

UNIVERSIDAD DE ALMERIA

ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA

“EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD  
EN EL TIEMPO DE FORMULADOS  
LÍQUIDOS MICROBIANOS”

**Mención: Hortofruticultura y Jardinería**

**Modalidad: Trabajo Técnico -Experimental**

**Curso 2020/2021**

**Alumno/a: Ana López Carrasco**

**Director/es:**

Dr. D. Fernando José Diánez Martínez

D. Alejandro Moreno Gavira



# **UNIVERSIDAD DE ALMERÍA**

## **ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA**

### **INGENIERÍA AGRÍCOLA MENCIÓN EN HORTOFRUTICULTURA Y JARDINERÍA**

**Trabajo Fin de Grado.**

## **EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD EN EL TIEMPO DE FORMULADOS LÍQUIDOS MICROBIANOS**

**El alumno:**

**Ana López Carrasco**

**Almería, 9 de Julio de 2021**

**Directores:**

**Dr. D. Fernando José Diánez Martínez**

**D. Alejandro Moreno Gavira**

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer tanto a mi director del trabajo Fernando José Diánez Martínez como a Milagrosa Santos Hernández por escucharme y brindarme la oportunidad realizar el trabajo con ellos aún sabiendo la carga de trabajo que tendrían. Así como toda su ayuda, aportaciones, dedicación y colaboración durante la realización de este trabajo. No se puede olvidar la labor realizada por mi codirector Alejandro Moreno Gavira que ha estado ayudándome en todo lo posible y se ha mostrado disponible en todo momento dándome repuestas y/o soluciones a cualquier duda que me ha podido surgir.

Me gustaría mencionar de forma especial a mi madre Paqui y a mi hermana Ángela las cuales son los pilares fundamentales de mi vida. Gracias por estar a mi lado en todo momento apoyándome, dándome ánimos, mimos y cariño cuando los he necesitado y sobre todo por ayudarme a levantarme cuando caigo.

A mi abuelo, tíos y resto de familiares que me han mostrado apoyo, interés y me han transmitido su fuerza durante todo el proceso para que no abandonase.

No puedo olvidarme de mis compañeros que me han ido acompañando en este duro camino durante estos años desde el principio y de todos aquellos que se han ido uniendo después con los que he compartido vivencias únicas. En especial, mencionar a mis amigos Raúl y Javi por estar siempre a mi lado, aguantarme, darme los mejores consejos y por esos abrazos y conversaciones que te reinician la vida.

Gracias de todo corazón a todas aquellas personas que forman o han formado parte de mi vida en alguna etapa porque os lo debo todo, ya que sin vosotros no sería quien soy ahora y no podría haber llegado a donde estoy.

## RESUMEN

Algunos hongos han sido utilizados ampliamente como agentes fúngicos antagonistas contra plagas; a su vez se han empleado como potenciadores del crecimiento en las plantas ya que se han demostrado sus beneficios en numerosas ocasiones. El papel antagónico de estos hongos es propiciado por un metabolismo más rápido, conformación fisiológica y metabolitos antimicrobianos. También es muy habitual la competencia por el espacio y nutrientes, el micoparasitismo, la inducción del sistema de defensa de las plantas y la antibiosis por enzimas y metabolitos. Al ver los beneficios que proporcionan a las plantas, se está investigando de forma más rápida los procesos de producción de los hongos para así poder comercializarlos de la forma más eficaz posible.

Este proyecto se ha centrado en los hongos *Trichoderma aggressivum*, *Trichoderma saturnisporum* y *Paecilomyces variotii* y se ha puesto bajo estudio la viabilidad de cada uno de ellos cuando forman parte de seis formulados diferentes a lo largo del tiempo. Se llevará un control del crecimiento y concentración de todas las muestras conforme se vayan cumpliendo los plazos marcados. Con todo esto se obtendrán los datos necesarios para poder establecer cuál es el mejor formulado para cada microorganismo a la hora de hacer un producto comercial, que es el principal objetivo de este trabajo.

## ABSTRACT

Some fungi have been widely used as antagonistic fungal agents against pests; at the same time, they have been employed as growth enhancers in plants as their benefits have been proven on numerous occasions. The antagonistic role of these fungi is promoted by a faster metabolism, physiological conformation and antimicrobial metabolites. Competition for space and nutrients, mycoparasitism, the induction of the defense system of plants and antibiosis by enzymes and metabolites are also very common. By seeing the benefits they provide to plants, the production processes of fungi are being investigated more quickly in order to be able to commercialize them in the most efficient way possible.

This project has focused on the fungi *Trichoderma aggressivum*, *Trichoderma saturnisporum* and *Paecilomyces variotii* and the viability of each of them has been studied when they are part of six different formulations over time. The growth and concentration of all the samples will be controlled as the established deadlines are met. With all this, the necessary data will be obtained to be able to establish which is the best formulated for each microorganism at the time to make a commercial product, which is the main objective of this work.

# ÍNDICES

## ÍNDICE GENERAL

<b>1.MEMORIA</b> .....	15
1.1. Interés .....	15
1.1.1. Interés en el uso de Organismos de Control Biológico.....	16
1.1.2. Importancia del control de hongos en los cultivos.....	16
<b>1.2. Objetivos</b> .....	16
<b>2. FASES DE REALIZACIÓN Y CRONOGRAMA</b> .....	19
2.1. Fases de realización .....	19
2.2. Cronograma .....	20
<b>3.INTEGRACIÓN DE LAS COMPETENCIAS EN LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO</b> .....	22
<b>4.ESPECIFICACIONES GENERALES</b> .....	24
4.1. PGPF.....	24
4.1.1. Introducción PGPF.....	24
4.1.2. Efectos en las plantas .....	25
4.2. Producción masiva.....	28
4.2.1. Introducción .....	28
4.2.2. Tipos de producción masiva .....	28
4.2.3. Conservación.....	31
4.3. <i>Trichoderma</i> .....	33
4.3.1. Morfología y taxonomía .....	33
4.3.2. Características de <i>Trichoderma spp.</i> .....	36
4.4. <i>Paecilomyces</i> .....	38
4.4.1. Morfología y taxonomía .....	38
4.4.2. Características de <i>Paecilomyces</i> .....	40
4.5. Materiales empleados .....	40
4.5.1. Material fúngico empleado .....	41
4.5.2. Otros materiales .....	41
4.6. Métodos .....	42
4.7. Diseño experimental .....	53

<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	57
5.1. Resultados.....	57
5.1.1. Resultados medio sólido .....	57
5.1.2. Resultados medio líquido.....	70
5.2. Discusión .....	98
<b>6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES TÉCNICAS</b> .....	102
6.1. Conclusiones.....	102
6.2. Recomendaciones técnicas .....	102
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	105

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema general del escalamiento de la producción del bioplaguicida a base del hongo <i>T. koningiopsis</i> Th003 (Fuente: Cotes Prado y Moreno, 2018). .....	29
<b>Figura 2.</b> <i>Trichoderma e Hypocrea</i> . (A) <i>Tolypocladium niveum</i> , ex neotipo (ARSEF 3280). (B) <i>Trichoderma polysporum-aggr.</i> anamorfo de <i>Hypocrea sp.</i> (G] S 98-121). (C) <i>Trichoderma minutisporum</i> Bissett, anamorfo de <i>Hypocrea sp.</i> (CBS 901.72). (D) <i>Trichoderma viride</i> anamorfo de <i>Hypocrea rufa</i> (G] S 90-97). (E) Anamorfo de <i>Hypocrea pulvinata</i> (G] S 91-220). Barras de escala = 10 - 11 $\mu\text{m}$ . (Fuente:Samuels, G. J., 1996). .....	34
<b>Figura 3.</b> <i>Trichoderma y Gliocladium</i> . (A). <i>Trichoderma virens</i> . cultura tipo ex. (B). <i>Gliocladium viride</i> (J. P. Jones Gl 114). (C). <i>Gliocladium prnicillioides</i> , anamorfo de <i>Sphaerostilbella aureonitens</i> (GJS 83-286). (D). Anamorfo de <i>Trichoderma de H. flavovirens</i> (GJS95-154). Barras de escala = 10 - 11 $\mu\text{m}$ (Fuente: Samuels, G. J.,1996).....	35
<b>Figura 4.</b> Actividades de promoción del crecimiento de <i>Trichoderma spp.</i> Indirectos: (a) micoparasitismo, (b) competencia; directa: (c) crecimiento micelial alrededor de la rizosfera de la planta y producción de metabolitos (Fuente: Verma et al., 2007). .....	36
<b>Figura 5.</b> Fotografías de la colonia y la estructura conidiógena de <i>Paecilomyces wawuensis</i> debajo microscópio electrónico escaneando. A. Colonia en agar Czapek después de 14 días a 25 ° C. B. Conidiógeno estructura. C. Conidios elipsoidales en cadenas. D. Fialides de la estructura conidiógena.E. Echinula de un conidium. Barras de escala: A = 10 mm, B = 5 $\mu\text{m}$ , C – D = 2 $\mu\text{m}$ , E = 0,5 $\mu\text{m}$ . (Fuente: He et al, 2011). .....	39
<b>Figura 6.</b> Placas de Petri con <i>Trichoderma aggressivum</i> , <i>Trichoderma saturnisporum</i> y <i>Paecilomyces variotii</i> respectivamente. ....	42
<b>Figura 7.</b> Raspado de esporas con varilla junto a mechero Bunsen. ....	44
<b>Figura 8.</b> Bandeja totalmente incubada sobre una base de diferentes cereales. ....	45
<b>Figura 9.</b> Adición de agua a bolsa de autoclave llena del contenido de las bandejas de un microorganismo.....	46
<b>Figura 10.</b> Filtrado del contenido de las bolsas haciendo uso de un colador metálico. ....	46
<b>Figura 11.</b> Botes con cada una de las soluciones madre finales.....	48
<b>Figura 12.</b> Llenado de botes con las soluciones madre junto al mechero Bunsen. ....	49
<b>Figura 13.</b> Placas Petri divididas y marcadas junto a las muestras a emplear en cada una de	



ellas.....	50
<b>Figura 14.</b> Gradilla con todos los Eppendorf identificados y con la cantidad de medio y formulado estipulado.....	51
<b>Figura 15.</b> Materiales empleados en la realización del conteo de esporas.....	52
<b>Figura 16.</b> Muestras totales del ensayo divididas por temperaturas.....	54
<b>Figura 17.</b> En la figura se representan las imágenes de las placas de Petri con el crecimiento de los diferentes hongos evaluados con los seis formulados bajo estudio tras el tiempo de 15 días a 40°C.....	58
<b>Figura 18.</b> En la figura se representan las imágenes de las placas de Petri con el crecimiento de los diferentes hongos evaluados con los seis formulados bajo estudio tras el tiempo de un mes a 20°C.....	59
<b>Figura 19.</b> En la figura se representan las imágenes de las placas de Petri con el crecimiento de los diferentes hongos evaluados con los seis formulados bajo estudio tras el tiempo de un mes a 30°C.....	61
<b>Figura 20.</b> En la figura se representan las imágenes de las placas de Petri con el crecimiento de los diferentes hongos evaluados con los seis formulados bajo estudio tras el tiempo de tres meses a 20°C.....	62
<b>Figura 21.</b> En la figura se representan las imágenes de las placas de Petri con el crecimiento de los diferentes hongos evaluados con los seis formulados bajo estudio tras el tiempo de tres meses a 30°C.....	64
<b>Figura 22.</b> En la figura se representan las imágenes de las placas de Petri con el crecimiento de los diferentes hongos evaluados con los seis formulados bajo estudio tras el tiempo de seis meses a 7°C.....	65
<b>Figura 23.</b> En la figura se representan las imágenes de las placas de Petri con el crecimiento de los diferentes hongos evaluados con los seis formulados bajo estudio tras el tiempo de seis meses a 20°C.....	67
<b>Figura 24.</b> En la figura se representan las imágenes de las placas de Petri con el crecimiento de los diferentes hongos evaluados con los seis formulados bajo estudio tras el tiempo de seis meses a 30°C.....	68

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Designación de las muestras dependiendo del material fúngico y el formulado. ....	53
<b>Tabla 2.</b> Número de botes asignados por formulado y temperatura.....	54
<b>Tabla 3.</b> Esquema final del ensayo con el reparto de botes por cada temperatura y formulado. .....	55
<b>Tabla 4.</b> Esquema resumen de los resultados obtenidos en el medio sólido de los tres microorganismos en los seis formulados bajo estudio durante todo el proceso del proyecto..	70

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Diagrama de Gantt del proyecto. ....	20
<b>Gráfica 2.</b> Porcentaje de germinación máxima y mínima de <i>T. aggressivum</i> de los cuatro formulados tras quince días de conservación a 40°C. ....	71
<b>Gráfica 3.</b> Porcentaje de germinación máxima y mínima de <i>T. aggressivum</i> de los cuatro formulados tras un mes de conservación.....	71
<b>Gráfica 4.</b> Porcentaje de germinación máxima y mínima de <i>T. aggressivum</i> tras un mes de conservación a 20°C y a 30°C. ....	72
<b>Gráfica 5.</b> Porcentaje de germinación máxima y mínima de <i>T. aggressivum</i> de los cuatro formulados tras tres meses de conservación. ....	73
<b>Gráfica 6.</b> Porcentaje de germinación máxima y mínima de <i>T. aggressivum</i> tras tres meses de conservación a 20°C y a 30°C. ....	73
<b>Gráfica 7.</b> Porcentaje de germinación máxima y mínima de <i>T. aggressivum</i> de los cuatro formulados tras tres meses de conservación a las temperaturas de 20°C y 30°C. ....	74
<b>Gráfica 8.</b> Porcentaje de germinación máxima y mínima de <i>T. aggressivum</i> de los cuatro formulados tras seis meses de conservación. ....	75
<b>Gráfica 9.</b> Porcentaje de germinación máxima y mínima de <i>T. aggressivum</i> tras seis meses de conservación a 20°C y a 30°C. ....	75
<b>Gráfica 10.</b> Porcentaje de germinación máxima y mínima de <i>T. aggressivum</i> de los cuatro formulados tras seis meses de conservación a las temperaturas de 20°Cy 30°C.....	76
<b>Gráfica 11.</b> Porcentaje de germinación máxima y mínima de <i>T. aggressivum</i> de los cuatro formulados tras seis meses de conservación. ....	77
<b>Gráfica 12.</b> Porcentaje de germinación máxima y mínima de <i>T. aggressivum</i> tras seis meses de conservación a las temperaturas de 7°C, 20°C y a 30°C.....	78
<b>Gráfica 13.</b> Porcentaje de germinación máxima y mínima de <i>T. aggressivum</i> de los cuatro formulados tras seis meses de conservación a las temperaturas de 7°C, 20°Cy 30°C.....	78
<b>Gráfica 14.</b> Porcentaje de germinación máxima y mínima de <i>T. saturnisporum</i> de los cuatro formulados tras quince días de conservación a 40°C. ....	79
<b>Gráfica 15.</b> Porcentaje de germinación máxima y mínima de <i>T. saturnisporum</i> de los cuatro	

formulados tras un mes de conservación.....	80
<b>Gráfica 16.</b> Porcentaje de germinación máxima y mínima de <i>T. saturnisporum</i> tras un mes de conservación a 20°C y a 30°C. ....	81
<b>Gráfica 17.</b> Porcentaje de germinación máxima y mínima de <i>T. saturnisporum</i> de los cuatro formulados tras un mes de conservación a las temperaturas de 20°C y 30°C. ....	81
<b>Gráfica 18.</b> Porcentaje de germinación máxima y mínima de <i>T. saturnisporum</i> de los cuatro formulados tras tres meses de conservación. ....	82
<b>Gráfica 19.</b> Porcentaje de germinación máxima y mínima de <i>T. saturnisporum</i> tras tres meses de conservación a 20°C y a 30°C.....	83
<b>Gráfica 20.</b> Porcentaje de germinación mínima de <i>T. saturnisporum</i> de los cuatro formulados tras tres meses de conservación a las temperaturas de 20°C y 30°C. ....	83
<b>Gráfica 21.</b> Porcentaje de germinación máxima y mínima de <i>T. saturnisporum</i> de los cuatro formulados tras seis meses de conservación. ....	84
<b>Gráfica 22.</b> Porcentaje de germinación máxima y mínima de <i>T. saturnisporum</i> tras tres meses de conservación a 20°C y a 30°C.....	85
<b>Gráfica 23.</b> Porcentaje de germinación máxima de <i>T. saturnisporum</i> de los cuatro formulados tras seis meses de conservación a las temperaturas de 20°C y 30°C.....	85
<b>Gráfica 24.</b> Porcentaje de germinación máxima y mínima de <i>T. saturnisporum</i> de los cuatro formulados tras seis meses de conservación. ....	86
<b>Gráfica 25.</b> Porcentaje de germinación máxima y mínima de <i>T. saturnisporum</i> tras seis meses de conservación a 7°C, 20°C y a 30°C.....	87
<b>Gráfica 26.</b> Porcentaje de germinación máxima y mínima de <i>T. saturnisporum</i> de los cuatro formulados tras seis meses de conservación a las temperaturas de 7°C, 20°C y 30°C.....	88
<b>Gráfica 27.</b> Porcentaje de germinación máxima y mínima de <i>P. variotii</i> de los cuatro formulados tras quince días de conservación a 40°C. ....	89
<b>Gráfica 28.</b> Porcentaje de germinación máxima y mínima de <i>P. variotii</i> de los cuatro formulados tras un mes de conservación.....	90
<b>Gráfica 29.</b> Porcentaje de germinación máxima y mínima de <i>P. variotii</i> tras un mes de conservación a 20°C y a 30°C. ....	90

<b>Gráfica 30.</b> Porcentaje de germinación máxima y mínima de <i>P. variotii</i> de los cuatro formulados tras un mes de conservación a las temperaturas de 20°C y 30°C. ....	91
<b>Gráfica 31.</b> Porcentaje de germinación máxima y mínima de <i>P. variotii</i> de los cuatro formulados tras tres meses de conservación. ....	92
<b>Gráfica 32.</b> Porcentaje de germinación máxima y mínima de <i>P. variotii</i> tras tres meses de conservación a 20°C y a 30°C. ....	93
<b>Gráfica 33.</b> Porcentaje de germinación máxima de <i>P. variotii</i> de los cuatro formulados tras tres meses de conservación a las temperaturas de 20°C y 30°C.....	93
<b>Gráfica 34.</b> Porcentaje de germinación máxima y mínima de <i>P. variotii</i> de los cuatro formulados tras seis meses de conservación. ....	94
<b>Gráfica 35.</b> Porcentaje de germinación máxima y mínima de <i>P. variotii</i> tras seis meses de conservación a 20°C y a 30°C. ....	95
<b>Gráfica 36.</b> Porcentaje de germinación máxima y mínima de <i>P. variotii</i> de los cuatro formulados tras seis meses de conservación. ....	95
<b>Gráfica 37.</b> Porcentaje de germinación máxima y mínima de <i>P. variotii</i> tras seis meses de conservación a 7°C, 20°C y a 30°C.....	96
<b>Gráfica 38.</b> Porcentaje de germinación máxima y mínima de <i>P. variotii</i> de los cuatro formulados tras seis meses de conservación a las temperaturas de 7°C, 20°C y 30°C.....	97

# MEMORIA

## **1.MEMORIA**

### **1.1.Interés**

Siempre ha habido conflicto entre maximizar los rendimientos con compuestos de síntesis o potenciar la biodiversidad natural para así poder llegar al suministro de alimentos necesarios para satisfacer las necesidades humanas (Roumpou, 2005).

Actualmente, como ya sabemos, se está reduciendo y limitando en gran cantidad el uso de productos químicos en el mundo de la agricultura. Este paso para dejar de lado el mundo de los químicos ocurre tras ver las consecuencias del uso abusivo que se ha hecho de ellos todos estos años atrás y del daño que han provocado no solo directamente, sino también indirectamente promoviendo problemas ambientales como pueden ser la contaminación del suelo, acuíferos entre otros muchos. Este tipo de productos han sido utilizados para combatir y/o controlar las diferentes y numerosas plagas que han ido apareciendo sobre nuestros cultivos a lo largo de toda la historia, debido a que estas plagas y/o enfermedades son el principal enemigo para acabar con el cultivo y por tanto con la economía o subsistencia del agricultor (Díaz *et al.*, 2016).

Las herramientas de control químico de plagas y enfermedades están bastante controladas y reguladas, para evitar que un posible uso excesivo y sin control de estos productos pueda tener un impacto negativo en el consumidor y en el medio ambiente. Las plagas, enfermedades y otras incidencias van a seguir apareciendo en los cultivos por lo que se deben buscar otras soluciones más viables y menos perjudiciales a las anteriores para seguir haciendo frente a estos problemas. Además, no se puede olvidar la notable disminución en la efectividad de los productos químicos, debido a las nuevas cepas que han ido apareciendo a lo largo de los años de patógenos con diferentes resistencias a plaguicidas (Ferrón,2013).

Debido a todos estos motivos expuestos, la agricultura ecológica está más en auge que nunca debido a que se emplean técnicas de cultivo más sostenibles y permite una modificación del suelo, consiguiendo con ello un mejor control de la comunidad microbiana asociada a la rizosfera y por tanto una reducción del nivel de insumos aplicados (Stoate *et al.*, 2009; Siegel-Hertz *et al.*, 2018).

### **1.1.1. Interés en el uso de Organismos de Control Biológico**

Hay una gran diversidad en la cantidad de microorganismos que son capaces de coexistir y asociarse a los sistemas radiculares de algunos cultivos (Hyakumachi y Kubota, 2003) por lo que una posible sustitución de los productos químicos podrían ser los agentes de control biológico. Esta es una buena optativa debido a que la mayoría de los organismos fitopatógenos tienen enemigos naturales que podemos emplear como estrategia de lucha. Podemos decir que el control biológico consiste en: “Utilización de organismos residentes o introducidos en un patosistema para suprimir las actividades o las poblaciones de patógenos” (Pal y Gardener, 2006).

No siempre se consigue suprimir completamente; si no que podemos conseguir una reducción de la severidad del ataque, del inóculo del patógeno o de plaga e incluso minimizar la infección producida. Por lo tanto, el uso de agentes de control biológico puede ser utilizado perfectamente como alternativa o complemento del control químico (Santos y Diáñez., 2010). Convirtiéndose así en uno de los campos con mayor interés en el mundo de la agricultura ya que además de todo lo anterior consiguen promover el crecimiento vegetal (Diáñez *et al.*, 2016).

### **1.1.2. Importancia del control de hongos en los cultivos**

Los hongos forman el grupo de patógenos más importante que afecta a los cultivos tanto en España como en el resto del mundo. Las enfermedades causadas por los mismos son numerosas e importantes, debido a que según en el momento que actúen pueden afectar al crecimiento de la planta, desarrollo de frutos, rendimiento global del cultivo..., por lo tanto, podemos afirmar que según sea el alcance y la severidad de estas enfermedades sobre la plantación pueden convertirse en factores que limiten la producción y comercialización de productos (Agris, 2005).

A pesar de todo esto, los hongos poseen muchos aspectos positivos los cuales se están empleando con resultados exitosos para la lucha contra diferentes enfermedades.

## **1.2. Objetivos**

El principal objetivo que persigue este Trabajo de Fin de Grado es la obtención del mejor formulado líquido en el cual puedan sobrevivir y mantenerse en buenas condiciones los microorganismos para así poder pasar a la comercialización de dichos productos y con ello poder ir desplazando a los formulados químicos.



Para ello, se tratará con tres microorganismos diferentes probados en las seis mismas soluciones y en las mismas condiciones. Se estudiarán los resultados obtenidos en cada caso y se hará una comparativa de los mismos. En esta se tendrá en cuenta la viabilidad de cada uno de los microorganismos basándonos en un conteo de esporas germinadas y no germinadas además de su capacidad de reproducción.

# FASES DE REALIZACIÓN Y CRONOGRAMA

## **2. FASES DE REALIZACIÓN Y CRONOGRAMA**

### **2.1. Fases de realización**

El trabajo experimental ha sido elaborado en los laboratorios de la Escuela Superior de Ingeniería de la Universidad de Almería.

Las diferentes fases por las que pasa el proyecto son las siguientes:

1.Fase inicial, esta fase consta de las siguientes:

- Esterilización de todo el material a emplear, esta fase es muy importante ya que cualquier posible contaminación nos proporcionaría unos falsos resultados.
  
- Preparación de los hongos bajo estudio y producción masiva de los mismos, para ello emplearemos bandejas ya que se trata de fermentación en fase sólida sobre cereal.
  
- Preparación de los diferentes formulados, se harán las soluciones madre de los seis tipos de formulados a emplear en el proyecto que posteriormente serán repartidas en correspondientes botes.

2.Fase de mediciones

Esta fase se realizará cada vez que se vayan cumpliendo los plazos establecidos en el proyecto, en total se harán cuatro conteos formados por estas partes:

- Conteo de esporas al microscopio. De cada uno de los botes preparados con los diferentes hongos y soluciones realizaremos un conteo, en el cual tendremos en cuenta las esporas germinadas, esporas no germinadas y aquellas que han germinado pero el tamaño de la hifa no supera al de la espora.
  
- Control de crecimiento y reproducción sobre placas de Petri. El mismo contenido usado para el conteo anterior se pondrá en placas para así poder ver el crecimiento de los hongos y posibles contaminaciones.

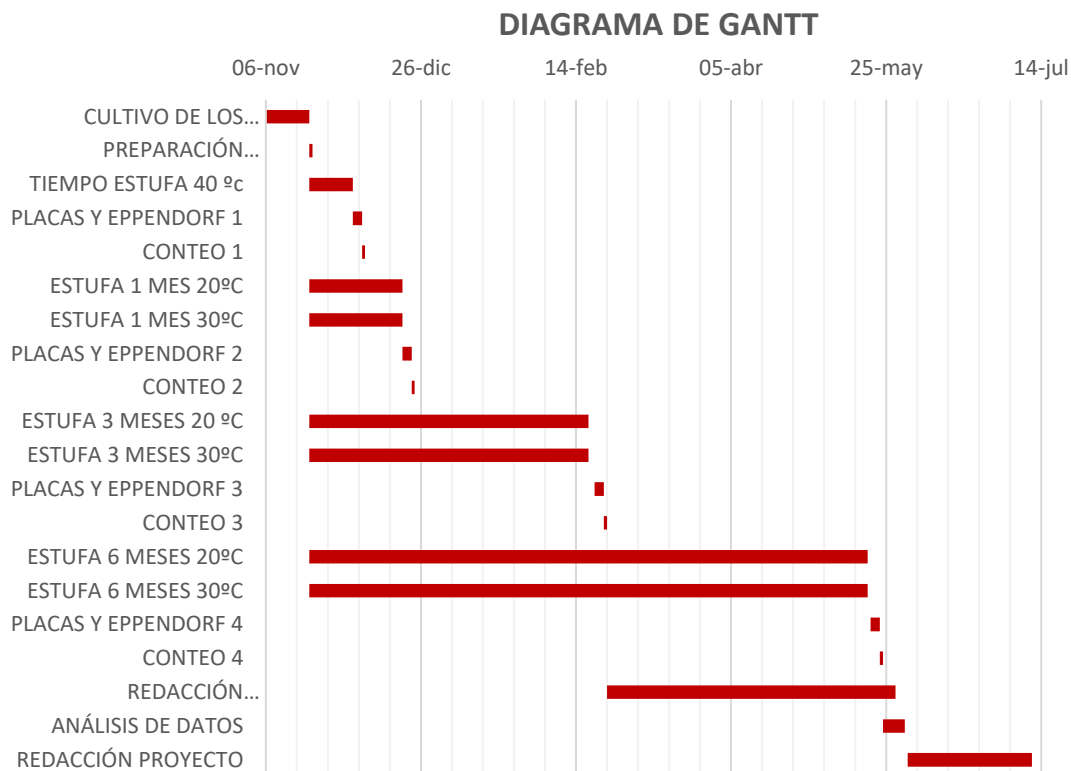
## 2.2. Cronograma

El inicio del proyecto se realizó el día 6 de noviembre de 2020, aquí se llevó a cabo la esterilización de los materiales, preparación de los hongos y preparación de las soluciones madres para su después reparto en botes para obtener los formulados bajo estudio.

Los conteos se han realizado en las siguientes fechas: 7 de diciembre de 2020, 23 de diciembre de 2020, 23 de febrero de 2021 y 24 de mayo de 2021.

Además, queda incluido el tiempo de redacción del anteproyecto, análisis e interpretación de los resultados obtenidos de las mediciones y el inicio de la transcripción del trabajo.

En la figura adjunta se muestran las tareas realizadas desde el inicio del proyecto con la producción masiva de los hongos hasta la finalización del proyecto con la redacción de este.



Gráfica 1.. Diagrama de Gantt del proyecto.

# INTEGRACIÓN DE LAS COMPETENCIAS EN LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO

### **3.INTEGRACIÓN DE LAS COMPETENCIAS EN LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO**

En este proyecto se han desarrollado de manera directa las competencias presentes en el Anexo III de la normativa del TFG del Grado de Ingeniería Agrícola, las cuales han sido obtenidas de la Orden CIN/323/2009 del 9 de febrero, son:

**-E-CB01.** Capacidad para la resolución de los problemas matemáticos que puedan plantearse en la ingeniería. Aptitud para aplicar los conocimientos sobre: álgebra lineal; geometría; geometría diferencial; cálculo diferencial e integral; ecuaciones diferenciales y en derivadas parciales; métodos numéricos, algorítmica numérica; estadística y optimización

**-E-CB04.** Conocimientos básicos de la química general, química orgánica e inorgánica y sus aplicaciones en la ingeniería.

**-E-CB08.** Conocimiento de las bases y fundamentos biológicos del ámbito vegetal y animal en la ingeniería.

**-E-CA01.** Capacidad para conocer, comprender y utilizar los principios de: Identificación y caracterización de especies vegetales.

**-E-CA02.** Capacidad para conocer, comprender y utilizar los principios de: Las bases de la producción vegetal, los sistemas de producción, de protección y de explotación.

**-CTH01.** Capacidad para conocer, comprender y utilizar los principios de Tecnología de la Producción Hortofrutícola: Bases y tecnología de la propagación y producción hortícola, frutícola y ornamental. Control de calidad de productos hortofrutícolas. Comercialización. Genética y mejora vegetal.

**-CTH05.** Capacidad para conocer, comprender y utilizar los principios de Material vegetal: producción, uso y mantenimiento.

# ESPECIFICACIONES GENERALES

## 4.ESPECIFICACIONES GENERALES

### 4.1. PGPF

#### 4.1.1. Introducción PGPF

Las siglas PGPF hacen referencia al grupo de hongos los cuales son promotores del crecimiento vegetal. Gracias a esta gran capacidad hay un gran interés por ellos a la hora de emplearlos como fertilizantes debido a sus numerosos efectos positivos en la calidad y cantidad de las plantas, así como con el entorno (Weselowski *et al.*,2016).

Especies pertenecientes al género *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Phoma* poseen la capacidad de estimular una respuesta inmune de la planta ante los posibles ataques que puedan sufrir cuando se encuentran presentes en la rizosfera, además de ser capaces de promover el crecimiento en las plantas cultivadas, considerándose como uno de los métodos más seguros para ello (Shoresh *et al.*, 2010; Harman *et al.*, 2004). Esto se ha llegado a conseguir con la evolución de diferentes mecanismos como es el antagonismo, la resistencia sistémica inducida y la competencia (Vinale *et al.*, 2008).

Tras varios estudios, se ha demostrado que los PGPF también tienen factores beneficiosos reduciendo el impacto de algunos hongos, nemátodos, virus y bacterias sobre la plantación provocando ISR (Fontenelle *et al.*, 2011; Gotlieb *et al.*, 2003; Elsharkawya *et al.*, 2012; Hossain *et al.*, 2008).

Las plantas que son tratadas con PGPF desarrollan varias resistencias, entre ellas, la principal fuente de resistencia está asociada con la biosíntesis de enzimas de defensa como son la peroxidasa,  $\beta$ -1,3-glucanasa y fenilalanina amoniacal liasa, las cuales son las encargadas de determinar cuál será el grado de resistencia del huésped (Harman *et al.*, 2004; Lamba *et al.*,2008; Sultana *et al.*,2009).

La fenilalanina amoniacal liasa o PAL es una enzima encargada de catalizar la desaminación de fenilalanina a ácido transcinámico, evitando así que el patógeno pueda penetrar en la pared celular ya que es un precursor de las fitoalexinas y de la lignina (Dixon, 2001).  $\beta$ -1,3-glucanasa o también conocida como GLU es una proteína activadora de la vía del ácido salicílico la cual sirve de defensa de las plantas, esto lo hace al degradar la pared celular de los hongos consiguiendo así un efecto antimicrobiano frente a hongos fitopatógenos (Van Wees *et al.*, 2008; Friting *et al.*, 1998). La peroxidasa o POX tiene un papel muy importante gracias a que catalizando la formación de lignina consigue ir limitando la propagación celular de la infección con la creación de barreras estructurales (Marjamaa *et al.*, 2009).



El tipo de interacción existente va a depender de la síntesis de toxinas, fitohormonas, CWDE (enzimas degradantes de la pared celular) y del grado que haya en la colonización de tallos, raíces y células fronterizas, y de forma independiente según la inducción de resistencia presente en las plantas (Lemanceau y Alabouvette, 1991; Jaroszuk-Sciseł *et al.*, 2008).

Las esporas de los hongos tienen la capacidad de poder infectar a los insectos a través de su cutícula por contacto, siendo esto una de sus mayores ventajas y también un factor limitante para su uso comercial. Esto es debido a que algunos insectos cambian de muda de forma muy rápida, lo cual implica que las esporas tienen que germinar más rápido de lo normal para poder cumplir su función (Pendland y Boucias, 1997; Humber, 2008).

Hay más de 150 productos de control biológico basados en fúngicos que han sido comercializados, en los cuales más del 75% del producto eran hongos como *Isaria fumosorosea*, *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii* o *Metarhizium anisopliae* entre otros (Faria y Wraight, 2007).

#### **4.1.2. Efectos en las plantas**

##### **4.1.2.1. Efectos directos**

Los efectos directos son aquellos que influyen en los mecanismos del vegetal. Esto podemos apreciarlo en el desarrollo del micelio, producción de sideróforos, procesos de quelatación, reducción, oxidación y solubilización (Harman *et al.*, 2004). A su vez, habrá un aumento de proteasa, celulasa, quitinasa, hemicelulasa y glucanasa, también se producirán IAA con lo que se mejorará la defensa de las plantas (Jogaiah *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2018).

Por lo tanto, podemos afirmar que los PGPF promueven directamente el crecimiento de las plantas ya sea facilitando la adquisición de recursos o modulando el nivel existente de hormonas vegetales (De Oliveira – Longatti, 2015). A su vez, intervienen en la síntesis de hormonas análogas a las que producen las plantas y en la dinámica de nutrientes en el suelo (Kapri y Tewari, 2010; Yadav *et al.*, 2009).

Como sabemos, las bacterias tienen una gran capacidad e importancia para la fijación biológica de nitrógeno (Igiehon y Babalola, 2018) aun así algunos hongos también poseen esta capacidad haciendo uso de la excreción de nitrogenasas como pueden ser *Penicillium spp.* y *Phoma spp.* (Alam *et al.*, 2010; Hyakumachi y Kubota, 2003), observando un aumento en la concentración de nitrógeno en la planta obtenido de la mayor presencia y disponibilidad de este en el suelo.

Además del nitrógeno, el fósforo también es un macronutriente que resulta limitante en el desarrollo de las plantas. A diferencia del anterior, cuando hay carencias este nutriente se encuentra inmovilizado en el suelo (Adesemoye y Kloepper, 2009). Y en esta ocasión las bacterias vuelven a ser los microorganismos solubilizadores de fósforo con mayor importancia (Guang-Can *et al.*, 2008).

A la hora de solubilizar el fósforo los microorganismos presentan dos vías principales para llevarlo a cabo. La primera consiste en la disminución del pH del medio a valores próximos a 2 donde el fósforo comienza a ser soluble (Lara *et al.*, 2011; Küçük *et al.*, 2008) debido a la liberación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular. La segunda vía se trata de la liberación de enzimas al medio como pueden ser fitasas y fosfatasas (Usha y Padmavathi, 2013; Küçük *et al.* 2008).

Por lo tanto, aquellas plantas que son inoculadas con algunas especies de hongos como pueden ser *Paecilomyces spp.*, *Penicillium spp.*, *Trichoderma spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Mucor spp.*, *Sclerotium spp.* y *Talaromyces spp.* han conseguido aumentos en parámetros como son el diámetro del tallo y su altura, longitud de las raíces y en el peso seco y fresco tanto de las raíces como de las partes aéreas (Islam *et al.*, 2014). También se produjo un aumento de su producción debido a una mayor presencia y por tanto absorción de nitrógeno, fósforo y potasio y un aumento en la acumulación de macronutrientes secundarios como son el magnesio y el calcio (Jogaiah *et al.*, 2013; Shivanna *et al.*, 2005).

#### **4.1.2.2. Efectos indirectos**

Los efectos indirectos que actúan en las plantas se denominan PGPR (rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal). Debido al estudio del papel de la rizosfera como ecosistema se ha conseguido identificar a un mayor número de PGPR (Saharan y Nehra, 2011).

Dentro de los efectos indirectos producidos por las plantas se incluyen aquellos que estén relacionados con las plagas de los cultivos y el control de enfermedades, lo que implica la producción de enzimas líticas, sideróforos, metabolitos secundarios y otros aspectos que tengan relación con la RSI (Resistencia Sistémica Inducida) (Elsharkawy *et al.*, 2014; Shores *et al.*, 2010).

Los métodos para obtener estos efectos se basan en la inhibición dando un favorecimiento notable a la planta, para ello actuará la antibiosis, induciéndose la resistencia sistémica y estimulando el crecimiento. Todos estos efectos van a provocar una estimulación de la producción de glucanasa, exoquitinasa, endoquitinasa; además de metabolitos secundarios que serán volátiles y no volátiles como pueden ser el gliovirin o gliotoxina (Avis *et al.*, 2008;

Harman *et al.*, 2004). En consecuencia, será capaz de inhibir patógenos como agentes de control biológico (De Oliveira – Longatti, 2015).

Las enzimas líticas son compuestos que juegan un papel fundamental en la capacidad hiperparasitaria de los microorganismos antagonistas. Estas enzimas consiguen degradar la pared celular de los patógenos acabando así con ellos (Tian y Sun, 2014). Además, se conoce la producción de quitinasas y celulasas como mecanismo de defensa en *Talaromyces spp.*, *Trichoderma spp.*, *Penicillium spp.* y *Aspergillus spp.* (Naziya *et al.*, 2020).

Los hongos promotores del crecimiento vegetal también son capaces de producir fitohormonas, se tratan de metabolitos secundarios que tienen relación con la dispersión y defensa de los hongos (Fox y Howlett, 2008). Además, pueden contribuir a la promoción vegetal de forma indirecta actuando como ACB y consiguiendo una inhibición del efecto negativo que ocasionan algunas enfermedades del suelo sobre los cultivos. Se consigue reducir la aparición y la gravedad de las enfermedades debido a la pérdida de virulencia del patógeno en cuestión (Elsharkawy y El-Khateeb, 2019). Los ACB emplean diferentes mecanismos, siendo los más importantes la síntesis de enzimas líticas relacionadas con el hiperparasitismo y la fungistasis, la síntesis de antibióticos, la inducción de la resistencia sistémica o algo tan simple como puede ser la competencia por el espacio disponible y los nutrientes (Vinayarani *et al.*, 2019; Murali *et al.*, 2013).

La liberación al medio de metabolitos secundarios con capacidad quelante sobre el hierro es considerado como un mecanismo de antagonismo debido a que los microorganismos logran un control de forma indirecta al reducir su disponibilidad en el suelo y por tanto quitándole a los agentes fitopatógenos un elemento necesario para su desarrollo (Tello *et al.*, 2011; Chaiharn *et al.*, 2009).

Por otra parte, para conseguir la activación de los mecanismos implicados en la Resistencia Sistémica Inducida se está empleando la inoculación de PGPF. Con ello se consigue una alteración en la composición de las paredes celulares de los vegetales debido a la introducción de compuestos como puede ser la lignina que reduce la infección y penetración de agentes patógenos (Zhu *et al.*, 2019; Nawrocka *et al.*, 2018). También activan la RSI en las plantas cuando se acumulan enzimas como la peroxidasa o la fenilalanina amonio-liasa, ambas tienen relación con la modificación celular (Zhou *et al.*, 2018; Naziya *et al.*, 2020).

## **4.2. Producción masiva**

### **4.2.1. Introducción**

A la hora de realizar el trabajo es fundamental tener una gran cantidad de microorganismos, para ello debemos hacer una buena y eficiente producción de los hongos a emplear, por lo tanto, se hará una multiplicación masiva de los hongos y junto a sus estructuras reproductivas en un sustrato (Cruz, 2007).

Los propágulos de los hongos empleados en la producción masiva requieren de un proceso rentable de producción además de una estabilización de estos para que sigan siendo viables e infecciosos (Jackson,2007; Goettel y Roberts, 1992).

Debe elegirse un propágulo adecuado, para ello se tendrá en cuenta la tolerancia térmica y a la desecación, su buena virulencia, estabilidad ambiental, velocidad de infección y de germinación, tolerancia a los rayos UV y la capacidad del hongo a la hora de producir el propágulo en cuestión sin olvidar el uso que se le quiera dar al producto (Vega *et al.*,1999; Jackson *et al.*,1997).

Uno de los principales factores a tener en cuenta es determinar cuál es la mejor relación entre carbono y nitrógeno para que así se consiga mantener en buenas condiciones la actividad de los complejos enzimáticos permitiendo la asimilación de los nutrientes presentes en el sustrato. Durante el proceso de la producción hay que suministrar oxígeno al hongo durante su crecimiento, con esto conseguiremos una colonización total del sustrato y facilidad para la esporulación (Harman y Kubicek, 1998).

Tras los años de estudio, la producción masiva se ha conseguido estandarizar, por lo que las condiciones son: temperatura a 27°C, un tiempo de incubación de 7 a 8 días y una humedad relativa siempre por encima del 50% (Peña, 2002).

### **4.2.2. Tipos de producción masiva**

La producción masiva se puede realizar de dos formas diferentes, una de ellas se hace en bolsas y/o bandejas o en biofermentadores. Ha quedado demostrado que usando el método de producción mediante bandeja consigue una concentración de esporas diez veces mayor que por el método de las bolsas (Jeyarajan, 2006; Prasad y Rangeshwara, 1998).

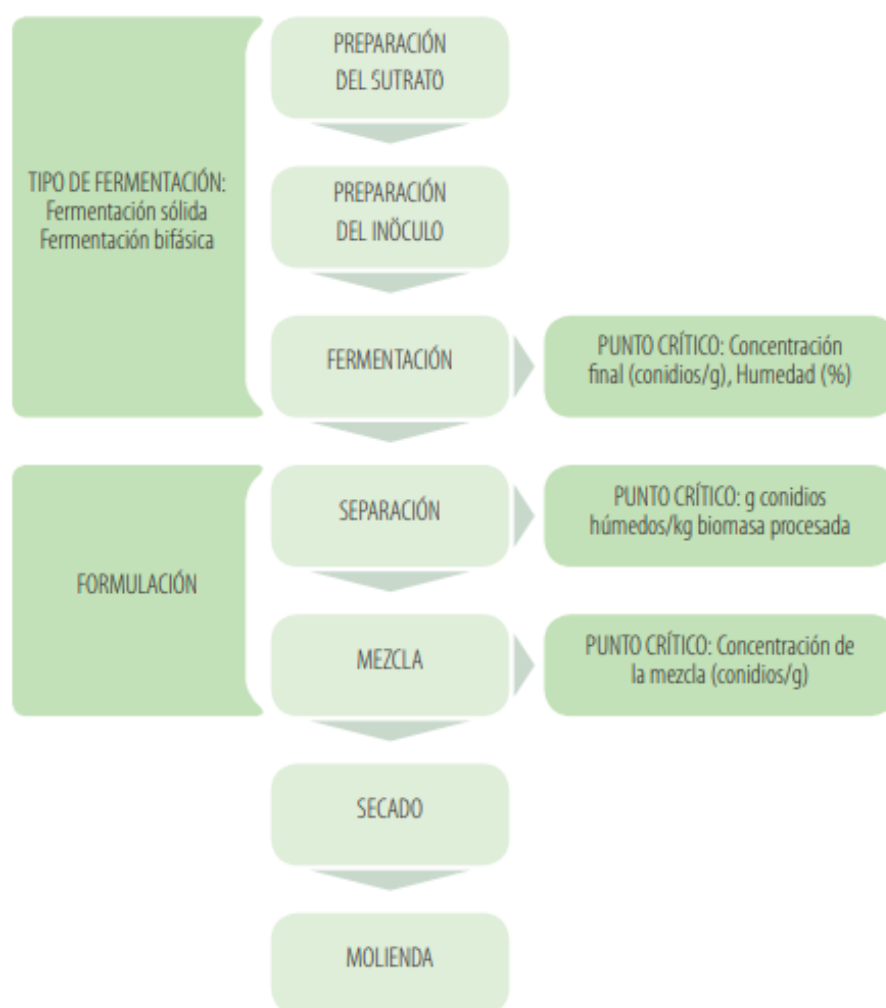


Figura 1. Esquema general del escalamiento de la producción del bioplaguicida a base del hongo *T. koningiopsis* Th003 (Fuente: Cotes Prado y Moreno, 2018).

#### 4.2.2.1. Fermentación líquida

Para la realización de la fermentación líquida los hongos son cultivados en medios líquidos y los materiales empleados son solubles en agua, estos pueden ser diferentes tipos de melaza, caldo de dextrosa de patata o medios con soja/ azúcar de palma (Prasad *et al.*, 2002).

En los procesos fermentativos de este tipo, la cantidad de agua debe estar presente en exceso debido a que es esencial para el crecimiento microbiano y en ocasiones llega a ser absorbida por el sustrato. Este sistema ha sido adaptado hasta poder darle uso en la multiplicación masiva de agentes fúngicos de biocontrol (Prasad *et al.*, 2002; Prasad y Rangeshwaran,1998).

Usando un medio adecuado en un fermentador adecuado con capacidad de controlar

diversos factores como la aireación, pH, temperatura... la fermentación se puede llevar a cabo en poco tiempo. Está estipulado que la cantidad máxima de propágulos viables y biomasa se puede conseguir en 96 horas siempre y cuando se tenga control sobre el fermentador (Prasad y Rangeswaran, 1998).

La fermentación líquida puede ser clasificada en dos categorías diferentes, la primera es la fermentación líquida sumergida en la cual el hongo se sumerge en un medio líquido en agitación constante y con suficiente aireación permitiendo así la formación de blastosporas, conidios o microesclerocios pero no se formarán conidios aéreos. La segunda categoría corresponde a la fermentación líquida estacionaria donde la esporulación se realiza en un alambique produciendo micelio y conidios aéreos (Kleespies y Zimmermann, 1992, 1998; Mascarín *et al.*, 2015).

Cuando se producen los conidios aéreos el proceso se denomina cultivo líquido de superficie o cultivo estacionario. Este proceso consigue una maximización de la relación superficie-volumen para promover un crecimiento rápido y abundante (Samsinakova *et al.*, 1981).

#### **4.2.2.2. Fermentación sólida**

El método más común para la producción masiva es la fermentación sólida. En esta, se usan materiales insolubles en agua, la cantidad de esta no debe superar la capacidad de saturación del lecho sólido en el que estén creciendo los microorganismos. La fermentación sólida (SSF) es un método eficaz para realizar la producción masiva de bioplaguicidas debido a que ofrece microporpropágulos con una mayor cantidad de conidios (Lewis, 1991).

Hay tres tipos de biorreactores para su realización: tambor rotatorio, bandejas con sustrato y lecho empacado con aireación forzada (Gervais y Molin, 2003). Los sustratos empleados para llevar a cabo la fermentación suelen ser cereales por su bajo precio (Lewis, 1991; Jeyarajan, 2006). Una vez se tiene el cereal escogido será humedecido, esterilizado e inoculado con el hongo en cuestión. Los hongos estarán unos días incubándose y por consecuencia se generará una capa de color verde oscuro sobre los granos, esto son las esporas (Mienda *et al.*, 2011).

La fermentación sólida se divide en dos tipos dependiendo de la fase sólida empleada. El primero y más usado implica el cultivo en sustratos naturales, en cambio, el segundo implica el cultivo en un soporte inerte con un medio líquido (Sriram *et al.*, 2011).

El factor más importante en el proceso es la temperatura, ya que está relacionado de forma directa con la velocidad de crecimiento y actividad metabólica de los microorganismos (Krishna, 2005).

El inconveniente de este método es que las fases de producción conllevan mucho trabajo cuyo resultado es un producto voluminoso y muy propenso a contaminarse trayendo como consecuencia unos malos resultados (Kumar *et al.*, 2012).

### 4.2.3. Conservación

Los formulados con microorganismos deben ser conservados en unas condiciones viables para mantener su efecto biológico, se debe asegurar la protección de los ingredientes activos contra baja humedad, productos químicos, radiación UV o condiciones de pH extremo. Por lo que los microorganismos deben tener una ventaja competitiva sobre los patógenos u otra microflora que pueda aparecer en el medio (Harman, 1991; Verma *et al.*, 2005). Estos, estarán en un medio de soporte que puede tener o no aditivos o materiales de enriquecimiento. Si los contienen se pueden dividir en portadores o en enmiendas que permiten una mejora física, química o nutricional del formulado (Schisler *et al.*, 2004).

Los materiales de enriquecimiento son aquellos con una gran riqueza en nutrientes como maltosa, trehalosa, melaza, además se puede añadir sacarosa para que así los materiales centrales obtengan una mejor viabilidad (Brar *et al.*, 2006; Tu *et al.*, 2001).

La temperatura de almacenamiento es un factor crítico que determina la conservación de la viabilidad y de la actividad biocontroladora de los bioplaguicidas. A la hora de comercializar los productos formulados, una larga vida útil es un factor muy importante y una gran ventaja para cualquier inoculante (Fages, 1992).

Para poder conseguir una larga vida útil del formulado este podrá realizarse en formulaciones en polvo humectable (WP), polvos solubles (SP), formulación granular, formulaciones de emulsión de aceite en agua (EW), emulsiones de agua en aceite (EO) o microcápsulas (Brar *et al.*, 2006; Brasil, 2004). Generalmente, las formulaciones en sólido se suelen preferir a las líquidas ya que suelen proporcionar una mayor vida útil y su almacenaje es más fácil (Lumsden *et al.*, 1995). Cuando se trata de formulados en polvo, el material activo es preferible que se encuentre en forma de esporas aumentando así la eficiencia y vida útil de la materia activa (Caesart y Burr, 1991).

Uno de los pasos más importantes para intentar conservar la viabilidad del formulado es optimizar el proceso de fermentación para intentar llegar a una máxima producción de esporas (Driks, 2004). En diferentes estudios se ha demostrado que hay una relación en la producción de esporas dependiendo de la composición mineral del medio (Krueger y Kolodziej, 1977; Mallidis y Scholefield, 1987).

Todavía, existen numerosas dificultades a la hora de producir y comercializar estos formulados a gran escala; el principal inconveniente es la ausencia de formulaciones adecuadas que puedan asegurar la eficiencia y viabilidad del agente de control biológico a la hora de su empleo (Kushwaha, 2011; Sharma *et al.*, 2005).

En el artículo de C.K.F Wong *et al.*, (2019) se llegó a la conclusión de que las poblaciones de *Pseudomonas aeruginosa* y *Trichoderma harzianum* disminuyeron cuando la temperatura de almacenaje de las bioformulaciones fue de 25°C y no de 4°C. Como formulaciones se emplearon gránulos de Pesta y perlas de alginato y en ambos casos los resultados apuntaron que la conservación a 25°C era peor que a 4°C, siendo las perlas de alginato la peor opción de las dos formulaciones ya que no se detectaron ninguna de las poblaciones microbianas.

Según los resultados obtenidos por J.I. Marín *et al.*, (2014) podemos decir que a 5°C los preparados bajo estudio se conservaron mejor que a temperatura ambiente; a su vez, en el preparado sólido hubo un mayor descenso de la viabilidad de las esporas. Aunque hubo más descenso en el preparado sólido que en el líquido este no afectó a la potencia  $10^7$  UFC·g<sup>-1</sup> que acompañaba a la concentración de los propágulos. También se vio que en el formulado líquido el cómputo de esporas en la mayoría de los casos fue menor a la viabilidad de los propágulos presentes; en el caso del formulado sólido hubo coincidencia entre el cómputo de esporas y su viabilidad que en ninguno de los casos dio resultados superiores al 40%.

Los resultados del artículo de Basil Y. Mahde *et al.*, (2019) mostraron que el material polimérico mejoró la longevidad de las esporas de *Trichoderma longibrachiatum* para seis meses, pero aunque la longevidad era mejor la viabilidad de las esporas comenzó a disminuir de forma gradual durante el tiempo de almacenamiento ya que la concentración de esporas pasó de  $5,09 \times 10^6$  UFC·g<sup>-1</sup> a  $1,77 \times 10^6$  UFC·g<sup>-1</sup> tras los seis meses de almacenamiento.



### 4.3. *Trichoderma*

Como se ha comentado, *Trichoderma* es un organismo que está siendo estudiado como agente de biocontrol ya que su uso ha tenido mucho éxito contra enfermedades transmitidas por el suelo, además se está explotando como agente promotor del crecimiento y como fuente de enzimas en las industrias (Bettiol, 2011; Kumar *et al.*, 2014).

#### 4.3.1. Morfología y taxonomía

La primera descripción de *Trichoderma* se realizó en 1794 (Persoon, 1794), posteriormente se creó la taxonomía que únicamente abarcaba a *Trichoderma viride*. A partir de este momento se fueron incluyendo numerosas especies a este género, llegando a contener más de cien especies definidas filogenéticamente en 2006 (Druzhinina *et al.*, 2006). La mayoría de las cepas no se asocian con etapas sexuales, esto es un obstáculo a la hora de entender las relaciones dentro y entre las diferentes especies de *Trichoderma* (Samuels, 1996).

*Trichoderma* es un género de deuteromicetos filamentosos. Se pensaba que *Trichoderma* solamente formaba esporas asexuales y conidios de color verdoso provenientes de un solo tipo de conidióforos. Hoy en día, se sabe que algunas especies producen clamidiosporas (Bissett, 1991), también se han descrito sinamorfos para varias especies que producen sus conidios a partir de pústulas (Chaverri, 2001).

Las especies pertenecientes al género *Trichoderma* producen una gran variedad de pigmentos que pueden pasar desde color amarillo verdoso a tonos rojizos, aunque también pueden ser incoloros. De la misma forma, también hay variación en la pigmentación de los conidios ya que oscila desde incoloro a tonos de diferentes verdes, grises o marrones. Al tener una morfología con poca variación resulta muy difícil la identificación dentro del género (Gans y Bissett, 1998). Se ha indagado la filogenia genérica de *Trichoderma* basándose primeramente en el espaciador transcrito interno (ITS) que pertenece al ADNr y posteriormente se emplearon múltiples genes (Kindermann *et al.*, 1998; Kullnig - Gradinger *et al.*, 2002).

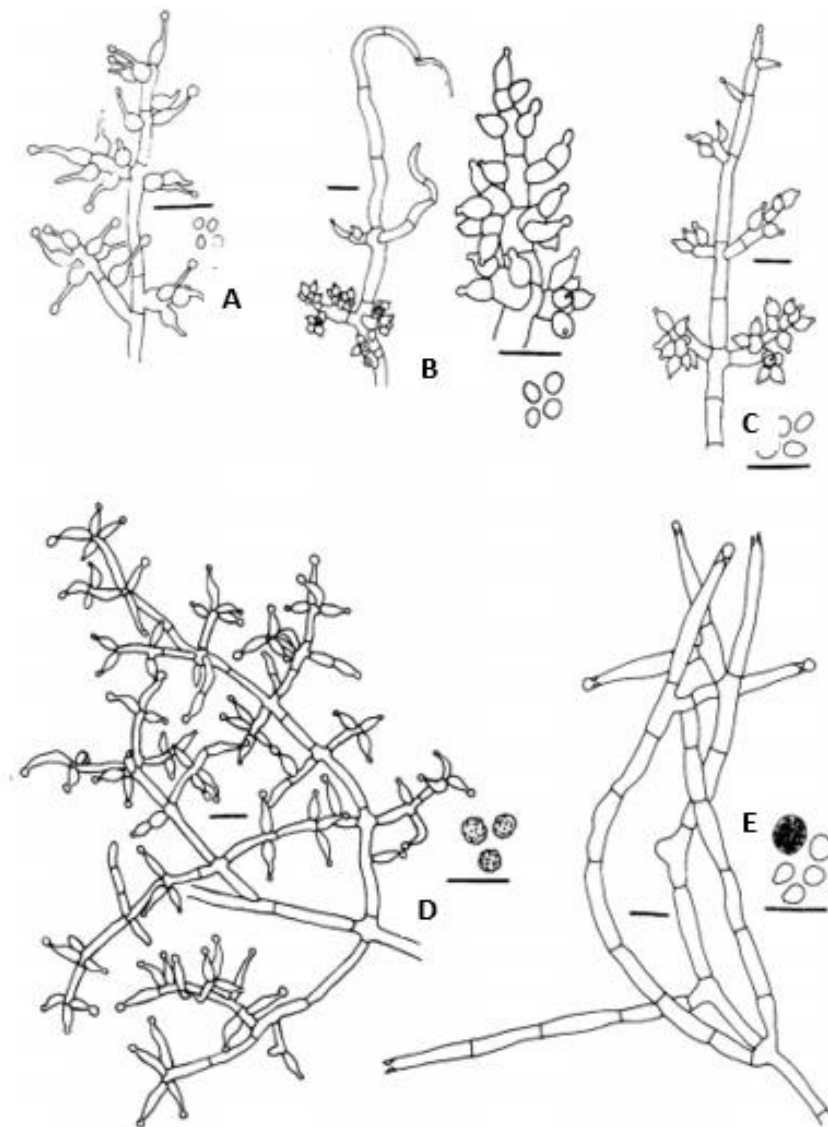


Figura 2. *Trichoderma* e *Hypocrea*. (A) *Tolypocladium niveum*, ex neotipo (ARSEF 3280). (B) *Trichoderma polysporum-aggr.* anamorfo de *Hypocrea* sp. (G] S 98-121). (C) *Trichoderma minutisporum* Bissett, anamorfo de *Hypocrea* sp. (CBS 901.72). (D) *Trichoderma viride* anamorfo de *Hypocrea rufa* (G] S 90-97). (E) Anamorfo de *Hypocrea pulvinata* (G] S 91-220). Barras de escala = 10 - 11  $\mu\text{m}$ . (Fuente: Samuels, G. J., 1996).

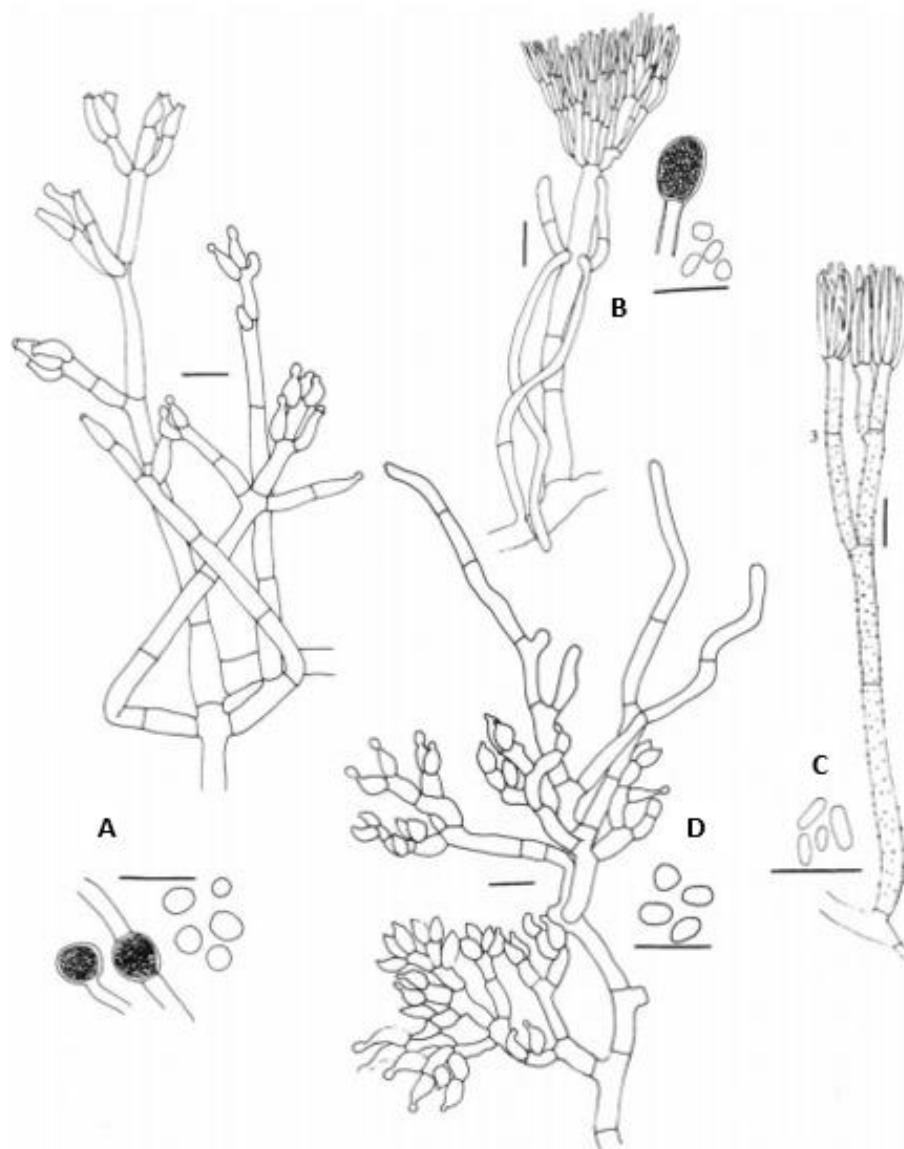


Figura 3. *Trichoderma* y *Gliocladium*. (A). *Trichoderma virens*. cultura tipo ex. (B). *Gliocladium viride* (J. P. Jones Gl 114). (C). *Gliocladium prnicillioides*, anamorfo de *Sphaerostilbella aureonitens* (GJS 83-286). (D). Anamorfo de *Trichoderma* de *H. flavovirens* (GJS95-154). Barras de escala = 10 - 11  $\mu\text{m}$  (Fuente: Samuels, G. J., 1996).

*Trichoderma spp.* está caracterizado por tener un crecimiento muy rápido, generando en su mayoría conidios con un color verde brillante y los conidióforos ramificados y mal definidos (Gams y Bissett, 1998; Rifai, 1969; Bissett, 1984; Bissett 1991).

Al ser tan complicada determinar su taxonomía por medio de la morfología, se han usado otros métodos taxonómicos mediante estudios de metabolitos secundarios que han llegado a mostrar la gran diversidad que hay dentro de este género (Okuda *et al.*, 1982).

#### 4.3.2. Características de *Trichoderma* spp.

Las *Trichoderma* son hongos de vida libre, ubicuos, no patógenos y altamente interactivos con las raíces, el suelo y las plantas interiores (Verma *et al.*, 2007). Se pueden encontrar en cualquier lugar en descomposición en el que haya material vegetal disponible (Kubicek *et al.* 2008; Jaklitsch 2009) así como en la rizosfera de las plantas, donde puede inducir resistencia sistémica contra patógenos (Harman, 2000).

*Trichoderma* puede ser empleada en sustrato o suelo para controlar patógenos como *Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp. y *Fusarium* spp, en el tratamiento de semillas o en el crecimiento de plántulas (Hjeljord y Tronsmo, 1998).

Algunas especies de *Trichoderma* spp. tienen la capacidad de producir enzimas que inhiben a otros hongos (Lima *et al.*, 1997; Mohamed *et al.*, 2010). Puede actuar al mismo tiempo como microbianos antagonistas y simbiontes de las plantas (Lorito *et al.*, 2006).

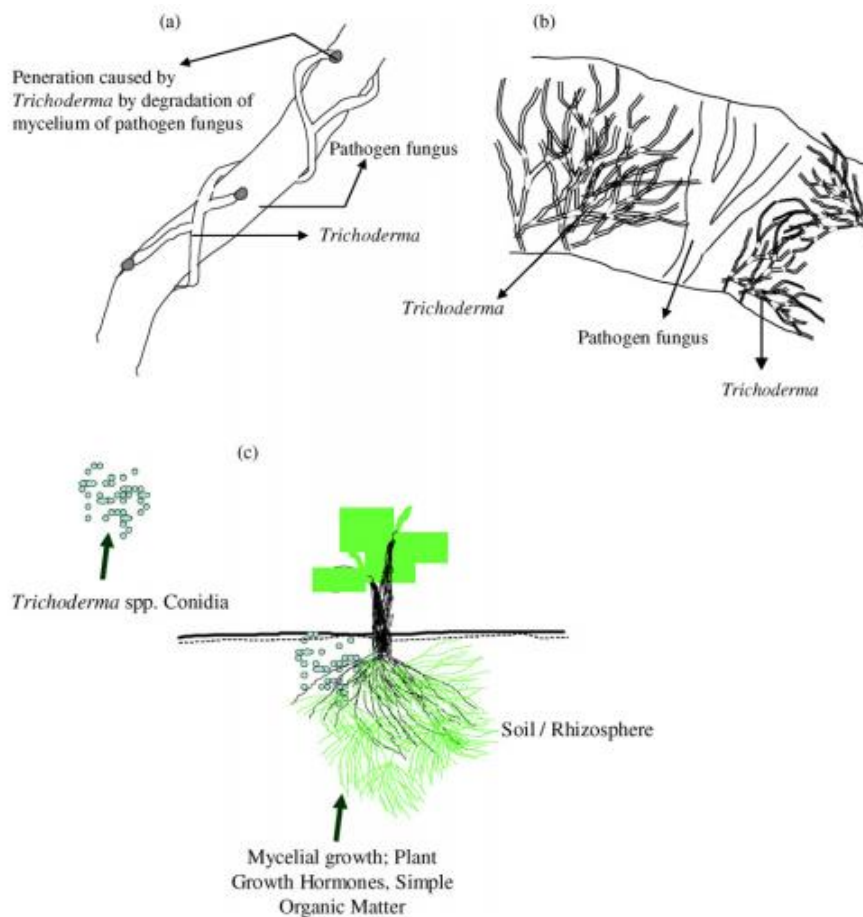


Figura 4. Actividades de promoción del crecimiento de *Trichoderma* spp. Indirectos: (a) micoparasitismo, (b) competencia; directa: (c) crecimiento micelial alrededor de la rizosfera de la planta y producción de metabolitos (Fuente: Verma *et al.*, 2007).

Diferentes modos de acción de biocontrol de *Trichoderma*:

- Micoparasitismo. El micoparasitismo junto a la producción de enzimas forman los principales mecanismos de biocontrol.
- Producción de antibióticos. La actividad contra otros hongos es ayudada por la producción de enzimas como proteasa, celulasa, quitinasa y  $\beta$ -1,3-glucanasa, los cuales son capaces de interrumpir el micelio de los hongos patógenos (Samuels, 1996; Elad *et al.*, 1982).
- Habilidad saprófita competitiva. La competencia por los sustratos es el factor más importante para los hongos (Garrett, 1956).
- Resistencia inducida. Se piensa que la resistencia sistémica inducida es uno de los mecanismos más importantes de efectos de biocontrol de *Trichoderma* (Harman *et al.*, 2006). *Trichoderma* puede inducir una respuesta sistémica en las plantas a través de la vía de señalización JA/ etileno, provocando que la planta sea más resistente al patógeno que la intenta infectar (Viterbo *et al.*, 2002). Hay tres vías reconocidas de resistencia inducida en plantas, dos de estas implicar la producción directa de patogénesis relacionada con proteínas (PR). La primera vía es el resultado del ataque de microorganismos patógenos, en la segunda vía las proteínas PR son producidas tras una herida o una necrosis inductora de patógenos vegetales. La tercera vía está inducida por bacterias no patógenas que están asociadas a las raíces (Harman *et al.*, 2004).

Hay algunos obstáculos a la hora de usar *Trichoderma* como agente de biocontrol debido a que consiguen colonizar de forma efectiva la espermosfera pero no sobrevive muy bien en la rizosfera (Deacon, 1994). La mayoría de los productos contienen conidios como ingrediente activo debido a que, aunque el micelio y las clamidiosporas tengan una gran actividad como agente de control biológico no aguantan todos los pasos de procesamiento necesarios para obtener el formulado (Whipps y Lumsden, 2001; Verma *et al.*, 2005).

Las principales limitaciones para el desarrollo de productos biopesticidas a base de *Trichoderma* son: elevado coste de las materias empleadas en la formulación, dificultades a la hora de cuantificar la eficacia del agente de control biológico, los agentes de control no llegan a registrarse como tal y se comercializan como productos para mejorar el suelo, bajo rendimiento y eficacia del proceso y hay pocas investigaciones en el desarrollo de formulados que aseguren la viabilidad de la actividad del agente biológico en cuestión (Verma

*et al.*, 2007; Whipps y Lumsden, 2001).

Las especies de *Trichoderma* más usadas son *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride*, se han explotado en al menos unos 90 cultivos diferentes transmitiéndose por el suelo y en 18 patógenos foliares respectivamente (Sharma *et al.*, 2014).

#### **4.4. *Paecilomyces***

*Paecilomyces* es un hongo entomopatógeno con un importante potencial a la hora de descubrir nuevos compuestos, esto hace que sea empleado como bionematicida, biofungicida o pesticida y su vez se considera como un buen biocontrolador, sin olvidar sus fines medicinales (Huang *et al.*, 2008; Rungjindamai *et al.*, 2008; Hyde y Soyong, 2008).

##### **4.4.1. Morfología y taxonomía**

Bainier estableció en 1907 el género *Paecilomyces*, este se caracterizaba por estar muy ligado a las especies de *Penicillium* diferenciándose por la presencia de conidióforos verticilados con fiálides cortos que se estrechan en cuellos largos y diferentes además de la ausencia de la creación de colonias de color verde (Luangsa-Ard *et al.*, 2005).

De manera taxonómica, el género *Paecilomyces* se encuentra dentro del filo *Ascomycota*, orden Eurotiales. Basándose en la base de datos Index Fungorum hay registradas un total de 145 especies en todo el mundo. La delimitación del género *Paecilomyces* quedó restringida a especies con conidióforos verticilados de verticilos divergentes de ramas y fiálides (Luangsa – Ard *et al.*, 2004; Samson 1974).

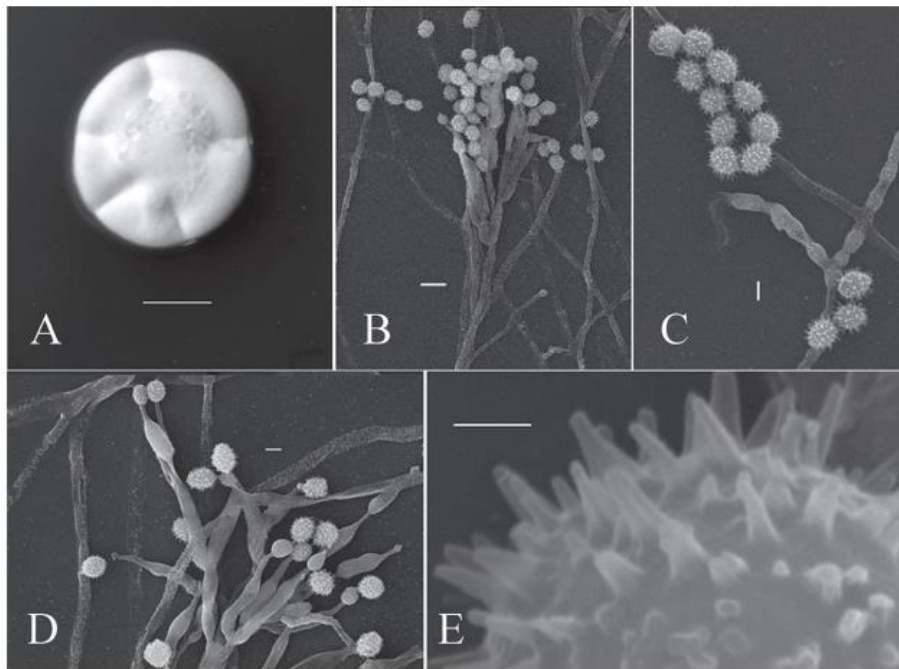


Figura 5. Fotografías de la colonia y la estructura conidiógena de *Paecilomyces wawuensis* debajo microscópio electrónico escaneando. A. Colonia en agar Czapek después de 14 días a 25 ° C. B. Conidiógeno estructura. C. Conidios elipsoidales en cadenas. D. Fialides de la estructura conidiógena. E. Echinula de un conidium. Barras de escala: A = 10 mm, B = 5  $\mu$ m, C – D = 2  $\mu$ m, E = 0,5  $\mu$ m. (Fuente: He et al, 2011).

Las especies incluidas dentro de *Paecilomyces* se han dividido en dos secciones. Una sección contiene especies termofílicas mientras que la otra sección contiene a las especies mesófilas (Inglis y Tigano, 2006). La clasificación taxonómica se ha basado en sus características morfológicas, dando lugar a sistemas taxonómicos con poca fiabilidad (Obornik et al., 2001). Para evitar estos errores a la hora de establecer las relaciones filogenéticas se empleó la filogenia molecular usando varios marcadores de ADN (Luangsa – Ard et al., 2004; Luangsa – Ard et al., 2005; Inglis y Tigano, 2006;)

Tras años de investigación, se ha demostrado que el género *Paecilomyces* es polifilético en dos tipos de ascomicetos, Hypocreales y Eurotiales (Inglis y Tigano, 2006; Luangsa – Ard et al., 2005). Más tarde, se empleó el gen de la  $\beta$ -tubulina y el ADNr para poder examinar de forma más certera la filogenia de *Paecilomyces* (Luangsa – Ard et al., 2005)

Dentro del género *Paecilomyces* se han encontrado ciertas especies raras las cuales tienen conidios equinulados, estas son *Paecilomyces gunnii* Z.Q. Liang (Liang, 1985), *Paecilomyces Brown* (Samson, 1974) y *Paecilomyces curticatenatus* (Han et al., 2007).

*Paecilomyces variotii* es un taxón con morfología variable por lo que ha sido descrito

bajo una gran variedad de nombres. Se ha mencionado la diversidad de tamaño y forma de los conidios, haciéndose incluso una división basada en el tamaño de los conidios (Samson, 1974).

#### 4.4.2. Características de *Paecilomyces*

Las especies contenidas en *Paecilomyces* se pueden definir como mohos ambientales los cuales están presentes en el suelo y se relacionan con la descomposición. Se han asociado algunas especies como patógenos animales, vegetales y humanos, aun así, han demostrado mucho potencial aplicándose en la agricultura, industria y medicina (Chen *et al.*, 1993; Frisvad, 2014).

Varias especies de *Paecilomyces* como *Paecilomyces variotii*, *Paecilomyces lilacinus*, *Paecilomyces farinosus*, *Paecilomyces fumosoroseus* y *Paecilomyces carneus* son consideradas como agentes de control biológico. Esto implica que las especies con estas capacidades son un recurso microbiano con mucho valor y ya no solo por su potencial, sino que también por su habilidad a la hora de producir sustancias bioactivas (Frisvad, 2014). Aun sabiendo esto, en general no se le ha prestado mucha atención al género en cuestión.

Los hongos tienen la capacidad de producir una gran variedad de metabolitos estructuralmente diversos lo que proporciona un gran abanico de propiedades biológicas. Actualmente, se han conseguido aislar un total de 148 metabolitos secundarios de especies de *Paecilomyces*. Sus estructuras son clasificadas en policétidos, terpenoides y esteroides, péptidos y otros compuestos con nitrógeno (Ayer *et al.*, 1991; Isaka *et al.*, 2007).

Estudios han demostrado que los metabolitos secundarios producidos por *Paecilomyces variotii* son capaces de proporcionar compuestos líderes e innovadores para conseguir nuevos descubrimientos en el mundo farmacéutico (Mioso *et al.*, 2015).

#### 4.5. Materiales empleados

- Material fúngico. Se emplearán tres tipos de microorganismos de los cuales ya se han estudiado sus efectos positivos sobre el material vegetal en el que se aplica.
- Lisina. La lisina es un aminoácido de carácter hidrófilo que presenta la capacidad de antioxidante y forma parte de la composición de las proteínas.
- Cloruro potásico. Se trata de un haluro metálico
- Materia orgánica líquida. Obtenida de un producto comercial.
- Estufa. Aparato que produce y emite calor pudiéndose establecer a una temperatura fija.



- Microscopio. Empleado a la hora de hacer el conteo de las esporas ya que gracias al sistema de lentes se consigue ampliar el objeto observado.
- Agitador Vortex-Genie 2. Usado para mezclar y agitar las diluciones de los botes o tubos Eppendorf antes de su uso.
- Autoclave. Máquina empleada para esterilizar todo el material usado.
- Placas de Petri. Pequeñas cajas de plástico circulares transparentes formadas por dos partes, recipiente y tapa, en las cuales se cultivan bacterias, hongos o cualquier tipo de microorganismos en condiciones controladas.
- Cámara de Neubauer. También llamada hemocitómetro es un instrumento que ha sido empleado para realizar el recuento de las esporas.
- Tubos eppendorf. Empleados para contener las soluciones de los diferentes formulados antes de realizar las mediciones. Comúnmente se usan para contener sustancias y para centrifugación.

#### **4.5.1. Material fúngico empleado**

Los microorganismos usados en la realización del proyecto son:

- *Trichoderma aggressivum*.
- *Trichoderma saturnisporum*.
- *Paecilomyces variotii*.

#### **4.5.2. Otros materiales**

- Bandejas. Recipiente de plástico con cierta profundidad en el que se hará la producción masiva de los hongos.
- Colador. Utensilio con un tamiz usado para separar el elemento líquido del sólido.
- Frascos de polipropileno. Envases de polipropileno con tapa que supuestamente son herméticos.
- Matraz Erlenmeyer. Frasco de vidrio con forma cónica y cuello cilíndrico utilizado en laboratorios.
- Cubreobjetos. Hoja fina transparente de forma cuadrada o rectangular que será empleada para cubrir la cámara de Neubauer.
- Mechero Bunsen. Necesario para crear un ambiente de trabajo antiséptico, evitando así posibles contaminaciones.

- Vasos de precipitado. Recipiente cilíndrico de vidrio usado principalmente para preparar, medir, calentar o traspasar sustancias en laboratorios.
- Pipeteador. Instrumento que usado junto a la pipeta sirve para traspasar líquidos contenidos en un recipiente a otro.
- Micropipetas. Instrumento empleado para transferir y absorber volúmenes pequeños de líquidos.
- Bolsas de autoclave. Se usan para guardar el material antes de ser esterilizado en autoclave ya que producen y mantienen condiciones estériles.
- Colador metálico. Utensilio metálico de forma semi-esférica usado como filtro gracias a su tamiz, existen de diferentes tamaños.

#### 4.6. Métodos

Técnicas realizadas:

##### 1. Cultivo y preparación de los diferentes hongos.

Para realizar el cultivo de los hongos primero prepararemos diez placas de Petri de cada hongo, es decir de *Trichoderma saturnisporum*, *Trichoderma aggressivum* y *Paecilomyces variotii*. Antes de nada, realizaremos el medio de las placas de Petri para ello pondremos 20 g/L de PD más 20 g/L de agar dentro de una botella de pyrex enrasada con agua destilada hasta que lleguemos a un litro y será esterilizada en autoclave durante el tiempo de 20 minutos a una temperatura de  $120 \pm 1$  °C.



Figura 6. Placas de Petri con *Trichoderma aggressivum*, *Trichoderma saturnisporum* y *Paecilomyces variotii* respectivamente.

Una vez lista la disolución será vertida en las placas dejando que solidifique. Tras tener las placas listas con el medio sembraremos discos de un diámetro de 0,5 cm obtenidos con un sacabocados, estos contendrán el micelio de cada uno de los hongos los cuales han sido obtenidos de los bordes activos de placas completamente esporuladas.

Posteriormente, haciendo uso de una lanceta esterilizada con alcohol y el mechero Bunsen cogemos los discos y se colocarán en el centro de la placa de Petri para finalmente ser incubadas en la estufa a  $25 \pm 1$  °C en un periodo de 7 a 10 días dependiendo del hongo y en condiciones de completa oscuridad.

## 2. Extracción del inóculo madre.

Pasado el tiempo necesario de incubación las placas de Petri se habrán esporulado completamente por lo que pasaremos a la extracción de las esporas. Para extraerlas se va a verter agua destilada estéril con un 0,02 % de Tween 20 sobre las placas y empleando una varilla esterilizada raspamos las esporas, extrayéndolas así del medio y consiguiendo que se diluyan en la solución.



*Figura 7. Raspado de esporas con varilla junto a mechero Bunsen.*

### 3. Producción masiva de los hongos.

Una vez hemos obtenido el inóculo madre se preparará el sustrato en el cual se llevará acabo la producción masiva. Antes de comenzar, esterilizaremos con dos ciclos de autoclave la mezcla de los granos humedecidos con agua contenidos en bolsas. La producción masiva empleada será la fermentación sólida en bandejas de polietileno de alta densidad (HDPE). Como todos los materiales empleados, las bandejas serán desinfectadas sumergiéndolas en una solución de agua que contendrá hipoclorito de sodio al 5 % y se dejarán secar. Cuando tengamos todo listo se colocará el sustrato en las bandejas y se inocula con las soluciones madre de las esporas obtenidas anteriormente.

Finalmente se estarán incubando durante 10-14 días a una temperatura de  $26 \pm 1$  °C. Al tratarse de unos productos que están en el proceso de comercialización no se pueden dar datos más concretos sobre los procesos descritos anteriormente.



*Figura 8. Bandeja totalmente incubada sobre una base de diferentes cereales.*

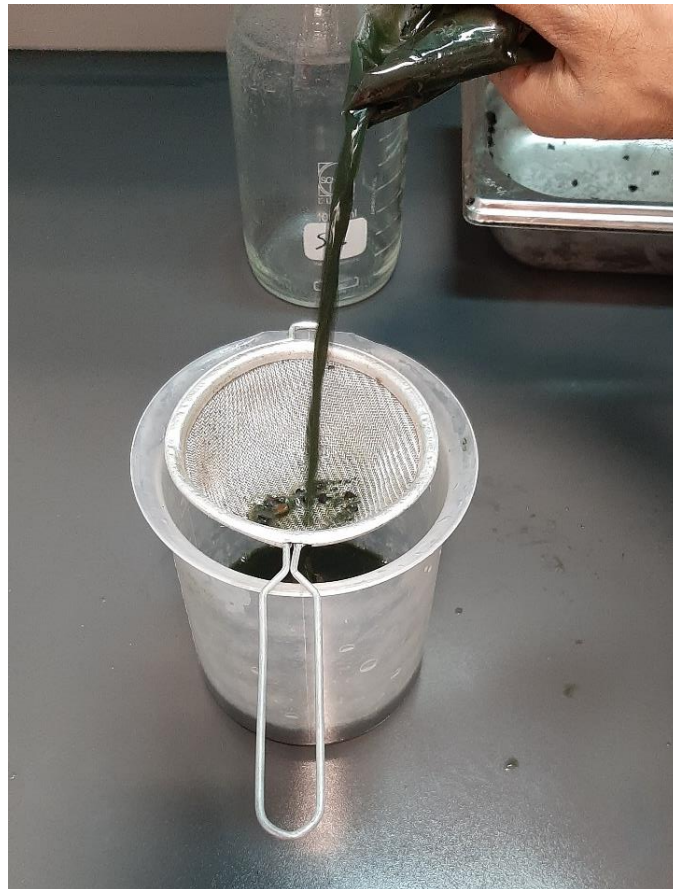
#### 4. Obtención de las esporas y ajuste de la dosis.

Una vez se haya completado la esporulación total de las bandejas se extraen las esporas de cada hongo usando agua estéril. Para ello añadiremos los granos de cereal con el agua en bolsas y se agitará para conseguir que las esporas se desprendan de los granos. Cuando se haya terminado la agitación pasaremos la solución obtenida a frascos haciendo uso de un colador para evitar que entre algún grano.





*Figura 9. Adición de agua a bolsa de autoclave llena del contenido de las bandejas de un microorganismo.*



*Figura 10. Filtrado del contenido de las bolsas haciendo uso de un colador metálico.*

Tras hacer esto, ajustaremos la concentración de esporas a  $5 \times 10^7$  esp/mL para saber el número de esporas obtenidas usaremos un hematocitómetro o cámara de Neubauer, empleando la siguiente fórmula:

$$X \cdot D \cdot f$$

En la cual:

X: Media de las esporas contadas

D: Dilución evaluada ( $10^{-2}$ )

f: Factor de la cámara empleada ( $10^4$ )

De *Trichoderma saturnisporum* se obtuvo un volumen de 2,43 litros con una concentración de  $1,0 \times 10^9$  esp/mL. Como nosotros sabemos que queremos obtener 1 litro con la concentración de  $5 \times 10^7$  esp/mL emplearemos la fórmula  $V_i \cdot C_i = V_f \cdot C_f$  para calcular el volumen necesario; donde:

$V_i$ : Volumen inicial

$V_f$ : Volumen final

$C_i$ : Concentración inicial

$C_f$ : Concentración final

$V_i \cdot 1,0 \times 10^9$  esp/mL =  $1000 \text{ mL} \cdot 5 \times 10^7$  esp/mL en este caso  $V_i$  será 50 mL de la solución de las esporas más 950 mL de agua, consiguiendo así un total de un litro.

En *Trichoderma aggressivum* en un volumen de 1,91 litros se consiguió una concentración de  $8,6 \times 10^8$  esp/mL, por lo tanto, aplicando la fórmula anterior:

$V_i \cdot 8,6 \times 10^8 = 1000 \text{ mL} \cdot 5 \times 10^7$  esp/mL podemos decir que  $V_i$  es 58,14 mL de solución de esporas más 941,86 mL de agua.

Por último, en *Paecilomyces variotii* se consiguió un volumen de 2,75 litros y una concentración de  $1,0 \times 10^8$  esp/mL, como se ha hecho en los dos casos anteriores aplicamos  $V_i \cdot C_i = V_f \cdot C_f$ ;  $V_i \cdot 1,0 \times 10^8$  esp/mL =  $1000 \text{ mL} \cdot 5 \times 10^7$  esp/mL siendo  $V_i$  igual a 500 mL de solución de esporas más 500 mL de agua.



*Figura 11. Botes con cada una de las soluciones madre finales.*

5. Separación de cada solución madre en botes para crear los diferentes formulados.

Una vez se han ajustado las soluciones madre de cada hongo pasaremos a separarlas en botes previamente esterilizados junto a sus tapaderas en el autoclave. Cuando tengamos los botes listos los separaremos indicando en la tapadera con un marcador permanente el hongo del que se trata y con qué se va a mezclar. Iremos añadiendo las soluciones madre en los botes correspondientes y posteriormente los elementos establecidos para la creación de cada formulado.

En el caso del agua solamente añadiremos la solución madre ya que esta ya va con agua, en el segundo caso se le añadirá lisina en una concentración de 60 g/L al tener un litro tendremos que añadir 60 gramos de lisina; el tercer caso lleva lisina con una concentración de 60 g/L junto con 100 g/L de cloruro potásico como ocurre en el caso anterior pondremos 60 g de lisina más 100 g de cloruro potásico. El cuarto caso solamente contiene cloruro potásico a una concentración de 100 g/L e igualmente pondremos 100 gramos en la solución de un litro. En el quinto y sexto caso se aplicará materia orgánica líquida comercial con unas concentraciones de 50% y 10% respectivamente.





*Figura 12. Llenado de botes con las soluciones madre junto al mechero Bunsen.*

6. Depositar los recipientes que contienen los microorganismos en estufas.

Tras repartir todas las soluciones en los botes los separaremos teniendo en cuenta a la temperatura en la que se van a depositar en las estufas con las temperaturas estipuladas (20°C, 30°C y 40°C) y se dejarán ahí durante quince días, un mes, tres meses o seis meses.

Como el número de muestras es muy elevado se les realizarán unas marcas para poder diferenciarlos y así evitar posibles confusiones. Las tapaderas de los botes destinados a estar en la estufa de 20°C se les realizará una marca, a las de 30°C no se les hará nada y las usadas para 40°C tendrán dos marcas.

7. Preparación previa al estudio de las muestras.

Conforme se vayan cumpliendo los plazos, se sacarán los recipientes de la estufa y su contenido será utilizado tanto para hacer una siembra de estos en placas de Petri como para hacer una nueva disolución que será depositada en tubos Eppendorf.

Para la realización de esta etapa, lo primero que se hace es sacar las cuatro repeticiones de cada formulado y de cada microorganismo. Una vez las tenemos fuera de las diferentes estufas diferenciamos los cuatro botes en a, b, c y d para saber localizar posibles contaminaciones y comenzamos con su manipulación siempre con el mechero Bunsen encendido.

Como de cada formulado a estudio tenemos cuatro muestras; a la hora de hacer las placas se dividirán en cuatro partes iguales (nombradas también con a, b, c y d) y se añadirá tres gotas de 15  $\mu$ L provenientes de cada muestra en su parte correspondiente, los botes serán agitados en el vortex antes de coger su contenido. El medio de las placas estará formado por 40 g/L de PDA en una botella pyrex enrasada hasta un litro con agua destilada y se esteriliza en autoclave a  $120 \pm 1$  °C durante el tiempo de veinte minutos. Una vez finalizado el ciclo se enfría sin que llegue a solidificar y se vierte en las placas de Petri a emplear dejando que solidifique ahí.

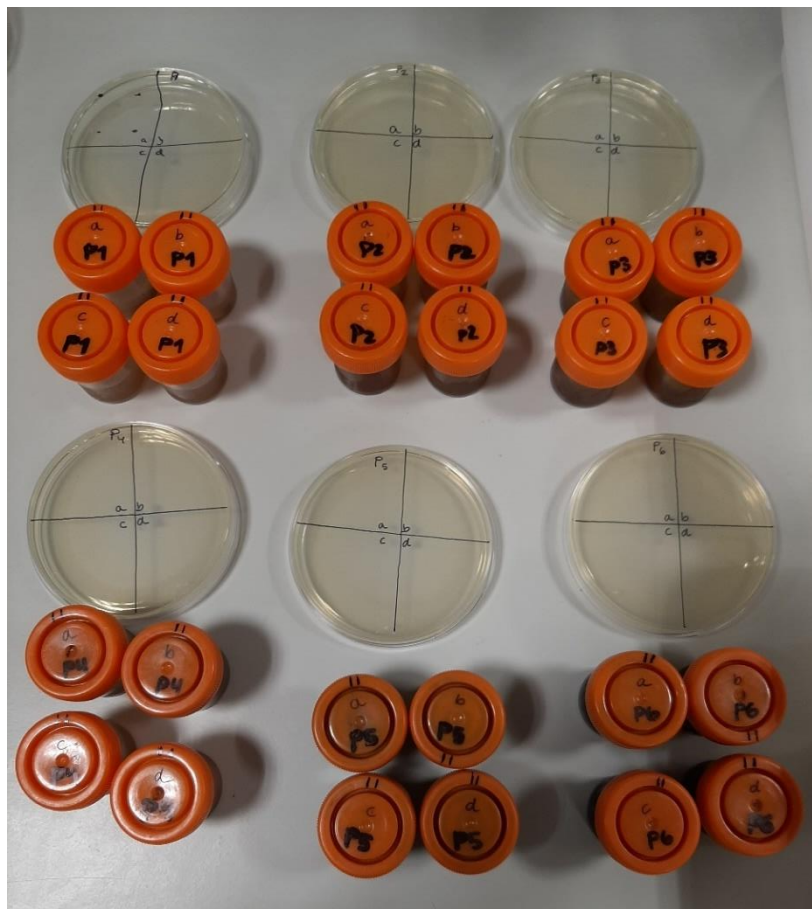
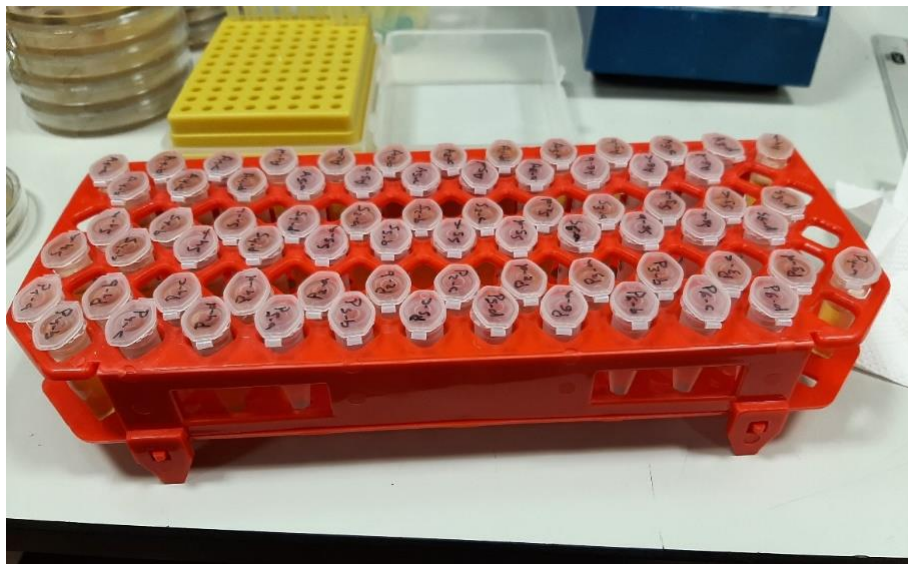


Figura 13. Placas Petri divididas y marcadas junto a las muestras a emplear en cada una de ellas.

Por otro lado, necesitamos hacer una solución que añadiremos a los tubos Eppendorf antes de añadir los microorganismos. Este medio está formado por 26,5 g/L de PD los cuales se enrasan en una botella pyrex con agua destilada hasta llegar al volumen de un litro, después será esterilizada en el autoclave a  $120 \pm 1$  °C durante veinte minutos, cuando haya terminado pondremos 980  $\mu$ L de medio junto a los 20  $\mu$ L correspondiente de cada muestra consiguiendo así d: 1/50 en cada Eppendorf. Como en el caso anterior agitaremos los botes antes de usarlos y cuando se tengan los Eppendorf con el medio y la solución también serán agitados haciendo uso del vortex- genie 2.



*Figura 14. Gradilla con todos los Eppendorf identificados y con la cantidad de medio y formulado estipulado.*

Las placas de Petri se introducirán en la estufa durante tres días a  $25 \pm 1$  °C; en cambio, los tubos Eppendorf estarán en un agitador a 115 revoluciones por minuto con calor durante 24 horas a  $25 \pm 1$  °C.

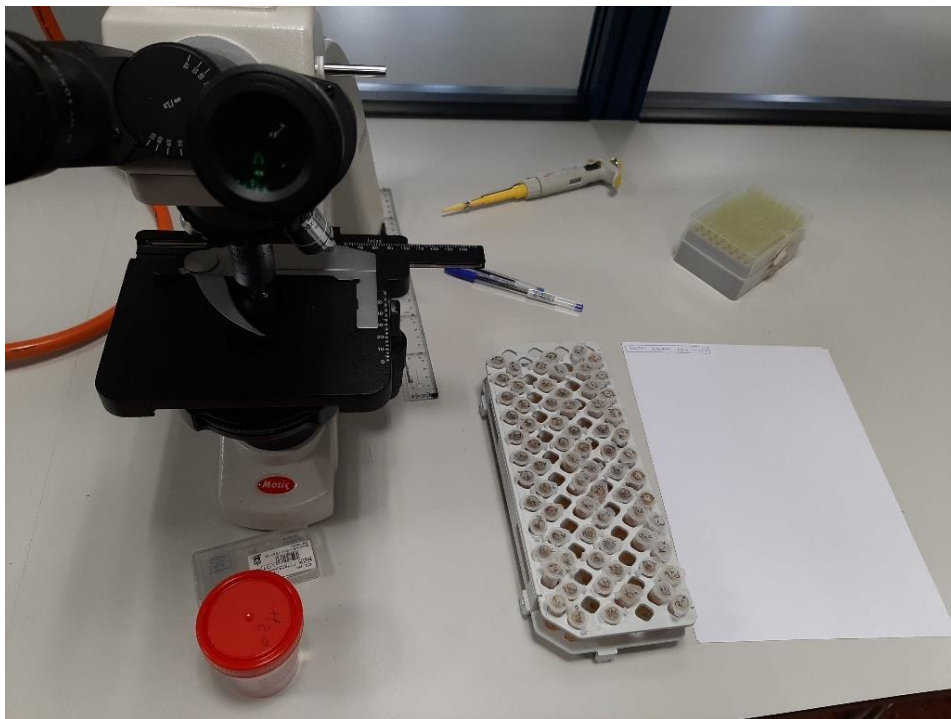
#### 8. Estudio de las muestras.

Pasado ese tiempo, se mirarán las placas para ver el crecimiento obtenido y posibles contaminaciones; en cambio, el contenido de los tubos Eppendorf será usado para realizar un conteo de esporas al microscopio.

Para la realización del conteo de esporas se cogerán los tubos Eppendorf uno por uno y se agitará su contenido usando el vortex antes de su uso para intentar conseguir una disolución

homogénea y sin decantaciones. Una vez se ha hecho esto, con ayuda de una micropipeta se obtendrán 20  $\mu\text{L}$  de la solución y se pondrán en la cámara de Neubauer para poder realizar el conteo de esporas germinadas haciendo uso de un microscopio para así poder establecer el porcentaje de germinación de cada caso.

La cámara de Neubauer tiene dos cámaras independientes con lo que se permite hacer dos conteos de forma simultánea. Cada cámara contiene cuatro zonas distintas formadas por dieciséis cuadrantes iguales cada una, cuando se haga el conteo nos centraremos en una de las cuatro zonas y contaremos el número de esporas que haya en la diagonal, por lo que se contarán cuatro cuadros. Antes de elegir la zona a contar se revisarán todas para comprobar que en todo hay algo más o menos homogéneo evitando así realizar el conteo en una zona en la que haya una gran acumulación de esporas o que por el contrario no haya; por lo que los datos obtenidos no se ajustarían a la realidad.



*Figura 15. Materiales empleados en la realización del conteo de esporas.*

#### 4.7. Diseño experimental

Como se ha comentado anteriormente el material fúngico empleado en el trabajo es: *Trichoderma aggressivum*, *Trichoderma saturnisporum* y *Paecilomyces variotii*. Estos serán probados y estudiados en seis soluciones distintas las cuales son: agua, lisina, lisina junto a cloruro potásico, cloruro potásico y materia orgánica líquida al 50 y al 10%.

A continuación, se deja un esquema para mostrar la forma en la que se ha nombrado a cada formulado y como se va a diferenciar a cada microorganismo. Los botes con *Trichoderma saturnisporum* serán marcados con una letra S, *Trichoderma aggressivum* con una letra A y *Paecilomyces variotii* irá con una letra P, el número que las acompaña corresponde a lo que se le ha añadido a las soluciones madre.

	<i>Trichoderma saturnisporum</i>	<i>Trichoderma aggressivum</i>	<i>Paecilomyces variotii</i>
1. Agua	S1	A1	P1
2. Lisina 60 g/L	S2	A2	P2
3. Lisina 60 g/L + 100 g/L KCl	S3	A3	P3
4. 100 g/L KCl	S4	A4	P4
5. Materia orgánica líquida 50 %	S5	A5	P5
6. Materia orgánica líquida 10 %	S6	A6	P6

Tabla 1. Designación de las muestras dependiendo del material fúngico y el formulado.

A la hora de realizar el ensayo, se harán 12 botes por hongo y por compuesto para las temperaturas de 20°C y 30°C, estos se irán sacando de cuatro en cuatro de la estufa según se vayan cumpliendo los plazos para realizar las correspondientes mediciones. Para la temperatura de 40°C únicamente se realizarán 4 botes para cada tipo de hongo y formulado ya que solamente se hará una sola medición de ellos transcurridos 14 días. Esto se hará para los tres microorganismos por lo que al final, se obtendrán los resultados de un total de 504 muestras.





Figura 16. Muestras totales del ensayo divididas por temperaturas.

	20°C	30°C	40°C
Agua	12 botes	12 botes	4 botes
Lisina 60 g/L	12 botes	12 botes	4 botes
Lisina 60 g/L +100 g/L KCl	12 botes	12 botes	4 botes
100 g/L KCl	12 botes	12 botes	4 botes
Materia orgánica líquida al 50%	12 botes	12 botes	4 botes
Materia orgánica líquida al 10%	12 botes	12 botes	4 botes

Tabla 2. Número de botes asignados por formulado y temperatura.

		15 días	1 mes		3 meses		6 meses	
		40°C	20°C	30°C	20°C	30°C	20°C	30°C
<i>Trichoderma Aggressivum</i>	A1	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes
	A2	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes
	A3	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes
	A4	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes
	A5	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes
	A6	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes
<i>Trichoderma Saturnisporum</i>	S1	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes
	S2	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes
	S3	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes
	S4	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes
	S5	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes
	S6	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes
<i>Paecilomyces variotii</i>	P1	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes
	P2	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes
	P3	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes
	P4	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes
	P5	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes
	P6	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes	4 botes

Tabla 3. Esquema final del ensayo con el reparto de botes por cada temperatura y formulado.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Resultados

A continuación, se van a exponer de forma gráfica todos los resultados obtenidos tras realizar los diferentes análisis en los tiempos de quince días, un mes, tres meses y seis meses tanto en medio sólido (Placas de Petri) como en medio líquido (Eppendorf con medio PD).

#### 5.1.1. Resultados medio sólido

##### 5.1.1.1. Resultados quince días

Este tratamiento en cuestión se ha realizado para comprobar el comportamiento de los microorganismos en los diferentes formulados simulando una situación extrema como podría ser el transporte marítimo del producto en el cual hay posibilidades de llegar a temperaturas que oscilen los 40°C.

- Resultados obtenidos de las placas de Petri tras quince días en la estufa a 40°C.

Como se puede apreciar, en las imágenes de las placas de Petri expuestas a continuación con los diferentes formulados de *Trichoderma aggressivum* se ve que en todos los formulados excepto en el A2 (formulado con lisina) ha habido crecimiento del hongo. Se puede ver contaminación en las placas de los formulados A3 y A6 (formulado con lisina más KCl y materia orgánica líquida al 10% respectivamente) que probablemente se trate de *Aspergillus niger*.

Se puede apreciar cómo ha habido crecimiento de *Trichoderma saturnisporum* en los seis formulados. También se aprecia como en S1 (agua) y S3 (lisina con KCl) las colonias están más maduras que el resto y que han crecido en las cuatro muestras que forman la placa. En el formulado 5 (materia orgánica líquida al 50%) solamente hay crecimiento del hongo en una de las partes de la placa.

Tras pasar las placas de Petri quince días en la estufa con *Paecilomyces variotii* vemos como hay crecimiento del hongo en todas ellas. La que tiene un mayor crecimiento y mejor maduración de los hongos es la P1 (agua), se puede ver algunas contaminaciones de *Aspergillus niger* en algunas secciones de las placas P3 (lisina junto KCl), P4 (KCl) y P6 (materia orgánica líquida al 10%). P5 (formulado con materia orgánica líquida al 50%) ha tenido los peores resultados ya que únicamente los hongos han germinado solo en una de las cuatro partes de la placa.

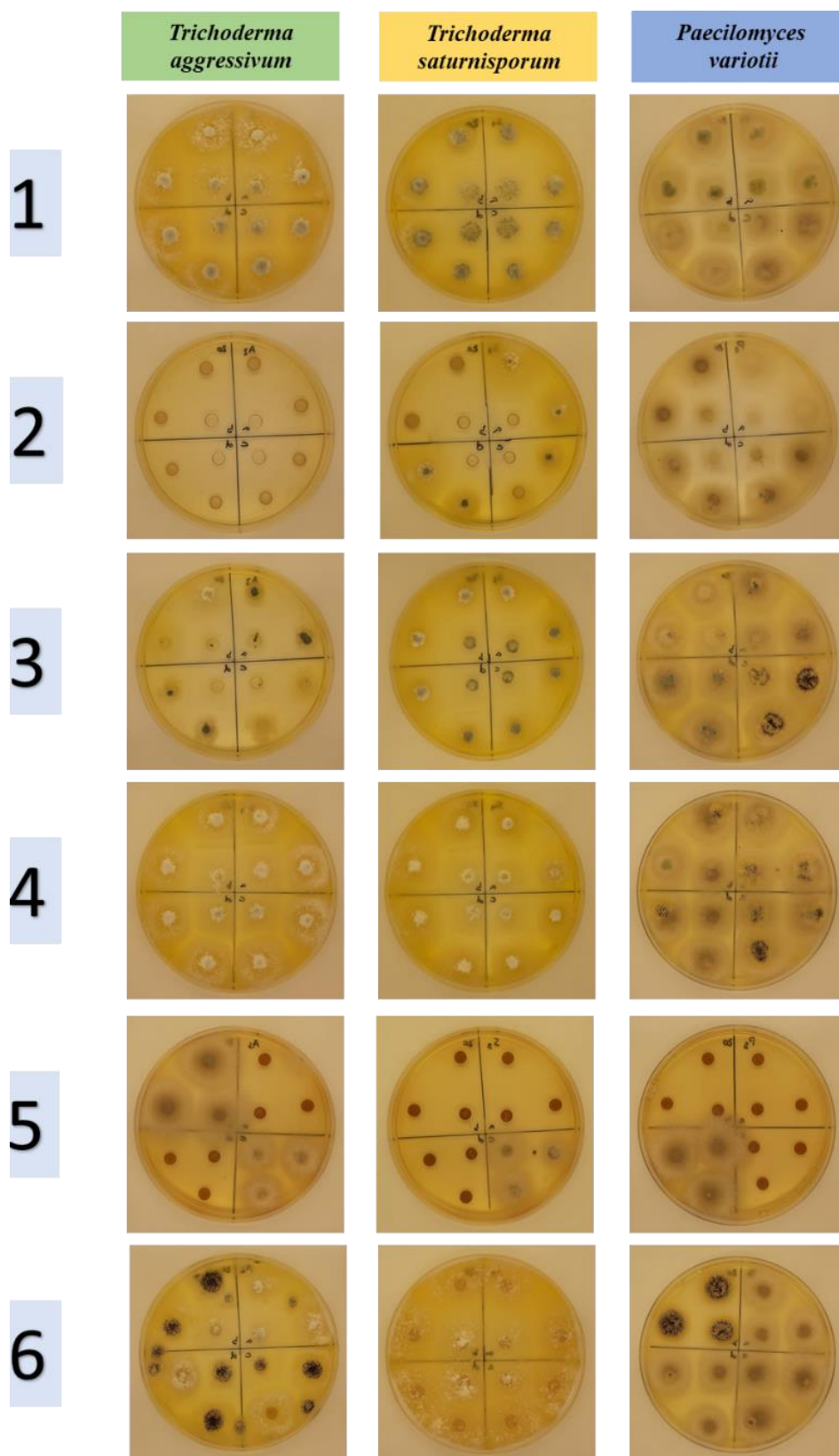


Figura 17. En la figura se representan las imágenes de las placas de Petri con el crecimiento de los diferentes hongos evaluados con los seis formulados bajo estudio tras el tiempo de 15 días a 40°C.

5.1.1.2. Resultados un mes

- Resultados obtenidos de las placas de Petri tras un mes en la estufa a 20°C.

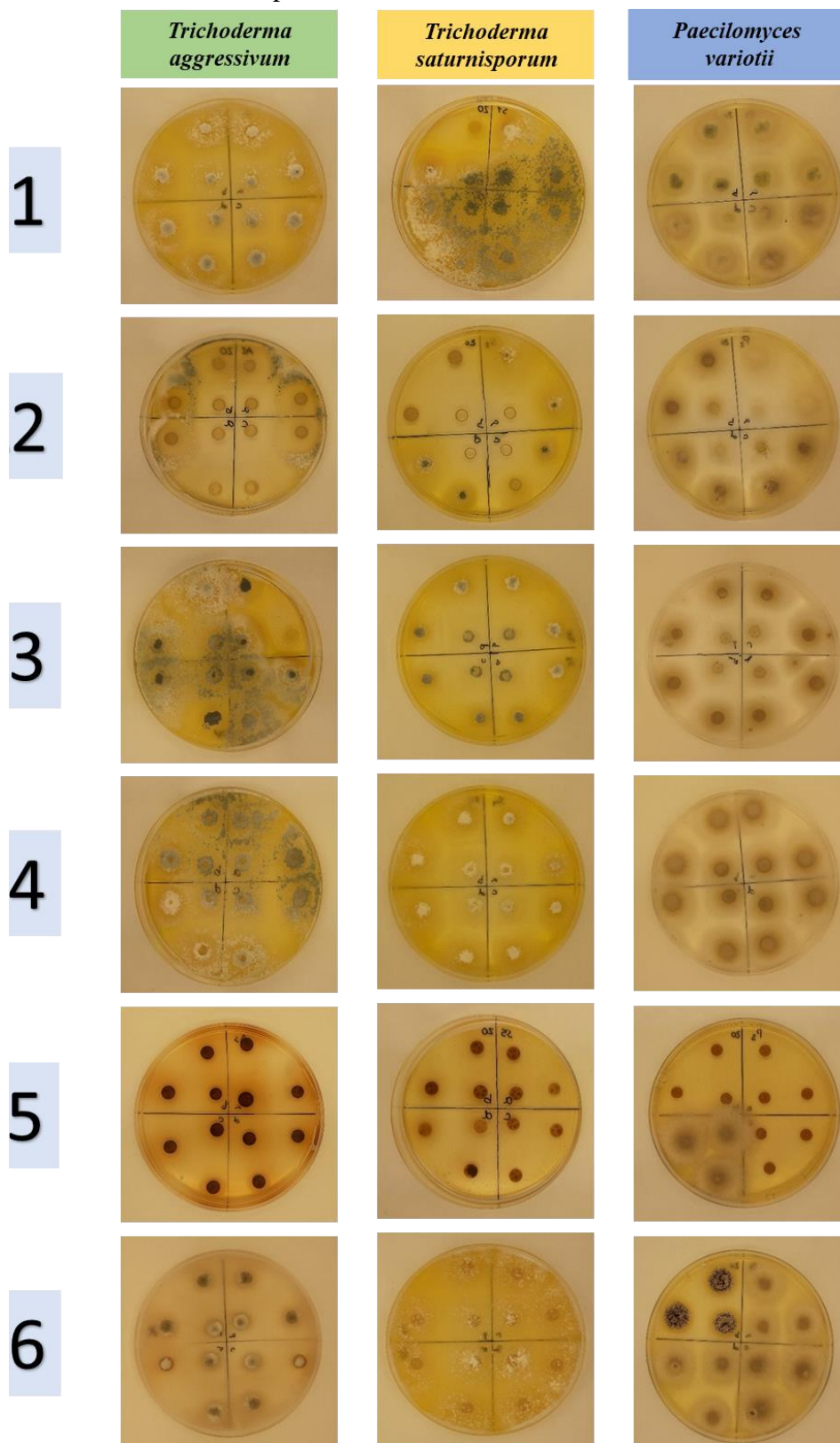


Figura 18. En la figura se representan las imágenes de las placas de Petri con el crecimiento de los

*diferentes hongos evaluados con los seis formulados bajo estudio tras el tiempo de un mes a 20°C.*

Pasado un mes desde que se introdujeron las placas de Petri en una estufa a 20°C vemos como en *Trichoderma aggressivum* hay crecimiento en todos los formulados excepto en el A5 (formulado con materia orgánica líquida al 50%). En el resto de placas se aprecia el crecimiento del hongo y como van madurando las colonias basándonos en los cambios de color de blanco a verde.

Como ha ocurrido en el caso anterior, en S5 (formulado con materia orgánica líquida al 50%) no ha habido crecimiento de *Trichoderma saturnisporum* cosa que en el resto de placas de Petri sí. El mejor crecimiento y asentamiento del hongo se ve en los formulados S1 (agua), S3 (lisina con KCl) y S2 (lisina) en orden decreciente.

Observando las placas de Petri con *Paecilomyces variotii* se ve como hay germinación en todas ellas, teniendo el peor resultado en P5 (formulado con materia orgánica líquida al 50%) ya que solo ha crecido el hongo en una de las cuatro partes y en P6 (formulado con materia orgánica líquida al 10%) se ve contaminación por *Aspergillus niger* en la parte superior izquierda.

- Resultados obtenidos de las placas de Petri tras un mes en la estufa a 30°C.

En el caso de las placas de *Trichoderma aggressivum* que se van a mostrar a continuación, tras un mes a 30°C vemos que hay crecimiento del hongo menos en A5 (formulado con materia orgánica líquida al 50%). En las placas A1 (formulado con agua) y A6 (formulado con materia orgánica líquida al 10%) se ve un buen crecimiento ya que han comenzado a ponerse de color verde las colonias. En A3 (formulado con lisina y KCl) se ve que hay una gran contaminación de *Aspergillus niger* sobre toda la placa.

En *Trichoderma saturnisporum* hay crecimiento del hongo en las placas menos en S5 (formulado con materia orgánica líquida al 50%); en S2 (formulado con lisina), S3 (formulado con lisina y KCl) y S4 (formulado con KCl) hay crecimiento pero poco comparado con S1 (formulado con agua) y S6 (formulado con materia orgánica al 10%) que se ve un crecimiento más asentado y maduro de las colonias.

Podemos ver como hay crecimiento de *Paecilomyces variotii* en todos los formulados, se puede señalar que en P5 (formulado con materia orgánica líquida al 50%) el crecimiento solo se ha dado en una de las cuatro partes de la placa.

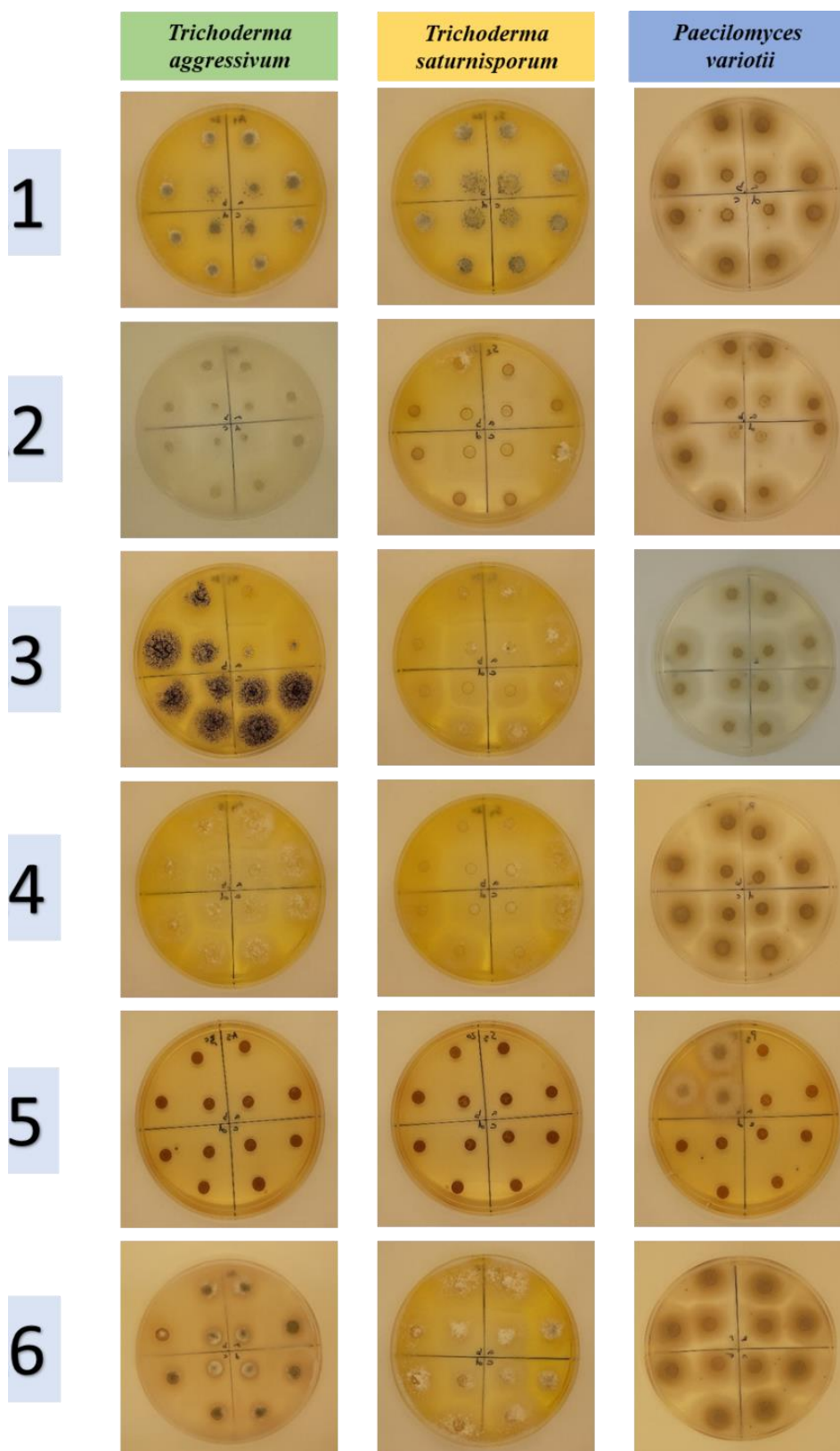


Figura 19. En la figura se representan las imágenes de las placas de Petri con el crecimiento de los diferentes hongos evaluados con los seis formulados bajo estudio tras el tiempo de un mes a 30°C.



5.1.1.3. Resultados tres meses

- Resultados obtenidos de las placas de Petri tras tres meses en la estufa a 20°C.

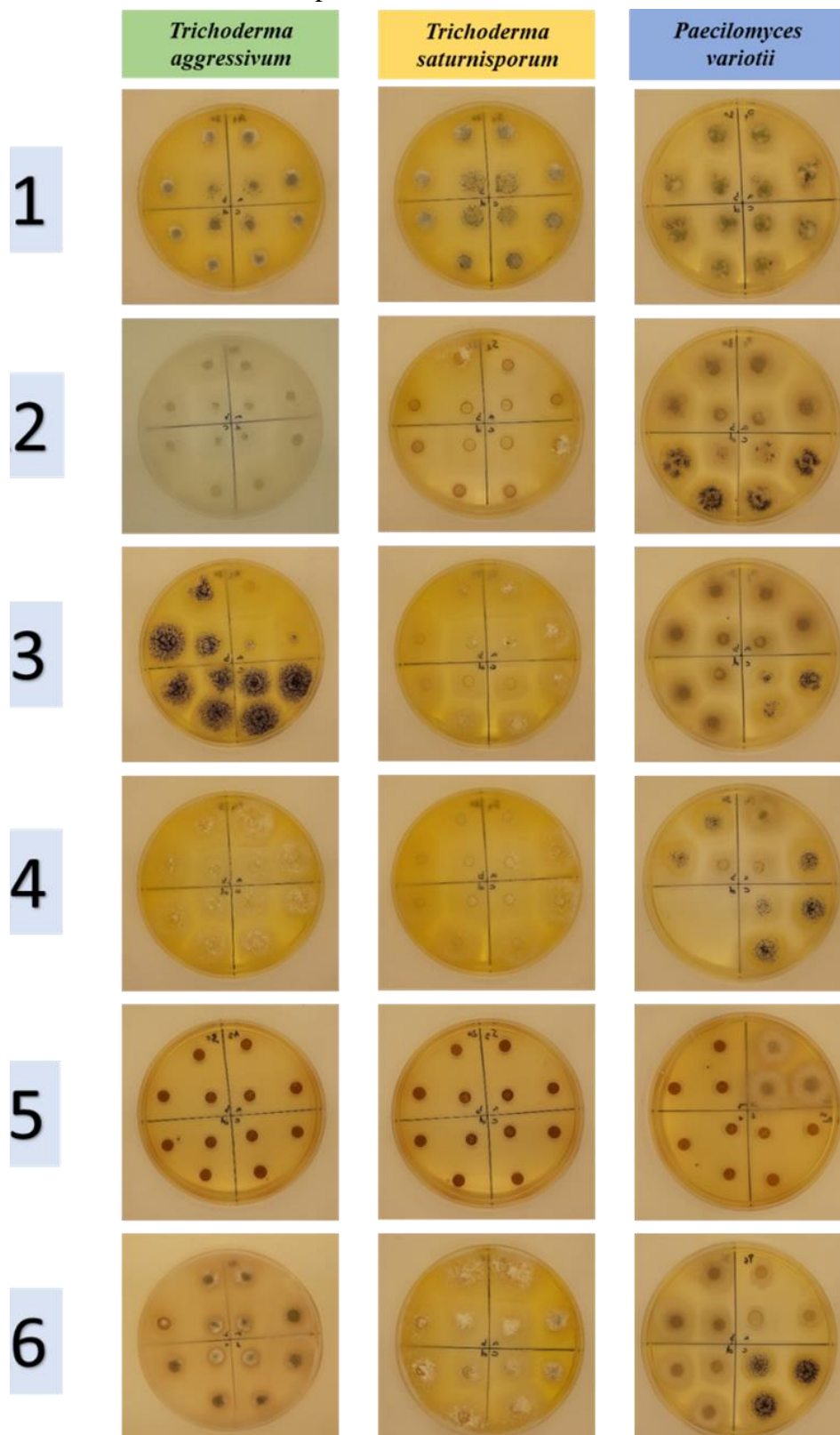


Figura 20. En la figura se representan las imágenes de las placas de Petri con el crecimiento de los

*diferentes hongos evaluados con los seis formulados bajo estudio tras el tiempo de tres meses a 20°C.*

Pasados tres meses desde que se dejaron las placas de *Trichoderma aggressivum* en la estufa a 20°C se ve un crecimiento en cada una de las placas menos en la A5 (formulado con materia orgánica líquida al 50%). En todas se ve un buen crecimiento y maduración de las colonias menos en el formulado A3 (formulado con lisina y KCl) que tres de las cuatro muestras parecen contaminadas con *Aspergillus niger*.

Como está pasando en más de un caso, en esta ocasión el S5 (formulado con materia orgánica líquida al 50%) no hay crecimiento de *Trichoderma saturnisporum*. En el resto de las placas sí que se ve el crecimiento del hongo y como en S1 (formulado con agua) y S4 (formulado con KCl 100g/L) están comenzando a madurar las colonias teniendo en S1 (agua) un estado más avanzado.

En las placas de *Paecilomyces variotii* se ve como hay crecimiento del hongo en cada uno de los formulados. En la placa P5 (formulado con materia orgánica líquida al 50%) solo hay crecimiento del hongo en la parte superior izquierda ya que en el resto de la placa no hay ningún tipo de crecimiento. También se aprecia colonias de color negro en los formulados 2 (formulado con lisina), 3 (formulado con lisina y KCl), 4 (formulado con KCl) y 6 (formulado con materia orgánica líquida al 10%), esto puede ser contaminación provocada por *Aspergillus niger*.

- Resultados obtenidos de las placas de Petri tras tres meses en la estufa a 30°C.

En las placas de Petri correspondientes a *Trichoderma aggressivum* que se van a mostrar, vemos que hay crecimiento en las placas excepto en A2 (formulado con lisina). El crecimiento de A5 (formulado con materia orgánica líquida al 50%) podría corresponder a *Aspergillus niger* tratándose entonces de una contaminación. El mejor crecimiento del hongo puede vincularse con la placa del formulado A6 (formulado con materia orgánica líquida al 10%).

Viendo las placas de Petri correspondientes a *Trichoderma saturnisporum* se puede decir que hay germinación en ellas menos en S5 (formulado con materia orgánica líquida al 50%). El mejor crecimiento del hongo se ve en S1 (formulado con agua) y S6 (formulado con materia orgánica líquida al 10%) ya que en las otras estaba comenzando y por tanto no se aprecia tan bien como en las mencionadas.

En las placas de Petri preparadas con *Paecilomyces variotii* podemos ver el crecimiento de este en las placas menos en P5 (formulado con materia orgánica líquida al 50%). En las

placas P3 (formulado de lisina junto KCl) y P6 (formulado con materia orgánica líquida al 10%) se ve contaminación que seguramente proviene de *Aspergillus niger*.

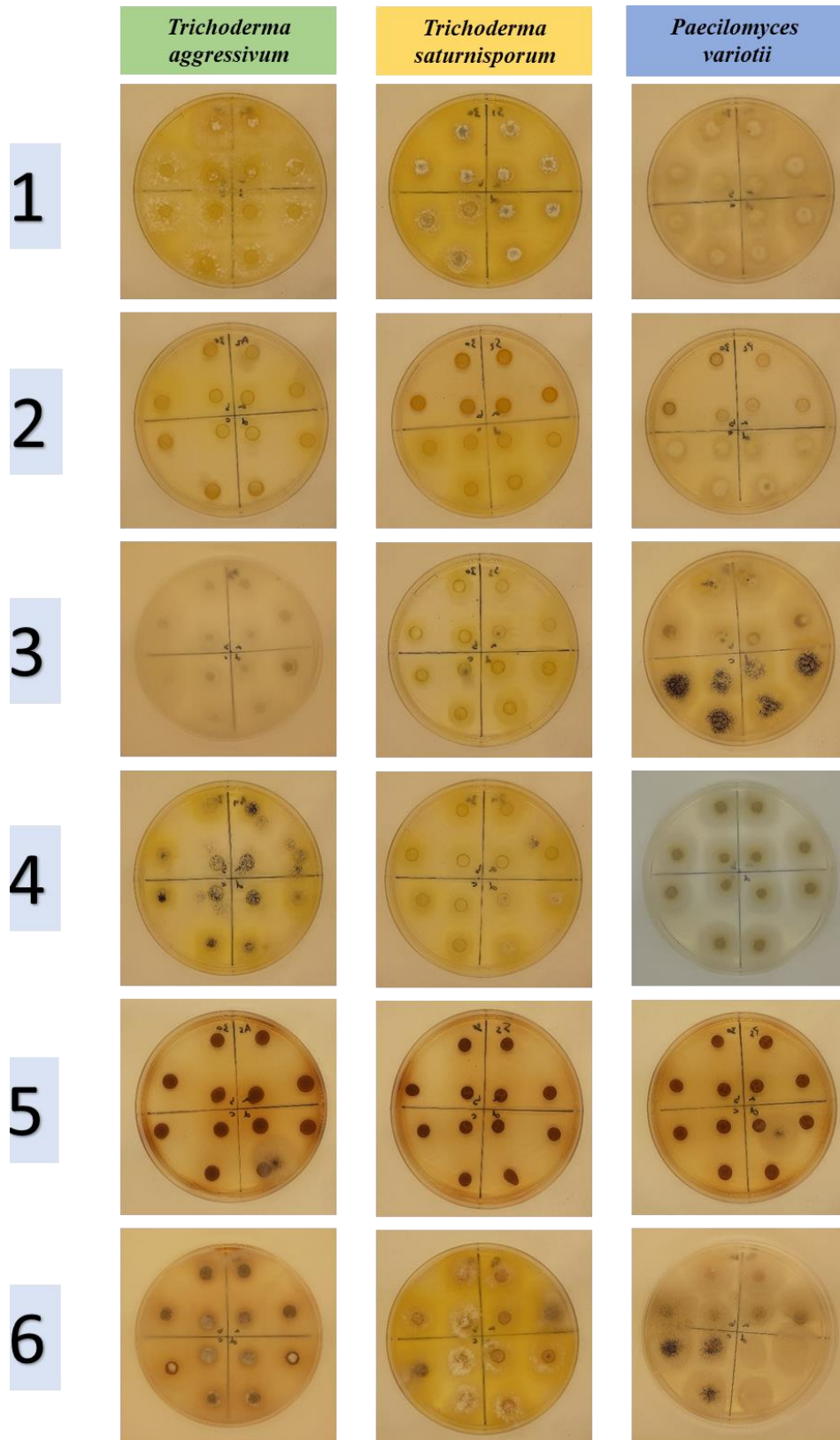


Figura 21. En la figura se representan las imágenes de las placas de Petri con el crecimiento de los



diferentes hongos evaluados con los seis formulados bajo estudio tras el tiempo de tres meses a 30°C.

#### 5.1.1.4. Resultados seis meses

- Resultados obtenidos de las placas de Petri tras seis meses en la estufa a 7°C.

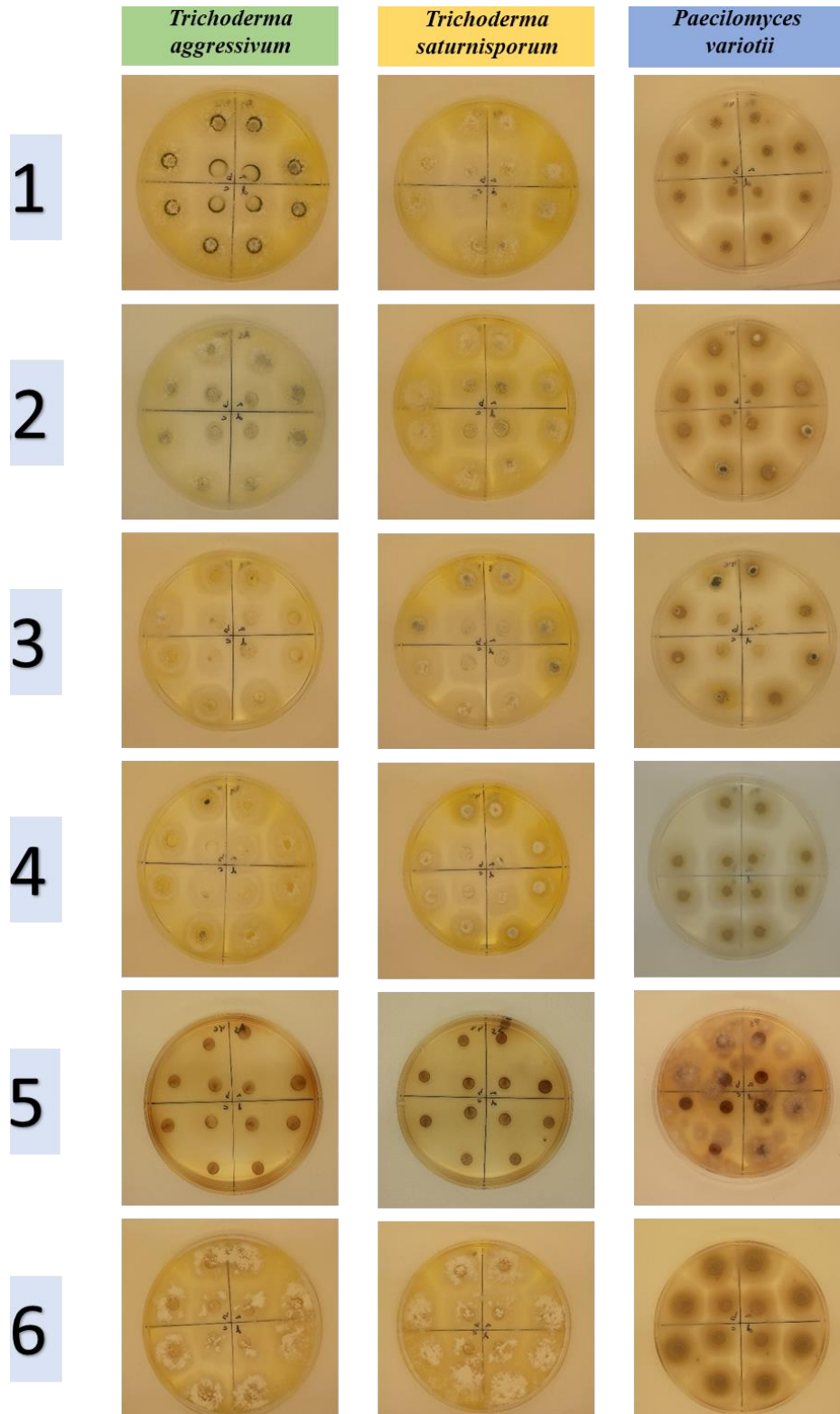


Figura 22. En la figura se representan las imágenes de las placas de Petri con el crecimiento de los

*diferentes hongos evaluados con los seis formulados bajo estudio tras el tiempo de seis meses a 7°C.*

Pasados seis meses con las placas de Petri a 7°C se ve que hay crecimiento de *Trichoderma aggressivum* en las placas menos en A5 (formulado con materia orgánica líquida al 50%). En A1 la maduración es mayor en cambio en A6 (formulado con materia orgánica líquida al 10%) hay más crecimiento, pero sin tanta maduración.

En las placas de *Trichoderma saturnisporum* se aprecia un buen crecimiento del hongo y comienzo de maduración de este en todas las placas por igual excepto en S5 (formulado con materia orgánica líquida al 50%) que no hay indicios de presencia del mismo.

Tras los seis meses en la estufa vemos que en los seis formulados puestos en las placas de Petri vemos crecimiento de *Paecilomyces variotii*, teniendo en P2 (formulado con lisina) y P3 (formulado con lisina y KCl) los mejores resultados ya que están empezando a madurar las colonias.

- Resultados obtenidos de las placas de Petri tras seis meses en la estufa a 20°C.

Las placas de *Trichoderma aggressivum* tienen crecimiento en la mayoría de los formulados estudiados menos en A5 (formulado compuesto con materia orgánica líquida al 50%). El mejor crecimiento del hongo se encuentra en los formulados A4 (formulado con 100 g/L de KCl) y A6 (formulado compuesto con materia orgánica líquida al 10%) ya que se puede observar el color verde indicando la maduración de las colonias. En A2 (formulado con lisina 60 g/L) hay crecimiento, pero es mínimo comparado con los otros formulados.

Como ha pasado en el caso anterior con *Trichoderma aggressivum*, aquí tampoco hay crecimiento de *Trichoderma saturnisporum* en el formulado S5 (formulado compuesto con materia orgánica líquida al 50%) y en S2 (formulado con lisina 60 g/L) el crecimiento es mínimo. En cambio, en S1 (formulado con agua), S4 (formulado con KCl) y S6 (formulado con materia orgánica líquida al 10%) hay buen crecimiento y maduración del hongo.

En las placas de *Paecilomyces variotii* tras seis meses en la estufa a 20°C vemos un crecimiento del hongo en todos los formulados, habiendo una mayor maduración en el formulado P6 (formulado con materia orgánica líquida al 10%).

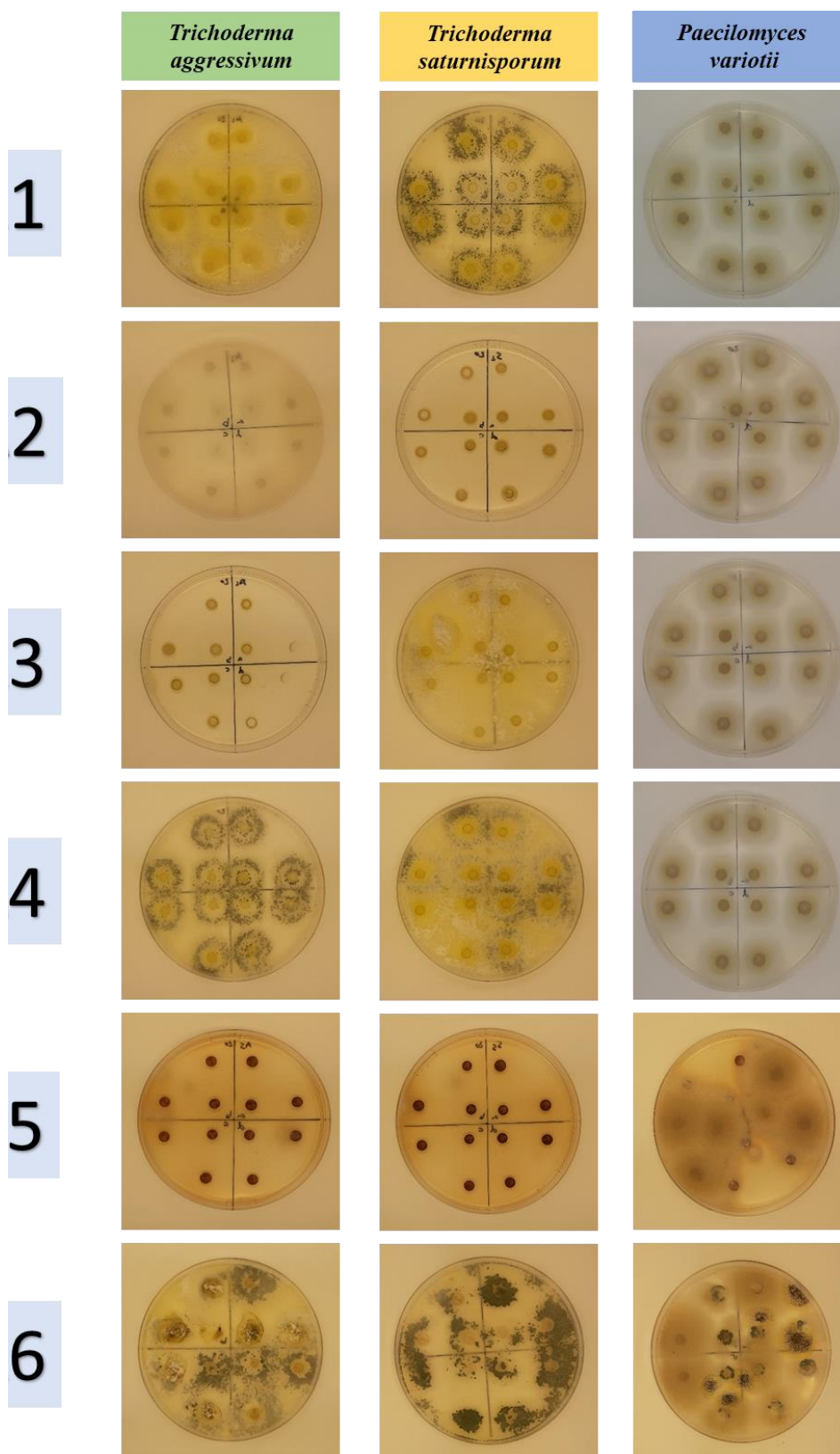


Figura 23. En la figura se representan las imágenes de las placas de Petri con el crecimiento de los diferentes hongos evaluados con los seis formulados bajo estudio tras el tiempo de seis meses a 20°C.

- Resultados obtenidos de las placas de Petri tras seis meses en la estufa a 30°C.

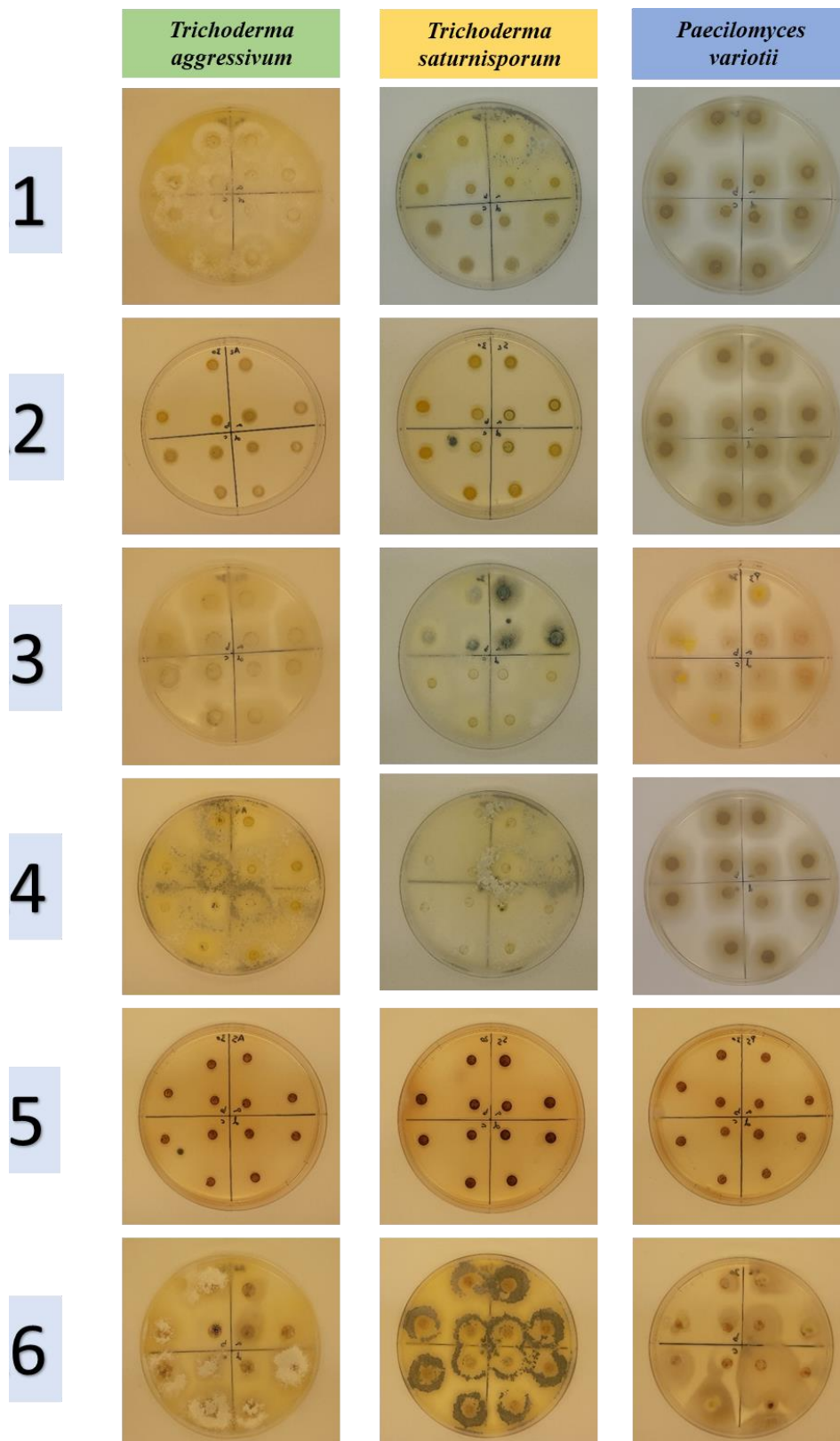


Figura 24. En la figura se representan las imágenes de las placas de Petri con el crecimiento de los diferentes hongos evaluados con los seis formulados bajo estudio tras el tiempo de seis meses a 30°C.

En las placas dejadas a 30°C de *Trichoderma aggressivum* durante seis meses hay crecimiento en todos los formulados menos en el 5 (materia orgánica líquida al 50 %) que carece de crecimiento del hongo y puede que esté contaminada con *Aspergillus niger*. También se ve como en A2 (formulado con lisina) hay muy poco crecimiento de *Trichoderma aggressivum* comparado con el resto de los formulados.

En este caso de *Trichoderma saturnisporum* hay crecimiento en las placas excepto en S5 (formulado con materia orgánica líquida al 50 %) que no hay nada. En la placa de Petri que contiene el formulado 6 (formulado con materia orgánica líquida al 10 %) se aprecia el buen crecimiento y maduración.

En las placas con *Paecilomyces variotii* tras seis meses a 30°C podemos decir que hay crecimiento del hongo en todas las placas menos en la del formulado P5 (formulado con materia orgánica líquida al 50 %).

A continuación, se va a presentar una tabla en la que se han dejado sintetizados todos los resultados que han sido expuestos anteriormente. Para su realización he tenido en cuenta los siguientes parámetros: crecimiento del microorganismo bajo estudio, no crecimiento del microorganismo bajo estudio y contaminación, se emplearán las siglas S, N o C respetivamente para identificar las muestras y facilitar su lectura. A su vez, se ha empleado el color verde para los formulados que han presentado crecimiento, el rojo para donde no ha habido crecimiento y el naranja para identificar las contaminaciones.

A simple vista y sin analizar los resultados en profundidad se aprecia como en el compuesto 5 (formulado con materia orgánica al 50%) no hay tanto crecimiento de los microorganismos comparados con los demás. En *Paecilomyces variotii* hay más “S” pero hay que señalar que en muchos casos el crecimiento solamente se ha dado en un cuarto de la placa de Petri.

A su vez podemos ver como la mayor contaminación se encuentra en las muestras correspondientes a *Paecilomyces variotii*.

		15 días	1 mes		3 meses		6 meses		
		40°C	20°C	30°C	20°C	30°C	7°C	20°C	30°C
<i>Trichoderma Aggressivum</i>	A1	S	S	S	S	S	S	S	S
	A2	N	S	N	N	N	S	S	S
	A3	S	S	C	C	S	S	S	S
	A4	S	S	S	S	S y C	S	S	S
	A5	S	N	N	N	N	N	N	N
	A6	S y C	S	S	S	S	S	S	S
<i>Trichoderma Saturnisporum</i>	S1	S	S	S	S	S	S	S	S
	S2	S	S	S	S	S	S	S	S y C
	S3	S	S	S	S	S	S	S	S
	S4	S	S	S	S	S	S	S	S
	S5	S	N	N	N	N	N	N	N
	S6	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Paecilomyces variotii</i>	P1	S	S	S	S	S	S	S	S
	P2	S	S	S	S y C	S	S	S	S
	P3	S y C	S	S	S	S y C	S	S	S
	P4	S y C	S	S	S y C	S	S	S	S
	P5	S	S	S	S	N	S	S	N
	P6	S y C	S y C	S	S y C	S y C	S	S	S

Tabla 4. Esquema resumen de los resultados obtenidos en el medio sólido de los tres microorganismos en los seis formulados bajo estudio durante todo el proceso del proyecto.

### 5.1.2. Resultados medio líquido

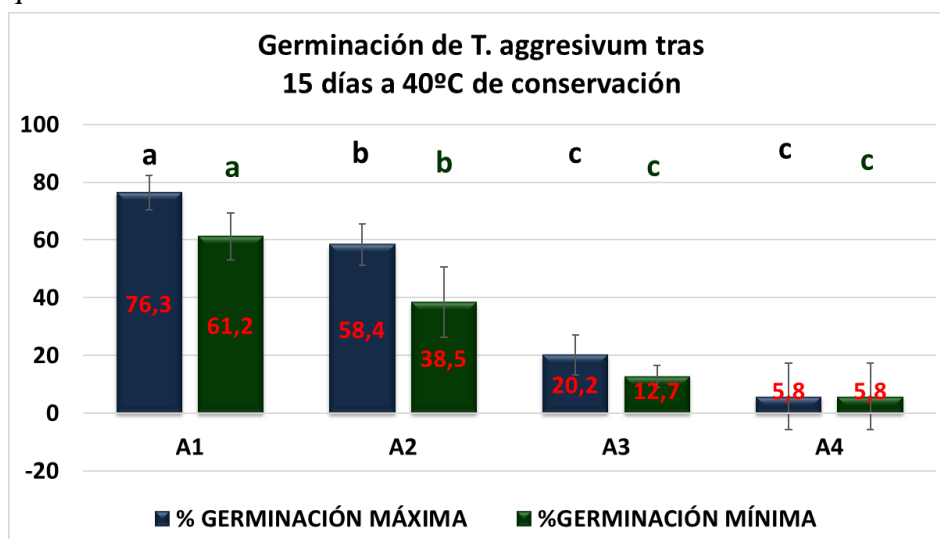
A la hora de exponer los resultados, solo se han tenido en cuenta los cuatro primeros formulados (agua, lisina 60 g/L, lisina 60 g/L con cloruro potásico 100 g/L y cloruro potásico 100 g/L) excluyendo los dos que contenían materia orgánica líquida.

Esto se debe a que en el formulado 5 el cual tenía un 50% de materia orgánica líquida nos encontramos con que no había germinación de esporas por lo tanto se encontraban muertas y el conteo era innecesario; en cambio, en el formulado 6, con un 10% de materia orgánica líquida, había esporas germinadas pero la presencia de residuos de la materia orgánica tenía un tamaño similar al de las esporas por lo que resulta imposible evaluar la germinación.



### 5.1.2.1. Resultados *Trichoderma aggressivum*

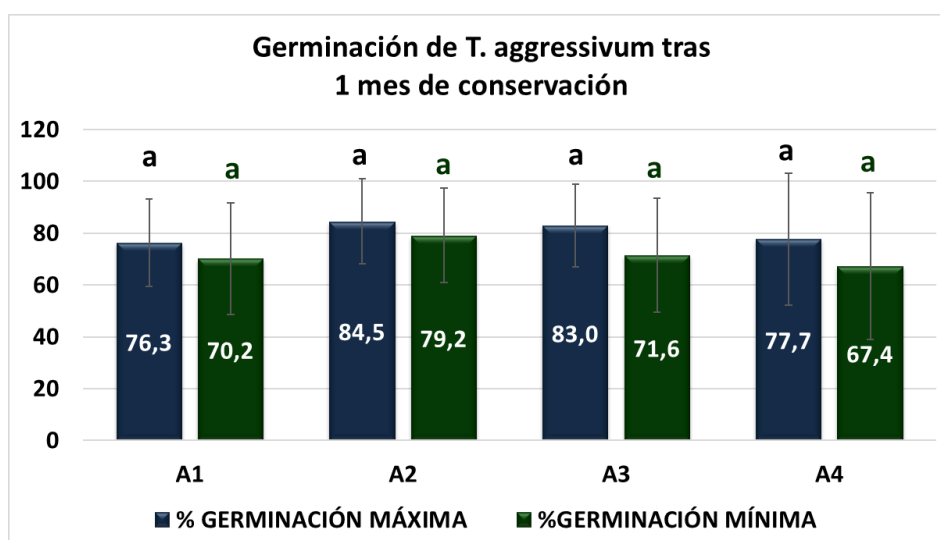
- Tras quince días de conservación a 40°C.



Gráfica 2. Porcentaje de germinación máxima y mínima de *T. aggressivum* de los cuatro formulados tras quince días de conservación a 40°C.

Tras el periodo de conservación a 40°C durante quince días podemos afirmar que los porcentajes más altos de germinación corresponden al formulado uno (agua), seguidos del formulado dos (lisina) y por último los formulados tres (lisina con KCl) y cuatro (KCl) tienen estadísticamente hablando los mismos porcentajes de germinación. Se pueden observar grandes diferencias entre el porcentaje de germinación A1 (formulado con agua) que corresponde al 76,30% comparado con el 5,80% proporcionado por el formulado A4 (formulado con KCl).

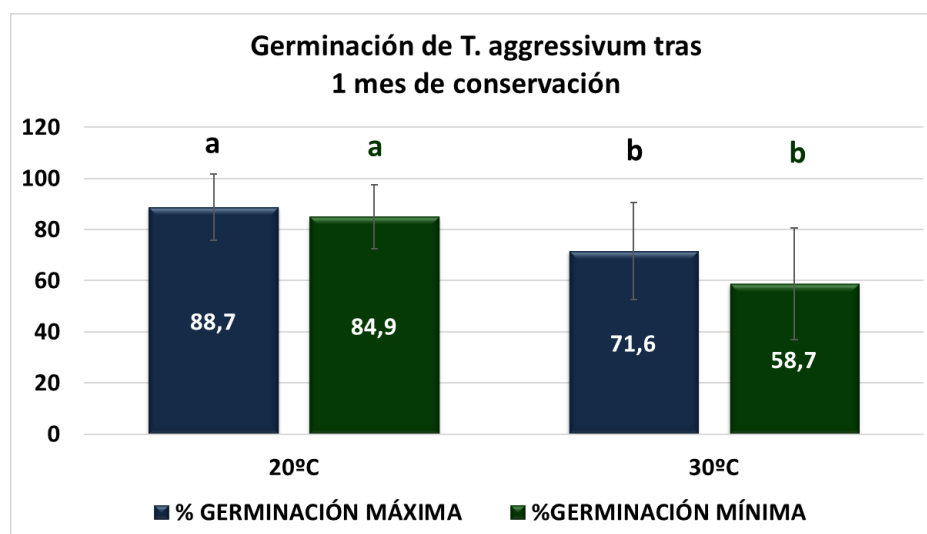
- Tras un mes de conservación a 20°C y 30°C.



Gráfica 3. Porcentaje de germinación máxima y mínima de *T. aggressivum* de los cuatro formulados

*tras un mes de conservación.*

Según el análisis estadístico no hay diferencias significativas entre los porcentajes de germinación máxima y mínima basándonos en el formulado. Se ve como los porcentajes de germinación máxima oscilan entre 84,5 – 76,3% y los porcentajes de germinación mínima entre 79,20-67,40% siendo en ambos casos unos porcentajes muy altos.

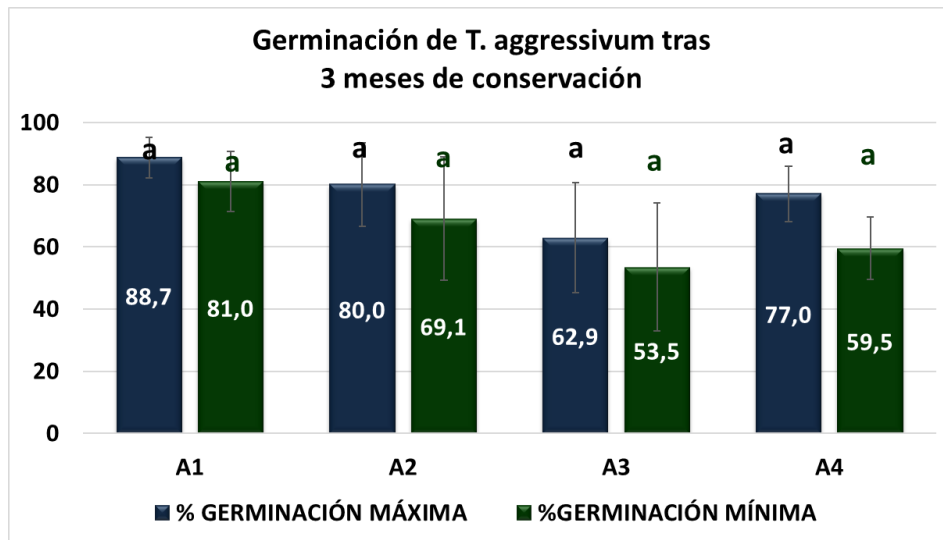


Gráfica 4. Porcentaje de germinación máxima y mínima de *T. aggressivum* tras un mes de conservación a 20°C y a 30°C.

En un mes podemos ver que hay diferencias significativas entre las dos temperaturas y que tanto el porcentaje de germinación máxima como la mínima son mayores a 20°C. Las diferencias de porcentaje de germinación mínima entre las temperaturas de 20°C y 30°C es del 26,20% siendo mayor que la diferencia del porcentaje de germinación máxima que es de 17,10%.

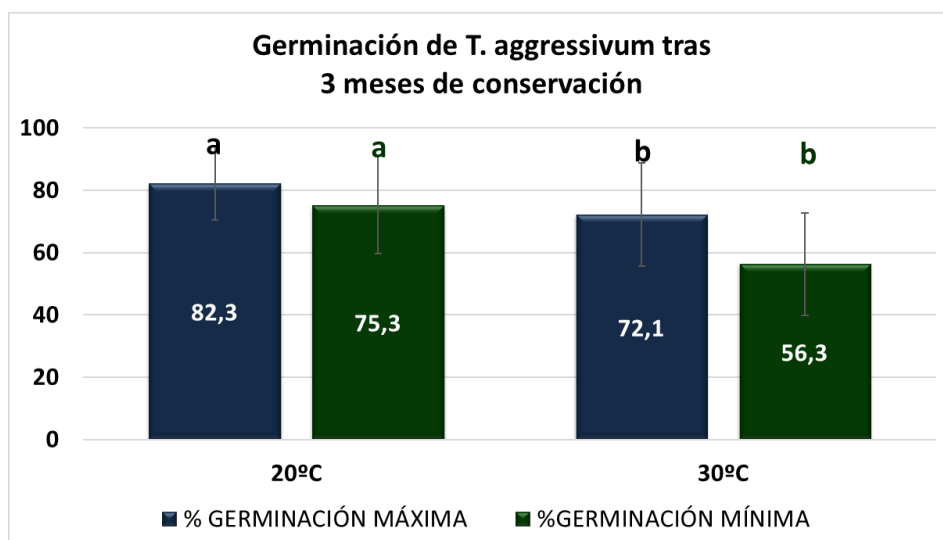


- Tras tres meses de conservación a 20°C y 30°C.



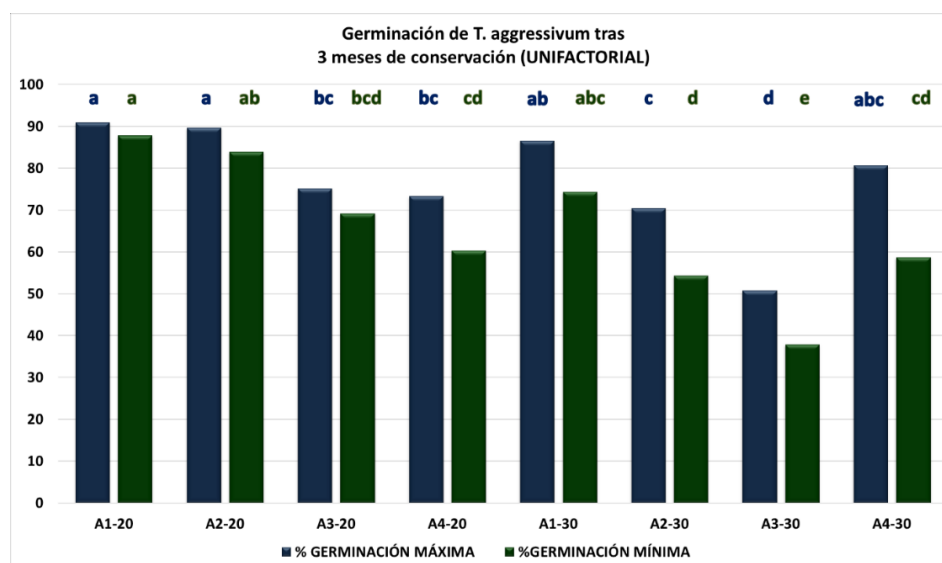
Gráfica 5. Porcentaje de germinación máxima y mínima de *T. aggressivum* de los cuatro formulados tras tres meses de conservación.

Se puede observar que tras tres meses de germinación entre todos los porcentajes de germinación no hay diferencias significativas. Aún así el porcentaje de germinación máximo se corresponde con el formulado A1 (agua) y es de 88,70% y el porcentaje de germinación máximo más pequeño es de 62,90% y es el dado por el formulado A3 (lisina junto KCl).



Gráfica 6. Porcentaje de germinación máxima y mínima de *T. aggressivum* tras tres meses de conservación a 20°C y a 30°C.

Viendo el gráfico podemos afirmar que los porcentajes de germinación a 20°C son mejores que a 30°C, existiendo una diferencia estadística significativa. Podemos ver como la diferencia de germinación máxima difiere un 10,2 % entre ambas temperaturas y de un 19 % para la germinación mínima.

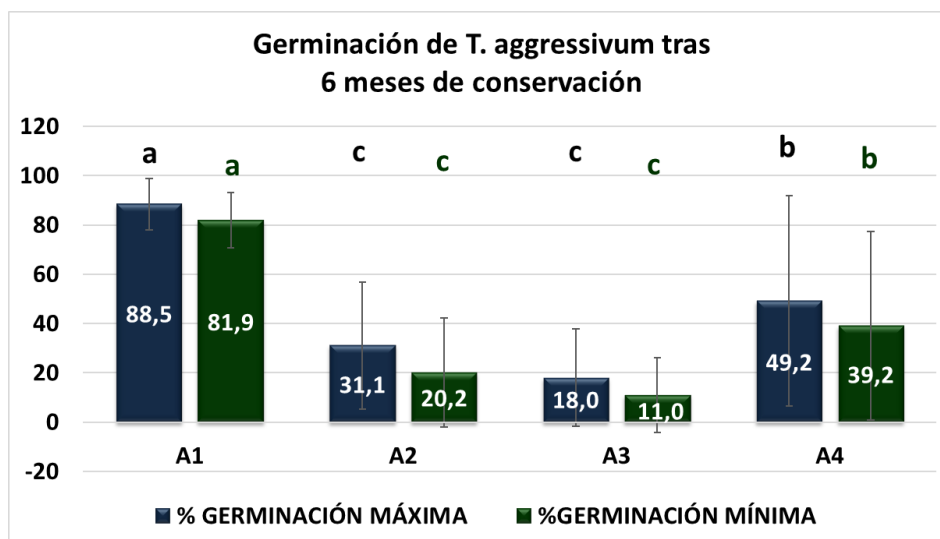


Gráfica 7. Porcentaje de germinación máxima y mínima de *T. aggressivum* de los cuatro formulados tras tres meses de conservación a las temperaturas de 20°C y 30°C.

Para la germinación de *Trichoderma aggressivum* pasados tres meses de conservación hay interacción entre las temperaturas y los formulados, por lo tanto podemos decir que el porcentaje de germinación máximo es superior e igual estadísticamente para los formulados A1 (agua) y A2 (lisina) a 20°C y para A1 (agua) y A4 (KCl) a 30°C; en cambio tiene el mejor porcentaje en el formulado A3 (lisina con KCl) a 30°C.

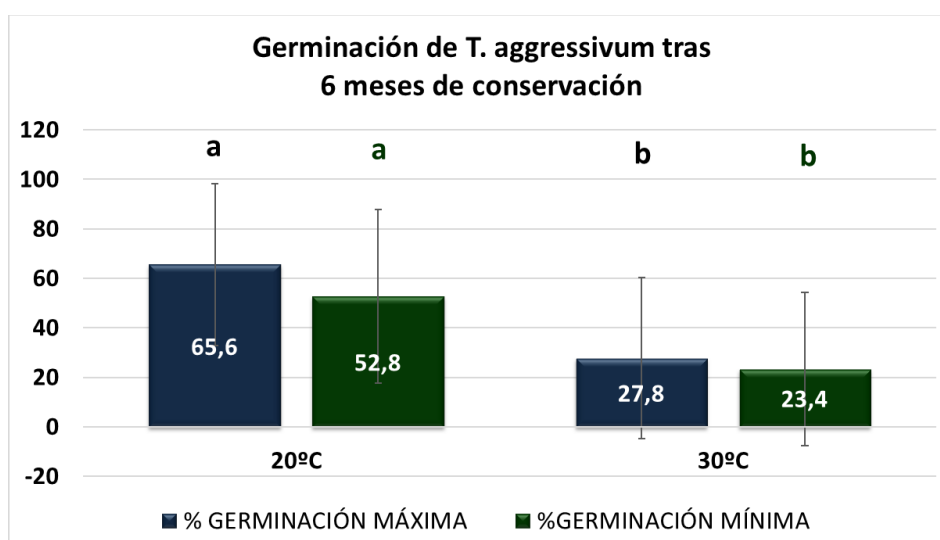
El porcentaje de germinación mínimo es mayor en los formulados A1 (agua) y A2 (lisina) a 20°C y en el formulado A1 (agua) a 30°C. Por otro lado, como ha ocurrido antes A3 (lisina más KCl) a 30°C presenta el porcentaje más bajo de germinación mínima.

- Tras seis meses de conservación a 20°C y 30°C.



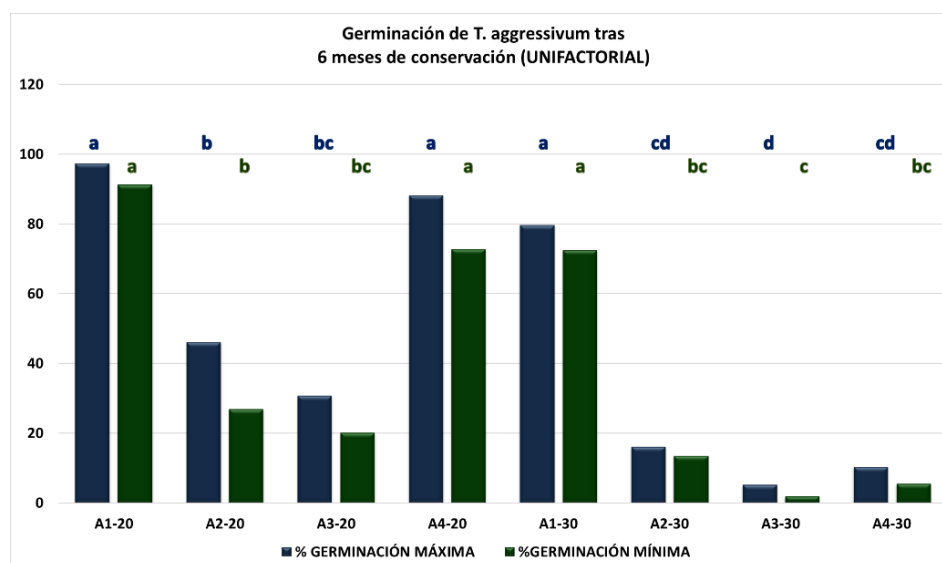
Gráfica 8. Porcentaje de germinación máxima y mínima de *T. aggressivum* de los cuatro formulados tras seis meses de conservación.

En el conteo de los seis meses se observan unas grandes diferencias entre los porcentajes de germinación de los diferentes formulados. En este caso el formulado A1 (agua) tiene los porcentajes de germinación máxima y mínima más elevados correspondiéndose con 88,50% y 81,90% respectivamente. Los formulados A2 (lisina) y A3(lisina con KCl) presentan los resultados más bajos teniendo A3 los peores con 18,00% para la germinación máxima y 11,00% para la germinación mínima.



Gráfica 9. Porcentaje de germinación máxima y mínima de *T. aggressivum* tras seis meses de conservación a 20°C y a 30°C.

Tras seis meses de conservación se aprecia perfectamente que a 20°C hay unos porcentajes de germinación casi el doble de altos que en el caso de 30°C. Aun así, las diferencias entre los porcentajes de germinación máxima y mínima son mayores a 20°C que a 30°C.

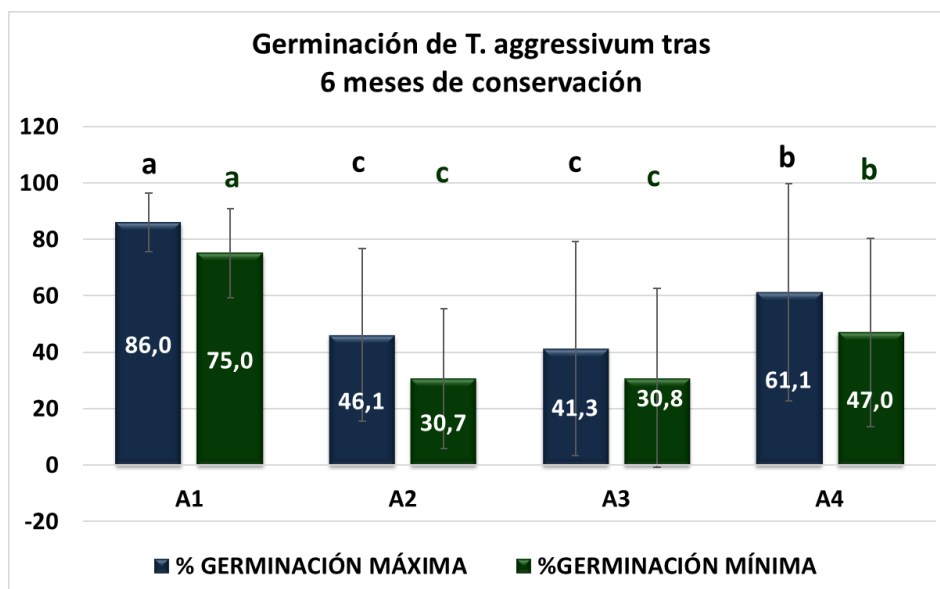


Gráfica 10. Porcentaje de germinación máxima y mínima de *T. aggressivum* de los cuatro formulados tras seis meses de conservación a las temperaturas de 20°C y 30°C.

Para *Trichoderma aggressivum* tras seis meses de conservación se ha visto que hay interacción entre los formulados y las temperaturas, por lo que se ha realizado un análisis unifactorial en el cual cada combinación de tratamiento y temperatura se ha considerado como un único factor. En este caso el porcentaje de germinación máxima estadísticamente se corresponde con A1 (agua) y A4 (KCl) a 20°C y con A1 (agua) a 30°C teniendo los porcentajes de germinación más bajos los formulados A2 (lisina), A3 (lisina con KCl) y A4 (KCl) a 30°C.

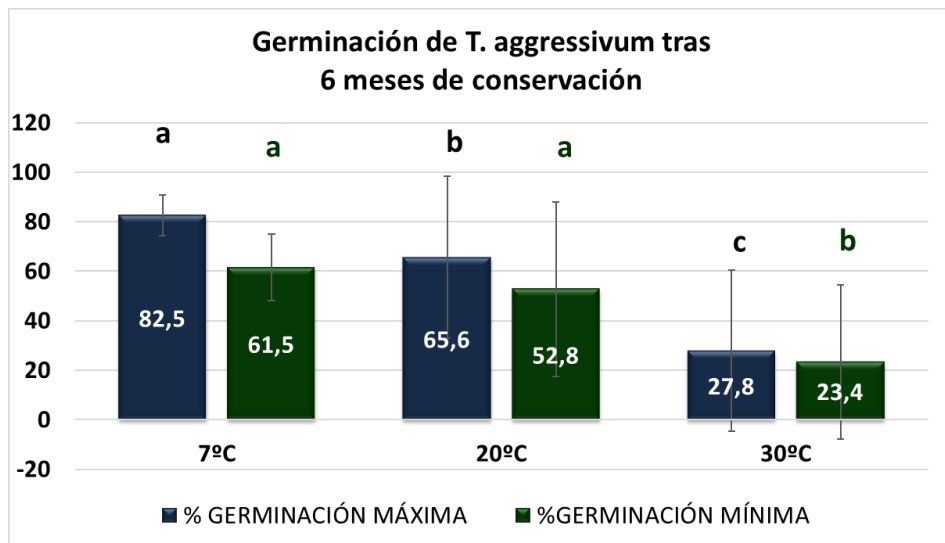
En cambio, los porcentajes de germinación mínimo más elevados se corresponden a los formulados A1 (agua) y A4 (KCl) a 20°C y a A1 (agua) a 30°C igual que ha pasado en el caso anterior. Por otro lado, los porcentajes más pequeños se encuentran en A3 (lisina más KCl) a 20°C y en A2 (lisina), A3 (lisina junto KCl) y A4 (KCl) a 30°C.

-Tras seis meses de conservación 7°C, 20°C y 30°C.



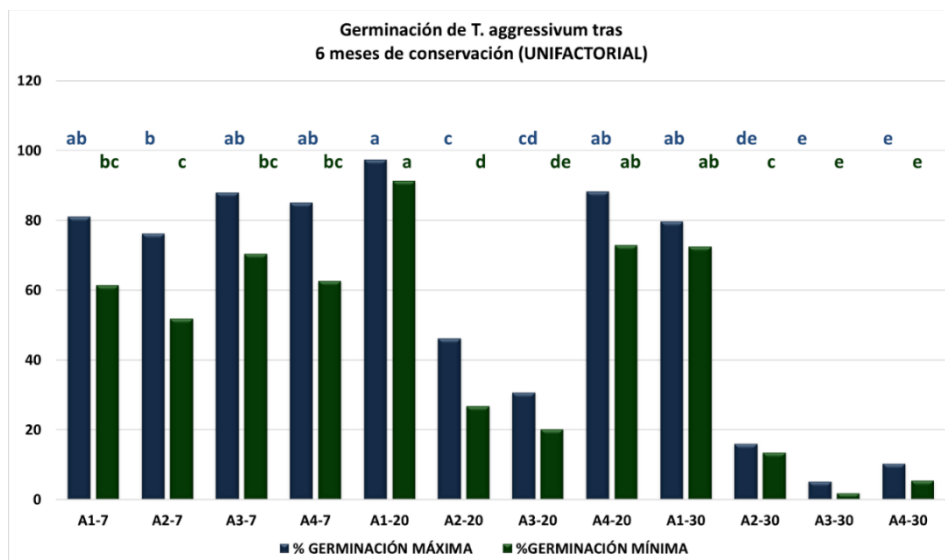
Gráfica 11. Porcentaje de germinación máxima y mínima de *T. aggressivum* de los cuatro formulados tras seis meses de conservación.

Como ocurría en el caso anterior, aunque cambian los porcentajes de germinación al añadir la temperatura de 7°C, seguimos viendo que el formulado A1 (formulado con agua) encabeza los porcentajes de germinación con un 86,00% para la germinación máxima y un 75,00% para la germinación mínima. Los formulados A2 (lisina 60 g/L) y A3 (formulado de lisina junto KCl) siguen siendo los más bajos pero su porcentaje de germinación han aumentado. El porcentaje de germinación máxima más bajo es de 41,30% y lo dio el formulado A3 (lisina con KCl) y el porcentaje de germinación mínima más pequeño es el proporcionado por el formulado A2 (lisina) y es del 30,70%.



Gráfica 12. Porcentaje de germinación máxima y mínima de *T. aggressivum* tras seis meses de conservación a las temperaturas de 7°C, 20°C y a 30°C.

En el caso de la comparativa de los porcentajes de germinación en *Trichoderma aggressivum* vemos que el porcentaje de germinación máxima es mejor a 7°C y mucho peor a 30°C con porcentajes 82,50% y 27,80% respectivamente. En la germinación mínima vemos que entre los porcentajes de 7°C y 20°C no hay diferencias significativas estadísticamente, pero la germinación a 30°C sí es mucho menor teniendo un porcentaje de 23,40% comparado con el 61,50% dado por la temperatura de 7°C.



Gráfica 13. Porcentaje de germinación máxima y mínima de *T. aggressivum* de los cuatro formulados tras seis meses de conservación a las temperaturas de 7°C, 20°C y 30°C.

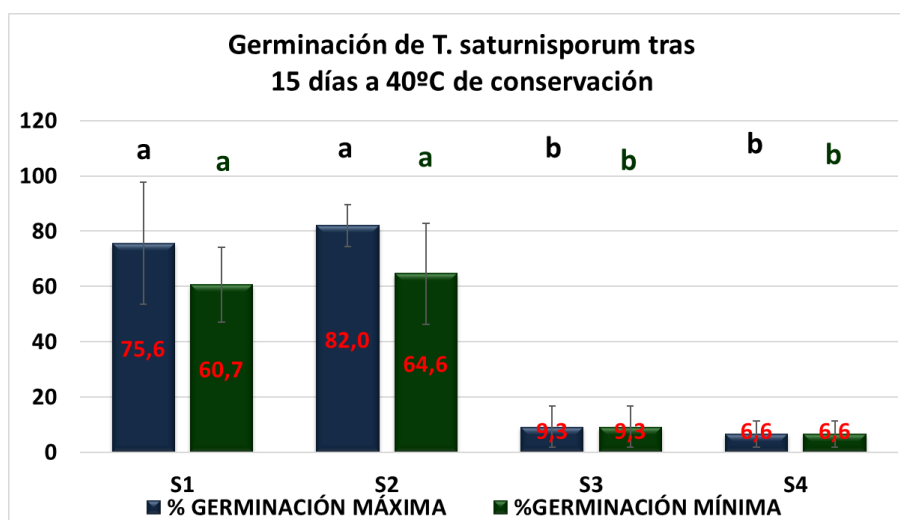
Se ha visto que hay interacción entre las temperaturas de 7°C, 20°C y 30°C con los formulados, de ahí que se haya realizado este análisis unifactorial en el cual cada combinación de tratamiento y temperatura se ha considerado como un único factor.

Para la germinación máxima, los porcentajes más elevados se corresponden con A1 (formulado con agua), A3 (formulado con lisina y KCl) y A4 (formulado con KCl) a 7°C, A1 (agua) y A4 (KCl) a 20°C y con A1 (agua) a 30°C, teniendo el valor más elevado de todos A1 (agua) a 20°C. En este mismo apartado podemos decir que los porcentajes más bajos son los relacionados con los formulados A3 (lisina con KCl) y A4 (KCl) a 30°C.

El porcentaje de germinación mínima más alto se encuentra en los formulados A1 (agua) y A4 (KCl) a 20°C y con A1 (agua) a 30°C, siendo otra vez más elevado el formulado A1 (agua) a 20°C. Como ha pasado antes, los porcentajes más bajos son los del formulado A3 (lisina junto KCl) y A4 (KCl) a 30°C, siendo el formulado A3 (lisina con KCl) el más bajo de todos.

### 5.1.2.2. Resultados *Trichoderma saturnisporum*

- Tras quince días de conservación a 40°C.

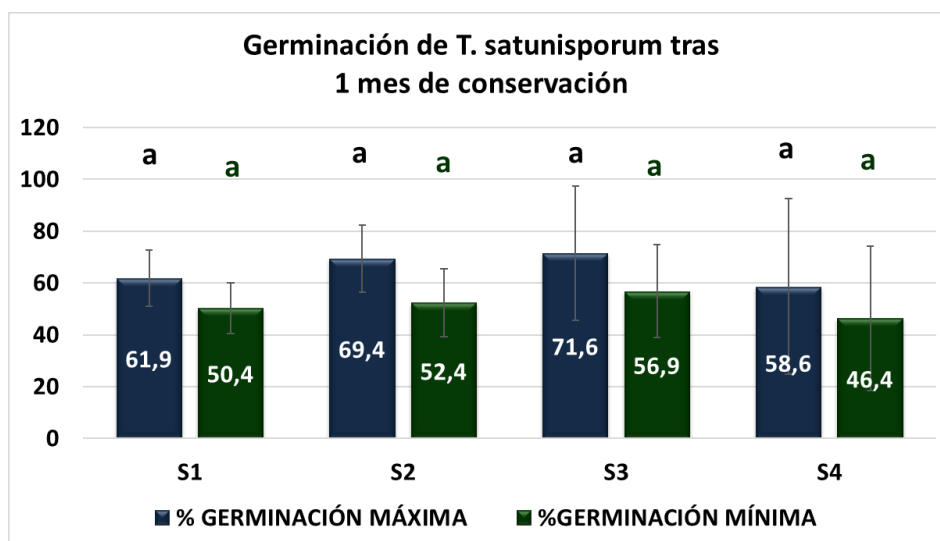


Gráfica 14. Porcentaje de germinación máxima y mínima de *T. saturnisporum* de los cuatro formulados tras quince días de conservación a 40°C.

Después de quince días a 40°C los formulados 1 (agua) y 2 (lisina) tienen unos porcentajes de germinación máxima y mínima iguales hablando de forma estadística, aunque los de S2 (lisina) son un poco más altos con unos porcentajes de 82,00% para la germinación máxima y 64,60% para la germinación mínima. Los formulados S3 (lisina junto KCl) y S4

(KCl) tienen unos porcentajes de germinación muchísimo más bajos que los anteriores pero iguales entre sí. Los peores resultados los proporciona el formulado 4 (KCl) con unos porcentajes de 6,60% para la germinación máxima y mínima, esto supone un porcentaje de germinación máxima doce veces menor que el dado por el formulado S2 (lisina).

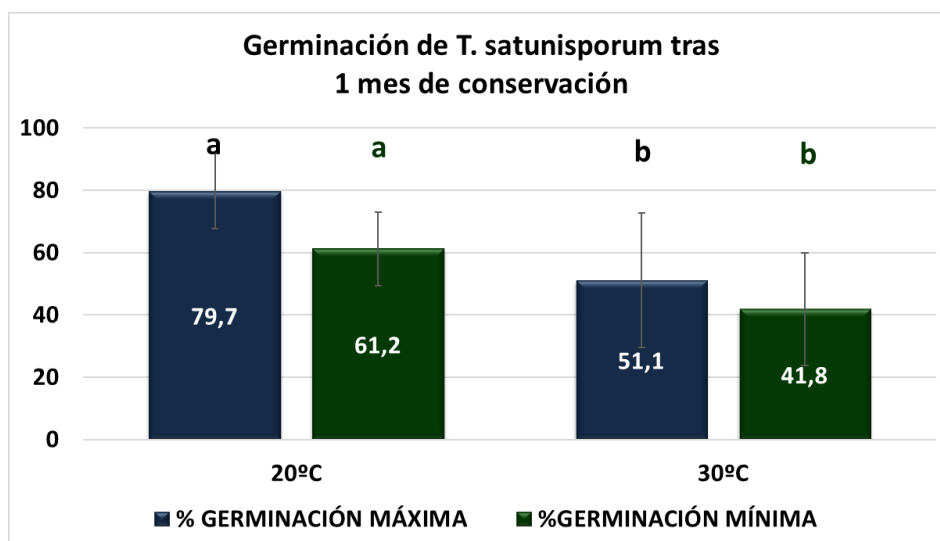
- Tras un mes de conservación a 20°C y 30°C.



Gráfica 15. Porcentaje de germinación máxima y mínima de *T. saturnisporum* de los cuatro formulados tras un mes de conservación.

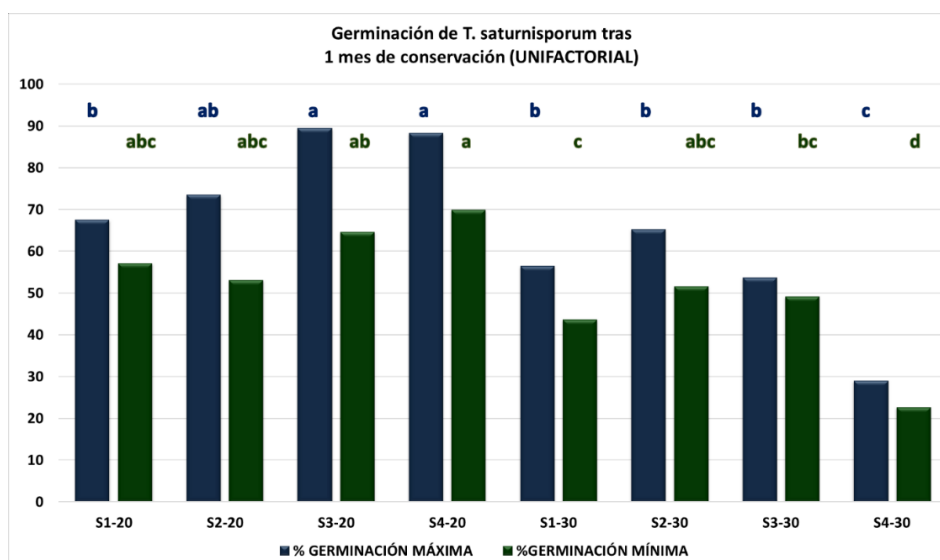
En este caso, tras un mes de conservación a 20°C y 30°C se puede decir que no hay diferencias estadísticas significativas entre los cuatro formulados en ambas germinaciones, aun así, los porcentajes de germinación máxima y mínima son algo mejores en el formulado 3 (formulado de lisina con KCl) que en el resto. La diferencia de porcentajes entre el más alto y el más bajo oscila en un 10% en ambas germinaciones.





Gráfica 16. Porcentaje de germinación máxima y mínima de *T. saturnisporum* tras un mes de conservación a 20°C y a 30°C.

Respecto al tema de las temperaturas, vemos que a 20°C se han obtenido mejores porcentajes de germinación que a 30°C. Habiendo una mayor diferencia de porcentajes entre los resultados dados por la germinación máxima ya que a 20°C tenemos un 79,70% de germinación frente al 51,10% que nos da los 30°C.



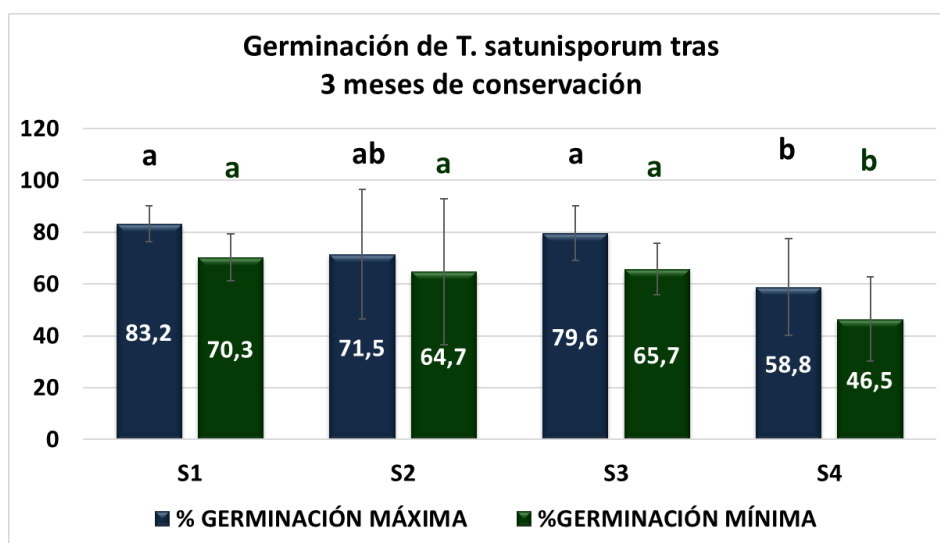
Gráfica 17. Porcentaje de germinación máxima y mínima de *T. saturnisporum* de los cuatro formulados tras un mes de conservación a las temperaturas de 20°C y 30°C.

Después de un mes de germinación de *Trichoderma saturnisporum* hay relación entre los formulados, las temperaturas y el porcentaje de germinación, tras ver esto se ha realizado un análisis unifactorial en el cual cada combinación de tratamiento y temperatura se ha considerado como un único factor. En relación con el porcentaje de germinación máxima se

aprecia que los formulados S2 (lisina), S3 (lisina junto KCl) y S4 (KCl) a 20°C tienen los porcentajes más altos e iguales de forma estadística; por el contrario, el porcentaje más bajo se corresponde al formulado S4 (KCl) a 30°C.

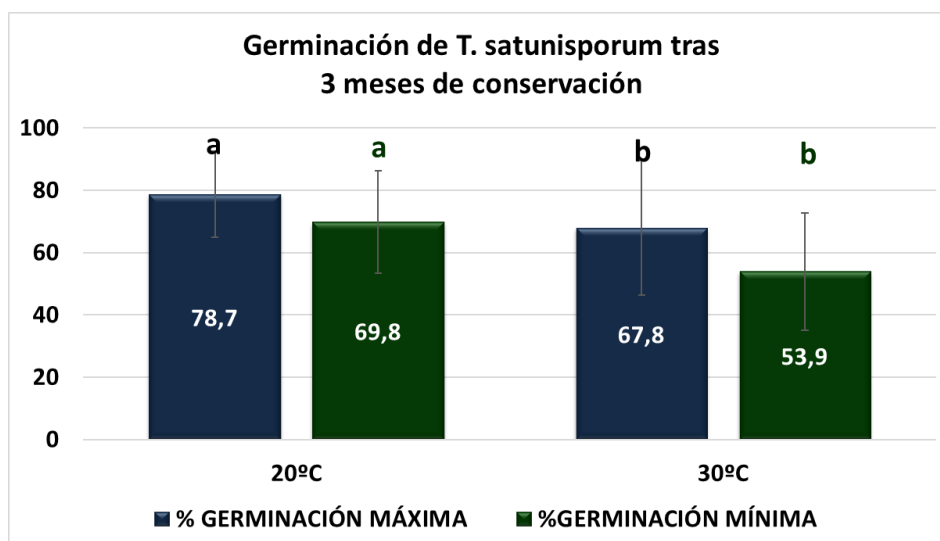
En el caso del porcentaje de germinación mínima los mayores se corresponden con los formulados S1 (agua), S2 (lisina), S3 (lisina más KCl) y S4 (KCl) a 20°C y S2 (lisina) a 30°C, de estos S4 (KCl) a 20°C presenta el porcentaje más elevado. Igual que pasaba con el porcentaje de germinación máxima el mínimo también se encuentra en el formulado S4 (KCl) a 30°C.

- Tras tres meses de conservación a 20°C y 30°C.



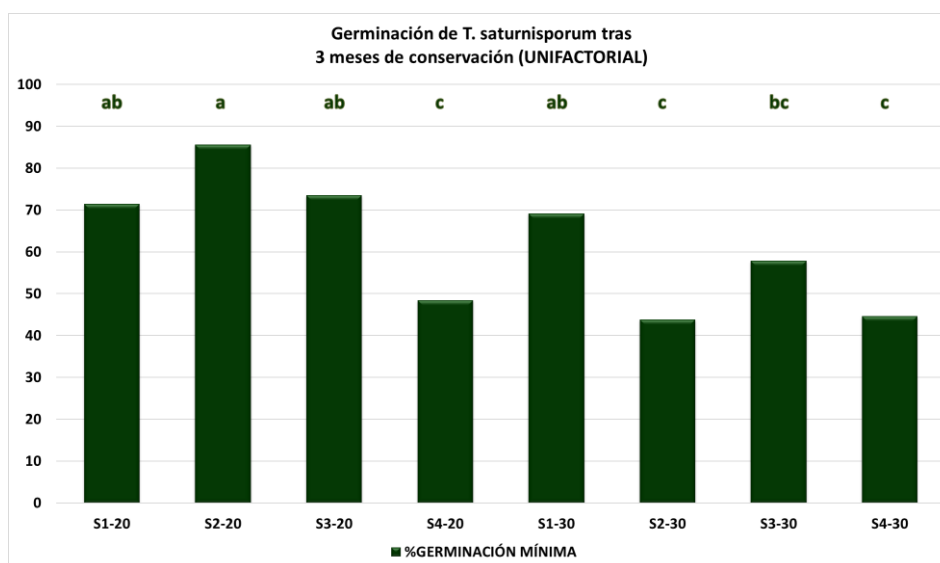
Gráfica 18. Porcentaje de germinación máxima y mínima de *T. saturnisporum* de los cuatro formulados tras tres meses de conservación.

En *Trichoderma saturnisporum* pasados tres meses podemos decir que los porcentajes de germinación máxima son iguales entre los formulados 1 (agua), 2 (lisina) y 3 (lisina con KCl) con unos porcentajes más altos y entre 2 (lisina) y 4 (KCl) con menor porcentaje. El mayor porcentaje de germinación máxima es de 83,20% y lo ha dado el formulado S1 (agua), el formulado S4 (KCl) es el que nos da un porcentaje más bajo con 58,80%. Respecto al porcentaje de germinación mínima los formulados 1 (agua), 2 (lisina) y 3 (lisina junto KCl) tienen unos porcentajes de germinación mayores e iguales estadísticamente que el formulado 4 (KCl).



Gráfica 19. Porcentaje de germinación máxima y mínima de *T. saturnisporum* tras tres meses de conservación a 20°C y a 30°C.

Se han obtenido unos mejores resultados en las germinaciones máximas y mínimas cuando las muestras se encontraban a 20°C en vez de a 30°C. Como se aprecia en el gráfico a 20°C tenemos una germinación máxima del 78,70% y una germinación mínima de 69,80%, en cambio a 30°C se han obtenido unos porcentajes de 67,80% y 53,90% respectivamente.

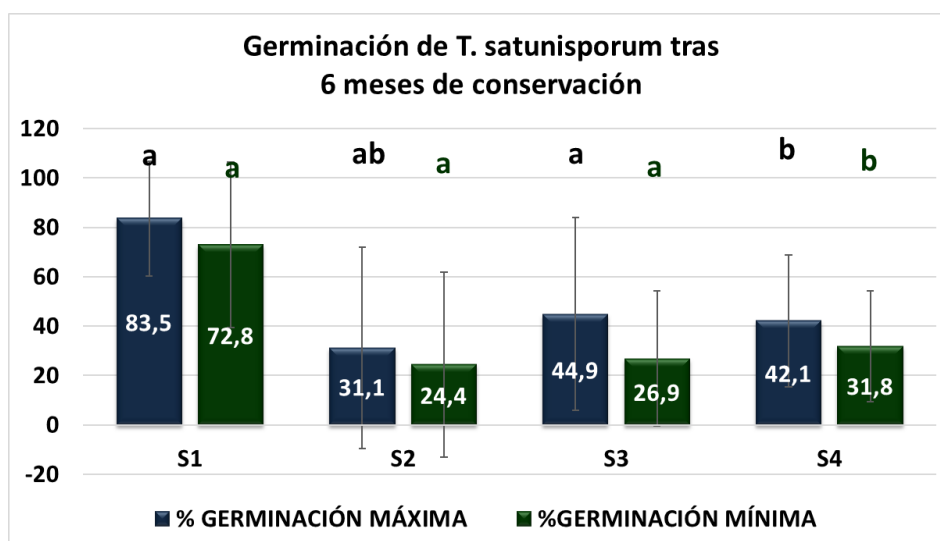


Gráfica 20. Porcentaje de germinación mínima de *T. saturnisporum* de los cuatro formulados tras tres meses de conservación a las temperaturas de 20°C y 30°C.

En la germinación de *Trichoderma saturnisporum* en tres meses hay interacción de las temperaturas con el porcentaje de germinación mínima de los formulados, por lo que se ha realizado un análisis unifactorial en el cual cada combinación de tratamiento y temperatura se ha considerado como un único factor. Observándose unos porcentajes de germinación mínimos

más altos en los formulados S1 (agua), S2 (lisina) y S3 (lisina junto KCl) a 20°C y S1 (agua) a 30°C, aunque sean iguales de forma estadística el porcentaje más alto lo presenta el formulado S2 (lisina) a 20°C. Los porcentajes más bajos los encontramos en los formulados S4 (KCl) a 20°C y S2 (lisina) y S4 (KCl) a 30°C.

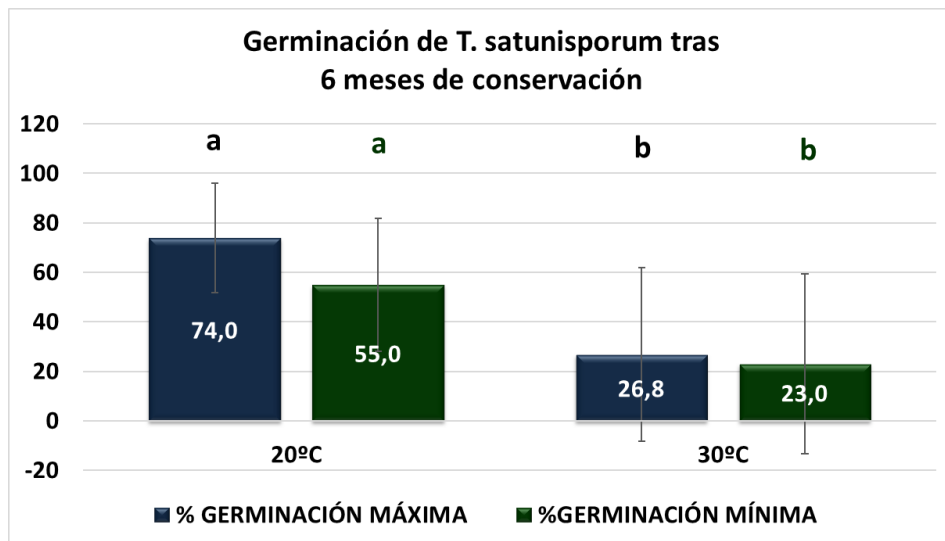
- Tras seis meses de conservación a 20°C y 30°C.



Gráfica 21. Porcentaje de germinación máxima y mínima de *T. saturnisporum* de los cuatro formulados tras seis meses de conservación.

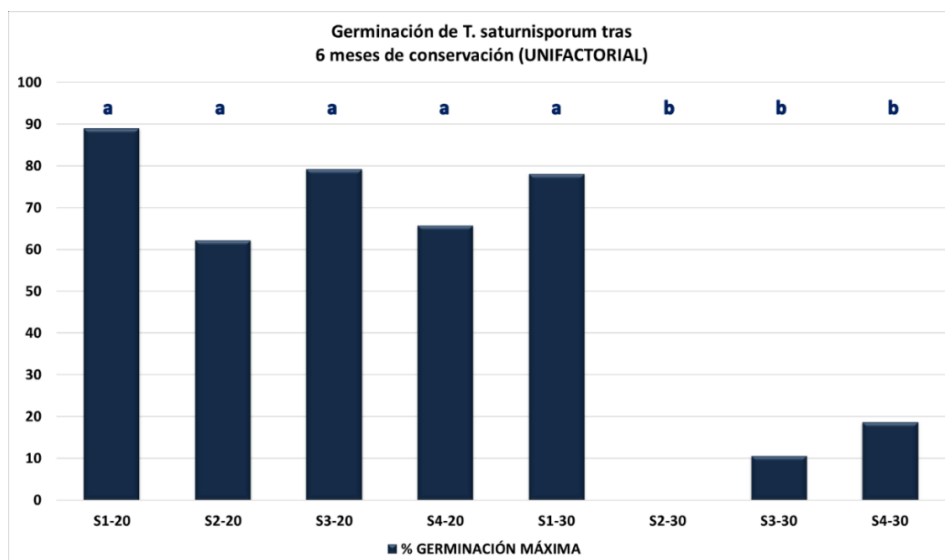
Comenzando por la germinación máxima de forma estadística los porcentajes de germinación son iguales para los formulados 1 (formulado con agua), 2 (formulado con lisina) y 3 (formulado con lisina y KCl) siendo más altos que los porcentajes de germinación de los formulados 2 (formulado con lisina) y 4 (formulado con KCl) que estadísticamente también son iguales entre sí. En la germinación mínima los formulados 1 (formulado con agua), 2 (formulado con lisina) y 3 (formulado con lisina y KCl) vuelven a ser iguales de forma estadística y mayores que el formulado 4 (formulado con KCl).

En este caso vemos como los porcentajes del formulado 1 (formulado con agua) sobresalen sobre el resto presentando unos resultados de 83,5% para la germinación máxima y 72,80% para la germinación mínima. De los otros tres formulados restantes, S2 (formulado con lisina) es el que presenta los porcentajes más pequeños con 31,10% para la germinación máxima y 24,40% para la mínima.



Gráfica 22. Porcentaje de germinación máxima y mínima de *T. saturnisporum* tras tres meses de conservación a 20°C y a 30°C.

Podemos ver como los porcentajes de germinación tanto máxima como mínima han obtenido unos resultados muchísimo mejores a 20°C con unos porcentajes de 74,00% y 55,00% para la germinación máxima y mínima respectivamente que a 30°C con unos porcentajes de 26,80% y 23,00%.



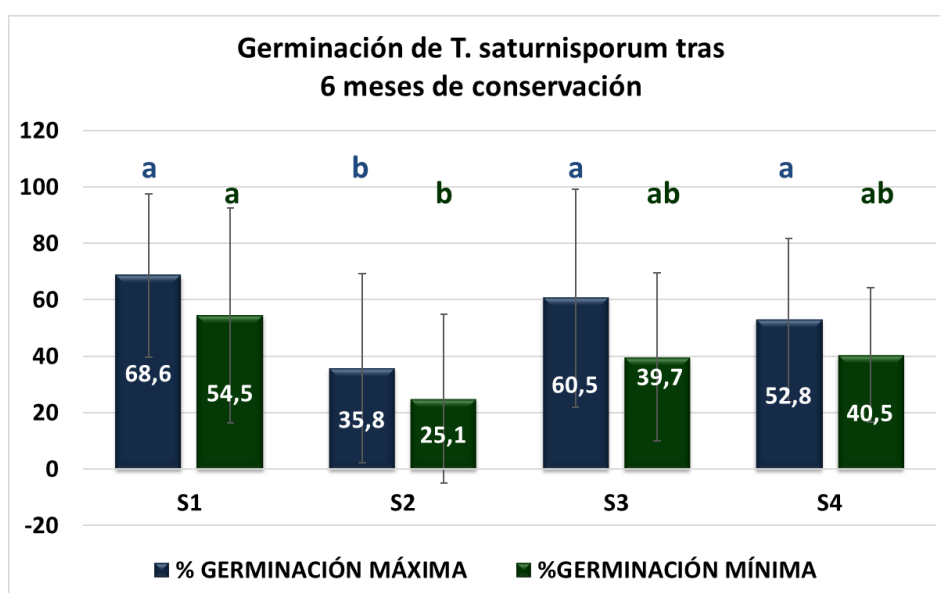
Gráfica 23. Porcentaje de germinación máxima de *T. saturnisporum* de los cuatro formulados tras seis meses de conservación a las temperaturas de 20°C y 30°C.

Tras seis meses de germinación de *Trichoderma saturnisporum* se ha visto que hay interacción por lo que se ha realizado un análisis unifactorial en el cual cada combinación de

formulado y temperatura se ha considerado como un único factor teniendo solo en cuenta el porcentaje de germinación máxima de los formulados. Localizando los porcentajes de germinación máxima en los formulados S1 (formulado con agua), S2 (formulado con lisina 60g/L), S3 (formulado con lisina y KCl) y S4 (formulado con KCl) a 20°C y en S1 (formulado con agua) a 30°C, siendo de estos S1 (formulado con agua) a 20°C el que presenta un porcentaje más alto.

Por descarte, los porcentajes de germinación máxima más bajos se encuentran en los formulados S2 (formulado con lisina), S3 (formulado con lisina y KCl) y S4 (formulado con KCl) a 30°C, teniendo el formulado S2 (formulado con lisina) un porcentaje de germinación nulo siendo por tanto el peor de todos.

-Tras seis meses de conservación 7°C, 20°C y 30°C.

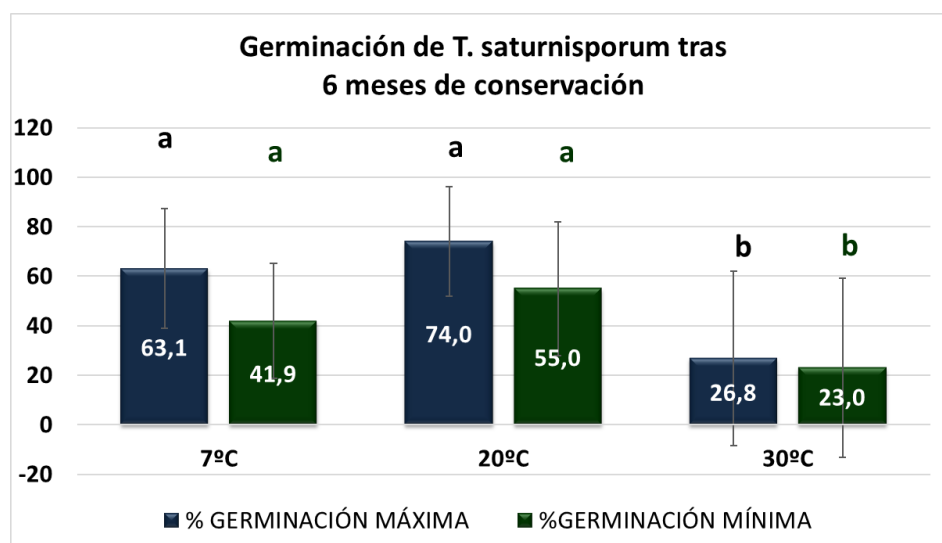


Gráfica 24. Porcentaje de germinación máxima y mínima de *T. saturnisporum* de los cuatro formulados tras seis meses de conservación.

Respecto a los porcentajes de germinación máxima, los formulados 1 (formulado con agua), 3 (formulado con lisina y KCl) y 4 (formulado con KCl) son iguales entre sí de forma estadística, siendo el formulado 1 (agua) más alto que los demás con un porcentaje de 68,60%. El porcentaje de germinación del formulado 2 (formulado con lisina) es el más bajo de todos con diferencia con un porcentaje de 35,80%.

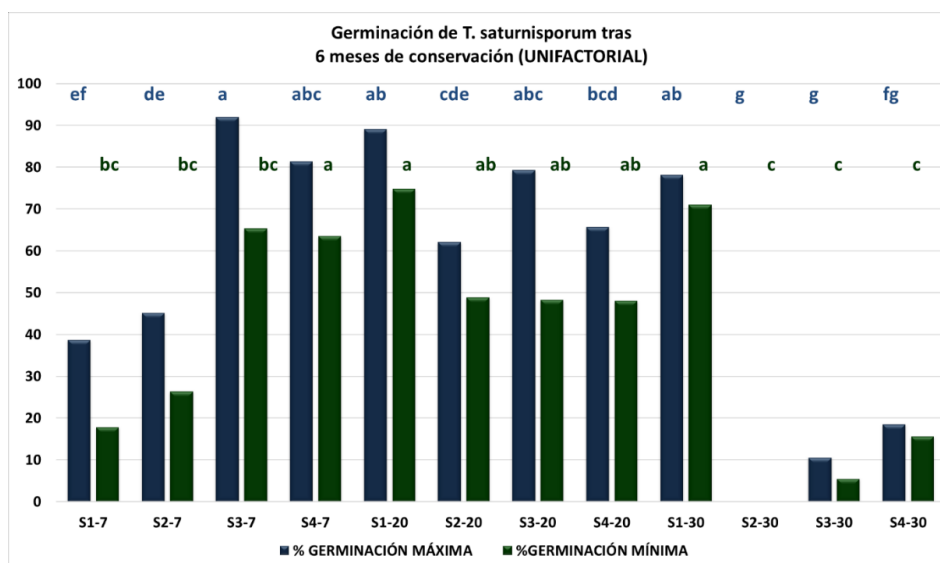
Para los porcentajes de germinación mínima los formulados 1 (formulado con agua), 3 (formulado con lisina y KCl) y 4 (formulado con KCl) son iguales entre sí siendo el 1

(formulado con agua) mayor que el resto con un 54,50% y los formulados 2 (formulado con lisina), 3 (formulado con lisina y KCl) y 4 (formulado con KCl) también son iguales entre ellos de forma estadística correspondiéndole el porcentaje de germinación más bajo al formulado 2 (formulado con lisina) con un 25,10%.



Gráfica 25. Porcentaje de germinación máxima y mínima de *T. saturnisporum* tras seis meses de conservación a 7°C, 20°C y a 30°C.

Tras los seis meses de conservación; en *Trichoderma saturnisporum* vemos que de forma estadística los porcentajes de germinación máxima y mínima son iguales a 7°C y a 20°C, aunque estos últimos son superiores con unos resultados de 74,00% para la germinación máxima y 55,00% para la germinación mínima. Por otra parte, los resultados obtenidos a 30°C son los más bajos para ambas germinaciones con unos porcentajes de 26,80% y 23,00% para la germinación máxima y mínima respectivamente.



Gráfica 26. Porcentaje de germinación máxima y mínima de *T. saturnisporum* de los cuatro formulados tras seis meses de conservación a las temperaturas de 7°C, 20°C y 30°C.

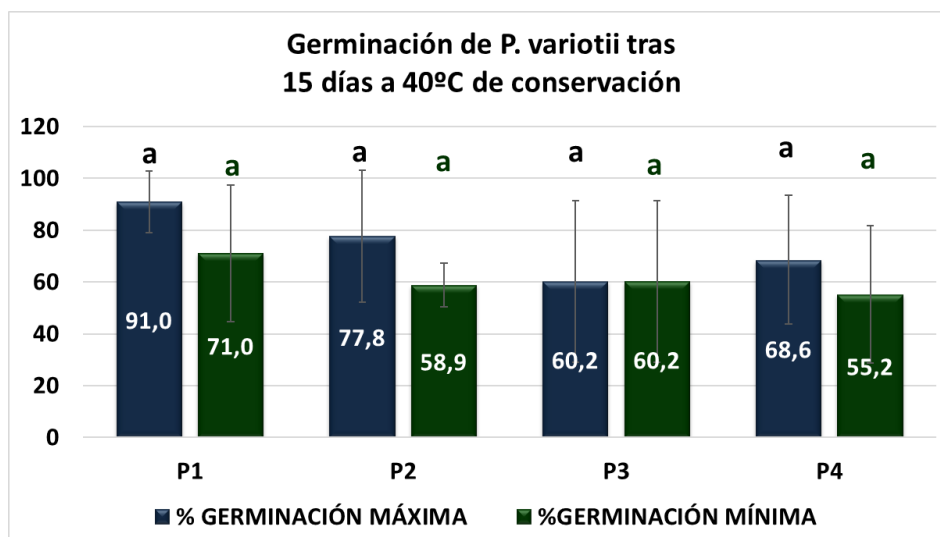
Haciendo un análisis estadístico se ha visto que hay interacción entre los porcentajes de germinación máxima y mínima con los diferentes formulados a las temperaturas de 7°C, 20°C y 30°C por lo tanto se realizó un análisis unifactorial en el cual cada combinación de tratamiento y temperatura ha sido considerado como un único factor. Una vez dicho esto, los porcentajes de germinación máxima más altos son los proporcionados por los formulados S3 (formulado con lisina y KCl) y S4 (formulado con KCl) a 7°C, S1 (formulado con agua) y S3 (formulado con lisina y KCl) a 20°C y S1 (formulado con agua) a 30°C, siendo el formulado S3 (formulado con lisina y KCl) a 7°C el que tiene un porcentaje más alto. Los porcentajes más bajos se encuentran en los formulados S2 (formulado con lisina) y S3 (formulado con lisina y KCl) a 30°C, aunque sean iguales de forma estadística S2 (formulado con lisina) es el peor debido a que no tiene nada de porcentaje de germinación.

En el caso de los porcentajes de germinación mínima más elevados nos encontramos con los formulados S4 (formulado con KCl) a 7°C, S1 (formulado con agua), S2 (formulado con lisina), S3 (formulado con lisina y KCl) y S4 (formulado con KCl) a 20°C y S1 (formulado con agua) a 30°C, siendo S1 (formulado con agua) a 30°C el que presenta un porcentaje más alto que el resto. En los formulados con los porcentajes más bajos nos encontramos con S2 (formulado con lisina), S3 (formulado con lisina y KCl) y S4 (formulado con KCl) a 30°C y como ocurriría con el porcentaje de germinación máxima el formulado S2 (formulado con lisina 60 g/L) no presenta ningún tipo de germinación siendo por lo tanto el peor formulado en ambos casos.



### 5.1.2.3. Resultados *Paecilomyces variotii*

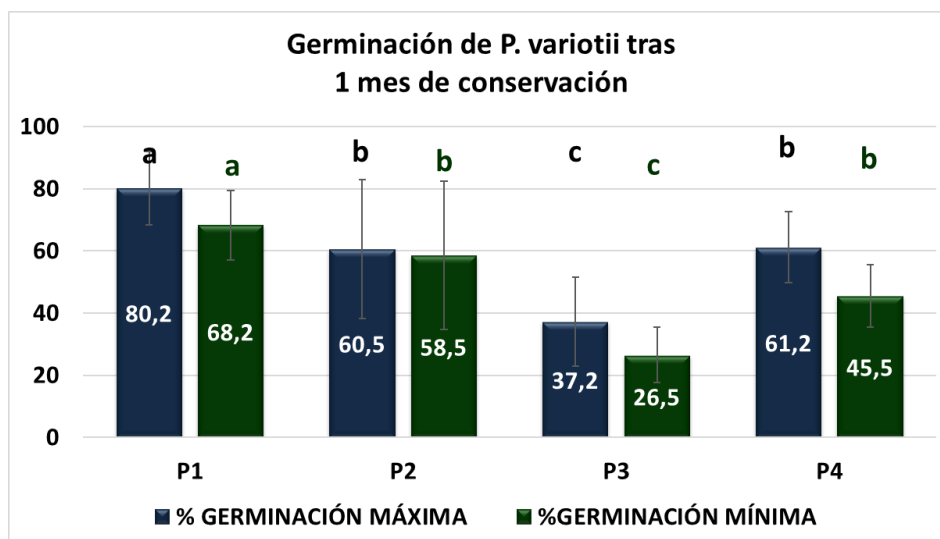
- Tras quince días de conservación a 40°C.



Gráfica 27. Porcentaje de germinación máxima y mínima de *P. variotii* de los cuatro formulados tras quince días de conservación a 40°C.

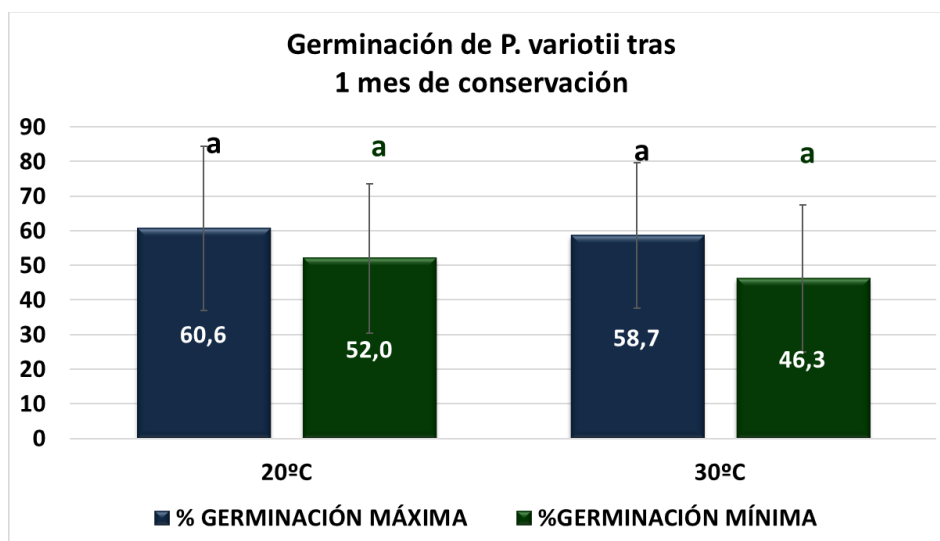
Una vez cumplido el plazo de quince días a 40°C podemos decir que los porcentajes de germinación máxima y mínima son iguales para los cuatro formulados; presentando el formulado 1 (formulado con agua) unos valores superiores al resto de formulados en ambas germinaciones con un 91,00% para la germinación máxima y 71,00% para la germinación mínima. El porcentaje de germinación máxima más bajo corresponde al formulado P3 (formulado de lisina con KCl) con un 60,20% y el porcentaje de germinación mínima más pequeño es el proporcionado por el formulado P4 (formulado con KCl) con un 55,20%.

- Tras un mes de conservación a 20°C y 30°C.



Gráfica 28. Porcentaje de germinación máxima y mínima de *P. variotii* de los cuatro formulados tras un mes de conservación.

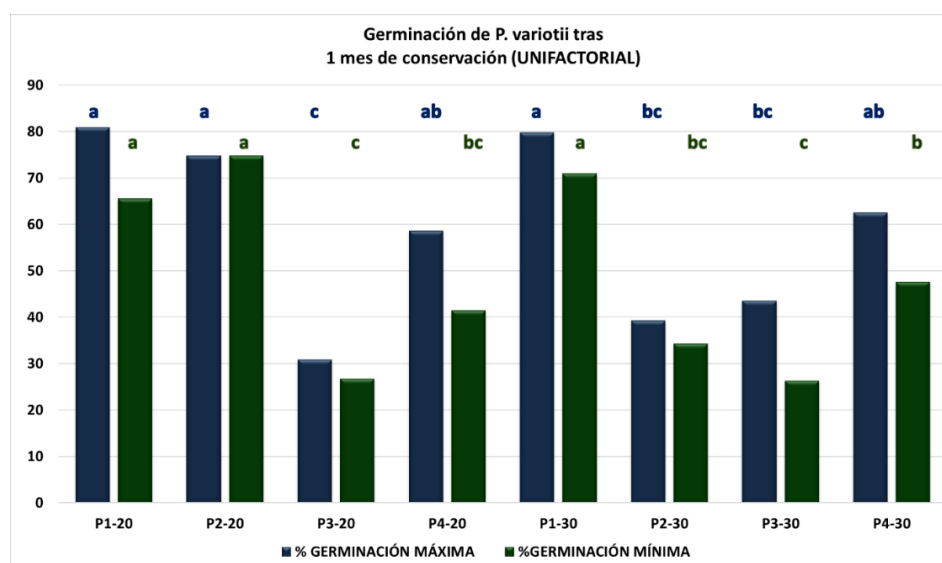
Pasado un mes de conservación, en el caso de *P. variotii* el formulado 1 (formulado con agua) presenta los porcentajes de germinación más elevados tanto para la germinación máxima como para la mínima con 80,20% y 68,20% respectivamente, tras este nos encontramos a los formulados 2 (formulado con lisina) y 4 (formulado con KCl) que también presentan los mismos porcentajes de germinación de forma estadística para ambos casos y por último se encuentra el formulado 3 (formulado con lisina y KCl) con los porcentajes de germinación más bajos de 37,20% para la germinación máxima y 26,50% para la mínima.



Gráfica 29. Porcentaje de germinación máxima y mínima de *P. variotii* tras un mes de conservación a

20°C y a 30°C.

En este caso, no se han encontrado diferencias significativas estadísticamente entre los resultados obtenidos de los porcentajes de germinación máxima y mínima a 20°C y a 30°C. Se aprecia como en la germinación máxima se han obtenido resultados muy similares de 60,60% para 20°C y 58,70% para 30°C; en la germinación mínima los porcentajes se han establecido en 52,00% y 46,30% para las temperaturas de 20°C y 30°C respectivamente.



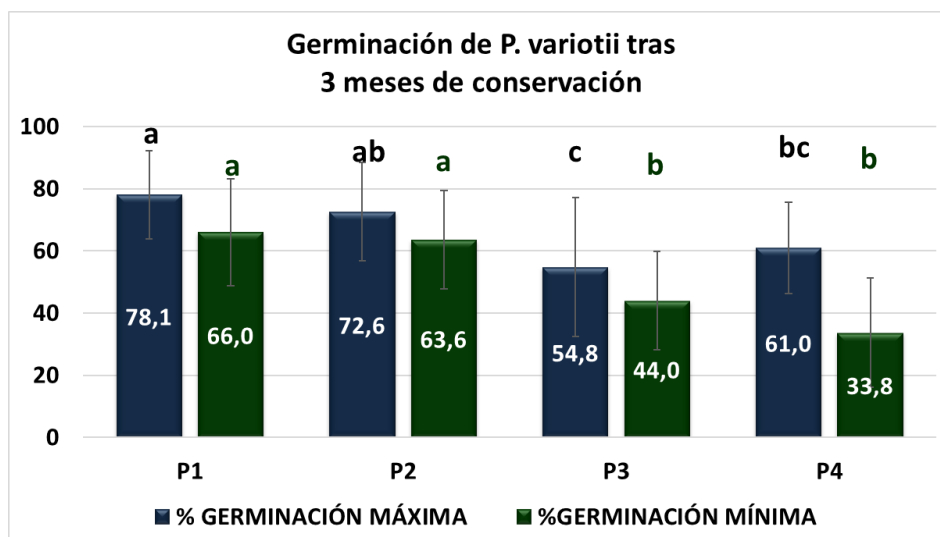
Gráfica 30. Porcentaje de germinación máxima y mínima de *P. variotii* de los cuatro formulados tras un mes de conservación a las temperaturas de 20°C y 30°C.

Una vez habiendo conservado *P. variotii* durante un mes se ha encontrado relación entre los formulados a las temperaturas de 20°C y 30°C y los porcentajes de germinación máxima y mínima, tras ver esto se ha realizado un análisis unifactorial en el cual cada combinación de tratamiento y temperatura se ha considerado como un único factor. Observando el gráfico se puede decir que los porcentajes de germinación máxima se ven en los formulados P1 (formulado con agua), P2 (formulado con lisina 60 g/L) y P4 (formulado con KCl) a 20°C y P1 (formulado con agua) y P4 (formulado con KCl) a 30°C. De todos los mencionados anteriormente el porcentaje más alto se corresponde al formulado P1 (formulado con agua) a 20°C. Para el porcentaje de germinación mínima más alto tenemos que hablar de los formulados P1 (formulado con agua) y P2 (formulado con lisina) a 20°C y P1 (formulado con agua) a 30°C.

En el caso del porcentaje de germinación mínima más elevado encontramos con los formulados P1 (formulado con agua) y P2 (formulado con lisina) a 20°C y P1 (formulado con agua) a 30°C correspondiéndose P2 (formulado con lisina) a 20°C con el porcentaje más alto de los tres. Los porcentajes más bajos están en los formulados P3 (formulado con lisina y KCl) a

20°C y en P3 (formulado con lisina y KCl) a 30°C siendo el primero el más pequeño de los dos.

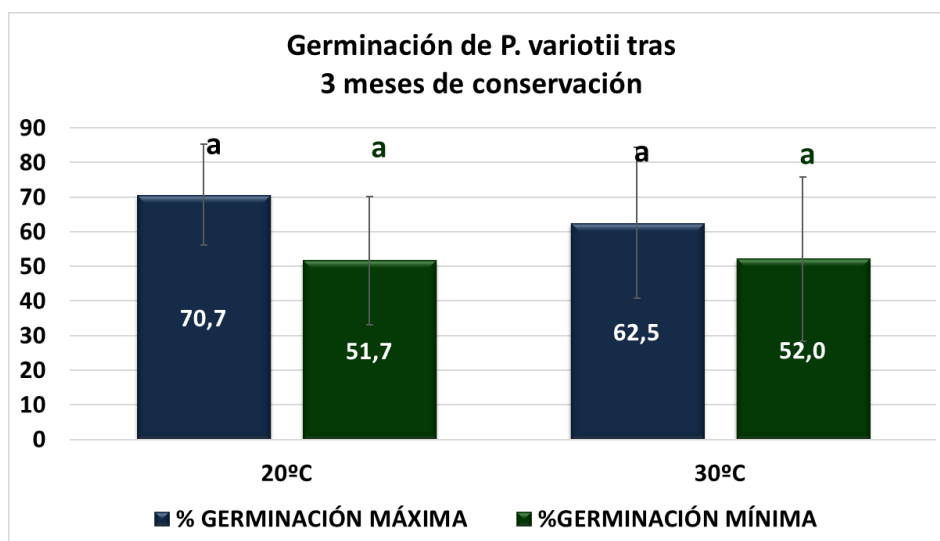
- Tras tres meses de conservación a 20°C y 30°C.



Gráfica 31. Porcentaje de germinación máxima y mínima de *P. variotii* de los cuatro formulados tras tres meses de conservación.

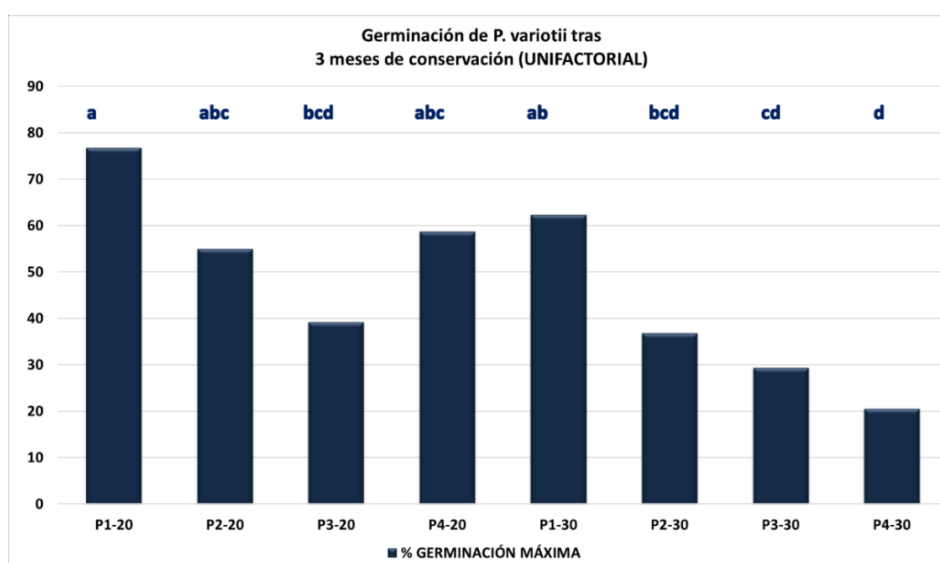
Transcurridos los tres meses de conservación de los diferentes formulados podemos decir que: para la germinación máxima las soluciones 1 (formulado con agua) y 2 (formulado con lisina) presentan los mismos porcentajes de germinación que a su vez son los más elevados siendo el formulado P1 (formulado con agua) el mayor de todos con un porcentaje de germinación del 78,10%, tras estos van los formulados 2 (formulado con lisina) y 4 (formulado KCl) que son iguales de forma estadística y por último los formulados 3 (formulado con lisina y KCl) y 4 (formulado con KCl) con unos resultados de 54,80% para P3 y 61,00% para P4.

Para la germinación mínima nos encontramos con que los formulados 1 (formulado con agua) y 2 (formulado con lisina) presentan los porcentajes más altos con un 66,00% y 63,60% respectivamente, seguidos de los formulados 3 (formulado con lisina y KCl) y 4 (formulado con KCl) que son más bajos e iguales desde un punto de vista estadístico.



Gráfica 32. Porcentaje de germinación máxima y mínima de *P. variotii* tras tres meses de conservación a 20°C y a 30°C.

En este caso, tanto los porcentajes de germinación máxima y mínima son iguales para ambas temperaturas, aun así, el porcentaje de germinación máxima es mayor a 20°C con un porcentaje de 70,70% frente al 62,50% proporcionado por la temperatura de 30°C. El porcentaje de germinación mínima es algo superior a 30°C ya que se obtuvo un resultado de germinación del 52,00% y a 20°C un porcentaje de 51,70%.

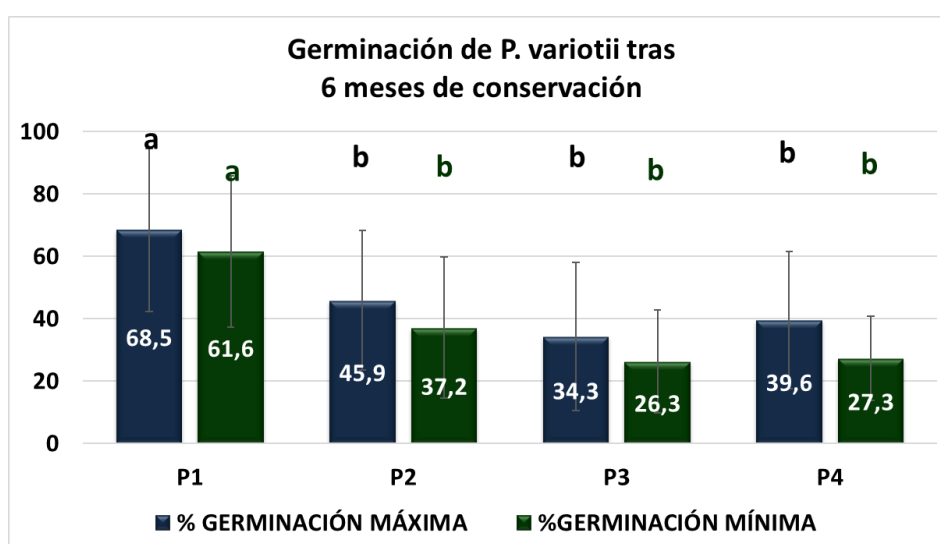


Gráfica 33. Porcentaje de germinación máxima de *P. variotii* de los cuatro formulados tras tres meses de conservación a las temperaturas de 20°C y 30°C.

Pasados tres meses de conservación del hongo *Paecilomyces variotii* se ha encontrado

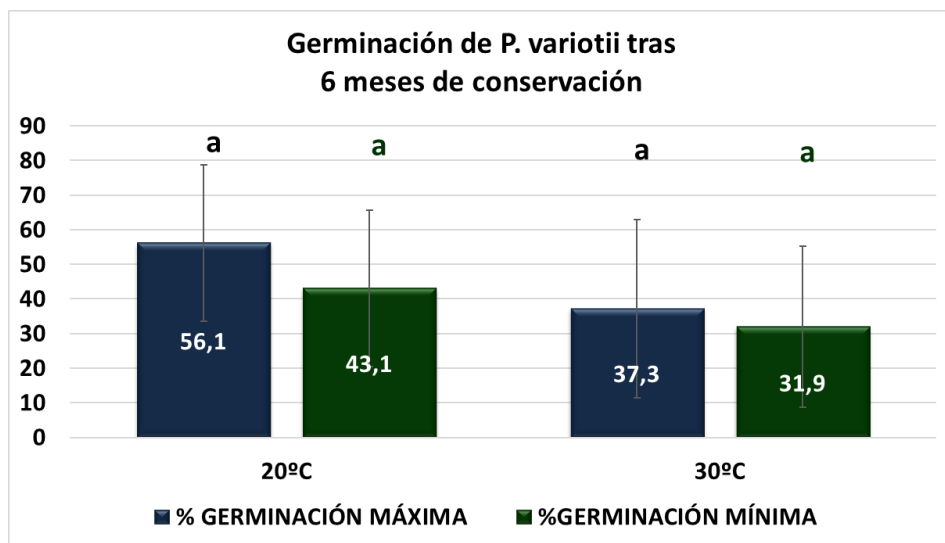
interacción entre el porcentaje de germinación máxima y los cuatro formulados de las temperaturas 20°C y 30°C al existir esta interacción se ha realizado un análisis unifactorial en el cual cada combinación de tratamiento y temperatura se ha considerado como un único factor. Entre los formulados se establece los porcentajes de germinación más altos en P1 (formulado con agua), P2 (formulado con lisina) y P4 (formulado con KCl) a 20°C y en P1 (formulado con agua) a 30°C, aunque de forma estadística se consideren iguales el porcentaje más elevado lo tiene el formulado P1 (formulado con agua) a 20°C. Por otra parte, el porcentaje de germinación máxima más bajo es el dado por el formulado P4 (formulado con KCl) a 30°C.

- Tras seis meses de conservación a 20°C y 30°C.



Gráfica 34. Porcentaje de germinación máxima y mínima de *P. variotii* de los cuatro formulados tras seis meses de conservación.

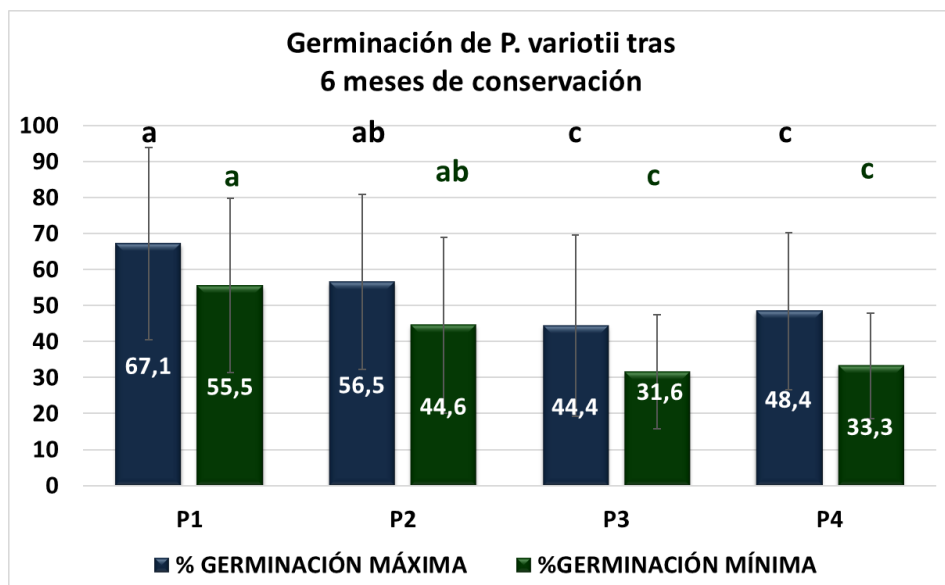
Como se puede apreciar en el gráfico, el formulado 1 (formulado con agua) presenta los mayores porcentajes de germinación tanto para la germinación máxima como para la mínima, en este caso vemos que hay unos porcentajes de 68,50% y 61,60% respectivamente. A su vez, los formulados 2 (formulado con lisina), 3 (formulado con lisina y KCl) y 4 (formulado con KCl) tras realizar un análisis estadístico podemos decir que tienen los mismos porcentajes de germinación máxima y mínima siendo de todas formas el formulado 3 (formulado con lisina y KCl) inferior al resto con unos porcentajes de 34,30% y 26,30% para la germinación máxima y mínima.



Gráfica 35. Porcentaje de germinación máxima y mínima de *P. variotii* tras seis meses de conservación a 20°C y a 30°C.

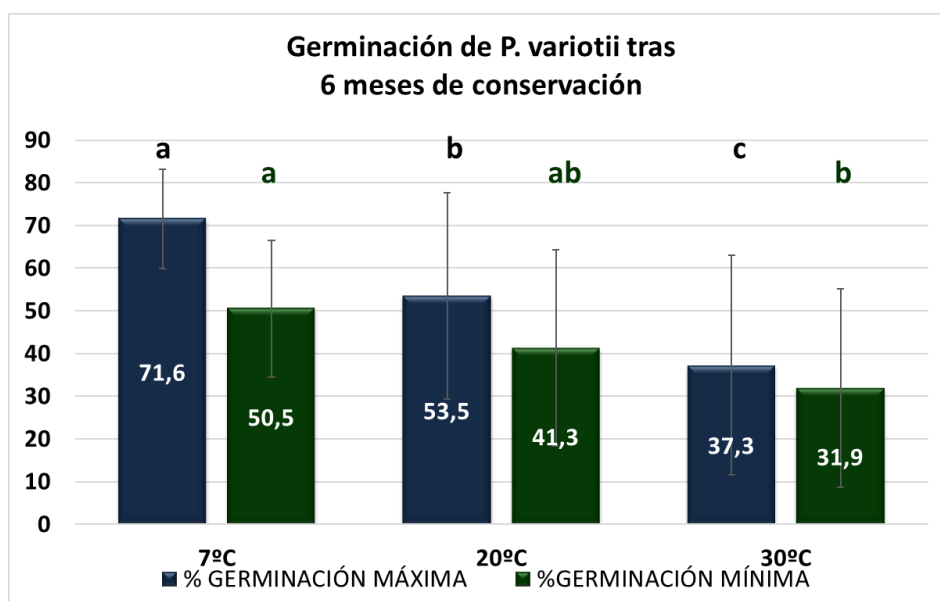
En relación a las temperaturas tanto los porcentajes de germinación máxima como los porcentajes de germinación mínima son los mismos de forma estadística para ambas. Sin embargo, los porcentajes de la temperatura de 20°C son mayores que los de 30°C con unos porcentajes de 56,10% y 43,10% frente al 37,30% y 31,90%.

-Tras seis meses de conservación 7°C, 20°C y 30°C.



Gráfica 36. Porcentaje de germinación máxima y mínima de *P. variotii* de los cuatro formulados tras seis meses de conservación.

Después de seis meses de conservación el formulado 1 (formulado con agua) es el que tiene los porcentajes más elevados de germinación máxima y mínima con 67,10% y 55,50% para cada una de las germinaciones, tras este le sigue el formulado 2 (formulado con lisina 60 g/L) que estadísticamente tiene los mismos porcentajes que el primero y por último se encuentran los formulados 3 (formulado con lisina y KCl) y 4 (formulado con KCl 100 g/L) con los mismos porcentajes de germinación en ambos casos. Teniendo el formulado P3 (formulado con lisina más KCl) los porcentajes más bajos con un 44,40% para la germinación máxima y un 31,60% para la germinación mínima.

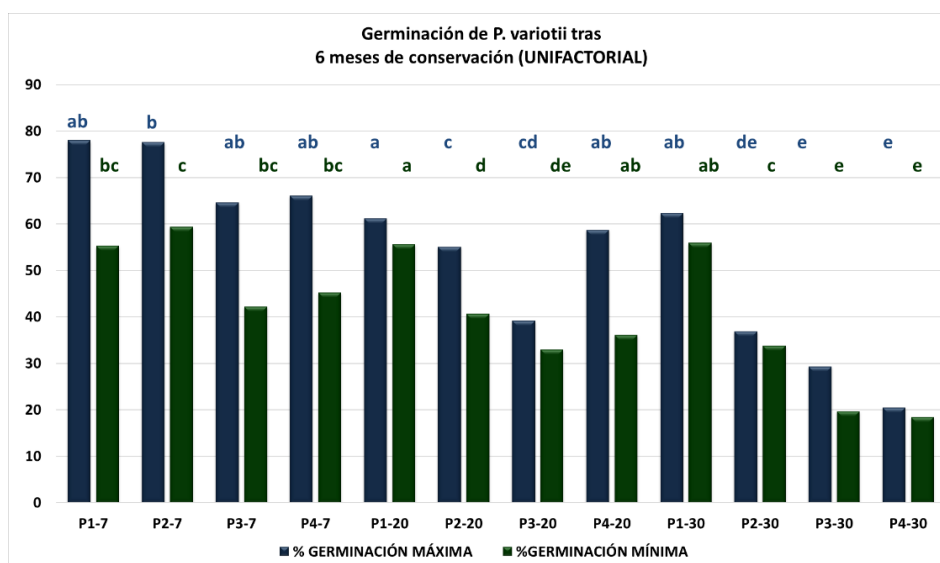


Gráfica 37. Porcentaje de germinación máxima y mínima de *P. variotii* tras seis meses de conservación a 7°C, 20°C y a 30°C.

Para la germinación máxima a 7°C se encuentra el porcentaje de germinación más elevado con un 71,60% seguido de 20°C con un 53,50% y por último a 30°C con 37,30%.

En cambio, para el porcentaje de germinación mínima nos encontramos que a 7°C y a 20°C tenemos el mismo porcentaje de germinación hablando de forma estadística que de forma numérica se trata de 50,50% y 41,30%, estos son más elevados que el porcentaje a 30°C de 31,90% que también es igual al de 20°C estadísticamente.





Gráfica 38. Porcentaje de germinación máxima y mínima de *P. variotii* de los cuatro formulados tras seis meses de conservación a las temperaturas de 7°C, 20°C y 30°C.

Después de seis meses de conservación de *Paecilomyces variotii* hay interacción entre los porcentajes de germinación máximos y mínimos con los formulados a las temperaturas de 7°C, 20°C y 30°C; considerándose la combinación de formulado y temperatura como un único factor tras realizar un análisis unifactorial. Basándome en el gráfico se puede decir que los porcentajes de germinación máximos más altos los han proporcionado los formulados P1 (formulado con agua), P2 (formulado con lisina 60 g/L), P3 (formulado con lisina y KCl) y P4 (formulado con KCl) a 7°C, P1 (formulado con agua) y P4 (formulado con KCl) a 20°C y P1 (formulado con agua) a 30°C, aunque el análisis estadístico haya dicho que son iguales entre ellos se puede decir que P1 (formulado con agua) a 7°C presenta el porcentaje más alto. Para los formulados con porcentajes más bajos de germinación máxima tenemos a P2 (formulado con lisina), P3 (formulado con lisina y KCl) y P4 (formulado de KCl) a 30°C siendo P4 (formulado con KCl) el más bajo de los tres.

Para el porcentaje de germinación mínima más alto nos encontramos con los formulados P1 (formulado con agua) y P4 (formulado con KCl) a 20°C y P1 (formulado con agua) a 30°C, de los cuales P1 (formulado con agua) a 20°C es el más elevado. En cambio, los formulados que tienen el porcentaje de germinación mínima más bajo son P3 (formulado con lisina y KCl) y P4 (formulado con KCl) a 30°C donde P4 (formulado con KCl) presenta el porcentaje más bajo.

## 5.2. Discusión

Como se ha expuesto durante todo el trabajo, el proyecto se ha llevado a cabo para conocer la viabilidad de *Trichoderma aggressivum*, *Trichoderma saturnisporum* y *Paecilomyces variotii* en seis formulados líquidos diferentes y a temperaturas distintas.

De entre los seis formulados empleados agua, lisina 60g/L, lisina 60g/L junto 100 g/L de KCl, 100 g/L de KCl y materia orgánica líquida al 50 y al 10% podemos decir que en general los mejores resultados en crecimiento de los hongos en las placas de Petri se han llevado a cabo en el primer formulado, este era el que tenía únicamente agua. Por el contrario, los peores crecimientos han sido los proporcionados por el formulado cinco, este es el que contiene un porcentaje de 50% de materia orgánica líquida y en la mayoría de los casos con este formulado los hongos no han llegado ni a germinar. Estos resultados se han repetido con todos los hongos y en todas las temperaturas.

En lo referido a las temperaturas, las muestras que han estado depositadas en estufa a 20°C han obtenido mejores resultados que aquellas que se encontraban a 30°C. Exceptuando cuando pasaron seis meses y las mediciones se hicieron también a 7°C donde se vio que en *Trichoderma aggressivum* y *Paecilomyces variotii* se mostraban mejores resultados de germinación a esa temperatura que a 20°C.

Conforme se iban cumpliendo los plazos y se realizaban los conteos, en los microorganismos se ha observado un descenso gradual en el porcentaje máximo de germinación. En el caso de *Trichoderma aggressivum* los porcentajes de germinación pasan de ser de 76,30% tras estar quince días a 40°C a 88,70% pasado el primer mes, 82,30% a los tres meses y finalmente 65,60% en el último conteo de los seis meses. Se puede ver como el porcentaje va bajando con el paso del tiempo excepto el porcentaje de germinación a los quince días que es menor que el obtenido a un mes, esto puede deberse a la alta temperatura a la que se encontró el microorganismo durante ese periodo de tiempo afectando por tanto a su capacidad de germinación.

Para *Trichoderma saturnisporum* se obtuvieron unos porcentajes de germinación máximos de 82,00% tras los quince días, 79,70% cuando pasó el primer mes en la estufa, 78,70% a los tres meses y un porcentaje de 74,00% en la última medición de los seis meses. En este caso se aprecia como el porcentaje de germinación va descendiendo de forma escalonada no habiendo mucha diferencia entre los porcentajes y siendo el último un porcentaje bastante alto.

Por último, en el caso de *Paecilomyces variotii* se comenzó obteniendo un porcentaje del 91,00% tras estar a 40°C durante quince días, tras el primer mes se obtuvo un porcentaje de germinación del 60,60%, seguido de un 70,70% tras los tres meses en la estufa y finalmente se llegó a un porcentaje del 56,10%. En este caso se ve que el porcentaje de germinación a un mes es menor que el obtenido a los tres meses, esto podría deberse a que, aunque todas las muestras son agitadas antes de su uso es posible que el material haya decantado y en consecuencia no se hubiera podido coger bien.

En el estudio de Marín *et al.*, (2014) también se hizo un estudio de la densidad de población de *Trichoderma sp.* en función del tiempo y la temperatura, aunque en su caso no solo estudiaron preparados líquidos, sino que también probaron en formulados sólidos. Centrándonos únicamente en sus resultados obtenidos en el preparado líquido, se puede ver como en su ensayo cuando el formulado se encuentra a temperatura ambiente hay un mayor descenso en la concentración de *Trichoderma sp.* que cuando se encuentra a 5°C, esto mismo ha sucedido en este ensayo en cuestión al comparar las muestras de *Trichoderma aggressivum* y *Trichoderma saturnisporum* que estuvieron a 7°C con las que se encontraban a 20°C o 30°C simulando temperaturas ambientes. Como se ha comentado anteriormente, se apreciaron descensos conforme iba aumentando el tiempo de conservación del formulado, cosa que se ha corroborado con la información obtenida de este mismo artículo.

Lewis *et al.*, (1987) realizaron un estudio donde se conservaron tres cepas diferentes de *Trichoderma* en cápsulas de alginato durante seis meses a temperaturas de 5 y 25°C. Pasado el periodo de conservación se observó que a 25°C la cantidad de UFC era un 5% menos que el número de esporas totales, en cambio a 5°C la conservación fue mucho mejor.

Los resultados obtenidos no solo concuerdan con los estudios anteriores, sino que Cejas *et al.*, (2000) llegaron a la conclusión de que los formulados líquidos tienen una mejor viabilidad cuando se conservan a temperaturas bajas, en su caso compararon los porcentajes de germinación de *Trichoderma harzianum* con alumbre y ácido sórbico al 1% a las temperaturas de 12°C y 26°C.

Por último, Roussos *et al.* (1989) tras estudiar varias técnicas de conservación en *Trichoderma harzianum* llegó a la conclusión que para mantener las conidiósporas con un porcentaje de viabilidad sobre el 85-95% durante un tiempo de dos meses la mejor técnica a emplear es la refrigeración a una temperatura de 4°C.

Por otro lado, en el artículo de Cardona *et al.* (2014) se estudió la capacidad de conservación y germinación de formulados con *Purpureocillium sp.* a las temperaturas de 4-8 °C, 14°C, 23-25°C y 30°C en los tiempos de ocho días, quince días, un mes y tres meses. En

este ensayo se partió de una concentración de  $3,6 \cdot 10^8$  esp/mL, en cambio en nuestro caso se obtuvo una concentración de *Paecilomyces variotii* de  $1,0 \times 10^8$  esp/mL. En su caso los porcentajes de germinación más elevados fueron los obtenidos a temperatura ambiente (23-25°C) y en frío (4-8°C), en cambio, cuando en este ensayo se compararon los porcentajes de germinación de las temperaturas de 7°C, 20°C y 30°C a la temperatura de 7°C fue cuando se consiguió el mejor resultado existiendo una diferencia de un 20% entre estos resultados y los dados a 20°C. Al finalizar su ensayo tras tres meses de conservación en todas las temperaturas se mantuvo una germinación entre el 85 y 90%, siendo estos resultados mejores que los nuestros ya que el mejor porcentaje fue del 70%; esto puede deberse a la cantidad de contaminación que apareció en las muestras de este hongo debido a que su extracción se hizo en el exterior para evitar contaminar el ambiente del laboratorio favoreciendo la incidencia de otros microorganismos en el medio.

# CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES TÉCNICAS

## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES TÉCNICAS

### 6.1. Conclusiones

Tras realizar los análisis estadísticos necesarios con todos los datos obtenidos durante la realización de este proyecto experimental, se puede concluir que:

1.- La mayor viabilidad en el tiempo de los tres microorganismos se ha logrado con el formulado 1 (agua). Seguidos en eficiencia por los formulados 4 (100 g/L de KCl), 3 (60 g/L de lisina y 100 g/L de KCl) y 2 (60 g/L de lisina) respectivamente para *T. aggressivum*, *T. saturnisporum* y *P. variotii*. El formulado 5 (50% de materia orgánica líquida) fue el peor de los tratamientos ensayados con los tres microorganismos.

2.- La conservación a temperaturas menores favoreció la capacidad de supervivencia en los tres microorganismos evaluados a lo largo del tiempo.

3.- El paso del tiempo influye de forma negativa en la viabilidad del formulado debido a que los porcentajes de germinación disminuyen; no obstante, los resultados finales son aceptables en algunas de las formulaciones ensayadas.

### 6.2. Recomendaciones técnicas

Tras la realización del presente ensayo, se ha puesto de manifiesto, que las esporas de los tres microorganismos mantienen su viabilidad en porcentajes que podemos considerar adecuados, durante 6 meses en varios de los formulados evaluados. Considerando que este es un estudio preliminar, la posible continuación del mismo, debería considerar ciertos posibles elementos de mejora, como:

1. Reducir el número de tratamientos ensayados, centrándose solo en aquellos que en principio han dado un mejor resultado. Ampliando el número de repeticiones basadas en lotes de producción distintos.
2. Ampliar el periodo de ensayo hasta un tiempo mínimo de año, para poder garantizar que la supervivencia final cumple con los requisitos legales sobre el número de esporas viables tras un año de conservación que establece el registro oficial de fertilizantes con microorganismos.
3. Dado que estos estudios son desarrollados durante largos periodos de tiempo, sería deseable que en paralelo se probasen otras alternativas de conservación como la

conservación en medios sólidos. Por si los resultados finales en los formulados líquidos no fuesen los esperados.

# BIBLIOGRAFÍA



## 7.BIBLIOGRAFÍA

**Adesemoye, A. O., y Kloepper, J. W. (2009).** Plant–microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(1), 1-12.

agents. *Phytoparasitica*, 36(4), 388.

**Agrios, G. (2005).** Plant pathology. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo: Elsevier academic Press.

**Alam, S. S., Sakamoto, K., Amemiya, Y., y Inubushi, K. (2010, August).** Biocontrol of soil borne *Fusarium* wilts of tomato and cabbage with a root colonizing fungus, *Penicillium* sp. EU0013. In *19th World Conference. Soil Science Proceedings* (pp. 20-22).

**Avis, T. J., Gravel, V., Antoun, H., y Tweddell, R. J. (2008).** Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil biology and biochemistry*, 40(7), 1733-1740.

**Ayer, W. A., Craw, P. A., y Nozawa, K. (1991).** Two 1 H-naphtho [2, 3-c] pyran-1-one metabolites from the fungus *Paecilomyces variotii*. *Canadian journal of chemistry*, 69(2), 189-191.

**Bainier, G. (1907).** Mycothèque de l'école de Pharmacie. XI. *Paecilomyces*, genre nouveau de Mucédinées. *Bulletin Trimestrielle de la Societe de Mycologie Française*, 23, 26-27.

**Bissett, J. (1984).** A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section Longibrachialum sect. nov. *Canadian journal of Botany* 62, 924-931.

**Bissett, J. (1991).** A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section Pachy-basium. *Can. J. Bot.* 69:2373-2417.

**Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., y Valéro, J. R. (2006).** Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochemistry*, 41(2), 323-342.

**Caesar, A. J., y Burr, T. J. (1991).** Effect of conditioning, betaine, and sucrose on survival of rhizobacteria in powder formulations. *Applied and environmental microbiology*, 57(1), 168-172.

**Cardona, N. L., Borrego, D. A., Fernández, E. P., Sánchez, J., Cardona, V., y Montoya, G. (2014).** Microbiological evaluation and pathogenicity of a liquid bioformulation of the fungus *Purpureocillium* sp. (strain UdeA 0109) on *Meloidogyne incognita-javanica* stages. *Biotecnología Aplicada*, 31(3), 210-215.

**Cejas, A., Fernández-Larrea, O., Díaz, R., Nieves, C., y Fuentes, R. (2000).** Conservación de preparados líquidos de *Trichoderma harzianum* cepa A34. (No. 3194).

**Chaverri, P., Samuels, G. J., y Stewart, E. L. (2001).** *Hypocrea virens* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma virens*. *Mycologia* 93:1113- 1124.

**Chen, Z. A., Liu, G. Y. y Hu, S. Y. (1993).** Studies on cultivation of *Paecilomyces cicadae* and its pharmacological function. *Acta Mycologica Sinica* 12: 138-144.

**Cotes Prado, A. M., y Moreno, C. A. (2018).** Desarrollo de un bioplaguicida a base de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y uso en el cultivo de la lechuga para el control del moho blanco (*Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*).

**Cruz Martínez, L. C. (2007).** Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto.

**De Oliveira-Longatti, S.M., De Sousa, P.M., Marra, L.M., Ferreira, P.A.A. y Souza Moreira, F.M. (2015).** *Burkholderia fungorum* promueve el crecimiento de frijol común en un oxisol distrófico. *Anales de microbiología*, 65 (4), 1825-1832.

**Deacon, J. W. (1994).** Rhizosphere constraints affecting biocontrol organisms applied to seeds.

**Diánez, F., Santos, M., Carretero, F., y Marín, F. (2016).** *Trichoderma saturnisporum*, a new biological control agent. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(6), 1934-1944.

**Dixon, R. A. (2001).** Natural products and plant disease resistance. *Nature* , 411 (6839), 843-847.

**Driks, A. (2004).** The Bacillus spore coat. *Phytopathology* 94:1249-1251.

**Elad, Y., Chet, I., y Henis, Y. (1982).** Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 28(7), 719-725.

**Elsharkawy, M. M., Hassan, N., Villajuan-Abgona, R., y Hyakumachi, M. (2014).** Mechanism of biological control of *Rhizoctonia* damping-off of cucumber by a non-pathogenic isolate of binucleate *Rhizoctonia*. *African Journal of Biotechnology*, 13(5).

**Elsharkawy, M. M., Shimizu, M., Takahashi, H., y Hyakumachi, M. (2012).** Induction of systemic resistance against Cucumber mosaic virus by *Penicillium simplicissimum* GP17-2 in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Pathology*, 61(5), 964-976. *Environmental Research and Development*, 5(3), 631-637.

**Fages, J. (1992).** An industrial view of *Azospirillum* inoculants: formulation and application technology. *Symbiosis* 13: 15-26.

**Faria, M. R., y Wraight, S. P. (2007).** Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological control*, 43(3), 237-256.

**Ferrón Sánchez, F. J. (2013).** Identificación de potenciales agentes de control biológico y efecto de sus metabolitos producidos en el control de patógenos.

**Fontenelle, A. D. B., Guzzo, S. D., Lucon, C. M. M., y Harakava, R. (2011).** Growth promotion and induction of resistance in tomato plant against *Xanthomonas euvesicatoria* and *Alternaria solani* by *Trichoderma* spp. *Crop Protection*, 30(11), 1492-1500.

**Fox, E. M., y Howlett, B. J. (2008).** Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current opinion in microbiology*, 11(6), 481-487.

**Frisvad, J. C. (2015).** Taxonomy, chemodiversity, and chemoconsistency of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* species. *Frontiers in Microbiology*, 5, 773.

**Fritig, B., Heitz, T. y Legrand, M. (1998).** Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Current Opinion in Immunology*, 10 (1), 16-22.

**Gervais, P., y Molin, P. (2003).** The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 85-101.

**Goettel, M. S., y Roberts, D. W. (1992).** Mass production, formulation and field application of entomopathogenic fungi.

**Gotlieb, D., Oka, Y., Ben-Daniel, B. H., y Cohen, Y. (2003).** Dry mycelium of *Penicillium chrysogenum* protects cucumber and tomato plants against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Phytoparasitica*, 31(3), 217-225.

**Guang-Can, T. A. O., Shu-Jun, T. I. A. N., Miao-Ying, C. A. I., & Guang-Hui, X. I. E. (2008).** Phosphate-solubilizing and-mineralizing abilities of bacteria isolated from soils. *Pedosphere*, 18(4), 515-523.

**Han, Y. F., Liang, Z. Q., y Chu, H. L. (2007).** A new thermophilic species of *Paecilomyces*, *Paecilomyces curticatenatus*. *Mycosystema*, 26(1), 13-16.

**Harman, G. E. (1991).** Seed treatments for biological control of plant disease. *Crop protection*, 10(3), 166-171.

**Harman, G. E., Custis, D., y Shores, M. (2006).** Plant Genomic And Environmental Factors that Affect the Abilities of *Trichoderma spp.* to Induce Plant Resistance and Increased Growth. In *9th International Workshop on Trichoderma and Gliocladium*.

**Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., y Lorito, M. (2004).** *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology*, 2(1), 43-56.

**Harman, G. E., Petzoldt, R., Comis, A., y Chen, J. (2004).** Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology*, 94(2), 147-153.

**Harman, G.E. (2011).** Simbiontes de plantas de hongos multifuncionales: nuevas herramientas para mejorar el crecimiento y la productividad de las plantas. *Nuevo fitólogo*, 189 (3), 647-649.

**He, J., Kang, J., Lei, B., y Wen, T. (2011).** *Paecilomyces wawuensis*, a new species isolated from soil in China. *Mycotaxon*, 115(1), 303-310.

**Hossain, M. M., Sultana, F., Kubota, M., Koyama, H., y Hyakumachi, M. (2007).** The plant growth-promoting fungus *Penicillium simplicissimum* GP17-2 induces resistance in *Arabidopsis thaliana* by activation of multiple defense signals. *Plant and cell physiology*, 48(12), 1724-1736.

**Huang, W. Y., Cai, Y. Z., Hyde, K. D., Corke, H. y Sun, M. (2008).** Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal Diversity* 33: 61-75.

**Humber, R. A. (2008).** Evolution of entomopathogenicity in fungi. *Journal of invertebrate pathology*, 98(3), 262-266.

**Hyakumachi, M., y Kubota, M. (2003).** Fungi as plant growth promoter and disease suppressor. *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food and Environmental Application*. Arora DK (ed) Marcel Dekker, 101-110.

**Hyde, K.D. y Soyong, K. (2008).** The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity* 33: 163-173.

**Igiehon, N. O., y Babalola, O. O. (2018).** Rhizosphere microbiome modulators: contributions of nitrogen fixing bacteria towards sustainable agriculture. *International journal of environmental research and public health*, 15(4), 574.

**Inglis, P. W., y Tigano, M. S. (2006).** Identification and taxonomy of some entomopathogenic *Paecilomyces spp.*(Ascomycota) isolates using rDNA-ITS sequences. *Genetics and Molecular Biology*, 29(1), 132-136.

**Isaka, M., Palasarn, S., Kocharin, K., y Hywel-Jones, N. L. (2007).** Comparison of the bioactive secondary metabolites from the scale insect pathogens, anamorph *Paecilomyces cinnamomeus*, and teleomorph *Torrubiella luteorostrata*. *The Journal of antibiotics*, 60(9), 577-581.

**Jackson, M. A. (2007).** The biotechnology of producing and stabilizing living, microbial biological control agents for insect and weed control. *Biocatalysis and biotechnology for functional foods and industrial products/edited by Ching T. Hou, Jei-Fu Shaw*.

**Jackson, M. A., Mcguire, M. R., Lacey, L. A., y Wraight, S. P. (1997).** Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycological Research*, 101(1), 35-41.

**Jarozuk-Ścisel, J., Kurek, E., Rodzik, B., y Winiarczyk, K. (2009).** Interactions between rye (*Secale cereale*) root border cells (RBCs) and pathogenic and nonpathogenic rhizosphere strains of *Fusarium culmorum*. *Mycological research*, 113(10), 1053-1061.

**Jarozuk-Ścisel, J., Kurek, E., Winiarczyk, K., Baturo, A., y Łukanowski, A. (2008).** Colonization of root tissues and protection against *Fusarium* wilt of rye (*Secale cereale*) by nonpathogenic rhizosphere strains of *Fusarium culmorum*. *Biological Control*, 45(3), 297-307.

**Jeyarajan, R. (2006).** Prospects of indigenous mass production and formulation of Trichoderma. In *Current status of biological control of plant diseases using antagonistic organisms in India. Proceedings of the group meeting on antagonistic organisms in plant disease management held at Project Directorate of Biological Control, Bangalore, India on 10-11th July 2003* (pp. 74-80). Project Directorate of Biological Control, Indian Council of Agricultural Research.

**Jogaiah, S., Abdelrahman, M., Tran, L. S. P., y Shin-ichi, I. (2013).** Characterization of rhizosphere fungi that mediate resistance in tomato against bacterial wilt disease. *Journal of experimental botany*, 64(12), 3829-3842.

**Kapri, A., y Tewari, L. (2010).** Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma spp.* *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(3), 787-795.

**Kindermann, J., El-Ayouti, Y., Samuels, G. J., y Kubicek, C. P. (1998).** Phylogeny of the Genus *Trichoderma* Based on sequence analysis of the internal transcribed spacer region 1 of the rDNA cluster. *Fungal Genetics and Biology*, 24(3), 298-309.

**Krishna, C. (2005).** Solid-state fermentation systems—an overview. *Critical reviews in biotechnology*, 25(1-2), 1-30.

**Krueger, W. B., y B. J. Kolodziej (1977).** Divalent cation mobility throughout exponential growth and sporulation of *Bacillus megaterium*. *Microbios* 18:159-167.

**Küçük, Ç., Kivanç, M., Kinaci, E., y Kinaci, G. (2008).** Determination of the growth and solubilization capabilities of *Trichoderma harzianum* T1. *Biologia*, 63(2), 167.

**Kullnig-Gradinger, C. M., Szakacs, G., y Kubicek, C. P. (2002).** Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycological Research*, 106(7), 757-767.

**Kumar, R., Kumar, S., y Upadhyay, J. P. (2012).** Effect of different solid and liquid media on growth and sporulation of *Trichoderma viride*. *Advances in Applied Research*, 4(2), 131-132.

**Kushwaha, D. S. (2011).** Comparison of effect of biofertilizers on seedling growth and available nutrients in soil of sesame (*Sesamum indicum* L.) varieties. *Journal of Environmental Research and Development*, 5(3), 631-637.

- Lamba, P., Sharma, S., Munshi, G. D., y Munshi, S. K. (2008).** Biochemical changes in sunflower plants due to seed treatment/spray application with biocontrol agents. *Phytoparasitica*, 36(4), 388.
- Lara, C., Esquivel Avila, L. M., y Peñata, N. (2011).** Native phosphate solubilizing bacteria to increase the crops in the department of Cordova-Colombia. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 9(2), 114-120.
- Lemanceau, P., y Alabouvette, C. (1991).** Biological control of *fusarium* diseases by fluorescent *Pseudomonas* and non-pathogenic *Fusarium*. *Crop protection*, 10(4), 279-286.
- Lewis, J. A. (1991).** Formulation and delivery systems of biocontrol agents with emphasis on fungi. In *The rhizosphere and plant growth* (pp. 279-287). Springer, Dordrecht.
- Liang, Z. Q. (1985).** Isolation and identification of the conidial stage of *Cordyceps gunnii*. *Acta Mycologica Sinica*, 4(3), 162-166.
- Lima, L. H., Ulhoa, C. J., Fernandes, A. P., y Felix, C. R. (1997).** Purification of a chitinase from *Trichoderma sp.* and its action on *Scierotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* cell walls. *The Journal of general and applied microbiology*, 43(1), 31-37.
- López, M. D. G., y Fernández, F. U. (2000).** La conservación de cepas microbianas. *SEM@ foro*, (30), 12-16.
- Luangsa-Ard, J. J., Hywel-Jones, N. L., y Samson, R. A. (2004).** The polyphyletic nature of *Paecilomyces sensu lato* based on 18S-generated rDNA phylogeny. *Mycologia*, 96(4), 773-780.
- Luangsa-Ard, J. J., Hywel-Jones, N. L., Manoch, L., y Samson, R. A. (2005).** On the relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species. *Mycological research*, 109(5), 581-589.
- Lumsden, R. D., J. A. Lewis y D. R. Fravel (1995).** Formulation and Delivery of Biocontrol Agents for Use against Soilborne Plant Pathogens. In: *Biorational Pest Control Agents: Formulation and Delivery*, Hall, F.R. and J.W. Barry (Eds.).
- Mallidis, C. G., y Scholefield, J. (1987).** Relation of the heat resistance of bacterial spores to chemical composition and structure II. Relation to cortex and structure. *Journal of applied bacteriology*, 63(3), 207-215.

**Marín, J. I., Rodríguez, P., y Velasco, V. (2014).** Evaluación de la conservación de dos preparados comerciales formulados a base de micromicetos del género *Trichoderma*. *ST5. Producción vegetal y prácticas culturales, 1*, 725.

**Marjamaa, K., Kukkola, E. M., y Fagerstedt, K. V. (2009).** The role of xylem class III peroxidases in lignification. *Journal of Experimental Botany, 60*(2), 367-376.

**Mienda, B. S., Idi, A., y Umar, A. (2011).** Microbiological features of solid state fermentation and its applications-An overview. *Research in Biotechnology, 2*(6).

**Mioso, R., Marante, F. J. T., y De Laguna, I. H. B. (2015).** The chemical diversity of the ascomycete fungus *Paecilomyces variotii*. *Applied biochemistry and biotechnology, 177*(4), 781-791.

**Mohamed, H. A. A., Wafaa, M. H., y Attallah, A. G. (2010).** Genetic enhancement of *Trichoderma viride* to overproduce different hydrolytic enzymes and their biocontrol potentiality against root rot and white mold diseases in bean plants. *Agriculture and Biology Journal of North America, 1*(3), 273-284.

**Nawrocka, J., Malolepsza, U., Szymczak, K., y Szczech, M. (2018).** Involvement of metabolic components, volatile compounds, PR proteins, and mechanical strengthening in multilayer protection of cucumber plants against *Rhizoctonia solani* activated by *Trichoderma atroviride* TRS25. *Protoplasma, 255*(1), 359-373.

**Oborník, M., Jirku, M., y Dolezel, D. (2001).** Phylogeny of mitosporic entomopathogenic fungi: Is the genus *Paecilomyces* polyphyletic. *Canadian Journal of Microbiology, 47*(9), 813-819.

**Okuda, T., Fujiwara, A., y Fujiwara, M. (1982).** Correlation between species of *Trichoderma* and production patterns of isonitrile antibiotics. *Agricultural and Biological Chemistry, 46*(7), 1811-1822.

**Pal, K. K., y Gardener, M. B. (2006).** *Biological control of plant pathogens. The Plant Health Instructor DOI, 10.*

**Peña, V. (2002).** Efecto de Diferentes Sustratos Sobre la Producción de conidios de *Trichoderma koningii* en medio sólido. *Trabajo de Grado de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia, 148.*



**Pendland, J. C., y Boucias, D. G. (1997).** In vitro growth of the entomopathogenic hyphomycete *Nomuraea rileyi*. *Mycologia*, 89(1), 66-71.

**Prasad, R. D., y Rangeshwaran, R. (2000).** A modified liquid medium for mass production of *Trichoderma harzianum* by fermentation process. *Plant Disease Research*, 15(2), 209-211.

**Prasad, R. D., Rangeshwaran, R., Anuroop, C. P., y Phanikumar, P. R. (2002).** Bioefficacy and shelf life of conidial and chlamydospore formulations of *Trichoderma harzianum* Rifai. *Journal of Biological Control*, 16(2), 145-148.

**Rifai, M. A. (1969).** A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological papers*, 116, 1-56.

**Roumpos, C. (2005).** Ecological studies on *Paecilomyces lilacinus* strain 251 and their importance for biocontrol of plant-parasitic nematodes and environmental risk assessment. Cuvillier Verlag.

**Roussos, S., Aquiahuatl, M. A., Brizuela, M. A., Olmos, A., Rodriguez, W., y Viniegra, G. (1989).** Produccion, conservacion y viabilidad de inoculo de hongos filamentosos para las fermentaciones solidas= Production, conservation and viability of filamentous fungi inoculum for solid substrate fermentations. *Micologia neotropical aplicada*, (2), 3-17.

**Rungjindamai, N., Pinruan, U., Choeyklin, R., Hattori, T., y Jones, E. B. G. (2008).** Molecular characterization of basidiomycetous endophytes isolated from leaves, rachis and petioles of the oil palm, *Elaeis guineensis*. *Thailand. Fungal Divers*, 33, 139-161.

**Saharan, B. S., y Nehra, V. (2011).** Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci Med Res*, 21(1), 30.

**Samson, R. A. (1974).** *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. *Studies in mycology*, 6, 1-119.

**Samuels, G. J. (1996).** *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycological research*, 100(8), 923-935.

**Santos, M., y Diáñez, F. (2010).** Los antagonistas microbianos en el manejo de micosis de la parte aérea de la planta. *Organismos para el control de patógenos en los cultivos protegidos. Prácticas culturales para una agricultura sostenible*, 523-528.

**Schisler, D. A., Slininger, P. J., Behle, R. W., y Jackson, M. A. (2004).** Formulation of *Bacillus spp.* for biological control of plant diseases. *Phytopathology*, 94(11), 1267-1271.

**Sharma, S., Kashyap, S., y Vasudevan, P. (2005).** Effect of bioinoculants on biomass productivity under agroforestry systems.

**Shivanna, M. B., Meera, M. S., Kubota, M., y Hyakumachi, M. (2005).** Promotion of growth and yield in cucumber by zoysiagrass rhizosphere fungi. *Microbes and environments*, 20(1), 34-40.

**Shoresh, M., Harman, G. E., y Mastouri, F. (2010).** Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual review of phytopathology*, 48, 21-43.

**Siegel-Hertz, K., Edel-Hermann, V., Chapelle, E., Terrat, S., Raaijmakers, J. M., y Steinberg, C. (2018).** Comparative microbiome analysis of a *Fusarium* wilt suppressive soil and a *Fusarium* wilt conducive soil from the Chateaufort region. *Frontiers in Microbiology*, 9, 568.

**Sriram, S., Roopa, K. P., y Savitha, M. J. (2011).** Extended shelf-life of liquid fermentation derived talc formulations of *Trichoderma harzianum* with the addition of glycerol in the production medium. *Crop protection*, 30(10), 1334-1339.

**Stoate, C., Báldi, A., Beja, P., Boatman, N. D., Herzog, I., Van Doorn, A., y Ramwell, C. (2009).** Ecological impacts of early 21st century agricultural change in Europe—a review. *Journal of environmental management*, 91(1), 22-46.

**Sultana, F., Hossain, M. M., Kubota, M., y Hyakumachi, M. (2009).** Induction of systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to a culture filtrate from a plant growth-promoting fungus, *Phoma sp.* GS8-3. *Plant Biology*, 11(1), 97-104.

**Tello Marquina, J. C., De Cara García, M., Moreno Díaz, A., Santos Hernández, M., y Palmero Llamas, D. (2011).** El suelo como "ente vivo" y su relación con las enfermedades de las plantas. *Agricultura Ecológica en Secano*, 181-220.

**Tu, M., Hurd, C., y Randall, J. M. (2001).** Weed control methods handbook: tools & techniques for use in natural areas.

**Usha, S., y Padmavathi, T. (2013).** Effect of plant growth promoting microorganisms from

rhizosphere of *Piper nigrum* L. *Int J Pharm Bio Sci*, 4(1), 835-846.

**Van Wees, S. C., Van der Ent, S., y Pieterse, C. M. (2008).** Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current opinion in plant biology*, 11(4), 443-448.

**Vega, F. E., Jackson, M. A., y McGuire, M. R. (1999).** Germination of conidia and blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* on the cuticle of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*.

**Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y., y Valero, J. R. (2007).** Antagonistic fungi, *Trichoderma spp.*: panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, 37(1), 1-20.

**Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Valéro, J. R., y Surampalli, R. Y. (2005).** Wastewater sludge as a potential raw material for antagonistic fungus (*Trichoderma sp.*): role of pre-treatment and solids concentration. *Water research*, 39(15), 3587-3596.

**Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., y Lorito, M. (2008).** *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil biology and Biochemistry*, 40(1), 1-10.

**Vinayarani, G., Madhusudhan, K. N., y Prakash, H. S. (2019).** Induction of systemic resistance in turmeric by rhizospheric isolate *Trichoderma asperellum* against rhizome rot disease. *Journal of Plant Pathology*, 101(4), 965-980.

**Viterbo, A., Montero, M., Ramot, O., Friesem, D., Monte, E., Llobell, A., y Chet, I. (2002).** Expression regulation of the endochitinase chit36 from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203). *Current genetics*, 42(2), 114-122.

**Weselowski, B., Nathoo, N., Eastman, A. W., MacDonald, J., y Yuan, Z. C. (2016).** Isolation, identification and characterization of *Paenibacillus polymyxa* CR1 with potentials for biopesticide, biofertilization, biomass degradation and biofuel production. *BMC microbiology*, 16(1), 1-10.

**Whipps, J. M., y Lumsden, R. D. (2001).** Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. *Fungal biocontrol agents: progress, problems and potential*, 9-22.

**Yadav, R. L., Shukla, S. K., Suman, A., y Singh, P. N. (2009).** *Trichoderma* inoculation

and trash management effects on soil microbial biomass, soil respiration, nutrient uptake and yield of ratoon sugarcane under subtropical conditions. *Biology and Fertility of soils*, 45(5), 461-468.

**Zhang, Y., Chen, F. S., Wu, X. Q., Luan, F. G., Zhang, L. P., Fang, X. M., y Ye, J. R. (2018).** Isolation and characterization of two phosphate-solubilizing fungi from rhizosphere soil of moso bamboo and their functional capacities when exposed to different phosphorus sources and pH environments. *PloS one*, 13(7), e0199625.

**Zhou, L. S., Tang, K., y Guo, S. X. (2018).** The plant growth-promoting fungus (PGPF) *Alternaria sp.* A13 markedly enhances *Salvia miltiorrhiza* root growth and active ingredient accumulation under greenhouse and field conditions. *International journal of molecular sciences*, 19(1), 270.

**Zhu, N., Yang, Y., Ji, M., Wu, D., y Chen, K. (2019).** Label-free visualization of lignin deposition in loquats using complementary stimulated and spontaneous Raman microscopy. *Horticulture research*, 6(1), 1-13.