

Establecimiento de las condiciones de producción de *Trichoderma asperellum* GRBHA1 en un biorreactor de tanque agitado para el control de *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.).

Vásquez-Alarcón Álvaro¹, Valdés Duque Beatriz², Botero Botero Liliana³, Monroy Rodríguez Mario⁴

1. Estudiante de Biotecnología. Semillero SIFACS. Facultad de Ciencias de la Salud. I.U. Colegio Mayor de Antioquia.

2. Docente Biotecnología. Grupo BIOCIENCIAS. Facultad de Ciencias de la Salud. I.U. Colegio Mayor de Antioquia

3. Investigadora y docente. Líder del Grupo GRINBIO. Universidad de Medellín

4. Investigador y docente Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Instituto Politécnico Nacional – México.

Correspondencia: beatriz.valdes@colmayor.edu.co

1. Introducción

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es uno de los cultivos más importantes del mundo (1), ya que se produce en casi todos los países (2) (1). En Colombia, para el año 2013, se produjeron 412.351 t, siendo el Norte de Santander el principal departamento productor con 119.787 t, seguido por Antioquia con 47.110 t, Boyacá con 46.638 t, Santander con 42.924 t y Cundinamarca con 26.851 t. Las exportaciones de tomate para ese mismo año fueron por un valor de \$ 298.565 US dólares (3).

La producción de esta hortaliza se ve afectada por el ataque de algunas enfermedades y plagas como el ahogamiento o secadera (“damping-off”) ocasionado por *Pythium aphanidermatum* y *Rhizoctonia solani*; tizón temprano por *Alternaria solani*; tizón tardío por *Phytophthora infestans*; la pudrición basal del tallo por *Sclerotium rolfsii*; pudriciones de fruto por *Alternaria* sp., *Pythium* sp. y *Geotrichum* sp.; así como las agallas en las raíces causadas por el nematodo *Meloidogyne* sp. (4); la enfermedad de marchitez causada por *Ralstonia solanacearum* (5) y la del moho gris causada por *Botrytis cinerea* (6); además de estas, tienen especial interés las ocasionadas por *Fusarium oxysporum* (2,6–8), ya que este hongo tiene la capacidad de atacar las plantas en todos sus estados de desarrollo, ocasionando grandes pérdidas económicas (2,9).

Las especies del género *Trichoderma* son colonizadores efectivos de las raíces de las plantas, lo que les permite promover el crecimiento de la misma aumentando su densidad radicular (10–12), a su vez tienen diferentes mecanismos de acción que le permiten ser muy efectivos antagonistas de fitopatógenos como *Fusarium oxysporum* (2,9,11,13–17), por ejemplo la producción de antibióticos, micoparasitismo, competencia por nutrientes, producción de enzimas líticas e inactivación de enzimas patógenas involucradas en el proceso de infección (6,13,15).

Los biorreactores de tanque agitado son el sistema más utilizado para el crecimiento masivo de *Trichoderma* sp. Los grandes volúmenes de medio de cultivo utilizados en este proceso limitan la implementación de dichos sistemas, por lo que la selección de un medio de bajo costo es necesaria al momento de desarrollar un proceso de producción a escala de biorreactor. Además se deben tener en cuenta las condiciones de operación a las que se va a llevar a cabo el proceso, ya que factores como el pH, la temperatura y la agitación afectan de manera directa la productividad (2,11,18–20).

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue el de establecer las condiciones de producción de *Trichoderma asperellum* GRBHA1 en un biorreactor de tanque agitado para el control de *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.).

2. Materiales y métodos

2.1. Definición de las condiciones de operación en biorreactor para el cultivo de *Trichoderma asperellum* GRBHA1.

Se utilizó un biorreactor de tanque agitado de 1,5 litros con una turbina tipo Rushton con un volumen de trabajo de 1,2 L (Applikon, Schiedam, Holanda). El equipo se configuró para monitorear el perfil de pH y de oxígeno disuelto, por medio de la ayuda de electrodos de pH y oxígeno disuelto, conectados a un biocontrolador *ADI 1030* (Applikon). Se controló la temperatura por medio de una mantilla de calentamiento también conectada al biocontrolador. Las condiciones de operación del biorreactor fueron 1,2 L de medio TSM, temperatura de 30 °C, agitación de 400 rpm, tasa de aireación de 0,5 vvm (21–25).

El biorreactor se inoculó con 30 mL de un cultivo de *T. asperellum* GRBHA1, preparado en un matraz Erlenmeyer con 29 mL de medio TSM y 1 mL de un inóculo a una concentración de 6×10^4 conidias/mL, crecido durante 84 horas en agitación 150 rpm y 30 °C.

Para realizar la cinética del cultivo, se tomaron aproximadamente 20 mL por triplicado en los siguientes tiempos: 0, 24, 36, 48, 72, 96 y 168 horas. Se evaluó el crecimiento del hongo (peso seco), la esporulación y se tomaron fotografías de los cultivos (22).

2.2. Actividad antifúngica de las esporas de *T. asperellum* GRBHA1 producidas en biorreactor contra *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate.

Para determinar el efecto de las esporas de *T. asperellum* producidas en el biorreactor contra *F. oxysporum* se utilizaron los siguientes tratamientos: *F. oxysporum*, *F. oxysporum* + *T. asperellum* (a partir de caja petri), *F. oxysporum* + *T. asperellum* (a partir del biorreactor), *F. oxysporum* + Funguicida (Carbendazim – 30 cm³/100 L de agua) y un control negativo (sin inocular).

Se prepararon inóculos de 1×10^6 conidias/ml de cada uno de los hongos, *T. asperellum* y *F. oxysporum*, y se adicionó 1 ml de estos inóculos (según el tratamiento) a 500 g de suelo estéril en el que se habían sembrado plantas de tomate de 30 días. Cada uno de los tratamientos tuvo 20 réplicas y se hizo un monitoreo semanal de los síntomas de infección del patógeno (Altura de la planta, caída de las hojas, decoloración vascular y marchitez, daño radicular, peso fresco y peso seco) (2).

Cada 3 días se regaron las plantas con 80 mL de una solución Half-strength Hoagland (26) y se mantuvieron en fotoperiodo 12 horas luz, a una temperatura de 22 ± 2 °C

3. Resultados parciales

3.1. Definición de las condiciones de operación en biorreactor para el cultivo de *Trichoderma asperellum* GRBHA1.

La Figura 1 muestra el crecimiento de *T. asperellum* GRBHA1 en un biorreactor de tanque agitado de 1,5 L con 1,2 L de medio TSM.

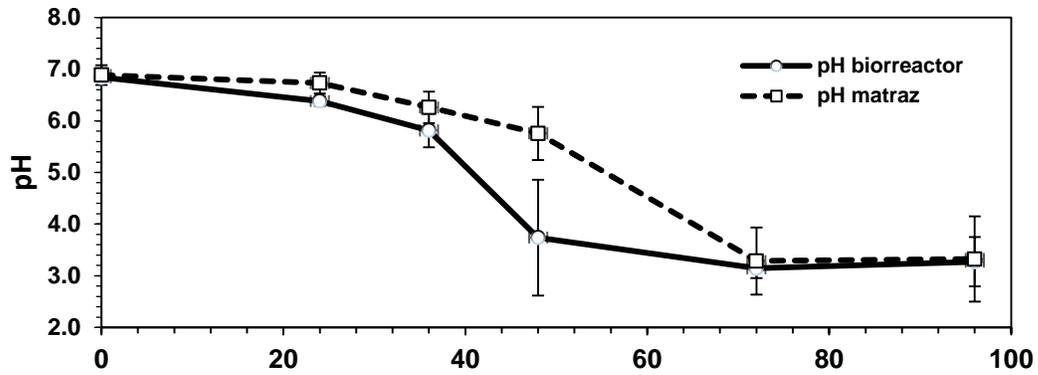


Figura 1. Crecimiento de *T. asperellum* GRBHA1 en un biorreactor de tanque agitado de 1,5 L con 1,2 L de medio TSM durante 96 horas. A) 20 mL de muestra tomados en las horas indicadas y B) contenido total del biorreactor.

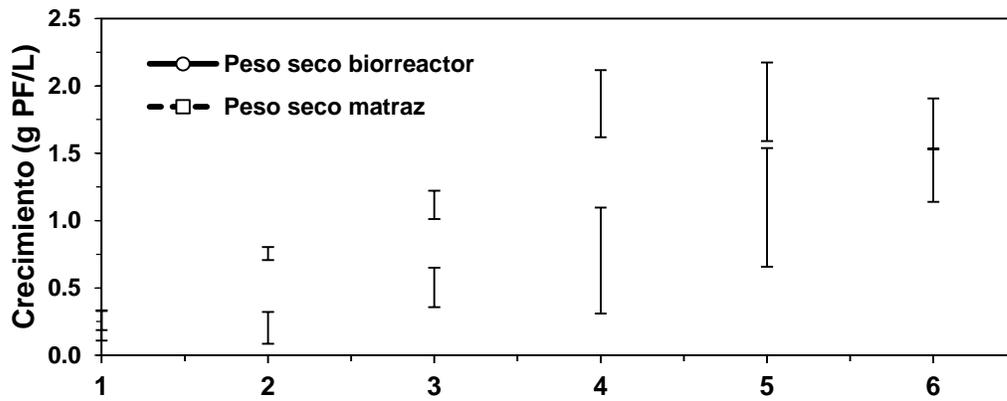
El perfil de pH fue similar al obtenido en matraces Erlenmeyer (Figura 2A), sin embargo, el pH del medio en el biorreactor bajó desde el inicio del cultivo, ya que el hongo comenzó su fase exponencial en ese momento; al final del cultivo el pH descendió hasta $3,27 \pm 0,48$.

La fase lag del cultivo fue menor a 24 horas y creció con una velocidad específica de crecimiento $\mu = 0,0407 \text{ h}^{-1}$ hasta la hora 48 (Figura 2B), donde alcanzó una producción de biomasa de $1,87 \pm 0,25 \text{ g PS/L}$, la cual es 40% mayor comparada con la obtenida en Erlenmeyer (Tabla 1). La concentración final de esporas en el biorreactor fue mayor ($6,62 \pm 6,37 \times 10^8$ Esporas/L) comparada con la obtenida en Erlenmeyer (Figura 2C).

A)



B)



C)

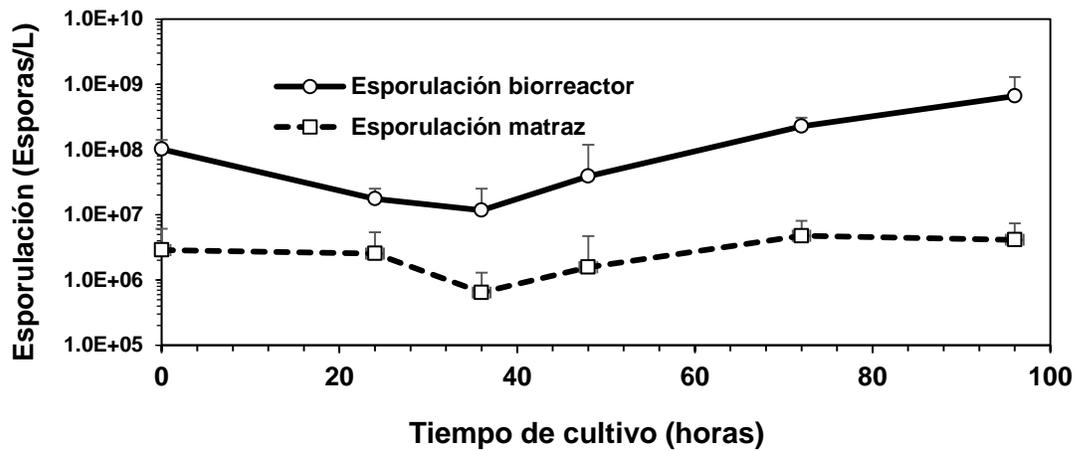


Figura 2. Comparación de la cinética de crecimiento de *T. asperellum* GRBHA1 en

matraces Erlenmeyer de 125 mL (□) contra un biorreactor de tanque agitado de 1,5 L (○). A) pH, B) peso seco y C) esporulación.

Tabla 1. Parámetros cinéticos de *T. asperellum* GRBHA1 en matraces Erlenmeyer de 125 mL y un biorreactor de tanque agitado de 1,5 L

Parámetro cinético	Matraces Erlenmeyer (125 mL)	Biorreactor (1,5 L)
Velocidad específica de crecimiento (μ)	0,016	0,040
Tiempo de duplicación (h)	43,05	17,03
Productividad (g PS/L h)	0,0128	0,0179
Velocidad de esporulación (esporas/L·h)	$6,63 \times 10^4$	$2,86 \times 10^4$

1. Casierra-Posada F, Aguilar-Avenidaño O. Calidad en frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cosechados en diferentes estados de madurez. *Agron Colomb*. 2008;26(2):300–7.
2. Akrami M, Yousefi Z. Biological Control of Fusarium wilt of Tomato (*Solanum lycopersicum*) by *Trichoderma* spp. as Antagonist Fungi. *Biol Forum*. 2015;7(1):887–92.
3. Cámara de Comercio de Bogotá. Manual tomate. 2015. p. 1–56.
4. Quiroga-Madrigal R, Rosales-Esquinca M, Rincón-Espinosa P, Hernández-Gómez E. Enfermedades cuasadas por hongos y nemátodos en el cultivo de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el municipio de Villaflores, Chiapas, México. *Rev Mex Fitopatol*. 2007;25:114–9.
5. Murthy K, Uzma F, Srinivas C. Induction of systemic resistance by *Trichoderma asperellum* against bacterial wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum*. *Int J Adv Res*. 2013;1(10):181–94.
6. Haggag W. Induction of hyperproducing chitinase *Trichoderma* mutants for efficient biocontrol of *Botrytis cinerea* on tomato and cucumber plants growing in plastic houeses. *Arab J Biotechnol*. 2002;5(2):151–64.
7. Sant D, Casanova E, Segarra G, Avilés M, Reis M, Trillas M. Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 on Fusarium wilt and water usage in carnation grown on compost-based growth medium. *Biol Control*. 2010;53:291–6.
8. Herrera H, Hurtado-Salazar A, Ceballos-Aguirre N. Estudio técnico y económico del tomate tipo cereza élite (*Solanum lycopericum* L. var. cerasiforme) bajo condiciones semicontroladas. *Rev Colomb Ciencias Hortícolas*. 2015;9(2):290–300.
9. Mahmoud H, Amgad A, Anas E, Younes Y. Characterization of Novel *Trichoderma asperellum* Isolates to Select Effective Biocontrol Agents Against Tomato *Fusarium* Wilt. *Plant Pathol J*. 2015;31(1):50–60.
10. Kotasthane A, Agrawal T, Kushwah R, Rahatkar O. In-vitro antagonism of *Trichoderma* spp . against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* and their response towards growth of cucumber , bottle gourd and bitter gourd. *Eur Jouarnal Plant Pathol*. 2015;523–43.
11. Rao K, Raju K, Ravisankar H. Cultural conditions on the production of extracellular enzymes by *Trichoderma* isolates from tobacco rhizosphere. *Brazilian J Microbiol*. 2015;47(1):25–32.
12. Lee S, Yap M, Behringer G, Hung R, Bennett JW. Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. *Fungal Biol Biotechnol*. 2016;3(7):1–14.
13. Marcello C, Stecca A, Petrofeza S, Silva R, Medes L, Ulhoa C. Expression analysis of the exo-B-1, 3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. *Microbiol Res*. 2008;165:75–81.

14. López-López N, Segarra G, Vergara O, López-Fabal A, Trillas M. Compost from forest cleanign green waste and *Trichoderma asperellum* strain T34 reduced incidence of *Fusarium circinatum* in *Pinus radiata* seedlings. Biol Control. 2016;95:31–9.
15. Waithira E. Effect of using *Trichoderma asperellum* a biocontrol agent against root knot nematodes on nodulation, galling and growght parameters of french beans in Kenya. Kenyatta University; 2014.
16. Yang P, Xu Q. The biocontrol mechanism of *Trichoderma asperellum* resistance plant pathogenic fungi. Adv Mater Res. 2013;726:4525–8.
17. Kipngeno P, Losenge T, Maina N, Kahangi E, Juma P. Efficacy of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma asperellum* against *Pythium aphanidermatum* in tomatoes. Biol Control. 2015;90:92–5.
18. Kakvan N, Heydari A, Reza H, Rezaee S. Development of new bioformulations using *Trichoderma* and *Talaromyces* fungal antagonists for biological control of sugar beet damping-off disease. Crop Prot. 2013;53:80–4.
19. Delgado-Jarana J, Pintor-Toro J, Benítez T. Overproduction of β -1,6-glucanase in *Trichoderma harzianum* is controlled by extracellular acidic proteases and pH. Biochim Biophys Acta. 2000;1481(2):289–96.
20. Wijesinghe C, Wilson R, Samarasekara J, Wijesundera R. Development of a formulation of *Trichoderma asperellum* to control black rot disease on pineapple caused by (*Thielaviopsis paradoxa*). Crop Prot. 2011;30:300–6.
21. Jourdir E, Ben F, Poughon L. Simple Kinetic Model of Cellulase Production by *Trichoderma reesei* for Productivity or Yield Maximization. Chem Eng Trans. 2012;27:313–8.
22. Syahiddin D. Spore Production of Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*: Effect of C/N ratio and glucose concentration. Rekausa Kim dan Lingkungan. 2007;6(1):35–40.
23. Shibuya H, Magara K, Nojiri M. Cellulase production by *Trichoderma reesei* in fed-batch cultivation on soda-anthraquinone pulp of the Japanese cedar. For For Prod Res Inst. 2015;14(1):29–35.
24. Bailey MJ, Tähtiharju J. Efficient cellulase production by *Trichoderma reesei* in continuous cultivation on lactose medium with a computer-controlled feeding strategy. Appl Microbiol Biotechnol. 2003;62:156–62.
25. Cabezas E. Obtención de un extracto enzimático con actividad lacásica por fermentación líquida del hongo *Pleurotus ostreatus* en un medio con bagazo de maíz a escala laboratorio para decoloración de colorantes textiles. Escuela Politécnica Nacional; 2014.
26. Alicia R, Moreno C-, Guadalupe M, David R, Angel M, Mendoza M-, et al. Induced protection by *Rhizophagus intraradices* against *Fusarium* wilt of tomato. 2013;