



Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión

Facultad de Ciencias

Escuela Profesional de Biología con Mención de Biotecnología

**Evaluación de *Trichoderma harzianum* bajo un biorreactor de
inmersión temporal neumático de fermentación sólida en una matriz
biochar**

Tesis

**Para optar el Título Profesional de Bióloga con Mención en
Biotecnología**

Autoras

**Dayana Copara Cornejo
Judith Verónica Saavedra Pinedo**

Asesor

Dr. José Luis Romero Bozzetta

Huacho – Perú

2024



9+

Reconocimiento - No Comercial – Sin Derivadas - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Reconocimiento: Debe otorgar el crédito correspondiente, proporcionar un enlace a la licencia e indicar si se realizaron cambios. Puede hacerlo de cualquier manera razonable, pero no de ninguna manera que

sugiera que el licenciante lo respalda a usted o su uso. **No Comercial:** No puede utilizar el material con fines comerciales. **Sin Derivadas:** Si remezcla, transforma o construye sobre el material, no puede distribuir el material modificado. **Sin restricciones adicionales:** No puede aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros de hacer cualquier cosa que permita la licencia.



UNIVERSIDAD NACIONAL JOSÉ FAUSTINO SÁNCHEZ CARRIÓN

LICENCIADA

(Resolución de Consejo Directivo N° 012-2020-SUNEDU/CD de fecha 27/01/2020)

“Año del Bicentenario, de la consolidación de nuestra Independencia, y de la conmemoración de las heroicas batallas de Junín y Ayacucho”.

Facultad Ciencias

Escuela Profesional de Biología con Mención en Biotecnología

INFORMACIÓN

DATOS DEL AUTOR (ES):		
NOMBRES Y APELLIDOS	DNI	FECHA DE SUSTENTACIÓN
Judith Veronica Saavedra Pinedo	47316697	28/ 11/2023
Dayana Copara Cornejo	48369726	28/ 11/2023
DATOS DEL ASESOR:		
NOMBRES Y APELLIDOS	DNI	CÓDIGO ORCID
Dr. José Luis Romero Bozzetta	15581525	0000-0002-6631-1480
DATOS DE LOS MIEMROS DE JURADOS – PREGRADO/POSGRADO-MAESTRÍA-DOCTORADO:		
NOMBRES Y APELLIDOS	DNI	CÓDIGO ORCID
Dr. Francisco Castillo More	15589942	0009-0005-8777-7764
Blgo. Desiderio Elías Cotos Duran	07243334	0000-0001-7456-5379
Dr. Pedro James Vásquez Medina	16562688	0000-0003-3735-1800

EVALUACIÓN DE TRICHODERMA HARZIANUM BAJO UN BIORREACTOR DE INMERSIÓN TEMPORAL NEUMÁTICO DE FERMENTACIÓN SÓLIDA EN UNA MATRIZ BIOCHAR

INFORME DE ORIGINALIDAD

15%	15%	8%	9%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.unjfsc.edu.pe Fuente de Internet	1%
2	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
3	repositorio.uncp.edu.pe Fuente de Internet	1%
4	ouci.dntb.gov.ua Fuente de Internet	1%
5	1library.co Fuente de Internet	<1%
6	www.produccioncientificaluz.org Fuente de Internet	<1%
7	repositorio.ucv.edu.pe Fuente de Internet	<1%
8	dspace.ups.edu.ec Fuente de Internet	<1%

TÍTULO

“Evaluación de *Trichoderma harzianum* bajo un biorreactor de inmersión temporal neumático de fermentación sólida en una matriz biochar”

Autoras

DAYANA COPARA CORNEJO

JUDITH VERONICA SAAVEDRA PINEDO

Asesor

Dr. JOSÉ LUIS ROMERO BOZZETTA

**UNIVERSIDAD NACIONAL JOSÉ FAUSTINO
SÁNCHEZ CARRIÓN**

FACULTAD CIENCIAS

JURADO EVALUADOR

DR. FRANCISCO CASTILLO MORE

Presidente

Blgo. DESIDERIO, COTOS DURAN

SECRETARIO

Dr. PEDRO JAMES, VÁSQUEZ MEDINA

VOCAL

Dr. JOSÉ LUIS ROMERO BOZZETTA

Asesor

DEDICATORIA

Primeramente, dedicar el siguiente trabajo a Dios por brindarnos la sabiduría para lograr nuestros objetivos, a nuestros padres por nuestra formación académica a lo largo de los años, ya que siempre estuvieron apoyándonos cuando más lo necesitábamos.

AGRADECIMIENTO

A nuestro asesor Dr José Luis Romero Bozzetta, por el empuje y orientación que nos brindó al realizar la investigación.

Agradecer al jefe del laboratorio de Biología, Ecología y RRHH el Ing. Jesús Gustavo Barreto Meza, quien nos brindó su apoyo haciendo el uso de las instalaciones, asimismo como los equipos y ciertos materiales que nos fueron brindados a lo largo de la realización de la investigación. asimismo, a la Facultad de Ingeniería Pesquera.

Al Dr. Adelmo Neil Goñi Salazar quien brindo su apoyo desde el inicio de la investigación.

Al Ing. Jose Laguna Causo por el apoyo brindado desde el inicio de la carrera hasta la culminación de nuestra investigación.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTO	4
ÍNDICE	5
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	10
1.1. Descripción de la realidad problemática:	10
1.2. Formulación del problema	12
1.2.1. Problema general.....	12
1.2.2. Problemas específicos	12
1.3. Objetivos de la investigación	12
1.3.1. Objetivo general	12
1.3.2. Objetivos específicos	12
1.4. Justificación de la investigación	12
1.5. Delimitaciones del estudio	13
1.6. Viabilidad del estudio	14
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	15
2.1. Antecedentes de la investigación	15
2.1.1. Investigaciones internacionales.....	15
2.1.2. Investigaciones nacionales	16
2.2. Bases teóricas	18
2.3. Definición de términos básicos	27
2.4. Hipótesis de investigación	28
2.4.1. Hipótesis general.....	28
2.4.2. Hipótesis específicas	28
2.5. Operacionalización de las variablesTabla 1.....	30
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA	31
3.1. Diseño metodológico	31
3.2. Población y muestra	31

3.3. Técnica de recolección de datos.....	31
3.4. Técnica para el procesamiento de la información.....	32
CAPÍTULO IV. RESULTADOS.....	34
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN.....	61
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	66
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
ANEXOS.....	74

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

RITA	: Récipient à Immersion Temporaire Automatique.
SSF	: Solid State Fermentation.
ml	: mililitros.
g	: gramos.
kg	: kilogramos.
U/g	: unidades por gramo.
°C	: grados Celsius.
UFC	: unidades formadoras de colonia.
IBI	: International Biochar Initiative.
L	: litros.
h	: horas.
DT	: diámetro.
PT	: peso.
R	: rendimiento.
nm	: nanómetros.
UV	: luz ultravioleta.
CaCl ₂	: cloruro de calcio.
KCl	: cloruro de potasio.
Na	: Sodio.
s	: segundos.
BIT	: biorreactor de inmersión temporal.

RESUMEN

Objetivo: Comparar el cultivo de *T. harzianum* en una matriz de biochar frente al cultivo en sustrato sólido estándar de arroz en el biorreactor de inmersión temporal neumático.

Métodos: En este estudio, la población la conformo la cepa de *Trichoderma harzianum*, la cual fue otorgada por el laboratorio del SENASA, estando a una concentración de 1×10^9 en cada uno de los tratamientos y ensayos (N=15). En los tratamientos de biochar y arroz, el hongo fue evaluado cada 10, 15 y 20 minutos, así como cada 2, 4 y 6 horas. Se examinaron posibles diferencias significativas entre los ensayos. Adicionalmente, se efectuó en los tratamientos 1 y 2 la prueba T de Student para comprobar posibles diferencias significativas

Resultados: En esta investigación no se observaron diferencias significativas en el cultivo de *Trichoderma harzianum* entre la matriz de biochar y el sustrato sólido de arroz en el biorreactor de inmersión temporal en diferentes intervalos de tiempo, podría indicar que ambos sistemas son igualmente eficaces para el cultivo de *T. harzianum* en términos de crecimiento y producción.

Conclusión: Mediante la prueba estadística de T-Student, que no existen evidencias significativas ($p > 0.05$) entre las medias del crecimiento y la viabilidad o germinación del hongo de los dos tratamientos realizados, por lo que no habría diferencia entre cultivar el *T. harzianum* en una matriz de biochar o en sustrato sólido estándar de arroz en el biorreactor de inmersión temporal neumático.

Palabras claves: *Trichoderma harzianum*, biochar, sustrato, matriz, biorreactor, SENASA.

ABSTRACT

Objective: Compare the cultivation of *T. harzianum* in a biochar matrix versus the cultivation in standard solid rice substrate in the pneumatic temporary immersion bioreactor.

Methods: In this study, the population was made up of the *Trichoderma harzianum* strain, which was provided by the SENASA laboratory, being at a concentration of 1×10^9 in each of the treatments and trials (N=15). In the biochar and rice treatments, the fungus was evaluated every 10, 15 and 20 minutes, as well as every 2, 4 and 6 hours. After 10 days of culture, quality control was evaluated and possible significant differences between the assays were examined by analysis of variance (ANOVA) as well as the application of the Tukey test ($p < 0.05$). Additionally, the Student's T test was carried out in treatments 1 and 2 to check possible significant differences.

Results: In this research, no significant differences were observed in the cultivation of *Trichoderma harzianum* between the biochar matrix and the solid rice substrate in the temporary immersion bioreactor at different time intervals, it could indicate that both systems are equally effective for the cultivation of *T. harzianum* in terms of growth and production.

Conclusion: Using the T-Student statistical test, there is no significant evidence ($p > 0.05$) between the means of growth and viability or germination of the fungus of the two treatments carried out, so there would be no difference between cultivating the *T. harzianum* in a biochar matrix or in standard rice solid substrate in the pneumatic temporary immersion bioreactor.

Keywords: *Trichoderma harzianum*, biochar, substrate, matrix, bioreactor, SENASA.

CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción de la realidad problemática:

Las enfermedades fúngicas son una problemática global en el campo agrario, dado que causan severos daños a cultivos económicos importantes, es así que suelen utilizarse químicos para solucionar esta problemática, lo cual genera un impacto negativo sobre el ambiente e incluso la salud humana. Por, por lo tanto, una de las alternativas ecológicas se basa en utilizar un biocontrolador, entre ellos, destaca el emplear hongos antagonistas y otros microorganismos. Dentro de este tipo de hongos existen diversos géneros de hongos, por ejemplo, *Trichoderma*, los cuales son capaces de curar las enfermedades fúngicas de forma efectiva, además, tienen una alta capacidad de producción en masa (Adnan et al., 2019).

Al respecto en Nigeria, Gwa et al. (2019) investigaron el uso de *Trichoderma* como agente de control biológico contra *Aspergillus niger*, aislado de tubérculos podridos de ñame (batata). Los resultados obtenidos in vitro indicaron que *T. harzianum* inhibía significativamente ($p \leq 0.05$) el crecimiento de *A. niger*. Asimismo, la máxima efectividad se lograba cuando se introducía dos días antes de la llegada de *A. niger*. Por su parte, Zhang et al. (2019) realizaron un estudio que demostró que *T. harzianum* mejora en plantas de pepino el nivel de tolerancia salina. Este efecto se logra a través de la expulsión de radicales libres con capacidad oxidativa (ROS), unido al hecho de mantener el equilibrio osmótico y la homeostasis metabólica en las plantas. A pesar de estos beneficios, se destaca la necesidad de reproducir y producir *Trichoderma* a mayor escala. En este sentido, los biorreactores de inmersión temporal de fermentación sólida se presentan como una alternativa económica y eficiente para afrontar este desafío.

Estos métodos de producción se fundamentan en la utilización de sustratos, ya sean sólidos o líquidos, que son transformados por microorganismos como bacterias, hongos, microalgas y levaduras. Estos microorganismos llevan a cabo la fermentación para generar sustancias activas y que posean un nivel elevado de valor agregado. Este proceso puede efectuarse en medio sólido o sumergido (líquido), y ambas modalidades ofrecen ventajas distintivas, por ejemplo, la primera es rentable a pequeña escala y el resultado es voluminoso, mientras que en el segundo tipo de fermentación se produce en biorreactores (tanques especializados) y se toman en cuenta las condiciones anaerobias o aerobias, además, los biorreactores con agitación neumática son más eficientes en la obtención de metabolitos de importancia industrial (Hernández et al., 2019).

Gran parte de estudios, se realizan entorno a la aplicación de estos sistemas que

permiten la producción de tejidos vegetales. En este enfoque, el tejido vegetal se sumerge en el medio de cultivo durante un período específico, alternando con fases en las que permanece en contacto con el aire. Asimismo, la periodicidad y duración de estos ciclos varían según la especie, y uno de los sistemas de inmersión temporal más reconocidos es el *Réceptif à Immersion Temporaire Automatique (RITA)*, desarrollado por Vitropic, SA en Francia. A pesar de esta orientación hacia tejidos vegetales, algunos estudios también exploran la aplicación de estos sistemas en microorganismos. Rayhane et al. (2019), por ejemplo, investigan la producción de sustancias activas en *Trichoderma*. Además, destacaron que la tecnología de fermentación en estado sólido (*Solid State Fermentation - SSF*) se presenta como una alternativa frente a la creciente demanda de biopesticidas. Sin embargo, aún no se ha realizado a escala industrial. Su experimento consistió en pasar de 250 ml en matraces con 20 g de sustrato sólido a 5 kg de sustrato sólido utilizando un biorreactor de plástico de un solo uso. Los resultados fueron óptimos, encontrando una producción de lipasas en 38.73 ± 0.21 U/gDM, amilasas en 15.22 ± 0.13 U/g DM, y producción de conidios en $8.55 \pm 0.04 \times 10^9$ conidios/g DM.

De igual manera, Karuganti et al. (2020) evaluaron la producción de inulinasa producida por *Trichoderma asperellum*, mediante un sistema de fermentación sólida (sustrato de ajo). Los resultados fueron óptimos, encontrando una producción de exo- inulinasa de 199.2 ± 6.3 U/g, 45% porcentaje de humedad, 26° C de temperatura y 5.0 pH. En ambos casos se sugiere que el proceso puede ser industrializado, sin embargo, mayores estudios deberían realizarse para obtener mejores antecedentes que minimicen los riesgos de su producción a gran escala.

En referencia al biocarbón, este es un producto carbonoso obtenido mediante la pirólisis o carbonización de materiales vegetales. Entre sus características están la porosidad, área de superficie específica grande, densidad pequeña y gran capacidad de adsorción (Liu et al., 2020; Qiu et al., 2019). Además, está compuesto de carbono y cenizas, siendo sus propiedades variables dependiendo de los materiales empleados en su elaboración. Por lo general, se emplean residuos de agricultura, como paja, cáscaras de arroz, aserrín, etc. Entre sus diversos usos, se ha utilizado para el crecimiento y reproducción de microorganismos, así como proveer de sitios reactivos para el metabolismo de microorganismos.

Liu et al. (2020) añadieron diferentes tipos de biochar a un sistema SSF para la producción de eritritol usando el microorganismo *Yarrowia lipolytica* M53-S. En el biochar que fue elaborado en base a pastel de prensa de maní, harina de sésamo y aceite de cocina se halló “micro zonas” y se mejoró la actividad enzimática, así como la síntesis de eritritol. En conclusión, se sugiere un buen desempeño de biochar en un sistema SSF aeróbico. A pesar de estos resultados, los estudios de este nuevo uso de biochar son aún escasos, de allí que el

presente trabajo de investigación busco complementar las evidencias que hasta la fecha se tiene, de acuerdo a las condiciones propias del lugar en que se efectuó la averiguación.

1.2. Formulación del problema

1.2.1. Problema general

¿Cuál es la respuesta de *Trichoderma harzianum* bajo un biorreactor de inmersión temporal neumático de fermentación sólida en una matriz biochar?

1.2.2. Problemas específicos

- a) ¿Cómo diseñar un biorreactor de inmersión temporal neumático de fermentación sólida?
- b) ¿Cuál es el resultado del cultivo de *T. harzianum* en medio PDA en el biorreactor de inmersión temporal neumático a 2h ,4 h y 6 h?
- c) ¿Cuál es la diferencia del cultivo de *T. harzianum* en una matriz de biochar frente al cultivo sustrato sólido estándar de arroz en el biorreactor de inmersión temporal neumático?

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1. Objetivo general

Evaluar la respuesta de *Trichoderma harzianum* bajo un biorreactor de inmersión temporal neumático de fermentación sólida en una matriz biochar.

1.3.2. Objetivos específicos

- a) Diseñar un biorreactor de inmersión temporal neumático de fermentación sólida
- b) Evaluar el cultivo de *T. harzianum* en medio PDA en el biorreactor de inmersión temporal neumático a 2h ,4 h y 6 h.
- c) Comparar el cultivo de *T. harzianum* en una matriz de biochar frente al cultivo en sustrato sólido estándar de arroz en el biorreactor de inmersión temporal neumático

1.4. Justificación de la investigación

Justificación teórica

La investigación desarrollada contribuye al surgimiento de nuevos conocimientos acerca del cultivo del hongo *Trichoderma harzianum* bajo un biorreactor de fermentación sólida en una matriz biochar, esto al no haber precedentes de una producción de *Trichoderma harzianum* bajo estas condiciones y características. Además, el diseño innovador del

biorreactor, considerado como “semisólido” (biorreactor en una matriz de biochar) podrá ser usado en próximas investigaciones, constituyéndose como un antecedente de valor.

Justificación metodológica

Un nuevo prototipo de biorreactor de inmersión temporal neumático de fermentación sólida con una matriz de biochar representará un nuevo diseño para la producción de biomasa de *Trichoderma*. Por lo general, los biorreactores de inmersión temporal neumático son líquidos, no obstante, en este estudio se hizo uso de un sustrato sólido ecoamigable, como lo es el biochar o biocarbón. Por tanto, el biorreactor diseñado se podría decir que es semisólido y es un modelo totalmente nuevo, usado para la producción de *Trichoderma*. Asimismo, la evaluación del hongo *Trichoderma harzianum* permitirá evaluar su capacidad como agente biocontrolador, según el análisis del desempeño en el biorreactor de inmersión temporal.

Justificación práctica

El género *Trichoderma* tiene una importancia industrial y, por tanto, su producción a gran escala es de gran interés hoy en día. Entre sus múltiples beneficios están: actuar como agente biocontrolador, mejorar la respuesta de las plantas ante hongos fitopatógenos y producir metabolitos secundarios, principalmente enzimas y antibióticos. Sin embargo, aún es necesario producir su biomasa *in vitro* en sistemas innovadores que permitan evaluar su viabilidad y condiciones necesarias para ser replicados a escalas mayores. Respecto al biochar como medio de sustrato, este reviste importancia por ser elaborado a partir de residuos vegetales mediante pirólisis, obteniéndose altos valores de carbono y cenizas, ello lo hace un sustrato ecoamigable, además de demostrarse otras ventajas cuando es aplicado al suelo. Un menor desperdicio de residuos vegetales (elaboración de biochar), un diseño innovador de biorreactor “semisólido” y una producción de biomasa alternativa de *Trichoderma* son algunos de beneficios que se obtienen.

1.5. Delimitaciones del estudio

Delimitación espacial:

La ejecución del estudio, tuvo como lugar las instalaciones correspondientes a la Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión- Huacho, haciendo uso de los instrumentos o equipos requeridos.

Delimitación temporal:

La investigación se desarrolló desde enero 2023 a agosto del 2023.

Delimitación del objeto de estudio:

El laboratorio del Servicio Nacional de Sanidad Agraria del Perú, otorgo la cepa utilizada en el estudio.

1.6. Viabilidad del estudio

Se contaron con los recursos económicos y/o financieros para desarrollar el estudio, los cuales fueron asumidos por las investigadoras. Además, si bien no existió abundante bibliografía en torno al tema, el recabado fue suficiente para llevar a cabo la formulación de la investigación dando también viabilidad.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

2.1.1. Investigaciones internacionales

En primer lugar, Maiga et al. (2021) desarrollaron un biorreactor de cultivo en estado sólido desechable (DSSCB) para la producción de Conidia de *Trichoderma asperellum*. El DSSCB fue elaborado a partir de un plástico flexible, fácil de esterilizar y el cual fue probado bajo aireación forzada para la producción de conidios (2.1×10^{10} /g sustrato seco en 140 h), empleando un sustrato compuesto por corteza de caña de azúcar, de trigo, orujo de oliva y hojuelas derivadas de papa, que incluía también el medio de cultivo apropiado para la multiplicación de microorganismos. Después de transcurrido el tiempo de fermentación, el sustrato fermentado fue secado por aireación seca y fue utilizado directamente en el mismo biorreactor previo a su uso. En este estudio, el biorreactor produjo un total de $1,26 \times 10^{14}$ conidios, señalando que el sustrato se puede emplear en estado sólido o líquido.

En Ecuador, Sánchez et al. (2020) llevaron a cabo experimentos en laboratorio haciendo uso de cultivos con medios preparados con biocarbón compuesto cacao y banano, variando las concentraciones. El diseño experimental consistió en tres tratamientos que incluían diferentes dosis de biocarbón (1,5 g, 3,75 g y 7,5 g), con cinco repeticiones cada uno, y un tratamiento de control en el cual *Trichoderma sp.* se cultivó únicamente en PDA (agar de papa dextrosa). Para reproducir *Trichoderma sp.*, se preparó en el laboratorio el medio de cultivo PDA, y luego se colocaron las muestras en concentraciones de 10^{11} UFC junto con distintas dosis de biocarbones. Los resultados obtenidos indicaron que el grupo de biocarbón de cacao con 3.75 g manifestó un crecimiento mayor, a pesar de que este no fue uniforme. Por lo tanto, no pudo afirmar de manera concluyente que la presencia de biocarbón fue el responsable del desarrollo en el suelo de *Trichoderma sp.*

Rosero (2019) llevó a cabo un estudio que se enfocó en la caracterización del biocarbón o biochar obtenido de la cascarilla de arroz. Este material pasó por un proceso que involucró etapas como sistemas mecánicos, sistemas térmicos y la aplicación de modelos matemáticos que respaldan el procedimiento. Asimismo, la caracterización del producto se realizó siguiendo los criterios propuestos por la Iniciativa Internacional de Biocarbón (International Biochar Initiative - IBI). Este sustrato se usó para el cultivo del hongo *Trichoderma harzianum*, permitiendo el desarrollo esporulación en la superficie porosa del biocarbón. El resultó no solo en un sustrato más económico, sino que también

demonstró una mayor efectividad en comparación con otros métodos convencionales.

Hernández et al. (2019) describieron al género *Trichoderma* en relación a su importancia en áreas agrícolas, biotecnológicas, la producción de la misma y las enzimas que son utilizadas a nivel industrial. Haciendo mención en que la fermentación puede darse en estado sólido o líquido para producir compuestos bioactivos a nivel industrial, principalmente enzimas mediante sistemas de producción denominados biorreactores, los cuales en estado sólido a gran escala resulta costosa. A pesar que en los últimos años, ha surgido el uso de biorreactores de tambor rotatorio múltiple. En el caso de la fermentación líquida se realiza en biorreactores convencionales, teniendo en cuenta las características de oxígeno cuando sea necesario, mediante la aplicación de agitación neumática o mecánica. Cabe destacar que, según indican, la fermentación líquida, en comparación con la fermentación sólida, genera más del 75% de enzimas microbianas.

Alfonso et al. (2018) desarrollaron un biorreactor discontinuo (batch) con 150 L de capacidad, con el fin de producir *Salmonella enteritidis*, de la variedad danyysz. El cual se llevó a cabo mediante la aplicación de modelaciones matemáticas y técnicas industriales, primero a una escala de 50 L y después a 150 L, además determinaron el tiempo de fermentación del microorganismo, señalando que el biorreactor debe mantener las semejanzas con el modelo, pero en procesos biológicos se debe considerar el criterio de escalado para tener éxito, es así como en el diseño del biorreactor evaluaron, crecimiento cinético del microorganismo, el tiempo de fermentación, parámetros específicos del diseño, velocidad de agitación y balance de calor. En sus resultados obtuvieron un crecimiento cinético óptimo del microorganismo, asimismo el tiempo de fermentación de *Salmonella enteritidis* fue de 3,35h, valor muy semejante al que se obtiene en la industria.

2.1.2. Investigaciones nacionales

A nivel nacional, en el departamento de Junín, Marmolejo y Corpus (2021) desarrollaron la producción de microtubérculos y esquejes de papa de las variedades Peruanita y Amarilla Tumbay bajo condiciones de invernadero en biorreactores de inmersión temporal, estas posteriormente fueron cultivadas y sometidas a evaluación haciendo uso de un diseño en base a bloques al azar, en base a dos factores, las variedades y los propágulos, los cuales se dividieron en 4 grupos y 3 repeticiones. Las variedades consideradas fueron Peruanita y Amarilla Tumbay, mientras que los tipos de propágulos fueron dos: microtubérculos y esquejes. Los parámetros evaluados incluyeron la supervivencia, el diámetro (DT), el peso (PT), el tamaño de los tubérculos y el rendimiento

(R). Evidenciando un rendimiento superior en los tubérculos en comparación con los esquejes, registrando un valor de $26,89 \pm 0,483$ kg/m². El peso promedio fue de $0,12 \pm 0,036$ kg, asociado a un diámetro de $22,59 \pm 0,451$ mm. Se encontró asimismo que la variedad más optima tanto en rendimiento de peso como en numero de tubérculos pro planta fue la variedad Peruanita

En el departamento de San Martín, Delgado (2020) hizo uso de sistemas de tipo inmersión temporal, con el fin de optimizar la obtención de plántulas de piña (*Ananas comosus* L. Merr.). Abordando diversos aspectos, que incluyeron el análisis de diferentes concentraciones de ozono, propagación y desarrollo de las plántulas in vitro, análisis de sistema de ventilación de bajo costo, la aplicación de sistemas de inyección con distintas concentraciones de CO₂. y la aclimatación de las plántulas. Como resultado, se logró obtener material vegetal de piña con una alta calidad genética y fitosanitaria, el cual posee un alto valor y demanda en el mercado.

Por su parte Ticlla (2019) en su investigación realizada en Arequipa examinó el cultivo de brócoli afectado por el patógeno *Plasmadiophora brassicae*, utilizando diversas concentraciones de biocarbón activado con *Trichoderma viride*. Para esto establecio un experimento con ocho grupos de tratamiento con tres repeticiones. Observando, que el cultivo de brócoli asociado al biocarbón con *Trichoderma viride* mermo el nivel de enfermedad a un 13.7% en contraste con el reportado en tratamiento control. Se reveló, además, que el grupo más efectivo desde el punto de vista estadístico fue la aplicación de 5 toneladas por hectárea de biocarbón activado mezclado con 2 litros de *Trichoderma viride*. Sin embargo, el estudio señala que estos tratamientos no resultan económicamente rentables a corto plazo.

En Lima, Carrión y Tapia (2019) desarrollaron un Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT) el cual fue utilizado para producir semilla prebásica de diversas variedades de papas peruanas. El diseño del biorreactor se basó en el modelo propuesto por Escalona et al. (1999) y consistió en el uso de dos biorreactores de 500 mL cada uno. El enfoque experimental se centró en la fase de proliferación, empleando tallos con segmentos nodales que tenían de 3 a 4 nudos, pertenecientes a las variedades Canchán, Capiro, Yungay, Única y Peruanita. Posteriormente, sembró en medios de cultivo de 100 mL con 30 g de sacarosa, por un tiempo de inmersión y frecuencia de 5 min cada 3 horas x 30 días, un fotoperíodo de 16 h de luz. Finalmente, en la fase de microtuberización cambiaron a un medio de cultivo de 80 g de sacarosa en oscuridad, con el mismo ciclo de riego x 60 días. Señalando como

resultados 20; 18,4; 13,4; 13,4 y 4,6 microtubérculos por biorreactor en las variedades Peruanita, Canchán, Capiro, Única y Yungay, respectivamente.

En el año 2014, el Servicio Nacional de Sanidad Agraria del Perú (SENASA) emitió una guía para la producción y uso de hongos entomopatógenos. El cual proporciona información detallada que abarca desde la producción hasta aspectos como el control de calidad, medios de cultivo y medidas de seguridad en el laboratorio. En sus páginas se detallan procedimientos para llevar a cabo pruebas de viabilidad, recuento directo de conidias, evaluación de pureza y otros parámetros de control de calidad aplicables a los productos finales obtenidos de producir hongos entomopatógenos.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. *Trichoderma harzianum*

2.2.1.1. Características del hongo

Trichoderma harzianum es un hongo filamentoso sin reproducción sexual que se emplea como agente de control biológico contra fitopatógenos que impactan a plantas de relevancia comercial. Cuyo método de acción radica en el crecimiento de hifas, así como de liberar enzimas hidrolíticas (quitinasas, N-acetil- β -D- glucosaminidasas y proteasas) que eliminan la pared celular del hongo parásito u objetivo. Además, se le atribuye cualidades de antibiosis y competición contra plantas patógenas y nemátodos (Guilger et al., 2019; Medeiros et al., 2017). Además, se ha reportado asociaciones de tipo beneficiosa entre diversidad de especies de plantas como arabidopsis, tomate, pepino, pera y canola, así como con plantas leñosas y *Trichoderma* spp., según informes documentados (Poveda et al., 2019; Samolski et al., 2012).

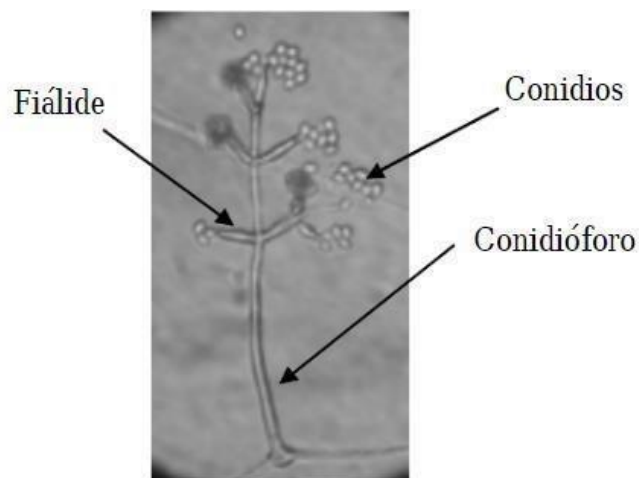
El suelo, es el ambiente predilecto de especies de *Trichoderma* spp., siendo utilizadas como sustratos para cultivar hongos comestibles. La taxonomía de este género se remonta a 1794, cuando Persoon acuñó el nombre genérico *Trichoderma*. En términos taxonómicos, el género *Trichoderma* pertenece a los Eucariotas, estableciéndose en el grupo de los Fungi, división Ascomycota, clase Sordariomycetes, Orden Hypocreales y la familia Hypocreaceae. Aunque se estima que existen alrededor de 200 taxones, la mayoría se encuentra en Norteamérica y Europa. No obstante, se continúan describiendo nuevas especies en diversas áreas geográficas, según informa Tyskiewicz et al. (2022). El género *Trichoderma* se estudia con frecuencia debido a su popularidad como un modelo sólido dado su fácil aislamiento y cultivo, así como su óptimo desarrollo en diferentes sustratos y su eficacia como biocontrolador frente a un amplio espectro de fitopatógenos, como

indica Infante et al. (2009), citado en Martínez et al. (2021).

Los cultivos de *Trichoderma* presentan colonias con una esporulación densa, inicialmente de color blanco que evoluciona hacia tonalidades verde oscuro o amarillento (Bissett, 2011). Los conidióforos son ramificados y las fiálides nacen en esas ramificaciones, mientras que los conidios nacen en los extremos de éstas a manera de anillos (Fig. 1). Además, la mayoría de especies poseen clamidosporas, las cuales hacen posible que el hongo pueda sea resistente en el tiempo. Se dice que *Trichoderma* tiene tres clases de propágulos entre los cuales se encuentran las clamidosporas, las hifas y los conidios Martínez et al. (2021).

Figura 1

Estructura microscópica de Trichoderma sp. (400 x).



Fuente: Tomado de Infante et al. (2009).

2.2.1.2. Condiciones de crecimiento

La temperatura óptima para la reproducción de *Trichoderma* en agar se sitúa entre 20 y 28 °C. Asimismo se requiere un contenido de humedad mínimo del 92% para el crecimiento vegetativo y entre 93% y 95% para la esporulación, aunque también puede adaptarse a valores de 70% a 80%. En cuanto al rango de pH óptimo oscila entre 4 y 7, aunque puede variar de 2 a 9. Se menciona además que la exposición a la luz, especialmente si se expone a un lapso de tres 3 minutos, con el uso de luz ultravioleta a 366 nm, mejora la esporulación, el crecimiento del micelio y la coloración.

En cuanto a la incubación de *T. harzianum*, el medio de cultivo PDA (agar de dextrosa y papa) es su medio de desarrollo a una temperatura de 25 °C toma aproximadamente 5 días (Romero et al., 2009). En el caso del género *Trichoderma* Suele

desarrollarse en este medio de cultivo en un rango de 40 a 60 horas (Chavarría, 2016).

En el aspecto de la nutrición, *Trichoderma* degrada de manera aipotina diversos sustratos tales como celulosa, peptina y almidona, esto dado que posee enzimas hidrolíticas (amilasas, celulasas, peptinasas, quitinasas, entre otras) (Küçük y Kivanc, 2008). Asimismo, este género requiere nutrientes entre los cuales destacan los ácidos grasos, ureas, carbohidratos aminoácidos y nitritos, los cuales suelen completarse con pequeños elementos y vitaminas, como Cu, Fe, Mo, Mn y vitamina B (Simkovic et al., 2008, citado en Schmoll et al., 2016).

En términos de salinidad, este género inhibe su crecimiento en concentraciones superiores a 80 g/L de CaCl₂, mientras que en valores de 10 g/L se logra un crecimiento óptimo. Particularmente, las sales NaCl y KCl también inhiben el crecimiento debido a que los iones Na y K afectan la esporulación (Simkovic et al., 2008, citado en Schmoll et al., 2016).

2.2.1.3. Mecanismos de acción

El género *Trichoderma* utiliza mecanismos directos e indirectos contra otros patógenos fúngicos, los cuales interactúan en conjunto en el fenómeno de biocontrol. Primero se da a través de la competencia (directa) sea por espacio o nutrientes, antibiosis, micoparasitismo y secreción de enzimas (Infante et al., 2009; Tyskiewicz et al., 2022).

Por otro lado, la acción indirecta consiste en solicitar o inducir a mecanismos de defensa, por ejemplo, se estimula para que la planta elabore compuestos que puedan resistir la acción de los patógenos, también se produce la eliminación de toxinas y desactivación de enzimas secretadas por estos últimos. Otros mecanismos indirectos incluyen la solubilización de sustancias nutritivas un nivel más alto de tolerancia al estrés (Infante et al., 2009; Tyskiewicz et al., 2022). Entre estos mecanismos destacan:

- **Competencia:**

La biología de *Trichoderma*, hace que sus especies se adapten para llevar a cabo una colonización agresiva de los sustratos, e inclusive poder sobrevivir en situaciones adversas, especialmente en forma de clamidosporas. Se caracterizan además por ser saprófitas y además presentar una buena velocidad de crecimiento, esporulación rápida y masiva, así como una amplia variabilidad de sustratos en los que puede desarrollarse. Estas características son las que lo convierten en un biocontrolador eficaz (Infante et al., 2009, citado en Allende et al., 2022). Se ha sugerido que *Trichoderma* es un competidor eficiente por espacio o nutrientes, llegando a bloquear el desarrollo de diversos patógenos (Martínez

et al., 2013). Por ejemplo, Garrido y Di Severino (2019) demostraron in vitro una alta actividad antagonista de *T. harzianum* contra Rhizoctonia.

- **Micoparasitismo:**

En Trichoderma se observa un crecimiento hacia el hospedante, adhiriéndose a las hifas de este y pueden llegar a penetrarlas. Posteriormente, se observa la reducción de las paredes celulares del hospedador. Las enzimas desempeñan un papel crucial en este proceso, particularmente en el caso de Trichoderma, donde la presencia de enzimas es fundamental. En este sentido, se cree indispensable la β 1-3-glucanasa, vinculada con la degradación de la pared celular de patógenos. Asimismo, se ha informado sobre la producción de polisacaridasas, proteasas y lipasas que también participan en la descomposición de la pared celular, como se observa en especies como *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Guevara et al., 2016; Martínez et al., 2013).

- **Antibiosis:**

Se refiere a los metabolitos secretados por Trichoderma los cuales pueden ser volátiles o no volátiles. Diversas especies de Trichoderma secretan metabolitos secundarios que inhiben a otros microorganismos sin tener algún contacto físico, recibiendo el nombre de antibióticos. Algunos de estos compuestos incluyen alquil-pironas (como 6-a-pentil-pirona), isométricos (isonitrina), poliquétidos (harzianolida), peptabioles (como trichodermina, atroviridina y alameticina), icetopiperacinas (como gliovirina y gliotoxina), sesquiterpenos (como ácido heptelídico) y esteroides (como viridina) (Howell, 2003; Sivasithamparam y Ghisalberti, 1998).

También se ha señalado que especies de Trichoderma tienen la capacidad de sintetizar compuestos antifúngicos contra los patógenos *R. solani* y *S. rolfii*, provocando que sus hifas se degraden (Baker y Cook, 1989). Además, se ha demostrado in vitro que inhibe la germinación de esporas en *Botrytis cinerea* (Lorito et al., 1994).

- **Actividad lítica:**

Se ha investigado exhaustivamente la actividad enzimática en Trichoderma, reportándose que secreta metabolitos los cuales cumplen un papel clave ya que degradan la pared celular, así como las hifas y además en la absorción de nutrientes del fitopatógeno, lo cual conduce a que el hospedante pierda parte de su citoplasma celular (Diaz, 1994, citado en Infante et al., 2009).

Gajera y Vakharia (2012) llevaron a cabo un estudio in vitro sobre la producción

de enzimas por *Trichoderma harzianum*, *viride* y *virens*. En la cual analizo la obtención de quitinasa, β -1,3- glucanasa y proteasa, celulasa y poligalacturonasa. Rayhane et al. (2019) también evaluaron las celulasas, amilasas y lipasas producidas por *T. asperellum*.

- **Inducción de resistencia:**

Según Mathivanan et al. (2005), *Trichoderma* es capaz de activar un componente protector de forma natural en las plantas, el cual se conoce como Inducción de Resistencia Sistémica (IRS). Por ejemplo, en la producción de pepino, se ha reportado que sudesarrollo en raíces, índice la resistencia de esta planta frente a patógenos como *Pseudomonas syringae* pv. Lachrymans (E. F. Smith y Bryan) (Shoresh et al., 2010). Encontrándose entre los compuestos liberados por *Trichoderma* ciertas proteínas o enzimas que promueven respuestas locales, mientras que otros desencadenan metabolismos a través de productos genéticos o factores de avirulencia (Woo et al., 2006;Woo et al., 2007).

- **Tolerancia al estrés:**

En la rizosfera, la *Trichoderma* mejora la tolerancia de factores bióticos y abióticos del estrés en plantas. Entre ellas se tiene la presencia de sequía, diferencias en salinidad, acumulación de metales pesados y temperaturas extremas (Hidangmayum y Dwivedi, 2018; Poveda et al., 2019). Azad y Kaminskyj (2016) estudiaron a *T. harzianum* bajo condiciones de salinidad y sequía en plántulas de tomate y resultó en un buen desempeño de la actividad fotosintética y redujo la acumulación de ROS. Así también, se demostró que la inoculación de *T. longibrachiatum* con plántulas de trigo mejoró su tolerancia a la salinidad y aumentó la concentración de enzimas antioxidantes (Zhang et al., 2019). Asimismo, investigaciones adicionales, han estudiado la resistencia del tomate (*Solanum lycopersicum*) a bajas temperaturas mediante la inoculación de *T. harzianum*, logrando mejoras significativas en cuanto a la fotosíntesis, crecimiento talla y peso, raíces, contenido de agua en hojas, brotes, entre otros (Ghorbanpour et al., 2018).

2.2.2. Fermentación en fase sólida (FFS)

También llamada de superficie, se desarrolla en medios de cultivo sólidos, siendo lo suficientemente húmedos para el crecimiento y reproducción del microorganismo (Cruz, 2007). Las ventajas de este tipo de fermentación se basan en sus bajos costos, obteniendo alta biomasa, que proviene de un menor manejo de control en variables como aireación, temperatura y otros aspectos que se consideran en una fermentación de tipo líquida (Lecault

et al. (2009) citado en Novy et al., (2016)). Desde un contexto ambiental, resulta en bajos niveles de contaminación por aguas residuales y por la semejanza del sustrato con el suelo y compost (Siddiqui et al., 2008).

La fermentación en fase sólida ha sido utilizada para producir enzimas, antibióticos, ácidos orgánicos, biosurfactantes y componentes aromáticos, pero, sobre todo, reviste gran importancia por la cantidad de metabolitos o biorremediación que se puede desprender de ella. Hoy en día, viene siendo estudiada en el campo de la producción de biomasa aún sin explorar (Lizardi y Hernández, 2017; Wang et al., 2010).

Arévalo et al. (2017) llevaron a cabo la preparación de cultivos utilizando mix de diversos residuos agrícolas sólidos (cascara de arroz, maní y descarte de arroz). Posteriormente, añadieron agua o una solución con nutrientes como urea y carbonato de calcio, realizando el proceso en dos fases: fermentación líquida y sólida para la producción masiva de conidias. Evidenciando que la reproducción de conidias fue optima, superando la cifra de $>1 \times 10^{10}$ conidias. Se ha reportado, asimismo, una producción óptima de *Trichoderma*, alcanzando valores de 100 g, 200 g y 2 kg utilizando como sustrato la corteza de caña de azúcar y cascara de arroz en condiciones que incluyeron la aplicación de un campo magnético en el entorno (Mas et al., 2015).

2.2.3. Biochar o Biocarbón

2.2.3.1. Definición

El biochar se refiere a un producto enriquecido de carbono y procede del pirólisis de organismos vegetales, teniendo entre sus principales características: alta porosidad, gran área de superficie específica, densidad pequeña y gran capacidad de adsorción (Liu et al., 2020; Qiu et al., 2019). Su composición es el carbono y cenizas, sin embargo, sus propiedades varían en base a los residuos utilizados en su elaboración. Además, este término proveniente del inglés, recibe el nombre, en español, de “biocarbón”, tal como refieren (Pérez et al., 2021).

Entre sus diversos usos, se destaca el impacto positivo que tiene en la calidad del suelo, así como su contribución a la retención de carbono, asimismo beneficia la reducción de los efectos negativos del cambio climático. En terminos productivos y de su aplicación en el suelo son aún nuevas tecnologías que vienen siendo implementadas y experimentadas en diferentes países del mundo (Escalante et al., 2016).

Es importante señalar que también se ha empleado in vitro para favorecer el crecimiento de microorganismos, proporcionando sitios de reacción para estos. Así, Liu et

al. (2020) encontraron buenas respuestas del uso de biochar en un sistema de fermentación sólida, la cual se midió por la presencia de micro zonas y mejora en la actividad enzimática.

2.2.3.2. Elaboración

- **Materias primas**

Existen numerosas fuentes de materiales para la producción de biocarbón. Entre los materiales más comúnmente descritos se encuentran los residuos de cosechas, los desechos de árboles, las plantas secas, los desechos de papel, los residuos de arroz y los restos orgánicos provenientes de zonas urbanas, tales como madera, hojas, residuos de cultivos, cáscaras de naranjas y nueces (Escalante et al., 2016). La composición química del biocarbón está determinada principalmente por la materia prima utilizada, y se ha demostrado que puede ser muy heterogénea (Brick, 2010).

En México, se produce biocarbón a partir de materiales naturales orgánicos como aserrín, corteza de caña de azúcar, restos de pino, lirio acuático y cascarilla de café, todo ello significó darles un valor agregado a residuos escasamente utilizados en el medio y se buscó evitar problemas medio ambientales, los que han sido reportados por la quema de aserrín, por citar un ejemplo (Escalante et al., 2016).

- **Procesos para obtener biocarbón:**

Los procesos de conversión de biomasa o pirólisis se clasifican en cuatro tipos: lenta, rápida, ultrarrápida y gasificación, los cuales se llevan a cabo en ausencia completa de oxígeno, y en el caso de la gasificación, se presenta una cantidad pequeña de oxígeno. Este proceso es termoquímico, y su finalidad es convertir la biomasa y demás compuestos con carácter de baja densidad, a compuestos de elevada densidad (líquidos), llamados bioaceites, así como sólidos de elevada densidad (biocarbón) y/o gas de baja densidad (gas de síntesis - syngas). Esto por medio de la aplicación de calor, con temperaturas mayores a 400 °C, sin presencia de oxígeno, descomponiéndolos térmicamente y liberando vapor y sólidos (biocarbón). La transformación es irreversible, afectando tanto a cambios físicos como químicos, y está estrechamente vinculada a la materia prima y las condiciones del reactor.

- **Proceso de Pirólisis convencional /lenta:** También llamada convencional. Consiste en periodos de calentamiento de 0.1 a 2 °C por segundo y sobrepasan las temperaturas de 500°C. Utilizando periodos de tiempo con interrupciones, temperaturas moderadas y tiempos continuos y largos tanto para sólidos como para gases. En el caso de la residencia del gas es de 5 segundos, aunque puede ser aún mayor. Este proceso se

considera el de mejor rendimiento (Escalante et al., 2016).

- **Proceso de Pirólisis rápida:** Por lo general se utilizan temperaturas de 550 °C. Se generan productos de alta calidad por tener poca residencia al vapor, sin embargo, sus productos son principalmente líquidos (bioaceites) y gases con etileno. También se produce carbón y alquitrán, pero en menores concentraciones (Escalante et al., 2016).
- **Proceso de pirólisis Ultrarrápida:** Este método implica temperaturas que oscilan entre 400 y 600 °C, con rápidos lapsos de calentamiento (> 2 °C/s). Con tiempo de residencia al vapor menor a 2 segundos, el cual produce una menor cantidad de alquitrán y gas, siendo los productos aceitosos los que logran un rendimiento más alto mediante este procedimiento (Escalante et al., 2016).
- **Gasificación:** Este proceso sigue dos reacciones. Primero, la madera se convierte en carbón, y a este paso se le denomina carbonización con evaporación de la madera. Una vez que el carbón ha sido formado, se convierte el carbón en ceniza mediante la aplicación de una mayor temperatura, y a esta segunda reacción se le llama gasificación de carbón. De esta manera, si hay un exceso de oxígeno, el carbón se consume solo se forman cenizas. A diferencia, si la cantidad de oxígeno es limitada, ya que solo una parte del carbón se consume y sus residuos son eliminados por el fondo del gasificador (McLaughlin et al., 2009, citado en Escalante et al., 2016).

2.2.3.3. Variables que afectan la elaboración de Biochar

- **Composición del sustrato:**

La composición y estructura del biocarbón resultante están determinadas por la biomasa utilizada en su elaboración. Por ejemplo, Gaskin et al. (2008) encontraron que el biocarbón elaborado a partir de plumas de aves contenía un 40% de carbono, mientras que el biocarbón derivado de astillas de pino alcanzaba un 78% de contenido de carbono. Medeiros et al. (2020) estudiaron tres tipos de biochar: cáscaras de frijol, molidos de café y cáscaras de café mezclados o no con *Trichoderma*, en donde observaron que la combinación de los tres elementos de la materia prima del biocarbón resultó en un crecimiento mejorado de la sandía y una mejora en la calidad del suelo. Finalmente, Da Silva et al. (2022) examinaron biocarbones producidos a partir de cuatro fuentes (molidos de café, cáscaras de café, cáscaras de frijol y residuos de guanábana) inoculados con *Trichoderma*. Demostrando que la tasa de descomposición de la raíz de yuca disminuyó significativamente en el tratamiento donde todo el biocarbón fue inoculado con *Trichoderma*.

- **Intervalo de calentamiento:**

La tasa, tiempo y la intensidad del calentamiento tienen influencia sobre el nivel y la velocidad de las reacciones de pirólisis, así como en los productos resultantes. En este contexto, se observa una mayor producción de biocarbón a medida que disminuye el ritmo de aumento de temperatura; en otras palabras, a temperaturas más elevadas, la producción de biocarbón tiende a disminuir. La cantidad de calor aplicada varía según la materia prima y el equipo de pirólisis utilizado. En el caso de los productos líquidos, estos se forman mediante pirólisis con altas temperaturas y partículas pequeñas, a comparación de los compuestos volátiles como son los gases y los líquidos su producción se eleva, mientras mayor temperatura tenga, y los productos sólidos disminuyen. En relación con los productos sólidos, la formación de carbón se maximiza temperaturas reducidas de calentamiento y partículas grandes (Escalante et al., 2016).

- **Temperatura:**

A bajas temperaturas se obtienen productos sólidos (carbón), seguido por agua. Gaskin et al. (2008) estudiaron el biocarbón producido entre 400 y 500 °C con y sin activación de vapor, obteniendo una alta concentración de nutrientes (P, K, Ca, Mg) en biocarbones producidos a 500 °C.

2.2.4. Sistema o Biorreactor de inmersión temporal (SIT o BIT)

Conocido también como sistema de inmersión temporal se basa generalmente en pequeñas plántulas colocadas en frascos y provistas de los nutrientes necesarios para una multiplicación óptima. Posteriormente, se lleva a cabo la inmersión en intervalos de tiempo determinados. De este modo, el medio de cultivo líquido entra en unión de manera intermitente con los tejidos vegetales (el Sistema BIT se realiza en frascos independientes), lo cual permite que los procesos biológicos se efectúen adecuadamente (división celular, entre otros).

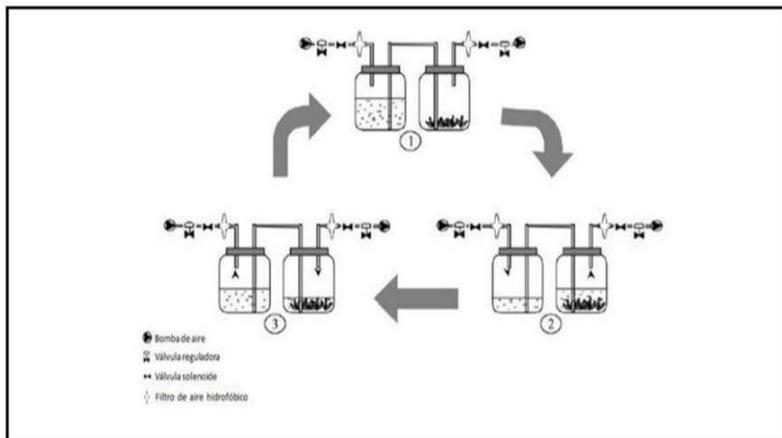
Estos sistemas, al propiciar la unión del medio de cultivo con tejido celular de la planta, favorecen una producción elevada, reduciendo además el coste productivo y elevando la productividad. Asimismo, dependiendo de la especie, es posible producir gran suma de plantas en un corto período, lo cual es relevante para la disminución de los costos de producción (Arredondo, 2019). Su impacto positivo se evidencia en la micropropagación en diversas especies mediante brotes, microestacas, microtubérculos y embriogénesis somáticas (Ettienne y Berthouly, 2002). No obstante, entre sus desventajas se han identificado un alto nivel de hiperhidratación y oxidación de tejidos, relacionados a factores

como el tiempo, la frecuencia de inmersión y los nutrientes presentes en el medio de cultivo (Castro y Gonzales, 2002). Es importante señalar que las referencias mencionadas anteriormente se basan en estudios realizados in vitro.

El biorreactor de inmersión temporal (BIT) se diseña a partir de dos recipientes de 1L de capacidad, uno va a contener el material vivo de interés y el segundo por lo general, el medio de cultivo líquido. Ambos recipientes están conectados mediante mangueras delgadas, mientras que el flujo de aire pasa mediante microfiltros de 0.2 μm . Es así que, el líquido pasa de un recipiente a otro debido a la presión del aire y se sumerge totalmente el material vivo. Luego, mediante el uso de válvulas de solenoide y temporizadores el flujo de aire se invierte con la finalidad de restaurar el líquido al recipiente de origen (Oviedo et al., 2015). Mediante la Figura 2 se presentan los pasos involucrados en el funcionamiento de un biorreactor tipo BIT. De esta manera, se observa en el primer paso, dos frascos de 1 litro, mientras que en el segundo paso ya se observa el como el medio de cultivo líquido fluye hacia los tejidos (explantos). Por último, en el tercer paso, se aprecia cómo el medio de cultivo líquido regresa al recipiente de origen.

Figura 2.

Funcionamiento de un biorreactor tipo BIT.



Fuente: Tomado de Oviedo et al. (2015)

Los factores que se consideran para un funcionamiento efectivo del Sistema de Inmersión Temporal (SIT) incluyen aspectos tales como la intensidad luminosa y temperatura, la frecuencia y extensión de la inmersión, la densidad del cultivo, así como la composición y duración del medio de cultivo. Los cuales están condicionados por la especie que se desea producir (Arredondo, 2019; Albarrán et al., 2014).

2.3. Definición de términos básicos

Biochar o biocarbón. - Producto enriquecido de carbono y procedente del

proceso de pirólisis de organismos vegetales, teniendo entre sus principales características: alta porosidad, gran área de superficie específica, densidad pequeña y gran capacidad de adsorción.

Biorreactor. - Es un recipiente conocido también como dorna. Sistema bajo el cual existen condiciones biológicas adecuadas para facilitar el crecimiento de estructuras celulares u otros microorganismos.

Cepa. - Población de microorganismos de una sola especie, siendo por lo general, clonada a partir de una célula.

Conidios. - También denominados conidiósporas son estructuras asexuales. Están pigmentadas y por lo general, se presentan como resistentes a la desecación.

Crecimiento bacteriano. – Referente al aumento del número de bacterias en una población, proceso que implica la reproducción bacteriana mediante la división de una bacteria madre en dos células hijas, y posteriormente, cada una de estas células se divide nuevamente, generando un crecimiento exponencial mientras las condiciones del medio ambiente sean favorables.

Fermentación. - Proceso por el cual se degradan sustancias a otras más simples. Se dice que es una reacción catabólica donde no es necesaria la presencia de oxígeno y cuyo producto final son los compuestos orgánicos. Principalmente, los microorganismos llevan a cabo este tipo de reacciones.

Pirólisis. - Se dice del calentamiento a altas temperaturas que originan la descomposición a nivel químico de materia orgánica, es decir, se producen cambios irreversibles sobre la materia.

Trichoderma harzianum. - Hongo filamentoso utilizado como control biológico por sus beneficios sobre plantas de importancia agrícola y/o comercial. Se reproduce generalmente asexualmente mediante conidios, clamidosporas e hifas.

2.4. Hipótesis de investigación

2.4.1. Hipótesis general

Existen diferencias significativas en la evaluación de *Trichoderma harzianum* bajo un biorreactor de inmersión temporal neumático de fermentación sólida en una matriz biochar respecto a una matriz de cultivo control (común).

2.4.2. Hipótesis específicas

- Es posible diseñar un biorreactor de inmersión temporal neumático de fermentación sólida
- Existen diferencias significativas respecto al cultivo de *T. harzianum* en medio PDA en el biorreactor de inmersión temporal neumático a 2h ,4 h y 6 h.
- Existen diferencias significativas entre el cultivo de *T. harzianum* en una matriz de biochar frente al cultivo en sustrato sólido estándar de arroz en el biorreactor de inmersión temporal neumático

2.5. Operacionalización de las variables

Tabla 1

Matriz de operacionalización de variables

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
Evaluación de <i>Trichoderma harzianum</i>	Parámetros que indican el crecimiento y reproducción en condiciones óptimas de <i>Trichoderma harzianum</i>	Biorreactor de inmersión temporal neumático de fermentación sólida en una matriz Biochar	SENASA	Recuento de conidios	Nº conidios/ml = X. 5. 104. ID
			SENASA	Viabilidad	% germinación
			SENASA	Pureza	% pureza
			Determinación de pH	pH	0-14
			Determinación de humedad	Humedad expresada en materia seca	g de DM
Biorreactor de inmersión temporal neumático de Fermentación sólida	Instrumento que permite el crecimiento del hongo	Diseño tomando como base la investigación de Solórzano (2016).	Ajuste de parámetros	Densidad del cultivo (concentración)	Número de colonias/cm ²
				Frecuencia de inmersión	Veces/día
				Tiempo de inmersión	Segundos o minutos
				Composición y duración del medio de cultivo	Tipo de cultivo (PDA y biochar) y semanas (tiempo)
				Fotoperiodo	Horas de día y de oscuridad
				Temperatura	°C

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1. Diseño metodológico

En base al enfoque, esta investigación se alinea a un estudio tipo cuantitativo: “El estudio cuantitativo se refiere al uso de la observación, técnicas, medición de unidades de análisis, muestreo y tratamiento estadístico, el cual permite responder a las hipótesis planteadas, por tanto, el uso del método científico es riguroso como fin último para alcanzar la verdad” (Ñaupas et al., 2018).

Según el diseño, fue experimental. Este diseño es ampliamente usado en biología, física, química y es el nivel más complejo de investigación, el cual consiste en tomar datos, analizarlos y verificar Hipótesis (Ñaupas et al., 2018)

De acuerdo al nivel de alcance, fue explicativa dado que se buscó establecer la relación causa efecto, así como la explicación del por qué ocurre un evento o fenómeno (Gallardo, 2017).

3.2. Población y muestra

3.2.1. Población

En este estudio, la población la conformo la cepa de *Trichoderma harzianum*, la cual fue otorgada por el laboratorio del SENASA para el presente trabajo de investigación.

3.2.2. Muestra

En este caso, los inóculos de *Trichoderma harzianum* representaron a la muestra de estudio, estando a una concentración de 1×10^9 en cada uno de los tratamientos y ensayos (N=15).

3.3. Técnica de recolección de datos

3.3.1. Obtención y reproducción *in vitro* de cepa

La cepa fue obtenida del laboratorio del SENASA y posteriormente fue reproducida en instalaciones del laboratorio de la Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión, manteniendo una temperatura *in vitro* de 37 ± 2 °C, una humedad entre el 93 y 95% y un pH entre los valores de 4 a 7. La cepa obtenida en placas Petri fue re activada en medio líquido PDA (Agar papa dextrosa), bajo las condiciones antes mencionadas.

3.3.2. El diseño del Biorreactor

Mediante la guía y directrices brindadas por Solorzano (2016), se estableció el desarrollo de los biorreactores de inversión temporal neumático.

3.3.3. Inoculación en la matriz de Biochar

La matriz de biocarbón fue obtenida de la Universidad Agraria La Molina y estaba compuesta por cáscara de coco. Posteriormente, se añadieron 50 g de este biocarbón a cada matraz de Erlenmeyer, y el cultivo de *Trichoderma harzianum* se incorporó a una concentración de 1×10^9 .

3.3.4. Del proceso en el biorreactor

Trichoderma harzianum estuvo expuesto al cultivo líquido PDA a 10, 15 y 20 min cada 2, 4 y 6 horas, respectivamente con 3 repeticiones (N1=9). El fotoperiodo fue de 12 horas de oscuridad y 12 horas de luz durante 10 días (SENASA, 2014). Posterior a ello, se determinó la mejor duración y tiempo de exposición de *Trichoderma harzianum* al cultivo líquido PDA en relación a su crecimiento y viabilidad.

3.3.5. Tratamientos

Se realizaron dos tratamientos: En el tratamiento 1 el hongo *Trichoderma harzianum* estuvo con la matriz biochar (50g) en un recipiente de vidrio, por otro lado, el tratamiento 2 estuvo constituido por el hongo *Trichoderma harzianum* en un sustrato sólido estándar (de arroz) (50 g) cada tratamiento tuvo 3 repeticiones (N=6). El tiempo y duración de exposición fue el mismo que en los pasos anteriores, luego se expuso a una temperatura de $37 \pm 2^\circ\text{C}$, humedad entre 93 y 95%, pH entre 4 y 7 y finalmente se determinó si existían diferencias significativas en ambos tratamientos.

3.3.6. Determinación de otros parámetros

Se considero la medida del pH y la humedad, en el caso del pH se estimó haciendo uso de una cinta de pH y para la humedad de ambos tratamientos se siguió el procedimiento señalado por Rayhane et al. (2019): es así que se colocó 1 g de materia fresca al horno a 105°C durante 24 h, posterior a esto se estableció el porcentaje de humedad en base a la siguiente ecuación: $\text{Humedad (\%)} = (\text{Peso fresco del sustrato} - \text{peso seco}) * 100$

3.4. Técnica para el procesamiento de la información

En los tratamientos de biochar y arroz, se llevó a cabo la medición del cultivo de *Trichoderma harzianum* en diferentes intervalos de tiempo, siguiendo el plan de Pérez et al. (2020) con algunas adaptaciones: el hongo fue evaluado cada 10, 15 y 20 minutos, así como cada 2, 4 y 6 horas. Después de 10 días de cultivo, se evaluó el control de calidad y se examinaron posibles diferencias significativas entre los ensayos mediante análisis de varianza (ANOVA) así como la aplicación de la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Adicionalmente, se efectuó en los tratamientos 1 y 2 la prueba T de Student para comprobar posibles diferencias significativas entre las medias de la concentración de *Trichoderma harzianum* en cada biorreactor.

3.4.1. Control de calidad de los productos finales

3.4.1.1. Recuento directo de conidias. –

Según el protocolo de Rayhane et al. (2019), se añadieron 100 ml de agua destilada estéril con Tween 80 a una concentración de 0,01% (v/v) en cada matraz Erlenmeyer conteniendo las cepas cultivadas y se procedió a agitar con un agitador magnético estéril, introducida al mismo tiempo durante 30 min. Luego, se transfirieron 100 µl a la cámara de Neubauer correspondientes a la suspensión con el fin de efectuar el conteo de conidios en 5 cuadrantes y se determinó el valor medio. Este número fue corregido por el factor de dilución y reportado por g de materia seca, se hizo el conteo de 5 celdas pequeñas, cada conteo se realizó por triplicado.

3.4.1.2. Viabilidad o porcentaje de germinación. –

Se siguió el protocolo de SENASA (2014), de esta manera procedió a la siembra en placas Petri de 0,2 ml de la dilución, las cuales se incubaron por 18 horas. Luego, se procedió a cortar un cuadrado de agar (1 cm²) el cual se puso sobre un portaobjeto. Al cual se le adiciono el azul de lactofenol, obteniéndose 5 muestras por cada placa, la cual se observó en el microscopio y para un conteo mínimo de 200 conidias.

$$\% \text{ Germinación} = a / (a+b) * 100$$

a = número de conidias germinadas b

= número de conidias sin germinar

3.4.1.3. Pureza. –

Siguiendo la metodología propuesta por el SENASA (2014), se llevaron a cabo diluciones escalonadas hasta 10¹¹. La última dilución se sembró (0,2 ml) en placas con medio PDA el cual se incubo por 5 días a una temperatura de 25 ± 2 °C. Consecutivamente, se estimó el promedio de UFC tanto para para el hongo evaluado como para los contaminantes. De e esta forma se estimó la pureza al multiplicar el valor por el recíproco de la dilución y el volumen empleado.

$$\% \text{ Pureza} = ((\text{UFC he}) / (\text{UFC t})) * 100$$

UFC he = Unidades Formadoras de Colonias del hongo evaluado

UFC t = Unidades Formadoras de Colonias totales

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

4.1. Diseño de un biorreactor de inmersión temporal neumático de fermentación sólida.

El diseño del biorreactor de inmersión temporal neumático se realizó siguiendo la guía y recomendaciones de Solórzano (2016), en la cual se ejecutaron las siguientes actividades:

A. El sistema de soporte o andamiaje

Se tomaron en cuenta en esta etapa ciertas características para establecer el adecuado soporte del biorreactor, las cuales fueron:

- a. Material: Se utilizó plástico debido a su durabilidad, similar a la del aluminio, pero sin oxidación y con resistencia al ataque de plagas. El material fue adquirido en un comercio local.
- b. Tipo: Se optó por un sistema modular, ya que facilita el armado, así da facilidades de transporte y manejo.
- c. Forma: Se eligió un soporte de forma rectangular, con la altura mayor que el ancho.
- d. Color: Se eligió trabajar con el color negro.

Considerando estas características, el sistema de soporte consistió en un estante de 4 niveles con una altura de 128.9 cm y un ancho de 30.1 cm. Cada nivel tenía dimensiones de 30.1 cm de ancho y 60.6 cm de alto.

Figura 3

Estante para el sistema de soporte del biorreactor de inmersión temporal neumática



B. El sistema de iluminación

Se consideraron ciertos requisitos en relación con la iluminación para preservar niveles óptimos de crecimiento de los cultivos. Estos incluyeron:

- *Tipo de luz:* Se optó por luz fluorescente, ya que su emisión es similar dado que se asemeja a la luz natural, es así que se eligió uno de forma tubular de 65 cm de longitud en relación con las dimensiones del estante.
- *Cantidad de luz:* Los tubos fluorescentes blancos eran de 40 W y fueron puestos sobre los cultivos a una altura de 10-20 pulgadas.
- *Fotoperiodo:* Se controló el periodo de luz mediante un temporizador digital programable con 8 intervalos de encendido y apagado para regular la exposición a la luz en los tratamientos.

La instalación del sistema de iluminación en el estante se realizó en paralelo, empleando cable mellizo número 2-16 AWG. Se colocó un tubo fluorescente y un interruptor por cada nivel. Asimismo, se instaló un temporizador digital de ocho tiempos que programaba el encendido y apagado de las luces según los requerimientos del cultivo.

Figura 4

Timer digital programable de 8 tiempos de encendido y apagado para control de paso de corriente en los fluorescentes



Figura 5

Fluorescente tubular de 40 watts de luz blanca fría

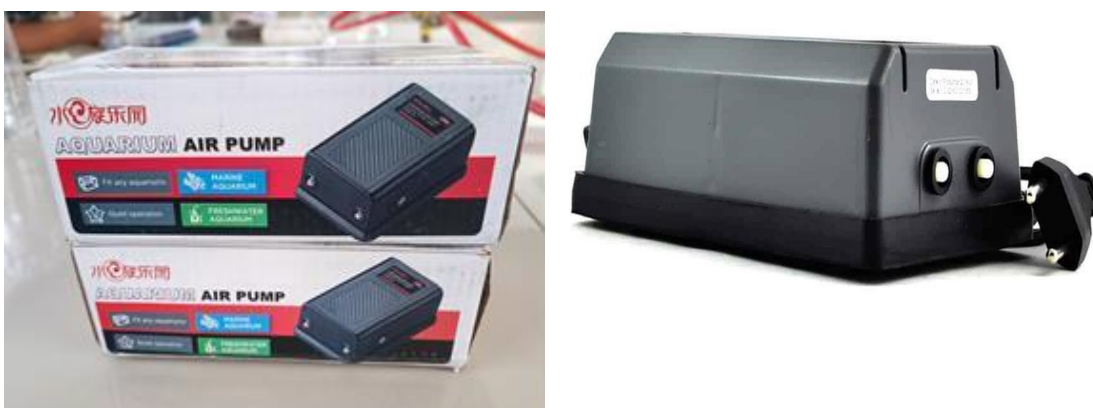


C. El sistema de aireación

Se optó por una Bomba de aire para el sistema de aireación, el cual fue de la marca Aquarium air pump con volumen de 2.5L/ 3.5L, el cual consta de dos entradas, lo cual permitió comprimir el aire y distribuir el oxígeno.

Figura 6

Bomba de aire Aquarium air pump con volumen de 2.5L/ 3.5L



Es así como el aire comprimido se distribuyó a los biorreactores las conexiones fueron directas con las mangueras de 10 mm de diámetro.

Figura 7

Mangueras del sistema de aireación y conectores.



D. El sistema de filtrado

Para el correcto filtrado del sistema, se contó con filtros de venteo de 0.20 μm de poro marca MACHEREY-NAGEL 729206 CHROMAFIL Xtra MV ideal para la filtración de gases, ya que cuenta con membrana hidrofóbica para líquidos y gases no polares y es muy resistente a una gran variedad de solventes incluyendo ácidos y bases.

Figura 8

Filtros de venteo CHROMAFIL Xtra MV de 0.20 μ m de poro



Estos filtros se conectaron entre los biorreactores y las salidas del sistema de aireación mediante mangueras de silicona autoclavable con un diámetro de 10 mm.

Figura 9

Manguera de silicona autoclavable de 10mm de diámetro



E. Contenedores

En cuanto a los contenedores para los cultivos, se utilizaron matraces de laboratorio, los cuales fueron traslúcidos, autoclavables, con boca ancha y de vidrio, asimismo contaron con una capacidad de 500 ml y 250ml respectivamente.

Aunque es cierto que estos contenedores son aptos para el autoclavado, las tapas no contaban con conexiones herméticas para el aire filtrado tanto en la entrada como en la salida. Por lo tanto, se añadieron estas conexiones utilizando corchos para matraces perforados con un diámetro de 7.5.

Figura 10

Matraz de vidrio de 250 y 500 ml de capacidad

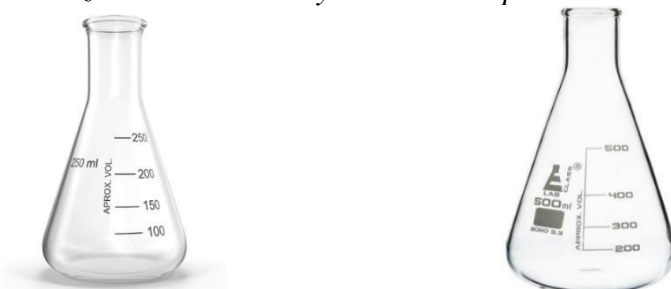


Figura 11

Corcho perforado para matraz



Es así como una vez construidos los contenedores se procedió al proceso de armado de biorreactores.

Figura 12

Biorreactores en proceso de armado



Por último, se realizó el ensamblado de todo el sistema en conjunto para comprobar así su correcto funcionamiento, en el cual se corrigieron algunas fallas menores en cuanto a las conexiones, verificando así finalmente que el sistema funcionaba de manera óptima y podría ser utilizado sin ningún problema.

Figura 13

Ensamblado y funcionamiento del sistema de biorreactores de inmersión temporal neumática



4.2. Evaluación del cultivo de *T. harzianum* en medio PDA en el biorreactor de inmersión temporal neumático a 2h ,4 h y 6 h.

4.2.1. Del proceso en el biorreactor

Se determinó la mejor duración y tiempo de exposición de *Trichoderma harzianum* al cultivo líquido PDA en relación a su crecimiento y viabilidad, esto mediante los siguientes resultados que se pueden observar a través de la tabla 3.

Tabla 2

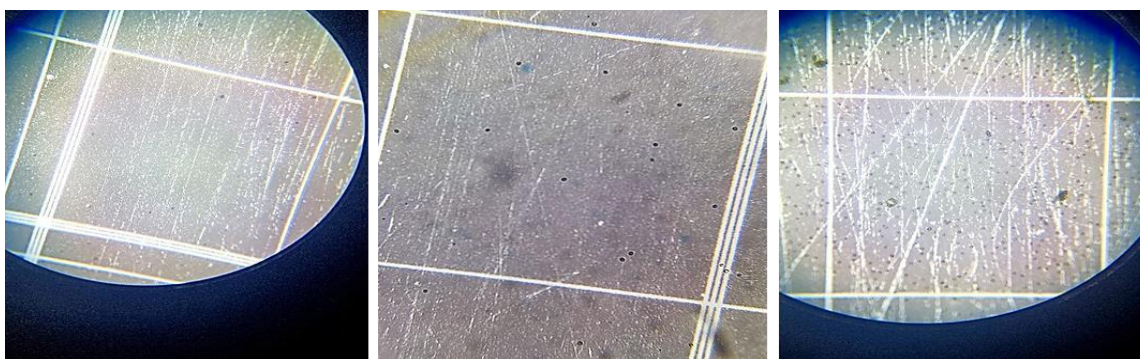
Crecimiento de conidios de Trichoderma harzianum con cultivo PDA

HORAS	<i>T. harzianum</i> + PDA		CRECIMIENTO (% de conidios)
	DURACIÓN	REPETICIONES	
2	10 min	3	1.55 x 10 ⁶ esporas/ml
4	15 min	3	3.83 x 10 ⁷ esporas/ml
6	20 min	3	1.39 x 10 ⁹ esporas/ml

Como se puede observar en la tabla 2, luego del conteo directo de conidias del hongo *Trichoderma harzianum* cultivadas en medio PDA, los valores correspondientes al número de conidios fueron 1.55 x 10⁶ esporas/ml correspondiente a 2 horas con una duración de 10 minutos, 3.83 x 10⁶ esporas/ml a las 4 horas con una duración de 15 minutos y 1.39 x 10⁶ esporas/ml a las 6 horas con una duración de 20 minutos. Observándose que los valores correspondientes al tiempo de 6 h fueron superiores, reflejando una concentración alta de conidios a comparación del de 2 h y 4 h donde los valores son menores.

Figura 14

Vista de conidios de la cepa Trichoderma harzianum en cámara de Neubauer correspondientes al cultivo PDA en las tres repeticiones (2h,4h,6 h)



En la figura 14 se puede observar los conidios correspondientes a *Trichoderma harzianum* con cultivo PDA, los cuales son esporas asexuales, que como podemos observar están pigmentadas con un color verde azulado y las cuales son ovaladas, estos

conidios se caracterizan porque son resistentes a la desecación, como se observa hay gran cantidad de estos en el campo microscópico de la tercera imagen correspondiente al tiempo de cultivo de 6 horas reflejando así un mayor crecimiento a comparación de los otros tiempos (2 h y 4 h).

Tabla 3

Porcentaje de germinación de conidios del Trichoderma harzianum con cultivo PDA

<i>T. harzianum</i> + PDA			N° de conidios germinadas	N° de conidios sin germinar	VIABILIDAD (% de germinación)
HORAS	DURACIÓN	REPETICIONES			
2	10 min	3	75	29	71.83%
			64	34	
			82	23	
4	15 min	3	190	1	99.82%
			198	0	
			185	0	
6	20 min	3	287	0	100%
			263	0	
			270	0	

En relación con el porcentaje de conidios de *Trichoderma harzianum* que tienen la capacidad de germinar en un tiempo específico, se puede observar en la Tabla 3 que fue del 71.83% a las 2 horas con una duración de 10 minutos, del 99.82% a las 4 horas con una duración de 15 minutos y del 100% a las 6 horas con una duración de 20 minutos. Se observa que los resultados para los tiempos de 4 horas y 6 horas son superiores al 90%, por lo que se establece que la viabilidad del producto es satisfactoria en comparación con el de 2 horas, donde el valor es inferior.

Figura 15

Vista de germinación de conidios de la cepa Trichoderma harzianum en cámara de neubauer correspondientes al cultivo PDA en las tres repeticiones (2h,4h,6 h)



En la figura 15 se observa que el desarrollo de los conidios de *Trichoderma harzianum* con cultivo PDA, en el campo microscópico de la tercera imagen correspondiente al tiempo de cultivo de 6 horas reflejando un mayor porcentaje de germinación (100%) es así como se visualiza la presencia de los conidióforos en forma de unas redes entrelazadas pero bastantes separadas unas con otras a comparación de los otros tiempos (2 h y 4 h) donde estas redes son escasas.

Para determinar la comparación entre los tratamientos por horas del crecimiento y la viabilidad de los mismos, se realizó el procesamiento estadístico de análisis de varianza de un factor (ANOVA). Se consideran, entonces, tres grupos (uno por cada tiempo) y como muestras se disponen las tres repeticiones realizadas por cada uno de ellos, obteniéndose lo siguiente:

Tabla 4

Análisis ANOVA para el crecimiento

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3,77E+18	2	1,89E+18	39,808	,000
Dentro de grupos	2,84E+17	6	4,74E+16		
Total	40,6E+18	8			

Para evaluar el crecimiento, se determinó, con base en un valor de p de 0.000 (<0.05), que existen diferencias significativas entre las medias de al menos dos de los tres grupos considerados, como se muestra en la tabla 4. Asimismo, para identificar entre qué grupos se dio este contraste, se realizó la prueba de Tukey, obteniendo los resultados correspondientes.

Tabla 5

Comparación múltiple entre tratamientos para crecimiento

(I) HORAS	(J) HORAS	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
2	4	-3,678E+7	1,778E+8	,977	-5,82E+8	509E+8
	6	-1,39E+9*	1,778E+8	,001	-1,94E+9	-8,46E+8
4	2	36783333	1,778E+8	,977	-5,09E+8	5,82E+8
	6	-1,36E+9*	1,778E+8	,001	-1,90E+9	-8,10E+8
6	2	1,392E+9*	1,778E+8	,001	8,46E+8	1,94E+9
	4	1,355E+9*	1,778E+8	,001	8,10E+8	1,90E+9

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Se evidencia en la tabla 5, la existencia de diferencias entre las medias de las mediciones del crecimiento realizadas tras 2 y 6 horas; así como entre las realizadas tras 4 y 6 horas. En contraste, no se observaron diferencias significativas estadísticamente entre las medias de las mediciones de crecimiento realizadas tras 2 y 4 horas. Así también, se realizó el mismo análisis para la viabilidad.

Tabla 6

Análisis ANOVA para la viabilidad

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	60412,667	2	30206,333	326,359	,000
Dentro de grupos	555,333	6	92,556		
Total	60968,000	8			

Para la viabilidad, se determinó, con base en un p valor de 0.000 (<0.05), la existencia de diferencias entre las medias de, al menos, dos grupos de los tres considerados como se observa en la tabla 6.

Para determinar entre qué grupos existe dicho contraste se efectuó la prueba de Tukey, obteniéndose:

Tabla 7

Comparación múltiple entre tratamientos para viabilidad

(I) HORAS	(J) HORAS	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
2	4	-117,333*	6,464	,000	-144,33	-90,34
	6	-199,667*	8,844	,000	-236,40	-162,94
4	2	117,333*	6,464	,000	90,34	144,33
	6	-82,333*	8,069	,006	-120,79	-43,88
6	2	199,667*	8,844	,000	162,94	236,40
	4	82,333*	8,069	,006	43,88	120,79

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Se evidencia en la tabla 7, la existencia de diferencias entre las medias de las mediciones de la viabilidad realizadas tras 2 y 4 horas; así como entre las realizadas tras 2 y 6 horas. Se observó, también, diferencias significativas entre las medias de las mediciones de viabilidad realizadas tras 4 y 6 horas.

4.3. Comparación del cultivo de *Trichoderma. harzianum* en una matriz de biochar frente al cultivo en sustrato sólido estándar de arroz en el biorreactor de inmersión temporal neumático

La matriz de biochar fue adquirida de La Universidad Agraria La Molina y estuvo compuesta de cáscara de coco, el cual se obtuvo como subproducto del proceso pirólisis, en el cual, la cáscara de coco se expuso a temperaturas muy altas (entre 300 y 500 centígrados) durante muchas horas para que se convierta en carbón. Las características físico químicas del biocarbón de cascara de coco se muestran a continuación:

Tabla 8

Características físico químicas del biocarbón de cascara de coco

	pH (1-14)	C/N	Densidad (g/ml)
BIOCHAR	8.50	C: 80% min N: 1.20%	0.60g/ cm ³

En la tabla 8, se observa que el biochar. la cascara de coco tiene características básicas o alcalinas, con una relación óptima de C: N lo que permite usarlo como soporte en la fermentación sólida para producir *Trichoderma harzianum* (TRICH 69) y reemplazo del sustrato de arroz comercial.

Luego de la inoculación del cultivo de *Trichoderma harzianum* a una concentración de 1×10^9 en la matriz de biochar se procedió a evaluar los tratamientos biochar y arroz cada uno con 3 repeticiones como se muestra en la tabla 9:

Tabla 9

Tratamientos en matriz biochar

TRATAMIENTO	REPETICIONES	COMPONENTES
T1	3	<i>T. harzianum</i> + matriz biochar (50g)
T2	3	<i>T. harzianum</i> + sustrato sólido estándar (arroz) (50 g)

Posteriormente, se expuso los tratamientos a una temperatura de $37 \pm 2^\circ\text{C}$, humedad entre 93 y 95%, pH entre 4 y 7, donde luego se determinó si existían diferencias significativas en ambos tratamientos, donde los tiempos y duración de exposición fueron los mostrados mediante la tabla 10.

Tabla 10*Características de los tratamientos para la producción de Trichoderma harzianum*

TRATAMIENTO	REPETICIONES	DESCRIPCIÓN	DURACIÓN DE EXPOSICIÓN
T1	3	T. harzianum + matriz biochar (50g); 2h	10 min
		T. harzianum + matriz biochar (50g); 4h	15 min
		T. harzianum + matriz biochar (50g); 6h	20 min
T2	3	T. harzianum + sustrato sólido estándar (arroz) (50 g);2h	10 min
		T. harzianum + sustrato sólido estándar (arroz) (50 g);4h	15 min
		T. harzianum + sustrato sólido estándar (arroz) (50 g);6h	20 min

4.3.1. Determinación de parámetros fisicoquímicos

- **Determinación del pH del (T1) cultivo de *T. harzianum* + matriz biochar**

El pH se tomó con una cinta de pH, es así como se obtuvieron los siguientes valores correspondientes al tratamiento con cultivo biochar en sus tres repeticiones en los tiempos establecidos (2h,4h,6h):

Tabla 11*Valores de pH del tratamiento 1 correspondiente a matriz biochar a las 2,4 y 6 horas*

T1: <i>T. harzianum</i> +Biochar (50 g)			pH	Promedio final pH
HORAS	DURACIÓN	REPETICIONES		
2	10 min	3	4.8	5.4
			5.2	
			6.4	
4	15 min	3	4.6	4.6
			4.3	
			4.9	
6	20 min	3	5.4	5.5
			6.2	
			4.9	

Como se puede observar en la tabla 11, el promedio de los valores de pH del tratamiento 1 fue de 5.4 correspondiente a 2 horas con una duración de 10 minutos, 4.6 a las 4 horas con una duración de 15 minutos y 5.5 a las 6 horas con una duración de 20 minutos. Observándose que el promedio más alto de pH corresponde al de 6 horas, con valores que oscilan entre 4.9 y 6, 2, seguido de valores parecidos a las 2 horas con valores entre 4.8 y 6.4, mientras valores menores se observan a las 4 horas, los cuales oscilan entre 4,3 a 4,9, sin embargo, todos los casos estos valores indican

acidez.

▪ **Determinación de la humedad del (T1) cultivo de *T. harzianum* + matriz biochar**

La humedad se estimó siguiendo el método de Rayhane et al. (2019), luego del cual se obtuvieron como resultados realizando los siguientes cálculos y se expresan porcentualmente:

$$\% \text{ Materia Seca} = 100 \times (\text{Pf} - \text{Pv}) / \text{Pm}$$

$$\% \text{ Humedad} = 100 - \text{Materia Seca}$$

En la cual, **Pf**: peso final de la placa conteniendo la muestra desecada

Pv: peso de la placa vacío

Pm: cantidad de muestra pesada (1g)

Tabla 12

Porcentaje de humedad del tratamiento 1 correspondiente a matriz biochar a las 2,4 y 6 horas

T1: <i>T. harzianum</i> +Biochar (50 g)			% Humedad	Promedio de% Humedad
HORAS	DURACIÓN	REPETICIONES		
2	10 min	3	60%	64.3%
			83%	
			50%	
4	15 min	3	50%	78.3%
			87%	
			96%	
6	20 min	3	70%	84.6%
			90%	
			94%	

Tal como se muestra en la tabla 12, el promedio de los valores de porcentaje de humedad del tratamiento 1 fue de 64.3% correspondiente a 2 horas con una duración de 10 minutos, 78.3% a las 4 horas con una duración de 15 minutos y 84.6% a las 6 horas con una duración de 20 minutos. Es así como se observa que el mayor porcentaje promedio de humedad fue el correspondiente al tiempo de 6 horas con valores de 70%, 90% y 94%, seguido de los valores a las 4 horas que fueron de 50%, 87% y 96% mientras valores menores se observan a las 2 horas, con valores de 50%, 60% y 83%.

▪ **Determinación del pH del (T2) cultivo de *T. harzianum* + sustrato sólido estándar (arroz)**

El pH se tomó con una cinta de pH, es así como se obtuvieron los siguientes valores correspondientes al tratamiento con cultivo de arroz en sus tres repeticiones en los tiempos establecidos (2h,4h,6h).

Tabla 13

Valores de pH del tratamiento 2 correspondiente a cultivo en sustrato sólido estándar (arroz) a las 2,4 y 6 horas

T2: <i>T. harzianum</i> + sustrato sólido estándar (arroz) (50g)			pH	Promedio final pH
HORAS	DURACIÓN	REPETICIONES		
2	10 min	3	5.7	5.0
			4.7	
			4.8	
4	15 min	3	5.4	5.9
			6.2	
			6.3	
6	20 min	3	5.4	5.4
			4.9	
			6.1	

Tal como se observa en la tabla 13, los valores promedio de pH del tratamiento 2 fue de 5.0 correspondiente a 2 horas con una duración de 10 minutos, 5.9 a las 4 horas con una duración de 15 minutos y 5.4 a las 6 horas con una duración de 20 minutos. Observándose que el promedio más alto de pH corresponde al de 4 horas, con valores que oscilan entre 5.4 y 6.3, seguido de los valores correspondientes las 6 horas con valores entre 4.9 y 6.1, mientras valores menores se observan a las 2 horas, los cuales oscilan entre 4.7 a 5.7, sin embargo, todos los casos estos valores indican acidez.

▪ **Determinación de la humedad del (T2) cultivo de *T. harzianum* + sustrato sólido estándar (arroz)**

La humedad se estimó siguiendo el método de Rayhane et al. (2019), luego del cual se obtuvieron como resultados realizando los siguientes cálculos y se expresan porcentualmente:

Tabla 14

Porcentaje de humedad del tratamiento 2 correspondiente a sustrato sólido estándar (arroz) a las 2,4 y 6 horas

T2: <i>T. harzianum</i> + sustrato sólido estándar (arroz) (50 g)				
HORAS	DURACIÓN	REPETICIONES	% Humedad	Promedio de% Humedad
2	10 min	3	60%	78.3%
			85%	
			90%	
4	15 min	3	40%	73.3%
			100%	
			80%	
6	20 min	3	70%	82.3%
			85%	
			92%	

Tal como se muestra en la tabla 14, el valor promedio de porcentaje de humedad para el tratamiento 2 fue de 78.3% correspondiente a 2 horas con una duración de 10 minutos, 73.3% a las 4 horas con una duración de 15 minutos y 82.3% a las 6 horas con una duración de 20 minutos. Es así como se puede observar que el porcentaje promedio más alto de humedad fue el correspondiente al tiempo de 6 horas con valores de 70%, 85% y 92%, seguido de los valores a las 2 horas que fueron de 60%, 85% y 90% mientras valores menores se observan a las 4 horas, con valores de 40%, 80% y 100%.

4.3.2. Control de calidad de los productos finales

▪ Recuento de conidios

Haciendo uso de la cámara de Neubauer se contabilizó el número de conidios en los tratamientos 1 y 2 correspondiente a 5 cuadrantes y se determinó el valor medio. Este número fue corregido por el factor de dilución y reportado por g de materia seca. Las principales modificaciones del método se refieren al uso de la cámara de conteo Malassez por la cámara Neubauer y el número de conteo de 5 celdas pequeñas en lugar de 10. Cada conteo se realizó por triplicado.

✓ Recuento directo de conidios del (T1) cultivo de *T. harzianum* + matriz biochar

Tabla 15

Crecimiento de conidios de T. harzianum del tratamiento 1 correspondiente a matriz biochar a las 2,4 y 6 horas

<i>T. harzianum</i> + PDA			CRECIMIENTO
HORAS	DURACIÓN	REPETICIONES	(% de conidios)
2	10 min	3	7.56 x 10 ⁶ esporas / ml
4	15 min	3	8.6 x 10 ⁶ esporas / ml
6	20 min	3	1.76 x 10 ⁷ esporas / ml

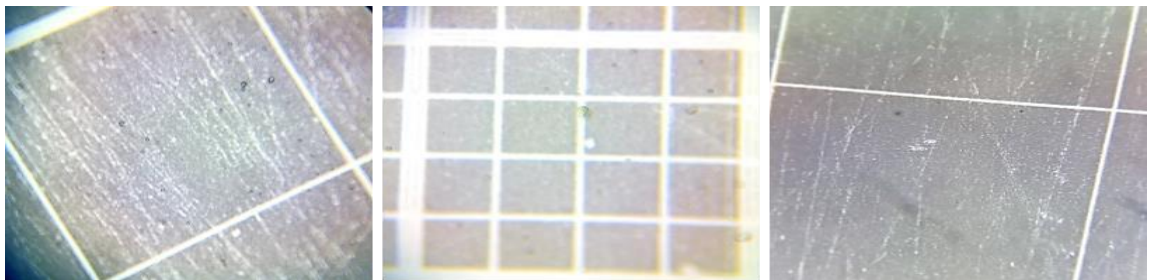
Como se puede observar en la tabla 15, luego del conteo directo de conidias del hongo *Trichoderma harzianum* cultivadas en matriz biochar, los valores correspondientes al número de conidios fueron 7.56×10^6 esporas / ml correspondiente a 2 horas con una duración de 10 minutos, 8.6×10^6 esporas / ml a las 4 horas con una duración de 15 minutos y 1.76×10^7 esporas /ml a las 6 horas con una duración de 20 minutos. Observándose que resultados correspondientes al tiempo de 6 h fue superior, reflejando una concentración alta de conidios a comparación del de 2 h y 4 h donde los valores son menores.

Figura16

Vista de conidios de la cepa *Trichoderma harzianum* en cámara de Neubauer correspondientes a matriz biochar en las tres repeticiones (2h,4h,6h)



*A las 4 horas



* A las 6 horas



En la figura 16 se puede observar los conidios correspondientes a *Trichoderma harzianum*, en el tratamiento 1 con biochar, los cuales son esporas asexuales, que, como podemos observar están pigmentadas con un color verde azulado y las cuales son ovaladas, estos conidios se caracterizan porque son resistentes a la desecación,

como se observa hay gran cantidad de estos en el campo microscópico correspondiente a la segunda imagen correspondiente al tiempo de cultivo de 6 horas reflejando así un mayor crecimiento a comparación de los otros tiempos (2 h y 4 h).

- ✓ **Recuento directo de conidios del (T2) cultivo de *T. harzianum* + sustrato sólido estándar (arroz)**

Tabla 16

*Crecimiento de conidios de *T. harzianum* del tratamiento 2 correspondiente a sustrato sólido estándar (arroz) a las 2,4 y 6 horas*

HORAS	<i>T. harzianum</i> + PDA		CRECIMIENTO (% de conidios)
	DURACIÓN	REPETICIONES	
2	10 min	3	1.3 x 10 ⁶ esporas / ml
4	15 min	3	1.83 x 10 ⁶ esporas / ml
6	20 min	3	1.8 x 10 ⁶ esporas / ml

Como se puede observar en la tabla 16, luego del conteo directo de conidias del hongo *Trichoderma harzianum* cultivadas en matriz biochar, los valores correspondientes al número de conidios fueron 1.3 x 10⁶ esporas / ml correspondiente a 2 horas con una duración de 10 minutos, 1.83 x 10⁶ esporas / ml a las 4 horas con una duración de 15 minutos y 1.8 x 10⁶ esporas / ml a las 6 horas con una duración de 20 minutos. Observándose que resultados correspondientes al tiempo de 4 h fue ligeramente superior en tanto el número de conidios a comparación del de 2 h y 6 h donde los valores son menores.

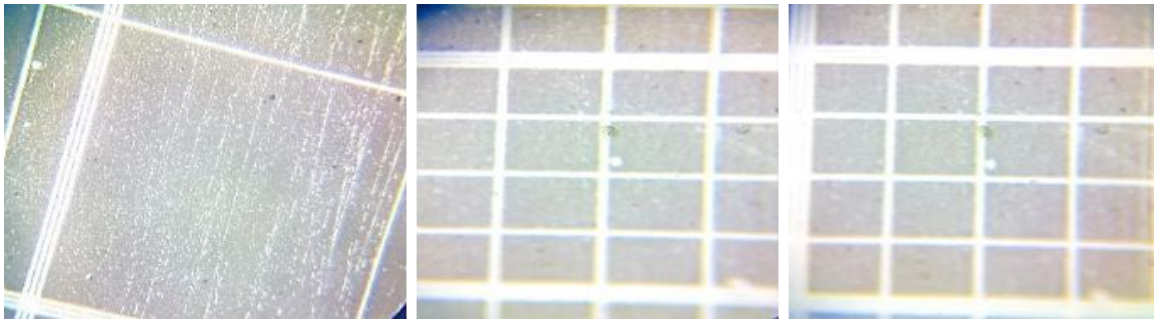
Figura 17

*Vista de conidios de la cepa *Trichoderma harzianum* en cámara de Neubauer correspondientes a sustrato sólido estándar (arroz) en las tres repeticiones (2h,4h,6 h)*

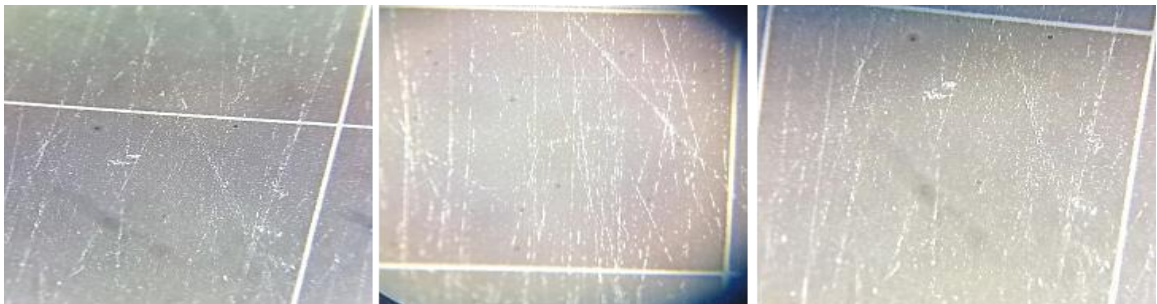
*A las 2 horas



*A las 4 horas



*A las 6 horas



En la figura 17, contrario al tratamiento 1, en el tratamiento 2 con sustrato sólido estándar de arroz se puede observar solo la presencia de algunos conidios correspondientes a *Trichoderma harzianum* en los tres períodos de tiempo establecidos.

▪ Viabilidad o porcentaje de germinación

Luego del registro de los datos, se estimó el promedio de las lecturas, lo cual permitió calcular el porcentaje de conidias germinadas y no germinadas de ambos esto luego de la aplicación de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Germinación} = a / (a+b) * 100$$

a = número de conidias germinadas

b = número de conidias sin germinar

Es así como se obtuvieron los siguientes resultados, para ambos tratamientos (matriz biochar y sustrato sólido de arroz) a las 2h, 4h y 6h.

✓ **Germinación de conidios del (T1) cultivo de *T. harzianum* + matriz biochar**

Tabla 17

Porcentaje de germinación de conidios del tratamiento 1 correspondiente a matriz biochar a las 2,4 y 6 horas

T1: <i>T. harzianum</i> +Biochar (50 g)					
HORAS	DURACIÓN	REPETICIONES	Nº de conidios germinadas	Nº de conidios sin germinar	% Germinación
2	10 min	3	89	18	76.94%
			77	27	
			95	34	
4	15 min	3	187	30	89.62%
			175	20	
			198	15	
6	20 min	3	298	30	97.87%
			347	29	
			384	42	

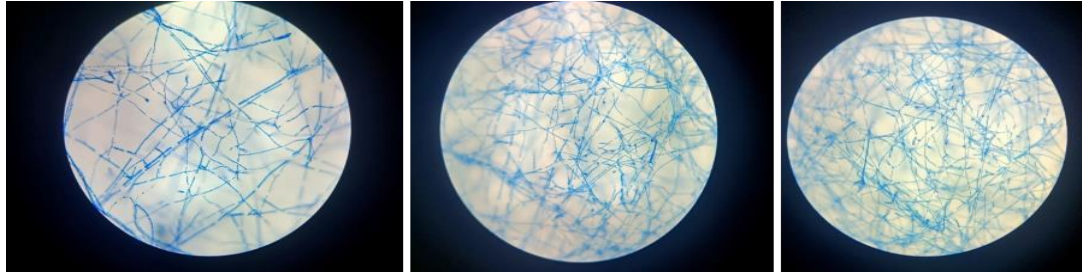
Es así como se observa por medio de la tabla 17, los valores promedio de porcentaje del número de conidios germinadas de *Trichoderma harzianum* para las 3 repeticiones del tratamiento 1 fueron, para el tratamiento correspondiente a 2 horas de 76.94% con una duración de 10 minutos, 89.62% a las 4 horas con una duración de 15 minutos y 97.87 % a las 6 horas con una duración de 20 minutos. De esta forma se muestra que el porcentaje promedio más alto de germinación fue el correspondiente al tiempo de 6 horas cuyos valores de conidios germinadas fue de 298,347 y 38460, seguido de los valores a las 4 horas que fueron de 187,175 y 198 mientras valores menores se observan a las 2 horas, con valores de 89,77 y 95 conidios germinadas.

Asimismo, en relación con el porcentaje de conidios de *Trichoderma harzianum* capaces de germinar en un tiempo específico, se observa que en el caso del T1, a las 6 horas, al superar el 90% de germinación, se considera que la viabilidad del producto es satisfactoria. En contraste con los otros casos, donde la viabilidad o el porcentaje de germinación no es adecuado.

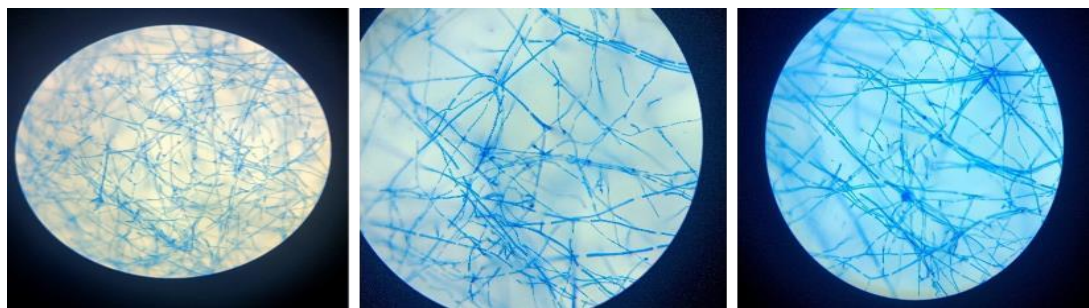
Figura 18

Vista microscópica donde se aprecia la germinación de conidios en la matriz biochar a las 2,4 y 6 horas

*A las 2 horas



*A las 4 horas



*A las 6 horas



En la figura 18 se observa el desarrollo de los conidios de *Trichoderma harzianum*, en el tratamiento 1 para cada uno de los períodos de tiempo establecidos (2h,4h y 6 h), lo cual se hace visible por la presencia de los conidióforos que tienen lugar como una red entrelazada una con otra reflejando así porcentajes altos de germinación.

✓ **Germinación de conidios del (T2) cultivo de *T. harzianum* + sustrato sólido estándar (arroz)**

Tabla 18

Porcentaje de germinación de conidios del tratamiento 2 correspondiente a sustrato sólido estándar (arroz) a las 2,4 y 6 horas.

T2: <i>T. harzianum</i> + sustrato sólido estándar (arroz) (50 g)			N° de conidias germinadas	N° de conidias sin germinar	% Germinación
HORAS	DURACIÓN	REPETICIONES			
2	10 min	3	37	94	19.31%
			21	105	
			18	120	
4	15 min	3	20	137	9.7%
			12	176	
			21	189	
6	20 min	3	15	160	10.92%
			10	89	
			12	73	

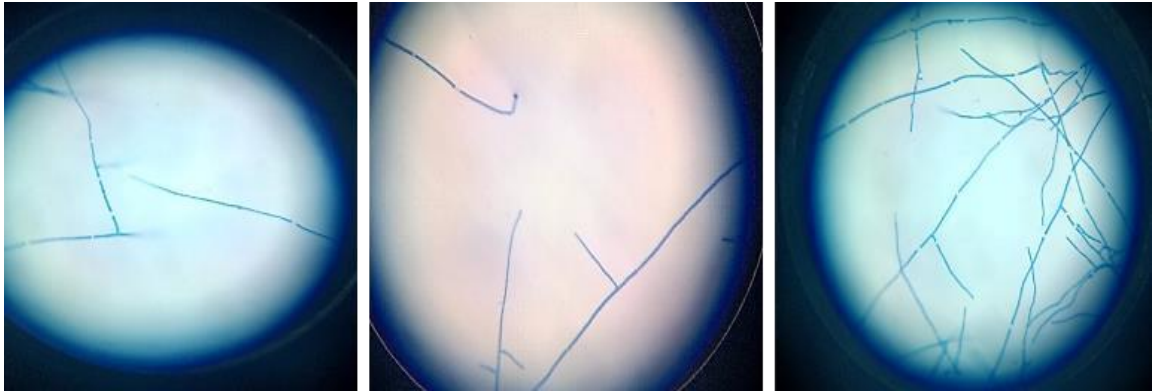
Es así como se observa por medio de la tabla 18, los valores promedio de porcentaje del número de conidias germinadas de *Trichoderma harzianum* para las 3 repeticiones del tratamiento 2 fueron, correspondiente a 2 horas de 19.31% con una duración de 10 minutos, 9.7% a las 4 horas con una duración de 15 minutos y 10.92% a las 6 horas con una duración de 20 minutos. De esta manera se muestra que el porcentaje promedio más alto de germinación fue el correspondiente al tiempo de 2 horas cuyos valores de conidias germinadas fue de 18,21 y 37, seguido de los valores a las 6 horas que fueron de 15,10 y 12 mientras valores menores se observan a las 4 horas, con valores de 20,12 y 21 conidias germinadas.

Además, en relación con el porcentaje de conidias de *Trichoderma harzianum* capaces de germinar en un tiempo específico, se observa que en el caso del T2, los resultados para los tres periodos de tiempo son bastante bajos y ninguno alcanza el 90%, por lo cual la viabilidad del producto no es satisfactoria.

Figura 19

Vista microscópica donde se aprecia la germinación de conidios en sustrato sólido estándar (arroz) a las 2,4 y 6 horas

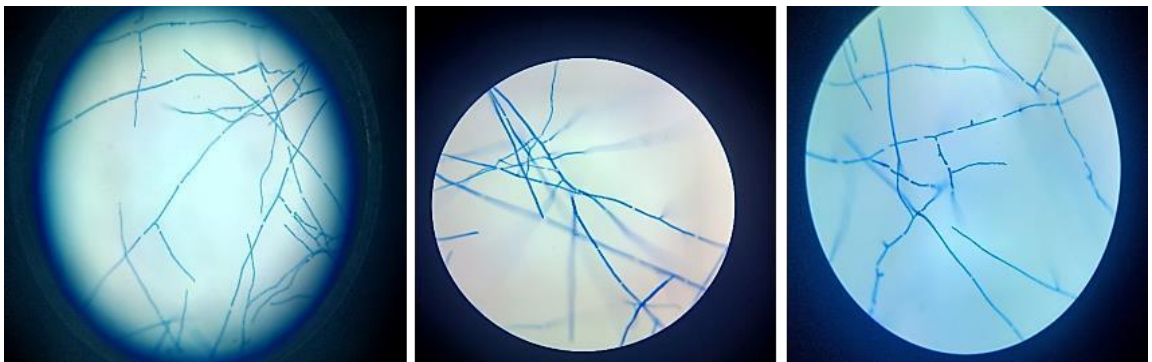
*A las 2 horas



*A las 4 horas



*A las 6 horas



A través de la figura 19 se puede visualizar el desarrollo de los conidios de *Trichoderma harzianum*, en el tratamiento 2 es bastante menor respecto al tratamiento 1, es así como se visualiza la presencia de los conidióforos en forma de unas redes entrelazadas pero bastantes separadas unas con otras, lo cual demuestra su poca germinación.

▪ **Pureza**

Después de seguir la metodología propuesta por el SENASA (2014), se calculó el promedio del número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de los contaminantes y del hongo evaluado. Este resultado se multiplicó por la inversa de la dilución (10^{-11}) y el volumen empleado (0.2 ml), aplicando estos datos a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Pureza} = ((\text{UFC he}) / (\text{UFC t})) * 100$$

UFC he = Unidades Formadoras de Colonias del hongo evaluado

UFC t = Unidades Formadoras de Colonias totales

Es así como se obtuvieron los siguientes resultados, para ambos tratamientos (matriz biochar y sustrato sólido de arroz) a las 2h, 4h y 6h

✓ **Pureza del (T1) cultivo de *T. harzianum* + matriz biochar**

Tabla 19

Porcentaje de pureza del tratamiento 1 correspondiente a matriz biochar a las 2,4 y 6 horas

T1: <i>T. harzianum</i> +Biochar (50 g)			UFC he	UFC t	% Pureza
HORAS	DURACIÓN	REPETICIONES			
2	10 min	3	0.9 x10 ¹² ufc/ml	1.0 x10 ¹² ufc/ml	94.1%
			1.1 x10 ¹² ufc/ml	1.1 x10 ¹² ufc/ml	
			1.2 x10 ¹² ufc/ml	1.3 x10 ¹² ufc/ml	
4	15 min	3	0.4 x10 ¹² ufc/ml	0.4 x10 ¹² ufc/ml	97.4%
			0.9 x10 ¹² ufc/ml	0.9x10 ¹² ufc/ml	
			1.2 x10 ¹² ufc/ml	1.3 x10 ¹² ufc/ml	
6	20 min	3	0.4 x10 ¹² ufc/ml	0.4 x10 ¹² ufc/ml	100%
			0.3 x10 ¹² ufc/ml	0.3 x10 ¹² ufc/ml	
			0.6 x10 ¹² ufc/ml	0.6 x10 ¹² ufc/ml	

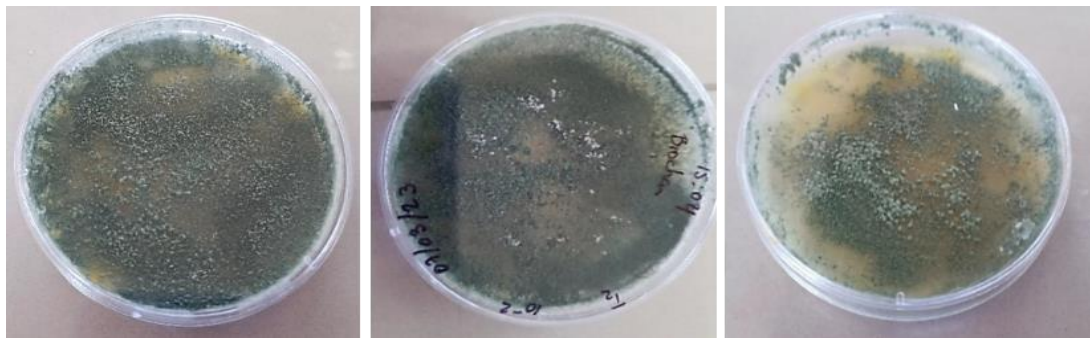
Es así como se observa por medio de la tabla 19, los valores de pureza del tratamiento 1 fueron, correspondiente a 2 horas de 94.1% con una duración de 10 minutos, 97.4% a las 4 horas con una duración de 15 minutos y 100% a las 6 horas con una duración de 20 minutos. De esta forma se visualiza que el valor más alto de pureza fue el correspondiente al tiempo de 6 horas ya que en sus 3

repeticiones la contaminación fue nula logrando así una pureza del 100% a diferencia de los otros tiempos en donde se aprecia cierto grado de contaminación en las placas de cultivo de la cepa *Trichoderma harzianum* sin embargo no fueron tan altos estando en valores de pureza superiores a 90%.

Figura 20

Placas contenidas de *Trichoderma harzianum* del Tratamiento 1 en la matriz biochar donde se aprecia el crecimiento de la cepa y los contaminantes a las 2,4 y 6 horas

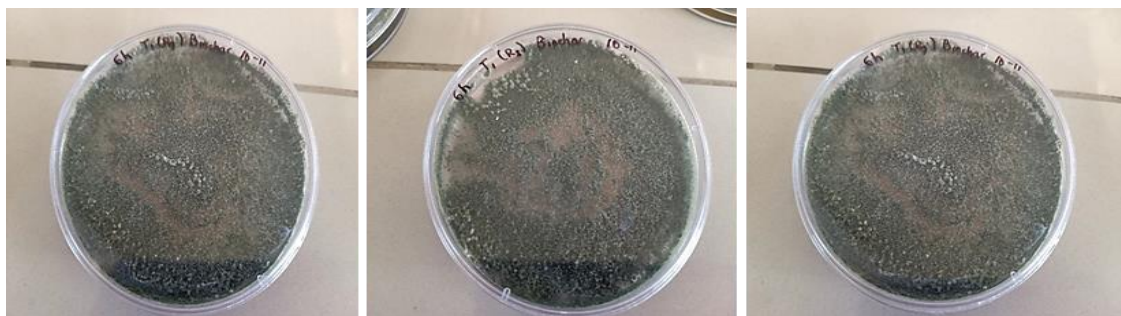
A las 2 horas



*A las 4 horas



*A las 6 horas



En la figura 18 se muestran los cultivos de *Trichoderma harzianum*, observándose que, en el tratamiento 1 en sus tres repeticiones presenta las colonias características de color verdoso las cuales predominan a comparación de las colonias contaminantes las cuales determinan sus porcentajes altos de pureza.

✓ Pureza del (T2) cultivo de *T. harzianum* + sustrato sólido estándar(arroz)

Tabla 20

Porcentaje de pureza del tratamiento 2 correspondiente a sustrato sólido estándar(arroz) a las 2,4 y 6 horas

T1: <i>T. harzianum</i> +Biochar (50 g)			UFC he	UFC t	% Pureza
HORAS	DURACIÓN	REPETICIONES			
2	10 min	3	0.2 x10 ¹² ufc/ml	5.9 x10 ¹² ufc/ml	2.08%
			0.1 x10 ¹² ufc/ml	8.0 x10 ¹² ufc/ml	
			0.2 x10 ¹² ufc/ml	12.2 x10 ¹² ufc/ml	
4	15 min	3	1.2x10 ¹² ufc/ml	8.5 x10 ¹² ufc/ml	20.16%
			1.8 x10 ¹² ufc/ml	7.2x10 ¹² ufc/ml	
			1.7 x10 ¹² ufc/ml	7.9x10 ¹² ufc/ml	
6	20 min	3	0 x10 ¹² ufc/ml	5.8 x10 ¹² ufc/ml	1.29%
			0.1 x10 ¹² ufc/ml	7.7 x10 ¹² ufc/ml	
			0 x10 ¹² ufc/ml	3.2 x10 ¹² ufc/ml	

Es así como se observa por medio de la tabla 20, los valores de pureza del tratamiento 2 fueron, correspondiente a 2 horas de 2.08% con una duración de 10 minutos, 20.16% a las 4 horas con una duración de 15 minutos y 1.29% a las 6 horas con una duración de 20 minutos. De esta forma se visualiza que el porcentaje de pureza más alto de germinación fue el correspondiente al tiempo de 4 horas sin embargo en sus 3 repeticiones se observan valores altos de contaminación lo mismo que los otros tiempos en donde los grados de contaminación en las placas de cultivo de la cepa *Trichoderma harzianum* son aún mayores por lo cual sus porcentajes de pureza son demasiado bajos con respecto al tratamiento 1.

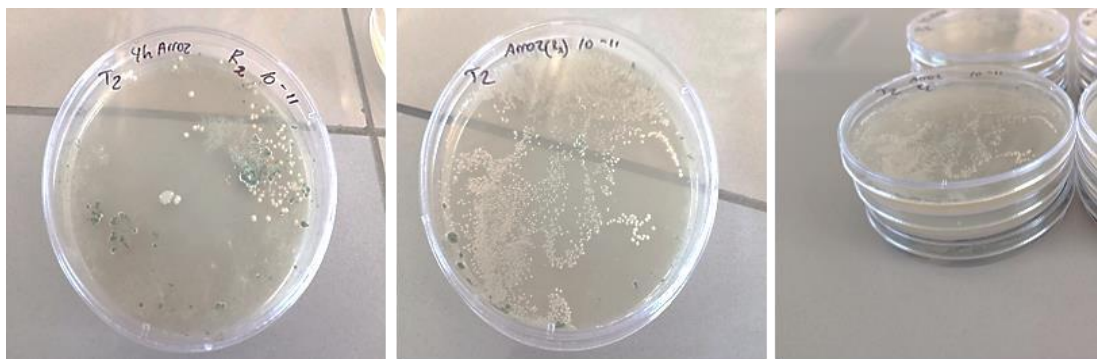
Figura 21

Placas contenidas de *Trichoderma harzianum* del Tratamiento 2 en sustrato sólido estándar (arroz) donde se aprecia el crecimiento de la cepa y los contaminantes a las 2,4 y 6 horas

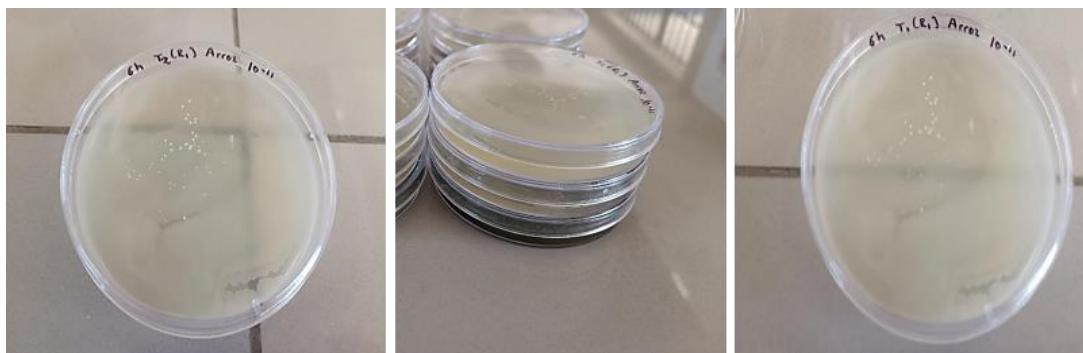
*A las 2 horas



*A las 4 horas



*A las 6 horas



En la figura 21, se puede observar las placas en las tres repeticiones del tratamiento 2 para cada periodo de tiempo con cultivo de *Trichoderma harzianum*, cuyas colonias características de color verdoso son casi imperceptibles a comparación de las colonias contaminantes que se pueden observar en casi toda la placa y que son de color blanquecino, lo cual refleja el mínimo grado de pureza de estos cultivos.

Para determinar la diferencia significativa en el crecimiento (número de

conidios) y la viabilidad (% de germinación) entre los tratamientos (biochar y sustrato sólido estándar de arroz), se realizó la prueba de T de Student para muestras independientes. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

✚ Prueba T student para el crecimiento de conidios del T1 y T2

Tabla 21

Prueba de Levene para crecimiento

	Prueba de Levene de igualdad de varianzas	
	F	Sig.
Se asumen varianzas iguales	11,347	,028
No se asumen varianzas iguales		

Tabla 22

Prueba T de Student para crecimiento

t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
					Inferior	Superior
2,028	4	,112	4330000,000	2134882,250	-1597383,374	10257383,374
2,028	2,026	,178	4330000,000	2134882,250	-4743202,035	13403202,035

Para el crecimiento, según la prueba T de Student, con un p-valor de 0.178 (>0.05) se establece que no existe evidencia significativa para establecer la existencia de diferencias significativas entre las medias del crecimiento entre los dos tratamientos realizados.

✚ Prueba T student para la germinación del T1 y T2

Para poder determinar las diferencias entre la viabilidad, se realizó el mismo análisis.

Tabla 23

Prueba de Levene para germinación

	Prueba de Levene de igualdad de varianzas	
	F	Sig.
Se asumen varianzas iguales	12,756	,023
No se asumen varianzas iguales		

Tabla 24

Prueba T de Student para germinación(viabilidad)

t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
					Inferior	Superior
1,827	4	,142	,5491333	,3005968	-,2854573	1,3837240
1,827	2,043	,207	,5491333	,3005968	-,7183901	1,8166567

Para germinación, según la prueba T de Student, con un p-valor de 0.207 (>0.05) se determina que no existe evidencia significativa entre las medias de la viabilidad entre los dos tratamientos realizados.

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

5.1. Discusión de resultados

A continuación, se discuten los resultados obtenidos del estudio:

En relación con el diseño y construcción de un biorreactor de inmersión temporal neumático para fermentación sólida. Este proceso se llevó a cabo utilizando materiales accesibles, económicos y funcionales, siguiendo la guía propuesta por Solórzano (2016), es así este biorreactor cuenta con los sistemas más importantes: sistema de soporte o andamiaje, iluminación, aireación, filtrado y por último los contenedores, se debió considerar además factores como el tamaño y forma del biorreactor, la frecuencia y duración de los intervalos de inmersión, la tasa de flujo de aire, la geometría de la cama de cultivo, finalmente se pudo verificar el funcionamiento óptimo del sistema para el cultivo de *T.harzianum*. Esto se relaciona con lo obtenido por Maiga et al. (2021) quienes crearon un biorreactor de cultivo en estado sólido desechable (DSSCB) para la producción de Conidia de *Trichoderma asperellum*, para lo cual usaron material fácil de conseguir, señalando que el diseño y uso de este biorreactor es utilizado para el cultivo de microorganismos en un medio sólido donde el aire es introducido en intervalos regulares para mejorar la oxigenación y mezcla, por lo cual un biorreactor de inmersión temporal neumático permitiría la micropropagación y aumento del coeficiente de multiplicación diversos microorganismos así como un control más exacto de las condiciones de cultivo, entre las cuales destacan la temperatura, humedad y aireación, lo que podría aumentar la producción de metabolitos deseados. En la misma línea Alfonso et al. (2018) señalan que realizaron el diseño de un biorreactor discontinuo (batch) de 150 L para la producción de *Salmonella enteritidis*, variedad danyysz, el cual se hizo en base a modelaciones matemáticas y técnicas industriales, primero a una escala de 50 L y después a 150 L, señalando que en el diseño de biorreactor debe mantener las semejanzas con el modelo, pero en procesos biológicos se debe considerar el criterio de escalado para tener éxito.

Respecto a la evaluación del cultivo de *T. harzianum* en medio PDA en el biorreactor de inmersión temporal neumático, donde se determinó la mejor duración y tiempo de exposición de *T. harzianum* al cultivo líquido PDA en relación a su crecimiento y viabilidad, con el fin de hallar la existencia de diferencias significativas del cultivo de *T. harzianum* en medio PDA en el biorreactor de inmersión temporal neumático a 2h, 4h y 6h, se mostró en los hallazgos del presente estudio, primero respecto al análisis descriptivo referente al crecimiento de conidios de *T. harzianum* con cultivo PDA que el tiempo de 6

h fue superior, reflejando una concentración alta de conidios a comparación del de 2h y 4h donde los valores son menores. Estos resultados se verificaron mediante el análisis inferencial donde se determinó, con base en un p valor de 0.000 (<0.05), la existencia de diferencias entre las medias de, al menos, dos grupos, y posteriormente mediante la prueba de Tukey, se evidencia que existen diferencias entre las medias de las mediciones del crecimiento realizadas tras 2 y 6 horas; así como entre las realizadas tras 4 y 6 horas. De la misma forma referente al porcentaje de germinación de conidios, los tiempos 4h y 6h son superiores al 90%, por lo cual se establece que la viabilidad del producto fue satisfactoria, a comparación del de 2h donde el valor es inferior. Este resultado fue verificado mediante el análisis inferencial donde se determinó, con base en un p valor de 0.000 (<0.05), es decir hubo diferencia entre las medias de, al menos, dos grupos, y posteriormente mediante la prueba de Tukey, se evidencia que existen diferencias entre las medias de las mediciones de la viabilidad realizadas tras 2 y 4 horas; así como tras 2 y 6 horas y 4 y 6 horas.

Este incremento en el crecimiento de conidios y el aumento en el porcentaje de germinación de *T. harzianum* a lo largo de las horas de 2, 4 y 6 en el biorreactor de inmersión temporal neumático sugiere además que hubo una relación positiva entre el tiempo de cultivo y la propagación exitosa del microorganismo. Las diferencias encontradas entre las horas de cultivo en medio PDA en función de su crecimiento y germinación podrían estar causadas por diferencias en la disponibilidad de nutrientes, oxigenación o acumulación de subproductos a lo largo del tiempo. Estos resultados coinciden con lo señalado por Chavarría (2016) quien cultivó *T. harzianum* en medio PDA, indicando que este aislado se distinguió por un tiempo promedio de crecimiento de 48 horas y un crecimiento promedio de 33 mm a esa hora. La producción de conidios parece estar vinculada a la cantidad de carbohidratos en el medio de cultivo, así como a la disponibilidad de oxígeno.

Respecto al cultivo de *T. harzianum* en una matriz de biochar, el biocarbón estuvo compuesto de cáscara de coco, en primer lugar, se evaluó las características físico químicas del tratamiento con biochar (biocarbón) hallándose que el promedio de los valores de pH fue de 5.4 correspondiente a 2 horas, 4.6 a las 4 horas y 5.5 a las 6 horas. Estando dentro de los rangos conformes con los señalado por Romero et al. (2009) quienes indican que el pH óptimo es entre 4 y 7, pero puede variar de 2 a 9, ya que este hongo estimula la producción de enzimas ácidas, acidificando el medio, lo cual es propicio para su crecimiento. Coincidiendo con lo reportado por Karuganti et al. (2020) quienes evaluaron

el cultivo de *Trichoderma asperellum*, mediante un sistema de fermentación sólida (sustrato de ajo). señalando un pH igual a 5. De manera similar el porcentaje de humedad fue de 64.3% correspondiente a 2 horas con, 78.3% a las 4 horas y 84.6% a las 6 horas. Estando dentro de los rangos conformes con los señalado por Romero et al. (2009) quienes reportan que el contenido de humedad mínimo es del 92% para un crecimiento vegetativo y para la esporulación entre 93 y 95%, aunque también puede adaptarse en valores que oscilan de 70 a 80%. Estos resultados se diferencian a lo encontrado por Karuganti et al. (2020) quienes evaluaron el cultivo de *Trichoderma asperellum*, mediante un sistema de fermentación sólida (sustrato de ajo). señalando un porcentaje de humedad de 45%, lo cual probablemente se deba al tipo de microorganismo utilizado, así como al tipo de sustrato solido del biorreactor que en este estudio fue cascara de coco y en el del autor a base de ajo.

Correspondiente a las características físico químicas del tratamiento con sustrato sólido estándar (arroz) el promedio de los valores de pH fue de 5.0 correspondiente a 2 horas, 5.9 a las 4 horas y 5.4 a las 6 horas todos los casos estos valores indican acidez. Estando dentro de los rangos conformes con los señalado por Romero et al. (2009) quienes señalan que el pH óptimo de cultivo de *T. harzianum* está entre 4 y 7, pero puede variar de 2 a 9, esto debido a que el hongo induce enzimas ácidas, acidificando el medio, lo cual es favorable para su crecimiento. Estando vinculado con lo reportado por Karuganti et al. (2020) quienes evaluaron el cultivo de *Trichoderma asperellum*, mediante un sistema de fermentación sólida (sustrato de ajo). señalando un pH igual a 5.

Referente al porcentaje de humedad fue de 78.3% correspondiente a 2 horas con, 73.3% a las 4 horas y 82.3% a las 6 horas. Estando dentro de los rangos conformes con los señalado por Romero et al. (2009) quienes indican que el contenido de humedad mínimo es del 92% para un crecimiento vegetativo y para la esporulación entre 93 y 95%, aunque también puede adaptarse en valores que oscilan de 70 a 80%. Estos resultados son diferentes a los obtenidos por Karuganti et al. (2020) quienes evaluaron el cultivo de *Trichoderma asperellum*, mediante un sistema de fermentación sólida (sustrato de ajo). señalando un porcentaje de humedad de 45%, lo cual probablemente se deba al tipo de microorganismo utilizado, así como al tipo de sustrato solido del biorreactor que en este estudio fue cascara de coco y en el del autor a base de ajo.

En cuanto al porcentaje de pureza del tratamiento correspondiente a matriz biochar a las 2,4 y 6 horas se observa que los valores de pureza fueron, correspondiente a 2 horas

de 94.1%, a las 4 horas 97.4% y a las 6 horas 100%, donde se aprecia que si bien hubo cierto grado de contaminación en las placas de cultivo de la cepa *Trichoderma harzianum* estas no fueron tan altas estando en valores de pureza superiores a 90%. En cuanto al porcentaje de pureza del tratamiento correspondiente a sustrato sólido estándar (arroz) a las 2, 4 y 6 horas se observa que los valores de pureza fueron, correspondiente a 2 horas de 2.08%, a las 4 horas 20.16% y a las 6 horas 1.29%, donde se aprecian valores altos de contaminación en todos los tiempos en donde los grados de contaminación en las placas de cultivo de la cepa *Trichoderma harzianum* son bastante altos por lo cual sus porcentajes de pureza son demasiado bajos con respecto al tratamiento 1. Según SENASA (2014) determinar este factor es clave dado que determina si el producto final es puro o contiene contaminantes indeseables, es así que un porcentaje de pureza mayor al 90% establece que el crecimiento del microorganismo se realizará de manera adecuada y satisfactoria dado que no tendrá competidor alguno que inhiba su crecimiento.

Qiu et al. (2019) afirma que la utilización de una matriz de biochar como soporte podría influir en la retención de humedad, la liberación de nutrientes y otros factores ambientales, lo cual se vincula con lo correspondiente a la comparación del cultivo de *T. harzianum* en una matriz de biochar frente al cultivo en sustrato sólido estándar de arroz en el biorreactor de inmersión temporal neumático planteándose una interesante pregunta sobre cómo la elección del soporte y el tiempo de cultivo pueden afectar el crecimiento de *T. harzianum* a diferentes intervalos de tiempo. En este aspecto, se determinó, para el crecimiento, según la prueba T de Student con un p-valor de 0.178 (>0.05), que no existe evidencia significativa para determinar la existencia de diferencias entre las medias del crecimiento de los dos tratamientos realizados. De manera similar, correspondiente a la viabilidad o porcentaje de germinación, con un p-valor de 0.207 (>0.05), se determinó que no existe evidencia significativa entre las medias de la viabilidad entre los dos tratamientos realizados. Estos hallazgos concuerdan con lo indicado por Rosero (2019), quien evaluó el uso de biochar a partir de la cascarilla de arroz para el cultivo del hongo *Trichoderma harzianum*. El biochar facilitó el crecimiento y la producción de esporas en la superficie porosa del biocarbón, permitiendo obtener un sustrato más económico y eficiente. Sin embargo, difieren de los resultados obtenidos por Sánchez et al. (2020), quienes utilizaron medios de cultivo de biocarbón de banano y biocarbón de cacao para el crecimiento de *Trichoderma* sp. En ese estudio, el tratamiento con biocarbón de cacao mostró un mayor crecimiento, y se encontró una diferencia significativa entre estos biocarbones con un

valor de ($p < 0,01$). No obstante, el crecimiento no fue uniforme. Estos resultados señalados por estos autores podrían deberse al tipo de microorganismo cultivado, así como al tipo de sustrato de biocarbón utilizado, estableciendo que uno difiere en gran manera de otro, a diferencia de esta investigación donde se trabajó en base a un medio biochar y otro sustrato sólido estándar.

Aunque en esta investigación no se observaron diferencias significativas en el cultivo de *Trichoderma harzianum* entre la matriz de biochar y el sustrato sólido de arroz en el biorreactor de inmersión temporal en diferentes intervalos de tiempo, eso también es un resultado valioso, ya que podría indicar que ambos sistemas son igualmente eficaces para el cultivo de *T. harzianum* en términos de crecimiento y producción. Estos resultados además podrían deberse a que el pH y la humedad se mantuvieron constantes y similares en ambos sistemas de cultivo (matriz de biochar y sustrato sólido de arroz) a lo largo de las horas de 2, 4 y 6, lo cual podría explicar la falta de diferencias significativas en los resultados observados. De esta forma, aunque no hubo diferencias significativas, esta investigación aún podría tener aplicaciones prácticas, en tanto por ejemplo la elección entre biochar y sustrato sólido de arroz en base a consideraciones de costo, disponibilidad de materiales y facilidad de manejo.

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

En relación al primer objetivo específico, centrado en el diseño de un biorreactor de inmersión temporal neumático para fermentación sólida, se concluyó que la forma más viable de realizarlo es mediante el uso de materiales económicos y funcionales, realizando un análisis de factores como tamaño y forma del recipiente; la frecuencia, duración e intervalos de la inmersión, y, por último, la tasa de flujo de aire y geometría de la cama de cultivo. Es necesario que contar con un sistema de soporte o andamiaje, iluminación, aireación, filtrado y contenedores.

Con respecto al segundo objetivo específico, orientado a evaluar el cultivo de *T. harzianum* en medio PDA en el biorreactor de inmersión temporal neumático a 2h, 4 h y 6 h se determinó, mediante la prueba de ANOVA, que existen suficiente evidencia significativa ($p < 0.05$) para manifestar que existen diferencias entre las medias de concentración de, al menos, dos de los tratamientos utilizados; siendo superior en el tiempo de 6 horas, por sobre las 2 y 4 horas. Así también, se concluyó mediante la prueba de ANOVA, que existió diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las medias de viabilidad de, al menos, dos de los tratamientos utilizados; siendo más satisfactoria en los tiempos de 4 y 6 horas, cuando la germinación fue mayor al 90%.

Con respecto al tercer objetivo específico, dirigido a comparar el cultivo de *T. harzianum* en una matriz de biochar frente al cultivo en sustrato sólido estándar de arroz en el biorreactor de inmersión temporal neumático, se concluyó, mediante la prueba estadística de T-Student, que no existen evidencias significativas ($p > 0.05$) entre las medias del crecimiento y la viabilidad o germinación del hongo de los dos tratamientos realizados, por lo que no habría diferencia entre cultivar el *T. harzianum* en una matriz de biochar o en sustrato sólido estándar de arroz en el biorreactor de inmersión temporal neumático.

Con respecto al objetivo general, que buscó evaluar la respuesta de *Trichoderma harzianum* bajo un biorreactor de inmersión temporal neumático de fermentación sólida en una matriz biochar, se concluyó que el promedio de crecimiento de conidios para las dos primeras horas es de 7.56×10^6 esporas / ml; para 4 horas, de 8.6×10^6 esporas / ml; y para 6 horas, de 1.76×10^7 esporas / ml. Por otro lado, el porcentaje promedio de germinación para este tratamiento es de 76.94% para las dos primeras horas; de 89.62% para las 4 horas y de 97.57% para las 6 horas.

6.2. Recomendaciones

Tras el análisis de los hallazgos obtenidos, se recomienda hacer uso, para el diseño y construcción del biorreactor de inmersión temporal neumático de fermentación sólida, de materiales viables económicos y funcionales, siguiendo la guía dispuesta por Solórzano (2016) en su investigación.

Así mismo, se sugiere utilizar el medio que resulte más factible para el cultivo de *T. harzianum*, ya que, según los resultados obtenidos en este estudio, no se evidencian diferencias significativas en el crecimiento y la viabilidad del hongo entre la experimentación con una matriz de biochar y el sustrato sólido estándar de arroz.

Por último, se aconseja llevar a cabo la experimentación realizada en la actual investigación más a profundidad, así como de un muestra mayor de manera que se cuente con una mayor cantidad de datos que permitan establecer la existencia de diferencias entre tratamientos; así mismo, incrementar la cantidad de posibles medios de manera que se establezca su efectividad como escenario de cultivo para el *T. harzianum*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adnan, M., Islam, W., Shabbir, A., Khan, K., Ghramh, H., Huang, Z., Lu, G. (2019). Plant defense against fungal pathogens by antagonistic fungi with *Trichoderma* in focus. *Microbial Pathogenesis*, 129(1), 7-18. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.042>
- Albarrán, J., Salazar, E., Trujillo, I., Vegas, A., Gonzáles, A., Díaz, A., y Silva, A. (2014). Biorreactores de inmersión temporal para la propagación masiva de plantas. INIA Divulga. *Revista de difusión de tecnología agrícola, pecuaria, pesquera y acuícola*, 60 (1).
- Alfonso, Y., Pérez, A., y Yll, M. (2018). Diseño de un biorreactor para la producción de inóculo de *Salmonella enteritidis*. *Revista Cubana de Química*, 31(1), 120-136. <https://n9.cl/4rk1x>
- Allende, R., Báez, K., Salazar, E., y Rojo, I. (2022). Biodiversidad de *Trichoderma* spp. en México y su potencial de utilización en la agricultura. *Tropical and Subtropical Agroecosystems.*, 25(3). :10.56369/tsaes.4297
- Arévalo, E., Cayotopa, J., Olivera, D., Gárate, M., Trigoso, E., Costa, B., y León, B. (2017). Optimización de sustratos para la producción de conidias de *Trichoderma harzianum*. Por fermentación sólida en la región de San Martín. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 19(2). <http://dx.doi.org/10.18271/ria.2017.272>
- Arredondo, C. (2019). *Diseño y automatización de un nuevo biorreactor para sistemas de inmersión temporal*. [Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias de la computación]. Repositorio Institucional de la Universidad Autónoma del Estado de México. <http://hdl.handle.net/20.500.11799/98805>
- Azad, K., y Kaminskyj, S. (2016). A fungal endophyte strategy for mitigating the effect of salt and drought stress on plant growth. *Symbiosis*, 68(1), 73-78. <https://doi.org/10.1007/s13199-015-0370-y>
- Baker, K., y Cook, R. (1989). Product Detail - Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. <https://acortar.link/aUCanC>
- Bissett, J. (2011). A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. *Canadian Journal of Botany*. <https://doi.org/10.1139/b91-299>
- Brick, S. (2010). Biochar: Assessing the promise and risks to guide U.S. policy. Natural Resources Defense Council. USA. www.nrdc.org/energy/files/biochar_paper.pdf
- Carrión, A., y Tapia, M. (2019). Yield of five potato varieties in Temporary Immersion Bioreactors (TIB). *Peruvian Journal of Agronomy*, 3(1), 24-28. <https://doi.org/10.21704/pja.v3i1.1281>
- Castro, J., y Gonzales, D. (2002). Micropropagación de eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) en el sistema de inmersión temporal. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 62(1), 68-78. <https://hdl.handle.net/1807/23020>

- Chavarría, M. (2016). Evaluación de aislados nativos de *Trichoderma* spp para el manejo de hongos causantes del mal del talluelo en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Doctoral dissertation, Universidad Nacional Agraria).
- Cruz, L. (2007). *Estandarización del proceso de producción masiva del hongo Trichoderma koningii Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto*. Repositorio Institucional de la Pontificia Universidad Javeriana. <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8237>
- Da Silva, J., De Medeiros, E., Da Costa, D., De Souza, C., De Oliveira, J., Da Franca, R., . . . Hammecker, C. (2022). Biochar and *Trichoderma aureoviride* URM 5158 as alternatives for the management of cassava root rot. *Applied Soil Ecology*, 172(2). <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104353>
- Delgado, H. (2020). *Optimización de sistemas de inmersión temporal para la producción masiva de plántulas de piña (Ananas comosus L. Merr.) en la Región San Martín*. Instituto Nacional de Innovación Agraria. <http://repositorio.inia.gob.pe/handle/20.500.12955/1163>
- Escalante, A., Pérez, G., Hidalgo, C., López, J., Campo, J., Valtierra, E., y Etchevers, J. (2016). Biocarbón (biochar) I: Naturaleza, historia, fabricación y uso en el suelo. *Terra Latinoamericana*, 34(3), 367-382. <https://goo.su/YOwrh2>
- Ettienne, H., y Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), 215-231. <https://doi.org/10.1023/A:1015668610465>
- Gajera, H., y Vakharia, D. (2012). Production of Lytic Enzymes by *Trichoderma* Isolates during in vitro Antagonism with *Aspergillus Niger*, The Causal Agent of Collar ROT of Peanut. *Brazilian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000100005>
- Gallardo, E. (2017). Metodología de la Investigación: manual autoformativo interactivo. Universidad Continental, Perú.
- Garrido, M., y Di Severino, N. (2019). Capacidad antagonica de *Trichoderma harzianum* frente a *Rhizoctonia*, *Nakatea sigmoidea* y *Sclerotium rolfsii* y su efecto en cepas nativas de *Trichoderma* aisladas de cultivos de arroz. *Scientia Agropecuaria*, 10(2). <https://doi.org/10.17268/sci.agrop>
- Gaskin, J., Steiner, C., Harris, K., Das, K., y Bibens, B. (2008). Effect of Low- Temperature Pyrolysis Conditions on Biochar for Agricultural Use. *Transactions of the Asabe*, 51(6). <https://doi.org/10.13031/2013.25409>
- Ghorbanpour, A., Salimi, A., Ghanbary, M., Pirdashti, H., y Dehestani, A. (2018). The effect of *Trichoderma harzianum* in mitigating low temperature stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Scientia Horticulturae*, 230(1). <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.11.028>
- Guevara, C., Rojas, L., López, J., y Vásquez, J. (2016). Efecto antagonico de una cepa de *Trichoderma* sp sobre *Fusarium* sp. En planta de tomate Río Grande (*Solanum*

- lycopersicum). UCV-HACER. *Revista de Investigación y Cultura*. <https://goo.su/1XVzMU>
- Lima, R. (2019). Biosynthesis of silver nanoparticles employing *Trichoderma harzianum* with enzymatic stimulation for the control of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50871-0>
- Gwa, V., Nwankiti, A., y Ekefan, E. (2019). In vitro Study of Antagonistic Capability of *Trichoderma harzianum* against *Aspergillus niger* Isolated from Rotten White Yam (*Dioscorea rotundata*) Tubers. *Journal of Advances in Biology y Biotechnology*, 21(1),10. <http://dx.doi.org/10.9734/JABB/2019/v21i130080>
- Hernández, D., Ferrera, R., y Alarcón, A. (2019). *Trichoderma*: Importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean journal of agricultural y amp; animal sciences*, 35(1). <https://doi.org/10.4067/S0719-38902019005000205>
- Hidangmayum, A., y Dwivedi, P. (2018). Plant responses to *Trichoderma* spp. and their tolerance to abiotic stresses: a review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(1), 758-766. <https://goo.su/TdFidI>
- Howell, C. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Diseases.*, 4-10. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.1.4>
- Infante, D., Martínez, B., González, N., y Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1). <https://goo.su/FQvhN>
- Karuganti, S., Reddy, G., y Ganti, S. (2020). Optimization of process parameters for high yield production of Exo-Inulinase from *Trichoderma asperellum* RSBRO8 by using Solid State Fermentation. *Current trends in Biotechnology and Pharmacy*, 428-433.
- Küçük, C., y Kivanc, M. (2008). Effect of Carbon Source on Production of Lytic Enzymes by *Trichoderma Harzianum*. *Journal of Applied Biological Sciences*, 2(2). <https://dergipark.org.tr/en/pub/jabs/issue/34893/386879>
- Lecault, V., Patel, N., y Thibault, J. (2009). An image analysis technique to estimate the cell density and biomass concentration of *Trichoderma reesei*. *Letters in Applied Microbiology*, 48(4). <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02544.x>
- Liu, X., Wang, Z., Yan, Y., Yu, X., Zhao, P., Wang, X., . . . Xu, J. (2020). Novel strategy of incorporating biochar in solid-state fermentation for enhancing erythritol production by forming “microzones”. *Bioresource Technology*, 306(1). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123141>
- Lizard, M., y Hernández, R. (2017). Solid state fermentation (SSF): Diversity of applications to valorize waste and biomass. *3 Biotech*, 7(1). [10.1007/s13205-017-0692-y](https://doi.org/10.1007/s13205-017-0692-y)
- Lorito, M., Peterbauer, C., Hayes, C., y Harman, G. (1994). Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. *Microbiology*, 140(3), 623-629.

<https://doi.org/10.1099/00221287-140-3-623>

- Maiga, Y., Carboué, Q., Hamrouni, R., Tranier, M., Ben, Y., y Roussos, S. (2021). Development and Evaluation of a Disposable Solid-State Culture Packed-Bed Bioreactor for the Production of *Conidia* from *Trichoderma asperellum* Grown Under Water Stress. *Waste and Biomass Valorization*, 12(6), 3223-3231. [10.1007/s12649-020-0](https://doi.org/10.1007/s12649-020-020-0)
- Marmolejo, D., y Corpus, C. (2021). Características y rendimiento de semillas básicas de papa nativa (*Solanum goniocalyx*) obtenidas en biorreactor de inmersión temporal en condiciones de invernadero. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia*, 38(2), 322-341. <https://produccioncientificaluz.org/index.php/agronomia/article/view/35502>
- Martínez, B., Infante, D., y Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. Y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal.*, 28(1), 1-11. <https://goo.su/kLciJYZ>
- Martínez, H., Rodríguez, R., Herrera, V., Paredes, F., Segura, T., y Osorio, E. (2021). Biocontrol of *Fusarium oxysporum* by *Trichoderma* spp. In *Aloe vera* under greenhouse and field conditions. *Mycopath*, 19(2), 65-73. <http://journals.pu.edu.pk/journals/index.php/mycopath/article/view/5547>
- Mas, S., Rodríguez, I., Martínez, C., Michelena, G., y Agenor, J. (2015). Fermentación en estado sólido de *Trichoderma harzianum* bajo campos magnéticos. *ICIDCA*, 49(1), 40-45. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223136961007>
- Mathivanan, N., Prabavathy, V., y Vijayanandraj, V. (2005). Application of Talc Formulations of *Pseudomonas fluorescens* Migula and *Trichoderma viride* Pers. Ex S.F. Gray Decrease the Sheath Blight Disease and Enhance the Plant Growth and Yield in Rice. *Journal of Phytopathology*, 153(11), 697-701. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2005.01042.x>
- Medeiros, E., Moraes, M., Costa, D., Duda, G., Silva, J., Oliveira, J., Hammecker, C. (2020). Biochar and *Trichoderma aureoviride* applied to the sandy soil: Effect on soil quality and watermelon growth. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 48(2), 735-751. <https://doi.org/10.15835/nbha48211851>
- Medeiros, H., Filho, J., Freitas, L., Castillo, P., Rubio, B., Hermosa, R., y Monte, E. (2017). Tomato progeny inherit resistance to the nematode *Meloidogyne javanica* linked to plant growth induced by the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride*. *Scientific Reports*, 7(1). <https://www.nature.com/articles/srep40216>
- Novy, V., Schmid, M., Eibinger, M., Petrasek, Z., y Nidetzky, B. (2016). The micromorphology of *Trichoderma reesei* analyzed in cultivations on lactose and solid lignocellulosic substrate, and its relationship with cellulase production. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1). [10.1186/s13068-016-0584-0](https://doi.org/10.1186/s13068-016-0584-0)
- Ñaupas, H., Valdivia, M., Palacios, J., y Romero, H. (2018). Metodología de la investigación cuantitativa-cualitativa y redacción de la tesis. 5a. Edición. Bogotá: Ediciones de la U.

- Oviedo, D., Alvarenga, S., Evangelista, S., y Sepúlveda, G. (2015). Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni, un Cultivo Promisorio para México. *BioTecnología*, 19(1), 14-27. <https://acortar.link/7Se3S8>
- Pérez-, C., Juárez, P., Anzaldo, J., Alía, I., Salcedo, E., y Balois, R. (2021). Beneficios potenciales del biocarbón en la productividad de cultivos agrícolas. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 12(4), 713-725. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i4.2542>
- Pérez J., Fonseca, M., Bahi, M., Silva, J., y Werbrouck, S. (2020). Multiplicación in vitro de *Morus alba* L. variedad criolla en sistemas de inmersión temporal. *Pastos y Forrajes*, 43(3), 235-243. <https://goo.su/S9Noui>
- Poveda, J., Hermosa, R., Monte, E., y Nicolás, C. (2019). *Trichoderma harzianum* favours the access of arbuscular mycorrhizal fungi to non-host Brassicaceae roots and increases plant productivity. *Scientific Reports*, 9(1). <https://www.nature.com/articles/s41598-019-48269-z>
- Qiu, L., Deng, Y., Wang, F., Davaritouchae, M., y Yao, Y. (2019). A review on biochar-mediated anaerobic digestion with enhanced methane recovery. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 115(1). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109373>
- Rayhane, H., Josiane, M., Gregoria, M., Yiannis, K., Nathalie, D., Ahmed, M., y Sevastianos, R. (2019). From flasks to single used bioreactor: Scale-up of solid-state fermentation process for metabolites and conidia production by *Trichoderma asperellum*. *Journal of Environmental Management*, 252(1). [10.1016/j.jenvman.2019.109496](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109496)
- Romero, O., Huerta, M., Damián, M., Domínguez, F., y Arellano, D. (2009). Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), 143-151. <https://goo.su/Z5cMmFi>
- Rosero, C. (2019). Producción y caracterización de biochar a partir de biomasa residual para el cultivo del hongo *Trichoderma harzianum*. [Tesis de Bachiller]. Repositorio Digital USFQ. <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/8548>
- Samolski, I., Rincón, A., Pinzón, L., Viterbo, A., y Monte, E. (2012). The *qid74* gene from *Trichoderma harzianum* has a role in root architecture and biofertilization. *Microbiology (Reading, England)*, 158(1), 129-138. [.:10.1099/mic.0.053140-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.053140-0)
- Sánchez, S., Condoy, A., Sisalima, P., Barrezueta, S., y Jaramillo, E. (2020). Uso de biocarbones en medios de cultivo para el crecimiento de *Trichoderma* spp. In vitro. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 3(2), 66-72. <https://remca.umetedu.ec/index.php/REMCA/article/view/267>
- Schmoll, M., Dattenböck, C., Carreras, N., Mendoza, A., Tisch, D., Alemán, M. I., y Herrera, A. (2016). The genomes of three uneven siblings: footprints of the lifestyles of three *Trichoderma* species. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 205-327. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00040-15>
- SENASA. (2014). Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos. Laboratorio de Entopatógenos SCB-SENASA, 1(1), 1-36.

- Shoresh, M., Harman, G., y Mastouri, F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology.*, 48(1), 21-43. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114450>
- Siddiqui, Y., Meon, S., Ismail, M. R., y Ali, A. (2008). Trichoderma-fortified compost extracts for the control of choanephora wet rot in okra production. *Crop protection*, 27(3-5), 385-390. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2007.07.002>
- Simkovic, M., Ditte, P., Kurucová, A., Lakatos, B., y Varecka, L. (2008). Ca²⁺- dependent induction of conidiation in submerged cultures of *Trichoderma viride*. *Canadian Journal of Microbiology.*, 54(4), 291-298. <https://cdnsiencepub.com/doi/abs/10.1139/W08-001>
- Sivasithamparam, K., y Ghisalberti, E. (1998). Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. En C. P. Kubicek y G. E. Harman (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium*. <https://goo.su/uSd34b>
- Solórzano, R. (2016). Diseño y construcción de un sistema de biorreactores de inmersión temporal neumática para la multiplicación de *Ananas comosus* var. Roja Trujillana. [Tesis de maestría]. Repositorio Digital - UNT. <https://goo.su/JcyFvis>
- Ticlla, H. (2019). Control de *Plasmadiophora brassicae* en brócoli (*Brassica oleracea* var. Italica) cv. "Avenger" con *Trichoderma viride* mezclado con biocarbón activado. [Tesis de Ingeniería]. Arequipa: Repositorio Institucional UNSA.
- Tyskiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., y Jaroszek, J. (2022). *Trichoderma*: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4). <https://doi.org/10.3390/ijms23042329>
- Wang, E.-Q., Li, S.-Z., Tao, L., Geng, X., y Li, T.-C. (2010). Modeling of rotating drum bioreactor for anaerobic solid-state fermentation. *Applied Energy*, 87(9), 2839-2845. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.05.032>
- Woo, S., Lorito, M., Vurro, M., y Gressel, J. (2007). Exploiting the interactions between fungal antagonists pathogens and the plant for biocontrol. En S. Woo, y M. Lorito, *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management* (págs. 107-130). Springer Netherlands. http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-5799-1_6
- Woo, S., Scala, F., Ruocco, M., y Lorito, M. (2006). The Molecular Biology of the Interactions Between *Trichoderma* spp., Phytopathogenic Fungi, and Plants. *Phytopathology*, 96(2), 181-185. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0181>
- Zhang, F., Wang, Y., Liu, C., Chen, F., Ge, H., Tian, F., Zhang, Y. (2019). *Trichoderma harzianum* mitigates salt stress in cucumber via multiple responses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 170(1), 436-445. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.084>

ANEXOS

Anexo 1

Diseño del biorreactor



Anexo 2

Evaluación de *Trichoderma harzianum* en la matriz biochar

Preparación del medio para la activación de la cepa *Trichoderma harzianum*



Plaqueo de medio de cultivo para la activación de la cepa *Trichoderma harzianum*



Inoculación de *Trichoderma harzianum* en el agar papa dextrosa (PDA)



Pesado del biochar antes de ser colocados en los respectivos biorreactores



I

noculación de *Trichoderma harzianum* en la matriz biochar

