

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO
USFQ**

Colegio de Ciencias e Ingeniería

**Evaluación de métodos de encapsulación de esporas de
Trichoderma en presencia de ácido húmico para mantener su
actividad.**

María del Carmen Elejalde Miranda

Ingeniería Química

Trabajo de integración curricular presentado como requisito para la
obtención del título de
Ingeniera Química

Quito, 23 de diciembre de 2019

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS E INGENIERÍA

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

Evaluación de métodos de encapsulación de esporas de *Trichoderma* en presencia de ácido húmico para mantener su actividad.

María del Carmen Elejalde Miranda

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Antonio León, Ph.D

Firma del profesor:

Nombre del profesor, Título académico

José Alvarez Barreto, Ph.D

Firma del profesor:

Nombre del profesor, Título académico

Daniela Almeida, Ph.D

Firma del profesor:

Quito, 23 de diciembre de 2019

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: María del Carmen Elejalde

Código: 00125946

Cédula de identidad: 1724912868

Lugar y fecha: Quito, 23 diciembre de 2019

Resumen

Los biofertilizantes son formulaciones que generalmente contienen un microorganismo vivo, ya sea bacterias, hongos o nematodos y un portador adecuado junto con aditivos, un ejemplo es la unión de *Trichoderma* y ácido húmico. La preservación de microorganismos es de gran importancia, por lo cual se han desarrollado métodos de encapsulación en materiales biopolímeros como el alginato y quitosano, que son materiales que poseen permeabilidad, es decir un alto grado de porosidad. En el presente estudio se prueban encapsulados con almidón y PVA (alcohol polivinílico), donde al encapsular a la *Trichoderma spp.* en materiales de almidón de yuca, el microorganismo consume este material como fuentes de carbono, por otro lado al modificar el almidón se tiene al microorganismo protegido completamente, pero es un material poco soluble por la propiedades mecánicas adquiridas después del tratamiento de oxidación. Se experimentaron con películas de almidón oxidado y PVA (alcohol polivinílico) al 2% y 4% respectivamente, donde se tiene un material soluble ($75,48 \pm 0,076$) %. y que encapsula al microorganismo protegiéndolo del ambiente. El tiempo de duración de las esporas de *Trichoderma* encapsuladas en presencia de ácido húmico es de 5 semanas.

Palabras clave: Biofertilizante, *Trichoderma*, ácido húmico, almidón oxidado, alcohol polivinílico PVA, solubilidad

ABSTRACT

Biofertilizers are formulations that normally contain a living microorganism, marine bacteria, fungi or nematodes and a suitable carrier together with additives, an example is the union of *Trichoderma* and humic acid. The preservation of microorganisms is of great importance, which is why encapsulation methods have been developed in biopolymer materials such as alginate and chitosan, which are materials that developed permeability, that is, a high degree of porosity. In the present study they are tested encapsulated with starch and PVA (polyvinyl alcohol), where when encapsulating *Trichoderma* spp. In cassava starch materials, the microorganism consumes this material as carbon sources, on the other hand when modifying the starch, the microorganism is completely protected, but it is a material that is not very soluble due to the mechanical properties acquired after the oxidation treatment. They were experimented with films of oxidized starch and PVA (polyvinyl alcohol) at 2% and 4% respectively, where there is a soluble material (75.48 ± 0.076)%. and that encapsulates the microorganism protecting it from the environment. The duration of *Trichoderma* spores encapsulated in the presence of humic acid is 5 weeks.

Keywords: biofertilizer, *Trichoderma*, humic acid, oxidized starch, PVA polyvinyl alcohol

TABLA DE CONTENIDO

I.	Introducción	10
II.	Metodología	12
	2.1. Análisis del efecto de ácido húmico sobre la <i>Trichoderma</i>	12
	2.1.1. Preparación de medios de PDA con diferentes concentraciones de ácido húmico	12
	2.1.2. Inoculación de <i>Trichoderma</i> , en medios sólidos.....	12
	2.1.3. Mediciones del crecimiento radial	13
	2.2. Encapsulado de <i>Trichoderma</i> en material polimérico	13
	2.2.1. Método de oxidación del almidón.....	13
	2.2.2. Extracción de esporas líquidas	13
	2.2.3. Preparación de soluciones encapsulantes de almidón nativo de yuca y almidón oxidado	14
	2.2.4. Preparaciones de soluciones encapsulantes de PVA (alcohol polivinílico y almidón oxidado)	14
	2.2.5. Pruebas de solubilidad del material.....	15
	2.2.6. Encapsulación de esporas de <i>Trichoderma</i> spp.	16
	2.2.7. Microscopia electrónica de barrido (SEM)	16
	2.3. Viabilidad de <i>Trichoderma</i> encapsulada en presencia de ácido húmico	16
	2.3.1. Formulaciones de <i>Trichoderma</i> encapsulada en presencia de ácido húmico	16
	2.3.2. Cultivo de formulaciones en medios específicos para <i>Trichoderma</i> (TSM)	17
	2.3.3. Inoculación de las formulaciones	17
	2.3.4. Análisis Estadístico	17
III.	Resultados y Discusión.....	18
	3.1. Pruebas de inhibición de crecimiento de <i>Trichoderma</i> en presencia de ácido húmico.	18
	3.2. Encapsulados de <i>Trichoderma</i>	20
	3.2.1. Diseño experimental para el estudio de las concentraciones de almidón oxidado y almidón nativo de yuca.	20
	3.2.2. Diseño experimental para el estudio de concentraciones de almidón oxidado y PVA (alcohol polivinílico).....	23
	3.2.3. Solubilidad de las películas de almidón oxidado	24
	3.3. Viabilidad de <i>Trichoderma</i> encapsulada en presencia de ácido húmico	25
	26
IV.	Conclusiones.....	27

V. Referencias	28
VI. Anexos	31
6.1. Componentes para realizar medios específicos para <i>Trichoderma</i>	31
Tabla 4.-Componentes del medio TSM.....	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Componentes y rangos de concentración de las películas de almidón para encapsulado de <i>Trichoderma</i> spp.	14
Tabla 2.- Componentes y rangos de concentración de las películas de almidón oxidado y PVA, para encapsulado de <i>Trichoderma</i> spp.....	15
Tabla 3.-Formulaciones de <i>Trichoderma</i> en presencia de ácido húmico	16
Tabla 4.-Componentes del medio TSM.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.-Porcentaje de inhibición de Trichoderma en presencia de ácido húmico al 5to día	19
Figura 2.- Trichoderma con ácido húmico a diferentes concentraciones, A 100g, B 150g y C 200g	19
Figura 3.- Encapsulado con almidón oxidado, A concentración 2%, B al 3% y C al 5%	21
Figura 4.-Encapsulado con almidón oxidado, A concentración 2%, B al 3%.....	22
Figura 5.- Encapsulado de Trichoderma en 2% de almidón oxidado y 4% de PVA.....	23
Figura 6.- Porcentaje de solubilidad de cada una de las composiciones poliméricas	24

I. Introducción

El empleo de agroquímicos en la agricultura tuvo importantes consecuencias tanto para el medio ambiente, como para la seguridad alimentaria y con ello la salud humana, por la persistencia de contaminantes químicos (Grageda-cabrera, Díaz-franco, José, & José, 2012). Con el fin de satisfacer tanto las necesidades de los suelos como la de los seres humanos, se ha desarrollado productos ecológicos. Los biofertilizantes son formulaciones que generalmente contienen un microorganismo vivo, ya sea bacterias, hongos o nematodos y un portador adecuado junto con aditivos, un ejemplo es la unión de *Trichoderma* y ácido húmico (Jurić, Šegota, & Vinceković, 2019). Este tipo de productos son aplicados con la finalidad de promover el crecimiento al aumentar la disponibilidad de nutrientes primarios para la planta huésped (Sociedad et al., 2010)

El hongo *Trichoderma* es un microorganismo utilizado para controlar hongos fitopatógenos en la agricultura, pero algunas cepas tienen una acción bioestimulante (López-bucio, Pelagio-flores, & Herrera-estrella, 2015). El mecanismo de fitoestimulación, se realiza a través de la comunicación de nivel de mosaico con los sistemas de raíces y brotes, ya que libera en la rizósfera auxinas, péptidos volátiles y otros metabolitos activos, que promueven la ramificación de la raíz y la absorción de nutrientes, lo que aumenta el crecimiento y el rendimiento de las plantas (López-bucio et al., 2015). El ácido húmico o el extracto de la materia orgánica, es conocido como un biofertilizante, ya que intervienen en procesos metabólicos de las plantas tales como fotosíntesis, respiración, síntesis protética y adsorción de nutrientes, debido a sus grupos funcionales carboxilos e hidroxifenólicos; también tienen un efecto positivo sobre el crecimiento de los microorganismos (Russo, Lugo, Arreola, & Rango, 2016)

Las formulaciones de biofertilizantes eficientes poseen un material portador, el cual preserva o mantiene organismos vivos en condiciones viables durante la etapa de

almacenamiento y transporte del producto, los mismos que deben mantener sus propiedades funcionales después de la aplicación (Jurić et al., 2019). En este caso tanto el ácido húmico como el hongo *Trichoderma* son utilizados como promotores de crecimiento. Al momento de estar en contacto crean una formulación única, en la cual actúa el microorganismo en el control biológico de plagas protegiendo las raíces y promoviendo el crecimiento, mientras que el ácido húmico ayuda a la fijación de fuentes nutrición para la población microbiana y de la planta (Adzmi, Meon, Musa, & Yusuf, 2012). Uno de los problemas al realizar este tipo de formulaciones en una presentación comercial sólida, se ve enfocada en la pérdida de viabilidad de las esporas de *Trichoderma* sólidas, es decir que comienzan a morir, esto se debe a las condiciones desfavorables a las cuales se ve sometido dicho hongo. Las características químicas que posee el ácido húmico como su pH y bajo porcentaje de humedad ocasionan que la *Trichoderma* pierda vitalidad y muera, ya que este tipo de hongos utilizados para el control de fitopatógenos se desarrolla en un medio con pH que oscila entre 4-9, con una humedad de 70-80%, y en cuanto a la salinidad, se puede presentar o no crecimiento al ser expuesto a determinadas concentraciones de sales (Kogo et al., 2017).

Este problema podría verse mitigado a través de la encapsulación del hongo, mejorando su viabilidad y la liberación controlada en campo (Jurić et al., 2019). El uso de polímeros naturales tales como el alginato y quitosano, que se caracterizan por tener propiedades tales como a la biocompatibilidad, estabilidad química y mecánica; teniendo permeabilidad oxígeno y difusión de nutrientes debido a la porosidad del material, ocasionando que este tipo de material no sea propicio para recubrir a la *Trichoderma* para que pueda estar en contacto con el ácido húmico (Lim & Ahmad, 2017). El almidón es uno de los materiales, que debido a su estructura molecular sirve como fuente de alimento para los microorganismos (Tarabukin et al., 2017).

El almidón al someterse a un tratamiento adquiere tanto grupos carbonilos como carboxilos, ocasionando que los microorganismos no puedan digerirlo con facilidad y siendo un material propicio para la encapsulación, además que es considerado un material compacto, ya que su tamaño de porosidad es muy pequeño y no permite el intercambio de nutrientes (Fariz Adzmi, 2012).

En la presente investigación, se establece el desarrollo de un método de encapsulación para formulaciones sólidas de *Trichoderma* spp en presencia de ácido húmico, el mismo que tenga un porcentaje alto de solubilidad para su aplicación en campo, de esta manera esta manera que producto contribuirá al establecimiento de estrategias que permitan dinamizar el sector agropecuario que basa su producción en tecnologías amigables con el medio ambiente.

II. Metodología

2.1. Análisis del efecto de ácido húmico sobre la *Trichoderma*

2.1.1. Preparación de medios de PDA con diferentes concentraciones de ácido húmico

Los medios se realizaron con 25 g/L PDA marca Difco™ (Papa Dextrosa Agar), con una mezcla de ácido húmico a diferentes concentraciones que varían desde 100g/L hasta 200g/L.

2.1.2. Inoculación de *Trichoderma*, en medios sólidos

La cepa de *Trichoderma* utilizada fue *Trichoderma* spp (*T-43*), la cual se encuentra en el Banco de Microorganismos del Laboratorio de Biotecnología Agrícola. Para realizar el cultivo de *Trichoderma* spp se tomaron discos de 5 mm de diámetro, y se procedió a inocular la cepa en una caja Petri en agar PDA con diferentes concentraciones de ácido húmico. Las cajas con el inóculo se llevaron a incubación a 28,5°C, por 6 días.

2.1.3. Mediciones del crecimiento radial

El crecimiento radial del microorganismo se realizó desde el primer día de haber realizado la inoculación. Con una regla de calibración, se midió la esporulación de la *Trichoderma* spp cada día hasta su total esporulación.

2.2. Encapsulado de *Trichoderma* en material polimérico

2.2.1. Método de oxidación del almidón

El almidón fue modificado con el método de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) propuesto por Zhang en el 2009, con breves modificaciones. Para el proceso de oxidación se realizó una solución de almidón comercial de almidón de yuca al 2% p/v, la cual fue gelatinizada durante una hora a 80 °C. Se enfrió la solución a temperatura ambiente, consecutivamente se prepara una solución al 5% de peróxido de hidrógeno, la cual se vierte en la solución viscosa de almidón en un lapso de una hora, con protección de la luz, y manteniendo el pH de reacción en 7. Se dejó precipitar al almidón colocando un volumen igual de etanol al 96% v/v. El secado del almidón oxidado se efectuó a 40°C durante aproximadamente 72 horas, de manera que se obtuvieron películas de dicho material, las mismas que fueron sometidas a un proceso de trituración en un molino de café para obtener pequeñas partículas. (Zhang, Zhang, Wang & Wang 2009).

2.2.2. Extracción de esporas líquidas

Se realizaron diluciones de la *Trichoderma* spp. cepa T34, existente en el laboratorio de Biotecnología Agrícola de la USFQ, la cual se encontró en las cajas Petri, cultivada en medios de PDA (papa agar dextrosa). Se recolecta el líquido obtenido de las diluciones. Para conocer la concentración de esporas se realizó un conteo en la cámara de Neubauer. Las suspensiones de esporas se almacenaron brevemente en refrigeración para su posterior encapsulación.

2.2.3. Preparación de soluciones encapsulantes de almidón nativo de yuca y almidón oxidado

Se probaron materiales encapsulantes a base de almidón nativo de yuca y almidón oxidado. Las soluciones se prepararon en diferentes concentraciones.

Tabla 1.- Componentes y rangos de concentración de las películas de almidón para encapsulado de *Trichoderma* spp.

Concentración [%P/V]	
Almidón Nativo	Almidón Oxidado
2	2
3	3
5	5

Se mezclaron los dos tipos de almidón tanto nativo (AN) como oxidado (AO) en una solución al 2% y 3%, en las siguientes proporciones: AN:AO de 25:75, 50:50, y 75:25. Después se colocaron en moldes para someter a un secado de 40 °C, por 36 horas en el horno, obteniendo películas finas del encapsulado.

2.2.4. Preparaciones de soluciones encapsulantes de PVA (alcohol polivinílico y almidón oxidado)

Se procedió a realizar pruebas con alcohol polivinílico PVA tipo 17-88, es soluble en agua a temperatura ambiente, posee un grado de hidrólisis de 88%. Con el fin de tener un material con un porcentaje alto de solubilidad, se realizaron soluciones en combinación con almidón oxidado almidón previamente ya tratado con la metodología propuesta por Zhang et al. 2009.

Tabla 2.- Componentes y rangos de concentración de las películas de almidón oxidado y PVA, para encapsulado de *Trichoderma* spp.

Componente	Rango de concentración [% p/v]
Almidón oxidado (AO)	2
Alcohol polivinílico (PVA)	2-4
Relación AO:PVA	2:2, 2:4

Tras haber mezclado tanto las soluciones se procede a colocarlas en un molde y se puso a secar dicho material a 40 °C durante 36 horas, obteniendo películas finas del material encapsulante.

2.2.5. Pruebas de solubilidad del material

Las pruebas de solubilidad son un parámetro útil, ya que nos ayudan a conocer la relación que existe entre el soluto y el solvente a través de la interacción de fuerzas intermoleculares, por lo cual se realizaron estos ensayos con el fin de tener un material que tenga mayor porcentaje de solubilidad. De manera que se utilizó el método de Thakur establecido en el año 2017, donde se tomaron muestras de las películas de almidón oxidado al 2% y las películas que tenían la combinación con alcohol polivinílico (PVA), se cortaron en tiras de 10 x 20 mm, las mismas que fueron sometidas a 24h de secado a 110 °C. Posteriormente se colocaron 50 mL de agua destilada y se agitó a 25 rpm por 24h a temperatura ambiente. Por último se coloca la película no disuelta a 110 °C durante un período de 24h o hasta alcanzar estabilidad en el peso (Thakur et al., 2017).

El porcentaje de solubilidad se obtuvo a través de la ecuación 1

$$\%S = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad (1)$$

Donde P_i es el peso inicial y P_f es el peso final de la muestra

2.2.6. Encapsulación de esporas de *Trichoderma* spp.

La encapsulación de esporas de *Trichoderma* spp. se realizó con todas las soluciones propuestas en las Tabla 1 y **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, las mismas que fueron autoclavadas por 20 min a una temperatura de 121 °C. Se dejaron enfriar las soluciones a temperatura ambiente y se colocaron las esporas de *Trichoderma* spp, en una concentración 1.45×10^9 esporas por cada ml de solución. Se colocaron las soluciones en cajas Petri y se dejaron secar por 72 horas a una temperatura de 35 °C, después se obtuvieron láminas finas del material encapsulante conjuntamente con el microorganismo.

2.2.7. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Se tomaron las películas encapsuladas de *Trichoderma*, con los materiales de almidón nativo, oxidado y las combinaciones de almidón oxidado y alcohol polivinílico PVA. Se tomó una muestra de cada uno y se colocó en el microscopio.

2.3. Viabilidad de *Trichoderma* encapsulada en presencia de ácido húmico

2.3.1. Formulaciones de *Trichoderma* encapsulada en presencia de ácido húmico

Las esporas encapsuladas de *Trichoderma* se ponen en contacto con el ácido húmico, al igual de las esporas de *Trichoderma* sin encapsular para observar la viabilidad, como se explicó en la sección 2.1. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestran las condiciones experimentales utilizadas.

Tabla 3.-Formulaciones de *Trichoderma* en presencia de ácido húmico

Formulación	Porcentaje [% p/p]	Control
<i>Trichoderma</i> encapsulada con ácido húmico	3-97%	Blanco
<i>Trichoderma</i> sin encapsular con ácido húmico	3-97%	Blanco
<i>Trichoderma</i> sin encapsular	100%	Control positivo
<i>Trichoderma</i> encapsulada	100%	Control positivo
Material de encapsulado con ácido húmico	3-97%	Control negativo

2.3.2. Cultivo de formulaciones en medios específicos para *Trichoderma*

(TSM)

Para el cultivo las formulaciones realizadas se utilizaron medios TSM (*Trichoderma* Specific Medium), con la composición mostrada en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** (Y. Elad, et al. 1981)

2.3.3. Inoculación de las formulaciones

La inoculación de las formulaciones se realiza una vez a la semana. Primero se preparan tubos de ensayo con 9 mL, y se pesa un gramo de cada formulación, se realizan diluciones hasta 10^9 . Se siembran las inoculan las cajas Petri con las diluciones a la 3, 5, 7 y 9 por triplicado. Se realizaron conteos de las unidades formadoras de colonias (UFC) a los 15 días, donde se encontró crecimiento en cada uno de los tratamientos.

2.3.4. Análisis Estadístico

Cada medición se realizó por triplicado y se reporta el promedio y la desviación estándar. Diferencias estadísticas se establecieron con un intervalo de confianza de 95% ($p < 0,05$).

III. Resultados y Discusión

En el presente trabajo se plantea crear un sistema de encapsulación para *Trichoderma*, que pueda protegerle en presencia del ácido húmico en presentaciones comerciales. Tanto la *Trichoderma* como el ácido húmico estarían así combinados en una formulación de biofertilizante que ayude a mejorar las características de los suelos, fomentando mayor nutrición para las plantas. Estos dos materiales estarían en estado sólido, y, en el momento de su aplicación, estos se disolverán en una solución acuosa para luego ser asperjados en el campo. Es por esto que es importante que ambos componentes estén en forma de gránulos solubles. Por lo tanto, se requiere tener materiales encapsulantes que tengan un alto porcentaje de solubilidad para la liberación de esporas al momento de su aplicación.

3.1. Pruebas de inhibición de crecimiento de *Trichoderma* en presencia de ácido húmico.

En el presente trabajo, fue importante, primeramente, corroborar el efecto antagónico del ácido húmico sobre el hongo. Al someter a la *Trichoderma* a diferentes concentraciones de ácido húmico, se pudo observar el efecto negativo que causa este a la viabilidad de dicho microorganismo. En la Figura 1 se puede observar el porcentaje de inhibición a las diferentes concentraciones de ácido húmico, las cuales varían de 100 a 200g/L.

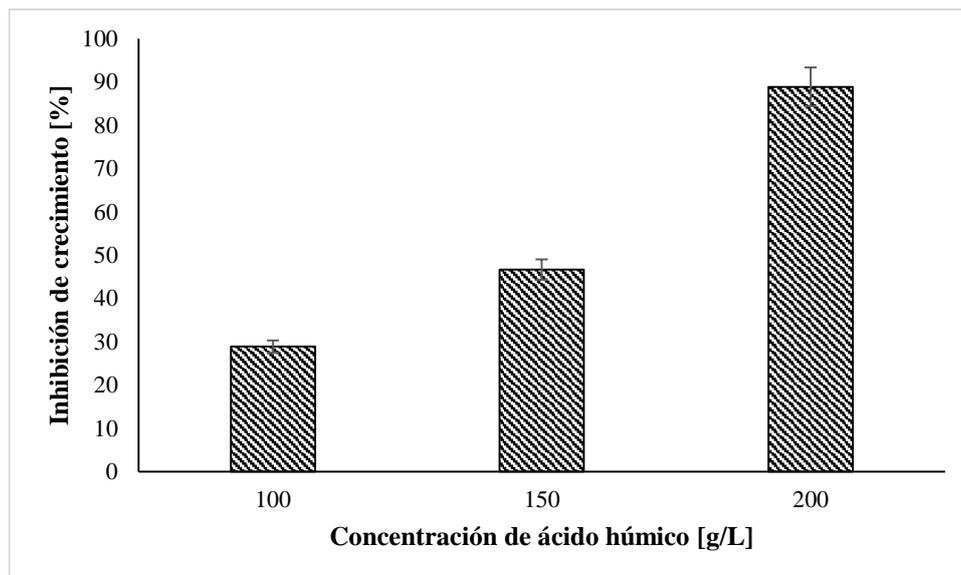


Figura 1.-Porcentaje de inhibición de *Trichoderma* en presencia de ácido húmico al 5to día de cultivo en medio PDA.

El ácido húmico inhibe el crecimiento de la *Trichoderma* a medida que se aumenta la concentración; es decir, que a mayor concentración de ácido húmico menor es la actividad de las esporas de *Trichoderma*.

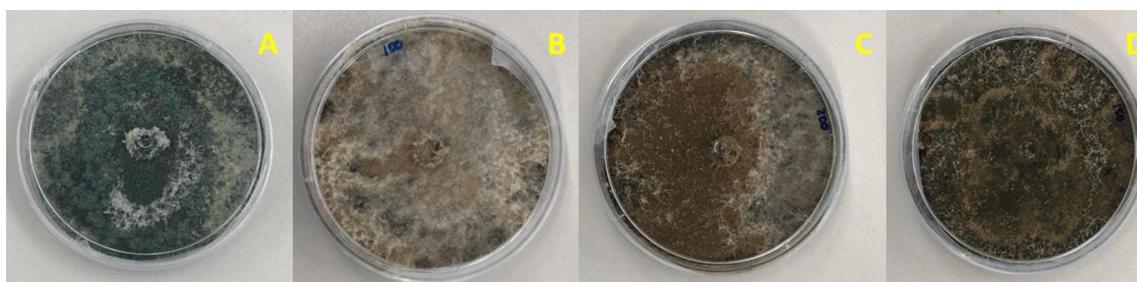


Figura 2.- *Trichoderma* con ácido húmico a diferentes concentraciones, A) sin ácido húmico, B) 100g/L, C) 150g/L y D) 200g/L

En la *Figura 2*, se observa cómo afecta el ácido húmico al crecimiento de la *Trichoderma*, a una mayor concentración de ácido húmico disminuye la vitalidad de dicho organismo, secando las esporas dándoles un color café.

El ácido húmico es conocido como un biopolímero multifuncional amorfo, el cual está compuesto por cientos de componentes orgánicos tales como carbohidratos y anillos

aromáticos condensados, los mismos que son capaces de sustituir a los grupos fenólicos, carboxilos, oxhidrilos y metilos; para la extracción de este material se utilizan hidróxido de potasio o sodio, con el fin de tener una mayor solubilidad. (López-salazar, González-cervantes, Vázquez-alvarado, & Olivares-sáenz, 2014).

Sus propiedades químicas se enfocan en su disolución a pH básico de 9, y posee un porcentaje de humedad del 10%. De manera que, al someter a la *Trichoderma*, en al contacto con el este compuesto, pierde viabilidad, al secarse las esporas, ocasionando que estas pierdan vitalidad. Este tipo de microorganismo pese a sobrevivir a condiciones desfavorables, crece y se desarrolla rápidamente a los 5 días al estar en un ambiente propicio, como es una área con un gran porcentaje de humedad y fuentes de carbono cercanas para su alimentación. Estos microorganismos generalmente prefieren pH ácido de 4.5-5, y baja conductividad de 2 dS/m, es decir que se desarrolla en sitios no salinos, y en una suspensión de bióxido de carbono en la atmósfera (Romero Arenas, Huerta Lara, Damián Huato, Domínguez Hernández, & Arellano Victoria, 2009)

3.2. Encapsulados de *Trichoderma*

La preservación de microorganismos a través de la encapsulación podría asegurar la viabilidad e integridad morfológica, fisiológica y genética de un cultivo. A través de materiales biopoliméricos tales como el almidón y alcohol polivinílico (PVA), se busca tener un encapsulado que mantenga la viabilidad de la *Trichoderma*.

3.2.1. Diseño experimental para el estudio de las concentraciones de almidón oxidado y almidón nativo de yuca.

Las concentraciones tanto de almidón nativo como almidón oxidado van desde 2 a 5%, donde se inoculó esporas de *Trichoderma*, de la cepa T34 existente en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola-USFQ. Las películas de almidón nativo con

Trichoderma, muestran que el microorganismo consume las fuentes de carbono que posee el material ocasionando que tanto conidios como hifas crezcan fuera del material de encapsulamiento.

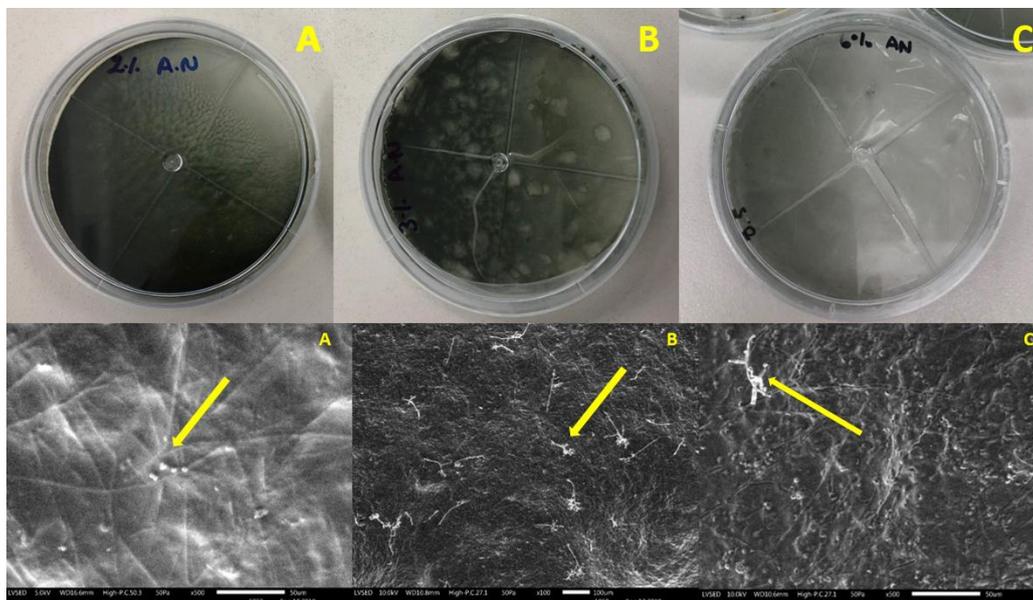


Figura 3.- Fotos y micrografías electrónicas del encapsulado con almidón nativo de yuca comercial, a concentraciones de A) 2%, B) 3% y C) 5% p/v

En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, se observan encapsulados a base de almidón nativo donde se inocularon 1.45×10^9 cepas/mL de solución de almidón. Al ser incubados a 35°C , se observó cambios de tonalidad en los recubrimientos, al tener un verde más intenso se muestra crecimiento de las esporas de *Trichoderma* sobre la superficie del encapsulado. Al tener baja concentración de almidón nativo, mayor fue el crecimiento del microorganismo. Esto se debió a que este hongo es un microorganismo que posee necesidades nutricionales, las cuales son conocidas por degradar sustratos muy complejos como almidón, pectina, celulosa y entre otros, a través de un gran complejo enzimático que comprende amilasas, pectinasas, celulasas y quitinasas, entre otras (Gato Cárdenas, 2010). A través de las micrografías se puede observar que hay crecimiento tanto de esporas como hifas (flechas), en los tres

recubrimientos, corroborando el uso del almidón por parte del hongo como fuente de carbono.

En las películas realizadas con almidón oxidado se observa que hay menor crecimiento del microorganismo fuera del material utilizado para encapsular, en comparación con las muestras con almidón nativo.

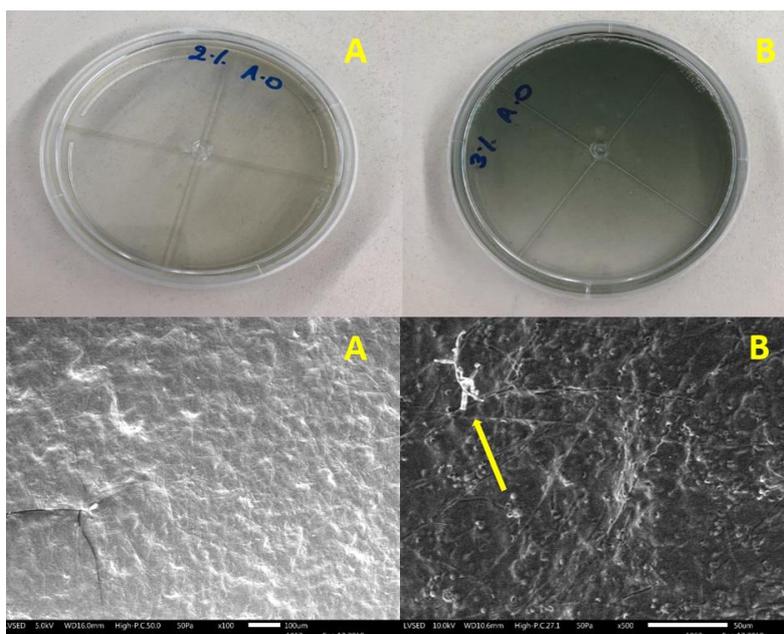


Figura 4.- Fotos y micrografías electrónicas del encapsulado con almidón oxidado, a concentraciones de A) 2% y B) 3% p/v

La Figura 4 muestra una diferencia significativa en el cambio de tonalidad, indicativo de cambio en tasas de crecimiento. En los encapsulados al 2% no se observó un color verde intenso, y al someterlo a pruebas de microscopía, se demostró que no hubo crecimiento significativo fuera del encapsulado. Por otro lado, se encontró que, en el recubrimiento al 3%, presentó un color verde oscuro fuerte relacionado con un alto grado de crecimiento del hongo, corroborado por la microscopía.

Los encapsulados a base de almidón oxidado no muestran un crecimiento abundante de esporas de *Trichoderma*. Esto se debió, posiblemente, a las propiedades

mecánicas como menos permeable y películas cristinas más flexibles. También existe un aumento en grupos funcionales tales como los carbonilos y carboxilos presentes en el material, esto puede ser una de las razones por las cuales el microorganismo no pueda digerir con facilidad al material como una fuente de carbono (Bonilla R., 2013)

3.2.2. Diseño experimental para el estudio de concentraciones de almidón oxidado y PVA (alcohol polivinílico)

El alcohol polivinílico es conocido como un material con un alto grado de solubilidad, por lo cual se considero como un material propicio para la encapsulación del microorganismo. Al mezclar tanto el almidón oxidado con el PVA en las concentraciones que se muestran en la Tabla 2, obteniendo los siguientes resultados.

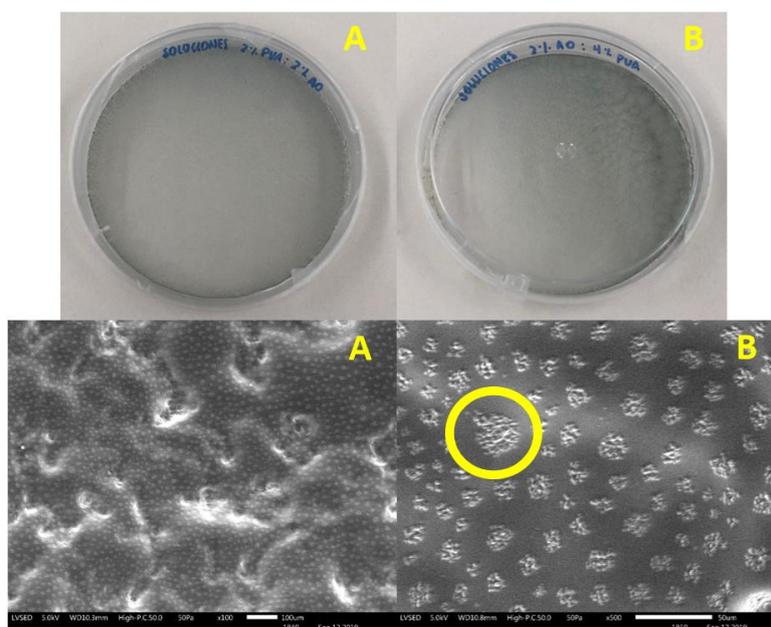


Figura 5.- Fotos y micrografías electrónicas del encapsulado con almidón oxidado AO y alcohol polivinílico (PVA), a concentraciones de A) 2-2%, B) 2-4% p/v.

En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se presenta dos encapsulados a diferentes concentraciones de PVA. Se observó que, tanto en el encapsulado de 2% AO y 2% PVA, como para la combinación 2% AO y 4% PVA, se tuvo

un aglomerado de partículas que pueden ser del material o una acumulación de esporas de *Trichoderma*. Por otro lado, no se observaron diferencias marcadas de tonalidad entre los dos encapsulados. A través de las micrografías, se corroboró que no existió un crecimiento significativo del hongo, al no observarse esporas ni hifas del microorganismo fuera del recubrimiento. A partir de los resultados obtenidos, se observa que los materiales para la encapsulación de esporas de *Trichoderma*, son idóneas en las dos concentraciones.

A partir de los resultados obtenidos, se observa que los materiales para la encapsulación de esporas de *Trichoderma*, son idóneas en las dos concentraciones.

3.2.3 Solubilidad de las películas de almidón oxidado

La **Figura 6** se muestra los porcentajes de solubilidad de diferentes formulaciones poliméricas encapsulantes.

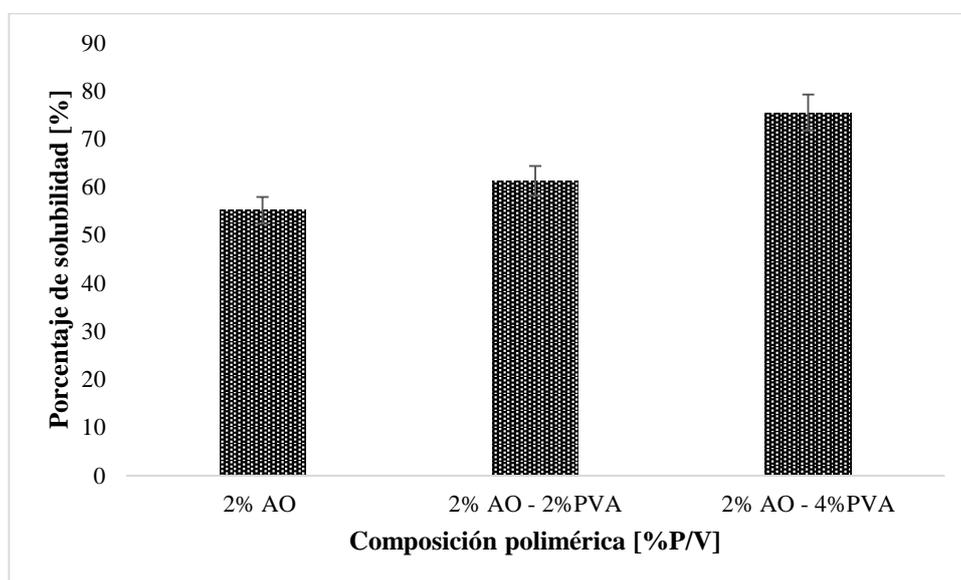


Figura 6.- Porcentaje de solubilidad de diferentes composiciones poliméricas utilizadas para la encapsulación de *Trichoderma*

Al 2% de almidón oxidado se tuvo una solubilidad de $55,14\% \pm 0,023$, significativamente menor a la presentada por los materiales que poseen PVA, con $61,33\% \pm 0,091$ al tener un 2% de dicho material, y $75,48\% \pm 0,076$ al 4% del mismo. De manera que, al tener una concentración mayor de PVA, la solubilidad del material aumenta. Esto se debe a la estructura química simple, dinámica y polar, la cual posee afinidad por las moléculas de agua y otro tipo de solventes que sean capaces de interactuar a través de puentes de hidrógeno (Lopretti & Olazabal, 2014).

Basado en los resultados de SEM y solubilidad, se puede decir que el material más apropiado para encapsular *Trichoderma* spp fue la combinación de almidón oxidado con PVA en un porcentaje de 2% - 4%, respectivamente, puesto que se observó que la mayoría de las esporas se encontraban recubiertas por el material, sin crecimiento en el exterior. Además, esta formulación tuvo un índice alto de solubilidad en comparación con los otros materiales.

3.3. Viabilidad de *Trichoderma* encapsulada en presencia de ácido húmico

En la Figura 7 se muestran los resultados obtenidos tras someter a las esporas encapsuladas con 2% de almidón oxidado y 4% de PVA, se tomaron las formulaciones explicadas en la Tabla 4.

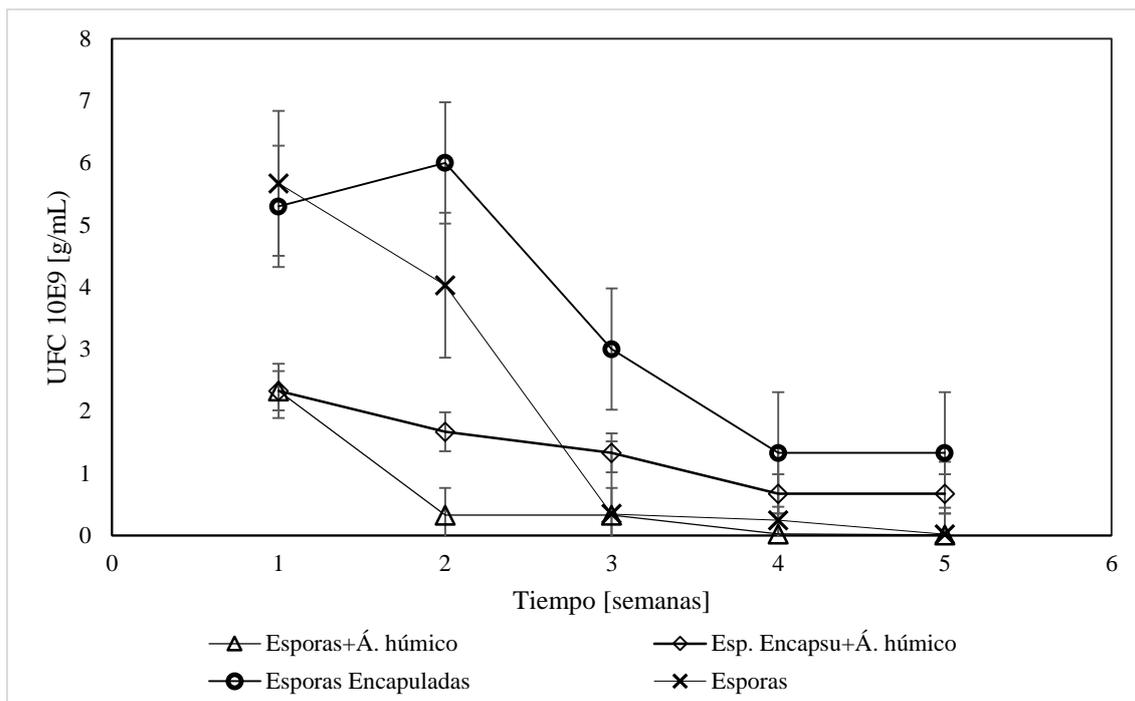


Figura 7.- Viabilidad de las esporas encapsuladas en presencia de ácido húmico

Los resultados que muestra la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** son hasta la semana 5, donde se observa la viabilidad de las esporas encapsuladas en presencia de ácido húmico. Todas las formulaciones comienzan a perder viabilidad a medida que transcurre el tiempo, se observa el efecto negativo que posee el ácido húmico sobre la *Trichoderma* desde la primera semana. En la semana 4 se nota una diferencia estadística significativa entre los otros grupos experimentales, ya que al comparar los datos obtenidos se aprecia que las esporas encapsuladas poseen un índice más alto de viabilidad comparado con las esporas encapsuladas sometidas al estrés que ocasiona el ácido húmico.

Las esporas encapsuladas en presencia de ácido húmico a partir de la semana 3 tienden a una viabilidad mayor que aquellas sin encapsular, de manera que se observa los efectos negativos que ocasiona el polvo de ácido húmico a las esporas de *Trichoderma*. De manera que al observar los resultados de la **¡Error! No se encuentra el origen de la**

referencia., se observa que las esporas encapsuladas logran mantener en un cierto nivel la viabilidad del microorganismo en presencia del ácido húmico.

IV. Conclusiones

La *Trichoderma spp.* cepa T34, al ser sometida a grandes concentraciones de ácido húmico disminuye su viabilidad, ya que las esporas del microorganismo se secan hasta morir. Para mitigar este problema y obtener un biofertilizante que satisfaga las necesidades del suelo, se estableció como material propicio para el encapsulado el almidón oxidado al 2% y alcohol polivinílico al 4%, donde se inocularon $1,45 \times 10^9$ esporas de *Trichoderma* por cada ml de solución. Se obtuvieron encapsulados donde no se muestra crecimiento del microorganismo fuera del recubrimiento y con un alto grado de solubilidad ($75,48 \pm 0,076$) %, significativamente mayor a otras formulaciones. Al someter a los encapsulados en presencia de ácido húmico se observa que se mantiene logra mantener un cierto nivel de viabilidad del microorganismo.

La *Trichoderma* tanto en almidón oxidado como en PVA, mantiene la viabilidad de las esporas hasta la semana 5, por lo cual se considera que el material utilizado para la encapsulación fue bueno pero no mantuvo la actividad del microorganismo. Se propone darle un tratamiento previo a la *Trichoderma*, al liofilizarla o colocarla persevantes para que aumente su tiempo de vida en percha, y de esta manera encapsular al microorganismo en estos materiales.

Por otro lado también se puede realizar un doble encapsulado para asegurar que las esporas de *Trichoderma* se encuentren protegidas al están en contacto con el ácido húmico. Se debe tomar en cuenta que los materiales que se utilicen para la encapsulación deben tener un tamaño de poro demasiado pequeño y un alto grado de solubilidad.

V. Referencias

- Acosta, Harold A, Villada, Héctor S, & Prieto, Pedro A. (2006). Envejecimiento de Almidones Termoplásticos Agrios de Yuca y Nativos de Papa por Microscopía de Fuerza Atómica. *Información tecnológica*, 17(3), 71-78.
- Adzmi, F., Meon, S., Musa, M. H., & Yusuf, N. A. (2012). *Preparation , characterisation and viability of encapsulated Trichoderma harzianum UPM40 in alginate-montmorillonite clay*. 29(3), 205–210.
<https://doi.org/10.3109/02652048.2012.659286>
- Gato Cárdenas, Y. (2010). Métodos de conservación y formulación de trichoderma harzianum rifai. *Fitosanidad*, 14(3), 189–195.
- Grageda-cabrera, O. A., Díaz-franco, A., José, J., & José, P. (2012). *Impacto de los biofertilizantes en la agricultura * Impact of biofertilizers in agriculture Resumen*. 3, 1261–1274.
- Jurić, S., Šegota, S., & Vinceković, M. (2019). Influence of surface morphology and structure of alginate microparticles on the bioactive agents release behavior. *Carbohydrate Polymers*, 218(April), 234–242.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.096>
- Kogo, T., Yoshida, Y., Koganei, K., Matsumoto, H., Watanabe, T., Ogihara, J., & Kasumi, T. (2017). Production of rice straw hydrolysis enzymes by the fungi *Trichoderma reesei* and *Humicola insolens* using rice straw as a carbon source. *Bioresource Technology*, 233, 67–73.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.075>
- Lim, G. P., & Ahmad, M. S. (2017). Development of Ca-alginate-chitosan microcapsules for encapsulation and controlled release of imidacloprid to control dengue outbreaks. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 56, 382–393.

<https://doi.org/10.1016/j.jiec.2017.07.035>

López-salazar, R., González-cervantes, G., Vázquez-alvarado, R. E., & Olivares-sáenz, E. (2014). *Metodología para obtener ácidos húmicos y fulvicos y su caracterización mediante espectrofotometría infrarroja * Humic and fulvic acid extraction method and characterization by infrared spectrophotometry Resumen Introducción*. 1397–1407.

López-bucio, J., Pelagio-flores, R., & Herrera-estrella, A. (2015). *Scientia Horticulturae* Trichoderma as biostimulant : exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Scientia Horticulturae*, 196, 109–123.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.043>

Lopretti, M. I., & Olazabal, L. (2014). *Microencapsulación De Microorganismos Kluyveromyces Marxianus En Diferentes Sistemas Y Materiales. Evaluación De Su Actividad Biológica En La Producción De Bioetanol a Partir De Materiales Lignocelulósicos. Revista Iberoamericana de Polímeros Volumen Iberoam. Polim*, 15(151), 55–65. Retrieved from
<http://www.ehu.es/reviberpol/pdf/Ene14/lopretti.pdf>

M, R. V. (2013). *Yuca Sobre Propiedades Mecánicas Y Effect of Cassava Starch Oxidation Over Mechanical and Thermal Properties of Biodegradable Films Efeito Do Amido De Mandioca Oxidação*. 11(1), 208–218.

Odukkathil, G., & Vasudevan, N. (2013). *Toxicity and bioremediation of pesticides in agricultural soil*. 421–444. <https://doi.org/10.1007/s11157-013-9320-4>

Romero Arenas, O., Huerta Lara, M., Damián Huato, M., Domínguez Hernández, F., & Arellano Victoria, D. (2009). Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *Revista Colombiana de*

Biotecnología, 11(2), 143–151.

- Russo, R., Lugo, J., Arreola, O., & Rango, O. A. (2016). Efecto de un bioestimulante húmico extraído del raquis de banano (Pinzote) sobre el crecimiento de plántulas de banano (Musa AAA subgrupo “Cavendish” clon ‘Gran enano). *Agronomía Mesoamericana*, 6, 130. <https://doi.org/10.15517/am.v6i0.24818>
- Sociedad, R. De, Desarrollo, C., Dagoberto, A., Bojórquez, A., Gutiérrez, C. G., Báez, J. R. C., ... Ximhai, R. (2010). *Ra Ximhai*. 6, 51–56.
- Thakur, R., Saberi, B., Pristijono, P., Stathopoulos, C. E., Golding, J. B., Scarlett, C. J., ... Vuong, Q. V. (2017). Use of response surface methodology (RSM) to optimize pea starch–chitosan novel edible film formulation. *Journal of Food Science and Technology*, 54(8), 2270-2278. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2664-y>
- Tarabukin, D. V., Torlopov, M. A., Shchemelinina, T. N., Anchugova, E. M., Shergina, N. N., Istomina, E. I., & Belyy, V. A. (2017). Biosorbents based on esterified starch carrying immobilized oil-degrading microorganisms. *Journal of Biotechnology*, 260(June), 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.08.024>
- Vincekovic, M., Jalšenjak, N., & Topolovec-, S. (2016). *Encapsulation of Biological and Chemical Agents for Plant Nutrition and Protection : Chitosan / Alginate Microcapsules Loaded with Copper Cations and Trichoderma viride Encapsulation of Biological and Chemical Agents for Plant Nutrition and Protection : C*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02879>
- Y. Elad, I. Chet I, y I. Henis (1981) “A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* sp. from soil”, *Phytoparasitica*, 71, 59-67.
- Zhang, S., Zhang, Y., Wang, X. and Wang, Y. High Carbonyl Content Oxidized Starch Prepared by Hydrogen Peroxide and Its Thermoplastic Application. *Starch/Stärke*, 61, 2009, p. 646–655.

VI. Anexos

6.1. Componentes para realizar medios específicos para *Trichoderma*

Tabla 4.-Componentes del medio TSM

Componentes	Concentración [g/l]
Nitrato de calcio	1
Nitrato de potasio	0,25
Sulfato de magnesio	0,25
Cloruro de calcio	1
Ácido cítrico	0,05
Sacarosa	2
Agar	20