granulated Bakery yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) were utilized as substratum. In glass bottles of 500 mL were place 100 mL of 5% molasses solution, it was added distilled water to 200 mL, and pH was adjusted to 5.5. These were sterilized in autoclave at 121°C and 15 PSI for 20 minutes, putting at rest for 24 h and then were added 10 g of yeast (5%). The inoculation was made with 5 mL of *Trichoderma harzianum* conidia suspensions ( $1 \times 10^{10}$  ufc), shaken and incubated in inclined static form during 14 days until getting complete production of conidia. Develop of different structures or fungus biomass (mycelium, conidia and clamidosphora) since two days was found. Conidia production finished between 8 and 14 days, in accordance with strain  $T_{12} = 1.8 \times 10^9$  ufc,  $T_3 = 5.8 \times 10^8$  ufc, IUTE =  $5.4 \times 10^8$  ufc, Natibiol =  $4.2 \times 10^8$  ufc,  $T_6 = 5.8 \times 10^8$  ufc, Inprodica =  $6.4 \times 10^8$  ufc,  $T_2 = 3.0 \times 10^8$  ufc,  $T_{11} = 2.8 \times 10^8$  ufc,  $T_1 = 2.6 \times 10^8$  ufc and Bioagícola =  $5 \times 10^7$  ufc. With this process is speeded up the obtaining of fungus inoculums for the production process, and it is obtained before three days with regard to normal conidia production by solid fermentation used to resuspend and apply as inoculums, which is reached between six and seven days.

Key words: biomass, *Trichoderma*, liquid fermentation

### INTRODUCCIÓN

La versatilidad, adaptabilidad y la fácil manipulación de las especies del hongo *Trichoderma* permite su uso efectivo en el control biológico. *Trichoderma* spp. produce tres tipos de propágulos como son hifas, clamidosporas y conidios, que son activas contra fitopatógenos en diferentes fases del ciclo de vida, desde la germinación de las esporas hasta la esporulación [Fernández-Larrea, 2002].

De acuerdo con Fernández-Larrea (2002) existen diferentes formulaciones de hongos antagonistas, las cuales se usan en dependencia del mecanismo de acción para

uso comercial; pero el material seco es el preferido, debido a que uno de los aspectos más importante en la comercialización es el peso y la manipulación de los productos. Las hifas son poco resistentes al secado, por lo que se trabaja en las formulaciones de las formas reproductoras (conidios y clamidosporas) como polvos humedecibles, polvos secos, formulaciones en aceite y encapsulados que contienen el hongo.

Los conidios son más resistentes que las clamidosporas y se producen en mayor cantidad por diferentes vías: sobre soporte sólido y en cultivos líquidos estáticos y

agitados, aunque más débil debido a que la pared celular es más delgada, de tal manera que son menos resistentes a las condiciones adversas del ambiente, como los rayos ultravioletas del sol y a la tecnología de aplicación, ya que se puede romper más rápidamente y dañarse antes de realizar su efecto de biocontrol.

Sin embargo, la producción de *Trichoderma* líquido representa una alternativa para cuando la demanda es alta, ya que de esta manera se acelera el proceso de producción masiva y se obtiene el producto en un tiempo más corto, con mayor cantidad y variedad de propágulos, lo cual indiscutiblemente aumenta su eficiencia.

Por otro lado, una de las formas de acelerar el proceso de producción es el uso de métodos combinados, es decir, a través de fermentación bifásica, en que se utiliza un proceso de fermentación líquida para la obtención de un buen inóculo que luego se inocula sobre sustratos sólidos.

Estudios realizados por Wei Lin *et al.* (2006) demuestran que en el proceso de fermentación líquida de *T. harzianum* se obtienen sustancias promotoras de crecimiento (ácido indolacético, ácido giberélico, citoquininas y vitaminas), las cuales son una clase de péptido. Cuando aplicaron *T. harzianum* sobre la rizósfera de plantas inoculadas con bacterias fijadoras de nitrógeno se logró un aumento del tamaño de los nódulos radiculares y se produjo un incremento en la eficiencia de la fijación de nitrógeno.

El método más comúnmente utilizado en Venezuela para la producción masiva del hongo *Trichoderma* es por fermentación sólida monobásica, con el uso de sustrato alimenticio sólido tanto para la producción de inóculo como para la obtención final del biopreparado. En otros casos se obtienen formulaciones líquidas por resuspensión de los conidios proveniente de una fermentación sólida [Zambrano, 2005].

El presente trabajo tuvo por objetivo evaluar la metodología de producción líquida estática en forma artesanal mediante el uso de melaza de caña panelera, obtenida en la zona (estado de Mérida), más levadura panadera como sustrato alimenticio líquido para la obtención del inóculo del hongo *T. harzianum*, a fin de mejorar la eficiencia en tiempo y producción de biomasa dentro del proceso de producción masiva.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 10 cepas de *T. harzianum* pertenecientes a la Colección de Hongos Antagonistas del Laboratorio

de Fitopatología del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas del estado de Mérida (INIA-Mérida).

Para iniciar el trabajo se hizo una reactivación de las cepas; se sembró por duplicado en el medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) y se incubaron a 27°C de tres a cinco días. Las cepas de *T. harzianum* utilizadas fueron siete no comerciales ( $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_3$ ,  $T_8$ ,  $T_{11}$ ,  $T_{12}$ , IUTE) y tres comerciales (Natibiol, Inprodica y Bioagrícola). La producción del inóculo del hongo en forma líquida se realizó a partir de una solución de 100 mL de melaza a 5%, que se aforó a 2000 mL con agua destilada, y se ajustó a pH 5,5. La solución se dispensó en frascos de vidrio de 500 mL, en una cantidad de 200 mL por frasco y se esterilizó en autoclave a 121°C y 15 PSI por 20 min, se dejaron reposar 24 h y entonces se le añadió 5% de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) en forma aséptica bajo la cámara de flujo laminar.

La producción del hongo en forma líquida se llevó a cabo a partir de una solución de 100 mL de melaza de trapiche de caña panelera fresca a 5% que se diluyó a 2000 mL de agua destilada y se ajustó el pH a 5,5. La solución se dispensó en frascos de vidrio de 500 mL, a razón de 200 mL por frasco, se esterilizó en autoclave a 121°C, 15 PSI por 20 min y se dejaron reposar 24 h; luego se le añadió 5% de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) en forma aséptica bajo la cámara de flujo laminar.

A las placas de Petri con los cultivos de *Trichoderma* se les agregaron 10 mL de agua destilada estéril, se agitó un poco, se tomaron 5 mL de suspensiones de conidios de cada cepa ( $1 \times 10^{10}$  ufc) y se inoculó en cada frasco que contenía la solución de melaza más levadura.

Una vez inoculados los frascos con la melaza se taparon con algodón y papel aluminio, y sellaron con parafilm para proporcionarles condiciones asépticas. Se sometieron a agitación y se incubaron en forma estática inclinada durante 14 días hasta obtener la producción completa de conidios. Cada tratamiento se repitió diez veces. Las observaciones se hicieron todos los días para detectar tipo de estructuras producidas y luego medir las cantidades.

La determinación de la concentración de conidios por mililitros se realizó en cámara de Neubauer por medio del microscopio óptico y un objetivo de 40X, en una dilución de  $10^2$ , y se calculó por la fórmula [Lecuona, 1996]:

Concentración (ufc.mL = Número de conidios  $\times 4 \times 10^6 \times$  dilución)

Se realizaron observaciones directas al microscopio óptico de muestras tomadas a las 24 h de incubación de

las siembras realizadas en placas con PDA para descartar las posibles contaminaciones. Los datos sobre concentración de conidios se analizaron a través del programa Estadística 6.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la *Tabla 1* se observan los resultados sobre producción de biomasa de *Trichoderma* bajo fermentación líquida. Se encontró que todas las cepas lograron producir biomasa del hongo a partir de dos días. La producción de conidios se alcanzó entre 8-14 días. Hubo alta producción de micelios y clamidosporas, y además se encontró una alta concentración de conidios que varió desde  $5,7 \times 10^7$  en la cepa comercial Bioagrícola hasta  $1,81 \times 10^9$  ufc/mL. Se obtuvieron diferencias significativas entre las cepas en cuanto a producción de conidios. También se observaron diferencias en forma cualitativas en cuanto a la producción de micelios y clamidosporas.

De acuerdo con la prueba de medias de LDS a 5%, todas las cepas tuvieron diferentes comportamientos en cuanto a producción de conidios. La que presentó mejor producción fue  $T_{12}$ , seguida de la comercial Inprodica,  $T_8$  y IUTE. Se encontraron también diferencias signi-

ficativas en el tiempo necesario para la obtención final de conidios. Estas mismas cepas alcanzaron la producción en solo ocho días, que fue la más rápida, seguidas de  $T_8$ ,  $T_2$  y  $T_3$  que lo lograron en diez. Las demás necesitaron entre 12 y 14 días.

Lo anterior indica que existe una alta variación en cuanto a la obtención final de estructuras reproductivas de *Trichoderma* cuando se usa medio líquido, y que ello está estrechamente relacionado con el comportamiento de la cepa a pesar de que todas son *T. harzianum*.

Trabajos similares se han realizado en Cuba para la obtención de *Trichoderma* por fermentación líquida con el uso de melaza de caña de azúcar y levadura torula, y se logró producir una concentración de  $2-3 \times 10^8$  conid./mL [Fernández-Larrea, 2002; Fernández-Larrea *et al.*, 1992; Stefanova *et al.*, 1999].

Asimismo Prakash y Lumsden (2006), con el objeto de obtener un preinóculo líquido de especies de *Trichoderma* utilizaron 0,3 g melaza y 0,05 g extracto de levadura en 100 mL de agua, y lograron una producción de  $10^3-10^8$  ufc. En tanto, en el proceso de producción de biomasa, cuando utilizaron 2,5 g de extracto de levadura y 500 mL de melaza en 1 L de agua, lograron una producción de  $10^6$  a  $10^7$  clamidosporas/mL.

**Tabla 1. Producción de biomasa y conidios de diferentes cepas de *T. harzianum* bajo fermentación líquida**

Cepas	Producción de micelios	Tiempo (días)	Producción de clamidosporas	Tiempo (días)	Producción de conidios	Tiempo (días)
$T_{12}$	+++	2	++	7	$1,81 \times 10^9$ a	8
Cepa comercial Inprodica	+	2	+	8	$6,4 \times 10^8$ b	12
$T_3$	++	2	++	8	$5,8 \times 10^8$ c	10
$T_8$	+++	2	++	8	$5,8 \times 10^8$ c	10
IUTE	++	2	++	8	$5,4 \times 10^8$ d	8
Cepa comercial Biográfica	++	3	+	8	$5,0 \times 10^7$ e	14
Cepa comercial Natibiol	++	3	++	8	$4,2 \times 10^8$ f	14
$T_2$	+++	2	+	9	$3,0 \times 10^8$ g	10
$T_{11}$	++	2	+	9	$2,8 \times 10^8$ h	14
$T_1$	++	2	+	10	$2,6 \times 10^8$ i	14
CV					4,4%	
Sx					0,378	

Letras distintas son diferentes en la prueba de LSD con probabilidad menor o igual a 5%.

## CONCLUSIONES

- La producción de biomasa del hongo *T. harzianum* a través del proceso de fermentación líquida es variable, depende del comportamiento de la cepa, por lo que se requiere realizar pruebas preliminares antes de aplicar este método para reproducción de una cepa en forma masiva.
- La melaza de trapiche panelera fresca y levadura de cerveza, probada por primera vez en Venezuela como suplementos nutricionales de *T. harzianum* para la obtención de biomasa por fermentación líquida, resultó exitosa. Se desarrollaron estructuras reproductivas del hongo: micelio, clamidosporas y conidios. Se requiere validar el método a mayor escala.
- Debido a la alta cantidad de estructuras reproductivas obtenidas por este método de fermentación líquida, se puede recomendar su utilización en la fase de preparación de inóculo dentro del proceso de producción para agilizarlo, así como para la producción final de propágulos a utilizar en campo para el biocontrol de enfermedades de plantas.

## REFERENCIAS

- Fernández-Larrea, O.; A. Calderón; M. Fraga: «Metodología de reproducción de cepas de *Trichoderma* spp. para el biocontrol de hongos fitopatógenos». Informe Técnico de Investigación, INISAV, 1992.
- Fernández-Larrea, O.: «Control biológico de enfermedades de plantas», *Control Biológico de Plagas Agrícolas*, Managua, Serie Técnica CATIE no. 53, 2002, pp. 160-184.
- Lecuona, R.: *Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga*, Talleres Gráficos Mariano MAS, Buenos Aires, 1996.
- Prakash Hebbar, K.; D. R. D. Lumsden: «Formulation and Fermentation of Biocontrol Agents of Cacao Fungal Pathogens: Example of *Trichoderma* Species», <http://www.cabi-commodities.org/Acc/ACCrc/PDFFiles/W-BPD/Ch7.pdf>. Revisado en marzo del 2006.
- Stefanova, M.; A. Leiva; L. Larrinaga; M. F. Coronado: «Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo», *Rev. Fac. Agron. (Luz)* 16:509-516, 1999,
- Wei Lin, Liang Zhi-Huai; Zhang, Zhi-Guang; Luo, He-Rong: «Effects of Peptide in the Fermentation Liquid of *Trichoderma harzianum* on Nodule Microstructure and Function of Cowpea», *Acta Laser Biology Sinica* 1-1, 2006.
- Zambrano, C.: «Historia y experiencias del control biológico en Venezuela». Memorias del Curso-Taller Control Biológico: Herramienta Básica en Una Agricultura Sostenible, Trujillo, 29 y 30 de septiembre del 2005.