

Caracterización del producto de la fermentación sólida de *trichoderma harzianum* Rifai (A-34) sobre bagazo de caña

Characterization of the product of *trichoderma harzianum* rifai (a-34) solid fermentation on sugar cane bagasse

MSc. Siannah M. Mas Diego^I, Ing. Lilian Torres-Brizuela^I, DrC.Clara Esther Martínez-Manrique^I, Dr C. Iván Leandro Rodríguez-Rico^{II}, Ing. Esli Lobaina-Lobaina^{III}

I Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado, Universidad de Oriente. Cuba. siannah@uo.edu.cu

II Universidad Central de Las Villas "Martha Abreu". Cuba

III Universidad Máximo Gómez Báez, Ciego de Ávila. Cuba

Resumen

El hongo *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) es usado en Cuba como una alternativa viable para la sustitución de productos químicos que representan un alto costo en la producción de hortalizas. Para lograr una vida en estante más prolongada se desarrollan formulaciones sólidas del hongo, para lo que es necesario realizar la separación y concentración de los conidios que se van a formular. Esta investigación realizada en el Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado, en Santiago de Cuba, caracterizó el producto de la fermentación sólida sobre bagazo de caña de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34). Se realizó una clasificación de tamaño de las partículas del producto de la fermentación sobre soporte sólido de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) crecido bajo la influencia de campos magnéticos y se obtuvo para la muestra control un diámetro promedio por clases de tamaño de 0,688 mm; una densidad aparente de las partículas de 0,155 g/cm³; una concentración de conidios en la bandeja de 2,14·10⁹ conidios/ g de sustrato. En el caso de la muestra tratada magnéticamente se obtuvo diferencias

significativas para la densidad aparente de las partículas ($0,163 \text{ g/cm}^3$) y la concentración de conidios en la bandeja ($2,40 \cdot 10^{11}$ conidios/g de sustrato).

Palabras clave: trichoderma harzianum , clasificación de tamaño, bagazo de caña, campo magnético, fermentación en fase sólida.

Abstract

The fungus *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) is used in Cuba as a viable alternative in order to substitute chemical products that represent a high cost in the production of vegetables. To achieve longer shelf-life solid formulations of the fungus are developed, for which it is necessary to develop the separation and concentration of the fungus' conidia. At the National Center of Applied Electromagnetism in Santiago de Cuba it was characterized the product of solid fermentation on *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) on sugar cane bagasse as a substrate. A particle size classification of the solid fermentation product of *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) was performed and an average diameter per size class of $0,688 \text{ mm}$ was found. An apparent particle density of $0,155 \text{ g/cm}^3$; conidia concentration in the tray was $2,14 \cdot 10^9$ conidia/g of substrate. In the case of the fungus grown under the influence of magnetic fields, significant differences were obtained for the apparent density of the particles ($0,163 \text{ g/cm}^3$) and the conidia concentration in the tray ($2,40 \cdot 10^{11}$ conidia/g of substrate).

Keywords: trichoderma harzianum , size classification, sugar cane bagasse, magnetic field, solid state fermentation.

INTRODUCCION

Trichoderma harzianum Rifai es uno de los medios biológicos utilizados en Cuba para el control de patógenos fúngicos en hortalizas. Aproximadamente el 90% de los productos registrados mundialmente para el control de hongos fitopatógenos está representado por *Trichoderma* [1] . Las formulaciones se presentan fundamentalmente en forma de polvos humedecibles, polvo seco, formulaciones en aceite y encapsulados que contienen el hongo [2] . El tiempo recomendado para el almacenamiento sobre polvo de arroz en Cuba no sobrepasa los seis meses a $23-25 \text{ }^\circ\text{C}$ [3].

Una propuesta tecnológica a escala industrial debe considerar la separación y concentración de los conidios del hongo para garantizar una vida en estante más prolongada. Sin embargo, en algunos casos las operaciones de acabado encarecen el proceso y no resultan factibles económicamente [4]. Durante estos procesos el grado de

pureza del polvo extraído puede ser muy variable, pero debe cumplir con las exigencias del formulado.

Los conidios obtenidos sobre sustratos sólidos presentan una mayor tolerancia frente al estrés abiótico medioambiental [5; 6]. Para separar los conidios a partir de estos sustratos se ha empleado cernidores manuales, lo que permite obtener un polvo con determinado tamaño de partícula según el tamaño del poro de la malla. Este método consume mucho tiempo y no garantiza uniformidad de partículas físicas, además de formar aerosoles de conidios con riesgo respiratorio para el personal expuesto [3].

Para producciones a pequeña escala y sustratos relativamente homogéneos (ej. hongos esporulados sobre granos como el arroz), se han desarrollado equipos como el Mycoharvester MH-1 (Cabi, Inglaterra) [7]. Estos equipos se basan en la separación mediante la clasificación de partículas gruesas por fluidización y un ciclón dual para separar las partículas grandes de los conidios, que son recogidas en una bandeja debajo del ciclón. Existe una versión para mayores escalas, MH3, basada en el mismo principio [8].

En el caso de *Trichoderma* creciendo sobre bagazo de caña, la separación de los conidios resulta más compleja. Los hongos filamentosos se desarrollan estrechamente ligados al sustrato, por lo que una parte de la biomasa permanecerá junto al sustrato residual [9]. Además, esta especie se caracteriza por la producción de enzimas celulolíticas que le permiten aprovechar el bagazo de caña no solo como soporte sino también como fuente de nutrientes, incidiendo esta característica en la degradación del sustrato [10].

Se ha reportado que la aplicación de un campo magnético a microorganismos y en especial a hongos del género *Trichoderma* tiene un efecto estimulador en el crecimiento micelial y la formación de conidios [11; 12]. Igualmente, se reporta un incremento en la producción de enzimas celulolíticas [13]. Estos resultados permiten inferir que existirán diferencias en la distribución de tamaño del producto fermentado debido a una mayor degradación del sustrato por el hongo tratado magnéticamente.

MATERIALES Y METODOS

El proceso experimental se desarrolló en la sala de fermentaciones del Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA), en la Universidad de Oriente, Santiago de Cuba.

Obtención y conservación de las cepas: *Trichoderma harzianum* Rifai cepa A-34, proveniente del banco de cepas del Instituto Nacional de Sanidad Vegetal (INISAV), La Habana; conservada en el Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal, Santiago de Cuba y fortalecida mediante su enfrentamiento con *Fusarium sp* para conservar su patogenicidad. Se utilizó como medio de conservación Papa Dextrosa Agar (PDA). A este medio se le ajustó el pH a 5,4 y se esterilizó durante 20 min en una autoclave a 1 atm y 121 °C. Las cepas se incubaron a una temperatura entre 28 y 30 °C.

Fermentación sólida: Se realizó en vasos de precipitado de 2000 mL con 100 g de sustrato en cada uno, replicados cuatro veces. Como sustrato se empleó bagazo de caña

(86 % w/w) proveniente del CAI "Paquito Rosales", zafra 2014 – 2015, enriquecido con cabecilla de arroz (14 % w/w). Se empleó un tamaño de partícula (-3 +0,85) mm de bagazo previamente esterilizado durante 40 min a 1 atm y 121 °C. Se ajustó la humedad del medio al 30 %. El proceso de fermentación sólida del hongo fue de 14 días.

Tratamiento magnético: Se aplicó con un imán de campo constante y no homogéneo modelo IP 1000-12 [14]. Se trataron las muestras con un campo magnético estático de 80 mT durante 15 minutos [15] .

Procesamiento estadístico de los datos: Se utilizó el software STATGRAPHICS Centurion XV, Versión 15.2.14. En todos los casos la prueba empleada fue la comparación de medias mediante un ANOVA simple con $p < 0,5$.

Análisis por tamizado: Se tomaron cuatro tamices de mallas ASTM (EEUU) 10, 14, 16 y 50 lo que permitió obtener cinco clases de tamaños: (+2 mm), (- 2 +1,41 mm), (-1,41 +1,19 mm), (-1,19 +0,30 mm) y (-0,30 mm). Se pesó cada tamiz, la bandeja colectora y la muestra a tamizar en una balanza técnica (Sartorius BS-2202S, Alemania). Se depositó una muestra de 30 g en el tamiz superior y se puso el conjunto de tamices en la tamizadora (MLW, Alemania) durante 30 min. Una vez terminado el tamizado, se pesó nuevamente cada uno de los tamices y la bandeja colectora con la fracción retenida y se obtuvo la curva de distribución acumulativa [16] . Se seleccionó este método con respecto al de la característica de las clases pues si se cambian las clases de tamaño no se modifican los resultados, lo que resulta conveniente para arribar a conclusiones sobre este estudio.

Determinación de la concentración de conidios por conteo directo: Se realizó mediante el conteo en Cámara de Neubauer en microscopio (N-800M, China) con aumento de 40 X, según el procedimiento recomendado para el control de calidad en producciones de *Trichoderma* [17].

Determinación de la densidad de sólidos: Se utilizó el procedimiento descrito en la norma ASTM D854-10 empleando picnómetros de Gay-Lussac de 50 mL (tres unidades por cada muestra) [18] pesados en una balanza analítica (Sartorius BP-124S, Alemania). Se realizaron los experimentos a una temperatura de 26 °C.

Se calcula la densidad relativa del sólido con respecto a la del agua a la temperatura de ensayo, G_T (adimensional):

$$G_T = \frac{M_3 - M_2}{(M_3 - M_2) + (M_1 - M_4)} \quad (1)$$

donde:

M₁: masa del picnómetro enrasado con agua (fluido de referencia) (g)

M₂: masa del picnómetro con agua hasta la mitad de su capacidad, sin tapa y seco. (g)

M₃: masa del picnómetro con agua hasta la mitad de su capacidad, y con la muestra de sólido dentro, sin tapa y seco (g).

M₄: masa del picnómetro enrasado con agua y con la muestra de sólido dentro

Luego se determinó la densidad relativa del sólido a 20 °C, G (adimensional):

$$G = G_T \cdot K \quad (2)$$

donde:

K: factor definido como el cociente entre la densidad del agua a la temperatura del ensayo y la densidad del agua a 20 °C. Se refiere un valor de 0,99858 para 26 °C en la norma correspondiente [18].

La densidad del sólido, D (g/cm³), se obtiene mediante:

$$D = G \cdot \rho_{H_2O}(20^\circ C) \quad (3)$$

donde:

$\rho_{H_2O}(20^\circ C)$: Densidad del agua a 20 °C (g/cm³).

RESULTADOS Y DISCUSION

Al cabo de 14 días, el producto de la fermentación en fase sólida de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) posee gran heterogeneidad, dada por el bagazo, cabecilla de arroz, micelio y polvo de conidios que componen la muestra. Se percibe el crecimiento del microorganismo en forma de masa de aspecto algodonoso (figura 1). El color de las colonias cambió gradualmente de blanco a blanco-verdoso y, hacia el final de la fermentación, a un color verde oscuro opaco, lo que coincide con lo reportado en la literatura [19].



Fig. 1 Fermentación en fase sólida de *Trichoderma harzianum* (A-34) sobre bagazo de caña y cabecilla de arroz a) experimento control, b) experimento con tratamiento magnético.

Los hongos filamentosos, como *Trichoderma*, crecen por la repetida interacción de módulos para alcanzar un patrón de ramificación [20]. La hifa tubular que emerge de la espora se elonga en la punta formando nuevas ramificaciones. Las ramificaciones continúan bifurcándose para formar una red porosa tridimensional de hifas, lo que se conoce como micelio. Estas características morfológicas, únicas de los hongos filamentosos son apropiadas para colonizar y penetrar el sustrato sólido en la búsqueda de nutrientes [21].

Las enzimas celulolíticas segregadas por el hongo le permiten aprovechar el bagazo de caña como fuente de carbono para el desarrollo de sus procesos metabólicos [22], siendo el sustrato degradado en el proceso (figura 2).



Fig. 2 Producto de la fermentación en fase sólida de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) sobre bagazo de Caña y cabecilla de arroz al cabo de 14 días.

Desde el punto de vista macroscópico no se observan diferencias significativas entre el crecimiento del hongo no tratado y el expuesto al campo magnético.

Clasificación de tamaño de las partículas producto de la fermentación en fase sólida de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) sobre bagazo de caña y cabecilla de arroz

En la tabla 1 se presenta la característica acumulativa de las partículas obtenidas de la fermentación sólida de *T. harzianum* Rifai (A-34) para el experimento control. Con estos resultados se obtuvo la gráfica mostrada en la figura 3.

Tabla 1
Característica acumulativa del producto de la fermentación en fase sólida de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) sobre bagazo de caña y cabecilla de arroz

| Clase | Clase de tamaño (mm) | Peso de la clase, $P_i(g)$ | Fracción en peso de la clase, Δx_i | Diámetro promedio de la clase $D_{pi}(mm)$ | Fracción acumulada del cernido, X_i | Fracción acumulada del retenido, Y_i | $\Delta x_i/D_{pi}$ |
|--------------|----------------------|----------------------------|--|--|---------------------------------------|--|---------------------|
| 1 | +2 | 1,80 | 0,060 0 | 2,680 | 1,000 0 | 0,000 0 | 0,022 4 |
| 2 | -2 +1,41 | 4,60 | 0,153 3 | 1,705 | 0,940 0 | 0,060 0 | 0,089 9 |
| 3 | -1,41 +1,19 | 2,70 | 0,090 0 | 1,300 | 0,786 7 | 0,213 3 | 0,069 2 |
| 4 | -1,19 +0,30 | 19,00 | 0,633 3 | 0,745 | 0,696 7 | 0,303 3 | 0,850 1 |
| 5 | -0,30 | 1,90 | 0,063 3 | 0,150 | 0,063 3 | 0,936 7 | 0,422 2 |
| Total | | 30,00 | | | | | 1,453 9 |

A partir de los datos calculados en la tabla 1, se determinó que el diámetro promedio de partícula del producto de la fermentación en fase sólida de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) sobre bagazo de caña y cabecilla de arroz por el método acumulativo es de 0,688 mm. Estos resultados evidencian un aumento del diámetro promedio de partículas con respecto al diámetro de 0,565 mm reportado para el bagazo de caña siguiendo este mismo método [23]. En el presente estudio el crecimiento del hongo provoca aglomeraciones de las partículas de bagazo lo que incide en el aumento del diámetro promedio de las mismas.

A partir de la tabla 1 se obtuvo el gráfico de la distribución de tamaños de las partículas (figura 3).

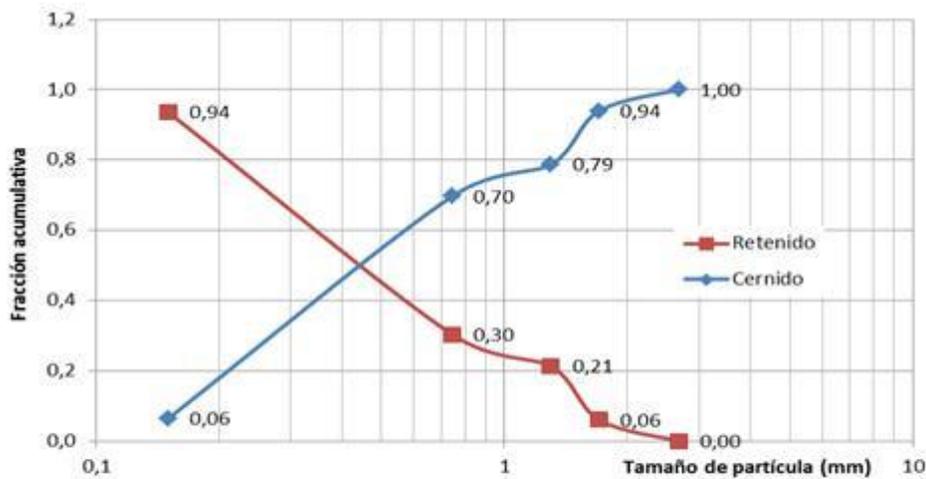


Fig. 3 Característica acumulativa de las partículas obtenidas del producto de la fermentación en fase sólida sobre bagazo de caña y cabecilla de arroz de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34).

Según la figura 3, las curvas del producto cernido y retenido se cortan en un punto donde el tamaño de las partículas es de 0,45 mm, siendo este valor el diámetro promedio de la muestra analizada mediante el método de la ecuación de distribución diferencial. Los resultados obtenidos resultan similares con los descritos para la clasificación de partículas de bagazo de caña [24], teniendo en cuenta que la muestra analizada se conformó con un tamaño de partícula inicial para el bagazo de caña menor de 3 mm. Además, el resultado de la fermentación no solo está conformado por bagazo, aunque este constituye el 86 % de la misma, sino que contiene además otros componentes como la cabecilla de arroz, micelio y el polvo de los conidios resultado del crecimiento y reproducción del *T. harzianum* Rifai (A-34) en el sustrato.

La diferencia entre el tamaño promedio obtenido por el método de distribución acumulativa y el método de la ecuación de distribución diferencial está dada por el completamiento de la serie de tamices empleadas para la clasificación de tamaño del producto de fermentación sólida de *T. harzianum* Rifai (A-34). Ambas funciones son coincidentes solamente en el límite cuando el diámetro de las partículas tiende a cero [16].

La característica acumulativa de las partículas de *T. harzianum* Rifai (A-34) obtenidas de la fermentación sólida para la muestra tratada con campo magnético de 80 mT durante 15 min se obtuvo en forma similar (tabla 2) y el gráfico resultante se muestra en la figura 4.

Tabla 2
Característica acumulativa del producto de la fermentación en fase sólida sobre bagazo de caña y cabecilla de arroz de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34)

| Clase | Clase de tamaño (mm) | Peso de la clase, P_i (g) | Fracción en peso de la clase, Δx_i | Diámetro promedio de la clase D_{pi} (mm) | Fracción acumulada del cernido, X_i | Fracción acumulada del retenido, Y_i | $\Delta x_i/D_{pi}$ |
|--------------|----------------------|-----------------------------|--|---|---------------------------------------|--|---------------------|
| 1 | +2 | 2,30 | 0,076 7 | 2,680 | 1,000 0 | 0,000 0 | 0,028 6 |
| 2 | -2 +1,41 | 5,00 | 0,166 7 | 1,705 | 0,923 3 | 0,076 7 | 0,097 8 |
| 3 | -1,41 +1,19 | 2,70 | 0,090 0 | 1,300 | 0,756 7 | 0,243 3 | 0,069 2 |
| 4 | -1,19 +0,30 | 18,00 | 0,600 0 | 0,745 | 0,666 7 | 0,333 3 | 0,805 4 |
| 5 | -0,30 | 2,00 | 0,066 7 | 0,150 | 0,066 7 | 0,933 3 | 0,444 4 |
| Total | | 30,00 | | | | | 1,445 4 |

A partir de los datos calculados en la tabla 2, se determinó que el diámetro promedio de partícula del producto de la fermentación en fase sólida de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) sobre bagazo de caña y cabecilla de arroz por el método acumulativo es de 0,692 mm. Los resultados ligeramente superiores al tratamiento sin exposición al campo magnético indican un mayor crecimiento del hongo provocando una aglomeración mayor de las partículas de bagazo.

Estudios recientes [23] reportan un diámetro promedio de partícula para el bagazo de caña de 0,565 mm empleando un juego de 13 tamices de mallas ASTM (EEUU). Estos resultados son semejantes a los obtenidos en el presente estudio, en el que se debe considerar además el efecto de la biomasa creciendo entre las partículas de bagazo.

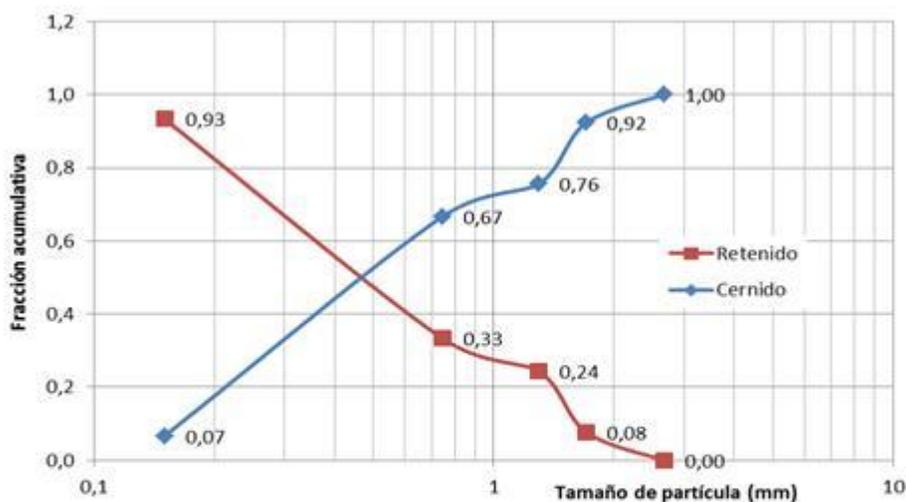


Fig.4 Característica acumulativa de las partículas obtenidas del producto de la fermentación en fase sólida sobre bagazo de caña y cabecilla de arroz de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34).

La distribución acumulativa de las partículas de la muestra tratada sigue un comportamiento semejante al de la muestra control descrita anteriormente, obteniéndose para este caso un diámetro promedio de 0,475 mm lo que indica una similitud en el comportamiento del tamaño de las partículas del sustrato conteniendo el hongo que se hizo crecer bajo la acción del campo magnético y el control.

La característica acumulativa en ambos casos se ajusta al modelo matemático descrito por Gaudin-Andreiev [16] , según muestra la tabla 3.

Tabla 3
Ajuste del modelo matemático de la distribución acumulativa para la fermentación sólida de *T. harzianum*.

| | Control | Tratado |
|---|------------------------------|------------------------------|
| Modelo matemático | $x = 0,757 \cdot Dp^{0,315}$ | $x = 0,729 \cdot Dp^{0,352}$ |
| Coefficiente de regresión (R ²) | 0,944 | 0,945 |

donde:

Dp: Diámetro promedio de las partículas (mm)

x: fracción de sólidos del alimentado menor de Dp.

Estas ecuaciones se ajustaron con coeficientes de regresión mayores de 0,90 por lo que se considera que el ajuste es bueno, así que la distribución de tamaño en ambos casos puede ser descrita satisfactoriamente por el modelo Gaudin-Andreiev.

Concentración de los conidios de *T. harzianum* Rifai (A-34) obtenidos de la fermentación en fase sólida sobre bagazo de caña y cabecilla de arroz

Se graficó los resultados de la concentración de los conidios de *T. harzianum* Rifai (A-34) por clases de tamaño: 1 er tamiz (+2,00 mm); 2^{do} tamiz (-2,00+1,41 mm); 3^{er} tamiz (-1,41+1,19 mm); 4^{to} tamiz (-1,19+0,30 mm); Bandeja colectora (-0,30 mm). Ver Figura 5.

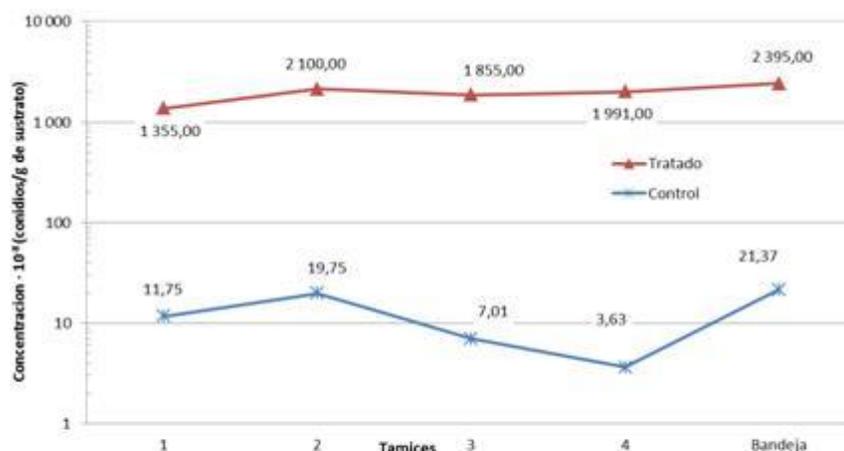


Fig. 5 Concentración de los conidios de *T. harzianum* Rifai (A-34) obtenidos de la fermentación sólida por clases de tamaño.

Las concentraciones de los conidios variaron según las clases de tamaño en las que se encuentra distribuida la muestra, de modo que la mayor cantidad se obtiene en la bandeja. El mayor valor ($2,40 \cdot 10^{11}$ conidios/g de sustrato) se alcanzó en el experimento tratado magnéticamente de la fracción extraída de la bandeja. El valor mínimo, $3,63 \cdot 10^8$ conidios/g de sustrato corresponde al cuarto tamiz del experimento control.

Tanto para el producto de la fermentación en fase sólida de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) tratado con campos magnéticos como para el control, las mayores concentraciones de conidios se obtienen en la bandeja colectora ($2,40 \cdot 10^{11}$ y $2,14 \cdot 10^9$ conidios/g de sustrato respectivamente). Estos resultados son similares a las concentraciones de conidios de $2 \cdot 3 \cdot 10^9$ conidios/g de sustrato, recomendadas para la propagación de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) en medio sólido [25].

Elósegui [26] obtuvo $7,8 \cdot 10^{10}$ conidios/g de sustrato con tamices de 0,209 mm y 0,035 mm respectivamente, y con un solo tamiz de 0,209 mm alcanzó un residuo de $4,5 \cdot 10^{10}$ conidios/g de sustrato para el producto de la fermentación de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) sobre un sustrato compuesto por arroz partido y cáscara de arroz.

Para el presente trabajo se obtuvieron $2,40 \cdot 10^{11}$ conidios/g correspondiente a la mayor cantidad de conidios obtenidos de la muestra tratada en la bandeja colectora, esto significa un valor superior al mayor valor alcanzado por Elósegui [26], por tanto se consideran los resultados aceptables.

Se observa además una diferencia entre las curvas correspondientes a la muestra tratada magnéticamente y la no tratada, lo que evidencia el efecto del campo magnético sobre el crecimiento del microorganismo en el sustrato. Se plantea que bajo la acción del campo magnético se inducen cambios en la conformación de las membranas, lo cual se traduce en alteraciones en sus propiedades físicas, provocando una alteración de las funciones de los receptores de la membrana [27].

En el segundo tamiz (-2+1,41 mm) según la figura 5 se encuentra la segunda concentración significativa de conidios, este aspecto es relevante ya que demuestra que una cantidad considerable de conidios no llega a la bandeja y quedan retenidas en esta clase de tamaño, lo que resulta desfavorable para el proceso de concentración de las mismas.

La muestra a la que corresponde esta fracción presenta partículas con poca uniformidad en su tamaño, las que corresponden a diferentes grados de fraccionamiento del bagazo de caña y la cabecilla de arroz, siendo estas últimas las más abundantes. En el sustrato retenido en este tamiz, el *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) se encuentra estrechamente ligado a las partículas sólidas que lo contienen, creciendo dentro de las fibras del sólido y pegándose a este debido a la humedad del medio.

En contraste, el polvo de conidios obtenido en la bandeja, donde se encuentra la mayor concentración, mostró una mayor uniformidad en el tamaño de las partículas, cuya característica fundamental es el aspecto de un polvo fino de color verde.

Lo anteriormente analizado indica que existe la posibilidad de emplear el producto de este tamiz como suplemento en el inóculo de próximas fermentaciones. Elóseguí [26] recomienda, además, disminuir la humedad relativa del biopreparado para contribuir a un despegue más fácil de los conidios del sustrato. Otra posible solución sería someter esta fracción a un proceso de reducción de tamaño y realizar el estudio de viabilidad correspondiente.

Densidad de las partículas producto de la fermentación en fase sólida de *T. harzianum* Rifai (A-34) sobre bagazo de caña y cabecilla de arroz

La determinación de la densidad de las partículas obtenidas luego de la fermentación en fase sólida de *T. harzianum* Rifai (A-34) se realizó a la fracción de las muestras tamizadas que quedaron en la bandeja según las ecuaciones 1, 2 y 3. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 4.

Tabla 4
Densidad de las partículas producto de la fermentación en fase sólida de *T. harzianum* Rifai (A-34) sobre bagazo de caña y cabecilla de arroz

| | Control | Tratado |
|------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| G _T | 0,155 4 ± 3,236 · 10 ⁻⁵ | 0,163 1 ± 2,298 · 10 ⁻⁴ |
| G | 0,155 1 ± 3,231 · 10 ⁻⁵ | 0,162 9 ± 2,295 · 10 ⁻⁴ |
| D (g/cm ³) | 0,154 9 ± 3,225 · 10 ⁻⁵ | 0,162 6 ± 2,291 · 10 ⁻⁴ |

Los resultados obtenidos evidencian mayores valores para el experimento tratado, mostrando una estrecha relación con el crecimiento del microorganismo. Existen diferencias significativas entre la densidad de las partículas producto de la fermentación

en fase sólida de *T. harzianum* Rifai (A-34) del experimento control y el tratado magnéticamente. En este último se obtuvo una mayor densidad, como consecuencia de un mayor crecimiento del microorganismo y una mayor concentración de conidios en el producto recogido en la bandeja colectora (figura 5).

Según lo reportado en la literatura [24], la densidad del bagazo de caña es de $0,1656 \pm 9,9 \cdot 10^{-4} \text{ g/cm}^3$. En este caso se empleó un tamaño de la clase de (+1 -2 mm). Se consideran aceptables los resultados haciendo notar que para el presente estudio los resultados se refieren al polvo de conidios y partículas finas recogidos en la bandeja colectora (-0,30 mm).

En la tabla 5 se resumen las propiedades determinadas para el producto de la fermentación sólida sobre bagazo de caña y cabecilla de arroz de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) tratado con campo magnético de 80 mT durante 15 min y el hongo no tratado.

Tabla 5
Propiedades determinadas de la fermentación sólida de *T. harzianum* Rifai (A-34) sobre bagazo de caña y cabecilla de arroz.

| Propiedades | Control | Tratado |
|--|-------------------|----------------------|
| Diámetro promedio de las partículas (mm) | 0,688 | 0,692 |
| Concentración de conidios (conidios/g de sustrato) | $2,14 \cdot 10^9$ | $2,40 \cdot 10^{11}$ |
| Densidad de las partículas (g/cm^3) | 0,155 | 0,163 |

De acuerdo con lo mostrado en la tabla 5 se obtuvieron valores mayores en las propiedades determinadas para la muestra tratada magnéticamente en comparación con la muestra control. Refiriéndose a estos efectos, los estudios realizados en laboratorios bajo condiciones bien controladas apoyan fuertemente la existencia de una relación significativa entre los campos magnéticos y una amplia variedad de procesos biológicos a nivel celular [28]. Los ejemplos de la diversidad de respuesta ante los campos electromagnéticos incluyen: alteración de la velocidad de crecimiento celular, supresión de la citotoxicidad de los linfocitos, aumento de determinadas enzimas, alteración de las cantidades de ácido ribonucleico transcrito (ARNt) y de proteínas, alteración en las propiedades de la superficie celular y efectos en el desarrollo, entre otras [29].

CONCLUSIONES

- No existieron diferencias significativas en el diámetro promedio de las partículas (0,692 mm) obtenidas producto de la fermentación en fase sólida de *T. harzianum* Rifai (A-34)

tratado con campo magnético de 80 mT durante 15 minutos con respecto al hongo no tratado que presentó un diámetro promedio de partículas de 0,688 mm.

- Para las partículas recogidas en la bandeja colectora (-0,30 mm) existieron diferencias significativas en cuanto a la concentración de conidios del *T. harzianum* Rifai (A-34) tratado con campo magnético de 80 mT durante 15 minutos ($2,40 \cdot 10^{11}$ conidios/ g de sustrato) con respecto al hongo no tratado ($2,14 \cdot 10^9$ conidios/ g de sustrato). Igualmente existieron diferencias significativas para la densidad de las partículas de esta fracción para el hongo tratado ($0,163 \text{ g/cm}^3$) y el control ($0,155 \text{ g/cm}^3$).

- El producto del segundo tamiz (-2+1,41 mm) tiene una concentración de conidios de $2,10 \cdot 10^{11}$ conidios/ g de sustrato para el *T. harzianum* Rifai (A-34) tratado con campo magnético de 80 mT durante 15 min y $1,98 \cdot 10^9$ conidios/ g de sustrato para el hongo no tratado. Existe la posibilidad de emplear esta fracción como suplemento del inóculo de próximas fermentaciones.

BIBLIOGRAFIA

1. WOO, Sheridan L; RUOCCO, Michelina; VINALE, Francesco; NIGRO, Marco, *et al.* "Trichoderma-based products and their widespread use in agriculture". *the Open Mycology Journal*. 2014, vol. 8, núm. p. 71-126.
2. PANAHIAN, Gh. R; RAHNAMA, K; JAFARI, M. "Mass production of *Trichoderma* spp and application". *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*. 2012, vol. 3, p. 292-298.
3. GATO CÁRDENAS, Y. "Métodos de conservación y formulacion de *Trichoderma harzianum* Rifai". *Fitosanidad*. 2010, vol. 14, p. 189-195.
4. ELÓSEGUI CLARO, Orestes. *Metodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas*. La Habana, Cuba: Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), 2006. p. 61.
5. BHARGAV, S; PANDA, B P; ALI, M; JAVED, S. "Solid-state Fermentation: An Overview". *Chem. Biochem. Eng. Q*. 2008, vol. 22, p. 49-70.
6. THOMAS, Leya; LARROCHE, Christian; PANDEY, Ashok. "Current developments in solid-state fermentation (Review)". *Biochemical Engineering Journal*. 2013, vol. 81, p. 146-161.
7. BATEMAN, Roy. MycoHarvester. 2002.
8. BATEMAN, Roy. Large-scale spore extraction unit (MycoHarvester Mk 3). 2012.
9. MITCHELL, David Alexander; MEIEN, Oscar F Von; KRIEGER, Nadia; DALSENTER, Farah Diba H. "A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and

intraparticle phenomena in solid-state fermentation". *Biochemical Engineering Journal*. 2004, vol. 17, p. 15-26.

10. BENÍTEZ, Tahía; RINCÓN, Ana M; LIMÓN, M Carmen; CODÓN, Antonio C. "Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains". *International Microbiology*. 2004, vol. 7, p. 249-260.

11. MÁS-DIEGO, Siannah María; GONZÁLEZ-MORLÁ, Adriana; CAMPOS-SOFÍA, Melek; CABEZA-PULLÉS, Dainelis. "Growth of *Trichoderma reesei* on static and dynamic solid substrate fermentation under electromagnetic fields." 2003, p. 57-62.

12. MÁS-DIEGO, Siannah María; MARTÍNEZ-MANRIQUE, Clara E; SIMÓN-RICARDO, Francisco; FURIGO, Agenor F Jr. "Consideraciones sobre la introducción de la tecnología del campo magnético a la producción de bioplaguicidas en cuba". *Investigación y Saberes*. 2013, vol. II, p. 8-26.

13. MANOLIU, Alexandru; OPRICA, Lacramioara; CREANGA, Dorina. "The influence of the static magnetic field (SMF) on some biochemical parameters in cellulolytic fungi *Chaetomium globosum* and *Trichoderma viride* cultivated on media supplemented with panification industrial wastes". *Romanian Journal of Biology Plant Biology*. 2007, vol. 51-52, p. 25-37.

14. TRISTÁ MONCADA, José Joaquín; BERENQUER MAURANT, Arístides; DEÁS YERO, Douglas; RIBEAUX KINDELÁN, Guillermo, et al. *Magnetizador a imanes permanentes exteriores*. Universidad de Oriente.

15. MÁS-DIEGO, Siannah María; RODRÍGUEZ-RICO, Iván L; MARTÍNEZ-MANRIQUE, Clara E; MICHELENA-ÁLVAREZ, Georgina, et al. "Fermentación en estado sólido de *Trichoderma harzianum* bajo campos magnéticos". *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar*. 2015, vol. 49, p. 40-45.

16. ROSABAL VEGA, Julio; VALLE MATOS, Manuel. *Hidrodinámica y separaciones mecánicas. Tomo II*. Cuba: ENPES, 1989.

17. MÁRQUEZ GUTIÉRREZ, María Elena; FERNÁNDEZ-LARREA VEGA, Orietta; JIMÉNEZ RAMOS, Jesús; ELÓSEGUI CLARO, Orestes, et al. Formas de obtención de controladores biológicos microbianos para su uso en el sistema de producción agrícola del MINAG. La Habana. 2010.

18. ASTM. *Standard test methods for specific gravity of soil solids by water pycnometer*. 2010.

19. SCHUSTER, André; SCHMOLL, Monika. "Biology and biotechnology of *Trichoderma*". *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010, vol. 87, p. 787-799.

20. SCHUTYSER, MAI; DE PAGTER, P; WEBER, FJ; BRIELS, WJ, et al. "Substrate aggregation due to aerial hyphae during discontinuously mixed solid-state fermentation with *Aspergillus oryzae*: experiments and modeling". *Biotechnology and bioengineering*. 2003, vol. 83, núm. 5, p. 503-513.

21. SUGAI-GUÉRIOS, Maura Harumi; BALMANT, Wellington; FURIGO JR, Agenor; KRIEGER, Nadia, et al. "Modeling the Growth of Filamentous Fungi at the Particle Scale in Solid-State Fermentation Systems." Springer, 2015, p. 171-221.
22. DERNTL, Christian; MACH-AIGNER, Astrid R.; MACH, Robert L. "Trichoderma proteins with disruption activity on cellulosic substrates." Elsevier, 2014.
23. MANALS-CUTIÑO, Enma M; PENEDO-MEDINA, Margarita; SALAS-TORT, Dolores. "Caracterización del bagazo de caña como biomasa vegetal". *Tecnología Química*. 2015, vol. 35, p. 244-255.
24. MARTINEZ-NODAL, Pastora de la Concepción; RODRÍGUEZ-RICO, Iván; ESPERANZA-PÉREZ, Guillermo; LEIVA-MAS, Jorge "Caracterización y evaluación del bagazo de caña de azúcar como biosorbente de hidrocarburos". *Afinidad*. 2014, vol. 71, núm. 565, p. 57-62.
25. STEFANOVA, Marusia. Producción y aplicación de *Trichoderma* spp. como antagonista de hongos fitopatógenos. Cuba: 2003.
26. ELÓSEGUI CLARO, Orestes; FERNÁNDEZ-LARREA VEGA, Orietta; PONCE GRIJUELA, Enrique; BORGES MARÍN, Giovanni, et al. "Colecta de esporas de *Trichoderma harzianum* Rifai cepa A34 por lecho fluidizado y ciclón dual". *Fitosanidad*. 2009, vol. 13, núm. 4, p. 265-269.
27. ROSEN, Arthur D. "Studies on the Effect of Static Magnetic Fields on Biological Systems". *PIERS Online*. 2010, vol. 6, p. 133-136.
28. BARNES, Frank S ; GREENEBAUM, Ben. Handbook of biological effects of electromagnetic fields: Bioengineering and Biophysical Aspects of Electromagnetic Fields. Boca Raton. 2006, vol. I, p. 1-467.
29. Wendell Wagner Campos; Romero Marcos Pedrosa; Thiago de Salazar e; Ana Lúcia Figueiredo. "Evidences of the static magnetic field influence on cellular systems". *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2016, vol. 121, p. 16-28.

Recibido: Noviembre 2016

Aprobado: Marzo 2017

MSc. Siannah M. Mas Diego^I. Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado, Universidad de Oriente. Cuba. siannah@uo.edu.cu