UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

ESCUELA DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

REPRODUCCION DEL HONGO *Trichoderma harzianum* (BIOFUNGICIDA) APROVECHANDO DESECHOS AGROINDUSTRIALES (RESIDUOS DE PAPA, TAMO DE FREJOL, BAGAZO DE CAÑA).

PROYECTO DE TESIS PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OPTAR POR EL TITULO DE INGENIERA AGROINDUSTRIAL

AUTOR: MARITZA ANGELES ENDARA BORJA

IBARRA – ECUADOR 2009



Hoy en día uno de los problemas que enfrentamos los seres humanos es la contaminación de los alimentos por la presencia de sustancias tóxicas, debido al uso indiscriminado de productos sello rojo para evitar la presencia de microorganismos que afectan el crecimiento de los cultivos, la industria agrícola utiliza fungicidas o pesticidas químicos.

La utilización de desechos agroindustriales como el tamo de fréjol, el bagazo de caña y residuos de papa, como sustrato para la reproducción de un hongo antagonista como es el *Trichoderma harzianum* en la elaboración de un biofungicida, es una alternativa viable para dar valor agregado a estos residuos de la industria, además de ser un valioso producto para mejorar la calidad de los alimentos que consumimos hoy en día, ya que puede ser utilizado en una gran diversidad de cultivos en la prevención de daños provocados por plagas fúngicas entre ellas las ocasionada por el hongo *Botritis*.

OBJETIVOS

□ General

Reproducir el hongo T*richoderma harzianum* (biofungicida) aprovechando desechos agroindustriales (residuos de papa, tamo de fréjol, bagazo de caño)

bagazo de caña).



Específicos

- -Determinar el mejor tipo de sustrato para la reproducción del hongo Trichoderma harzianum (residuos de papa, tamo de fréjol, bagazo de caña).
 - -Determinar la temperatura óptima para el desarrollo de este hongo (ambiente, 25°C, 30°C).
 - -Construir curvas de crecimiento del hongo T*richoderma harzianum* en los diferentes sustratos.
 - -Determinar el porcentaje de rendimiento del hongo T*richoderma harzianum* en cada sustratos.
 - Realizar una prueba de efectividad del hongo en el laboratorio.

HIPOTESIS

- El hongo T*richoderma harzianum* si se reproduce en residuos de papa.
- □ El hongo T*richoderma harzianum* si se reproduce en tamo de fréjol.
- □ El hongo T*richoderma harzianum* si se reproduce en bagazo de caña.



CARACTERÍSTICAS DEL ÁREA DE ESTUDIO

La parte experimental del presente proyecto de tesis se realizó en la propiedad ubicada en las calles Maldonado 10 – 22 y Pedro Moncayo en la ciudad de Ibarra, y la parte de laboratorio fue realizada en el Laboratorio de uso Múltiple de la Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales.

MATERIALES

LABORATORIO

REACTIVOS

MATERIA PRIMA

- Autoclave
- Material de vidrio

-Medio de cultivo para hongos

-Cepas de T*richoderma*

- Residuos de papa
- Tamo de fréjol
- Bagazo de caña
- Cascarilla de arroz



FACTORES EN ESTUDIO

□ Factor A

Tipo de sustrato

- **-A1** 12.5 % arrocillo 12.5% de cascarilla de arroz 75% de residuos de papa
- -A2 12.5 % arrocillo 12.5% de cascarilla de arroz 75% de tamo de fréjol
- -A3 12.5 % arrocillo 12.5% de cascarilla de arroz 75% de bagazo de caña

□ Factor B

Temperaturas

- **B1** temperatura ambiente 18 20° C
- **B2** temperatura controlada de 25 ° C

INTERACCIÓN A x B

Tratamientos	Nomenclatura
T1	A1B1
T2	A1B2
Т3	A1B3
T4	A2B1
T5	A2B2
Т6	A2B3
T7	A3B1
Т8	A3B2
Т9	A3B3

DISEÑO EXPERIMENTAL

En la presente investigación se utilizó el Diseño Completamente al Azar, con 9 tratamientos y 3 repeticiones

CARACTERÍSTICAS DEL EXPERIMENTO

Repeticiones	3
Tratamientos	9
Unidad experimental	27

Cada unidad experimental estará conformada por una muestra de 500g de sustrato inoculado con cepas de *Trichoderma harzianum* en un porcentaje del 5% con relación al peso del sustrato.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Análisis de varianza

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	26
Tratamientos	8
Factor A	2
Factor B	2
A x B	4
Error experimental	18

□ Coeficiente de variación (CV) %
Se realizó la prueba significativa estadística de: TUKEY al 5%

DMS

La prueba de significación estadística DMS se realizó para factores.

VARIABLES A EVALUARSE

■ Porcentaje de rendimiento del hongo Trichoderma harzianum.

El porcentaje de rendimiento del hongo *Trichoderma harzianum* se midió para determinar en que sustrato el hongo se desarrolló mejor, esto analizando la curva de crecimiento del hongo en cada uno de los sustratos y a las diferentes temperaturas.

Curva de crecimiento

La curva de crecimiento se realizó para ver el proceso de desarrollo del hongo, para lo cual se efectuó un lavado de cada sustrato con un litro de agua estéril, para luego de realizar las diluciones respectivas efectuar la siembra e incubar las cajas por 72 horas, al cabo de este tiempo se procedió al recuento de mohos, este procedimiento se repitió a los cinco, diez, quince y veinte días de inoculada la cepa.

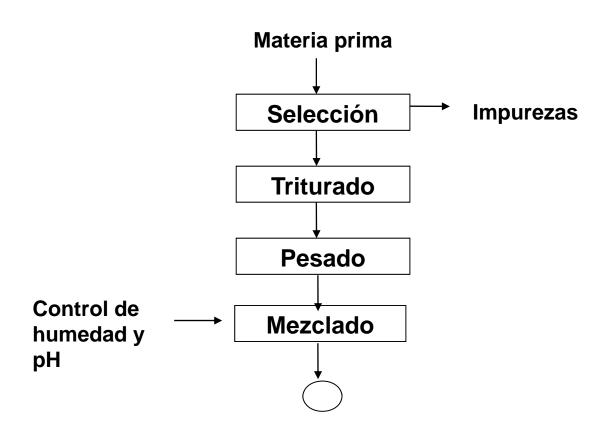
□ Recuento de Unidades Formadoras de Mohos por gramo (UFM/g)

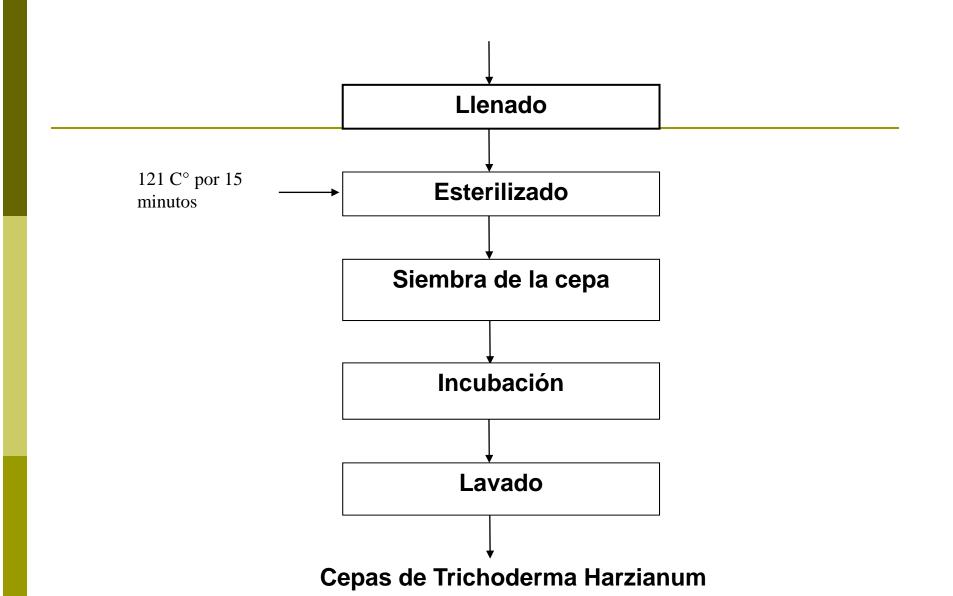
Recuento de Unidades Formadoras de de Mohos por gramo (UFM/g) se realizó con el fin de determinar cual es el mejor tratamiento, que debe tener 2.5 x 10 9 UFM/g basados en el parámetro que se utiliza en el Instituto de Investigación Cubano, para esto se efectuó siembras y recuento de mohos en cada tratamiento al día cero, cinco, diez, quince y veinte días.

□ Efectividad del hongo como fungicida.

Se efectuó una prueba en el laboratorio sembrando un hongo patógeno de la especie *Fusarium* junto con el hongo Trichoderma harzianum, para comprobar si realmente el Trichoderma harzianum es biofungicida y no permite el desarrollo del hongo patógeno.

MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO





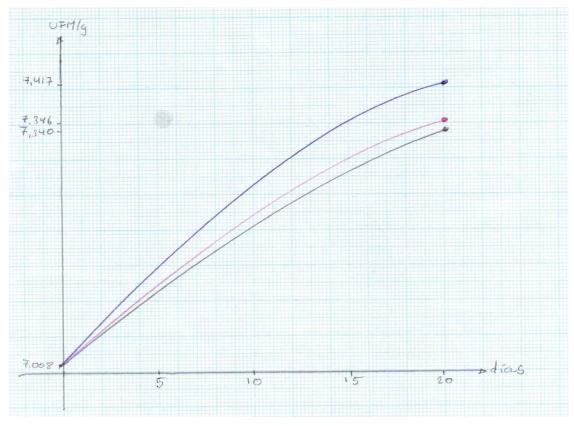


PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DEL HONGO

Tratamientos	I	II	II	MEDIA
A1B1	77,033	77,033	77,097	77,055
A1B2	78,421	77,869	76,539	77,610
A1B3	78,060	77,743	78,499	78,101
A2B1	76,516	77,575	77,480	77,190
A2B2	77,887	78,060	77,851	77,933
A2B3	78,060	78,178	78,261	78,166
A3B1	77,441	77,887	77,779	77,702
A3B2	78,026	78,145	78,228	78,133
A3B3	78,622	78,928	79,203	78,918

Cuadro #1 Porcentaje de crecimiento de hongo a los veinte días.

CURVA DE CRECIMIENTO



Escala

H: 1cm=1 día

V: 1cm = 0.05UFM/g

Residuos de papa Tamo de fréjol Bagazo de caña

Grafico #1 Curva de crecimiento en los tres sustratos a los 20 días

RECUENTO DE UNIDADES FORMADORAS DE MOHOS POR GRAMO (UFM/ G)

Tratamientos	I	II	III	∑ Tratamientos	Medias
A1B1	7,093	7,093	7,097	21,284	7,095
A1B2	7,265	7,104	7,097	21,466	7,155
A1B3	7,272	7,144	7,166	21,581	7,194
A2B1	7,043	7,027	7,037	21,107	7,036
A2B2	7,037	7,186	7,076	21,299	7,100
A2B3	7,091	7,126	7,131	21,347	7,116
A3B1	7,064	7,126	7,099	21,289	7,096
A3B2	7,082	7,202	7,104	21,388	7,129
A3B3	7,141	7,161	7,168	21,470	7,157
∑ Repeticiones	64,088	64,169	63,975	192,232	64,077

Cuadro # 2 Recuento total de UFM/g día 5

ADEVA

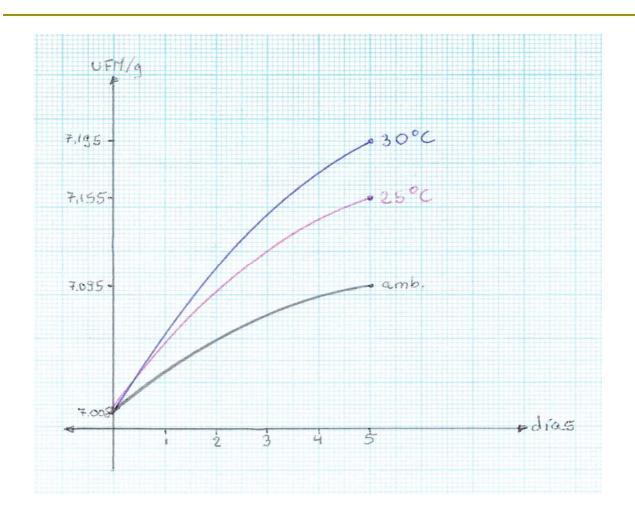
F DE V	GL	SC	CM	FC	0,05	0,01
TOTAL	26	0,102				
TRAT.	8	0,051	0,006	2,236 NS	2,59	3,89
F. A	2	0,019	0,010	3,422 NS	3,63	6,23
F. B	2	0,030	0,015	5,242 *	3,63	6,23
FAXB	4	0,002	0,000	0,141 NS	3,11	5,04
E. EXP.	18	0,051	0,003			

CV = 0.748%

Factores	Medias	Rangos
В3	21,466	a
B2	21,385	b
B1	21,227	c

Cuadro #4 Prueba DMS para factor B (temperatura)

Gráfico #2 Curva de crecimiento en Residuos de papa a los 5 días

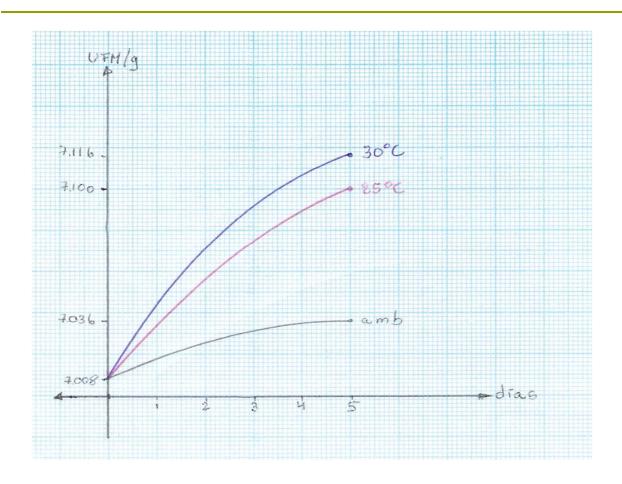


Escala

H: 1cm=1 día

V: 1cm = 0.03UFM/g

Gráfico #3 Curva de crecimiento en Tamo de fréjol a los 5 días

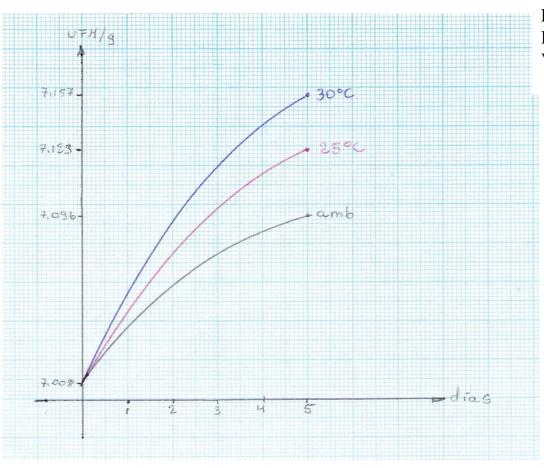


Escala

H: 1cm=1 día

V: 1cm= 0.02UFM/g

Gráfico #4 Curva de crecimiento en Bagazo de caña a los 5 días



Escala

H: 1cm=1 día

V: 1cm = 0.02UFM/g

Tratamientos	I	II	III	∑ Tratamientos	Medias
A1B1	7,158	7,149	7,168	21,475	7,158
A1B2	7,294	7,236	7,164	21,694	7,231
A1B3	7,287	7,166	7,285	21,738	7,246
A2B1	7,052	7,118	7,091	21,261	7,087
A2B2	7,141	7,261	7,134	21,536	7,179
A2B3	7,180	7,193	7,202	21,575	7,192
A3B1	7,128	7,184	7,180	21,492	7,164
A3B2	7,163	7,236	7,175	21,574	7,191
A3B3	7,236	7,259	7,270	21,765	7,255
∑ Repeticiones	64,639	64,801	64,668	194,108	64,703

Cuadro # 5 Recuento total de UFM/g día 10

ADEVA

F DE V	GL	SC	CM	FC	0,05	0,01
TOTAL	26	0,101				
TRAT.	8	0,064	0,008	3,971 **	2,59	3,89
F. A	2	0,019	0,009	4,595 *	3,63	6,23
F. B	2	0,042	0,021	10,295 **	3,63	6,23
FAXB	4	0,004	0,001	0,497 NS	3,11	5,04
E. EXP.	18	0,037	0,002			

Cuadro # 6 Análisis de varianza

CV= 0,627 %

Tratamientos	Medias	Rangos
A3B3	7,255	a
A1B3	7,246	a
A1B2	7,231	a
A2B3	7,192	b
A3B2	7,191	b
A2B2	7,179	b
A3B1	7,164	b
A1B1	7,158	b
A2B1	7,087	С

Cuadro #7 Prueba de TUKEY para tratamientos

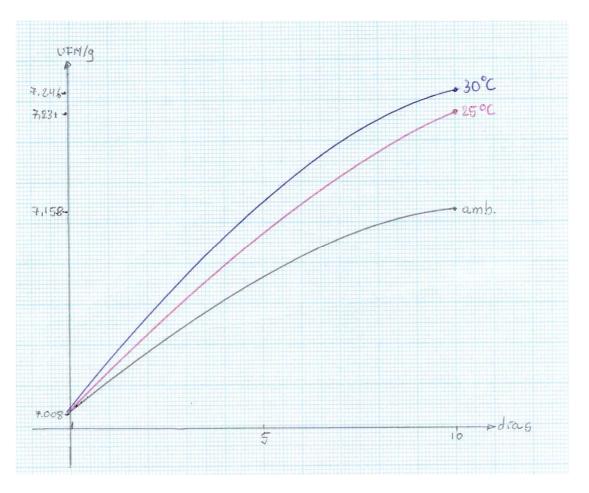
Factores	Medias	Rangos
A3	21,635	a
A1	21,610	a
A2	21,457	b

Cuadro # 8 Prueba DMS para factor A (tipo de sustrato)

Factores	Medias	Rangos
В3	21,692	a
B2	21,601	b
B1	21,409	c

Cuadro # 9 Prueba DMS para factor B (temperatura)

Gráfico #5 Curva de crecimiento en Residuos de papa a los 10 días

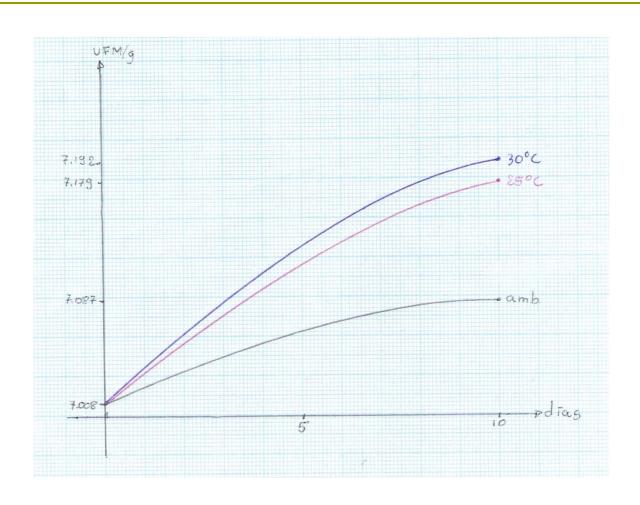


Escala

H: 1cm=1 día

V: 1cm = 0.03UFM/g

Gráfico #6 Curva de crecimiento en Tamo de fréjol a los 10 días

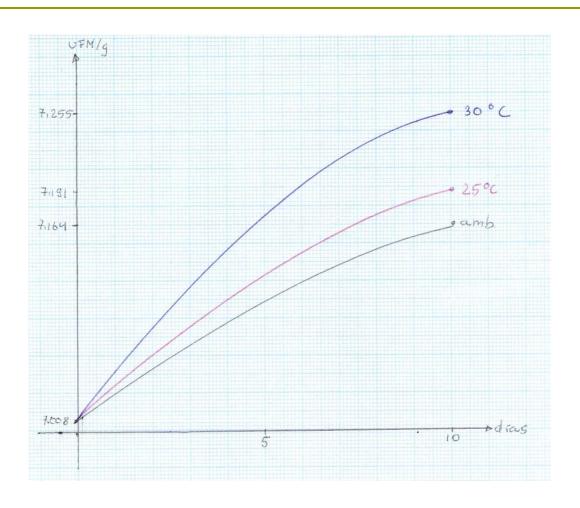


Escala

H: 1cm=1 día

V: 1cm = 0.03UFM/g

Gráfico #7 Curva de crecimiento en Bagazo de caña a los 10 días



Escala

H: 1cm=1 día

V: 1cm = 0.03UFM/g

Tratamientos	I	II	II	∑ Tratamientos	Medias
A1B1	7,189	7,200	7,206	21,595	7,198
A1B2	7,301	7,298	7,177	21,776	7,259
A1B3	7,315	7,202	7,330	21,846	7,282
A2B1	7,126	7,195	7,166	21,487	7,162
A2B2	7,215	7,296	7,204	21,715	7,238
A2B3	7,227	7,249	7,255	21,732	7,244
A3B1	7,166	7,259	7,223	21,648	7,216
A3B2	7,231	7,265	7,225	21,722	7,241
A3B3	7,347	7,347	7,364	22,058	7,353
∑ Repeticiones	65,117	65,311	65,151	195,579	65,193

Cuadro # 10 Recuento total de UFM/g día 15

ADEVA

F DE V	GL	SC	CM	FC	0,05	0,01
TOTAL	26	0,103				
TRAT.	8	0,069	0,009	4,680 **	2,59	3,89
F. A	2	0,014	0,007	3,691 *	3,63	6,23
F. B	2	0,046	0,023	12,367 **	3,63	6,23
FAXB	4	0,010	0,002	1,330 NS	3,11	5,04
E. EXP.	18	0,033	0,002			

Cuadro # 11 Análisis de varianza

CV=0,594%

Tratamientos	Medias	Rangos
A3B3	7,353	a
A1B3	7,282	a
A1B2	7,259	a
A2B3	7,244	b
A3B2	7,241	b
A2B2	7,238	b
A3B1	7,216	b
A1B1	7,198	b
A2B1	7,162	c

Cuadro #12 Prueba de TUKEY para tratamientos

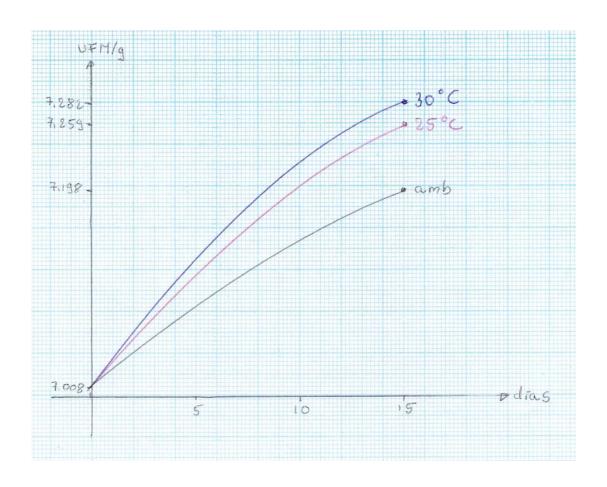
Factores	Medias	Rangos
A3	21,809	a
A1	21,739	b
A2	21,645	С

Cuadro # 13 Prueba DMS para factor A (tipo de sustrato)

Factores	Medias	Rangos
В3	21,879	a
B2	21,738	b
B1	21,576	С

Cuadro # 14 Prueba DMS para factor B (temperatura)

Gráfico #8 Curva de crecimiento en Residuos de papa a los 15 días

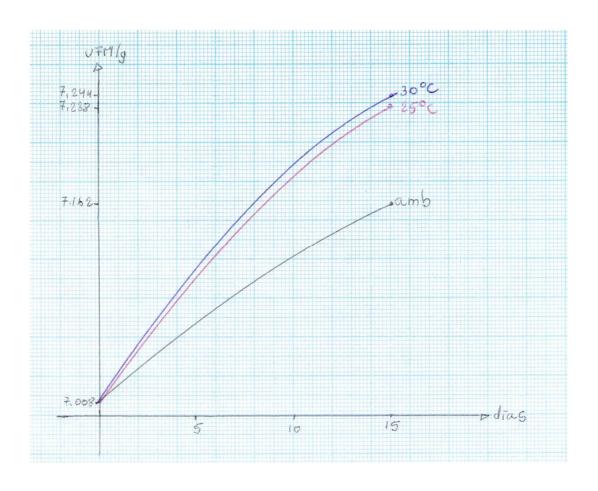


Escala

H: 1cm=2 día

V: 1cm= 0.04UFM/g

Gráfico #9 Curva de crecimiento en Tamo de fréjol a los 15 días

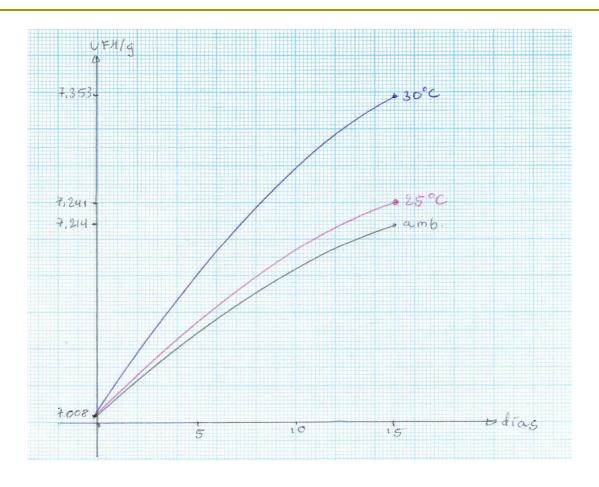


Escala

H: 1cm=2 día

V: 1cm = 0.03UFM/g

Gráfico #10 Curva de crecimiento en Bagazo de caña a los 15 días



Escala

H: 1cm=2 día

V: 1cm = 0.04UFM/g

Tratamientos	I	II	III	∑ Tratamientos	Media
A1B1	7,213	7,240	7,246	21,698	7,233
A1B2	7,370	7,318	7,193	21,881	7,294
A1B3	7,336	7,306	7,377	22,020	7,340
A2B1	7,191	7,290	7,281	21,763	7,254
A2B2	7,320	7,336	7,316	21,972	7,324
A2B3	7,336	7,347	7,355	22,038	7,346
A3B1	7,278	7,320	7,310	21,907	7,302
A3B2	7,333	7,344	7,352	22,029	7,343
A3B3	7,389	7,418	7,443	22,250	7,417
∑ Repeticiones	65,765	65,919	65,874	197,557	65,852

Cuadro # 15 Recuento total de UFM/g día 20

ADEVA

F DE V	GL	SC	CM	FC	0,05	0,01
TOTAL	26	0,100				
TRAT.	8	0,071	0,009	5,587 **	2,59	3,89
F.A	2	0,020	0,010	6,318 **	3,63	6,23
F.B	2	0,049	0,025	15,384 **	3,63	6,23
FAXB	4	0,002	0,001	0,322 NS	3,11	5,04
E. EXP.	18	0,029	0,002			

CV = 0,547%

Tratamientos	Medias	Rangos
A3B3	7,417	a
A2B3	7,346	a
A3B2	7,343	a
A1B3	7,340	a
A2B2	7,324	a
A3B1	7,302	b
A1B2	7,294	b
A2B1	7,254	b
A1B1	7,233	b

Cuadro #17 Prueba de TUKEY para tratamientos

Factores	Medias	Rangos
A3	22,062	a
A2	21,924	b
A1	21,866	b

Cuadro # 19 Prueba DMS para factor A (tipo de sustrato)

Factores	Medias	Rangos
В3	22,103	a
B2	21,961	b
B1	21,789	С

Cuadro # 20 Prueba DMS para factor B (temperatura)

Gráfico #11 Curva de crecimiento en Residuos de papa a los 20 días



Escala

H: 1cm=2 día

V: 1cm= 0.04UFM/g

Gráfico #12 Curva de crecimiento en Tamo de fréjol a los 20 días

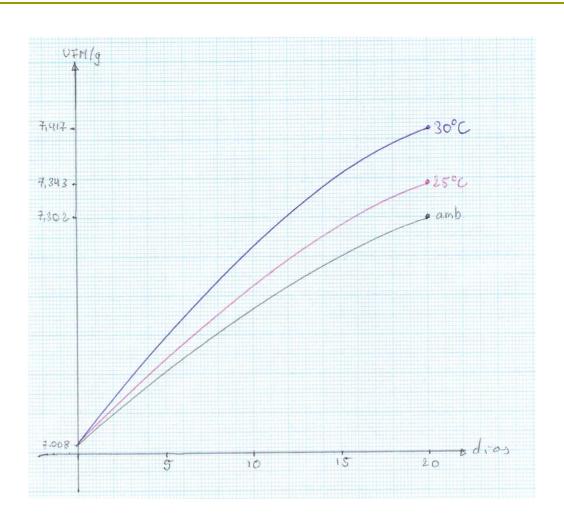


Escala

H: 1cm=2 día

V: 1cm = 0.04UFM/g

Gráfico #13 Curva de crecimiento en Bagazo de caña a los 20 días



Escala

H: 1cm=2 día

V: 1cm = 0.05UFM/g

EFECTIVIDAD DEL HONGO COMO FUNGICIDA

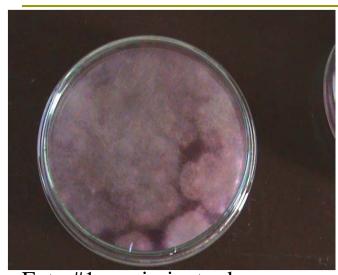


Foto #1 crecimiento de hongo patógeno Fusarium

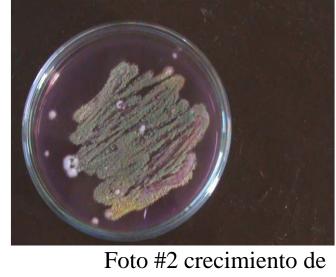


Foto #2 crecimiento de hongo Trichoderma harzianum



Foto #3 comprobación de efectividad de hongo T*richoderma harzianum*

DISCUSION

Los tratamientos que mejor responden al desarrollo del hongo *Trichoderma harzianum* son el A3B3 que corresponde a 12.5 % arrocillo, 12.5% de cascarilla de arroz, 75% de bagazo de caña a una temperatura de 30°C y el A1B3 que corresponde a 12.5 % arrocillo, 12.5% de cascarilla de arroz, 75% de residuos de papa a una temperatura de 30°C, esto debido a que contienen mayor cantidad de nutrientes necesarios para el desarrollo del hongo, con respecto al tamo de fréjol donde no existió un buen crecimiento del hongo esto debido a que es un desecho agroindustrial con un bajo porcentaje de nutrientes.

En la prueba de efectividad se pudo comprobar la capacidad fungicida del hongo al no permitir el desarrollo del hongo *Fusarium* comprobándose lo expuesto por ALVAREZ, H. donde hace referencia a lo siguiente: a nivel de laboratorio, el hongo Trichoderma es capaz de anular gran cantidad de hongos patógenos aéreos como Botrytis. De hecho, si se coloca en un cultivo de laboratorio Trichoderma antes que Botrytis, este último hongo no es capaz de desarrollarse



- Al analizar las pruebas de significación estadística de TUKEY se concluye que el hongo T*richoderma harzianum* se reproduce de mejor manera en residuos de papa y en bagazo de caña, ya que se observa que durante todo el proceso de incubación existen un excelente desarrollo por lo que se obtiene los mejores rendimientos.
- Al comparar las curvas de crecimiento del hongo T*richoderma harzianum* en los diferentes sustratos (residuos de papa, tamo de fréjol, bagazo de caña) a las diferentes temperaturas, se puede concluir que la temperatura óptima para el desarrollo de este hongo es a 30° C.
- □ En las curvas de crecimiento de cada una de los tratamientos se observa que el hongo en ninguna curva llega a la fase estacionaria, por lo que se concluye que el hongo sigue el proceso de desarrollo por más tiempo.
- El tratamiento que mas se aproxima al parámetro utilizado por el Instituto de Investigación Cubano que es de 2.5 x 10 9 UFM/g, es el tratamiento A3B3 que corresponde a 12.5 % arrocillo, 12.5% de cascarilla de arroz, 75% de bagazo de caña a una temperatura de 30°C, con un rendimiento de 2.61 x 10 7 UFM/g

- □ El mayor porcentaje de rendimiento del hongo T*richoderma harzianum* se obtiene en el tratamiento A3B3 que corresponde a 12.5 % arrocillo, 12.5% de cascarilla de arroz, 75% de bagazo de caña a una temperatura de 30°C con un porcentaje de rendimiento de 78.918%.
- Mediante la prueba de efectividad realizada en el laboratorio se pudo verificar las propiedades biofungicidas del *Trichoderma harzianum* al inhibir el desarrollo del hongo patógeno *Fusarium*.
- Durante el transcurso del desarrollo del *Trichoderma harzianum* se observo que no tiene un adecuado crecimiento en el tamo de fréjol debido a que se obtiene un bajo porcentaje de rendimiento.
- Cuando se realizó un movimiento de agitación en los frascos con sustrato se observo que el hongo obtuvo mejor desarrollo, logrando llegar al parámetro establecido y en algunos casos superarlo.



- Se recomienda continuar con el desarrollo del hongo *Trichoderma* harzianum por mas de veinte días hasta llegar a un valor constante de UFM/g ya que de esta manera se puede determinar la fase estacionaria de la curva de crecimiento y así verificar el máximo rendimiento en la reproducción del hongo.
- □ Investigar sobre un método de agitación adecuado del sustrato a nivel industrial.
- Realizar pruebas de efectividad en el campo para comprobar las ventajas de la aplicación de este hongo en diferentes cultivos.
- Para la reproducción de este hongo se recomienda utilizar bagazo de caña debido a que en este sustrato el hongo prolifera de mejor manera obteniéndose mayor cantidad de UFM, esto debido a que tiene una gran cantidad de nutrientes necesarios para la reproducción del hongo.
- Para futuras investigaciones de recomienda tener un mejor control de la humedad y la aireación ya que estos factores afectan directamente en el desarrollo del hongo.

