



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**Sede
Santo Domingo**

Obtención de un bioproducto a partir de cepas nativas de *Trichoderma spp.* para su aplicación como agente de control biológico y potenciador del crecimiento de *Capsicum chinense*.

Autora: Adriana Estefania Cajamarca Asqui

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Trabajo de Integración Curricular previo a la obtención del título de Ingeniería en
Biotecnología

Tutora: Bqf. Anabell Del Rocío Urbina Salazar Ph.D

Santo Domingo – Ecuador

2023





Impacto ambiental por uso de agroquímicos

Residuos agroindustriales: gestión inadecuada



Bioproductos a base de *Trichoderma* spp.

Fermentación de los residuos agroindustriales con microorganismos.

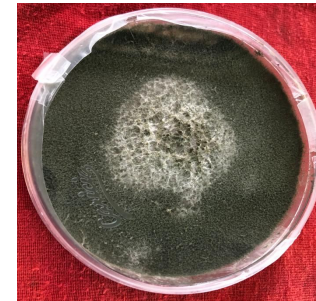
- Hongo filamentososo
- Se establece en la raíz de las plantas
- Se encuentran en diversos hábitats
- Producción industrial de enzimas

Aplicación control biológico

- Crea barrera que evita el ataque de fitopatógenos
- Capacidad de crecer y desarrollarse en diversos sustratos

Promueve el crecimiento vegetal

- Libere enzimas que ayudan en la absorción de nutrientes
- AIA: crecimiento radicular





OBJETIVOS



General

Obtener un bioproducto a partir de cepas nativas de *Trichoderma* spp. para su aplicación como agente de control biológico y potenciador del crecimiento de *Capsicum chinense*.

Específicos

Aislar la cepa nativa de *Trichoderma* spp.

Analizar diferentes subproductos como sustratos orgánicos.

Obtener ácido indol acético mediante fermentación.

Evaluar el bioproducto en un cultivo in vitro de semillas de *Capsicum chinense*

Evaluar la cepa como agente de control biológico



Factor A

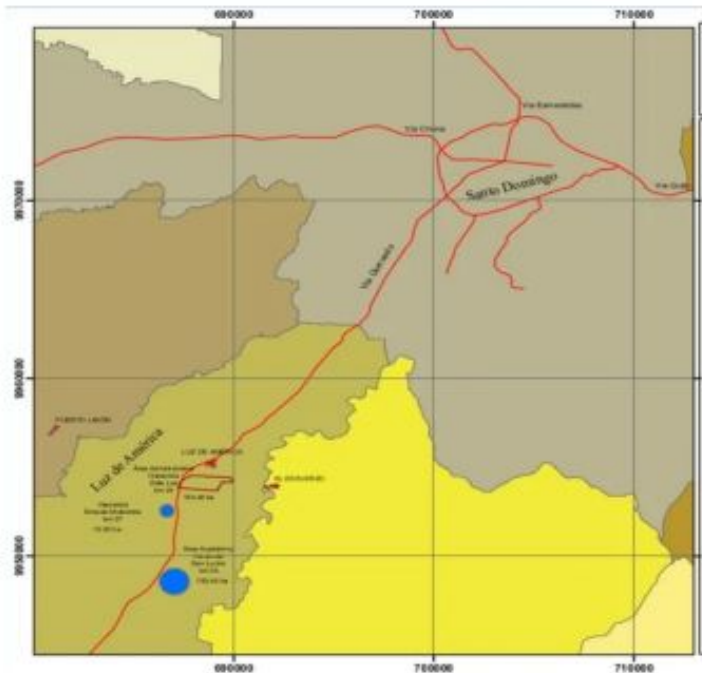
- **Ho:** El tipo de fermentación no influye en la capacidad del hongo para producir ácido indol acético.
- **Ha:** El tipo de fermentación influye en la capacidad del hongo para producir el ácido indol acético

Factor B

- **Ho:** El tipo de sustrato utilizado no influye en la capacidad del hongo para producir ácido indol acético.
- **Ha:** El tipo de sustrato utilizado influye en la capacidad del hongo para producir ácido indol acético.

Factor C

- **Ho:** Los días no influyen en la capacidad del hongo para producir ácido indol acético.
- **Ha:** Los días influyen en la capacidad del hongo para producir ácido indol acético



Ubicación Política

País: Ecuador
Provincia: Santo Domingo de los Tsáchilas
Cantón: Santo Domingo de los Colorados
Parroquia: Luz de América
Dirección: Vía Quevedo km 24, margen izquierdo

Ubicación Ecológica

Zona de vida: Bosque húmedo tropical
Altitud: 224 msnm
Precipitación: 2860 mm año
Humedad relativa: 85%

Ubicación Geográfica

Latitud: 00° 24' 36"
Longitud: 79° 18' 43"
Altitud: 270 msnm

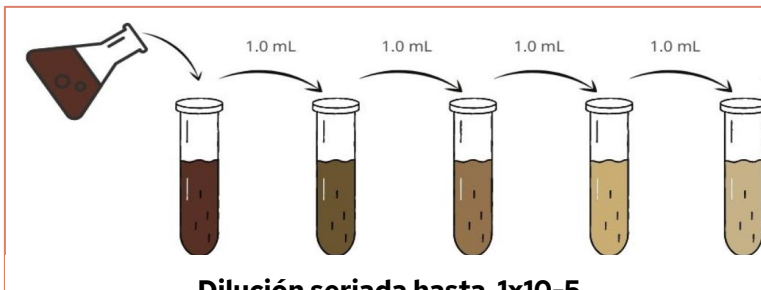
Obtención del microorganismo



Limpieza de la zona de muestreo



Toma de muestra de suelo



Dilución seriada hasta 1×10^{-5}



Incubación (28°C)



Siembra de dilución (1×10^{-5})



Dispensar medio PDA

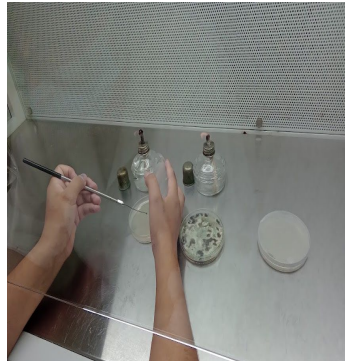


Preparación medio PDA

Purificación del microorganismo e identificación macroscópica



Identificación de *Trichoderma*



Siembra de cosp. Ionias de *Trichoderma* spp.



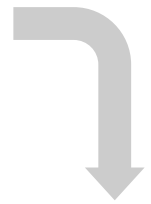
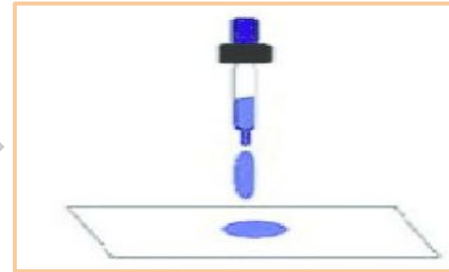
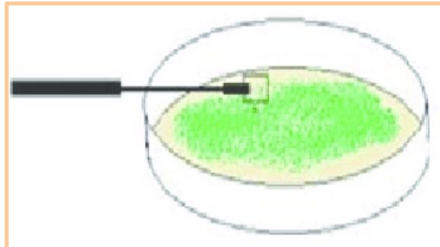
Color del micelio blanco



Color del micelio verde

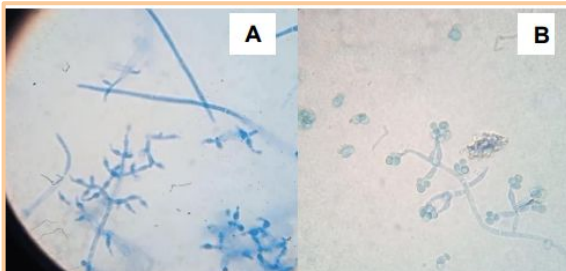
Identificación microscópica

Cinta adhesiva



Cinta sobre micelio de *Trichoderma*

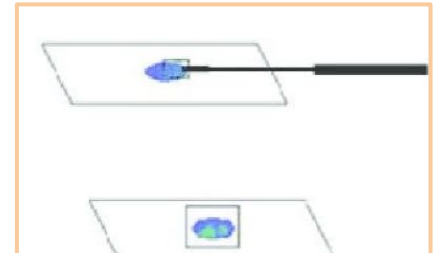
Gota sobre portaobjetos



Observación de estructuras

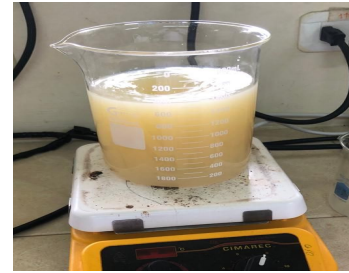


Observación en microscopio

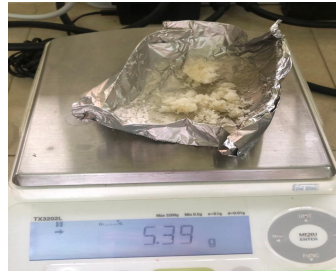


Cinta con micelio sobre la gota

Medios de fermentación



Medio mínimo enriquecido



Sustrato



Preparación de medio de fermentación



Adición de L-Tryp (500 mg)



Esterilización



Ajuste de pH (5.5-6.5)

Inoculación del microorganismo



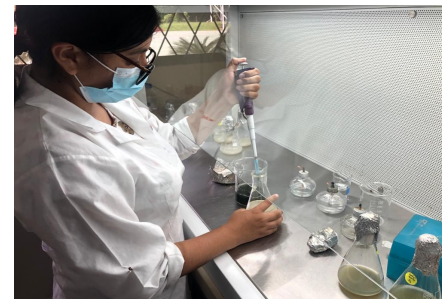
Buffer de siembra ($MnCl_2$ 0.1M)



Remover micelio de *Trichoderma*



Microorganismo en buffer de siembra



Inoculación de microorganismo



Medios en agitación

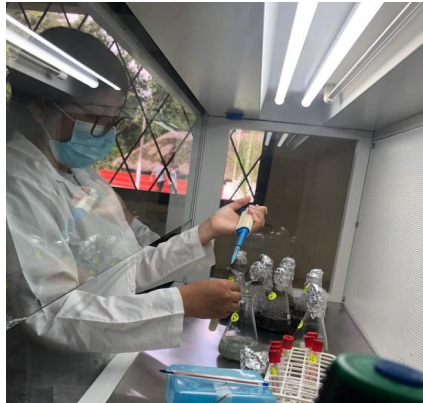


Incubación

Toma de muestras



Medios de fermentación en cámara de flujo laminar



Toma de muestras de cada medio de fermentación (5mL)



Conservación de muestras en tubos herméticos

Días 0, 2, 5, 7 y 8

Determinación de biomasa



Muestras

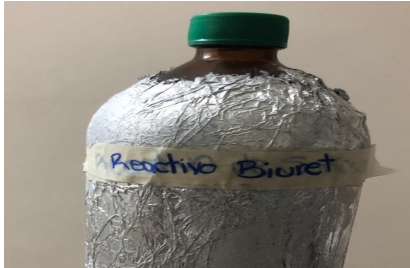


Centrifugación de muestras



Espectrofotometría a 540 nm

Cuantificación de proteínas



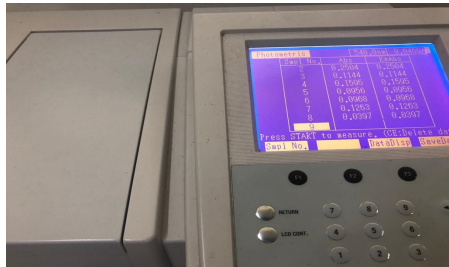
Preparación de reactivo de Biuret



Muestras



Centrifugación de muestras



Espectrofotometría a 540 nm



Incubación de muestras



Sobrenadante + reactivo de Biuret

Cuantificación de AIA



Preparación de reactivo de Salkowski



Muestras



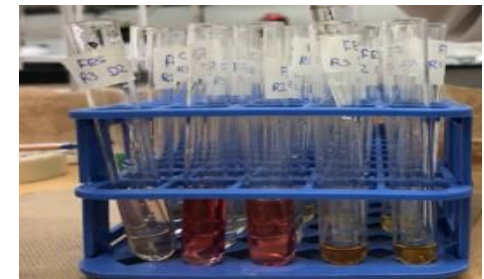
Centrifugación de muestras



Espectrofotometría a 530 nm



Incubación de muestras



Sobrenadante + reactivo de Salkowski

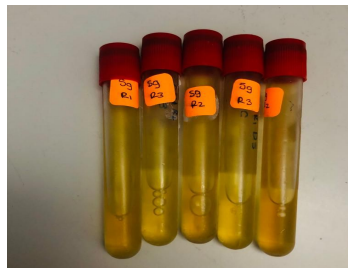
Filtración del bioproducto



Muestras



Centrifugación de muestras



Centrifugación de muestras



Filtración con filtro de jeringa de 0.2µm

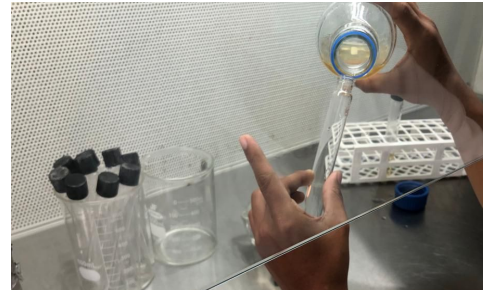


Bioproducto

Evaluación del bioproducto



Preparación medio



Dispensar medio en tubos



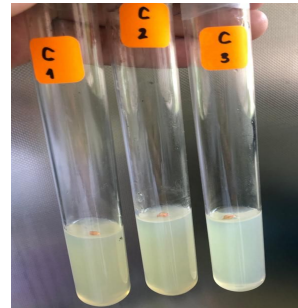
Desinfección de semillas

- Etanol 70% : 5 minutos
- Enjuague: agua estéril
- Cloro al 2%: 15 minutos
- Enjuague: Agua estéril



Siembra de semillas en tubos de ensayo

- Semillas tratadas con bioproducto por 24h



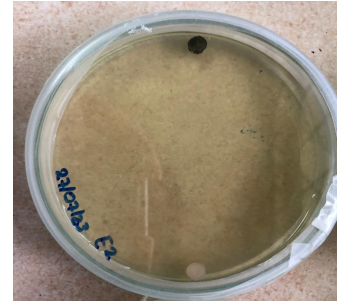
Evaluación del efecto antagonista de la cepa de *Trichoderma* spp.



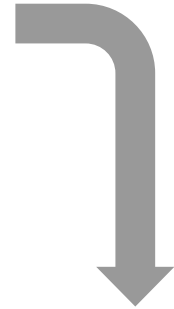
Preparación medio PDA



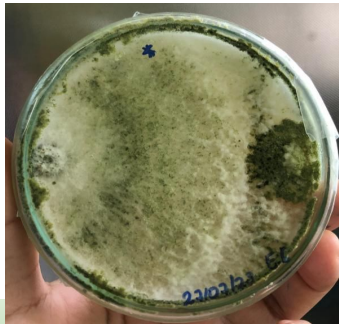
Siembra de microorganismos



Centrifugación de muestras



Medición del crecimiento radial cada 24h





Diseño Experimental

Factores de estudio que actúan en el proceso de obtención del bioproducto.

Factores	Simbología	Nivel
Tipo de fermentación (A)	a0	Fermentación sólida
	a1	Fermentación sumergida
Tipo de sustrato (B)	b0	Cáscaras de cacao
	b1	Bagazo de caña
Días de medición	c0	Día 0
	c1	Día 2
	c2	Día 5
	c3	Día 7
	c4	Día 8

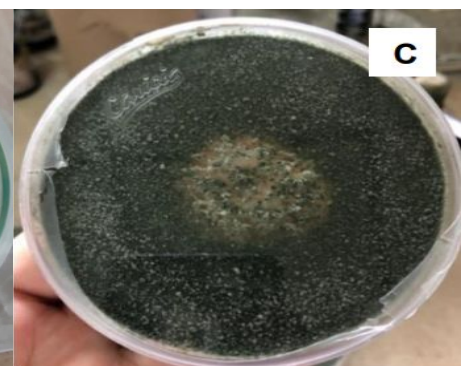
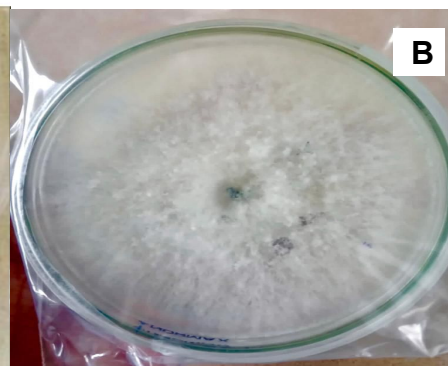
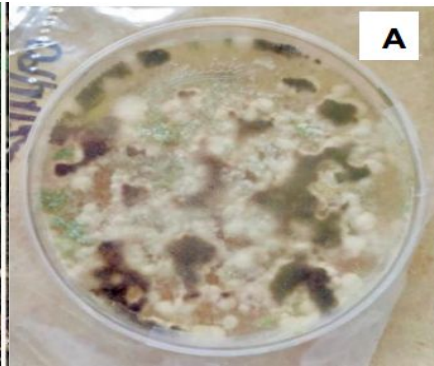
ANOVA con un arreglo factorial **AxBxC** (2x2x5).

- **Factor A:** tipo de fermentación.
- **Factor B:** tipo de sustrato.
- **Factor C:** días de medición.
20 tratamientos.

3 repeticiones por tratamiento → 60 unidades experimentales.



Obtención del microorganismo

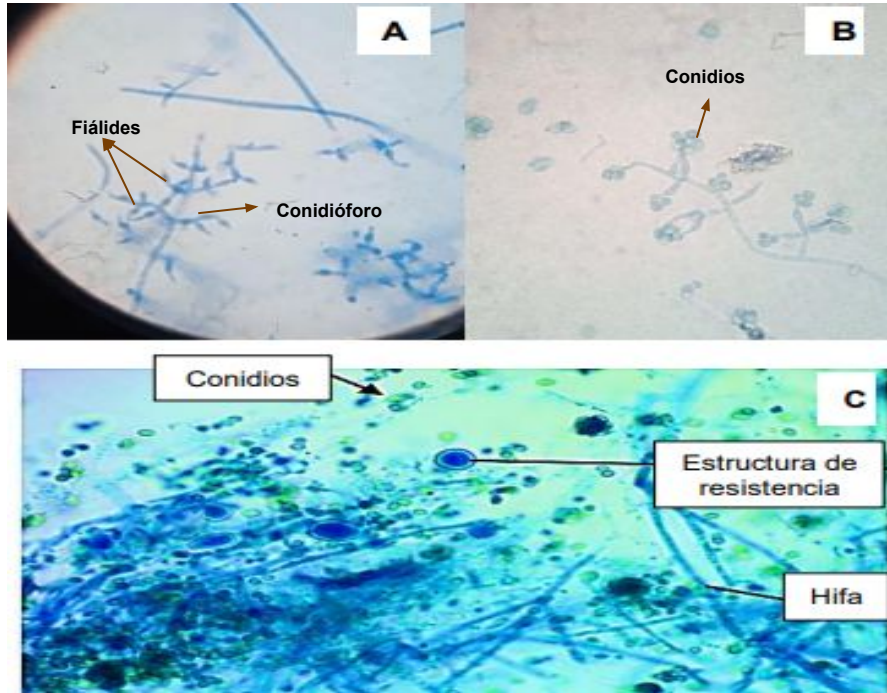


- Suelo de una área boscosa.
- Presencia de *Trichoderma* spp. por características macroscópicas.
- Inicio: micelio blanco.
- Paso de días: micelio color verde.

(Carreras et al., 2012), especies de *Trichoderma* spp. son hongos de vida libre que se establecen en ecosistemas de suelo y raíces

(Racić et al., 2023), mencionan que se pueden encontrar en la rizosfera de las plantas de suelos tropicales con abundante materia orgánica.

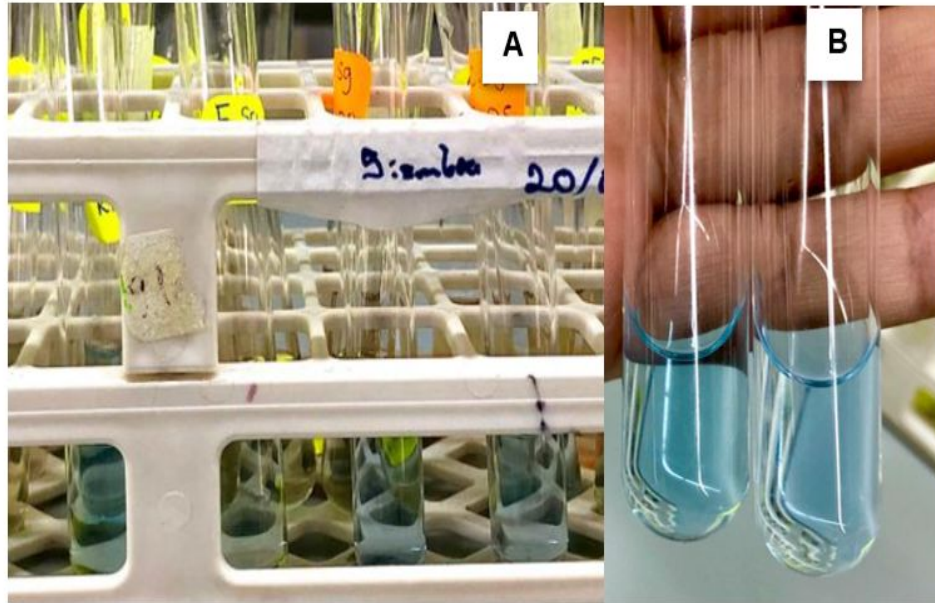
Identificación microscópica



- Conidióforos → fiálides hialinas → ápices de las fiálides se encontraron conidios
- También se observó estructuras de resistencia → clamidosporas
- Reproducción de la cepa nativa → asexual

(Castro-Gómez, 2015): estructuras de reproducción asexual de *Trichoderma* son: conidios y clamidosporas

Cuantificación de proteínas mediante el método de Biuret



- Celeste claro: menor concentración de proteínas en la muestra
- Azul: mayor concentración de proteínas en las muestras

(Álvarez et al., 2018): reactivo de Biuret forma un complejo colorido entre los enlaces peptídicos de las proteínas y los iones cúpricos (Cu^{2+}).

- La intensidad del color \rightarrow cantidad de enlaces peptídicos.

Detección de ácido indol acético (AIA) mediante el reactivo de Salkowski



Reactivo de Salkowski → determinó la presencia de AIA

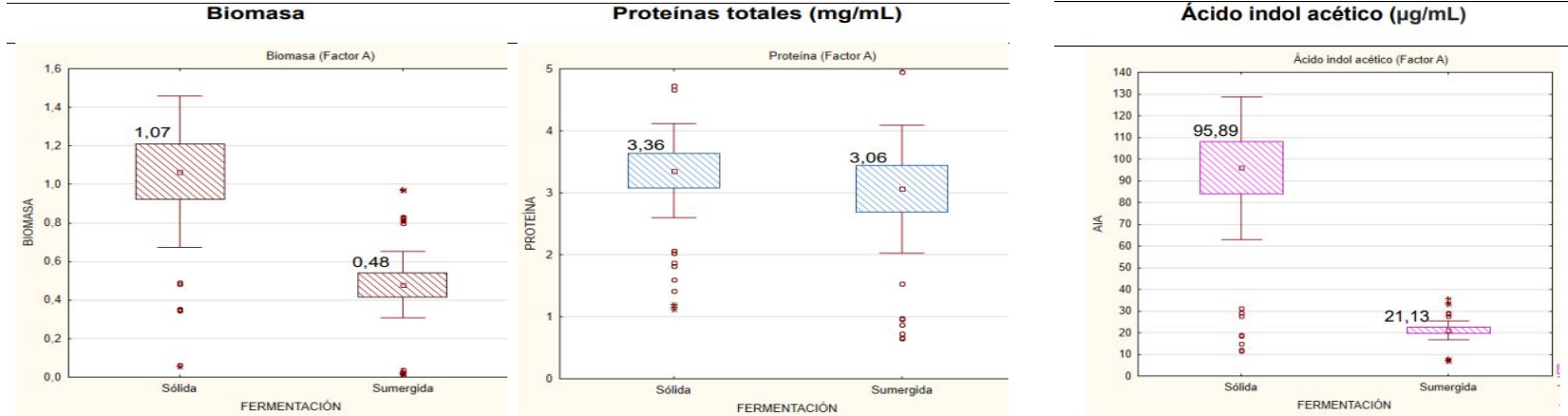
- Tipo de fermentación, tipo de sustrato y día → se observa distintas coloraciones.

(Vico, 2017): sales férricas oxidan compuestos indólicos.

- Resultado positivo, se observa una coloración que puede ir desde un color rosa claro a un rosa intenso.

La coloración depende de la concentración del compuesto.

Prueba de significancia (Tukey $p \leq 0.05$) para Tipo de fermentación (Factor A)

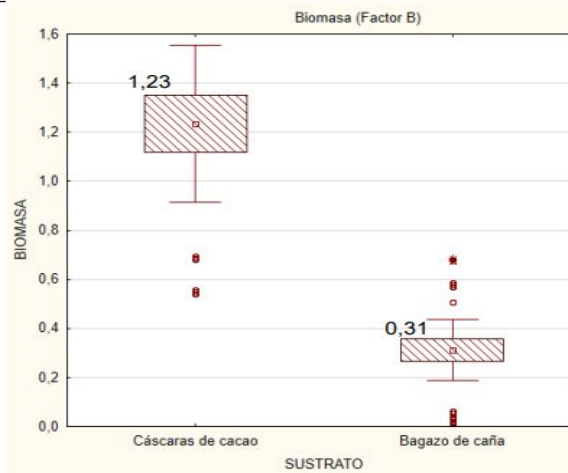


FES produjo mayor cantidad de biomasa, proteínas y AIA.

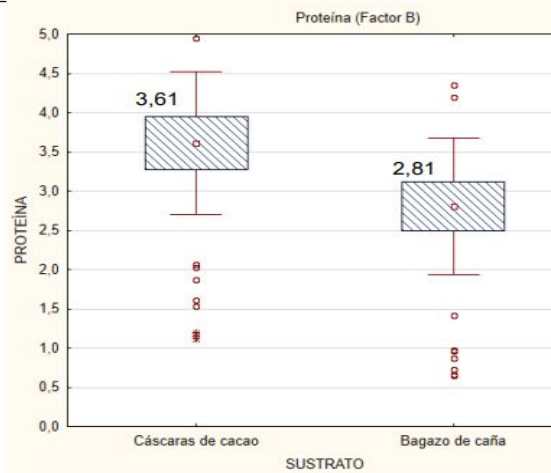
- **(Nanjundaswamy y Okeke, 2020):** compararon la FES con la FS utilizando *Trichoderma* spp. → mayor conversión de biomasa en FES.
- **(Alias et al., 2022):** la FES presenta parámetros y condiciones que se acoplan bien a la fisiología natural de los hongos

Prueba de significancia (Tukey $p \leq 0.05$) para Tipo de sustrato (Factor B)

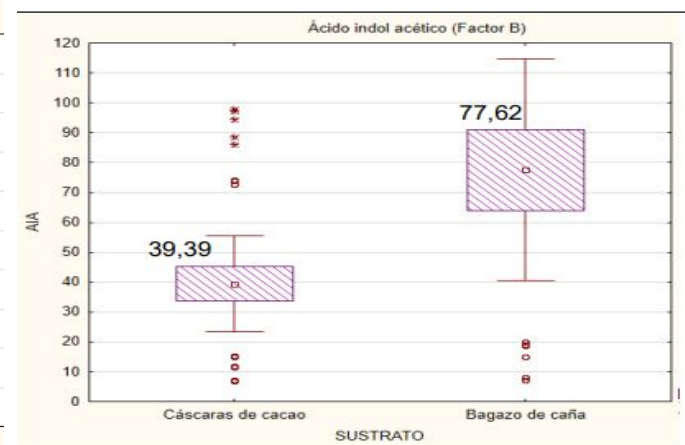
Biomasa



Proteínas totales (mg/mL)



Ácido indol acético ($\mu\text{g/mL}$)



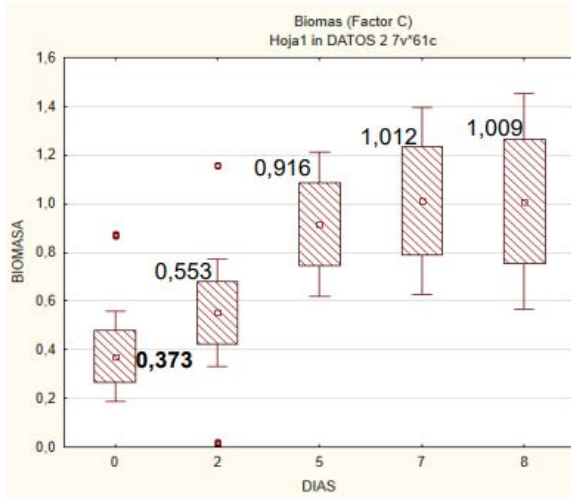
Mejor sustrato para la obtención de AIA: bagazo de caña

Alvarado (2021): bagazo de caña está compuesto por 41% de celulosa, 25% de hemicelulosa y 20% de lignina.

(Pozo, 2020): Trichoderma → hongo lignívoro y tiene la capacidad de degradar fibra.

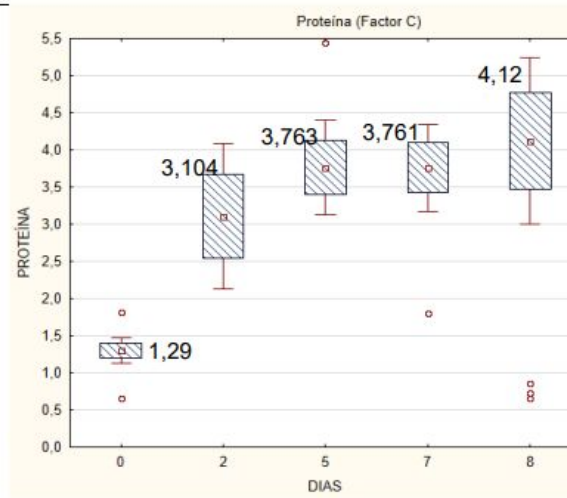
Prueba de significancia (Tukey $p \leq 0.05$) para Día de medición (Factor C)

Biomasa



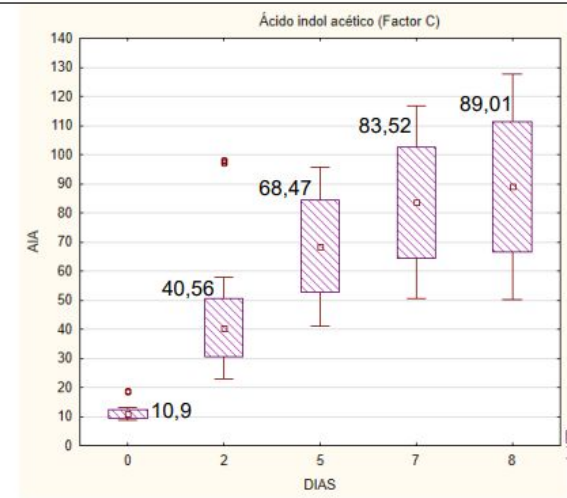
Día 7: 1,012 g

Proteínas totales (mg/mL)



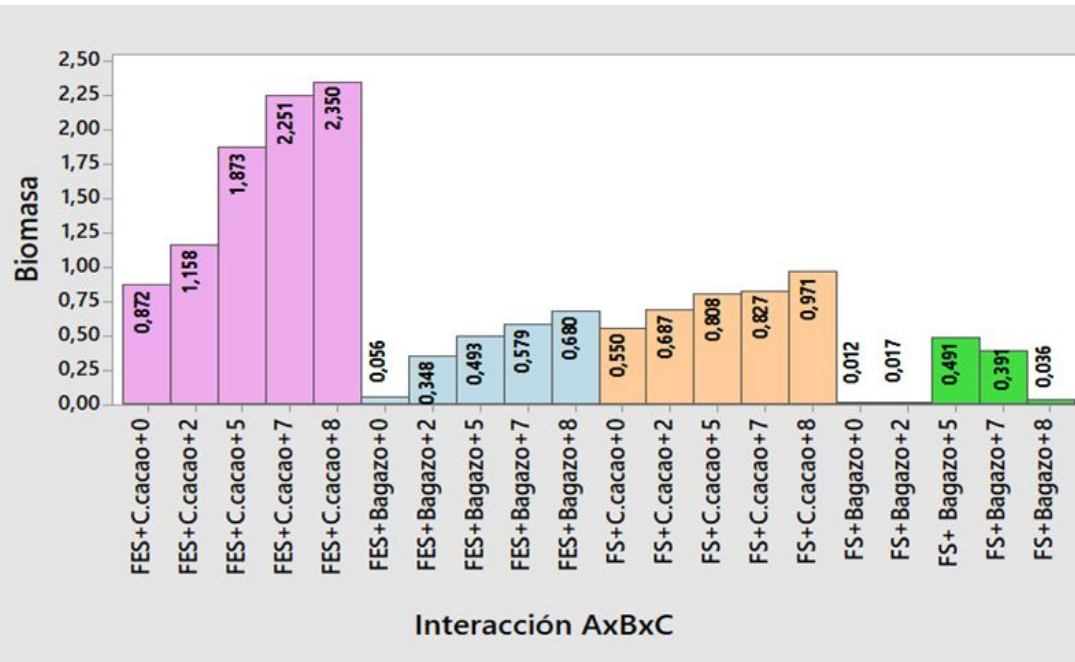
Día 8: 4,12 mg/mL

Ácido indol acético ($\mu\text{g/mL}$)



Día 8: 89,01 $\mu\text{g/mL}$

Prueba de significancia de Tukey ($p \leq 0.05$) para Interacción A*B*C (Tipo de fermentación*Tipo de sustrato*Días de medición)

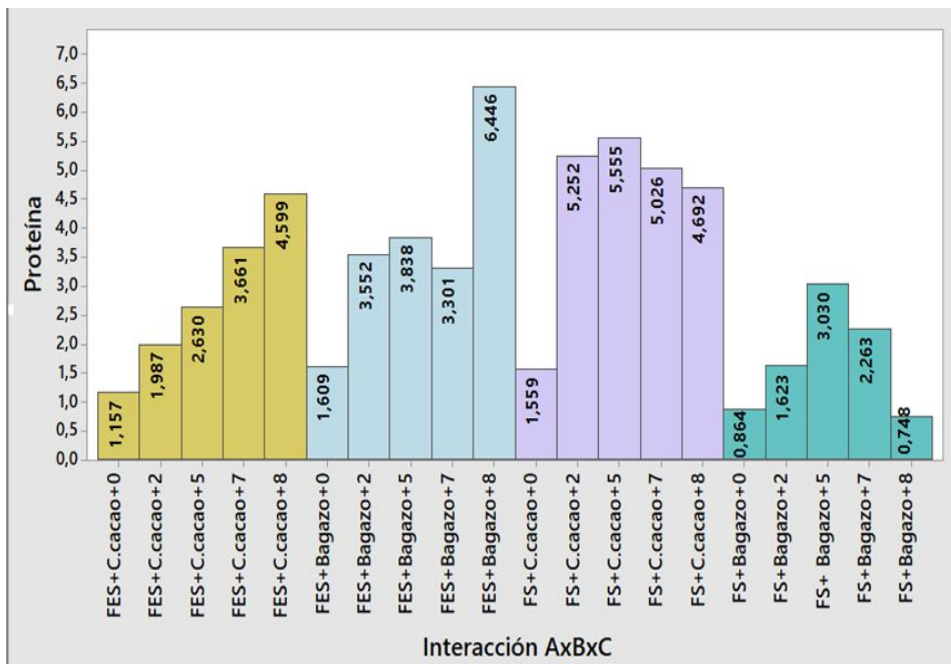


Mayor producción de biomasa en FES con cáscaras de cacao al octavo día.

(García et al., 2006) encontraron que las especies de *Trichoderma* producen **biomasa** a partir del **segundo día**.

La producción de biomasa por especies de *Trichoderma* es variable → **comportamiento** de cada cepa.

Prueba de significancia de Tukey ($p \leq 0.05$) para Interacción A*B*C (Tipo de fermentación*Tipo de sustrato*Días de medición)



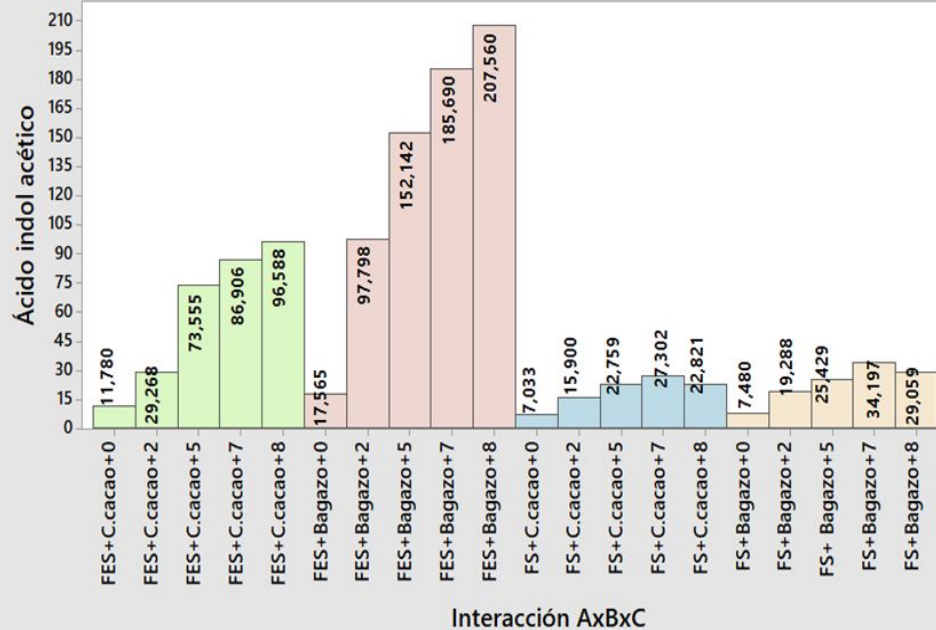
FES + bagazo de caña + D 8 = 6,446 mg/mL

(Valiño et al., 2004): FES con *Trichoderma viride* sobre bagazo de caña → % proteínas aumentó 6.4 veces con respecto al control = 6,5 mg a las 96h

(Pozo-Enríquez, 2020): FES con *Trichoderma asperellum* en 3 sustratos (bagazo de caña, tamo de fréjol, cascarilla de café) → aumentar el contenido proteico

- Bagazo de caña aumentó más del 80% la concentración de proteína bruta.

Prueba de significancia de Tukey ($p \leq 0.05$) para Interacción A*B*C (Tipo de fermentación*Tipo de sustrato*Días de medición)

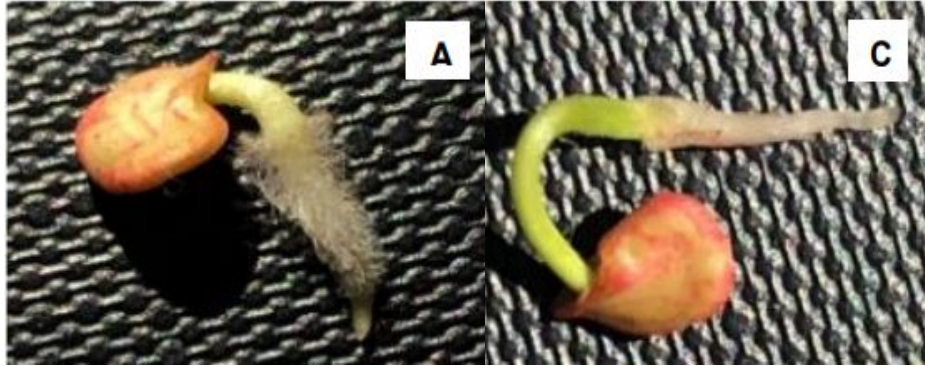


FES + bagazo de caña + D 8 = 207,560 µg/mL

(Contreras et al., 2009): 233,64 ± 3,06 µg/mL de AIA al quinto día con *Trichoderma virens*, en medio suplementado con L-Tryp.

(Salas-Marina et al., 2011): al suplementar el medio con L-Tryp, *Trichoderma atroviride* produjo más del doble de AIA cuando no se suplementa el medio con L-Tryp (150 µg/mL).

Evaluación del bioproducto en cultivo de *Capsicum chinense*



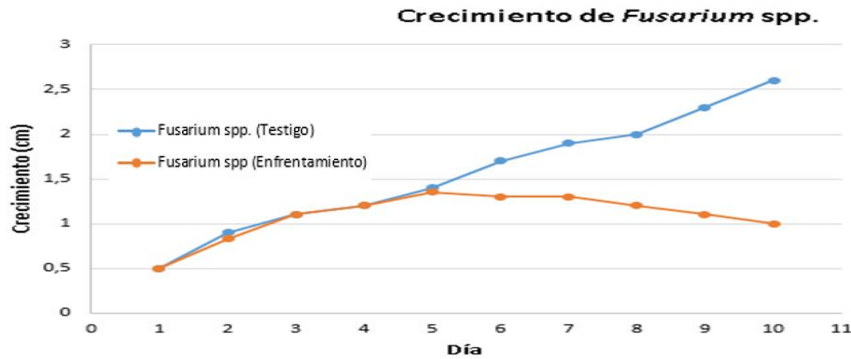
(Contreras et al., 2009), ensayo *in vitro* → *Trichoderma virens* y *Trichoderma atroviride* producen AIA que promueve y aumenta el crecimiento de vellos radicales, mejora la germinación, ramificación de las raíces.

- Semillas tratadas con bioproducto: abundante crecimiento de vellos radicales (A).
- Semillas no tratadas con bioproducto: menor cantidad de vellos radicales (C)

(Amador et al., 2013): el AIA tiene un efecto positivo para promover el inicio de la germinación de semillas, debido a que un 16% ocurre al día 3 → 500 ppm

(Xie et al., 2023): recubrieron semillas con *Trichoderma guizhouense* → germinación de semillas, aumento de longitud de la raíz principal y aumento de raíces laterales.

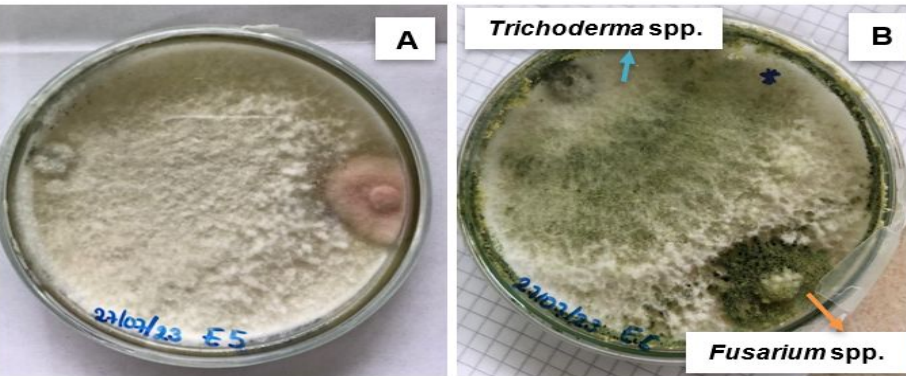
Efecto antagónico de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium* spp.



- Antagonismo de clase 1
- porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *Fusarium* fue de 61,43%.

(Qin et al., 2011) → *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* inhiben el crecimiento de *Fusarium solani* → concluyen que el porcentaje de inhibición representa la clase 1 de antagonismo.

(Jaroszuk-Ścisł et al., 2019), las hifas de *Trichoderma* reconocen al huésped, crea una espiral alrededor de las hifas del fitopatógeno, penetra la pared celular al secretar enzimas .





Conclusiones



Se una cepa nativa perteneciente al género *Trichoderma* spp. a partir de una muestra de suelo tomada de una zona boscosa sin intervención agrícola.

Trichoderma spp. puede crecer en residuos agroindustriales de la zona ricos en lignocelulosa como el bagazo de caña y cáscaras de caña, siendo el mejor el bagazo de caña.

La FES con bagazo de caña al octavo día fue el mejor proceso para obtener el bioproducto, ya que en este se obtuvo una mayor concentración de AIA debido a que *Trichoderma* spp. está mejor adaptado a los sustratos sólidos con un alto contenido de lignocelulosa

El bioproducto evaluado en el cultivo in vitro de *Capsicum chinense* demostró mejorar el proceso de germinación de las semillas y estimular la producción de pelos radiculares.

La cepa nativa de *Trichoderma* spp. aislada demostró ser efectiva para el biocontrol de *Fusarium* spp.





Recomendaciones



Se recomienda seguir aislando cepas nativas de la zona, ya que estas resultan ser más eficientes para controlar una amplia variedad de plagas en los cultivos.



Probar una variedad de residuos agroindustriales de la zona para evaluar en cuál de ellos *Trichoderma* spp. puede producir una mayor cantidad de biomasa, proteínas o AIA.



Realizar estudios con la cepa nativa en fases de invernadero y campo con plantas de la zona sensibles al ataque de fitopatógenos para probar la efectividad de esta cepa como agente de control biológico.



Se recomienda realizar ensayos *in vitro* de la cepa frente a otros fitopatógenos para evaluar el efecto antagónico.





¡GRACIAS!

