



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

EFICIENCIA DE CRECIMIENTO DEL HONGO *Trichoderma harzianum* Rifai PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOPLAGUICIDA, APROVECHANDO EL RESIDUO AGROINDUSTRIAL DE CÁSCARA DE HABA (*Vicia faba* L.)

Trabajo de Titulación presentado para optar el grado académico de:
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORA: SERPA BARAHONA MARÍA JOSÉ

TUTORA: DRA. C. ROSA DEL PILAR CASTRO GÓMEZ

RIOBAMBA-ECUADOR

2015

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: “EFICIENCIA DE CRECIMIENTO DEL HONGO *Trichoderma harzianum* Rifai PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOPLAGUICIDA, APROVECHANDO EL RESIDUO AGROINDUSTRIAL DE CÁSCARA DE HABA (*Vicia faba L.*)” de responsabilidad de la señorita María José Serpa Barahona, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

Dr. C. Rosa Castro Gómez
**DIRECTORA DE
TRABAJO DE TITULACIÓN**

Dra. Mayra Espinoza Melendres
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Yo, María José Serpa Barahona, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación le pertenecen a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

MARÍA JOSÉ SERPA BARAHONA

DEDICATORIA

A Dios, a mi esposo Harrinson y a mis padres por todo el apoyo.

María José

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Jesucristo único y verdadero Dios por otorgarme sabiduría y guiar mi diario caminar.

María José

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	xii
SUMMARY	xiii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO.....	4
1.1 Género <i>Trichoderma</i>	4
1.1.1 <i>Ecología</i>	5
1.1.2 <i>Taxonomía</i>.....	5
1.1.3 <i>Mecanismos de acción</i>	7
1.1.3.1 <i>Micoparasitismo</i>.....	7
1.1.3.2 <i>Antibiosis</i>.....	7
1.1.3.3 <i>Competencia por nutrientes y espacio</i>	7
1.1.3.4 <i>Promoción de crecimiento de las plantas</i>	8
1.1.3.5 <i>Degradación de agrotóxicos</i>	8
1.1.3.6 <i>Inducción de mecanismos de defensa de la planta</i>	8
1.1.4 <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai.....	9
1.1.4.1 <i>Características morfológicas</i>	9
1.1.4.2 <i>Beneficios de Trichoderma harzianum</i> Rifai	10
1.2 Fermentación en estado sólido.....	11
1.2.1 <i>Humedad y actividad de agua</i>	12
1.2.2 <i>Temperatura</i>	12
1.2.3 <i>Aireación</i>	12
1.2.4 <i>Microorganismos</i>.....	13
1.2.5 <i>Sustratos</i>	13
1.3 El haba (<i>Vicia faba</i> L.)	14
1.3.1 <i>Taxonomía</i>.....	14
1.3.2 <i>Composición química</i>	14
1.3.3 <i>Morfología</i>.....	16
1.3.4 <i>Aspectos botánicos de la semilla</i>	16

1.3.4.1	<i>Testa o cáscara de haba (Vicia faba L.)</i>	17
1.3.5	<i>Clima y suelo</i>	18
1.3.6	<i>El haba (Vicia faba L.) en el Ecuador</i>	18

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	19
2.1	Metodología	19
2.1.1	<i>Tipo y diseño de investigación</i>	19
2.1.2	<i>Diseño experimental</i>	19
2.1.3	<i>Población de estudio y tamaño de la muestra</i>	21
2.1.4	<i>Selección de las condiciones de fermentación</i>	22
2.1.4.1	<i>Preparación del sustrato de interés</i>	22
2.1.4.2	<i>Determinación del porcentaje de humedad del sustrato</i>	22
2.2	Técnicas de recolección de datos	23
2.2.1	<i>Obtención y cuantificación del inóculo</i>	23
2.2.2	<i>Inoculación del microorganismo en el sustrato sólido</i>	23
2.2.3	<i>Evaluación de crecimiento</i>	24
2.2.4	<i>Viabilidad en el tiempo</i>	24
2.3	Análisis funcional	25

CAPÍTULO III

3.	RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	26
3.1	Resultados y análisis de los resultados	26
3.1.1	<i>Condiciones de fermentación en estado sólido</i>	26
3.1.2	<i>Evaluación del crecimiento</i>	27
3.1.2.1	<i>Observación macroscópica</i>	27
3.1.2.2	<i>Cuantificación de biomasa</i>	27
3.1.2.3	<i>Modelo cinético de fermentación sólida</i>	29
3.1.3	<i>Efecto del contenido de humedad</i>	33
3.1.4	<i>Eficiencia del sustrato</i>	34
3.1.5	<i>Viabilidad en el tiempo</i>	36
3.1.6	<i>Resultados experimentales</i>	36
3.1.7	<i>Verificación de la hipótesis</i>	37

CONCLUSIONES	38
RECOMENDACIONES	39
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ABREVIATURAS

mL	mililitros
cm	centímetros
cm²	centímetro cuadrado
mm	milímetros
Tm	Toneladas métricas
g	gramos
%	porcentaje
°C	grados centígrados
UFC	Unidad formadora de colonia
pH	Potencial hidrógeno
FES	Fermentación en estado sólido
PDA	Papa dextrosa agar
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1	Contenido nutricional del haba fresca (<i>Vicia faba</i> L.).....	15
Tabla 2-1	Contenido nutricional del haba seca (<i>Vicia faba</i> L.).....	15
Tabla 3-1	Morfología del haba (<i>Vicia faba</i> L.)	16
Tabla 4-1	Producción nacional de haba seca (<i>Vicia faba</i> L.).....	18
Tabla 1-2	Cuadro de tratamientos	20
Tabla 2-2	Modelo matemático de diseño experimental	21
Tabla 1-3	Porcentaje de humedad contenido en cada tratamiento	26
Tabla 2-3	Condiciones de fermentación sólida para cada tratamiento.....	26
Tabla 3-3	Concentración del hongo a los 14 días de incubación	30
Tabla 4-3	Análisis de varianza para la concentración conidial a los 30 días de incubación ...	31
Tabla 5-3	Análisis de varianza para la concentración conidial a los 60 días de incubación ...	32
Tabla 6-3	Composición química de la cascarilla de arroz (<i>Oriza sativa</i> L.).....	34
Tabla 7-3	Composición química de la cáscara de haba (<i>Vicia faba</i> L.).....	34
Tabla 8-3	Resultados de la prueba de Tukey de los Tratamientos	35
Tabla 9-3	Contenido de conidios presentes y viables en cada tratamiento experimental	36
Tabla 10-3	Relación de datos experimentales.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1	Grupos moleculares del género <i>Trichoderma</i>	6
Figura 2-1	Morfología de <i>Trichoderma harzianum</i>	9
Figura 3-1	Cepa de hongo <i>Trichoderma harzianum</i>	11
Figura 4-1	Variedades de semilla del haba (<i>Vicia faba</i> L.).....	17
Figura 5-1	Partes de la semilla del haba (<i>Vicia faba</i> L.).....	17
Figura 1-2	Técnica de siembra vertido en placa	25
Figura 1-3	Curva de crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai para el tratamiento A	27
Figura 2-3	Curva de crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai para el tratamiento B	28
Figura 3-3	Curva de crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai para el tratamiento C	28
Figura 4-3	Curva de crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai para el tratamiento D	29
Figura 5-3	Curva de crecimiento exponencial del hongo para cada Tratamiento.....	30
Figura 6-3	Modelo cinético de crecimiento en fermentación sólida del hongo	31
Figura 7-3	Concentración final de esporas de hongo en los Tratamientos	32
Figura 8-3	Interacción del factor sustrato y contenido de humedad	33
Figura 9-3	Relación viabilidad y concentración de esporas de los Tratamientos	37

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A: Zonas productoras de habas en el Ecuador

Anexo B: Testa o cáscara de haba (*Vicia faba* L.) grano seco

Anexo C: Modelo cinético de fermentación sólida

Anexo D: Coeficiente de correlación de los tratamientos al finalizar la fermentación

Anexo E: Viabilidad en el tiempo

Anexo F: Registro fotográfico

RESUMEN

En la presente investigación se evaluó la eficiencia de la cáscara de haba (*Vicia faba* L.) al ser utilizada como sustrato para producir esporas del hongo biocontrolador *Trichoderma harzianum* Rifai mediante fermentación en estado sólido (FES). Se aplicaron tres tratamientos utilizando la cáscara de haba (*Vicia faba* L.) y un tratamiento testigo con cascarilla de arroz (*Oriza sativa* L.) evaluando cinco muestras por tratamiento. El sustrato ensayado fue hidratado durante tres tiempos de remojo correspondientes a 24, 48 y 72 horas; codificados como tratamiento A, B y C. El sustrato testigo, codificado como tratamiento D, fue hidratado durante 24 horas. Cada unidad experimental fue inoculada con 1.0 cm² de la cepa del hongo y sometida al proceso de FES durante 8 días, posteriormente el producto fue almacenado hasta los 60 días para determinar su viabilidad. Los altos recuentos de esporas obtuvieron los tratamientos A, B y D con un contenido de humedad superior al 40.0% alcanzaron concentraciones de 1.86×10^9 ; 1.41×10^9 y 2.29×10^9 UFC/g respectivamente y la menor concentración el tratamiento C equivalente a 5.67×10^8 UFC/g con un porcentaje de humedad del 21.5%. En el análisis estadístico no se apreciaron diferencias significativas en cuanto a la viabilidad del sustrato para propagación de blastoesporas debido a que sí satisface sus necesidades nutricionales, sin embargo, la dureza de la cáscara de haba (*Vicia faba* L.) impide una mejor degradación por parte del hongo con respecto a la consistencia quebradiza del sustrato testigo (*Oriza sativa* L.) que alcanzó concentraciones superiores en un 18.0%. Se concluye que los tratamientos A y B son los mejores para el desarrollo del microorganismo ya que obtuvieron elevada concentración de esporas y un excelente grado de viabilidad correspondiente a 96.94% y 92.76%, por lo que se recomienda su aplicación.

Palabras clave: < CÁSCARA DE HABA [*Vicia faba* L.]> <CASCARILLA DE ARROZ [*Oriza sativa* L.]> <FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO [FES]> <HUMEDAD> <HONGO [*Trichoderma harzianum*]> <UNIDAD FORMADORA DE COLONIA [UFC]>

SUMMARY

In this research the efficiency of the bean husk (*Vicia faba* L.) to be used as a substrate to produce spores of the fungus *Trichoderma harzianum* Rifai by solid state fermentation (SSF) is evaluated. Three treatments were applied using the shell bean (*Vicia faba* L.) and a control treatment with husk of rice (*Oryza sativa* L.) evaluated five samples per treatment. The substrate tested was hydrated for three soaking corresponding to 24, 48 and 72 hours; treatment coded as A, B and C. The control substrate, coded treatment D was hydrated for 24 hours. Each experimental unit was inoculated with 1 cm² of the strain of the fungus and subjected to the process of SSF for 8 days, and then the product was stored up to 60 days to determine its viability. High spore counts obtained treatments A, B and D with a moisture content above 40% levels reached 1.86×10^9 ; 1.41×10^9 and 2.29×10^9 CFU/g respectively and C lowest concentration equivalent treatment 5.67×10^8 CFU/g with a moisture content of 21.5%. In the statistical analysis no significant differences were observed in terms of the viability of the substrate to spread blastospores because it does satisfy their nutritional needs, however, the hardness of the bean husk (*Vicia faba* L.) prevents degradation better of the fungus over the crispness of control substrate (*Oryza sativa* L.) reaching concentrations above 18%. We conclude that A and B treatments are best for the development of the organism and they got high concentration of spores and an excellent degree corresponding to 96.94% and 92.76% viability, so its application is recommended.

Keywords: < HUSK BEAN [*Vicia faba* L.]> < RICE BRAN [*Oryza sativa* L.]> < SOLID STATE FERMENTATION [SSF]> < MOISTURE> < FUNGUS [*Trichoderma harzianum*]> < COLONY FORMING UNIT [CFU] >

INTRODUCCIÓN

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO, en su último informe titulado “*Agricultura mundial hacia los años 2015/2030*” indica que el deterioro de los recursos naturales y en particular el recurso suelo, se debe al uso abusivo de plaguicidas y productos químicos que provocan baja productividad agrícola y desertización.

Además advierte una total degradación ambiental para el año 2030 si no se cambian los hábitos de producción agrícola frenando la aplicación indiscriminada de los pesticidas en los cultivos, aludiendo que a éste ritmo la producción necesaria para satisfacer la demanda mundial no será sostenible; por lo cual, incentiva al estudio e investigación de mecanismos y estrategias de biocontrol.

Agrios (2005, p.403) indica que el control biológico es una alternativa al uso de agroquímicos, y tiene como ventaja el bajo riesgo de efectos adversos sobre la salud ambiental y humana (Cavero, 2014, p.953).

Entre los microorganismos más utilizados en este ámbito se encuentran los hongos del género *Trichoderma*, en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo se han realizado 128 investigaciones acerca de este hongo filamentoso en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales (Castro, 2015) en búsqueda de alternativas para formular productos que contribuyan al mejoramiento ambiental.

Para la propagación y desarrollo de *Trichoderma* se han utilizado diferentes sustratos tanto a nivel nacional como internacional (Falconí, 2011, p.32) el más eficiente a resultado el grano de arroz (*Oriza sativa* L.) pero se limita su uso debido al elevado costo de producción que genera (Zerega *et al.*, 2005 p.608).

La propuesta de esta investigación es la implementación de un subproducto agrícola, la cáscara de haba (*Vicia faba* L.) utilizándola como sustrato en la producción del hongo *Trichoderma harziuanum* Rifai para desarrollar tecnologías de bajo costo y eficaz que contribuyan al control biológico de plagas en los cultivos.

Hipótesis

- Hipótesis nula (Ho): La cáscara de haba (*Vicia faba* L.) no es eficiente para el crecimiento del hongo *Trichoderma harzianum* Rifai.
- Hipótesis alternativa (Hi): La cáscara de haba (*Vicia faba* L.) es eficiente para el crecimiento del hongo *Trichoderma harzianum* Rifai.

Justificación

En los últimos años la contaminación ambiental causada por el uso excesivo de pesticidas químicos incentiva al manejo integrado de plagas, donde los agroquímicos son sustituidos por los bioplaguicidas para el control de enfermedades de los cultivos

Los hongos del género *Trichoderma* se emplean en el control biológico de varios fitopatógenos (Rakholiya, 2010, p.406) debido a que poseen mayor capacidad para promover el crecimiento vegetal y la actividad de la recuperación del suelo (Cavalcante *et al.* 2008, pp. 100-102).

Su producción se realiza en forma artesanal o industrial implementando técnicas de fermentación líquida o sólida, mediante la optimización de condiciones fisicoquímicas y biológicas (Apaza, 2008, <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010044901>) como temperatura, aireación, fuente nutricional y humedad.

Como fuente nutricional se han probado diferentes sustratos pero han resultado limitados ya que necesitan ser complementados con otros nutrientes sintéticos para aumentar su eficiencia y satisfacer las demandas del hongo benéfico (Verma *et al.*, 2007 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X07001994>).

Entre los sustratos más utilizados actualmente se encuentra el grano de arroz (*Oryza sativa* L.) y el trigo (*Triticum aestivum* L.) sin embargo su utilización es limitada por sus elevados costos (Zerega *et al.*, 2005 p.608).

En la búsqueda de subproductos agrícolas de bajo costo que permitan el óptimo desarrollo conidial del hongo biocontrolador en esta investigación se planteó determinar si la cáscara de haba (*Vicia faba* L.) resulta eficiente al ser utilizada como sustrato para la producción de *Trichoderma harzianum* Rifai aplicando la técnica de fermentación en estado sólido (FES).

Objetivos

General

- Determinar la eficiencia de crecimiento del hongo *Trichoderma harzianum* Rifai en base a cáscara de haba (*Vicia faba* L.).

Específicos

- Determinar las condiciones de fermentación sólida del hongo *Trichoderma harzianum* Rifai.
- Evaluar la población en un periodo de 0 a 30 días en los tres tiempos de remojo correspondiente a 24, 48 y 72 horas.
- Determinar las curvas de crecimiento para cada uno de los tiempos de remojo.
- Determinar la viabilidad del producto a los 30, 45 y 60 días.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Género *Trichoderma*

Los hongos pertenecientes al género *Trichoderma* según Harman (2006, p.190) constituyen un grupo de microorganismos cosmopolitas de tipo filamentoso pertenecientes al reino Mycetae (hongos verdaderos) división Eumycota, subdivisión Deuteromycotina, clase Hyphomycetes, orden Hyphales y familia Moniliaeae.

No obstante, Samuels *et al.* (2006, p.203) puntualiza que la clasificación de *Trichoderma* como género sería como Reino Myceta (verdaderos hongos), División Eumycota, Subdivisión Ascomycotina, Clase Euascomycetes, Orden Hypocreales, Familia Hypocreaceae y Género de *Trichoderma* además de *Hypocrea*.

Su reproducción es asexual mediante un ciclo, en el que alternan micelios y esporas (Tijerino, 2010, p.21) también es capaz de reproducirse sexualmente y corresponde al género *Hypocrea* (estado teleomorfo), por eso al referirse a *Hypocrea* o *Trichoderma* se trata del mismo organismo.

Se lo conoce oficialmente a partir de 1794 por las descripciones de Persoon, se los puede localizar fácilmente en diferentes ecosistemas en una amplia variedad de zonas climáticas, su supervivencia en diferentes hábitats geográficas puede estar relacionado con la diversidad metabólica, alta capacidad reproductiva y capacidades competitivas en la naturaleza (Gupta *et al.*, 2014, pp. 3-4)

Teóricamente puede ser aislado de casi todos los suelos agrícolas, lo confirma Falconí (2011, p.18) al decir que no existe suelo agrícola en el Ecuador donde no se haya localizado *Trichoderma*.

Su principal característica es la de ser saprófitos, ocupan fácilmente la rizósfera, sus requerimientos nutricionales son relativamente pocos, pero en general se puede señalar que

responde bien a sustratos orgánicos, elevada humedad ambiental y temperaturas de 25.0 °C a 30.0 °C.

Se lo ha caracterizado como agente de control biológico de patógenos del suelo (Tijerino, p.25) tanto en asociación con la planta como en aplicaciones al suelo, ya que es capaz de parasitar y destruir hongos fitopatógenos que se encuentran en el suelo mediante competencia, antibiosis, y micoparasitismo llegando a colonizar gran parte de la rizósfera (Infante *et al.*, 2009, pp.15-16).

Por otro lado mejora el rendimiento de los cultivos aumentando la disponibilidad de nutrientes y la promoción del crecimiento de planta (Harman, 2006; Li *et al.* 2015) razones por las cuales ha sido ampliamente estudiado y se lo comercializa en el mercado como biofungicida y biofertilizante.

1.1.1 Ecología

Se adapta a diferentes ambientes naturales o artificiales como dentro de un fermentador, atenuando su capacidad de secreción de metabolitos antibióticos y producción de enzimas de gran importancia biotecnológica (Tijerino, p.24).

Falconí (2011, p.28) menciona que las actividades biológicas de *Trichoderma* en el suelo influyen en la solubilidad y disponibilidad de los minerales de nutrientes en la superficie de la raíz, lo que reafirma su capacidad para promover el crecimiento de plantas.

Además se desarrolla rápidamente emitiendo grandes cantidades de conidios con tonalidades verdes, al ser observado en el microscopio su cuerpo fructífero se asemeja a un árbol pequeño.

En condiciones ambientales adversas forma sobre el micelio estructuras de forma globosa u ovoide denominadas clamidosporas que tienen gran importancia en la supervivencia del hongo (Tijerino, 2010, p.21) ya sea en condiciones de desecación o escasez de nutrientes.

1.1.2 Taxonomía

La Subcomisión Internacional de *Trichoderma/Hypocrea*, ISTH, clasifica 104 especies del género *Trichoderma* en trece grupos moleculares o “clades” denominados: *ceramica*, *harzianum*, *stromaticum*, *brevicompactum*, *viride*, *minutisporum*, *megalocitrina*, *lutea*, *semiorbis*, *chlorospora*, *strictipile* y *longibrachiatum*; como se muestra en la Figura 1-1, basándose en estudios morfológicos y moleculares.

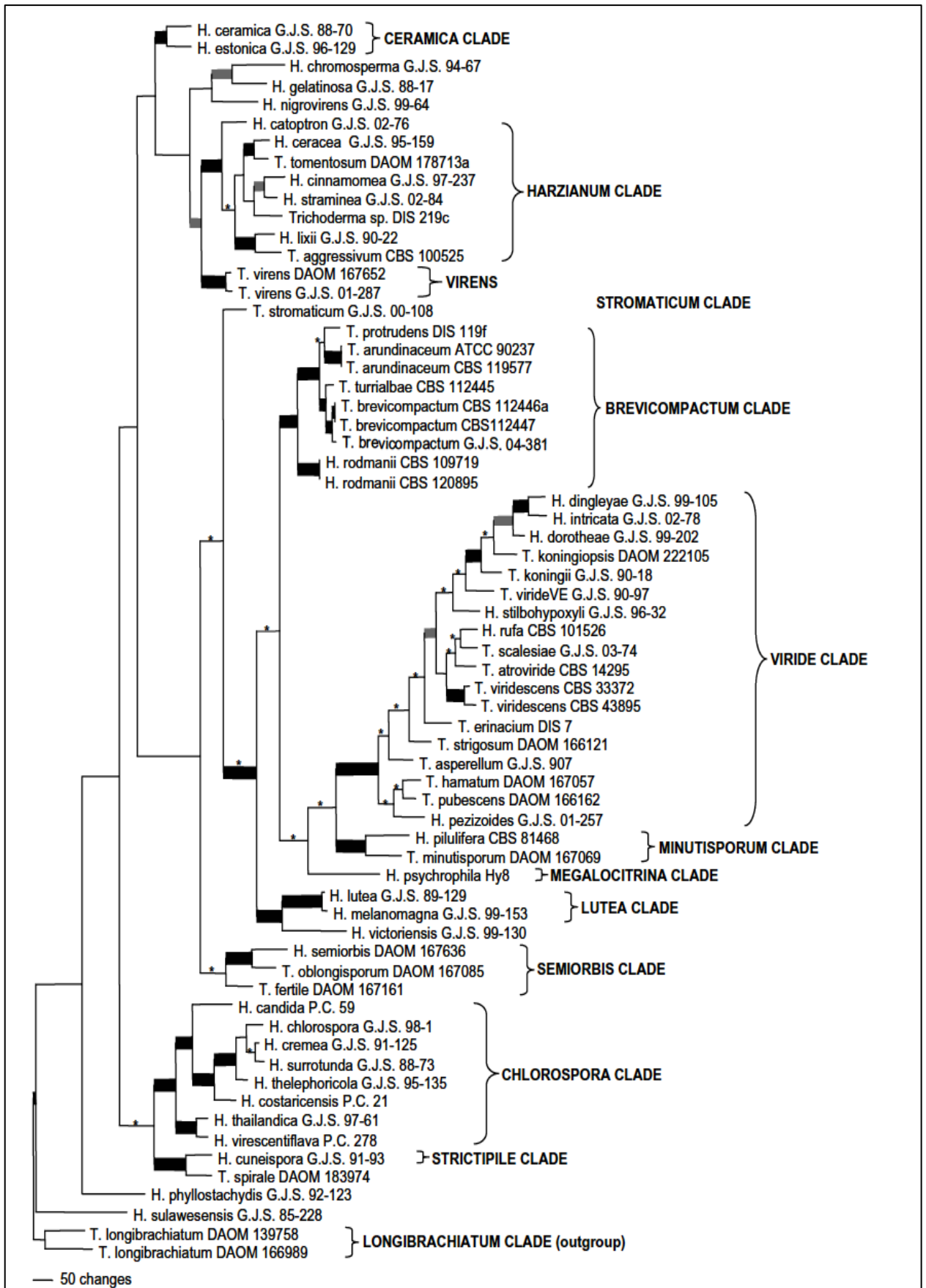


Figura 1-1: Grupos moleculares del género *Trichoderma*

Fuente: Tijerino, 2010, p.23

1.1.3 Mecanismos de acción

Entre los distintos mecanismos de acción directa e indirecta responsables de la actividad biocontroladora de *Trichoderma* se describen antibiosis, micoparasitismo, competencia por espacio y nutrientes, promoción del crecimiento de las plantas, degradación de agrotóxicos e inducción de resistencia

1.1.3.1 Micoparasitismo

Es la relación que un organismo establece con un hongo huésped para beneficiarse del mismo, normalmente para obtener nutrientes sin aportarle nada a cambio (Tijerino, 2010, p.26), es decir, el parasitismo consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista que conlleva al debilitamiento casi total del fitopatógeno.

Trichoderma localiza al patógeno y comienza a crecer en dirección hacia él (Woo *et al.*, 2014, <http://benthamopen.com/contents/pdf/TOMYCJ/TOMYCJ-8-127.pdf>) una vez que los hongos entran en contacto *Trichoderma* forma estructuras especializadas de tipo apresorio, con las que penetra en el interior de las hifas del patógeno causándole la muerte.

1.1.3.2 Antibiosis

Es la acción directa de metabolitos tóxicos o antibióticos por parte de un microorganismo sobre otro sensible a estos. Dennis y Webster (1971, p.25) fueron los pioneros en esta temática, detectaron que la actividad antibiótica de algunos aislamientos más activos poseían un fuerte olor a coco debilitaban al patógeno y lo hacían más sensible a los antibióticos.

Varias especies de *Trichoderma* producen metabolitos secundarios volátiles y no volátiles que al parecer causan a nivel celular coagulación, desintegración y lisis (Infante *et al.*, 2009, p.15) impidiendo el desarrollo de fitopatógenos con los que no hacen contacto físico.

1.1.3.3 Competencia por nutrientes y espacio

La competencia ocurre cuando dos o más microorganismos requieren un mismo recurso (nutrientes, oxígeno, espacio físico, luz); un factor esencial para la competencia es que exista "escasez" de un elemento, si hay exceso no hay competencia (Luna-Fontalvo *et al.*, 2014, <http://revistas.unimagdalena.edu.co/index.php/intropica/article/view/1441>).

La ubicuidad de *Trichoderma* en suelos agrícolas ratifica que es un buen competidor por el espacio y por los recursos nutritivos impidiendo el desarrollo de otros microorganismos.

Harman (2006, p.192) manifiesta que resulta difícil determinar si sólo a través de la competencia es capaz de ejercer su acción antagonista, o si tanto su función parasitaria o la antibiosis preparan el escenario para que la competencia se lleve a cabo de una forma más eficaz.

1.1.3.4 Promoción del Crecimiento de las plantas

En los últimos años se ha comprobado la capacidad de ciertas cepas de este hongo entre ellas *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma virens*, tienen la capacidad de estimular el crecimiento y el desarrollo de las raíces de las plantas, lo que se traduce en un incremento de la productividad agrícola (Harman *et al.*, 2004; Chávez *et al.*, 2014).

1.1.3.5 Degradación de Agrotóxicos

Trichoderma cuenta con resistencia natural a la mayoría de los productos químicos utilizados para el control de plagas en la agricultura, incluyendo los fungicidas. Enzimas secretadas por este hongo, como la celulasa y la hemicelulosa contribuyen a la ruptura de moléculas complejas como plaguicidas (Vinale *et al.*, 2008, p.3).

1.1.3.6 Inducción de mecanismos de defensa de la planta

Mecanismo de defensa capaz de resistir el ataque de patógenos y otras enfermedades en respuesta a un tratamiento de infección (Hammerschmidt, 2007, http://www.psm.msu.edu/people/ray_hammerschmidt) entre los compuestos que inducen resistencia se encuentran hongos, bacterias y productos metabólicos de los mismos (Walters *et al.*, 2007 <http://base.dnsgb.com.ua/files/book/Agriculture/Pesticides/Induced-Resistance-for-Plant-Defence.pdf>).

Se ha demostrado que *Trichoderma* al estar asociado con la rizosfera estimula mecanismos de defensa de la misma (Korolev *et al.*, 2008; Segarra *et al.*, 2009) que facilita la resistencia a fitopatógenos e incluso nematodos.

La acción del hongo biocontrolador involucra cambios en el interior de la pared en el hospedero bajo la acción de enzimas secretadas como las peroxidasas (Tijerino, 2010, p.29).

1.1.4 *Trichoderma harzianum* Rifai

Es un hongo micoparasítico y antagonista de fitopatógenos, su crecimiento se ve favorecido por la presencia de raíces de plantas a las cuales coloniza rápidamente.

Presenta una alta velocidad de crecimiento, abundante esporulación sobre determinados sustratos en los que se desarrolla debido a la riqueza de enzimas que posee hacen que sea muy eficiente como saprófito y aún más como agente de control biológico (Villegas, 2012, pp.1- 2).

Crece y madura rápidamente a los cinco días de incubación en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) a 25.0 °C, prefiere un pH de 4.5-5.0 y se desarrolla en áreas con un rango de humedad aceptable (Tijerino, p.24).

1.1.4.1 Características morfológicas

a) Colonia: En una etapa temprana de crecimiento se ven como una superficie lisa, pero la formación de esporas aéreas, permite observarlas ligeramente algodonosas (color blanco) y desarrolla un color verde oscuro, se debe a la esporas producidas su tamaño oscila de 7 a 9 μ m (Cruz, 2007; Iza, 2010; Falconí, 2011).

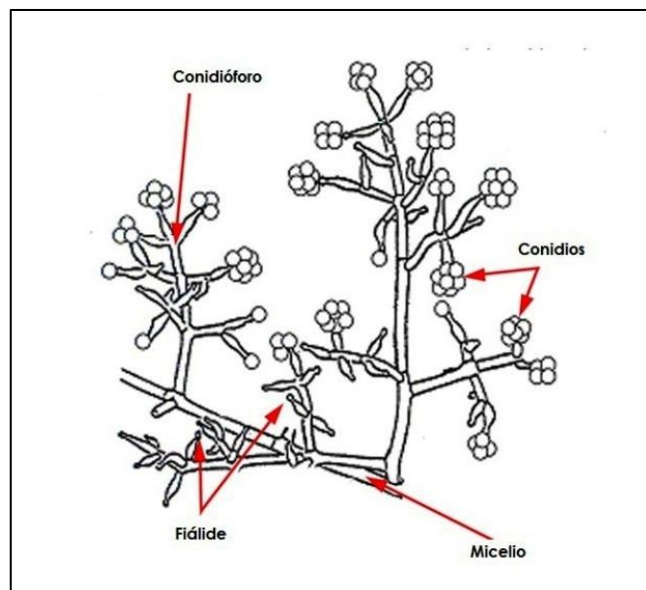


Figura 2-1: Morfología de *Trichoderma harzianum*
Fuente: BIOCET - Bioinsumos Centro Agrobiotecnológico, 2015

- b) Micelio: Está constituido por hifas hialinas, septadas, de paredes lisas y abundante ramificación
- c) Clamidosporas: son intercaladas ocasionalmente terminales o sobre una ramificación lateral de una hifa corta, globosa, elipsoidal, incolora de pared lisa (Falconí, 2011, p.54)
- d) Conidióforos: Tienen estructura compleja por su abundante ramificación, son cónicos y piramidales. Sobre las ramificaciones principales de los conidióforos se producen ramificaciones laterales, cortas, individuales o en grupos (Iza, 2010; Falconí, 2011).
- e) Fiálides: Son estructuras que se parecen a una pera reducida en su base hinchada, se disponen en grupos irregulares de hasta cinco alrededor del extremo de las penúltimas células de las ramificaciones (Amboya, 2012; Gupta *et al.*, 2014).
- f) Esporas: Se producen individual o sucesivamente acumuladas en el ápice de los fiálides que conforman una cabeza de esporas, su diámetro es menor a 15 μ m o puede estar en cadenas cortas, su coloración es verde amarillenta u oscura, son de forma subglobosa, ovoide o elíptica (Falconí, 2011, p.55).

1.1.4.2 Beneficios de *Trichoderma harzianum* Rifai

Entre las ventajas de este hongo tanto Agrobeta (2012) como Gupta *et al.* (2014) indican las siguientes:

- Estimula el crecimiento de la planta gracias a la acción de metabolitos secretados que promueven su desarrollo.
- Participa en procesos de degradación de materia orgánica, haciendo que los nutrientes se conviertan en formas asimilables para la planta, por lo tanto tiene un efecto indirecto en la nutrición del cultivo.
- Es un antagonista eficiente contra pudriciones radiculares producidas por *Pythium*, *Armillaria*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Phytophthora*.
- Actúa conjuntamente con otros organismos biológicos controladores de plagas entre los cuales se encuentran los hongos entomopatógenos
- Previene y controla enfermedades protegiendo la raíz y follaje.
- Preservación de recursos naturales al disminuir el uso de fungicidas tóxicos.
- No presenta efectos nocivos para el hombre ni para insectos benéficos.

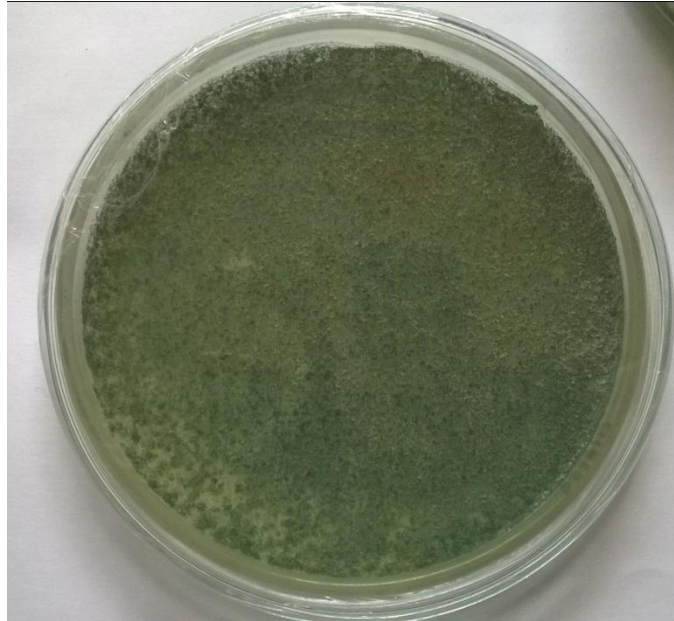


Figura 3-1: Cepa de hongo *Trichoderma harzianum*
Fuente: BIO CET - Bioinsumos Centro Agrobiotecnológico, 2015

1.2 Fermentación en estado sólido

La fermentación en estado sólido (FES) es un proceso biológico donde se utiliza residuos orgánicos ya sea como fuente de carbono, de energía o como soporte inerte, para obtener productos finales tales como ácidos orgánicos, enzimas y metabolitos secundarios (Welters *et al.*, 2007 <http://base.dnsgb.com.ua/files/book/Agriculture/Pesticides/Induced-Resistance-for-Plant-Defence.pdf>).

El desarrollo de la biotecnología se basa en bioprocesos dentro de los cuales la FES se destaca como técnica para promover el crecimiento microbiano y producción de metabolitos utilizados en la industria láctea, agrícola, alimentos, entre otros (Ferrer *et al.*, 2014, p. 13).

Es una tecnología de bajo costo, adecuada para las necesidades de los países en desarrollo (Rachmawaty, 2015, p.93) se lleva a cabo bajo dos modalidades de uso del oxígeno de manera aeróbica y anaeróbica, dependiendo de las vías metabólicas y fermentativas utilizadas por los microorganismos para su crecimiento.

Ofrece ventajas biotecnológicas como la alta adaptabilidad de los microorganismos y en particular los hongos al sistema (Granda *et al.*, 2005, p.14) los mismos que producen enzimas para degradar estos materiales sólidos y utilizar los nutrientes para su supervivencia.

La esporulación depende de condiciones ambientales tales como la humedad, la actividad de agua, fuente de carbono y nitrógeno, granulometría, temperatura, aireación y la forma de

inoculación influyen tanto en el crecimiento como en la formación de productos (Apaza, 2008, <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010044901>).

1.2.4 Humedad y actividad de agua

La humedad es la cantidad de agua presente en la superficie o el interior de un medio sólido, el porcentaje de humedad durante la FES puede variar entre 30.0 y 80.0% en dependencia del sustrato utilizado y el microorganismo objetivo de producción.

Constituye un factor crítico para la reproducción de hongos, la mayoría requieren un porcentaje elevado para producir esporas (Cavalcante *et al.*, 2008, p. 102).

La actividad de agua se define como la relación entre la presión de vapor del agua del sustrato y la del agua pura a la misma temperatura. Influye en el crecimiento, la resistencia y la supervivencia del microorganismo; los hongos filamentosos requieren contenidos mayores al 80.0% para una mayor capacidad de degradación de fibra de origen vegetal (Ito *et al.*, 2011, p. 303).

1.2.5 Temperatura

Gupta *et al.* (2014, p.11) menciona que estos hongos filamentosos son generalmente mesófilos crecen a temperaturas óptimas entre 28.0 y 35.0 °C. Sin embargo, la producción de calor metabólico durante el proceso causa un aumento significativo de esta variable y si este calor no es eliminado instantáneamente del medio de cultivo, puede limitar seriamente el desarrollo de los microorganismos.

Entre las estrategias para controlar la temperatura y la humedad se encuentran la aireación y la evaporación del agua.

1.2.6 Aireación

Se utiliza para suministrar el oxígeno necesario y para extraer tanto el dióxido de carbono como el calor metabólico formado; de tal manera que el flujo de aire esté en consideración con la naturaleza del microorganismo utilizado.

1.2.7 Microorganismos

Entre los hongos filamentosos más utilizados aplicando FES se encuentran *Trichoderma* (Falconí, 2011; Castro, 2015), *Penicilium*, *Gliocladium*, *Rhizopus*, *Aspergillus* y *Pleurotus* (Ferrer *et al.*, 2014, p.14). En otros casos se utilizan cultivos mixtos de cepas modificadas genéticamente para trabajar en simbiosis.

1.2.8 Sustratos

Los sustratos más utilizados actualmente en FES se encuentran el grano de arroz (*Oryza sativa* L.) y el trigo (*Triticum aestivum* L.) pero su utilización es limitada por los altos costos de producción que generan (Zerega *et al.*, 2005 <http://dx.doi.org/10.1600/0363644054782134>).

Algunos desechos agroindustriales contienen en su composición química la presencia de polisacáridos que los hace adecuados para utilizarse como sustratos en los bioprocesos de FES.

Como sustrato ideal se considera aquel que provea los nutrientes necesarios para el metabolismo celular del microorganismo en estudio; en caso de que exista déficit en los valor nutricional del sustrato es necesario utilizar un suplemento como fuente externa del mismo (Ferrer *et al.*, 2014, p.13).

Pineda *et al.* (2015, p.43) manifiesta que la granulación del sustrato debe permitir una óptima circulación del aire, en general debe permitir una circulación del 15.0% al 35.0 % y 20.0% al 60.0 % de agua en relación con el volumen total.

Además menciona que en Ecuador se están atenuando esfuerzos para proveer un manejo adecuado para la disposición final de los residuos generados, esto indica la reutilización de un gran potencial contaminante enfocando su aprovechamiento con mejores fines.

Sin embargo, dadas las características de cada residuo y las demandas del microorganismo en estudio, no siempre se consigue un aprovechamiento eficaz por ello es recomendable determinar la eficiencia que presenta cada sustrato para el desarrollo y propagación de cepas de interés científico.

1.3 El haba (*Vicia faba* L.)

El haba (*Vicia faba* L.) forma parte de las leguminosas más importantes, ocupa el quinto lugar de consumo por la población mundial, después del fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.), arveja (*Pisum sativum* L.), garbanzo (*Cicer arietinum* L.) y lenteja (*Lens culinaris* L.) (FAOSTAT, 2010, <http://faostat.fao.org/site/385/default.aspx>) su nombre le viene dado por el fruto (vaina), que recibe el nombre de legumbre (Ortega, 2006; Sarmiento, 2012).

Según las cifras de la FAO en el año 2010 esta leguminosa ocupó una superficie de cultivo de 2.559.773 hectáreas y según el INEC (2013, <http://www.ecuadorencifras.gob.ec>) en el Ecuador la superficie sembrada de este cultivo fue de 8.586 hectáreas cultivadas encontrándose la mayor producción en la región sierra.

Una de sus principales características es la resistencia a las altas temperaturas sin afectar su producción y calidad. La semilla seca, se la puede guardar varios años sin que se pierda su viabilidad (Ortega, 2006, p.16).

1.3.4 Taxonomía

Según INFOAGRO (2008, <http://www.infoagro.com/hortalizas/haba.asp>) la taxonomía del haba (*Vicia faba* L.) es la siguiente:

Reino	Vegetal
Clase	Angiosperma
Subclase	Dicotiledóneas
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae
Subfamilia	Papilionaceae
Género	Vicia
Especie	<i>faba</i>
Nombre Científico	<i>Vicia faba</i> L.

1.3.5 Composición química

Lucero (2014, p.36) menciona que el cultivo del haba (*Vicia faba* L.) es de gran importancia económica tanto en verde (vaina) como en grano seco y es muy apreciada por sus cualidades

alimentarias y nutritivas. Las semillas secas tienen mayor cantidad de hidratos de carbono y proteínas, por lo que su valor energético es elevado (Arévalo y Catucumba, 2007, pp.22-23)

Por cada 100.0 gramos de materia seca tiene 26.1 % de proteínas, 21.0 % de grasas, 32.5 % de carbohidratos y 350 calorías (Tabla 1-1 y 2-1).

Tabla 1-1: Contenido nutricional del haba fresca (*Vicia faba* L.)

Nutriente	Contenido (100 gramos habas cocidas y escurridas)
Proteínas (gr)	7,60
Lípidos (gr)	0,40
Carbohidratos (gr)	19,65
Cenizas (gr)	0,81
Energía (gr)	110,00
Agua (gr)	71,54
Fibra total (gr)	5,40
Calcio, Ca (mg)	36,00
Hierro, Fe (mg)	1,50
Magnesio, Mg (mg)	43,00
Fósforo, P (mg)	125,00
Potasio, K (mg)	268,00
Sodio, Na (mg)	5,00

Realizado por: María José Serpa

Fuente: Estrada, 2012, p.38

Tabla 2-1: Contenido nutricional del haba seca (*Vicia faba* L.)

Nutriente	Contenido (100 gramos de grano seco)
Agua %	13,80
Energía, Kcals	328,00
Proteínas, (gr)	25,00
Grasas, (gr)	1,20
Carbohidratos, (gr)	56,90
Fibra cruda, (gr)	5,10
Ceniza, (gr)	3,10
Calcio, Ca (mg)	104,00
Hierro, Fe (mg)	4,20
Tiamina, (mg)	0,45
Riboflavina, (mg)	0,19

Realizado por: María José Serpa

Fuente: Estrada, 2012, p.39

1.3.6 *Morfología*

El haba (*Vicia Faba* L.) es un cultivo anual denominado también leguminosa forrajera o pratense, en la Tabla 3-1 se describe sus características morfológicas principales.

Tabla 3-1: Morfología del haba (*Vicia Faba* L.)

Morfología de haba (<i>Vicia Faba</i> L.)	Descripción
Raíz	Es pivotante, desarrolla 1,5 m de profundidad.
Tallo	De consistencia herbácea, y varía en la altura desde 0,50 a 1,80 m.
Hoja	Compuestas paripinadas, con cuatro a siete folíolos glabros
Inflorescencia	Es de tipo racimo, en número de dos a doce flores
Flor	Tienen corola evolucionada, dialipétala
Fruto	Vaina
Semilla	Forma ovalada, el tamaño un largo de 1,6 cm a 3,5 cm.

Realizado por: María José Serpa

Fuente: Yáñez, 2013, pp. 16-17

1.3.7 *Aspectos botánicos de la semilla*

La semilla constituye la primera fase del desarrollo de la nueva planta y las partes esenciales de ésta son las cubiertas seminales y el embrión (Figura 5-1). Según Ortega (2006, pp.17-18) se reconocen tres tipos principales de variedades botánicas:

- Variedad Mayor: Comprende todas las habas cultivadas para la obtención de granos destinados al consumo humano, estos cultivos producen granos de tamaño grande con un diámetro entre 15 y 25 mm.
- Variedad Equina o Caballar: los granos son de tamaño intermedio y se cultivan para la obtención de forraje, abono verde y granos secos para la alimentación de animales.
- Variedad Minor: Los frutos son vainas pequeñas y redondas, se cultivan para la obtención de productos utilizados en la alimentación animal.

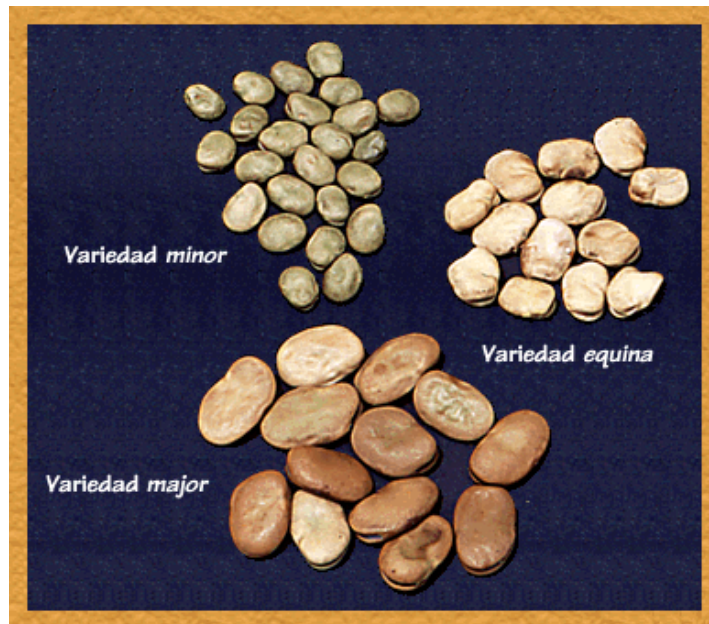


Figura 4-1 Variedades de semillas de haba (*Vicia faba* L.)
 Fuente: Arévalo y Catucumba, 2007, p.21

1.3.7.1 Testa o cáscara de haba (*Vicia faba* L.)

La semilla del haba (*Vicia faba* L.) presenta una envoltura denominada cubierta seminal, tegumento o testa (Figura 4-1) que es una capa gruesa alrededor de la semilla. Constituye un mecanismo de supervivencia de la planta y posibilita su germinación (Sarmiento, 2012, p.45). Es rica en carbohidratos y proteínas.

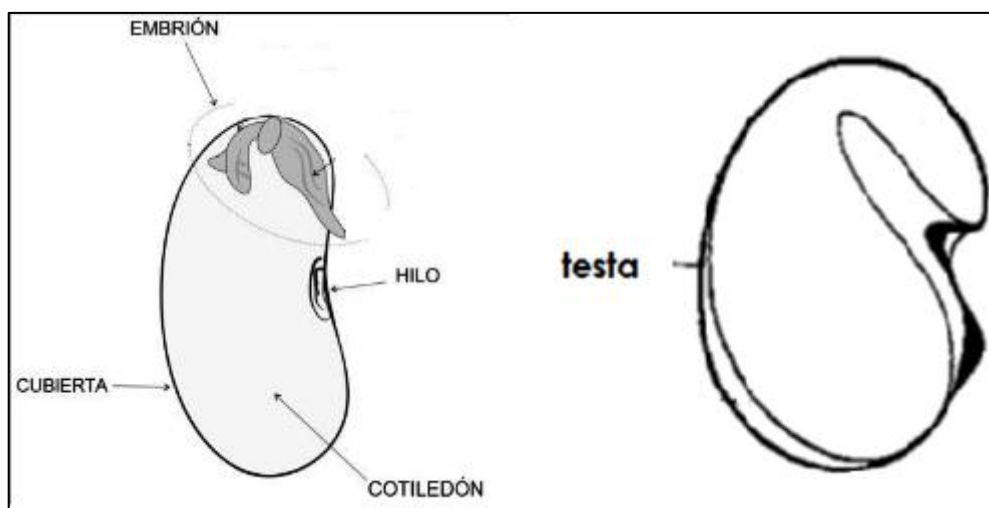


Figura 5-1: Testa o cáscara de la semilla del haba
 Fuente: Sarmiento, 2012, p.45

1.3.8 Clima y suelo

Su cultivo requiere de una temperatura que fluctúe entre 8 y 14 °C y una precipitación de 700 a 1000 mm de lluvia distribuidos a través del ciclo vegetativo. Los mejores rendimientos de producción se obtienen en alturas comprendidas entre los 2000 y 3000 metros sobre el nivel del mar, a veces toleran alturas de hasta 3600 metros o bajan hasta 1800 metros, pero a estas alturas las hojas se caen y los rendimientos bajan (Estrada, 2012, p.39).

Este cultivo puede desarrollarse en varios tipos de suelos ya sea franco arenoso, franco arcilloso que sean profundos, con buena cantidad de materia orgánica y pH alrededor de 7.0 (Yáñez, 2013, p.18).

De acuerdo a la información del III Censo Nacional Agropecuario realizado en el Ecuador en el 2010 la producción anual de esta leguminosa en grano seco en el Ecuador (Tabla 4-1) alcanzó un total de 2.402 Tm tanto en cultivo solo y asociado en el año 2013.

Tabla 4-1: Producción nacional de haba seca (*Vicia faba* L.)

AÑO: 2013		PRODUCTO: HABA SECA- GRANO SECO		
CARACTERÍSTICA: SUPERFICIE		ÁMBITO: NACIONAL		
CARACTERÍSTICA	SUPERFICIE (Has)		PRODUCCIÓN (Tm)	VENTAS (Tm)
	SEMBRADA	COSECHADA		
Solo	2.431	2.342	1.540	1.112
Asociado	6.155	3.992	861	395
TOTAL	8.586	6.333	2.402	1.507

Realizado por: María José Serpa

Fuente: Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP), 2013

1.3.9 El haba (*Vicia faba* L.) en el Ecuador

Es un cultivo tradicional de la Sierra ecuatoriana (Anexo A); se cultiva sola o en asociación con otras especies de plantas, constituye un componente importante en la dieta de amplios sectores de la población y se consume tanto en estado tierno como en seco. Cada año crece la cantidad de agricultores, asociaciones de pequeños productores y pequeños empresarios que se incorporan directamente a la cadena productiva de este tipo de cultivo (Estrada, 2012; Yáñez 2013).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Metodología

2.1.1 Tipo y diseño de Investigación

Por el tipo de investigación: Aplicada, porque alcanzó un fin directo e inmediato. Se propuso determinar la eficiencia del sustrato cáscara de haba (*Vicia faba* L.) para el crecimiento del hongo *Trichoderma harzianum* Rifai aprovechando este residuo industrial.

Por la temporalidad: Longitudinal, ya que se recolectó datos a través del tiempo en puntos o periodos especificados para determinar el crecimiento y desarrollo del hongo en el sustrato probado.

Por el tipo de enfoque: Cuantitativo. Se procedió a recolectar datos físicos y microbiológicos durante el periodo de crecimiento y desarrollo del hongo en el sustrato para comprobar la hipótesis en base a una relación numérica y al análisis estadístico.

Por el diseño de investigación: Experimental. Debido a que manipuló variables como porcentaje de humedad y viabilidad en el tiempo del sustrato probado, determinando en qué relación de las mismas se logra el crecimiento eficaz y viable del hongo *Trichoderma harzianum* Rifai.

2.1.2 Diseño Experimental

Se aplicó un diseño completo al Azar (DCA) con cuatro tratamientos y cinco repeticiones (Tabla 1-2 y 2-2) de acuerdo al tiempo de hidratación ensayado.

- Tratamiento A: Producción del hongo *Trichoderma harzianum* Rifai aplicando fermentación en estado sólido empleando la cáscara de haba (*Vicia faba* L.) como sustrato hidratado durante 24 horas.
- Tratamiento B: Producción del hongo *Trichoderma harzianum* Rifai aplicando fermentación en estado sólido empleando cáscara de haba (*Vicia faba* L.) como sustrato hidratado durante 48 horas.

- Tratamiento C: Producción del hongo *Trichoderma harzianum* Rifai aplicando fermentación en estado sólido empleando cáscara de haba (*Vicia faba* L.) como sustrato hidratado durante 72 horas.
- Tratamiento D (Testigo): Producción del hongo *Trichoderma harzianum* Rifai aplicando fermentación en estado sólido empleando cascarilla de arroz (*Oriza sativa* L.) como sustrato hidratado durante 24 horas.

Tabla 1-2 Cuadro de tratamientos

Codificación	Tratamiento	Código de réplica	Descripción
A	T ₁	24AR ₁	24 horas de remojo, codificación A, repetición 1
A	T ₁	24AR ₂	24 horas de remojo, codificación A, repetición 2
A	T ₁	24AR ₃	24 horas de remojo, codificación A, repetición 3
A	T ₁	24AR ₄	24 horas de remojo, codificación A, repetición 4
A	T ₁	24AR ₅	24 horas de remojo, codificación A, repetición 5
B	T ₂	48BR ₁	48 horas de remojo, codificación B, repetición 1
B	T ₂	48BR ₂	48 horas de remojo, codificación B, repetición 2
B	T ₂	48BR ₃	48 horas de remojo, codificación B, repetición 3
B	T ₂	48BR ₄	48 horas de remojo, codificación B, repetición 4
B	T ₂	48BR ₅	48 horas de remojo, codificación B, repetición 5
C	T ₃	72CR ₁	72 horas de remojo, codificación C, repetición 1
C	T ₃	72CR ₂	72 horas de remojo, codificación C, repetición 2
C	T ₃	72CR ₃	72 horas de remojo, codificación C, repetición 3
C	T ₃	72CR ₄	72 horas de remojo, codificación C, repetición 4
C	T ₃	72CR ₅	72 horas de remojo, codificación C, repetición 5
D	T ₄	24DR ₁	24 horas de remojo, codificación D, repetición 1
D	T ₄	24DR ₂	24 horas de remojo, codificación D, repetición 2
D	T ₄	24DR ₃	24 horas de remojo, codificación D, repetición 3
D	T ₄	24DR ₄	24 horas de remojo, codificación D, repetición 4
D	T ₄	24DR ₅	24 horas de remojo, codificación D, repetición 5

Realizado por: María José Serpa

Dónde:

A = Tratamiento 1. Sustrato: cáscara de haba (*Vicia faba* L.) con 24 horas de remojo.

B = Tratamiento 2. Sustrato: cáscara de haba (*Vicia faba* L.) con 48 horas de remojo.

C = Tratamiento 3. Sustrato: cáscara de haba (*Vicia faba* L.) con 72 horas de remojo.

D = Tratamiento 4. (Testigo). Sustrato: cascarilla de arroz (*Oriza sativa* L.) con 24 horas de remojo.

Tabla 2-2 Modelo matemático del Diseño Experimental

Diseño completo al azar (DCA)		
Fuentes de variación	Grados de Libertad	Fórmula
Tratamiento	3	t-1
Error	16	(r-1) (t-1)
TOTAL	19	rt-1

Realizado por: María José Serpa

Dónde:

t= tratamiento

r= repeticiones

2.1.2.1 Variables dependientes analizadas

En los cuatro tratamientos se analizaron las variables: recuento de esporas y viabilidad de sustrato empleado.

2.1.3 Población de estudio y tamaño de la muestra

Tanto la población como el tamaño de la muestra la conformaron el total de las 20 unidades experimentales de los cuatro tratamientos que contenían el inóculo del microorganismo *Trichoderma harzianum* Rifai, bajo condiciones controladas de fermentación sólida.

2.1.4 Selección de las condiciones de fermentación

- Se estableció una temperatura de fermentación de 28.0 °C para las 20 muestras de los cuatro tratamientos.

- El peso del sustrato para cada unidad experimental fue de 100.0 gramos.
- El contenido de humedad contenida en cada unidad experimental se estableció de acuerdo al tiempo de remojo establecido en el diseño experimental (Tabla 1-2)

2.1.4.1 Preparación del sustrato de interés

Se trituró en un mortero la cáscara de haba (*Vicia faba* L.) hasta obtener partículas de 0.5 – 3.0 cm de diámetro y se colocó en recipientes de vidrio de 250.0 mL.

Pasado el tiempo de hidratación se esterilizaron los sustratos (experimental y testigo) a una temperatura de 121.0°C durante 20 minutos y posteriormente se dejaron a enfriar a temperatura ambiente.

2.1.4.2 Determinación del porcentaje de humedad del sustrato

Para determinar la humedad contenida en cada tratamientos se procedió a tomar 10.0 gramos sustrato pasado el tiempo de remojo establecido en el diseño experimental, el mismo que correspondió al peso húmedo (Ph) y se colocó en la estufa de secado por el lapso de una hora.

Se repitió el mismo procedimiento hasta que el peso obtenido al final de la desecación sea constante. El peso obtenido de cada tratamiento se registró y correspondió al Peso seco (Ps)

Se calculó del porcentaje de humedad obtenido de cada uno de los tratamientos aplicando la siguiente fórmula:

$$H = 100 - \left(\frac{Ph - Ps}{Ph} \times 100 \right)$$

Dónde:

H = porcentaje de humedad

Ps = peso seco de la muestra

Ph = Peso húmedo de la muestra correspondiente al tiempo de remojo establecido en el diseño experimental.

2.2 Técnicas de recolección de datos

2.2.1 Obtención y cuantificación del inóculo

Se trabajó con cultivos puros del hongo *Trichoderma harzianum* Rifai de 72 horas de incubación en agar PDA, el inóculo fue aislado del cultivo madre a partir de un raspado superficial.

Para su cuantificación se utilizó la cámara de Neubauer, para ello se tomó el tubo de la dilución de la muestra a analizar y se la agitó durante 30 segundos.

Inmediatamente después se tomó la muestra de 0.1 mL con una pipeta automática para ser depositado en la cámara. Se dejó reposar medio minuto antes de proceder al conteo.

Luego se llevó a la cámara el microscopio y se procedió a realizar el conteo respectivo con el objetivo de 40X.

La concentración de esporas se calculó multiplicando la suma del número de esporas contadas en los cinco cuadrados secundarios, por el inverso de la dilución empleada y por el factor de la cámara.

Según Castro (2015) para el cálculo del número de esporas por mililitro se emplea la siguiente fórmula:

$$\text{Número de esporas/mL} = \text{Suma de 5 C.S.} \times \text{factor de dilución} \times 50.000$$

2.2.2 Inoculación del microorganismo en el sustrato sólido

Los sustratos estériles una vez fríos se inocularon en condiciones asépticas agregando 1.0 cm² de inóculo en cada una de las botellas, se cultivaron durante ocho días a 28.0 °C. Cumplidas 48 horas de incubación se removieron las botellas para oxigenar los sustratos sin quitar el tapón.

2.2.3 Evaluación del crecimiento

Para evaluar el crecimiento conidial del hongo en los sustratos se procedió a tomar muestras de cada una de las botellas durante los primeros 14 días consecutivos; posteriormente a los 30, 45 y 60 días de incubación.

Después se procedió a determinar el número de conidios por gramo de sustrato, para ello se prepararon diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) para facilitar el conteo.

Para la cuantificación de la concentración se utilizó la cámara de Neubauer, el cálculo se realizó multiplicando la suma del número de esporas contadas en los cinco cuadrados secundarios, por el inverso de la dilución empleada y por el factor de la cámara.

El resultado obtenido se expresó en Unidades Formadoras de Colonias por gramo de sustrato (UFC/g de sustrato).

2.2.4 Viabilidad en el tiempo

Para determinar la viabilidad en los cuatro tratamientos se realizó el conteo del número de conidios presentes y germinados (por gramo) a los 30, 45 y 60 días de incubación.

Se procedió a tomar 1.0 gramo del producto final y se colocó en 9.0 mL de agua destilada, se realizó diluciones seriadas hasta 10^{-3} . Posteriormente con la micro pipeta se tomó 1.0 mL de la suspensión y se sembró en agar Agua.

Para realizar la siembra se aplicó la técnica de vertido en placa (Figura 1-2) para ello se marcó las placas Petri estériles, con la fecha, número de muestra y dilución correspondiente, conforme se prepararon las diluciones se colocó por duplicado en placas alícuotas de 1.0 mL de las diluciones escogidas para la siembra.

Finalmente se colocó en las placas Petri de 10.0 a 15.0 mL del medio de cultivo (PDA) fundido a 45.0 °C y posteriormente con un movimiento oscilatorio efectuando la figura del número 8 se mezcló el inóculo con el medio fundido.

Para realizar la cuantificación de la concentración del hongo obtenido se realizó por conteo directo de la placa en el microscopio a las 24 horas de incubación.

El porcentaje de viabilidad se calculó con la siguiente fórmula:

$$\%Viabilidad = \frac{\text{Número de conidios germinados}}{\text{Número de conidios presentes al inicio de la formulación}} \times 100$$

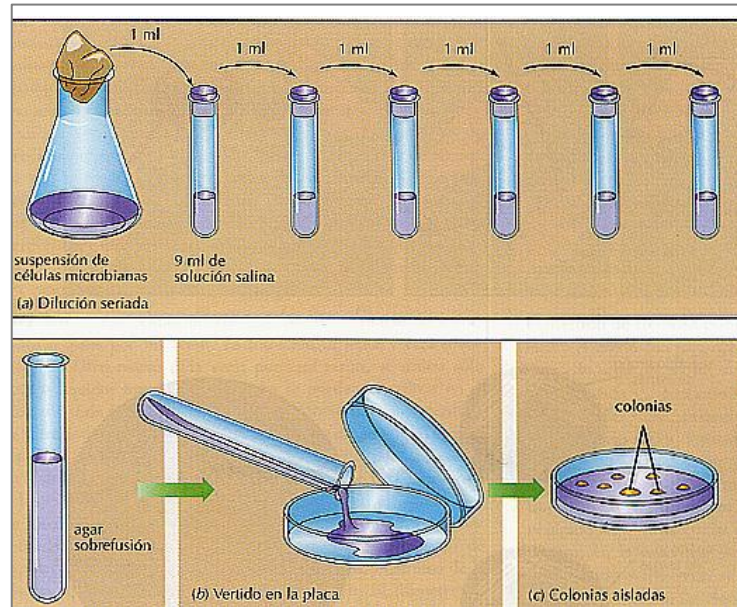


Figura 1-2 Técnica de siembra vertido en placa

Fuente: <http://es.slideshare.net/EDU3364/diversidad-de-los-microorganismos>

2.3 Análisis funcional

- 1.- Análisis de varianza ANOVA a un nivel de confianza del 95.0% mediante el cual se determinó el efecto del factor humedad evaluada sobre la variable producción de conidios.
- 2.- Pruebas de separación de medias: para ello se empleó el test de Tukey, el nivel de significación se fijó en $p < 0.05$
- 3.- Para la cuantificación de esporas desarrolladas en el sustrato se utilizó la cámara Neubauer.
- 4.- Viabilidad: Se consideró como viabilidad límite el 85.0% de conidios germinados por gramo a los tiempos de remojo ensayados.

En el procesamiento estadístico de los datos se trabajó logaritmo base 10 (Log_{10}) para los resultados obtenidos de la concentración de esporas en cada tratamiento

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 Resultados y análisis de resultados

3.1.1 Condiciones de fermentación en estado sólido

Los datos para de la variable contenido de humedad (Tabla 1-3) se presenta a continuación:

Tabla 1-3 Porcentaje de humedad contenido en cada Tratamiento

Tratamiento	Sustrato	Humedad (%)
A	Cáscara de haba (<i>Vicia faba</i> L.) 24 horas de hidratación	42.3
B	Cáscara de haba (<i>Vicia faba</i> L.) 48 horas de hidratación	40.1
C	Cáscara de haba (<i>Vicia faba</i> L.) 72 horas de hidratación	21.5
D	Cascarilla de arroz (<i>Oriza sativa</i> L.) 24 horas de hidratación	48.0

Realizado por: María José Serpa

En base a los resultados del contenido de humedad obtenidos para cada tratamiento se establecieron las condiciones de fermentación sólida para la propagación de conidios (Tabla 2-3), cada unidad experimental de los tratamientos fue inoculada con una concentración inicial de esporas de 5.0×10^5 UFC/g por un tiempo total de fermentación de 8 días.

Tabla 2-3 Condiciones de fermentación sólida para cada Tratamiento

Tratamiento	Composición	Peso del sustrato por unidad experimental (g)	Humedad (%)	Temperatura (°C)
A	Cáscara de haba, 24 horas de hidratación	100.0	42.3	28.0
B	Cáscara de haba, 48 horas de hidratación	100.0	40.1	28.0
C	Cáscara de haba, 72 horas de hidratación	100.0	21.5	28.0
D	Cascarilla de arroz, 24 horas de hidratación	100.0	48.0	28.0

Realizado por: María José Serpa

3.1.2 Evaluación del Crecimiento

3.1.2.1 Observación macroscópica

En el proceso de FES se evidenció la producción de conidios del hongo *Trichoderma harzianum* Rifai en los tratamientos mediante al observación del crecimiento y desarrollo de una capa fina de coloración blanquecina en los primeros cuatro días de incubación, terminando por colonizar todo el sustrato donde es sembrado presentado una coloración verde oscuro a partir del sexto día de incubación (Anexo F). De acuerdo con Elósegui (2006, p.10) estos datos corresponden a características propias del género *Trichoderma* lo que confirma que lo germinado en cada unidad experimental correspondía al microorganismo en estudio.

3.1.2.2 Cuantificación de biomasa

Una vez pasado los ocho días de incubación, los sustratos fueron almacenados a 4.0 °C durante dos meses y se evaluó su crecimiento. En todos los tratamientos aplicados se evidenció la producción de biomasa del hongo a partir del tercer día de incubación.

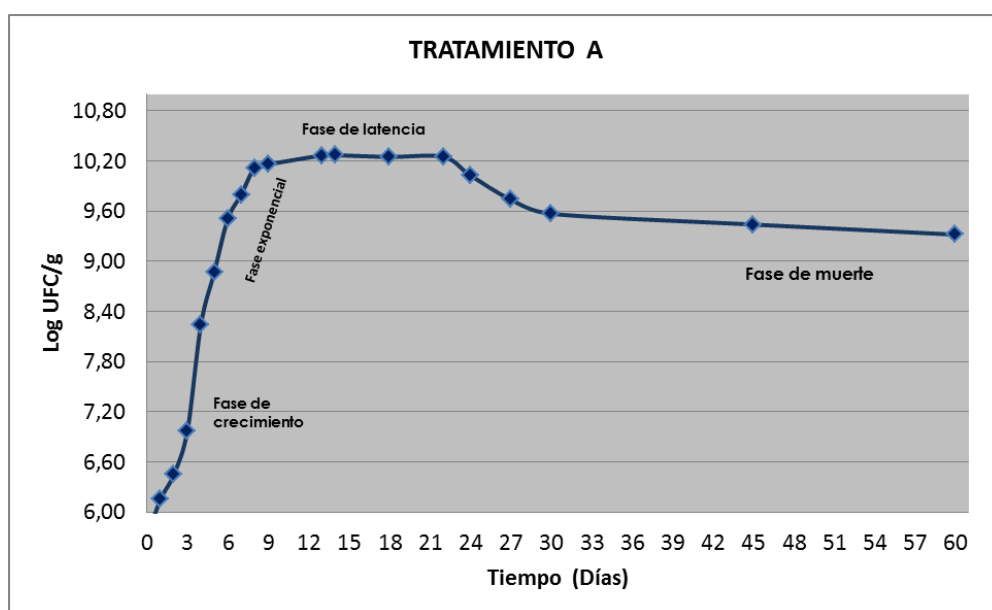


Figura 1-3 Curva de crecimiento de *Trichoderma harzianum* Rifai para el tratamiento A
Fuente: Realizado por: María José Serpa

En el Tratamiento A (*cáscara de haba con 24 horas de hidratación*), la curva de crecimiento de *Trichoderma harzianum* Rifai presentó la fase de crecimiento exponencial hasta los 13 días de incubación con una población de 1.85×10^9 UFC/g de sustrato, seguida de la fase estacionaria que se extendió hasta los 22 días donde la concentración permaneció constante, finalmente la

fase de muerte alcanzó una población final de 7.59×10^8 UFC/g de sustrato al cabo de los 60 días de almacenado el producto (Figura 1-3).

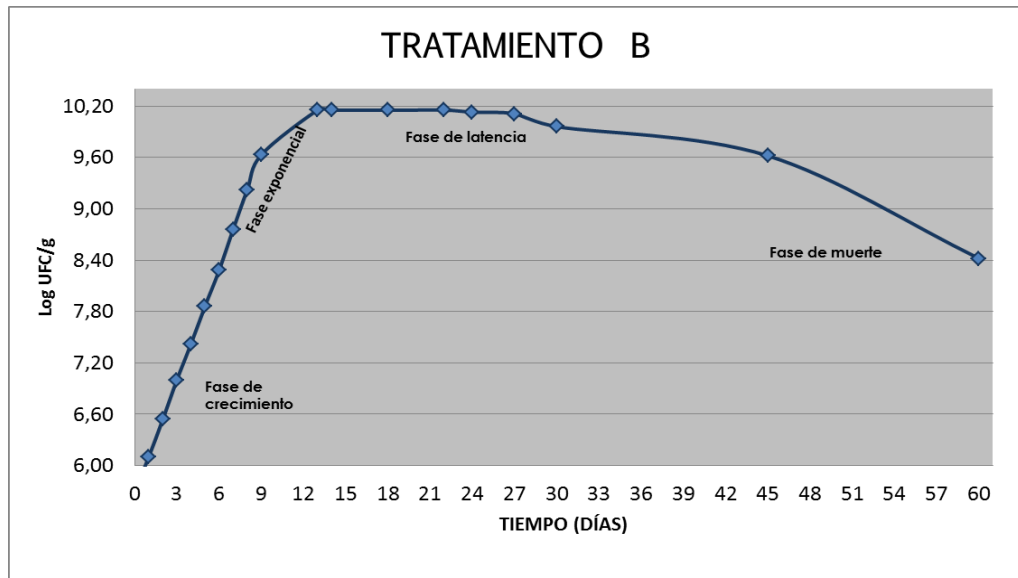


Figura 2-3 Curva de crecimiento de *Trichoderma harzianum* Rifai para el tratamiento B
Fuente: Realizado por: María José Serpa

Como se presenta en la Figura 2-3 la curva de crecimiento de *Trichoderma harzianum* Rifai, en el Tratamiento B (*cáscara de haba con 48 horas de hidratación*) presenta la fase de crecimiento exponencial hasta los 13 días con una población equivalente a 1.41×10^9 UFC/g, seguida de la fase estacionaria que se extendió hasta los 22 días donde la concentración permaneció constante, finalmente la fase de muerte alcanzó una población de $5,89 \times 10^8$ UFC/g de sustrato al cabo de los 60 días de almacenado el producto.

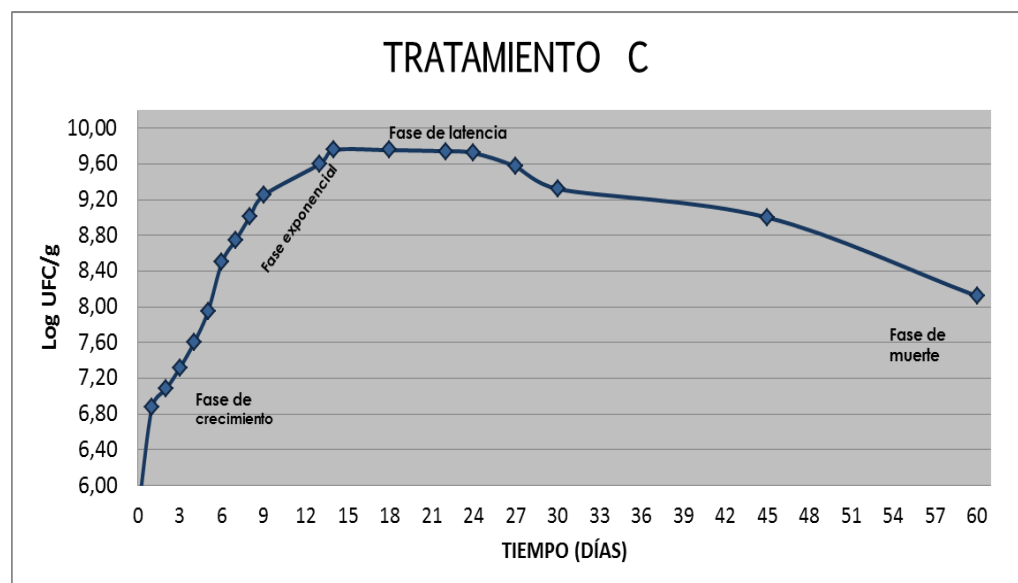


Figura 3-3 Curva de crecimiento de *Trichoderma harzianum* Rifai para el tratamiento C
Fuente: Realizado por: María José Serpa

La curva de crecimiento de *Trichoderma harzianum* Rifai para el Tratamiento C (*cáscara de haba con 72 horas de hidratación*) la fase de crecimiento se extendió hasta los 14 días con una población de 5.62×10^8 UFC/g, seguida de la fase estacionaria hasta los 24 días donde la concentración permaneció constante, finalmente la fase de muerte obtuvo una población final de 4.37×10^8 UFC/g de sustrato, al cabo de los 60 días (Figura 3-3).

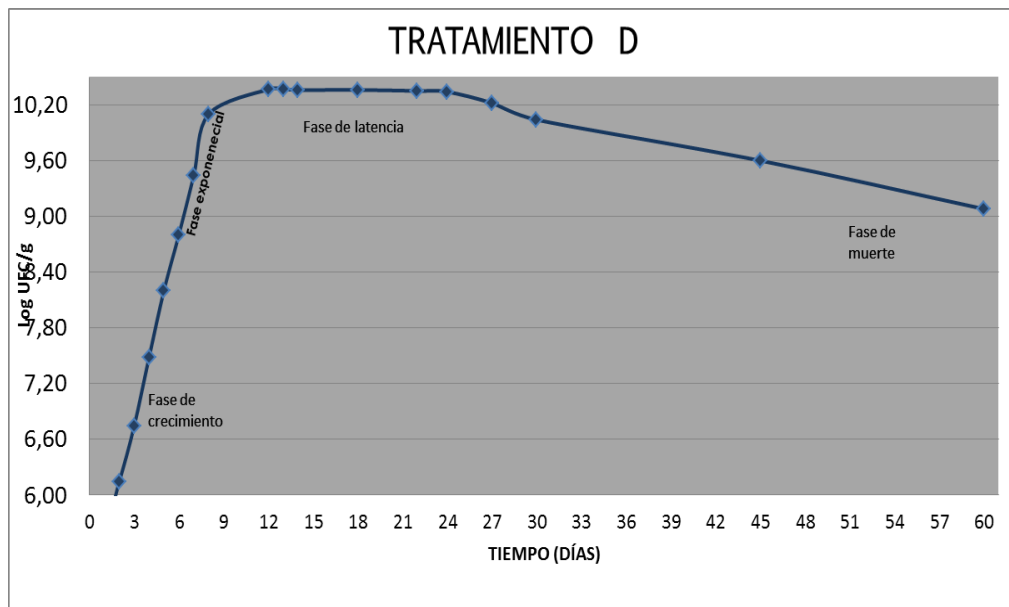


Figura 4-3 Curva de crecimiento de *Trichoderma harzianum* Rifai para el tratamiento D
Fuente: Realizado por: María José Serpa

Como se muestra en la Figura 4-3, el tratamiento testigo (*cascarilla de arroz con 24 horas de hidratación*), la curva de crecimiento de *Trichoderma harzianum* Rifai presentó la fase de crecimiento exponencial hasta los 12 días de incubación con una población de 2.29×10^9 UFC/g, la fase estacionaria se extendió hasta los 24 días y finalmente la fase de muerte alcanzó una población de 1.10×10^9 UFC/g de sustrato al cabo de los 60 días de almacenado el sustrato.

3.1.2.3 Modelo cinético de fermentación sólida

En general, el comportamiento del hongo *Trichoderma harzianum* Rifai en los diferentes tratamientos obedeció a un modelo cinético de orden exponencial (Tabla 3-3; Figura 5-3 y Figura 6-3) hasta los 14 días de incubación, ya que al realizar el análisis de los datos obtenidos, este modelo presentó un coeficiente de correlación altamente significativo (96%) (ANEXO D).

Tabla 3-3 Concentración del hongo a los 14 días de incubación

TIEMPO (días)	Concentración de esporas (Log_{10} UFC/g)			
	Tratamientos			
	A	B	C	D
6	8,37	8,21	7,79	8,46
8	8,41	8,26	7,85	8,52
14	9,27	9,13	8,75	9,44

Realizado por: María José Serpa

Tratamiento A: Cáscara de haba (*Vicia faba* L.) con 24 horas de hidratación

Tratamiento B: Cáscara de haba (*Vicia faba* L.) con 48 horas de hidratación

Tratamiento C: Cáscara de haba (*Vicia faba* L.) con 72 horas de hidratación

Tratamiento D: Cascarilla de arroz (*Oriza sativa* L.) con 24 horas de hidratación

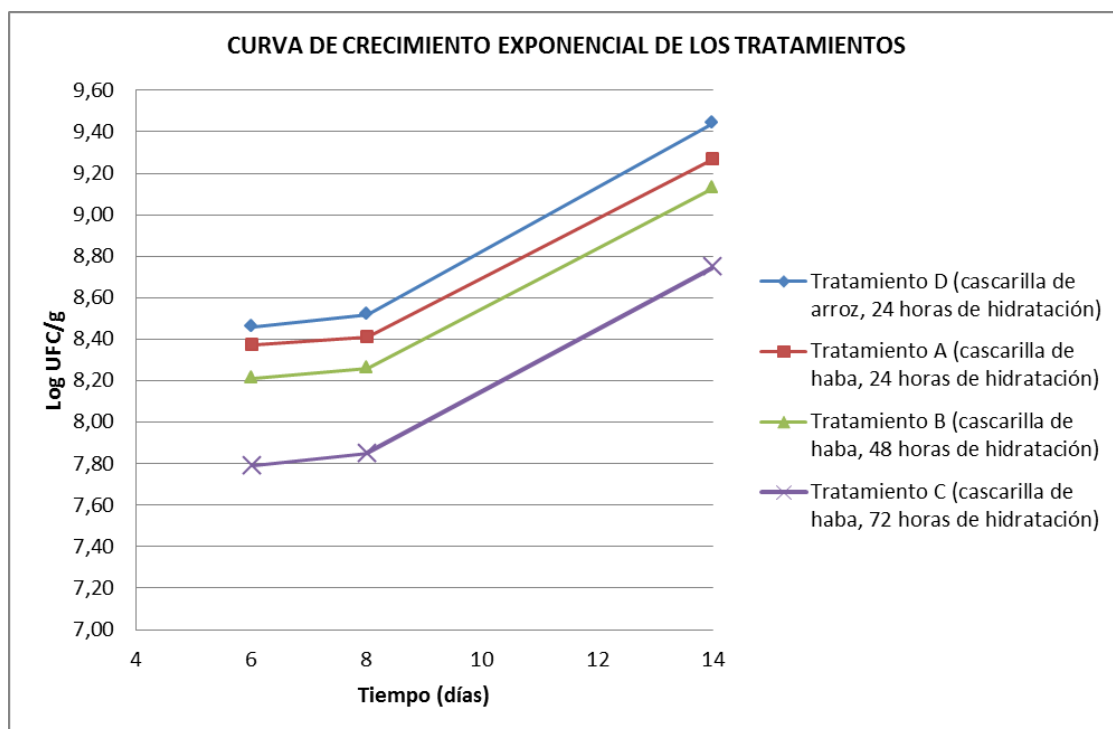


Figura 5-3 Curva de crecimiento exponencial del hongo para cada Tratamiento

Fuente: Realizado por: María José Serpa

Tratamiento A: Cáscara de haba (*Vicia faba* L.) con 24 horas de hidratación

Tratamiento B: Cáscara de haba (*Vicia faba* L.) con 48 horas de hidratación

Tratamiento C: Cáscara de haba (*Vicia faba* L.) con 72 horas de hidratación

Tratamiento D: Cascarilla de arroz (*Oriza sativa* L.) con 24 horas de hidratación

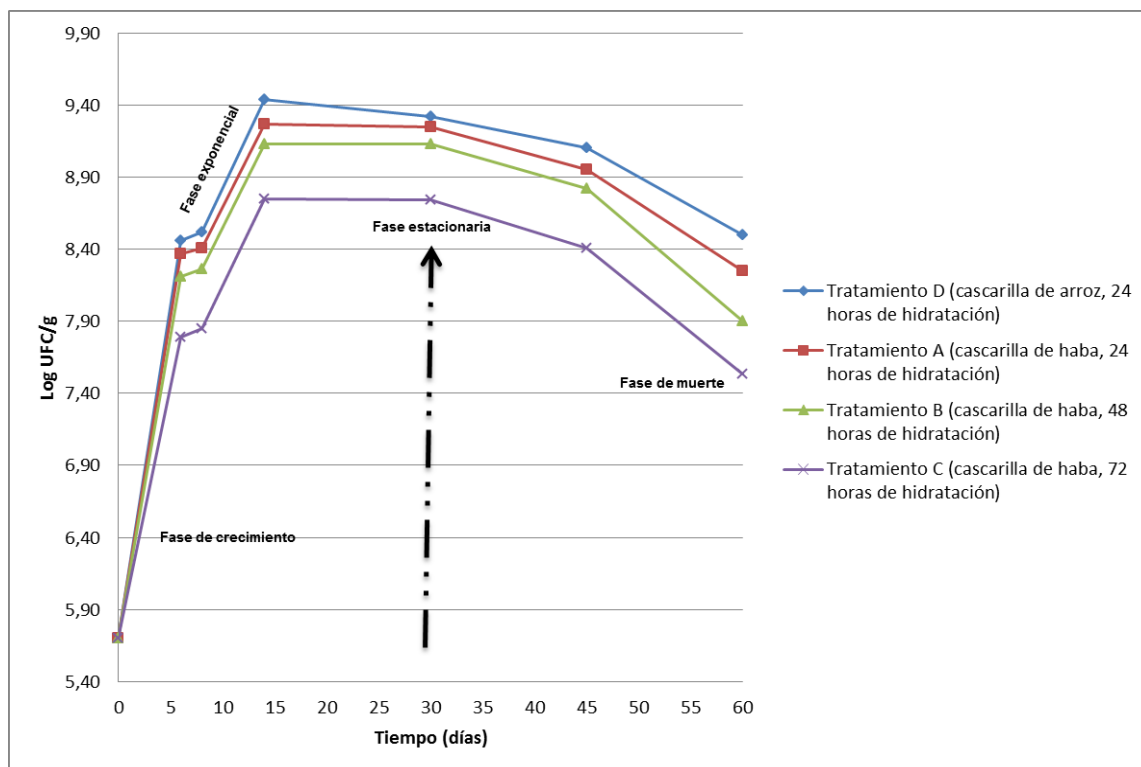


Figura 6-3 Modelo cinético de crecimiento en fermentación sólida del hongo

Fuente: Realizado por: María José Serpa

Tratamiento A: Cáscara de haba (*Vicia faba* L.) con 24 horas de hidratación

Tratamiento B: Cáscara de haba (*Vicia faba* L.) con 48 horas de hidratación

Tratamiento C: Cáscara de haba (*Vicia faba* L.) con 72 horas de hidratación

Tratamiento D: Cascarilla de arroz (*Oriza sativa* L.) con 24 horas de hidratación

El análisis de varianza presentó diferencias significativas al 5% para los tratamientos, con un coeficiente de variación del 0.36% a los 30 días; y 0.26 % a los 60 días de incubación (Tabla 4-3 y 5-3).

Tabla 4-3 Análisis de varianza para la concentración conidial a los 30 días de incubación

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-calculado
Tratamientos	3	1.019	0.340	309.496 **
Error	16	0.018	0.001	
Total	19	1.037		

Coeficiente de variación = 0.36%

Media general = 9.113

Tabla 5-3 Análisis de varianza para la concentración conidial a los 60 días de incubación

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-calculado
Tratamientos	3	0.471	0.157	296.413**
Error	16	0.008	0.001	
Total	19	0.480		

Coefficiente de variación = 0.26%

Media general = 8.838

El análisis estadístico de los datos empleando la prueba de Tukey al 5% de nivel de significancia presentó diferencias significativas de la variable concentración de conidios contenidos en los tratamientos al final del proceso de fermentación sólida, obteniendo el Tratamiento A (*cáscara de haba con 24 horas de hidratación*) y D (*cascarilla de arroz con 24 horas de hidratación*) la mayor concentración media de esporas equivalente a 1.10×10^9 y 7.59×10^8 UFC/g de sustrato respectivamente (Figura 7-3).

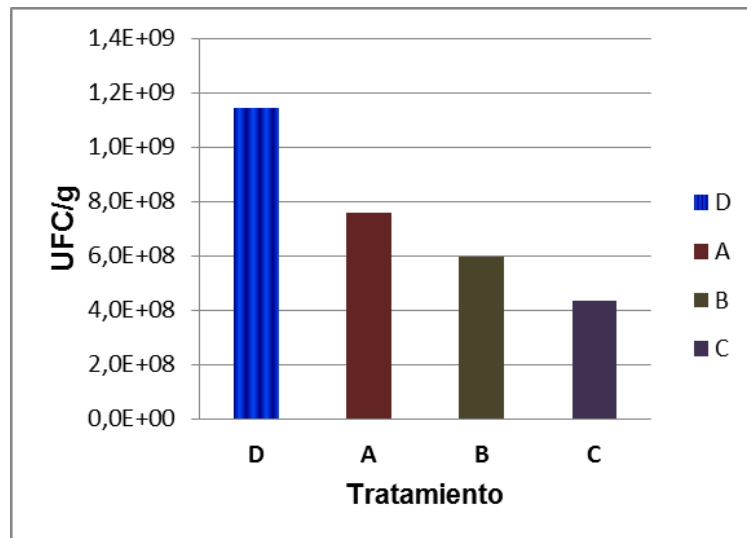


Figura 7-3 Concentración final de esporas en los Tratamientos

Fuente: Realizado por: María José Serpa

Tratamiento A: Cáscara de haba (*Vicia faba* L.) con 24 horas de hidratación

Tratamiento B: Cáscara de haba (*Vicia faba* L.) con 48 horas de hidratación

Tratamiento C: Cáscara de haba (*Vicia faba* L.) con 72 horas de hidratación

Tratamiento D: Cascarilla de arroz (*Oriza sativa* L.) con 24 horas de hidratación

3.1.3 Efecto del contenido de humedad

La humedad con la cual iniciaron todas las fermentaciones sólidas para la producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en los tratamientos estuvo comprendida entre el 21.5 y 48.0 % (Tabla 1-3). Gervais y Molin (2003) mencionan que el contenido de humedad para propagación de ciertas especies hongos filamentosos mediante fermentación en estado sólido se encuentra cercano al 55.0%, ya que en este valor de humedad la producción de ciertas enzimas se incrementa, por otro lado, manifiesta que para lograr la esporulación de hongos antagonistas en medio solido es necesario que el sustrato empleado en la fermentación tenga una humedad comprendida entre el 40.0% y 70.0%.

En la interacción de los factores (sustrato-contenido de humedad) se puede observar gráficamente (Figura 8-3) que el crecimiento, desarrollo y colonización del sustrato sólido por parte de *Trichoderma harzianum* Rifai son altamente dependientes del contenido de humedad durante el proceso de fermentación sólida para llevar a cabo los procesos de crecimiento y esporulación. Se determinó una mayor concentración en los tratamientos A (cáscara de haba con 24 horas de hidratación), B (cáscara de haba con 48 horas de hidratación) y D (cascarilla de arroz con 24 horas de hidratación) que corresponden a los de mayor porcentaje de humedad; lo que corrobora con lo dicho por Moore (1996) que indica que la humedad del sustrato debe ser superior al 40.0% mientras que para el proceso de esporulación es necesario mantener un contenido de humedad del sustrato entre un 35.0% y 40.0%.

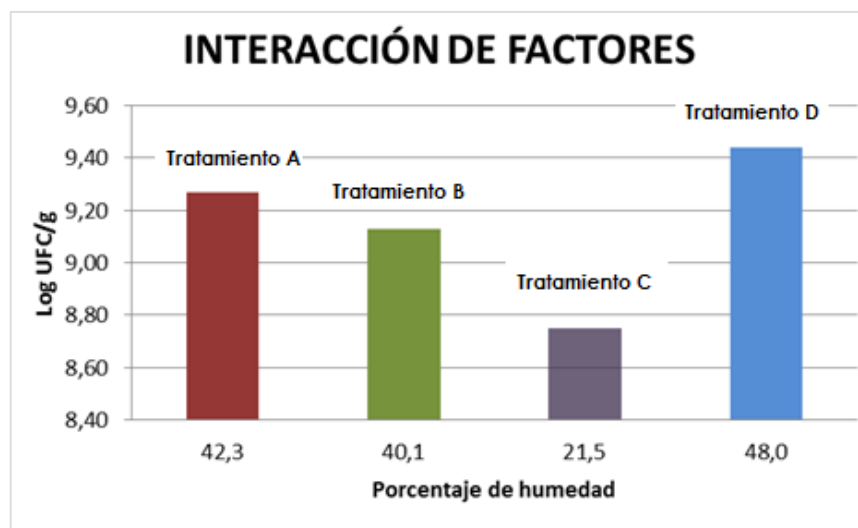


Figura 8-3 Interacción del factor sustrato y contenido de humedad

Fuente: Realizado por: María José Serpa

Tratamiento A: Cáscara de haba (*Vicia faba* L.) con 24 horas de hidratación

Tratamiento B: Cáscara de haba (*Vicia faba* L.) con 48 horas de hidratación

Tratamiento C: Cáscara de haba (*Vicia faba* L.) con 72 horas de hidratación

Tratamiento D: Cascarilla de arroz (*Oriza sativa* L.) con 24 horas de hidratación

3.1.4 Eficiencia del sustrato

En ambos sustratos (experimental y testigo), *Trichoderma harzianum* Rifai creció de manera uniforme llegando a colonizar totalmente su superficie; inicialmente se observó la formación de micelio de color blanco cambiando gradualmente hasta un color verde oscuro.

La relación de carbono: nitrógeno presente en el sustrato es esencial para las fermentaciones de hongos ya que influye en la propagación de esporas. Según Elósegui (2006, p.17) se necesita que la fuente de carbono esté en exceso y el contenido de nitrógeno sea el factor limitante del crecimiento, lo que desencadena el proceso de desarrollo y esporulación.

Tabla 6-3 Composición química de la cascarilla de arroz (*Oriza sativa* L.)

Constituyente	Contenido (%)
Carbono	39.1
Hidrógeno	5.2
Nitrógeno	0.6
Oxígeno	37.2
Azufre	0.1
Cenizas	17.8

Realizado por: María José Serpa
Fuente: Bayas, 2012, p.56

Tabla 7-3 Composición química de la cáscara de haba (*Vicia faba* L.)

Constituyente	Contenido (%)
Carbono	48.8
Hidrógeno	4.3
Nitrógeno	12.6
Fibra	10.4
Grasa	1.8
Cenizas	22.9

Realizado por: María José Serpa
Fuente: Goyoaga, 2005; García, 2011, p. 31

Al observar la composición química de cada sustrato (Tabla 6-3 y Tabla 7-3) se puede determinar que la cáscara de haba (*Vicia faba* L.) satisface mejor los requerimientos de carbono y nitrógeno con respecto a la cascarilla de arroz (*Oriza sativa* L.); sin embargo, la cáscara de haba es de consistencia dura e impermeable lo que le permite realizar su función de proteger a la

semilla (Goyoaga, 2005, p.21) y la cascarilla de arroz es de consistencia quebradiza, liviana y facilita que haya una buena aireación (Bello, 2009, p.20) lo cual contribuye a una mayor facilidad de degradación por parte del microorganismo y óptima producción de esporas. Por lo cual si bien es cierto en cáscara de haba creció, en cascarilla de arroz lo hizo mejor obteniéndose como resultado 1.45×10^9 UFC/g y 2.29×10^9 UFC/g respectivamente.

En el análisis de la prueba de Tukey se presentaron dos rangos (Tabla 8-3), donde se determinó tanto el Tratamiento testigo codificado como “D” como el Tratamiento A (*cáscara de haba con 24 horas de hidratación*) y B (*cáscara de haba con 48 horas de hidratación*) resultan eficientes para la propagación de esporas con una concentración media general de 8.02 UFC/g, sin embargo, el tratamiento C (*cáscara de haba con 72 horas de hidratación*) con un contenido de humedad del 21.5% no satisface los requerimientos para un óptimo desarrollo del hongo biocontrolador.

Tabla 8-3 Resultados de la prueba de Tukey de los tratamientos

Tratamiento	Concentración media de conidios	Rangos homólogos	
	(Log ₁₀ UFC/g)		
D	9,058	X	
A	8,88	X	
B	8,774	X	
C	8,638		XX

Fuente: Realizado por: María José Serpa

Tratamiento A: Cáscara de haba (*Vicia faba* L.) con 24 horas de hidratación

Tratamiento B: Cáscara de haba (*Vicia faba* L.) con 48 horas de hidratación

Tratamiento C: Cáscara de haba (*Vicia faba* L.) con 72 horas de hidratación

Tratamiento D: Cascarilla de arroz (*Oriza sativa* L.) con 24 horas de hidratación

Es importante considerar que la concentración de esporas que se aplica en el control biológico de fitopatógenos; entre mayor sean, los resultados son mejores. Generalmente en trabajos de invernadero y campo se utiliza al menos una concentración de 1.0×10^8 UFC/g (Acevedo, 2008, p.258). Todos los tratamientos evaluados en la presente investigación alcanzaron esta concentración; confirmando lo indicado por Michel-Aceves (2008, p.188) en el sentido de que *Trichoderma* para su producción masiva presenta facilidad de cultivarse sobre diferentes sustratos orgánicos, por lo que se puede deducir que el sustrato de la cáscara de haba (*Vicia faba* L.) resulta eficiente para la producción de esporas de *Trichoderma harzianum* Rifai.

3.1.5 Viabilidad en el tiempo

Al cabo de los 30, 45 y 60 días de almacenado el producto se procedió a analizar la viabilidad del producto mediante el conteo de colonias de las cajas petri con medio Agar agua. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 9-3.

Tabla 9-3 Contenido de conidios presentes y viables en cada tratamiento experimental

Tiempo (días)	Log ₁₀ No. conidios g ⁻¹			Log ₁₀ No. conidios germinados g ⁻¹		
	TRATAMIENTOS			TRATAMIENTOS		
	A	B	C	A	B	C
30	9.25 (1.78 x 10 ⁹)	9.14 (1.38 x 10 ⁹)	8.74 (5.50 x 10 ⁸)	9.24 (1.73 x 10 ⁹)	9.11 (1.28 x 10 ⁹)	8.39 (2.45 x 10 ⁸)
45	8.96 (9.12 x 10 ⁸)	9.11 (1.29 x 10 ⁹)	8.67 (4.68 x 10 ⁸)	8.33 (2.15 x 10 ⁸)	8.47 (2.97 x 10 ⁸)	8.06 (1.16 x 10 ⁸)
60	8.88 (7.59 x 10 ⁸)	8.77 (5.89 x 10 ⁸)	8.64 (4.37 x 10 ⁸)	7.99 (9.82 x 10 ⁷)	7.89 (7.82 x 10 ⁷)	7.78 (5.97 x 10 ⁷)

Realizado por: María José Serpa

La viabilidad disminuyó con el tiempo desde una concentración de 10⁹ hasta 10⁷ UFC/g a los 60 días de incubación del producto lo cual confirma lo indicado por Santos *et al.* (2012, p.154) que manifiestan que la tendencia de los productos biológicos disminuye su viabilidad en el paso del tiempo.

En el análisis estadístico de la variable viabilidad se obtuvieron diferencias significativas, ésta oscilaba entre 90.82 y 98.0 %, el mayor porcentaje se obtuvo para el tratamiento D (*cascarilla de arroz, 24 horas de hidratación*) con un 98.0% seguido de los tratamientos A (*cáscara de haba, 24 horas de hidratación*) y B (*cáscara de haba, 48 horas de hidratación*) con un 97.54 % y 92.76 % respectivamente. El menor porcentaje de germinación conidial fue para el tratamiento C (*cáscara de haba, 72 horas de hidratación*) con un 90.82% de viabilidad.

3.1.6 Resultados experimentales

Los resultados experimentales sobre conteo de esporas, viabilidad y humedad se presentan en la Tabla 10-3, Figura 9-3. Según el análisis estadístico, se observó que para la variable crecimiento de esporas el porcentaje de humedad contenido en el sustrato probado (*Vicia faba L.*) resultó significativo para lograr una elevada concentración conidial.

Tabla 10-3 Relación de datos experimentales

Relación de datos experimentales				
Variables	Tratamientos			
	A	B	C	D
Conteo crecimiento esporas (UFC/g)	1.85×10^9	1.41×10^9	5.62×10^8	2.25×10^9
Conteo crecimiento esporas final (UFC/g)	7.59×10^8	5.89×10^8	4.37×10^8	1.10×10^9
Viabilidad final (%)	97.54	92.76	90.82	98.0
Humedad (%)	42.3	40.1	21.5	48.0

Realizado por: María José Serpa

A: Cáscara de haba (*Vicia faba* L.) con 24 horas de hidratación

B: Cáscara de haba (*Vicia faba* L.) con 48 horas de hidratación

C: Cáscara de haba (*Vicia faba* L.) con 72 horas de hidratación

D: Cascarilla de arroz (*Oriza sativa* L.) con 24 horas de hidratación

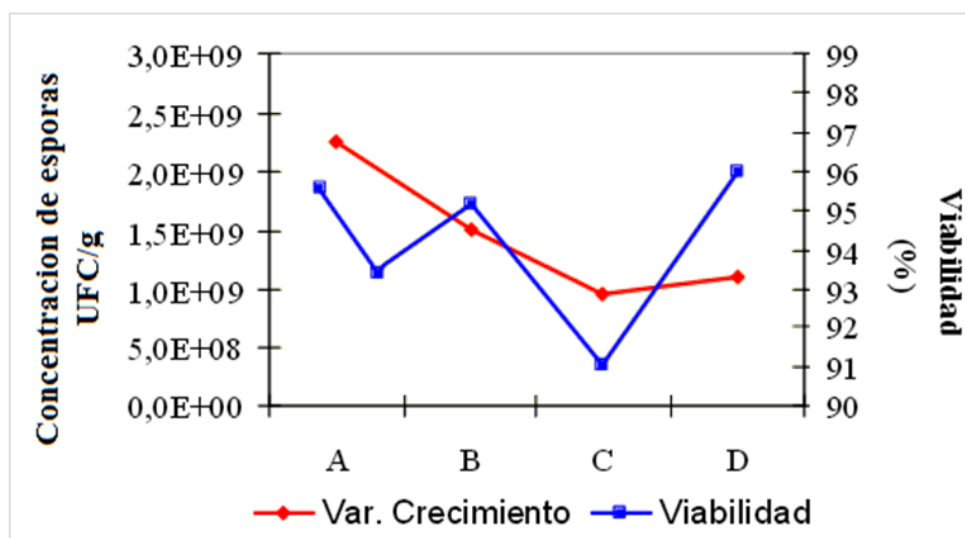


Figura 9-3 Relación viabilidad y concentración de esporas en los Tratamientos

Fuente: Realizado por: María José Serpa

Se determinó que un mayor contenido de humedad superior al 40.0% presente en el sustrato ensayado permite un mayor desarrollo conidial del hongo *Trichoderma harzianum* Rifai lo que confirma Campos *et al.* (2001) al manifestar que un rango de humedad existente en el sustrato del 20.0% al 50.0 % favorece el desarrollo de hongos del género *Trichoderma*.

3.1.7 Verificación de la hipótesis

Tras haber realizado el procesamiento, análisis e interpretación de los resultados obtenidos, se rechaza la hipótesis de nula (la cáscara de haba no es eficiente para el crecimiento del hongo *Trichoderma harzianum* Rifai), ya si resulta eficiente para la producción de esporas del hongo *Trichoderma harzianum* Rifai, lo cual es ratificado con la parte experimental llevada a efecto.

CONCLUSIONES

- *Trichoderma harzianum* Rifai puede crecer satisfactoriamente en el sustrato de cáscara de haba (*Vicia faba* L.) ya que el mismo puede ser utilizado por las enzimas que el hongo es capaz de sintetizar.
- Las condiciones de fermentación sólida óptimas para el desarrollo del hongo fueron temperatura 28.0 °C, porcentaje de humedad superior al 40.0 % durante 8 días.
- A partir de las evaluaciones realizadas se encontró que la fase de crecimiento exponencial del hongo se desarrolló hasta los 14 días de incubación donde se presentaron las concentraciones de esporas más elevadas con valores de hasta 1.41×10^9 UFC/g, seguida de una fase estacionaria hasta los 22 días de incubación, finalizando con la fase de muerte a partir de los 30 días hasta los 60 días de incubación.
- En todos los casos se obtuvo elevados niveles de viabilidad de las esporas, comprendidas en un rango entre un 90.8% y 96.9% lo que garantiza la efectividad del sustrato. Los tratamientos experimentales A (*cáscara de haba, 24 horas de hidratación*) y B (*cáscara de haba, 48 horas de hidratación*) obtuvieron los mejores resultados de concentración de blastoesporas correspondiente a una media de 1.78×10^9 y 1.38×10^9 UFC/g y un excelente grado de viabilidad 96.94 y 92.76% respectivamente

RECOMENDACIONES

- La cáscara de haba (*Vicia faba* L.) en las condiciones estudiadas podría servir de sustrato para la producción de hongos entomopatógenos usados en el control biológico, por lo que se recomienda profundizar su estudio.
- Probar los tratamientos A (*cáscara de haba con 24 horas de hidratación*) y B (*cáscara de haba con 48 horas de hidratación*) a nivel de vivero y campo por ser los que mejores promedios de concentración y viabilidad de esporas obtuvieron.

BIBLIOGRAFÍA.

ACEVEDO et al. “Utilización de desechos orgánicos como sustrato para la producción de un fungicida natural en la región cafetalera del municipio de Tuxtepec, Oaxaca y Zihuatanejo, Gro” *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, vol.4, n° 2 (2008), (México) p.258

AGRIOS, George. *Fitopatología*. Quinta edición, México D.F. México: Limusa, 2005, pp. 402-453.

AMBOYA NAULA Mesías Teodoro. *Evaluación de tres frecuencias de aplicación de Trichoderma harzianum como estimulador de crecimiento en el cultivo de rosa*. (Tesis pregrado) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Recursos Naturales, Riobamba, Ecuador. 2012. pp.19-25

APAZA TICONA . *Optimización de parámetros físicos, químicos y biológicos del cultivo de Trichoderma hamatum Bol 12 QD para una mejor producción de compuestos biológicamente activos contra Botrytis cinerea* [en línea]. (Tesis) (Maestría) Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia. 2008, pp. 22-35 [Consulta: 2015-09-13]. Disponible en: <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010044901>

ARÉVALO FUERTES, Carlos Julio & CATUCUAMBA CATUCUAMBA, Héctor. *Mejoramiento de la calidad de las galletas de harina de trigo mediante la adición de harina de haba (Vicia faba L.) y de panela como edulcorante* (Tesis) Universidad Técnica del Norte, Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales. Ibarra, Ecuador. 2009. pp. 13-26

BAYAS RAMÍREZ, Silvana Gabriela. *Aprovechamiento de residuos Agroindustriales, cascarilla de arroz (Oriza sativa) y residuos de papa (Solanum tuberosum) para la producción de Trichoderma spp.* (Tesis) Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Escuela de Ingeniería Bioquímica. Ambato, Ecuador. 2012. p.56

BELLO, Marcelo Oscar. *Procesamiento hidrotérmico de arroz cáscara. Efecto de las condiciones de hidratación y cocción en el rendimiento, textura y propiedades térmicas del grano elaborado* [en línea] (Tesis) (Doctoral) Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Industrial. Buenos Aires-Argentina. 2009. pp.19-23 [Consulta: 2015-09-13]. Disponible en: http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_4639_Bello.pdf

BIOCET Bioinsumos Centro Agrobiotecnológico. Laboratorio. Riobamba, Ecuador, 2015.

CAMPOS Sofía et al. “Influencia de algunos parámetros en la fermentación en estado sólido del hongo *Trichoderma viride*” *Tecnología química Centro Nacional de Electromagnetismo*, vol. 21, n° 1 (2001),(Cuba) p. 86

CASTRO et al. “Efecto de cepa ecuatoriana de *Trichoderma harzianum* Rifai como antagonista de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en condiciones de casa de cultivo” *Revista de Protección Vegetal*, vol.30, n°2 (2015), (Cuba) pp. 133-138.

CAVALCANTE, et al. “Efecto de la humedad en la producción de conidios de *Trichoderma* en el maíz y salvado de trigo por fermentación en estado sólido” *Bioprocesos y tecnología de Alimentos*, vol. 1, n° 1, (2008), (Brasil) pp.100-104

CAVERO, Poholl. “Control biológico de plátano enfermedad Sigatoka negra con *Trichoderma*”. *Ciencia Rural*, vol. 45, n° 6 (2014) (Brasil) 45 (6), pp. 951-957.

CHAVEZ et al. “Potencial de cepas fúngicas aisladas en el área de Biotecnología Fúngica Segunda parte: Biocontroladores fúngicos” *Revista de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas*, vol. 2, n°1 (2014), (Bolivia) pp. 49-55.

CRUZ MARTÍNEZ Lina Carolina. Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* a escala piloto [en línea] (Tesis) Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Escuela de Microbiología Industrial. Bogotá, Colombia. 2007. pp. 35-62 [Consulta: 2015-09-14]. Disponible en:
<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis23.pdf>

DENNIS, C., & WEBSTER, J. “Propiedad antagonista de especies grupos de *Trichoderma*. Producción de antibióticos no volátiles” *Transacciones de Micología de la Sociedad Británica*, n° 57 (1971), (Gran Bretaña) pp. 25-39

ELÓSEGUI CLARO, Orestes. “Métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas” *Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV)*, Manual de Laboratorio, (2006), (Cuba). p.18

ESTRADA MONTEROS, Paola Fernanda. *Proyecto de factibilidad para la creación de una empresa productora y comercializadora de café de haba con filtrantes en el cantón Cayambe.*

(Tesis) Universidad Politécnica Salesiana, Administración de Empresas, Ingeniería Comercial. Quito, Ecuador. 2012. pp. 39-42

FALCONÍ Carlos. Manual de Taxonomía de *Trichoderma spp.* Quito – Ecuador: 2011, pp. 3-40.

FAO Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. *Agricultura mundial hacia los años 2015/2030* [en línea]. Italia: Jacques Diouf, 2015 [Consultado: 13 septiembre 2015] Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/004/y3557S/y3557s00.pdf>

FAOSTAT - Estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. *Estadística- cultivo del haba (Vicia faba L.)* [en línea] 2010 [Consulta: 2015-09-14]. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/385/default.aspx>

FERRER et al. “Una alternativa biotecnológica para el aprovechamiento de desechos agroindustriales” *Revista Tecnocientífica URU*, nº 7 (2014), (Venezuela) pp. 11-22

GARCÍA SÁNCHEZ, Isabel. Variación en el contenido de L-DOPA y compuestos fenólicos durante el desarrollo de semilla de *Vicia faba L.* [en línea] (Tesis) (Maestría) Colegio de Postgraduados Institución de enseñanza e investigación en Ciencias Agrícolas. Puebla-México. 2011. p.31 [Consulta: 2015-09-13]. Disponible en: http://www.biblio.colpos.mx:8080/xmlui/bitstream/10521/623/1/Garcia_Sanchez_I_MC_EDAR_2011.pdf

GERVAIS, Patrick. y MOLIN, Paúl. “El papel del agua en la fermentación en estado sólido” *BiOChem. Eng. Journal*, vol.13, nº (2-3) (2003), (Francia) pp. 85-101.

GOYOAGA JORBA, Carmen. *Estudio de factores no nutritivos en Vicia faba L. Influencia de la germinación sobre su valor nutritivo* [en línea] (Tesis) (Doctoral) Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia, Departamento de Nutrición y Bromatología II. Madrid-España. 2005. pp. 19-26 [Consulta: 2015-09-13]. Disponible en: <http://biblioteca.ucm.es/tesis/far/ucm-t28827.pdf>

GRANDA et al. “Utilización de residuos de plátano para la producción de metabolitos secundarios por fermentación en estado sólido con el hongo *Lentinus crinitus*” *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, vol. 12, nº 5 (2005) (Medellín) pp. 13-20

GUPTA, Vijaí; SCHMOLL, Monika; HERRERA-ESTRELLA, Alfredo, DRUZHININA, Irina; TUOHY, María. *Biotecnología y biología del Trichoderma*. Galway-Irlanda. Elsevier, 2014. pp.3-22

HAMMERSCHMIDT Ray. *Resistencia inducida de defensa de la planta: Un enfoque sostenible para la protección de cultivos Introducción: Definición y un poco de historia*. [en línea] Oxford, Blackwell, 2007 [Consulta: 2015-09-14]. Disponible en: http://www.psm.msu.edu/people/ray_hammerschmidt

HARMAN, et al. “Especies de *Trichoderma* oportunistas, simbioses de plantas no virulentas” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 2, n° 1 (2004), (Estados Unidos) pp.43-56.

HARMAN, Gary. “Descripción general de los mecanismos y usos de *Trichoderma spp*” *Fitopatología*, vol. 96, n° 2 (2006), (Estados Unidos) pp. 190-194

INEC – Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. *Producción anual de haba seca* [en línea] 2013 [Consulta: 2015-09-14]. Disponible en: http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac%202013/

INFANTE, et al. “Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos” *Revista de Protección Vegetal*, vol. 24, n° 1 (2009), (Cuba) pp.14- 21

INFOAGRO. *El cultivo del haba*. [en línea] 2008 [Consulta: 2015-09-14]. Disponible en: <http://www.infoagro.com/hortalizas/haba.asp>

ITO et al. “Fermentación en estado con hongos y su producción de enzimas eficientes. Cultura uniforme en sólidos” *Biociencia y Bioingeniería*, n° 111 (2011), (Japón) pp. 300-305

IZA, Roberto. (2010). Interacción de cuatro fosfonatos mas *Trichoderma harzianum* para el control de la lancha de papa (*Phytophthora infestans*) a nivel de laboratorio. (Tesis) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Recursos Naturales. Riobamba, Ecuador. 2010. pp. 16-20

KOROLEV et al. “El papel de fitohormonas en la resistencia basal y resistencia sistémica inducida de *Trichoderma* a *Botrytis cinérea* en *Arabidopsis thaliana*” *Biocontrol*, n° 53 (2008), (Estados Unidos) pp. 667-683

LI et al. “Solubilización de fosfato y micronutrientes por *Trichoderma harzianum* y su relación con la promoción de crecimiento de la planta de tomate” *Plos one* [en línea], 2015, (China) 10(6), pp. 1-16 [Consulta: 13 septiembre 2015]. DOI: 10.1371/journal.pone.013008. Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0130081>

LUCERO CANO Nelson David. *Determinación del efecto del elicitor ácido acetilsalicílico sobre el control de mancha chocolate (Botrytis fabae L.), en el cultivo de haba (Vicia faba L.)* (Tesis) Universidad Politécnica Estatal de Carchi, Facultad de Industrias Agropecuarias y Ciencias Ambientales, Escuela de Desarrollo Integral Agropecuario. Tulcán, Ecuador. 2014. pp. 36-46

LUNA-FONTALVO et al. “Microbiota aislada del pepino de Mar (*Isostichopus badionotus*) nativo de la Bahía de Taganga Caribe Colombiano” *Intropica* [en línea] 2014, (Colombia) 9(1), pp. 75-83. [Consulta: 2015-09-14]. ISSN 2389-7864 Disponible en: <http://revistas.unimagdalena.edu.co/index.php/intropica/article/view/1441>

MICHEL-ACEVES et al. “Producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en diferentes sustratos orgánicos” *Revista Chapingo, Serie Horticultura*, vol.14, n° 2, (2008), (México) pp. 186-190

MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERÍA, ACUACULTURA Y PESCA, (MAGAP). III. Censo Nacional Agropecuario, *Producción de Leguminosas*. Ecuador. 2010

MOORE, Elizabeth-Landecker. *Los fundamentos de los Hongos*. Cuarta edición. New Jersey, Estados Unidos: Prentice Hall, 1996 pp. 95-103

ORTEGA GARCIA, Carlos Gabriel. *Proyecto de factibilidad para la producción y exportación de haba seca al mercado estadounidense 2006 – 2015*. (Tesis) Universidad Tecnológica Equinoccial, Facultad de Ciencias Económicas y Negocios, Escuela de Comercio Exterior, Integración y Aduanas. Quito, Ecuador, 2006. pp. 14-23

PINEDA et al. “Crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en residuos agroindustriales no suplementados” *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería de la Universidad del Zulia*, vol. 38, n°1 (2015), (Venezuela) pp. 41-49

RACHMAWATY, Madihah “Efecto del pretratamiento físico sobre residuos de camarón para la Producción quitinasa por *Trichoderma virens* en Fermentación en estado sólido” *Jurnal Teknologi*, Vol. 69, n°5 (2014), (Malasia) pp. 91–94.

RAKHOLIYA, K.B. “La eficacia de los fungicidas contra *Trichoderma harzianum* y *Sclerotium rolfsii*”. *Revista de Protección Fitosanitaria*, vol. 3, n°2 (2010), (India) pp. 406-407.

SAMUELS et al. “Especies agregadas, *Trichoderma koningii*” *Estudios de micología*, n° 56 (2006a), (Estados Unidos) pp. 67-133

SANTOS et al. “Efecto de la formulación sobre la vida útil de bioplaguicidas a base de dos aislamientos colombianos de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y *Trichoderma asperellum* Th034” *Revista Iberoamericana de Micología*, vol. 29, n°3, (2012), (Colombia) pp. 152-154

SARMENTO, Rachel Thaise. *Impacto del procesamiento sobre la pared celular y las propiedades hipoglucémicas y tecnofuncionales de leguminosas* (Tesis) (Doctoral) Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Química Agrícola. Madrid, España. 2012. pp.40-54

SEGARRA, G. et al. “MYB72, un nodo de convergencia sistémica inducida de resistencia provocada por un hongo y bacteria benéficos” *Biología vegetal*, n° 11 (2009), (España) pp. 90-96

TIJERINO AYALA Anamariela *Aislamiento, caracterización y análisis funcional del gen *Tbtri5* de *Trichoderma brevicompactum**. (Tesis) (Doctoral) Universidad de Salamanca, Departamento de Microbiología y Genética. Salamanca, España. 2010. pp. 19-55

VERMA, et al. “Hongos antagónicos, *Trichoderma spp* control biológico de *Panoplia*” *Biochemical Engineering Journal* [en línea], 2007, (Canadá) 37(1), pp. 1-20 [Consulta: 2015-09-13].ISSN 1369-703X Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X07001994>

VILLEGAS, M. “*Trichoderma pers.* características generales y su potencial biológico en la agricultura sostenible” [en línea] Colombia: ORIUS BIOTECNOLOGÍA, 2012 [Consulta: 2015-09-14]. Disponible en: <http://www.oriusbiotecnologia.com/trichoderma-pers-caracteristicas-generales-y-su-potencial-biologico-en-la-agricultura-sostenible>

VINALE et al. “Interacciones de *Trichoderma* planta- patógeno en los agro ecosistemas del suelo” *Biología y Bioquímica del Suelo*, nº 40 (2008) (Estados Unidos) pp. 1-10

WELTERS Dale, NEWTON Adrian & LYON Gary. Resistencia inducida en la protección de cultivos [en línea] Oxford, Reino Unido. Blackwell Publishing, 2007. [Consulta: 2015-09-14]. Disponible en: <http://base.dnsgb.com.ua/files/book/Agriculture/Pesticides/Induced-Resistance-for-Plant-Defence.pdf>

WOO et al. “*Trichoderma* metabolitos secundarios activos en las plantas y los hongos patógenos” *Revista de micología libre* [en línea], 2014, (Italia) 8(1), pp. 127-139. [Consulta: 2015-09-13]. ISSN 1874-4370. Disponible en: <http://benthamopen.com/contents/pdf/TOMYCJ/TOMYCJ-8-127.pdf>

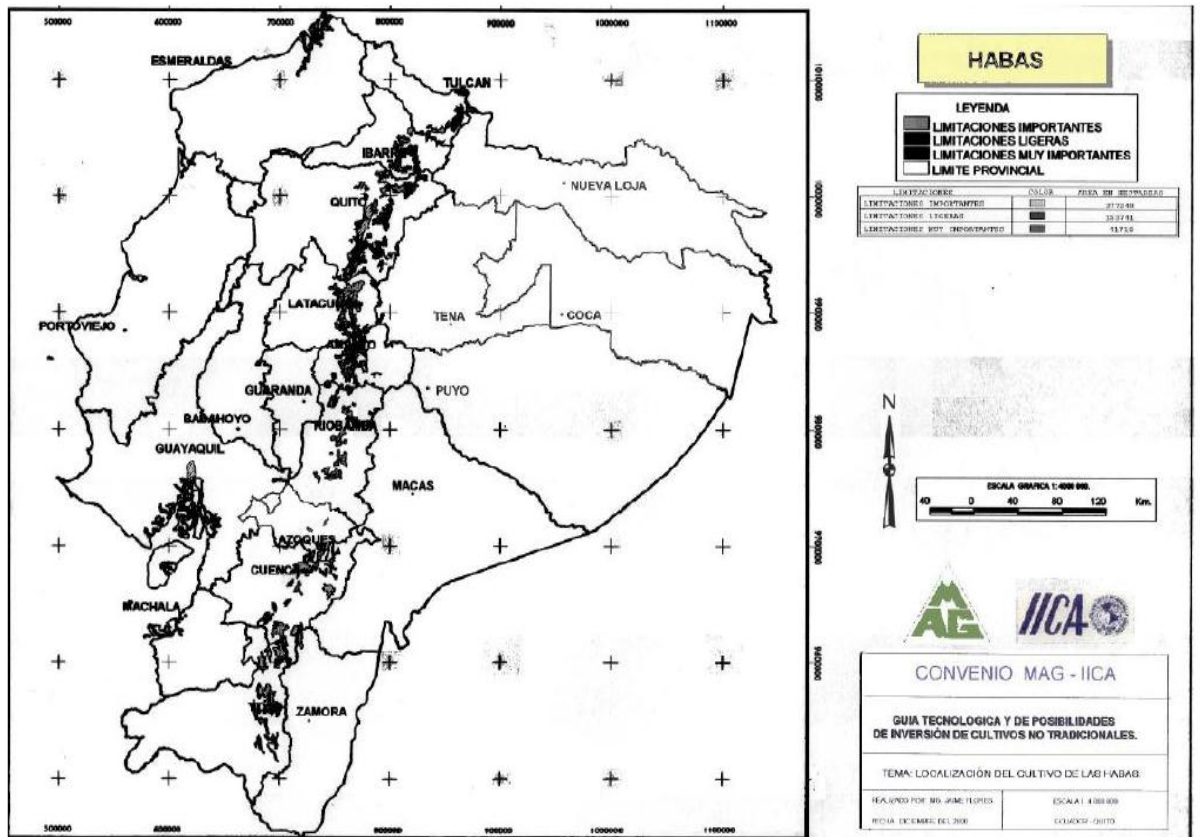
YÁNEZ Gabriel. *Evaluación del deshije y distancias de siembra en el cultivo de haba (Vicia faba)* (Tesis) (Maestría) Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ingeniería Agronómica, Centro de Estudios Posgrado. Ambato, Ecuador. 2013. pp.16-24

ZEREGA et al. “Sistemática y especies límites de árbol del pan (*Artocarpus, Moraceae*)” *Botánica sistemática*, nº 30 (2005), (Estados Unidos) pp. 603- 615.

ANEXOS

Anexo A. Zonas productoras de cultivo de haba (*Vicia faba* L.) en el Ecuador

ZONAS PRODUCTORAS DE HABAS EN EL ECUADOR



Anexo B. Testa o cáscara de haba (*Vicia faba* L.) seca

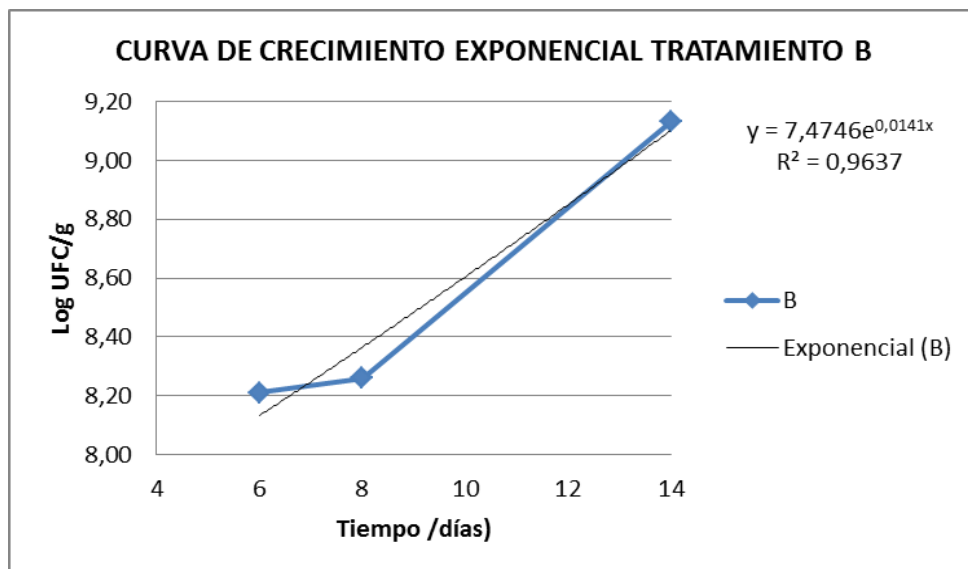
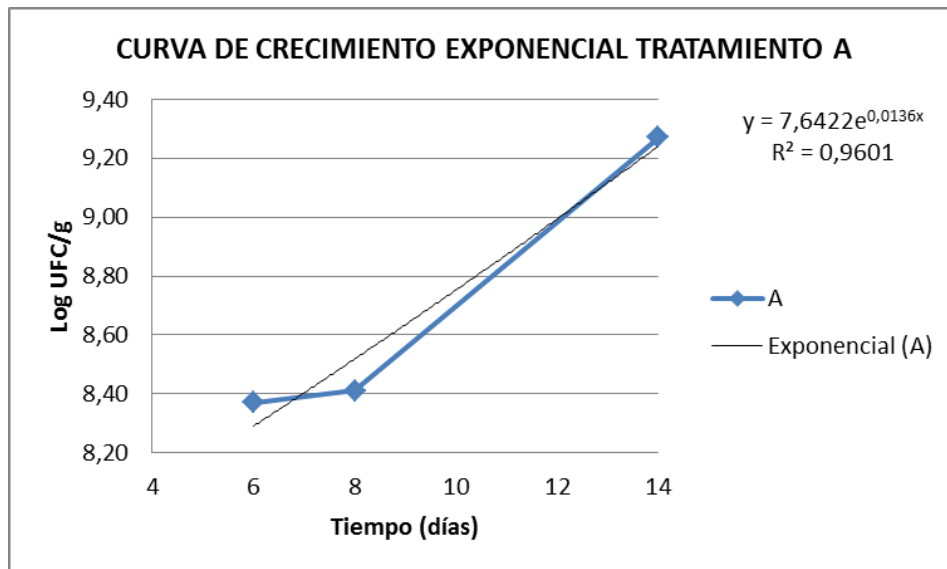


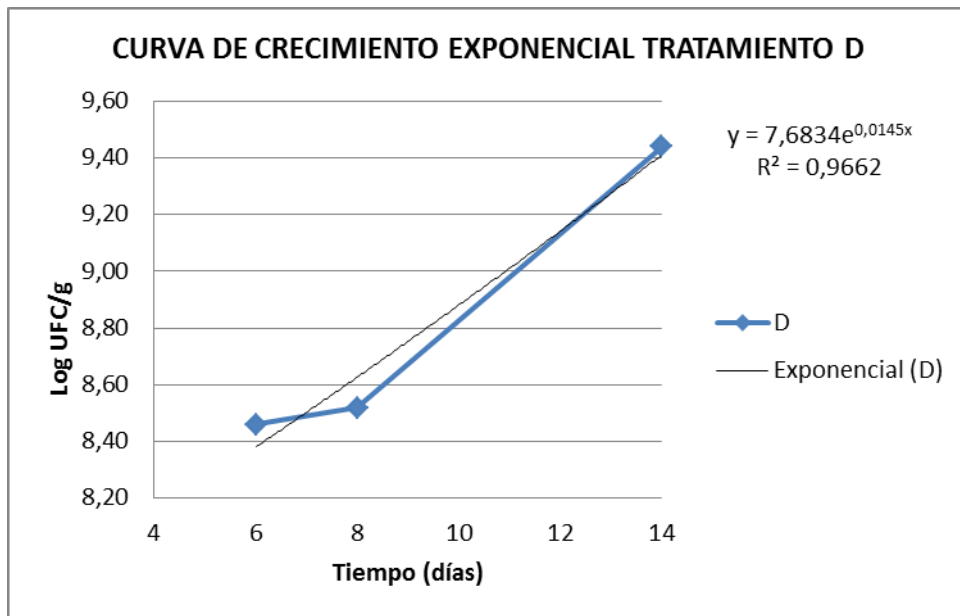
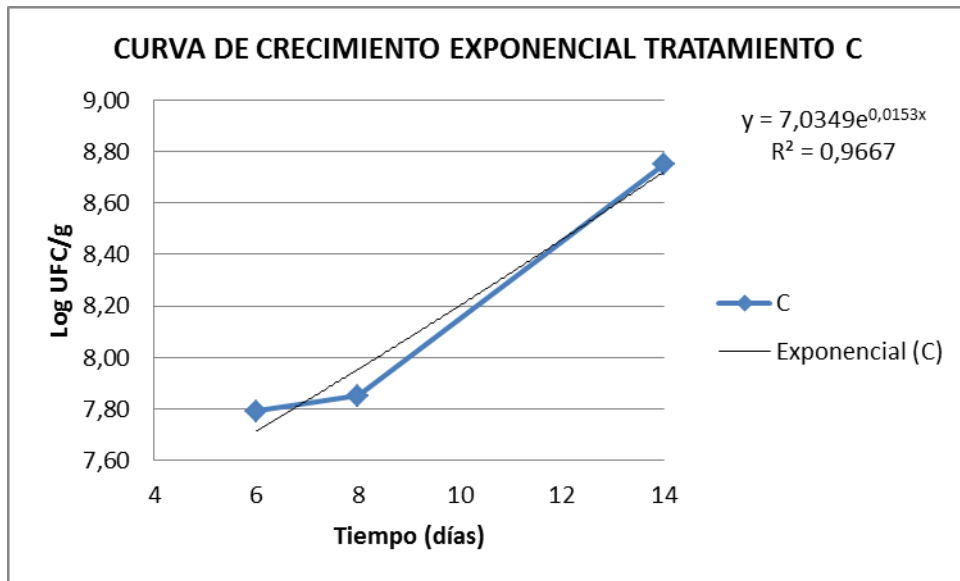
Anexo C. Modelo cinético de fermentación sólida

Modelo exponencial: $Y = \exp(a + b \cdot X)$

Y: Log concentración de conidios (UFC/g)

X: Tiempo de fermentación (días)





Tratamiento A: Cáscara de haba (*Vicia faba* L.) con 24 horas de hidratación
 Tratamiento B: Cáscara de haba (*Vicia faba* L.) con 48 horas de hidratación
 Tratamiento C: Cáscara de haba (*Vicia faba* L.) con 72 horas de hidratación
 Tratamiento D: Cascarilla de arroz (*Oriza sativa* L.) con 24 horas de hidratación

Anexo D. Coeficiente de correlación de los Tratamientos al finalizar la fermentación

FERMENTACIÓN		
Fermentación	Código de réplica	R²
TRATAMIENTO A	24AR ₁	0,9601 **
	24AR ₂	0,9645 **
	24AR ₃	0,9697 **
	24AR ₄	0,9644 **
	24AR ₅	0,9642 **
TRATAMIENTO B	48BR ₁	0,9637 **
	48BR ₂	0,9634 **
	48BR ₃	0,9632 **
	48BR ₄	0,9641 **
	48BR ₅	0,9629 **
TRATAMIENTO C	72CR ₁	0,9667 **
	72CR ₂	0,9632 **
	72CR ₃	0,9660 **
	72CR ₄	0,9662 **
	72CR ₅	0,9659 **
TRATAMIENTO D	24DR ₁	0,9662 **
	24DR ₂	0,9664 **
	24DR ₃	0,9708 **
	24DR ₄	0,9744 **
	24DR ₅	0,9661 **

* Coeficiente de correlación significativo

** Coeficiente de correlación altamente significativo

Tratamiento A: Cáscara de haba (*Vicia faba* L.) con 24 horas de hidratación

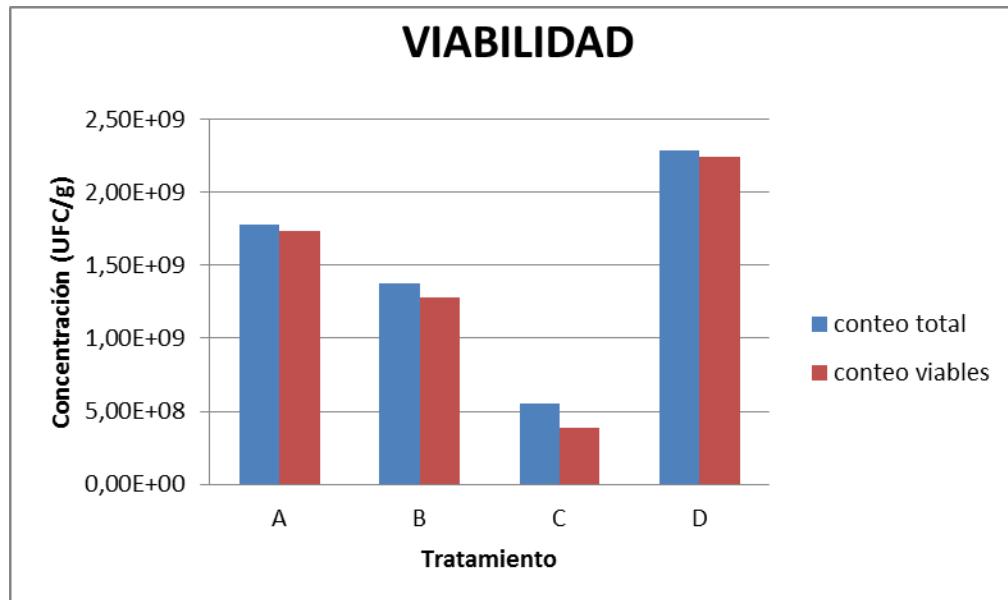
Tratamiento B: Cáscara de haba (*Vicia faba* L.) con 48 horas de hidratación

Tratamiento C: Cáscara de haba (*Vicia faba* L.) con 72 horas de hidratación

Tratamiento D: Cascarilla de arroz (*Oriza sativa* L.) con 24 horas de hidratación

Anexo E. Vialidad en el tiempo

TRATAMIENTO	Concentración (UFC/g)	
	conteo total	conteo viables
A	1,78E+09	1,73E+09
B	1,38E+09	1,28E+09
C	5,50E+08	3,90E+08
D	2,29E+09	2,25E+09



Tratamiento A: Cáscara de haba (*Vicia faba* L.) con 24 horas de hidratación

Tratamiento B: Cáscara de haba (*Vicia faba* L.) con 48 horas de hidratación

Tratamiento C: Cáscara de haba (*Vicia faba* L.) con 72 horas de hidratación

Tratamiento D: Cascarilla de arroz (*Oriza sativa* L.) con 24 horas de hidratación

Anexo F. Registro fotográfico





