

08

USO DE BIOCARBONES

**EN MEDIOS DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DE
TRICHODERMA SPP. IN VITRO**

USO DE BIOCARBONES

EN MEDIOS DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DE TRICHODERMA SPP. IN VITRO

USE OF BIOCHAR IN SUBSTRATE FOR IN VITRO GROWTH OF TRICHODERMA SPP

Stalin Sánchez Pilcorema¹

E-mail: sesanchezp_est@utmachala.edu.ec

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2171-5008>

Alexander Condoy Gorotiza¹

E-mail: aacondoy_est@utmachala.edu.ec

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6432-7385>

Priscila Sisalima Morales¹

E-mail: psisalima_est@utmachala.edu.ec

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2391-9143>

Salomón Barrezueta Unda¹

E-mail: sabarrezueta@utmachala.edu.ec

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4147-9284>

Edison Jaramillo Aguilar¹

E-mail: ejaramillo@utmachala.edu.ec

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8241-9598>

¹ Universidad Técnica de Machala. Ecuador.

Cita sugerida (APA, séptima edición)

Sánchez Pilcorema, S., Condoy Gorotiza, A., Sisalima Morales, P., Barrezueta Unda, S., & Jaramillo Aguilar, E. (2020). Uso de biocarbones en medios de cultivo para el crecimiento de *Trichoderma spp.* in vitro. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 3(2), 66-72.

RESUMEN

Para alcanzar una agricultura sostenible es necesario investigar los diferentes mecanismos de control natural, como el uso de microorganismo eficientes (*Trichoderma sp*) y de biocarbones, que en conjunto pueden generar una sinergia que beneficien al suelo y por tanto a los cultivos. Por tanto, los objetivos de la investigación fueron: Evaluar el crecimiento de *Trichoderma sp.*, sobre medios de cultivo formulados con biocarbón de banano y biocarbon de cacao en laboratorio en diferentes concentraciones. El ensayo se conformó en 3 dosis de biocarbones (1,2 g; 3,5 g; 7,5 g) obtenidos por pirolisis de los residuos de raquis de banano y de la cascara del cacao. En laboratorio se prepara el medio de cultivo en PDA para reproducir *Trichoderma sp.*, a una concentración de 10×10^{11} UFC que luego fue tomada una porción para ser colocada en cajas de Petri con la dosis de biocarbones. Los resultados fueron medidos a intervalos de 7 días. El tratamiento de 3,75 gr de biocarbón de cacao fue el de mayor crecimiento su fluctuación fue de 5 a 8,5 cm en 21 días desde la siembra. Para el medio con el biocarbon de banano no se portó crecimiento de *Trichoderma sp.*

Palabras clave:

Microorganismos eficientes, agricultura sustentable, sinergismo, unidades formadoras de colonias.

ABSTRACT

Research into different natural control mechanisms, such as the use of efficient micro-organisms (*Trichoderma sp*) and bio-coals, is necessary to achieve sustainable agriculture, which together can generate a synergy that benefits the soil and therefore the crops. Therefore, the objectives of the research were: To evaluate the growth of *Trichoderma sp.*, on culture media formulated with banana biochar and cocoa biochar in the laboratory in different concentrations. The test was made up of 3 doses of biochar (1.2 g; 3.5 g; 7.5 g) obtained by pyrolysis of banana rachis residues and cocoa shells. In the laboratory, the culture medium is prepared in PDA to reproduce *Trichoderma sp.* at a concentration of 10×10^{11} UFC, which was then taken a portion to be placed in Petri dishes with the dose of biochar. The results were measured at 7-day intervals. The treatment of 3.75 gr of biochar of cocoa was the one of greater growth its fluctuation was of 5 to 8.5 cm in 21 days from the sowing. For the medium with banana biochar there was no growth of *Trichoderma sp*

Keywords:

Efficient microorganism, sustainable agriculture, synergy, colony-forming units.

INTRODUCCIÓN

Para lograr una agricultura sostenible es necesario comprender que los recursos naturales: suelo, agua y planta funcionan como un sistema y al ser afectado por las plagas, se rompe el equilibrio natural (Robert, et al., 2017). Aunque el control químico es una alternativa rápida, en muchos de los casos ocasionan la contaminación de los recursos mencionando, debido a que están constituido en su formulación por metales pesados como: cobre (Cu), plomo (Pb), Arsénico (As), en otros que se acumulan en el suelo, contamina el agua e intoxica a las plantas. Por tanto, este control acentúa la ruptura del equilibrio de los sistemas agrarios, afectando la sostenibilidad (Zhao, et al., 2019).

Desde la década de los 80 hasta la actualidad, los trabajos sobre el control biológico contra las plagas abrió nuevas líneas de investigación, una de ellas es el uso de microorganismos eficientes (ME), las enmiendas orgánica con biocarbones por ejemplo, en otras alternativas tendientes al control de plagas y para mejorar el suelo (Barrow, 2012) aid sustainable production and reduce contamination of streams and groundwater. This study reviews biochar potential and problems and argues for adequate research before hasty application leads to environmental and socio-economic damage and discourages application. There is also a need for broad overview because research is conducted by a diversity of specialist fields including soil chemistry, archaeology, farming extension and so forth. Research on biochar-rich Amazonian dark earths may help identify the best raw materials (feedstock).

Por otra parte, el ME *Trichoderma spp.*, es un agente biológico muy eficaz que posee un desarrollo y crecimiento rápido, capaz de manifestarse en una amplia gama de sustrato que facilita su producción masiva para uso en la agricultura (Howell, 2003). También, se conoce que *Trichoderma spp.*, tiene algunos mecanismos de acción biorreguladora de forma indirecta, los cuales son los que incitan al mecanismos de la defensa fisiológico y bioquímica relacionados con la detoxificación de toxinas excretadas por los patógenos y en la desactivación de enzimas que ocurren en el proceso de infección (Dignac, et al., 2017; Jaramillo, et al., 2017).

En el caso del biocarbón, su incorporación al suelo mejorar la retención de humedad, incide sobre la densidad aparente, incrementa los niveles de materia orgánica y regula el pH; así como, facilidad de laboreo en el suelo y mejorar la estructura. También el biocarbón es un portador de microorganismos, que al incorporarse como enmienda estimulan el crecimiento de hongos benéficos, como *Trichoderma spp.* (Escalante, et al., 2016).

Investigaciones previas indican que la interacción biótica-abiótica (ME-Biocarbón), se desarrolla un ciclo de intercambio de nutrientes que produce un medio favorable para la planta que equilibra la microbiota del suelo

y la disponibilidad de nutrientes (Escalante, et al., 2016; Herrera, et al., 2018).

En este marco, desde la primera década del siglo XXI, se investiga el crecimiento del ME *Trichoderma spp.*, sobre distintos medios a dicional al uso de arroz o sorgo, para obtener una sinergia que actúe en beneficio de una producción sostenible (Howell, 2003). Los carbones obtenidos de biomasa vegetal por el proceso de pirólisis es una alternativa como medio de cultivo, debido que tienen una gran capacidad de biosorción de metales pesados en el suelo, que sumado a la capacidad de biocontrol de plagas como la del *Fusarium spp.* puede producir la sinergia esperada.

Pero establecer una dosis adecuada se debe realizar varios experimentos de laboratorio, debido que el crecimiento de *Trichoderma spp.*, está limitado a medio de cultivo con un pH 4.0 a 7.0 y por lo general los biocarbones en especial los obtenidos del raquis de banano y de la mazorca de cacao (pH 9-9.5). En este marco, es limitado el crecimiento de *Trichoderma spp.* sobre los biocarbones en mención. Por tanto, los objetivos de la investigación fueron: Evaluar el crecimiento de *Trichoderma spp.* sobre medios de cultivo formulados con biocarbón de banano y biocarbon de cacao en laboratorio en diferentes concentraciones.

DESARROLLO

La investigación se realizó en el Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Machala, ubicada entre las coordenadas 79° 54' 05" W y 03° 17' 16" S y una altura 6 msnm, en la ciudad de Machala (El Oro-Ecuador). Entre los meses de octubre y noviembre del 2019.

Obtención de la materia prima

Biomasa de la cáscara de cacao.

Las mazorcas de cacao cosechadas fueron recolectadas de una finca cacaotera del cantón Arenillas (El Oro-Ecuador). Se utilizó este tipo de biomasa por su alto contenido de lignina y celulosa que permite obtener carbones con mayor superficie específica, propiedad que incrementa la absorción de los metales y facilita el crecimiento de los ME.

Obtención del raquis de banano

El raquis de banano se obtuvo de una finca bananera del cantón El Guabo (El Oro-Ecuador). Recolección que se realizó después de la cosecha. Esta materia prima está constituida de niveles altos de fósforo y potasio, elementos que permiten un desarrollo de ME. Con el material recolectado en ambos casos se procedió al secado al ambiente durante 20 días, sobre una superficie de concreto.

Producción del biocarbón

La metodología utilizada para la obtención de biocarbón fue tomada de Marin-Armijos, García-Batista & Barrezueta-Unda (2018), y consistió en introducir 7 kg de la materia prima (biomasa seca de la cáscara de cacao y raquis de banano por separado) en un tanque metálico de 70 cm de largo por 40 cm de ancho, cerrado con una tapa metálica (Figura 1 A), para ser introducido dentro de un tanque más grande de 120 cm de alto por 50 cm de ancho (Figura 1 B). A continuación, se llenó los espacios de tanque más grande con leña para iniciar el proceso de calcinación y producir biocarbón vegetal (Figura 1). El tiempo de incineración fue de 3 horas.

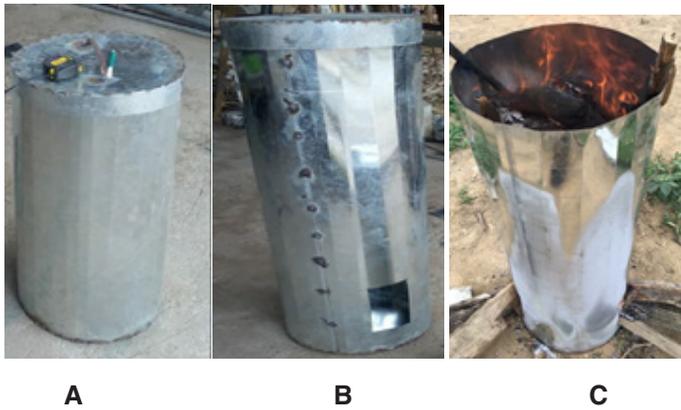


Figura 1. Horno para la elaboración del bio carbón vegetal.

Características del biocarbón

El biocarbón es un producto que muestra una estructura fina y porosa. Las partículas tienen cargas eléctricas capaces tanto de absorción y adsorción de metales pesados (Figura 2). La aplicación de biocarbón a los suelos potencia la productividad de los cultivos atribuyendo a la capacidad de intercambio catiónico, lograr un pH deseado, incrementar la materia orgánica, diversificación de las comunidades microbianas del suelo, entre otros aspectos (Elad, et al., 2011) the thermal degradation of biomass in the absence of oxygen. Pyrolysis also yields gaseous and liquid biofuel products. There is a growing interest worldwide in the pyrolysis platform, for at least four reasons: (i.

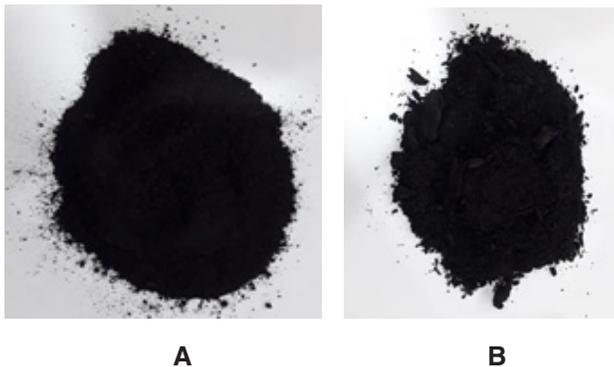


Figura 2. Biocarbon vegetal de cacao (A) y banano (B)

Para caracterizar a los biocarbones se tomó 10 g de carbón vegetal para pH (1:2.5) y conductividad eléctrica (CE), determinados mediante extracto de saturación en agua y se leyó en un conductivímetro Hi5222-1 (Hanna, Rumania).

Para determinar el porcentaje de carbón obtenido de los residuos, se dividió el peso del carbón vegetal y el peso de la biomasa seca, y se multiplicó por 100 (Ecuación 1).

$$\% \text{ carbón} = \frac{\text{Peso del carbon vegetal}}{\text{Peso de la biomasa}} * 100 \quad (1)$$

Obtención de la cepa de *Trichoderma spp.*

La cepa de *Trichoderma spp.* (Figura 3), se obtuvo una suspensión comercial (Bio Fertilizante Orgánico de *Trichoderma*) a una concentración de 10^{11} UFC (unidades formadoras de colonias), producto formulado por la empresa FENEC S.A.

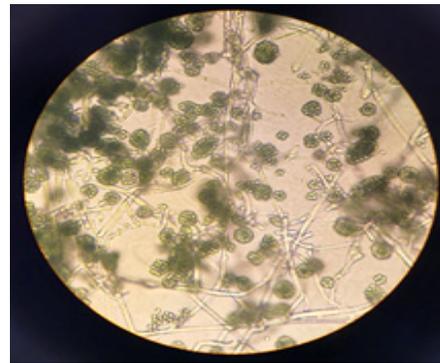


Figura 3. *Trichoderma spp.* observado en aumento 100 x.

El medio de cultivo estuvo constituido de 39 g de papa dextrosa agar (PDA) para un 1 litro de agua destilada. Luego se dispensó 20 ml de PDA en cajas de Petri; a continuación, se agregó 1 ml de la suspensión comercial de *Trichoderma spp.*, con ayuda de un asa de Drigalsky, se distribuyó la suspensión en toda la caja. Se esperó 8 días para su crecimiento. Luego, se preparó el medio de cultivo biochar de acuerdo a las siguientes dosis (Tabla 1).

Tabla 1. Dosis de biocarbones y Agar Agar (PDA).

Materia prima del biocarbón	Dosis Biocarbon	Codificación	Dosis Agar Agar (PDA)	H2O
Cacao	1,5 g	BC 1,5	1,6 g	80 ml
Cacao	3,75 g	BC 3,75	1,6 g	80 ml
Cacao	7,5 g	BC 7,5	1,6 g	80 ml
Banano	1,5 g	BB 1,5	1,6 g	80 ml
Banano	3,75 g	BB 3,75	1,6 g	80 ml
Banano	7,5 g	BB 7,50	1,6 g	80 ml

Se tomó la dosis de agar, que se disolvió en agua destilada, para llevarlo a punto de ebullición, incorporando la

dosis de biocarbón; a continuación, se autoclavar a 121 °C por 20 min. Por cada caja de Petri se colocó 20 ml de medio de cultivo biochar, y se procedió a sembrar tomando una porción de 1,4 cm de diámetro del medio de cultivo de PDA con *Trichoderma spp.*

Medición de las variables

El trabajo consistió en comparando el crecimiento de *Trichoderma spp.* en función del diámetro en tres intervalos de tiempo cada 7 días. El diseño del experimento fue completamente al azar, conformado por tres tratamientos (dosis de biochar 1,5 g, 3,75 g y 7,5 g) y cinco repeticiones más un tratamiento control que consistió en el crecimiento del *Trichoderma sp.*, solo en PDA. Los factores fueron los tipos de biocarbones (Tabla 1).

Todos los valores fueron promediados y tabulados en una hoja de Excel para la presentación e interpretación de los resultados. Para establecer la comparación entre los valores se realizó un análisis de varianza entre los biocarbones y una prueba Tukey entre los tratamientos. Todo el análisis estadístico inferencial fue realizado al 5% de significancia.

Los resultados obtenidos, nos muestran el análisis de varianza (ANOVA) entre los biocarbones BB y BC (Tabla 2), solo mostro diferencia significativa ($p < 0,01$) en la medición del pH, que vario de $9,74 \pm 0,04$ (BB) a $9,5 \pm 0,01$ (BC), valores que indican que el medio utilizado fue altamente alcalino. Gaskin *et al* (2008) justifica, que los valores extremadamente alcalinos en carbón vegetal de banano y cacao, es producto del alto contenidos de fosforo y potasio en brácteas o mazorcas.

Los valores de carbonos fueron ligeramente inferiores en banano ($34,63 \% \pm 14,42$) con respecto al cacao ($37,59 \% \pm 18,93$), diferencias que se pueden atribuir a la composición química de cada biomasa. En el caso del cacao la cantidad de celulosa y ligninas es superior a la de banano y pudo influir en los resultados (Kabenge *et al.*, 2018; Marin-Armijos, *et al.*, 2018; Tsai, *et al.*, 2018) cocoa pod husk (CPH). Los grupos funcionales como los carboxilos están presentantes en mayor proporción en la corteza de la mazorca del cacao (Ellerbrock & Kaiser, 2005).

El valor de conductividad eléctrica (CE) fue más alta en BC ($1,17 \text{ dS/m}^2$) con respecto al BC ($0,35 \text{ dS/m}^2$), diferencia numérica pero no significativa entre los dos biocarbones ($p=0,343$). Los valores que están en el rango de CE determinada por Azeem *et al.*, (2019), pero en carbón vegetal obtenido de bagazo de la caña de azúcar. Diferencia que pude estar relacionado con el mayor nivel de calcio y magnesio en la cascara de cacao.

Tabla 2. Análisis de varianza de las principales características de los biocarbones obtenidos de raquis de banano (BB) y cascara de cacao (BC).

Tratamiento	Variable	N	Media	DS(±)	Sig. 0,05
Banano	carbón (%)	10	34.63	14.42	0.343
Cacao		10	37.59	18.93	
Banano	pH (1:2.5 H2O)	3	9.74	0.04	0.001
Cacao		3	9.5	0.01	
Banano	CE(dS/m ²)	3	0.35	0.08	0.141
Cacao		3	1.17	0.78	

En la Figura 4, se muestra el crecimiento de *Trichoderma spp.*, en las diferentes dosis y del tratamiento control, así como el análisis de medias (Tukey al 5%). Todos los tratamientos mostraron significancia intragrupo. La dosis de 1,5 g de BC, *Trichoderma sp.*, mostro un crecimiento de forma aislada en colonias en el centro de la caja de Petri y cuya medición fluctuó de 3 a 7, 8 mm de diámetro en 21 días después de la siembra. En la dosis de 3,75 g de BC el crecimiento vario de 5,14 mm a 8,42 mm de diámetro similar a la dosis de 1,25 g de BC. Valores que indican significancia estadística. Para el tratamiento BB en las tres dosis no se observó crecimiento de *Trichoderma sp.*, al igual que para el BC en la dosis de 7,5 g. Por otra parte, el tratamiento control creció de 4,6 mm a 13,9 mm.

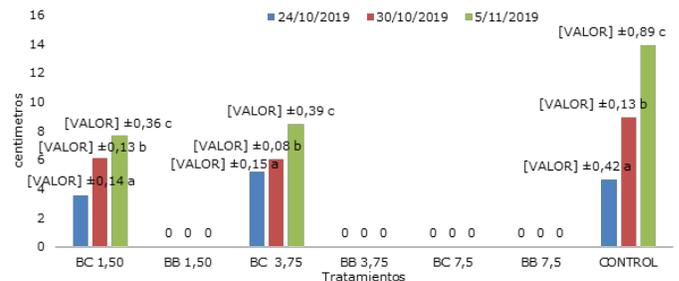
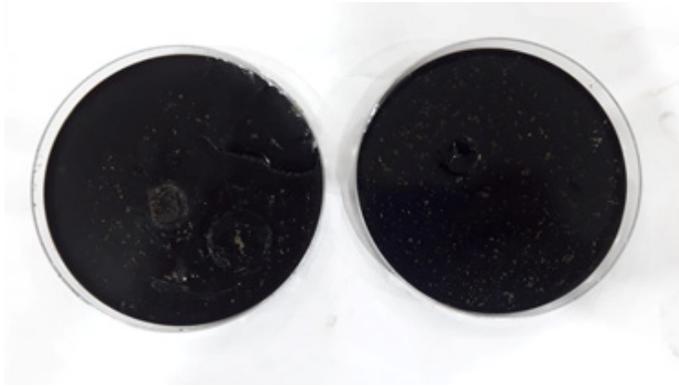


Figura 4. Crecimiento de *Trichoderma spp.* en medio de cultivo biochar.

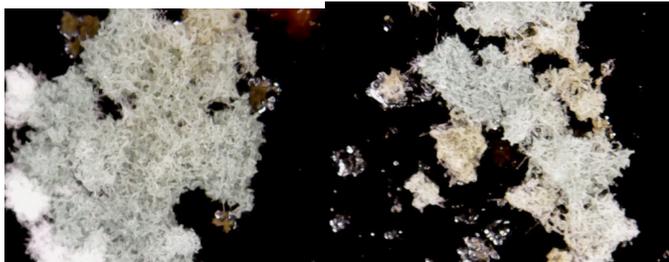
En la Figura 5 se observa el crecimiento irregular de *Trichoderma spp.*, en el medio de cultivo conformado por BC en las dosis de 1,5 g (Figura 5B) y 3,75 g (Figura 5C). Imágenes que contrasta con las obtenidas en PDA, que se desarrolló desde el centro hasta los costados formando hileras de color verde (Figura 5D). La falta de carbohidratos u otros aminoácidos pueden ser la causa que los medios de biocarbones no se pudo lograr un crecimiento homogéneo.

A.



B.

C.



D.



Figura 5. Crecimiento de *Trichoderma spp.* a) colonias aisladas de *Trichoderma spp.*, b) colonias de *Trichoderma spp.* En la dosis de 1,25 g, c) colonias de *Trichoderma spp.* En la dosis de 3,5 g.

CONCLUSIONES

El tratamiento de 3,75 gr de biocarbón de cacao fue el de mayor crecimiento, aunque este no fue uniforme como se reporta en arroz o sorgo. Por tanto, no podemos sustentar que el biocarbón si permiten el crecimiento y desarrollo de *Trichoderma sp.*, en el suelo, y que no tengan reacciones que puedan inhibir su crecimiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barrow, C. J. (2012). Biochar: Potential for countering land degradation and for improving agriculture. *Applied Geography*, *34*, 21–28.
- Dignac, M. F., Derrien, D., Barre, P., Barot Sébastien, C. L., Chenu, C., Chevallier, T., Freschet, G. T., Garnier, P., Guenet, B., Hedde, M., Klumpp, K., Lashermes, G., Maron, P. A., Nunan, N., Roumet, C., & Basile-Doelsch, I. (2017). Increasing soil carbon storage: mechanisms, effects of agricultural practices and proxies. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, *37*(2), 7–27.
- Elad, Y., Cytryn, E., Meller Harel, Y., Lew, B., & Graber, E. R. (2011). The biochar effect: Plant resistance to biotic stresses. *Phytopathologia Mediterranea*, *50*(3), 335–349.
- Ellerbrock, R., & Kaiser, M. (2005). Stability and composition of different soluble soil organic matter fractions – evidence from $\delta^{13}C$ and FTIR signatures. *Geoder*, *128*, 28–37.
- Escalante, A., Pérez, G., Hidalgo, C., López, J., Campo, J., Valtierra, E.,... Etchevers, J. (2016). Biocarbón (biochar) I: Naturaleza, historia, fabricación y uso en el suelo Biocarbon (biochar) I: Nature, history, manufacture and use in soil. *Terra Latinoamericana*, *34*, 367–382.
- Herrera, E., Feijoo, C., Alfaro, R., Solís, J., Gómez, M., Keiski, R., & Cruz, G. (2018). Biochar based on residual biomasses and its influence over seedling emergence and growth in vivarium of *Capparis scabrida* (Sapote). *Scientia Agropecuaria*, *9*(4), 569–577.
- Howell, C. R. (2003). Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Disease*, *87*(1), 4–10.
- Jaramillo, E., Barrezueta-Unda, S., Luna, E., & Castillo, S. (2017). In vitro evaluation of the Aloe vera gel on *Mycosphaerella fijiensis*, causative agent of black Sigatoka disease in *Musa* (AAA). *Scientia Agropecuaria*, *8*(3), 273–278.
- Kabenge, I., Omulo, G., Banadda, N., Seay, J., Zziwa, A., & Kiggundu, N. (2018). Characterization of Banana Peels Wastes as Potential Slow Pyrolysis Feedstock. *Journal of Sustainable Development*, *11*(2), 14–24.
- Marin-Armijos, J., García-Batista, R., & Barrezueta-Unda, S. (2018). Elaboracion de biocarbón obtenido a partir de la cáscara del cacao y raquis del banano Elaboration. *Revista Agroecosistemas*, *6*(3), 75–81.

- Robert, M., Thomas, A., Sekhar, M., Badiger, S., Ruiz, L., Willaume, M., Leenhardt, D., & Bergez, J. E. (2017). Farm Typology in the Berambadi Watershed (India): Farming Systems Are Determined by Farm Size and Access to Groundwater. *Water*, *9*(1).
- Tsai, C. H., Tsai, W. T., Liu, S. C., & Lin, Y. Q. (2018). Thermochemical characterization of biochar from cocoa pod husk prepared at low pyrolysis temperature. *Biomass Conversion and Biorefinery*, *8*(2), 237–243.
- Zhao, J., Shen, X. J., Domene, X., Alcañiz, J. M., Liao, X., & Palet, C. (2019). Comparison of biochars derived from different types of feedstock and their potential for heavy metal removal in multiple-metal solutions. *Scientific Reports*, *9*(1).