

# PRODUCCIÓN DE *Trichoderma koningiopsis* Th003

Fredy Mauricio Cruz I.Q.,  
Martha Isabel Gómez Ph.D.  
y Alba Marina Cotes Ph.D.

Investigadores Laboratorio de Control Biológico,  
Centro de Biotecnología y Bioindustria - CBB,  
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Corpoica.  
Km 14 vía Bogotá-Mosquera.  
E-mail: mgomez@corpoica.org.co



## CAPÍTULO 2

## RESUMEN

El hongo *Trichoderma koningiopsis* cepa Th003 fue aislado de suelo en el departamento de Cundinamarca y ha sido objeto de varios estudios por sus características promisorias para el control biológico de diferentes hongos fitopatógenos. Por esta misma razón en el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de Corpoica se desarrollaron diferentes sistemas de producción masiva de este agente biocontrolador. Con el propósito de contar con un sistema de producción masiva, técnico y económicamente favorable, se evaluaron diferentes sustratos orgánicos bajo condiciones de fermentación sólida y medios de cultivo líquidos en condiciones de fermentación bifásica, teniendo como punto de partida los resultados de las investigaciones previas de Peña, *et al.* (2002) y Cruz, *et al.* (2007), donde se obtuvieron producciones de *T. koningiopsis* Th003 con concentraciones finales de  $1.0 \times 10^9$  conidios/g en sustratos sólidos y de  $5.0 \times 10^8$  conidios/ml en medios líquidos. La técnica de fermentación sólida fue utilizada para evaluar dos metodologías de producción, en una el sustrato estandarizado SS1 se dispuso en bandejas de aluminio y en la otra en bolsas de polietileno. Tras realizar 3 lotes piloto para cada metodología, las productividades promedio de *T. koningiopsis* Th003 al final de las fermentaciones fueron de  $8.45 \times 10^9$  conidios/Kg sustrato/hora para la fermentación en bandejas de aluminio y de  $4.73 \times 10^9$  conidios/Kg sustrato/hora en bolsas de polietileno.

## 2.1 INTRODUCCIÓN

Para alcanzar una producción eficiente de hongos biocontroladores tal como *Trichoderma* sp., es de gran importancia determinar la relación óptima entre las fuentes de carbono y nitrógeno (C/N), que permita mantener la actividad de los complejos enzimáticos como xilanasas, celulasas y glucosidasas entre otros, secretados por el hongo para la asimilación de los nutrientes del sustrato. Por otra parte, en este proceso se debe brindar el suministro efectivo de oxígeno durante el crecimiento del hongo, lo cual influye en la colonización completa del sustrato y posterior esporulación (Harman y Kubicek, 1998). La estandarización del proceso de producción de *T. koningiopsis* Th003 se inició con la evaluación de sustratos potenciales para su eficiente crecimiento a nivel de laboratorio; es así como en investigaciones previas en el Laboratorio de Control Biológico se utilizaron matrices sólidas compuestas por cereales (trigo, cebada perlada, millo y arroz) con diferentes relaciones C/N. Adicionalmente, se evaluaron sustratos líquidos como medio de cultivo Saboureaud, solución de sacarosa con microelementos y arroz licuado. Después de estas investigaciones se estandarizaron las condiciones de incubación del microorganismo, las cuales fueron de 27 °C, humedad relativa superior a 50% y un tiempo de incubación entre 7 y 8 días. Igualmente, fueron seleccionados dos medios de cultivo promisorios para la producción masiva de Th003, uno sólido y otro líquido, codificados como SS1 y SL1 respectivamente (Peña, 2002).

## 2.2 METODOLOGÍA

### Microorganismo

La cepa Th003 de *T. koningiopsis* fue suministrada por el Banco de Germoplasma de Microorganismos con interés en control biológico, administrado por el Laboratorio de Control Biológico de Corpoica, la cual se encontraba crioconservada a -70 °C. Su mantenimiento a corto plazo (3-5 semanas) se realizó mediante el almacenamiento de cultivos esporulados en medio agar PDA a 4 °C.

### Proceso de fermentación de *T. koningiopsis* Th003

A partir de cultivos del hongo de 7 días de edad en medio PDA, se removieron los conidios mediante la adición de 10 ml de una solución de Tween 80 a 0.1% (v/v). La suspensión de conidios obtenida se ubicó en un tubo estéril y se homogeneizó en un agitador vibratorio durante 30 segundos. A partir de esta suspensión madre se realizaron diluciones seriadas usando una solución de Tween 80 a 0.1% (v/v) con el fin de obtener el inóculo con una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/ml.

Posteriormente con el sustrato SS1, seleccionado en el estudio de Peña (2002) como el mejor en cuanto a rendimiento y con una relación C/N de 8.89, se evaluó la producción de *T. koningiopsis* Th003 mediante dos metodologías de fermentación sólida. La primera metodología consistió en el empleo de bolsas de polietileno de alta densidad que contenían 200g de sustrato humedecido (SS1). Cada bolsa se selló con un tapón de algodón y gasa con el propósito de permitir el intercambio de gases como el oxígeno y el dióxido de carbono con el ambiente durante el tiempo de incubación. Luego el sustrato fue esterilizado en autoclave a 121 °C y 15 psi durante 20 min. Posteriormente, el inóculo fue inyectado con una jeringa a razón de 10 ml por bolsa (Figura 1).

Las condiciones de incubación fueron de 27 °C y una humedad relativa de 50%, siendo éstas las recomen-



Figura 1. Inoculación de *T. koningiopsis* Th003 en bolsas de polietileno.

dadas en las investigaciones previas efectuadas en el Laboratorio de Control Biológico por Peña (2002) y Cruz (2007). Con esta metodología, se formaron tres lotes de fermentación de *T. koningiopsis* Th003 cada uno con 100 bolsas aproximadamente.

La segunda metodología de fermentación sólida evaluada consistió en el uso de bandejas de aluminio con dimensiones de 21x14x5 cm, en donde se colocó un promedio de 150 g de sustrato SS1 humedecido con agua. Las bandejas con el sustrato fueron esterilizadas en autoclave a 121 °C y 15 psi durante 20 min. En este caso la inoculación del sustrato con Th003 se hizo por aspersión directa, a razón de 3.5 ml por bandeja, aproximadamente (Figura 2).

Una vez inoculado el sustrato, las bandejas fueron selladas mediante una película plástica que permitía el intercambio de gases y luego se incubaron en las condiciones antes mencionadas. Con esta metodología se instalaron tres lotes con aproximadamente 60 bandejas cada uno.

Los tiempos de incubación para las fermentaciones en bolsas de polietileno fueron de 10 días, siendo éste el tiempo necesario para alcanzar la colonización y la esporulación homogéneas del hongo en el sustrato y evitando así el parasitismo. Por otra parte, para las fermentaciones llevadas a cabo en bandejas de aluminio, se requirieron 8 días de incubación.



Figura 2. Inoculación de *T. koningiopsis* Th003 en bandejas de aluminio.

**Tabla 1.** Resultados de los lotes producidos de *T. koningiopsis* (Th003) por fermentación sólida, mediante las dos metodologías descritas.

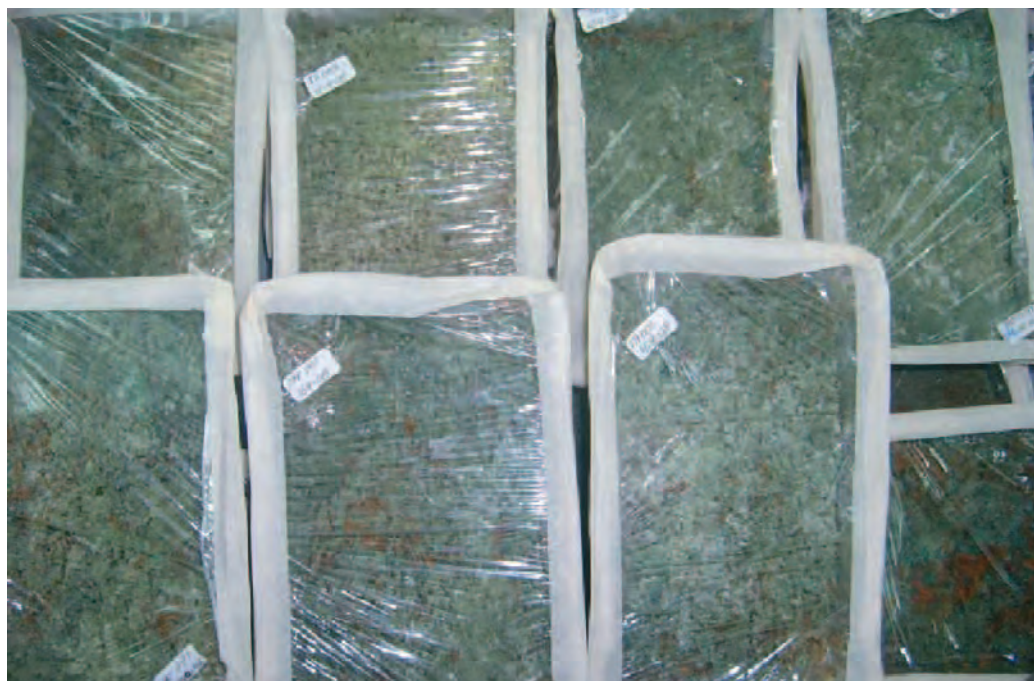
LOTE	Bolsas de polietileno			Bandejas de aluminio		
	Concentración (conidios/g)	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Concentración (conidios/g)	Desviación estándar	Coefficiente de variación
1	$8.31 \times 10^8$	0.028	0.32%	$1.23 \times 10^9$	0.055	0.60%
2	$1.65 \times 10^9$	0.109	1.19%	$2.08 \times 10^9$	0.027	0.28%
3	$9.18 \times 10^8$	0.049	0.54%	$1.55 \times 10^9$	0.009	0.09%
Promedio	$1.13 \times 10^9$	0.161	1.78%	$1.62 \times 10^9$	0.114	1.24%

Al terminar la fase de incubación de cada lote, todo el sustrato colonizado se homogeneizó en un mezclador planetario y luego, mediante recuento en cámara de NeuBauer, se determinó por triplicado la concentración de conidios por gramo.

## 2.3 RESULTADOS

Para la metodología de crecimiento en las bolsas de polietileno, la concentración promedio de conidios

en los tres lotes de fermentación de *T. koningiopsis* Th003 fue de  $1.13 \times 10^9$  conidios/g. La reproducibilidad del proceso fue alta, pues entre lotes se obtuvo una desviación estándar de 0.161 y un coeficiente de variación de 1.78% (Tabla 1). Se presume que la mayor limitante encontrada en el crecimiento de *T. koningiopsis* Th003 con esta metodología, fue la baja transferencia de gases entre el hongo y el ambiente, en especial de oxígeno, ya que fue notoria la tendencia de esporulación del hongo sólo en la zona cercana a la boca de las bolsas, lo que hizo nece-



**Figura 3.** Fermentación sólida de *T. koningiopsis* Th003 en bandejas de aluminio.

saría la manipulación periódica de éstas buscando dinamizar la transferencia de oxígeno, siendo esto dispendioso para un gran número de bolsas.

El proceso de fermentación en las bandejas de aluminio mostró una concentración de conidios superior a la de las bolsas, con un valor promedio de  $1,62 \times 10^9$  conidios/g. Igualmente, la reproducibilidad del proceso también fue alta, con una desviación estándar de 0.114 y un coeficiente de variación entre lotes de 1.24% (Tabla 1).

El mejor comportamiento encontrado en el crecimiento de *T. koningiopsis* Th003 utilizando bandejas de aluminio se podría explicar por la mejor oxigenación del hongo en el sustrato, a causa de la mayor área de transferencia. Adicionalmente, el sustrato fue colonizado por el hongo homogéneamente, a diferencia de lo que ocurrió en las bolsas, por lo que no fue necesario manipular el sustrato durante la incubación (Figura 3).

Después de estas fermentaciones se estimaron los rendimientos de producción del hongo en tres lotes piloto, obteniendo  $4.73 \times 10^9$  conidios/Kg sustrato/

hora para el crecimiento en bolsas de polietileno y  $8.45 \times 10^9$  conidios/Kg sustrato/hora para la fermentación en bandejas de aluminio. Se puede afirmar que la metodología de fermentación sólida utilizando bandejas, presenta mayor viabilidad de escalamiento a nivel de planta piloto pues, adicional a una mayor productividad, tiene menores tiempos de incubación y se requiere menos volumen de inóculo: 0,023 ml/g sustrato. Mientras que la producción en bolsas de polietileno requiere mayor tiempo de incubación, mayor volumen de inóculo: 0,050 ml/g sustrato y mano de obra adicional para manipular periódicamente el sustrato durante la incubación, mostrando así que esta última metodología tiene bajo potencial técnico y económico para ser escalable.

## 2.4 CONCLUSIÓN

El sustrato sólido SS1 y la metodología de fermentación sólida en bandejas fueron las condiciones más promisorias seleccionadas para llevar a cabo la producción masiva de *T. koningiopsis* Th003 a nivel de planta piloto.

---

## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a los investigadores Laura Villamizar Ph.D. y Carlos Andrés Moreno M.Sc, a las estudiantes de microbiología industrial de la Universidad Javeriana Viviana Peña, Carolina Cruz, Isabel Quiroga y Eliana Cañón, a los auxiliares del Laboratorio de Control Biológico Juan Carlos Barrios y Aura María Salamanca, quienes colaboraron con la presente investigación y desarrollo del proyecto.

## REFERENCIAS

- Cruz, C. 2007. Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Tesis de grado. Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.127 p.
- Harman G., Kubicek C. 1998 *Trichoderma* and *Gliocadium* enzymes and biological control applications. Cornell University, Geneva, N.Y., USA. University of Technology, Vienna, Austria. Volumen 2. 183-190.
- Peña, V. 2002. Efecto de diferentes sustratos sobre la producción de conidios de *Trichoderma koningii* en medio sólido. Tesis de grado. Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.153 p.