

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



OBTENCIÓN DE ESPORAS DE *Trichoderma spp.* A PARTIR DE SUBPRODUCTO DE *Oryza sativa* (ARROZ), MEDIANTE OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS DE PRODUCCIÓN Y SU EVALUACIÓN DE ACCIÓN ANTAGÓNICA CONTRA *Fusarium spp.*

Tesis presentada por el Bachiller:

Vera Gutiérrez, Mishell Milagros

Para optar por el Título profesional de

Ingeniera Biotecnóloga

Asesora:

Ing. Manrique Pino, Pamela Lizeth

AREQUIPA – PERÚ

2019

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°.20180000028606

N° Trámite en Fac. **389-2018**

Fecha Recep. Fac. **26-06-2018**

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: **VERA GUTIERREZ, Mishell Milagros**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

"DESARROLLO DE UNA METODOLOGIA PARA LA OBTENCION DE ESPORAS DE Trichoderma spp. A PARTIR DE UN SUB PRODUCTO DE Sativa oryzae, MEDIANTE OPTIMIZACION DE PARAMETROS DE PRODUCCION FISICOQUIMICOS"

DICTAMINADORES: **Ing. Cinthia Córdova Barrios 2) Dr. Fredy Molina Rodríguez**

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, sugerimos que el título debe cambiar a: **"OBTENCION DE ESPORAS DE Trichoderma spp. A PARTIR DE SUBPRODUCTO DE Sativa oryzae (ARROZ), MEDIANTE OPTIMIZACION DE PARAMETROS DE PRODUCCION Y SU OPTIMIZACIÓN DE ACCION ANTAGONICA CONTRA Fusarium spp"**, después de lo cual consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

FIRMA: (Devolver antes de 8 días hábiles) FECHA **13-08-18**

ASESOR: **Ing. Pamela Manrique Pino**

DICTAMEN ASESORÍA: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesora del trabajo de investigación presentado por la recurrente, tengo a bien informar que se ha verificado el cumplimiento de los objetivos y redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes por lo cual considero que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente
FIRMA: FECHA **12-7-18**

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) **Ing. Eugenia Zeballos Delgado** 3) **Ing. Cinthia Córdova Barrios**
2) **Dr. Fredy Molina Rodríguez**

DICTAMEN FINAL: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, es que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente
FIRMA: (Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA **19-12-18**

JURADOS: PRESIDENTE **ING. EUGENIA ZEBALLOS DELGADO**
VOCAL **DR. FREDY MOLINA RODRIGUEZ**
SECRETARIO **ING. CINTHIA CORDOVA BARRIOS**

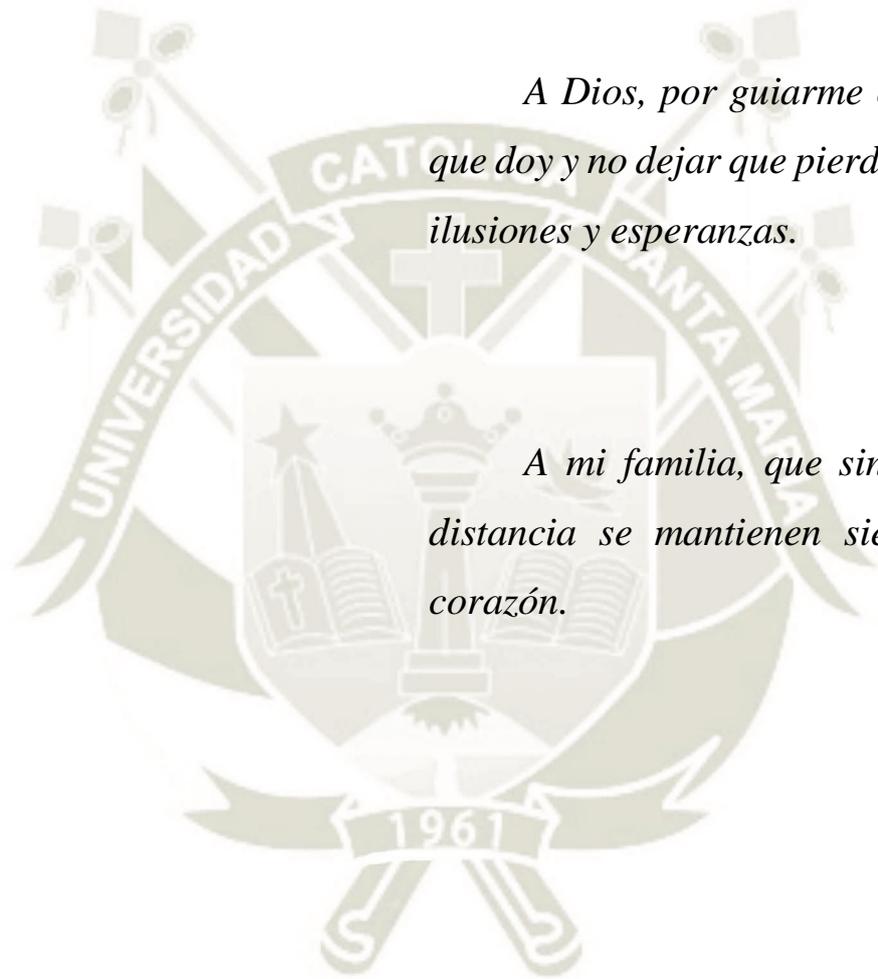
FECHA **7/1/18** HORA **19.00** LOCAL **C-402**

FIRMA DEL DECANO: FECHA

DEDICATORIA

*A Dios, por guiarme en cada paso
que doy y no dejar que pierda de vista mis
ilusiones y esperanzas.*

*A mi familia, que sin importar la
distancia se mantienen siempre en mi
corazón.*



AGRADECIMIENTOS

A Dios, por todo lo que he recibido en mi vida y darme la voluntad de perseguir cada una de mis metas y sueños.

A mis padres Lourdes y Miguel, por todo el amor y apoyo incondicional que me brindaron durante toda la vida, y por enseñarme todo lo que me hace ser yo. A Ginger, por acompañarme todo este tiempo, por su lealtad y todo su amor.

A mi hermana Belem, por darme el ejemplo de valentía y lucha más grande que tengo. A mi sobrino Joaquin, por hacerme sonreír cuando más me hacía falta.

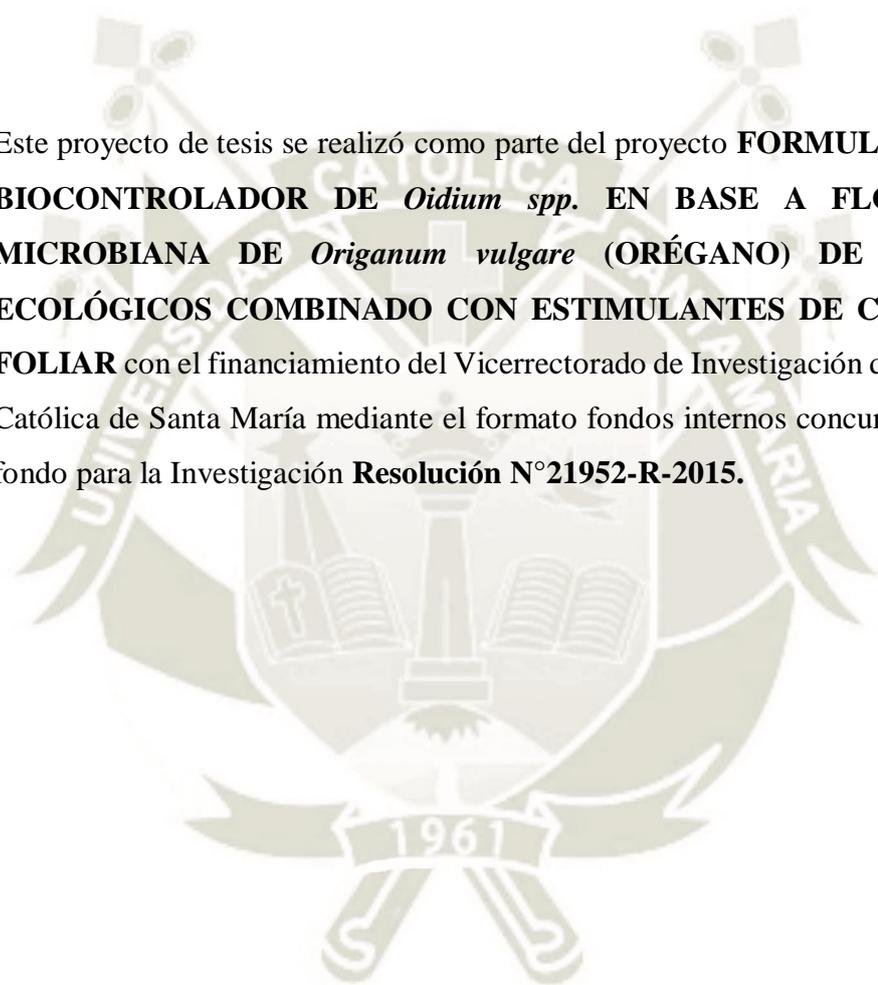
A la Ing. Pamela Manrique, mi asesora, por guiarme durante todo este proceso, sus valiosas enseñanzas y brindarme su amistad.

A José Luis y María Fernanda, por haberme apoyado y haberme brindado palabras de aliento en momentos clave durante este proceso y siempre.

A mis jurados: Ing. Cinthia Córdova, Ing. Eugenia Zeballos y Dr. Fredy Molina, por su guía durante el desarrollo de este trabajo de tesis y por todas las enseñanzas durante mi formación universitaria.

A Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Católica de Santa María y a su director Dr. Gonzalo Dávila por haber hecho posible este trabajo de tesis mediante el financiamiento y la gestión del mismo.

Este proyecto de tesis se realizó como parte del proyecto **FORMULACIÓN DE UN BIOCONTROLADOR DE *Oidium spp.* EN BASE A FLORA NATIVA MICROBIANA DE *Origanum vulgare* (ORÉGANO) DE TRES PISOS ECOLÓGICOS COMBINADO CON ESTIMULANTES DE CRECIMIENTO FOLIAR** con el financiamiento del Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Católica de Santa María mediante el formato fondos internos concursables. Proyecto fondo para la Investigación **Resolución N°21952-R-2015.**



INTRODUCCIÓN

El sector agrícola, es uno de los pilares de la supervivencia humana y de muchas otras especies, ya que provee recursos para mantenernos nutridos y saludables. En el Perú y el mundo se tiene una importante superficie agrícola, la cual se ve afectada por diversas amenazas como la contaminación ambiental, los diversos productos químicos popularizados para erradicar plagas, enfermedades, entre otros.

Con la población mundial en aumento exponencial, también aumentan las demandas por alimentos de mayor calidad y cada vez con una velocidad de producción más rápida. Esto hace que los agricultores teman algún retraso en sus cosechas como lo son las enfermedades fitopatogénicas o la falta de nutrientes en los suelos. Dicho temor los lleva a tomar alternativas poco saludables para el suelo como son el empleo de herbicidas o plaguicidas en exceso violentos. Los efectos secundarios de estos no solo se limitan al suelo donde se aplica, sino también al agricultor y a los consumidores tanto de los productos como del agua que se vio contaminada en el proceso. Dichos efectos van desde eliminar la flora y fauna microbiana del suelo hasta ser potencialmente cancerígenos para humanos y animales.

Una alternativa para reemplazarlos son los controladores biológicos como las esporas de *Trichoderma spp.* Su producción se lleva a cabo mediante métodos convencionales, los cuales emplean sustratos costosos como el grano de arroz comercial, grano de alpiste, entre otros. Estos encarecen el producto final para el agricultor, quien termina eligiendo productos químicos.

Por otro lado, se sabe que toda actividad humana genera residuos o desechos siendo el caso del cultivo de arroz, la actividad económica con mayores utilidades a nivel mundial, que produce el subproducto llamado arrocillo o arroz quebrado. Ambos tienen la misma composición química, por lo tanto, este puede ser considerado como un sustrato experimental viable tomando en cuenta que dicho subproducto equivale al 15% del arroz producido mundialmente y tiene menos de la mitad de su precio.

Así mismo, en numerosas investigaciones se ha confirmado la acción antagónica de las esporas de *Trichoderma spp.* contra distintos microorganismos

patógenos como los géneros de *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, etc. Este hongo antagonista actúa con el mecanismo de micoparasitismo, siendo de vital importancia la concentración de esporas presente y la viabilidad de las mismas para asegurar su acción.

Es por ello, que la presente investigación busco emplear este subproducto del arroz (*Oryza sativa*) para la obtención de esporas de *Trichoderma spp.*, con la finalidad de realizar una optimización de las variables de concentración y porcentaje de viabilidad.

Por tanto, la presente investigación podrá brindar una metodología estandarizada para la producción de esporas de *Trichoderma spp.* asegurando resultados satisfactorios e industrialmente competentes a partir de un subproducto poco valorado en el Perú. Además, pudiendo encaminar hacia estudios de factibilidad para poder desarrollar una planta biotecnológica de producción de biocontroladores en la región Arequipa, que más allá de generar utilidades y empleo, estrechará la relación con los agricultores locales ensanchando la brecha para la aplicación del conocimiento experimental en el sector agrícola.

RESUMEN

En el Perú se tiene una importante superficie agrícola, la cual se ve afectada por diversas enfermedades, entre ellas los hongos patógenos. Una alternativa para erradicarlas son los controladores biológicos como las esporas de *Trichoderma spp.* que además de tener acción antagónica frente a diversos fitopatógenos confiere a la planta ventajas tales como: mayor biodisponibilidad de los nutrientes y mayor resistencia a cambios de temperatura y pH en el suelo. Su producción se lleva a cabo mediante métodos convencionales, los cuales emplean materias primas costosas que encarecen el producto final para el agricultor, el cual prefiere productos químicos a pesar de los efectos secundarios que generan en el cultivo, el suelo y el medio ambiente.

Esta investigación se realizó con el objetivo de optimizar la concentración y porcentaje de viabilidad en la producción de esporas de *Trichoderma spp.* usando un sustrato alternativo experimental denominado arrocillo, el cual tiene un bajo valor comercial, se empezó caracterizándolo gravimétricamente obteniendo un 87.83% de sólidos volátiles, demostrando su gran cantidad de materia orgánica traducida como nutrientes disponibles para la proliferación de *Trichoderma spp.* Por otro lado, se estudió la cinética de crecimiento del hongo antagonista en medio PDA líquido siendo a partir del séptimo día en adelante que este entró en fase estacionaria de crecimiento. Con esta información se pudo llevar a cabo la prueba preliminar con el sustrato experimental, obteniendo una concentración de 3.0785×10^7 UFC/mL, también se

determinó que el porcentaje de humedad y sólidos totales del sustrato debe ser 43.81% y 56.19% respectivamente para que permita la proliferación del hongo.

Para cumplir con el objetivo principal, se identificaron como variables posiblemente significativas en el resultado de la concentración y porcentaje de viabilidad: la concentración porcentual de melaza (A), el volumen de la misma añadida al sustrato (B), el volumen de medio PDA inoculado con *Trichoderma spp* (C), y el tipo de aireación a colocarse en cada unidad experimental (D). Se realizó un diseño factorial 2^4 aleatorizando los diferentes niveles de las variables identificadas, resultando en una matriz experimental de veinte unidades experimentales que se realizaron por duplicado.

Se determinaron los valores de concentración y viabilidad de cada una de ellas. Con estos datos se realizó un análisis estadístico donde se pudo observar que todas las variables fueron significativas en los resultados finales, ya que mostraron valores P menores a 0.05. Sin embargo, el efecto individual más significativo fue el volumen de medio PDA inoculado añadido al sustrato (C). Gracias a la metodología de superficie de respuesta se pudieron identificar también los efectos interactivos, siendo sólo unos cuantos significativos, entre ellos destaca la interacción entre el volumen de melaza y el volumen del medio PDA inoculado (BC).

Todos los datos recabados permitieron identificar los valores de concentración y porcentaje de viabilidad óptimos en la región experimentada siendo de 3.7925×10^8 UFC /mL y un 86.74% respectivamente resultantes de 250 g de arrozillo, con 15 mL de melaza al 15% de concentración, 2.5 mL de inóculo y aireación con perforaciones finas a 5 cm de altura por encima del sustrato y espaciadas por 3 cm entre ellas. La replicación del óptimo teórico obtuvo valores de 4.13×10^8 UFC/mL de concentración y 85.15% de viabilidad. Finalmente, la acción antagónica de *Trichoderma spp.* frente a *Fusarium spp.* por cultivo dual fue de 70.3190% en promedio de las tres repeticiones realizadas.

PALABRAS CLAVE: *Trichoderma spp.*; Arrocillo; Antagonismo.

ABSTRACT

In Perú there is an important agricultural area, which is affected by various diseases, including pathogenic fungi. An alternative to eradicate them are biological controllers such as spores of *Trichoderma spp.* Besides having antagonistic action against various phytopathogens, it also confers some advantages to the plant such as: Greater bioavailability of nutrients and resistance to temperature and pH changes in the soil. Its production is carried out by conventional methods, which use expensive raw materials that make the final product more expensive for farmers, who prefers chemical products despite of all the bad consequences produced in the environment by them.

This research work was developed with the main objective of optimize the concentration and percentage of viability in the production of spores from *Trichoderma spp.* using an experimental alternative substrate named “arrocillo”, which has a very low commercial value, the study was started by characterizing gravimetrically the substrate obtaining 87.83% of volatile solids, showing it’s quantity of organic matter traduced as the nutrients that can be used for the growth of *Trichoderma spp.* On the other hand, the growth kinetic of the antagonistic fungus showed that it reached the stationary phase of growth by the seventh day. With this information it became possible to make a preliminary test with the experimental substrate obtaining 3.0785×10^7 UFC/mL, it was also determined that the percentage of humidity and total solids has to be 43.81% and 56.19% respectively so it can allow the fungus growth.

In order to achieve the main objective there were identified as possibly significant variables: the percentile concentration of molasses (A), the volume of the same added to the substrate (B), the volume of PDA medium inoculated with *Trichoderma spp.* (C) and the type of aeration on each experimental unit (D). A 2^4 factorial design was developed using randomly the levels given to each variable resulting in twenty experiments made in duplicate.

The values of concentration and viability was determined on each of them. With the data obtained a statistic analysis was performed where it was visible that all

variables were significant on the final results, because they showed a P value less than 0.05. But the individual effect most significant was the volume of PDA medium inoculated to the substrate (C). The methodology of surface of response made possible to appreciate the interactive effects, being significant just a few, among them the interaction between (B) and (C) stands out.

All the data obtained allowed to identify the optimum values of concentration and viability in the experimental region being 3.7925×10^8 UFC /mL and 86.74% respectively result of adding 15 mL of molasses at 15% of concentration, 2.5 mL of inoculum and aeration with fine perforations at 5 cm of height above the substrate and spaced by 3 cm between them. The replication of the theoretical optimum obtained stands for 4.13×10^8 UFC / mL of concentration and 85.15% of viability. Finally, the antagonistic action of *Trichoderma spp.* against *Fusarium spp.* was 70.3190% on average.

Keywords: *Trichoderma spp.*; Arrocillo; Antagonism.

INDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	vi
ABSTRACT	viii
INDICE DE CONTENIDO.....	x
OBJETIVOS	xix
HIPOTESIS.....	xx
CAPITULO I.....	1
MARCO TEORICO	1
1.1. EL SUELO	1
1.1.1. BIODIVERSIDAD DEL SUELO	1
1.1.2. IMPORTANCIA EN EL PERÚ	2
1.2. CONTROL BIOLÓGICO	4
1.2.1. TIPOS DE CONTROL BIOLÓGICO	4
1.2.2. CONTROLADORES BIOLÓGICOS MAS USADOS	6
1.2.3. MECANISMOS DE ACCION.....	6
1.3. GENERO <i>Trichoderma spp.</i>	7
1.3.1. CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS Y MICROSCOPICAS	8
1.3.2. CONTROL BIOLÓGICO	10
1.3.4. PRODUCCIÓN DE ESPORAS DE <i>Trichoderma spp.</i>	12
1.3.4.1. PROTOCOLOS DE PRODUCCIÓN CONOCIDOS	13
1.4. ARROCILLO	14
1.5. FITOPATOGENOS MAS COMUNES.....	15
1.5.1 GENERO <i>Fusarium spp.</i>	16
1.5.1.1 IMPACTO EN LOS CULTIVOS NACIONALES Y LOCALES	17
1.6. PRUEBA DE ANTAGONISMO	19
1.6.1. CUANTITATIVA	19
1.6.2. CUALITATIVA.....	20
1.7. PLANEAMIENTOS FACTORIALES.....	21
1.7.1. EXPERIMENTOS FACTORIALES CON “k” FACTORES.	22
1.7.2. METODOLOGIA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA.....	22
CAPITULO II.....	24
MATERIALES Y METODOS	24

2.1. MATERIALES	24
2.1.1. MUESTRAS Y/O UNIDADES BIOLÓGICAS:	24
2.1.2. MATERIAL DE LABORATORIO	24
2.1.2.1. MATERIAL DE VIDRIO	24
2.1.2.2. INSUMOS Y REACTIVOS QUÍMICOS	24
2.1.2.3. EQUIPOS E INSTRUMENTACIÓN	25
2.1.3. OTROS	25
2.1.4. SOFTWARE	25
2.2. METODOS	26
2.2.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL SUBPRODUCTO DE <i>Oryza sativa</i> (ARROZ)	26
2.2.2. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE <i>Trichoderma spp.</i> POR ESPECTROFOTOMETRÍA.....	26
2.2.2.1. OBTENCIÓN Y REPRODUCCIÓN DE <i>Trichoderma spp.</i>	26
2.2.2.2. CURVA DE CRECIMIENTO DE <i>Trichoderma spp.</i>	26
2.2.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA HUMEDAD, LA DISPOSICIÓN DE AIREACIÓN Y LA CONCENTRACIÓN DE MELAZA EN LA PRODUCCIÓN DE ESPORAS DE <i>Trichoderma spp.</i>	27
2.2.3.1. DESARROLLO DE PRUEBA PRELIMINAR.....	27
2.2.3.2. ESCALAMIENTO DE LA PRUEBA PRELIMINAR.....	28
2.2.4. OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS DE PRODUCCIÓN MEDIANTE DISEÑO FACTORIAL.....	28
2.2.5. EVALUACIÓN DE ACCIÓN ANTAGONISTA DE ESPORAS DE <i>Trichoderma spp.</i> OBTENIDAS CONTRA <i>Fusarium spp.</i> POR CULTIVO DUAL..	32
2.2.5.1. OBTENCIÓN Y REPRODUCCIÓN DE <i>Fusarium spp.</i>	32
2.2.5.2. PRUEBA DE ANTAGONISMO POR CULTIVO DUAL	32
CAPITULO III:	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
3.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL SUBPRODUCTO DE <i>Oryza sativa</i> (ARROZ).....	34
3.2. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE <i>Trichoderma spp.</i> POR ESPECTROFOTOMETRÍA.....	36
3.2.1. OBTENCIÓN Y REPRODUCCIÓN DE <i>Trichoderma spp.</i>	36
3.2.2. CURVA DE CRECIMIENTO DE <i>Trichoderma spp.</i>	38
3.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA HUMEDAD, LA DISPOSICIÓN DE AIREACIÓN Y LA CONCENTRACIÓN DE MELAZA.....	43
3.3.1. DESARROLLO DE PRUEBA PRELIMINAR.....	43

3.3.2.	ESCALAMIENTO DE LA PRUEBA PRELIMINAR.....	45
3.4.	OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS DE PRODUCCIÓN MEDIANTE DISEÑO FACTORIAL.....	52
3.4.1.	RESULTADOS DE CONCENTRACIÓN DE ESPORAS DE <i>Trichoderma spp.</i>	52
3.4.1.1.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	54
3.4.1.1.1.	FORMULACIÓN DEL MODELO MATEMÁTICO	59
3.4.1.2.	ANÁLISIS DE SUPERFICIE DE REPUESTA	62
3.4.2.	RESULTADOS DE VIABILIDAD DE ESPORAS DE <i>Trichoderma spp.</i>.....	66
3.4.2.1.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	68
3.4.2.1.1.	FORMULACIÓN DEL MODELO MATEMÁTICO	72
3.4.2.2.	ANÁLISIS DE SUPERFICIE DE RESPUESTA	73
3.5.	EVALUACIÓN DE ACCIÓN ANTAGONISTA DE ESPORAS DE <i>Trichoderma spp.</i> OBTENIDAS CONTRA <i>Fusarium spp.</i> POR CULTIVO DUAL. .	80
3.5.1.	OBTENCIÓN Y REPRODUCCIÓN DE <i>Fusarium spp.</i>.....	80
3.5.2.	PRUEBA DE ANTAGONISMO POR CULTIVO DUAL.....	81
CAPITULO IV	88
4.1.	CONCLUSIONES	88
4.2.	RECOMENDACIONES.....	90
BIBLIOGRAFÍA	91
ANEXOS	99

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Superficie agropecuaria peruana por región 2017.....	3
Figura 2. Vista macro y microscópica de <i>Trichoderma spp.</i>	8
Figura 3. Estructura microscopica de <i>Trichoderma spp.</i>	9
Figura 4. Efecto de la luz en el desarrollo de micelio y en la esporulación de <i>Trichoderma spp.</i>	10
Figura 5. Mecanismo de acción (micoparasitismo) de <i>Trichoderma spp.</i>	11
Figura 6. Concentración y viabilidad de esporas de <i>Trichoderma spp.</i> En distintos sustratos.	12
Figura 7. Producción de esporas en bolsas.	13
Figura 8. Producción de esporas en bandejas.	14
Figura 9. Composición del arroz cáscara	14
Figura 10. Producción de arroz cascara por regiones en el Perú. Código de colores.....	15
Figura 11. Vista microscópica y macroscópica de <i>Fusarium spp.</i>	16
Figura 12. Producción de cebolla por región y provincia, 2018.	17
Figura 13. Diagrama de prueba de antagonismo en cultivo dual.	19
Figura 14. Modelos de gráficos obtenidos de superficies de respuesta: individual o de un solo factor (A), de interacciones o dos factores en: tres dimensiones (B) y en grafica de contornos (C)	23
Figura 15. Esquema del experimento de acción antagónica de <i>Trichoderma spp.</i> contra <i>Fusarium spp.</i>	32
Figura 16. <i>Trichoderma spp.</i> En cultivos solidos a: medio Sabouraud ; b: medio PDA.	36
Figura 17. <i>Trichoderma spp.</i> En medio liquido PDA. A: micelio sumergido; b: micelio intacto.	37
Figura 18. Vista microscópica a 40x de conidias de <i>Trichoderma spp.</i>	37
Figura 19. Gráfico de Cinética de crecimiento de <i>Trichoderma spp.</i>	42
Figura 20 . Medio de arrozillo y melaza sin inocular (A); medio infestado con <i>Trichoderma spp.</i> (B).....	43
Figura 21. Conidias de <i>Trichoderma spp.</i> en cámara Neubauer a 40x. Disolución 1:10 (A) disolución 1:100 (B).....	44
Figura 22. Gráfico de promedios obtenidos para el porcentaje de humedad de los tratamientos empleados para el crecimiento de <i>Trichoderma spp.</i> en sustrato sólido.....	47

Figura 23. Promedios obtenidos para el porcentaje de sólidos totales de los tratamientos empleados para el crecimiento de <i>Trichoderma spp.</i> en sustrato sólido.....	50
Figura 24. Diagrama de Pareto para la evaluación de la concentración de esporas de <i>Trichoderma spp.</i> en sustrato sólido. Fuente: Statgraphics Centurión XV.....	54
Figura 25. Efectos principales sobre la concentración de esporas obtenidas de <i>Trichoderma spp.</i> en sustrato sólido.	57
Figura 26. Gráfica de interacciones sobre la concentración de esporas de <i>Trichoderma spp.</i> en sustrato sólido.....	57
Figura 27. Superficies de respuesta para la concentración de esporas de <i>Trichoderma spp.</i> en sustrato sólido.	63
Figura 28. Gráficas de contornos para el porcentaje viabilidad de <i>Trichoderma spp.</i> en sustrato sólido , interacción (BC).....	64
Figura 29. Gráficas de contornos para el porcentaje viabilidad de <i>Trichoderma spp.</i> en sustrato sólido , interacción (AB).	65
Figura 30. Diferenciación de esporas germinadas y no germinadas teñidas con azul de lactofenol, ensayos de viabilidad.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 31. Diagrama de Pareto para la evaluación de viabilidad de <i>Trichoderma spp.</i> en sustrato sólido.	68
Figura 32. Efectos principales individuales sobre el porcentaje de viabilidad de esporas obtenidas de <i>Trichoderma spp.</i> en sustrato sólido	70
Figura 33. Gráfica de interacciones sobre el porcentaje de viabilidad de esporas obtenidas de <i>Trichoderma spp.</i> en sustrato sólido.....	70
Figura 34. Superficies de respuesta para el porcentaje de viabilidad de esporas obtenidas de <i>Trichoderma spp.</i> en sustrato sólido. Interacción BC (A), interacción AB (B) e interacción AC (C).	75
Figura 35. Gráficas de contornos para el porcentaje de viabilidad de esporas obtenidas de <i>Trichoderma spp.</i> en sustrato sólido , interacción BC (A), interacción AB (B) e interacción AC (C).	76
Figura 36. <i>Fusarium spp.</i> en medio PDA sólido. Vistas del reverso y frente de la placa Petri.	80
Figura 37. Resultados de antagonismo en cultivo dual <i>Trichoderma spp.</i> vs <i>Fusarium spp.</i> Cultivo control (<i>Fusarium spp.</i>) (A), primera, segunda y tercera repetición (B, C Y D).	81
Figura 38. Crecimientos reportados por <i>Trichoderma spp.</i> y <i>Fusarium spp.</i> en las repeticiones del ensayo de Antagonismo, comparado con el crecimiento control de <i>Fusarium spp.</i>	82

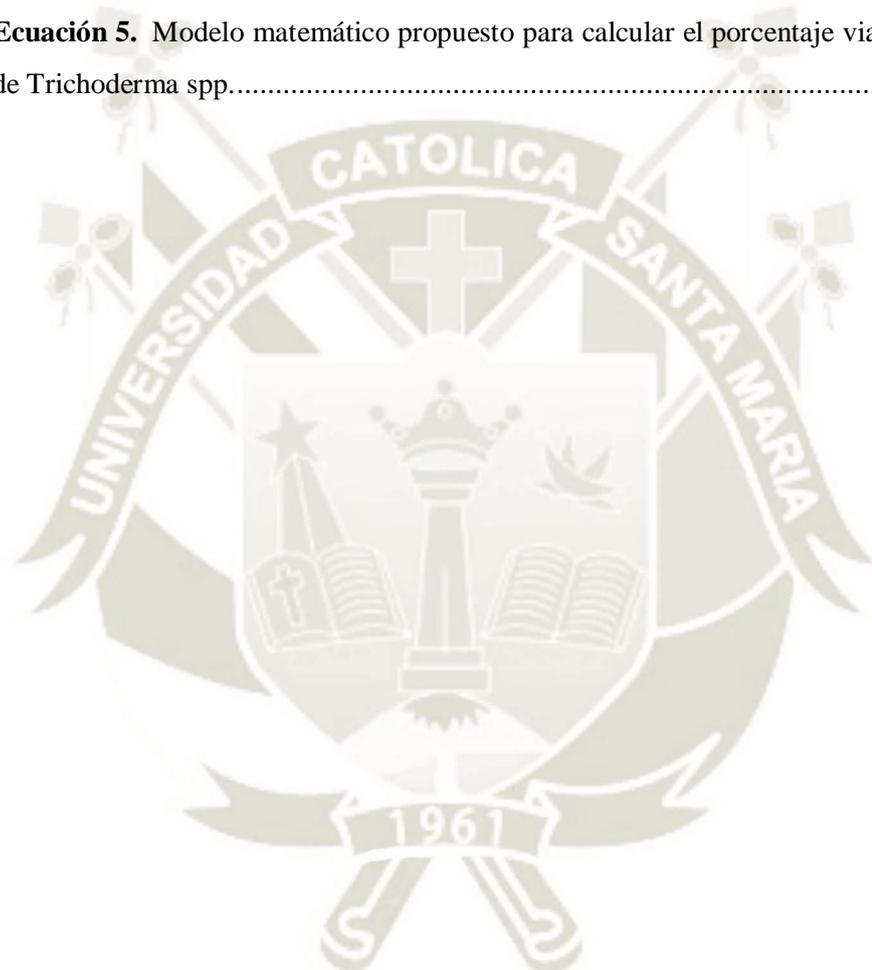
INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividades de los habitantes del suelo en el proceso de descomposición y en la estructura del suelo.....	2
Tabla 2. Controladores biológicos más usados y su función.	5
Tabla 3. Condiciones de crecimiento del género <i>Trichoderma</i> spp.	8
Tabla 4. Productos disponibles en el mercado de <i>Trichoderma</i> spp12	12
Tabla 5. Hongos entomopatógenos más comunes y los cultivos que afectan.....15	15
Tabla 6. Fungicidas más usados en el Perú, mayo 2018.....18	18
Tabla 7. Escala utilizada por Bell et Al. Para la evaluación de la capacidad antagónica de los biocontroladores.....21	21
Tabla 8. Factores y niveles del diseño experimental para la evaluación de producción de esporas de <i>Trichoderma</i> spp.29	29
Tabla 9. Matriz experimental para la evaluación de producción de esporas de <i>Trichoderma</i> spp. Con variables codificadas.....30	30
Tabla 10. Matriz experimental para la evaluación de producción de esporas de <i>Trichoderma</i> spp. Con variables reales.31	31
Tabla 11. Resultados de los ensayos gravimétricos del sustrato “arrocillo”34	34
Tabla 12. Resultados de determinaciones gravimétricas de distintos sustratos, en porcentajes. ⁽²⁶⁾34	34
Tabla 13. Factores para el análisis de medidas repetidas en la evaluación del crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp.38	38
Tabla 14. Resultados estadísticos descriptivos para los valores de absorbancia obtenidos del crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp.....39	39
Tabla 15. Análisis de varianza intrasujeto de efectos en el crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. a través del tiempo.40	40
Tabla 16. Comparaciones múltiples para la absorbancia registrada para el crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. mediante LSD Fisher.....41	41
Tabla 17 Resultados de % de humedad y solidos totales en arrozillo de la prueba preliminar.45	45
Tabla 18. Resultados de % de humedad en arrozillo cocido (500 g) pruebas 1 y 2.46	46
Tabla 19. Resultados de % de humedad en arrozillo cocido (1000 g) prueba 3 y 4.46	46
Tabla 20. Análisis estadístico descriptivo para humedad del sustrato sólido.47	47
Tabla 21. Análisis de varianza (ANOVA) para el porcentaje de humedad de los tratamientos empleados para el crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. en sustrato sólido.....48	48

Tabla 22. Resultados de porcentaje de solidos totales en arrozillo cocido (500 g) pruebas 1 y 2.	48
Tabla 23. Resultados de porcentaje de solidos totales en arrozillo cocido (1000 g) prueba 3 y 4.	49
Tabla 24. Análisis estadístico descriptivo para porcentaje de sólidos totales del sustrato sólido.	49
Tabla 25. Análisis de varianza (ANOVA) para el porcentaje de sólidos totales de los tratamientos empleados para el crecimiento de <i>Trichoderma spp.</i> en sustrato sólido.	50
Tabla 26. Comparaciones múltiples para el porcentaje de humedad de los tratamientos empleados para el crecimiento de <i>Trichoderma spp.</i> en sustrato sólido.	52
Tabla 27. Resultados de la evaluación de concentración (UFC/mL) de <i>Trichoderma spp.</i> ...	53
Tabla 28. Análisis de varianza para la evaluación del crecimiento de <i>Trichoderma spp.</i> en sustrato sólido.	56
Tabla 29. Coeficientes para el modelo matemático construido para calcular la concentración de esporas de <i>Trichoderma spp.</i>	60
Tabla 30. Óptimo resultante para el crecimiento de <i>Trichoderma spp.</i> en sustrato sólido. ...	65
Tabla 31. Resultados de la evaluación de la viabilidad de esporas de <i>Trichoderma spp.</i>	67
Tabla 32. Análisis de varianza para la evaluación del crecimiento de <i>Trichoderma spp.</i> en sustrato sólido.	69
Tabla 33. Coeficientes para el modelo matemático construido para calcular la concentración de esporas de <i>Trichoderma spp.</i>	72
Tabla 34. Óptimo resultante para el porcentaje de viabilidad y concentración de esporas de <i>Trichoderma spp.</i> en sustrato sólido.	77
Tabla 35. Resultados de ensayos de concentración y viabilidad de esporas de <i>Trichoderma spp.</i> Producidas en distintos sustratos, en porcentajes. ⁽²⁶⁾	79
Tabla 36. Productos en el mercado a base de <i>Trichoderma spp.</i> ⁽⁵⁶⁻⁶²⁾	80
Tabla 37. Análisis Estadístico descriptivo para los datos obtenidos del antagonismo entre <i>Trichoderma spp.</i> y <i>Fusarium spp.</i>	83
Tabla 38. Análisis de varianza para la evaluación de la capacidad antagónica de <i>Trichoderma spp.</i> ante <i>Fusarium spp.</i> a través del tiempo.	84
Tabla 39. Análisis de varianza para la evaluación de la capacidad antagónica de <i>Trichoderma spp.</i> ante <i>Fusarium spp.</i> entre las repeticiones.	84
Tabla 40. Comparaciones múltiples para la altura de tallos de maíz en su etapa germinativa según sustratos en distinto tiempo mediante LSD Fisher.	85

INDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Ecuación para calcular el porcentaje de inhibición de antagonismo'	19
Ecuación 2. Determinación de % humedad y solidos totales.....	28
Ecuación 3. Determinación de % germinación.	30
Ecuación 4. Modelo matemático propuesto para calcular la concentración de esporas de Trichoderma spp. (UFC/mL).	61
Ecuación 5. Modelo matemático propuesto para calcular el porcentaje viabilidad de esporas de Trichoderma spp.....	73



INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Composición de los Medios Sabouraud (A) y Papa Dextrosa Agar (B).	99
Anexo 2. Fotografía de Cámara de crecimiento de <i>Trichoderma spp.</i> , parte superior: aislamiento en oscuridad, parte inferior: iluminación constante.	100
Anexo 3. Longitudes de onda (nm) en el espectro visible, colores absorbidos y observados.	100
Anexo 4. Tabla de correctores resultante del análisis de varianza (ANOVA) sobre la cinética de crecimiento de <i>Trichoderma spp.</i> con respecto al tiempo.	101
Anexo 5. Registro del peso de arrocillo durante el ensayo de determinación de humedad y sólidos totales.	102
Anexo 6. Registro de esporas viables de <i>Trichoderma spp.</i> en cada repetición del ensayo de viabilidad.	104
Anexo 7. Registro de crecimiento (cm.) de <i>Trichoderma spp.</i> y <i>Fusarium spp.</i> durante ensayo de Antagonismo.	105
Anexo 8. Tabla de correctores resultante del análisis de varianza (ANOVA) sobre el crecimiento de <i>Fusarium spp.</i> en ensayo de antagonismo.	105

OBJETIVOS

- **OBJETIVO GENERAL**

- Obtener esporas de *Trichoderma spp.* a partir de un subproducto de *Oryza sativa* (arroz) mediante la optimización de parámetros de producción y evaluar su acción antagonista contra *Fusarium spp.*

- **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Caracterizar fisicoquímicamente el subproducto de *Oryza sativa* (arroz).
2. Determinar la cinética de crecimiento de *Trichoderma spp.* por espectrofotometría.
3. Evaluar el efecto de la humedad, la disposición de aireación y la concentración de melaza en la producción de esporas de *Trichoderma spp.*
4. Optimizar los parámetros de producción mediante un diseño factorial.
5. Evaluar la acción antagonista de las esporas de *Trichoderma spp.* obtenidas contra *Fusarium spp.* en cultivo dual.

HIPOTESIS

Debido a que el hongo filamentoso *Trichoderma spp.* tiene un metabolismo versátil y que para su proliferación requiere de un sustrato rico en carbono y es utilizado como biocontrolador; es posible la obtención de esporas del mismo a partir de un subproducto de *Oryza sativa* (arroz) mediante la optimización de parámetros de producción y evaluar su acción antagónica contra *Fusarium spp.*



CAPITULO I

MARCO TEORICO

1.1. EL SUELO

El Suelo se define como la capa más superficial de la tierra, biológicamente activa. Es producto de la descomposición física y química de las rocas y residuos de las actividades de los seres que habitan en ella, la acción de la humedad y el aire también moldean su estructura. Cumple una función vital ya que es la matriz del desarrollo de la vida, aquí se desarrolla una cadena que afecta a todos los organismos, desde el más pequeño al más grande, por los nutrientes que en ella se producen y los factores que los hacen disponibles para la proliferación de todas las especies conocidas.⁽¹⁾

Se compone principalmente de:

- **Materia orgánica:** Como restos de vegetales, hongos, diversos insectos entre otros y por el humus formado durante siglos en él.
- **Materia inorgánica:** Proveniente del proceso de meteorización, el cual da origen a elementos como el fósforo, azufre y nitrógeno, claves para la fertilidad del mismo.⁽¹⁾
- **Agua:** Cuya presencia es crucial para mantener todos los nutrientes en solución para que puedan ser aprovechados por las plantas
- **Aire:** Este ocupa los poros que el flujo del agua deja libres con gases atmosféricos como el CO₂.⁽²⁾

1.1.1. BIODIVERSIDAD DEL SUELO

Es uno de los ecosistemas con mayor diversidad y complejidad que existen naturalmente, contiene la cuarta parte de toda la diversidad del mundo. En el suelo se desarrollan toda clase de organismos que están en constante interacción y ayudan a que se mantengan los ciclos globales que hacen posible la vida.⁽²⁾

Su biodiversidad se compone a grandes rasgos por: microflora, microfauna, mesofauna y macrofauna. Cada una de estas tiene diferentes roles y actividades que son de vital importancia como se muestra en la Tabla 1.⁽¹⁾

Tabla 1. Actividades de los habitantes del suelo en el proceso de descomposición y en la estructura del suelo. ⁽¹⁾

CATEGORIA	CICLADO DE NUTRIENTES	ESTRUCTURA DEL SUELO
Microflora Bacterias Hongos	Catabolizan material orgánico. Mineralizan e inmovilizan nutrientes.	Producen compuestos orgánicos que unen los agregados.
Microfauna Nemátodos Protozoarios Ácaros (pequeños)	Regulan bacterias y hongos. Intervienen en el reciclado de nutrientes.	Pueden alterar la estructura de los agregados por interacciones con microflora.
Mesofauna Ácaros Collembolos Artrópodos	Regulan hongos, microfauna Reciclado de nutrientes Fragmentan restos vegetales	Producen pelotas fecales. Crean Bioporos. Promueven la humificación.
Macrofauna Lombrices Enquitráidos Moluscos Insectos	Fragmentan vegetales Estimulan Actividad microbiana	Redistribuyen materia orgánica y microorganismos. Lo mismo que la Mesofauna,

1.1.2. IMPORTANCIA EN EL PERÚ

En el Perú, el suelo es ampliamente aprovechado a través de la agricultura debido a la gran variedad de tipos de suelo y climas que poseemos. ⁽¹⁾

Para la mitad del año 2018 el sector agropecuario representó una actividad comercial de gran importancia para el país, ya que es responsable del 5.3% del PBI peruano y el 6% de la región Arequipa. Se sabe también que dicho sector ocupa 38 millones de hectáreas, cerca del 30% de la superficie nacional, siendo el 18% exclusivamente para agricultura. La agricultura se ve más beneficiada por la gran variedad y fertilidad que tenemos en cuanto a suelos, se sabe que más del 70% de los alimentos más consumidos también se producen aquí en el Perú. Actualmente 1 de cada 4 pobladores económicamente activos (PEA) son empleados por la industria

agropecuaria siendo casi un total de 2 millones 785 mil productores existentes en nuestro país. Por lo tanto, cualquier cambio, desastre natural o pérdidas masivas por cultivos infestados nos afecta económicamente a todos. .⁽³⁾⁽⁴⁾

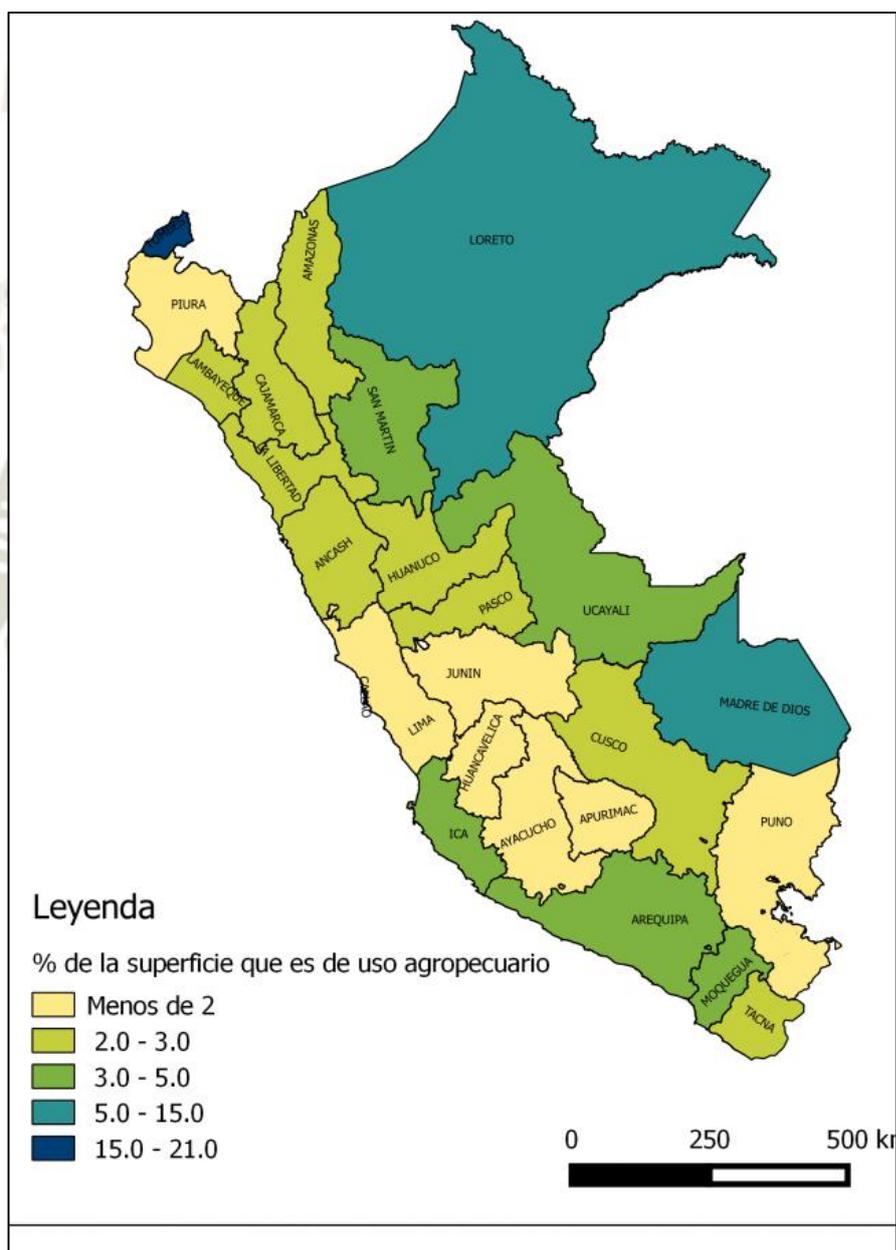


Figura 1. Superficie agropecuaria peruana por región 2017⁽³⁾

1.2. CONTROL BIOLÓGICO

Por definición, se refiere al control de especies patógenas con agentes biológicos, tanto insectos como microorganismos, que puedan infectar o causar alteraciones en la fisiología o funciones de otras especies. Aplicado a la agricultura, significa aprovechar las habilidades naturales de regulación de ciertos sistemas biológicos para evitar pérdidas económicas. Al ser sistemas naturales no son tan efectivos o letales como los ya existentes agentes químicos, pero son útiles para mantenerlas por debajo del Nivel del Daño Económico. ^(5,6)

Tomando como referencia al país de Australia, el cual incluyó en los últimos 25 años políticas inclusivas al control biológico, dando beneficios a los agricultores que probaran que los utilizaban. Se sabe que se ha ahorrado aproximadamente 4000 millones de dólares en plaguicidas y se benefició la biodiversidad de sus ecosistemas. ⁽⁷⁾

Por lo tanto, es necesario innovar para poder proponer estrategias que ayuden a evitar la sobreexplotación y abuso de los recursos naturales y favorecer la actividad de los organismos benéficos o antagonistas. Dicho de otra forma, dejar que la naturaleza actúe. ⁽³⁾

1.2.1. TIPOS DE CONTROL BIOLÓGICO

Existen tres tipos de control biológico: Conservativo, Clásico y Aumentativo.

- **Control Biológico Conservativo**

Este control propone la modificación de prácticas y cuidados de un cultivo, haciendo todo esto con la finalidad de crear un ambiente que le dé una mayor ventaja de proliferación al agente de control biológico. Para que sea puesto en uso, se debe estar seguro que la interacción de estas modificaciones no perjudique la calidad del producto agrícola final, es por eso que aún se está introduciendo, puesto que aún requiere de investigación para ser aplicada. ^(6,8)

- **Control Biológico Clásico**

Este control basa sus acciones en liberar nuevas especies en el ecosistema para controlar una especie invasora y lograr un equilibrio. Su principal objetivo no es ser letal con la especie invasora, sino obtener un resultado paulatino y a largo plazo. Esto tiene un efecto benéfico ya que mantiene las condiciones relativamente iguales para los micro-pobladores de estos ecosistemas y no afecta a largo plazo la biodiversidad existente. ^(5,7)

- **Control Biológico Aumentativo**

Se utiliza mayormente en cultivos pequeños o invernaderos, cuando se quiere salvar un cultivo a corto plazo. Se basa en la producción industrial en masa del agente de control biológico, y son introducidos masivamente en el cultivo. Este tipo de control tiene efectos rápidos y eficaces, no favorece a la biodiversidad y por esto es que no se aplica a ecosistemas naturales. ⁽⁸⁾

Tabla 2. Controladores biológicos más usados y su función. ^(7,9–12,12–14)

	Controlador Biológico	Acción
Animales	Mantis Religiosa	Insecticida
	Cien-Pies	
	Crisopa	
	<i>Encarsia formosa</i>	
Microorganismos	<i>Trichoderma harzianum</i>	Nematicida
	<i>Beauveria bassiana</i>	Fungicida
	<i>Lecanicillum lecanii</i>	Hormiguicida
	<i>Bacillus subtilis</i>	Insecticida
	<i>Bacillus licheniformis</i>	Nematicida
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	
	<i>Brevibacillus anisopliae</i>	Bactericida
	<i>Brevibacillus brevis</i>	Nematicida
<i>Peocilomyces lilacinus</i>		

1.2.2. CONTROLADORES BIOLÓGICOS MAS USADOS

En los últimos años los controladores biológicos han ido ganando popularidad, siendo visibles los más usados en la Tabla 2, al confirmarse su efectividad y las consecuencias positivas a largo plazo en los suelos donde fue aplicado aumentando su fertilidad y versatilidad de acoger otros cultivos diferentes. Es por esto, que se han comenzado a producir de manera comercial para tener una aplicación más localizada y específica.⁽⁵⁾

1.2.3. MECANISMOS DE ACCION

Existen tres tipos de mecanismos que pueden emplear los controladores biológicos, los cuales son: por competencia exclusiva, por antibiosis y por hiperparasitismo.

- **Control Biológico por Competencia exclusiva.**

Los controladores biológicos pertenecientes a este tipo de control, son escogidos porque tanto él, como el patógeno, necesitan de un mismo nutriente en específico. Al colocar dos especies para que compitan por sobrevivir y poder proliferarse en el medio o en la planta afectada, la que prevalecerá será la que tenga alguna ventaja como movilidad, producción de enzimas que le permitan metabolizar el nutriente primero. Es el mecanismo que casi todos los controladores emplean, tiene además la ventaja de ser tan específico como se quiera, ya que se puede seleccionar el nutriente según el patógeno que se quiera atacar.⁽¹⁵⁾

- **Control Biológico por Antibiosis**

Se refiere a la interacción antagonica de dos organismos, más allá de luchar por los nutrientes disponibles, el agente de control biológico tiene la capacidad de producir compuestos biológicos que amenacen la integridad de la estructura del patógeno o la biodisponibilidad de algún nutriente importante, estos componentes pueden ser antibióticos y compuestos

fitotóxicos. Para entender la naturalidad de este mecanismo, debemos recordar que casi todos los antibióticos usados en la medicina actual fueron aislados de microorganismos que habitan el suelo, por lo tanto, debieron desempeñar una función crucial para formar y mantener los ecosistemas que hoy conocemos.^(6,15)

- **Control Biológico por Hiperparasitismo**

Se refiere a la interacción de dos organismos considerados como parásitos. Lo que sucederá es que el controlador biológico atacará como un parásito al patógeno problema. El género *Trichoderma spp.* actúa bajo este mecanismo de micoparasitismo. Una característica en estos controladores biológicos es que sean capaces de generar enzimas o estructuras secundarias que le den una ventaja ante el otro parásito.⁽¹⁵⁾

1.3. GENERO *Trichoderma spp.*

El género *Trichoderma* se puede encontrar en casi todos los suelos del mundo, también en la superficie de las raíces de las plantas, en las cortezas en descomposición ya que se alimenta de biomasa fúngica muerta.⁽¹⁶⁾

Su clasificación taxonómica es la siguiente:

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Subdivisión: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Hypocreaceae

Género: *Trichoderma*

1.3.1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS

Para poder apreciar todas sus características se recomienda el uso de medios de crecimiento como el “*Cornmeal Agar*” o el agar PDA (*Potato Dextrose Agar*). En el primero mencionado se le puede ver como una colonia transparente, mientras que en el segundo tiene un color amarillo a verde tal como se ve en la Figura 2. ⁽¹⁷⁾

Su crecimiento micelial inicial sumergido en el medio sólido y conforme las colonias van madurando se puede observar un crecimiento aéreo descrito como flocoso, algodónoso o aracnoide dependiendo de la cepa. La colonia presenta como característica un micelio vegetal incoloro, y su aroma propio descrito como a coco o dulce. Las condiciones que deben tomarse en cuenta son visibles en la Tabla 3. ⁽¹⁸⁾

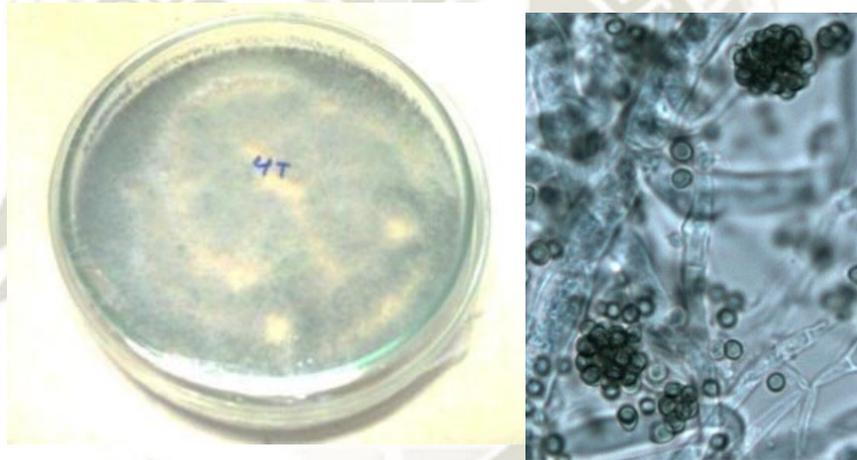


Figura 2. Vista macro y microscópica de *Trichoderma spp.* ⁽¹⁶⁾

Tabla 3. Condiciones de crecimiento del género *Trichoderma spp.* ^(19,20)

CONDICIONES DE CRECIMIENTO	VALORES RECOMENDADOS
Exposición a la Luz Solar	<ul style="list-style-type: none"> • Periodos Alternados de luz y oscuridad.
Temperatura	<ul style="list-style-type: none"> • 10 – 40° C (25°C Temperatura ideal)
pH	<ul style="list-style-type: none"> • Desde 2.0 hasta 9.0 (4.0 – 7.0 Valor Ideal) • <u>Valores Ácidos:</u> Estimula el crecimiento del hongo y la esporulación del mismo • <u>Valores Básicos:</u> Entorpece el proceso de germinación.
Salinidad	<ul style="list-style-type: none"> • Una concentración mayor a 20-70 g/Litro inhiben la esporulación

La descripción microscópica del género *Trichoderma* se caracteriza por una conidiación difuminada o aglomerada generando pústulas que normalmente son de una coloración verdosa; también pueden presentarse de color blanco, gris o café. El hongo presenta conidióforos que tienen un axis principal en intervalos regulares, normalmente con ramas sucesivas apicales y distales que progresivamente se van acortando y acercando. Estas ramificaciones son más o menos divergentes, solitarias, emparejadas o en verticilos. Cuando son verticilos muy repetitivos la estructura termina siendo una estructura piramidal altamente ramificada.⁽¹⁶⁾

En las estructuras conidiogénicas, se puede observar la presencia de fiálides dispuestas normalmente en verticilos terminales divergentes en ramas del conidióforo como se representa en la Figura 3. Se pueden observar la presencia de conidios y clamidosporas. Los conidios son unicelulares, verdes o incoloros, de pared lisa o rugosa; y estos se acumulan en las cabezas de las fiálides, a veces incluso, en sacos. Las clamidosporas se presentan usualmente y muchas veces abundan en el micelio sumergido, con paredes gruesas y con la presencia de pigmentación en algunos casos.⁽¹⁷⁾

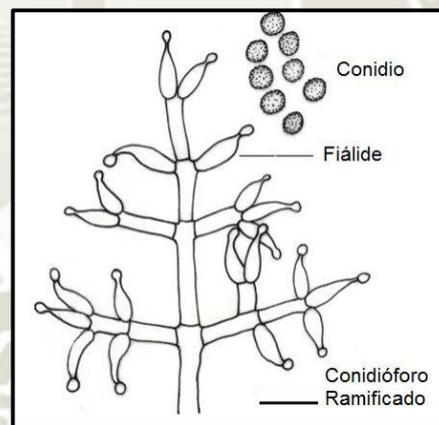


Figura 3. Estructura microscópica de *Trichoderma* spp.⁽¹⁶⁾

Con respecto a los metabolitos secundarios de *Trichoderma* spp. algunos son de gran interés para la industria farmacéutica mientras que otras están implicadas en los efectos tóxicos sobre plantas y animales. Estos metabolitos son peptabioles, compuestos saiketopiperazínicos, polyketidos, pyrones y terpenos.⁽²¹⁾

La producción de esporas se ve afectada positivamente por la presencia de luz, ya sea solar o artificial; por otro lado; la formación de micelio no se ve afectada por la presencia o ausencia de luz. ⁽²²⁾

Durante la producción experimental de esporas del género *Trichoderma* llevada a cabo por González-Morlá et al se obtuvo como conclusión que, si bien la luz no afecta el crecimiento de micelio, las unidades puestas en oscuridad los primeros 3 días mientras crece micelio y luego expuestas a la luz hasta completar los 5 a 8 días, desarrollaban una mayor concentración y viabilidad de esporas. Estos resultados se ven evidenciados en la Figura 4. ⁽²²⁾



Figura 4. Efecto de la luz en el desarrollo de micelio y en la esporulación de *Trichoderma spp.* ⁽²²⁾

1.3.2. CONTROL BIOLÓGICO

Trichoderma spp. es un hongo filamentoso del cual se sabe por referencias bibliográficas que las esporas que produce tienen un efecto antagónico sobre muchas enfermedades y plagas como las producidas por: *Fusarium Oxysporum* en cebolla, maíz, tomate, etc. *Pseuoperonosporas cubensis* causando la enfermedad “Mildeu velloso” en cultivo de cucurbitáceas, *Sclerotinia Sclerotium* causando la podredumbre blanca en lechuga y *Bipolaris Orizae* la cual infecta cultivos de arroz. ⁽²³⁾⁽²⁴⁾

Además de esto, tiene efectos positivos en los campos ya que alivia el estrés abiótico, por sequía, salinidad y calor. A su vez, induce el sistema de respuesta ante

enfermedades, se sabe que al colonizar las raíces de una planta cambia el metabolismo de las mismas haciendo que produzca enzimas como peroxidasas, glucanasas, quitinasas, entre otras, que la hacen resistentes a los efectos negativos de las ROS como el envejecimiento y muerte prematura. También ayuda a la mayor absorción de agua y nutrientes incluso en estrés osmótico. ⁽¹²⁾⁽¹⁶⁾

1.4. MEANISMO DE ACCION

El género *Trichoderma* tiene un mecanismo de acción llamado Hiperparasitismo necrotrófico o Mycoparasitismo representado en la Figura 5. Una vez en el suelo intenta encontrar patógenos enemigos liberando proteasas que harán que el hongo patógeno libere pequeñas moléculas péptidas, las cuales pueden unirse a receptores de Proteína G o a Receptores sensibles de Nitrógeno, esta unión está presente en la superficie del hongo *Trichoderma* lo cual desencadena la cascada de reacciones de la Proteína G y de las proteinkininas mitogénicamente activadas. Las funciones de estas dos cascadas de reacciones regulan factores de transcripción aún desconocidos que producirán hidrolasas para lisar la pared celular, provocando que se unan el hongo patógeno y el hongo *Trichoderma*. Después, el hongo patógeno secreta metabolitos secundarios y ROS producto del estrés sufrido desintoxicándose en *Trichoderma spp.* ⁽²⁵⁾

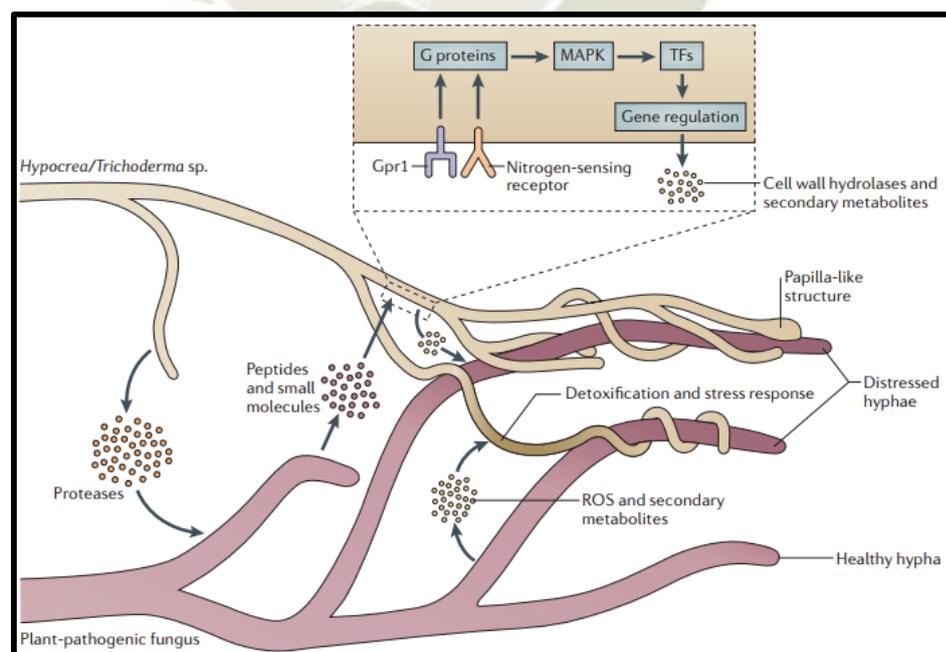


Figura 5. Mecanismo de acción (micoparasitismo) de *Trichoderma spp.* ⁽²⁵⁾

1.3.4. PRODUCCIÓN DE ESPORAS DE *Trichoderma spp.*

Las esporas de *Trichoderma spp.* pueden producirse de casi cualquier materia que contenga carbohidratos y glucosa. Lo que diferencia a los sustratos son las concentraciones de esporas obtenidas con cada uno de ellos, como se puede ver en la Figura 6 a continuación.

Núm.	Tratamiento (Simbología)	Número de esporas x 10 ⁸ ml ⁻¹	Porcentaje de Viabilidad
6	Olote de maíz picado	4.43 a ²	99.0 a ²
7	Grano de arroz	3.13 b	97.5 ab
9	Grano de alpiste	2.31 c	94.3 abc
11	Cáscara de cacahuate picada	1.98 d	93.8 abcd
8	Grano de sorgo	1.72 e	94.8 abc
2	Cáscara de arroz	1.47 f	97.0 ab
13	Rastrojo de maíz picado	1.40 g	93.0 abcd
12	Rastrojo de soya picado	1.12 h	94.0 abcd
3	Cáscara de ajo picada	1.12 h	87.8 d
5	Cáscara de ajonjolí picada	1.11 h	95.5 abc
1	Cáscara de tomate picada	0.73 i	92.5 bcd
15	Cáscara de café	0.57 j	91.8 bcd
4	Cáscara de cacao	0.42 k	89.3 cd
14	Vaina de fríjol picada	0.25 l	92.5 bcd
10	Grano quebrado de maíz	0.25 l	90.3 cd

Figura 6. Concentración y viabilidad de esporas de *Trichoderma spp.* En distintos sustratos. ⁽²⁶⁾

Actualmente están en el mercado diferentes formulaciones de esporas de *Trichoderma spp.* la mayoría de estos productos utilizan el arroz como su sustrato estrella ya que asegura una concentración adecuada para su efectividad. Dichos productos se pueden observar a continuación en la Tabla 4. ⁽²⁶⁾

Tabla 4. Productos disponibles en el mercado de *Trichoderma spp.* ⁽²⁷⁾

PRODUCTO	EMPRESA
Triconova	Novagri
Trichomax	Solagro S.A.C
Excalibur Gold	Disagro
Biosa	Tricho- Biosa
TrichoH	Agrobiotecnia
Triderma	Ideas Biologicas
Tricobiol	Agricola Tanausu

1.3.4.1. PROTOSCOLOS DE PRODUCCIÓN CONOCIDOS

SENASA publicó el Manual de producción y manejo de Hongos antagonistas, en donde se detalla los métodos de obtención de las esporas de *Trichoderma spp.* ⁽²⁸⁾

En otros artículos revisados se tiene casi exactamente la misma metodología, varían simples pasos y unidades de volumen, ya que SENASA tiene el objetivo de producir las esporas comercialmente, mientras que en otras metodológicas solo se hace con el fin de investigar, sin considerar la viabilidad económica. ^(26,28)

SENASA utiliza como sustrato arroz cocido, y obtiene esporas mediante producción en bolsas o en bandejas, el inóculo de *Trichoderma spp.* lo preparan a partir de su cepario en una suspensión de melaza ⁽²⁶⁾

- Según su metodología de **producción en bolsas**, el tiempo de producción es de 5 a 8 días, de los cuales los primeros tres las bolsas deben permanecer en oscuridad, antes de pasar a la etapa del secado para minimizar la cantidad de sustrato presente, esta metodología representada en la Figura 7. ⁽²⁸⁾⁽²⁶⁾



Figura 7. Producción de esporas en bolsas. ⁽²⁶⁾

- Según su metodología de **producción en bandejas**, Se hace igual que con las bolsas hasta que se produce el micelio satisfactoriamente , es ahí donde el arroz será pasado en condiciones asepticas a las bandejas donde esporulará como se puede observar en la Figura 8.⁽²⁸⁾



Figura 8. Producción de esporas en bandejas. ⁽²⁶⁾

1.4. ARROCILLO

En la Región Arequipa se tienen 7309 Ha destinadas a producción de arroz cáscara. A nivel nacional la producción de arroz cáscara es significativa como se puede ver en la Figura 10. La Región Arequipa produce de 125-250 miles de Toneladas al año. Tomando en cuenta que el arrocillo o arroz quebrado representa el 15% de la producción de arroz cáscara como se ve en la Figura 9, estaríamos hablando de entre 18.75 y 37.5 miles de toneladas de arrocillo anualmente. Estos si bien entran al mercado con un precio menor al grano de arroz, su distribución y venta no está del todo asegurada, entonces se podría asumir que un gran porcentaje será desechado. ⁽³⁾⁽⁴⁾



Figura 9. Composición del arroz cáscara ⁽²⁹⁾.

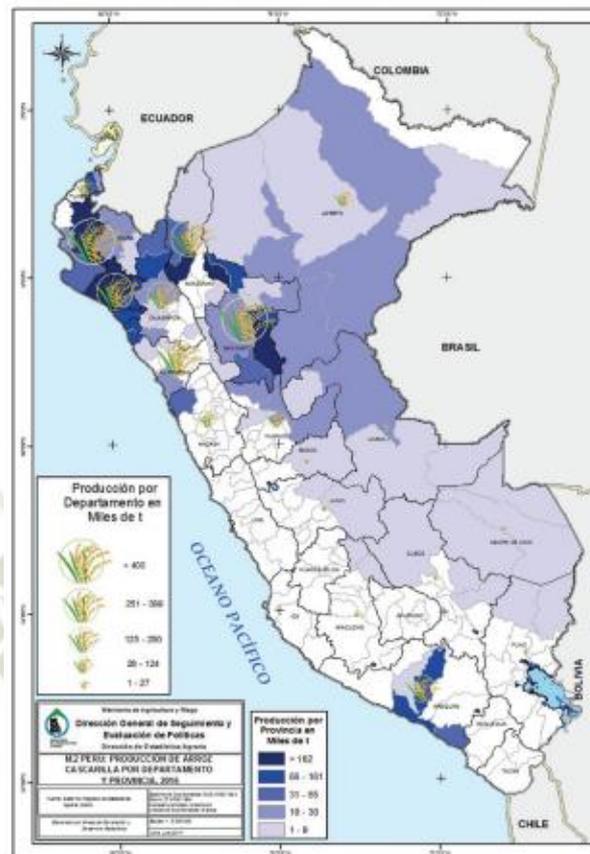


Figura 10. Producción de arroz cascara por regiones en el Perú. Código de colores.⁽⁴⁾

1.5. FITOPATOGENOS MAS COMUNES

Todos los cultivos corren el riesgo de ser infectados por algún patógeno, en cualquiera de sus etapas de crecimiento y desarrollo como se puede observar en la Tabla 5. enfocada a las enfermedades fúngicas que las esporas de *Trichoderma spp.* pueden controlar.⁽²¹⁾

Tabla 5. Hongos entomopatógenos más comunes y los cultivos que afectan ^(9,11-14,21,30,31).

HONGO ENTOMOPATÓGENO	CULTIVO QUE AFECTA
Rhizoctonia solani	Arroz, papa.
Sclerotium rolfsii	Causa el Tizón sureño en bastantes cultivos.
Puccinia	Trigo.
Magnaporthe Oryzae	Arroz.
Fusarium graminearum	Toda la gama de cereales.
Fusarium oxysporum	Causa pudrición basal en numerosos cultivos.
Botrytis cinérea	Afecta a más de 200 especies de plantas

1.5.1 GENERO *Fusarium spp.*

El género *Fusarium* es un grupo de hongos filamentosos ampliamente distribuidos en el suelo y plantas. Debido a su capacidad de crecer a 37°C, son considerados oportunistas. Produce toxinas, entre las más comunes están: las fumonisinas, tricotecenos y zearalenonas.⁽¹⁹⁾

Al microscopio, la fiálide es generalmente fina, con forma de botella, los macroconidios presentan forma de media luna, hialinos y septados. En medio sólido presenta colonias algodonosas de inicio blanco que se tornan en tonalidades naranjas, como se puede apreciar en la Figura 11⁽³²⁾



Figura 11. Vista microscópica y macroscópica de *Fusarium spp.*⁽³²⁾.

Son la causa de cuantiosas pérdidas por causar la enfermedad conocida como fusariosis en cultivos de cereales entre otros como la cebolla y el tomate. Por otro lado, pueden causar infecciones sistémicas en personas y animales inmunocomprometidos. Son patógenos facultativos, capaces de sobrevivir en el agua y suelo alimentándose de materiales en descomposición. Son importantes agentes de contaminación en los laboratorios de microbiología. Algunas especies son fitopatógenas.⁽¹⁰⁾

1.5.1.1 IMPACTO EN LOS CULTIVOS NACIONALES Y LOCALES

Según estadísticas de fines del año 2017 y la primera mitad del año 2018, en el Perú tenemos aproximadamente 2 millones y medio de Ha dedicadas a la agricultura, 8 000 de las cuales son de la región de Arequipa. Los principales productos agrícolas cultivados en nuestra región son: cebolla, ajo, arroz cáscara, papa, palta, banano y uva.⁽⁴⁾

Según el INEI, la región Arequipa es la mayor productora de cebolla a nivel nacional como se puede ver en la Figura 12, obteniendo aproximadamente el 65% de cebolla nacional, superando las 64 000 toneladas anuales. También somos responsables del 43% del ajo cosechado nacionalmente, llegando a las 14 000 toneladas anuales.^(3,4)

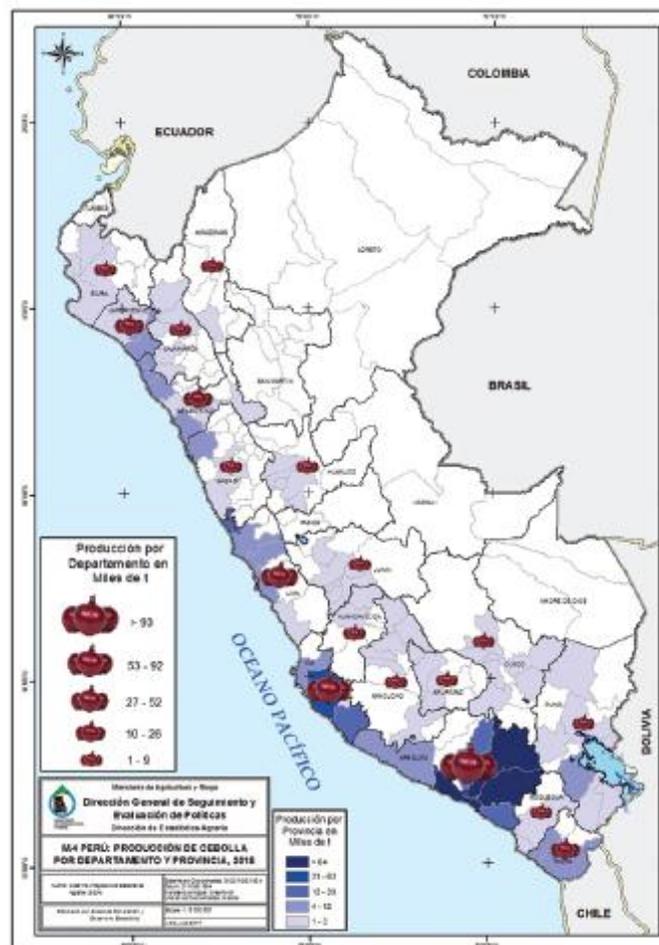


Figura 12. Producción de cebolla por región y provincia, 2018.⁽³⁾

Es importante hacer énfasis en estos dos productos agrícolas, ya que se ven afectados por el hongo patógeno *Fusarium spp.* causándoles la podredumbre basal, dejándolos sin valor comercial. En el boletín mensual “El Agro en Cifras” de Mayo del 2018, se reportan los fungicidas más usados y comercializados en el Perú, como se puede observar en la Tabla 6.⁽¹⁹⁾

Tabla 6. Fungicidas más usados en el Perú, mayo 2018.⁽³⁾

FUNGICIDA	PRECIO (S./)	COMPOSICIÓN
Antracol	51 / Kg	Propineb
Curzate	76 /Kg	Mancozeb, Cymoxanil
Fitoraz 76% PM	76/ Kg	Propineb , Cymoxanil
Manzate 200	30.5 / Kg	Mancozeb
Kumulos DF	22 / Kg	Azufre Micronizado
HERBICIDA MAS USADO	PRECIO (S./)	COMPOSICIÓN
RoundUp	29 / Litro	Glifosato

La mayoría de estos fungicidas son parte de la familia de los ditiocarbamatos, estos no permanecen en el tejido foliar mucho tiempo y son fácilmente lavados por la lluvia, por esta razón es que se requiere de repetitivas aplicaciones al cultivo infestado, representando una desventaja ya que aumenta el riesgo de exposición de los agricultores y el medio ambiente, siendo los recursos hídricos públicos los más contaminados. Los Ditiocarbamatos influyen bioquímicamente en el daño y muerte celular, los animales intoxicados mueren por fallas cardíacas o respiratorias, también se tiene referencias de que es un agente carcinógeno en potencia.⁽³³⁾

Un dato preocupante es que el Herbicida más usado en el país es el Glifosato, formulado como Round Up por Monsanto. Este es un herbicida de amplio espectro de la familia de los organofosforados, se ha demostrado que elimina la flora y fauna microbiana del suelo. Al ser residual contamina los acuíferos, produce alteraciones y malformaciones en el desarrollo embrionario no sólo en vegetales sino también en animales. Así mismo, puede producir cáncer, enfermedades respiratorias y otras enfermedades en el ser humano.⁽³⁴⁾

1.6. PRUEBA DE ANTAGONISMO

Para poder reportar los resultados de las interacciones entre organismos patógenos y antagonistas, se debe realizar una prueba de antagonismo en un cultivo dual. Para evaluar el antagonismo o la interacción entre ambos organismos se puede usar indicadores tanto cualitativos como cuantitativos.

1.6.1. CUANTITATIVA

- PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO RADIAL

Se siembran ambos microorganismos en los extremos de una placa Petri como se grafica en la Figura 13, para observar si se da el antagonismo y poder cuantificarlo en porcentaje y poder comparar la efectividad del agente controlador biológico con la de otros. ⁽⁹⁾

Para dar resultados se toman las medidas de diámetro de las colonias después de 72, 96 y 120 horas después de su inoculación. Se calcularon los valores medios de porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) por la fórmula que se muestra en la Ecuación 1. ⁽³⁵⁾

$$PICR = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

Donde:

R1: Diámetro del testigo.

R2: Diámetro del organismo ensayado.

Ecuación 1. Ecuación para calcular el porcentaje de inhibición de antagonismo: ^(9,35)

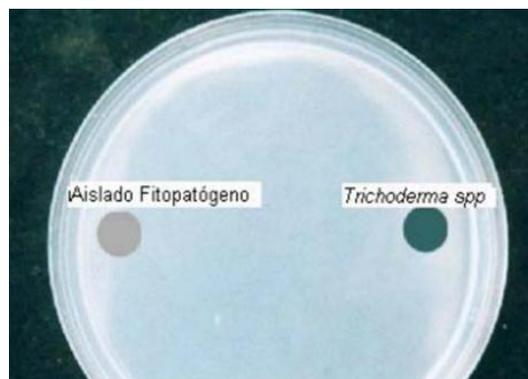


Figura 13. Diagrama de prueba de antagonismo en cultivo dual. ⁽⁹⁾

1.6.2. CUALITATIVA

Otra alternativa para interpretar las interacciones de antagonismo entre los microorganismos enfrentados es observando macroscópicamente como se ha visto afectado el crecimiento del patógeno ante el antagonista o viceversa.

Han sido propuestas diferentes reacciones por Jhonson et al.

- En la placa Petri los microorganismos, tanto patógeno como antagonista crecen mezclándose, lo cual indica que el agente antagonista no genera **ningún tipo de acción controladora** hacia el patógeno.⁽³⁶⁾
- En la placa Petri se observa una **inhibición por contacto**, ya que el agente antagonista crece abriéndose paso a través del patógeno. Da la apariencia que el crecimiento del patógeno se retrae al contacto con el antagonista, pero, de manera más lenta.⁽³⁶⁾
- En la placa Petri se observa una **inhibición mutua por contacto**. Es decir, al encontrarse ambas poblaciones se ven inhibidas y se retraen cada una hacia su lado de origen. Es característico ver un espacio entre ambas colonias en la placa.⁽³⁶⁾
- En la placa Petri se observa una **inhibición de uno de los microorganismos a distancia**, se puede observar que el patógeno no crece acercándose hacia el antagonista, solo se ve el crecimiento del antagonista a través de la zona libre del medio o zona de contacto.⁽³⁶⁾
- En la placa Petri se evidencia una **inhibición mutua a distancia**, es decir ninguno de los dos microorganismos tanto antagonista como patógeno crece, se concluye que ambos se inhiben entre ellos mismos sin necesidad de entrar en la zona de contacto.⁽³⁶⁾

A su vez, hay una escala de calificación de la acción antagonista propuesta por Bell et al con bases cualitativas como se puede observar en la Tabla 7.⁽³⁷⁾

Tabla 7. Escala utilizada por Bell et al. Para la evaluación de la capacidad antagonica de los biocontroladores. ⁽³⁷⁾

GRADO	DESCRIPCION DE ANTAGONISMO
1	Antagonista crece encima de microorganismo patógeno
2	Microorganismo antagonista cubre dos tercios del medio de cultivo
3	Microorganismos antagonista y patógeno crecen hasta la mitad del cultivo
4	Microorganismo patógeno cubre dos tercios del medio de cultivo
5	Patógeno crece encima de microorganismo antagonista

1.7. PLANEAMIENTOS FACTORIALES

En la actualidad la mayoría de procesos industriales y planeamientos experimentales requieren de técnicas de optimización para poder aumentar sus utilidades, rendimiento o productividad a la vez que disminuyan uso de recursos monetarios y de tiempo. ⁽³⁸⁾

Años atrás, para resolver problemas experimentales que estudiaban los efectos en el resultado buscado de más de un factor se llevaban a cabo experimentos conocidos como “one-at-a-time”, estos consistían en escoger un factor al azar del cual se investigaría, variando sus niveles y manteniendo el resto de los factores fijos en un nivel asumido por el investigador, esto se hacía hasta haber variado todos los niveles de cada factor. Si bien se requería de demasiadas pruebas, tiempo para realizarlas y recursos para implementarlas; su mayor desventaja se encuentra en su falta de enfoque en las interacciones, ya que no tomaba en cuenta que los resultados podrían verse influenciados en una mayor proporción por la interacción de dos factores que por uno solo. ⁽³⁹⁾

Para poder incluir el efecto de las interacciones en los resultados finales, se empezó a utilizar matrices que incluyeran todas las combinaciones posibles entre todos los factores y sus respectivos niveles, si bien este método explora los resultados de todo el campo experimental, requiere de una inmensa cantidad de ensayos. A este método se le añadió un planeamiento experimental factorial para elaborar la matriz de ensayos obteniendo así el más eficaz de los tres ya descritos, ya que al estar asociado

al análisis de superficies de respuesta asegura una mejor calidad y precisión de la información sobre el óptimo teórico puesto que, elimina el factor del error experimental. ⁽⁴⁰⁾

1.7.1. EXPERIMENTOS FACTORIALES CON “k” FACTORES.

Dichos experimentos factoriales están diseñados específicamente para estudiar paralelamente varias combinaciones entre los niveles de dos o más factores en la respuesta. Esto es importante ya que la finalidad de realizar todas estas pruebas es llegar a un modelo que describa el comportamiento general del problema estudiado, para poder optimizar su resultado. ^(40,41)

Los diseños 2^k tienen la estructura de una potencia, siendo K la cifra de factores analizados y el número dos, los niveles a ser evaluados. El resultado de esta operación representa el número de tentativas o ensayos a realizarse. Por ejemplo, un diseño factorial de 2^3 necesita 8 ensayos. ⁽⁴²⁾

Los planeamientos factoriales de 2^k son ampliamente usados en la industria, tales planeamientos permiten evaluar por separado los efectos individuales e interactivos de los factores cuando estos valores varían simultáneamente en un patrón de opciones diseñado especialmente. ⁽⁴³⁾

Cabe mencionar que los factores reciben letras del abecedario, mientras los niveles del factor suelen ser representados con los símbolos (+) y (-). ⁽⁴³⁾

1.7.2. METODOLOGIA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA.

Esta metodología acompaña o complementa a los planeamientos factoriales ya que con los resultados obtenidos es que se puede comprender la dinámica de funcionamiento y la relevancia de los factores seleccionados.

Al comprender la dinámica de funcionamiento del problema experimental es que, con ayuda de técnicas estadísticas se puede obtener los coeficientes para el modelo matemático, cuya función es predecir el valor exacto de la variable independiente teniendo en cuenta la influencia de todos los factores ya sea individualmente o por interacciones incluso en niveles no probados experimentalmente por el investigador. ^(44,45)

La mayoría de veces se obtienen modelos de primer orden (lineales) o de segundo orden (cuadráticos), dependiendo del comportamiento de los factores sobre la variable independiente o respuesta. Esta metodología reporta los valores obtenidos influenciados por un solo factor en graficas de dos dimensiones ó por interacciones de los mismos en graficas 3D o de contornos, como se puede ver en la Figura 14.^(43,46)

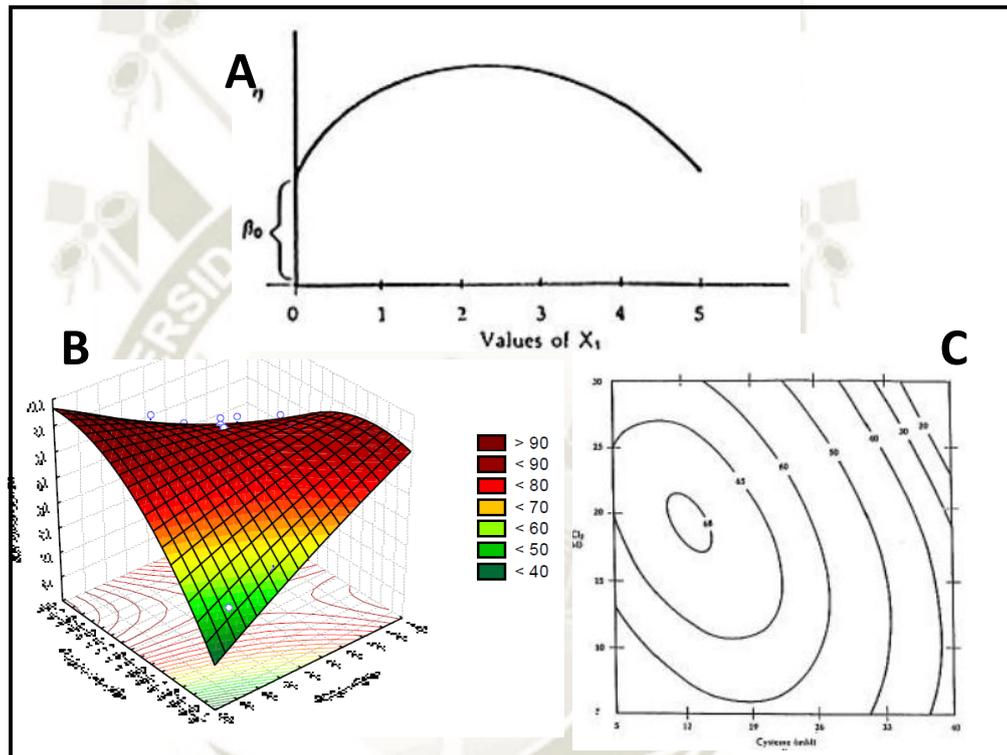


Figura 14. Modelos de gráficos obtenidos de superficies de respuesta: individual o de un solo factor (A), de interacciones o dos factores en: tres dimensiones (B) y en grafica de contornos (C)^(43,45,46)

En la Figura 14 se puede observar las tres diferentes maneras de representación que tiene la metodología de superficie de respuesta, dependiendo si está evaluando el efecto de uno o más factores. Cabe mencionar que en gráfico B con los códigos de colores se quiere representar el área donde se obtienen los mejores valores de la variable independiente, si bien es útil visualmente, el gráfico de contornos proporciona datos más exactos y es más fácil comparar los efectos de los factores.⁽⁴⁵⁾

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

2.1. MATERIALES

2.1.1. MUESTRAS Y/O UNIDADES BIOLÓGICAS:

Se utilizaron cultivos de *Trichoderma spp.* y *Fusarium spp.*, ambos aislados de suelo local Arequipeño. Para obtener el sustrato se adquirió del mercado “Mi mercado” localizado en la Av. Vidaurrázaga, Arequipa-Perú

2.1.2. MATERIAL DE LABORATORIO

2.1.2.1. MATERIAL DE VIDRIO

- Probeta de 500 mL
- Probetas de 100 mL
- Matraces 250 mL
- Beakers de 100 mL
- Pipeta de 10 mL
- Placas Petri
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Propipeta
- Pipeta Pasteur

2.1.2.2. INSUMOS Y REACTIVOS QUÍMICOS

- Agua Destilada
- Agar Sabouraud Glucosado
- Agar Papa Dextrosa
- Melaza
- Alcohol Etílico al 98%
- Sacarosa
- Azul de Lactofenol

2.1.2.3. EQUIPOS E INSTRUMENTACIÓN

- Balanza Analítica (Digital Precision ES-2000H)
- Autoclave (Kyntel XFS-280A)
- Microscopio Binocular Led Mod (Labor- Tech – BK-1201)
- Cocina Eléctrica (Practika)
- Olla de Aluminio (1.5 L - Ilko)
- Incubadora (Kert Lab – ODHG-9023A)
- Espectrofotometro (BOECO – S200)

2.1.3. OTROS

- Aspersor de plástico.
- Bolsas de Polipropileno.
- Mechero Bunsen
- Algodón de uso medicinal.
- Jeringa 10 mL.
- Perforador de escritorio.
- Espátula.
- Asa de Khole
- Escalímetro
- Tira de luces LED (Orange).

2.1.4. SOFTWARE

- Statgraphics Centurion XV versión 15.2 (StatPoint Inc., Warrenton, Virginia, EEUU)
- Microsoft Office Excel Professional Plus 2010 (Microsoft Corporation, Redmon, Whashington, EEUU)

2.2.METODOS

2.2.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL SUBPRODUCTO DE *Oryza sativa* (ARROZ)

Se hizo una caracterización del subproducto denominado “arrocillo” para obtener los valores de % de humedad y % de sólidos totales, usando el método rápido de termobalanza NMX-F-428, para calcular el % cenizas y % de sólidos volátiles se usó el método gravimétrico. Todos estos ensayos se realizaron en el Laboratorio de ensayo y control de calidad de la UCSM con sede en el campus universitario.

2.2.2. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Trichoderma spp.* POR ESPECTROFOTOMETRÍA.

2.2.2.1. OBTENCIÓN Y REPRODUCCIÓN DE *Trichoderma spp.*

La cepa de *Trichoderma spp.* se obtuvo del aislamiento y caracterización realizado en el proyecto “FORMULACIÓN DE UN BIOCONTROLADOR DE *Oidium spp.* EN BASE A FLORA NATIVA MICROBIANA DE *Origanum vulgare* (OREGANO)” financiado por la Universidad Católica de Santa María, una vez obtenido fue repicado en medio PDA líquido y sólido, así como en medio Sabouraud sólido, ver composiciones en Anexo 1, se mantuvo a temperatura constante de 25°C en una incubadora. También se observó al microscopio a 40X.

2.2.2.2. CURVA DE CRECIMIENTO DE *Trichoderma spp.*

Para estudiar su cinética de crecimiento y cuantificar el número de días que tiene cada etapa de su desarrollo en medio líquido se usó el método espectrofotométrico. Esto para establecer el comienzo y la duración de su etapa estacionaria la cual es la indicada para obtener el inóculo de *Trichoderma spp.* y realizar la siembra en las bolsas de arrocillo. Se tomó un cultivo de *Trichoderma spp.* en medio líquido PDA incubado por 20 días con el color verde característico, se utilizó un espectrofotómetro para evaluar la turbidez y relacionarlo con el crecimiento del hongo en el medio líquido, se realizó un barrido con esta muestra para determinar la longitud de onda en nm sensible a percibir cambios en la densidad del medio por su color. El medio líquido inoculado fue evaluado por 18 días, tomándose alícuotas de 1 mL cada 24 horas y manteniéndose en agitación constante.

2.2.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA HUMEDAD, LA DISPOSICIÓN DE AIREACIÓN Y LA CONCENTRACIÓN DE MELAZA EN LA PRODUCCIÓN DE ESPORAS DE *Trichoderma spp.*

2.2.3.1. DESARROLLO DE PRUEBA PRELIMINAR.

Esta prueba fue realizada con la finalidad de observar el crecimiento de *Trichoderma spp.* en el sustrato experimental y así poder determinar cuáles serían los factores a variar para realizar la optimización. El sustrato fue recolectado del Mercado “Mi Mercado”. Se siguió la metodología modificada antes usada por Aceves et al. para obtener esporas de *Trichoderma spp.* ⁽²⁶⁾

Se hizo la preparación del medio de crecimiento con 250 g arrozillo cocido, se prepararon 250 g de arrozillo crudo con 350 mL de agua común, a esto se adicionó 10 mL de una solución de melaza al 10% rociada uniformemente sobre el sustrato, se depositó el sustrato en bolsas de polipropileno, posteriormente se esterizaron a 161°C durante 30 minutos en autoclave. Se inoculó con 1 mL de suspensión de *Trichoderma spp.* en medio líquido PDA. En cada bolsa se implementó un sistema de aireación por perforaciones en las bolsas de polipropileno a 5 cm de altura por encima del sustrato y espaciadas por 3 cm entre ellas.

En el proceso de incubación las bolsas permanecieron a temperatura ambiente, los tres primeros días se encontraron en oscuridad, para favorecer la producción de micelio, posteriormente, las bolsas estuvieron iluminadas con tiras de luces LED las 24 horas de cada día para favorecer la esporulación, en el Anexo 2 se puede apreciar la cámara de crecimiento usada. Se esperó la contaminación del sustrato 14 días.

Para determinar la concentración de la unidad experimental, se enjuagó la bolsa que obtuvo resultados satisfactorios y se realizó un conteo en cámara de Neubauer, aquí no se realizaron pruebas de viabilidad. También se realizaron ensayos de % de humedad y % de sólidos totales al sustrato replicando sus condiciones de cocción, realizando las pruebas antes de inocularlo.

El ensayo se realizó tomando tres muestras de 1 g al azar del arroz cocido y se les depositó en crisoles, acto seguido fueron puestos en una estufa a 110° C para eliminar el agua, los crisoles fueron evaluados en peso cada quince minutos con una balanza analítica para mantener control de la pérdida del agua libre en el sustrato hasta que el peso del arrocillo se mantuvo prácticamente constante. A continuación, se calculó el % de Humedad y de Sólidos totales usando la Ecuación 2.⁽⁴⁷⁾

$$\% \text{ Humedad} = \frac{M1 - M2}{M1} \times 100$$

Donde:

M1: Peso inicial

M2: Peso final

Ecuación 2. Determinación de % humedad y sólidos totales.⁽⁴⁷⁾

2.2.3.2. ESCALAMIENTO DE LA PRUEBA PRELIMINAR

Para asegurar el crecimiento de *Trichoderma spp.* en las bolsas con arrocillo y melaza debía mantenerse el % de humedad de la prueba preliminar. Al mismo tiempo se necesitaba obtener una mayor cantidad de arrocillo cocido por lote de preparación para ahorrar recursos eléctricos y tiempo de espera.

Para escalar su producción se hicieron numerosas pruebas variando el peso del arrocillo crudo, desde 250 g a 1000 g, y el volumen de agua como fuera necesario hasta obtener las condiciones buscadas.

2.2.4. OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS DE PRODUCCIÓN MEDIANTE DISEÑO FACTORIAL

La optimización de parámetros de producción de esporas de *Trichoderma spp.* se llevó a cabo mediante un diseño factorial 2⁴ teniendo como factores cuantitativos: % de melaza, Volumen de melaza y volumen de inóculo; y como factor cualitativo el tipo de aireación. Los niveles fijados para cada uno de ellos se detallan en la Tabla 8.

Tabla 8. Factores y niveles del diseño experimental para la evaluación de producción de esporas de *Trichoderma spp.*

FACTORES		-1	0	+1
A	% Melaza	5	10	15
B	Volumen (mL) Melaza	5	10	15
C	Volumen (mL) inóculo <i>Trichoderma spp.</i>	1.5	2	2.5
D	Aireación	Perforaciones finas	-	Perforación grande

Los tratamientos realizados se muestran en detalle en la Tabla 9, los cuáles se ejecutaron de manera aleatoria y por duplicado para la evaluación de concentración de esporas UFC/mL y % de viabilidad de esporas.

La preparación de cada tratamiento fue basada en los resultados de la prueba preliminar variando únicamente el porcentaje de melaza, volumen de melaza, inóculo y tipo de aireación para cumplir con la matriz experimental mostrada, la recuperación de esporas se realizó el día 14 de incubación mediante el enjuague de las bolsas.

El cálculo de concentración de esporas se realizó mediante diluciones seriadas y conteos en cámara de Neubauer, la viabilidad se evaluó usando la técnica modificada del Manual de producción de hongos antagonistas de SENASA, se cuantificó el porcentaje de germinación de las esporas obtenidas de cada unidad experimental, se sembró cinco alícuotas equidistantes de 0.5 mL de suspensión de esporas en una placa Petri con medio sólido PDA, las cuales se incubaron a 20°C por 24 horas, pasado el tiempo de incubación se detuvo la germinación distribuyendo uniformemente en la placa colorante azul de lactofenol, se cortaron porciones cuadradas iguales del agar de 1cm de lado con ayuda de un bisturí para colocarlas en un portaobjetos y observarlas a 40X en un microscopio óptico. Se consideraron esporas germinadas aquellas cuyo tubo germinativo sea mayor al doble del tamaño de la espora.⁽²⁸⁾

Para calcular el porcentaje de esporas viables, se utilizó la Ecuación 3.

$$\% \text{ Germinación} = \frac{a}{a + b} \times 100$$

Donde:

A = Número de esporas germinadas

B = Número de esporas sin germinar

Ecuación 3. Determinación de % germinación. ⁽²⁸⁾

Los resultados fueron evaluados mediante el software *Statgraphics Centurión XV* empleando análisis de varianza multifactorial, diagrama de Pareto, graficas de efectos principales e interacciones y superficies de respuesta.

Tabla 9. Matriz experimental para la evaluación de producción de esporas de *Trichoderma spp.* Con variables codificadas.

# PRUEBA	A	B	C	D
1	+	+	+	+
2	-	+	+	+
3	+	-	+	+
4	-	-	+	+
5	+	+	-	+
6	-	+	-	+
7	+	-	-	+
8	-	-	-	+
9	0	0	0	+
10	0	0	0	+
11	+	+	+	-
12	-	+	+	-
13	+	-	+	-
14	-	-	+	-
15	+	+	-	-
16	-	+	-	-
17	+	-	-	-
18	-	-	-	-
19	0	0	0	-
20	0	0	0	-

Tabla 10. Matriz experimental para la evaluación de producción de esporas de *Trichoderma spp.* Con variables reales.

# PRUEBA	% Melaza	Volumen mL Melaza	Volumen mL Inoculo	Aireación
1	15	15	2.5	Grande
2	5	15	2.5	Grande
3	15	5	2.5	Grande
4	5	5	2.5	Grande
5	15	15	1.5	Grande
6	5	15	1.5	Grande
7	15	5	1.5	Grande
8	5	5	1.5	Grande
9	10	10	2	Grande
10	10	10	2	Grande
11	15	15	2.5	Finas
12	5	15	2.5	Finas
13	15	5	2.5	Finas
14	5	5	2.5	Finas
15	15	15	1.5	Finas
16	5	15	1.5	Finas
17	15	5	1.5	Finas
18	5	5	1.5	Finas
19	10	10	2	Finas
20	10	10	2	Finas

2.2.5. EVALUACIÓN DE ACCIÓN ANTAGONISTA DE ESPORAS DE *Trichoderma spp.* OBTENIDAS CONTRA *Fusarium spp.* POR CULTIVO DUAL.

2.2.5.1. OBTENCIÓN Y REPRODUCCIÓN DE *Fusarium spp.*

La cepa de *Fusarium spp.* fue obtenida del laboratorio de Diagnóstico de enfermedades fitopatógenas de la empresa Industrias Biotecnológicas del Sur SAC, fue aislada de una planta que padecía fusariosis. Una vez obtenida la cepa, se le replicó en medio PDA sólido y se mantuvo en cámara de incubación a 25°C.

2.2.5.2. PRUEBA DE ANTAGONISMO POR CULTIVO DUAL

Una vez obtenido el óptimo confirmado de la matriz experimental, se tomó una muestra de esporas de dicha unidad experimental, esta fue inoculada en medio PDA sólido. Se incubó en cámara a 25°C hasta que se observó un crecimiento uniforme en toda la placa. Acto seguido se procedió con el esquema de la Figura 15 para enfrentar ambos microorganismos.

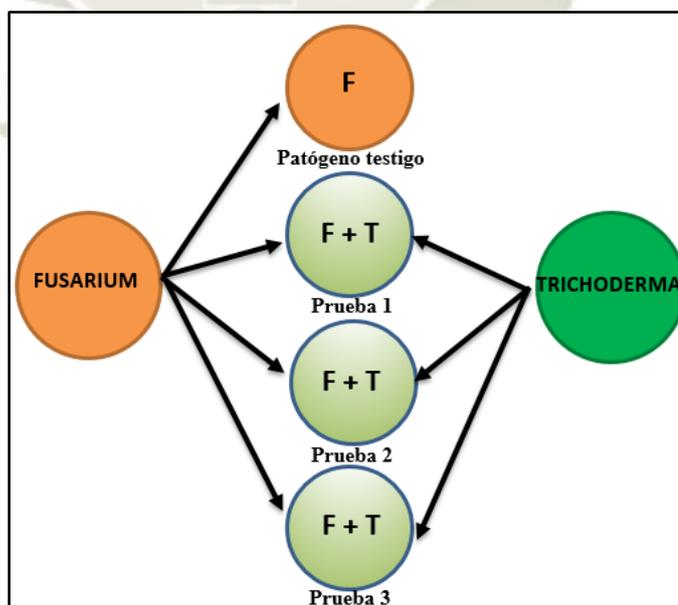
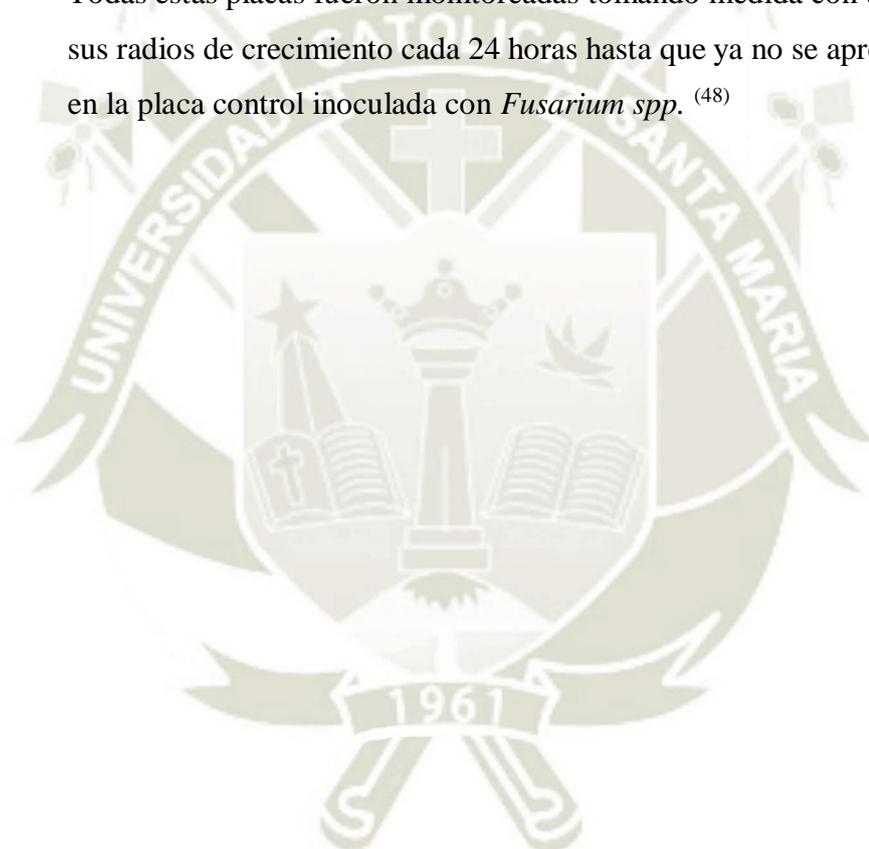


Figura 15. Esquema del experimento de acción antagonista de *Trichoderma spp.* contra *Fusarium spp.*

Para poder evidenciar la acción antagonista, se realizó la metodología de cultivo dual utilizada por Ezziyani el Al. Se tomaron ambos medios de cultivo sólidos, tanto de *Trichoderma spp.* como de *Fusarium spp.*, se sembraron cada uno de ellos por punción en una esquina diferente de una placa de Petri con medio PDA. La prueba se realizó por triplicado, dichas placas estuvieron en una cámara de crecimiento a 25°C. Paralelamente se sembró un control donde solo se encontraba *Fusarium spp.* para tomarlo en cuenta como referencia del crecimiento regular del microorganismo sin presencia de ningún antagonista. Todas estas placas fueron monitoreadas tomando medida con un escalímetro de sus radios de crecimiento cada 24 horas hasta que ya no se aprecie proliferación en la placa control inoculada con *Fusarium spp.* ⁽⁴⁸⁾



CAPITULO III:

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL SUBPRODUCTO DE *Oryza sativa* (ARROZ).

El sustrato a analizar, arrocillo, fue evaluado por el laboratorio de Control de Calidad de la Universidad Católica de Santa María. Se encargaron determinaciones de porcentaje de humedad, sólidos volátiles y de cenizas, los resultados reportados se ven en la Tabla 11 a continuación.

Tabla 11. Resultados de los ensayos gravimétricos del sustrato “arrocillo”

% Humedad	% Sólidos Volátiles	% Cenizas
11.51	87.83	0.66

Se obtuvo un porcentaje de humedad de 11.51, esto representa la cantidad de agua presente en los granos de arrocillo crudo, la cual sirve para aportar peso al grano, mas no contiene ninguna sustancia nutritiva. Por otro lado, se encuentran los Sólidos Volátiles representando un 87.83% de materia orgánica, como proteínas, grasa y carbohidratos, aportando nutrientes necesarios para la proliferación de *Trichoderma spp.* Por último, las sales minerales en forma de cenizas representan menos del 1%.⁽⁴⁹⁾

Tabla 12. Resultados de determinaciones gravimétricas de distintos sustratos, en porcentajes.⁽²⁶⁾

PRODUCCIÓN DE ESPORAS	SUSTRATO	% HUMEDAD	% SST	%CENIZAS
+	Olote de Maíz picado	8.09	91.94	2.18
	Grano de Arroz	12.56	87.44	3.66
	Grano de Alpiste	9.14	90.86	13.48
	Cáscara de Arroz	0.11	99.89	22.22
-	Rastrojo de Maíz	7.46	92.54	9.49
	Cáscara de Café	12.54	87.46	19.22
	Cascara de Cacao	9.74	90.26	7.51
	Grano quebrado de maíz	11.16	88.84	3.16

En el estudio realizado por Aceves et al, se probaron distintos sustratos orgánicos para comparar las concentraciones obtenidas de esporas de *Trichoderma spp.*, en la Tabla 12 se puede observar los resultados de las determinaciones gravimétricas que se les realizó a algunos de los sustratos potenciales, siendo los cuatro primeros los que resultaron tener un mayor índice de crecimiento de *Trichoderma spp.* a comparación de los cuatro últimos que, tuvieron resultados opuestos.

Según los valores reportados de la Tabla 12, se puede inferir que los sustratos con menor cantidad de cenizas y a la vez un alto contenido de sólidos totales son los más eficaces. Sin embargo, observando la cáscara del arroz esta tiene el mayor contenido de cenizas en toda la tabla y el mayor contenido de sólidos totales de todos. Se puede suponer que por esta razón conserva una concentración bastante alta a pesar de su alto contenido de cenizas.

El grano de arroz es el sustrato más utilizado para producción industrial, siendo usado así por SENASA y otros emprendimientos de menor envergadura. Según la Tabla 12, se puede ver que cuenta con un 87.44% de sólidos totales, 12.56% de agua y 3.66% de cenizas (incluidas en los sólidos totales). Comparando dichos datos con los obtenidos del arrocillo es que se puede decir que la cantidad de agua en ambos difiere por menos de 1%, mientras que la cantidad de cenizas en el grano de arroz es mucho mayor que en el arrocillo superándola por 3% exactamente. Esta diferencia le da una ventaja al arrocillo, ya que un mayor volumen del arrocillo está compuesto por nutrientes.⁽²⁸⁾

El maíz quebrado tiene muchas similitudes con el arrocillo, ya que ambos son subproductos industriales. Sin embargo, por su composición el arrocillo es más nutritivo por su bajo porcentaje de cenizas (0.66%), aun ambos teniendo un valor similar de humedad presente. Al parecer esta diferencia es bastante significativa al momento de ser aprovechado el sustrato para la proliferación de distintos microorganismos, entre ellos *Trichoderma spp.*

3.2. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Trichoderma spp.* POR ESPECTROFOTOMETRÍA.

3.2.1. OBTENCIÓN Y REPRODUCCIÓN DE *Trichoderma spp.*

Una vez obtenida la cepa de *Trichoderma spp.* fue repicada por punción en medio PDA, tanto sólido como líquido y en medio sólido Sabouraud. Se observaron colonias blancas los primeros días de crecimiento mientras crecía el micelio, las cuales cambiaron a colores verdes, en cuanto se inició la conidiogénesis; se presentó un aspecto polvoriento en la parte superior atribuido a las esporas presentes.

En el medio líquido se presentó una coloración amarilla verdosa y en la parte superior el mismo micelio observado en medio sólido.

A su vez, se observaron las colonias utilizando un microscopio óptico, usando cinta adhesiva y un portaobjetos. Se pudo observar las esporas características del hongo como se ve en la Figura 18.

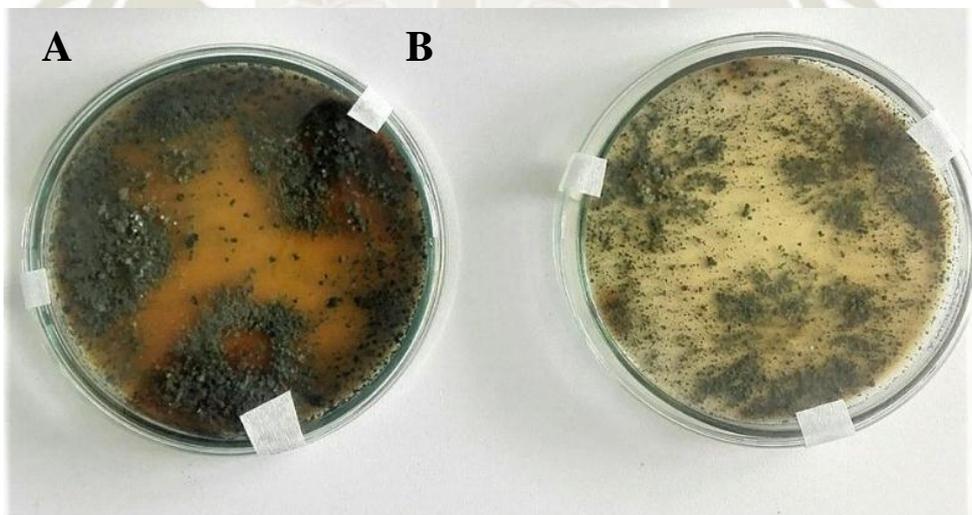


Figura 16. *Trichoderma spp.* En cultivos sólidos A: medio Sabouraud ; b: medio PDA.

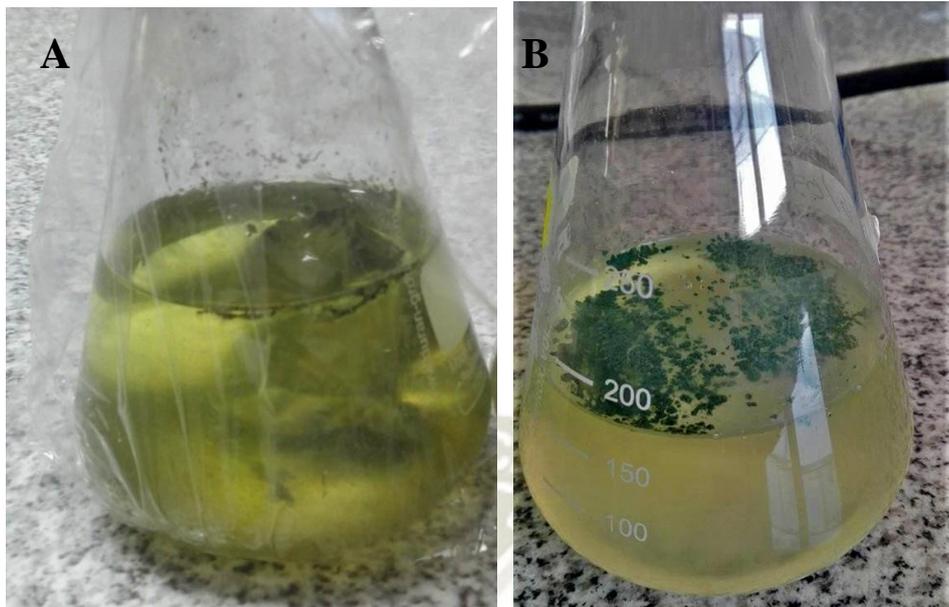


Figura 17. *Trichoderma spp.* En medio líquido PDA. A: micelio sumergido; b: micelio intacto.



Figura 18. Vista microscópica a 40X de conidias de *Trichoderma spp.*

3.2.2. CURVA DE CRECIMIENTO DE *Trichoderma spp.*

La curva de crecimiento se realizó con el objetivo de determinar la duración de cada una de las etapas de crecimiento del hongo obtenido, *Trichoderma spp.*

El resultado del barrido espectrofotométrico fue una longitud de onda de 430 nm. Esta longitud corresponde a la región final del espectro transmitido del color verde, la cual limita con la región inicial del color amarillo. Dichas longitudes y la de los demás colores del espectro visible y sus respectivos colores complementarios pueden verse en el Anexo 3.

Tabla 13. Factores para el análisis de medidas repetidas en la evaluación del crecimiento de *Trichoderma spp.*

FACTOR	NOMBRE	NIVELES
INTRASUJETO	Tiempo (Horas)	T0
		T24
		T48
		T72
		T96
		T120
		T144
		T168
		T192
		T216
		T240
		T264
		T288
		T312
		T336
		T360
T384		
T408		
T432		

* Fuente: Statgraphics Centurión XV.

Esto es muy razonable ya que el color del cultivo es un color amarillo verdoso como se puede ver en la Figura 17. Se utilizó como muestra blanco una alícuota de medio líquido PDA sin ser inoculado, su absorbancia fue de 0.529, dicha cifra fue restada de las medidas de absorbancia de las muestras a distintas horas luego de la inoculación del medio PDA con *Trichoderma spp.*

Para poder evidenciar si efectivamente hubo un cambio significativo en el crecimiento de *Trichoderma spp.* mientras transcurría el tiempo de evaluación, se realizó un análisis estadístico de medidas repetidas, donde se tomó el tiempo como intrasujeto con sus diferentes variaciones, como se puede ver en la Tabla 13.

Tabla 14. Resultados estadísticos descriptivos para los valores de absorbancia obtenidos del crecimiento de *Trichoderma spp.*

Horas	Día	Promedio	Rango	Desviación Estándar	Coefficiente de variación
0	0	0+/-0		0.0000	
2	0	0+/-0		0.0000	
24	1	0.08	+/- 0.01	0.0014	1.77%
48	2	0.29	+/-0.04	0.0042	1.47%
72	3	0.36	+/-0.03	0.0035	0.99%
96	4	1.65	+/-0.30	0.0339	2.06%
120	5	2.3	+/-0.97	0.1075	4.68%
144	6	2.83	+/-0.55	0.0608	2.15%
168	7	3.27	+/-0.02	0.0021	0.06%
192	8	3.37	+/-0.10	0.0113	0.34%
216	9	3.37	+/-0.11	0.0127	0.38%
240	10	3.38	+/-0.11	0.0127	0.38%
264	11	3.33	+/-0.15	0.0170	0.51%
288	12	3.36	+/-0.05	0.0057	0.17%
312	13	3.38	+/-0.06	0.0064	0.19%
336	14	3.35	+/-0.04	0.0042	0.13%
360	15	3.36	+/-0.04	0.0049	0.15%
384	16	3.39	+/-0.10	0.0113	0.33%
408	17	3.35	+/-0.15	0.0163	0.49%
432	18	3.38	+/-0.06	0.0071	0.21%

* Fuente: Statgraphics Centurión XV.

Los resultados del análisis estadístico de medidas repetidas (Tabla 14) se muestran los promedios para cada tiempo evaluado de las medidas de absorbancia con respecto a sus repeticiones, mostrando valores de desviación estándar bastante bajos, lo cual se puede comprobar con los coeficientes de variación siendo el más alto 4,68%.

Este valor fue obtenido durante el quinto día de evaluación, exactamente a las 120 horas estando en la mitad de la fase de crecimiento exponencial como se puede observar en el Figura 19. Dicha diferencia en los datos de repetición podría ser explicada por el gran aumento natural del crecimiento del microorganismo en esta etapa, el cual se puede ver influenciado por numerosos factores tales como la agitación del medio y las condiciones de transporte al laboratorio donde se realizaron las pruebas. Aun tomando en cuenta la ligera diferencia de valores entre las repeticiones, esto no es significativo por su bajo porcentaje.

El análisis de medidas repetidas requiere cumplir con el supuesto de esfericidad para poder seleccionar las pruebas estadísticas subsecuentes; por ello se realizó la prueba de esfericidad W de Mauchly la cual reportó un valor P menor a 0.05 el cual indica que no existe esfericidad asumida y que es necesario aplicar correctores (mostrados en el Anexo 4 para poder identificar diferencias significativas en los efectos).

Tabla 15. Análisis de varianza intrasujeto de efectos en el crecimiento de *Trichoderma spp.* a través del tiempo.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Valor F	Valor p
Tiempo	74.638	1.000	74.638	4789.368	0.009
Error(TIEMPO)	0.016	1.000	0.016		

* Fuente: Statgraphics Centurión XV.

El análisis de varianza para la evaluación del efecto del tiempo fue realizado con el estadístico de Greenhouse-Geisser debido a que no se cumplió el supuesto de esfericidad, obteniendo un valor-p de 0.009 indicando que existen diferencias estadísticamente significativas con un 95% de confianza entre los valores de absorbancia reportados para el crecimiento de *Trichoderma spp.* en diferentes días de medición lo cual se puede evidenciar en la Tabla 15 del Análisis intrasujeto.

Tabla 16. Comparaciones múltiples para la absorbancia registrada para el crecimiento de *Trichoderma spp.* mediante LSD Fisher.

Horas	Día	Promedio	Rango
0	0	0+/-0 ^a	
2	0	0+/-0 ^a	
24	1	0.08 ^b	+/-0.01
48	2	0.29 ^c	+/-0.04
72	3	0.36 ^d	+/-0.03
96	4	1.65 ^e	+/-0.30
120	5	2.3 ^f	+/-0.97
144	6	2.83 ^g	+/-0.55
168	7	3.27 ^h	+/-0.02
192	8	3.37 ⁱ	+/-0.10
216	9	3.37 ⁱ	+/-0.11
240	10	3.38 ⁱ	+/-0.11
264	11	3.33 ⁱ	+/-0.15
288	12	3.36 ⁱ	+/-0.05
312	13	3.38 ⁱ	+/-0.06
336	14	3.35 ⁱ	+/-0.04
360	15	3.36 ⁱ	+/-0.04
384	16	3.39 ⁱ	+/-0.10
408	17	3.35 ⁱ	+/-0.15
432	18	3.38 ⁱ	+/-0.06

* Fuente: Statgraphics Centurión XV.

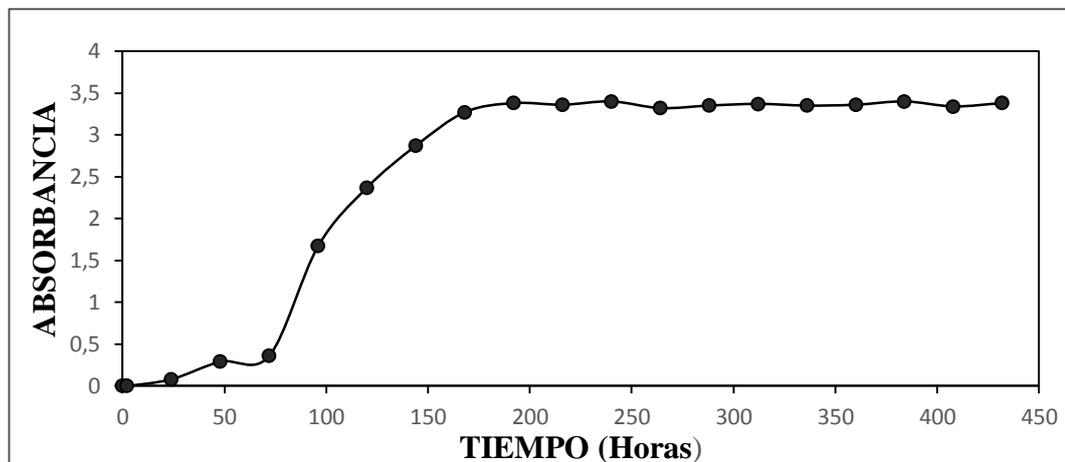


Figura 19. Gráfico de Cinética de crecimiento de *Trichoderma spp.*

Según la Tabla 17, se puede agrupar los datos y así inferir la fase en que el crecimiento se encontraba por su similitud estadística probada y apoyar los datos visualizados en la Figura 19 donde se puede ver que la fase de adaptación tuvo lugar entre el día cero hasta los tres días, la fase logarítmica da inicio a partir del día tres hasta el día siete, donde se ve que empieza una clara meseta hasta el día dieciocho, que representaría la fase estacionaria donde podemos tomar una alícuota del medio para inocular las bolsas de arrozillo y melaza. Solo se tomaron muestras hasta el día dieciocho por disponibilidad del equipo y el laboratorio donde se encuentra.

Como se sabe, el hongo *Trichoderma spp.* ha sido ampliamente estudiado y probado como biocontrolador de diferentes microorganismos, en dichas investigaciones también se espera hasta tener la mayor proliferación posible en el medio líquido antes de tomar la alícuota de prueba, es decir la fase estacionaria del crecimiento.

Contrastando los resultados se puede observar que la cepa de *Trichoderma spp.* probada tiene una alta similitud de cinética de crecimiento con algunas otras de las especies del hongo, como *Trichoderma spp.*, la cual según reporta El-Sharkawy et al, alcanza su etapa estacionaria al día 5; *Trichoderma harzianum*, la cual según reportan De la Cruz-Quiroz et al, Lopez-Ramirez et al y Braun et al alcanza su etapa estacionaria entre los días 5 y 7; *Trichoderma asperellum*, la cual según reporta Singh et al, alcanza su etapa estacionaria al día 7; y finalmente *Trichoderma atriviride*, la cual según reporta Saravanakumar et al, alcanza la etapa estacionaria a los 10 días (24,50-54)

3.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA HUMEDAD, LA DISPOSICIÓN DE AIREACIÓN Y LA CONCENTRACIÓN DE MELAZA.

3.3.1. DESARROLLO DE PRUEBA PRELIMINAR.

Pasados los catorce días de incubación del microorganismo *Trichoderma spp.* en el medio compuesto de arrozillo y melaza, se observó la infestación sobre la matriz, tomando un aspecto verdoso polvoriento producto de las esporas presentes, a simple vista se puede ver como se formaron bloques de arrozillo separados y uniformemente coloreados, como se puede apreciar en la Figura 20.



Figura 20 . Medio de arrozillo y melaza sin inocular (A); medio infestado con *Trichoderma spp.* (B)

Al realizarse las pruebas de concentración en las tres distintas repeticiones de la prueba preliminar por medio de conteos en Cámara Neubauer como se puede observar en la Figura 21, se obtuvo una concentración promedio de 3.0785×10^7 UFC/mL.

Como biocontrolador, las conidias de *Trichoderma spp.* son consideradas aptas para aplicación en campo a partir de una concentración mayor a 1×10^7 , claro que su aplicación a campo debe estar siempre sujeta a un diagnóstico previo del suelo enfermo por un fitopatólogo especializado, ya que la frecuencia del uso y la concentración varían de acuerdo al microorganismo patógeno y el avance de la enfermedad tanto en el suelo como en el material vegetal.⁽²⁸⁾

Comercialmente existen formulaciones a base de *Trichoderma spp.* con un variado rango de concentraciones, siendo uno de los más bajos el producto TrichoH de Agrobiotecnía con 3×10^7 UFC/mL, siendo este el cual tiene la concentración más cercana al resultado obtenido. Por otro lado, el resto de los productos tienen concentraciones que fluctúan ente 1×10^9 y 1×10^{12} , siendo el producto Biosa formulado por TrichoBiosa el que mayor concentración de conidias posee reportando una concentración de 4×10^{12} .

Tomando en cuenta las cifras obtenidas es que se puede decir que, la prueba preliminar obtuvo una concentración de conidias aceptable dentro del rango comercial, pero no al nivel de la mayoría de las que se encuentran en el mercado. La concentración obtenida es, teóricamente eficaz al momento de biocontrolar microorganismos fitopatógenos, pero tomando en cuenta la cantidad de factores que fueron involucrados es que, se puede inferir que una optimización sería necesaria para poder obtener mejores resultados.

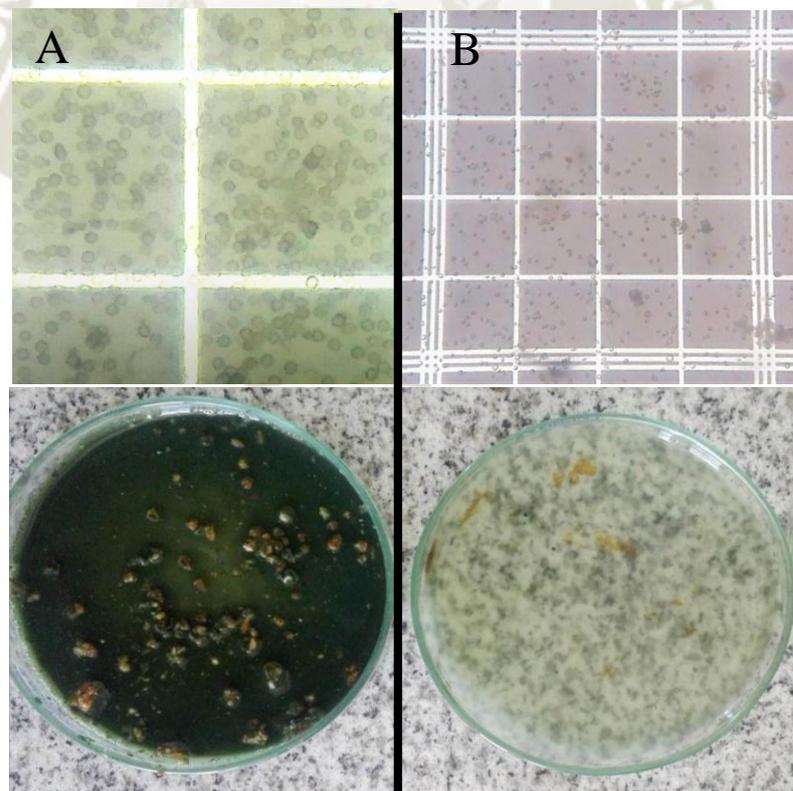


Figura 21. Conidias de *Trichoderma spp.* en cámara Neubauer a 40x. Disolución 1:10 (A) disolución 1:100 (B).

Los ensayos de determinación de % de humedad y % de Sólidos totales se realizaron en el medio de arrozillo y melaza antes descrito, antes de inocularlo con *Trichoderma spp.* Se realizaron dichos ensayos con siete repeticiones obteniéndose un porcentaje de Humedad de 41.51% y un porcentaje de Sólidos Totales de 58.49%, como se puede observar en la Tabla 17. Dichos resultados serán analizados estadísticamente más adelante.

Esta prueba se tomará como “Prueba Estándar” para poder escalar el volumen del sustrato utilizado, ya que con los resultados óptimos de concentración de esporas producidas se sabe que tiene valores adecuados de humedad y sólidos totales.

Tabla 17 Resultados de % de humedad y sólidos totales en arrozillo de la prueba preliminar.

250 g Arrocillo – 350 mL Agua		
Nº REPETICION	SÓLIDOS TOTALES (%)	HUMEDAD (%)
1	60.53	39.47
2	57.23	42.77
3	55.71	44.29
4	56.57	43.43
5	62.47	37.53
6	55.99	44.01
7	60.93	39.07
PROMEDIO	58.49	41.51

3.3.2. ESCALAMIENTO DE LA PRUEBA PRELIMINAR.

El escalamiento de la preparación del sustrato, arrozillo, en primera instancia se hizo duplicando las proporciones tanto de arrozillo como de agua, siendo esta la prueba 1.

En total se realizaron 4 pruebas, todas derivadas tanto de la primera como de la prueba estándar, llegando a probar 1000 g de arrozillo. Los datos obtenidos de durante la determinación visibles en el Anexo 5, mientras que los porcentajes de **Humedad** de cada repetición se pueden observar en las Tablas 18 y 19.

Tabla 18. Resultados de % de humedad en arrozillo cocido (500 g) pruebas 1 y 2.

Repetición	500 g Arrocillo -700 mL Agua	500 g Arrocillo -650 mL Agua
1	57.36 %	55.67 %
2	58.44 %	56.49 %
3	58.28 %	56.85 %
PROMEDIO	58.0266667	56.3366667

* Fuente: Elaboración Propia

Tabla 19. Resultados de % de humedad en arrozillo cocido (1000 g) prueba 3 y 4.

Repetición	1Kg Arrocillo -1200 mL Agua	1 Kg Arrocillo -1050 mL Agua
1	53.8 %	46.2 %
2	56.24 %	43.76 %
3	58.54 %	41.46 %
PROMEDIO	56.1933333	43.8066667

El objetivo de esta prueba fue conseguir valores lo más parecidos posibles de porcentaje de humedad y de sólidos totales a los de la prueba estándar. Comparando a simple vista, se puede apreciar que la cuarta prueba obtuvo 43.8066 en promedio de porcentaje de humedad y es la más parecida a la prueba estándar con 41.51 por ciento. Siendo los resultados de las pruebas uno dos y tres, 58.0266%, 53.3366% y 56.1933%, respectivamente. Siendo más parecidos entre sí que al tratamiento estándar.

Cualquier diferencia o similaridad debe ser probada estadísticamente, para poder comparar los medios sólidos realizados en las pruebas. Por tal razón empezamos con la Tabla 20 del análisis estadístico descriptivo. Aquí se reportan coeficientes de variación (%) aceptables, siendo el mayor 6.61% de la prueba estándar, esto puede ser explicado por la elevada cantidad de pruebas tomadas en cuenta para el análisis y el margen de error que eso conlleva. Seguidos por el tratamiento tres y cuatro, con 4.22% y 3.28 respectivamente. Estos coeficientes son insignificantes por su bajo valor y apoyan el sentido de precisión en la repetitibilidad del ensayo.

Tabla 20. Análisis estadístico descriptivo para humedad del sustrato sólido.

	TC	T1	T2	T3	T4
Recuento	7	3	3	3	3
Promedio	41.51+/- 2.54	58.03+/- 1.45	56.34+/-1.5	56.19+/- 5.89	41.4+/-3.38
Desviación Estándar	2.74493	0.582866	0.604759	2.37034	1.36001
CV%	6.61%	1.00%	1.07%	4.22%	3.28%
Mínimo	37.53	57.36	55.67	53.8	40.04
Máximo	44.29	58.44	56.85	58.54	42.76
Rango	6.76	1.08	1.18	4.74	2.72
Sesgo Estandarizado	-0.485885	-1.12174	-0.754911	-0.0626216	-0.0155974

*Fuente: Statgraphics Centurión XV.

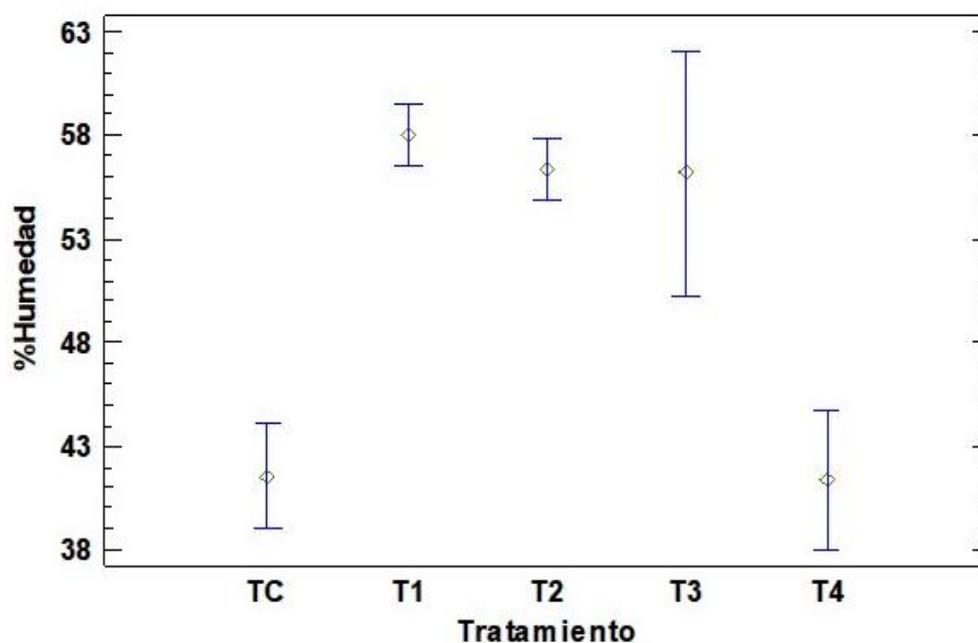


Figura 22. Gráfico de promedios obtenidos para el porcentaje de humedad de los tratamientos empleados para el crecimiento de *Trichoderma spp.* en sustrato sólido

Tabla 21. Análisis de varianza (ANOVA) para el porcentaje de humedad de los tratamientos empleados para el crecimiento de *Trichoderma spp.* en sustrato sólido.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1125.89	4	281.473	64.02	0.0000
Intra grupos	61.5553	14	4.3968		
Total (Corr.)	1187.45	18			

*Fuente: Statgraphics Centurión XV.

En la Figura 22 se puede observar los promedios de los valores obtenidos de humedad, siendo evidente que el tratamiento cuatro es el único con cifras cercanas al tratamiento estándar, también se puede apreciar que el resto de tratamientos tienen resultados muy variables entre sí, confirmándose con la Tabla de resultados de ANOVA (Tabla 21), donde se reporta un Valor P de 0.0000 demostrando la significancia de la varianza de volumen de arrozillo y agua en las pruebas de determinación de % de Humedad.

Por otro lado, los resultados de la determinación de **Sólidos Totales** de las pruebas uno a la cuatro se ven representados en las Tablas 22 y 23 reportando valores entre los 41 a los 44 %, excepto por la prueba cuatro que presenta un valor promedio de 56.1933%. Lo cual sugiere resultados con la misma tendencia que los obtenidos por la determinación de humedad.

Tabla 22. Resultados de porcentaje de sólidos totales en arrozillo cocido (500 g) pruebas 1 y 2.

Repetición	500 g Arrozillo -700 mL	500 g Arrozillo -650 mL
	Agua	Agua
1	42.64%	44.33%
2	41.56%	43.51%
3	41.72%	43.15%
PROMEDIO	41.9733%	43.6633%

Tabla 23. Resultados de porcentaje de sólidos totales en arrozillo cocido (1000 g) prueba 3 y 4.

Repetición	1Kg Arrocillo -1200 mL	1 Kg Arrocillo -1050 mL
	Agua	Agua
1	46.2 %	53.8 %
2	43.76 %	56.24 %
3	41.46 %	58.54 %
PROMEDIO	43.8066667	56.1933333

El análisis estadístico descriptivo (Tabla 24) presenta un resumen y recapitulación de todos los valores obtenidos en la determinación de Sólidos totales. Se reportan coeficientes de variación cifras porcentualmente insignificantes, siendo la mayor 5.41% y las menores 1.39% correspondiente al tercer, primer y segundo tratamiento respectivamente.

Tabla 24. Análisis estadístico descriptivo para porcentaje de sólidos totales del sustrato sólido.

	TC	T1	T2	T3	T4
Recuento	7	3	3	3	3
Promedio	58.49+/- 2.54	41.97+/- 1.45	43.66+/- 1.5	43.81+/- 5.89	58.6+/- 3.38
Desviación Estándar	2.74493	0.582866	0.604759	2.37034	1.36001
CV%	4.69%	1.39%	1.39%	5.41%	2.32%
Mínimo	55.71	41.56	43.15	41.46	57.24
Máximo	62.47	42.64	44.33	46.2	59.96
Rango	6.76	1.08	1.18	4.74	2.72
Sesgo Estandarizado	0.485885	1.12174	0.754911	0.0626216	0.0155974

*Fuente: Statgraphics Centurión XV.

En la Figura 23 se diagrama en un gráfico la diferencia de los promedios de las cifras reportadas de la determinación de Sólidos Totales. Corroborado por la tabla de resultados de ANOVA (Tabla 25) donde se observa un Valor P de 0.0000 demostrando la significancia de la varianza de volumen de arrocillo y agua en las pruebas de determinación de % de Sólidos Totales.

Tabla 25. Análisis de varianza (ANOVA) para el porcentaje de sólidos totales de los tratamientos empleados para el crecimiento de *Trichoderma spp.* en sustrato sólido.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1125.89	4	281.473	64.02	0.0000
Intra grupos	61.5553	14	4.3968		
Total (Corr.)	1187.45	18			

*Fuente: Statgraphics Centurión XV.

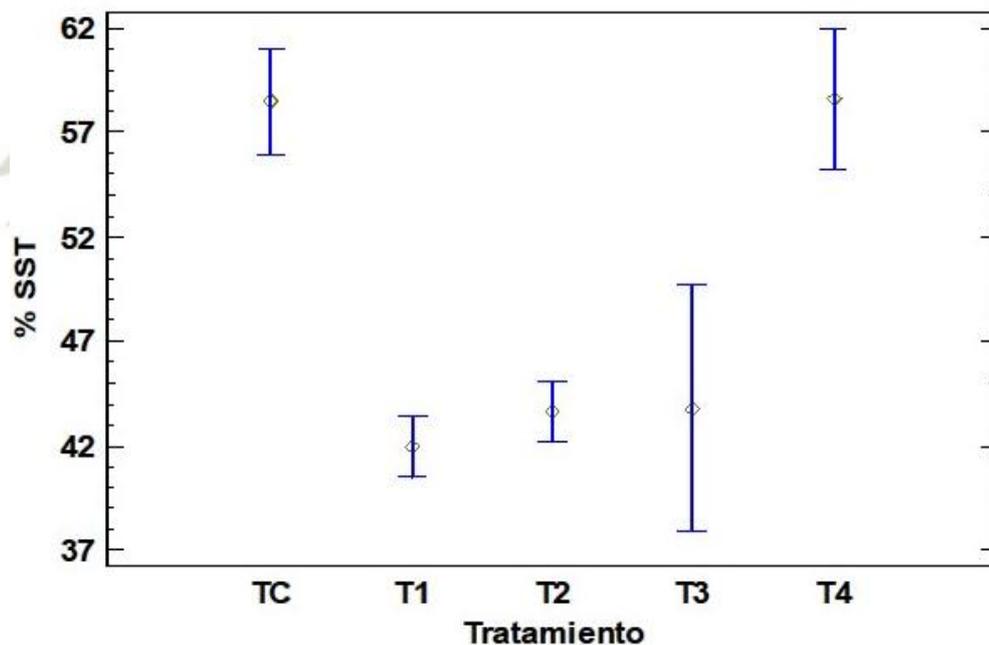


Figura 23. Promedios obtenidos para el porcentaje de sólidos totales de los tratamientos empleados para el crecimiento de *Trichoderma spp.* en sustrato sólido.

En la Tabla 26 de comparaciones múltiples se ven agrupados los datos por su similitud estadística, tomando en cuenta la significancia demostrada de la varianza de los volúmenes de arrocillo y agua en los valores de humedad y sólidos totales.

Finalmente se puede observar que el tratamiento que debe ser escogido para proceder al escalamiento es el número cuatro.

En los estudios realizados e investigaciones sobre sustratos comunes y experimentales usados para obtener conidias o esporas de *Trichoderma spp.* no se reporta o evalúa la humedad del sustrato cocido justo antes de ser inoculado con el hongo en cuestión, solo se hace una caracterización del sustrato crudo.

Se tomaron ambos valores, humedad y sólidos totales, como un factor relevante ya que como veremos más adelante la humedad presente en el medio o sustrato es determinante para que se pueda desarrollar satisfactoriamente el hongo sobre la matriz del sustrato.

A su vez, era evidente a simple vista que mientras cada grano de arrozillo estuviera graneado e independiente del resto a pesar de la adición de melaza, se obtenía como resultado la proliferación de *Trichoderma spp.* en el sustrato. Y cuando estas condiciones no se cumplían se observaba una pudrición del mismo sin lograr crecimiento o conidiogénesis.

Como lo muestran los resultados, la cocción del arrozillo no se puede escalar manteniendo la proporción del tratamiento estándar, esto es inusual ya que todas las pruebas se trabajaron con arrozillo de un mismo lote de producción de arroz cáscara.

Si se toma el valor de agua del tratamiento estándar (350 mL) como el 100% de agua que debería ser utilizada por cada 250 g de arrozillo, en el tratamiento 1 se trabajó con el mismo porcentaje sin obtener resultados satisfactorios. Por otro lado, en los tratamientos del segundo al cuarto se trabajó con 7.14298%, 14.2857% y 25% menos de agua respectivamente, siendo solo el cuarto tratamiento el más adecuado.

Esto puede deberse a que dichas pruebas de cocción fueron realizadas en un mismo recipiente, con una capacidad de 1.5 litros. Al ser así, se llevó a cabo la prueba del tratamiento estándar contando con bastante más espacio libre en la olla que en el

resto de las pruebas. Al haber más espacio disponible el vapor producido por el agua en ebullición estuvo disperso tardando más de lo normal en condensarse y volver en estado líquido a estar en contacto con los granos de arrozillo. Estas condiciones fueron diferentes al realizar el resto de tratamientos ya que se contaba con menos espacio libre en el recipiente, haciendo que el agua se condense más rápido, necesitando menos agua añadida desde un comienzo. Se podría decir que, para mantener la proporción en un escalamiento, sería necesario que se escale también el recipiente a usarse.

Tabla 26. Comparaciones múltiples para el porcentaje de humedad de los tratamientos empleados para el crecimiento de *Trichoderma spp.* en sustrato sólido

Grupos	Casos	Humedad	Sólidos Totales
TC	7	41.51+/-2.54 ^a	58.49+/-2.54 ^b
T1	3	58.03+/-1.45 ^b	41.97+/-1.45 ^a
T2	3	56.34+/-1.50 ^b	43.66+/-1.50 ^a
T3	3	56.19+/-5.89 ^b	43.81+/-5.89 ^a
T4	3	41.4+/-3.38 ^a	58.6+/-3.38 ^b

*Fuente: Statgraphics Centurión XV.

3.4. OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS DE PRODUCCIÓN MEDIANTE DISEÑO FACTORIAL.

3.4.1. RESULTADOS DE CONCENTRACIÓN DE ESPORAS DE *Trichoderma spp.*

Se desarrolló la matriz experimental factorial diseñada, y se determinó la concentración de cada unidad experimental como se puede ver en la Tabla 27, siendo la bolsa N° 8 la que presentó la mayor concentración con un resultado de 3.32×10^8 UFC /mL, y la bolsa N°3 la que reportó 3.15×10^7 UFC/mL, siendo la bolsa en la que menos esporas de *Trichoderma spp.* se desarrollaron.

Tabla 27. Resultados de la evaluación de concentración (UFC/mL) de *Trichoderma spp.*

	% Melaza	Melaza (mL)	Inóculo (mL)	Aireación	Repetición 1	Repetición 2
1	5	5	1.5	Finas	6.20E+07	6.00E+07
2	15	5	1.5	Finas	1.59E+08	1.58E+08
3	5	15	1.5	Finas	3.05E+07	3.15E+07
4	15	15	1.5	Finas	1.53E+08	1.55E+08
5	5	5	2.5	Finas	6.00E+07	7.40E+07
6	15	5	2.5	Finas	1.77E+08	1.68E+08
7	5	15	2.5	Finas	2.29E+08	2.61E+08
8	15	15	2.5	Finas	4.13E+08	3.32E+08
9	10	10	2	Finas	1.04E+08	1.48E+08
10	10	10	2	Finas	1.19E+08	1.79E+08
11	5	5	1.5	Grande	3.95E+07	5.70E+07
12	15	5	1.5	Grande	7.15E+07	8.50E+07
13	5	15	1.5	Grande	2.90E+07	3.20E+07
14	15	15	1.5	Grande	4.05E+07	5.20E+07
15	5	5	2.5	Grande	8.10E+07	7.80E+07
16	15	5	2.5	Grande	3.75E+07	4.30E+07
17	5	15	2.5	Grande	5.55E+07	6.80E+07
18	15	15	2.5	Grande	1.44E+08	2.70E+08
19	10	10	2	Grande	1.38E+08	2.08E+08
20	10	10	2	Grande	1.07E+08	1.30E+08

* Fuente: Statgraphics Centurión XV.

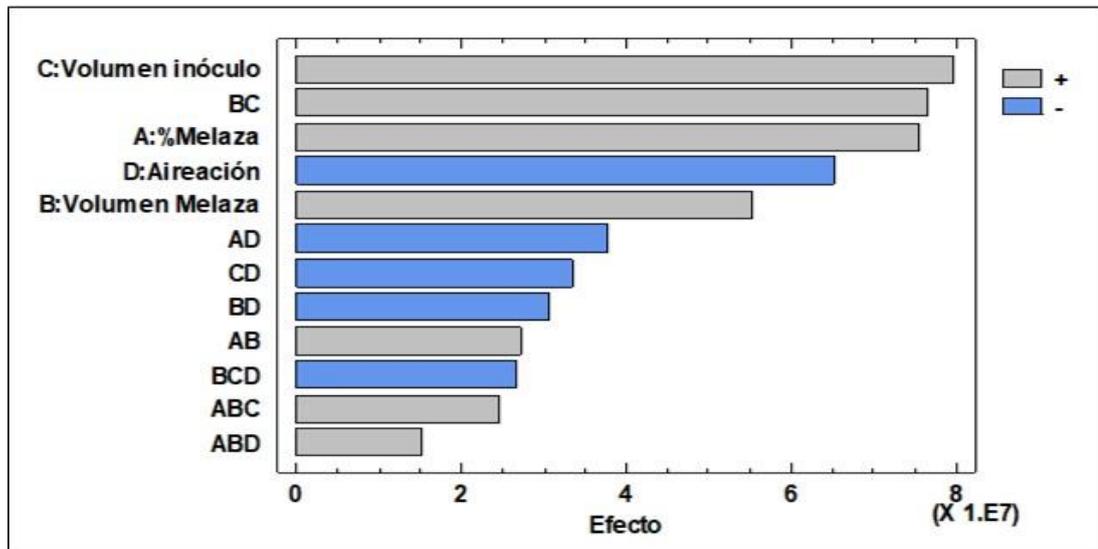


Figura 24. Diagrama de Pareto para la evaluación de la concentración de esporas de *Trichoderma spp.* en sustrato sólido. Fuente: Statgraphics Centurión XV.

3.4.1.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Es necesario realizar un análisis estadístico sobre los valores obtenidos y relacionarlos con los efectos e interacciones de los factores que influenciaron la concentración de esporas de *Trichoderma spp.* obtenidas.

Para evaluar la significancia de los efectos principales e interacciones se utilizó la prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA) visible en la Tabla 28, en la cual se mostraron ocho efectos, A: Concentración de melaza (%), B: Volumen de Melaza (mL), C: Volumen del inóculo (g), D: Tipo de aireación; BC: Volumen de Melaza – Volumen del inóculo, AD: Concentración de Melaza – Aireación, CD: Volumen del inóculo – Aireación y BD: Volumen de Melaza – Aireación.; que reportaron un Valor P menor al 0.05 lo cual indica que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza de 95%. Es decir que su efecto en la concentración de esporas de *Trichoderma spp.* es influyente para realizar la optimización. El análisis de varianza también indica que el estadístico R-Cuadrado del modelo matemático propuesto según sus resultados es capaz de explicar el 85.05% de la variabilidad en las concentraciones obtenidas y

el estadístico R-Cuadrada ajustado un 78.40%. Siendo este más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes.

El error estándar del estimado mostró una desviación estándar de los residuos de 4.02702×10^7 , un error medio absoluto de 2.48273×10^7 el cual corresponde al valor medio de los residuos. Por último, se reporta el estadístico de Durbin- Watson, cuya función es determinar si existe algún tipo de relación o influencia en cuanto al error obtenido entre los datos por su naturaleza serial. Es decir, descartar que un dato sea erróneo o menos confiable debido a que el dato anterior afecto su valor. Su resultado fue un Valor P de 1.48079, indicando la falta de correlación serial en los residuos con un nivel de significancia del 95%. En la Figura 24 se aprecian por orden de significancia en el resultado, los efectos antes mencionados.

En la Figura 25 se pueden apreciar los efectos individuales de los factores sobre la concentración de esporas obtenida.

Como factor más influyente, según la Figura 25 se encuentra el volumen de inóculo expresado en mL, esto se refiere a la cantidad de PDA líquido inoculado con *Trichoderma spp.* que se puso en el medio de arrozillo y melaza. Es bastante lógico que este sea el factor más significativo puesto que mientras mayor volumen de inóculo esté presente en la bolsa, más cantidad del mismo estará en contacto con los granos de arrozillo, esto sin duda aumentara la velocidad de crecimiento al iniciar la proliferación por contacto directo con el inóculo y no progresivamente por contacto entre granos de arrozillo ya infestados con el microorganismo. Se puede observar como los valores de concentración dan un salto importante en la Figura 25 al pasar de 0.5 mL a 1.5 mL casi duplicándolo desde 81×10^6 hasta 161×10^6 UFC/mL.

Tabla 28. Análisis de varianza para la evaluación del crecimiento de *Trichoderma spp.* en sustrato sólido.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: %Melaza	4.56398E16	1	4.56398E16	27.36	0.0000
B: Volumen Melaza	2.44481E16	1	2.44481E16	14.66	0.0007
C: Volumen inóculo	5.07609E16	1	5.07609E16	30.43	0.0000
D: Aireación	4.25756E16	1	4.25756E16	25.52	0.0000
Volumen Melaza*Volumen inóculo (BC)	4.67033E16	1	4.67033E16	28.00	0.0000
%Melaza*Aireación (AD)	1.13439E16	1	1.13439E16	6.80	0.0147
Volumen inóculo*Aireación (CD)	8.92782E15	1	8.92782E15	5.35	0.0285
Volumen Melaza*Aireación (BD)	7.45726E15	1	7.45726E15	4.47	0.0439
%Melaza*Volumen Melaza (AB)	5.8997E15	1	5.8997E15	3.54	0.0708
Volumen Melaza*Volumen inóculo*Aireación (BCD)	5.73788E15	1	5.73788E15	3.44	0.0746
%Melaza*Volumen Melaza*Volumen inóculo (ABC)	4.76532E15	1	4.76532E15	2.86	0.1025
%Melaza*Volumen Melaza*Aireación (ABD)	1.88345E15	1	1.88345E15	1.13	0.2974
Residual	4.5037E16	27	1.66804E15		
Total (corrected)	3.0118E17	39			

R-cuadrada = 0.850465

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 0.784005

Error estándar del est. = 4.02702E7

Error absoluto medio = 2.48273E7

Estadístico Durbin-Watson = 1.48079 (P=0.0303)

*Fuente: Statgraphics Centurión XV.

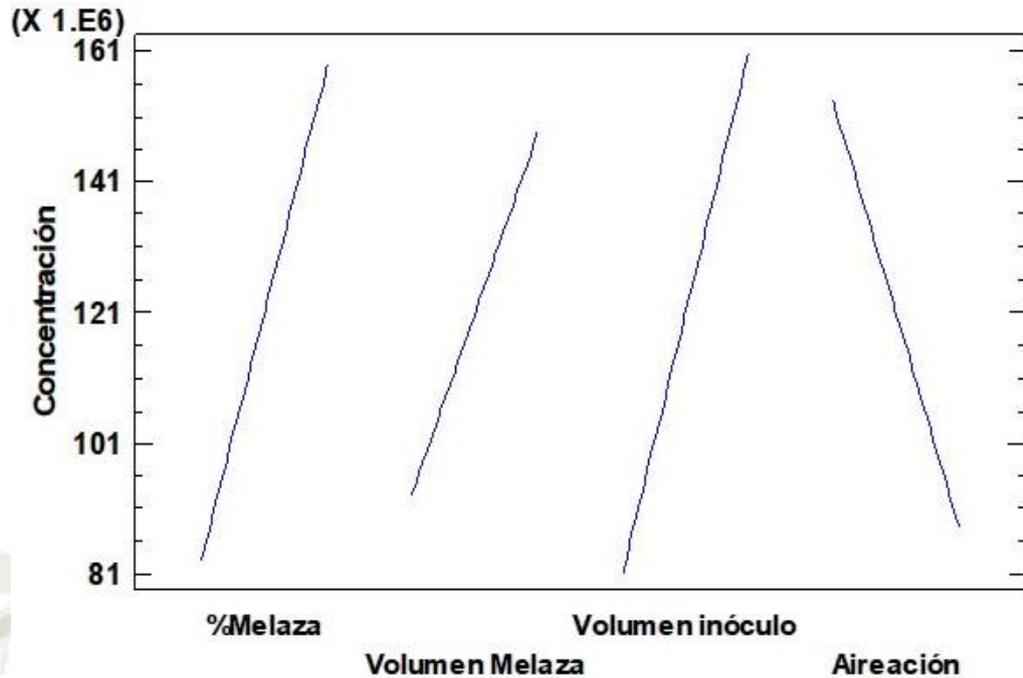


Figura 25. Gráfica de efectos principales sobre la concentración de esporas obtenidas de *Trichoderma spp.* en sustrato sólido.

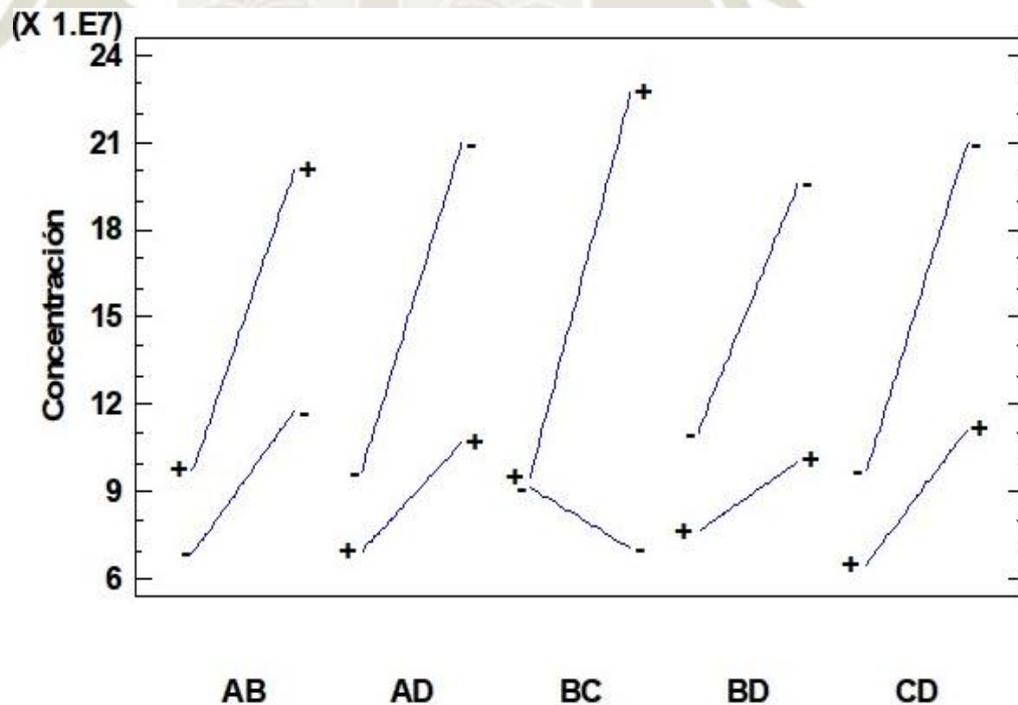


Figura 26. Gráfica de interacciones sobre la concentración de esporas de *Trichoderma spp.* en sustrato sólido.

El siguiente factor individual de importancia es la variable codificada como “A” correspondiente a la concentración de melaza, Esto se refiere a la concentración porcentual de la melaza presente en el sustrato. Tomando en cuenta el aporte de Sanclemente et al, se sabe que la melaza en un medio de cultivo cumple la función de agente acelerador de descomposición en este caso del arrozillo, para facilitar la absorción de nutrientes por el microorganismo y por ende su desarrollo y proliferación, además de ser una importante fuente de glucosa. Según la Figura 26 cambiar desde 5% a 15% de melaza tiene un cambio ligeramente menor que el producido por el volumen de inóculo, pero igualmente importante.⁽⁵⁵⁾

Continuando se tiene a la variable “D” que representa la aireación del medio, esta variable al ser cuantitativa no puede ser apreciada en un gráfico de superficie de respuesta, ya que no tiene valores medios para graficar. Los niveles de esta variable dependían de la disposición física de la misma como fue descrito en el apartado de Materiales y Métodos. Al contrario del resto de efectos individuales, se ve un incremento en la concentración de esporas al tener aireación con perforaciones finas distribuidas uniformemente en la bolsa que una sola de mayor tamaño. El rol de la Aireación es evitar que el sustrato sólido entre en proceso de fermentación, el cual es inducido por la melaza. Al ser este un proceso anaeróbico, requiere de la falta de oxígeno para iniciarse, pero las perforaciones finas detienen dicho proceso antes que proceda hasta la pudrición de toda la unidad experimental. Es por esta razón que la concentración va desde 86×10^6 hasta 156×10^6 UFC/mL de esporas al cambiar la aireación de perforaciones finas a una sola perforación grande.

El menos significativo de todos los efectos individuales es el volumen de la Melaza, esto puede deberse a que la función de la concentración de la melaza tiene un efecto más influyente. Cabe mencionar que el salto que se da en los valores de concentración al cambiar desde 5 mL hasta 15 mL es importante puesto que va desde 91×10^6 hasta 151×10^6 UFC/mL de esporas.

Los efectos de interacción se pueden observar en la Figura 26, solo usaremos este gráfico para discutir los efectos donde esté involucrada la variable de Aireación, puesto que esta es cualitativa y no puede ser visible en gráficos 3D de superficie de respuesta.

Como primer factor de interacción significativo tenemos al efecto Concentración de Melaza – Aireación, como se puede apreciar: mientras se mantengan las perforaciones finas sí se observa un cambio desde 1×10^8 hasta 2×10^8 UFC/mL de esporas usando 5% y 15% de melaza respectivamente. Por otro lado, cuando se utiliza una sola perforación de mayor tamaño en las bolsas, la concentración de la melaza no altera los valores resultados siendo estos 7×10^8 y 11×10^8 UFC/mL para 5% y 15% de melaza. Se puede inferir que la falta de oxígeno no atenúa el proceso de fermentación en las bolsas con una sola perforación, llegando al punto donde el microorganismo no puede desarrollarse correctamente. Mientras que en las bolsas con perforaciones múltiples se puede ver la diferenciación en el desarrollo por la función de la concentración de la melaza aumentando la velocidad de aprovechamiento de los nutrientes del arcillo.

La misma tendencia con respecto a la aireación se reporta en las interacciones Volumen de Melaza – Aireación (BD) y Volumen de Inóculo – Aireación (CD). Pero, se diferencia al enfocarse en el cambio de la variable acompañante, en la primera interacción si bien se observa un incremento en el valor de concentración mientras se aumente el volumen de melaza este no es tan significativo como cuando se sube el volumen del inóculo. Con estos datos se puede confirmar las interacciones individuales en la Figura 25, donde se manifiesta que la variable C es más significativa que la variable B.

3.4.1.1.1. FORMULACIÓN DEL MODELO MATEMÁTICO

Al poder identificar los efectos significativos tanto individual como interactivamente, se procedió a refinar el modelo de primer orden propuesto para explicar el comportamiento de la concentración, de esporas obtenidas. Esto se hizo tomando en cuenta lo significativas que son en la alteración de la variable

independiente, es decir, por el Valor P reportado por cada una de ellas y si se observaba una mejora en el valor de R^2 ajustado.

Se pudo eliminar el efecto AB, por no ser significativo en el análisis de varianza realizado, este efecto fue el único eliminado de interacción de dos variables. Por el contrario, todos los efectos que tenían tres variables involucrados fueron eliminados.

Cabe resaltar que todos los efectos eliminados tuvieron un efecto sobre el valor reportado de concentración de esporas de *Trichoderma spp.*, pero todos estos son irrelevantes estadísticamente, es decir tienen un efecto muy bajo.

El objetivo de refinar el modelo matemático es obtener un valor más exacto y preciso, tomando los valores acertados y significantes mientras se desechan los efectos que al ser tomados en cuenta se obtenga un resultado alejado de ser real.

Tabla 29. Coeficientes para el modelo matemático construido para calcular la concentración de esporas de *Trichoderma spp.*

COEFICIENTE	ESTIMADO
CONSTANT	1.45042380E8
Aireación	-3.0887379E7
%Melaza	3.9088469E7
Volumen Melaza	2.9813651E7
Volumen inóculo	4.2000151E7
Volumen Melaza*Volumen inóculo	3.6031099E7
%Melaza*Aireación	-2.0151969E7
Volumen inóculo*Aireación	-1.8875151E7
Volumen Melaza*Aireación	-1.7438651E7
%Melaza*Volumen Melaza	1.36E7
Volumen Melaza*Volumen inóculo*Aireación	-1.34E7
%Melaza*Volumen Melaza*Volumen inóculo	1.22E7
%Melaza*Volumen Melaza*Aireación	7.67E6

* Fuente: Statgraphics Centurión

Después del refinamiento de llego a un valor de R2 y R ajustado de 85.0465% y 78.4005 respectivamente como fue ya reportado en la Tabla 28. También se pudo obtener el modelo refinado configurado de la siguiente manera:

Concentración

$$\begin{aligned} &= 1.45042380E8 - 3.0887379E7 (\text{Aireación}) \\ &+ 3.9088469E7 (\% \text{Melaza}) + 2.9813651E7 (\text{Vol. Melaza}) \\ &+ 4.2000151E7 (\text{Vol. Inoculo}) + 3.6031099E7 (B * C) \\ &- 2.0151969E7 (A * D) - 1.8875151E7 (C * D) \\ &- 1.7438651E7 (B * D) \end{aligned}$$

Ecuación 4. Modelo matemático propuesto para calcular la concentración de esporas de *Trichoderma spp.* (UFC/mL).

Cabe resaltar que en los espacios donde se debe reemplazar con los valores tomados por las variables de (Aireación, Volumen de melaza, etc.) deben ser reemplazados por el valor codificado. Es decir, debe introducirse numéricamente el nivel que se desee que tome el factor.

Si bien los factores tomados en cuenta en el modelo matemático tienen diferentes unidades de medida, el resultado final obtenido responderá a la unidad de concentración (UFC/mL), esto porque los valores reemplazados al ser “valores codificados” son adimensionales, lo cual evita el conflicto de mezclar diferentes unidades de medida.

3.4.1.2. ANÁLISIS DE SUPERFICIE DE REPUESTA

Para poder hacer un análisis más a fondo y claro sobre los efectos de las interacciones es mejor representarlas en gráficos 3D o en gráficos de contornos, ya que así se tendrá una ventaja de facilidad de visualización como se puede ver en la Figuras 27, 28 y 29.

En la Imagen 24 se representó la interacción Volumen de melaza – Volumen de Inóculo (BC) como el más importante de los efectos interactivos. En la Figura 28 se puede apreciar el gráfico de contornos de la interacción contando con valores fijos de % de Melaza y Aireación, siendo 15% y Perforaciones finas respectivamente.

Hablando de la interacción, se ve que el valor de volumen del inóculo es mucho más importante que el volumen de melaza a probar, ya que no importa el volumen de melaza que se elija desde 1.5 mL hasta 2.5 mL, el valor de la concentración no va a ascender a menos que se suba el volumen de inóculo. Tomando el mejor resultado de esta interacción se puede llegar a un rango de concentración máxima de 3.5×10^8 hasta 4×10^8 UFC/mL cuando ambas variables están en su valor al nivel 1.

Sin embargo, cabe mencionar que no hay mayor alteración de la concentración variando los volúmenes de melaza desde su nivel -1 al 1 hasta subir más allá del nivel -0.2 en el volumen del inoculo, dando un salto en los resultados desde 1.5×10^8 hasta 2.5×10^8 UFC/mL.

Otra interacción de importancia, es la que existe entre Concentración de Melaza - Volumen de Melaza. En la Figura 27 y 29 se puede observar los gráficos de superficie de respuesta correspondientes a este factor. En la gráfica de contornos se puede apreciar un crecimiento en los valores de concentración bastante proporcional al aumento de los niveles de las variables y teniendo fijos los valores de aireación y volumen de inoculo a perforaciones finas y 2.5 mL respectivamente. De esta interacción pueden resultar valores de concentración desde 4×10^7 hasta 4×10^8 UFC/mL.

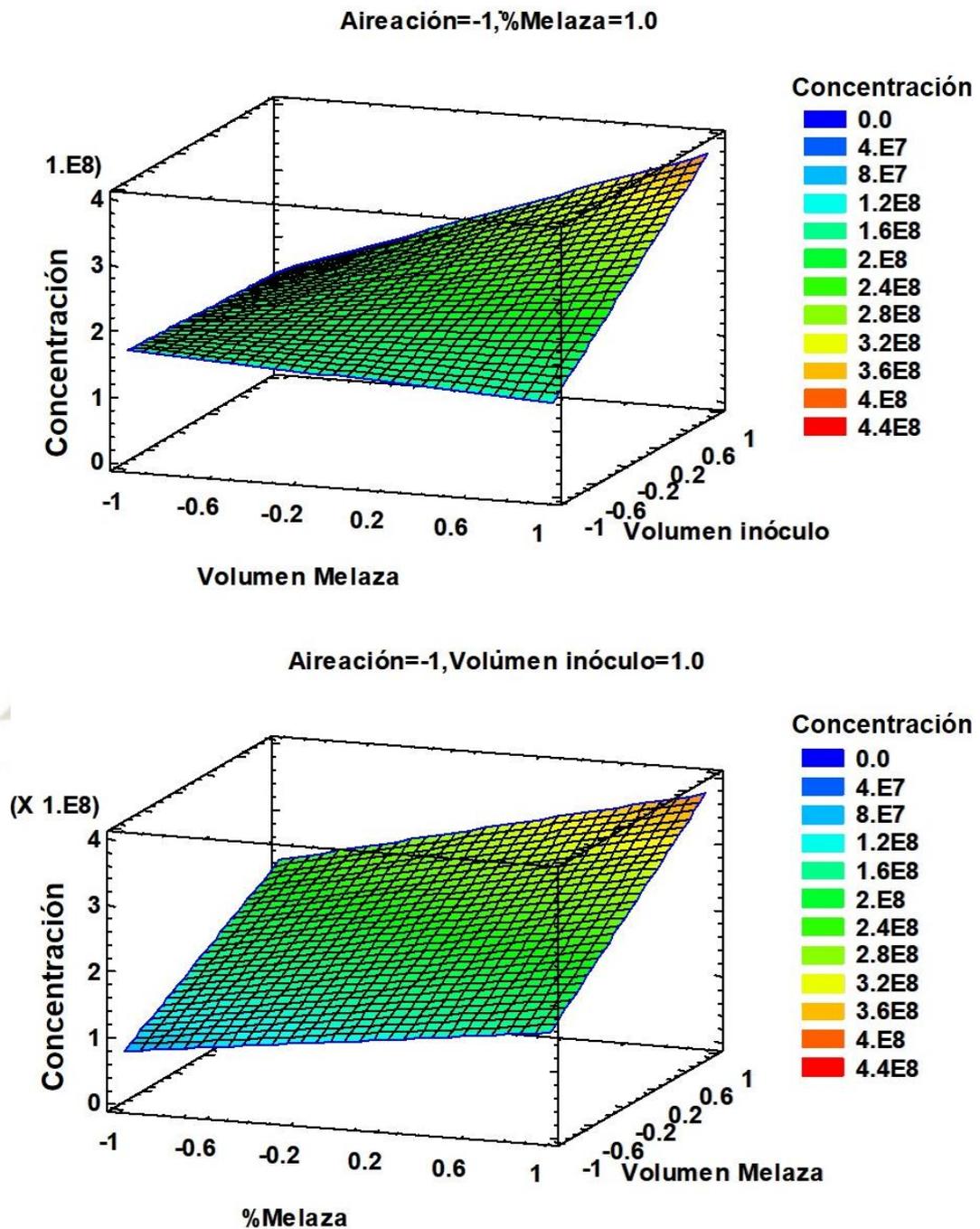


Figura 27. Superficies de respuesta para la concentración de esporas de *Trichoderma spp* en sustrato sólido.

La proporcionalidad de cambios denota que ambas variables tienen igual de influencia en la concentración obtenida, pero, es visible que es más fácil llegar a un rango de 2×10^8 - 2.4×10^8 cuando el volumen de melaza está a su nivel 0.6 sin importar que la concentración de melaza esté en nivel 0. Mientras que, para alcanzar el mismo rango la concentración de melaza debería estar fijada a nivel 1 y dependería de que el volumen de melaza esté a un nivel de -0.6 por lo menos. Por esta razón es que podemos asumir que el volumen de melaza en esta interacción tiene mayor influencia que la variable de concentración de melaza.

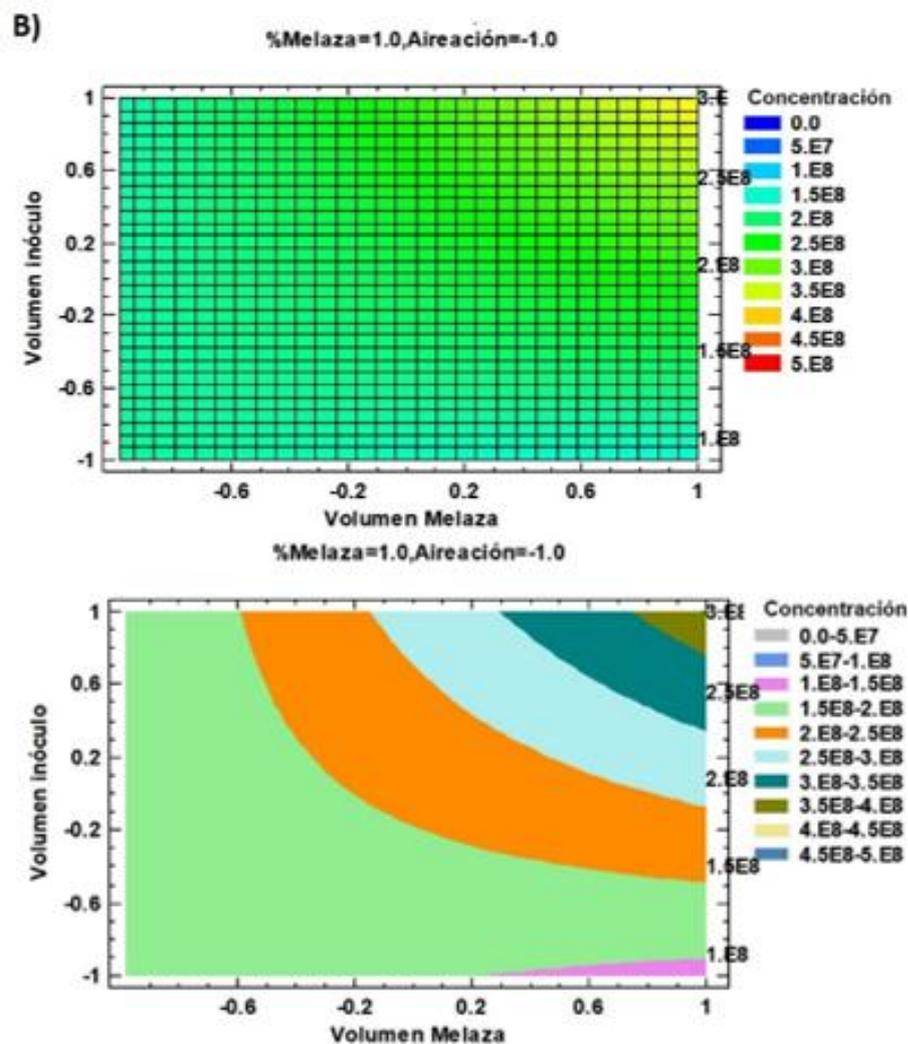


Figura 28. Gráficas de contornos para el porcentaje viabilidad de *Trichoderma spp.* en sustrato sólido, interacción (BC).

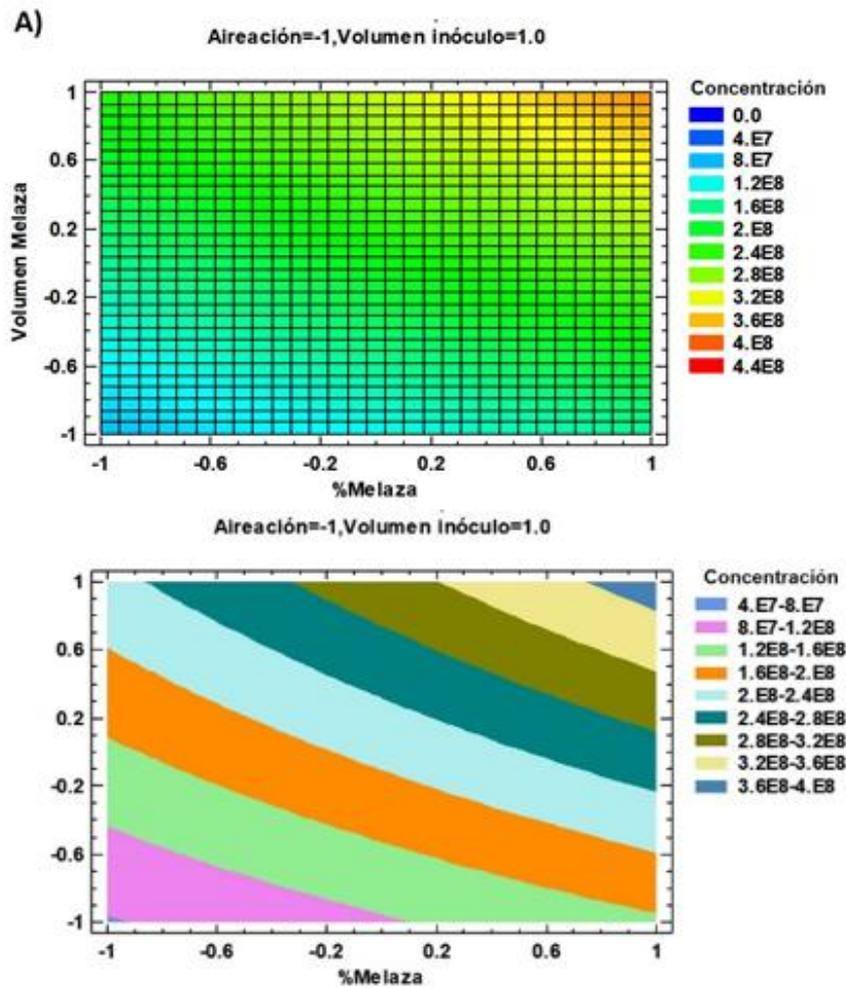


Figura 29. Gráficas de contornos para el porcentaje viabilidad de *Trichoderma spp.* en sustrato sólido , interacción (AB).

Después de evaluar y analizar los efectos individuales e interactivos, se obtuvo el óptimo para la concentración en UFC/mL de *Trichoderma spp.* (Tabla 30).

Tabla 30. Óptimo resultante para el crecimiento de *Trichoderma spp.* en sustrato sólido.

Factor	Óptimo Codificado	Óptimo Real	Valor óptimo de crecimiento
%Melaza	1.0	15%	3.79259E8
Volumen Melaza	1.0	15 mL	
Volumen inóculo	1.0	2.5 mL	
Aireación	-1.0	Finas	

* Fuente: Statgraphics Centurión XV.

3.4.2. RESULTADOS DE VIABILIDAD DE ESPORAS DE *Trichoderma spp*

Como se describe en el apartado de Materiales y Métodos, después de los ensayos de concentración de esporas se procedió a determinar los valores de viabilidad por tamaño del tubo germinativo, como se puede observar en la Figura 30, los valores obtenidos en las diferentes repeticiones por cada unidad experimental son visible a mayor detalle en el Anexo 6.

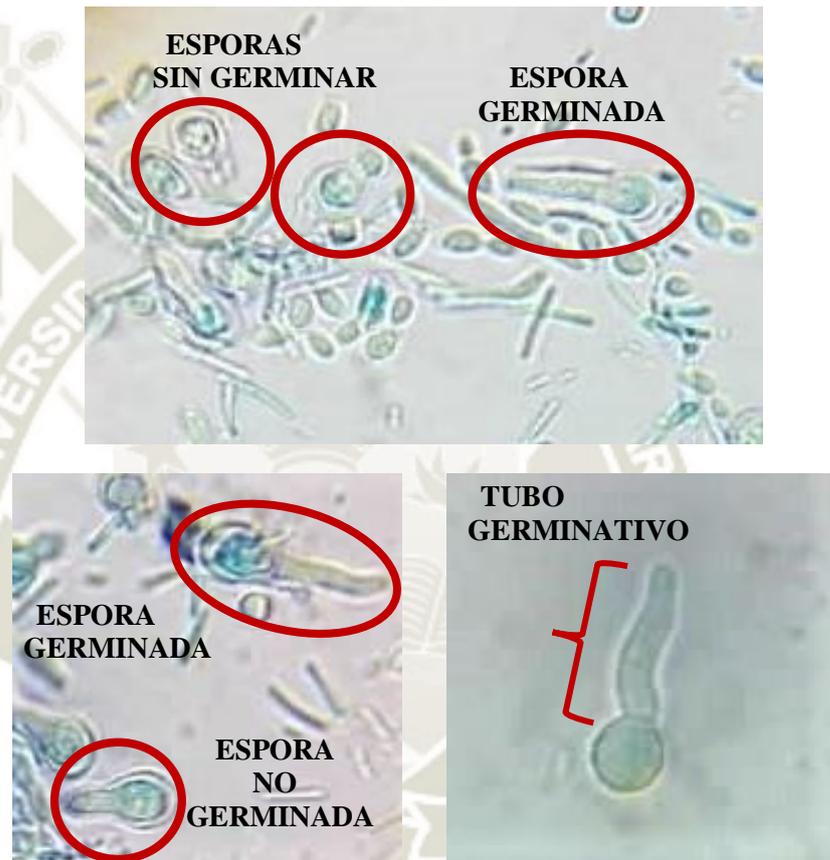


Figura 30. Diferenciación de esporas germinadas y no germinadas teñidas con azul de lactofenol, ensayos de viabilidad.

Los promedios de los resultados se pueden observar en la Tabla 31, donde se puede observar que la unidad experimental con un porcentaje mayor de esporas viables fue la bolsa N°8 con 85.15% y la Bolsa N° 14 fue la que obtuvo el porcentaje más bajo registrando 22.91% de esporas viables.

Tabla 31. Resultados de la evaluación de la viabilidad de esporas de *Trichoderma spp.*

	% Melaza	Melaza (mL)	Inóculo (mL)	Aireación	Repetición 1	Repetición 2
1	5	5	1.5	Finas	47.72	50.84
2	15	5	1.5	Finas	50.85	51.25
3	5	15	1.5	Finas	47.14	49.47
4	15	15	1.5	Finas	31.63	29.37
5	5	5	2.5	Finas	61.91	58.81
6	15	5	2.5	Finas	78.83	76.28
7	5	15	2.5	Finas	82.63	76.82
8	15	15	2.5	Finas	85.15	78.02
9	10	10	2	Finas	73.31	69.20
10	10	10	2	Finas	76.01	71.72
11	5	5	1.5	Grande	37.34	34.39
12	15	5	1.5	Grande	50.95	47.48
13	5	15	1.5	Grande	44.77	41.56
14	15	15	1.5	Grande	25.75	22.91
15	5	5	2.5	Grande	50.73	43.06
16	15	5	2.5	Grande	77.54	71.19
17	5	15	2.5	Grande	82.96	81.73
18	15	15	2.5	Grande	84.29	82.38
19	10	10	2	Grande	72.74	68.41
20	10	10	2	Grande	73.91	72.09

* Fuente: Statgraphics Centurión XV.

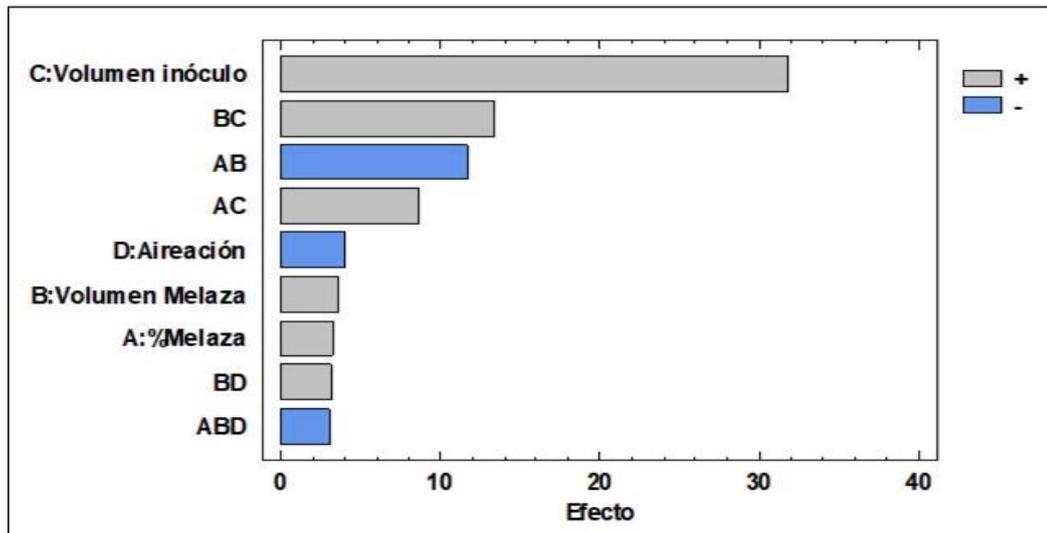


Figura 31. Diagrama de Pareto para la evaluación de viabilidad de *Trichoderma spp.* en sustrato sólido.

3.4.2.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con la finalidad de generar un modelo matemático que explique el funcionamiento de la variable independiente (% Viabilidad) y comparar los efectos de los factores que afectan su variabilidad, se realizó un análisis estadístico.

Para evaluar la significancia de los efectos principales y también interacciones de los mismos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) presente en la Tabla 32.

El Valor P resultó ser menor a 0.05 en cuatro efectos, un solo efecto individual y tres compuestos por interacciones de dos factores. En el Diagrama de Pareto de la Figura 31 se puede observar que los efectos obtenidos por orden de importancia son: C: Volumen del inóculo (mL)., BC: Volumen de melaza (mL) - Volumen de Inóculo, AB: Concentración de Melaza (%) y, por último, la interacción de los factores AC: Concentración de Melaza (%) - Volumen de inóculo (mL).

El valor P indica que dichos efectos son significativamente diferentes de cero con un nivel de 95% confirmando que el efecto dicho de los factores de interés es relevante para realizar la optimización. El análisis de varianza o ANOVA reportó que el estadístico R- Cuadrado del modelo matemático propuesto según sus resultados es capaz de explicar el 87.1414% de la variabilidad en los resultados de viabilidad obtenidos, mientras que el estadístico R-cuadrado ajustado puede explicar el 83.2839% de los mismos.

También se puede observar que: el error estándar mostró una desviación estándar de los residuos de 7.5898 %, el error medio absoluto fue de 5.01262%.

Tabla 32. Análisis de varianza para la evaluación de la viabilidad de esporas de *Trichoderma spp* en sustrato sólido.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón- F	Valor- P
%Melaza	84.4741	1	84.4741	1.47	0.2354
Volumen Melaza	102.961	1	102.961	1.79	0.1913
Volumen inóculo	8093.42	1	8093.42	140.50	0.0000
Aireación	163.132	1	163.132	2.83	0.1028
Volumen Melaza*Volumen inóculo	1428.81	1	1428.81	24.80	0.0000
%Melaza*Volumen Melaza	1094.75	1	1094.75	19.00	0.0001
%Melaza*Volumen inóculo	595.71	1	595.71	10.34	0.0031
Volumen Melaza*Aireación	77.9357	1	77.9357	1.35	0.2539
%Melaza*Volumen Melaza*Aireación	70.5342	1	70.5342	1.22	0.2773
Residual	1728.18	30	57.6059		
Total (corrected)	13439.9	39			

R-cuadrada = 0.871414

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 0.832839

Error estándar del est. = 7.5898

Error absoluto medio = 5.01262

Estadístico Durbin-Watson = 1.3579 (P=0.0303)

*Fuente: Statgraphics Centurión XV.

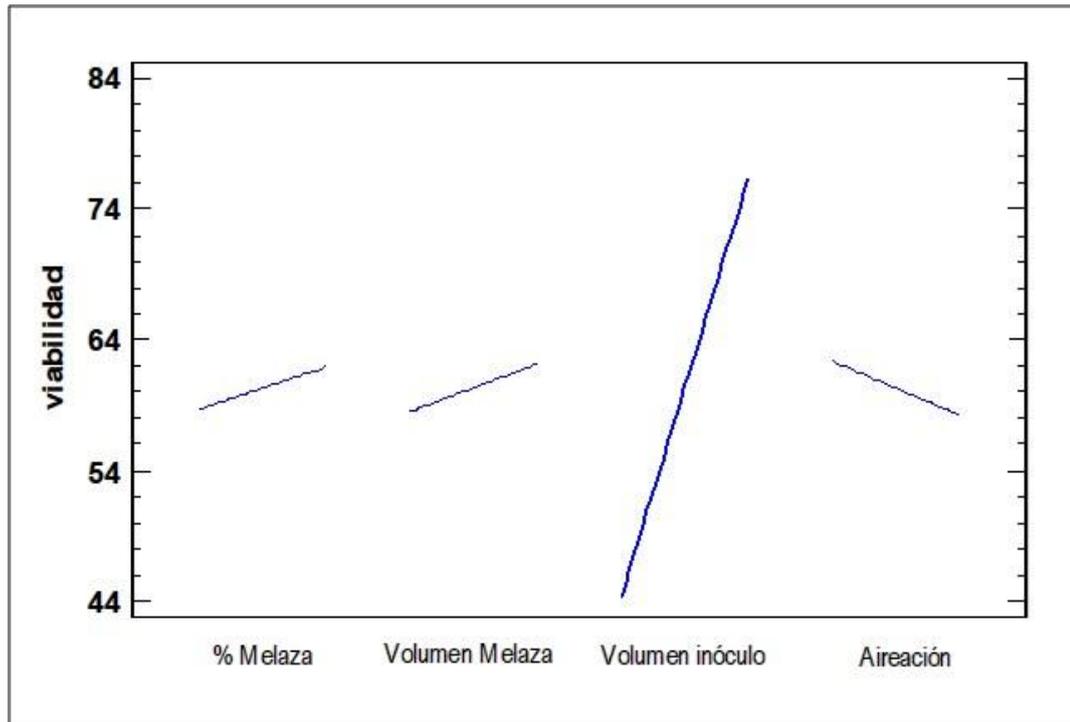


Figura 32. Efectos principales individuales sobre el porcentaje de viabilidad de esporas obtenidas de *Trichoderma spp.* en sustrato sólido

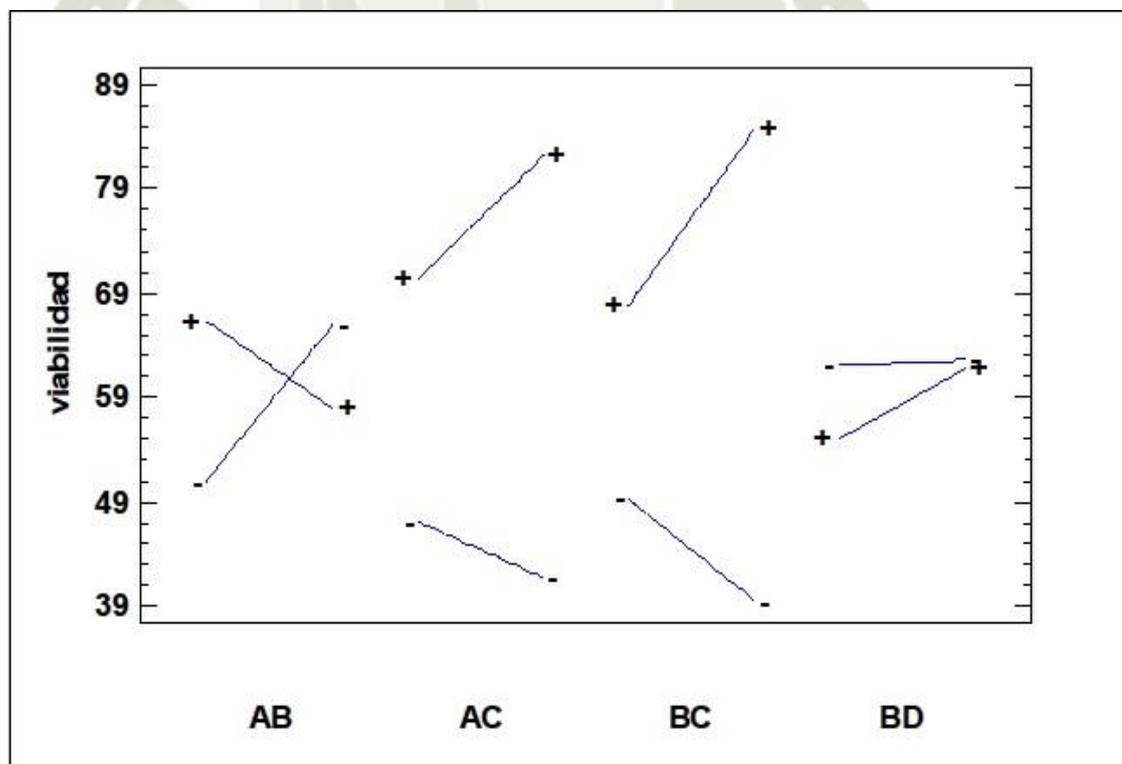


Figura 33. Gráfica de interacciones sobre el porcentaje de viabilidad de esporas obtenidas de *Trichoderma spp.* en sustrato sólido.

En la Figura 32 se pueden observar los efectos individuales de los factores sobre los resultados de porcentaje de viabilidad obtenido en las esporas.

Entre todos los factores, según la Figura 31, el más influyente y significativo esta codificado como la variable “C”, que representa al Volumen de inóculo (mL) presente en el medio de crecimiento, dicha influencia es positiva para la variable independiente mientras se tome un mayor valor del factor. Es decir que mientras más volumen de inóculo tenga el sustrato se obtendrá un mayor porcentaje de viabilidad. El cambio de su nivel de -1 a +1, conlleva aproximadamente un salto desde 44% hasta casi 80% en la viabilidad resultante. Este también es el factor con el mayor efecto con respecto a la variable independiente de concentración, la cual fue evaluada en un apartado anterior.

Continuando, vemos que el siguiente efecto individual más importante es la disposición y tamaño de la Aireación en las bolsas o unidades experimentales, aunque su efecto esta por detrás de otros tres que son interactivos, cabe mencionarlo ya que este también es lo suficientemente significativo para entrar al modelo matemático propuesto para la variable de concentración. Sin embargo, el cambio en sus niveles no es relevante al momento de tratar de optimizar los resultados de viabilidad.

Por último, los factores B y A correspondientes al Volumen de melaza y concentración de melaza respectivamente tampoco son significativos, puesto que se observa una ligera e irrelevante mejoría en los resultados cuando su nivel se acerca al valor de 1, pero estadísticamente deben considerarse en el modelo matemático, para poder incluir las interacciones en las que estén involucrados.

Como ya se mencionó los efectos interactivos de importancia serán evaluados con los gráficos de superficie de respuesta para poder discutirlos con mejor perspectiva. Ya que no hay ninguna interacción significativa con el factor de aireación que, al ser cualitativo, es el único que puede discutirse con la Figura 33.

3.4.2.1.1. FORMULACIÓN DEL MODELO MATEMÁTICO

Debido al análisis de varianza es que se pudo identificar cuál de los factores, tanto individuales como interactivos, tenía relevancia o si era lo suficientemente significativo para ser tomado en cuenta para ser incluido en el modelo matemático. Cuya función es de predecir el valor del porcentaje de viabilidad final de cada unidad experimental variando los niveles de los factores elegidos mediante el refinamiento de la Ecuación 5.

Dicho refinamiento se llevó a cabo descartando las variables cuyos Valores P fueran mayores a 0.05 y evaluando si al dejarlos fuera había una mejora en los estadísticos R2 y R2 ajustado.

Si bien los efectos individuales no son significantes, no se eliminaron del modelo matemático ya que, sin ellos incluidos, se imposibilitaría la presencia de interacciones. Excepto la variable “C”, correspondiente al valor del volumen de inóculo, ya que es el más influyente de todos.

Tabla 33. Coeficientes para el modelo matemático construido para calcular la concentración de esporas de *Trichoderma spp.*

COEFICIENTE	ESTIMADO
CONSTANT	60.708035
Aireación	-1.9893701
%Melaza	1.5071757
Volumen Melaza	1.8313718
Volumen inóculo	15.941072
Volumen Melaza*Volumen inóculo	6.6444407
%Melaza*Volumen Melaza	-5.7314382
%Melaza*Volumen inóculo	4.4321868
Volumen Melaza*Aireación	1.56061
%Melaza*Volumen Melaza*Aireación	-1.48465

* Fuente: Statgraphics Centurión XV.

De igual manera se eliminaron las interacciones BD y ABD, denotando que en cuanto a los porcentajes de viabilidad obtenidos el tipo de aireación utilizada no afecta el resultado final.

El objetivo de todo modelo matemático es dar resultados lo más cercanos posibles a los que serían obtenidos empíricamente, por eso se realizó el refinamiento. Tras ser realizado se llegaron a valores de 87.1414% y 83.2839% para los estadísticos R² y R² ajustado respectivamente, como ya estaba visible en la Tabla 32. Cabe resaltar que las indicaciones de remplazo de unidades e interpretación de resultados son iguales a las propuestas en el modelo matemático predictor de concentración, variando únicamente que la unidad final obtenida por el modelo en este caso sería porcentaje de viabilidad.

$$\begin{aligned} \text{Viabilidad} = & 60.708035 - 1.9893701 (\text{Aireación}) \\ & + 1.5071757 (\% \text{ Melaza}) + 1.8313718 (\text{Vol. Melaza}) \\ & + 15.941072 (\text{Vol. Inóculo}) + 6.6444407 (B * C) \\ & - 5.7314382 (A * B) + 4.4321868(A * C) \end{aligned}$$

Ecuación 5. Modelo matemático propuesto para calcular el porcentaje viabilidad de esporas de *Trichoderma spp.*

3.4.2.2. ANÁLISIS DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

Los efectos de las interacciones de los factores son muy importantes, ya que es muy posible que un factor individualmente pueda tener un efecto remarcablemente positivo, pero a la vez pueda presentar una reacción no esperada que pueda desfavorecer a las variables independientes, que son las más importantes después de todo.

En la Figura 35 tenemos las gráficas de contornos, en la parte A se puede ver con detalle la interacción BC, es decir Volumen de Melaza – Volumen de Inóculo con las condiciones fijas de 15 % de melaza y aireaciones finas.

Este es el efecto interactivo entre dos factores más relevante. Se puede apreciar que el porcentaje más alto de viabilidad que puede ser obtenido esta entre

los rangos de 80% a 90% y se puede llegar solo con mantener en el nivel 1 el volumen de inóculo, ya que sin importar que la variable del volumen de melaza este en su valor más bajo, se obtienen resultados satisfactorios.

Es importante mencionar que cuando ambas variables están en su valor máximo (+1) se potencian, ya que se puede llegar a bajar el nivel del volumen de inculo hasta +0.6 sin alterar los resultados finales.

A su vez se puede observar que su peor resultado no es cuando ambos factores tienen un nivel de -1 como era de esperarse, sino que el efecto más negativo se observa cuando el volumen de melaza está en su tope y el de inóculo está a su mínimo. Pudiendo ser posible que al aumentar tanto la humedad del medio no se produzcan esporas y, por ende, no puedan germinar por su limitada concentración.

En la parte B de las figuras 33 y 35 se puede observar la interacción AB, es decir: Concentración de Melaza - Volumen de Melaza mientras se mantienen fijos los valores de 2.5 mL de Inóculo y aireaciones finas.

El comportamiento evaluado en este gráfico de superficie de respuesta tiene resultados muy buenos, ya que, aún en la peor interacción del espacio experimental se obtiene 60% de viabilidad.

Ambas variables son casi igual de importantes, ya que cuando cualquiera de las variables está en valores correspondientes al nivel (-1), se puede elegir valores de +1 para la sobrante y los valores de viabilidad se mantienen bastante altos, en promedio desde 80% hasta 90% de viabilidad.

Sin embargo, existe un tipo de toxicidad cuando se prueba con el nivel +1 en ambas variables, ya que expresada en la interacción mostrada en la Figura 33, mas no en la gráfica de superficie de respuesta.

En dicha imagen se puede apreciar que el porcentaje de viabilidad desciende hasta su mínimo (aproximadamente 60%) bajo dichas condiciones.

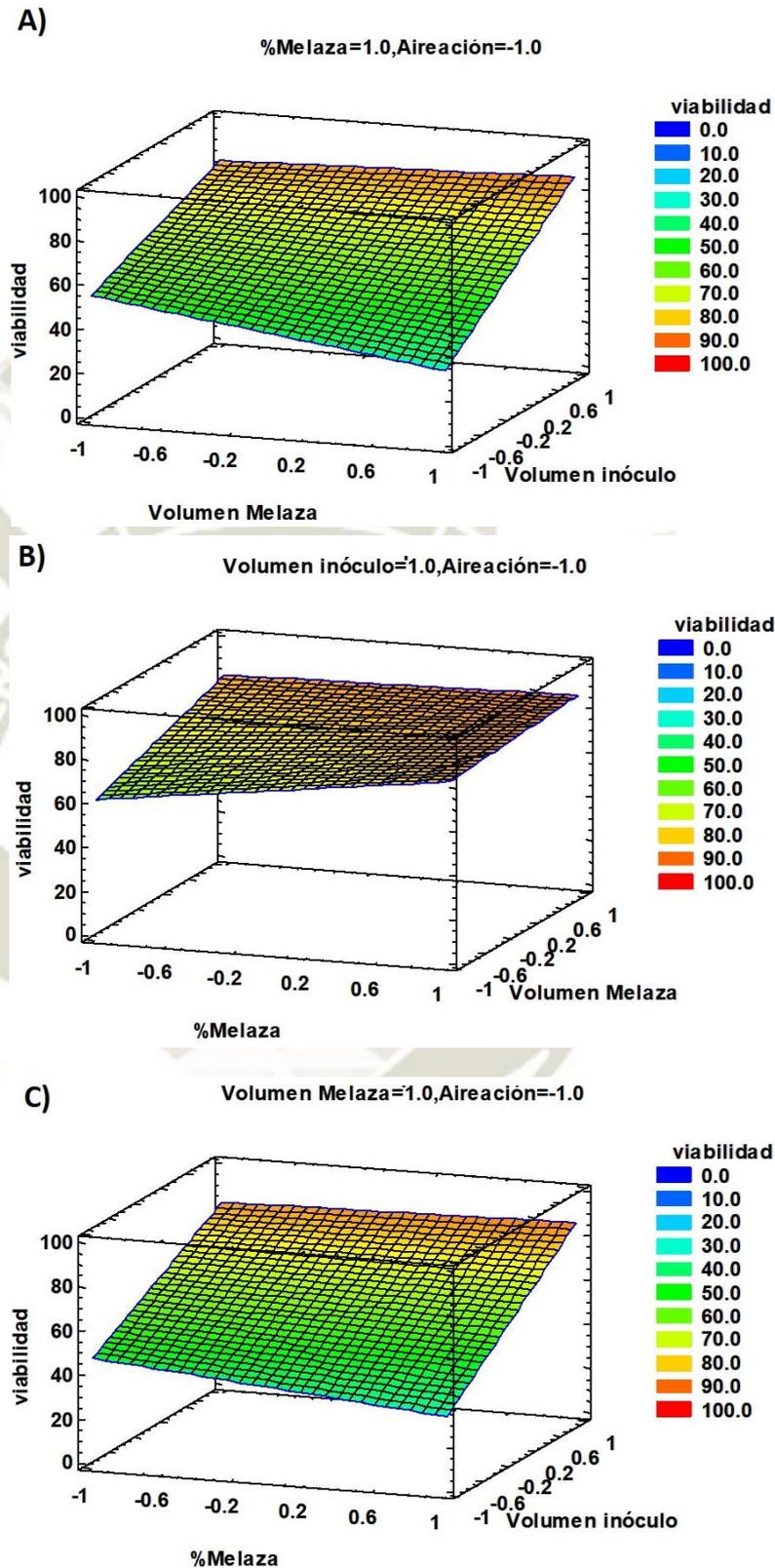


Figura 34. Superficies de respuesta para el porcentaje de viabilidad de esporas obtenidas de *Trichoderma spp.* en sustrato sólido. Interacción BC (A), interacción AB (B) e interacción AC (C).

Es más, es igual de desfavorable que no hay diferencia con poner 5 mL de melaza al 15% que utilizar 15 mL de melaza al 15%.

Por último, se observa en la parte C de la Figura 35 a la interacción de efectos AC, que representan a los factores Concentración de Melaza – Volumen de Inóculo, teniendo como valores fijos: 15 mL de melaza y la aireación fina.

La interacción se parece bastante a la antes observada en los factores BC juntos. De igual manera la variable C o el volumen del inóculo controla prácticamente el valor de viabilidad a esperar para que siempre tenga un rango de 80% a 90% solo por tener su valor al nivel +1, sin importar que se ponga una solución de melaza con concentración de 5%.

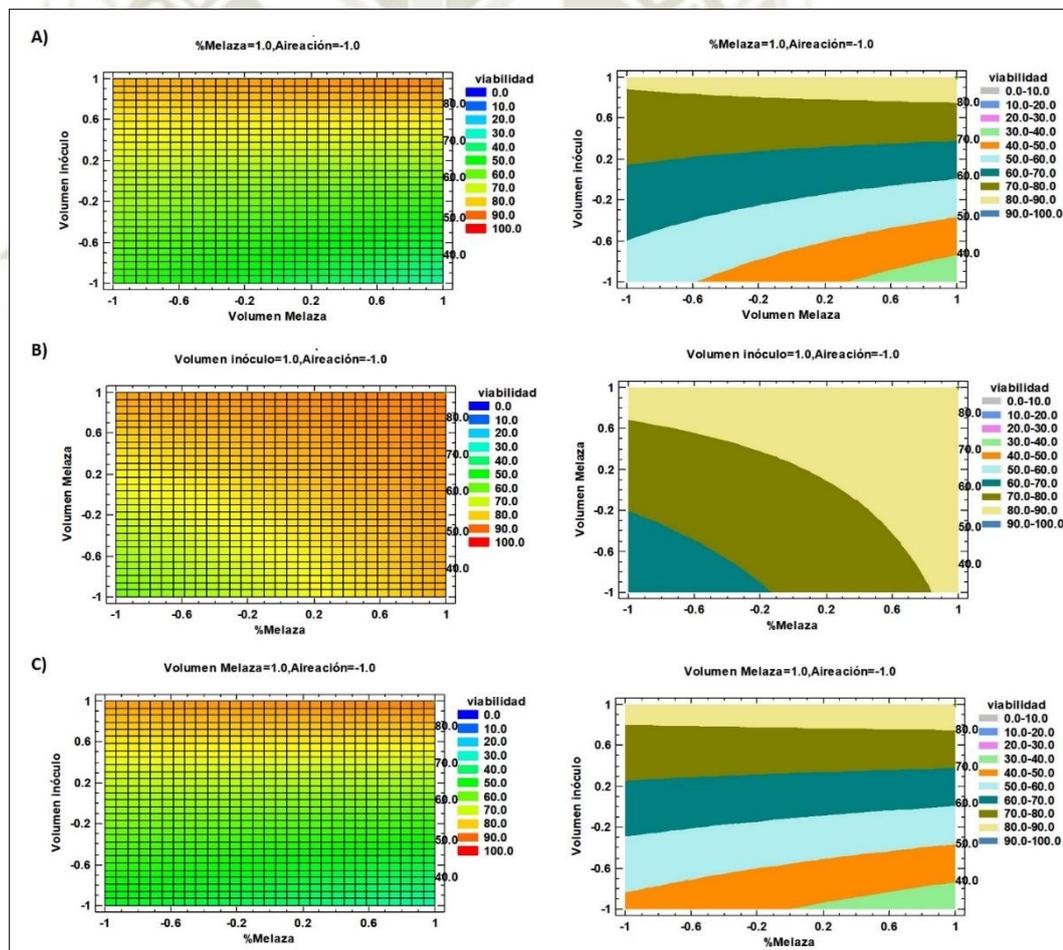


Figura 35. Gráficas de contornos para el porcentaje de viabilidad de esporas obtenidas de *Trichoderma spp.* en sustrato sólido, interacción BC (A), interacción AB (B) e interacción AC (C).

Como ambas variables, tanto concentración de esporas como el porcentaje de viabilidad de las mismas, son importantes se debió realizar una optimización múltiple, para asegurar el mejor resultado para ambas.

Sin embargo, el óptimo obtenido por ambas variables resulto ser el mismo y también haber sido uno de los tratamientos creados por el diseño factorial de la matriz experimental. En la Tabla 34 se muestra el óptimo codificado, el óptimo real y los valores que se podría llegar a obtener de concentración de esporas en UFC/mL y de porcentaje de viabilidad siguiendo un tratamiento con las mejores interacciones de los factores.

Tabla 34. Óptimo resultante para el porcentaje de viabilidad y concentración de esporas de *Trichoderma spp.* en sustrato sólido.

Factor	Óptimo codificado	Óptimo Real	Valor óptimo de viabilidad	Valor óptimo de Concentración
%Melaza	1.0	15%		
Volumen Melaza	1.0	15 MI		
Volumen inóculo	1.0	2.5 MI	86.74%	3.79259E8
Aireación	-1.0	Finas		

* Fuente: Statgraphics Centurión XV.

El valores obtenidos y visibles en la Tabla 34 indican que lo más adecuado es usar todos los factores en su nivel +1, menos el factor Aireación en donde se debe optar por la aireación de perforaciones finas por sobre la Aireación por perforación única y de mayor tamaño. Tomando en cuenta todos estos valores se puede llegar a obtener esporas de *Trichoderma spp.* a 3.79259×10^8 UFC/mL con una viabilidad de 86.74%. Al recrear por segunda vez las condiciones del óptimo teórico se obtuvieron valores de 4.13×10^8 UFC/mL de concentración y un 85.15% de viabilidad, estos resultados si bien no son idénticos a los predichos por el modelo matemático propuesto están dentro del rango de confianza explicado por el valor del estadístico R^2 .

Los resultados para ambas variables, concentración y porcentaje de viabilidad, parecen mantener una tendencia ascendente y lineal mientras los factores significativos sigan subiendo de nivel. Esto supone que aún no se ha llegado a un óptimo máximo, hacerlo significaría establecer otra región experimental con otro diseño factorial y sin seguridad de que estemos en la región donde se encuentra el óptimo y talvez utilizando una cantidad de recursos que talvez si aumenten los valores de las variables de interés, pero conlleven a perder la rentabilidad del proceso.

Si comparamos la concentración obtenida en la Tabla 34 a través del proceso de optimización con las obtenidas por otros sustratos experimentales en la investigación de Aceves et al (Tabla 35), podemos notar que se obtuvo una concentración competente, con valores bastante parecidos y hasta por encima de algunos granos enteros como el de arroz y alpiste que son productos industriales con un valor monetario mucho más elevado que el arrocillo, doblando su precio como mínimo.

Por otro lado, se ve que no se superó la concentración obtenida por el medio de olote picado, esto puede explicarse por la baja cantidad de cenizas que contiene el sustrato como ya se discutió en un apartado anterior.

Si lo comparamos con otros desechos o subproductos industriales como lo son el rastrojo de maíz, las cascara de arroz, cacao y alpiste; se superó por mucho sus resultados finales.

Así mismo, los porcentajes de viabilidad son muy distintos, los valores obtenidos por la optimización muestran resultados bastante inferiores a los vistos por otros sustratos experimentales, esto puede deberse a muchos factores. Hay que tomar en cuenta que el hongo *Trichoderma spp.* muestra comportamientos muy diferentes de acuerdo al suelo desde el cuál fue aislado o proviene y esto puede afectar la velocidad de germinación que mostró en los resultados finales.

Tabla 35. Resultados de ensayos de concentración y viabilidad de esporas de *Trichoderma spp.* Producidas en distintos sustratos, en porcentajes.⁽²⁶⁾

SUSTRATO	CONCENTRACION (UFC/mL)	% VIABILIDAD
Olote de Maiz picado	4.43E8	99
Grano de Arroz	3.13E8	97.5
Grano de Alpiste	2.31E8	94.3
Cáscara de Arroz	1.47E8	97
Rastrojo de Maiz	1.40E8	91.8
Cáscara de Café	0.57E8	89.3
Cáscara de Cacao	0.42E8	90.3
Grano quebrado de maíz	0.25E8	93

Sin embargo, comercial e industrialmente, no se toma en cuenta el porcentaje de viabilidad. Ninguna empresa que vende biocontroladores reporta este valor.

Según el Manual de producción de Hongos biocontroladores de SENASA, una preparación de *Trichoderma spp.* o de cualquiera de sus otras especies como *Trichoderma Harzianum* o *Trichoderma Atroviride* para ser considerado apto para uso agrícola o como un tratamiento para enfermedades fitopatogénicas tiene que tener un mínimo de concentración de 1.00×10^7 UFC/mL.

Al fin del año 2018 existen muchos productos en el mercado como se pueden ver en la Tabla 36, todos tienen diferentes concentraciones siendo la menor 1×10^{12} UFC/mL y la menor 3×10^7 UFC/mL. Los resultados obtenidos son competentes industrialmente y tienen una ventaja, que es el gran ahorro que se tiene al usar un sustrato de tan bajo costo.⁽⁵⁶⁻⁶²⁾

Es importante mencionar que para tratar un campo o cultivo se debe tener la supervisión y prescripción de un Ing. Agrónomo especializado en fitopatología, ya que cada tipo de enfermedad y sus etapas necesita una dosis y recurrencia de aplicación distinta para obtener resultados eficaces sin alterar la dinámica del suelo a tratar.

Tabla 36. Productos en el mercado a base de *Trichoderma spp.*⁽⁵⁶⁻⁶²⁾

PRODUCTO	EMPRESA	CONCENTRACION (UFC)
Triconova	Novagri	4 X 10 ⁹ / mL
Trichomax	Solagro S.A.C	1 X 10 ⁹ / mL
Excalibur Gold	Disagro	1 X 10 ¹² / mL
Biosa	Tricho- Biosa	4 X 10 ¹² / mL
TrichoH	Agrobiotecnía	3 X 10 ⁷ / mL
Triderma	Ideas Biologicas	1 X 10 ⁹ / mL
Tricobiol	Agricola Tanausu	4 X 10 ¹¹ / mL

3.5. EVALUACIÓN DE ACCIÓN ANTAGONISTA DE ESPORAS DE *Trichoderma spp.* OBTENIDAS CONTRA *Fusarium spp.* POR CULTIVO DUAL.

3.5.1. OBTENCIÓN Y REPRODUCCIÓN DE *Fusarium spp.*

La cepa aislada se obtuvo por medio del laboratorio de diagnóstico fitopatológico de la empresa Biotecnólogos del Sur S.A.C. El microorganismo fue aislado desde muestras de suelo de un campo infectado cuyo cultivo de cebolla presentaba podredumbre basal.

Se repicó por punción en medio sólido PDA, se mantuvo a 30°C. Se pudieron observar colonias algodonosas con un ligero aspecto polvoriento. Con diferentes tonalidades que variaban desde el color naranja hasta el rosado claro, como se puede observar en la Figura 36

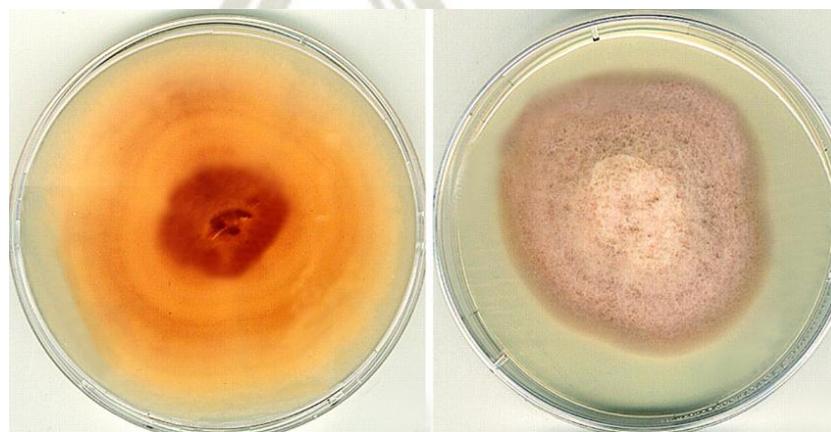


Figura 36. *Fusarium spp.* en medio PDA sólido. Vistas del reverso y frente de la placa Petri.

3.5.2. PRUEBA DE ANTAGONISMO POR CULTIVO DUAL.

Se enfrentaron ambas cepas en tres repeticiones, sin contar la placa donde se mantenía *Fusarium spp.* sin ningún otro microorganismo presente. Se monitoreo su velocidad de crecimiento con un escalímetro cada 24 horas como se describió en un apartado anterior. Las medidas obtenidas progresivamente durante el ensayo están detalladas en el Anexo 7. Se mantuvieron enfrentados tanto *Trichoderma spp.* y *Fusarium spp.* durante 14 días, que fue cuando la colonia en la placa control correspondiente a *Fusarium spp.* ya no presentó modificaciones dimensionales, terminando el periodo de evaluación con 8.7 cm de crecimiento en la placa Petri.

Por otro lado, las tres repeticiones del antagonismo tuvieron medidas finales de crecimiento bastante similares entre sí, siendo estas 2.3 cm, 2.4 cm y 3.2 cm. Tomando en cuenta que las medidas obtenidas en la placa control representan el 100% del crecimiento esperado, cada repetición fue antagonizada en un 73.84104%, 71.3229% y 65.7931% respectivamente, teniendo un promedio de 70.319% de acción antagónica. Los resultados finales son visibles en las Figura 37 a continuación.

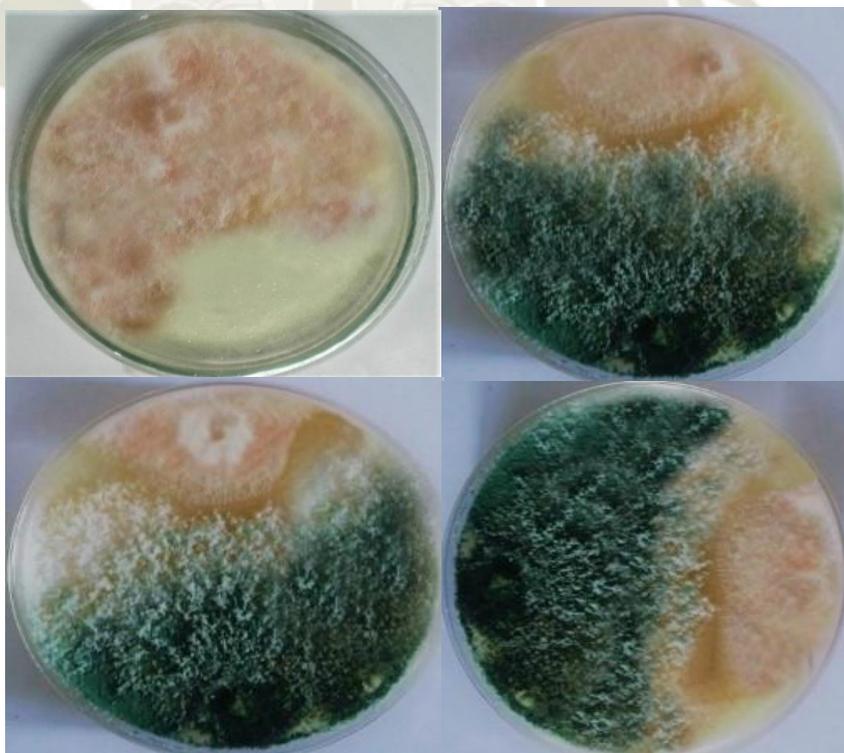


Figura 37. Resultados de antagonismo en cultivo dual *Trichoderma spp.* vs *Fusarium spp.*. Cultivo control (*Fusarium spp.*) (A), primera, segunda y tercera repetición (B, C Y D).

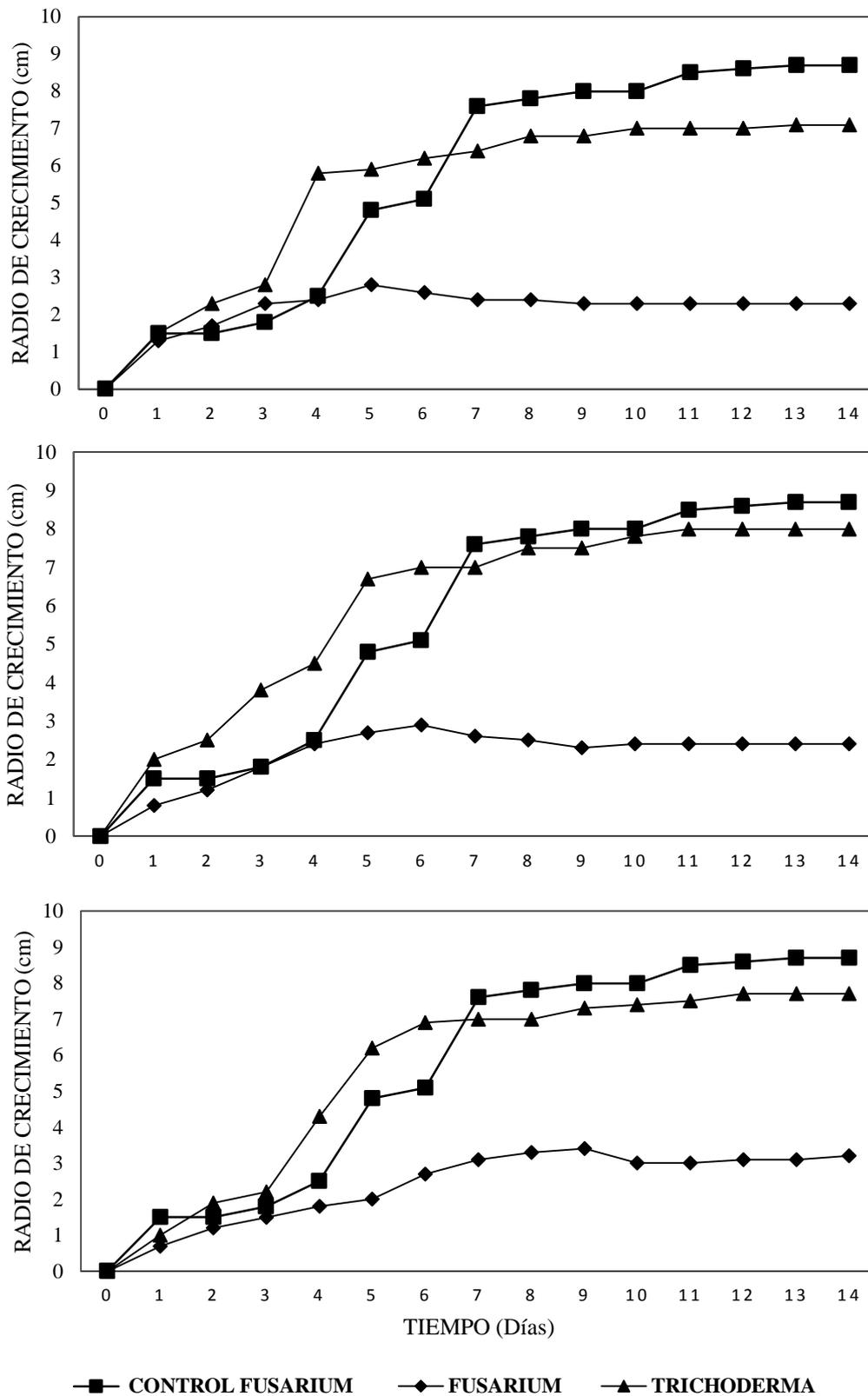


Figura 38. Crecimientos reportados por *Trichoderma spp.* y *Fusarium spp.* en las repeticiones del ensayo de Antagonismo, comparado con el crecimiento control de *Fusarium spp.*

Los datos estadísticos descriptivos del crecimiento tanto de la placa control como de las repeticiones realizadas al antagonismo en la Figura 38 se pueden ver en la Tabla 37, los coeficientes de varianza entre las repeticiones del control tienen un porcentaje de varianza insignificante siendo el mayor de 4.88%. Por otro lado, los coeficientes de variación de las placas de antagonismo son bastante altos siendo el mayor de 34.44%, esto puede deberse a que lo que se está evaluando son interacciones entre microorganismos, donde no necesariamente debe haber una precisión exacta en la repetibilidad porque los datos obtenidos dependen de interacciones biológicas entre ellos.

Tabla 37. Análisis Estadístico descriptivo para los datos obtenidos del antagonismo entre *Trichoderma spp.* y *Fusarium spp.*

Día	Control <i>Fusarium</i>		Antagonismo <i>Fusarium</i>	
	Promedio	CV %	Promedio	CV %
D0	0	0 %	0	34.44%
D1	1.45	4.88%	0.93	21.12%
D2	1.45	4.88%	1.37	21.65%
D3	1.75	4.04%	1.87	15.75%
D4	2.55	2.77%	2.2	17.44%
D5	4.85	1.46%	2.5	5.59%
D6	5.2	2.72%	2.73	13.35%
D7	7.7	1.84%	2.7	18.05%
D8	7.85	0.90%	2.73	23.82%
D9	8.05	0.88%	2.67	14.75%
D10	8.05	0.88%	2.57	14.75%
D11	8.45	0.84%	2.57	16.77%
D12	8.6	0%	2.6	16.77%
D13	8.7	0%	2.6	18.73%
D14	8.7	0%	2.63	34.44%

* Fuente: *Statgraphics Centurión XV.*

El análisis de medidas repetidas requiere cumplir con el supuesto de esfericidad para poder seleccionar las pruebas estadísticas subsecuentes; por ello se realizó la prueba de esfericidad W de Mauchly la cual reportó un valor P menor a 0.05 ($p=0.000$) el cual indica que no existe esfericidad asumida y que es necesario aplicar correctores para poder identificar diferencias significativas en los efectos,

los cuales resultantes de los datos de antagonismo están presentes en el Anexo 8, El análisis de varianza (Tabla 38) para la evaluación del efecto del tiempo fue realizada con el estadístico de Greenhouse-Geisser debido a que no se cumplió el supuesto de esfericidad. Obteniéndose un valor P de 0.000, demostrando que el crecimiento de las cepas en todas las unidades, incluyendo a la placa control, se ve significativamente afectado por el tiempo.

De igual manera se realizó un análisis de varianza (Tabla 39) para la evaluación del efecto de crecimiento entre repeticiones, con el mismo estadístico de Greenhouse-Geisser puesto que, ambos ANOVA provienen de la misma matriz de datos. Se obtuvo un valor P de 0.000, mostrando que las interacciones de antagonismo entre las placas son significativamente diferentes entre las placas.

Tabla 38. Análisis de varianza para la evaluación de la capacidad antagónica de *Trichoderma spp.* ante *Fusarium spp.* a través del tiempo.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Valor F	Valor p
Días	263.474	1.190	221.439	187.471	0.000
Días * Tratamiento	114.743	1.190	96.437	81.644	0.001
Error(Días)	4.216	3.569	1.181		

* Fuente: Statgraphics Centurión XV.

Tabla 39. Análisis de varianza para la evaluación de la capacidad antagónica de *Trichoderma spp.* ante *Fusarium spp.* entre las repeticiones.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Valor F	Valor p
Intersección	1076.789	1	1076.789	5306.317	.000
Repeticiones	205.504	1	205.504	1012.705	.000
Error	.609	3	.203		

* Fuente: Statgraphics Centurión XV.

Si bien se puede observar una variabilidad importante entre las repeticiones del antagonismo, el dato realmente importante y relevante para poder discutir la actividad antagónica de *Trichoderma spp.* es demostrar que el crecimiento observado en las placas de antagonismo es estadísticamente diferente del visto en la placa control.

En la Tabla 40 se puede observar, que el crecimiento de *Fusarium spp.* en las placas de antagonismo no es diferente al evidenciado en la placa de control hasta el día 5, donde la placa control mostraba un radio de 4.85+/-0.64 cm., mientras que, el crecimiento promedio influenciado por *Trichoderma spp.* se estancó en 2.5 +/- 1.08 cm. apenas 0.3 cm. más grande que la medición anterior. Más adelante, esta brecha continúa creciendo hasta que, al final del periodo de observación se puede ver como el crecimiento de ambos se diferencia bastante siendo 8.7 cm y 2.63 cm. respectivamente. Estadísticamente se comprueba que la presencia de *Trichoderma spp.* sí ejerce una diferencia importante en la proliferación de *Fusarium spp.*

Tabla 40. Comparaciones múltiples para la actividad antagónica de *Trichoderma spp.* Ante *Fusarium spp.* en distinto tiempo mediante LSD Fisher.

Placa	D0	D1	D2	D3
Control	0.00+/-0.00 ^a	1.45+/-0.64 ^a	1.45+/-0.64 ^a	1.75+/-0.64 ^a
Antagonismo	0.00+/-0.00 ^a	0.93+/-0.8 ^a	1.37+/-0.72 ^a	1.87+/-1.00 ^a
Placa	D4	D5	D6	D7
Control	2.55+/-0.64 ^a	4.85+/-0.64 ^a	5.2+/-1.27 ^a	7.7+/-1.27 ^a
Antagonismo	2.2+/-0.86 ^a	2.5+/-1.08 ^b	2.73+/-0.38 ^b	2.7+/-0.9 ^b
Placa	D8	D9	D10	D11
Control	7.85+/-0.64 ^a	8.05+/-0.64 ^a	8.05+/-0.64 ^a	8.45+/-0.64 ^a
Antagonismo	2.73+/-1.23 ^b	2.67+/-1.58 ^b	2.57+/-0.94 ^b	2.57+/-0.94 ^b
Placa	D12	D13	D14	
Control	8.6+/-0.00 ^a	8.7+/-0.00 ^a	8.7+/-0.00 ^a	
Antagonismo	2.6+/-1.08 ^b	2.6+/-1.08 ^b	2.63+/-1.23 ^b	

* Fuente: Statgraphics Centurión XV.

La interacción entre ambos microorganismos se puede ver en la Figura 37, se puede apreciar que el hongo antagonista (*Trichoderma spp.*) logró frenar el avance del hongo patógeno (*Fusarium spp.*). En las tres repeticiones se puede ver que en la zona de contacto hay un espacio vacío denotando un antagonismo mutuo por contacto, ya que en los días 9 y 10 se pudo notar un retraimiento ligero de ambos hongos hacia donde había sido inicialmente sembrado y en la medida respectiva de la retracción en la placa se estabilizaron hasta el fin del monitoreo.

Este tipo de inhibición no es muy común en *Trichoderma spp.* puesto que, su modo de acción es el micoparasitismo, lo cual implica entrar en contacto con el patógeno y esporular o producir conidias encima del micelio patógeno, cosa que no se ve en las unidades experimentales monitoreadas.

Este dato podría tener una estrecha relación con el bajo porcentaje de viabilidad obtenido en los resultados de optimización, lo cual podría indicar que el hongo antagonista tiene problemas para reconocer condiciones no hostiles y empezar su germinación.

Sin embargo, esto no descarta la acción biocontroladora del hongo estudiado, ya que puede ejercer una acción antagonista en promedio de 70.319% como lo indican los resultados estadísticos.

Los resultados satisfactorios son indicativos de que el hongo *Trichoderma spp.* aislado y probado durante todas las fases de experimentación tiene un uso preventivo. Es decir, que puede combatir *Fusarium spp.* y otros patógenos siempre y cuando este ya desarrollado en el suelo antes de entrar en contacto con los microorganismos indeseados y haya establecido una simbiosis con las raíces de la planta presente, que muy aparte de protegerla atacando mediante micoparasitismo, le brindará otras ventajas como la mayor biodisponibilidad de nutrientes y mayor resistencia al cambio de temperatura o pH en el suelo. Dichas acciones fortalecerán la planta para que no sea tan vulnerable al ataque de un fitopatógeno e independientemente de eso pueda brindar productos de mejor calidad y una velocidad mayor.

Comparando la acción antagónica del aislado local de *Trichoderma spp.* con otros de distintos lugares es que podemos contrastar con investigaciones como la que

realizo Fernandez et al, que probó la capacidad antagonica in vitro de *Trichoderma atroviride* contra *Fusarium oxysporum* presente en Mango nativo de México, esta investigación probó que hubo una actividad antagonica de 62.9% sin micoparasitismo.⁽⁶³⁾

Otras investigaciones relevantes son las realizadas por Casimiro et al y Pemberthy et al, donde se trabajó con *Trichoderma harzianum* aislada de suelos colombianos enfrentándola in vitro con la misma técnica (cultivo dual) contra *Fusarium spp.* proveniente de plantas de Maracuyá y Crisantemo ornamental, exhibiendo una acción antagonista de 70.51% y 66.8% respectivamente sin presentar micoparasitismo.^(64,65)

Por último, es importante mencionar que estas pruebas también se realizaron en Canadá y España por Bunbury-Blanchette et al y Saro et al respectivamente. Revelando acción antagonica in vitro sin micoparasitismo de 72.8% y 69.5% contra *Fusarium oxysporum* proveniente de cultivo de cebolla.^(66,67)

La acción antagonista de la cepa aislada de suelo Arequipeño, mostró ser competente con un valor de 70.319%, entrando en la clasificación cualitativa propuesta por Bell et al de “2” que va desde 1 hasta 5, siendo “1” la calificación del micoparasitismo.⁽³⁷⁾

CAPITULO IV

4.1. CONCLUSIONES

- **CONCLUSIÓN GENERAL:**

Se obtuvieron esporas de *Trichoderma spp.* con una concentración de 3.7925×10^8 UFC /mL y un 86.74% de viabilidad respectivamente en la región experimentada. A su vez, se probó su actividad antagónica contra *Fusarium spp.* teniendo en promedio, 70.319% de inhibición.

- **PRIMERA:**

El sustrato experimental subproducto del arroz denominado arrocillo obtenido de lotes de producción de arroz cáscara de la ciudad de Arequipa está compuesto por 11.51% de Humedad, 87.83% de Sólidos volátiles y 0.66% de cenizas.

- **SEGUNDA:**

Se determinó la cinética de crecimiento de la cepa de *Trichoderma spp.* aislada por el proyecto “FORMULACIÓN DE UN BIOCONTROLADOR DE *Oidium spp.* EN BASE A FLORA NATIVA MICROBIANA DE *Origanum vulgare* (OREGANO) DE TRES PISOS ECOLÓGICOS COMBINADO CON ESTIMULANTES DE CRECIMIENTO FOLIAR”. Se identificó que entró a la fase exponencial entre el tercer y cuarto día, entrando a la fase estacionaria en el séptimo día hasta el final del monitoreo, que duró dieciocho días.

- **TERCERA:**

Tras el desarrollo de la prueba preliminar de cultivo y cosecha de esporas de *Trichoderma spp.* se determinaron valores de concentración de 3.0785×10^7 UFC/mL obtenidos a partir de un medio de arrocillo producido con proporción de 250g de Arrocillo- 350 mL de Agua, determinando que tiene un 41.51% de humedad y 58.49% de sólidos totales.

El tratamiento cuatro (1000g de Arrocillo - 1150 mL de Agua) se posicionó como la alternativa correcta de escalamiento para la producción del sustrato obteniendo valores de 43.8066% de humedad y 56.1933% de sólidos totales.

- **CUARTA:**

La optimización de concentración y viabilidad mediante superficie de respuesta concluyó que las variables evaluadas tienen efectos significantes en la concentración y viabilidad de esporas de *Trichoderma spp.*, siendo los principales el volumen de inóculo, su interacción con el volumen de melaza empleado y la concentración de melaza. Como resultado óptimo de la región experimental evaluada se sabe que añadiendo al sustrato 15 mL de melaza al 15% de concentración, 2.5 mL de inóculo y aireación con perforaciones finas a 5 cm de altura por encima del sustrato y espaciadas por 3 cm entre ellas; se puede obtener 3.7925×10^8 UFC /mL y un 86.74% respectivamente.

- **QUINTA:**

La prueba de Antagonismo se realizó por triplicado obteniendo medidas finales de crecimiento de 2.3 cm, 2.4 cm y 3.2 cm. El valor obtenido en la placa control de *Fusarium spp.* (8.7cm) representó el 100% del crecimiento esperado. Por lo tanto, la acción antagónica fue de 70.319% en promedio, siendo clasificada cualitativamente con “2” por la escala propuesta por Bell et al.

4.2. RECOMENDACIONES

- Si bien se demostró que *Trichoderma spp.* tiene acción antagónica *in vitro* frente a *Fusarium spp.*, sería recomendable hacer pruebas en *in vivo* en viveros o en campo tomando especial atención a los síntomas presentados al comienzo del cuadro de fusariosis y a su regresión relacionada o no con la presencia de *Trichoderma spp.*
- Evaluar el efecto antagónico de *Trichoderma spp.* contra otros microorganismos patógenos, tanto *in vitro* como *in vivo*, como por ejemplo *Rhizoctonia* o *Sclerotium*, los cuales también representan pérdidas en el sector agrícola.
- Evaluar nuevos sustratos experimentales de menor costo y mejor rendimiento que el arroz quebrado, tomando en cuenta los principales productos del Perú y sus desechos, los cuales suelen tener poco valor comercial.
- Realizar un estudio de mercado, para evaluar las utilidades y pérdidas del proceso escalado industrialmente. Para poder abastecer las necesidades locales o regionales de biocontroladores.

BIBLIOGRAFÍA

1. Betancourt M. El Suelo. Inia Tacuarembó [Internet]. 2015;2:3–19. Available from: <http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=BAC.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=020674>
2. Rose MT, Cavagnaro TR, Scanlan CA, Rose TJ, Vancov T, Kimber S, et al. Impact of Herbicides on Soil Biology and Function [Internet]. Vol. 136, Advances in Agronomy. Elsevier Inc.; 2016. 133-220 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.agron.2015.11.005>
3. MAGA. El agro en cifras 2018. Dirección de Planeamiento. 2018;9:62.
4. Agraria S integrado de E. Anuario Estadístico de la Producción agrícola y ganadera 2017. Instituto de Estadística [Internet]. 2017;1–156. Available from: http://siea.minagri.gob.pe/siea/sites/default/files/anuario-agricola-ganadera2016_210917_0.pdf%0Ahttp://nube.siap.gob.mx/cierre_agricola/
5. Rodríguez A, Guillén C, Valle H, Uva V, Segura R, Laprade Se, et al. 8. Aspectos a considerar sobre el control biológico. Corbana. 2010;2:2–3.
6. Moazami N. Biological Control. Compr Biotechnol Second Ed. 2011;3(January 2016):731–9.
7. Cabrera G, Briano J, Briano AE De. El control biológico de plagas. 2012;57–64.
8. Rodríguez V. Efecto antagonico y biocontrolador de algunos microorganismos saprofiticos contra Rhizoctonia solani un fitopatógeno causante del (damping off) en plantas de tomate. Repos Tesis - UNMSM [Internet]. 2011;14–24.
9. Astorga-Quirós K, Meneses-Montero K, Zúñiga-Vega C, Brenes-Madriz J, Rivera-Méndez W. Evaluación del antagonismo de Trichoderma sp. y Bacillus subtilis contra tres patógenos del ajo. Tecnol en Marcha [Internet]. 2014;27(2):82–91. Available from: http://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/viewFile/1929/1755

10. Hirpara DG, Gajera HP, Hirapara JG, Golakiya BA. Inhibition coefficient and molecular diversity of multi stress tolerant *Trichoderma* as potential biocontrol agent against *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2017;55:75–92.
11. Fernández-Northcote EN, Navia O, Gandarillas A. Bases de las Estrategias de Control Químico del Tizón Tardío de la Papa Desarrolladas por PROINPA en Bolivia. *Rev Latinoam la Papa*. 1999;11:1–25.
12. Infante D, Martínez B, González N, Reyes Y. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Rev Protección Veg*. 2009;24(1):14–21.
13. Claro OE, George E, Vega OF, Pérez C, Urrutia EL. Rifai desarrolladas sobre tres sustratos sólidos mediante lecho fluidizado y tamizaje vibratorio
Assessment of harvest of *Trichoderma harzianum* spores Rifai developed on three solid substrates and collected by fluidized bed and by vibratory sieving. 2015;19(1):23–7.
14. Li YT, Hwang SG, Huang YM, Huang CH. Effects of *Trichoderma asperellum* on nutrient uptake and *Fusarium* wilt of tomato. *Crop Prot* [Internet]. 2018;110:275–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2017.03.021>
15. Rubio SV, Fereres C a. Control biológico de plagas y enfermedades de los cultivos. *Ciencias Agrar* [Internet]. 2005;(5):1–16. Available from: <file:///C:/Users/stefyq/Documents/Tesis/textos consultados/cb.pdf>
16. Gupta, Vijai K.; Schmoll, Monika; Herrera-Estrella, Alfredo; Upadhyay, R.S; Druzhinina, Irina; Tuohy MG. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. 2014.
17. Hohmann P, Jones EE, Hill RA, Stewart A. Understanding *Trichoderma* in the root system of *Pinus radiata*: Associations between rhizosphere colonisation and growth promotion for commercially grown seedlings. *Fungal Biol* [Internet]. 2011;115(8):759–67.

18. Klein D, Eveleigh DE. Ecology of Trichoderma. *Trichoderma and Gliocladium -Volume 1*. 1998. 57-69 p.
19. Klein PH. *Industrial Microbiology and Biotechnology (Capítulo)*. Microbiology. 2002.
20. Krishna C. Solid-state fermentation systems - An overview. *Crit Rev Biotechnol*. 2005;25(1–2):1–30.
21. Fernández-Sandoval MT, Ortiz-García M, Galindo E, Serrano-Carreón L. Cellular damage during drying and storage of *Trichoderma harzianum* spores. *Process Biochem* [Internet]. 2012;47(2):186–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2011.10.006>
22. González-Morlá A, Más-Diego SM, Cabeza-Pullés D, Campos-Sofía M. Influencia de la luz solar en el crecimiento y esporulación del biofungicida *Trichoderma viride*. *Tecnol Química*. 2000;XX(1):92–7.
23. López Mondéjar R. Detección y Cuantificación de *Trichoderma harzianum* , y Evaluación de su Actividad Biocontrol frente a la Fusariosis Vascular del Melón mediante la Aplicación de Herramientas Moleculares. 2011;162.
24. De la Cruz-Quiroz R, Roussos S, Rodríguez-Herrera R, Hernandez-Castillo D, Aguilar CN. Growth inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Phytophthora capsici* by native Mexican *Trichoderma* strains. *Karbala Int J Mod Sci* [Internet]. 2018;4(2):237–43. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405609X17306115>
25. Przylucka A, Akcapinar GB, Chenthamara K, Cai F, Grujic M, Karpenko J, et al. HFB7 – A novel orphan hydrophobin of the Harzianum and Virens clades of *Trichoderma*, is involved in response to biotic and abiotic stresses. *Fungal Genet Biol* [Internet]. 2017;102:63–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2017.01.002>
26. Michel-Aceves AC, Otero-Sánchez MA, Martínez-Rojero ; R D, Rodríguez-Morán NL, Ariza-Flores ; R, Barrios-Ayala ; A. Redalyc.PRODUCCIÓN MASIVA DE *Trichoderma harzianum* Rifai EN DIFERENTES SUSTRATOS

- ORGÁNICOS. Rev Chapingo Ser Hortic [Internet]. 2008;14(2):185–91.
Available from: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rcsh/v14n2/v14n2a12.pdf>
27. Salazar NJ, Aldana ML. Herbicida Glifosato : Usos , Toxicidad Y Regulación. Rev ciencias Biol t la salud la Univ Son. 2011;Volumen XI:23–8.
 28. Hilda I, Ramírez G, Enrique B, Del T. Manual De Producción Y Uso De Hongos Antagonistas. 2013;
 29. Shih FF. An update on the processing of high-protein rice products. Nahrung - Food. 2003;47(6):420–4.
 30. Bae SJ, Mohanta TK, Chung JY, Ryu M, Park G, Shim S, et al. Trichoderma metabolites as biological control agents against Phytophthora pathogens. Biol Control [Internet]. 2016;92:128–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.10.005>
 31. Muñoz-Celaya AL, Ortiz-García M, Vernon-Carter EJ, Jauregui-Rincón J, Galindo E, Serrano-Carreón L. Spray-drying microencapsulation of Trichoderma harzianum conidias in carbohydrate polymers matrices. Carbohydr Polym. 2012;88(4):1141–8.
 32. Parikh L, Kodati S, Eskelson MJ, Adesemoye AO. Identification and pathogenicity of Fusarium spp. in row crops in Nebraska. Crop Prot. 2018;108(February):120–7.
 33. Méndez JC, Bertsch F, Castro O. Efecto de la aplicación de los fungicidas propineb y mancozeb sobre el estado nutricional de plántulas de banano en medio hidropónico. Agron Costarric. 2013;37(1):7–22.
 34. Campuzano Cortina C, Feijoó Fonnegra LM, Manzur Pineda K, Palacio Muñoz M, Rendón Fonnegra J, Zapata Díaz JP. Efectos de la intoxicación por glifosato en la población agrícola: revisión de tema. Rev CES Salud Pública [Internet]. 2017;8(1):121–33. Available from: http://revistas.ces.edu.co/index.php/ces_salud_publica/article/view/4427%0Ah
http://revistas.ces.edu.co/index.php/ces_salud_publica/article/viewFile/4427/28

35. Riera A, Paul M. Evaluación in vitro de la capacidad antagonista de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium* spp. 2017; Available from: <http://www.dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/14419>
36. Johnson LF. Methods for studying soil microflora-plant disease relationships / [Internet]. Minneapolis ; 1959 [cited 2018 Sep 4]. Available from: <http://hdl.handle.net/2027/mdp.39015006856465>
37. Bell DK, Wells HD, Markham CR. In Vitro Antagonism of *Trichoderma* species Against six fungal plant pathogens. *Ecol Epidemiology*. 1982;72:379–82.
38. Haaland PD. Experimental design in biotechnology [Internet]. Marcel Dekker; 1989 [cited 2018 Nov 29]. 259 p. Available from: https://books.google.com.pe/books/about/Experimental_Design_in_Biotechnology.html?id=K0xH0HINiKQC&redir_esc=y
39. Box GEP, Hunter WG, Hunter JS. Statistics for experimenters : an introduction to design, data analysis, and model building [Internet]. Wiley; 1978 [cited 2018 Nov 29]. 653 p. Available from: <https://books.google.com.pe/books?id=QaFqAAAAMAAJ&q=Statistics+for+experimenters:+An+introduction+to+designs+BOX&dq=Statistics+for+experimenters:+An+introduction+to+designs+BOX&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiTwwfaPiPveAhWPk1kKHagnC8AQ6AEIKDAA>
40. Montgomery DC. DESIGN AND ANALYSIS OF EXPERIMENTS [Internet]. 2014 [cited 2018 Nov 29]. 734 p. Available from: https://books.google.com.pe/books?id=Py7bDgAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=montgomery+design&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiXo5jTh_veAhWot1kKHc-QCUIQ6AEIKDAA#v=onepage&q=montgomery+design&f=false
41. Montgomery DC. Diseño y análisis de experimentos [Internet]. Limusa Wiley; 2003 [cited 2018 Nov 29]. Available from: https://books.google.com.pe/books?id=TJFoAAAACAAJ&dq=montgomery+design&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiXo5jTh_veAhWot1kKHc-QCUIQ6AEINzAC

42. Shen L, Farid H, Mcpeek MA. PLANEAMIENTOS FACTORIALES]. In: Evolution Statistics. 2008. p. 1–14.
43. Morrissey D, Askew D, Raj L, Weir M. METODOLOGIA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA. In 1991. p. 1684–96.
44. Rodriguez MI. Planejamento de experimentos e otimização de processos: Uma estratégia ... - Maria Isabel Rodrigues - Google Libros [Internet]. First. Casa do Pao, editor. Campinas1; 2005 [cited 2018 Nov 29]. 267-289 p. Available from:
https://books.google.com.pe/books?id=ZXLkPgAACAAJ&dq=Planejamento+de+Experimentos+%26+Otimizacao+de+Processos&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjcv_7GiPveAhXFrFkKHXR2CcUQ6AEIKjAA
45. Siqueiros A. Aplicación de la Metodología de Superficies de Respuesta para el Mejoramiento de la Calidad del Aceite de Soya. Univ Son [Internet]. 2004;113. Available from:
<http://lic.mat.uson.mx/tesis/122TesisAlejandraSiq.PDF>
46. Ponterotto JG., Burkard A, Rieger BP., Grieger I, D’Onofrio A, Dubuisson A, et al. Capítulo 5: Superficie de Respuesta. In: Evolution Statistics. 2008. p. 1016–31.
47. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Stand Methods. 2012;541.
48. Ezziyyani M, Pérez Sánchez C, Requena ME, Rubio L, Candela ME. Biocontrol por *Streptomyces rochei* –Ziyani–, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. An Biol. 2005;26:69–78.
49. Márquez A, Navarro MA. Análisis de alimentos 1. Col Bachill Del Estado Son Hermosillo. 2007;1–63.
50. Saravanakumar K, Chelliah R, Ramakrishnan SR, Kathiresan K, Oh DH,

- Wang MH. Antibacterial, and antioxidant potentials of non-cytotoxic extract of *Trichoderma atroviride*. *Microb Pathog* [Internet]. 2018;115(December 2017):338–42. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.081>
51. Singh V, Upadhyay RS, Sarma BK, Singh HB. *Trichoderma asperellum* spore dose depended modulation of plant growth in vegetable crops. *Microbiol Res* [Internet]. 2016;193:74–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2016.09.002>
 52. El-Sharkawy HHA, Rashad YM, Ibrahim SA. Biocontrol of stem rust disease of wheat using arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma* spp. *Physiol Mol Plant Pathol* [Internet]. 2018;103(May):84–91. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2018.05.002>
 53. Lopez-Ramirez N, Volke-Sepulveda T, Gaime-Perraud I, Saucedo-Castañeda G, Favela-Torres E. Effect of stirring on growth and cellulolytic enzymes production by *Trichoderma harzianum* in a novel bench-scale solid-state fermentation bioreactor. *Bioresour Technol* [Internet]. 2018;265(June):291–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.015>
 54. Braun H, Woitsch L, Hetzer B, Geisen R, Zange B, Schmidt-Heydt M. *Trichoderma harzianum*: Inhibition of mycotoxin producing fungi and toxin biosynthesis. *Int J Food Microbiol*. 2018;280(December 2017):10–6.
 55. Sanclemente Ó, García M, Valencia F. Efecto del uso de melaza y microorganismos eficientes sobre la tasa de descomposición de la hoja de caña (*Saccharum officinarum*). *Rev Investig Agrar y Ambient*. 2011;2(2):13–9.
 56. Novagri. Triconova: Ficha Técnica. 2015.
 57. Ideas Biológicas. Triderma : Ficha Técnica. 2016.
 58. BIOSA. TRICHO-BIOSA. 2012;(354).
 59. S.A.C. S. TRICHO D: Ficha Técnica. 2010.
 60. DISAGRO. Excalibur Gold 5 Fs. :1–2.
 61. SOLAGRO S.A.C. Trichomax: Ficha técnica [Internet]. 2004. p. 2. Available

- from: file:///C:/Users/Usuario/Downloads/guayaba2 (1).pdf
62. BIOCONTROL S.A.C. TrichoBiol : Ficha tecnica. Vol. 34, Nucleic Acids Research. 2006.
 63. Fernández RJ, Suárez CL. ANTAGONISMO IN VITRO DE *Trichoderma harzianum* Rifai SOBRE *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp *passiflorae* EN MARACUYÁ (*Passiflora edulis* Sims var. *Flavicarpa*) DEL MUNICIPIO ZONA BANANERA COLOMBIANA. *FacNalAgrMedellín* [Internet]. 2009;62(1):4743–8. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v62n1/a01v62n1.pdf>
 64. Michel-aceves AC, Otero-sánchez MA, Yuridia L, Estudios C De, Superior C, Guerrero E De, et al. subglutinans (Wollenweb . y Reinking) Nelson , Toussoun y Marasas y F . *oxysporum* Schlecht ., Agentes Causales de la “ Escoba de Bruja ” del Mango (*Mangifera indica* L .). 2009;18–26.
 65. Pemberthy MP, Granada-sinar D. Analysis of the action mode and the antagonistic capability of *Trichoderma asperellum* against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium* sp. *Rev Tumbaga*. 2012;49(7):29–49.
 66. Bunbury-Blanchette AL, Walker AK. *Trichoderma* species show biocontrol potential in dual culture and greenhouse bioassays against *Fusarium* basal rot of onion. *Biol Control* [Internet]. 2018.
 67. Sarro Baro A, Lara JM, Fernandez C. Evaluación in vitro de la capacidad antagonista de *Trichoderma lignorum* FEED TL0601 frente a *Fusarium oxysporum* f.sp. *Control Biológico*. 2011;29:127–32.
 68. Britania Lab. S.A. Sabouraud Glucosado Agar. 2008;2. Available from: <http://www.britanialab.com/productos/HT B04150 REV 01-SABOURAUD GLUCOSADO AGAR.pdf>
 69. Acumedia. Agar Papa Dextrosa-Potato Dextrose Agar (7149). 2015;(7149):3–5. Available from: www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalmanualBAM/default.htm.

ANEXOS

A) MEDIO SABOURAUD GLUCOSADO	
Componente	Gramos/ Litro
Peptona	5
Tripteína	5
Glucosa	40
Cloranfenicol	0.05
Agar	15.0
B) MEDIO PDA (Potato Dextrose Agar)	
Componente	Gramos/ Litro
Peptona	5
Tripteína	5
Glucosa	40
Cloranfenicol	0.05
Agar	15.0

Anexo 1. Composición de los Medios Sabouraud (A) y Papa Dextrosa Agar (B). ^(68,69)



Anexo 2. Fotografía de Cámara de crecimiento de *Trichoderma spp.*, parte superior: aislamiento en oscuridad, parte inferior: iluminación constante.

Longitud de onda de máxima absorbancia (nm)	Color Absorbido	Color Observado
380 – 420	Violeta	Amarillo verdoso
420 – 440	Azul violáceo	Amarillo
440 – 470	Azul	Naranja
470 – 500	Verde azulado	Rojo
500 – 520	Verde	Púrpura
520 – 550	Verde amarillento	Violeta
550 – 580	Amarillo	Azul violáceo
580 – 620	Naranja	Azul
620 – 680	Rojo	Verde azulado
680 – 780	Púrpura	Verde

Anexo 3. Longitudes de onda (nm) en el espectro visible, colores absorbidos y observados.

	ORIGEN	TIPO III DE SUMA DE CUADRADOS	GL	MEDIA CUADRÁ TICA	F	SIG.
TIEMPO	Esfericidad asumida	74.638	19	3.928	4789.368	.000
	Greenhouse-Geisser	74.638	1.000	74.638	4789.368	.009
	Huynh-Feldt	74.638
	Límite inferior	74.638	1.000	74.638	4789.368	.009
Error (tiempo)	Esfericidad asumida	.016	19	.001		
	Greenhouse-Geisser	.016	1.000	.016		
	Huynh-Feldt	.016	.	.		
	Límite inferior	.016	1.000	.016		

Anexo 4. Tabla de correctores resultante del análisis de varianza (ANOVA) sobre la cinética de crecimiento de *Trichoderma spp.* con respecto al tiempo.

A) Tratamiento Estándar: 250 g de Arrocillo – 350 mL de Agua.

Repetición	Peso arrocillo (gramos)					
	0 (min)	15 (min)	30 (min)	45 (min)	60 (min)	75 (min)
1	1	0.64	0.6329	0.6189	0.6123	0.6053
2	1	0.612	0.5966	0.5822	0.5736	0.5723
3	1	0.6	0.5934	0.5785	0.5573	0.5571
4	1	0.72	0.58	0.5742	0.566	0.5657
5	1	0.85	0.65	0.6421	0.6338	0.6247
6	1	0.74	0.58	0.5786	0.56	0.5599
7	1	0.98	0.6525	0.6249	0.6124	0.6093

B) Tratamiento 1: 500 g de Arrocillo – 700 mL de Agua.

Repetición	Peso arrocillo (gramos)					
	0 (min)	15 (min)	30 (min)	45 (min)	60 (min)	75 (min)
1	1	0.6236	0.48	0.4422	0.4422	0.4264
2	1	0.6791	0.5029	0.4402	0.4402	0.4156
3	1	0.5746	0.4471	0.4232	0.4232	0.4172

C) Tratamiento 2: 500 g de Arrocillo – 650 mL de Agua.

Repetición	Peso arrocillo (gramos)					
	0 (min)	15 (min)	30 (min)	45 (min)	60 (min)	75 (min)
1	1	0.704	0.5231	0.4624	0.4432	0.4433
2	1	0.7255	0.5625	0.4702	0.443	0.4351
3	1	0.6787	0.5051	0.4505	0.442	0.4315

D) Tratamiento 3: 1000 g de Arrocillo – 1200 mL de Agua.

Repetición	Peso arrocillo (gramos)					
	0 (min)	15 (min)	30 (min)	45 (min)	60 (min)	75 (min)
1	1	0.6641	0.5395	0.4864	0.4783	0.462
2	1	0.6096	0.4883	0.4504	0.4406	0.4376
3	1	0.6007	0.4817	0.4357	0.4259	0.4146

E) Tratamiento 4: 1200 g de Arrocillo – 1150 mL de Agua.

Repetición	Peso arrocillo (gramos)					
	0 (min)	15 (min)	30 (min)	45 (min)	60 (min)	75 (min)
1	1	0.6507	0.5032	0.4654	0.4271	0.4259
2	1	0.64	0.4914	0.4541	0.4363	0.4296
3	1	0.6813	0.5489	0.4972	0.4906	0.4824

Anexo 5. Registro del peso de arrocillo durante el ensayo de determinación de humedad y sólidos totales.

A) Primera repetición del diseño factorial.

ESPORAS VIABLES									
	Repetición N° 1			Repetición N° 2			Repetición N° 3		
Bolsa	Total	Viables	% V.	Total	Viables	% V.	Total	Viables	% V.
1	87	42	48.28	78	35	44.87	86	43	50.00
2	81	39	48.15	65	32	49.23	87	48	55.17
3	68	27	39.71	67	26	38.81	89	56	62.92
4	70	19	27.14	61	19	31.15	41	15	36.59
5	98	47	47.96	105	65	61.90	87	66	75.86
6	69	58	84.06	82	67	81.71	123	87	70.73
7	113	93	82.30	102	88	86.27	87	69	79.31
8	160	136	85.00	88	80	90.91	88	70	79.55
9	66	59	89.39	68	45	66.18	87	56	64.37
10	65	45	69.23	54	43	79.63	96	76	79.17
11	87	36	41.38	56	22	39.29	67	21	31.34
12	34	18	52.94	54	17	31.48	38	26	68.42
13	41	16	39.02	45	23	51.11	43	19	44.19
14	28	7	25.00	35	10	28.57	38	9	23.68
15	32	17	53.13	43	15	34.88	67	43	64.18
16	65	51	78.46	78	56	71.79	34	28	82.35
17	78	61	78.21	62	54	87.10	67	56	83.58
18	57	50	87.72	69	59	85.51	108	86	79.63
19	52	41	78.85	56	39	69.64	76	53	69.74
20	76	56	73.68	38	26	68.42	54	43	79.63

B) Segunda Repetición del diseño factorial.

ESPORAS VIABLES									
Bolsa	Repetición N° 1			Repetición N° 2			Repetición N° 3		
	Total	Viables	% V.	Total	Viables	% V.	Total	Viables	% V.
1	91	41	45.05	65	28	43.08	73	47	64.38
2	76	42	55.26	46	23	50.00	66	32	48.48
3	78	35	44.87	44	16	36.36	67	45	67.16
4	45	12	26.67	53	19	35.85	43	11	25.58
5	101	61	60.40	98	54	55.10	64	39	60.94
6	134	98	73.13	67	52	77.61	105	82	78.10
7	67	51	76.12	78	57	73.08	96	78	81.25
8	79	57	72.15	132	87	65.91	75	72	96.00
9	46	31	67.39	75	52	69.33	79	56	70.89
10	75	54	72.00	65	43	66.15	87	67	77.01
11	54	25	46.30	87	12	13.79	65	28	43.08
12	65	38	58.46	58	28	48.28	28	10	35.71
13	43	16	37.21	65	23	35.38	48	25	52.08
14	52	10	19.23	43	9	20.93	21	6	28.57
15	28	9	32.14	38	17	44.74	65	34	52.31
16	76	51	67.11	75	55	73.33	67	49	73.13
17	83	69	83.13	79	64	81.01	58	47	81.03
18	48	38	79.17	59	48	81.36	112	97	86.61
19	43	29	67.44	45	32	71.11	78	52	66.67
20	78	53	67.95	48	35	72.92	61	46	75.41

Anexo 6. Registro de esporas viables de *Trichoderma spp.* en cada repetición del ensayo de viabilidad.

Día	Crecimiento (cm.)						
	Control	Repetición N°1		Repetición N°2		Repetición N°3	
	Control Fusarium	Fusarium	Trichoderma	Fusarium	Trichoderma	Fusarium	Trichoderma
0	0	0	0	0	0	0	0
1	1.5	1.3	1.5	0.8	2	0.7	1
2	1.5	1.7	2.3	1.2	2.5	1.2	1.9
3	1.8	2.3	2.8	1.8	3.8	1.5	2.2
4	2.5	2.4	5.8	2.4	4.5	1.8	4.3
5	4.8	2.8	5.9	2.7	6.7	2	6.2
6	5.1	2.6	6.2	2.9	7	2.7	6.9
7	7.6	2.4	6.4	2.6	7	3.1	7
8	7.8	2.4	6.8	2.5	7.5	3.3	7
9	8	2.3	6.8	2.3	7.5	3.4	7.3
10	8	2.3	7	2.4	7.8	3	7.4
11	8.5	2.3	7	2.4	8	3	7.5
12	8.6	2.3	7	2.4	8	3.1	7.7
13	8.7	2.3	7.1	2.4	8	3.1	7.7
14	8.7	2.3	7.1	2.4	8	3.2	7.7

Anexo 7 Registro de crecimiento (cm.) de *Trichoderma spp.* y *Fusarium spp.* durante ensayo de Antagonismo.

	ORIGEN	TIPO III DE	GL	MEDIA	F	SIG.
		SUMA DE CUADRADOS		CUADRÁTICA		
TIEMPO	Esfericidad asumida	263,474	14	18,820	187,471	,000
	Greenhouse-Geisser	263,474	1,190	221,439	187,471	,000
	Huynh-Feldt	263,474	2,182	120,770	187,471	,000
	Límite inferior	263,474	1,000	263,474	187,471	,001
Error (tiempo)	Esfericidad asumida	114,743	14	8,196	81,644	,000
	Greenhouse-Geisser	114,743	1,190	96,437	81,644	,001
	Huynh-Feldt	114,743	2,182	52,595	81,644	,000
	Límite inferior	114,743	1,000	114,743	81,644	,003

Anexo 8. Tabla de correctores resultante del análisis de varianza (ANOVA) sobre el crecimiento de *Fusarium spp.* en ensayo de antagonismo.