

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGIA**



**PRODUCCIÓN DE UNA BIOFORMULACIÓN A BASE DE *Trichoderma sp.*  
CON EFECTO INHIBITORIO EN EL CRECIMIENTO DE *Fusarium sp.***

**TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE LICENCIADO  
(A) EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORES:**

Bach. Lara Peralta Lucero del Pilar

Bach. Rodríguez Vilela Roy Albert

**ASESOR:**

Dr. Castro Alvarado Ángel Pablo

**NUEVO CHIMBOTE- PERÚ**

**2022**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGIA**



**PRODUCCIÓN DE UNA BIOFORMULACIÓN A BASE DE *Trichoderma sp*  
CON EFECTO INHIBITORIO EN EL CRECIMIENTO DE *Fusarium sp.***

**TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE LICENCIADO  
(A) EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORES:** Bach. Lara Peralta Lucero del Pilar  
Bach. Rodríguez Vilela Roy Albert

REVISADO Y APROBADO POR EL ASESOR

.....

Dr. Ángel Pablo Castro Alvarado

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGIA**



**PRODUCCIÓN DE UNA BIOFORMULACIÓN A BASE DE *Trichoderma sp.*  
CON EFECTO INHIBITORIO EN EL CRECIMIENTO DE *Fusarium sp.***

**TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE LICENCIADO  
(A) EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORES:** Bach. Lara Peralta Lucero del Pilar  
Bach. Rodríguez Vilela Roy Albert

REVISADO Y APROBADO POR EL ASESOR

.....  
Dr. WILLIAN CAPA ROBLES  
Presidente

.....  
Dr. ÁNGEL CASTRO ALVARADO  
Integrante

.....  
Ms. Blgo. Mblgo. JOSÉ VILLANUEVA CARLOS  
Integrante

## ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN DE LA TESIS

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en la reunión en el Aula de la Escuela de Posgrado UINS, dando cumplimiento a la Resolución N° 228-2021-UINS/CFC, siendo las 12:00 horas del día 17 agosto del 2022

se reunió el Jurado Evaluador presidido por el Dr. Willian Capa Robles, teniendo como miembros a Ms Blgo Mblgo José Villanueva Carlos. (secretario) (a) y al Dr. Ángel Castro Alvarado. (integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA, realizado por él, (la), (los) tesista (as)

Roy Albert Rodríguez Vilela y Lucero del Pilar Lara Peralta, quien (es) sustentó (aron) la tesis intitulada:

"Producción de una Bioformulación a base de *Trichoderma sp.* Con efecto inhibitorio en el crecimiento de *Fusarium sp.*"

Terminada la sustentación, el (la), (los) tesista (as)s respondió (ieron) a las preguntas formuladas por los miembros del jurado.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como Sobresaliente asignándole un calificativo de Diecinueve puntos. Según artículo 111° del Reglamento General de Grados y Títulos vigente (Resolución N° 580-2022-CU-R-UNS)

Siendo las 13:00 horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad

Nombre: Dr. Willian Capa Robles  
Presidente

Nombre: Ms. José Villanueva Carlos  
Secretario

Nombre: Dr. Ángel Castro Alvarado  
Integrante

Distribución: Integrantes JE (02), teletipo ( ) y archivo FC (02).



### DECLARACION JURADA DE AUTORÍA

Yo, Lara Peralta Lucero del Pilar estudiante / docente de la

Facultad:	Ciencias	X	Educación		Ingeniería	
Escuela Profesional:	Biotecnología					
Departamento Académico:	Ciencias					
Escuela de Posgrado	Maestría			Doctorado		

Programa:

De la Universidad Nacional del Santa; Declaro que el trabajo de investigación intitulado:

**Producción de una bioformulación a base de *trichoderma sp.* Con efecto inhibitorio en crecimiento de *fusarium sp.***

presentado en ..... folios, para la obtención del Grado académico: ( )

Título profesional: ( X ) Investigación anual: ( )

- He citado todas las fuentes empleadas, no he utilizado otra fuente distinta a las declaradas en el presente trabajo.
- Este trabajo de investigación no ha sido presentado con anterioridad ni completa ni parcialmente para la obtención de grado académico o título profesional.
- Comprendo que el trabajo de investigación será público y por lo tanto sujeto a ser revisado electrónicamente para la detección de plagio por el VRIN.
- De encontrarse uso de material intelectual sin el reconocimiento de su fuente o autor, me someto a las sanciones que determinan el proceso disciplinario.

Nuevo Chimbote, 14 de Diciembre de 2022

Firma:

Nombres y Apellidos: Lara Peralta Lucero del Pilar

DNI: 73208728



### DECLARACION JURADA DE AUTORÍA

Yo, Rodriguez Vilela Roy Albert estudiante / docente de la

Facultad:	Ciencias	X	Educación		Ingeniería	
Escuela Profesional:	Biotecnología					
Departamento Académico:	Ciencias					
Escuela de Posgrado	Maestría			Doctorado		

Programa:

De la Universidad Nacional del Santa; Declaro que el trabajo de investigación intitulado:

**Producción de una bioformulación a base de *trichoderma sp.* Con efecto inhibitorio en crecimiento de *fusarium sp.***

presentado en ..... folios, para la obtención del Grado académico: ( )

Título profesional: ( X ) Investigación anual: ( )

- He citado todas las fuentes empleadas, no he utilizado otra fuente distinta a las declaradas en el presente trabajo.
- Este trabajo de investigación no ha sido presentado con anterioridad ni completa ni parcialmente para la obtención de grado académico o título profesional.
- Comprendo que el trabajo de investigación será público y por lo tanto sujeto a ser revisado electrónicamente para la detección de plagio por el VRIN.
- De encontrarse uso de material intelectual sin el reconocimiento de su fuente o autor, me someto a las sanciones que determinan el proceso disciplinario.

Nuevo Chimbote, 14 de Diciembre de 2022

Firma:

Nombres y Apellidos: Rodriguez Vilela Roy

DNI: 71386477

## **DEDICATORIA**

*A nuestros padres  
Por sus consejos, su apoyo  
incondicional y su paciencia,  
todo lo que somos hoy es gracias  
a ellos.*

*A todas las personas y profesores por el apoyo  
incondicional en nuestro desarrollo  
académico, profesional y  
humano*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios.

A nuestros Padres, por su apoyo incondicional y constante.

Queremos agradecer de manera especial y sincera a nuestro asesor, el Dr. Ángel Pablo Castro Alvarado y al Dr. Roberto Jhalver Vega Paulino por su amabilidad, su orientación y apoyo en esta etapa de nuestra formación académica y por su especial cuidado en la revisión del presente trabajo.

Al ingeniero Jorge Zavaleta Calua y a los ingenieros encargados de cada área por permitirnos realizar las pruebas de Aw y humedad en el laboratorio de análisis y composición de productos agroindustriales de la Escuela de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional del Santa.

Al técnico del laboratorio y a todos nuestros compañeros por su calidez y generosidad que han sido capaces de ganarse nuestra admiración.

A todos aquellos que en el proceso nos dijeron “No” y nos impulsaron a esforzarnos el doble.

# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>15</b>
1.1. Realidad problemática.....	15
1.2. Antecedentes.....	15
1.3. Formulación del problema.....	17
1.4. Importancia y justificación.....	18
1.5. Hipótesis.....	19
1.6. Objetivo.....	19
1.6.1. Objetivo general.....	19
1.6.2. Objetivos específicos.....	19
<b>II. MARCO TEORICO</b> .....	<b>20</b>
2.1. Material lignocelulósico.....	20
2.2. Melaza de caña de azúcar.....	20
2.3. <i>Trichoderma sp.</i> .....	21
2.4. <i>Fusarium sp.</i> .....	22
2.5. Fermentación en estado sólido (FES).....	22
2.6. Bioformulación.....	24
2.7. Actividad de agua (Aw).....	24
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
3.1. Material vegetal.....	25
3.2. Microorganismos.....	25
3.3. Diseño experimental.....	25
3.3.1. Producción de <i>Trichoderma sp.</i> por fermentación en estado sólido.....	25
3.3.2. Efecto de la bioformulación a base de <i>Trichoderma sp.</i> sobre el crecimiento de <i>Fusarium sp.</i> .....	26
3.4. Obtención del inóculo.....	27
3.4.1. Cuantificación del inóculo (expresada en conidios/mL).....	27
3.5. Cámara de fermentación.....	27
3.5.1. Dimensiones de la cámara fermentativa.....	27
3.6. Condiciones de fermentación.....	28
3.7. Evaluación de la fermentación en estado sólido en el tiempo.....	29
3.8. Determinación de azúcares reductores durante la fermentación.....	29
3.9. Actividad del agua:.....	30
3.10. Determinación de la humedad.....	30
3.11. Preparación de la fermentación en estado sólido.....	30
3.12. Inoculación en la fermentación en estado sólido.....	30

3.13.	<b>Evaluación del crecimiento</b> .....	31
3.14.	<b>Preparación de la bioformulación líquida</b> .....	31
3.15.	<b>Cuantificación de conidios en el bioformulado</b> .....	32
3.16.	<b>Evaluación de la viabilidad</b> .....	33
3.17.	<b>Efecto de la bioformulación sobre el crecimiento de <i>Fusarium sp.</i></b> .....	33
3.17.1.	Reactivación del monocultivo .....	33
3.17.2.	Preparación del medio de cultivo .....	33
3.17.3.	Efecto inhibitorio de la bioformulación frente a <i>Fusarium sp.</i> .....	33
3.18.	<b>Análisis estadístico</b> .....	34
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>35</b>
4.1.	<b>Caracterización de la cepa de <i>Trichoderma sp.</i> y <i>Fusarium sp.</i></b> .....	35
4.2.	<b>Evaluación de la fermentación en estado sólido.</b> .....	35
4.3.	<b>Proceso de fermentación en estado sólido.</b> .....	36
4.3.1.	Cuantificación del inóculo (expresada en conidios/mL) .....	36
4.3.2.	Crecimiento en la fermentación en estado sólido .....	37
4.3.3.	Efecto del tipo de sustrato .....	38
4.4.	<b>Condiciones de Aw y humedad en la fermentación en estado sólido</b> .....	39
4.5.	<b>Evaluación del crecimiento en medio sólido</b> .....	40
4.6.	<b>Determinación de azúcares reductores en la FES</b> .....	40
4.7.	<b>Preparación de la bioformulación</b> .....	41
4.8.	<b>Cuantificación y viabilidad de conidios en el bioformulado</b> .....	43
4.9.	<b>Efecto inhibitorio de la bioformulación sobre el crecimiento de <i>Fusarium sp.</i> a los 12 días de evaluación.</b> .....	45
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	<b>48</b>
<b>VI.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y VIRTUALES</b> .....	<b>49</b>
<b>VII.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>53</b>
	<b>Anexo 1:</b> Métodos experimentales .....	53
	<b>Anexo 2:</b> Procedimiento para la determinación de azúcares reductores en la fermentación. ....	54
	<b>Anexo 3:</b> Evaluación de la actividad de agua en cada sistema FES. ....	55
	<b>Anexo 4:</b> Para determinar la humedad en cada sistema de fermentación en estado sólido se procedió a realizar la siguiente tabla. ....	55
	<b>Anexo 5:</b> Evaluación de crecimiento: Para determinar los datos se siguió los parámetros y criterios de evaluación detallados en la tabla 6 donde se especifica: .....	57
	<b>Anexo 6:</b> Crecimiento de <i>Trichoderma sp.</i> en la fermentación en estado sólido. ....	58
	<b>Anexo 6:</b> Desarrollo de la bioformulación a partir de <i>Trichoderma sp.</i> .....	60
	<b>Anexo 7:</b> Análisis estadístico.....	62
	<b>Anexo 8:</b> Evidencias del trabajo realizado.....	65

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Composición nutricional del esparrago por cada 100 g de materia seca. ....	20
<b>Tabla 2:</b> Composición de melaza de caña de azúcar .....	21
<b>Tabla 3:</b> Diseño experimental de relación de crecimiento y desarrollo de <i>Trichoderma sp.</i> .....	26
<b>Tabla 4:</b> Diseño experimental para desarrollo del crecimiento micelial de <i>Fusarium sp.</i> y el % de inhibición por bioformulación de <i>Trichoderma sp.</i> a diferentes concentraciones .....	26
<b>Tabla 5:</b> Relación de Melaza: Peladilla expresada en v/p .....	28
<b>Tabla 6:</b> Parámetros y criterios de evaluación .....	31
<b>Tabla 7:</b> Concentración de los adyuvantes específicos para la bioformulación. ....	31
<b>Tabla 8:</b> Número de conidios inicial obtenido en cada replica. ....	36
<b>Tabla 9:</b> Crecimiento de <i>Trichoderma sp.</i> en la fermentación en estado sólido a los 14 días de incubación. ....	37
<b>Tabla 10:</b> Crecimiento de <i>Trichoderma sp.</i> en la fermentación en estado sólido en proceso de formación de conidios. ....	40
<b>Tabla 11:</b> Promedio de Concentración de conidios en las 3 réplicas a los 14 días de incubación en la fermentación en estado sólido (FES).....	41
<b>Tabla 12:</b> Porcentaje del crecimiento micelial de <i>Fusarium sp.</i> a los 12 días de evaluación. ....	45
<b>Tabla 13:</b> Porcentaje de inhibición de la bioformulación sobre el crecimiento de <i>Fusarium sp.</i> .....	47
<b>Tabla 14:</b> Esquema de Tabla de datos de Aw. ....	55
<b>Tabla 15:</b> Tabla de datos para la construcción de la humedad .....	55
<b>Tabla 16:</b> Evaluación inicial de la humedad en el tiempo de fermentación de estado sólido. ....	56
<b>Tabla 17:</b> Evaluación final de la humedad en el tiempo de fermentación de estado sólido del día 14.....	56
<b>Tabla 18:</b> Evaluación de parámetros y criterios de crecimiento de <i>Trichoderma sp.</i> en la fermentación de estado sólido del día 14. ....	57
<b>Tabla 19:</b> Evaluación de la fermentación en estado sólido de <i>Trichoderma sp.</i> en el tiempo.....	58
<b>Tabla 20:</b> Crecimiento de <i>Trichoderma sp.</i> en la fermentación en estado sólido .....	59
<b>Tabla 21:</b> Cuantificación y viabilidad de conidios en la bioformulación a partir de la FES de <i>Trichoderma sp.</i> .....	60
<b>Tabla 22:</b> Crecimiento de micelio de <i>Fusarium sp.</i> durante 12 días de evaluación a diferentes concentraciones de la bioformulación .....	61
<b>Tabla 23:</b> Porcentaje del crecimiento micelial de <i>Fusarium sp.</i> durante 12 días de evaluación a diferentes concentraciones de la bioformulación en porcentaje.....	61
<b>Tabla 24:</b> Porcentaje de inhibición de la bioformulación frente al crecimiento micelial de <i>Fusarium sp.</i> durante 12 días de evaluación.....	61
<b>Tabla 25:</b> Diseño Experimental AxB; el Factor A y B con 3 niveles cada uno .....	62
<b>Tabla 26:</b> Prueba de Tukey .....	63
<b>Tabla 27:</b> Diseño completamente al azar (DCA) de un solo factor.....	63
<b>Tabla 28:</b> Test de homogeneidad de las varianzas .....	64
<b>Tabla 29:</b> Prueba de Tukey .....	64

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Modelo de la cámara fermentativa. ....	28
<b>Figura 2:</b> Gráfica de crecimiento de <i>Trichoderma sp.</i> en la fermentación en estado sólido por 28 días. ....	36
<b>Figura 3:</b> Crecimiento de <i>Trichoderma sp.</i> en la fermentación en estado sólido con el material lignocelulósico de espárrago más 5% de melaza de caña a los 14 días de incubación. ....	38
<b>Figura 4:</b> Representación gráfica de la Aw en los diferentes tiempos de fermentación en estado sólido. ....	39
<b>Figura 5:</b> Resultados de la absorbancia vs concentración de azúcares reductores. ....	41
<b>Figura 7:</b> Obtención de la bioformulación a diferente tiempo de fermentación en estado sólido: A) suspensión de elementos nutritivos a base de melaza de caña, y ayudantes; B) Bioformulación líquida de <i>Trichoderma sp.</i> a base de la fermentación en estado sólido. ....	42
<b>Figura 8:</b> Representación gráfica de la viabilidad del bioformulado de <i>Trichoderma sp.</i> cultivado sobre la Fermentación en estado sólido a los 30 días de conservación a 4°C. ....	43
<b>Figura 9:</b> Proceso de verificación del número de conidios mediante la técnica del micro cultivo; A) Inoculación de la bioformulación en agar agua; B) Evaluación a 24h; C) Germinación de conidios a las 24h 100x. ....	44
<b>Figura 10:</b> Porcentaje del crecimiento micelial de <i>Fusarium sp.</i> a los 12 días de evaluación. ....	45
<b>Figura 11:</b> Medición del crecimiento micelial de <i>Fusarium sp.</i> para determinar el efecto inhibitorio de la bioformulación a los 12 días de evaluación. <b>A:</b> Tratamiento de la Bioformulación al 1%, <b>B:</b> Tratamiento de la Bioformulación al 5%. ....	46
<b>Figura 12:</b> Porcentaje de inhibición de la bioformulación a base de <i>Trichoderma sp.</i> frente al crecimiento de <i>Fusarium sp.</i> ....	47
<b>Figura 13:</b> Esquema de grafica de Aw. ....	55
<b>Figura 14:</b> Preparación de la bioformulación líquido; a) Extracto de maíz + 5% de melaza. b y c) Concentración de adyuvantes + 250 mL de Tween 80 al 0.1% d) Crecimiento de <i>Trichoderma sp.</i> cultivado en FES. E y f) Lavado con Tween 80 al 0.1% a los frascos. ....	60
<b>Figura 15:</b> Grafica de la variable dependiente (conidios/g) vs la variable independiente (tiempo). ....	62
<b>Figura 16:</b> Grafica de la variable dependiente (conidios/g) vs la variable independiente (razón).. ....	63
<b>Figura 17:</b> Gráfica de la variable dependiente (centímetro micelial) vs la variable independiente (porcentaje de la bioformulación). ....	64
<b>Figura 18:</b> Cepas de <i>Trichoderma sp.</i> (izquierda) y <i>Fusarium sp.</i> (derecha). ....	65
<b>Figura 19:</b> A) Proceso de triturado en el mortero el material lignocelulósico la peladilla de espárrago. B-C) Distribución y autoclavado del material lignocelulósico (peladilla de espárrago) según el peso correspondiente en la fermentación en estado sólido. ....	65
<b>Figura 20:</b> Crecimiento de <i>Trichoderma sp.</i> en la fermentación en estado sólido después de 14 días a incubación de 30°C. ....	66
<b>Figura 21:</b> Análisis de Aw al primer y último día. ....	66
<b>Figura 22:</b> Discos de <i>Fusarium sp.</i> en placas con medio PDA con 1 mL de la bioformulación al 1 y 5 %. ....	66
<b>Figura 23:</b> Efecto de la bioformulación a base de <i>Trichoderma sp.</i> a concentración de 1 y 5 % sobre el crecimiento micelial de <i>Fusarium sp.</i> a los 12 días de evaluación. A: Bioformulación al 1%, B: Bioformulación al 5%, C: Placas Control. ....	67

## RESUMEN

Este estudio se realizó en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional del Santa donde se evaluó el crecimiento de *Trichoderma sp.* por fermentación en estado sólido (FES) utilizando el desecho lignocelulósico de espárrago y melaza de *Saccharum officinarum* como sustrato bajo diferentes condiciones de tiempo de remojo y melaza/cáscara de espárrago, para desarrollar una bioformulación líquida con efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Fusarium sp.*

Se inició el estudio determinando el tiempo para culminar la evaluación del crecimiento de *Trichoderma sp.*, tomando como referencia 28 días. Se evaluó diferentes condiciones de fermentación (24 h, 48 h y 72 h y 30 g, 40 g y 50 g de sustrato). En la cual, produjo una mayor concentración de conidios/ g de sustrato ( $9.05E+10$ ) en las condiciones de 72 h de fermentación y 50 g. A continuación, se evaluaron las condiciones de Aw y humedad. La humedad inicial fue 83.87% y al finalizar la fermentación se obtuvo un promedio de 84.96% mientras que en la evaluación de la actividad de agua (Aw) se obtuvo un promedio de 0.75. Se efectuó la obtención de la bioformulación líquida preparando una suspensión de elementos nutritivos a base de melaza de caña y levadura de cerveza para mejorar la viabilidad del producto, la bioformulación con mayor conservación y formación de esporas se obtuvo a 72 h. Para evaluar el efecto de la bioformulación frente a *Fusarium sp.* se trabajó en placas con medio PDA., donde se agregó a cada placa 1 mL de la bioformulación a las concentraciones de 1% y 5% (v/v) y se sembró 1 cm<sup>2</sup> de *Fusarium sp.* A los 6 días la bioformulación del 5% inhibió el crecimiento de *Fusarium sp.* en su totalidad.

Las bioformulaciones a base de microorganismos son la mejor alternativa para el control de enfermedades producidas por hongos fitopatógenos y a diferencia de los plaguicidas químicos, no produce contaminación ambiental ni problemas de crecimiento a las plantas tratadas.

**Palabras clave:** *Trichoderma sp.*, Fermentación en estado sólido (FES), Desecho lignocelulósico de espárrago, melaza de *Saccharum officinarum*, Bioformulación líquida, *Fusarium sp.*, actividad de agua (Aw).

## ABSTRACT

This study was carried out in the Biotechnology laboratory of the National University of Santa where the growth of *Trichoderma sp.* by solid state fermentation (FES) using the lignocellulosic waste of asparagus and molasses from *Saccharum officinarum* as substrate under different conditions of soaking time and molasses / pellet, to develop a liquid bioformulation with an inhibitory effect on the growth of *Fusarium sp.*

The study was started by determining the time to complete the *Trichoderma sp.* growth evaluation, taking 28 days as a reference. Different fermentation conditions were evaluated (24 h, 48 h and 72 h and 30 g, 40 g and 50 g of substrate). In which, it gave a higher concentration of conidia / g of substrate ( $9.05E + 10$ ) under the conditions of 72 h of fermentation and 50 g. Next, the Aw and humidity conditions were evaluated. The initial humidity was 83.87% and at the end of the fermentation an average of 84.96% was obtained while in the evaluation of the water activity (Aw) an average of 0.75 was obtained. The liquid bioformulate was obtained by preparing a suspension of nutritional elements based on cane molasses and brewer's yeast to improve the viability of the product, the bioformulate with greater conservation and spore formation was obtained at 72 h. To evaluate the effect of the bioformulate against *Fusarium sp.* Plates were worked with PDA medium, where 1 ml of the bioformulate was added to each plate at concentrations of 1% and 5% (v / v) and 1 cm<sup>2</sup> of *Fusarium sp.* At 6 days the bioformulation of 5% inhibited the growth of *Fusarium sp.* in its entirety.

The most important thing is that, unlike chemical pesticides, it does not produce environmental pollution or growth problems for the treated plants.

**Key words:** *Trichoderma sp.*, Solid state fermentation (SSF), Asparagus lignocellulosic waste, *Saccharum officinarum* molasses, Liquid bioformulation, *Fusarium sp.*, Water activity (Aw).

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Realidad problemática

En estos últimos años el crecimiento poblacional y la demanda de alimentos a incrementado la degradación del suelo, debido a las prácticas agrícolas inadecuadas, existe evidencia que demuestran impactos negativos de la fertilización sintética y del uso de agroquímicos que afectan a la población de microorganismos edáficos que cumplen roles en el ciclado de nutrientes y en la salud del suelo (Singh, 2018). Además, en general, algunos fertilizantes se aplican en exceso y/o tienen una baja eficiencia, detectándose pérdidas por volatilización y/o escurrimiento que también presentan impactos negativos sobre el medioambiente y la salud humana (FAO, 2019).

Por esta razón, frente al creciente daño ambiental generado por el uso de sustancias químicas para el control de enfermedades en las plantas se propone nuevas alternativas biológicas, como es el caso de bioformulaciones a base de *Trichoderma*, el cual es un género fúngico de la rizosfera considerado simbiote oportunista de plantas, que es capaz de producir elicitores que inducen la defensa vegetal contra patógenos e insectos, ayuda a la solubilización de fósforo, y propician la síntesis de sustancias promotoras del crecimiento vegetal.

### 1.2. Antecedentes

Se conoce que el género *Fusarium sp.* se ha convertido en un problema serio ya que producen metabolitos tóxicos que ponen en peligro la salud de los seres humanos y de los animales. Además, incluye muchos patógenos de plantas de importancia agrícola que en conjunto ocasionan enfermedades caracterizadas por marchitez, tizones, pudriciones en cultivos ornamentales y forestales de ecosistemas agrícolas y naturales (Villa A, et al., 2014).

*Fusarium* es el principal patógeno que afecta al espárrago no solo en el Perú, sino a nivel mundial. Este hongo al infectar la corona, el órgano más importante del espárrago puede llegar a matar a la planta. La corona contiene las raíces reservantes y las yemas, las cuales generan la parte foliar. Si estos órganos son dañados se tendrá una reducción en el rendimiento y reducirá la vida útil del sembrío de espárrago. En el Perú se han

identificado dos especies de *Fusarium* afectando al espárrago. Estas dos especies son: *Fusarium oxysporum f. sp. asparagi* y *Fusarium moniliforme*. Por lo general, *Fusarium oxysporum f. sp. asparagi* afecta a coronas de sembríos de esparrago jóvenes, mientras que *Fusarium moniliforme* es común en esparragueras adultas (Bio Baro, 2016)

Frente a este problema, el sector productivo considera que la agricultura orgánica es una alternativa sostenible de menor impacto en el ambiente. Una de las aplicaciones agroindustriales que ha despertado interés en la comunidad agrícola es la utilización de controladores biológicos. La necesidad es desarrollar una bioformulación a base de hongos y bacterias asequibles en el mercado local a bajo costo, con el fin de ofertar al agricultor productos estables y eficaces que preserven los suelos agrícolas y el medio ambiente. Las bioformulaciones tienen como base activa un microorganismo benéfico que ayuda al desarrollo fitohormonal y atenúa las enfermedades, permitiendo que el crecimiento de las raíces sea más fuerte y, por lo tanto, incrementa los sistemas radiculares haciéndolos más sanos. (Geoconda V. 2015).

Existe una amplia gama de microorganismos que se usan en la producción de bioformulaciones. Un ejemplo es la utilización de la bacteria *Rhizobium* (o *Rizobios*) en cultivos de leguminosas, una técnica que en países de Latinoamérica tiene ya un peso importante, según los expertos (Papavizas y Lewis, et al. 1984). Los *Rizobios* están en los suelos y se encargan de "fijar el nitrógeno atmosférico del aire para que esté disponible para las plantas, ya que se trata de uno de sus principales nutrientes. El hongo *Trichoderma sp.* es un eficiente controlador biológico que está siendo ampliamente usado en agricultura como agente de biocontrol evitando la contaminación de las cosechas, plantas, animales y humanos (Tovar, J. 2008).

Falconí (2011), 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. Entre las ventajas de este hongo están 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. Preserva los recursos naturales al disminuir el uso de fungicidas tóxicos. No presenta efectos nocivos para el hombre, ni para insectos benéficos (Serpa, M.2015).

Para la propagación y desarrollo de *Trichoderma* se han utilizado diferentes sustratos (Falconí, 2011), siendo el grano de arroz (*Oriza sativa L.*), el más eficiente, pero se limita su uso debido al elevado costo de producción que genera (Zerega *et al.*, 2005). Los residuos agroindustriales es una buena alternativa de uso. Como parte del proceso de pelado de espárrago en las plantas conserveras, se obtiene la peladilla o turión lo que constituye aproximadamente el 25% en peso del espárrago adquirido.

Una planta conservera de mediana infraestructura procesa al día 60 TM de espárrago y desecha 15 TM de desecho lignocelulósico de espárrago (*Asparagus officinalis*) este subproducto crudo es usado como alimento para el ganado, sin embargo, es necesario antes enriquecer el pienso incorporándole proteínas. Una nueva alternativa de uso del desecho lignocelulósico de espárrago (*Asparagus officinalis*) es como medio de cultivo para la producción del hongo *Trichoderma sp.* de tal manera contribuir al control biológico de plagas en los cultivos (Bardales C. *et al.*,2011).

### **1.3. Formulación del problema**

Por lo expuesto anteriormente la principal problemática de esta investigación se refleja en la siguiente pregunta:

¿A través de la producción de una bioformulación a base del *Trichoderma sp.* utilizando concentraciones al 1% y 5% inhibirá el crecimiento de *Fusarium sp.*?

#### 1.4. Importancia y justificación

Este estudio contribuirá a los beneficios para los sectores de la agroindustria y medio ambiente. En el ámbito agroindustrial, este estudio será un aporte para la reutilización de los residuos del esparrago. Asimismo, la bioformulación inhibirá el crecimiento del hongo *Fusarium sp.* como también las plagas más comunes que afectan a los cultivos.

La bioformulación es una alternativa para inhibir el crecimiento del hongo patógeno *Fusarium sp.*, así como, las plagas más comunes que afecten a los cultivos. Así, la 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 suelo, se debe al uso indiscriminado de plaguicidas y productos químicos que provocan la baja productividad agrícola y desertización.

Con esta investigación se busca reemplazar los plaguicidas químicos por una bioformulación a base de *Trichoderma sp.* el cual beneficiará al medio ambiente debido que es un producto natural y no tienen ningún efecto secundario para los suelos ni para los cultivos (Cavero, 2014).

Las bioformulaciones son eficaces en el control de plagas agrícolas, sin causar daños graves al ambiente o empeorar la contaminación del medio ambiente. La investigación y el desarrollo de su aplicación práctica en el campo se enfocan a mitigar la contaminación ambiental causada por residuos de plaguicidas químicos, aunque por su naturaleza biológica también promueven el desarrollo sustentable de la agricultura.

El desarrollo de nuevas bioformulaciones estimula la modernización de la agricultura y sin duda, va a reemplazar gradualmente a una cantidad de los plaguicidas químicos. En la producción agrícola, en ambientes libres de contaminación, las bioformulaciones son sustitutos ideales para sus homólogos químicos tradicionales (Leng et al., 2011).

La presente investigación propone una alternativa al uso indiscriminado de agroquímicos, fungicidas químicos, pesticidas entre otros y dar realce a medidas más amigables con el ambiente como es el uso de controladores biológicos conocidos como bioformulaciones (Tovar, J. 2008).

En la búsqueda de subproductos agrícolas de bajo costo que permitan el desarrollo conidial de *Trichoderma sp.* se propone la producción de una bioformulación usando como medio de cultivo el desecho lignocelulósico de espárrago (*Asparagus officinalis*) y melaza de caña de *Saccharum officinarum* con la finalidad de ejercer un efecto inhibitorio de *Fusarium sp.*

## **1.5. Hipótesis**

La siguiente hipótesis responde a nuestro problema:

La concentración del 5% de la bioformulación a base del hongo *Trichoderma sp.* inhibirá el 90% crecimiento de *Fusarium sp.*

## **1.6. Objetivo**

### **1.6.1. Objetivo general**

Producir una bioformulación a base de *Trichoderma sp.* cultivado sobre el desecho lignocelulósico *Asparagus officinalis* con melaza de *Saccharumofficinarum* para evaluar el efecto inhibitorio que tiene frente al crecimentode *Fusarium sp.*

### **1.6.2. Objetivos específicos**

- Establecer la razón optima de melaza y desecho lignocelulósico de espárrago para el uso como sustrato en el proceso fermentativo de *Trichoderma sp.*
- Determinar las condiciones optima de humedad y actividad de agua que favorezcan el crecimiento de *Trichoderma sp* en el proceso de fermentación en estado sólido.
- Determinar la concentración optima de la bioformulación líquida a base de *Trichoderma sp.* con efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Fusarium sp.* y con estabilidad en el tiempo.

## II. MARCO TEORICO

### 2.1. Material lignocelulósico

Como parte del proceso de pelado de espárrago en las plantas conserveras, se obtiene la peladilla lo que constituye aproximadamente el 25% en peso del espárrago adquirido. Una planta conservera de mediana infraestructura procesa al día 60 TM de espárrago y desecha 15 TM de "peladilla"; este subproducto crudo es usado como alimento al ganado, sin embargo, es necesario antes enriquecer el producto adicionándole proteínas (Bardales, 2013).

*Tabla 1: Composición nutricional del espárrago por cada 100 g de materia seca.*

<i>Valor nutricional por 100 g de materia seca</i>	
– Agua (%)	93.75 - 94.5
– Albumina (%)	1.62 - 1.79
– Grasas (%)	0.11 - 0.25
– Azúcares (%)	0.37
– Extractos De Nitrogenados (%)	2.26 - 2.33
– Fibra (%)	0.81 - 1.04
– Cenizas (%)	0.54 - 0.70
– Calcio (Mg)	20
– Fósforo (Mg)	60
– Hierro (Mg)	1
– Vitamina B1 (Mg)	25
– Vitamina B2 (Mg)	170
– Vitamina C (Mg)	30
– Vitamina A (U.I.)	900
– Valor Energético (Cal)	26

### 2.2. Melaza de caña de azúcar

La melaza es una mezcla compleja que contiene sacarosa, azúcar invertido, sales y otros compuestos solubles en álcali que normalmente están presentes en el jugo de caña localizado, así como los formados durante el proceso de manufactura del azúcar. Además de la sacarosa, glucosa, fructosa y refinados los cuales son fermentables, las melazas también contienen sustancias reductoras no fermentables (Tabla 2). Estos

compuestos no fermentables reductores del cobre, son principalmente caramelos libres de nitrógeno producidos por el calentamiento requerido por el proceso y las melanoidinas que si contienen nitrógeno derivadas a partir de productos de condensación de azúcar y aminocompuestos (Fajardo, 2017).

**Tabla 2:** Composición de melaza de caña de azúcar

<b>Componentes</b>	<b>Constituyentes</b>	<b>Contenido (P/P)</b>
<b>Componentes Mayores</b>	Materia Seca	78%
	Proteínas	3%
	Sacarosa	60 - 63 % P/P
	Azúcares Reductores	3 - 5 % P/P
	Sustancias Disueltas (Difer. Azúcares)	4 - 8 % P/P
	Agua	16%
	Grasas	0.40%
	Cenizas	9%
<b>Contenido De Minerales</b>	Calcio	0.74%
	Magnesio	0.35%
	Fósforo	0.08%
	Potasio	3.67%
<b>Contenido De Aminoácidos</b>	Glicina	0.10%
	Leucina	0.02%
	Lisina	0.01%
	Treonina	0.06%
	Valina	0.02%
	Colina	600 Ppm
<b>Contenido De Vitaminas</b>	Niacina	48.86 Ppm
	Acido Pantoténico	42.90 Ppm
	Piridoxina	44 Ppm
	Riboflavina	4.40 Ppm
	Tiamina	0.88 Ppm

Fuente: Tellez, 2004.

### 2.3. *Trichoderma* sp.

El género *Trichoderma* constituye un número de especies de hongos saprofitos filamentosos, con capacidad para reducir daños en enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, debido, a su fuerte capacidad competitiva (Ahmad y Baker, 1987), al fenómeno de antibiosis (Nelson *et al.*, 1997), por la producción de enzimas líticas, metabolitos secundarios y al micoparasitismo. Muchas especies de este género son agentes de control biológico con potencial benéfico contra diferentes enfermedades (Martínez *et al.*, 2013).

En particular, *Trichoderma sp.*, es la especie con más amplio espectro de control, bajo diferentes condiciones ambientales (Weinding, 1932; Chet, 1987; Harman, 2006; Martínez *et al.*, 2013).

#### **2.4. *Fusarium sp.***

El género *Fusarium* comprende 70 especies descritas, que a su vez están agrupadas en 12 secciones. Cada sección es un conjunto de especies relacionadas entre sí. Más de la mitad de las especies son parásitas de plantas y entre ellas se encuentran algunos de los más serios patógenos del mundo agrícola. Dentro del género *Fusarium* existen especies que presentan formas con reproducción sexual conocida, como *F. solani*, y otras, como *F. oxysporum*, en las que no se conoce fase sexual. Este hecho dificulta la clasificación, ya que, tradicionalmente las formas sexuales de una especie se han incluido en un grupo diferente y con un nombre distinto de las que presentan las formas sin reproducción sexual. Diferentes teleomorfos se han asociado con las especies de *Fusarium*, la mayoría de los teleomorfos son miembros de los *Hypocreales*, ubicados en la clase *Ascomycetes*. Tres teleomorfos se relacionan con los anamorfos del género *Fusarium*: *Gibberella*, *Haematonectria* y *Albonectria*. *Gibberella* es el género más comúnmente asociado a la mayoría de las especies de *Fusarium* (Samuels *et al.*, 2001) e incluye a los patógenos de plantas como *Gibberella zeae* (*F. graminearum*), *G. moniliformis* (*F. verticillioides*) y otras especies incluidas en el complejo *G. fujikuroi*. El género *Haematonectria* incluye *H. haematococca* (*F. solani*), de distribución cosmopolita, patógeno de plantas de importancia económica tales como porotos, cítricos, soja, maní, pimienta, papa, calabaza. El género *Albonectria* se asocia con un número pequeño de especies de *Fusarium*, entre ellas la más importante es *F. decemcellulare*, patógeno en regiones tropicales y subtropicales asociado a canchales de varias especies de frutales, tales como cacao, aguacate, mango y guaraná (Villa, 2014).

#### **2.5. Fermentación en estado sólido (FES)**

La fermentación en estado sólido es un proceso que involucra sólidos en ausencia parcial o total de agua libre; sin embargo, el sustrato debe tener la humedad suficiente para permitir el crecimiento del microorganismo y que lleve a cabo todos sus procesos metabólicos, además, sirve como fuente de nutrientes y como soporte físico para que

los microorganismos crezcan sobre él. Este tipo de procesos tienen bajos requerimientos de energía y producen una menor cantidad de aguas residuales en comparación con los procesos de fermentación líquida (Pandey, 2003).

Otro de los aspectos importantes a tener en cuenta para la fermentación en estado sólido es la elección de los parámetros del proceso y su optimización. Estos incluyen parámetros fisicoquímicos y bioquímicos como: el tamaño de partícula, la humedad inicial, el pretratamiento del sustrato, la humedad relativa, la temperatura y la edad del inóculo, la composición del medio de cultivo, la suplementación con microelementos como sales e inductores de crecimiento, así como de elementos trazas, la extracción del producto y su posterior purificación, etc. Dependiendo de la clase, el nivel y la aplicación del experimento, una sola o varias variables pueden ser usadas como parámetros de optimización del proceso (Pandey, 2003).

Dentro de los parámetros mencionados anteriormente, la selección de un sustrato adecuado es un factor clave en los procesos de fermentación en estado sólido. Generalmente, se utilizan residuos agroindustriales debido a que suplen la demanda de nutrientes requeridos por los microorganismos a un bajo costo. Algunos ejemplos son: bagazo de caña, trigo, melaza, arroz, maíz, residuos de té, café, pulpa de remolacha y harina de trigo, entre otros (Krishna, 2005). Adicionalmente, es necesario mantener un nivel óptimo de humedad ya que una baja humedad tiende a reducir la difusión de nutrientes, el crecimiento del microorganismo, la estabilidad enzimática y la degradación del sustrato. En general, los contenidos de humedad encontrados en los procesos de fermentación sólida se encuentran entre el 30% y el 85%. Para cultivos bacterianos, la humedad del sustrato debe ser superior al 70%, mientras que, en el caso de los hongos filamentosos, ésta podría encontrarse en un rango que oscila entre el 20% y el 70% (Raimbault, 1998). De esta manera, los hongos filamentosos constituyen el grupo de microorganismos de mayor utilización en los procesos de fermentación sólida ya que su crecimiento en forma de micelio e hifas, así como su tolerancia ante condiciones tales como baja actividad de agua y una alta presión osmótica, les proporcionan ventajas sobre otros microorganismos en la colonización de sustratos sólidos y su utilización como fuente de nutrientes (Krishna, 2005).

## **2.6. Bioformulación**

La bioformulación, como tal consiste en el tipo de preparado o carrier en el que microorganismos vivos o latentes son suministrados sobre el objetivo, que puede ser una planta o el suelo. Este preparado o bioformulado va a permitir un fácil manejo, un periodo de almacenamiento más o menos largo y una buena efectividad del producto final. De este modo, la tecnología del bioinoculante va a depender básicamente de dos factores, el tipo de cepa microbiana y la formulación del inóculo. No obstante, los últimos avances en bioformulación han hecho que las tecnologías desarrolladas en esta línea puedan adaptarse sin muchos cambios a casi cualquier tipo de cepa microbiana.

Por otro lado, una bioformulación se puede definir como la producción y formulación de agentes de biocontrol con términos estrechamente ligados al concepto de microbiología industrial, cuyo objetivo es usar microorganismos en procesos de propagación artesanal, semi-industrial e industrial, para obtener productos comerciales aplicables al campo (Aimacana, 2010).

## **2.7. Actividad de agua (Aw)**

El total de agua realmente disponible para uso microbiano se expresa como actividad de agua (Aw) (Atlas & Bartha, 2002). Cada microorganismo en particular necesita unos niveles mínimos de Aw para llevar a cabo actividades metabólicas y síntesis de enzimas. Los hongos filamentosos tienen un Aw óptimo de 0.96 y pueden crecer a un Aw mínimo de 0.7 (Ramana et 1993; citado por Peña, 2002).

Cuando la actividad de agua disminuye, los microorganismos previenen la pérdida de agua intracelular acumulando "solutos compatibles" que protegen la estructura macromolecular e incrementan la presión osmótica del citoplasma (Hallsworth et 2003). Los hongos generalmente acumulan polihidroxicoholes (polioles) como glicerol, arabitol, eritritol o manitol, los cuales reducen la actividad de agua (Aw) intracelular previniendo la inhibición enzimática como consecuencia de la desecación. De manera que se puede acumular trehalosa, un disacárido que reemplaza el agua presente en las membranas celulares (Hallsworth y Magan, 1994).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

Este proyecto de investigación se realizó en el laboratorio de investigación de la Escuela Profesional de Biotecnología de la Universidad Nacional del Santa.

#### 3.1. Material vegetal

En el proceso de fermentación en estado sólido (FES) se utilizó el material lignocelulósico de espárrago (*Asparagus officinalis*) y melaza de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) como soporte/sustrato para el crecimiento de *Trichoderma sp.* Para determinar el efecto inhibitorio de la bioformulación líquida de *Trichoderma sp.* sobre el crecimiento del patógeno *Fusarium sp.* se realizó una confrontación en agar papa dextrosa (APD) siguiendo la metodología de placa envenenada.

#### 3.2. Microorganismos

La cepa de *Trichoderma sp.* fue proporcionado por el Cepario de Biotecnología de la Universidad Nacional de Tumbes del grupo INCA'Biotec SAC y la cepa de *Fusarium sp.* fue proporcionado por el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional del Santa. Ambas cepas se conservaron en un medio de cultivo agar papa dextrosa (APD) a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ .

#### 3.3. Diseño experimental

##### 3.3.1. Producción de *Trichoderma sp.* por fermentación en estado sólido.

Para la producción de *Trichoderma sp.* se realizó una fermentación en estado sólido (FES) donde se aplicó un diseño completamente aleatorio y distribuido a una prueba factorial de 3 factores de estudio con 3 niveles cada uno, haciendo 3 réplicas por cada tratamiento. Los factores de estudio fueron el tiempo de remojo en tres niveles 24 h, 48 h y 72 h y la relación entre melaza y peladilla de espárrago (1:3; 1:4; 1:5). El análisis de varianza se efectuó utilizando el software Statistica 10.

Se aplicó un Diseño Experimental AxB; el factor A y factor B tuvieron 3 niveles como se detalla en la siguiente Tabla:

- Replicas: 3

- Tratamientos: 3
- Total, de unidades experimentales: 27

**Tabla 3:** Diseño experimental de relación de crecimiento y desarrollo de *Trichoderma sp.*

RANGOS DE REMOJO PARA LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SOLIDO	RAZON MELAZA - PELADILLA									
	<u>HORAS</u>	<u>01:03</u>			<u>01:04</u>			<u>01:05</u>		
<b>b1: 24</b>		Y <sub>111</sub>	Y <sub>112</sub>	Y <sub>113</sub>	Y <sub>121</sub>	Y <sub>122</sub>	Y <sub>123</sub>	Y <sub>131</sub>	Y <sub>132</sub>	Y <sub>133</sub>
<b>b2: 48</b>		Y <sub>211</sub>	Y <sub>212</sub>	Y <sub>213</sub>	Y <sub>221</sub>	Y <sub>222</sub>	Y <sub>223</sub>	Y <sub>231</sub>	Y <sub>232</sub>	Y <sub>233</sub>
<b>b3: 72</b>		Y <sub>311</sub>	Y <sub>312</sub>	Y <sub>313</sub>	Y <sub>321</sub>	Y <sub>322</sub>	Y <sub>323</sub>	Y <sub>331</sub>	Y <sub>332</sub>	Y <sub>333</sub>

Fuente: Elaboración propia

Leyenda

01: n: Relación melaza y material lignocelulósico

b<sub>n</sub>: Tiempo de remojo (horas).

Y<sub>ijk</sub>: Concentración de conidios/g (Con repeticiones)

### 3.3.2. Efecto de la bioformulación a base de *Trichoderma sp.* sobre el crecimiento de *Fusarium sp.*

Se utilizó el diseño completamente al azar (DCA) de un solo factor donde se comparó las concentraciones de 1% y 5% de la bioformulación líquida a base de *Trichoderma sp.*, donde la variable de respuesta a observar fue la inhibición de *Fusarium sp.*

**Tabla 4:** Diseño experimental para desarrollo del crecimiento micelial de *Fusarium sp.* y el % de inhibición por bioformulación de *Trichoderma sp.* a diferentes concentraciones

% De concentración de la bioformulación	Crecimiento micelial de <i>Fusarium sp.</i> en porcentaje					
	<u>Crecimiento Micelial</u>			<u>% de Inhibición</u>		
<b>%<sub>1</sub>: Testigo 0%</b>	Y <sub>111</sub>	Y <sub>112</sub>	Y <sub>113</sub>	Y <sub>121</sub>	Y <sub>122</sub>	Y <sub>123</sub>
<b>%<sub>2</sub>: Concentración 1%</b>	Y <sub>211</sub>	Y <sub>212</sub>	Y <sub>213</sub>	Y <sub>221</sub>	Y <sub>222</sub>	Y <sub>223</sub>
<b>%<sub>3</sub>: Concentración 5%</b>	Y <sub>311</sub>	Y <sub>312</sub>	Y <sub>313</sub>	Y <sub>321</sub>	Y <sub>322</sub>	Y <sub>323</sub>

Fuente: Elaboración propia

Leyenda

%<sub>n</sub>: Concentración de la bioformulación

Y<sub>ijk</sub>: Crecimiento de micelio (cm) (Con repeticiones).

### **3.4. Obtención del inóculo**

Se realizó una suspensión de conidios a partir del raspado superficial del hongo *Trichoderma sp.* esporulado. La concentración de conidios se suspendió en una solución de 30 mL de agua destilada con Tween 80 al 0.1 % (v/v) y se determinó la concentración inicial del inóculo (conidios/mL) mediante recuento de conidios en cámara de Neubauer.

#### **3.4.1. Cuantificación del inóculo (expresada en conidios/mL)**

La concentración de inóculo esencial para los procesos de fermentación sólida debe de estar entre  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^8$ , por lo cual se realizó la cuantificación del inóculo mediante la técnica de recuento de conidios en cámara de Neubauer. Se procedió a tomar 1 g de muestra previamente homogeneizada (conidios + sustrato) y se agregó una solución de 30 mL de agua destilada estéril con Tween 80 al 0.1 % (v/v), estimando el número de conidios/mL a través de la fórmula experimental (anexo A).

### **3.5. Cámara de fermentación**

Se construyó una cámara para favorecer la fermentación en estado sólido con la finalidad de acondicionar el crecimiento del hongo *Trichoderma sp.* utilizando como soporte / sustrato el residuo lignocelulósico “peladilla” de espárrago (*Asparagus officinalis*) y melaza de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*).

#### **3.5.1. Dimensiones de la cámara fermentativa**

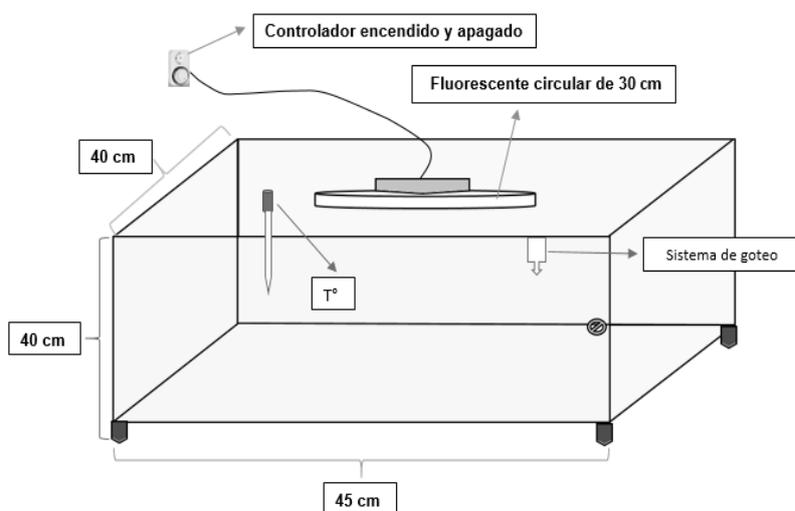
La cámara diseñada para los procesos fermentativos fue construida de madera y tecnopor con la finalidad de conservar la temperatura y la humedad interna a través del sistema de focos y de goteo.

Capacidad: 35 frascos de vidrio

Características

- Rango de temperatura de fermentación entre 25 y 30°C.
- Programación a través de timer para control de temperatura.
- Control de humedad a través de sistemas de ingreso de agua por sistemas de venoclisis.
- Sensor de temperatura.

- Puerta con sistema de bisagra y sellado hermético.



**Figura 1:** Modelo de la cámara fermentativa.

Fuente: Elaboración propia.

### 3.6. Condiciones de fermentación

La fermentación en estado sólido se realizó a 30°C para establecer el efecto del tiempo de remojo a 24 h, 48 h y 72 h del residuo lignocelulósico de espárrago (*Asparagus officinalis*) y melaza (*Saccharum officinarum*) para el crecimiento del hongo *Trichoderma sp.* El peso del sustrato para cada unidad experimental se realizó según el diseño experimental expresado anteriormente.

**Tabla 5:** Relación de Melaza: Peladilla expresada en v/p

Melaza: Cascara de espárrago	Melaza: Cascara de espárrago (v/p)
<b>01:03</b>	5 % (1.5 mL): 30 g
<b>01:04</b>	5 % (2 mL): 40 g
<b>01:05</b>	5 % (2.5 mL) : 50 g

Fuente: Elaboración propia

La concentración de melaza será un factor de importancia en la producción de conidios. Nutricionalmente la melaza presenta un alto contenido en azúcares e hidratos de carbono simples, además de vitaminas del grupo B y abundantes minerales, entre los que se destacan el hierro, el cobre y el magnesio, elementos esenciales para los

requerimientos nutricionales de *Trichoderma*. Allori et al. (2017) obtuvo una producción de conidios por gramo de sustrato  $1 \times 10^9$  conidios/g en los sustratos de granos de arroz y bagazo enriquecido con soluciones de melaza al 10 % y al 5 %. Estos resultados coinciden con lo reportado por Silvia et al. (2017) quienes empleando sustratos a base de granos de quinua y granos de arroz obtuvieron concentraciones de conidios similares en el mismo periodo de tiempo, lo que demostraría que, si el sustrato le provee al hongo los nutrientes necesarios, este continuará creciendo y esporulando.

### **3.7. Evaluación de la fermentación en estado sólido en el tiempo.**

El proceso fermentativo consta de realizar la mezcla de sustratos sólidos enriquecidos con fuentes nutritivas y con características que proporcionen condiciones de humedad, textura, estructura y disponibilidad de nutrientes para la producción de conidias de *Trichoderma sp.*

Para determinar el tiempo adecuado de crecimiento del hongo *Trichoderma sp.* en el proceso de fermentación se utilizó como fuente de carbono melaza al 5% y como sustrato y soporte la cascara de esparrago (material lignocelulósico). Para determinar el tiempo de fermentación adecuado en la producción de *Trichoderma sp.* se realizó una evaluación por 28 días. El proceso fermentativo se trabajó en 27 frascos de vidrio similares a los envases de mermelada donde se agregó 50 g cascara de esparrago y 5% de melaza como fuente de sustrato y soporte, cabe resaltar que la fermentación se dejó por 72 h en incubación antes de ser autoclavados a 121 °C por 20 minutos. posteriormente a la esterilización se realizó la inoculación de 1mL de suspensión de *Trichoderma sp* a una concentración de  $10^6$  conidios/ml. Para evaluar el crecimiento de *Trichoderma sp.* se realizó la toma de muestra de 1 gramo de cada proceso fermentativo y a través de una solución de Tween 80 al 0.1% v/v se hicieron lavados para así realizar el recuento de conidios en cámara de Neubauer a través de diluciones seriadas.

### **3.8. Determinación de azúcares reductores durante la fermentación.**

Teniendo en cuenta que el medio de cultivo está compuesto por sacarosa, fue necesario realizar hidrólisis ácida previa a la cuantificación de azúcares reductores mediante la técnica del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). En el anexo B se detalla el procedimiento realizado.

### **3.9. Actividad del agua:**

Para medir la  $A_w$  se colocó el sustrato/soporte compuesto por el material lignocelulósico más la melaza dentro del sostenedor de muestra del equipo medidor de actividad de agua, HygroLab y se procedió según el fabricante.

### **3.10. Determinación de la humedad**

Se determinó la pérdida de peso de la muestra al someterla a calentamiento en estufa a condiciones determinadas. En una placa previamente tarada, se pesó 5 g de muestra de la fermentación en estado sólido, luego se procedió a colocar la placa con la muestra en la estufa de desecación a 105°C durante 3 h. Posteriormente, las placas se colocaron en un desecador por 30 min. Dicha metodología se obtuvo de un trabajo de investigación de la Planta Piloto de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad de Zaragoza. Por último, se realizó una tabla de datos para la construcción de la humedad.

### **3.11. Preparación de la fermentación en estado sólido**

Para poder realizar la fermentación en estado sólido, primero se procedió a lavar con agua destilada estéril el material lignocelulósico para poder liberar todo tipo de impurezas. Luego se procedió a triturar con la ayuda de un mortero hasta conseguir partículas aproximadas de 1 cm de diámetro. Se trabajó con 27 frascos de vidrio similares a los envases de mermelada, los cuales contuvieron concentraciones de sustrato expresadas en la tabla 5, el soporte de material lignocelulósico y melaza se dejó en un proceso fermentativo por 24, 48 y 72 horas. Pasado el tiempo de remojo se cubrió con papel aluminio y papel Kraft y de manera circular se tapó la entrada de los recipientes de vidrio para poder ser autoclavados a 121 °C por 20 minutos.

### **3.12. Inoculación en la fermentación en estado sólido**

Se realizó la inoculación de 1 mL de suspensión de *Trichoderma sp.* a una concentración de  $10^8$  conidios/mL. Posteriormente, los recipientes de vidrio de cada proceso fermentativo inoculados se distribuyeron de acuerdo con los 3 tiempos de remojo y fueron incubados a una temperatura de fermentación de 30°C.

### 3.13. Evaluación del crecimiento

Para evaluar la producción de conidios se tomó muestras de 1g de cada recipiente de la fermentación en estado sólido a lo largo del tiempo para determinar el número de conidios/mL a través del recuento en cámara de Neubauer, la metodología consiste en colocar la muestra en 10 ml de solución de Tween 80 al 0.1% y colocar en agitación con la ayuda de un vortex por 30 segundos con la finalidad de obtener una suspensión y realizar diluciones seriadas hasta obtener la dilución apropiada ( $10^{-3}$ ) para realizar el recuento de conidios/ml. Por conversión se obtiene el número de conidios/g de sustrato empleado. La variable de respuesta seleccionada fue el crecimiento y desarrollo de *Trichoderma sp.*, puesto que este indicador determina el rendimiento del producto biotecnológico de interés.

**Tabla 6:** Parámetros y criterios de evaluación

INDICADOR	ÍNDICE
Cuantificación de biomasa	Conidios/g
Numero de generación	n

Fuente: Elaboración propia

### 3.14. Preparación de la bioformulación líquida

Para poder obtener una bioformulación líquida de *Trichoderma sp.* se preparó una suspensión de elementos nutritivos a base de melaza de caña, y otros compuestos como levadura de cerveza, almidón y extracto de maíz que favorecerá su multiplicación, una rápida esporulación y sobrevivencia del antagonista. Seguidamente se procedió a mezclar la suspensión con la producción de *Trichoderma sp.* del proceso fermentativo. Se realizó la purificación del producto separando el material sólido procedente de la fermentación en estado sólido a través de una filtración con el fin de solo obtener conidios de *Trichoderma sp.* El bioformulado se envasó en botellas de vidrio de 1 litro estéril.

**Tabla 7:** Concentración de los adyuvantes específicos para la bioformulación.

Adyuvantes	Cantidad	Fuentes
Levadura de cerveza	35 g/L	Nitrógeno
Melaza de caña de azúcar	5%	Carbono
Almidón de maíz	26 g/L	Carbono
Extracto de maíz	20 g/L	Nitrógeno

Fuente: Elaboración propia

### 3.15. Cuantificación de conidios en el bioformulado

- Los datos fueron representados en curvas de crecimiento con la finalidad de observar las fases de crecimiento y determinar la viabilidad del bioformulado de *Trichoderma sp.* conservado a  $-4^{\circ}\text{C}$ , el conteo de conidios se realizó durante 30 días consecutivos mediante la técnica de diluciones sucesivas y con la ayuda de la cámara de Neubauer.
- Para la determinación del número de conidios por mL de producto se preparó diluciones en serie ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) del bioformulado líquido y agua destilada con el fin de facilitar el conteo en la cámara de Neubauer.
- Para obtención de la primera dilución ( $10^{-1}$ ), se transfirió con una pipetaestéril 10 mL del bioformulado a un Erlenmeyer con 90 mL de agua estéril y se agitó fuertemente durante 1 min; luego se procedió con la dilución ( $10^{-2}$ ), se tomó 1 mL de la dilución de bioformulado ( $10^{-2}$ ) y se transfirió al tubo de ensayo de la dilución ( $10^{-3}$ ) con 9 mL de agua estéril y se agitó.
- Se tomó el tubo de la dilución de la muestra a analizar y se agitó durante 30 segundos. Inmediatamente después se tomó la muestra de 10  $\mu\text{l}$  (0.01 mL) con una pipeta automática para ser depositado en la cámara. Se dejó reposar medio minuto antes de proceder al conteo. El mismo procedimiento se repitió tres veces.
- Luego, se llevó la cámara al microscopio y se procedió a realizar el conteo respectivo con el objetivo de 40 X. Cinco de estos cuadrados se utilizó para el conteo de los conidios. Se debe dar especial atención al hecho de que la cámara se encuentra delimitada por tres líneas blancas entre los cuadrados. Esto es importante para definir cuáles son los conidios que se encuentran en el límite y que deben ser contadas.
- La concentración de conidios por mL de producto se calculó multiplicando la suma del número de esporas contadas en los cinco cuadrados secundarios (C.S), por el inverso de la dilución empleada y por el factor de la cámara, mediante la siguiente fórmula.

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

### **3.16. Evaluación de la viabilidad**

El número de conidios se evaluó mediante la técnica del microcultivo.

- Se preparó un medio de cultivo de agar-agua al 3%, posteriormente se depositó una gota de medio de cultivo agar-agua sobre el portaobjetos y se distribuyó uniformemente.
- Inoculamos con la ayuda de una pipeta una gota de la dilución ( $10^{-3}$ ) en el portaobjetos.
- Posteriormente se coloca en una cámara húmeda la cual consiste en añadir 5 mL de agua estéril en una caja Petri y colocar la lámina.
- Incubamos a una temperatura de 28°C durante 24 h, y realizamos 3 repeticiones por cada sustrato y tiempo de fermentación.
- Para la evaluación se observó y contó el crecimiento de conidios que se observa en un total de 20 campos visual.

### **3.17. Efecto de la bioformulación sobre el crecimiento de *Fusarium* sp.**

#### **3.17.1. Reactivación del monocultivo**

Para el caso del cultivo purificado de *Fusarium* sp. se replicó en medio APD y fue incubado a 30°C.

#### **3.17.2. Preparación del medio de cultivo**

Se empleó la técnica de medio “envenenado” que consistió en colocar placa Petri contenidas con medio agar papa dextrosa (PDA) más la bioformulación a dos dosis de evaluación (1% y 5%), como testigo se empleó solo medio PDA.

#### **3.17.3. Efecto inhibitorio de la bioformulación frente a *Fusarium* sp.**

Para evaluar el efecto inhibitorio se realizó la técnica de medio envenenado en agar papa dextrosa adicionando una dosis de la bioformulación de 1% y 5% correspondiente al volumen del medio de cultivo. Se colocó discos de 5 mm de diámetro con micelio de *Fusarium* sp. Como testigo se sembró discos de micelio de *Fusarium* sobre medio agar papa dextrosa sin la bioformulación. Todas las placas sembradas fueron incubadas a 25°C y se evaluaron diariamente midiéndose el

crecimiento radial del hongo fitopatógeno (cm) de los 4 cuadrantes trazados en la parte posterior de las placas Petri. La evaluación concluyó a los 12 días cuando el micelio del hongo fitopatógeno cubrió totalmente la placa del tratamiento testigo.

### 3.18. Análisis estadístico

Los factores de estudio para evaluar el crecimiento de *Trichoderma sp.* se analizaron a través de un análisis de varianza utilizando el software Statistica 10.

Las hipótesis a probar son las siguientes:

- Ho:  $\mu_0 = \mu$ : Todas las medias de los tratamientos (razón melaza-peladilla) son iguales
- Ha:  $\mu_0 \neq \mu$ : Existe al menos una media de un tratamiento (razón melaza-peladilla) que es diferente
- Ho:  $\mu_0 = \mu$ : Todas las medias de los tratamientos (tiempo de fermentación) son iguales
- Ha:  $\mu_0 \neq \mu$ : Existe al menos una media de un tratamiento (tiempo de fermentación) que es diferente
- Ho:  $\mu_0 = \mu$ : No existen interacciones entre los tratamientos (razón melaza-peladilla y tiempo de fermentación)
- Ha:  $\mu_0 \neq \mu$ : Existe al menos una interacción entre los tratamientos (razón melaza-peladilla y tiempo de fermentación)

Nivel de significancia:  $\alpha = 0.05$

La evaluación de la bioformulación sobre la inhibición de *Fusarium sp.* se analizó a través de un análisis de varianza de un solo factor para el DCA utilizando el software Statistica 10. Las hipótesis a probar son las siguientes:

- Ho:  $\mu_0 = \mu$  : Todas las medias de los tratamientos son iguales
- Ha:  $\mu_0 \neq \mu$ : Existe al menos una media de un tratamiento que es diferente

Nivel de significancia:  $\alpha = 0.05$

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Caracterización de la cepa de *Trichoderma* sp. y *Fusarium* sp.

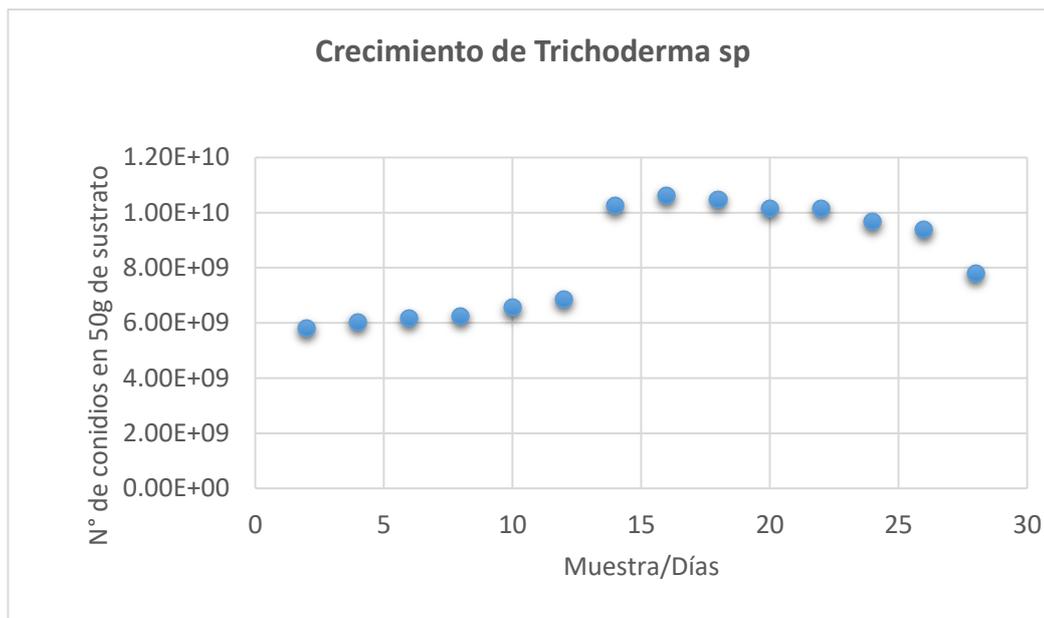
Ambos hongos fueron cultivados en medio de cultivo PDA a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ . El crecimiento de *Trichoderma* sp. se dio en toda la placa después de los cinco días presentando un color blanco verdoso del micelio. Después de una semana, el hongo esporuló por completo dando el color verde característico. Estos resultados están de acuerdo con los hallazgos reportados por Rivas (1994), quien evaluó el crecimiento de cepas de *Trichoderma pseudokoningii* que cubrieron totalmente el medio de cultivo en placas de Petri a las 72 h de incubación.

Con respecto a *Fusarium* sp, se observó que la cepa muestra un crecimiento de micelio a partir de las 48 h de incubación llegando a esporular por completo en toda la placa a los 12 días.

### 4.2. Evaluación de la fermentación en estado sólido.

Como se muestra en la figura 2, *Trichoderma* sp. inició su esporulación cuando no posee nutrientes o es insuficiente } a los 4 días en el proceso de fermentación en estado sólido con 50 g del material lignocelulósico. Entre los 14 y 22 días el crecimiento se mantuvo y se obtuvo recuentos similares de  $1.06\text{E}+10$  conidios/g, esto nos indicó que a partir de los 14 días el hongo no produce conidios. Posteriormente, la cantidad de conidios empezó a descender.

A los 28 días hubo una disminución significativa por lo que se detuvo la evaluación. Se decidió trabajar la fermentación en estado sólido hasta los 14 días, cabe resaltar que en investigaciones anteriores Arévalo (2017) reportó una mayor esporulación de *Trichoderma* usando residuos agrícolas sólidos a los 14 días. *Trichoderma* usando residuos agrícolas sólidos a los 14 días.



**Figura 2:** Gráfica de crecimiento de *Trichoderma sp.* en la fermentación en estado sólido por 28 días.

### 4.3. Proceso de fermentación en estado sólido.

#### 4.3.1. Cuantificación del inóculo (expresada en conidios/mL)

Para determinar la cantidad de conidios contenido en 1 g de sustrato se utilizó una placa Petri con *Trichoderma sp.*, a partir del crecimiento observado se realizó un corte de 1 g de micelio y se colocó en un tubo falcón con 1 mL de solución de Tween 80 al 0.1%, para determinar la concentración de conidios por medio del recuento en la cámara de Neubauer.

Siguiendo este proceso se realizó la obtención del inóculo, el cual consistió en lavar las placas de *Trichoderma sp.* con 9 mL de Tween 80 al 0.1%. Las concentraciones obtenidas en las diferentes replicas fueron de:

**Tabla 8:** Número de conidios inicial obtenido en cada replica.

<b>REPLICAS</b>	<b>Numero de conidios por gramo /mL</b>
<i>R1</i>	11850000
<i>R2</i>	12825000
<i>R3</i>	18625000

Fuente: Elaboración propia

#### 4.3.2. Crecimiento en la fermentación en estado sólido

Se realizó 3 repeticiones para evaluar el crecimiento de *Trichoderma sp*, en el proceso de fermentación en estado sólido donde se utilizó como sustrato y soporte el desecho lignocelulósico de esparrago más el 5% de melaza de caña.

Se pudo observar que a partir del día 4, la esporulación fue significativa debido que presentó crecimiento en todos los frascos de vidrio (Figura 3). La evaluación reflejó diferencias significativas entre el número de conidios/g de sustrato en los diferentes procesos de fermentación.

**Tabla 9:** Crecimiento de *Trichoderma sp* en la fermentación en estado sólido a los 14 días de incubación.

CRECIMIENTO DE TRICHODERMA SP A LOS 14 DÍAS		
TRATAMIENTO	COMPOSICIÓN MELAZA: ESPARRAGO	CONIDIOS/ g SUSTRATO
24 H	5% - 30 g	7.97E+10
	5% - 40 g	7.31E+10
	5% - 50 g	8.09E+10
48 H	5% - 30 g	8.44E+10
	5% - 40 g	8.18E+10
	5% - 50 g	8.77E+10
72 H	5% - 30 g	8.52E+10
	5% - 40 g	8.67E+10
	5% - 50 g	9.53E+10

Fuente: Elaboración propia

Como se muestra en la tabla 9, se obtuvieron mayor concentración de conidios/ g de sustrato a las 72 h de fermentación y 50 g de sustrato donde el valor alcanzado fue 9.53E+10 conidios/g de sustrato. Por el contrario, se obtuvo menor número de conidios en la fermentación de 24 h y 40 g de sustrato siendo 7.31E+10 conidios/g de sustrato. En la tabla 17 se puede observar el conteo de conidios que se realizó en las tres réplicas por el tiempo de 14 días. Los resultados en este estudio se asemejan con otros autores como Fernández Larrea y Elosegui (2006), quienes informaron que la multiplicación de *Trichoderma sp*. en sustrato de arroz permitió alcanzar una concentración de 2,30E+8 conidios /mL



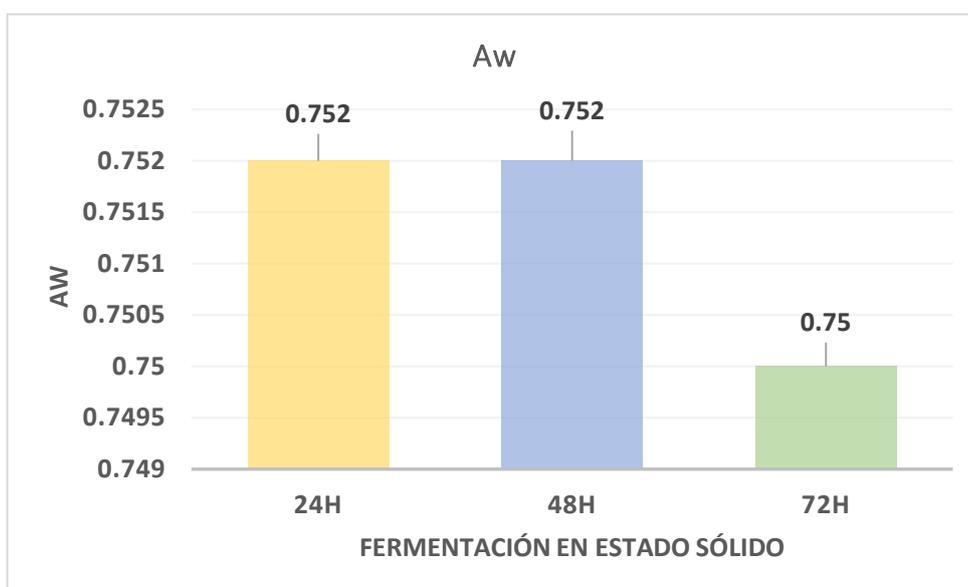
**Figura 3:** Crecimiento de *Trichoderma sp.* en la fermentación en estado sólido con el material lignocelulósico de esparrago más 5% de melaza de caña a los 14 días de incubación.

#### **4.3.3. Efecto del tipo de sustrato**

El crecimiento de *Trichoderma sp.* en medio utilizado es complejo, el nutriente limitante y la fuente de nitrógeno en este proceso es previsto por la melaza (tabla 2); mientras, el desecho lignocelulósico de esparrago fue utilizado como sustrato/ soporte y además con una fuente de nutriente donde se puede tener proteínas e hidratos de carbono (fuente de carbono) (tabla 1). Este tipo de medio es utilizado porque no existe exactamente los requerimientos nutricionales del hongo *Trichoderma sp.* En la mayoría de trabajos realizados con el hongo, varían mucho la fuente de carbono, nitrógeno, energía y vitaminas, por lo que no se puede elaborar un medio definido. Según Ramírez, (2012), la relación carbono (C): nitrógeno (N) es esencial para las fermentaciones de hongos. En los hongos, se necesita que la fuente de C esté en exceso en el medio y el contenido de N sea el factor limitante del crecimiento, lo que desencadena el proceso de esporulación.

#### 4.4. Condiciones de Aw y humedad en la fermentación en estado sólido

La humedad inicial en todas las fermentaciones sólidas para la producción de *Trichoderma sp.* en los diferentes tiempos de fermentación estuvo comprendida entre un promedio de 83.87% y al finalizar la fermentación se obtuvo un promedio de 84.96% (Tabla 16 y 17). Los datos obtenidos concuerdan con Gervais y Molin (2003) quienes mencionan que el contenido de humedad para la propagación de ciertas especies de hongos filamentosos mediante fermentación en estado sólido se encuentra cercano al 85%, ya que en este valor de humedad favorece la producción de ciertas enzimas endógenas y exógenas, por otro lado, manifiesta que para lograr la esporulación de hongos antagonistas en medio sólido es necesario que el sustrato empleado en la fermentación tenga una humedad comprendida entre el 40% y 85%. Para la evaluación de la actividad de agua (Aw) en cada sistema de fermentación en estado sólido, se obtuvo promedio de 0.75. Según Peña, (2002), cada microorganismo en particular necesita unos niveles mínimos de Aw para llevar a cabo actividades metabólicas y síntesis de enzimas. Los hongos filamentosos tienen un Aw óptimo de 0.96 y pueden crecer a un Aw mínimo de 0.7. Las condiciones que se dieron están dentro del rango de actividad de agua disponible en cada sistema de fermentación en estado sólido lo cual permitió una buena esporulación de *Trichoderma sp.* en los diferentes tiempos de remojo.



**Figura 4:** Representación gráfica de la Aw en los diferentes tiempos de fermentación en estado sólido.

#### 4.5. Evaluación del crecimiento en medio sólido

**Tabla 10:** Crecimiento de *Trichoderma sp.* en la fermentación en estado sólido en proceso de formación de conidios.

<i>Crecimiento de Trichoderma sp.</i>				
	Composición		14 días	n
<b>24 H</b>	5% - 30g	1.5 mL: 30 g	8.10E+10	13.741
	5% - 40g	2 mL: 40 g	8.18E+10	13.755
	5% - 50g	2.5 mL: 50 g	8.34E+10	13.780
<b>48H</b>	5% - 30g	1.5 mL: 30 g	8.34E+10	13.780
	5% - 40g	2 mL: 40 g	8.16E+10	13.750
	5% - 50g	2.5 mL: 50 g	8.51E+10	13.809
<b>72 H</b>	5% - 30g	1.5 mL: 30 g	8.31E+10	13.776
	5% - 40g	2 mL: 40 g	8.41E+10	13.794
	5% - 50g	2.5 mL: 50 g	8.61E+10	13.826

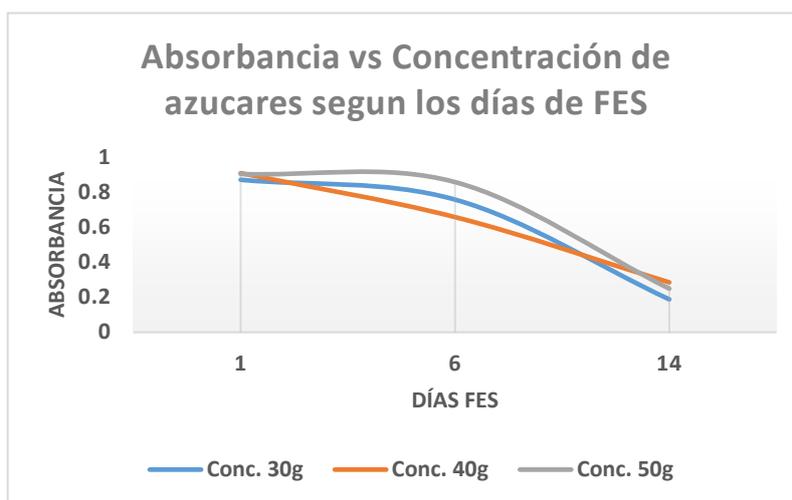
Fuente: Elaboración propia

Realizando la evaluación con los parámetros y criterios de evaluación descritos en la tabla 6 se obtuvo como resultados los siguientes valores más relevantes en los tiempos de fermentación de 72 h de remojo donde; el número de generaciones obtenida fue de 13.826 utilizando 5% de melaza y 50g del material lignocelulósico.

#### 4.6. Determinación de azúcares reductores en la FES

Con la finalidad de determinar los azúcares reductores del proceso de fermentación en estado sólido de cada tratamiento, se realizó la hidrólisis de la sacarosa, luego se procedió con la prueba de DNS para cuantificar la melaza al inicio y final de la fermentación, esto se realizó para mostrar cómo va disminuyendo la melaza mientras que el hongo *Trichoderma sp.* lo utiliza como fuente de carbono. Como se observan en los resultados obtenidos en la fermentación en estado sólido (FES) se realizó la medición inicial y final de azúcares reductores lo cual nos indica que después de 14 días de FES la concentración de azúcares disminuye según el transcurso de los días.

Concentración en el proceso fermentativo			
Día	30g	40g	50g
1	0.871	0.909	0.904
6	0.758	0.658	0.858
14	0.188	0.285	0.249



**Figura 5:** Resultados de la absorbancia vs concentración de azúcares reductores.

#### 4.7. Preparación de la bioformulación

La concentración de conidios/g de sustrato obtenida en esta investigación concuerda con los de Castro (2015) donde indica que la obtención de un elevado número de esporas por g de sustrato empleado que garantiza la multiplicación del antagonista. De esta concentración obtenida se inició la preparación de la bioformulación de las fermentaciones sólidas, cabe resaltar que la mayor formación de conidios se obtuvo a 72 h, las bioformulaciones fueron conservados a temperatura de 4°C para determinar su crecimiento y viabilidad.

**Tabla 11:** Promedio de Concentración de conidios en las 3 réplicas a los 14 días de incubación en la fermentación en estado sólido (FES).

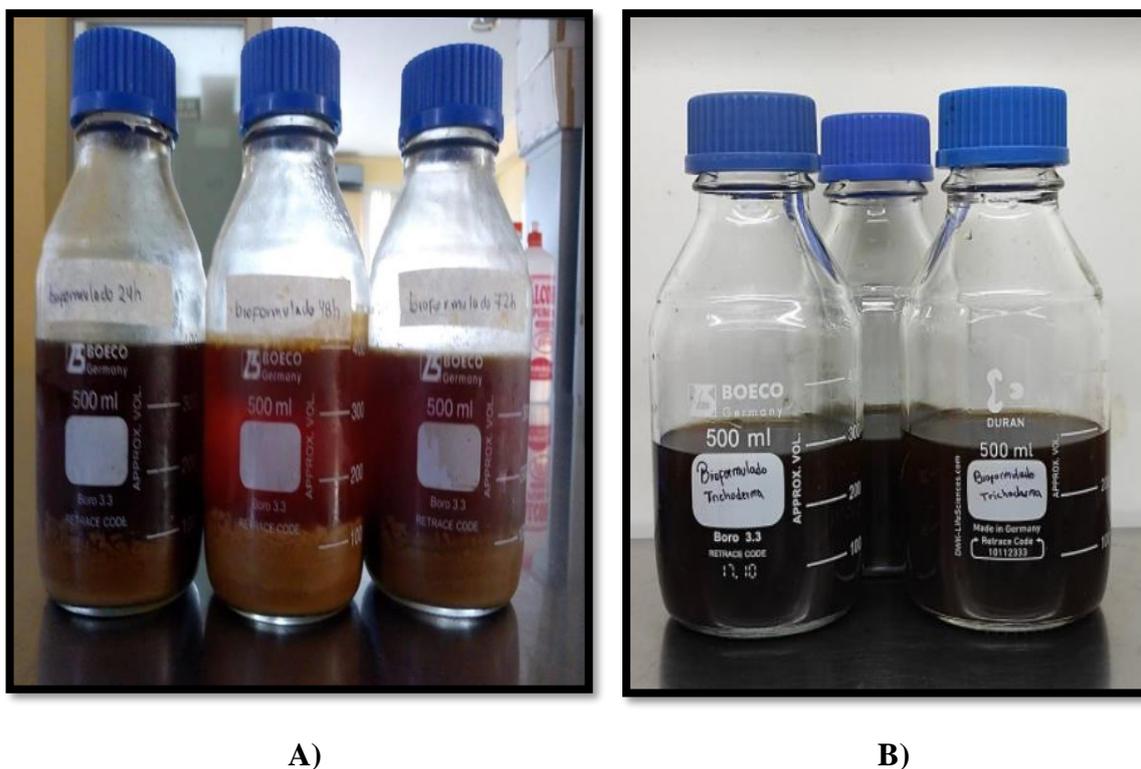
CRECIMIENTO DE <i>Trichoderma sp.</i>		14 DÍAS conidios/g sustrato
<i>Fermentación</i>	Composición melaza: esparrago	Promedios 3R
24 H	5% - 30 g	8.10E+10
	5% - 40 g	7.98E+10
	5% - 50 g	8.42E+10
48H	5% - 30 g	8.44E+10
	5% - 40 g	8.18E+10
	5% - 50 g	8.77E+10
72 H	5% - 30 g	8.52E+10
	5% - 40 g	8.67E+10
	5% - 50 g	8.90E+10

Fuente: elaboración propia

Para la obtención de la bioformulación líquida de *Trichoderma sp*, se preparó una suspensión de elementos nutritivos a base de melaza de caña, y levadura de cerveza que favoreció su multiplicación, una rápida esporulación y sobrevivencia del antagonista (Tabla 7).

El proceso de extracción de la suspensión de esporas consistió básicamente en agregar una solución de Tween 80 a 0,5% v/v para realizar la remoción de conidios a los envases de vidrio.

Después se pasó por un colador para separar el material sólido con la solución que contendrá las esporas del hongo. A continuación, se hizo un colado fino con una gasa y se ajustó la cantidad de la bioformulación en 0.5 litro, a partir de la bioformulación obtenido se trabajaron los procesos de placa “envenenada” con una concentración de 1% y 5% de la bioformulación frente al volumen de medio de cultivo agar papa dextrosa. (Anexo 6- figura 14).

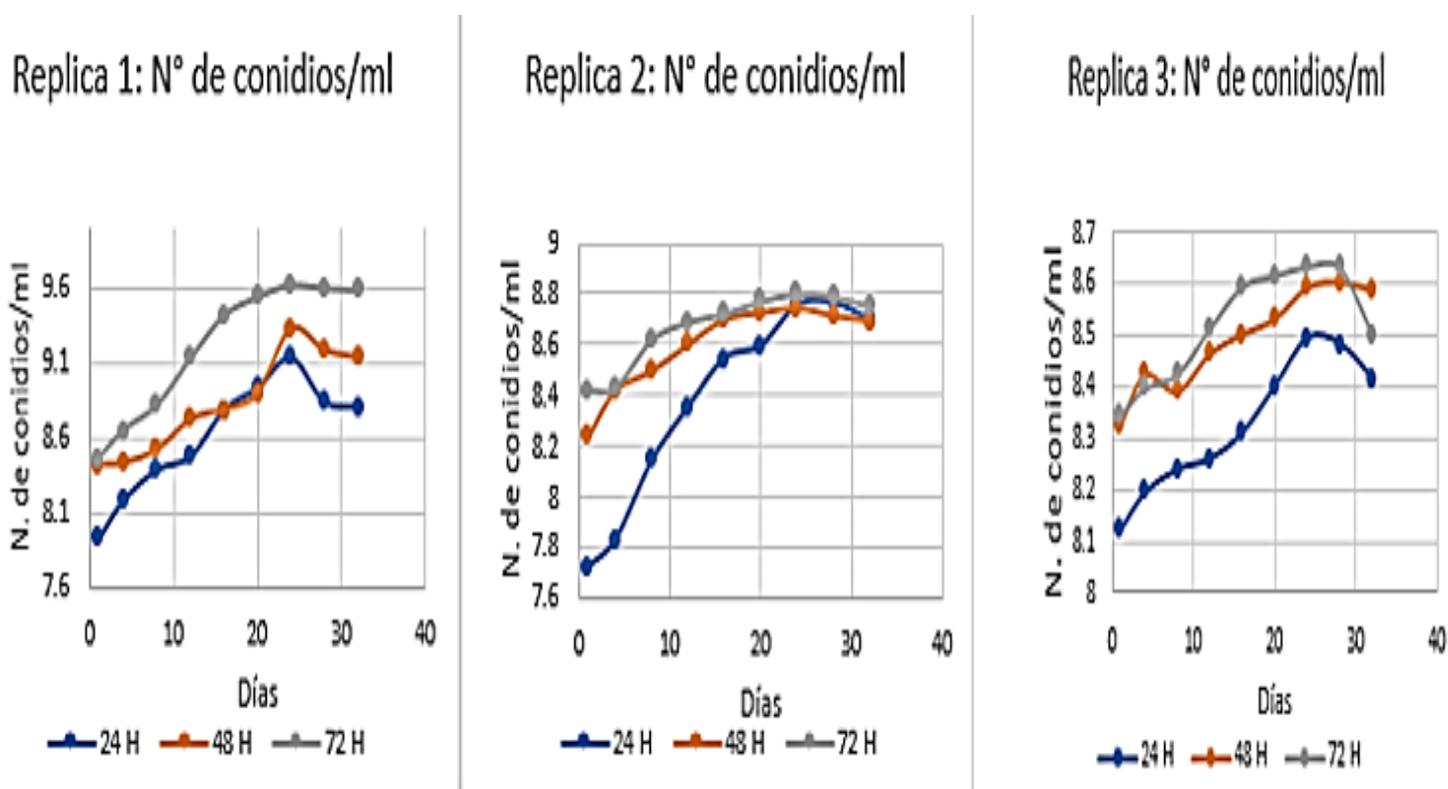


**Figura 6:** Obtención de la bioformulación a diferente tiempo de fermentación en estado sólido: A) suspensión de elementos nutritivos a base de melaza de caña, y ayudantes; B) Bioformulación líquida de *Trichoderma sp*. a base de la fermentación en estado sólido.

#### 4.8. Cuantificación y viabilidad de conidios en el bioformulado

La evaluación constó en realizar el conteo de cada bioformulación por el tiempo de 30 días, donde se pudo observar que los adyuvantes permitieron la conservación y producción de conidios a la temperatura de conservación de 4°C.

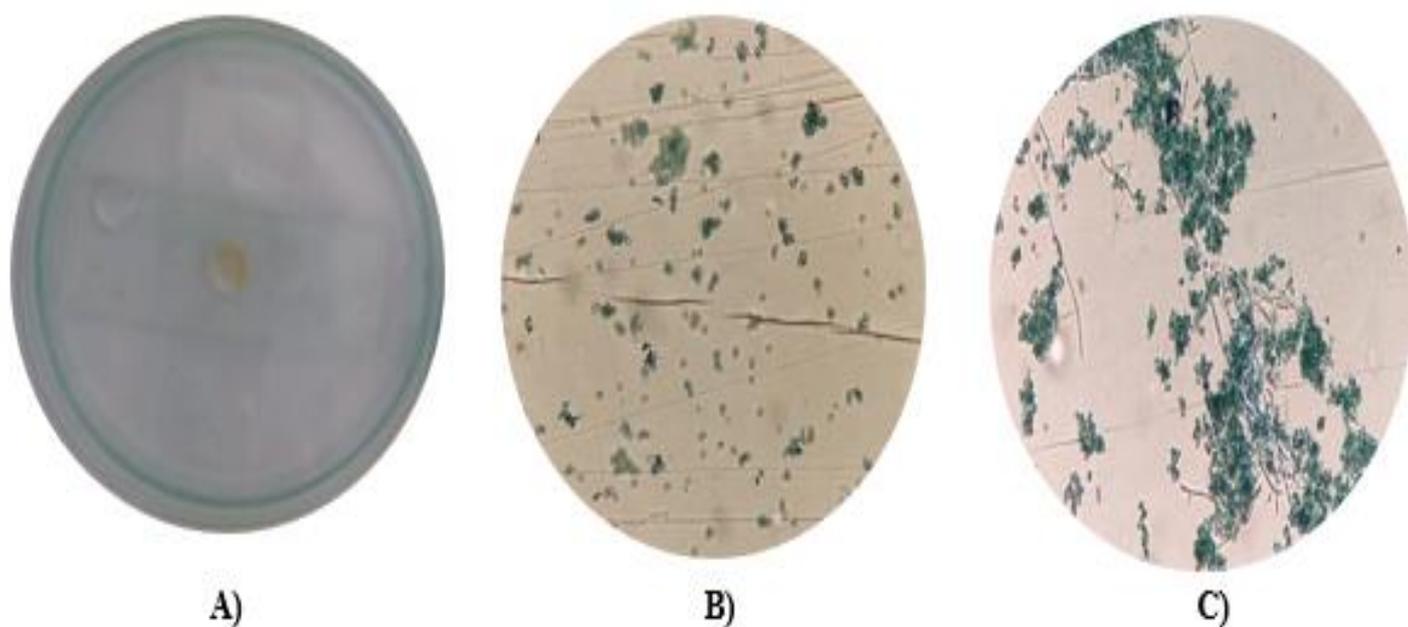
El número de conidios fue reduciendo en el tiempo en las bioformulaciones, pero se puede resaltar que la bioformulación con mayor conservación y formación de esporas se obtiene del proceso de FES a 72 h.



**Figura 7:** Representación gráfica de la viabilidad del bioformulado de *Trichoderma sp.* cultivado sobre la Fermentación en estado sólido a los 30 días de conservación a 4°C.

Como se representa en la figura 8, se puede observar que se obtuvieron altas concentraciones de conidios/mL (Tabla 21) lo que nos indica que el producto desarrollado es viable a lo largo del tiempo y tiene acción de control biológico contra hongos patógenos, también se realizó el proceso de verificación del número de conidios mediante la técnica del micro cultivo.

Lo que nos permitió ver si en 24 h el bioformulación aún era viable en el tiempo, el proceso consistió en agregar una gota de agar-agua al 3% y una gota de la dilución ( $10^{-3}$ ) de la bioformulación. Ese proceso nos corrobora si la bioformulación aún tenía conidios que podían germinar en el tiempo como se aprecia en la figura 9.



**Figura 8:** Proceso de verificación del número de conidios mediante la técnica del micro cultivo; A) Inoculación de la bioformulación en agar agua; B) Evaluación a 24h; C) Germinación de conidios a las 24h 100x.

Cómo se observa el número de germinación fue creciendo a lo largo del tiempo, pero se apreció que a partir de los días 28 a 30 la cantidad de conidios/mL de la bioformulación (figura 8) iba disminuyendo.

Con los resultados obtenidos se puede concluir que las bioformulaciones presentan una viabilidad óptima entre 30 a más días de almacenamiento. El resultado concuerda con Castro, (2015) que indica que la viabilidad o proporción de conidios vivos disminuye con el tiempo dependiendo de las condiciones en las cuales son almacenados. Obteniendo una viabilidad del 94% a 40 días de almacenamiento.

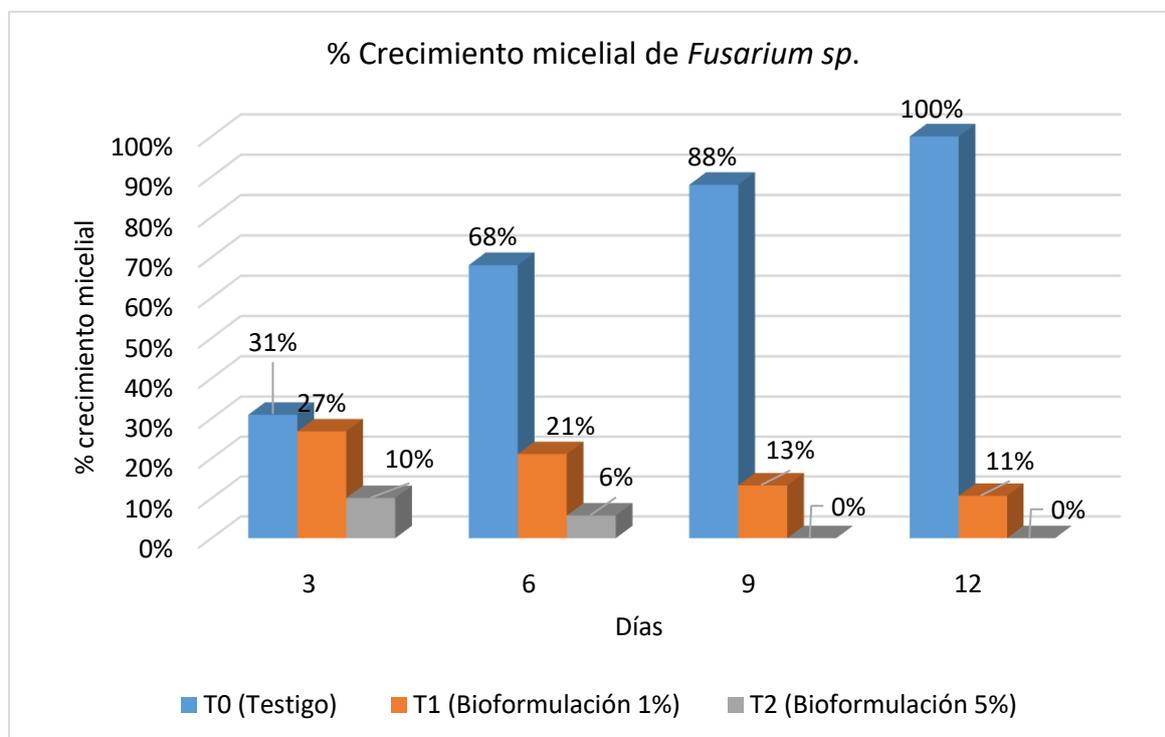
**4.9. Efecto inhibitorio de la bioformulación sobre el crecimiento de *Fusarium sp.* a los 12 días de evaluación.**

Se realizó la medición del crecimiento micelial de *Fusarium sp.* en cm como se aprecia en la tabla 21 de los anexos donde se obtuvo un promedio de 7.61 cm que corresponde el crecimiento de *Fusarium sp.* en la placa petri valor que representa un crecimiento del 100% a los 12 días de evaluación a comparación de las placas con los tratamientos de la bioformulación se obtuvo 11% de crecimiento que corresponde un promedio de 0.8 cm los tratamientos con la bioformulación al 1% y 0% debido que no se vio crecimiento micelial en los tratamientos trabajados a una concentración del 5%.

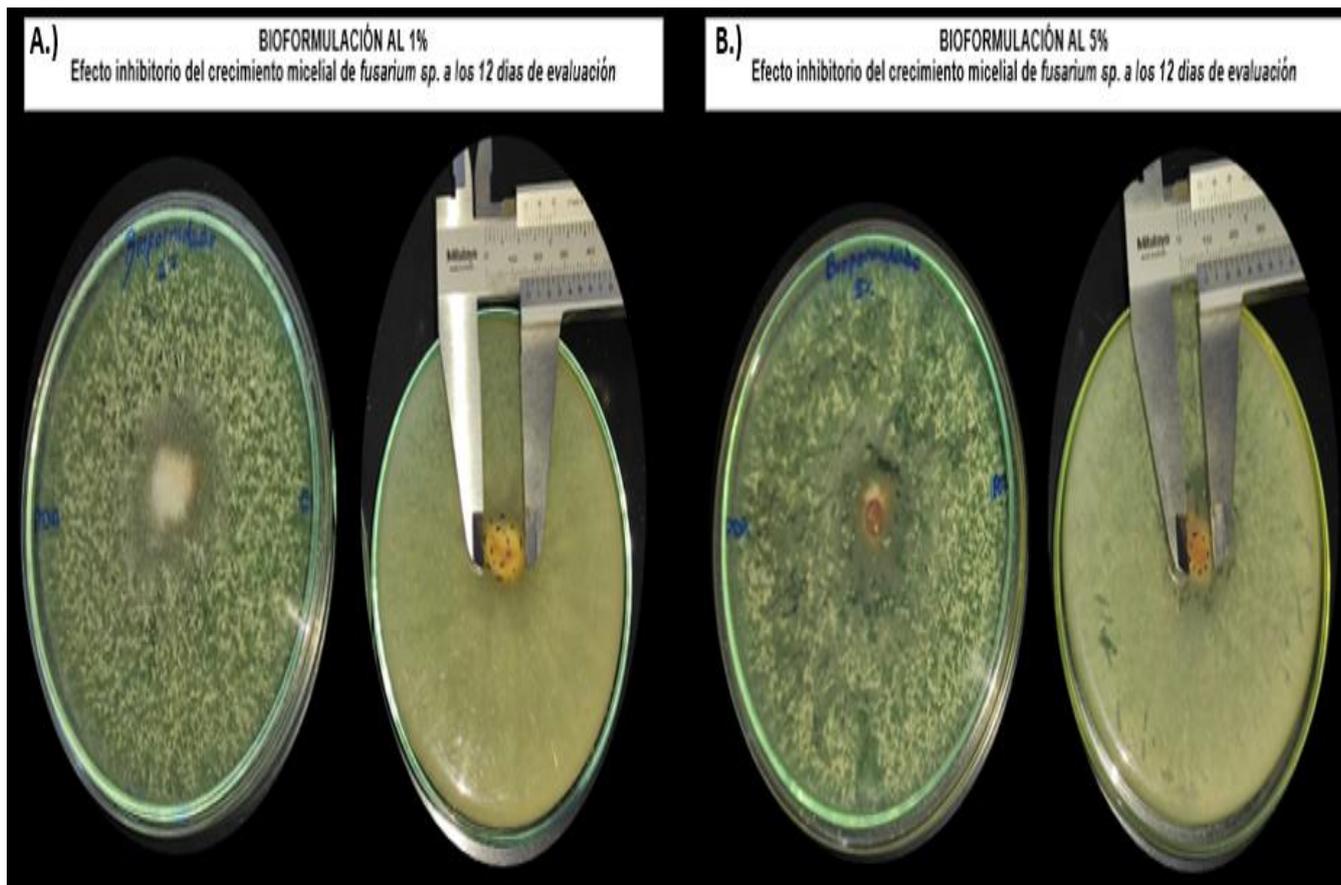
**Tabla 12:** Porcentaje del crecimiento micelial de *Fusarium sp.* a los 12 días de evaluación.

% Crecimiento micelial de <i>Fusarium sp.</i>			
Días	T0 (Testigo)	T1 (Bioformulación 1%)	T2 (Bioformulación 5%)
3	31%	27%	10%
6	68%	21%	6%
9	88%	13%	0%
12	100%	11%	0%

*Porcentaje: crecimiento micelial de Fusarium sp.*



**Figura 9:** Porcentaje del crecimiento micelial de *Fusarium sp.* a los 12 días de evaluación.



**Figura 10:** Medición del crecimiento micelial de *fusarium sp* para determinar el efecto inhibitorio de la bioformulación a los 12 días de evaluación. **A:** Tratamiento de la Bioformulación al 1%, **B:** Tratamiento de la Bioformulación al 5%.

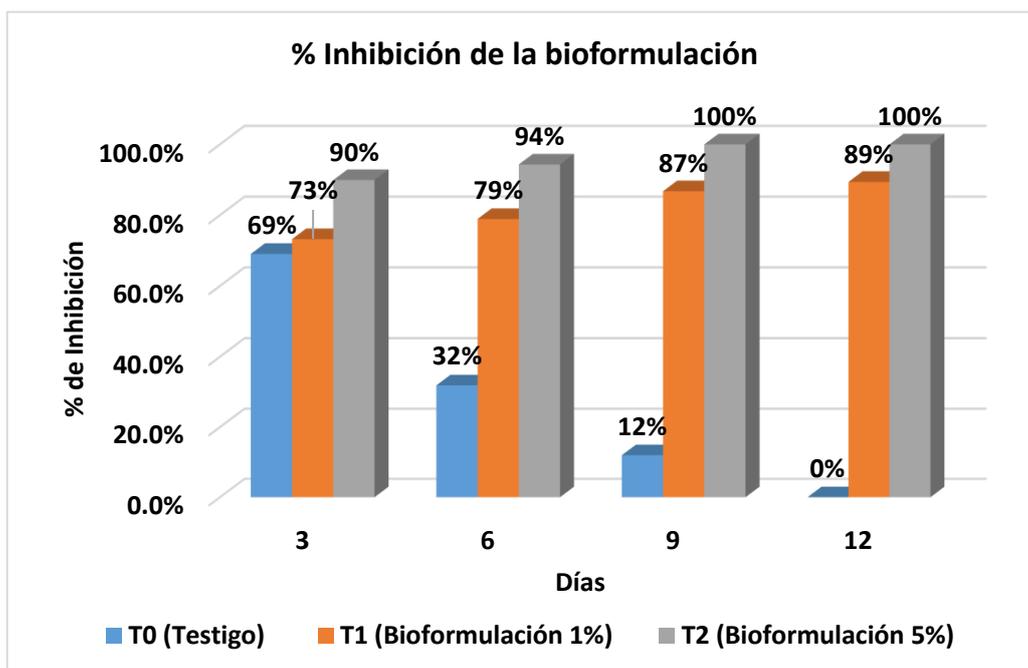
Para determinar el efecto inhibitorio de la bioformulación a base de *Trichoderma sp.* se realizó mediciones a lo largo del tiempo y como se aprecia en la tabla 13 y en la figura 12 la bioformulación logra controlar el crecimiento de *Fusarium sp.* utilizando una concentración al 1% y 5% de la bioformulación.

A los 6 días la concentración al 5% de la bioformulación de *Trichoderma sp.* llega a inhibir el crecimiento de *Fusarium sp.*, en un 94.3% a comparación de la concentración al 1% donde se logró una inhibición 78.9%. Estos resultados se asemejan a los obtenidas por Michel (2009) donde, a pesar de que se les dieron tres días de ventaja por su crecimiento lento a *Fusarium*, se observó que *Trichoderma* se comportó como agresivo.

Por lo tanto, podemos indicar que la bioformulación inhibirá el crecimiento micelial de *Fusarium sp.* en ambas concentraciones de la bioformulación debido que mostraron valores significativos (tabla 27; figura 17).

**Tabla 13:** Porcentaje de inhibición de la bioformulación sobre el crecimiento de *fusarium sp.*

% de inhibición de la bioformulación			
Días	T0 (Testigo)	T1 (Bioformulación 1%)	T2 (Bioformulación 5%)
3	69%	73%	90%
6	32%	79%	94%
9	12%	87%	100.0%
12	0.0%	89%	100.0%



**Figura 11:** Porcentaje de inhibición de la bioformulación a base de *Trichoderma sp.* frente al crecimiento de *Fusarium sp.*

## V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. Conclusiones

- Los ensayos realizados confirman que el proceso de fermentación en estado sólido permitió el óptimo crecimiento de *Trichoderma sp.* a las 72 h de FES a razón de 50 g del material lignocelulósico más 5% de melaza (sustrato/soporte), obteniendo  $9.05E+10$  conidios/ g de sustrato después de 14 días.
- Bajo las condiciones evaluadas en el proceso de fermentación en estado sólido se concluyó que la disponibilidad de  $A_w$  al 0.75 y una humedad al 85% permitió una buena esporulación de *Trichoderma sp.* en los diferentes tiempos de remojo.
- Se preparó una bioformulación a base de *Trichoderma sp.* de la fermentación en estado sólido con concentraciones de  $10^{10}$  conidios/ mL. Los resultados del análisis estadístico demostraron que existe efecto significativo ( $P<0.05$ ) de la bioformulación frente al crecimiento micelial de *Fusarium sp.* al trabajar a concentraciones al 1% y 5% resaltando el efecto inhibitorio que tiene la bioformulación al 5%.

### 5.2. Recomendaciones

- Sería muy útil para nosotros proyectar el producto en el mercado a nivel nacional de manera que se propague la utilización de productos agrícolas amigables con el ambiente evitando la contaminación ambiental y preservando la salud humana.
- Se recomienda la utilización del sustrato peladilla de espárrago para el crecimiento de otros hongos entomopatógenos ya que resultó óptimo para el crecimiento del hongo *Trichoderma sp.* siendo utilizado no solo como soporte sino también como fuente de carbono, vitaminas y fósforo, sería muy útil profundizar su estudio.
- Se recomienda trabajar la bioformulación en el campo para poder determinar con más exactitud su eficacia en el control fitopatógeno.
- Profundizar en el mecanismo de acción que tiene *Trichoderma sp.* contra *Fusarium sp.*, estudiar los metabolitos secundarios encargados de la acción inhibitoria sobre el hongo fitopatógeno.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y VIRTUALES

Aguirre Ótalora, N. del P. (2006). Determinación Del Efecto De Algunas Fuentes De Carbono Y Nitrógeno, Del Ph Y De La Actividad De Agua Sobre El Desarrollo De *Nomuraea Rileyi*. [Tesis de Pregrado]. Pontificia Universidad Javeriana. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10554/8271>

Almacaña, D. (2010). Preparación de Bioformulaciones a base de *Trichoderma harzianum* Rifai para el control biológico de *Sigatoka negra* (*Mycosphaerella fijiensis* var. *Difformis* Morelet) en banano (*Musa acuminata* Colla). [Tesis de Pregrado]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Recuperado de: <http://biblioteca.esPOCH.edu.ec/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=44769>

Arias, E., Piñeros, P. (2008). Aislamiento E Identificación De Hongos Filamentosos De Muestras De Suelo De Los Paramos De Guasca Y Cruz Verde. [Tesis de Pregrado]. Pontificia Universidad Javeriana. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10554/8233>

Bardales, C. (2011). Producción De Bioetanol Del Desecho Lignocelulósico "Peladilla" De *Asparagus officinalis* L. "Espárrago" Por *Candida utilis* Var. Major. [Tesis de Pregrado]. Universidad Cesar Vallejo. Recuperado de: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/5911>

Bravo, J., Farto J. (2007). Creación de una empresa de producción de espárrago para su comercialización en los Estados Unidos. [Tesis de posgrado]. Universidad San Francisco De Quito. Repositorio digital <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/812>

Bio Baro Sure Gold (2016). Fusarium, Fungicida y bactericida sistémico. <http://biobaro.com/contenido/pag%20suregold/ficha%20tecnica.pdf>

Urtubia H., Irina y France I., Andrés (2007). Formulaciones de hongos entomopatógenos para control de plagas en agricultura. Tierra Adentro. <https://hdl.handle.net/20.500.14001/6379>

Castro, R. (2015). Bioproducto A Base De Una Cepa Nativa De *Trichoderma harzianum* Rifai Para El Manejo De La *Sigatoka Negra* (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) En Bananeras Orgánicas. [Tesis Doctorado]. Universidad Central "Marta

Abreu” De Las Villas. Archivo  
<http://dspace.uclv.edu.cu:8089/handle/123456789/7000>

Castro R. (2015). Efecto de cepa ecuatoriana de *Trichoderma harzianum* Rifai como antagonista de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en condiciones de casa de cultivo. *Revista de Protección Vegetal*, 30(2), 133. Recuperado de <http://revistas.censa.edu.cu/index.php/RPV/article/view/577>

Arzate-Vega, J., Michel-Aceves, A. C., Domínguez-Márquez, V. M., & Santos-Eméstica, O. A. (2006). Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, Agente Causal de la Sigatoka Negra del Plátano (*Musa* sp.) in vitro e Invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(2), 98. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61224203>

Fajardo, E., Sarmiento, S. (2017). Evaluación De Melaza De Caña Como Sustrato Para La Producción De *Saccharomyces Cerevisiae* Otalora [Trabajo de Grado], Pontificia Universidad Javeriana. Recuperado de <http://hdl.handle.net/10554/8279>

Comercio Internacional (2012, julio). Producción De Espárrago Casmeño. <http://fernandocomerciointernacional.blogspot.com/2012/07/la-provincial-de-casma-en-la-region.ht>

Fajardo, E. Sarmiento, S. (2007). Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *saccharomyces cerevisiae*. [Proyecto de investigación]. Pontificia Universidad Javeriana. Disponible en: <https://1library.co/document/dzx5drwq-evaluacion-melaza-cana-sustrato-produccion-saccharomyces-cerevisiae.html>.

Guilcapi, G. (2016). Determinación De La Estabilidad Y Viabilidad De *Trichoderma Harzianum* Rifai En Cinco Sustratos Usados Para La Elaboración De Un Biofungicida En Formulación Líquida. [Tesis de pregrado]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/4956>

Juan de Dios. P. (2013) Efectividad in vitro de cepas de *Trichoderma* spp. en la supresión del crecimiento micelial de fitopatógenos de suelo. [Proyecto de investigación]. Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. Disponible en: <http://www.sodiaf.org.do/congreso2013/memoria/orales/06.pdf>

Hernández, Alexander, Jiménez, María, Arcia, Asdrúbal, Ulacio, Dilcia, & Méndez, Naileth. (2013). Caracterización molecular de doce aislamientos de *Trichoderma* spp.

mediante rapd y rADN-ITS. *Bioagro*, 25(3), 167-174. Recuperado de: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1316-33612013000300003&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612013000300003&lng=es&tlng=es).

Hernández, M. J. L.; Sánchez, P. M. I.; García, O. G. J.; Mayek, P. N.; González, P. J. M. y Quiroz, V. J. di C (2011) Caracterización molecular y agronómica de aislados de *Trichoderma* spp. nativos el noreste de México. *Rev. Colomb. Biotecnol.* XIII (2):176-185. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77621587017>

Martínez Benedicto, Jesús Pérez, danay Infante, Yanisia Duarte, Martha Moreno (2013) Antagonismo de aislamientos de *Trichoderma* spp. frente a *Didymella bryoniae*. *Revista Protección Vegetal.* 28 (3), 192-198. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/publication/260839347\\_Antagonismo\\_de\\_aislamientos\\_de\\_Trichoderma\\_spp\\_frente\\_a\\_Didymella\\_bryoniae\\_Fuckel\\_Rehm](https://www.researchgate.net/publication/260839347_Antagonismo_de_aislamientos_de_Trichoderma_spp_frente_a_Didymella_bryoniae_Fuckel_Rehm)

Michel, A., Otero, M., Martínez, R., Rodríguez, N., Arizaflores, R., Barrios, A. (2008). Producción Masiva De *Trichoderma Harzianum* Rifai En Diferentes Sustratos Orgánicos. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 14(1). 185-191. Recuperado de: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1027-152X2008000200012](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2008000200012)

Monzón, A., (2011). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Revista Manejo integrado de plagas*, 63(6), 95–103. Recuperado de: <http://www.bio-nica.info/biblioteca/Monzon2001HongoEntomopatogenos.pdf>

Muñoz, K. (2015). Difusión de la importancia del consumo del esparrago en el Perú para su mayor comercialización. [Proyecto de investigación]. Universidad cesa vallejo. Disponible en: <https://es.slideshare.net/karolmunozsagastegui/karol-muoz-proyecto-de-computo-i>.

Ramírez, S. (2012). Aprovechamiento de residuos Agroindustriales, cascarilla de arroz (*Oriza sativa*) y residuos de papa (*Solanum tuberosum*) para la producción de *Trichoderma* spp. [Tesis de pregrado]. Universidad Técnica de Ambato. Disponible en: <http://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/3063>

Serpa, M. (2015). Eficiencia de crecimiento del hongo *trichoderma harzianum rifai* para la producción de bioplaguicida, aprovechando el residuo agroindustrial de

cáscara de haba (*vicia faba* L.) [Tesis de pregrado]. Escuela superior politécnica de Chimborazo. Recuperado de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/4864>

Tanzini, M.; Batista, S.; Gallegos, M., Shield, B. (2011). Compatibilidad de agentes Tensoactivos con *Beauveria bassiana* y *Metharizium anisopliae*. *Revista Manejo Integrado de Plagas*. 154(3), 15-18. Recuperado de: <https://pdfs.semanticscholar.org/fcf4/e088cdd751957870184f459bd1e893562200.pdf>

Tellez, D. 2004. Caracterización de las melazas empleadas en el proceso fermentativo de la destilería San Martín- Industria de Licores del Valle. [Tesis de pregrado] Universidad del Valle. Recuperado de: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8279/tesis26.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Tovar, J. (2008). Evaluación De La Capacidad Antagonista "In Vivo" De Aislamiento De *Trichoderma Spp*" Frente Al Hongo Fitopatógeno *Rhizoctonia Solani*, [Tesis de pregrado]. Universidad Javeriana. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10554/8951>

Villa, R., Morales, M., Soto, E. (2014). Situación actual en el control de *Fusarium spp.* y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Revista Acta Agronómica*, 64(2). 194-205. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/1699/169933767011.pdf>

## VII. ANEXOS

### Anexo 1: Métodos experimentales

Datos del inóculo: Con estas fórmulas se puede determinar la cantidad de conidios tanto en mL como en gr de sustrato.

- **Volumen de la cámara de Neubauer**

$$V = A \times b$$

$$V = 0,2 \text{ mm} \times 0,2 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm}$$

Conidios contados
$\text{N}^\circ \text{ de conidios/mm}^3 = \frac{\text{Superficie contada. (mm}^2\text{) x profundidad (mm) x dilución}}{\text{Conidios contados}}$

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

- **Numero de conidios contenidos en 1 mL**

$$\text{Número de conidios observados} = \frac{\text{conidios contados}}{\text{N}^\circ \text{ cuadrados}} 4 \times 10^6 \text{ ml}$$

Como se muestra en la tabla 8 para determinar los datos de la concentración de conidios/mL se realizó el recuento en la cámara de Neubauer, cabe mencionar que el promedio de los 4 cuadrantes y se multiplico  $4 \times 10^6$  para determinar la concentración final.

- **Numero de conidios contenidos en W gramos de sustrato**

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

$$\frac{\text{N. conidios}}{\text{gde sustrato}} = \frac{x \frac{\text{conidios}}{\text{ml} * \text{vol}}}{w \text{ muestra}}$$

Esta fórmula nos permitió determinar la concentración por gramo de sustrato tal como se presenta en la tabla 19.

**Anexo 2:** Procedimiento para la determinación de azúcares reductores en la fermentación.

- **Hidrólisis de la sacarosa**

Inicialmente, se realizó la curva patrón de sacarosa preparando una concentración Stock de 1/10. A partir de esta solución se prepararon diferentes concentraciones para obtener la curva patrón. Posteriormente, se tomó 2 mL de cada una de las concentraciones y se adicionó 2 mL de HCl al 20% (w/v) con dilución 1/2. Los tubos fueron agitados en vórtex y calentados a 92 °C durante 10 minutos. La reacción se frenó en hielo. Posteriormente, se adicionaron tres gotas de fenoftaleína cada una de las muestras, luego NaOH al 25% (p/v) (aproximadamente 2.02 mL) hasta obtener un tono ligeramente rosado.

Por último, se adicionó HCl al 5% (v/v) (aproximadamente 0.6 mL), este proceso se realizó porque en presencia de HCl y en caliente, la sacarosa se hidroliza, es decir, incorpora una molécula de agua y se descompone en los monosacáridos que la forman, glucosa y fructosa. y por último se agitó nuevamente en vórtex (Godoy, 2002; ICONTEC, 1994).

- **Técnica del Ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS)**

Después de la etapa de hidrólisis, se procedió con el protocolo para llevar a cabo la técnica de determinación de azúcares reductores por el método de DNS para lo cual se realizó diluciones 1/100 a 0.5 mL de la solución hidrolizada se agregaron 0.5 mL del reactivo DNS, los tubos fueron calentados en ebullición durante 5 minutos. Posteriormente, se frenó la reacción con hielo. Se adicionaron 5 mL de agua destilada, se agitó en vórtex y se realizó la lectura de densidad óptica (D.O) a 540 nm para cada tubo (Miller, 1959).

**Anexo 3:** Evaluación de la actividad de agua en cada sistema de fermentación en estado sólido.

**Tabla 14:** Esquema de Tabla de datos de Aw.

Muestras	Aw
Fermentación 24 h	##
Fermentación 48 h	##
Fermentación 72 h	##



**Figura 12:** Esquema de grafica de Aw.

Fuente: Elaboración propia - Manual de Agroindustrial UNS.

**Anexo 4:** Para determinar la humedad en cada sistema de fermentación en estado sólido se procedió a realizar la siguiente tabla.

Cálculo de % Humedad:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_i - P_f}{W} * 100$$

Donde:

Pi = Peso de la placa más muestra húmeda.

Pf= Peso de la placa más muestra seca.

W= Peso de la muestra

**Tabla 15:** Tabla de datos para la construcción de la humedad

N° TIEMPO	Peso de placa (g)	Peso de la muestra (g)	Peso de placa + Masa inicial (g)	Peso de placa + Masa final (g)	% H. en base húmeda	% H. en base seca
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-

Fuente: Elaboración propia

LEYENDA:

Masa inicial: Muestra al inicio de la fermentación

Masa final: Muestra al final de la fermentación

**Tabla 16:** Evaluación inicial de la humedad en el tiempo de fermentación de estado sólido.

FERMENTACIÓN EN ESTADO SOLIDO		Peso de placa (g)	Peso de la muestra (g)	Peso de placa + Masa inicial (g)	Peso de placa + Masa final (g)	% H. en base húmeda	% H. en base seca
R1	24 H	45.143	5	50.143	46.032	100	82.22
	48 H	41.6734	5	46.6734	42.532	100	82.828
	72 H	49.2358	5	54.2358	50.103	100	82.656
R2	24 H	49.9205	5	54.9205	50.628	100	85.85
	48 H	34.4819	5	39.4819	35.186	100	85.918
	72 H	51.1818	5	56.1818	52.0215	100	83.206
R3	24 H	43.8482	5	48.8482	44.622	100	84.524
	48 H	35.3721	5	40.3721	36.214	100	83.162
	72 H	49.3473	5	54.3473	50.124	100	84.466

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 17:** Evaluación final de la humedad en el tiempo de fermentación de estado sólido del día 14.

FERMENTACIÓN EN ESTADO SOLIDO		Peso de placa (g)	Peso de la muestra (g)	Peso de placa + Masa inicial (g)	Peso de placa + Masa final (g)	% H. en base húmeda	% H. en base seca
R1	24 H	38.124	5	43.124	38.853	100	85.42
	48 H	45.632	5	50.632	46.241	100	87.82
	72H	38.321	5	43.321	38.9218	100	87.984
R2	24 H	41.6565	5	46.6565	42.2414	100	88.302
	48 H	48.0032	5	53.0032	48.5319	100	89.426
	72 H	39.344	5	44.344	39.9218	100	88.444
R3	24 H	42.654	5	47.654	43.385	100	85.38
	48 H	37.532	5	42.532	38.319	100	84.26
	72 H	39.632	5	44.632	40.348	100	85.68

Fuente: Elaboración propia

**Anexo 5: Evaluación de crecimiento:** Para determinar los datos se siguió los parámetros y criterios de evaluación detallados en la tabla 6 donde se especifica:

- Numero de generaciones:
  - En donde:  $n = \frac{\ln N - \ln N_0}{\ln 2}$
  - N= Número de conidios/g final.
  - No= Numero de conidios/g inicial

**Tabla 18:** Evaluación de parámetros y criterios de crecimiento de *Trichoderma sp.* en la fermentación de estado sólido del día 14.

<b>CRECIMIENTO DE <i>Trichoderma sp.</i></b>						
	<b>COMPOSICIÓN</b>	<b>14 DIAS</b>	<b>n</b>	<b>g(h<sup>-1</sup>)</b>	<b>μ Conidios/(h<sup>-1</sup>)</b>	
<b>REPLICA 1</b>						
<b>24 H</b>	5% - 30g	1.5 mL: 30 g	7.88E+10	13.701	10.510	0.066
	5% - 40g	2 mL: 40 g	7.88E+10	13.701	10.510	0.066
	5% - 50g	2.5 mL: 50 g	7.88E+10	13.701	10.510	0.066
<b>48H</b>	5% - 30g	1.5 mL: 30 g	7.88E+10	13.701	10.510	0.066
	5% - 40g	2 mL: 40 g	7.88E+10	13.701	10.510	0.066
	5% - 50g	2.5 mL: 50 g	7.88E+10	13.701	10.510	0.066
<b>72 H</b>	5% - 30g	1.5 mL: 30 g	7.88E+10	13.701	10.510	0.066
	5% - 40g	2 mL: 40 g	7.88E+10	13.701	10.510	0.066
	5% - 50g	2.5 m : 50 g	7.88E+10	13.701	10.510	0.066
<b>REPLICA 2</b>						
<b>24 H</b>	5% - 30g	1.5 mL: 30 g	8.25E+10	13.767	10.460	0.066
	5% - 40g	2 mL: 40 g	8.49E+10	13.808	10.428	0.066
	5% - 50g	2.5 mL: 50 g	8.70E+10	13.843	10.403	0.067
<b>48H</b>	5% - 30g	1.5 mL: 30 g	8.63E+10	13.831	10.411	0.067
	5% - 40g	2 mL: 40 g	8.17E+10	13.752	10.471	0.066
	5% - 50g	2.5 mL: 50 g	8.86E+10	13.869	10.383	0.067
<b>72 H</b>	5% - 30g	1.5 mL: 30 g	8.50E+10	13.810	10.428	0.066
	5% - 40g	2 mL: 40 g	8.72E+10	13.847	10.399	0.067
	5% - 50g	2.5 mL: 50 g	9.05E+10	13.900	10.360	0.067
<b>REPLICA 3</b>						
<b>24 H</b>	5% - 30g	1.5 mL: 30 g	8.18E+10	13.754	10.470	0.066
	5% - 40g	2 mL: 40 g	8.18E+10	13.754	10.470	0.066
	5% - 50g	2.5 mL: 50 g	8.43E+10	13.798	10.437	0.066
<b>48H</b>	5% - 30g	1.5 mL: 30 g	8.50E+10	13.810	10.428	0.066
	5% - 40g	2 mL: 40 g	8.42E+10	13.797	10.437	0.066
	5% - 50g	2.5 mL : 50 g	8.78E+10	13.857	10.392	0.067
<b>72 H</b>	5% - 30g	1.5 mL: 30 g	8.55E+10	13.819	10.421	0.067
	5% - 40g	2 mL: 40 g	8.64E+10	13.834	10.409	0.067
	5% - 50g	2.5 mL: 50 g	8.91E+10	13.878	10.496	0.067

**Anexo 6:** Crecimiento de *Trichoderma sp.* en la fermentación en estado sólido.

**Tabla 19:** Evaluación de la fermentación en estado sólido de *Trichoderma sp.* en el tiempo.

Muestra/ días	CONTEO (PRO)	Vol. CN	N° en 0.5mL	N° 1g sustrato	N° 50 g sustrato
2	46.4	0.00000 4	11600000	116000000	5.80E+09
4	48.3	0.00000 4	12075000	120750000	6.04E+09
6	49.2	0.00000 4	12300000	123000000	6.15E+09
8	50	0.00000 4	12500000	125000000	6.25E+09
10	52.4	0.00000 4	13100000	131000000	6.55E+09
12	54.8	0.00000 4	13700000	137000000	6.85E+09
14	82	0.00000 4	20500000	205000000	1.03E+10
16	84.8	0.00000 4	21200000	212000000	1.06E+10
18	83.9	0.00000 4	20975000	209750000	1.05E+10
20	81.2	0.00000 4	20300000	203000000	1.02E+10
22	81.2	0.00000 4	20300000	203000000	1.02E+10
24	77.4	0.00000 4	19350000	193500000	9.68E+09
26	75	0.00000 4	18750000	187500000	9.38E+09
28	62.4	0.00000 4	15600000	156000000	7.80E+09

Fuente: Elaboración propia

**LEYENDA:**

CONTEO (PRO): Conteo de conidios de *Trichoderma sp.* (promedio)

Vol. CN: Volumen de Conidios

N° en 0.5mL: Numero de conidios de *Trichoderma sp.* en 0.5 mL

N°1g de substrato: Número de conidios de *Trichoderma sp.* en 1 g de substrato

N°50 g substrato: Número de conidios de *Trichoderma sp.* en 50 g de substrato

**Tabla 20:** Crecimiento de *Trichoderma sp.* en la fermentación en estado sólido en las 3 réplicas realizadas a los 14 días de incubación.

CRECIMIENTO De <i>Trichoderma sp</i>				14 DIAS conidios/g sustrato		
COMPOSICIÓN MELAZA: ESPARRAGO				R1	R2	R3
<b>REPLICA 1</b>	<b>24 H</b>	5% - 30 g	1.5 mL: 30 g	8.24E+10	8.47E+10	6.94E+10
		5% - 40 g	2 mL: 40 g	8.18E+10	7.29E+10	6.35E+10
		5% - 50 g	2.5 mL: 50 g	8.37E+10	8.53E+10	7.49E+10
	<b>48H</b>	5% - 30 g	1.5 mL: 30 g	8.57E+10	8.49E+10	7.53E+10
		5% - 40 g	2 mL: 40 g	8.52E+10	8.38E+10	6.98E+10
		5% - 50 g	2.5 mL: 50 g	8.66E+10	8.76E+10	8.63E+10
	<b>72 H</b>	5% - 30g	1.5mL: 30 g	8.47E+10	8.49E+10	8.58E+10
		5% - 40g	2 mL: 40 g	8.56E+10	8.95E+10	8.46E+10
		5% - 50g	2.5mL: 50 g	8.71E+10	8.86E+10	8.66E+10
<b>REPLICA 2</b>	<b>24 H</b>	5% - 30 g	1.5mL: 30 g	8.45E+10	8.37E+10	7.94E+10
		5% - 40 g	2 mL: 40 g	8.61E+10	8.52E+10	8.35E+10
		5% - 50 g	2.5mL: 50 g	8.87E+10	8.73E+10	8.49E+10
	<b>48H</b>	5% - 30 g	1.5mL: 30 g	8.87E+10	8.48E+10	8.53E+10
		5% - 40 g	2 mL: 40 g	7.93E+10	7.88E+10	8.69E+10
		5% - 50 g	2.5mL : 50 g	8.96E+10	8.86E+10	8.75E+10
	<b>72 H</b>	5% - 30 g	1.5mL: 30 g	8.34E+10	8.58E+10	8.58E+10
		5% - 40 g	2 mL: 40 g	8.46E+10	9.15E+10	8.56E+10
		5% - 50 g	2.5mL: 50 g	8.75E+10	9.63E+10	8.76E+10
<b>REPLICA 3</b>	<b>24 H</b>	5% - 30 g	1.5mL: 30 g	8.12E+10	8.27E+10	8.14E+10
		5% - 40 g	2 mL: 40 g	8.21E+10	8.35E+10	7.98E+10
		5% - 50 g	2.5mL: 50 g	8.17E+10	8.43E+10	8.69E+10
	<b>48H</b>	5% - 30 g	1.5mL: 30 g	8.47E+10	8.45E+10	8.58E+10
		5% - 40 g	2 mL: 40 g	8.14E+10	8.48E+10	8.65E+10
		5% - 50 g	2.5 mL: 50 g	8.72E+10	8.76E+10	8.87E+10
	<b>72 H</b>	5% - 30 g	1.5 mL: 30 g	8.41E+10	8.57E+10	8.68E+10
		5% - 40 g	2 mL: 40 g	8.39E+10	8.95E+10	8.59E+10
		5% - 50 g	2.5 mL: 50 g	8.54E+10	9.23E+10	8.96E+10

Fuente: Elaboración propia

**Anexo 6:** Desarrollo de la bioformulación a partir de *Trichoderma sp.*

Como se indica anteriormente se procedió a preparar la bioformulación con diferentes concentraciones de adyuvantes los cuales ayudaran a la conservación de la bioformulación.



**Figura 13:** Preparación de la bioformulación liquido; a) Extracto de maíz + 5% de melaza. b y c) Concentración de adyuvantes + 250 mL de Tween 80 al 0.1% d) Crecimiento de *Trichoderma sp.* cultivado en FES. E y f) Lavado con Tween 80 al 0.1% a los frascos.

**Tabla 21:** Cuantificación y viabilidad de conidios en la bioformulación a partir de la FES de *Trichoderma sp.*

<b>Bioformulado de <i>Trichoderma sp.</i> a base de una fermentación en estado solido</b>										
	<b>Replica 1 Número de conidios/mL</b>			<b>Replica 2 Número de conidios/mL</b>			<b>Replica 3 Número de conidios/mL</b>			
<i>D</i>	24 H	48 H	72 H	24 H	48 H	72 H	24 H	48 H	72 H	
1	7.932	8.423	8.462	7.723	8.242	8.423	8.123	8.324	8.343	
4	8.192	8.435	8.652	7.832	8.423	8.432	8.195	8.423	8.396	
8	8.395	8.522	8.82	8.143	8.498	8.621	8.241	8.391	8.423	
12	8.482	8.724	9.134	8.352	8.601	8.691	8.261	8.464	8.513	
16	8.789	8.789	9.421	8.543	8.698	8.723	8.312	8.502	8.595	
20	8.935	8.893	9.543	8.592	8.724	8.773	8.401	8.532	8.616	
24	9.134	9.325	9.624	8.752	8.743	8.802	8.494	8.592	8.634	
28	8.842	9.183	9.601	8.763	8.714	8.793	8.482	8.602	8.631	
32	8.812	9.132	9.589	8.694	8.692	8.754	8.415	8.586	8.501	

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 22:** Crecimiento de micelio de *Fusarium sp.* durante 12 días de evaluación a diferentes concentraciones de la bioformulación

CRECIMIENTO DE MICELIO DE <i>Fusarium sp.</i>									
DÍA DE EVALUACIÓN	REPLICA 1 Crecimiento radial/cm			REPLICA 2 Crecimiento radial/cm			REPLICA 3 Crecimiento radial/cm		
	0%	1%	5%	0%	1%	5%	0%	1%	5%
<b>3</b>	2.8	1.8	0.8	1.4	2.3	0.7	2.9	2	<b>0.8</b>
<b>6</b>	4.7	1.3	0.4	4.3	1.9	0.4	6.6	1.6	<b>0.5</b>
<b>9</b>	6.8	0.7	0	5.9	1.5	0	7.42	0.8	<b>0</b>
<b>12</b>	7.6	0.5	0	7.4	1.3	0	7.83	0.6	<b>0</b>

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 23:** Porcentaje del crecimiento micelial de *Fusarium sp* durante 12 días de evaluación a diferentes concentraciones de la bioformulación en porcentaje

DÍA DE EVALUACIÓN	CRECIMIENTO DE MICELIO DE <i>FUSARIUM SP</i> EN PORCENTAJE								
	REPLICA 1			REPLICA 2			REPLICA 3		
	0%	1%	5%	0%	1%	5%	0%	1%	5%
<b>3</b>	37%	24%	11%	19%	31%	9%	37%	26%	10%
<b>6</b>	62%	17%	5%	58%	26%	5%	84%	20%	6%
<b>9</b>	89%	9%	0%	80%	20%	0%	95%	10%	0%
<b>12</b>	100%	7%	0%	100%	18%	0%	100%	8%	0%

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 24:** Porcentaje de inhibición de la bioformulación frente al crecimiento micelial de *Fusarium sp.* durante 12 días de evaluación

DÍA DE EVALUACIÓN	% INHIBITORIO DE LA BIOFORMULACIÓN FRENTE AL CRECIMIENTO DE <i>FUSARIUM SP</i>								
	REPLICA 1			REPLICA 2			REPLICA 3		
	0%	1%	5%	0%	1%	5%	0%	1%	5%
<b>3</b>	63%	76%	89%	81%	69%	91%	63%	74%	90%
<b>6</b>	38%	83%	95%	42%	74%	95%	16%	80%	94%
<b>9</b>	11%	91%	100%	20%	80%	100%	5%	90%	100%
<b>12</b>	0%	93%	100%	0%	82%	100%	0%	92%	100%

Fuente: Elaboración propia

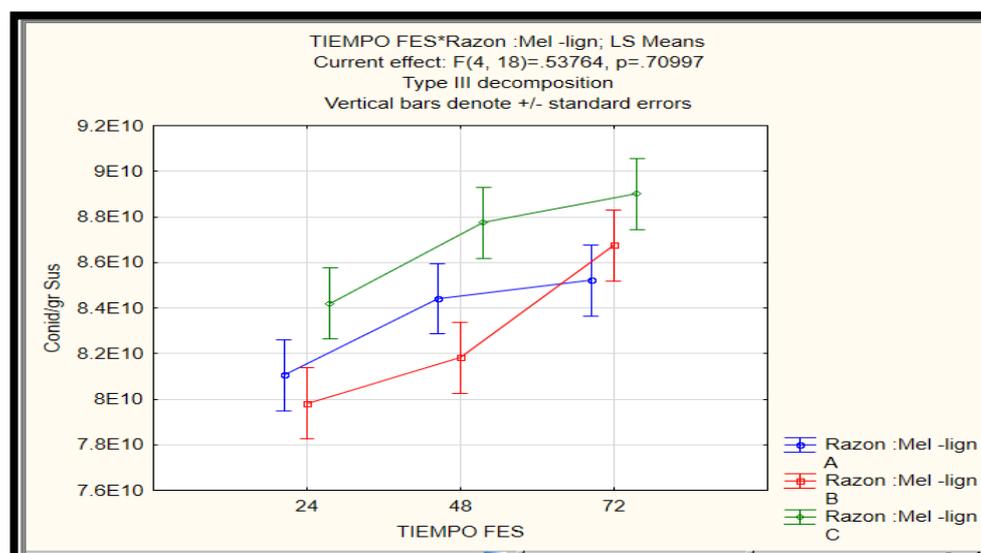
## Anexo 7: Análisis estadístico

- Producción de *Trichoderma sp.* por fermentación en estado sólido.

**Tabla 25:** Diseño Experimental Ax<sub>B</sub>; el Factor A y B con 3 niveles cada uno

Efecto	Grados de libertad	Conidios/g sustrato SS	Conidios/g sustrato MS	Conidios/g sustrato F	Conidios/g sustrato p
Intercepción	1	1.93E+23	1.93E+23	26419.28	0.000000
Tiempo FES	2	1.27E+20	6.36E+19	8.73	0.002240
Razón Mel/Lig	2	8.91E+19	4.46E+19	6.12	0.009401
Tiempo FES * Razón Mel/Lig	4	1.56E+19	3.92E+18	0.54	0.709967
Error	18	1.31E+20	7.29E+18		
Total	26	3.63E+20			

Fuente: Statistica 10.



**Figura 14:** Grafica de la variable dependiente (conidios/g) vs la variable independiente (tiempo).

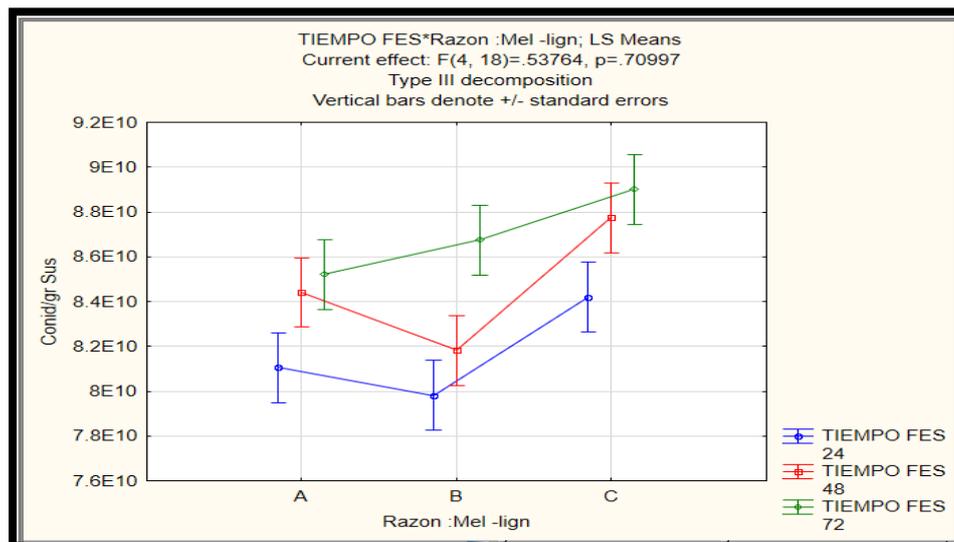


Figura 15: Grafica de la variable dependiente (conidios/g) vs la variable independiente (razón)

Tabla 26: Prueba de Tukey

Tukey HSD test; variable Conid/gr Sus (Spreadsheet5)											
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests											
Error: Between MS = 729E16, df = 18.000											
Cell No.	TIEMPO FES	Razon :Mel-lign	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}
1	24	A	8104E7	0.999657	0.873345	0.829054	0.999987	0.119962	0.624949	0.257767	0.040710
2	24	B	0.999657		0.573230	0.513042	0.989240	0.041946	0.316622	0.099865	0.013315
3	24	C	0.873345	0.573230		1.000000	0.971896	0.786465	0.999901	0.955490	0.454650
4	48	A	0.829054	0.513042	1.000000		0.953328	0.836121	0.999984	0.973407	0.513042
5	48	B	0.999987	0.989240	0.971896	0.953328		0.221455	0.824264	0.429342	0.081267
6	48	C	0.119962	0.041946	0.786465	0.836121	0.221455		0.958596	0.999923	0.999583
7	72	A	0.624949	0.316622	0.999901	0.999984	0.824264	0.958596		0.998337	0.731646
8	72	B	0.257767	0.099865	0.955490	0.973407	0.429342	0.999923	0.998337		0.978227
9	72	C	0.040710	0.013315	0.454650	0.513042	0.081267	0.999583	0.731646	0.978227	

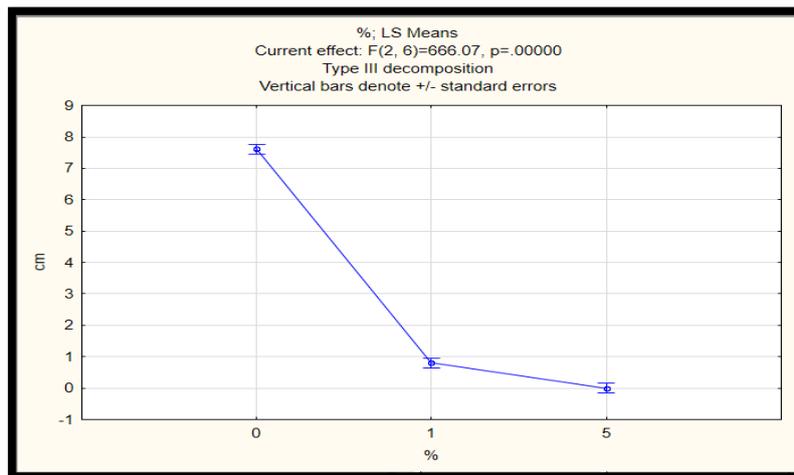
La prueba de Tukey nos mostró que hay valores significativos, es decir no todos los tratamientos realizados tienen semejanza, son diferentes estadísticamente.

- Efecto de la bioformulación a base de *Trichoderma sp.* sobre el crecimiento de *Fusarium sp.*

Tabla 27: Diseño completamente al azar (DCA) de un solo factor

Efecto	Grados de libertad	cm SS	cm MS	cm F	cm p
Intercepción	1	7.07E+01	7.07E+01	897.9446	0.000000
%	2	1.05E+02	5.25E+01	666.0698	0.000000
Error	6	4.73E-01	7.88E-02		
Total	8	1.05E+02			

Fuente: Statistica 10.



**Figura 16:** Gráfica de la variable dependiente (centímetro micelial) vs la variable independiente (porcentaje de la bioformulación).

La gráfica de valores donde nos muestra las diferencias significativas que hay en el crecimiento micelial con respecto a la concentración de la bioformulación.

**Tabla 28:** Test de homogeneidad de las varianzas

Prueba F-max	Prueba C/cochran	Chi cuadrado	df	p
cm	0.804063	-0.558698	1	1.000000

La varianza es homogénea en cada nivel, en cada tratamiento realizado entre la bioformulación y el crecimiento micelial la varianza es no significativa.

**Tabla 29:** Prueba de Tukey

Numero	%	(1) 7.6100	(2) 80000	(3) 0.0000
1	0		0.000227	0.000227
2	1	0.000227		0.030136
3	5	0.000227	0.030136	

Fuente: Statistica 10

La prueba de Tukey nos mostró que todos los valores son significativos, es decir no hay semejanza en ningún tratamiento realizado, son diferentes estadísticamente.

## Anexo 8: Evidencias del trabajo realizado



**Figura 17:** Cepas de *Trichoderma sp.* (izquierda) y *Fusarium sp.* (derecha).



**Figura 18:** A) Proceso de triturado en el mortero el material lignocelulósico la peladilla de espárrago. B-C) Distribución y autoclavado del material lignocelulósico (peladilla de espárrago) según el peso correspondiente en la fermentación en estado sólido.



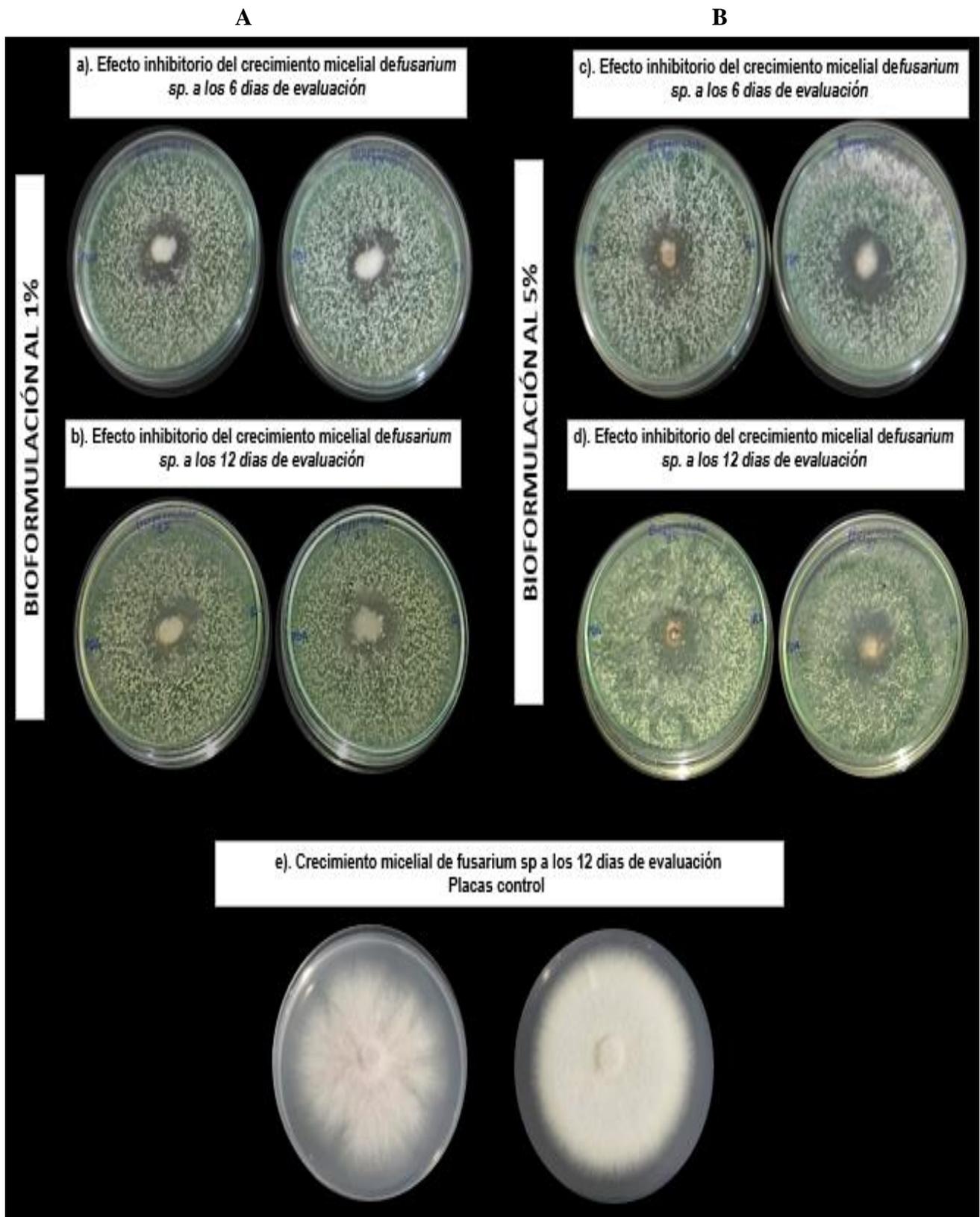
**Figura 19;** Crecimiento de *Trichoderma* sp. en la fermentación en estado sólido después de 14 días a incubación de 30°C.



**Figura 20:** Análisis de Aw al primer y último día.



**Figura 21:** Discos de *Fusarium* sp. en placas con medio PDA con 1 mL de la bioformulación al 1 y 5 %.



**Figura 22:** Efecto de la bioformulación a base de *Trichoderma* sp. a concentración de 1 y 5 % sobre el crecimiento micelial de *Fusarium* sp. a los 12 días de evaluación. A: Bioformulación al 1%, B: Bioformulación al 5%, C: Placas Control.