

## Evaluación de la colecta de esporas de *Trichoderma harzianum* Rifai desarrolladas sobre tres sustratos sólidos mediante lecho fluidizado y tamizaje vibratorio

### Assessment of harvest of *Trichoderma harzianum* spores Rifai developed on three solid substrates and collected by fluidized bed and by vibratory sieving

Orestes Elósegui Claro,<sup>1</sup> Elton George,<sup>2</sup> Orietta Fernández-Larrea Vega,<sup>3</sup> Cecilia Pérez Pérez<sup>4</sup> y Eduardo Laguardia Urrutia<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), Carretera Nacional Hoyo de la Puerta, Valle de Sartenejas, Caracas, Venezuela, bassi2609@yahoo.es

<sup>2</sup> Estudiante de Pregrado, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba, microbdoc@yahoo.com

<sup>3</sup> Investigadora independiente, orietta572002@yahoo.com

<sup>4</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP), Avenida Universidad Vía El Limón, Maracay, Venezuela, cperezen@gmail.com

<sup>5</sup> Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), Calle 110 no. 514, Playa, La Habana, Cuba, elaguardia@inisav.cu. Autor para correspondencia: bassi2609@yahoo.es

#### RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar para *Trichoderma harzianum* Rifai la colecta de esporas desarrolladas sobre tres sustratos sólidos mediante lecho fluidizado y ciclón dual y por tamizaje vibratorio. Los sustratos ensayados fueron grano de arroz descascarado y partido con cáscara de arroz (biopreparado B), grano de arroz partido sin descascarar (biopreparado C) y grano de arroz partido descascarado con arroz partido sin descascarar (biopreparado D). Se alcanzaron los mayores rendimientos de la colecta de esporas en el biopreparado de *T. harzianum* molido y separado por tamizaje. Los rendimientos de la colecta de esporas de los biopreparados de *T. harzianum* molidos y separados por lecho fluidizado y ciclón fueron menores que los ensayos con los biopreparados sin moler. El biopreparado D molido y tamizado fue el de mejor recobrado de esporas con el 86,8 %. El polvo colectado de esporas mostró en todos los tratamientos concentraciones mayores a 1000 000 000 conidios  $\cdot g^{-1}$  con valores de calidad microbiológicos internacionalmente aceptables, lo que permite usarlos en la formulación de bioplaguicidas del hongo. Los residuos generados tuvieron valores de calidad dentro del rango aceptable, por lo que estos se pueden comercializar. Estos resultados evidenciaron la importancia de la composición del sustrato para la eficiente separación de esporas directamente de biopreparados sólidos, los que tienen la ventaja de un mayor tiempo de vida en estante comparados con las esporas obtenidas por fermentación sumergida. Adicionalmente los métodos usados son el principio de funcionamiento de equipos en el mercado que permiten evaluar el escalamiento para la colecta de esporas.

Palabras claves: *Trichoderma*, bioplaguicida, spora, formulación.

#### ABSTRACT

The objective of this research was to assess for *Trichoderma harzianum* Rifai the spore harvest from three substrates by fluidized bed and cyclone and by vibratory sieving. The substrates assayed were mix of polished white rice and rice husk (Biopesticide B), unpolished broken rice (Biopesticide C) and polished broken rice plus broken unpolished rice (Biopesticide D). The greatest spore harvest yield was achieved by sieving the biopesticides previously milled. Contrary, the spore harvest yields for biopesticides processed by fluidized bed and cyclone were lower for the milled biopesticides. The biopesticide D, which was previously milled and sieved had the best yield with 86.8 % spore yield. The spore powder harvested showed internationally accepted microbiological quality parameters values and the spore concentrations resulted higher than 1000 000 000 conidia  $\cdot g^{-1}$  which allows to use it in fungi biopesticide formulation. The residues generated had accepted microbiological quality parameters values to commercialize. These results showed the importance of substrate composition for an efficient spore harvest from solid biopreparations. These spores have a longer shelf life compared to those obtained by submerged fermentation. In addition, the methods used here are the principles of operations of machines present in the market for assessing scaling-up for *Trichoderma* spore harvest.

Key words: *Trichoderma*, biopesticide, spore, formulation.

Recibido: 10/8/2014

Aceptado: 10/11/2014

## INTRODUCCIÓN

El mercado de bioplaguicidas ha mantenido un crecimiento acelerado, con ventas de 2100 millones de dólares en 2012, y se espera sean superiores a 3700 millones de para 2017 [BBCResearch, 2013]. Esto hace que se cuente con retos tecnológicos que impliquen una compatibilidad con los medios convencionales modernos en la agricultura, teniendo en cuenta a la vez que se usan organismos vivos como es el caso de los micoplaguicidas [Elósegui, 2006].

Las especies del género *Trichoderma* son usadas como biofungicidas agrícolas a nivel mundial. Desde 2006 el uso del hongo en biocontrol de hongos fitopatógenos supera el 90 % de los micoplaguicidas [Lorito, 2006].

La producción de *Trichoderma* para un gran escalado se realiza generalmente de forma sumergida, pero las esporas obtenidas no son apropiadas para almacenaje a mediano y largo plazos. El método más empleado en términos prácticos es la fermentación bifásica, donde se obtiene un producto concentrado de esporas sobre la superficie de un soporte sólido. Estas esporas son de gran calidad por la mayor sobrevida que logran en condiciones de almacenaje, así como mejor resistencia a la desecación, la luz solar y a las altas temperaturas en el momento de la aplicación [Watanabe *et al.*, 2006].

Para la obtención de un producto final económico y de fácil uso, es necesario un proceso de extracción y concentración de las esporas del sustrato sobre el que esporula el hongo [Bateman, 2013], si se tiene además en cuenta que la obtención de un formulado en polvo seco de *Trichoderma* ha mostrado gran estabilidad [Santos *et al.*, 2012]. El objetivo de este trabajo fue evaluar la colecta de esporas de *Trichoderma harzianum* Rifai producidas sobre tres sustratos sólidos mediante lecho fluidizado y ciclón dual, y por tamizaje vibratorio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluaron biopreparados con el hongo *Trichoderma harzianum* cepa A-34 completamente esporulado con una concentración de  $10^9$  esporas  $\cdot$  g<sup>-1</sup>. Los sustratos en los que se desarrollaron los biopreparados fueron:

- Grano de arroz descascarado y partido + cáscara de arroz (biopreparado B).
- Grano de arroz partido con cáscara (biopreparado C).
- Grano de arroz partido descascarado con arroz partido con cáscara (biopreparado D).

Los tratamientos consistieron en la separación y colecta de las esporas de cada biopreparado por dos métodos: lecho fluidizado y ciclón dual, y por tamizaje vibratorio, molidos previamente a la separación o sin moler. Para los tratamientos donde se evaluó la colecta por tamizaje vibratorio se usó una malla con tamaño de poro de 209  $\mu$ m. El tiempo de operación para cada tratamiento fue de 10 min y la masa inicial de 500 g del biopreparado por cada réplica (tres réplicas).

Para cada tratamiento se pesaron, luego de la separación de las esporas, la masa (m) de los residuos y del polvo de esporas colectado (g). Para la fracción conformada por el polvo de esporas colectado se le determinó la masa en balanza analítica (Sartorius). En una balanza técnica se determinó la masa (m) de los residuos generados en la separación de las esporas y la masa en el biopreparado inicial.

Se determinaron la concentración de esporas (Conc) por conteo directo (esporas  $\cdot$  g<sup>-1</sup>), la viabilidad de las esporas por su capacidad de germinación (%) y el nivel de contaminación por unidades formadoras de colonias contaminantes en placa) (UFC)  $\cdot$  g<sup>-1</sup> [Elósegui, 2005]. Se calculó el rendimiento según esporas recuperadas del biopreparado inicial como sigue:

### Rendimiento de esporas por cada experimento

Se obtuvo para cada fracción el número total de esporas contenidas en ella (N):

$$N = Conc \cdot m$$

El rendimiento ( $R_0$ ) (recobrado de esporas) final se calculó teniendo en cuenta a la fracción de polvo de esporas (pe) y al biopreparado inicial (biop):

$$R_0 = 100 \cdot N_{pe} / N_{biop}$$

También se calculó un rendimiento con respecto a las esporas totales contenidas en la fracción biopreparado molido (biopM) para los experimentos realizados con el biopreparado molido (Rm), para que se tuviera en cuenta la pérdida real de esporas al molerse este.

$$R_m = 100 \cdot N_{pe} / N_{biopM}$$

El valor del rendimiento fue el promedio calculado para las tres repeticiones de cada tratamiento.

Los datos fueron procesados estadísticamente usando el paquete estadístico Statgraphics Plus versión 5.0. Para los datos de rendimiento se realizó una prueba de homogeneidad de varianzas (Test de Bartlett) nivel de significación 95 %; se realizó una prueba de Chi cuadrado para comprobar el ajuste a una distribución normal de

los datos y luego se realizó un ANOVA de clasificación simple ( $p = 0,05$ ). Las medias se compararon mediante el test de rangos múltiples de Duncan (95 % confianza). Las medias con letras iguales no difieren estadísticamente.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El comportamiento en cuanto al recobrado de esporas (rendimiento) de cada biopreparado procesado fue diferente (Tabla 1). El sustrato y el método de separación jugaron un papel determinante en el recobrado de esporas.

**Tabla 1. Rendimiento de cada biopreparado desarrollado en cada sustrato sometido a separación por lecho fluidizado y tamizaje**

Biopreparado	Lecho fluidizado	Tamizaje
Sin moler		
Biopreparado B	48,3 cd	27,3 e
Biopreparado C	18,9 ef	42,1 d
Biopreparado D	15,7 fg	44,6 d
Molidos		
Biopreparado B	22,1 ef	66,4 b
Biopreparado C	4,6 h	57,5 c
Biopreparado D	9 gh	86,8 a

El rendimiento con respecto a la separación por lecho fluidizado fue mejor para el sustrato B (Tabla 2) con el 48,3 % de recobrado de las esporas contenidas en el biopreparado. Los otros dos sustratos ensayados tuvieron diferencias significativas con rendimientos muy bajos, que fue en el sustrato C del 18,9 %, y en el D del 15,7 %. Sin embargo, cuando la separación fue por tamizaje, el sustrato B tuvo un rendimiento del 27,3 %, el sustrato C del 42,1 % y el sustrato D fue el de mejor rendimiento con el 44,6 % (Tabla 3).

Al moler el biopreparado, el rendimiento cayó para la separación por lecho fluidizado, el sustrato B alcanzó el 22,1 % de esporas recobradas, el sustrato C el 4,6 % y el sustrato D el 9 %. Contrariamente, para la separación por tamizaje del biopreparado molido se elevaron los rendimientos. Para el sustrato B fue del 66,4 %, para el sustrato C del 57,5 % y para el sustrato D se obtuvo el mejor rendimiento de todos los ensayos con el 86,8% de las esporas recobradas (Tabla 4).

**Tabla 2. Separación por lecho fluidizado de esporas de *T. harzianum* del sustrato compuesto por grano de arroz descascarado y partido mezclado con cáscara de arroz (biopreparado B) sin moler**

Fracción	Masa (g ± ES)	Viabilidad (% ± ES)	Esporas (conidios • g <sup>-1</sup> ± ES)	Nivel de contamin. (ufc • g <sup>-1</sup> )	Esporas en la fracción
Biopreparado	500 ± 2,3	90,5 ± 0,8	1,3 x10 <sup>9</sup> ± 0,07	<10 <sup>5</sup>	6,5 x10 <sup>11</sup>
Residuo final arroz	416 ± 1,5	91,2 ± 0,64	2,5 x 10 <sup>8</sup> ± 2,5	<10 <sup>5</sup>	1,04 x10 <sup>11</sup>
Residuo final cáscara	50 ± 0,13	89,2 ± 0,5	1,69 x10 <sup>9</sup> ± 7,03	<10 <sup>5</sup>	8.45 x10 <sup>10</sup>
Polvo de esporas	6,25 ± 0,22	87,2 ± 0,46	5,8 x 10 <sup>10</sup> ± 3,25	<10 <sup>5</sup>	3,62 x 10 <sup>11</sup>
Rendimiento	–	–	–	–	48,3 %

ES: Error estándar Contamin.: Contaminación

**Tabla 3. Separación por tamizaje de esporas de *T. harzianum* del sustrato compuesto por grano de arroz partido descascarado y arroz partido con cáscara (biopreparado D) molido previamente**

Fracción	Masa (g ± ES)	Viabilidad (% ± ES)	Esporas (conidios • g <sup>-1</sup> ± ES)	Nivel de contamin. (UFC • g <sup>-1</sup> )	Esporas en la fracción
Biopreparado	500 ± 2	89,5 ± 0,75	1,19 x 10 <sup>9</sup> ± 0,07	<10 <sup>5</sup>	5,95 x 10 <sup>11</sup>
Residuo final	480 ± 2,7	89 ± 0,5	6,45 x 10 <sup>8</sup> ± 2,75	<10 <sup>5</sup>	3,1 x 10 <sup>11</sup>
Polvo de esporas	7,48 ± 0,07	86 ± 1,0	3,55 x 10 <sup>10</sup> ± 1,75	<10 <sup>5</sup>	2,65 x 10 <sup>11</sup>
Rendimiento	–	–	–	–	44,6%

ES: Error estándar Contamin.: Contaminación

**Tabla 4. Separación de esporas por tamizaje de biopreparado de *T. harzianum* desarrollado en sustrato D y molido previo a la separación**

Fracción	Masa (g ± ES)	Viabilidad (% ± ES)	Esporas (conidios • g <sup>-1</sup> ± ES)	Nivel de contamin. (UFC • g <sup>-1</sup> )	Esporas en la fracción
Biopreparado inicial	500 ± 3,35	74,2 ± 1,2	2,37 x 10 <sup>9</sup> ± 7,5	<10 <sup>5</sup>	1,18 x 10 <sup>12</sup>
Biopreparado molido	500 ± 2,25	80 ± 1,2	2,3 x 10 <sup>9</sup> ± 6,25	<10 <sup>5</sup>	1,15 x 10 <sup>12</sup>
Residuo final	440 ± 3,35	85 ± 1,6	4,75 x 10 <sup>8</sup> ± 1,25	<10 <sup>5</sup>	2,090 x 10 <sup>11</sup>
Polvo de esporas	58,70 ± 1,19	90 ± 2,0	1,7 x 10 <sup>10</sup> ± 6,25	<10 <sup>5</sup>	9,98 x 10 <sup>11</sup>
Rendimiento (Ro)	–	–	–	–	84,5 %
Rendimiento (Rm)	–	–	–	–	86,8 %

ES: Error estándar    Contamin.: Contaminación

El polvo de esporas colectado, así como todos los residuos, son útiles para comercializar de acuerdo con los valores de su viabilidad y concentraciones [Jenkins y Grzywacz, 2003]. Los residuos finales de arroz en todos los casos generados (siempre más de 440 g de residuos) tuvieron concentraciones entre 4-6 x 10<sup>8</sup> esporas • g<sup>-1</sup>, y una viabilidad mayor del 85 %, lo que los hace disponibles para ser comercializados localmente a precios más bajos que una formulación a partir del polvo de esporas.

El poder contar con un polvo concentrado de esporas permite ahorrar espacio de almacenaje en refrigeración, el cual consiente hacer diversas formulaciones del hongo según las necesidades de uso del bioproducto. Además, las esporas obtenidas en sustratos sólidos, a diferencia de las alcanzadas por fermentación sumergida, pueden sobrevivir mayor tiempo a temperatura de 5 °C y a humedad relativa del 5 %, lo que permite mayor disponibilidad del bioproductos en períodos de alta demanda. Adicionalmente estas esporas tienen mejor comportamiento ante factores abióticos del ambiente como la sequedad, la luz UV y la temperatura elevada [Sanyang *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 2006].

En este tipo de separación es importante la fricción que se genera entre las partículas del sustrato que se procesa a nivel microscópico, entre la superficie de cáscara de arroz del grano entero y la superficie del grano pulido de arroz blanco. La superficie externa de la cascarilla de arroz (exocarpo) se caracteriza por tener una estructura simétrica constituida por celdas convexas (presencia de papilas simples), las cuales están separadas por surcos y granos de compuestos de silicio dispersos sobre toda la superficie. También hay presencia de macropelos unicelulares con un tamaño promedio de 200 µm. El tamaño de los microfotolitos (cuerpos de

silíce) varía entre 2,2 y 7,5 µm, y el tamaño promedio de las superficies redondeadas y de los surcos está entre 50 x 45,64 y 21,52 µm, respectivamente. La superficie interna (endocarpo) de la cascarilla presenta celdas cóncavas con una distancia promedio de 46,98 µm entre ellas [Arcos *et al.*, 2007]. Esta arquitectura simétrica, pero no lisa, pudiera actuar como un rallador (efecto erosivo sobre otra superficie), desprendiendo mayor número de esporas en los sustratos C y D por colisiones frecuentes, y más fuertes con más alto rozamiento al tener ausencia de cáscara de arroz libre.

De los análisis anteriores queda claro que la extracción de las esporas de los biopreparados sólidos de *Trichoderma* y de otros hongos biocontroladores es un punto tecnológico necesario y crítico. El tamizado manual es un método bastante usado para pequeñas producciones artesanales, pero su reproducibilidad es baja, tiene elevados costos de mano de obra e impone riesgos a la salud del operario por la generación de aerosoles [Posada-Flórez, 2008].

En la producción de *Trichoderma* a mayor escala la presencia de equipos con principios de separación similares a los ensayados en este artículo, pero con versiones industriales, donde se procesarían mayores volúmenes de biopreparados con un aumento de la complejidad tecnológica, podrían usarse para evaluar estos métodos [Bateman, 2013; Prophyta, 2013; Cuccolini, 2014].

Es sabido que hay una dificultad tecnológica para despegar las esporas del sustrato en las producciones sólidas de hongos [Posada-Flórez, 2008]. Se considera positivo el resultado de este trabajo con la obtención del 86,8 % de recobrado de esporas por tamizaje para biopreparados de *Trichoderma* obtenidos sobre un sustrato específico, con niveles de calidad internacional-

mente aceptables [Jenkins y Grzywacz, 2003] a pesar de no contar con valores de referencia del rendimiento en la colecta de esporas de este hongo, al ser parte del secreto tecnológico de las compañías involucradas en estas producciones.

## CONCLUSIONES

- El mayor recobrado de esporas fue del 86,8 % y se logró a partir del biopreparado de *T. harzianum* molido y separado por tamizaje, compuesto por el sustrato con arroz partido descascarado y arroz sin descascarar.
- El mayor recobrado de esporas separadas por lecho fluidizado fue del 48,3 % a partir del biopreparado de *T. harzianum* sin moler y compuesto por el sustrato con arroz descascarado y partido y cáscara de arroz.
- Los residuos generados tuvieron niveles de viabilidad mayores que el 85 % y niveles de contaminación aceptables ( $<10^5$  UFC  $\cdot$  g<sup>-1</sup>).
- El polvo de esporas obtenido tuvo parámetros de calidad microbiológicos aceptables para su uso en diversas formulaciones de bioplaguicidas de *T. harzianum*.

## REFERENCIAS

- Arcos, C. A.; D. Macías y J. E. Rodríguez: «La cascarilla de arroz como fuente de SiO<sub>2</sub>», *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia* 41:7-20, Colombia, 2007.
- Bateman, R.: *Mycoharvesters: Enabling technologies for biopesticide development*. <http://www.dropdata.net/mycoharvester/> (consultado en julio de 2013).
- BBCResearch. March 25, 2013: «Global market for biopesticides to reach \$3.7 billion in 2017», <http://bccresearch.blogspot.com/2013/03/global-market-for-biopesticides-to.html#.VZ2hZFJopXu> (consultado en julio de 2013).
- Cuccolini: Products. <http://www.cuccolini.it/inglese/prodotti.php> (consultado en diciembre de 2014).
- Elósegui, O.; O. Fernández-Larrea y A. Carr: «Influencia de la carga microbiana contaminante inicial del sustrato en la calidad final de biopreparados de *Trichoderma harzianum* Rifai y *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin», *Fitosanidad* 9(1):51-55, Cuba, 2005.
- Elósegui, O.: «Producción de hongos para el control biológico», *Memorias del Curso Taller Manejo Agroecológico de Plagas en el Sistema de Producción*, INISAV, Ed. CIDISAV, La Habana, 2006.
- Jenkins, N. E. y D. Grzywacz: «Towards the standardization of quality control of fungal and viral Biocontrol agents», *Quality control and production of biological control agents: Theory and Testing Procedures*, CAB International, Reino Unido, 2003.
- Lorito, M.: «The molecular biology of the interactions between *Trichoderma*, phytopathogenic fungi and plants: opportunities for developing novel disease control methods», *Memorias de Taller Latinoamericano Biocontrol de fitopatógenos con Trichoderma y otros antagonistas*, 28-31 marzo, La Habana, Cuba, 2006.
- Posada-Flórez, F. J.: «Production of *Beauveria bassiana* Fungal Spores on Rice to Control the Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei*, in Colombia», *Journal of Insect Science*, 8: 41, EE.UU., 2008.
- Prophyta (2013): <http://www.prophyta.de> (consultado en agosto de 2013).
- Santos, A.; M. García; A.M. Cotes; L. Villamizar: «The effect of the formulation on the shelf-life of biopesticides based on two Colombian isolates of *Trichoderma koningiopsis* Th003 and *Trichoderma asperellum* Th034», *Rev. Iberoam. Micol.* 29(3), 150-156, España, 2012.
- Watanabe, S.; H. Kato; K. Kumakura; E. Ishibashi; K. Nagayama: «Properties and biological control activities of aerial and submerged spores in *Trichoderma asperellum* SKT-1», *J. Pestic. Sci.* 31(4): 375-379, Japón, 2006.