

Evaluación preliminar de la arcilla para la producción de inoculantes de *Trichoderma longibratium* en condiciones de laboratorio

Ing. Diego Efrén Zambrano Pazmiño ¹, Ing. Ángel Monserrate Guzmán Cedeño Ms.C ¹, Dra. C. Ana Julia Rondón Profesora titular², Ing. Marta Laurencio Silva Ms.C², Dr. C.

¹ Coordinación de Investigación Científica, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, Campus Politécnico El Limón, Km 2.7 Vía Calceta-El Limón

2. Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos” Apartado Postal 44740, Km 3 ½, Matanzas, Varadero, Cuba.

Contacto: diegozambrano1987@outlook.com

Resumen

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar la supervivencia de la cepa fúngica *Trichoderma longibratium* en un inoculante elaborado a base de arcilla estéril, almacenado a temperatura ambiente durante cuatro meses. El suelo fue molido y pasado por un tamiz; para su esterilización, el portador se esterilizó en autoclave a una temperatura de 121°C durante tres días consecutivos y su posterior secado se realizó en la estufa a una temperatura de 70°C. Se realizó una evaluación a 45°C y a diferentes tiempos de secado (1/2, 1, 2, 3, 4, 5, 6 horas) con la finalidad de evaluar la sobrevivencia de la cepa fúngica, para lo cual se realizaron diluciones seriadas y su posterior recuento en placa, este método también fue empleado para realizar el seguimiento de la cepa fúngica durante los cuatro meses de almacenamiento. El mejor tiempo de desecación de la arcilla se obtuvo a partir de las 4 horas, además el hongo *Trichoderma longibratium* se mantuvo viable durante 4 meses con una viabilidad de 10⁵ UFC/g.

Palabras claves. Compost, estabilidad, preservación, Temperatura ambiente.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas para vivir necesitan nutrirse en base de las sustancias químicas que se encuentran en el suelo, en cuyo sustrato deben existir los nutrientes en cantidad necesaria y en un balance adecuado con los otros elementos, lo cual se logra, incorporando nutrientes con criterio técnico que garanticen la obtención de una buena cosecha. En efecto, la producción agrícola ha evolucionado en gran medida con la incorporación de fertilizantes sintéticos, dando como respuesta un incremento significativo de los rendimientos, pero, a costa de la formación de una serie de condiciones y factores negativos en los agroecosistemas, por lo que en muchos suelos se observan acumulaciones importantes de sales minerales y otras combinaciones ecológicamente dañinas. Castro, D. La fertilización constituye junto a la disponibilidad de agua, uno de los principales requerimientos en el desarrollo agrícola. En la actualidad y debido a los altos costos de los fertilizantes químicos, cobra mayor importancia el desarrollo de tecnologías que involucren fertilizantes biológicos que incorporan al suelo las cantidades necesarias de nitrógeno, fósforo y potasio (Rey *et al.*, 2014).

Resulta necesaria la obtención de formulaciones sólidas que aumenten la estabilidad en el tiempo y favorezcan su transportación y almacenamiento (Arianna, N. 2009). Para la comercialización de los biofertilizantes es importante conservar su calidad el mayor tiempo posible, de lo cual depende la aceptación del producto en la cadena productiva, además que el medio brinde protección y los requerimientos necesarios que mantengan viable al microorganismo (Pallo y Velastegui 2011). Es necesario contar con métodos de preservación adecuados que permitan mantener a las cepas microbianas viables, de tal forma que no se modifiquen sus características morfológicas, fisiológicas y genéticas (Morales *et al.*, 2010).

2. DESARROLLO

2.1. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.1. ELABORACIÓN DE SOPORTE

El soporte se elaboró utilizando suelo recolectado del campus del área orgánica correspondiente a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí; el suelo fue molido y pasado por un tamiz; el portador se esterilizó en autoclave a una temperatura de 121°C y 15 libras de presión (por 15 min), durante tres días consecutivos. El secado de la arcilla se realizó en la estufa a una temperatura de 70°C.

2.1.2. PREPARACIÓN DEL INOCULANTE

El inóculo se preparó a partir de la adición de un cultivo líquido el cual se inició con la siembra del microorganismo en medio de crecimiento (caldo arroz), con agitación de 250 rpm durante 72 horas (h) a una temperatura de incubación de 30°C, teniendo una concentración final de 10^5 UFC/g (González y Rondón 1998). Se adicionaron 5 mL de cultivo líquido al portador estéril; dejando como control una tarrina del portador sin inocular (Matos y Zúñiga 2003).

2.1.3. EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DURANTE EL SECADO

El secado se realizó en estufa a 45°C y a diferentes tiempos de evaluación (1/2, 1, 2, 3, 4 y 6 horas). Después de cada tiempo de evaluación se realizaron diluciones seriadas Stanier y Ingraham, (1996) y su posterior recuento en placa; el medio de cultivo utilizado fue agar sabouraud.

2.1.4. SEGUIMIENTO DE LA SOBREVIVENCIA DEL HONGO *Trichoderma longibrachiatum*

A los 0, 7, 15, 30, 60, 90 y 120 días de almacenamiento se evaluó la sobrevivencia de la cepa fúngica *Trichoderma longibrachiatum*, determinando el número de unidades formadoras de colonia (UFC) por el método de dilución decimal y el recuento en placa; el medio de cultivo utilizado fue agar sabouraud.

2.1.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis, los datos fueron transformados a log₁₀ UFC/g, por el sistema INFOSTAT versión 1 (Belzarini *et al.*, 2001).

2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.2.1. EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DURANTE EL SECADO

El grafico 1 muestra los resultados de la sobrevivencia del cultivo de *Trichoderma longibrachiatum* en la arcilla a 45°C de temperatura y diferentes tiempos de secado. Se observa que el hongo mantiene la viabilidad durante los seis tiempos de secado, esto puede deberse a que la humedad del vehículo permanece elevada, lo que hace que continúe el crecimiento; sin embargo el número de unidades formadoras de colonias disminuye gradualmente en todos los tiempos evaluados. El mejor tiempo de secado que permita la conservación y estabilidad del producto es de 4 horas.

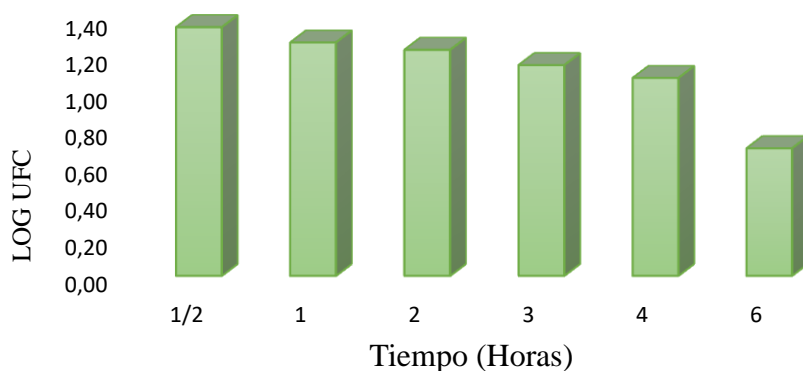


Grafico 1. Sobrevivencia del cultivo de *Trichoderma* en arcilla a 45°C de temperatura y a diferentes tiempos de secado.

En el producto seco se detienen los procesos bioquímicos y fisiológicos, de manera que el microorganismo permanece en un estado de latencia (Morales *et al.*, 2010, Burguet *et al.*, 2012). Según Machado *et al.*, (2010) en la conservación de microorganismos, la deshidratación o secado es considerado como uno de los procedimientos importantes en la reducción de la actividad del agua. La mayoría de los cultivos microbianos, principalmente bacterias, contienen una humedad elevada, lo que permite que continúe la acción de los microorganismos, el secado es necesario para evitar ese fenómeno (Stell y

Ross 2008). En estado seco, o de muy baja humedad, los microorganismos prácticamente no se desarrollan por la baja actividad del agua, asimismo, se inhiben la mayoría de las reacciones químicas y enzimáticas que provocan alteraciones en los productos (Zuluaga *et al.*, 2010). Además, con el secado, se favorece el transporte y la manipulación del producto, además de prolongar la vida útil durante el almacenamiento (Gato 2010).

2.2.2. SEGUIMIENTO DE LA SOBREVIVENCIA DEL HONGO *Trichoderma longibrachiatum*

Al evaluar la población a través del tiempo se observó un descenso en la viabilidad de la cepa fúngica *Trichoderma longibrachiatum* (grafico 2). La población fúngica se incrementó durante los primeros 7 días de almacenamiento. En estudios realizados por Matos y Zúñiga (2003) en soportes a base de suelo y de compost, atribuyen el incremento inicial de los microorganismos a la presencia de nutrientes que contienen este tipo de soportes. A los 15 días comenzó a disminuir la viabilidad, lo cual se siguió observando hasta el final del experimento.

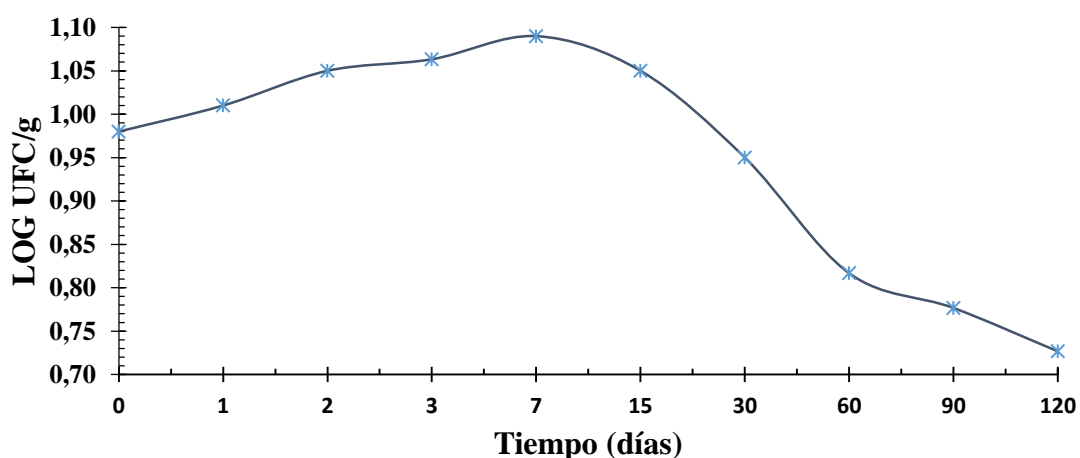


Grafico 2. Viabilidad de la cepa fúngica de *Trichoderma longibrachiatum*, en inoculante a base arcilla a temperatura ambiente.

3. CONCLUSIONES

A 45°C de temperatura, en un tiempo de 4 horas se obtuvieron los mejores resultados en el secado del biopreparado a base del hongo *Trichoderma longibrachiatum* con el uso de arcilla como portador.

En cuatro meses de conservación se mantuvo viable el hongo *Trichoderma longibrachiatum*.

4. BIBLIOGRAFÍA

Arianna, N. 2009. Turba y zeolita como soportes de inoculantes microbianos con acción fertilizante. La Habana, Cuba. ICIDCA. vol. XLIII (3). P 22-27.

Burguet N. L, Sierra Prado N., Brito Godoy L. 2012. Conservación de cepas microbianas por el método de liofilización para el control microbiológico en Laboratorios Liorad. Revista CENIC, Ciencias Biológicas, 43, (3), versión electrónica, ISSN: 2221-2450.

Belzarini, M, G., Casanoves, F., ADi Rienzo, J., Laura A González. & Robledo, C. W. 2001. Infostat Software estadístico Versión 1. Córdoba Argentina.

Castro, D. 2014. Evaluación preliminar de soportes para la producción de inoculantes de *Azotobacter* spp bajo condiciones de laboratorio e invernadero, Tumbaco, Pichincha. Tesis Ingeniero Agrónomo. Quito – EC. p 89.

Gato, Y. 2010. Métodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum* rifai. Fitosanidad [online], 14, (3): 189-195.

González, I. Rondón, A. 1998. Estudio de la turba como portador para la producción de inoculante a base de *Azospirillum*. Matanzas, Cuba. Pastos y Forrajes. Vol. 21 (2). P 1-3.

Machado A. V., Oliveira E.L, Santos E.S. y Oliveira J.A. 2010. Estudio del Secado de Anacardo (*Anacardium occidentale* L.) mediante Secador Solar de Radiación Directa. Información Tecnológica, 21, (1): 31-37.

Matos, G. C. & Zúñiga, D. D. 2003. Variabilidad de cepas de rizobios en inoculantes basados en soportes no estériles. Ecología Aplicada. Vol. 2(1). p 81-85.

Morales Y. Duque E, Rodríguez O. De la Torre J. Martínez R. Pérez R. Muñoz, J. 2010. Bacterias Preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. Rev. Biotecnología Aplicada. Vol.14 (2). p 11-29.

Pallo, Y. Velastegui. 2011. "Evaluación de soportes sólidos y líquidos, para la producción de un biofertilizante a base de *Azospirillum* spp. Aplicable al cultivo de maíz (*Zea mays*, L.)".

Rey, A. D. Chamorro, D. R. Barahona, R. 2014. Efecto del medio de soporte en la estabilidad biológica de dos cepas de *Frankia* aisladas de *Alnus acuminata* H. B. K. Matanzas. Pastos y Forrajes. Vol. 37(3). P 305-312.

Stanier, R. & Ingraham, J. 1996. Microbiología. Ed. Reverté S.A. p 195.

Stell KJ, Ross HE. 2008. Survival of freeze dried bacterial cultures. J. Appl. Microbiol., 26, (3): 370-375.

Zuluaga J. D., Rodríguez M. C., Sandoval E. R. 2010. Evaluación de las características físicas de mango deshidratado aplicando secado por aire caliente y deshidratación osmótica. Revista de la Facultad de Ingeniería, 25, (4), 127–135.