



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

**FACULTAD DE INGENIERIA EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES**

CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

**APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS VEGETALES DE
MERCADO EN LA PRODUCCIÓN DE *Trichoderma ssp.* PARA
USO COMERCIAL.**

**TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA
AGROINDUSTRIAL**

Autor: YÉPEZ PANTOJA TANIA SALOMÉ

Director: Ing. Jimmy Núñez Pérez MSc.

2019



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN
A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	040173245-8		
APELLIDOS Y NOMBRES:	Yépez Pantoja Tania Salomé		
DIRECCIÓN:	Jardín del Norte. San Gabriel		
EMAIL:	tsyepetzp@utn.edu.ec		
TELÉFONO FIJO:	292-296	CELULAR:	0993325103

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	Aprovechamiento de residuos vegetales de mercado en la producción de <i>Trichoderma ssp.</i> para uso comercial.
AUTOR:	Yépez Pantoja Tania Salomé
FECHA:	23-05-2019
PROGRAMA:	(X) PREGRADO () POSGRADO
TITULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniera Agroindustrial
ASESOR /DIRECTOR:	Ing. Jimmy Nuñez, MSc.

2. CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto, la obra es original y que es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 23 días del mes de mayo de 2019

EL AUTOR:

Tania Salomé Yépez Pantoja

DECLARACIÓN

Manifiesto que la presente obra es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autoridad, por lo tanto, es original y que soy el titular de los derechos patrimoniales; por lo que asumo la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldré en defensa de la Universidad Técnica del Norte en caso de reclamación por parte de terceros.

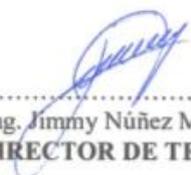
Ibarra, a los 23 días de mayo 2019.



Tania Salomé Yépez Pantoja
C.I.: 0401732458

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por la Srt. Tania Salomé Yépez Pantoja, bajo supervisión.



.....
Ing. Jimmy Núñez MSc.
DIRECTOR DE TESIS

DEDICATORIA

A Dios, quien siempre me mostró que todo es posible con fe y trabajo.

A mi madre, por ser la promotora de mis sueños y a toda mi familia, quienes creen en mí incondicionalmente; todo ello es una maravillosa bendición y a mi hermana que me da el mejor ejemplo a seguir.

A mis maestros que no sólo me formaron como profesional, sino como una persona crítica y responsable en cada paso que doy.

A mis amigas quienes me acompañaron durante la etapa universitaria, dejándome en el alma las mejores experiencias.

Asimismo, agradezco infinitamente a mis compañeros que me permitieron aprender de ellos, cuando al mismo tiempo aprendían de mí, así llegamos a comprender un poco más lo que es la solidaridad.

Salomé

AGRADECIMIENTO

En estas líneas quiero agradecer a todas las personas que hicieron posible esta investigación y que de alguna manera estuvieron conmigo en este espacio tiempo de mi vida universitaria.

A Dios, por bendecirme la vida, por ser la luz en mi camino, mi fortaleza en los días débiles y por permitirme tener una familia increíble.

A mi madre, Cecilia por todo su amor, comprensión y apoyo pero sobre todo gracias infinitas por la paciencia que me ha tenido, que gracias a ella soy una persona noble, por sus enseñanzas y más que eso su ejemplo.

Las palabras que busco no existen, pues mis agradecimientos hacia mi familia no tienen comparación, por su entrega en la labor de educarme con el ejemplo de amor, paciencia y sobre todo de trabajo.

A mis maestros de la Universidad Técnica del Norte, por proveerme de sus conocimientos que me permitirán desenvolverme en mi vida profesional. Al Ing. Jimmy Nuñez por guiarme y ser constante en este trabajo investigativo. De igual manera, a la Dra. Lucía Yépez, MSc. Valeria Olmedo y a la MSc. Carmen Alvear por regalarme un pedacito de su tiempo y paciencia cada día. De manera especial a la Ing. María Vizcaíno, cuya colaboración durante el desarrollo me ayudó inmensamente en el desarrollo de esta investigación.

A mis amigos, compañeros de camino y aprendizaje, aunque estén lejos, mi corazón nunca olvidará que somos amigos y que estamos unidos por miles de aventuras y desafíos que supimos vencer juntos. Gratifico a ustedes por siempre tener una palabra de aliento, por siempre tenderme una mano y por tener una sonrisa para mí cuando estaba triste.

Salomé

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL.....	ii
INDICE TABLAS.....	v
INDICE DE FIGURAS.....	vi
GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	vii
RESUMEN.....	viii
SUMMARY	ix
CAPITULO I.....	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1 PROBLEMA	1
1.2 JUSTIFICACIÓN	2
1.3 OBJETIVOS	3
1.4 HIPÓTESIS.....	3
1.4.1 Alternativa.....	3
1.4.2 Nula.....	3
CAPÍTULO II	4
MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 RESIDUOS VEGETALES EN EL ECUADOR.....	4
2.1.1 Residuos vegetales en la zona 1	5
2.2 TRICHODERMA SPP.....	12
2.2.1 Antecedentes	12
2.2.2 Clasificación taxonómica	16
2.2.3 Morfología.....	16
2.2.4 Reproducción	17
2.2.5 Requerimientos nutricionales y ambientales.....	17

2.2.6 Mecanismos de acción	19
2.2.7 Aplicación	21
2.3 FERMENTACIÓN	22
2.4 BIOMASA	24
2.4.1 Determinación de biomasa.....	24
2.4.2 Estabilización de la biomasa	25
2.4.3 Ventajas de la biomasa.....	27
2.5 ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA REGRESIÓN	28
2.5.1 Terminología	28
2.5.2 Calidad del ajuste en regresión lineal	29
CAPITULO III.....	30
MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1 ENFOQUE Y TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	30
3.2 LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO	30
3.3 MATERIALES Y EQUIPOS.....	30
3.3.1 Materia prima e insumos.....	30
3.3.2 Equipos y materiales de laboratorio.....	31
3.4 MÉTODOS	31
3.4.1 Caracterizar los residuos vegetales mediante un análisis físico-químico	31
3.4.2 Evaluar la influencia de la temperatura de incubación, tamaño de partícula de los residuos y cantidad de inóculo en el crecimiento del hongo.	33
3.4.3 Estabilizar la biomasa obtenida para su comercialización.....	35
3.5 MANEJO DEL EXPERIMENTO.....	36
3.5.1 Diagrama de bloques para producción del hongo <i>Trichoderma asperellum</i> . 36	
3.5.2 Diagrama ingenieril.....	37
3.5.3 Descripción del proceso	37

3.5.4 Diagrama de bloques. estabilización del hongo <i>Trichoderma asperellum</i> . .	39
3.5.5 Diagrama ingenieril.....	40
3.5.6 Descripción del proceso	40
CAPITULO IV	42
RESULTADOS Y DISCUSIONES	42
4.1 CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA	42
4.1.1 Análisis proximal	42
4.1.2 Análisis de macro y micro elementos	43
4.1.3 Caracterización física	44
4.2 EVALUAR LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE INCUBACIÓN, TAMAÑO DE PARTÍCULA DE LOS RESIDUOS Y CANTIDAD DE INÓCULO EN EL CRECIMIENTO DEL HONGO.	44
4.3 ESTABILIZACIÓN DE LA BIOMASA DE <i>Trichoderma spp.</i> OBTENIDA	52
4.3.1 Determinación de variable evaluada	52
CAPITULO V	55
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	55
5.1 CONCLUSIONES	55
5.2 RECOMENDACIONES	56
BIBLIOGRAFÍA.....	57
ANEXOS.....	65

INDICE TABLAS

Tabla 1. Biomasa media de un suelo biológicamente activo	11
Tabla 2. Resumen Histórico Taxonómico del <i>Trichoderma spp.</i>	13
Tabla 3. Control biológico hacia fitopatógenos por <i>Trichoderma spp.</i>	14
Tabla 4. Taxonomía de <i>Trichoderma spp.</i>	16
Tabla 5. Aplicación de bio preparada de <i>Trichoderma spp.</i>	21
Tabla 6. Productos a partir de FES.....	23
Tabla 7. Métodos de Determinación de Biomasa	24
Tabla 8. Ubicación y datos meteorológicos del área de experimentación	30
Tabla 9. Variables Cuantitativas del Análisis Físico Químico.....	32
Tabla 10. Métodos para determinación de macro y micro elementos.....	32
Tabla 11. Factores y niveles estadísticos	33
Tabla 12. Descripción de los tratamientos	33
Tabla 13. Análisis de Varianza	34
Tabla 14. Variables Experimentales.....	34
Tabla 15. Constituyentes del método	35
Tabla 16. Detalle de los tratamientos	35
Tabla 17. Variables del Método	35
Tabla 18. Análisis Proximal (2018), muestra residuos vegetales secos.....	42
Tabla 19. Macro y micro elementos (2018), muestra residuos vegetales secos...	43
Tabla 20. Descripción física de las partículas de los residuos	44
Tabla 21. Análisis de varianza de la biomasa producida	45
Tabla 22. Prueba Tukey para las interacciones de las variables en estudio	46
Tabla 23. ADEVA de la regresión	49

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa: Tipo de residuos sólidos recolectados al día (%)	4
Figura 2. Disposición final de los residuos sólidos.....	5
Figura 3. Plagas en rellenos sanitarios	7
Figura 4. Dinámica del proceso de degradación en compostaje	9
Figura 5. Cúpula de lombriz, Reproducción y Alimentación	10
Figura 6. Composición del biol.....	10
Figura 7. FES a escala laboratorio de microorganismos agricultores.....	12
Figura 8. Características: a) macroscópicas b) microscópicas.....	17
Figura 9. Estructura de la cámara de Neubauer	25
Figura 10. Ajuste de datos.....	29
Figura 11. Diagrama operacional.....	36
Figura 12. Diagrama Ingenieril.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 13. Diagrama de bloques para estabilización del hongo <i>Trichoderma asperellum</i>	39
Figura 14. Diagrama Ingenieril.....	40
Figura 15. Tratamientos experimentales.....	46
Figura 16. Resultados de tratamientos con inóculo 5ml	47
Figura 17. Resultados de tratamiento con inóculo 10ml.....	47
Figura 18. Comparativo de tratamientos.....	48
Figura 19. Efectos principales para biomasa	49
Figura 20. Diagrama de Pareto	49
Figura 21. Biomasa real vs Biomasa estimada	50
Figura 22. Predicción de biomasa (esporas/g) a partir de la temperatura de incubación	51
Figura 23. Predicción de biomasa (esporas/g) a partir de partícula de sustrato... ..	51
Figura 24. Predicción de biomasa (esporas/g) a partir del nivel de inóculo	51
Figura 25. Viabilidad del hongo <i>Trichoderma spp.</i> a dos temperaturas.....	52
Figura 26. Estabilidad resultante en el tratamiento uno (temperatura ambiente) 53	
Figura 27. Estabilización resultante en el tratamiento dos.....	54

GLOSARIO DE TÉRMINOS

AGUA TIPO I: Agua destilada estéril, usada para procedimientos que requieren de precisión; tales como espectrometría atómica, fotometría, enzimología, soluciones, conservas y reconstitución de materiales usados como estándares.

AVR: Análisis de Varianza de la Regresión

Aw: actividad de agua

EE: Extracto Etéreo

ELN: Extracto Libre de Nitrógeno

DBO: Demanda Biológica de Oxígeno

DQO: Demanda Química de Oxígeno

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

FES: Fermentación en estado Sólido

INEC: Instituto Nacional de Estadísticas y Censos

INHAMI: Instituto Nacional de Meteorología Hidrología

INIAP: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias

I: Cantidad de inóculo, unidad mililitros (ml)

MO-LSAIA.: método referencia de la Universidad Florida 1980, adaptado por el departamento de nutrición y calidad vegetal del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias del Ecuador para metodología de análisis.

PNGIDS: Programa Nacional para la Gestión Integral de Desechos Sólidos

Spp: sp. y spp. son simbologías que le siguen al nombre genérico de la especie, en general estas abreviaciones se usan cuando los nombres específicos de las especies no son relevantes en el tema.

Tp: Tamaño de partícula, unidad milímetros (mm)

T: Temperatura de incubación, unidad grados centígrados (°C)

X̄±: Desviación Estándar

RESUMEN

Cada proceso agroindustrial, genera residuos a diario y por excesiva cantidad, desde el punto de vista económico, esto representa desperdicio de capital y desde el punto de vista ambiental representa contaminación total. En la actualidad se desarrollan técnicas de valorización con base a la biomasa para obtener energía, combustibles, biomateriales, biomoléculas, mediante tecnologías limpias y sistemas cerrados que permitan la disminución de pérdidas. La calidad estructural de los residuos vegetales producto de la actividad comercial que ejerce un mercado permitió plantear como alternativa de aprovechamiento el uso de microorganismos agricultores (hongo *Trichoderma asperellum*) con doble finalidad: convertir a los residuos en un sustrato óptimo para el microorganismo y posterior regenerar la microbiología natural del suelo. A partir de ello se determinó pre tratamientos y operaciones unitarias para este sustrato. Se empleó un diseño experimental 2^3 : tamaño de partículas (1 y 5 mm) y temperatura de incubación (23 y 33°C) y cantidad de inóculo (5 y 10 ml) y como variable respuesta la concentración total de esporas (UFC/g) en un periodo establecido de 10 días. Para la biomasa final de estableció un método de conservación con agua destilada estéril. Finalmente se llegó a determinar que las variables de estudio influyen en la producción de hongo. De los tratamientos estudiados destacaron T8 (temperatura 33°C, tamaño partícula 5 mm, cantidad de inóculo 10ml), T7 (temperatura 33°C, tamaño partícula 5 mm, cantidad de inóculo 5ml) y T4 (temperatura 23°C, tamaño partícula 5 mm, cantidad de inóculo 10ml) como mayores productores de biomasa siendo el tamaño de partícula (5 mm) la variable de mayor efecto en el bio proceso y la temperatura de estabilidad fue de 5°C con mayor viabilidad de 60 días. Esto reconoce a los residuos vegetales de mercados como sustratos de calidad para uso biotecnológico agroindustrial.

Palabras claves

Técnicas de valorización, residuos agroindustriales, *Trichoderma spp.*

SUMMARY

Each agroindustrial process generates waste daily and by excessive amount, from the economic point of view, this represents waste of capital and from the environmental point of view represents total contamination. At present, valorisation techniques based on biomass are developed to obtain energy, fuels, biomaterials, biomolecules, through clean technologies and closed systems that allow the reduction of losses. The structural quality of the vegetal residues product of the commercial activity that exerts a market allowed to consider as alternative of use the use of microorganisms agriculturists (fungus *Trichoderma asperellum*) with double purpose: to turn to the residues in an optimal substrate for the microorganism and later to regenerate the natural microbiology of the soil. From this, pre-treatments and unit operations for this substrate were determined. An experimental design 23 was used: particle size (1 and 5 mm) and incubation temperature (23 and 33 ° C) and inoculum quantity (5 and 10 ml) and the total spore concentration as a variable response (CFU / g.) in an established period of 10 days. For the final biomass, a conservation method with sterile distilled water was established. Finally it was determined that the study variables influence the production of fungus. Of the treatments studied, T8 (temperature 33 ° C, particle size 5 mm, inoculum quantity 10ml), T7 (temperature 33 ° C, particle size 5 mm, inoculum quantity 5ml) and T4 (temperature 23 ° C, particle size) stood out 5 mm, inoculum quantity 10ml) as the largest producers of biomass, the particle size (5 mm) being the variable with the greatest effect on the bioprocess and the stability temperature was 5 ° C with greater viability of 60 days. This recognizes plant waste from markets as quality substrates for agro-industrial biotechnological use.

Keywords

Valorization techniques, agroindustrial residues, *Trichoderma* spp.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 PROBLEMA

La cantidad excesiva de residuos urbanos se ha convertido en un problema serio en cada sector del país. De acuerdo con un informe publicado por el INEC (2014), el problema de la basura o los desechos sólidos está asumiendo proporciones nunca antes alcanzadas, sus tratamientos básicos como: compost y biol, generan a diario contaminación biológica y producción de gases de efecto invernadero, que afecta de manera directa el campo agroindustrial, afectando la producción agrícola y su desarrollo.

El 43% de los municipios del Ecuador dispone sus residuos sólidos en relleno sanitario; un 36%, en botaderos y el 21% en celda emergente, consecuencia del poco tratamiento de residuos vegetales en el área de almacén y las malas prácticas agrícolas como monocultivos, agroquímicos; son los causantes de la pérdida de la carga microbiológica natural del suelo y contaminación al ambiente.

El tratamiento hacia los residuos vegetales heterogéneos recolectados, enfrenta problemas técnicos de almacén, transporte y manejo con afectaciones al ambiente. El desorden y mezcla de toda clase de residuos orgánicos, hace que exista una excesiva cantidad de los mismos que, por el desconocimiento de alternativas de aprovechamiento, no se han llevado a cabo procesos válidos con ellos.

1.2 JUSTIFICACIÓN

Las investigaciones encaminadas al desarrollo de subproductos a partir de residuos vegetales, satisface en gran medida a los agricultores y las investigaciones en la rama de biotecnología industrial, ya que estos residuos son materia orgánica completa, cuyo aprovechamiento está limitado por técnicas básicas.

La generación de valor biológico hacia los residuos, es viable; constituyéndose los mismos como materia prima para el desarrollo de biomasa de *Trichoderma ssp.*, de esta manera la producción de un hongo agricultor en residuos vegetales heterogéneos, se presenta como alternativa biológica de recuperación e incremento de la población microbiana beneficiosa en el suelo.

En la presente investigación, se expone una alternativa para la producción del hongo antagónico *Trichoderma* especie *asperellum*, el cual ejecuta tres mecanismos de bio control: competencia por nutrientes o espacio, antibiosis y mico parasitismo; siendo este último su mecanismo principal de acción.

El manejo adecuado de microorganismos antagónicos, proporciona ventajas y beneficios para el control de enfermedades de los cultivos, lo cual es una opción innovadora para minimizar el consumo de agroquímicos, mientras se aprovecha la cantidad de residuos vegetales que se generan a diario en la actividad de un mercado.

Al realizar el bio proceso de producción de este hongo en residuos, se contribuye a formar una nueva cadena de valor, reconociendo a los residuos como un sustrato económico, pero de alto potencial en microbiología industrial y así aportar microbiología propia del suelo.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 General

- Aprovechar los residuos vegetales de mercado en la producción de *Trichoderma spp.* para uso comercial.

1.3.2 Específicos

- Caracterizar los residuos vegetales mediante un análisis físico químico
- Evaluar la influencia de la temperatura de incubación, tamaño de partícula de los residuos y cantidad de inóculo en el crecimiento del hongo.
- Estabilizar la biomasa obtenida para su comercialización.

1.4 HIPÓTESIS

1.4.1 Alternativa

- La temperatura de incubación, tamaño de partícula de los residuos y cantidad de inóculo influyen en el crecimiento del hongo *Trichoderma spp.*
- Se estabiliza la biomasa obtenida para su posterior comercialización

1.4.2 Nula

- La temperatura de incubación, tamaño de partícula de los residuos y cantidad de inóculo no influyen en el crecimiento del hongo *Trichoderma spp.*
- No se estabiliza la biomasa obtenida para su comercialización

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 RESIDUOS VEGETALES EN EL ECUADOR

En el Ecuador, 183 Municipios gestionan sus residuos sólidos a través de unidades o departamentos del GAD, mediante Empresas Públicas Mancomunadas, que son aquellas empresas donde intervienen dos o más municipalidades. La Asociación de Municipalidades del Ecuador (AME) en el 2014, presenta una investigación de producción per cápita, que determinó que cada ecuatoriano produce 0,58 kilogramos de basura diaria promedio; cantidad que llega a un kilo por persona en ciudades como Quito y Guayaquil.

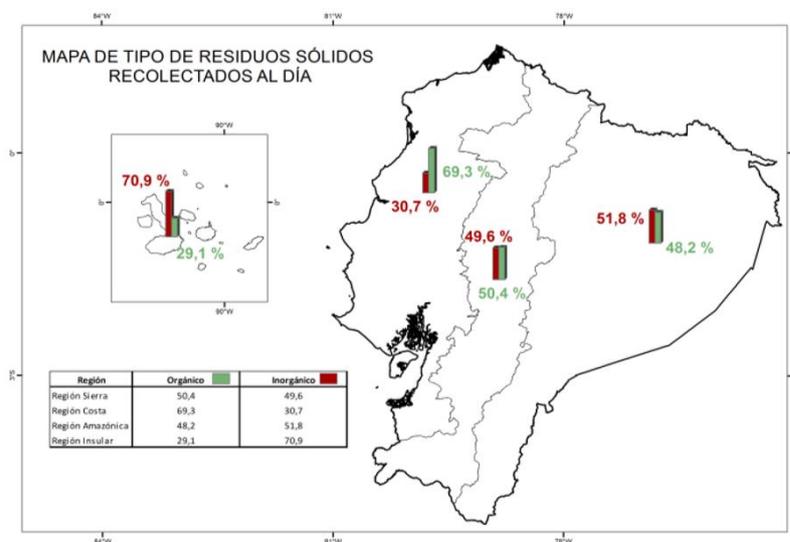


Figura 1. Mapa: Tipo de residuos sólidos recolectados al día (%)
Fuente: INEC (2014)

Un 37,1% de gobiernos municipales del Ecuador, (un total de 82) cuenta con procesos de separación en la fuente; es decir, diferencian los materiales orgánicos e inorgánicos (cartón, papel, plástico, vidrio, madera, metal, chatarra, caucho, textil, focos, pilas y desechos sanitarios no peligrosos, entre otros). En la región Insular, la totalidad de sus municipios implementaron dichos procesos (INEC, 2017).

El objetivo del actual gobierno ecuatoriano (2017 – 2021) es generar resultados positivos con la valorización de desechos vegetales de todas las ciudades; la creación de los PNGIDS ECUADOR, empezó como una fase de diagnóstico y ahora, ya presenta estrategias de acción, para promover cierres técnicos de rellenos

sanitarios, creación de celdas emergentes, reordenamiento de rellenos con áreas óptimas en el manejo adecuado de residuos y la elaboración de proyectos de gestión integral y valorización de residuos orgánicos (MAE, 2010).

Los residuos que presentan las grandes industrias alimenticias, son de carácter homogéneo; lo que abre la posibilidad de reciclaje, transformación y uso de los mismos, dentro de un contexto de desarrollo sostenible, para la propia empresa y sus alrededores (Basanta, 2007).

Según datos del INEC (2014) en el país: el 39% de los municipios disponen sus residuos sólidos en rellenos sanitarios, de acuerdo a la estructura existente:

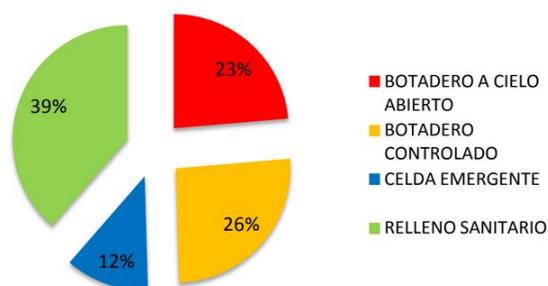


Figura 2. Disposición final de los residuos sólidos
Fuente: INEC (2014)

En el Ecuador, el promedio de subsidio de la prestación del servicio de residuos sólidos por parte de los GADS Municipales es del 50,24% con relación al costo del mismo INEC (2014).

2.1.1 Residuos vegetales en la zona 1

La zona 1, se conforma por cuatro provincias, dedicadas a actividades de agricultura y ganadería. Cada provincia destaca productos de cantidad y calidad, como: Esmeraldas: ganado de carne, frutas cítricas y dulces; Carchi: ganado de leche, cultivo de papas y arveja; Imbabura: legumbres secas y hortalizas y Sucumbíos con producción piscícola, formando así una zona fuerte en cuanto a producción de alimentos y con ella la responsabilidad de generar nutrición pública (SENPLADES, 2013).

La cantidad de residuos, producto de las PYMES de alimentos en el ámbito zonal, de acuerdo a Espinoza (2018) tienden a mínimos tratamientos de valorización. Las

empresas adoptan técnicas de comercialización o transformaciones básicas a sus residuos. En cuanto a los residuos de la agricultura, éstos son destinados a compost o directamente al relleno sanitario. Con la ganadería, se presenta un valor económico de sus residuos, ya que; partiendo de heces de los animales, pueden desarrollarse abonos con alto contenido de nitrógeno.

En cuanto al suero resultante de producción láctea, el valor económico es más bien un intercambio, ya que las industrias hacen la devolución del suero para alimentación animal y a cambio se da un descuento en el pago de los litros de leche entregados (Enriquez, 2015).

La provincia de Imbabura, en la ciudad de Ibarra en el año 1997 fue protagonista del colapso del relleno sanitario, donde se destacó el mal manejo de los residuos, provocando destrucción total del terreno en que se situaba, con la proliferación de enfermedades por agentes biológicos (mosquitos, ratas).

Carchi también tiene experiencias con el mal manejo de residuos, ya que la proliferación de enfermedades por agentes biológicos, es rápida. El relleno sanitario se ubicaba relativamente cerca de la ciudad de Tulcán, el mismo que proliferó enfermedades virulentas en 2001.

Actualmente se manejan los rellenos sanitarios a las afueras de las ciudades, con disposición de organización: orgánico, papel, cartón, plástico, vidrio; en lo posible valorar el 80% de la basura. (Oviedo, 2010).

2.1.2 Problemática en la degradación de residuos vegetales

La problemática derivada del extendido incontrolado de residuos vegetales que describe Grijalva, (2013) destaca las graves afecciones medio ambientales, como son la contaminación de suelos, acuíferos por lixiviados, aguas superficiales, emisión de gases de efecto invernadero, ocupación incontrolada del territorio; lo que genera la destrucción de los espacios naturales, creación de focos infecciosos, proliferación de plagas como roedores e insectos, producción de malos olores, entre otros.

2.1.2.1 Gases Invernadero

Los gases de efecto invernadero resultantes de los procesos biológicos en los rellenos sanitarios dónde no existen tratamientos adecuados; producen metano y otros gases pesados, representando el 10% del total de las emisiones perjudiciales al ambiente. Las emisiones generadas durante la aplicación de fertilizantes sintéticos representan el 13% de las emisiones nocivas de la agricultura hacia el ambiente (Cevallos, 2014).

2.1.2.2 Desgaste del suelo

La degradación del suelo por consecuencia de las instalaciones finales de residuos orgánicos e inorgánicos, es la infertilidad, debido al inadecuado manejo de la cantidad y calidad de residuos que abarcan. Debe transcurrir mucho tiempo (cientos de años) hasta recuperar las características propias de un suelo productivo. A pesar de que esta afirmación es de conocimiento general, pocos son los datos disponibles que cuantifican esta reducción (FAO, 2013).

2.1.2.3 Plagas

La manera en que se dispongan los residuos, es la determinante para el desarrollo de plagas, si se consideran de la mejor manera las condiciones del espacio a utilizar, los problemas biológicos serán controlados; de lo contrario las plagas serán parte total del espacio (Morales, 2010).

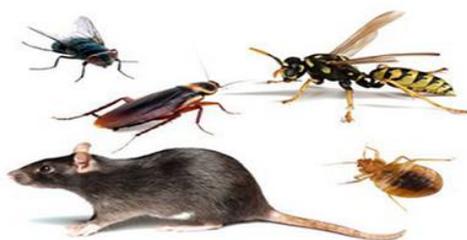


Figura 3. Plagas en rellenos sanitarios
Fuente: (Dias, 2018)

Ahora bien, el saneamiento ambiental en el relleno sanitario, es de difícil control, puesto que conlleva la variedad de residuos en áreas amplias. Un trabajo de fumigación cada semana, llega a determinarse como alternativa de higiene y control biológico, con área de cobertura de 50 m² recorriendo el predio del relleno. (Ponzo, 2010).

2.1.3 Tratamientos a residuos vegetales

Técnicas ya establecidas mundialmente para el tratamiento de residuos, como es el reciclaje tanto orgánico como inorgánico, no producen mucho resultado en el Ecuador, solo en un 34% de las ciudades se realizan programas de reciclaje, según la Asociación de Municipalidades del Ecuador (AME). La mayoría de estos son planes piloto, que se dan en ciertas comunidades y no en toda la población.

Las diversas técnicas de tratamiento a residuos orgánicos vegetales, representan múltiples beneficios al suelo y al ambiente y por ende a los agricultores directamente (Martinez, 2015) además con aplicación de técnicas adecuadas, se disminuye la problemática en que viven las poblaciones, fauna y flora aledañas al relleno sanitario y botaderos clandestinos que se llenan de residuos cada día (Martinez , Gonzales, & Torres, 2014).

Existen tratamientos adecuados para residuos vegetales, según reporta (Cruz, 2010) que varía de acuerdo a la cantidad y calidad de ellos, para la selección más apropiada a seguir. La valorización biológica y química, obtención de combustibles y valorización térmica; son las técnicas más destacadas.

En un 73% los residuos de las actividades comerciales de un mercado, poseen compuestos atractivos desde el punto de vista biotecnológico, ya que son fuente directa de materia orgánica y agua, la cual es base para reproducción de microorganismos (Cruz, 2010).

2.1.4 Características de los residuos vegetales

La caracterización, es el punto de partida para establecer soluciones directas; con éste procedimiento, se consigue determinar el porcentaje de elementos y compuestos presentes en la materia prima, la cual será el fundamento para la toma de decisiones sobre su aprovechamiento, tratamiento y disposición final (Rendón, 2010).

A nivel de laboratorio, se presentan técnicas básicas en cuanto a una caracterización Físico Química de una muestra, en donde contiene:

Forma: puede ser sólido, líquido, gas o plasma; se determina de manera simple, mediante técnicas visuales con el uso de microscopios. Un microscopio simple, llega a determinar el tamaño de partícula desde 0,5 y 10 mm con el lente de 0.10x.

Estructura: se identifica la distribución, contenido y propiedades de los elementos estructurales que forman a la muestra, mediante un análisis proximal.

Un residuo vegetal caracterizado completo, presenta propiedades singulares, como fuente de carbono directa, proteína, fibra y grasas, que son benéficas para el suelo; por otra parte, un residuo vegetal en estado seco contiene macro y micro elementos esenciales en el desarrollo del cultivo (Yepes, Montoyo, & Orozco, 2015). Posterior a la caracterización de los residuos vegetales, se selecciona la técnica de valorización de acuerdo a los resultados que presenten.

Contenido de cenizas: se establece mediante análisis de macro y micro elementos, si la muestra presenta cierto elemento de interés, se identifica mediante espectrofotometría y análisis químicos.

2.1.5 Técnicas de valorización biológica y química

Este tipo de tecnología permite desarrollar bio productos: gases, líquidos o sólidos, que puedan recuperar los recursos naturales en gran medida. Entre los procesos biológicos más comunes y más usados por las industrias, se encuentran el compostaje, lombricultura, biol y microbiología (Yepes et al., 2015).

2.1.5.1 Compostaje

Según Román (2013) el compost es el producto final obtenido mediante un proceso de descomposición biológica de la materia orgánica, en condiciones controladas de humedad y temperatura, que oscila entre 50 y 70°C. Este material puede ser usado como mejorador de suelos o como abono.



Figura 4. Dinámica del proceso de degradación en compostaje
Fuente: (Nélida, 2013)

2.1.5.2 Lombricultura

Es una técnica en la que además del abono, se puede obtener proteína animal usando para ello, la lombriz roja californiana que se alimenta de la materia orgánica y la convierte en humus o abono natural. El humus producido por la lombriz, está compuesto principalmente de carbono, oxígeno, nitrógeno e hidrógeno; encontrándose también una gran cantidad de microorganismos como hongos y bacterias.

Las cantidades de estos elementos, dependerán de las características químicas del sustrato que dieron origen a la alimentación de lombrices. Estas lombrices pueden criarse en cualquier lugar del planeta que posea temperaturas entre 20 y 25°C, un intervalo de temperatura en el cual esta técnica presenta su mayor rendimiento (Román, 2013).



Figura 5. Cúpula de lombriz, Reproducción y Alimentación
Fuente: (Garza, 2013).

2.1.5.3 Biol

El Biol es un abono orgánico líquido, que se origina a partir de la descomposición de materiales orgánicos como: estiércol de animales, plantas verdes, frutos, entre otros, en ausencia de oxígeno. Es una especie de vida, muy fértil, siendo rentable ecológica y económicamente. Contiene nutrientes que son asimilados fácilmente por las plantas, haciéndolas más vigorosas y resistentes (Jimenez, 2011).



Figura 6. Composición del biol
Fuente: (Dominguez, 2015)

El biol presenta una buena actividad biológica alta, desarrollo de fermentos nitrosos y nítricos, micro flora, hongos y levaduras, que serán un excelente complemento a suelos improductivos o desgastados (Chavez, Ortuño , & Mamani, 2012).

2.1.5.4 Uso de microorganismos

En un suelo biológicamente activo, están presentes grandes cantidades de microorganismos. En los suelos agrícolas que han sido sometidos a prácticas muy agresivas como el laboreo o el uso de productos químicos su presencia se reduce considerablemente y es allí donde la calidad vegetal se reduce.

Tabla 1. Biomasa media de un suelo biológicamente activo

Micro y macro fauna	Cantidad
Protozoarios	10 a 20 gr/m ²
Lombrices de tierra	100 a 200 gr/m ²
Otros organismos animales	50 a 100 gr/m ²
Bacterias	> 1000 gr/m ²
Actinomicetos	> 300 gr/m ²
Hongos	> 1000 gr/m ²

Fuente: (García & Fernandez, 2016)

Actualmente, el uso de microorganismos benéficos en la agricultura, juega un papel importante para la sostenibilidad de los ecosistemas (Sierra, 2008) tales microorganismos son las bacterias fijadoras de nitrógeno, promotoras de crecimiento, otros aportan metabolitos secundarios.

Para conseguir óptimo manejo de los microorganismos, no sólo deben tenerse en cuenta las condicionantes de crecimiento del microorganismo agricultor (rangos de pH, temperaturas, humedad y luz). El manejo debe tener en cuenta el sistema suelo - microbiología - planta, ya que las interacciones entre los tres es lo que determina la efectividad de estos productos y el comportamiento del cultivo (Rizo, 2014).

Los bio estimulantes a base de microorganismos, promueven y benefician la nutrición y el crecimiento de las plantas. Se trata de microorganismos del suelo, generalmente hongos saprófitos, levaduras, bacterias ácido lácticas; que no poseen manipulación genética y se encuentran presentes en ecosistemas naturales, siendo

fisiológicamente compatibles entre el suelo y la planta (Hernández, Velázquez & Hernández, 2007).

Sin microorganismos, el ciclo de la vida se interrumpiría y no podrían reciclarse los residuos orgánicos que llegan al suelo, ni integrarse en el ciclo de la vida los minerales que forman parte de las rocas.

Los microorganismos son capaces de ajustar las necesidades hídricas de la planta, asimismo, incrementan la fotosíntesis, inmovilizan los metales pesados y aumentan los rendimientos de los cultivos.

Por estos antecedentes la repoblación de microorganismos, es de estudio universal, siendo doble su intención: primero regenerar el suelo microbiológicamente y segundo utilizar sustratos económicos, pero completos (Torres, Martínez, Rodríguez, & Lobania, 2017).



Figura 7. FES a escala laboratorio de microorganismos agricultores
Fuente: (Torres, Martínez, Rodríguez, & Lobania, 2017)

2.2 TRICHODERMA SPP.

“Es un hongo saprofito, con alto potencial oportunista y adaptabilidad a diversas condiciones ecologistas” (Mayo, 2017).

2.2.1 Antecedentes

Un resumen histórico taxonómico del género *Trichoderma spp.* presentado por Romero et al., (2009) permite identificar todo el campo de acción de este hongo agricultor, que puede ser encontrado de modo natural en muchos suelos, así como en otros medios naturales, como cortezas de árboles y otras superficies orgánicas.

El género *Trichoderma*, fue descrito por primera vez por Persoon en 1801 hace casi 200 años. La habilidad anti fúngica de *Trichoderma*, fue encontrada desde 1930 y desde entonces se ha hecho un esfuerzo extensivo en su uso para el control de enfermedades de las plantas (Martinez M. , 2016). La mayoría de las especies de *Trichoderma spp.*, se han descrito de Norteamérica y de Europa (Romero et al., 2009).

Tabla 2. Resumen Histórico Taxonómico del *Trichoderma spp.*

Autor	Fecha	Comentario
Fries	1829	Reduce la sinonimia de ambas especies a <i>T. viride</i> (Pers.: S.F. Gray).
Harz	1871	Realiza la primera delimitación del género con base en observaciones microscópicas de las fiálides
Saccardo	1885	Crea el género <i>Pachybasium spp.</i> , para incluir a 13 especies de <i>Trichoderma spp.</i> , excluyendo a <i>T. viride</i> (Pers.: S.F. Gray).
Brefeld	1891	Menciona que <i>Hypocrea rufa</i> es sinónimo de <i>T. viride</i> (Pers.: S.F. Gray).
Oudemans y Koning	1902	Primera descripción de <i>Trichoderma spp.</i> , en el suelo. Qudemans identifica a <i>T. koningii</i> (Qudem).
Cook y Taubenhau	1911	Reconocen diferencias entre <i>T. koningii</i> (Qudem.) y <i>T. viride</i> (Pers.: S.F. Gray).
Oale	1912	Describe a <i>T. koningii</i> (Qudem.), <i>T. lignorum</i> (Harz), y <i>T. álbum</i> (Alb.).
Abbott	1926	Describe 4 especies, incluyendo a <i>Trichoderma lignorum</i> (Lig.), <i>T. koningii</i> (Qudem) y <i>T. glaucum</i> (Abbott).
Rifai	1969	Hace una revisión del género <i>Trichoderma spp.</i> , ofrece una clave de identificación de 9 especies describiéndolas ampliamente. Actualmente es la clave más aceptada.
Bissett	1984 1992	Realiza una amplia descripción de <i>T. atroviride</i> (Bissett), sugiriendo que la descripción original realizada por Karsten (1892) debe ser modificada y ampliada de acuerdo a las nuevas técnicas disponibles (la microscopia electrónica y la genética molecular).
Doyle, Seaby, Chen, Castle y Hermosa	1991 2000	Diferenciaron cuatro formas biológicas de <i>T. harzianum</i> (Rifai), <i>Th1</i> , <i>Th2</i> , <i>Th3</i> y <i>Th4</i>
(a partir del 2002 experimentos aplicativos, en diversos países, en especial Cuba)	2002	Evaluación de aislados nativos de <i>Trichoderma sp</i> para el control de hongos patógenos a escala laboratorio, experimentos y aplicación.

Fuente: (Romero et al., 2009)

De acuerdo con estudios científicos recientes, se considera que existen más de 30 especies de este hongo, todas las cuales son beneficiosas en agricultura y botánica, se presenta como un eliminador de amplio rango de patógenos, causantes de daños estructurales en las plantas, por ende; la reducción en la calidad de producción de frutos. (Romero, 2015).

La aplicación de *Trichoderma spp.* en los primeros estados de la planta para los cultivos hortícolas especialmente, muestra un aumento general del sistema radicular y de la parte aérea proporcionándole un mayor vigor y protección a las mismas a la hora del trasplante. (Prada Ospina, 2012).

Se definen especies de *Trichoderma spp.* que son antagonistas frente a diversos patógenos:

Tabla 3. Control biológico hacia fitopatógenos por *Trichoderma spp.*

Especie	Antagonista a	Cutivo y Autor que lo reporta
<i>T. atroviride</i>	<i>Rhizotonia solani</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Sclerotinia sclerotium</i> <i>Armillaria mellea</i>	Papa (Lahlali y Hijri, 2010) Fresa (Fraize et, 2003) Alfalfa (Savazzini et, 2008) Uva (Savazzini et, 2008)
<i>T. asperellum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Pseudomonas syringae</i> <i>Pythium spp.</i>	Tomate (Segarra et, al 2010) Pepino (Trillas et, 2006) Tomate (Aerts et, 2005)
<i>T. hamatum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Sclerotinia sclerotium</i>	Rábano (Heremans et, 2005) Begonia (Horst et, 2005) Pepino (Elad, 2000)
<i>T. harzianum</i>	<i>Rhizotonia solani</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Pythium spp.</i>	Tomate (Segarra et, al 2010) Melón (López, 2010) Maíz (Harman et, 2004)

Fuente: López (2011)

Una de las características más relevantes de este hongo, es su versatilidad y su capacidad de adaptarse a una diversas variedades de sustratos y crecer en condiciones medioambientales adversas. Por ello se han desarrollado a través del tiempo investigaciones experimentales aplicativas con este hongo y su conducta frente a residuos y condiciones controladas.

Brasil es el segundo país abastecedor mundial de azúcar, con una producción próxima de cosecha de 647 millones de toneladas en cultivos, que se extienden por unos 10 millones de hectáreas; lo que conlleva a procesos definidos y

aprovechamiento de los subproductos que se generan. Se ha experimentado como sustrato para producción de hongos antagónicos y su posterior uso en el suelo al bagazo de caña, establecido con 86 % v/v, enriquecido con cabecilla de arroz a 14 % v/v. Se empleó un tamaño de partícula (3 +0,85) mm de bagazo previamente esterilizado durante 40 min a 1 atm y 121 °C. Se ajustó la humedad del medio al 30 %. El proceso de fermentación sólida del hongo fue de 8 días (Cruz Martínez, 2007).

En la fermentación sólida aplicada en la reproducción de *Trichoderma spp.*, se evidenció un crecimiento abundante, así como una rápida colonización del sustrato en seis días, relacionado con una coloración verde oscura con una concentración de 52×10^{15} conidios/g y con parámetros de porcentaje de germinación y de pureza aceptados por las normas de calidad. Se manejó temperatura de 25°C y una exposición a luz favorable para la conidiogénesis, con 96% de germinación y 92% de pureza; además presentó un aroma dulce característico, similar a coco. El proceso productivo se asocia a factores como el tamaño de partícula y Aw del material, que resultan adecuados cuando se emplea arroz solo o suplementado con factores de crecimiento como vitaminas y así con resultados finales superiores a 10^{10} conidios/g (Arévalo et al., 2017).

La producción del *Trichoderma spp.* en un experimento realizado en Ambato - Ecuador en el 2012 presentó resultados de tratamientos con cascarilla de arroz, siendo el mejor tratamiento a 25°C, a un pH de 4 y un porcentaje de humedad del 70 % su desarrollo fue favorable con micelio denso y presencia de esporulación a los ocho días de inoculación, con concentraciones desde los $1,20 \times 10^8$ conidios/g. Con la segunda y tercera repetición se determinó que el factor temperatura, ejerció un efecto positivo significativo sobre la esporulación del hongo *Trichoderma spp.*; ya que se presentó mayor esporulación a los 30°C (Ramirez, 2012).

2.2.2 Clasificación taxonómica

Las especies del género *Trichoderma spp.* pertenecen a un grupo de hongos filamentosos que han sido caracterizados por sus aplicaciones en el sector agrícola, como controladores biológicos de una amplia gama de organismos patógenos.

Tabla 4. Taxonomía de *Trichoderma spp.*

Taxonomía de <i>Trichoderma spp.</i>	
Reino	Fungi
División	Eumycota
Subdivisión	Deuteromycotina
Clase	Hyphomycetes
Orden	Hyphales
Familia	Moniliaceae
Género	<i>Trichoderma spp.</i>
Especie	<i>Trichoderma asperellum.</i>

Fuente: (Argumedo, Alarcón, Ferrera, & Peña, 2009)

2.2.3 Morfología

2.2.3.1 Características macroscópicas

Crece formando colonias que simulan una película sobre el medio, así se reconocen fácilmente por sus coloraciones: blancas, verdes. Las áreas con colonias, se presentan con anillos concéntricos (Poalacin, 2015). En la figura 8a se observan las características macroscópicas que presenta *Trichoderma spp.*

2.2.3.2 Características microscópicas

Conidióforos: Son erectos, hialinos, no verticilados; en su mayoría ramificados, parecen un árbol pequeño con un sistema de ramas irregulares de manera piramidal y pueden estar solitarios o en grupos.

Fiálides: Son en forma de botella, pueden estar solas o en grupos, hinchada en la región central pero delgada hacia el ápice, son hialinas y en ángulo recto con respecto a los conidióforos; es donde se forman las esporas asexuales o conidios, de gran importancia para la identificación taxonómica a nivel de especies.

Conidios: Son esporas asexuales de color verde, amarillo, blanco, con esporulación densa que aseguran la generación del hongo durante gran parte del período vegetativo de las plantas. Su pared está compuesta por quitina y glucanos.

Las características microscópicas se identifican en la figura 8b.

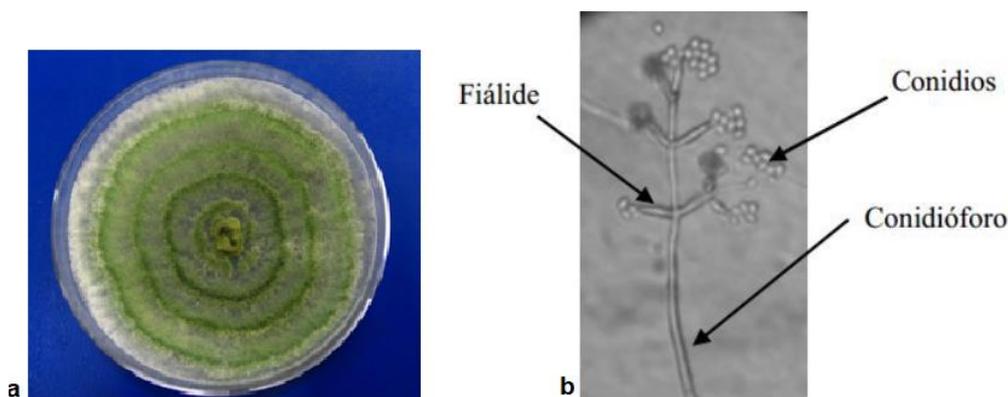


Figura 8. Características: a) macroscópicas b) microscópicas
Fuente: (Arias & Piñeros, 2008).

2.2.4 Reproducción

De acuerdo a Poalacin (2015) las especies *Trichoderma spp.* se reproducen asexualmente y pueden utilizar una gran variedad de sustratos complejos como: celulosa, quitina, pectina y almidón que son fuente de carbono para su reproducción.

Muchas cepas crecen eficientemente en medios sólidos y líquidos a un amplio rango de temperaturas, son relativamente tolerantes a humedades bajas y crecen en suelos ligeramente ácidos.

2.2.5 Requerimientos nutricionales y ambientales

Su desarrollo en condiciones ambientales se fortalece con un ambiente ligeramente ácido y tiempos cortos de exposición a la luz. Adicionalmente sus requerimientos nutricionales no son exigentes, por ello se conoce a *Trichoderma spp* como un hongo cosmopolita de importancia agroindustrial.

2.2.5.1 Relación C:N

La relación C:N presentó diferentes resultados en los sitios experimentales, aunque siempre estuvo dentro del óptimo reportado (10:1) (Sergio, Ortiz, & Gutierrez, 2008). Cuando la concentración de carbono es inferior a 50g/l, la producción de conidios se eleva; por el contrario, cuando la concentración de carbono supera este valor, la esporulación tiende a disminuir.

2.2.5.2 Sustrato

Los sustratos empleados para la producción de microorganismos, en lo posible deben contener todos los elementos necesarios para una adecuada síntesis del material, generalmente se utilizan compuestos procedentes de la agricultura, subproductos de la agroindustria, aunque los residuos de compuestos orgánicos, son la ventaja competitiva, debido a que suplen la demanda de nutrientes requeridos por los microorganismos a un bajo costo (Poalacin, 2015).

En cuanto al medio de cultivo sobre el cual se desarrollarán los microorganismos, este debe tener todos los nutrientes necesarios de forma balanceada y con concentraciones adecuadas para favorecer el crecimiento del microorganismo. Al igual que en cualquier otro medio de cultivo, las relaciones entre algunos de sus elementos son de particular importancia; por ejemplo, carbono-nitrógeno y fósforo-oxígeno (Chavez, Rodriguez, Rodriguez, & Aguilar, 2009).

El tamaño de partícula resulta fundamental para el desarrollo del hongo en fermentación sólida, ya que está estrechamente relacionado con la accesibilidad del hongo al sustrato; mientras más accesible sea el área del sustrato, más fácil será para el hongo degradar el medio. Ahora bien el tamaño de la partícula de mejor resultado, depende del microorganismo adoptado (Centeno & Pavone, 2015).

2.2.5.3 Macro y micro elementos

Por otra parte, los microelementos (Ca, Mn, Na, K, P, Cu, Fe, Mg, Zn) no son indispensables para el desarrollo de *Trichoderma spp* (Vásquez, 2010), pero sin la funcionalidad del hongo es incompleta.

2.2.5.4 Temperatura

La temperatura es un factor importante en el crecimiento de estos y también para que se lleven a cabo toda una serie de diversas y múltiples reacciones químicas, de manera que así puedan llevar a cabo todas sus actividades celulares. Este factor puede ser considerado como una variable crítica, debido a la alta concentración de sustrato por unidad de volumen y a la baja conductividad térmica del sistema heterogéneo sólido-líquido-gas (Chavez et al., 2009).

El rango de temperatura para el crecimiento de *Trichoderma* oscila entre 15 y 35 °C, con un óptimo de 25°C, temperaturas mayores a 35°C limitan el crecimiento y desarrollo del hongo e inicia la formación de clamidosporas (Castro & Rivillas, 2012)

2.2.5.5 Humedad

Las condiciones adecuadas de humedad están en el 70-80% de parámetros óptimos, sin embargo; tiene su capacidad de crecimiento en un rango entre 20% y 90% (Vásquez, 2010).

2.2.5.6 pH

Trichoderma tiene un rango de pH relativamente amplio para su crecimiento, presenta valores de pH comprendidos entre 2.0 y 9.0, con un pH óptimo que se encuentra entre 4.0 y 7.0. A pH ligeramente ácido, lo que permite la asimilación de nutrientes como glucosa, que actúa directamente sobre el crecimiento del hongo y su posterior esporulación. Si el sustrato presenta condiciones inestables de pH, el hongo es capaz de acidificar el medio, mediante la liberación de ácidos orgánicos, los que sirven para protección de la planta. (Castro & Rivillas, 2012).

2.2.5.7 Luz

Son fotosensibles, puesto que presentan una mayor esporulación al ser expuestas a la luz. Sin embargo, cuando se someten a períodos alternados de luz y oscuridad, se favorece la colonización del hongo sobre diferentes sustratos sólidos; la exposición de los cultivos en agar durante 20 a 30 segundos a la luz, es suficiente para inducir la esporulación (Cruz Martínez, 2007).

2.2.6 Mecanismos de acción

Su funcionalidad como mecanismo de acción, se basa en los metabolitos secundarios que produce *Trichoderma ssp.* y amplia gama de enzimas, lo que le permite habitar en casi todos los suelos agrícolas y en otros ambientes, demostrando gran plasticidad ecológica. Entre las enzimas secretadas por el *Trichoderma*, se considera fundamental la b-1,3 glucanasa, estrechamente relacionada con la degradación de la pared celular de patógenos (B Martínez, Infante, & Reyes, 2013).

Las ventajas del control biológico dado por la acción del *Trichoderma* son múltiples: mejora la germinación de las semillas, actúa como protector contra los hongos que atacan las raíces de estas plantas, estimula la resistencia de la planta, incrementa su crecimiento y la consecuente producción y respeta el ambiente con microorganismos benéficos (Growland, 2014)

De acuerdo con (Cruz, 2010) el *Trichoderma spp.* se caracteriza por su capacidad antagónica que promueve al control biológico de todo cultivo, de manera especial en hortalizas por cercanía al suelo. Este autor también refiere la existencia de cuatro componentes en el concepto de control biológico, los factores que son: microorganismo antagónico, organismos patógenos, condiciones ambientales favorables para el inicio de la infección y el cuarto componente se constituye de la enfermedad.

2.2.6.1 Antibiosis

Sin establecer contacto físico alguno *Trichoderma sp.* puede inhibir el crecimiento de otros hongos, mediante la producción de varios metabolitos secundarios volátiles y no volátiles como gliotoxina, auxina y gliovirina.

2.2.6.2 Micoparasitismo

Es un proceso complejo en la interacción antagonista patógeno, que ocurre en cuatro etapas, descritas por Martínez et al., (2013):

- Crecimiento quimiotrófico: donde *Trichoderma spp.* puede detectar a distancia a sus posibles hospedantes.
- Reconocimiento: Se considera que existe una alta especificidad del antagonista por su sustrato.
- Adhesión y enrollamiento: Ocurre por la asociación de un azúcar de la pared del antagonista con una lectina presente en la pared del patógeno.
- Actividad lítica: Producción de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, que degradan las paredes celulares del patógeno y posibilitan la penetración de las hifas de *Trichoderma spp* (Benedicto Martínez, Infante, & Peteira, 2015).

2.2.6.3 Competencia

La presencia de *Trichoderma spp* en suelos y ambientes naturales en todo el mundo es una evidencia, de que es un excelente competidor por espacio y nutrientes. La competencia es principalmente por carbono, nitrato y hierro. De forma general, entre las cualidades que favorecen al hongo antagonista se encuentran, la alta velocidad de crecimiento que posee y la secreción de metabolitos, que frenan o eliminan a los competidores en el microambiente (Benedicto Martínez et al., 2015).

2.2.7 Aplicación

Trichoderma spp producido a nivel de laboratorio, se considera un producto biológico y al caracterizarse así, se puede mezclar y combinar con otros abonos, fertilizantes, nematicidas y fungicidas orgánicos y aunque presente cierta resistencia a químicos no se recomienda su combinación (Akdi, 2016).

El efecto de este hongo en los primeros estados del cultivo es muy positivo ya que a la hora del trasplante la planta se protege ante los estados de estrés posibles. La aplicación de *Trichoderma spp.* en los cultivos hortícolas muestra un aumento general del sistema radicular y de la parte aérea proporcionándole un mayor vigor y protección a las mismas.

En la tabla 5, se presentan dos cultivos de aplicación certera descritos por Akdi (2016) en cuanto a *Trichoderma spp.* en cultivos masivos extendidos: hortalizas y flores, siendo cultivos que forman parte de exportaciones, por ello se rigen a normas fitosanitarias más rígidas, en cuanto a cultivos orgánicos.

Tabla 5. Aplicación de bio preparada de *Trichoderma spp.*

Cultivo	Ciclo	Aplicación	Dosis(%)
Hortalizas	Formación de follaje / Floración	2/15 días	$1 \times 10^6 / m^2$
Rosas	Germinación / Floración	4/15 días	$1 \times 10^6 / m^2$

Fuente: (TRICHODEX, 2016)

2.3 FERMENTACIÓN

La fermentación en medio sólido o también fermentación en estado sólido, se define como el crecimiento de microorganismos en medios sólidos o semisólidos en ausencia de agua libre. Las fermentaciones de estas características son aquellas en las cuales el sustrato no está disuelto ni en suspensión en un gran volumen de agua. La definición más general y reciente fue formulada por (Vásquez, 2010). donde se plantea que "es un proceso microbiológico que ocurre comúnmente en la superficie de materiales sólidos que tienen la propiedad de absorber y contener agua, con o sin nutrientes solubles".

Los hongos más importantes implicados en las fermentaciones industriales se clasifican principalmente en dos grupos: los *Zygomycotina*, como los géneros *Mucor* y *Rhizopus*, y los *Deuteromycotina* y hongos imperfectos, por ejemplo, los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*.

En cualquier proceso de fermentación que sea objeto de estudio, se debe evaluar una serie de variables para conocer, controlar y manipular el curso de la fermentación; estas variables se suelen dividir, entre las que se pueden medir continuamente (temperatura, velocidad de agitación, presión, formación de espuma, oxígeno disuelto y pH principalmente) y las que típicamente se miden a ciertos intervalos de tiempo (formación de biomasa de producto y consumo de sustrato básicamente) (Cruz Martínez, 2007).

En general, la producción masiva de microorganismos biocontroladores, puede llevarse a cabo mediante dos técnicas: fermentación líquida o sumergida y fermentación sólida o en superficie.

2.3.1 Fermentación en estado sólido

El objetivo del proceso de fermentación sólida, es lograr el máximo desarrollo del metabolismo de un microorganismo, para lo cual se debe adecuar óptimamente el medio en el cual se llevará a cabo la fermentación. La ingeniería de fermentación de estado sólido, se divide en cuatro partes: tecnología de flujo ascendente, intermedio, descendente y auxiliar (Vásquez, 2010).

La selección de un sustrato adecuado, es un factor clave en los procesos de fermentación sólida, donde generalmente se utilizan residuos agroindustriales, ya que suplen la demanda de nutrientes requerida por los microorganismos a un bajo costo (Arévalo et al., 2017).

Para optimizar el sustrato, es necesario variar uno o más factores fisicoquímicos que influyen en el crecimiento del microorganismo como: nutrientes, pH, temperatura, humedad, oxígeno disuelto, velocidad de agitación y aplicación de luz. Al final se evaluará en tiempos determinados el consumo del sustrato, formación de biomasa y producto (Vásquez, 2010).

Este proceso fermentativo, se caracteriza principalmente por requerir bajos niveles económicos y a la vez obtener alta formación de biomasa y producto, lo cual se da por su bajo requerimiento de aplicación de aireación, control de temperatura y otros factores. Además es significativo resaltar su importancia en el impacto ambiental, pues los niveles de contaminación son bajos por sus pocas cantidades de aguas residuales y por la semejanza de la matriz sólida con la textura del suelo y el compost (Arévalo et al., 2017).

2.3.2 Aplicación de fermentación sólida

En la actualidad, los productos de fermentación en estado sólido, incluyen principalmente alimentos tradicionales. El control del proceso de fermentación, requiere una descripción detallada de las características biológicas dinámicas de los microorganismos y el sustrato (Chen, 2013).

Tabla 6. Productos a partir de FES

FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO	
Características	Producción
Contenido de agua del sustrato es bajo	Células microbianas (proteína unicelular, espirulina, hongos comestibles)
Los microorganismos se adsorben o penetran en el sustrato sólido	Hongos saprófitos, filamentosos
Al final, el medio es húmedo y las concentraciones de productos son altas.	Alimentos tradicionales (vinagre, salsa de soja, especias aromáticas)
La mezcla es difícil, y el crecimiento de microorganismos está restringido por la difusión de nutrientes.	Enzimas microbianas, metabolitos microbianos
Bajo costo de materia prima	Residuos agroindustriales heterogéneos como sustratos

Fuente: (Chen, 2013).

2.4 BIOMASA

La biomasa es toda aquella materia orgánica producida por plantas, animales y microorganismos; como por ejemplo: cáscaras de frutos, excrementos de animales, desechos de agricultura, generación de enzimas y subproductos a partir de hongos y levaduras, entre otros (Obremo, 2012).

Sin embargo, cuando se habla de biomasa como fuente de producción de microorganismos, se refiere al proceso que emplea materia orgánica como sustrato para el desarrollo de microorganismos favorecedores de calidad del suelo y cultivos.

2.4.1 Determinación de biomasa

La concentración de la biomasa microbiana, es la respuesta de todo bioproceso. Existen diversos métodos directos e indirectos para estimar el rendimiento final de la biomasa. En la tabla 7 se muestra los métodos más utilizados.

Tabla 7. Métodos de Determinación de Biomasa

Métodos	
Directo	Indirecto
Gravimétrico	DQO
Espectrofotométrico	DBO
Microscópico de recuento celular en cámara	Componentes Celulares
Microscopia de epifluorescencia	Bioquímico
Siembra	Cinético

Fuente: Arnáiz, Isac, & Lebrato, (2000)

2.4.1.1 Métodos microscópicos de recuento celular en cámara.

Es un método directo de manejo simple, existen diversos tipos de cámaras para el recuento de microorganismos tales como: cámara de Neubauer. Thoma, Bürker, Tirk, Fuchs-Rosenthrl, Malassez, Petroff-Hausser (Arredondo, 2007).

- **Conteo en cámara de Neubauer**

La cámara Neubauer, consiste en una placa gruesa con forma de porta, cuya porción central está dividida en tres bandas longitudinales perpendiculares a su eje longitudinal. De ellas, las dos laterales se encuentran sobre elevadas con respecto de la central en 0.1 mm y en la central hay grabado un retículo cuadrangular (Moreno, 2004). La unidad final puede ser sobre ml, g.

Datos básicos de la cámara:

Cuadro grande central (formado por 400 cuadros pequeños): 1mm² /400 cuadros.

Cuadro mediano (formado por 4x4=16 cuadros pequeños): 0.2 mm x 0.2 mm

Cuadro pequeño: 0.05 mm x 0.05 mm= 0.0025 mm²

Lineas separadoras: 0.025 mm

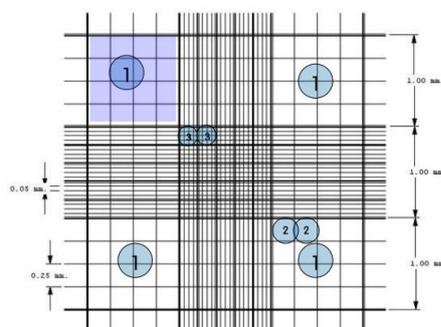


Figura 9. Estructura de la cámara de Neubauer
Fuente: (Bastidas, 2012)

2.4.2 Estabilización de la biomasa

Existen diferentes métodos para la preservación de los microorganismos y todos tienen ventajas y desventajas, por lo tanto el método escogido debe ser el que mejor se adecue a las necesidades de la colección, teniendo en cuenta la competencia técnica, los recursos financieros y las facilidades disponibles, recordando siempre que no existe un método universal para la preservación adecuada de todos los microorganismos (Perez, 2011).

Para la correcta conservación de las cepas se debe cumplir:

- El cultivo a conservar esté puro,
- Viabilidad del 70-80% de las células y
- Genéticamente estables.

2.4.2.1 Métodos a largo plazo

Son las técnicas de mejores resultados, presentando desde 30 años de estabilidad, ya que garantizan al máximo la estabilidad genética, a él pertenecen los métodos de congelación y la liofilización (Bagatolli, 2017).

- **Congelación**

Consiste en el almacenamiento de células a muy bajas temperaturas. En estas condiciones el agua, mayor componente de las células vivientes, pasa de fase

líquida a sólida. Las temperaturas utilizadas pueden ser de 20 a 70°C, y temperaturas de nitrógeno (fase de vapor = 140°C; fase líquida = 196°C). Para asegurar la viabilidad a largo plazo de los cultivos fúngicos, se recomienda la congelación y el almacenamiento en nitrógeno a bajas temperaturas y así estabilizar la genética por un período superior a treinta años. (Cárdenas, 2010).

- **Liofilización**

El éxito de la liofilización para la preservación de los microorganismos, no solo depende de los pasos de esta técnica (congelación y deshidratación) sino también de las características físico-químicas del medio de suspensión, siendo el tipo de microorganismo, el estado fisiológico del cultivo, las condiciones del cultivo y la concentración de los microorganismos. (Cárdenas, 2010).

El proceso es costoso, pues aunque no necesariamente requiere de un equipo sofisticado, se necesita al menos de un sistema de vacío, por lo que no se puede aplicar en laboratorios con recursos limitados.

Estudios recientes sobre las técnicas de preservación por largo plazo, han evidenciado que éstas técnicas, no cubren algunos efectos preocupantes sobre la estabilidad genética y las características fenotípicas de algunos de los aislados fúngicos estudiados.

2.4.2.2 Métodos a corto plazo

Se utilizan cuando los recursos son limitados, pero no por ello, su importancia es menor; ciertos estudios de conservación por métodos alternativos presentan resultados de conservación por 5 años (Bagatolli, 2017).

- **Capa de aceite mineral**

La esencia del método, está en cubrir el cultivo desarrollado sobre medio nutritivo líquido o agarizado con el aceite mineral no tóxico y estéril, como la parafina o vaselina; también se usa petrolato líquido. Los cultivos pueden mantenerse por varios años o en casos excepcionales por más de treinta y dos a 15 - 20 °C.

Este método está especialmente recomendado para conservar micelio u hongos no esporulados, donde la congelación puede ser adversa para ellos. Se recomienda éste

método en climas tropicales, para prevenir la desecación del cultivo e impedir la penetración de ácaros. Su mayor desventaja es que el hongo puede continuar su crecimiento, al menos durante los primeros períodos y así ocurrir que sobrevivan mutantes capaces de crecer bajo las condiciones adversas que implican la conservación (Nakasone, Peterson, & Jong).

- **Conservación en agua destilada estéril**

Es un método alternativo desarrollado por Bueno & Gallardo (1998), donde se obtiene altos porcentajes de viabilidad en hongos filamentosos y algunas bacterias, en períodos de tiempo que en muchas ocasiones superan los 5 años, observándose además una buena estabilidad de los caracteres morfológicos y fisiológicos.

Aparentemente el agua suprime cambios morfológicos en muchos hongos, es un método simple, económico y seguro; capaz de garantizar la supervivencia de los cultivos fúngicos por períodos prolongados; evita el pleomorfismo y la contaminación con ácaros. La estabilidad para caracteres morfológicos y fisiológicos ha sido comprobado por Bueno & Gallardo, (1998), con resultados puntuales.

Los ascomycetes, incluidas sus formas mitospóricas; sobreviven por 10 años cuando se almacenan a 20°C y tratamientos a temperatura ambiente (20-25°C) con una supervivencia de 5 años. Se han conservado por este método cepas autóctonas de las especies *Trichoderma sp.*, *T. harzianum* y *T. koningii* Bueno et al. (1988).

2.4.3 Ventajas de la biomasa

Se presentan ventajas de la obtención y uso de la biomasa, producida en residuos vegetales mediante acción de microorganismos (Obremo, 2012):

- Fuente de microorganismos agricultores con origen renovable, es decir; que se obtiene de fuentes naturales inagotables, debido a las características físicoquímicas y contenido de minerales necesarios para la producción de microorganismos.
- Convierte residuos en recursos. Gracias a la biomasa, el sector agrícola y otras industrias pueden reciclar sus excedentes.

2.5 ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA REGRESIÓN

La regresión estadística es una metodología que modela y analiza problemas, permitiendo solucionar los procesos al encontrar las condiciones óptimas de las variables independientes que maximizan, minimizan o cumplen limitaciones en las variables de respuesta (Gutiérrez, 2005).

El método de *análisis de varianza de la regresión*, investiga y modela la relación entre una variable *Y* dependiente o *de respuesta* en función de otras variables de *predicción X's*, a través de métodos matemáticos (Reyes, 2007). La AVR ha sido usada para el desarrollo, mejoramiento y optimización de diferentes bioprocesos (Myres & Montgomery, 2009).

2.5.1 Terminología

En un análisis de regresión, la interpretación de los datos experimentales es clave, ya que se explica en forma matemática y lógica el comportamiento de una variable en función de una o más variables (Gutiérrez Pulido, 2008).

- **Predicciones:** una de las aplicaciones de la regresión, es la predicción de la variable dependiente para nuevos valores de las variables independientes. En general, para fines de predicción se recomienda un coeficiente de determinación ajustado de al menos 0.7.
- **Suma de cuadrados del error:** Es la suma de los residuos al cuadrado, y se utiliza para estimar la varianza del error de ajuste de un modelo.
- **Coeficiente de determinación R²:** Mide la proporción de la variabilidad en los datos (Y) que es explicada por el modelo de regresión.
- **Error estándar de estimación:** Estima la desviación estándar del error e indica la magnitud del error de estimación de un modelo.

2.5.2 Calidad del ajuste en regresión lineal

Un criterio para evaluar la calidad del ajuste, es observar la forma en que el modelo se ajustó a los datos. En el caso de la regresión lineal simple se distingue, al observar si los puntos tienden a ajustarse razonablemente bien a la línea recta (figura 7).

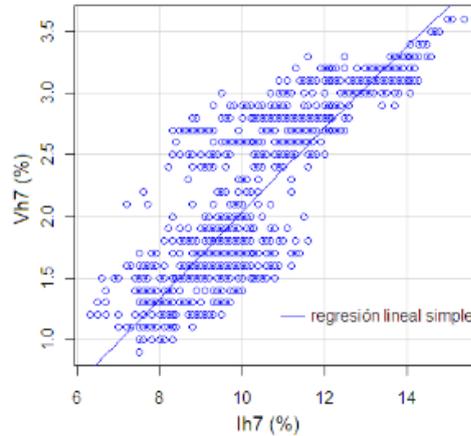


Figura 10. Ajuste de datos

Fuente: (Gutiérrez Pulido, 2008).

Un criterio más cuantitativo es el que proporciona Gutiérrez Pulido (2008) con el coeficiente de determinación definido por:

$$R^2 = \frac{\text{Variabilidad explicada por el modelo}}{\text{Variabilidad total}}$$

R^2 mide la proporción de la variación total respecto a la media que es explicada por la regresión. Puede tomar valores entre 0 y 1; los valores cercanos a 1, implican que ajuste adecuado del modelo (Gutiérrez Pulido, 2008).

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ENFOQUE Y TIPO DE INVESTIGACIÓN

Se realizó una investigación experimental con enfoque cuantitativo, con el fin de evaluar una alternativa de generación de valor para los residuos vegetales a escala de laboratorio.

3.2 LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO

La experimentación se realizó en tres sitios (anexo 1): Unidades Edu-productivas de la carrera de Ingeniería Agroindustrial, en los laboratorios de microbiología y análisis fisicoquímicos de la Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales (FICAYA) de la Universidad Técnica del Norte y en los laboratorios del Centro Ecuatoriano de Biotecnología del Ambiente (CEBA) y sus condiciones ambientales se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Ubicación y datos meteorológicos del área de experimentación

Provincia:	Imbabura
Cantón:	Ibarra
Altitud	2256 m.s.n.m
Humedad Relativa Promedio	62%
Temperatura media	17,9 °C
Pluviosidad	503 – 1000 mm. año
Sitio 1:	Unidades Edu-productivas Agroindustrias
Sitio 2:	Centro Ecuatoriano de Biotecnología del Ambiente (CEBA)
Sitio 3:	Antiguo Hospital “San Vicente de Paúl” – Laboratorios de Análisis Físico- Químicos FICAYA

Fuente: (INAMHI, 2015)

3.3 MATERIALES Y EQUIPOS

3.3.1 Materia prima e insumos

- Residuos vegetales (sólidos del Mercado Amazonas)
- Cepa del hongo *Trichoderma ssp* (ficha técnica, anexo 2)
- Agar PDA (Agar Papa Dextrosa)
- Agua destilada estéril

3.3.2 Equipos y materiales de laboratorio

Equipos: autoclave, cámara de flujo, incubadora, balanza gramera, termómetro, secador de bandejas, microscopio.

Materiales: cuchillos, rallador, fundas con cierre hermético, tamiz (2 medidas: 1 y 5 mm), frascos de vidrio con tapa, probeta.

3.3.3 Software

La parte estadística del trabajo investigativo, se realizó utilizando paquetes estadísticos actuales, así los resultados son verificados en varias fuentes.

- Statgraphics Centurion XVI.II
- Infostat 2017
- Excel 2016

3.4 MÉTODOS

3.4.1 Caracterizar los residuos vegetales mediante un análisis físico-químico

La caracterización de los residuos vegetales generados en el Mercado Amazonas de Ibarra, permitió determinar una posibilidad de generar valor agroindustrial en los residuos, mediante la producción de biomasa activa. Para esto se debió analizar la composición estructural de los residuos.

Se tomó un total de dieciséis muestras aleatorias de residuos vegetales de la unidad de almacenamiento del mercado Amazonas, durante siete días; las muestras presentaron alta heterogeneidad por lo que se procedió al método del cuarteo por volumen (anexo 3) para obtener una muestra representativa.

Se llevó a cabo la caracterización físico química de los residuos vegetales con un previo secado, para la determinación de: humedad, cenizas, extracto etéreo, proteína, fibra, macro y micro elementos que son condicionantes en el crecimiento del hongo *Trichoderma spp.*

Análisis Físico químico

Los residuos vegetales, fueron sometidos a un análisis proximal para cuantificar sus componentes estructurales, sus variables se presentan en la tabla 9.

Tabla 9. Variables Cuantitativas del Análisis Físico Químico

VARIABLES	MÉTODO REF. Florida 1980	UNIDAD
Humedad	MO-LSAIA-01.01	%
Cenizas	MO-LSAIA-01.02	%
Extracto Etéreo	MO-LSAIA-01.03	%
Proteína	MO-LSAIA-01.04	%
Fibra	MO-LSAIA-01.05	%
E.L.N	MO-LSAIA-01.06	%

Fuente: INIAP (2018)

Descripción de las variables cuantitativas previo a la producción del hongo:

Para la determinación de: humedad, cenizas, extracto etéreo, proteína, fibra y ELN; se utilizó el método MO-LSAIA-01, el mismo que hace referencia la Universidad Florida 1980 y que es aplicado por el departamento de nutrición y calidad vegetal del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias del Ecuador (INIAP).

Análisis de: macro elementos (%) y micro elementos (ppm)

En la tabla 10, se presentan los métodos a utilizar para la determinación de macro elementos presentes en los residuos vegetales secos.

Tabla 10. Métodos para determinación de macro y micro elementos

VARIABLES	Método ref. florida 1980	Unidad
Calcio y Magnesio	MO-LSAIA-03.01.02	%
Sodio y Potasio	MO-LSAIA-03.01.03	%
Cobre y Hierro	MO-LSAIA-03.01.02	ppm
Manganeso y Zinc	MO-LSAIA-03.01.03	ppm

Fuente: INIAP (2018)

Descripción de la metodología para determinación de macro y micro elementos:

Para la cuantificación de los macro elementos: Ca, Mg, Na, K y P, micro elementos: Cu, Fe, Mn y Zn, se utilizó el método MO-LSAIA-03.01, método referencia de la Universidad Florida 1980 y adaptado por el departamento de nutrición y calidad vegetal del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias del Ecuador (INIAP).

3.4.2 Evaluar la influencia de la temperatura de incubación, tamaño de partícula de los residuos y cantidad de inóculo en el crecimiento del hongo.

El diseño estadístico que se utilizó, tuvo como finalidad la experimentación de la operación de fermentación en estado sólido, por lo tanto; aplicado a los principales parámetros de control del FES, se manejó un Diseño 2^3 , que consta de tres factores: A: representa tamaño de partícula de los residuos (mm), B: temperatura de incubación ($^{\circ}\text{C}$) y C: la cantidad de inóculo del hongo, con dos niveles cada uno.

Factores en estudio

La presente investigación, toma como factores de estudio a:

Tabla 11. Factores y niveles estadísticos

Factor A		Factor B		Factor C	
Tamaño de partícula (mm)		Temperatura de incubación ($^{\circ}\text{C}$)		Cantidad de inóculo (ml)	
Nivel bajo	Nivel alto	Nivel bajo	Nivel alto	Nivel bajo	Nivel alto
23	33	1	5	5	10

Tratamientos en estudio

De la combinación de los tres factores en estudio resultaron 8 tratamientos de experimentación. Los tratamientos se detallan en la tabla 12.

Tabla 12. Descripción de los tratamientos

Tratamiento	Combinación	Descripción
1	A1B1C1	1 mm, 23°C , 5 ml
2	A1B1C2	1 mm, 23°C , 10 ml
3	A1B2C1	5 mm, 23°C , 5 ml
4	A1B2C2	5 mm, 23°C , 10 ml
5	A2B1C1	1 mm, 33°C , 5 ml
6	A2B1C2	1 mm, 33°C , 10 ml
7	A2B2C1	5 mm, 33°C , 5 ml
8	A2B2C2	5 mm, 33°C , 10 ml

Características del experimento

Se evaluaron 8 tratamientos con tres repeticiones, resultando 24 unidades experimentales constituidas por 12g de sustrato.

El esquema del análisis de varianza se evidencia en la tabla 13.

Tabla 13. Análisis de Varianza

Fuentes de variación	Grados de Libertad
Total	23
Tratamientos	7
Factor A	1
Factor B	1
Factor C	1
A x B	1
A x C	1
B x C	1
Error experimental	16

Variables a evaluarse

En la tabla 14 se detalla las variables evaluadas en el desarrollo del experimento.

Tabla 14. Variables Experimentales

Variables	Métodos	Unidad
Independientes		
Tamaño de partícula	Tamización	mm
Temperatura de incubación	Termométrico	°C
Cantidad de inóculo	Volumétrico	ml
Dependientes		
Biomasa	Método Microscópico de recuento celular en cámara	esporas/g

Descripción de las variables experimentales

Humedad: El contenido de humedad disminuyó por la aplicación del secado, operación base para posterior reducción de tamaño del sustrato. Se estandarizó la humedad de $8.32 \pm 0.7\%$ hasta llegar a un 70% al inicio del experimento, con cálculos de base seca.

Tamaño de partícula: se estableció por el método de tamización, utilizando dos rejillas de tamaños diferentes (1 y 5 mm) logrando obtener 2 tamaños de partículas uniformes, necesarias para el desarrollo del hongo.

Temperatura de incubación: se trabajó en dos niveles de temperatura, dadas por el termómetro de la cámara de incubación.

Cantidad de inóculo: se manejaron dos niveles de volumen (5- 10 ml). En los procesos de producción de esporas mediante fermentación sólida se utilizan

inóculos puros o en dilución. La concentración inicial del inóculo fue 1.32×10^4 esporas.

Biomasa: se determinó mediante la cámara de Neubauer. El conteo de esporas se realiza en el cuadrante que proporcione mejor precisión de visualización para posteriormente aplicar la debida conversión. Las fórmulas de aplicación de la cámara de Neubauer se presentan en el anexo 4.

3.4.3 Estabilizar la biomasa obtenida para su comercialización.

Se estableció la viabilidad de la cepa, como principio de estabilidad para el hongo *Trichoderma asperellum*. Se utilizó el método de conservación en agua destilada estéril a dos temperaturas: 5°C y ambiente, con control de periodos cada 15 días, hasta llegar a los 60 días de estabilidad propuestos.

Manejo del método de estabilización

En la tabla 15, se presenta las características del método de estabilidad utilizado para el hongo *Trichoderma asperellum*.

Tabla 15. Constituyentes del método

Método	Control	Resultado
Agua destilada estéril	Temperatura (°C)	Viabilidad (%)

Tratamientos del método

Resultaron 2 tratamientos de estabilización, las combinaciones se detallan en la tabla 16.

Tabla 16. Detalle de los tratamientos

Tratamiento	Descripción
1	Temperatura Ambiente 23°C, dilución 10^{-5}
2	Temperatura 5°C, dilución 10^{-5}

Variables del Método

En la tabla 17 se detalla las variables evaluadas durante el desarrollo de la técnica.

Tabla 17. Variables del Método

Variables	Métodos	Unidad
Independientes		
Temperatura de incubación	Termométrico	°C
Dependientes		
Viabilidad	Directo Visual	%

3.5 MANEJO DEL EXPERIMENTO

3.5.1 Diagrama de bloques para producción del hongo *Trichoderma asperellum*.

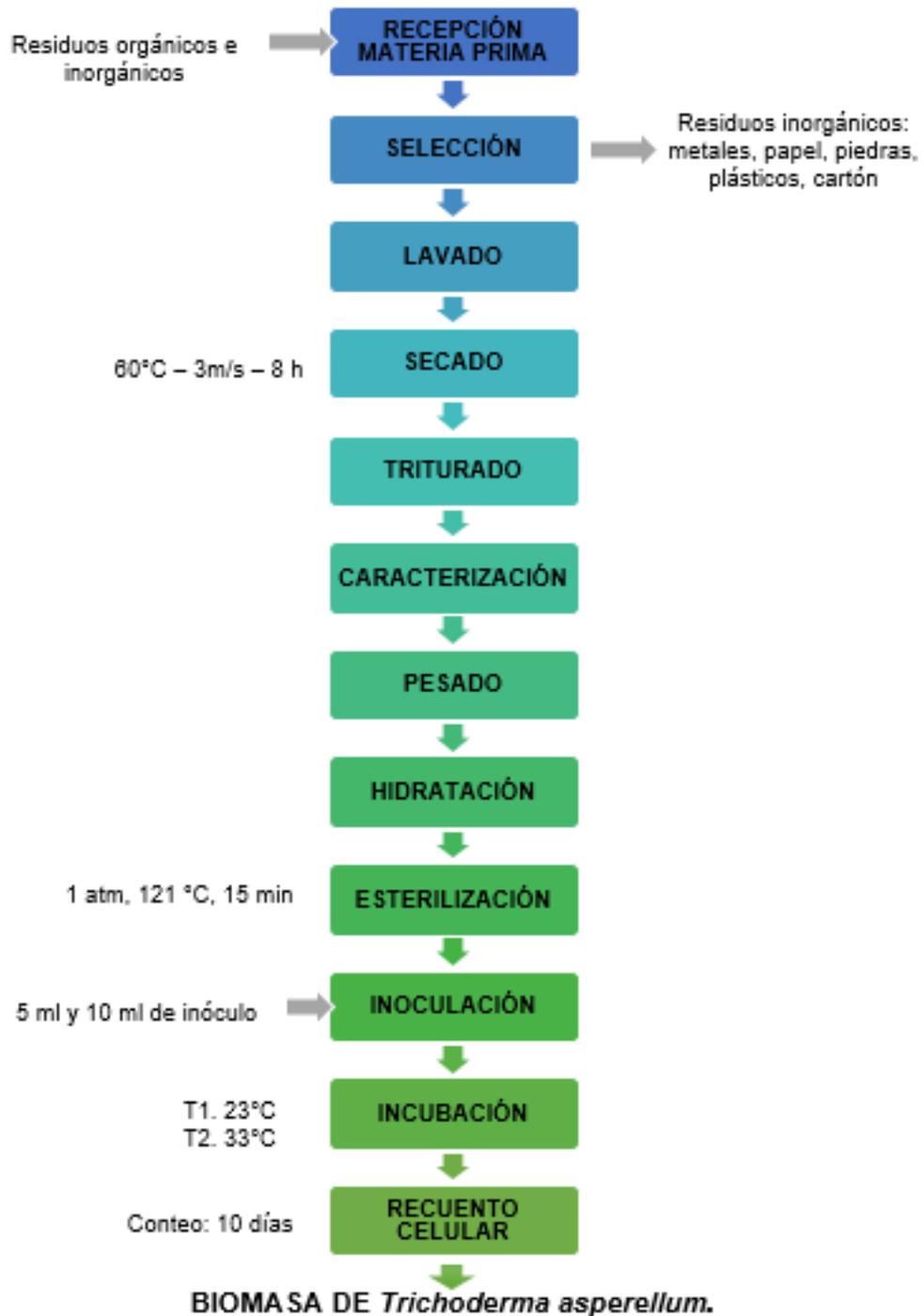
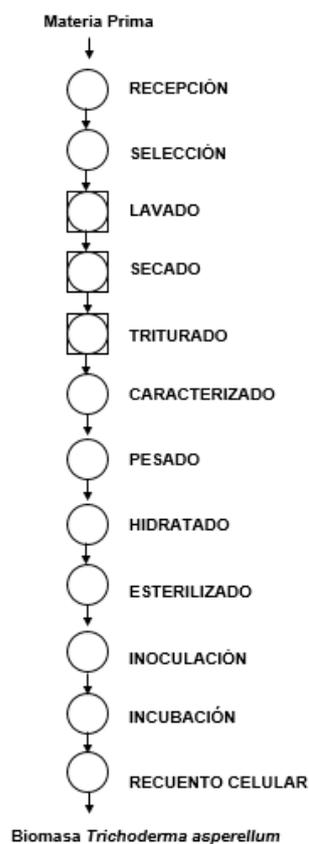


Figura 11. Diagrama operacional

3.5.2 Diagrama ingenieril

En la figura 12, se representa cada etapa de la experimentación.



3.5.3 Descripción del proceso

Recolección de la muestra

La materia prima, se obtuvo del área de almacenaje de residuos del mercado Amazonas de Ibarra, presentó características heterogéneas; por lo cual se utilizó el método de cuarteo por volumen (anexo 3) para formar una muestra representativa.

Selección

No existe un procedimiento de clasificación de residuos, al final de su comercialización, por lo que; se procedió a seleccionar los residuos vegetales y así excluir del proceso material inorgánico (metales, papel, piedras, plásticos, cartón) presente en la muestra.

Lavado

Para eliminar impurezas y materia extraña, que podrían afectar la caracterización y desarrollo del hongo, se realizó un lavado con agua potable, pH 6.5 – 7 básico; durante 20 minutos.

Secado

El tiempo aproximado de secado fue de 8 a 10 horas, en un secador de bandejas; se manejó temperaturas de 60°C, con flujo de aire 3 m/s, ajustadas en Software Sitrad (anexo 5).

Triturado

La materia prima se sometió a una reducción de tamaño, mediante un molino de mano; posteriormente se obtuvo 2 tamaños de partícula (1 mm y 5 mm) mediante tamización.

Caracterización

La caracterización de los residuos, consistió en 2 análisis; uno proximal (proteína, fibra, E.L.N, grasa, humedad, cenizas) y otro análisis de macro y micro elementos (Ca, Mn, Na, K, P, Cu, Fe, Mg, Zn). Como una caracterización adicional, se procedió a describir físicamente a las partículas (0,5 y 1 mm) con ayuda de un microscopio, con lente 10x.

Hidratación

Mediante cálculo de diferencia de peso en base seca, se determinó cantidad de agua a completar para llegar a un 70% de humedad aproximada en el experimento.

Esterilizado

Se sometió la materia prima a una esterilización, con parámetros de: tiempo 15 minutos; temperatura 121°C y 1 atmósfera de presión, para destruir la carga microbiana existente, lo que aseguró un medio de cultivo limpio e inocuo.

Inoculación

La inoculación, se realizó a dos niveles: 5 ml y 10 ml; el hongo se traspasó de la caja Petri hacia agua destilada estéril; se procedió a medir el volumen con una probeta.

Incubación

En ésta operación en la que ingresa el último factor de estudio, que es la temperatura de incubación, se utilizó 2 incubadoras a 23°C y otra a 33°C durante un periodo de 10 días.

Recuento Celular

Se utilizó el método de cámara de Neubauer, para el recuento de esporas del hongo, se realizó una dilución 10^{-1} (9 ml de agua destilada estéril + un gramo de muestra sólida). Una vez reposada la muestra, con una micro pipeta, se tomó un volumen 1 micro litro, se procedió al enfoque (10X hasta 40X) y conteo de esporas. Se registra el total de esporas y por medio de la ecuación (anexo 3) correspondiente al cuadrante utilizado, se calcula el número de unidades propagadoras de mohos.

3.5.4 Diagrama de bloques. estabilización del hongo *Trichoderma asperellum*.

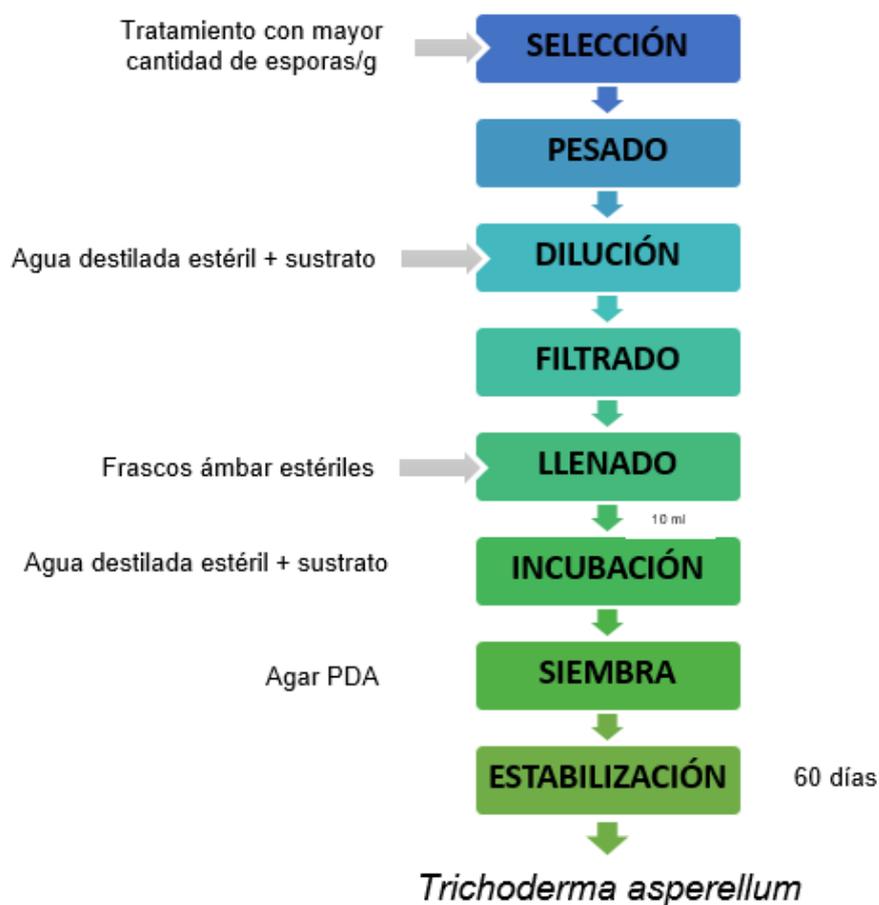


Figura 12. Diagrama de bloques para estabilización del hongo *Trichoderma asperellum*.

3.5.5 Diagrama ingenieril

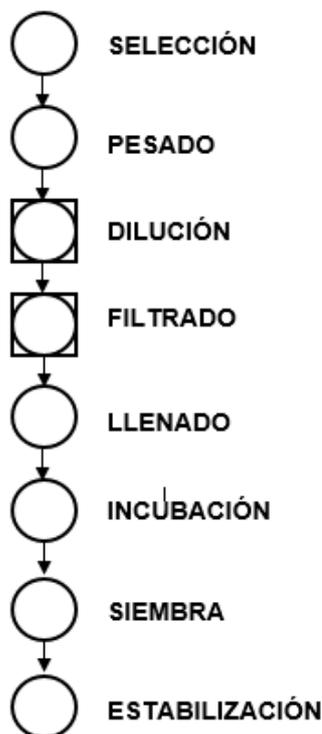


Figura 13. Diagrama Ingenieril

3.5.6 Descripción del proceso

Selección

El tratamiento de mejor respuesta en esporas/g del hongo, anteriormente obtenido, fue el optado para establecer el método de estabilización del hongo obtenido.

Pesado

Para el pesaje de la muestra, se utilizó una balanza gramera en la que se estableció la unidad experimental inicial.

Dilución

La dilución fue 10^{-5} , en el que se utilizó agua destilada estéril (agua tipo 1) como solvente, se agitó la muestra y reposó durante 10 minutos.

Filtrado

Con el fin de eliminar restos de residuos vegetales provenientes de las operaciones anteriores, se realizó un filtrado a la dilución; donde se utilizó algodón doblemente estéril como agente de filtración.

Llenado

Para almacenar 10 ml de solución, se utilizó frascos ámbar de 25 ml, previamente esterilizados en una autoclave.

Incubación

La incubación se realizó a dos niveles de temperatura: ambiente ($23^{\circ}\text{C}\pm 3$) y refrigeración 5°C , durante 60 días.

Siembra

Para la propagación del hongo, se utilizó agar PDA. Las siembras se realizaron en periodos de 15 días, hasta llegar a 60 días de estabilidad propuesta.

Estabilidad

La estabilidad del hongo se aseguró desde el primer día de incubación hasta los 60 días, con manejo del método visual directo, el cual reconoció microorganismos identificados como contaminantes a todos aquellos diferentes al hongo *Trichoderma spp.* que no permitieron su desarrollo.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

La materia prima, fue adquirida del Mercado Amazonas de la ciudad de Ibarra, provincia de Imbabura, en el área de almacén de residuos, previos a ser llevados al relleno sanitario en las afueras de la ciudad. Los análisis se realizaron por duplicado y el resultado se presenta en la tabla 18 (Análisis Proximal) y tabla 19 (Macro y micro elementos).

4.1.1 Análisis proximal

Un análisis estructural, es el punto de partida para la determinación de valor. La caracterización de residuos es la actividad que consiste en determinar la composición del residuo en sus diferentes fracciones. Los valores que resultan de la caracterización físico química de los residuos vegetales secos, son una base a comparar con los rangos de producción del hongo *Trichoderma spp*, ya descritos en escalas de aplicación a nivel mundial (Castro & Rivillas, 2012). En la tabla 18 se representan los resultados de la muestra:

Tabla 18. Análisis Proximal (2018), muestra residuos vegetales secos

Humedad	E.L.N	E.E	Proteína	Fibra	Cenizas
%	%	%	%	%	%
8.32	64.82	2.57	11.74	13.64	7.23

*E.E: Extracto Etéreo *E.L.N: Extracto libre de nitrógeno *, X: dos repeticiones de análisis

El contenido de humedad de los residuos secos, fue de $8.32 \pm 0.7\%$ y se estandarizó como un parámetro de control inicial en el experimento y asumiendo los rangos de Castro & Rivillas (2012) que utilizan para la producción de *Trichoderma* con rangos óptimos entre el 60-70% de humedad.

La relación C:N, se determinó a partir del contenido de proteína y porcentaje de nitrógeno, la caracterización mostró valores de 3.24% de Carbono y 1.88% de Nitrógeno; mientras que Ortiz & Gutierrez (2008) presentan resultados experimentales de una relación C:N (10:1) y detallan que cuando la concentración de carbono es mayor a la del nitrógeno, la producción de conidios se eleva; por el

contrario, cuando la concentración de nitrógeno es mayor a la de Carbono, la esporulación se vuelve nula, el hongo no llega a su reproducción.

Con relación al contenido de grasa en los residuos vegetales, se obtiene un valor de $2.57 \pm 5\%$, lo que permite el crecimiento del hongo, ya que según Fernández (2011) con resultados de experiencias anteriores, se requiere únicamente de un 0.75% de grasa, para que el hongo realice por completo sus funciones metabólicas. Con respecto al contenido de proteína, el mismo autor menciona rangos 7 - 12%, siendo valores suficientes para el desarrollo y esporulación del hongo, por lo tanto; el contenido de proteína presente de 11.74% es adecuado para la producción del hongo *Trichoderma spp.*

La fibra presente en la caracterización de los residuos vegetales secos, se encuentra en un 13.64% aproximado; no existe una tendencia definida de este hongo sobre este factor; sin embargo al contener mayor cantidad de fibra, es decir; celulosa, el hongo presenta mayor viabilidad y fortaleza de acuerdo a estudios de (Agosin & Aguilera, 2010).

Los principales componentes de los residuos vegetales secos, corresponden a los carbohidratos y fibra, estos componentes son biopolímeros que se constituyen en la materia prima necesaria para diferentes procesos de biodegradación, conducentes a la obtención de productos de valor agregado como biomasa activa.

4.1.2 Análisis de macro y micro elementos

Por otra parte, el contenido de cenizas obtenidas a partir de los residuos fue: 7.23% y de una manera desglosada se presentan en macro y micro elementos. En la tabla 19 se detallan cuantitativamente los valores de cada mineral.

Tabla 19. Macro y micro elementos (2018), muestra residuos vegetales secos

Macro elementos	Ca	P	Mg	K	Na
Unidad	%	%	%	%	%
Resultado	0,58	0,15	0,16	1,55	0,10
Micro elementos	Cu	Fe	Mn	Zn	
Unidad	ppm	ppm	ppm	ppm	
Resultado	2	227	25	19	

% - ppm: relación peso/peso

Puntualiza Cruz (2010) que la presencia de macro y micro elementos, en cantidades mínimas, aportan a un desarrollo potencial al hongo y por el contrario si el caso presenta ausencia de éstos elementos, el hongo tiende a crecer escaso y con capacidad antagónica casi nula.

4.1.3 Caracterización física

Dentro de las propiedades físicas de los residuos vegetales heterogéneos, destacan las siguientes: forma, color, textura. De acuerdo a Saldaña, Hernandez, Messina, & Pérez (2013) las características físicas influyen en el desarrollo de microorganismos y agente aceleradores de reacción químicas como enzimas y metabolitos secundarios.

Nivel	Forma	Aspecto de color	Borde	Textura
1 mm	redondeada	homogéneo opaco	con tendencia a la regularidad	rugosa
5 mm	rectangular	heterogéneo opaco	irregular	rugosa

Tabla 20. Descripción física de las partículas de los residuos

4.2 EVALUAR LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE INCUBACIÓN, TAMAÑO DE PARTÍCULA DE LOS RESIDUOS Y CANTIDAD DE INÓCULO EN EL CRECIMIENTO DEL HONGO.

Para el desarrollo de esta investigación, se determinó el mejor tratamiento en respuesta al número de esporas por gramo, en un periodo de diez días. Los resultados de cada tratamiento con su respectiva repetición se presentan en el anexo 7. Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilks, para verificar el supuesto de normalidad de los datos ($p = 0.22$). En el análisis de varianza, las diferencias significativas se evidenciaron cuando $F_0 > F$. tabular.

Al décimo día de incubación, el tratamiento 8, en el cual se aplicó las variables de estudio más altas (tamaño de partícula 5 mm, temperatura 33°C e inóculo 10 ml), generó la máxima concentración de esporas: 1.75×10^{10} , concordando con Stazonelli et al., (2017) ya que demostró que para la producción de *Trichoderma spp*, con sustratos de partícula 10 ± 5 mm y temperatura 30°C, generan mayor cantidad de esporas, con resultados de 3.04×10^{10} esporas/g en su experimentación

y aunque este autor no toma la variable de inóculo los resultados en cuanto a biomasa son aproximaciones.

Mediante el análisis de varianza de la tabla 21, se determinó que existe una alta significación estadística para el factor A (tamaño de partícula), B (temperatura de incubación) y C (cantidad de inóculo). Por otra parte, las interacciones entre los factores de estudio son significativas sólo para AxB; por lo que las variables de estudio, si influyen directamente en el contenido de biomasa final, así se confirma la aceptación de la hipótesis alternativa.

Se identificó también que, para las interacciones AxC y BxC; resultaron valores no significativos para la variable respuesta del experimento. Además, se presentó un coeficiente de variación, que resultó en un 0,56%; lo que confiere un buen manejo del experimento.

Los resultados de cada tratamiento, fueron cantidades exponenciales, por ello se realizó transformaciones a logaritmo natural (ln), para la validación de resultados.

Tabla 21. Análisis de varianza de la biomasa producida

F.V.	SC	GL	CM	pF	p-valor	Significancia
Factor B	17,12	1	17,12	2361,41	<0,0001	**
Factor A	0,30	1	0,30	41,12	<0,0001	**
Factor C	0,23	1	0,23	32,08	<0,0001	**
A x B	0,04	1	0,04	5,35	0,0344	*
B X C	4,3e-04	1	4,3e-04	0,06	0,8113	Ns
A X C	3,3e-04	1	3,3e-04	0,05	0,8346	ns
AxBxC	0,04	1	0,04	5,37	0,0341	*
Error	0,12	16	0,01			
Total	17,85	23				

A: Temperatura, B: Partícula, C: Inóculo, ns: no significativo, * significativo 1%, ** significativo 5%

La temperatura de incubación y la cantidad de inóculo llegan a generar valores reales de mayor significancia hacia la variable final de biomasa, sin embargo, en este experimento dónde no se controló flujo de aire, pH y aditivos no fue idóneo el medio para que exista una interacción directa de las dos variables hacia la biomasa final.

En los tratamientos 3,4,7 y 8 se presentan los valores más altos de biomasa (figura 15), en el periodo establecido de 10 días, siendo su variable constante el tamaño de partícula de 5mm.

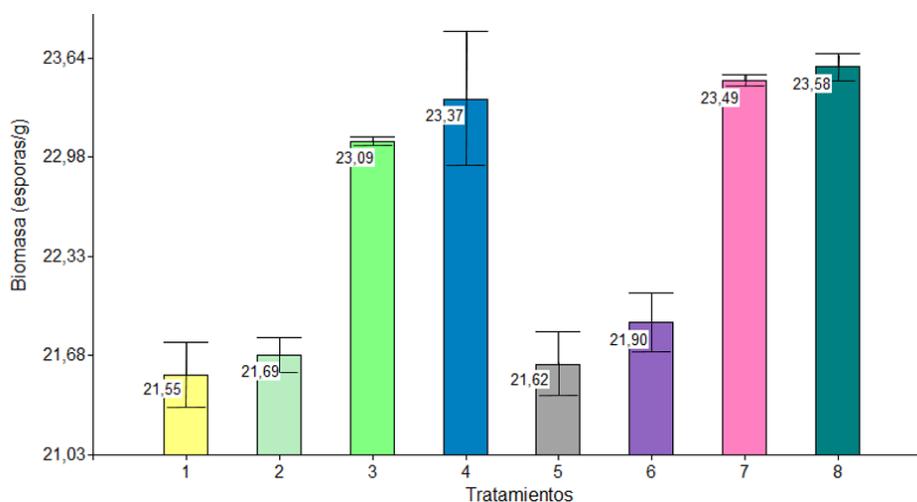


Figura 14. Tratamientos experimentales

Al encontrarse significancia estadística en los tratamientos, se procedió a realizar la prueba Tukey al 5%, alcanzando resultados que se presentan en la tabla 22.

Tabla 22. Prueba Tukey para las interacciones de las variables en estudio

Tratamiento	Combinación	Media	Rango
8	A2B2C2	23,58	a
7	A2B2C1	23,49	a
4	A1B2C2	23,37	a
3	A2B1C1	23,09	b
6	A2B1C2	21,90	c
2	A1B1C2	21,69	c
5	A1B2C1	21,62	c
1	A1B1C1	21,55	c

Nota: Medias con letras iguales no son significativamente diferente

La prueba aplicada de Tukey al 5%, definió a los tratamientos **T8**, **T7** y **T4**, como estadísticamente iguales con respecto a la biomasa final. Estos tratamientos, están dentro del límite de producción de biomasa del hongo *Trichoderma*, reproducido en residuos vegetales. Resultados similares reportaron diversos autores en diferentes años (Arnáiz, Isac, & Lebrato, 2000; Agamez, Zapata, Oviedo, & Barrera, 2008; Fernández, 2014; Ibarra & Rojas, 2016; Stazzonelli, Yasem De Romero, & Ploper, 2017) donde al trabajar con sustratos vegetales y condiciones semejantes del experimento, resultan ser análogos entre sí. No obstante, este

experimento reveló que 3 tratamientos tienen un buen potencial para producción del hongo agricultor. Se realizó una comparación entre los tratamientos con base a la variable de nivel de inóculo, teniendo en cuenta varios antecedentes, entre ellos Bécquer et al., (2015) donde expresa que el efecto del nivel de inóculo en sustratos es susceptible a la relación e interacción hacia la variable respuesta; así se presentó una comparación entre los tratamientos que, adoptaron la variable independiente de inóculo de 5 y 10ml.

De la combinación de las variables de estudio se obtuvo ocho tratamientos, cuatro de ellos adoptaron el nivel menor de inóculo: 5ml (figura 16) y los cuatro tratamientos restantes adoptaron el nivel mayor de inóculo 10 ml (figura 17).

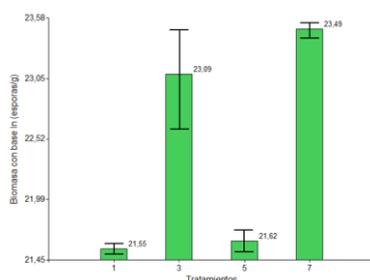


Figura 15. Resultados de tratamientos con inóculo 5ml

En la figura 16, se presentan los valores medios de los cuatro tratamientos con inóculo de nivel 5ml. El tratamiento 3 y 7, resultan con desviación de error concordante y con mayor cantidad de biomasa estimada ($23,28 \pm 0,21$) entre los cuatro tratamientos con el mismo nivel de inóculo.

Para los cuatro tratamientos posteriores, que adoptaron la variable independiente de 10 ml y se presentaron los siguientes resultados.

En la figura 17 se representan los valores medios, resultante entre los tratamientos con nivel de inóculo 10ml, en esta comparación los tratamientos 4 y 8 presentan desviación estándar equivalente y con mayor cantidad de biomasa ($23,35 \pm 0,19$ esporas/g).

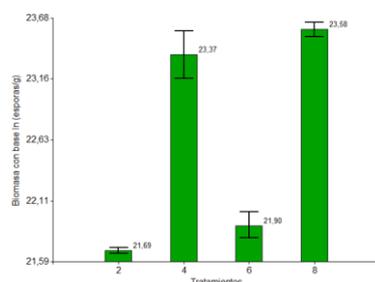


Figura 16. Resultados de tratamiento con inóculo 10ml

En el análisis comparativo generado por el error de la desviación estándar, presenta los resultados de la interacción del hongo con las variables de estudio, así resultó la no significancia de la cantidad de inóculo hacia la biomasa final ($p > 0,05$) al ser comparados los dos niveles de inóculo 5 y 10 ml, mientras que (Bécquer et al., 2015) por el contrario encontraron la relación que genera el nivel de inóculo cuando interactúa con un pH ligeramente ácido del medio, generando mayor cantidad de esporas en un tiempo establecido.

Entre las comparaciones mediante desviación estándar, los tratamientos de mayor producción de biomasa son el tratamiento 4,7 y 8 (figura 18). La constante para la producción de biomasa resultó el tamaño de partícula del sustrato (5mm) ya que determinó que el hongo *Trichoderma spp.* se mantenga en su fase exponencial mayor tiempo; concordando con la proposición de Páramo & Hernández (2017) quienes describen la relación de la fase exponencial del microorganismo con el acceso a su alimentación siendo determinante en su reproducción.

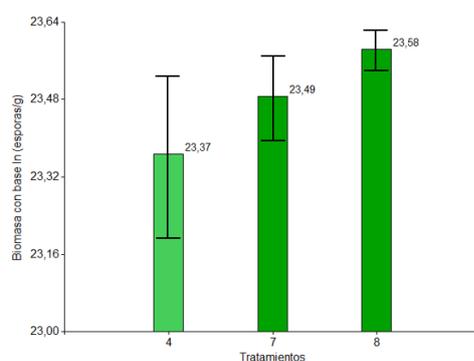


Figura 17. Comparativo de tratamientos

De acuerdo a Martínez, Infante, & Reyes (2013) la relación entre la temperatura y el desarrollo de *Trichoderma spp.*, depende de la especie y del propio aislamiento, así como su influencia en su capacidad antagónica.

Al final del periodo establecido de los 10 días, el tamaño de partícula fue el condicionante para generar la mayor cantidad de esporas (figura 19) la temperatura de incubación fue la energía de activación para la reproducción y consecuente para la evaporación del agua en el sustrato y el nivel de inóculo aporta la disminución de tiempo de producción de esporas/g.

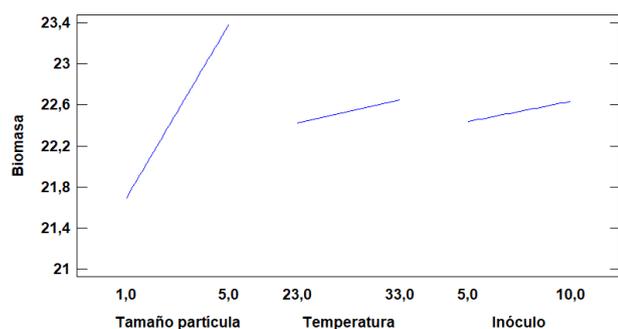


Figura 18. Efectos principales para biomasa

El diagrama Pareto presente en la figura 20, muestra los valores absolutos de los efectos estandarizados, desde el efecto más grande hasta el efecto más pequeño. El diagrama muestra la línea de referencia para indicar cuáles efectos son estadísticamente significativos: tamaño de partícula, temperatura y cantidad de inóculo, como variables independientes, mientras que sus interacciones no son significativas en el experimento.

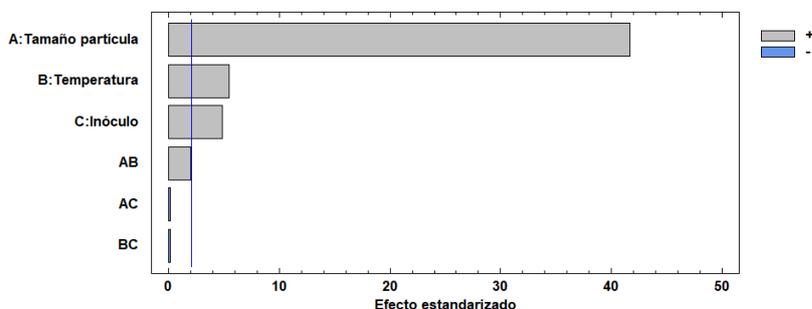


Figura 19. Diagrama de Pareto

El análisis de varianza de la regresión para la construcción del modelo (tabla 23) se ajustó con la prueba de validación sumatoria de la desviación del error de estimación; la cual resultó en una ecuación precisa de valores válidos, en cuanto a la aplicación de la ecuación.

Tabla 23. ADEVA de la regresión

FV	SC	GL	MC	Fc	Sig.
Regresión	9,20812E+20	2	4,60406E+20	595,328	**
Residual	1,62407E+19	21	7,73365E+17		
Total	9,37052E+20	23			
R cuadrado			0,9827		
R cuadrado ajustado			0,9810		
Error típ. de la estimación			879411872,11		

Gutiérrez Pulido (2008) interpreta en general a R^2 , como la proporción de la variabilidad en los datos (Y) que es explicada por el modelo. En el caso del R^2 , a partir de la tabla 21 se tiene: $R^2 = 0.9827$ y un R ajustado de 0.9810; por lo tanto, se puede decir que 98% de la variación observada en la resistencia, es explicada por el modelo; lo cual indica que la calidad del ajuste es satisfactoria y que la relación entre X y Y es descrita adecuadamente por la ecuación presentada.

La fórmula presenta constantes y variables, las que están especificadas en sus unidades originales, pero estadísticamente se refiere a las variables de estudio: temperatura 33°C, tamaño de partícula de 5 mm y cantidad de inóculo 5 ml. Las 3 variables en este caso son influencia directa, para la producción biomasa final.

La ecuación del modelo ajustado en base general:

$$\text{Biomasa} = -3,42 \times 10^{08} + 7,93 \times 10^{07} (Tp \times T) + 1,01^{08} (Tp \times I)$$

El estudio tuvo 24 unidades experimentales, de los cuales 20 unidades se ajustan; representando un 83.33% de nivel de confianza. La confiabilidad del modelo, dada por el coeficiente de determinación $R^2 = 0.9827$ y un R ajustado de 0,9810; y como se resultado se obtiene una ecuación válida, simple y precisa para producción de esporas de *Trichoderma* en residuos vegetales.

La figura 21, representa la comparación entre la biomasa real (biomasa obtenida en el experimento) y la biomasa teórica estimada (biomasa generada por el modelo de regresión):

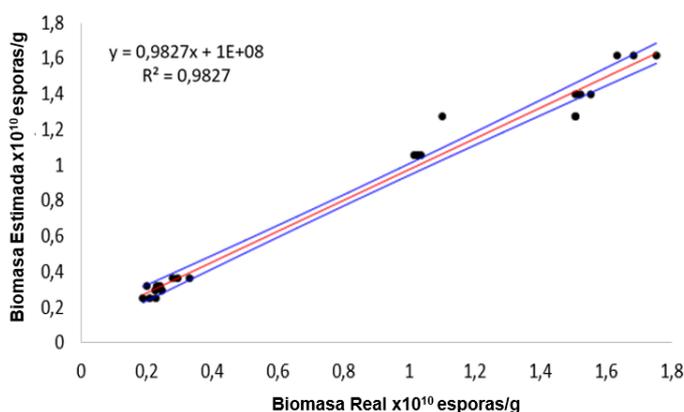


Figura 20. Biomasa real vs Biomasa estimada

En las figuras 22, 23 y 24 se presenta la predicción del crecimiento del hongo de acuerdo al modelo matemático generado con cada una de las variables de estudio: temperatura de incubación, tamaño de partícula y cantidad de inóculo. En la figura se representa el trayecto, desde el centro de la región experimental actual, a través del cual; la respuesta estimada cambia más rápidamente con los factores experimentales de menos valor. Indica también características para ejecutar experimentos adicionales, si el objetivo es incrementar o disminuir la cantidad de biomasa.

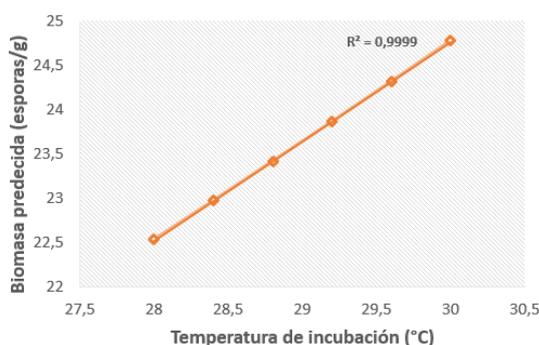


Figura 21. Predicción de biomasa (esporas/g) a partir de la temperatura de incubación

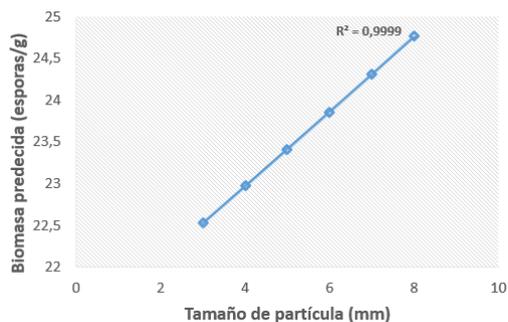


Figura 22. Predicción de biomasa (esporas/g) a partir de partícula de sustrato

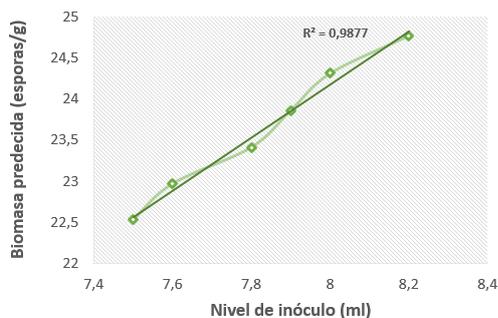


Figura 23. Predicción de biomasa (esporas/g) a partir del nivel de inóculo

4.3 ESTABILIZACIÓN DE LA BIOMASA DE *Trichoderma spp.* OBTENIDA

Bagatolli (2017) puntualiza a la viabilidad, como principio de estabilidad frente a hongos y bacterias. En este punto, se hace referencia a la estabilidad del hongo antagonista *Trichoderma asperellum*, durante un periodo de 60 días.

4.3.1 Determinación de variable evaluada

Viabilidad

Para la determinación de la viabilidad, se realizó una escala de 5 puntos, de 1 a 60 días con rango de 15 días cada uno. Esta variable se identifica con el porcentaje del área ocupada por el microorganismo seleccionado versus microorganismos diferentes a él, mediante métodos visuales directos e indirectos, así permite el control de crecimiento del hongo definido.

Para la estabilización, se utilizó el tratamiento de mayor concentración de esporas/gramo obtenido inicialmente. El método de estabilidad mediante agua destilada estéril, se ensayó a dos temperaturas: ambiente ($21^{\circ}\text{C}\pm 2$) y 5°C , durante un periodo de 60 días, los valores resultantes se muestran en la figura 23.

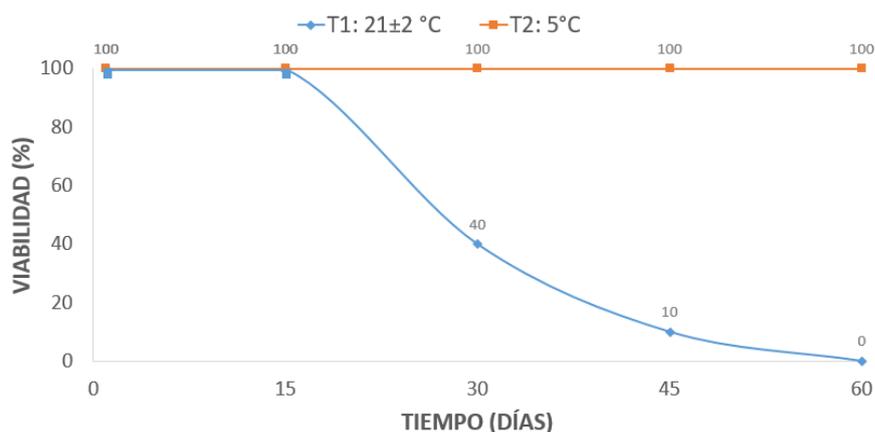


Figura 24. Viabilidad del hongo *Trichoderma spp.* a dos temperaturas.

El tratamiento 1, almacenado a temperatura ambiente ($21^{\circ}\text{C}\pm 2$) tuvo una viabilidad estable hasta los 15 días; a los 30 días presentó un crecimiento en placa se evidenció muy pobre, contando con un 60% de contaminación, pasando a los 45 días con una viabilidad realmente escasa y contaminación de un 90% del área de la siembra. A los 60 días, la viabilidad se perdió totalmente.

Sin embargo, se observó la presencia de microorganismos no identificados (contaminación), en la placa de siembra.

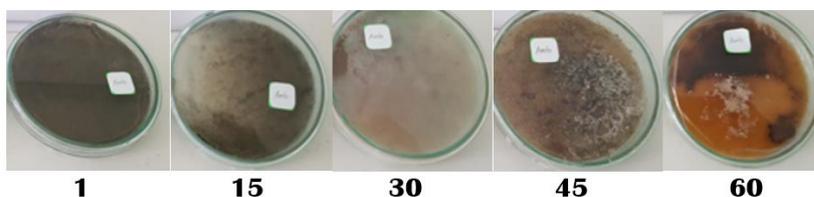


Figura 25. Estabilidad resultante en el tratamiento uno (temperatura ambiente)

Estos resultados coinciden con los registrados por Sarmiento Rangel, Vergel, & Cárdenas Caro (2013) quienes encontraron esta desventaja en la conservación del microorganismo, mediante agua destilada estéril a temperatura ambiente; ya que demostraron una tasa de supervivencia de 10% a un periodo de 50 días, atribuido a que estos rangos de temperaturas, no detienen el metabolismo celular y los microorganismos pueden continuar con su crecimiento, dado que no hay nutrientes en el agua, las células pierden su viabilidad.

De acuerdo al Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INHAMI) del Ecuador, en los meses Julio y Agosto 2018, la temperatura ambiente en Ibarra, osciló entre 19 y 27 °C, precipitando un clima de templado a cálido seco (anexo 6); ésta fluctuación, influyó directamente al proceso de estabilidad del hongo, ya que llegó a ser causante de estrés; por consecuente esporulación brusca y llevó al microorganismo a su muerte.

El tratamiento 2, almacenado a temperatura 5°C, mantuvo viable al hongo hasta los 45 días, en el que presentó un desarrollo en placa sin trazas de contaminación. Pasado los 60 días se evidenció una viabilidad de crecimiento pobre, aproximadamente un 60% área de cultivo y sin presencia de contaminantes, coincidiendo con Lupión, Marín, & Tello (2016) que describen la estabilidad de hongos filamentosos aplicando temperaturas bajas entre 3 y 10°C.

La baja temperatura provoca una disminución en disponibilidad de nutrientes esenciales, así crean un ambiente de suspensión de las actividades vitales del hongo, razón por la cual *Trichoderma spp.* no creció, frenó todo tipo de actividad metabólica, manteniéndose estable y viable, hasta los 60 días posteriores.

De acuerdo Bagatolli (2017) el método de conservación en agua destilada estéril a temperaturas de refrigeración, presenta una alternativa de viabilidad como estabilización de microorganismos, con periodos de duración de hasta 5 años, por tanto; se considera aceptable para su utilización en el laboratorio.

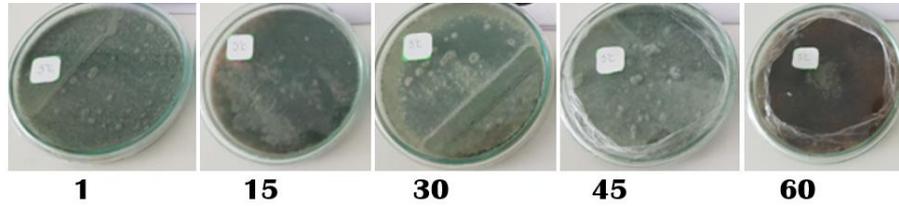


Figura 26. Estabilización resultante en el tratamiento dos.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- La caracterización físico química del sustrato, elaborado a partir de los residuos vegetales heterogéneos, contiene elementos predominantes en forma de carbohidratos y fibra; siendo así, un sustrato conveniente para el crecimiento del hongo *Trichoderma spp*, ya que cumple con las exigencias requeridas por este.
- El factor de mayor influencia en la producción del hongo fue el tamaño de partícula, de lo que se concluye que con partícula de 5mm se obtiene $1,75 \times 10^{10}$ esporas/gramo de *Trichoderma asperellum*, en un periodo de 10 días.
- La fórmula generada mediante el análisis de regresión, permitió una predicción oportuna para la producción de biomasa de *Trichoderma asperellum* en sustratos de residuos vegetales heterogéneos.
- El método de estabilización a partir de agua destilada estéril para la biomasa, determina que a temperatura $21 \pm 2^\circ\text{C}$ la viabilidad máxima del hongo es de 15 días, mientras que a temperatura de 5°C el hongo permanece estable hasta 60 días.
- La investigación experimental permitió generar una alternativa de valorización biológica, hacia los residuos vegetales, mediante la producción de un hongo agricultor: *Trichoderma asperellum*, ya que se estableció condiciones de temperatura de incubación, tamaño de partícula de sustrato e inóculo y posteriormente su estabilidad hasta 60 días, por lo que se aceptan las hipótesis alternativas propuestas.

5.2 RECOMENDACIONES

- Durante la operación de fermentación, definir una variable más de estudio: el pH, puesto que mientras más control tenga esta operación, los resultados serán eficientes.
- Evaluación del potencial del hongo como agente antagónico de patógenos agrícolas con ensayos *in vitro* y posteriormente en pruebas de campo.
- Estudio de medios de cultivos para la conservación del hongo *Trichoderma ssp.* con fines de comercialización.
- Desarrollo de un plan de marketing para establecer la viabilidad de la comercialización del hongo.

BIBLIOGRAFÍA

- Agosin, E., & Aguilera, J. (2010). *Industrial production of active propagules of Trichoderma for agricultural uses*. Estados Unidos: Tylor & Francis. Inc. Bristol.
- AGROCALIDAD. (2017). *Agricultura Orgánica*. Quito.
- Akdi, K. (2016). *La aplicación del hongo Trichoderma spp.* Lima Perú.
- Agamez, E. Y., Zapata, R. I., Oviedo, L. E., & Barrera, J. L. (2008). Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma sp* . Evaluating solid fermentation processes and substrates for producing *Trichoderma sp* . spores. *Rev. Colomb. Biotecnol*, 10(2), 23–34.
- Arévalo, E., Cayotopa, J., Olivera, D., Gárate, M., Trigos, E., Costa, B., & Leon, B. (2017). Optimization of substrates for conidia production of *Trichoderma harzianum* By Solid Fermentation in the region of San Martin. Peru, 19, 135–144. Retrieved from <http://www.scielo.org.pe/pdf/ria/v19n2/a03v19n2.pdf>
- Argumedo, D., Alarcón, A., Ferrera, R., & Peña, J. J. (2009). Revisión / Review EL GÉNERO FÚNGICO. *Rev. Int. Contam. Ambient*, 25(4), 257–269. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v25n4/v25n4a6.pdf>
- Arias, E., & Piñeros, P. (2008). *Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de guasca y cruz verde*. Pontificia Universidad Javeriana. Retrieved from <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis226.pdf>
- Arnáiz, C., Isac, L., & Lebrato, J. (2000). Determinación de la biomasa en procesos biológicos. *Tecnología Del Agua*, 45–52.
- Arredondo, B. ; V. D. (2007). Concentración recuento celular y tasa de crecimiento. *Métodos y Herramientas Analíticas En La Evaluación de La Biomasa Microalgal*, (January 2007), 17–27.
- Agamez, E. Y., Zapata, R. I., Oviedo, L. E., & Barrera, J. L. (2008). Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de

- Trichoderma sp . Evaluating solid fermentation processes and substrates for producing Trichoderma sp . spores. *Rev. Colomb. Biotecnol*, 10(2), 23–34.
- Bagatolli, D. (2017). *Validación de un método alternativo para la conservación de bacterias*. Universidad Nacional de Cuyo.
- Bastidas, O. (2012). *Fórmula de la cámara de Neubauer*. Retrieved from <http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Formula-Camara-Neubauer-Concentracion.pdf>
- Bécquer, C. J., Lazarovits, G., Nielsen, L., Quintana, M., Adesina, M., & Quigley, L. (2015). Efecto de la inoculación con bacterias rizosféricas y Trichoderma en trigo (*Triticum aestivum* L .) Effect of the inoculation with rhizospheric bacteria and Trichoderma in wheat (*Triticum aestivum* L .), 38(1), 29–37.
- Bueno, L., & Gallardo, R. (1998). Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. *Rev Iberoam Micol*, 15, 166–168. Retrieved from <http://www.reviberoammicol.com/1998-15/166168.pdf>
- Basanta, R. (2007). *Sostenibilidad del reciclaje de residuos de la agroindustria azucarera*. *SOMENTA*, 14.
- Brito, R. (2006). *Fitosanidad - Protección de las plantas; trichoderma; plantas ornamentales; enfermedades de las plantas; metodos de control*. Habana - Cuba.
- Cárdenas, J. (2010). *Métodos de conservación y formulación de Trichoderma ssp*. La Habana.
- Castro, A., & Rivillas, C. (2012). *Trichoderma spp, modo de acción eficacia y usos en el cultivo del cafe*. Colombia.
- CCEEM. (2012). *Guia para la caracterizacion quimica, fisico - quimica y mecanica de los biomateriales*. Habana - Cuba.
- Centeno, R., & Pavone, D. (2015). *Producción de celulasas y biomasa del hongo Trichoderma utilizando lodo papelero como fuente de carbono*. Venezuela.

- Cevallos, F. (2014). *Gases de efecto invernadero de la agricultura*. Quito: El telégrafo.
- Chavez, E., Ortuño , N., & Mamani, P. (2012). *EL BIOL*. Colombia.
- Chavez, M., Rodriguez, L., Rodriguez, R., & Aguilar, C. (2009). *Aspectos básicos de la fermentación en medio sólido*. CienciAcierta.
- Cruz, F. M. (2014). *Desarrollo de un proceso de fermentación sólida para el hongo trichoderma asperellum en un fermentador de lecho fijo*. Bogotá - Colombia: Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ingeniería Química y Ambiental.
- Cruz Martínez, L. (2007). *Estandarización del proceso de producción masiva del hongo Trichoderma koningii Th003 Mediante Fermentación Bifásica a Escala Piloto*. Facultad de ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA FACULTAD DE CIENCIAS. [https://doi.org/10.1016/S0181-1584\(01\)01073-9](https://doi.org/10.1016/S0181-1584(01)01073-9)
- Cruz Mora, N. (2010). *Aprovechamiento Y Manejo De Desechos Orgánicos De Cocina Utilizando Microorganismos Eficientes De Montaña (Mem) Aislados De Dos Bosques Secundarios De Costa Rica*. Instituto Tecnológico Costa Rica. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Chen, H. (2013). *Modern Solid State Fermentation* (Primera). Beijing, China: Springer Dordrecht Heidelberg New York London.
- Dias, Y. (2018). *Municipio en campaña de control de plagas*. Loja: Nueva Loja.
- Dominguez, J. (2015). *Biol*. Mexico.
- Enriquez, L. (2015). *Producción y comercialización de leche en la zona 1*. Imbabura.
- Espinoza, F. (16 de Febreo de 2018). *Los fruticultores de la zona 1 fortalecen el manejo de desperdicos y residuos*. EL COMERCIO.

- FAO. (2013). *Utilización de un Sistema de Información Geográfica (SIG) en la Evaluación de la Erosión Actual de Suelos y la Predicción del Riesgo de Erosión Potencial*. Santiago de Chile.
- Fernández, V. O. (2011). *Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario*. Costa Rica.
- Fernández, D. A. (2014). Incidencia Del Tamaño De La Partícula En La Biodegradación De Residuos Sólidos Urbanos (Rsu), En El Tratamiento Mecánico Biológico (Tmb), *1*, 52.
- Grijalva, N. (2013). Degradación de residuos vegetales mediante inoculación con cepas microbianas. *Enfoque UTE*, 4(1), 1–13. <https://doi.org/10.29019/enfoqueute.v4n1.21>
- Gutiérrez Pulido, H. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. (P. Roing & L. Campa, Eds.) (Segunda Ed). Mexico: MCGRAW-HILL/INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.
- Gallardo, R., & Bueno, L. (1998). *Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril*. La Habana.
- García, A., & Fernández, B. (2016). *Características Físicas, Químicas y Biológicas del suelo*. La Habana - Cuba.
- García, I. (2010). *Valorización y reciclaje material*. Barcelona - España.
- Garza, B. (2013). *Lombricultura una alternativa viable y versátil que contribuye a mejorar los rendimientos en los cultivos de una manera sustentable*. Mexico.
- Gimeno, A. (2012). *Principales factores condicionantes para el desarrollo de los hongos y la producción de micotoxinas*. Florida - Estados Unidos.
- Gómez, T. (2017). *Evaluación de diferentes medios de cultivo y condiciones para la producción de conidios de TRICHODERMA SPP mediante fermentación en líquido y sólido*. Costa Rica: DSpace(v. 5.5).

- Gregori, P. (2017). *Regresión lineal y Análisis de Varianza*. España: Universidad de Castellón.
- Growland, J. (2014). *Modo de acción del Trichoderma spp.* España - Barcelona.
- Gutierrez, H. (2005). *Análisis y Diseño de experimentos*. Guanajato - Mexico: Mc Graw Hill.
- Guzman, R. (1970). *Micología Médica*. Bogota - Colombia.
- Hernández, A. N., Bautista, S., Velázquez, M., & Hernández, A. (2007). Uso de Microorganismos Antagonistas en el Control de Enfermedades Postcosecha en Frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25(1), 66–74. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v25n1/v25n1a9.pdf>
- Ibarra, J., & Rojas, P. (2016). Effect of operating parameters in the synthesis of magnetic nanoparticles for biomedical applications using a design of experiments 2k. *Nova Scientia*, 1, 158–180. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/ns/v8n17/2007-0705-ns-8-17-00157.pdf>
- INAMHI. (2015). *Boletín Climatológico Anual*. Ecuador.
- INEC. (2014). *Estadística de información ambiental del Ecuador*. Quito, Ecuador.
- INEC. (2017). *Censo de información Ambiental Económica en GADs del Ecuador*. Quito - Ecuador.
- INEC. (2018). *Estadística de información ambiental del Ecuador*. Quito - Ecuador: Dirección de estadística agropecuarias y ambientales.
- Infante, D. (2013). *Trichoderma spp. y su función en el control de plagas en los cultivos*. La Habana.
- Jimenez, E. (2011). *Aplicación de biol y fertilización química en la rehabilitación de pradera*. Ecuador.
- Lorenzo, M. E. (2002). *Prospección de hongos antagonistas en la provincia de Cienfuegos. Efectividad y posibilidades de reproducción de cepas nativas de Trichoderma ssp.* La Habana.

- López, R. (2011). *Detección y Cuantificación de Trichoderma harzianum* , y *Evaluación de su Actividad Biocontrol frente a la Fusariosis Vascular del Melón mediante la Aplicación de Herramientas Moleculares*. Universidad de Alicante. Retrieved from https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/22767/1/Tesis_Mondejar.pdf
- Lupión, B., Marín, J. I., & Tello, J. C. (2016). Evaluación de la conservación de dos preparados comerciales formulados a base de micromicetos del género..., (December), 1–4.
- Martínez, B., Infante, D., & Peteira, B. (2015). Taxonomía Polifásica y Variabilidad en el Género Trichoderma Polyphasic Taxonomy and Variability in the Genus Trichoderma. *Rev. Protección Veg. Número Especial (Diciembre, 30(5))*, 11–22. Retrieved from <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v30s1/rpv004s15.pdf>
- Mayo, S. (2017). *Evaluación de Trichoderma spp. en el control biológico de Rhizoctonia solani y la respuesta defensiva en plantas de alubia pertenecientes a la IGP “Alubia La Bañeza-León.”* Universidad de león. Retrieved from file:///C:/Users/HP/AppData/Local/Temp/Tesis.pdf
- Moreno, R. (2004). Recuento en cámara de Neubauer (u otro tipo de cámara), *1*, 3–4.
- MAE. (2010). *Programa ‘PNGIDS’ Ecuador*. Quito - Ecuador.
- Martinez , N., Gonzales, P., & Torres, A. (2014). *Guía Técnica para el aprovechamiento de residuos orgánicos*. Bogotá.
- Martinez, M. (2016). *Evaluación de aislados nativos de Trichoderma sp para el control de hongos patógenos del suelo en tomate*. Ciencias Naturales y Agropecuarias., 32-42.
- Morales, X. (2010). *Plagas y Residuos*. Guayaquil.
- Myres, R., & Montgomery, D. (2009). *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*. New York.

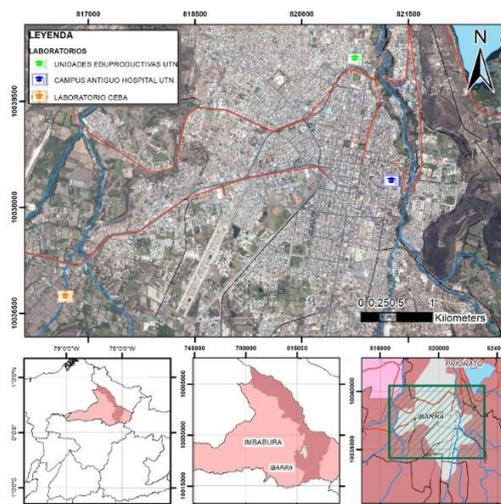
- Nakasone, k., Peterson, S., & Jong, S. (s.f.). *Biodiversity of Fungi Inventory and Monitoring Methods*. Preservation and Distribution of Fungal Cultures, 37-47.
- Nélida, M. (2013). *Organismos que actúan durante las diferentes etapas del compostaje*. Venezuela.
- Nieto, C. A. (2013). *Evaluación comparativa de la actividad del Trichoderma spp., con el Biocatalizador Microbiano para la descomposición de la materia orgánica en desechos sólidos domiciliarios en la ciudad de Guayaquil*. Guayaquil - Ecuador
- Obremo. (2012). *Biomasa y sus ventajas*. Valencia - España.
- Oviedo, M. (2010). *Salud laboral y medio ambiente*. Valencia - España.
- Papavizas, G. (1985). *Trichoderma and Gliocladium: biology, ecology, and potential for biocontrol*. Annual Review of Phytopathology, 23 - 54.
- Perez, J. (2011). *Conservación de bacterias*. Colombia.
- Ponzo, H. (2010). *Control de plagas y saneamiento ambiental en el relleno sanitario*. Sucumbios.
- Páramo, L., & Hernández, J. (2017). Caracterización de *Trichoderma viridae* y *t atroviridae* aislados de monumentos históricos en ciudad de México . Characterization of *Trichoderma Viridae* And *T Atroviridae* Isolated From Historical Monuments In Mexico City ., 30(02), 60–72.
- Poalacin, J. M. (2015). *Estudio del adecuado crecimiento del hongo Trichoderma spp. en sustrato sólido*. Universidad Central del Ecuador.
- Prada Ospina, R. (2012). *Alternativa de aprovechamiento eficiente de residuos biodegradables: el caso del almidón residual derivado de la industrialización de la papa Bogotá*. Bogotá.
- Ramirez, S. G. (2012). *Aprovechamiento de residuos Agroindustriales, cascarilla de arroz y resisuos de papa, para la producción de Trichoderma* . Ambato - Ecuador.

- Rizo, E. (2014). *Investigación sobre el uso de microorganismos benéficos en la raíz de aguacate*. Distrito Federal - Mexico.
- Román, P. (2013). *Manual de compostaje del agricultor. Experiencias en América Latina*. Chile.
- Romero, O. (2015). *Producción de Trichoderma en diferentes sustratos agrícolas*. Argentina.
- Rendón, A. F. M. (2010). Caracterización de Residuos Sólidos. *Cuaderno Activa*, (4), 67–72. Retrieved from <http://ojs.tdea.edu.co/index.php/cuadernoactiva/article/view/34>
- Reyes, P. (2007). *Análisis de regresión*. Universidad Iberoamericana A.C.
- Romero, O., Lara, M. H., Angel, M., Huato, D., Hernández, F. D., Alfonso, D., & Victoria, A. (2009). Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles The characteristics of *Trichoderma harzianum* as a limiting agent in edible mushrooms, (2), 143–151.
- Saldaña, C., Hernandez, P., Messina, S., & Pérez, J. (2013). Caracterización física de los residuos sólidos urbanos y el valor agregado de los materiales recuperables en el vertedero el Iztete, de Tepic-Nayarit, México, 29, 25–32. Retrieved from <https://www.redalyc.org/html/370/37029665003/>
- Sarmiento Rangel, Y., Vergel, A. H., & Cárdenas Caro, D. M. (2013). Evaluación de la estabilidad de *Trichoderma* sp. y *Azotobacter* sp. conservados por diferentes métodos. (Spanish). *Evaluation of the Stability of Trichoderma Sp. and Azotobacter Sp. Preserved by Different Methods. (English)*, 15(1), 150–158. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fua&AN=91508184&lang=es&site=ehost-live>
- Stazonelli, E. A., Yasem De Romero, M. G., & Ploper, L. D. (2017). Evaluación de sustratos para la producción de esporas de *Trichoderma* y estudio del crecimiento en arroz de las cepas antagonistas TPT03, TPT02, MRT35 y MRT40 Substrate evaluation for *Trichoderma* spore production and rice

- growth study in TPT03, TPT02, MRT3. *Rev. Agron. Noroeste Argent*, 37(1), 57–66. Retrieved from <http://www.scielo.org.ar/pdf/ranar/v37n1/v37n1a06.pdf>
- SENPLADES. (2013). *Agenda Zonal de la Zona 1 del Ecuador*. Quito - Ecuador.
- Sergio, O., Ortiz, C., & Gutierrez, M. (2008). *Aplicación directa de residuos sólidos orgánicos*. Cali - Colombia.
- Sierra, B. E. (2008). Micorriza arbuscular. Recurso microbiológico en la agricultura sostenible. *Tecnología en Marcha*, 191-201.
- Tejada, H. (2002). *Control de calidad y análisis de alimentos*. Mexico, D.F.
- Torres, L., Martínez, C., Rodríguez, I., & Lobania, E. (2017). *Caracterización del producto de la fermentación sólida de Trichoderma harzianum sobre el bagazo de caña*. Cuba.
- TRICHODEX. (2016). *Campos de aplicación del Trichoderma spp*. Lima - Perú.
- Vásquez, J. (2010). *CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y PRODUCCIÓN DE Trichoderma harzianum Y Trichoderma viride EN CULTIVO ARTESANAL*. Pontificia Universidad Javeriana. Retrieved from <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8662/tesis615.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Yepes, S. M., Montoyo, J., & Orozco, F. (2015). VALORIZACIÓN DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES – FRUTAS – EN MEDELLÍN Y EL SUR DEL VALLE DEL ABURRÁ, COLOMBIA, 61(1), 4422–4431.

ANEXOS

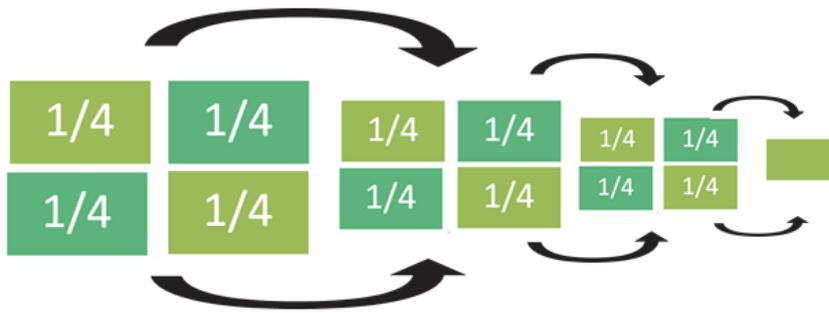
Anexo 1 Localización de la experimentación



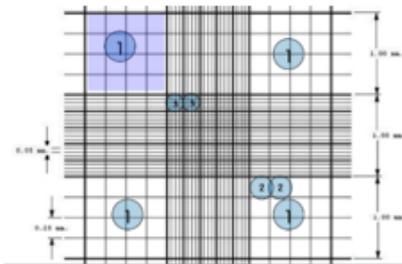
Anexo 2 Ficha Técnica de *Trichoderma asperellum*.

 FICHA TÉCNICA CEPA PURA DE TRICHODERMA	
ELABORADO POR	Dr. C. Julio Pineda Insuasti, PhD
NOMBRE DEL PRODUCTO	CEPA PURA DE TRICHODERMA SPP. (Go)
MARCA DEL PRODUCTO	BIODIVERSITY®
UNIDAD PRODUCTIVA / EMPRESA	UNIDAD PRODUCTIVA: PINEDA INSUASTI JULIO AMILCAR RUC/RISE: 1001914470001 REGISTRO ÚNICO DE MIPYMES/ R.U.M. No. 1001914470001 CATEGORIZACIÓN MIPRO: MICRO EMPRESA DIRECCIÓN: Periférico Sur s/n, Fincas San Agustín, San Antonio, Cel. 099 5797813, info.biodiversity@gmail.com , www.biodiversity.com.ec , Ibarra-Ecuador.
PÉRMISO DE FUNCIONAMIENTO	CERTIFICADO DE REGISTRO DE EMPRESA DE FERTILIZANTES, ENMIENDAS DE SUELO Y PRODUCTOS AFINES DE USO AGRÍCOLA. Registro Agrocalidad: 181-RD-FABRICANTE-DISTRIBUIDOR-AGR
ORIGEN DE LA CEPA	Banco de Recursos Genéticos Microbianos (BRGM-CEBA (www.ceba.org.ec)).
IDENTIFICACIÓN	Identificación molecular de microorganismos (Extracción de ADN, Amplificación de barcode, secuenciación estándar, ensamblaje de productos de PCR y búsqueda en base de datos).
ESPECIE	<i>Trichoderma asperellum</i>
DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO	Go. Cepa de trichoderma spp. se designa con la escala Pineda J., lo que significa la expansión del micelio que cubre una placa petri de 100 x 15 mm (aproximadamente 1000,0-2000,0 divisiones celulares). La primera vez que una especie silvestre es cultivada con tejidos, la edad se denomina Go. A continuación, cada crecimiento sucesivo sobre la superficie de la placa de petri se describe en incrementos de G1, G2, G3, etc.
COMPOSICIÓN NUTRICIONAL	Solicitar al BRGM
PRESENTACIÓN Y EMPAQUES	Producto cultivado en caja Petri de 100 mm.
CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS	
Color: verde intenso Olor: característico Sabor: NA Aspecto: sólido Medio: Agar Extracto de Malta	
REQUISITOS MÍNIMOS Y NORMATIVIDAD	Producido bajo la norma de BIOSEGURIDAD III.
TIPO DE CONSERVACIÓN	Conservar refrigerada a temperatura de 4 °C.
CONSIDERACIONES PARA EL ALMACENAMIENTO	Almacenar en lugar fresco, limpio, alejado de la luz.
FORMULACIÓN	<i>Trichoderma</i> spp., cultivado en agar extracto de malta con 99,99% de pureza.
PROCESO DE PRODUCCIÓN	Preparación del medio de cultivo, inoculación a partir de cepa liofilizada, incubación, empaquetado y envío a todo el territorio nacional.
VIDA ÚTIL ESTIMADA	12 meses a partir del día de su elaboración.
INSTRUCCIONES DE USO	Cepa de <i>Trichoderma</i> de alta pureza, utilizada para la producción de células filamentosas (micelios) o esporas para control biológico de plagas o metabolitos secundarios enzimáticos.

Anexo 3 Técnica de cuarteo por volumen



Anexo 4. Fórmulas en cámara de Neubauer



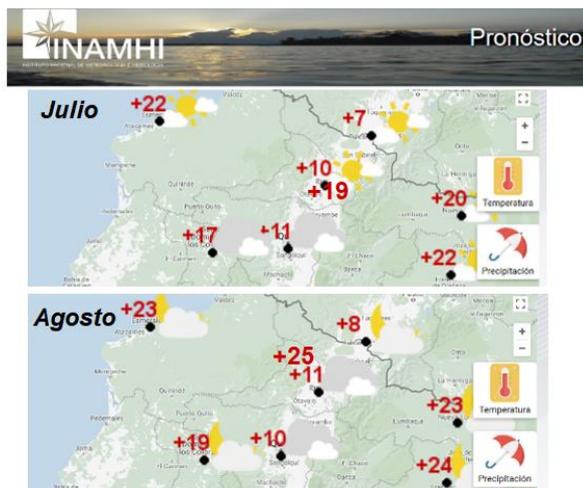
- (1) $Concentración\ celular = \frac{Total\ de\ células\ contadas}{Número\ de\ cuadros\ contados} \times 10000 \times dilución$
- (2) $Concentración\ celular = \frac{Total\ de\ células\ contadas}{Número\ de\ cuadros\ contados} \times 160000 \times dilución$
- (3) $Concentración\ celular = \frac{Total\ de\ células\ contadas}{Número\ de\ cuadros\ contados} \times 250000 \times dilución$

Anexo 5 Software Sitrad – Parámetros de control en el proceso de secado

The screenshot displays the Sitrad software interface for an MT-530 Super unit. The interface is divided into several sections:

- Status:** Online
- Alarmas:** 1 - Sensor 1 desconectado, 2 - Sensor 2 desconectado, 3 - Alarma en el auxiliar, 4 - Alarma en el buzzer, 5 - Tiempo salida activa.
- Temperatura (°C):** 69.2
- Humedad (%HR):** 8.9
- Termostato (°C):** Setpoint: 69.1, Histéresis: 0.2
- Humidistato (%UR):** Setpoint: 66.0, Histéresis: 5.0
- Auxiliar (Alarma):** Inf: -10.0 °C, 0.0 %HR; Sup: 70.0 °C, 100.0 %HR
- SALIDAS:** THERM, HUMID, AUX, BUZZ (all inactive).
- Unidad en realce:** Estación 1
- MT-530 Super:** Versión 5
- Gráfico:** A line graph showing temperature (red line) and humidity (blue line) over time. The x-axis represents time from 11:00:00 to 11:00:00, and the y-axis represents temperature and humidity values.

Anexo 6 Ibarra-Reporte climatológico del mes: Julio y Agosto



Anexo 7. Descripción del proceso de producción de *Trichoderma asperellum*.



Fotografía 1 Recolección de materia prima



Fotografía 2 Selección del material inorgánico presente



Fotografía 3 Lavado



Fotografía 4 Secado



Fotografía 5 Trituración



Fotografía 6 Caracterización Visual



Fotografía 7 Hidratación



Fotografía 8 Esterilización



Fotografía 9 Inoculación



Fotografía 10 Incubación



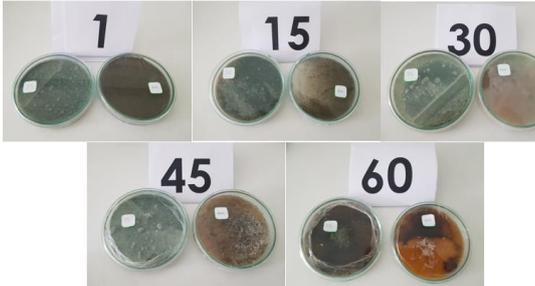
Fotografía 11 Recuento Celar

Anexo 8. Matriz de resultados experimentales

Combinación	N° Bloque	Temperatura	Tamaño de Partícula	Inóculo	Resultado ml	In
A2B2C1	1	33	5	5	1,61E+10	23,50
A2B1C2	1	33	1	10	3,53E+09	21,99
A1B1C2	1	23	1	10	2,69E+09	21,71
A2B1C1	1	33	1	5	2,53E+09	21,65
A1B2C1	1	23	5	5	1,05E+10	23,08
A1B2C2	1	23	5	10	1,14E+10	23,16
A1B1C1	1	23	1	5	2,30E+09	21,56
A2B2C2	1	33	5	10	1,69E+10	23,55
A1B2C2	2	23	5	10	1,57E+10	23,47
A2B2C2	2	33	5	10	1,74E+10	23,58
A1B2C1	2	23	5	5	1,06E+10	23,09
A2B1C2	2	33	1	10	3,03E+09	21,83
A1B1C2	2	23	1	10	2,69E+09	21,71
A2B1C1	2	33	1	5	2,63E+09	21,69
A1B1C1	2	23	1	5	2,49E+09	21,64
A2B2C1	2	33	5	5	1,58E+10	23,48
A2B1C1	3	33	1	5	2,23E+09	21,52
A1B2C2	3	23	5	10	1,55E+10	23,47
A1B1C1	3	23	1	5	2,09E+09	21,46
A2B2C1	3	33	5	5	1,56E+10	23,47
A1B1C2	3	23	1	10	2,48E+09	21,63
A2B2C2	3	33	5	10	1,81E+10	23,62
A2B1C2	3	33	1	10	3,18E+09	21,88
A1B2C1	3	23	5	5	1,08E+10	23,10

Fuente: Autor

Anexo 9. Descripción del proceso de estabilización de *Trichoderma asperellum*.

 <p>Fotografía 12 Selección del tratamiento con mayor cantidad de esporas/g de <i>Trichoderma asperellum</i></p>	 <p>Fotografía 13 Pesado en gramos de la muestra inicial</p>
 <p>Fotografía 14 Dilución</p>	 <p>Fotografía 15 Filtrado</p>
 <p>Fotografía 16 Llenado de la dilución</p>	 <p>Fotografía 17 Incubación a 2 temperaturas: 5°C y Ambiente (23±3)</p>
 <p>Fotografía 18 Siembra</p>	 <p>Fotografía 19 Cepa Viable de <i>Trichoderma asperellum</i>.</p>

