

**PRODUCCIÓN MASIVA DE *Trichoderma koningiopsis* (Th003) UTILIZANDO COMO SOPORTE
DE CRECIMIENTO BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR**

ELIANA CAÑÓN AMAYA

**Trabajo de grado como requisito parcial
Para optar por el título de

Microbióloga Industrial**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ, D.C, COLOMBIA
MAYO DE 2010**

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo vela porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

**PRODUCCIÓN MASIVA DE *Trichoderma koningiopsis* (Th003) UTILIZANDO COMO SOPORTE
DE CRECIMIENTO BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR**

ELIANA CAÑÓN AMAYA

Martha Isabel Gómez A, Ph.D.

Directora

Hugo Jiménez Sabogal, Ph.D.

Codirector

Amanda Varela Ramírez, Ph.D.
Jurado

Ingrid Schuler, Ph.D.

Decana Académica

Janeth Arias, M.Sc.

Directora de Carrera de Microbiología

AGRADECIMIENTOS

A Alba Marina Cotes Ph.D. Directora del Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB) de Corpoica-Tibaitatá, por darme la oportunidad de ingresar a su excelente grupo de trabajo.

A Martha Isabel Gómez, Ph.D. Investigadora del Laboratorio de Control Biológico y directora de este trabajo, por permitirme desarrollar este proyecto, por su constante apoyo, su paciencia y dedicación a este trabajo, y por sus enseñanzas que me fortalecerán en mi vida personal y profesional.

A Hugo Jiménez Sabogal, Ph.D. Investigador del Laboratorio de Nutrición del CBB de corpoica, codirector de este trabajo, por su inmensa ayuda y su constante apoyo además por enseñarme a sentirme segura de mi propio trabajo. A él gracias por reconocer siempre mis logros.

A los auxiliares e investigadores del Laboratorio de Control Biológico, Corina, Liz, Adriana, Claudia, Mauricio, por ayudarme cuando lo necesité y por brindarme su amistad.

A mis padres, a mi hermana y a mi abuela por escucharme y siempre darme ánimo para seguir adelante.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN	8
2. INTRODUCCIÓN	9
3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
4. MARCO TEÓRICO	11
4.1. Generalidades de <i>Trichoderma</i> sp.	11
4.2. El bagazo de caña de azúcar	11
4.3. Pre tratamiento del bagazo de caña de azúcar antes de su uso	12
4.4. Producción mediante fermentación sólida de <i>Trichoderma koningiopsis</i> (Th003)	12
5. OBJETIVOS	13
5.1. OBJETIVO GENERAL	13
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
6. METODOLOGÍA	14
6.1. Microorganismo	14
6.2. Matriz de crecimiento	14
6.3. EVALUACIÓN DE SISTEMAS DE HIDRÓLISIS FISICOQUÍMICAS	14
6.3.1. Hidrólisis fisicoquímicas del bagazo de caña de azúcar	14
6.3.2. Determinación de azúcares reductores	14
6.3.3. Análisis estadístico	15
6.4. SELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO ALTERNO A BASE DE BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR	15
6.4.1. Cinéticas de crecimiento de <i>Trichoderma koningiopsis</i> (Th003)	15
6.4.1.1. Análisis estadístico	16
6.4.2. Bioensayo de patogenicidad de <i>Trichoderma koningiopsis</i> (Th003) sobre esclerocios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Sc001)	16
6.4.2.1. Análisis estadístico	17
6.4.3. Análisis de costos de los medios de cultivo seleccionados	17
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
7.1. Composición bromatológica del bagazo de caña de azúcar	17
7.2. Hidrólisis fisicoquímicas del bagazo de caña de azúcar	18
7.3. SELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO ALTERNO A BASE DE BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR	20
7.3.1. Cinéticas de crecimiento de <i>Trichoderma koningiopsis</i> (Th003)	20
7.3.2. Bioensayo de patogenicidad de <i>Trichoderma koningiopsis</i>	25

(Th003) sobre esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* (Sc001)

7.3.3. Análisis de costos de los medios de cultivo	27
8. CONCLUSIONES	28
9. RECOMENDACIONES	28
10. REFERENCIAS	29
11. ANEXOS	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis bromatológico del bagazo de caña de azúcar proveniente de la estación experimental CIMPA (Barbosa Santander).	18
Tabla 2. Azúcares reductores promedio obtenidos (mg/ml) después de las hidrólisis fisicoquímicas del bagazo de caña de azúcar.	18
Tabla 3. Valores promedio de pH y humedad después de la esterilización en cada uno de los medios de cultivo.	21
Tabla 4. Producción de conidios al noveno día de fermentación en los medios de cultivo evaluados.	22
Tabla 5. Valores de áreas debajo de la curva para cada una de las cinéticas de crecimiento de <i>T. koningiopsis</i> (Th003) evaluadas durante los nueve días de fermentación.	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Concentración de azúcares reductores (mg/ml) promedio obtenidos después de cada tratamiento de hidrólisis fisicoquímica.	20
Figura 2. Cinética de crecimiento de <i>T. koningiopsis</i> (Th003) durante nueve días de fermentación.	22
Figura 3. Concentraciones de conidios (Log_{10}) alcanzadas al noveno día de fermentación.	23
Figura 4. Crecimiento de <i>T. koningiopsis</i> sobre bagazo de caña sin adición de ácido y con esterilización y sobre bagazo de caña hidrolizado.	24
Figura 5. Diferencias entre crecimiento de <i>T. koningiopsis</i> (Th003) al cuarto día de fermentación en sustrato arroz salvado y sobre bagazo de caña hidrolizado.	24

1- RESUMEN

El Laboratorio de Control Biológico del Centro y Biotecnología y Bioindustria (CBB) de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica) ha trabajado durante más de 10 años en la producción masiva y desarrollo de un bioplaguicida a base del hongo *Trichoderma koningiopsis* (Th003) para el biocontrol de fitopatógenos foliares y del suelo. Este bioproducto está en proceso de registro ante el ICA, y se espera en poco tiempo empezar su producción a nivel comercial.

Actualmente, para la producción masiva del biocontrolador se utilizan como sustratos de crecimiento productos alimenticios como el arroz y el salvado, los cuales hacen parte de la cadena alimentaria y teniendo en cuenta la crisis económica generalizada se crea la necesidad de no utilizar estos recursos. Es evidente entonces, la necesidad de diseñar un nuevo medio de cultivo con base en recursos renovables para la producción de este microorganismo, que cumpla con las políticas ambientales de la Corporación. Por lo tanto, en el presente trabajo se utilizó el bagazo fibroso de caña de azúcar (desecho de la planta de producción de bioetanol de la estación experimental CIMPA-Corpoica) como sustrato alternativo para la producción de *T. koningiopsis* (Th003), teniendo en cuenta su abundante disponibilidad (80-100 toneladas/día) y su composición energética (84.2% de hemicelulosa, celulosa y lignina).

El bagazo de caña de azúcar fue pre tratado por hidrólisis fisicoquímica para facilitar la disponibilidad de azúcares en el medio, y así mismo la colonización del hongo en el soporte. Se evaluaron diferentes sistemas de hidrólisis, donde se utilizaron diferentes concentraciones de ácido clorhídrico y dos condiciones de presión (HCl 0.005N, HCl 0.05N, HCl 0.1N y HCl 0.3N a 15 psi [121°C] y 24 Psi [132 °C]). Después del proceso de hidrólisis en cada medio, se determinó la concentración de azúcares reductores (mg/ml) por la técnica de DNS (Miller, 1959). Los valores experimentales obtenidos en las hidrólisis realizadas a 15 Psi (121°C) y a 24 Psi (132°C) permitieron comprobar el efecto conjunto del HCl y de la presión sobre la liberación de azúcares, ya que en estos tratamientos se encontraron concentraciones desde 26.18 hasta 64.10 mg/ml, mientras que el bagazo tratado únicamente con presión- temperatura se encontraron concentraciones de 0.90 hasta 1.27 mg/ml. Con estos valores se evidenció la eficiencia del pretratamiento en la liberación de estos nutrientes al medio.

Para la selección del mejor medio de cultivo alterno a base de bagazo de caña de azúcar para la producción de *T. koningiopsis* (Th003) se tuvieron en cuenta tres criterios principalmente; uno fue la producción de alta concentración de conidios en el sustrato para lo cual se realizaron cinéticas de crecimiento del hongo midiendo la concentración de conidios/gramo, como segundo criterio buena actividad biológica de los conidios provenientes de la fermentación sólida y finalmente que el medio requiriera de bajos costos de producción para lo cual se realizó un análisis de costos de acuerdo a las materias primas requeridas para cada proceso.

Se realizaron cinéticas de crecimiento de *T. koningiopsis* (Th003) durante nueve días sobre los medios previamente hidrolizados y en el medio estándar (sustrato- arroz salvado), midiendo la concentración de conidios (conidios/g) diariamente desde el día cuarto hasta el día noveno mediante recuento en cámara de Neubauer.

En el medio tratado con HCl 0.3N a las dos presiones, no se evidenció crecimiento del microorganismo en el sustrato. Este comportamiento se le podría atribuir a los compuestos tóxicos que se forman a raíz de la combinación entre el ácido, la presión y la temperatura (compuestos furfurales). Por esta razón, este medio de cultivo fue descartado y no se continuó su evaluación durante los nueve días de fermentación. El análisis estadístico de los datos obtenidos al noveno día de fermentación empleando la prueba de Tukey con un 95% permitió determinar que los controles (bagazo de caña sin adición de ácido y esterilizado a 15 y 24 Psi), presentaron la menor concentración de conidios de todos los medios evaluados con un valor máximo de 2.3×10^8 conidios/g. Por otro lado, no se detectó diferencias significativas entre la concentración de conidios (1.2×10^9 –

1.30x10⁹ conidios/g) obtenida en los medios de cultivo tratados con HCl 0.005N y HCl 0.05N a 15 psi (121°C) y a 24 psi (132°C) determinando, que en estos cuatro medios de cultivo se obtienen concentraciones similares de conidios aún cuando se cambian las condiciones de presiones-temperatura y ácido. Por otro lado, también se encontró que el medio estándar presentó los mayores valores de concentración en todas las fermentaciones evaluadas (2.3x10⁹ conidios/g).

Se realizó un bioensayo de patogenicidad con el fin de determinar el efecto biocontrolador de *T. koningiopsis* (Th003) sobre esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* utilizando los conidios provenientes de las fermentaciones en el bagazo de caña hidrolizado con ácido y presión al igual que el medio estándar y determinando finalmente en porcentaje de parasitismo de *T. koningiopsis* sobre el hongo fitopatógeno. El menor valor se encontró en el medio tratado con HCl 0.1N (83%) tanto a 15 como a 24 psi. Se concluyó que este valor tan bajo podría estar relacionado con los compuestos furfurales formados en el medio, por lo que este medio de cultivo se descartó dentro del proceso de selección. Los conidios de los medios restantes (bagazo tratado con HCl 0.005N, HCl 0.05N tanto a 15 como a 24 psi) presentaron valores del 93% de parasitismo con lo que se determinó que los conidios poseen buena actividad biocontroladora al superar el valor mínimo de aceptación de la técnica (80%).

Se realizó el análisis de costos de los medios y se encontraron diferencias mínimas entre ellos por lo cual se decidió tomar como criterio de selección el medio de cultivo que presentó mayor producción de conidios numéricamente y menor costo.

Finalmente se seleccionó el medio a base de bagazo de caña hidrolizado con 0.05N HCl a 15 psi (121°C) como el medio óptimo para el crecimiento de *T. koningiopsis* por presentar alta concentración de conidios, con buena actividad biológica y con bajos costos de producción.

2- INTRODUCCIÓN

La utilización de microorganismos antagonistas como *T. koningiopsis* es una alternativa de control biológico utilizada comúnmente para combatir hongos fitopatógenos, debido a su versatilidad, adaptabilidad y fácil manipulación (Markovich y Kononova, 2003). Para la producción masiva de este microorganismo se necesitan usualmente fuentes de carbono y nitrógeno que promuevan su crecimiento y desarrollo. Desde los años 70's se han usado fuentes ricas en almidón y fibra de fácil consecución como el arroz y el salvado para la elaboración de medios de cultivo para el crecimiento de este microorganismo. Dentro de los alimentos más utilizados para este fin se encuentran el maíz, el azúcar y el arroz (FAO, 2008).

Para su producción masiva se emplean técnicas de fermentación líquida, sólida y bifásica. Es común el crecimiento de este hongo mediante fermentación sólida utilizando sustratos a base de productos alimenticios. Es así como se ha descrito la producción de *Trichoderma* sp. en arroz (Cheng Sun *et al.*, 2008), salvado de trigo (Azin *et al.*, 2007), maíz (Vintila *et al.*, 2009), Soja (Harikesh *et al.*, 2009), café (Soccol *et al.*, 2005), y harina de trigo (Kishna, 2005) entre otros. Sin embargo, actualmente existe la tendencia a buscar fuentes alternas de energía y nitrógeno que no comprometan la utilización de sustratos que pertenezcan a la cadena de alimentos utilizada por los humanos. Como alternativas para el reemplazo de estos sustratos se ha propuesto la utilización de residuos agro-industriales como soportes para el crecimiento microbiano, planteando así la posibilidad de reemplazar sustratos alimenticios por recursos renovables.

Esta tendencia del uso de recursos renovables para su incorporación en otros procesos como el de utilización como fuentes de energía, se acopla a otra iniciativa global relacionada con el manejo de los residuos que se generan en la industria agropecuaria, particularmente por que su mal manejo se asocia con problemas de índole ambiental. Los residuos agrícolas al ser mal dispuestos generan diversos agentes contaminantes al suelo, aire y agua y pueden convertirse en criaderos de plagas que afectan cultivos o peor aún ser detonantes para el crecimiento de microorganismos patógenos (García, 2007). Por consiguiente una alternativa sostenible tanto desde el punto de vista ambiental como económico es la reincorporación de estos desechos dentro de procesos de desarrollo industrial que permitan su reutilización.

En Colombia se producen variedad de residuos de cosecha tales como la cascarilla de arroz con un volumen de 1.5 millones de toneladas al año, 2.360 toneladas anuales de cascarilla de algodón, 10.432 toneladas de afrecho de maíz y alrededor de 28.500 toneladas de desechos sólidos de fique (Bolsa nacional agropecuaria, 2009). Sin embargo, uno de los de mayor producción anual mundialmente es el bagazo de caña que se encuentra cercana a los 15.4 millones de toneladas (CENICAÑA, 2009). Este sustrato lignocelulósico, generalmente es utilizado como fuente calorífica en los hornos industriales de la industria azucarera o panelera, generando gran cantidad de emisiones de gases invernadero como dióxido de carbono y cenizas.

En el caso particular del uso de residuos agroindustriales para la producción de bioplaguicidas, es de suma importancia caracterizar bromatológicamente los materiales con potencial uso, y en algunos casos realizar un pre tratamiento o hidrólisis del soporte para facilitar la colonización del agente de control biológico. En este proyecto se ha propuesto el bagazo de caña de azúcar pretratado como sustrato alterno para la producción masiva de *Trichoderma koningiopsis* (Th003), por su gran abundancia al ser el principal subproducto generado en los ingenios azucareros del país (LAICA, 2009). Por otro lado es importante resaltar que el bagazo de caña de azúcar es un sustrato rico en azúcares fermentables; por ser tejido lignocelulósico, está compuesto por celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina convirtiéndolo en un gran reservorio energético y de la misma forma en un soporte óptimo para la producción del hongo masivamente (Barreto, 2008).

3- JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dentro del contexto mundial, existe la necesidad de optimizar la producción y distribución de los alimentos en el mundo, ya que se percibe que en un futuro cercano habrá escasez de alimentos a causa de problemas relacionados con el cambio climático y sobrepoblación. Esta situación afecta no solo a la población humana, sino que trae consigo consecuencias colaterales relacionadas con la consecución de materias primas para la elaboración de sustratos de crecimiento empleados en la bioindustria, particularmente en la producción de medios de cultivo indispensables para el crecimiento de microorganismos. Por consiguiente, se requiere de un arduo trabajo en la búsqueda de alternativas sostenibles de producción (Paz, 2008).

Es así como desde sus comienzos la producción de microorganismos benéficos y/o sus metabolitos ha demandado el uso de materiales pertenecientes a cadenas alimentarias tales como maíz, avena, arroz, y soya entre otros (Biomass and agriculture : sustainability, markets and policies, 2007). Como alternativa a la limitación de materias primas como cereales y almidón provenientes de recursos alimenticios básicos, actualmente se promueve la utilización de fuentes alternas a estos productos, como lo son los recursos de cosecha tales como bagazo de caña, cascarilla de café, cascarilla de algodón, semilla de algodón y afrecho de maíz entre otros (Salazar, 2008).

A nivel nacional, el Laboratorio de Control Biológico de Corpoica, ha trabajado en la producción de un bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* (Th003), para el control de hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia solani* en frijol, papa y tomate (Beltrán, 2004), *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* en tomate (Cotes et al., 2001), *Sclerotinia sclerotiorum* en lechuga (Cotes et al., 2006) y *Alternaria dauci* en cilantro (Villamizar et al., 2004), con niveles de control superiores al 80% en condiciones de invernadero y campo.

Sin embargo, la producción de este microorganismo se ha venido realizando en sustratos comúnmente utilizados como alimento para el ser humano, como lo son el arroz y el salvado de trigo. Por tal razón, se hace necesario el diseño de un medio de cultivo que sea consecuente con las políticas ambientales de la corporación y que cumpla con la filosofía de desarrollo de bioplaguicidas, implementando además una política de tecnología limpia, reciclaje y reúso de los recursos en esta línea de investigación. Adicionalmente, se busca un beneficio en la planta productora de bioetanol ubicada en la estación experimental CIMPA de Corpoica en Barbosa – Santander, que suministrará

las muestras de bagazo de caña de azúcar para su uso como medio de cultivo alternativo y en la cual se produce grandes volúmenes de este material (80-100 toneladas/día) y su mala disposición puede generar a largo plazo diferentes agentes contaminantes.

4- MARCO TEÓRICO

4.1. GENERALIDADES DE *Trichoderma* sp.

Trichoderma sp. es un hongo filamentoso que se encuentra de manera natural en un número importante de suelos agrícolas. Es un microorganismo aeróbico que se reproduce asexualmente y que puede estar en suelos con pH neutro hasta ácido (Demain, 2005). Es un hongo de rápido crecimiento que puede degradar gran variedad de sustratos complejos como la lignina, celulosa, pectina y almidón (Singh *et al.*, 2008). Existen diferentes factores que influyen sobre el crecimiento de este microorganismo tales como: la fototrofia, la humedad, la temperatura, el pH y las condiciones nutricionales (Verma y Satinder 2007). *Trichoderma* sp., crece en un rango de valores de pH desde 2.0 hasta 9.0 con un rango óptimo que se encuentra entre 4.0 y 6.0, a una temperatura óptima de 25°C y con un contenido de humedad del 70 y el 80% (Wakelin *et al.*, 1999).

El interés científico despertado por los hongos de este género, se debe a las características antagónicas que presentan frente a hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, y *Sclerotinia sclerotiorum* entre otros. Algunos de los mecanismos de control referenciados para *Trichoderma* sp. son la competencia por nutrientes o espacio, el micoparasitismo y la antibiosis (Vinale *et al.*, 2008). Estos mecanismos no son excluyentes sino que actúan sinérgicamente en el control de los patógenos. La importancia relativa de cada uno de ellos depende de la relación entre el antagonista, el patógeno y las condiciones ambientales (Grondona *et al.*, 2008).

En estudios adelantados por el Laboratorio de Control Biológico del CBB de Corpoica, se seleccionó la cepa de *T. koningiopsis* Th003, la cual ha mostrado alta eficiencia para controlar fitopatógenos del suelo y foliares en diferentes patosistemas. A partir de esta cepa se desarrolló un bioplaguicida, diseñado como un polvo mojable usando como principio activo los conidios de este hongo. La aplicación de este bioplaguicida ha demostrado que disminuye la incidencia de los patógenos *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Betancour, 1997) y *Rhizoctonia solani* (Cárdenas, 1999) entre un 70% y un 100% en el cultivo de tomate respectivamente. Además, el producto en polvo ha mostrado un control eficiente de enfermedades foliares como el moho gris (*Botrytis cinerea*) y el mildew polvoso (*Oidium* sp) en un 41% y un 85%, respectivamente (Moreno, 2003). En casa de malla, con plántulas de papa, Beltrán (2004) determinó que las plántulas tratadas con *T. koningiopsis* (Th003) presentaron diferencias apreciables en tamaño y una protección cercana al 70% contra *Rhizoctonia solani*. Asimismo, este producto han sido evaluado contra fitopatógenos como *Sclerotium cepivorum* en cebolla de bulbo (Paris y Cotes, 2002) y *Alternaria dauci* en cilantro (Villamizar *et al.*, 2004).

4.2. EL BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR

La biomasa lignocelulósica es el recurso renovable más abundante en la tierra, dentro de esta categoría se considera que el bagazo de caña de azúcar es una de las fuentes de material lignocelulósico más abundante en las regiones tropicales y subtropicales; tales como Brasil, India, Tailandia, Hawái y el sur de Estados Unidos (M.Fatih Demirbas *et al.*, 2009).

El bagazo de caña de azúcar es un material lignocelulósico constituido principalmente por celulosa y hemicelulosa ligadas fuertemente a la lignina. Se denomina bagazo al residuo de materia después de extraído su jugo (Matew y Abraham, 2005). Existen varias clases de bagazo de caña de azúcar, una de ellas es el residuo leñoso de la caña de azúcar que en estado fresco contienen un 40% de agua, y suele utilizarse como combustible de las propias azucareras. Por otro lado, se produce la fibra de la caña de azúcar que además de ser un material combustible para la industria, se usa como materia

prima para la industria papelera y de maderas artificiales (Avella, 2007). Otra clase de bagazo es el meollo que contiene alto contenido de cenizas e interfiere normalmente en el proceso de producción de bioetanol, ya que por su pequeño tamaño se filtra hacia la parte líquida recuperada. El bagazo de caña en general se obtiene como subproducto de los centros azucareros y representa entre un 25 y 40 % del total de la masa procesada (Piña *et al.*, 2008).

El bagazo es un material heterogéneo en cuanto a su composición granulométrica y estructural, que presenta relativamente baja densidad y un alto contenido de humedad en las condiciones en que se obtiene del proceso de molienda de la caña (Hamelink, 2005). Como todos los materiales lignocelulósicos es rico en fibra, conteniendo alrededor de 45% de este componente. Presenta una alta heterogeneidad de tamaño de partículas (35 y 50 mm), contiene sólidos solubles (2-3%) e insolubles (2-3%). Químicamente el bagazo está constituido por celulosa, hemicelulosa, lignina (90%) y otros componentes (10%). La celulosa representa entre el 41 y el 44 %, la hemicelulosa entre el 25 y el 27% y la lignina entre el 20 y el 22% (Merencio, 2007). Es así como debido a su compleja estructura física y química, resulta de difícil degradación por parte de microorganismos fibrolíticos. Por consiguiente, es necesario someterlo a tratamientos que conduzcan a la disminución o eliminación de las barreras físicas y químicas que limitan la accesibilidad de los microorganismos (Sánchez, 2009).

4.3. PRETRATAMIENTO DEL BAGAZO DE CAÑA ANTES DE SU USO

El pretratamiento del bagazo de caña es necesario para alterar la estructura de la biomasa celulolítica y hacer más accesible la celulosa a la acción de los microorganismos y las enzimas celulolíticas que convierten los polímeros de carbohidratos en azúcares fermentables (Mosier *et al.*, 2005). Existen diferentes métodos para pretratar el bagazo de caña y romper el entramado de lignina que impide el ataque de microorganismos sobre la celulosa. Se han utilizado principalmente las hidrólisis químicas (con ácidos o bases), físicas (tratamiento térmico o de vapor) y fisicoquímicas que combinan la acción de la hidrólisis química con el tratamiento térmico (Hernández *et al.*, 2007). También se conocen las hidrólisis enzimáticas con la utilización de consorcios microbianos que degradan biológicamente el sustrato y por otro lado la utilización de kits comerciales hechos a base de enzimas previamente purificadas (Laureano-Perez *et al.*, 2005). Aunque los tratamientos químicos y físicos ayudan en el rompimiento de la compleja estructura de la fibra, se ha sugerido que la combinación de ambos tratamientos (fisicoquímico) genera una mejor acción sobre el sustrato a degradar.

En el caso de la hidrólisis fisicoquímica utilizada en este estudio se buscó inicialmente por la acción del ácido, la solubilización de la hemicelulosa especialmente a xilano y a glucomanano (Fengel y Wegener, 1984; Kianoush y Zoghi, 2001; Ramos, 2003) para posteriormente por los cambios de presión y temperatura dentro de las estructuras internas del material, provocar el rompimiento de las fibras generando mayor área superficial para la eventual hidrólisis de la celulosa y permitir una mejor invasión por parte de los microorganismos que lo colonizan (Overend y Chornet, 1987).

4.4. PRODUCCIÓN MEDIANTE FERMENTACIÓN SÓLIDA (SSF) DE *Trichoderma koningiopsis* (Th003)

Para la producción masiva de este hongo como bioplaguicida es necesario un medio químicamente definido con el fin de determinar las condiciones óptimas de cultivo que permitan una rápida producción con altos niveles de conidios activos y con una alta actividad biocontroladora.

La fermentación en estado sólido (SSF) se define como el cultivo de microorganismos sobre un soporte sólido humedecido, un vehículo inerte o sobre sustratos insolubles que además pueden ser usados como fuente de carbono y de energía (Pandey *et al.*, 2008). La fermentación sólida tiene lugar en ausencia o con muy baja cantidad de agua libre (Holker *et al.*, 2005). En general los sustratos utilizados para la fermentación sólida pueden ser productos de la agricultura o bioproductos de la agro-industria como el bagazo de caña de azúcar. Esta estructura macromolecular puede

simplemente servir como matriz en la cual las fuentes de carbono y energía son absorbidas, o representar el sustrato y proveer al mismo tiempo estas fuentes de energía. La escogencia del sustrato depende de muchos factores incluyendo la disponibilidad local del mismo y su costo (Demain, 2005).

El cultivo de microorganismos sobre diferentes sustratos o soportes sólidos depende de diferentes parámetros y factores ambientales como son: el tipo de microorganismo, la cantidad de inóculo, la humedad, la actividad de agua, la aireación, la transferencia de oxígeno, la regulación de la temperatura y el pH (Roussos y Perraud, 2005). El papel del agua en la fermentación sólida es múltiple, este componente es dominante en la composición de la biomasa, y sirve de vehículo para las enzimas y los nutrientes, además de facilitar los intercambios gaseosos (Verma, 2007). Una humedad elevada en el sustrato causa una disminución de la porosidad del sustrato, una baja difusión de oxígeno y una alta contaminación. Al contrario, una baja humedad conduce a un crecimiento limitado y disminuye la disponibilidad del sustrato (Jian *et al.*, 2006).

Uno de los parámetros que caracteriza la eficiencia de la fermentación es la productividad expresada en conidios/kg/h. Aunque, muchos de los trabajos relacionados con la producción masiva de *Trichoderma* sp. (a nivel de laboratorio y de planta piloto) se han realizado en fermentaciones en medio líquido, la producción de este microorganismo mediante fermentación en estado sólido ha mostrado altos valores de productividad, como los descritos por Zhihui *et al.*, (2007) en un trabajo sobre la producción de *Trichoderma viridae* en medio sólido utilizando residuos de la industria del vino donde se encontraron rendimientos de 6.6×10^9 conidios/g. Así mismo, en trabajos sobre la producción masiva de *Trichoderma harzianum* en medio sólido realizados por Thangavelu (2004), Ramos y Navarro (2008) y Anand Singh (2007) se obtuvo rendimientos de 5.0×10^9 , 2.5×10^9 y 8.6×10^9 conidios/g respectivamente. Adicionalmente, se ha realizado la producción de *Trichoderma* sp. utilizando cascarilla de algodón y cascarilla de arroz como soportes de crecimiento alcanzando concentraciones de 2.5×10^9 y 2.3×10^9 conidios/g respectivamente (Panazo, 2007).

El Laboratorio de control biológico del CBB de Corpoica ha realizado trabajos de producción masiva de *T. koningiopsis* (Th003) en fermentación sólida a nivel planta piloto, utilizando como soporte de crecimiento una mezcla de cereales. La producción de este hongo ha sido evaluada tanto en fermentación bifásica (líquida – sólida) como en fermentación sólida, encontrándose valores de producción de 1.29×10^9 y 1.04×10^{10} conidios/kg/h respectivamente (Gómez *et al.*, 2009). Actualmente la producción del hongo se realiza mediante fermentación sólida durante un tiempo de siete días, alcanzando una concentración de 2.0×10^9 conidios/g.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Producir *Trichoderma koningiopsis* (Th003) en fermentación sólida utilizando como sustrato bagazo de caña de azúcar previamente hidrolizado.

5.2. Objetivos específicos

- Evaluar diferentes sistemas de hidrólisis fisicoquímica sobre el bagazo de caña de azúcar como pre tratamiento para favorecer la colonización de *Trichoderma koningiopsis* (Th003) en fermentación sólida.
- Seleccionar un medio de cultivo alternativo para la producción de *Trichoderma koningiopsis* (Th003) utilizando bagazo de caña de azúcar, que produzca una alta concentración de conidios, con una buena actividad biológica y con bajos costos de producción.

6. METODOLOGÍA

Este trabajo se llevó a cabo en las instalaciones de la planta piloto de bioplaguicidas del CBB de Corpoica, ubicada en el Km. 14 vía- Mosquera.

6.1. Microorganismo

Para este trabajo se empleó el hongo *Trichoderma koningiopsis* cepa Th003, suministrado por el banco de germoplasma de microorganismos del Laboratorio de Control Biológico de Corpoica. La cepa se encuentra criopreservada a -70°C en crioviales con glicerol al 10% (p/v) y 0.1% de peptona (p/v). Para la preparación del inóculo la cepa se repicó en agar PDA (Agar papa dextrosa) (Anexo 3) por la técnica de punción central, y se incubó a 25°C por ocho días, tiempo al cual se utilizó para la preparación de la suspensión de conidios.

6.2. Matriz de crecimiento

El bagazo de caña fibroso utilizado fue suministrado por la estación experimental CIMPA de Corpoica ubicada en Barbosa- Santander, donde se encuentra situada la planta de bioetanol. El material vegetal recibido, se secó en estufa a 80°C por dos días. Posteriormente, se molió con un molino eléctrico Tomas Wiley Mil hasta alcanzar un tamaño de partícula de 1000 micras y se almacenó en bolsas de plástico herméticas para su posterior utilización.

6.3. EVALUACIÓN DE LOS SISTEMAS DE HIDRÓLISIS SOBRE BAGAZO DE CAÑA

6.3.1. Hidrólisis fisicoquímicas del bagazo de caña

Para la realización de las hidrólisis fisicoquímicas, se colocaron 10 g de bagazo de caña molido en bandejas de aluminio pequeñas (10 x 3.5 x 2 cm) y se mezclaron con 50 ml de ácido clorhídrico (HCl) a una concentración de 0.005N (relación 5:1 ácido/bagazo). La mezcla de reacción permaneció por 20 minutos a temperatura ambiente (18°C+/- 2°C). Después del tiempo de contacto entre la biomasa y el ácido, las bandejas fueron cubiertas con papel aluminio. Esta misma metodología se siguió para la evaluación de HCl al 0.05N, 0.1N y 0.3N. Para cada concentración de ácido se prepararon seis bandejas, tres de ellas se llevaron a esterilización a 15 psi (121°C) y las tres restantes a 24 psi (132°C) en un autoclave marca Gemmy por 20 minutos. Como tratamientos testigos se prepararon bandejas de bagazo humedecido con agua en la misma relación descrita anteriormente y se esterilizaron tanto a 15 como a 24 psi. En total se evaluaron 10 tratamientos con tres repeticiones por cada uno, para un total de 30 bandejas.

6.3.2. Determinación de azúcares reductores

Como parámetro de eficiencia de cada uno de los sistemas de hidrólisis evaluados para favorecer la colonización de *T. koningiopsis* (Th003) en el medio de cultivo, se cuantificó la concentración de azúcares reductores (mg/ml) por la técnica de DNS (Ácido 3-5 dinitrosalicílico) (Miller, 1959). La cuantificación de los azúcares se determinó a partir de una curva de calibración elaborada con glucosa grado analítico a diferentes concentraciones (0-1.4 mg/ml) para obtener una ecuación de la recta en la cual se reemplazaron los valores experimentales obtenidos (Anexos 1 y 2).

Una vez finalizadas cada una de las hidrólisis, el sustrato de cada bandeja se filtró al vacío para extraer la suspensión líquida que contenía los azúcares, obteniendo tres suspensiones líquidas por cada tratamiento de hidrólisis.

Posteriormente, a cada suspensión se le midió el pH utilizando un potenciómetro marca Hanna instruments, y seguidamente fue neutralizado con NaOH (98% p/v). A los extractos neutralizados se les determinó la concentración de azúcares reductores por la técnica de DNS. Cada muestra se leyó por triplicado a una absorbancia de 540 nm (nueve valores por cada tratamiento). Los datos de absorbancia obtenidos se reemplazaron en la ecuación patrón cuantificando finalmente los valores de glucosa (mg/ml) presentes en cada tratamiento. Finalmente, a cada concentración de azúcares obtenida, se le restó el valor inicial de azúcares provenientes del bagazo de caña sin adición de ácido y sin presión (0.46 mg/ml), que se cuantificaron también por la técnica de DNS. Lo anterior con el fin de garantizar que los valores de azúcares mg/ml expresados eran sólo los producidos por acción de los tratamientos de hidrólisis y no en combinación con los presentes inicialmente en el bagazo de caña.

6.3.3. Análisis estadístico

Los nueve datos por tratamiento obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza ANOVA y a la prueba de comparación de medias de Tukey a un nivel de confianza del 95% con ayuda del programa statistix versión 3.0, para determinar si existían diferencias significativas entre los azúcares obtenidos en los medios control y los obtenidos en los medios hidrolizados.

Adicionalmente, se realizó una ANOVA de dos vías con ayuda del programa Minitab 5.0 para evaluar la interacción de los factores evaluados (presión- temperatura y concentración de ácido) con la variable respuesta central que en este caso fue la concentración de azúcares (mg/ml) y así mismo el efecto individual de cada una de ellas sobre dicha variable.

6.4. SELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO ALTERNO A BASE DE BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR

Para la selección del mejor medio de cultivo alternativo a base de bagazo de caña de azúcar para la producción de *T. koningiopsis* (Th003) se tuvieron en cuenta tres criterios principalmente:

- Producción de alta concentración de conidios en el sustrato para lo cual se realizaron cinéticas de crecimiento del hongo sobre los medios hidrolizados.
- Buena actividad biológica de los conidios provenientes de la fermentación sólida en el bagazo de caña previamente hidrolizado realizando un bioensayo de patogenicidad.
- Bajos costos de producción para lo cual se realizó un análisis de costos de acuerdo a las materias primas requeridas para cada proceso.

6.4.1. Cinéticas de crecimiento de *Trichoderma koningiopsis* (Th003)

Para la realización de las cinéticas de crecimiento de *T. koningiopsis* (Th003), se colocaron 30 g de bagazo de caña molido en bandejas medianas de aluminio (15 cm x 9 cm x 4 cm) y se sometieron a los procesos de hidrólisis fisicoquímicas anteriormente descritos (HCl 0.005N, HCl 0.05N, HCl 0.1N y HCl 0.3N a 15 psi (121°C) y 24 psi (132°C)). Como controles se prepararon las bandejas con la mezcla de bagazo y agua sin adición de ácido y fueron esterilizadas tanto a 15 como a 24 psi. Adicionalmente, se prepararon bandejas con el sustrato estándar comúnmente utilizado en la planta de Bioplaguicidas de Corpoica para el crecimiento de *T. koningiopsis* (Th003) (23 g de arroz, 18 g de salvado y 120 ml de agua). Se obtuvieron en total 11 tratamientos con tres repeticiones por cada uno, para un total de 33 bandejas.

Después de la esterilización de las bandejas, de cada una se tomó una muestra de 2 g para la medición de pH con un potenciómetro marca Hanna instruments y la medición de humedad (%) con una balanza de humedad marca Kern. Cada determinación se realizó por triplicado incluyendo el sustrato estándar.

Antes de la inoculación, los medios fueron suplementados con extracto de levadura 0.2% p/v adicionando 18 ml de la suspensión en cada bandeja y homogeneizando el sustrato con ayuda de

una espátula de acero inoxidable estéril, a excepción del medio estándar. Posteriormente, todas las bandejas fueron inoculadas con 9 ml de una suspensión de *T. koningiopsis* (Th003) a una concentración de 2.0×10^7 conidios/ml. Las bandejas inoculadas se cubrieron con papel vinipel y se incubaron por nueve días a una temperatura de $23^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. Se tomaron muestras de un gramo por triplicado de cada bandeja desde el día cuarto hasta el día noveno para la determinación de la concentración (conidios/g) mediante recuento en cámara de Neubauer.

Terminadas las cinéticas de crecimiento, se realizó la separación de los conidios del sustrato en cada uno de los tratamientos incluyendo los controles y el medio estándar. Para esto se adicionó a cada bandeja 200 ml de Tween 80 (0.1%). El sustrato se filtró con ayuda de una gasa recuperando la suspensión líquida de conidios que fue ajustada a una concentración de 2.0×10^7 conidios/ml y con la cual se realizó el bioensayo de patogenicidad.

6.4.1.1. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de concentración de conidios (nueve datos por tratamiento por día) fueron sometidos a un análisis de varianza ANOVA y a la prueba de Tukey a un nivel de confianza del 95% con ayuda del programa Statistix versión 3.0, para determinar si existían diferencias significativas entre las concentraciones de conidios obtenidas utilizando los medios de cultivo a base de bagazo de caña con la obtenida en el medio estándar.

Adicionalmente, se realizó una ANOVA de dos vías con ayuda del programa Minitab 5.0 para evaluar la interacción de los factores evaluados (presión- temperatura y concentración de ácido) con la variable respuesta central que en este caso fue la concentración de conidios (conidios/g) y así mismo el efecto individual de cada una de ellas sobre dicha variable.

Finalmente como criterio de confirmación se evaluó el área debajo de la curva para cada una de las fermentaciones evaluadas durante los nueve días, asumiendo que a mayor área mejor rendimiento del proceso.

6.4.2. Evaluación de patogenicidad de *Trichoderma koningiopsis* (Th003) sobre esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* (Sc001).

Con el fin de determinar el efecto biocontrolador de los conidios provenientes de las fermentaciones evaluadas, se realizó una prueba de patogenicidad para estimar la habilidad de *T. koningiopsis* (Th003) para controlar el crecimiento y proliferación de los esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* cepa Sc001, aislada de cultivos de lechuga (Martinez, 2007). Esta prueba se realizó para todas las fermentaciones a excepción de la realizada sobre bagazo hidrolizado con 0.3N de HCl donde no se evidenció crecimiento del microorganismo en el medio. Para este bioensayo se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con 10 tratamientos y tres repeticiones por tratamiento (unidades experimentales).

Inicialmente, se realizó la prueba de germinación a los esclerocios del hongo fitopatógeno colocándolos en agar agua (Anexo 3) e incubándolos por un tiempo ocho días a $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. Lo anterior con fin de observar si se encontraban viables desde el inicio al germinar normalmente en el medio.

En cajas de petri grandes que contenían 10 g de suelo tamizado ($0,45 \mu\text{m}$) previamente esterilizado en autoclave (Gemmy) a 121°C , 15 psi por 20 minutos, se colocaron en condiciones de esterilidad, 10 esclerocios viables por caja. En todos los casos, los esclerocios fueron colocados aleatoriamente sobre las cajas y el suelo se humedeció con agua estéril hasta alcanzar una humedad del 70% (capacidad de campo). El bioensayo contó con un diseño completamente al azar y por cada tratamiento se prepararon tres cajas incluyendo los controles (medio bagazo con agua sin adición de ácido y esterilizado a 15 y a 24 psi) y el medio estándar obteniendo un total de 30 cajas (unidades experimentales).

Finalmente, se adicionó tres ml de la suspensión de conidios provenientes de las fermentaciones evaluadas a una concentración de 2.0×10^7 conidios/g. A continuación las cajas se incubaron por ocho días a $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

Finalizado el tiempo de incubación, se extrajeron los esclerocios del suelo y se colocaron en agar agua distribuyéndolos distanciados uno del otro. Las cajas se incubaron nuevamente a $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por ocho días. Pasado este tiempo, se contaron las estructuras que presentaron colonización de *T. koningiopsis* (Th003). Los resultados de parasitismo fueron determinados utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Parasitismo del antagonista sobre el fitopatógeno} = \frac{\text{Esclerocios parasitados} \times 100}{\text{Esclerocios totales}}$$

Se cuentan como esclerocios parasitados aquellos que presenten macroscópicamente la esporulación típica de *T. koningiopsis* (Th003).

6.4.2.1 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza ANOVA y a la prueba de comparación de medias de Tukey con un nivel de confianza del 95%, con el fin de determinar si existían diferencias significativas entre los porcentajes de colonización obtenidos con los conidios provenientes de fermentación en bagazo de caña y los obtenidos en el medio estándar.

6.4.3 Análisis de costos de los medios de cultivo evaluados

Se realizó una matriz de costos para cada uno de los medios de cultivo evaluados a base de bagazo de caña, tomando como referencia el modelo utilizado por la unidad de valorización del CBB de Corpoica para la producción de bioplaguicidas. Para lo anterior, se tuvieron en cuenta los costos fijos y los costos variables haciendo especial énfasis en los costos de materia prima. Finalmente se hizo una comparación de los valores obtenidos para el proceso de fermentación sólida con bagazo de caña, con los valores requeridos para la producción en el sustrato estándar (arroz, salvado, agua).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. COMPOSICIÓN BROMATOLÓGICA DEL BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron muestras de bagazo de caña de azúcar leñoso proveniente de la planta de bioetanol ubicada en la estación experimental de Corpoica CIMPA en Barbosa Santander. Este material fue analizado bromatológicamente por el Laboratorio de Nutrición Animal del CBB.

El análisis bromatológico permitió evidenciar la elevada composición de azúcares complejos en su estructura como la hemicelulosa, la lignina y la celulosa (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis bromatológico del bagazo de caña de azúcar proveniente de la estación experimental CIMPA (Barbosa – Santander).

ANÁLISIS EVALUADO	COMPOSICIÓN - EN MATERIA SECA ENCONTRADA (%)
Hemicelulosa, lignina, celulosa, proteínas y sílice.	84.42
Lignina	16.37
Celulosa	38.71
Fibra	42
Humedad	38

7.2. HIDRÓLISIS FISCOQUÍMICAS DEL BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR

Finalizados los tratamientos de hidrólisis del bagazo de caña de azúcar, se recuperó la suspensión líquida y se determinó en ella la concentración (mg/ml) de azúcares por la técnica de DNS (Miller, 1959) (Anexo 1). Los valores experimentales obtenidos en las hidrólisis realizadas a 15 Psi (121°C) y a 24 Psi (132°C) (Tabla 2) permitieron comprobar el efecto conjunto del HCl y de la presión sobre la liberación de azúcares, ya que en estos tratamientos se encontraron concentraciones desde 26.18 hasta 64.10 mg/ml, mientras que el bagazo tratado únicamente con presión- temperatura se encontraron concentraciones de 0.90 hasta 1.27 mg/ml. De igual forma al realizar el análisis estadístico ANOVA y la prueba de Tukey con un 95% de confianza para todos los tratamientos, se determinó que existieron diferencias significativas en la variable respuesta para cada una de las concentraciones de ácido utilizadas ($P < 0.05$), incrementando notoriamente la concentración de azúcares a medida que la concentración de ácido aumentó. Con lo anterior se puede inferir que el aumento en la concentración de ácido provocó una mayor solubilización de la hemicelulosa y de la lignina produciendo así mayores concentraciones de azúcares fermentables.

Resultados similares describieron Hernandez *et al.*, (2007) quienes realizaron un estudio de comparación de hidrólisis en bagazo de caña para la producción de bioetanol y utilizaron concentraciones de ácido clorhídrico de 1.2 %v/v y 3.6 %v/v y encontraron valores de azúcares reductores de 24.82 y 35.43 g/L, respectivamente.

Tabla 2. Promedio de azúcares reductores obtenidos (mg/ml) después de las hidrólisis fiscoquímicas del bagazo de caña de azúcar.

MEDIO DE CULTIVO	ABSORBANCIA (540 nm)	CONCENTRACIÓN (mg/ml)
Bagazo de caña + agua a 15 Psi (121°C)	0.402	0.90
Bagazo de caña + 0.005N HCl a 15 Psi (121°C)	0.185	26.18
Bagazo de caña + 0.05N HCl a 15 Psi (121°C)	0.215	30.08
Bagazo de caña + 0.1 N HCl a	0.281	40.09

15 Psi (121°C)		
Bagazo de caña + 0.3N HCl a 15 Psi (121°C)	0.316	46.30
Bagazo de caña + agua a 24 Psi (132°C)	0.523	1.27
Bagazo de caña + 0.005N HCl a 24 Psi (132°C)	0.214	30.70
Bagazo de caña + 0.05N HCl a 24 Psi (132°C)	0.309	45.02
Bagazo de caña + 0.1 N HCl a 24 Psi (132°C)	0.377	55.07
Bagazo de caña + 0.3N HCl a 24 Psi (132°C)	0.431	64.10

Al realizar el análisis ANOVA y la prueba de Tukey al 95% se determinó que existen diferencias significativas entre los 10 tratamientos de hidrólisis evaluados ($P < 0.05$). Adicionalmente, se determinó que el tratamiento hidrolizado con HCl 0.3N a 24 psi presentó la mayor concentración de azúcares reductores (64.10 mg/ml).

El medio de cultivo tratado con HCl 0.1N a 24 Psi presentó menores valores de concentración que el pretratado con HCl 0.3N a 24 Psi, pero fue significativamente mayor a todos los tratamientos evaluados presentando una concentración de 55.07 mg/ml de azúcares reductores, con lo que se puede determinar que este tratamiento también presenta buena eficiencia en comparación con los ocho restantes. El análisis de Tukey no detectó diferencias estadísticamente significativas entre los medios de cultivo tratados con HCl 0.3N a 15 psi y el tratado con HCl 0.05N a 24 psi, sin embargo este primero presentó valores numericamente superiores (46.30 mg/ml) a los obtenidos en el tratamiento de 0.05 N de HCl a 24 psi (45.02mg/ml). Esto mismo ocurrió con los medios evaluados con HCl 0.05N a 15 Psi y HCl 0.005N a 24 Psi, donde se encontraron valores de azúcares de 30.8 y 30.70 (mg/ml) respectivamente y donde el análisis estadístico tampoco detectó diferencias significativas entre los dos tratamientos. Para estos casos se puede determinar que se alcanzaron concentraciones de azúcares similares en tratamientos donde independientemente de la concentración de ácido siempre se obtuvieron mayores resultados a una presión más alta. Se determinó además, que para alcanzar altos valores de azúcares no es necesario utilizar concentraciones de ácido tan altas sino que se podría emplear una menor concentración de ácido y aumentar la condición de presión - temperatura.

Estos datos permitieron ver la influencia directa del aumento en la condición de presión- temperatura, sobre la liberación de azúcares en el medio. Galbe (2007) afirmó que en los métodos fisicoquímicos para el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica, el material al ser sometido a altas temperaturas entre los 160°C y los 240°C y altas presiones entre las 10 y 34 bar permiten que la hemicelulosa sea solubilizada en mayor medida encontrando una fase líquida donde se encuentran azúcares oligoméricos y monoméricos, haciendo del método un sistema realmente eficiente. Es posible que dichos resultados se hayan obtenido debido a que a mayor presión mayor temperatura obtenida en el sistema y por lo tanto mayor solubilización de los componentes del sustrato. Por otro lado es importante resaltar que la combinación de estos dos factores (presión-temperatura y ácido) promovió una interacción entre las dos variables, que incrementó la superficie de contacto y los ácidos pudieron penetrar más fácilmente al soporte.

Además de los controles (bagazo tratado sin ácido y esterilizado a las condiciones de presión) el medio de cultivo tratado con HCl 0.005N a 15 Psi fue el que menor concentración de azúcares reductores presentó con un valor promedio de 26.18 mg/ml, presentando diferencias significativas con todos los tratamientos evaluados. En general se determinó que todos los tratamientos presentaron liberación de azúcares después de los procesos de hidrólisis y que es indispensable la adición de ácido para liberar azúcares reductores al medio. Tengborg (2001) realizó estudios de pretratamiento

de diferentes sustratos lignocelulósicos utilizando ácido clorhídrico como catalizador en combinación con vapor, obteniendo rendimientos de 91.4 % y 82.8% de glucosa y xilosa, respectivamente. Esto permite reafirmar que los tratamientos fisicoquímicos permiten altos niveles de liberación de azúcares en sustratos lignocelulósicos.

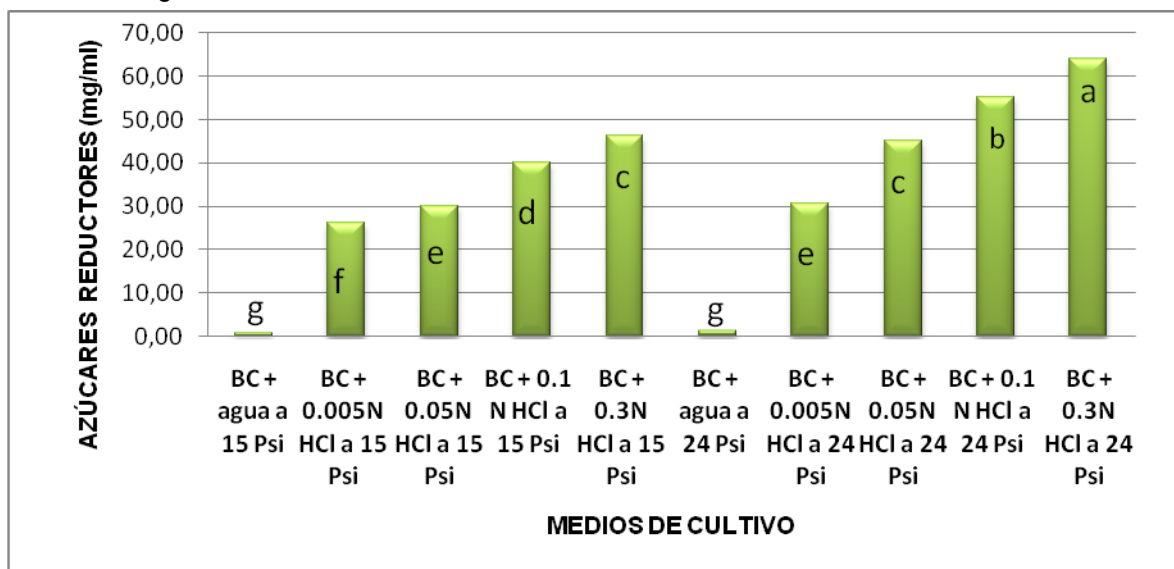


Figura 1. Concentración de azúcares (mg/ml) reductores promedio obtenidos después de cada tratamiento de hidrólisis fisicoquímica. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey (95%).BC: Bagazo de caña de azúcar.

Como análisis adicional y con el fin de evidenciar detalladamente el efecto individual de los factores evaluados (presión - temperatura y ácido) sobre la variable respuesta, se usó la prueba de ANOVA de dos vías (Anexo 4) a los datos obtenidos de concentración de azúcares. Para el caso de la concentración de ácido se observó una tendencia ascendente alrededor de la línea de significancia central o rango promedio de concentración de azúcares. Al observar esta tendencia se pudo confirmar que ésta variable fue directamente proporcional a la variable respuesta y que el efecto de la concentración de ácido es un parámetro influyente sobre la remoción de la estructura cristalina de la hemicelulosa y la lignina. Para el caso de las dos presiones, se observaron distancias drásticas de los dos valores por encima y por debajo de la media central con lo que también se determina que el aumento de presión incrementa notoriamente la liberación de azúcares al medio.

7.3. SELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO ALTERNO A BASE DE BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR

7.3.1 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE *T. koningiopsis* (Th003)

Para la selección del medio de cultivo alternativo a base de bagazo de caña previamente hidrolizado se prepararon los medios siguiendo las metodologías anteriormente descritas.

Debido a que después de los procesos de hidrólisis el sustrato puede sufrir determinados cambios tanto físicos como químicos se realizó la medición de pH y humedad en cada uno de los medios evaluados así como en los controles (bagazo de caña sin adición de ácido y esterilizado a las dos condiciones de presión-temperatura) y en el medio estándar (arroz, salvado y agua), lo anterior con el fin de garantizar las condiciones óptimas de crecimiento del microorganismo antes de la inoculación

del mismo. En la Tabla 3 se puede observar que los medios presentaron en general valores de humedad entre el 70 y el 77% estos valores son favorables para el crecimiento de *T. koningiopsis* (Th003) en fermentación sólida. En cuanto a los valores de pH en todos los medios menos en los controles y el estándar, se presentaron valores de pH entre 4,1 y 4,9 debido a la adición de ácido clorhídrico al sustrato. Estos valores son aceptables para el crecimiento de *T. koningiopsis* ya que se ha descrito que su rango óptimo de crecimiento se encuentra entre 4.0 y 6.0 (Wakelin *et al.*, 1999).

Tabla 3. Valores promedio de pH y humedad después de la esterilización en cada uno de los medios de cultivo.

MEDIO DE CULTIVO	pH	HUMEDAD (%)
Bagazo de caña + 15 Psi (121°C) con agua	7.00	75.20
Bagazo de caña + 0.005N HCl a 15 Psi (121°C)	4,91	69.50
Bagazo de caña + 0.05N HCl a 15 Psi (121°C)	4.51	76.46
Bagazo de caña + 0.1 N HCl a 15 Psi (121°C)	4,24	75.42
Bagazo de caña + 0.3N HCl a 15 Psi (121°C)	4.12	75.49
Bagazo de caña + 24 Psi (132°C) con agua	7.00	75.80
Bagazo de caña + 0.005N HCl a 24 Psi (132°C)	4.86	75.27
Bagazo de caña + 0.05N HCl a 24 Psi (132°C)	4.42	74.22
Bagazo de caña + 0.1 N HCl a 24 Psi (132°C)	4.25	75.32
Bagazo de caña + 0.3N HCl a 24 Psi (132°C)	4.13	74.96
Medio estándar (Arroz salvado y agua)	7.04	75.20

En las fermentaciones realizadas el crecimiento de *T. koningiopsis* (Th003) se evaluó mediante el recuento diario de conidios en cámara de Neubauer. En el medio tratado con HCl 0.3N a las dos presiones (15 psi (121°C) y 24 psi (132°C)) no se evidenció crecimiento del microorganismo en el sustrato a pesar de ser el que mayor concentración de azúcares reductores produjo. Este comportamiento se le podría atribuir a los compuestos tóxicos que se forman a raíz de la combinación entre el ácido, la presión y la temperatura. De acuerdo con Napoles *et. al.* (2006); Rodríguez *et al.*, (2001) el hidrolizado hemicelulósico obtenido mediante la hidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar además de encontrarse enriquecido por xilosa, glucosa y arabinosa, contiene otros componentes como furfural e hidroximetilfurfural (0.6 -1.6 g/L), ácido acético (3.0-3.5 g/L), cenizas (0.3- 0.41%), metales pesados y compuestos fenólicos de bajo peso molecular, estos últimos producto de la degradación de la lignina soluble. Estos compuestos tóxicos pudieron haberse formado en este sistema de hidrólisis y probablemente se quedaron retenidos en el sustrato sobre el cual se inoculó el microorganismo, inhibiendo su crecimiento por completo. Por esta razón, éste medio de cultivo fue descartado y no se continuó su evaluación durante los nueve días de fermentación.

En cuanto a los otros medios de cultivo evaluados, en la tabla 4 se observa la concentración promedio de conidios obtenida en el día noveno de fermentación. La concentración de conidios estuvo en el orden de 10^8 y 10^9 conidios/g y en todos los medios se evidenció esporulación de *T. koningiopsis* (Th003) al cuarto día después de inocular las bandejas (figura 2).

Tabla 4. Producción de conidios al noveno día de fermentación en los medios de cultivo evaluados.

MEDIO DE CULTIVO	PROMEDIO RECUESTO (Conidios/g)	LOG ₁₀
Bagazo de caña tratado con HCl 0.005N a 15 psi	1.22×10^9	9.08
Bagazo de caña tratado con HCl 0.05N a 15 psi	1.30×10^9	9.10
Bagazo de caña tratado con HCl 0.1N a 15 psi	7.00×10^8	8.87
Bagazo de caña tratado con agua a 15 psi	2.2×10^8	8.34
Bagazo de caña tratado con HCl 0.005N a 24 psi	1.17×10^9	9.07
Bagazo de caña tratado con HCl 0.05N a 24 psi	1.20×10^9	9.09
Bagazo de caña tratado con HCl 0.1N a 24 psi	7.80×10^8	8.93
Bagazo de caña tratado con agua a 24 psi	2.30×10^8	8.35
Medio estándar (arroz salvado y agua)	2.30×10^9	9.35

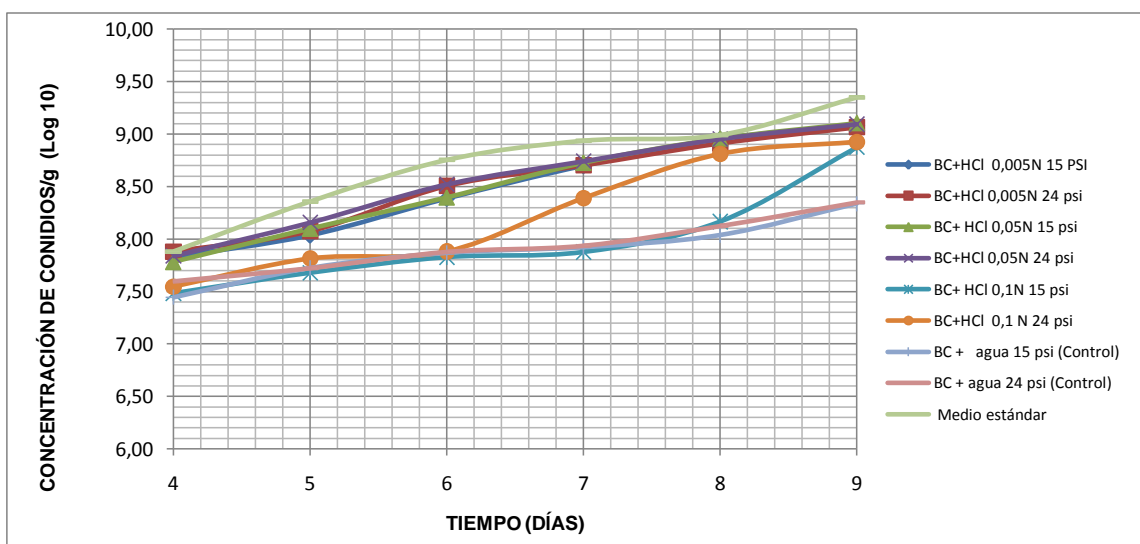


Figura 2. Cinética de crecimiento de *T. koningiopsis* Th003 durante nueve días de fermentación. **BC:** Bagazo de caña de azúcar.

El análisis estadístico de los datos obtenidos al noveno día de fermentación empleando la prueba de Tukey con un 95%, permitió determinar que los controles (Bagazo de caña sin adición de ácido y esterilizado a 15 y 24 Psi) presentaron la menor concentración de conidios de todos los medios evaluados con un valor máximo de 2.3×10^8 conidios/g. Estos tratamientos no presentaron diferencias significativas entre sí, pero si presentaron diferencias significativas con el resto de tratamientos evaluados donde se encontraron concentraciones superiores a 1.0×10^9 conidios/g.

Con lo anterior, se confirma que es necesario el tratamiento previo del sustrato (combinación de presión- temperatura y ácido) para favorecer el crecimiento del hongo en el medio al dejar disponibles los nutrientes y además disminuir la fibrosidad del bagazo. En figura 4 se puede observar que el crecimiento del hongo en el bagazo tratado a 15 psi sin adición de ácido no fue homogéneo como en los medios hidrolizados con ácido sino que dejó varios espacios sin colonizar. Resultados parecidos donde se denota la importancia del pre tratamiento en el residuo lignocelulósico, obtuvo Carrizales (2007) cuando evaluó los efectos de los tratamientos ácidos y acuoso sobre la producción de lisina y tirosina en bagacillo de caña de azúcar, mediante fermentación sólida de *Trichoderma reesei* y *Chaetomium cellulolyticum*. En este estudio se determinó que el pre tratamiento permitió incrementar la producción proteica, obteniéndose los mejores resultados utilizando el pre tratamiento ácido.

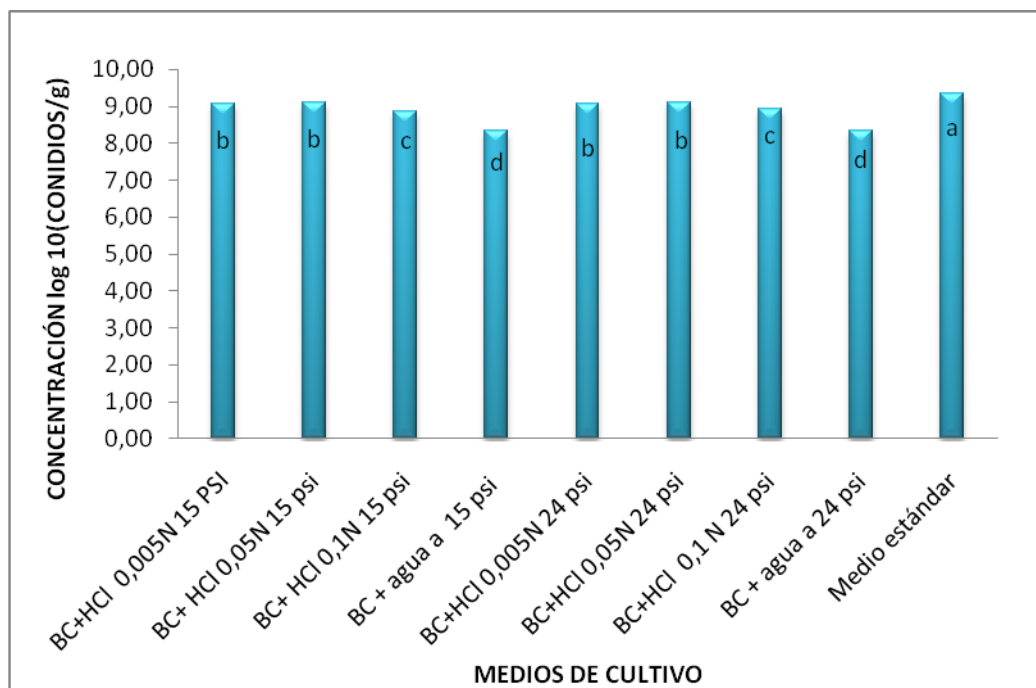


Figura 3. Concentraciones de conidios (Log_{10}) alcanzadas al noveno día de fermentación. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey (95%). **BC:** Bagazo de caña de azúcar.

Por otro lado, el análisis estadístico no detectó diferencias significativas entre la concentración de conidios obtenida en los medios de cultivo tratados con HCl 0.005N y HCl 0.05N a 15 psi (121°C) y a 24 psi (132°C) por lo que los valores se comportan homogéneamente, sin embargo el medio de cultivo tratado con HCl 0.005N a 15 psi (121°C) presentó una concentración promedio de 1.30×10^9 conidios/g siendo este valor numéricamente superior a los obtenidos por los tres tratamientos restantes. Con lo anterior se sugiere, que en estos cuatro medios de cultivo se obtienen concentraciones similares de conidios aún cuando se cambian las condiciones de presión-temperatura y ácido.

El análisis estadístico no detectó diferencias significativas entre las concentraciones de conidios alcanzadas en los medios hidrolizados con HCl 0.1N a 15 psi y de HCl 0.1N a 24 psi, sin embargo, estas fermentaciones fueron las que menor concentración de conidios mostraron con valores de 7.0×10^8 y 7.7×10^8 conidios/g respectivamente. Estos resultados podrían deberse a la producción de compuestos tóxicos que inhiben el crecimiento del hongo en el medio (Napoles *et al.*, 2006), como en el caso de los medios hidrolizados con HCl 0.3N donde no hubo crecimiento del microorganismo en el medio. Sin embargo, estos medios no fueron descartados a pesar de su baja producción de conidios, hasta realizar las pruebas de patogenicidad.

Por otro lado el análisis estadístico también mostró que el medio estándar presentó valores de concentración significativamente mayores a todas las fermentaciones evaluadas (2.3×10^9 conidios/g). Se debe tener en cuenta que este sustrato está hecho a base de arroz y salvado y por su composición nutricional el hongo es capaz de colonizarlo hasta la parte más interna de la bandeja, mientras en el bagazo de caña sólo se vio colonización superficial.

Lo anterior puede ser debido a que el almidón presente en el arroz es más fácil de degradar que la hemicelulosa o lignina restante que quedó en el bagazo y que tal vez no se hidrolizó por completo. Esto se vio reflejado en la concentración de conidios marcando una gran diferencia entre los dos sustratos. Resultados parecidos a los obtenidos en este estudio se obtuvieron por Pérez y colaboradores (2000) para la producción masiva de *Trichoderma harzianum* utilizando arroz como sustrato en las cuales la concentración máxima obtenida después de la fermentación en estado sólido fue de 2.0×10^9 conidios/g.

Sin embargo, cabe resaltar que a pesar de que en general en el bagazo de caña se obtuvieron concentraciones menores que en el sustrato estándar estos resultados siguen siendo promisorios pues el hongo creció homogéneamente y esporuló más rápido que en el medio estándar. En el bagazo de caña se evidenció visualmente la esporulación del hongo al cuarto día de fermentación mientras en el sustrato estándar solo se vio crecimiento micelial (Figuras 4 y 5).

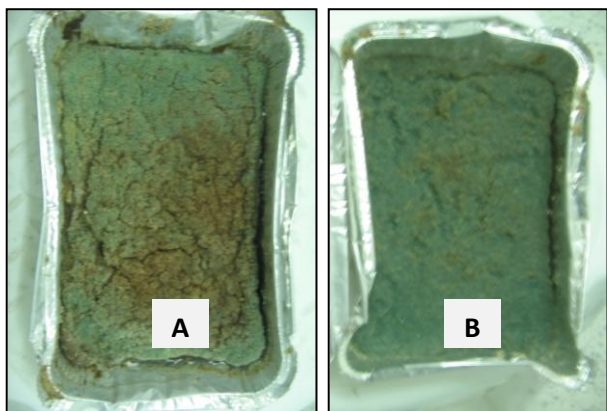


Figura 4. A) Crecimiento de *T. koningiopsis* (Th003) sobre medio control (bagazo de caña sin adición de ácido y esterilizado a 15 psi). **B)** Crecimiento de *T. koningiopsis* (Th003) en bagazo de caña hidrolizado con HCl 0.05N a 15 psi.

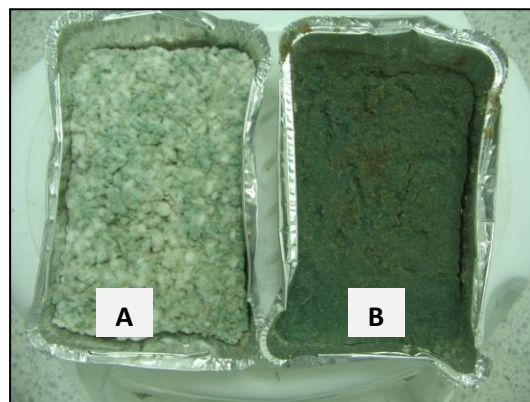


Figura 5. A) Crecimiento de *T. koningiopsis* (Th003) en sustrato arroz- salvado al cuarto día de fermentación. **B)** Crecimiento de *T. koningiopsis* (Th003) en bagazo de caña hidrolizado con HCl 0.05N a 24 psi al cuarto día de fermentación.

Como análisis adicional y con el fin de evidenciar más detalladamente el efecto individual de los factores evaluados (presión - temperatura y ácido) sobre la variable respuesta que para este caso es

concentración de conidios, se usó la prueba de ANOVA de dos vías (Anexo 4). Para el caso de factor concentración de ácido, a medida que aumentó su concentración los puntos se mostraron por debajo de la media global, con lo que se confirmó el efecto negativo de esta variable sobre el desarrollo del microorganismo en el medio. Para el caso del factor presión- temperatura, los dos puntos que representan las dos presiones se mostraron dentro de la línea de significancia, lo que indica que no es un factor influyente sobre la variable respuesta, es decir se puede utilizar cualquier presión y se obtendrán concentraciones de conidios similares.

Tabla 5. Valores de áreas debajo de la curva obtenidas para cada una de las cinéticas de *T. koningiopsis* (Th003) evaluadas durante los nueve días de fermentación.

MEDIO DE CULTIVO	Área debajo de la curva (Log ₁₀ concentración/t)
Bagazo de caña tratado con HCl 0.005N a 15 psi	76.12
Bagazo de caña tratado con HCl 0.05N a 15 psi	76.23
Bagazo de caña tratado con HCl 0.1N a 15 psi	71.66
Bagazo de caña tratado con agua a 15 psi (control)	70.52
Bagazo de caña tratado con HCl 0.005N 24 psi	75.67
Bagazo de caña tratado con HCl 0.05N 24 psi	75.87
Bagazo de caña tratado con HCl 0.1N 24 psi	73.62
Bagazo de caña tratado con agua a 24 psi (Control)	71.52
Medio estándar (arroz, salvado y agua)	77.61

Finalmente con los resultados gráficos en barras de las cinéticas de cada una de las fermentaciones evaluadas (Anexo 5) se realizó el cálculo del área debajo de la curva (Tabla 5) como un estimado de eficiencia de los tratamientos. Se asume que entre mayor sea el área mayor amplitud en los valores dependientes, es decir mayor eficiencia en términos de concentración de conidios.

Estos resultados concuerdan con los resultados mencionados anteriormente donde se determinó que el medio de cultivo más eficiente es el medio estándar, y además que los medios menos eficientes fueron los tratados con HCl 0.1N a 15 y 24 psi. Además, estos datos permitieron confirmar que no existen diferencias drásticas en cuanto a la eficiencia encontrada en los medios de cultivo tratados con HCl 0.005N y 0.05N a 15 y a 24 psi.

7.3.2. Prueba de patogenicidad de *T. koningiopsis* (Th003) sobre esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* Sc001.

Inicialmente, al realizar la prueba de germinación de los esclerocios del hongo fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* se observó porcentajes de germinación superiores al 95% a los cuatro días

de incubación en agar agua (Anexo 6). Adicionalmente, los esclerocios presentaron la morfología macroscópica y microscópica característica de la cepa.

Después de cuatro días de la inoculación de los esclerocios con las suspensiones de conidios de *T. koningiopsis* (Th003) provenientes de las fermentaciones evaluadas se evidenció visualmente cómo los esclerocios empezaron a ser colonizados por *T. koningiopsis* con lo cual se empezó a asumir que el hongo si estaba ejerciendo control sobre dichas estructuras (Anexo 6). Carsolio (2007) afirmó que las especies de *Trichoderma* sp. durante el proceso de micoparasitismo crecen quimiotrópicamente hacia el hospedante, se adhieren a las hifas del mismo, se enrollan en ellas frecuentemente y las penetran en ocasiones. La degradación de las paredes celulares del hospedero se observa en los estados tardíos del proceso parasítico que conlleva al debilitamiento del fitopatógeno. Es por esto tal vez que aún realizando un lavado de los esclerocios después de la colonización externa, volvieron a germinar en agar agua ocho días después de la incubación, evidenciando claramente la colonización interna del patógeno sobre la estructura (Anexo 6).

Al realizar la comparación de medias de Tukey al 95% (Figura 7) para los porcentajes de parasitismo, el análisis estadístico no detectó diferencias significativas entre los porcentajes de parasitismo de los conidios obtenidos en ninguna de las fermentaciones evaluadas, a excepción de los conidios provenientes de la fermentación con bagazo hidrolizado a HCl 0.1N a 15 y a 24 Psi. Estos tratamientos tuvieron porcentajes de parasitismo significativamente inferiores a todos los demás, con valores de 66 y 53% respectivamente. Estos resultados permitieron confirmar el efecto tóxico que ejercen los compuestos que posiblemente se formaron a raíz de la hidrólisis del bagazo sobre el desarrollo del hongo, al inhibir su crecimiento y no permitir que cumpliera su función biocontroladora de manera más eficiente. Cabe recordar que estos dos medios fueron los que menor concentración de conidios produjeron, posiblemente por la presencia en el medio de compuestos antimicrobianos.

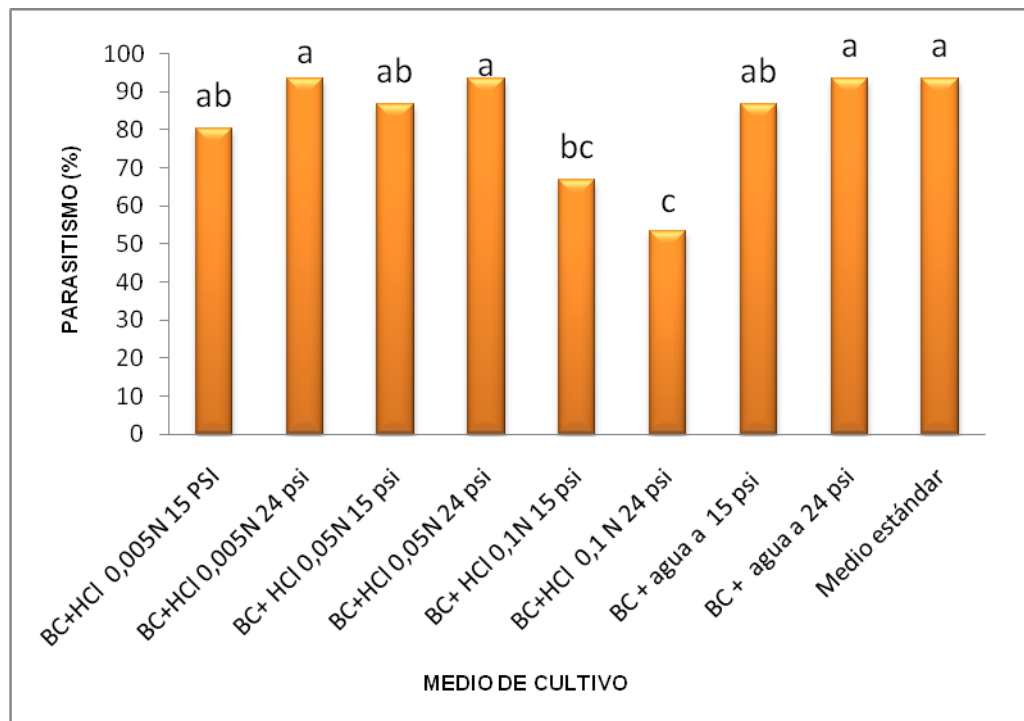


Figura 7. Porcentaje promedio de parasitismo de los conidios provenientes de todas las fermentaciones evaluadas. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) según la prueba de Tukey al 95%. **BC:** Bagazo de caña de azúcar.

Bajo este criterio estos dos medios fueron descartados dentro del proceso de selección del medio de cultivo alternativo, pues el medio seleccionado debe tener dentro de sus características, la capacidad de producir una alta concentración de conidios con buena actividad biocontroladora. Para efectos de este trabajo se debe tener en cuenta que la búsqueda del medio de cultivo alternativo va encaminada a la producción del hongo en este sustrato para obtener el principio activo del bioplaguicida, es decir que es de vital importancia garantizar que el hongo tenga una alta capacidad biocontroladora durante todo el proceso de producción.

Los mejores porcentajes de parasitismo, se encontraron en los conidios provenientes de las fermentaciones con bagazo hidrolizado con HCl 0.005N y HCl 0.05N a 24 psi (132°C) donde se obtuvieron valores de 93% de parasitismo siendo este porcentaje igual al encontrado en el medio estándar utilizado actualmente en la planta de bioplaguicidas de Corpoica. Resultados similares a los obtenidos en este estudio obtuvieron Inbar y Menendes (2007) cuando evaluaron *in vitro* el efecto biocontrolador de *Trichoderma harzianum* sobre *Sclerotinia sclerotiorum* aislada de cultivos de lechuga, donde se encontraron una inhibición de la pre y pos emergencia del patógeno con valores del 92%.

Cundom *et al.*, (2003) afirman que las pruebas *in vitro* para determinar la capacidad antagónica de un microorganismo con respecto a otro, no representan necesariamente el grado de antagonismo y de control biológico en condiciones naturales, pero reflejan la capacidad y variabilidad genética del antagonista, y la del fitopatógeno para resistir el antagonismo. Es así como, el Laboratorio de Control Biológico del CBB de Corpoica cuenta con un Laboratorio de Biotécnica que realiza pruebas *in vitro* para realizar los controles de calidad pertinentes al bioplaguicida después de su formulación.

Uno de estos análisis es la prueba *in vitro* de patogenicidad de *T. koningiopsis* (Th003) sobre esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* Sc001 realizada en este estudio. Dicha prueba es necesaria en condiciones de laboratorio para evaluar y garantizar la efectividad del producto teniendo como factor de aceptación, mínimo un 80% de patogenicidad. Teniendo en cuenta esta referencia, se puede afirmar que los conidios provenientes de las fermentaciones en bagazo de caña hidrolizado presentaron buena actividad biológica pues se encontraron valores de parasitismo hasta de 93%.

Teniendo en cuenta que los medios de cultivo hidrolizados con HCl 0.1 N 15 psi y 0.1N de HCl a 24 psi fueron descartados por que presentaron bajas concentraciones de conidios y porcentajes de parasitismo menores al 60%, se procedió a realizar el análisis de costos de los cuatro medios restantes (Bagazo de caña hidrolizado con HCl 0.005N y HCl 0.05N a 15 y 24 Psi) para la selección final del medio de cultivo.

7.3.3 Análisis de costos de los medios seleccionados

Para este propósito se utilizó la matriz de costos que ya se tiene estandarizada en Corpoica para la producción de bioplaguicidas). Adicionalmente se tuvieron en cuenta los costos adicionales de adición de ácido, extracto de levadura, molido y secado del bagazo de caña. En la producción de los cuatro medios de cultivo que utilizan bagazo de caña se observó un 73.3% de ahorro en el ítem de materia prima en comparación con el medio estándar utilizado actualmente en la planta de bioplaguicidas (Anexo 7).

Es así como para la producción de 100 kg de medio de cultivo utilizando el medio estándar se requieren \$ 291.354,65 mientras que para los medios con bagazo de caña se requieren entre \$ 76.834,63 y \$ 83.834,63. Los conceptos como insumos, arriendo de instalaciones se mantuvieron constantes para los todos los procesos.

Finalmente los costos de producción de 100 kg de cada uno de los cuatro medios de cultivo con bagazo de caña de azúcar mostraron diferencias mínimas entre sí con valores entre \$ 5.875.886 y \$ 5.894.886 mensuales. Por lo anterior, se decidió escoger como medio óptimo para el crecimiento de *T. koningiopsis* el medio con menor costo y con mayor producción numérica de conidios/g siendo el

medio hidrolizado a 0.05N a 15 psi (121°C) el que cumplió con todos los parámetros tenidos en cuenta.

8. CONCLUSIONES

- Se seleccionó el medio de cultivo a base de bagazo de caña de azúcar hidrolizado a una concentración de 0.05N de HCl y a 15 Psi (121°C) de presión como el medio más adecuado para la producción de *T. koningiopsis* en fermentación sólida, debido a su alta concentración de conidios, con buena actividad biológica y por presentar costos inferiores al medio estándar de producción.
- Los tratamientos de hidrólisis fisicoquímica favorecieron la colonización de *T. koningiopsis* sobre el sustrato al ser bastante eficientes en la liberación de azúcares reductores fermentables por el microorganismo.
- No es conveniente realizar sistemas de hidrólisis fisicoquímicas con concentraciones de ácido muy altas pues se producen compuestos tóxicos que desfavorecen el crecimiento del hongo en el medio y a la vez disminuyen notablemente su capacidad biocontroladora.
- Se logró determinar que la utilización de bagazo de caña como soporte de crecimiento de *T. koningiopsis* (Th003) podría disminuir notablemente los costos de materia prima requeridos para el proceso de producción del bioplaguicida en alrededor de .

9. RECOMENDACIONES

- Evaluar el medio seleccionado a base de bagazo de caña de azúcar a nivel planta piloto y determinar si es posible escalar el proceso.
- Realizar pruebas de patogenicidad en campo, de los conidios provenientes de la fermentación en el medio de cultivo seleccionado a base de bagazo de caña de azúcar.
- Garantizar por medio de un análisis bromatológico más detallado la ausencia de compuestos antimicrobianos formados en el medio por acción del tratamiento de hidrólisis y así evitar la inhibición del crecimiento del microorganismo.
- Evaluar la eficiencia del proceso de separación con este sustrato en términos de recuperación de conidios.

10. REFERENCIAS

1. **Anand Singh., Shishir Srivastava., H.B.** 2007. Effect of substrates on growth and shelf life of *Trichoderma harzianum* and its use in biocontrol of diseases. *Bioresource Technology* Vol 98. Pp 470–473.
2. **ASOCAÑA.** 2009. (*Asociación Colombiana de cultivadores De caña de azúcar*), informe anual, disponible en: www.asocaña.com.co.
3. **Avella Guzmán Oscar.** 2007. Etanol celulósico a partir de residuos agrícolas. Revisión universidad de la salle.
4. **Azin, M., Roya, M., Zareh, D.** 2007. Production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on a mixture of wheat bran and wheat straw: Optimization of culture condition by Taguchi method. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol 40. Pp 801–805.
5. **Barreto.** 2008. Actividad enzimática degradación de residuos sólidos y generación de biomasa útil .Tesis maestría universidad nacional de Manizales.
6. **Beltrán, C.** 2004. Selección de aislamientos de *Trichoderma spp.* con potencial biocontrolador de *Rhizoctonia solani* en papa bajo condiciones de casa de malla. Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología: Universidad Nacional de Colombia. Pp 52-56.
7. **Betancour, J.C.** 1997. Evaluación de una técnica de pregerminación controlada en matriz sólida en combinación con los agentes de control biológico *Trichoderma koningii* y *Pseudomona fluorescens* para el control del marchitamiento vascular del tomate causado por *Fusarium oxysporium*. Tesis de pregrado. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de los Andes. Pp 25-45.
8. **Biomass and agriculture: sustainability, markets and policies.** 2007. Organisation for Economic Co-operation and Development.Paris.p.565.
9. **Bolsa Nacional Agropecuaria.** 2009. Precios y estadísticas. Disponible en: www.bna.com.co.
10. **Cárdenas, A.** 1999. Control biológico bajo condiciones de invernadero de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* en tomate *Lycopersicon esculentum* empleando pregerminación controlada de semillas y los agentes biocontrolador *Trichoderma koningii* y *Pseudomonas fluerenscens*. Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. Pag 53.
11. **Carrizales, V., D, Sáenz.** 2007. Enriquecimiento proteínico del bagacillo de caña mediante cultivo semi-sólido de *Chaetomium cellulolyticum*. *Asociación Científica Venezolana*, 37: 580-586.
12. **Carsolio Carolina., Benhamou N., Haran, S.** 2007. Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene ech42 in mycoparasitism. *Appl Environ Microbiol.*; 65: Pp. 929-935.
13. **CENICAÑA.**2009. (*Centro de investigación de la Caña de azúcar en Colombia*). Informe anual disponible en: www.cenicaña.org.co.
14. **Cheng., Chung-Hsien., Wen-Chien.** 2008. Protein expression and enzymatic activity of cellulases produced by *Trichoderma reesei* Rut C-30 on rice straw. *Process Biochemistry*. Vol 43. Pp 1083–1087.

15. **Cotes, A. M., Cárdenas, A., Pinzón, H.** 2001. Effect of seed priming in the presence of *Trichoderma koningii* on seed and seedling disease induced in tomato by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. En: Monte, E., Freeman, S. y Elad, Y. (eds.). Biocontrol agents modes of action and their integration with other means of control. Bulletin IOBC/WPRS. Sevilla, España. Vol. 24 (3) 259-263.
16. **Cotes, A. M., Moreno, C. A., Molano, L. F., Villamizar, L. F., Piedrahita, W. P.** 2006. Prospects for integrated management of *Sclerotinia sclerotiorum* in lettuce. En: memorias
17. **Cundom, M., A, Mazza de Gaiad., Sivia M., Mazzanti de Castañon.** 2003. Actividad Antagónica in vitro de Hhongos saprófitos sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. Cátedra de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias, Corrientes Argentina.
18. **Demain. J.** 2005. Manual of industrial microbiology and biotechnology. Second edition. ASM press Washington. Pp 49-93.
19. **FAO.** Food Agricultural Organization. 2008. Disponible en: www.fao.org.
20. **Fengel, D., Wegener, G.** 1984. Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions. De Gruyter, Berlin.
21. **Galbe, Mats., Guido Zacchi.** 2007. Pretreatment of lignocellulosic materials of efficient bioethanol production. Springer.bioche, *Adv Biochem Engin/Biotechnol.* Vol 108. Pp 41-65.
22. **García, E.** 2007. Medio ambiente y sociedad. La sociedad industrial y los límites del planeta, Madrid, Editorial Alianza, S.A.
23. **Gómez, M., Cruz, M., Diaz, A., Cotes, A.** 2009. Producción masiva de *Trichoderma koningiopsis* Th003 mediante fermentación sólida a nivel planta piloto. Informe Ascolfi. Corpoica.
24. **Grondona, M.D., Mateos, P.D., Monte.** 2008. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, New York, Vol 63. Pp. 3189-3198.
25. **Hamelinck, N., Geertje, H., Andre Faaij.** 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy.* Vol 28. Pp 384-410.
26. **Harikesh, B., Singh, Brahma N., Singh, Satyendra P.** 2009. Solid-state cultivation of *Trichoderma harzianum* NBRI-1055 for modulating natural antioxidants in soybean seed matrix bioresource technology Vol 9 . Pp 23-28.
27. **Hernández Salas, JM., M.S.Villa Ramirez., J.S.Veloz-Rendon.** 2007. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. *Elsevier.Bioresource technology.*
28. **Holker Udo., Jurgen Lenz.** 2005. Solid-state fermentation are there any biotechnological advantages? *Elsevier.Bioresource technology.*
29. **Inbar, Jacob., Ana Menendez . Ian Chet.** 2007. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. Department of Plant Pathology and Microbiology. Ciudad-Universitaria, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.) Buenos Aires, Argentina.
30. **Jian Liu., Yang Ji-chu.** 2006. Fermentation characteristics of vinegar residue and some natural materials. Springerlink. Forestry Studies in China. Vol: 8. Pp 22 25.
31. **Kianoush, K.D., Alaleh Zoghi.** 2001. Comparison of pretreatment strategies of sugarcane bagasse. *Elsevier.Bioresource technology.*
32. **Krishna, C.** 2005. Solid state fermentation systems – a overview.

33. **LAICA.** 2009. (Liga agrícola industrial de la caña de azúcar). Disponible en: www.laica.com.co.
34. **Laureano, P. L., Teymouri, F., Alizadeh, H., Dale, B.E.** 2005. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* págs 1081–1099.
35. **M. Fatih Demirbas., Mustafa Balat., Havva Balat.** 2009. Potential contribution of biomass to the sustainable energy development. Elsevier. *Energy Conversion and Management.* Págs. 1746-1758.
36. **Markovich, N.A., Kononova, G.L.** 2003. Lytic Enzymes of *Trichoderma* and Their Role in Plant Defense from Fungal Diseases: A Review. Springer science. *Applied Biochemistry and Microbiology.* Vol 39. Pp 341-351.
37. **Mathew Sindhu., T, Emilia Abraham.** 2005. Studies on the production of feruloyl esterase from cereal brans and sugar cane bagasse by microbial fermentation. Elsevier. *Enzyme and Microbial Technology.* Vol: 36. Pp 565–570.
38. **Merencio., Deny.** 2007. Publicación fundamentos teóricos de los subproductos de la caña de azúcar. Centro de Estudios de Tecnologías Energéticas Renovables (CETER). Facultad de Ingeniería Mecánica, Instituto Superior Politécnico José Antonio Echeverría (ISPJAE), La Habana Cuba.
39. **Miller, G.** 1959. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426-428.
40. **Moreno, C.** 2003. Control biológico de enfermedades foliares del cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* mill.) con énfasis en mildew polvoso (*Oidium* sp.). Tesis de Pregrado. Carrera de Ingeniería Agrónoma. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional De Colombia. Bogotá D.C. Colombia.
41. **Mosier Nathan., Wyman Charles., Bruce Dale.et al.** 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass .Elsevier. *Bioresource Technology.*
42. **Napoles, S., Ortiz A., et al.** 2006. Purificación de hidrolizado de bagazo de caña de azúcar con carbón activado y resinas de intercambio iónico. *Ciencia y tecnología alimentaria.* Reynosa Mexico. Vol 5.Pp 124-128.
43. **Overend, R.P., Chornet, E.** 1987. Fractionation of lignocellulosis by steam–aqueous pretreatments. *Philos. Trans. R. Soc. London A* 321, Pp 523–536.
44. **Panazo, J.** 2007. Reproducción de *Trichoderma* en diferentes sustratos con fines de control biológico. Trabajo de grado universidad de ciencias agrícolas y pecuarias. Universidad mayor de san simon Bolivia.
45. **Pandey, Ashok., P. Selvakumar., Carlos R.** 2008. Solid state fermentation for the production of industrial enzyme. Biotechnology Division, Regional Research Laboratory, Thiruvananthapuram India. School of Applied Biological and Chemical Sciences.
46. **París, A., Cotes, A.M.** 2002. Biological Control of *Sclerotium cepivorum* in Onion with a yeast and bacteria. En: *Program and Abstract. Influence of Abiotic and Biotic Factors on Biocontrol Agents.* Edit: Y. Elad, J. Köhl. Turkia. Pág: 100.
47. **Paz.** 2008. Revista biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial vol: 6.Pp 23-45.

48. **Perez, L., Ramirez, C.** 2000. Efecto de las variables, condiciones de la fermentación y del sustrato en la producción de *Trichoderma harzianum*. Tesis de pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. 153p.
49. **Piña., Pernalte.** 2008. Fraccionamiento del bagazo de caña mediante el fraccionamiento amoniacal: efecto sobre la humedad del bagazo y la carga de amoniaco, *Bioagro* 20(1) 3-10.
50. **Ramos Agamez., Navarro Elkin.** 2008. Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma sp* *Revista Colombiana de Biotecnología*, Universidad Nacional de Colombia Vol. X. págs 23-34.
51. **Ramos, L.P.** 2003. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Quim. Nova.* 26 (6), págs 863–871.
52. **Rodríguez, R.C.L.B., Felipe M.** 2001. The influence of ph, temperature and hidrolysite concentration in the removal of volatile and nonvolatile compounds from sugarcane bagasse hemycellulosic hydrolysate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation. *Brazilian journal of chemical engineering.* 18. Pp: 299-311.
53. **Roussos, M., Raimbault, F et al.** 1991. Potential of ensiling for efficient management of spent residue from solid state fermentation system. *Elsevier. Bioresource Technology.*
54. **Roussos. S., Perraud Gaim.** 2005. Fisiología y Bioquímica de Microorganismos Utilizados en Procesos de Fermentación en Medio Sólido. *Laboratoire de Biotechnologie PMC, Centre. Francia.*
55. **Salazar.** 2008. Etanol a partir de desechos agrícolas. Hidrólisis ácida de la celulosa. Trabajo de grado, Universidad Nacional de Colombia.
56. **Sánchez Carmen.** 2009. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, Volume 27, Issue 2, Pp 185-19.
57. **Shendong Zhu., Yuanxin Wu., Ziniu. Yu.** 2005. Pretreatment by microwave / alkali of rice straw and its enzymatic hydrolysis. *Elsevier. Bioresource technology.*
58. **Singh Vijai., B. B, Joshi. et al.** 2008. Eco-friendly management of red rot disease of sugarcane with *Trichoderma* strains. Research article. *Applied Biochemistry and Microbiology.* Vol:6. Pp.46-89.
59. **Soccol C.R., Luciana P.S.** 2005. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Laboratory of Biotechnological Processes (LPB), Department of Chemical Engineering, Federal University of Paraná (UFPR).*
60. **Sun, Y., Cheng, J.** 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* 83: 1-11.
61. **Tenborg C., Galbe M., Zacchi.** 2001. *Biotechnology Prog* 17:110.
62. **Thangavelu, R. A., Palaniswami, R., Velazhahan.** 2004. Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing *fusarium* wilt of banana. *Agriculture, Ecosystems and Environment.* Págs 259–263.
63. **Verma M., Satinder K.** 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Elsevier. Biochemical Engineering Journal.* Pp 1–20.
64. **Villamizar, L., Moreno, C., Paris, A., Cotes, A.** 2004. Development of biopesticide prototypes for controlling pathogens in vegetables. En: *Diseases Biocontrol.* International Workshop. Ediciones de UdL. Pág: 136.

65. **Villamizar, L., Moreno, C., Paris, A., Cotes, A., Garzón, C.** 2004. Development of biopesticide prototypes for controlling pathogens in vegetables. En: Diseases Biocontrol. International Workshop: Development of biocontrol agents of diseases for commercial applications in food productions systems. Book of abstracts. Sevilla, España. Ediciones de la UdL. pp. 136
66. **Vinale Francesco., Sivasithamparam Krishnapillai., et al.** 2008. *Trichoderma* -plant pathogen interactions. Review Article. Elsevier. Soil Biology & Biochemistry. Pp 1-10.
67. **Vintila. T, M., Dragomirescu, R., Vintila, V., Croitoriu.** 2009. Saccharification of pretreated wheat straw and corn stover using cellulolytic enzymes from *Trichoderma viride* and *Aspergillus niger*. University of Agricultural Science Timisoara, Romania.
68. **Wakelin,S.A., Sivasithamparam,K., Skipp, R.A.**1999. Saprohytic growth in soil of a strain of *Trichoderma koningii*. New zeland journal of agricultural research.Vol:42. Pp 37-345.
69. **Zhihu, JIN Bo., LI Yuejie.** 2007. Utilization of winery wastes for *Trichoderma viride* biocontrol agent production by solid state fermentation. *Journal of Environmental Sciences* 20: págs.

11. ANEXOS

ANEXO 1

PROTOCOLO TÉCNICA DE DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES ÁCIDO DINITROSALICILICO (DNS)

1. Reactivos

- **Solución DNS (A)**

1.6 g de Hidróxido de Sodio
30 g de tartrato de sodio y potasio
11 g de ácido dinitrosalicílico (DNS)
Aforar a 100 ml con agua destilada

Preparación: Colocar el Hidróxido de sodio en 100 ml de agua destilada y calentar hasta que se disuelva completamente. Adicionar lentamente el tartrato de sodio y de potasio y homogeneizar. Finalmente colocar la solución preparada en un frasco ámbar hermético y adicionar el reactivo DNS lentamente. Dejar en agitación continua por un periodo de 12 horas.

- **Solución Stock de glucosa (B)**

Pesar 200 mg de glucosa grado analítico y disolverlos en 50 ml de agua destilada (4mg/ml) almacenar a -20 °C.

2- Curva estándar

Para la realización de la curva estándar es necesario colocar en 6 tubos de ensayo las cantidades que aparecen en la siguiente tabla y seguir el procedimiento que aparece en el numeral 3.

	BLANCO	1	2	3	4	5	6
Solución B (µl)	-----	25	50	75	100	125	150
Agua destilada (µl)	500	475	450	425	400	375	350
Volumen final (µl)	500	500	500	500	500	500	500
Concentración (mg/ml)	-----	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2

3-Procedimiento

- Adicionar a cada tubo 500 µl de reactivo DNS (solución A)
- Colocar los tubos en ebullición durante 5 minutos.
- Transferir a un vaso de precipitado con agua – hielo.
- Adicionar 5 ml de agua destilada a cada tubo.

- Agitar y dejar en reposo durante 15 minutos.
- Leer a 540 nm la absorbancia de la muestra.

4- Preparación del blanco

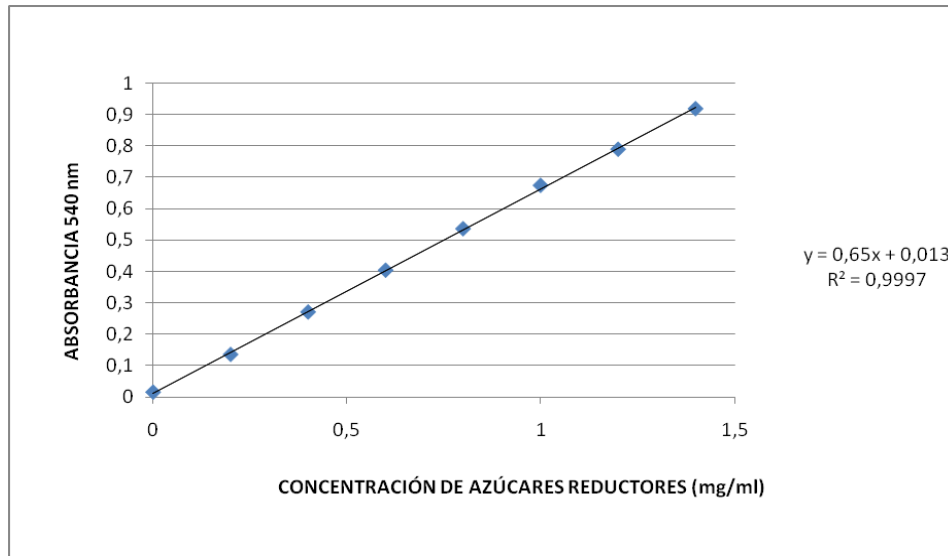
- Tomar 500 µl de agua destilada.
- Adicionar 500 µl de reactivo DNS (solución A)
- Seguir el procedimiento que se describe en el numeral 3

ANEXO 2

ELABORACIÓN DE LA CURVA PATRÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES POR LA TÉCNICA DE ÁCIDO DINITROSALICÍLICO (DNS)

La curva patrón de azúcares reductores se realizó según el protocolo descrito por Miller (1959) (Anexo1). Como sustancia de referencia se empleó glucosa grado analítico. Se prepararon siete soluciones de glucosa de concentraciones conocidas con un volumen final de 500 µl. Se prepararon concentraciones de 0.2 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.6 mg/ml, 0.8 mg/ml, 1.0 mg/ml, 1.2 mg/ml y 1.4 mg/ml. A los 500 µl de cada concentración se le adicionaron 500 µl de reactivo DNS (ácido 3,5- dinitrosalicílico) se llevaron los tubos a ebullición y la reacción se detuvo al sumergir los tubos en hielo. A cada tubo se le adicionó 5 ml de agua destilada y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm, ajustando el cero de absorbancia con el blanco de la prueba.

REPLICA	ABSORBANCIA 540 nm							
	0	0.2 mg/ml	0.4 mg/ml	0.6 mg/ml	0.8 mg/ml	1 mg/ml	1.2 mg/ml	1.4 mg/ml
1	0,016	0,136	0,273	0,404	0,536	0,674	0,789	0,918
2	0,017	0,135	0,272	0,405	0,537	0,675	0,789	0,918
3	0,018	0,136	0,272	0,403	0,538	0,673	0,789	0,917
4	0,017	0,132	0,271	0,404	0,536	0,672	0,789	0,916
5	0,014	0,136	0,271	0,404	0,536	0,674	0,785	0,918
6	0,016	0,138	0,271	0,403	0,534	0,674	0,786	0,918
Promedio	0,016	0,136	0,272	0,404	0,536	0,674	0,788	0,918



Ecuación patrón de azúcares reductores:

$$Y = 0.65x + 0.013$$

$$R^2 = 0.9997$$

Donde **Y** representa la absorbancia obtenida a 540 nm , **x** la concentración de azúcares reductores (mg/ml), **b** el punto de corte con el eje x y **a** la pendiente.

ANEXO 3

MEDIOS DE CULTIVO

Para preparar Un (1) litro

PDA (Papa dextrosa agar):

- Papa: 200 g.
- Agar: 18 g.
- Sacarosa: 2 g.

AGAR AGUA

- Agar 18 g.
- Agua: 1000 ml.

ANEXO 4

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

ANEXO 4 a- TRATAMIENTOS DE HIDRÓLISIS FÍSICOQUÍMICAS

Análisis de varianza ANOVA

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	9	35529.5	3947.73	5316.07	0.0000
WITHIN	80	59.4081	0.74260		
TOTAL	89	35588.9			

VARIABLE	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
T1	0.8978	9	0.0239
T10	64.056	9	0.5769
T2	26.178	9	0.5044
T3	30.856	9	1.5891
T4	40.944	9	0.9422
T5	46.278	9	0.5357
T6	1.2678	9	0.0130
T7	30.678	9	0.3232
T8	45.211	9	1.6174
T9	55.700	9	0.6461
TOTAL	34.207	90	0.8617

CASES INCLUDED 90 MISSING CASES 0

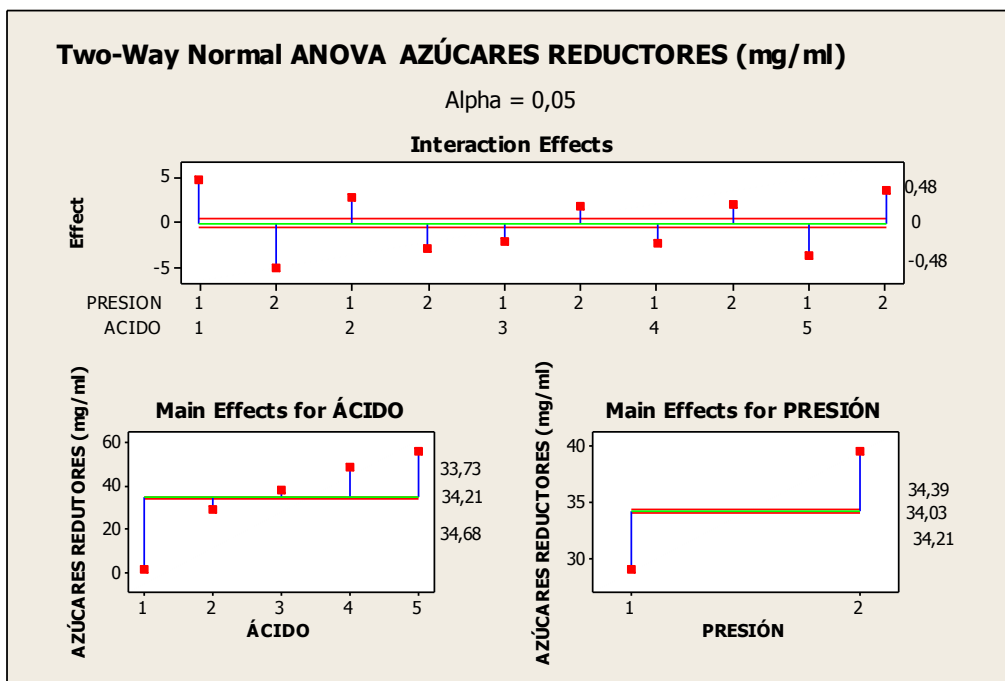
Comparación de medias de Tukey (95%)

VARIABLE	HOMOGENEOUS MEAN	GROUPS
T10	64.056	I
T9	55.700	..I
T5	46.278I
T8	45.211I
T4	40.944I
T3	30.856I
T7	30.678I
T2	26.178I
T6	1.2678I
T1	0.8978I

THERE ARE 7 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE 4.601 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 1.3216
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.4062

Análisis ANOVA de dos vías para los tratamientos de hidrólisis fisicoquímicas



PRESIÓN 1: 15 Psi PRESIÓN 2: 24 Psi
ÁCIDO 1: 0 ÁCIDO 2: HCl 0.005N ÁCIDO3: HCl 0.05N ÁCIDO 4: HCl 0.1N ÁCIDO 5: 0.3N

ANEXO 4 b - Cinéticas de crecimiento de *Trichoderma koningiopsis* (Th003)

Análisis de varianza ANOVA

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	8	8.49296	1.06162	496.20	0.0000
WITHIN	72	0.15404	0.00214		
TOTAL	80	8.64700			

VARIABLE	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
T1	8.3378	9	0.0254
T2	9.0811	9	0.0732
T3	9.1044	9	0.0639
T4	8.8411	9	0.0382
T5	8.3600	9	0.0332
T6	9.0644	9	0.0585
T7	9.0711	9	0.0420
T8	8.8911	9	0.0302
T9	9.3489	9	0.0226
TOTAL	8.9000	81	0.0463

CASES INCLUDED 81 MISSING CASES 0

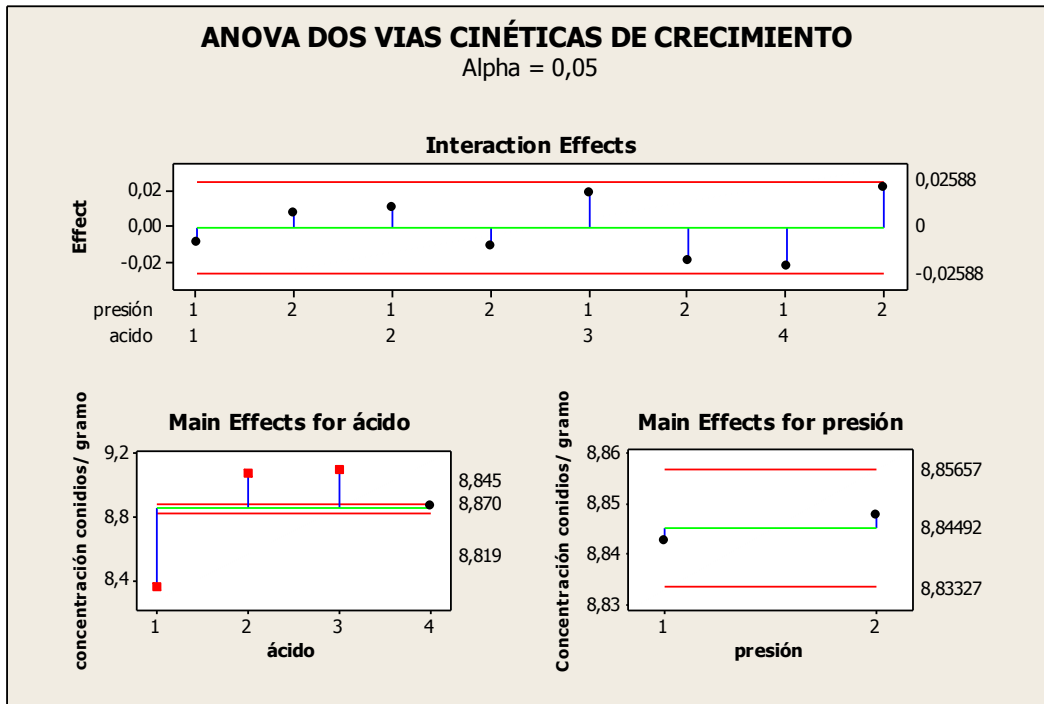
Comparación de medias de Tukey (95%)

VARIABLE	HOMOGENEOUS MEAN	GROUPS
T9	9.3489	I
T3	9.1044	.. I
T2	9.0811	.. I
T7	9.0711	.. I
T6	9.0644	.. I
T8	8.8911 I
T4	8.8411 I
T5	8.3600 I
T1	8.3378 I

THERE ARE 4 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE 4.521 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.0697
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.0218

Análisis ANOVA de dos vías para las cinéticas de crecimiento de *T. koningiopsis* (Th003)



PRESIÓN 1: 15 Psi PRESIÓN 2: 24 Psi
ÁCIDO 1: 0 ÁCIDO 2: HCl 0.005N ÁCIDO 3: HCl 0.05N ÁCIDO 4: HCl 0.1N

Anexo 4 c- Prueba de patogenicidad de *T. koningiopsis* (Th003) sobre esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* Sc001.

Análisis de varianza ANOVA

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	8	4829.63	603.704	2.91	0.0285
WITHIN	18	3733.33	207.407		
TOTAL	26	8562.96			

VARIABLE	SAMPLE		GROUP
	MEAN	SIZE	STD DEV
TA	80.000	3	20.000
TB	93.333	3	11.547
TC	86.667	3	23.094
TD	93.333	3	11.547
TE	66.667	3	11.547
TF	53.333	3	11.547
TG	86.667	3	11.547
TH	93.333	3	11.547

TI	93.333	3	11.547
TOTAL	82.963	27	14.402

CASES INCLUDED 27 MISSING CASES 0

Comparación de medias de Tukey (95%)

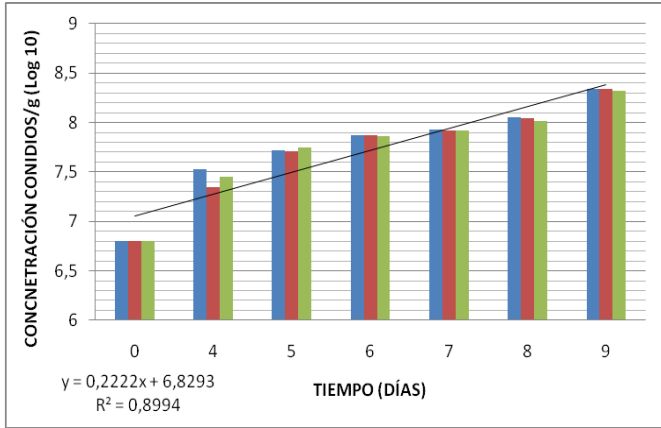
VARIABLE	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
TB	93.333	I
TD	93.333	I
TH	93.333	I
TI	93.333	I
TC	86.667	II
TG	86.667	II
TA	80.000	II
TE	66.667	..III
TF	53.333I

THERE ARE 3 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

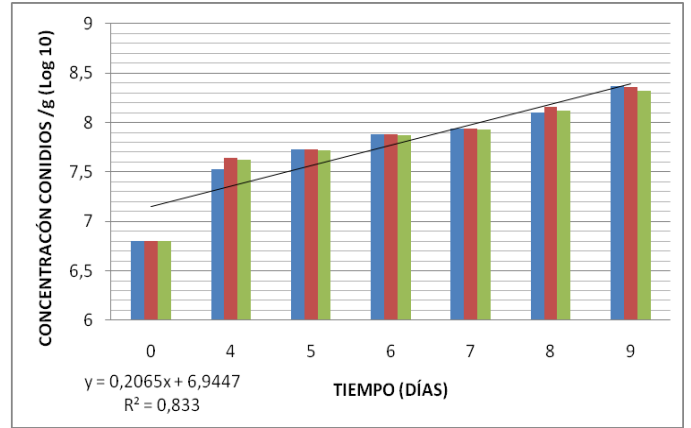
CRITICAL T VALUE 2.101 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 24.705
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 11.759

ANEXO 5

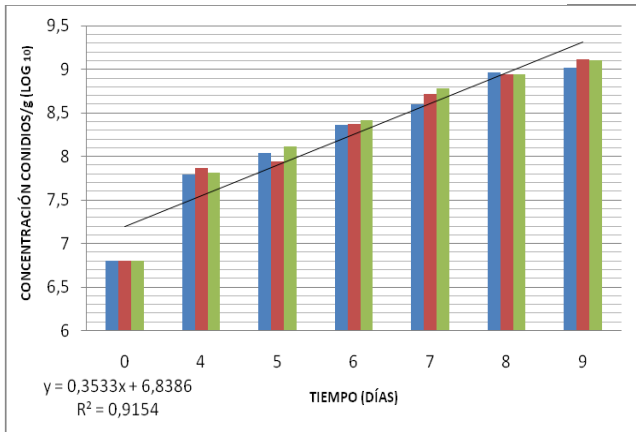
COMPORTAMIENTO CINÉTICO DE *T. koningiopsis* (Th003) EN LOS MEDIOS DE CULTIVO EVALUADOS A LO LARGO DE NUEVE DÍAS DE FERMENTACIÓN



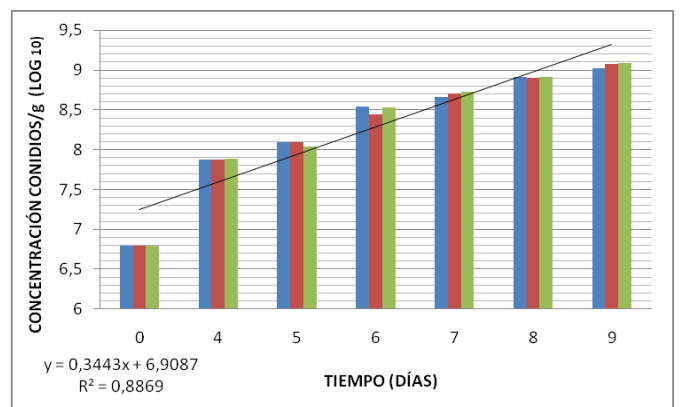
Bagazo de caña sin adición de ácido y esterilizado a 15 Psi (121°C)



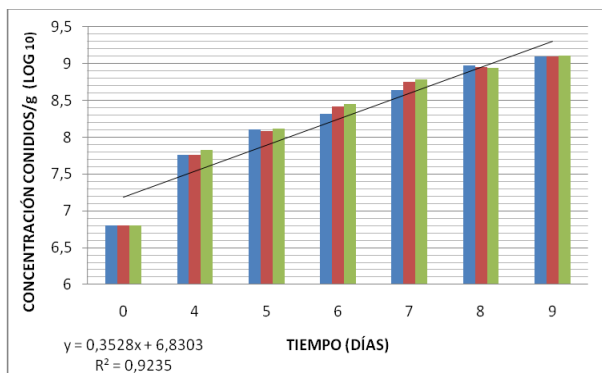
Bagazo de caña sin adición de ácido y esterilizado a 24 Psi (132°C)



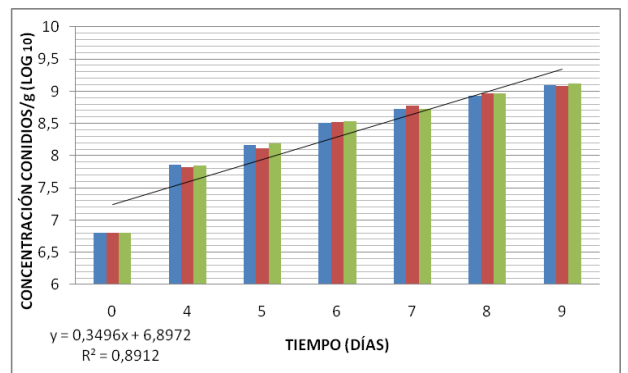
Bagazo de caña tratado con HCl a 0.005N 15 Psi (121°C)



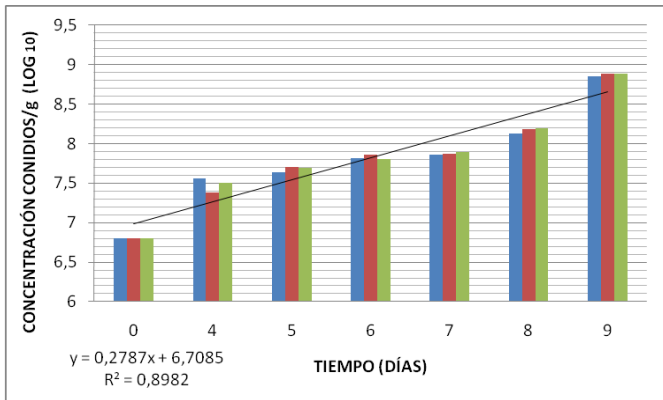
Bagazo de caña tratado con HCl 0.005 N a 24 Psi (132°C)



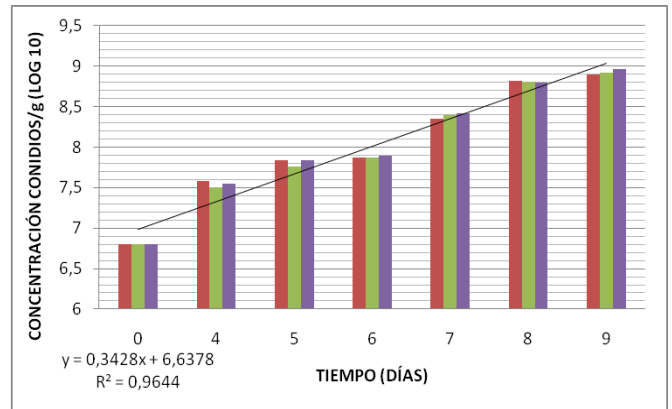
Bagazo de caña tratado con HCl a 0.05N 15 Psi (121°C)



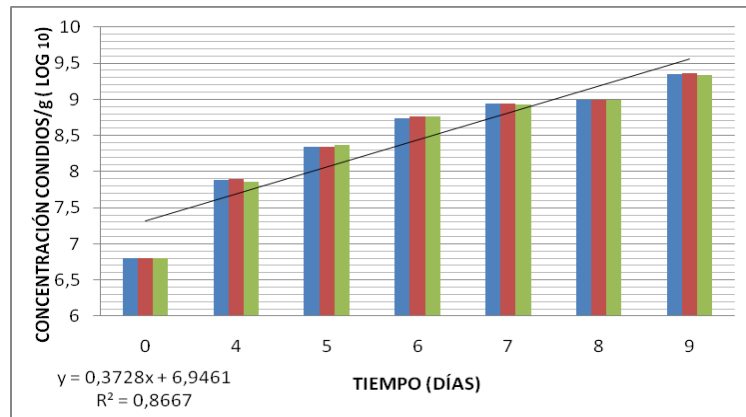
Bagazo de caña tratado con HCl a 0.05N 24 Psi (132°C)



**Bagazo de caña tratado con HCl a 0.1N 15 Psi
(121°C)**



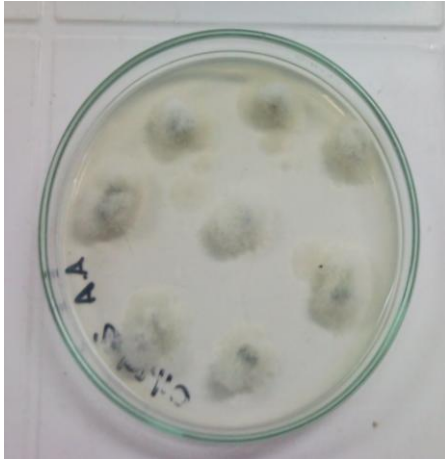
**Bagazo de caña tratado con HCl a 0.1N 24 Psi
(132°C)**



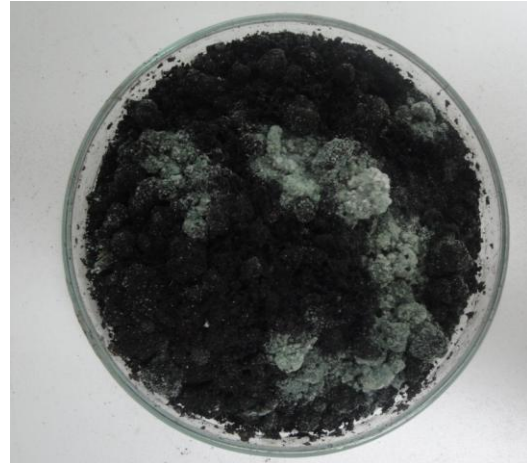
Medio estándar (Arroz salvado y agua)

ANEXO 6

FOTOS PATOGENICIDAD DE *T. koningiopsis* (Th003) SOBRE ESCLEROCIOS DE *Sclerotinia sclerotiorum* (Sc001).



Germinación de esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* (Sc001) en agar agua después de cuatro días de incubación.



Colonización de *T. koningiopsis* sobre esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* después de cuatro días de interacción.



Colonización de *T. koningiopsis* sobre esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* después del lavado de las estructuras.

ANEXO 7**ANÁLISIS DE COSTOS DE LOS MEDIOS SELECCIONADOS A BASE DE BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR EN COMPARACIÓN CON EL MEDIO ESTÁNDAR**

PRODUCCIÓN POR MES SSF DE <i>T. koningiopsis</i> en arroz-salvado (100Kg)		
CONCEPTO	COSTO POR MES	PARTICIPACIÓN
Mano de Obra fija	944.000,0	12,5%
Implementos fijos	82.541,917	1,1%
Arriendo instalaciones	654.000,0	8,6%
Materias primas	291.354,65	3,8%
Insumos	888.808	11,7%
Servicios	500.000,	6,6%
Equipos-mantenimiento	742.021,73	18,2%
Mano de obra variable	1.987.680	37,4%
COSTOS TOTALES MES	6.090.406,30	100,0%

TOTAL COSTO POR MES PRODUCCIÓN	6.090.406,30	
COSTOS FIJOS	1.680.541,92	
COSTOS VARIABLES	4.409.864,38	

PRODUCCIÓN EN SSF DE <i>T. koningiopsis</i> CON BAGAZO DE CAÑA TRATADO CON HCl 0.005N a 15 Psi (100Kg)		
CONCEPTO	COSTO POR MES	PARTICIPACIÓN
Mano de Obra fija	944.000,0	12,5%
Implementos fijos	82541,917	1,1%
Arriendo instalaciones	654.000,0	8,6%
Materias primas	76.834,63	2,0%
Insumos	888.808	11,7%
Servicios	500.000,	6,6%
Equipos-mantenimiento	742.021,73	19,1%
Mano de obra variable	1.987.680,00	51,2%
TOTAL COSTO POR MES DE SFF	5.875.886,28	100,0%

TOTAL COSTO POR MES PRODUCCIÓN	5.875.886,28	
COSTOS FIJOS	1.680.541,92	
COSTOS VARIABLES	4.195.344,36	

PRODUCCIÓN EN SSF DE <i>T. koningiopsis</i> CON BAGAZO DE CAÑA TRATADO CON HCl 0.005N a 24 Psi (100Kg)		
CONCEPTO	COSTO POR MES	PARTICIPACIÓN
Mano de Obra fija	944000,0	12,5%
Implementos fijos	82541,917	1,1%
Arriendo instalaciones	654.000,0	8,6%
Materias primas	76.834,63	2,0%
Insumos	888.808	11,7%
Servicios	500.000,	6,6%
Equipos-mantenimiento	750.021,73	22%
Mano de obra variable	1.987.680,00	51,2%
TOTAL COSTO POR MES DE SFF	5.885.886,28	100,0%

TOTAL COSTO POR MES PRODUCCIÓN	5.885.886,28	
COSTOS FIJOS	1.680.541,92	
COSTOS VARIABLES	4.205.344,36	

PRODUCCIÓN EN SSF DE <i>T. koningiopsis</i> CON BAGAZO DE CAÑA TRATADO CON HCl 0.05N a 15 Psi (100Kg)		
CONCEPTO	COSTO POR MES	PARTICIPACIÓN
Mano de Obra fija	944000,0	12,5%
Implementos fijos	82541,917	1,1%
Arriendo instalaciones	654.000,0	8,6%
Materias primas	83.834,63	2,0%
Insumos	888.808	11,7%
Servicios	500.000,	6,6%
Equipos-mantenimiento	742.021,73	19,1%
Mano de obra variable	1.987.680,00	51,2%
TOTAL COSTO POR MES DE SFF	5.882.886,28	100,0%

TOTAL COSTO POR MES PRODUCCIÓN	5.882.886,28	
COSTOS FIJOS	1.680.541,92	
COSTOS VARIABLES	4.202.344,36	

PRODUCCIÓN EN SSF DE <i>T. koningiopsis</i> CON BAGAZO DE CAÑA TRATADO CON HCl 0.05N a 24 Psi (100Kg)		
CONCEPTO	COSTO POR MES	PARTICIPACIÓN
Mano de Obra fija	944000,0	12,5%
Implementos fijos	82541,917	1,1%
Arriendo instalaciones	654.000,0	8,6%
Materias primas	83.834,63	2,0%
Insumos	888.808	11,7%
Servicios	500.000,	6,6%
Equipos-mantenimiento	750.021,73	22%
Mano de obra variable	1.987.680,00	51,2%
TOTAL COSTO POR MES DE SFF	5.894.886,28	100,0%

TOTAL COSTO POR MES PRODUCCIÓN	5.894.886,28	
COSTOS FIJOS	1.680.541,92	
COSTOS VARIABLES	4.214.344,36	