



**Tecnologías agroecológicas para la
agricultura familiar**



PRODUCCION ARTESANAL DE TRICHODERMA



Nancy Sivila y Susana Alvarez

Jujuy. 2013







***Producción artesanal de
Trichoderma.***

Tecnologías agroecológicas para la agricultura
familiar.

Sivila Nancy y Alvarez Susana

Jujuy-Argentina

2013

Alvarez, Susana Edith

Produccion artesanal de trichoderma / Susana Edith Alvarez y Nancy Sivila. - 1a ed. - San Salvador de Jujuy: Universidad Nacional de Jujuy. Universitaria de Jujuy. Facultad de Ciencias Agrarias, 2013.

E-Book.

ISBN 978-950-721-443-1

1. Agricultura Familiar. I. Sivila, Nancy II. Título

CDD 630

¹ Alumna becaria CIN 2012-2013

² Directora de beca CIN

Experiencias realizadas en el marco del proyecto SECTER Cod. 08/A129 y del Proyecto de experimentación adaptativa para la agricultura familiar. Financiado por el MAGP, Subsecretaria de Agricultura Familiar: “Investigación adaptativa con la cooperativa Prosol de agricultores familiares de la Quebrada de Humahuaca, para la obtención de sopas de hortalizas y cereales andinos; a partir de tecnología agroecológica y agregado de valor en forma semiartesanal”.

Índice

Presentación	Pag 10
SECCION 1:	
Introducción.....	13
Control Biológico de Enfermedades.....	14
Microorganismos Antagonistas.....	17
Características de <i>Trichoderma</i>	18
Mecanismos de Acción.....	20
SECCION 2:	
Producción de <i>Trichoderma</i>	25
Etapas en el Proceso de Producción de <i>Trichoderma</i>	27
Control de Calidad de <i>Trichoderma</i>	36
Bibliografía.....	45



Presentación

No hay duda de que la humanidad necesita de un paradigma alternativo de desarrollo agrícola, donde se fomente una agricultura biodiversa, resiliente, sostenible y socialmente justa. La base de estos nuevos sistemas son los distintos estilos agrícolas ecológicos desarrollados por agricultores familiares de distintas partes del mundo. Sistemas que usualmente son intensivos en conocimientos ancestrales, pero que no siempre resultan eficaces o aplicables. La agroecología como nuevo paradigma viene a revitalizar éstos saberes, a validarlos, adaptarlos y/o incrementarlos científicamente. Reconociendo que para lograrlo se requiere de un acompañamiento de medidas políticas en donde los agricultores puedan acceder a recursos fundamentales como la tierra, semilla, agua, crédito, y la posibilidad de optimizar el funcionamiento de sus parcelas mediante tecnologías agroecológicas apropiadas. En éste sentido la presente publicación propone el desarrollo de una tecnología que con una capacitación simple en ciertas destrezas, puede ser autogenerada por el propio agricultor, tecnología probada científicamente para el manejo de enfermedades de origen fúngico de muchos cultivos, con potencialidades promotoras de crecimiento en las plantas; un preparado artesanal de un agente de control biológico (*Trichoderma spp*) como insumo alternativo a los fungicidas químicos. Sabiendo que su uso o aplicación no se refiere simplemente a una sustitución de insumo (sustituir fungicida químico por fungicida biológico) sino que implica la promoción en nuestras parcelas de una serie de procesos que de forma integral impactaran en la sanidad, rendimiento, calidad, etc.

El documento se divide en dos secciones, la primera que tiene entre sus objetivos exponer de forma simple las bases en las que se sustenta la tecnología propuesta y una segunda sección donde se describe la forma de producción de *Trichoderma*, basado en experiencias locales compartidas muchas veces con agricultores familiares de la región.

Esperando que éste aporte pueda ser útil a estudiantes y técnicos extensionistas, pero por sobre todo a los agricultores con quien compartimos saberes y la ideología de una agricultura basada en la vida, que sea una granito de arena más para incrementar la soberanía tecnológica, que junto a la soberanía alimentaria y energética representan los objetivos fundamentales de la agroecología.

Sección I

Introducción

En la agricultura convencional moderna producto de la revolución verde, los fungicidas son la principal herramienta empleada para el control de hongos fitopatógenos. Dichos pesticidas son sustancias químicas que producen innumerables efectos indeseados sobre el ecosistema, induciendo a la generación de microorganismos resistentes o “pestes”, persistencia ambiental de residuos tóxicos, contaminación de suelos y recursos hídricos, lo cual altera el equilibrio ecológico.

Una de las alternativas más promisorias para disminuir el impacto ambiental causado por el frecuente uso de productos químicos para el control de plagas y enfermedades de plantas se centra en la utilización de agentes de control biológico. Dentro de estos agentes se destacan los hongos del género *Trichoderma*.

Las especies del género *Trichoderma* son los antagonistas más utilizados a nivel mundial debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aisladas y cultivadas, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos y a que no son patógenas de plantas. *Trichoderma* puede estar en la rizósfera, colonizar y proteger las raíces de las plantas, o mediante aplicaciones foliares prevenir enfermedades del folaje en un amplio rango de cultivos.

La multiplicación de *Trichoderma*, se puede realizar en forma artesanal o industrial, implementando distintas técnicas de fermentación líquida y/o sólida.

Entre los sustratos naturales para la producción de éstos hongos antagonistas se encuentran granos de trigo, avena, cebada, centeno, arroz, maíz, soya, cabecilla de arroz y salvado de trigo, inclusive desechos de los propios sistemas productivos como paja.

Las experiencias de producción artesanal de *Trichoderma* en distintos países, se han basado en el uso del arroz como sustrato; el presente manual tiene como objetivo transmitir las experiencias en la producción artesanal de trichoderma sobre sustratos alternativos al arroz, tales como el trigo, avena y los pseudocereales quinoa y amaranto. Utilizando como contenedores botellas de vidrios y/o bolsas de polietileno, insumos económicos y fáciles de adquirir.

Control Biológico de Enfermedades

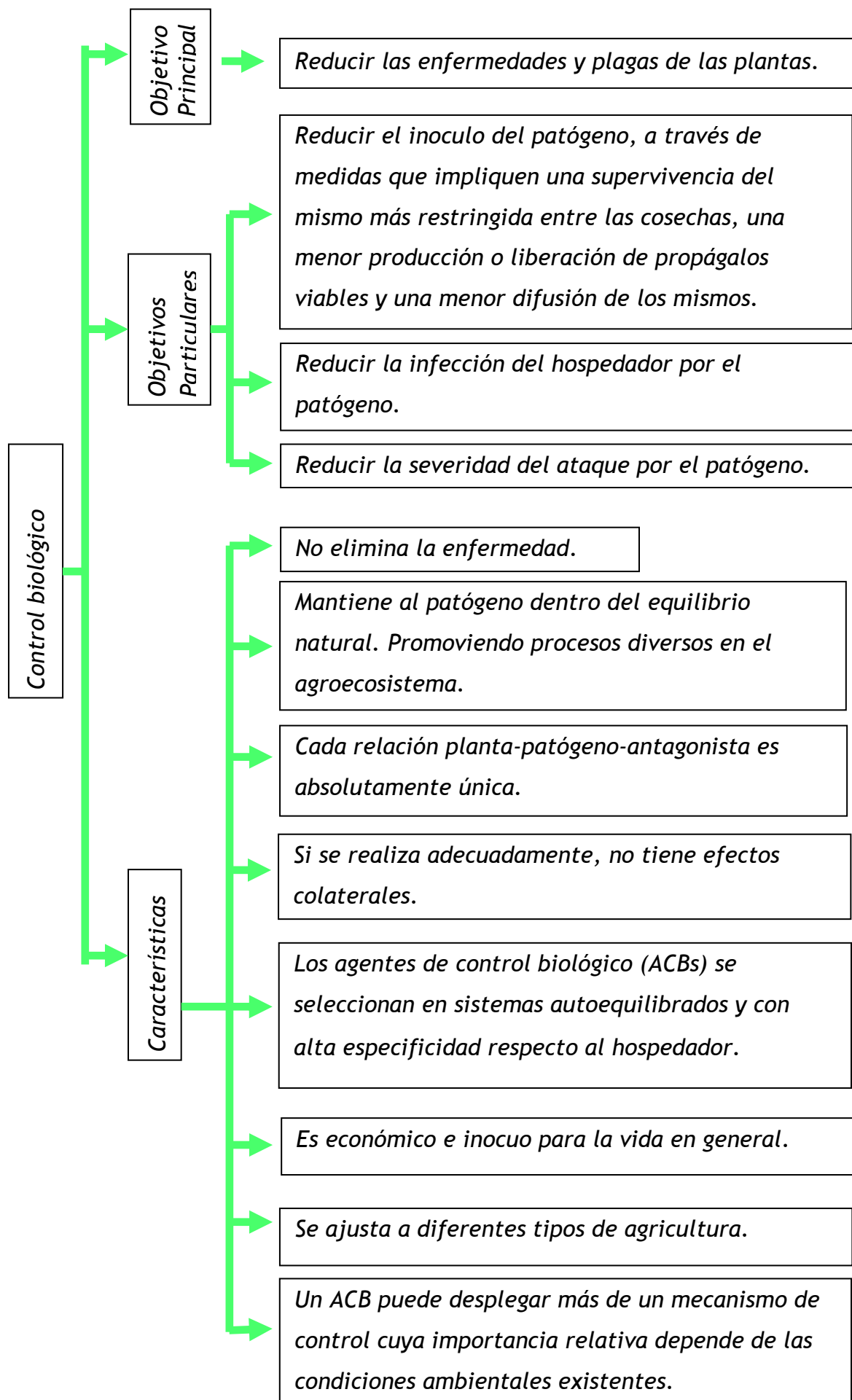
Baker y Cook (1974) definen el control biológico como “la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades productoras de enfermedad de un patógeno o parásito, en su estado activo o durmiente, mediante uno o más organismos, lograda de manera natural o a través de la manipulación del ambiente, del huésped o del antagonista, o por la introducción masiva de uno o más antagonistas.

Por su parte, el agente biocontrolador se define como el microorganismo (hongo o bacteria) con capacidad de limitar o evitar de manera más o menos selectiva el crecimiento de un hongo patógeno, sin interferir en el crecimiento de la planta.

Hongos del genero *Trichoderma* están entre los más promisorios agentes de biocontrol por sus propiedades antagónicas frente a los hongos patogénicos de plantas, sobre todo porque ellos pueden estar en la rizósfera y colonizar y proteger las raíces de las plantas, como también colonizar flores, semillas y/o hojas reduciendo daños de enfermedades en un amplio rango de cultivos.

Trichoderma puede afectar distintas estructuras de los hongos patógenos: conidios, esclerocios, hifas. Otra de las ventajas es la amplia gama de hongos patogénicos que puede controlar, entre los que se encuentran hongos de suelo que causan enfermedades radiculares y/o vasculares, y hongos que producen manchas foliares, mildius o tizones.

Se presenta a continuación un cuadro sinóptico con las características del control biológico y un cuadro que resume las ventajas y/o inconvenientes a superar en un proceso de transición, de una agricultura industrial hacia una horticultura agroecológica.



Ventajas del Control Biológico (CB)	Inconvenientes a superar
<ul style="list-style-type: none">▪ El CB es muy barato y puede autopropagarse.▪ El CB tiene efectos suaves sobre el equilibrio edáfico y no elimina los organismos que ayudan a tener al patógeno controlado.▪ No tiene efectos dañinos para el hombre, otros cultivos, árboles, animales, vida silvestre y otros organismos beneficiosos.▪ No se han descrito resistencias a los ACBs.▪ El CB resulta seguro. Los ACBs no se acumulan en la cadena alimentaria▪ El CB es efectivo en ambientes naturales y artificiales.	<ul style="list-style-type: none">▪ El ACB universal no existe.▪ No hay una conciencia generalizada del consumo de productos libres de residuos de agroquímicos. Aspecto éste importante en la adopción de alternativas biológicas entre otras.▪ Suficiente formación a técnicos y/o extensionistas rurales en manejo agroecológico en general y de CB en particular.

Microorganismos Antagonistas

Entre los microorganismos antagonistas más estudiados y/o desarrollados comercialmente se encuentran las bacterias de los géneros, *Pseudomonas* y *Bacillus* y hongos de los géneros *Gliocladium* y *Trichoderma*.

El género *Trichoderma* tiene cinco especies consideradas como antagonistas: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma pseudokoningii* y *Trichoderma viride* (García y otros, 2006).

En general, los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de éstos es una característica importante para su selección como agentes de control biológico.

Si el antagonista posee varios modos de acción reduce los riesgos de desarrollo de resistencia en el patógeno. Este riesgo de resistencia también se reduce mediante el uso de combinaciones de antagonistas con diferente modo de acción.

Cacterísticas de *Trichoderma spp.*

El género *Trichoderma* fue identificado en 1871 y ha sido ampliamente estudiado, se encuentra de manera natural en un número importante de suelos agrícolas. Lo podemos encontrar en diferentes zonas y hábitats, especialmente donde existe materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, así como en residuos de cultivos. Su desarrollo se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, las cuales coloniza rápidamente. Esta capacidad de adaptación a diversas condiciones ambientales y sustratos confiere a *Trichoderma* la posibilidad de ser utilizado en diferentes suelos, cultivos, climas y procesos tecnológicos para su multiplicación.

Trichoderma es un hongo anaerobio facultativo. La mayoría de las colonias de *Trichoderma* en su inicio tienen color blanco, después se torna a verde oscuro o amarillento, como consecuencia de una densa esporulación.

Trichoderma, produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y esporas “conidias”. Las esporas son los más viables de los propágulos empleados en programas de biocontrol. Estos cuerpos especializados se caracterizan por poseer una gruesa pared exterior, constituida por tres capas (endospora, epispora y perispora) que protegen el interior del conidio (protoplasto). Esta gruesa pared se diferencia de la pared celular de las células vegetativas del hongo (hifas y clamidosporas), las cuales son mucho más delgadas y no está formada por capas constitutivas como las esporas. La ventaja del conidio de poseer una pared celular gruesa es la posibilidad de aislarlo de su medio natural y que sobreviva a condiciones adversas, manteniéndolo en dormancia hasta que las condiciones sean propicias para la germinación.

En consecuencia, las conidias son verdaderas semillas que utiliza el hongo para colonizar nuevos sustratos y, en el caso de *Trichoderma*, es la principal producto a obtener en la producción comercial y/o artesanal.

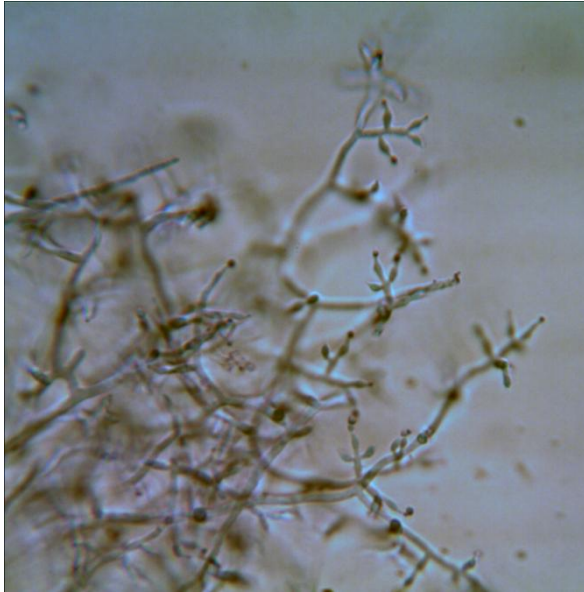


Imagen al microscopio óptico de *Trichoderma spp.*

Las necesidades nutricionales de *Trichoderma* son bien conocidas, es capaz de degradar sustratos muy complejos como almidón, pectina y celulosa entre otros, y emplearlos para su crecimiento gracias al gran complejo enzimático que posee (enzimas hidrolíticas como amilasas, pectinasas, celulasas y quitinasas entre otras). Así mismo, *Trichoderma* asimila como fuente de nitrógeno compuestos tales como aminoácidos, urea, nitritos, amoniaco y sulfato de amonio (Agamez Ramos y otros, 2008).

Trichoderma es un hongo con una alta capacidad de tolerar un amplio rango de temperaturas, presentando una amplia distribución ecológica. Los valores óptimos para su crecimiento y esporulación oscilan alrededor de los 25°C. Un factor importante a tener en cuenta durante la multiplicación es la conveniencia de periodos alternados de luz y oscuridad, que favorecen la colonización del hongo sobre diferentes sustratos sólidos.

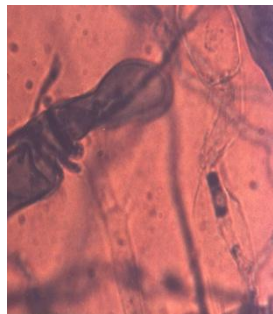
Mecanismos de Acción

Trichoderma presenta distintos mecanismos de acción para ejercer su antagonismo, dependiendo de las características de la cepa de trichoderma, del patógeno y las condiciones ambientales:

1. Micoparasitismo

Este proceso incluiría el crecimiento del antagonista hacia el patógeno, desarrollándose alrededor de éste o formando estructuras similares a ganchos o apresorios en la superficie del hospedero, que le permitirían, penetrar al interior (del patógeno) y por acción de enzimas líticas (quitinasa y β -1,3 glucanasa) degradar su pared celular.

Algunas cepas de Trichoderma tienen este comportamiento frente a hongos del suelo causantes del damping-off o mal de los almácigos. Localmente se ha comprobado este modo de acción en ensayos realizados con ciertas cepas de Trichoderma frente a Rizoctonia (Abdo y otros, 2008).



Imágen al microscopio óptico (x40) de hifas de *Rhizoctonia solani* con enrollamiento a modo de lazo por *Trichoderma spp.*

2. Competencia

Se puede definir competencia como el desigual comportamiento de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. Un factor esencial para que exista competencia es que haya "escasez" de un elemento, si hay exceso no hay competencia. La competencia más común es por nutrientes, oxígeno o espacio.

Materia orgánica en plantas (estiércol verde, compost) en suelo regula muchos patógenos como Pythium y Rhizoctonia por medio de saprofitos fuertemente competitivos presentes en los sustratos como Trichoderma spp.

3. Antibiosis

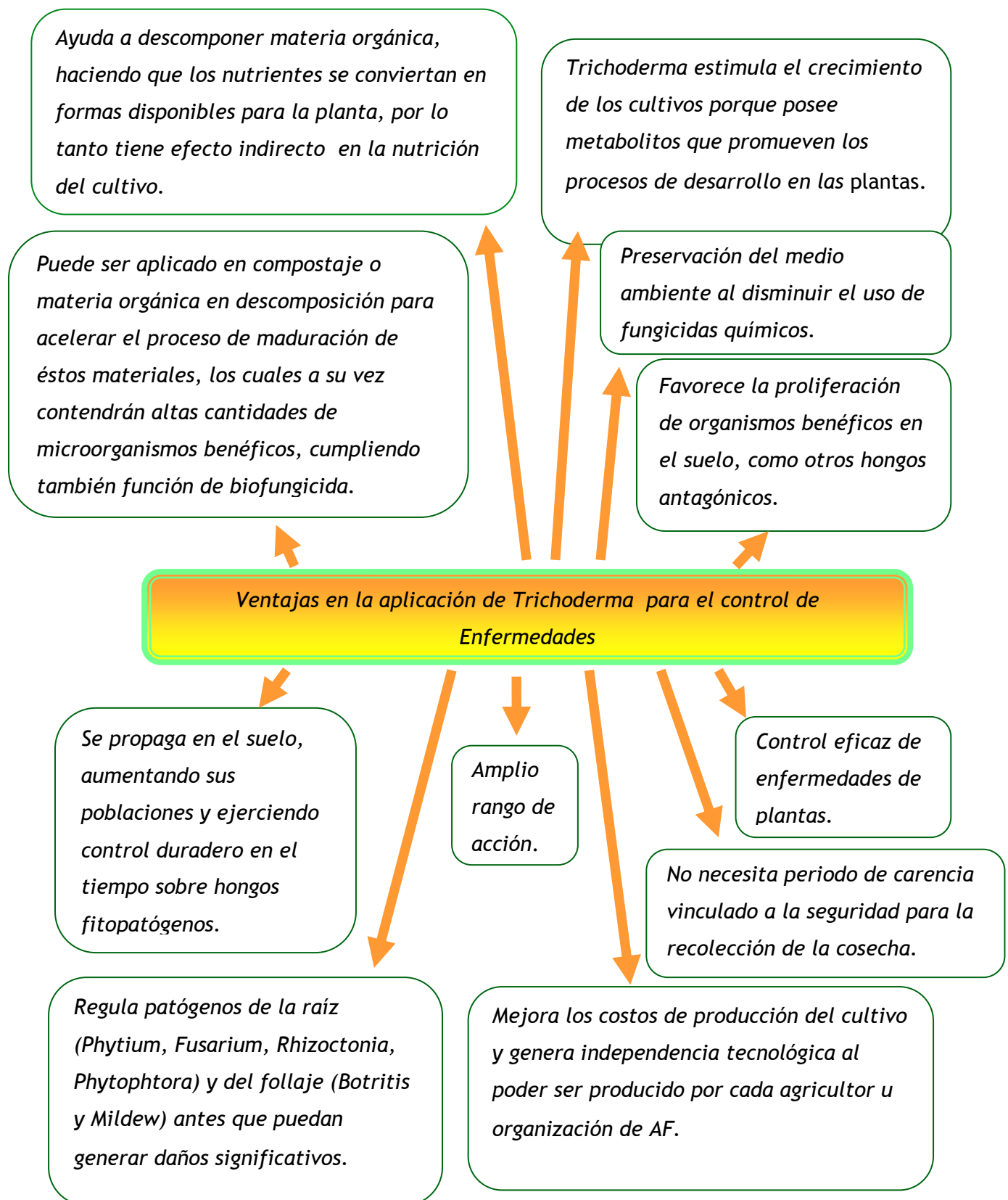
Se refiere a la producción por parte de un microorganismo de sustancias tóxicas para los microorganismos patógenos, las cuales actúan en bajas concentraciones (menores a 10 ppm.). Estos metabolitos volátiles y no volátiles, son del tipo antibiótico como: viridín, trichodermin, glioviridin, gliotoxin y harzaniolide. De todas estas micotoxinas la más representativa es Trichodermin que actuaría inhibiendo la actividad ribosomal de los patógenos, por lo tanto su reproducción (Ghisalberti y Sivasithamparam, 1991).

En el CEDAF (Centro de Estudios para el desarrollo de la Agricultura Familiar) se pudo comprobar el efecto de metabolitos tóxicos volátiles y no volátiles sobre el crecimiento y reproducción de diversos hongos de suelo, tales como Phytophthora spp, Fusarium, Sclerotium, Sclerotinia, Rhizoctonia a partir de cepas locales de Trichoderma.

Otros beneficios que cepas de trichoderma puede inducir en las plantas:

Conjuntamente a la acción supresora de patógenos, numerosos estudios señalan a *Trichoderma*, como promotor o estimulador del crecimiento de plantas. Inbar y otros (1994) han documentado que la aplicación de trichoderma a plantas promueve incremento de tamaño, aumento del área foliar y peso, el efecto positivo sobre la germinación de las semillas con un pretratamiento con el microorganismo. El grado de potenciación del crecimiento depende de la especie y cepa de *Trichoderma* utilizada.

La inducción de mecanismos de resistencia se refiere al incremento en la resistencia de una planta hacia los patógenos, después de que la planta ha estado expuesta o tratada con ciertos microorganismos o químicos que pueden inducirlo aún cuando éste ya no se encuentre presente. En los años 90, se ha descrito la capacidad de cepas de *Trichoderma* como agentes responsables de la síntesis de sustancias causantes de inducción de resistencia en plantas. Pudiendo colonizar y penetrar los tejidos de las raíces de las plantas, e inician una serie de cambios morfológicos y bioquímicos en las plantas, lo cual conlleva a la resistencia sistémica inducida de la planta (García y otros, 2006).



Sección II

Producción de *Trichoderma*

Las 4 formas principales de producción de hongos antagonistas son:

- 1-Cultivos bifásicos.
- 2-Cultivos líquidos agitados o fermentaciones líquidas.
- 3-Cultivos líquidos estáticos.
- 4-Cultivos sobre soporte sólido.

Éstos últimos representan formas de producción artesanal, que requiere equipamiento simple, de fácil acceso para los agricultores familiares, pero con una mayor demanda de operaciones manuales. La calidad de éstos formulados suele ser óptima, obteniéndose estructuras infectivas “conidios” con altos porcentajes de viabilidad y niveles de esporulación, característica esta última, que puede variar dependiendo del sustrato utilizado. Las hifas son poco resistentes al secado, por lo se busca en la multiplicación artesanal generar las condiciones necesarias para la producción de conidios.

“En Colombia, la producción de biopreparados de *Trichoderma* a

partir de procesos de fermentación artesanal emplea principalmente el arroz como sustrato. Otras experiencias citan a otros cereales como: trigo, avena, cebada, centeno, maíz o granos de soya, cabecilla de arroz y salvado de trigo. Los formulados pueden realizarse en frascos o en bolsas de polietileno.

Cultivos en Botellas

Ventajas:

- *Mejor control de la contaminación y de la calidad del formulado.*
- *Durante el proceso de esterilización del sustrato, éste se compacta mucho menos que en las bolsas, lo que mejora las condiciones para la multiplicación de *Trichoderma*.*

Desventaja:

- *No siempre se dispone de botellas con un diámetro de abertura que facilite la incorporación del sustrato y el vaciamiento de los mismos, una vez colonizado.*

Cultivos en bolsas

Ventajas:

- Ocupa menor espacio en el autoclave u ollas durante la esterilización del sustrato, en la estufa y/o estantes durante la incubación.
- Mayor volumen de producción en un solo lote, con el consiguiente ahorro de energía eléctrica y humana.
- Posibilidad de remover el contenido de la bolsa cada cierto tiempo.
- Envase más económico y/o fácil de conseguir.
- Manipulación más sencilla en el momento de utilizar.

Desventaja

- Mayor riesgo de contaminación.
- Manipulación muy cuidadosa ya que es muy fácil la ruptura de los envases y la pérdida del contenido.



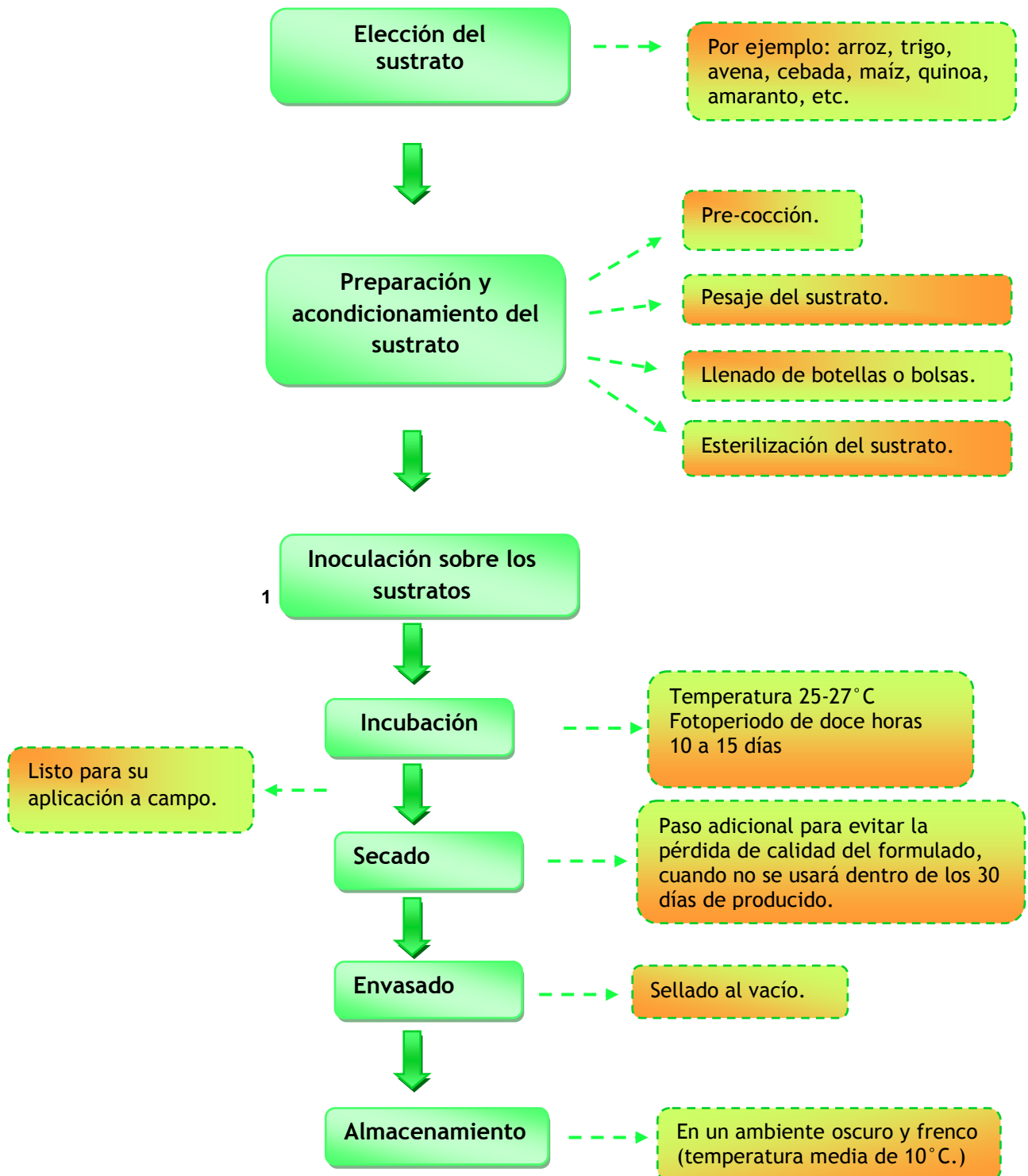
Cultivo de *Trichoderma* en bolsas.



Multiplicación de *Trichoderma* en botellas.

Etapas en el proceso de producción de *Trichoderma spp.*

El siguiente diagrama presenta las etapas durante el proceso de producción artesanal de hongos.



¹ El CEDAF dispone de cepas locales de *Trichoderma*, disponibles en forma gratuita para organizaciones de agricultores familiares.

Etapas en el proceso de producción de *Trichoderma*.

Se describen a continuación las etapas a seguir durante el proceso de producción artesanal de *Trichoderma*:

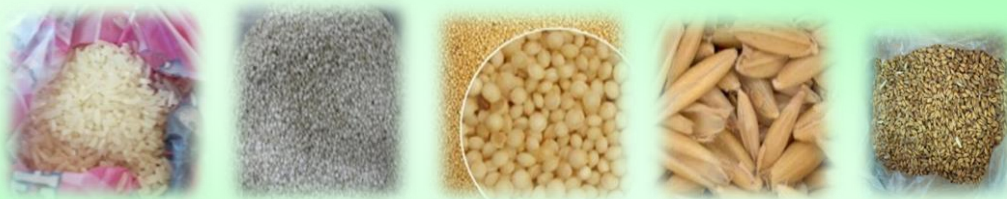
Etapa 1

Se debe realizar la elección del sustrato, resultando conveniente en caso de que los propios agricultores realicen la producción, un análisis de posibles sustratos que no incremente los costos. Experiencias locales han demostrado la excelente calidad de la producción de *Trichoderma* utilizando sustratos alternativos al arroz.

Cereales como el trigo, la avena y el maíz, y pseudocereales

como la quinoa y el amaranto, permiten por sus propiedades nutritivas (contenidos de proteínas, aminoácidos, hidratos de carbono, grasas, minerales etc.) ser utilizados como sustratos.

Los agricultores familiares de cada localidad o región contarán, entonces, con una diversidad de opciones de potenciales sustratos a utilizar para la producción del hongo antagonista.



Arroz, quinoa, amaranto, avena y trigo

Desechos o descartes de producciones realizados por los propios agricultores pueden probarse como sustratos alternativos para la producción de *Trichoderma*.

Etapa 2

El acondicionamiento del sustrato, en el caso de emplearse granos, puede variar en relación al tiempo de pre-cocción o hervor inicial, que estará en función de las características del grano (tamaño, grano refinado o pelado, integral, etc.)

1-Colocar sobre fuego una olla con agua. Al alcanzar el punto de ebullición agregar el sustrato y controlar el tiempo de hervor. Si se

utiliza arroz pelado, quinoa o amaranto se requiere de solo 5 minutos, mientras que si se trata de trigo o avena integral necesitaremos 40 minutos.

2-Cumplido el tiempo, escurrir el sustrato inmediatamente y colocarlo en bandejas o sobre una superficie plana, dejando que oree, de forma que los granos queden sueltos.



Preparación del sustrato

El tiempo de pre cocción debe ser suficiente como para ablandar el tegumento de los granos y obtener una óptima hidratación de los mismos.

Se debe tener en cuenta que la fermentación sólida es un proceso que involucra sólidos en

ausencia parcial o total de agua libre; sin embargo, el sustrato debe tener la humedad suficiente para permitir el crecimiento del microorganismo y que se lleven a cabo todos sus procesos metabólicos. Una baja humedad puede inhibir el desarrollo del

microorganismo al no poner la suficiente cantidad de nutrientes en solución para ser usado por éste, además de la poca resistencia a la desecación que tienen los hongos en el periodo activo de crecimiento micelial, así también,

Etapa 3

Cuando se trabaja en forma artesanal, no se aconseja el acondicionamiento del sustrato en envases o volúmenes grandes, debido a que usualmente no se dispone de un autoclave, no lográndose una esterilización eficiente a baño de María. Se debe prestar especial cuidado durante la etapa de esterilización, de manera de asegurar que el sustrato que usaremos para la multiplicación de *Trichoderma* quede completamente libre de otro tipo de microorganismos, de no ser así, la producción se contaminará no resultando apta para su uso a campo.

Durante ésta etapa, se pueden utilizar botellas de vidrio de 500 mililitros (que tengan una abertura de al menos 3 centímetros de diámetro) o bolsas de polietileno. Las botellas deben lavarse con

un exceso de humedad provoca baja disponibilidad de oxígeno y por ende pobre desarrollo del microorganismo, además de que el sustrato se compacta impidiendo la colonización total del mismo.

jabón o detergente, luego se las sumerge en agua con lavandina y finalmente se enjuagan nuevamente con agua.

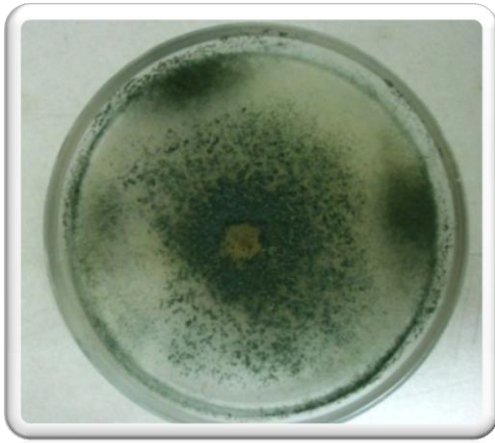
En botellas de vidrio de estas características se coloca 100 gramos de sustrato pre cocido y 50 gramos en el caso de utilizarse bolsas pequeñas. Cuando se utilizan botellas se cubre la boca de la misma, confeccionando un tapón de algodón y un capuchón de papel de diario el cual queda asegurado a la botella por medio de un piolín. De tratarse de bolsas de polietileno estas son cerradas con una termo selladora o con cinta de pegar. La esterilización del material se puede realizar en olla a presión, en una olla a baño de María (30-40 minutos) o de disponerse de autoclave, durante 10 minutos a 120°C.



Etapa 4

Esta etapa no es más que la siembra del hongo antagonista o sea de *Trichoderma*, en el sustrato ya esterilizado. Junto a la etapa anterior, representa los momentos del proceso de producción, en que se debe prestar especial cuidado, a modo de asegurar la calidad del

producto final. Para la inoculación de *Trichoderma* en los sustratos, se requiere de un cultivo puro del hongo, insumo que el CEDAF (Centro de Estudios para el Desarrollo de la Agricultura Familiar) puede facilitar de forma gratuita a organizaciones de AF.

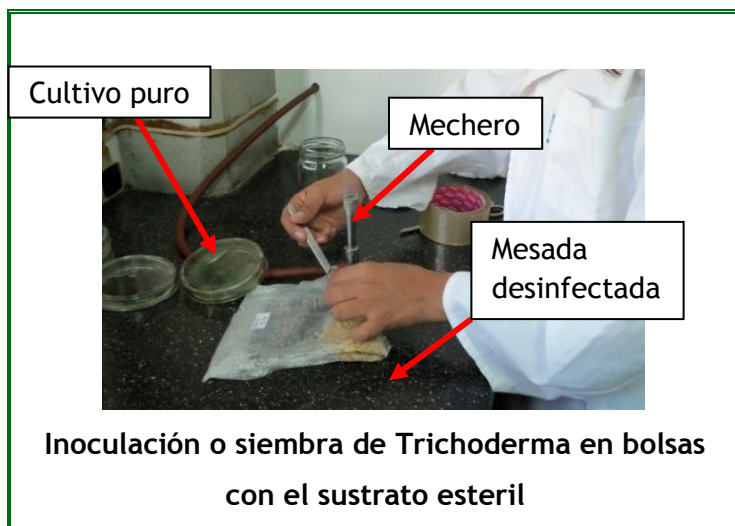


Cultivo puro de *Trichoderma spp.*

Cada botella o bolsa con el sustrato esterilizado, se inocula con una sección de 1cm² del medio de cultivo colonizado por el hongo, teniendo la precaución de realizarlo en un lugar donde no haya corriente de aire (para evitar la contaminación), cerca de un mechero y sobre una mesada previamente desinfectada con alcohol o lavandina.

El éxito del biocontrol depende en gran parte de la capacidad de los antagonistas de proliferar bajo condiciones del ambiente, por esta razón el uso de cepas nativas con acción fúngica en biocontrol puede ser ventajoso comparado con formulados comerciales.

En la provincia de Jujuy el CEDAF selecciona continuamente cepas locales de Trichoderma de diferentes ambientes, con diferentes modos de acción.



Etapa 5

Las botellas y bolsas con el sustrato inoculado se colocan en una estufa a 25-27°C durante diez días con un fotoperiodo de doce horas, cada dos días se agitan a fin de facilitar la colonización homogénea del sustrato.

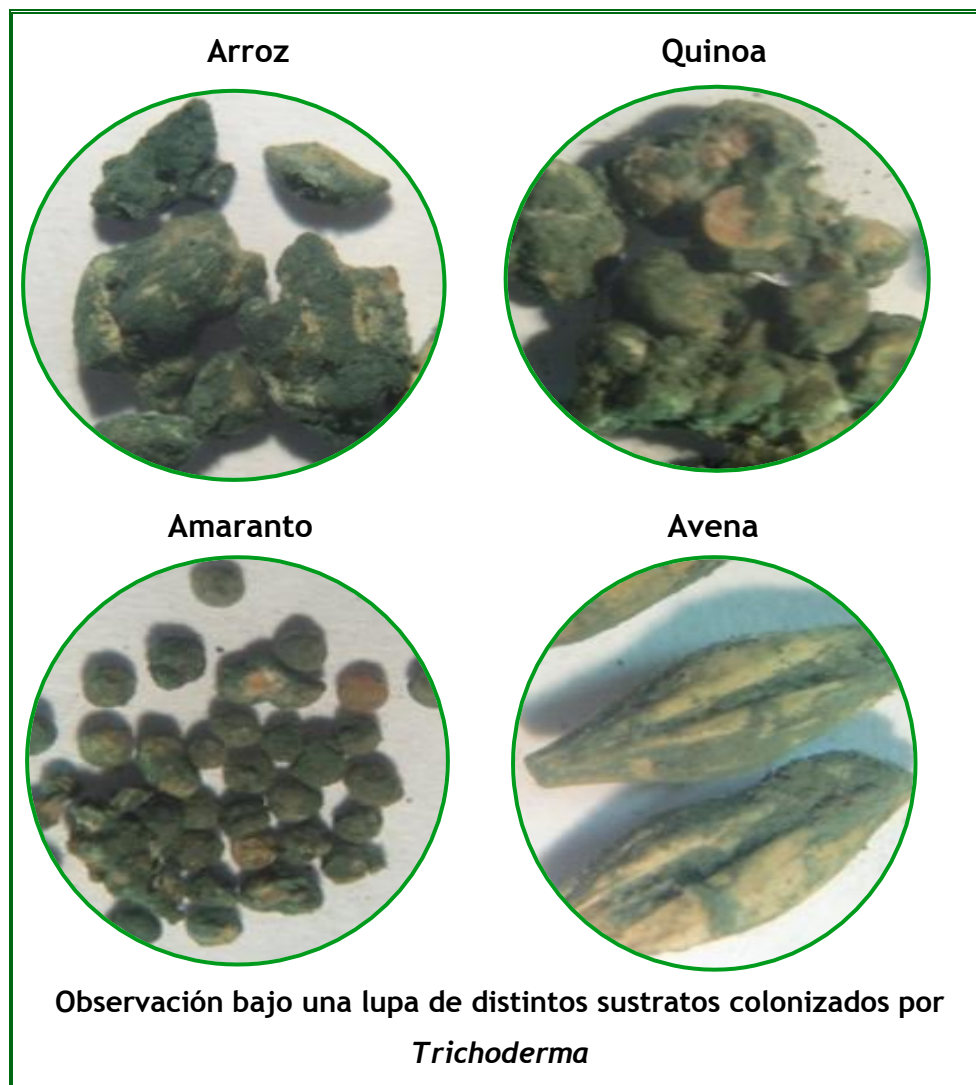


Acondicionamiento de botellas y bolsas en una estufa de cultivo. Sustratos colonizados por *Trichoderma* en bolsas y botellas, luego del periodo de incubación.

De no contar con una estufa de cultivo, las botellas o bolsas se pueden acondicionar en estantes o armarios limpios, donde no haya tierra y estén protegidos del sol. Al cabo de dos semanas el sustrato se cubrirá totalmente con las estructuras del hongo, el que tomará distintos tonos de verde o amarillo dependiendo de la especie o cepa de *Trichoderma*. En ese momento el producto ya está listo para su uso o aplicación. En caso de

prever su uso dentro de las siguientes semanas se puede conservarse en la parte baja de una heladera o mantener en un ambiente fresco.

De necesitar conservarlo por más tiempo, se aconseja realizar los pasos que se describen a continuación, para garantizar la calidad del formulado, que implican la deshidratación del sustrato y envasado al vacío.



Etapa 6

Con la superficie del sustrato cubierta por la biomasa conidial de *Trichoderma*, se pasa al proceso de secado para que los conidios permanezcan viables por mayor tiempo durante el almacenamiento.

Se vuelca el contenido de las botellas y/o bolsas (sustrato colonizado) en bandejas acondicionándolas en una cámara o

ambiente con un extractor de aire, aire acondicionado, etc., lo que dependerá de las posibilidades locales. Diariamente se pesa el sustrato colonizado hasta verificar peso constante. El período de secado puede ser variable en función del acondicionamiento del ambiente de secado.



Sustrato colocado en bandejas durante el proceso de secado.

Etapa 7

El sustrato colonizado y deshidratado se coloca en bolsas de polietileno, sellándose al vacío.



Termo selladora doméstica

Etapa 8

El producto final puede ser almacenado por un periodo de hasta 10 meses en oscuridad a temperatura media de 10°C, período en el que se conserva la calidad del preparado.



Las temperaturas bajas son más favorables para mantener niveles de viabilidad adecuados en condiciones de almacenamiento.

Producto acondicionado para un almacenamiento prolongado .

Control de Calidad de *Trichoderma spp.*

La producción artesanal de organismos para el control biológico, debe garantizar parámetros de calidad, que aseguren que el formulado mantiene las propiedades biológicas y así posibilite cumplir con el objetivo pretendido con su aplicación a campo.

El control de calidad del producto final es el punto más importante que garantiza el funcionamiento de éste y su aceptación a largo plazo. Si el producto tiene una viabilidad alta al igual que una adecuada virulencia, se maximiza la probabilidad de que actúe bien en el campo.

Se trata de pruebas microbiológicas que requieren de instrumental de laboratorio y de un técnico capacitado, la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNJu, brinda éste servicio a organizaciones de AF sin costo.

Se describe a continuación las pruebas de calidad realizadas rutinariamente en el control de los formulados artesanales:

- A. Determinación del grado de antagonismo.
- B. Determinación de la producción de conidios
- C. Determinación de la viabilidad de los conidios.
- D. Determinación de contaminantes (Pureza).

A. Determinación del grado de antagonismo

En general se trata de pruebas de laboratorio que implican entre 4 a 10 días, que permiten inferir para una especie de hongo patógeno particular, los posibles mecanismos de acción que ejerce *Trichoderma* en condiciones de laboratorio.

Para determinar el grado de antagonismo de las cepas de *Trichoderma*, frente a un patógeno o grupos de patógenos de plantas, se pueden realizar tres tipos de pruebas:

1. Cultivos duales, con el que se determina la capacidad competitiva por espacio principalmente (CD).

2. El método de placas superpuestas, para verificar producción de metabolitos volátiles (MV).

3. El método del papel Celofán, para verificar la producción de metabolitos difusibles al medio (MDM).

Cultivos duales

Permite inferir la capacidad competitiva de *Trichoderma* frente al hongo patógeno. La competencia más común es por espacio y nutrientes.

Se requiere un cultivo puro del organismo fitopatógeno y uno del organismo antagonista (Ej. *Trichoderma*), en ambos casos se extrae una sección de colonia de aproximadamente 2mm², los que se colocan en los extremos opuestos

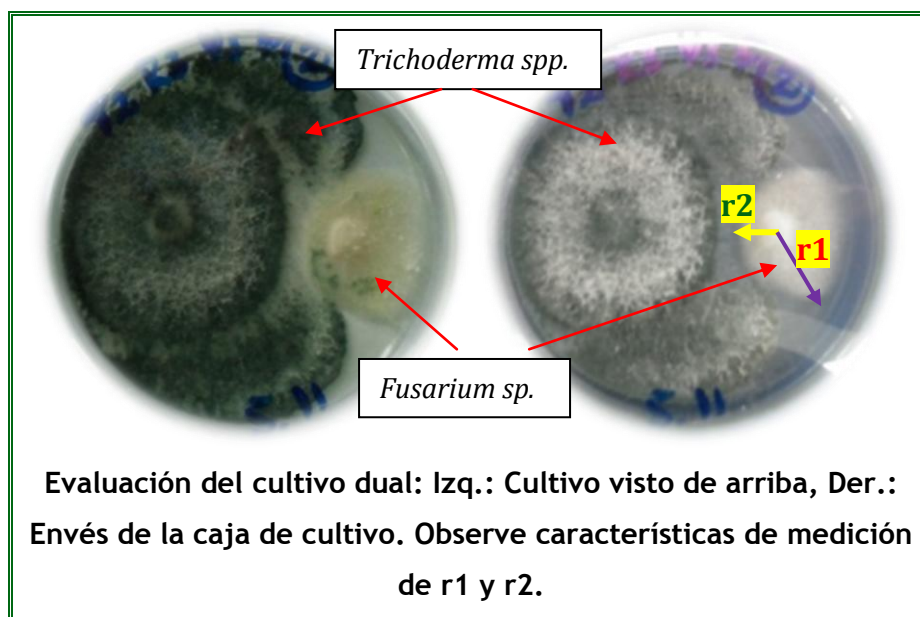
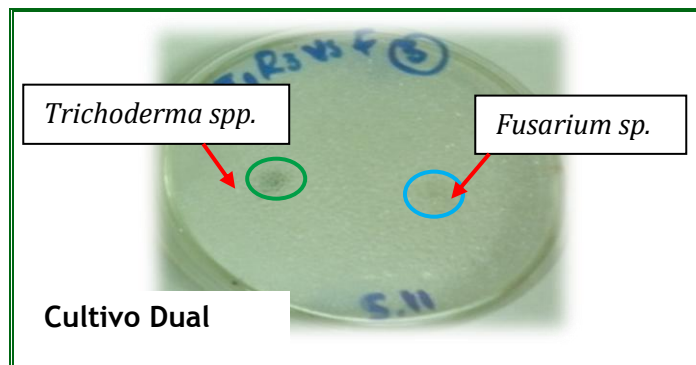
de una caja de Petri con medio de cultivo Agar papa glucosado al 2% (APG 2%) separados uno del otro 3 cm.

Luego de un periodo de incubación de 24 a 72 horas a 25°C, se evalúa el efecto antagónico mediante el porcentaje de inhibición del crecimiento radial del patógeno (%I), aplicando la siguiente ecuación de Royse and Ries.

$$\%I = 100 \times [(r1-r2)/r1]$$

r1= crecimiento radial del patógeno

r2= crecimiento radial del patógeno, en orientación directa al crecimiento del antagonista. (Ver imágenes)



Método de placas superpuestas:

Su objetivo es verificar la producción por parte de *Trichoderma* de sustancias tóxicas volátiles para otros microorganismos.

Se requiere al igual que en la prueba anterior cultivos puros del hongo patógeno y del antagonista o *Trichoderma*. Se siembra cada hongo transfiriendo una sección de 2mm² en el centro de una caja de petri con medio APG 2%, luego se substituye las respectivas tapas de

las cajas de Petri por un disco de papel celofán estéril, uniendo ambas bases con cinta adhesiva. Paralelamente se siembra en otra caja de Petri con APG 2% el hongo fitopatógeno quien cumplirá la función de testigo sin antagonista.

Las cajas así acondicionadas se colocan en una estufa de cultivo durante 5-7 días, momento en que se mide el crecimiento radial del hongo fitopatógeno enfrentado a *Trichoderma* y del testigo.

La diferencia de crecimiento de la colonia del patógeno, estará en función de la producción de metabolitos volátiles que difunden desde la colonia de *Trichoderma*, hacia la colonia del patógeno. Se

aplica la ecuación de Royse and Ries, donde r_1 representa el crecimiento radial de la colonia del patógeno testigo y r_2 el crecimiento radial de la colonia del patógeno frente a *Trichoderma*.



Método del Papel Celofán

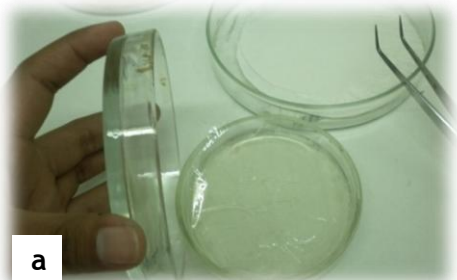
Esta prueba se realiza para determinar si *Trichoderma* produce sustancias tóxicas que difunden al medio de cultivo, afectando el crecimiento de hongos fitopatógenos.

Consiste en colocar un disco de papel celofan estéril cubriendo la superficie del medio de cultivo (APG 2%) de la caja de Petri. En el centro de la caja, sobre el papel celofan se transfiere una sección de 2mm² de un cultivo de *Trichoderma*. Este se acondiciona en la estufa de cultivo a 25°C durante 48 horas, momento en que se retira el papel celofán con la colonia adherida a él. En ese momento se siembra en el centro de la placa, “limpia” de estructuras del antagonista, una sección de 2mm² del hongo fitopatógeno. Paralelamente a ésta última

siembra se realiza en otra caja de Petri con APG 2% la siembra del fitopatógeno que será utilizada como testigo.

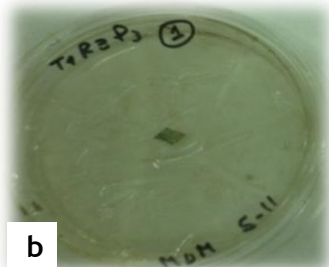
Se acondicionan en una estufa de cultivo a 25°C, a los 7 días se mide el crecimiento radial de las colonias y se calcula el porcentaje de inhibición utilizando la ecuación de Royse and Ries, donde r_1 representa el crecimiento radial de la colonia del patógeno testigo y r_2 el crecimiento radial de la colonia del patógeno en la caja donde previamente creció *Trichoderma*. La diferencia de crecimiento de la colonia del patógeno, estará en función de la producción de metabolitos que difunden desde la colonia de *Trichoderma*, hacia el medio de cultivo en que luego creció el patógeno.

Se debe poner especial cuidado en el manipuleo, esterilización y colocación del papel celofan, a fin de asegurar la integridad del mismo. Evitando de esta manera el riesgo de contaminación del medio de cultivo con estructuras de Trichoderma



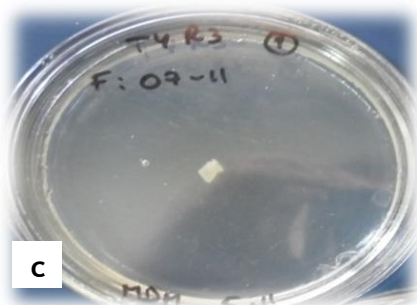
a

a) Colocación del papel de celofán sobre el APG 2%.



b

b) Siembra de una sección de *Trichoderma spp.* sobre papel celofán.

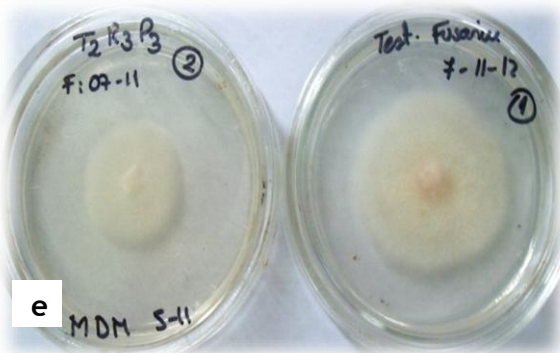


c



d

c) y d) Luego de 48 hs de incubación se retira el papel de celofán con la colonia de *Trichoderma spp.* y se realiza la siembra de una sección del hongo fitopatogeno (*Fusarium spp.*) sobre el medio de APG 2%.



e

e) Izq.: Colonia de *Fusarium spp.* en presencia de los metabolitos producidos por *Trichoderma spp.* que difundieron al medio. Der.: colonia de *Fusarium* testigo.

Método del papel celofán

B. Determinación de la producción de conidios

La determinación de la producción de conidios es de gran importancia ya que determinará la forma de dosificarlo y/o diluirlo luego a campo.

Se determina por conteo directo en cámara de Neubauer.

Se realizan suspensiones en tubos de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril y 1gr del sustrato colonizado, se cuenta el número de conidios de los cuatro cuadrados secundarios (CS) esquinados y el central de la cámara (CC), aplicando la siguiente fórmula se obtienen los números de conidios por mililitros.

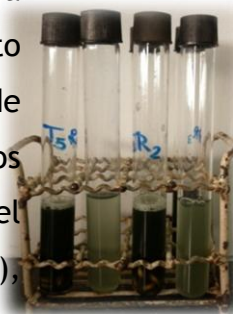
El número de conidios contados por gramo del producto final se obtiene multiplicando el número de conidios presentes en 1 mililitro por el número de mililitros en que fue disuelta la muestra y dividiendo este resultado entre los gramos de muestra usados.

$$(CM \times B) / G = GM$$

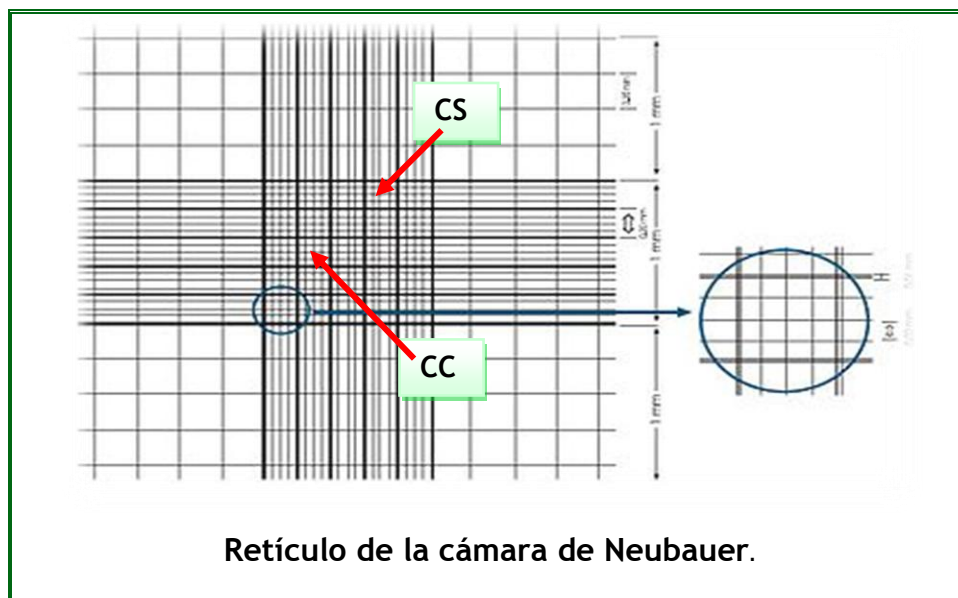
CM= Conidios por mililitro
B= Cantidad de mililitros usados en la solución madre.

G= Cantidad de gramos usados en la solución madre.

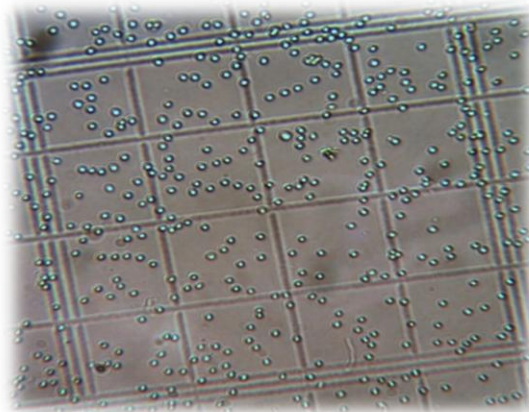
GM= Conidios por gramo de muestra



Suma de 5 CS x 50000= conidios/ml.



Observación de conidios en cámara de Neubauer, bajo microscopio óptico.



C. Determinación de la viabilidad de los conidios

Se evalúa si los conidios están vivos o no. Se trata de una prueba de germinación conidial, mediante la realización de microcultivos en medios nutritivos agarizados o líquidos o por conteo de viables en placa (ufc/g o ml de producto).

Se realizan suspensiones en agua de acuerdo a lo descrito en el punto anterior, posteriormente se

realiza la siembra en portaobjetos excavados con APG 2%, colocándose en estufa a 25°C. La observación se realiza dentro de las primeras 24 horas. Observando al microscopio óptico se realiza el conteo de conidios germinados, calculando luego el porcentaje de germinación.

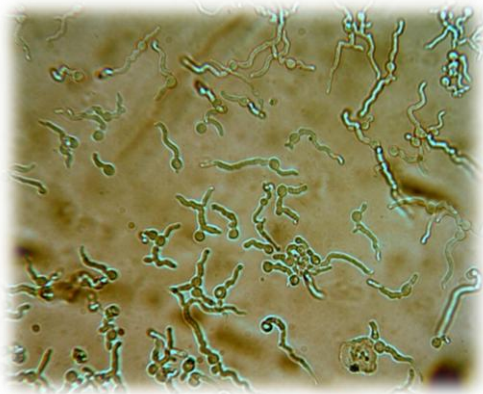


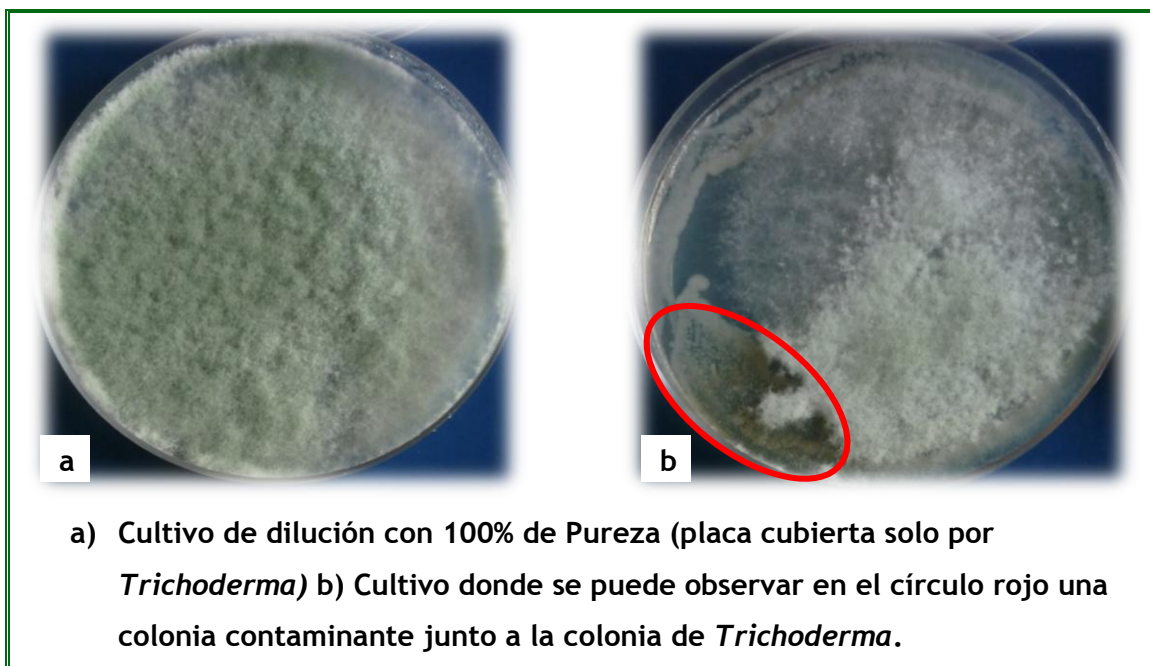
Imagen de conidios de *Trichoderma spp* germinados.

D. Determinación de contaminantes (pureza)

La prueba de pureza permite verificar la proporción del antagonista, en éste caso *Trichoderma spp*, en relación con otros microorganismos que se han multiplicado en el formulado, como contaminantes. Se trata de una prueba esencial para mejorar el proceso de producción y formulación.

Todas las producciones microbianas tienen el riesgo de contaminarse y en las artesanales esto puede ocurrir con más frecuencia si no se cumplen las buenas prácticas de producción, debido al gran número de operaciones manuales.

La técnica consiste en preparar suspensiones a partir del formulado obtenido de *Trichoderma* de la forma antes descrita. Realizando una serie de diluciones seriadas, a fin de sembrar en cajas de Petri con APG 2% aquellas más diluidas. Las que se acondicionan en estufa de cultivo. Dentro de los 4 días se evalúa el desarrollo de colonias que no corresponden a *Trichoderma*, el resultado se expresa como porcentaje. Se considera 100% de pureza cuando la totalidad de la placa esta colonizada por *Trichoderma*.



Bibliografía

- Aldo G.; Alvarez S.; Bonillo M.; Rolle R.; Tapia S. 2008. Producción hortícola sustentable. Ed. INTA: 103 p.
- Agamez Ramos E.; Zapata Navarro R.; Oviedo Zumaque L.; Barrera Voleth J. 2008. Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. Rev. Colomb. Biotecnol. Vol X, N° 2: 23-34.
- Baker H.; Cook R. 1974. Biological Control of Plant Pathogens. W.H. Freeman & Co., San Francisco.
- García R.; Riera R.; Zambrano C.; Gutierrez L. 2006. Desarrollo de un fungicida biológico a base de una cepa del hongo *Trichoderma harzianum* proveniente de la región andina venezolana. Rev. Fitosanidad Vol 10, N° 2: 115-121.
- Ghisalberti E. y Sivasithamparam K. 1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. Soil Biol. Biochem, 23 (11) 1011-1020.
- Santos A.;









“CEDAF”

**CENTRO DE ESTUDIO PARA EL DESARROLLO
DE LA AGRICULTURA FAMILIAR
INVESTIGACIÓN, DESARROLLO Y TRANSFERENCIA
DE TECNOLOGÍA AGROECOLÓGICA PARA
AGRICULTORES FAMILIARES**



www.cedafjujuy.com.ar

Alberdi 47, 2º piso, Oficina 314, Bº Los Naranjos. S. S de Jujuy

Tel . 0054-388-4221554. Fax 0054-388-4221547.