

# PRODUCCION DE BIOMASA VIABLE DE *Trichoderma harzianum* BAJO DIFERENTES ESQUEMAS Y CONDICIONES DE FERMENTACION

Celia Flores<sup>1</sup>, Mainul Hassan<sup>1</sup>, Gabriel Corkidi<sup>2</sup>, Enrique Galindo<sup>1</sup> y Leobardo Serrano-Carreón<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología. Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico, Universidad Nacional Autónoma de México  
Apdo. Post. 510-3, Cuernavaca, 62250 Morelos, MEXICO  
Fax: (52) 777-3 13 88 11, e-mail: [celia@ibt.unam.mx](mailto:celia@ibt.unam.mx)

**Palabras clave:** condiciones de cultivo, viabilidad, *Trichoderma harzianum*

**Introducción.** En procesos biotecnológicos, la viabilidad es un factor que determina importantemente la producción de metabolitos y es particularmente crítica cuando la biomasa se usa como agente de control biológico (1). La determinación de viabilidad en hongos filamentosos es compleja debido a su naturaleza pluricelular.

En este trabajo se evaluó la influencia de parámetros nutricionales y de proceso sobre el crecimiento y la viabilidad del micelio de *Trichoderma harzianum* en cultivo sumergido. La viabilidad se evaluó con una técnica (2) que combina una tinción fluorescente (con diacetato de fluoresceína) y análisis de imágenes.

**Metodología.** Los cultivos se desarrollaron en biorreactores de 14 L, equipados con turbinas Rushton (D/T = 0.3); 200 rpm. El control de pH a 5.6 se realizó con NaOH 2N, 0.5 vvm de aireación (inicial) con un difusor de punto. El medio de cultivo "base" estuvo constituido de glucosa (30 g/L), sulfato de amonio (0.94 g/L) y sales minerales. Estas condiciones se modificaron para incrementar la concentración de biomasa (tabla 1). La viabilidad se evaluó como en (2). La biomasa se cuantificó por peso seco. La glucosa residual se determinó con un método enzimático. La concentración de amonio se cuantificó por el método del indofenol (3).

**Tabla 1.** Esquema de procesos evaluados en términos de crecimiento y la viabilidad de *Trichoderma harzianum*.

Proceso	Modificación al medio de cultivo "base"	Parámetros de proceso modificados
A		pH= 3
B	A + Ext. de levadura (1.5 g/L)	
C	B + 10 g/L glucosa (72 h)	D/T = 0.5, Control de pH (5.6) con NH <sub>4</sub> OH, difusor de anillo, incremento de agitación a 350 rpm (72 h)

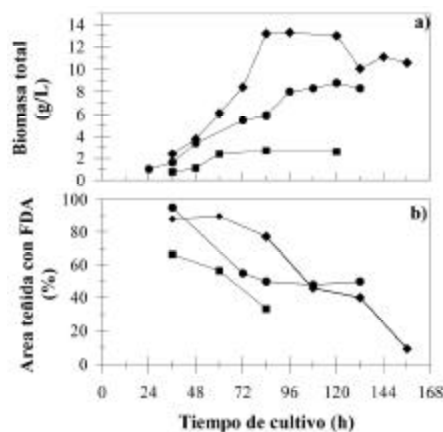
**Resultados y Discusión.** El crecimiento de *Trichoderma harzianum* como función del tipo de proceso se presenta en la Fig. 1a. La mayor concentración de biomasa (13 g/L) se obtuvo en el cultivo alimentado (proceso C), mientras que en el proceso con medio rico (proceso B) y con medio mínimo (proceso A) sólo se alcanzaron 9 y 2.5 g/L de biomasa, respectivamente. De manera análoga, la viabilidad que presentó el micelio generado en los diferentes procesos fue significativamente diferente (Fig. 1b). Los cultivos realizados a

pH de 5.6 (B y C) presentaron una viabilidad superior al 80 % a las 36 h de cultivo mientras que en el cultivo a pH 3 (proceso A), la viabilidad fue sólo del 60 %. Los análisis de glucosa y nitrógeno inorgánico demostraron que hasta las 60 horas de cultivo no existieron limitaciones en estos nutrientes (datos no presentados), por lo que las diferencias en viabilidad entre el proceso A y los procesos B y C solo pueden atribuirse al pH del medio de cultivo. Por otra parte, el uso de impulsores más grandes (mejor transferencia de oxígeno) y la adición de nutrientes (glucosa y NH<sub>4</sub>OH) permiten explicar las diferencias (de las 60 a las 84 h de cultivo) entre la viabilidad del cultivo alimentado (proceso C) y la del cultivo en medio rico (proceso B). Posteriormente, un exceso en la concentración de amonio

causó una inhibición del crecimiento en el cultivo alimentado (proceso B).

## Proceso

- ! A
- ? B
- ? C



**Figura 1.** Biomasa (a) y viabilidad (b) del micelio de *T. harzianum* cultivado en diferentes esquemas de proceso.

**Conclusiones.** Las condiciones de cultivo afectan importantemente la viabilidad del micelio de *T. harzianum*. El pH del medio de cultivo resultó ser un parámetro crítico en la viabilidad del hongo. Con el mejoramiento en el mezclado del caldo de fermentación y la adición de glucosa y amonio al medio de cultivo, se logró mantener la viabilidad arriba del 70 %, durante la fase exponencial de crecimiento del hongo.

**Agradecimientos.** CONACyT (proyecto Z-001).

**Bibliografía.**

1. Chet, I. (1987). In: *Innovative Approaches to Plant Disease Control*. Chet I, Wiley, New York. pp. 137-160.
2. Hassan, M., Corkidi, G., Galindo, E., Flores, C. and Serrano-Carreón, L. (2002). *Biotechnol. Bioeng.* 80 (6): 677-684.
3. Kaplan, A. (1965). *Std . Met. Clin. Chem.* 5: 245-256.

*Trichoderma* –aplication, mode of action and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi

Accurate and rapid viability assesment of *Trichoderma harzianum* using fluorescence-based digital image analysis.

Urea nitrogen and urinary ammonia