

Modelación de la formación de biomasa de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) en fase sólida

Modelling of biomass formation of Trichoderma harzianum Rifai (A-34) in solid fermentation

*DraC. Siannah Maria Mas-Diego^I, MSc. Esli Lobaina-Lobaina^{II},
DrC. Iván L. Rodríguez-Rico^{III}, Téc. Héctor Elpidio Tejera-Cisneros^I,
Ing. Eduardo Núñez-Fidalgo^{IV}*

siannah@uo.edu.cu

^ICentro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA). Santiago de Cuba, Cuba; ^{II}Universidad "Máximo Gómez Báez", Cuba; ^{III}Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Cuba; ^{IV}Universidad de Oriente. Santiago de Cuba, Cuba

Resumen

Trichoderma sp. es un hongo filamentoso empleado en la protección ecológica de tomate, pimiento, pepino y otros cultivos. En su reproducción a gran escala se ha considerado su cultivo en fermentación en estado sólido con el uso de tratamiento magnético para incrementar la formación de biomasa. En este trabajo se reporta la cinética microbiana bajo condiciones de estimulación del crecimiento por la acción del campo magnético sobre *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) en la fermentación en estado sólido. El crecimiento microbiano se describe mediante el uso de un modelo primario. Dos de los modelos más aplicados y menos complejos se compararon utilizando la versión 9.4 (2017) de OriginPro (OriginLab Inc.). Para la validación estadística de los modelos, los valores residuales se estudiaron aplicando el Criterio de información de Akaike (AIC), R² ajustado, χ^2 (Chi-cuadrado), Mínimo cuadrado de residuos y Test de Fischer. La normalidad de los residuos se verificó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se obtuvieron los coeficientes que describen los modelos Gompertz y Logístico para el experimento de control y el desarrollado con el hongo tratado con campos magnéticos en fermentación en estado sólido aireada a 30° C. El modelo logístico ajustó los datos experimentales más adecuadamente, por lo que se selecciona para describir la formación de biomasa.

Palabras clave: *trichoderma harzianum*, modelación, modelo logístico, fermentación en estado sólido.

Abstract

Trichoderma sp. is used in the ecologic protection of tomato, pepper, cucumber and other crops. An alternative for increasing the efficiency of biological systems is the use of magnetic treatment of cell cultures. In this work, the microbial kinetics under growth stimulation conditions by the action of the magnetic field on *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) in solid-state fermentation is reported. Microbial growth is described by a primary model. Two of the most applied and least complex models were compared using the OriginPro (OriginLab Inc.) version 9.4 (2017). For the statistical validation of the models, the residual values were studied applying the Akaike Information Criterion (AIC), adjusted R², χ^2 (Chi-square), Minimum square of residues and Test of Fischer. The normality of the residues was checked using the

Kolmogorov-Smirnov test. Coefficients describing Gompertz and Logistic models were obtained for the control experiment and the one with the fungus treated with magnetic fields in aerated solid fermentation at 30 °C. Logistic model adjusted the experimental data more adequately, so it is selected to describe biomass formation.

Keywords: *trichoderma harzianum*, modeling, logistic model, solid-state fermentation.

Introducción

El desarrollo de un biocontrolador de plagas depende, primeramente, de la disponibilidad de un agente de control biológico altamente eficiente. Experiencias previas en la aplicación del campo magnético, sugieren que es posible su uso para aumentar la eficiencia de procesos fermentativos de hongos al disminuir los tiempos de fermentación y aumentar la calidad del producto final. Esto implica directamente una mayor producción en menor tiempo y, por tanto, un menor costo [4].

Una vez identificado el agente de biocontrol, debe diseñarse el método para su producción masiva que permita producir altos niveles de propágulos viables e infectivos. Si se desea un escalamiento industrial que permita obtener las cantidades necesarias para la aplicación de este microorganismo en condiciones de campo, se deben definir los requerimientos químicos y físicos que permitan su producción sin afectar la actividad biocontroladora [2,3]. El estudio de la cinética microbiana es de particular importancia para la investigación en los campos de microbiología y biotecnología.

La propiedad más importante de un modelo primario es que describa de forma adecuada el crecimiento de los microorganismos y permita obtener estimaciones precisas de los parámetros que caracterizan dicho crecimiento. La variabilidad de las estimaciones depende de la técnica usada para monitorear el crecimiento y del modelo usado [4]. Dada la existencia de diferentes modelos primarios, se hace necesario comparar el comportamiento de los mismos a fin de seleccionar el que asegure mejores resultados para un conjunto determinado de datos. Guerra *et al* [4] indicaron que, aspectos tales como la bondad de ajustes y las propiedades de estimación deben ser tenidos en cuenta en la comparación de modelos competidores.

Cayré *et al.* [6] refieren que, entre los modelos microbiológicos predictivos, los modelos de nivel primario describen los cambios de los números microbianos con el tiempo. Estos permiten estimar los parámetros cinéticos que caracterizan dicha curva: tiempo de latencia, máxima velocidad específica de crecimiento y máxima densidad celular [7]. Esser *et al.* [8] clasificaron a los modelos primarios como: modelos sigmoidales, entre los que se encuentran las versiones modificadas de los modelos Logístico y de Gompertz [9]; modelos con una función de ajuste, como los propuestos por Baranyi [10] y modelos de compartimentos como el propuesto por Hills y Wright [11].

El objetivo del presente trabajo es describir el crecimiento microbiano de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) en la fermentación en estado sólido bajo condiciones de estimulación del crecimiento por la acción del campo magnético mediante el uso de un modelo primario.

Materiales y métodos

Se empleó *Trichoderma harzianum* Rifai cepa A-34, proveniente del banco de cepas del Instituto Cubano de Investigaciones de la Caña de Azúcar (ICIDCA), La Habana. Esta cepa es la que se emplea nacionalmente en el Programa de Protección de Plagas. Se conservó en el Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal, Santiago de Cuba y se fortaleció mediante su enfrentamiento con *Fusarium sp.* para conservar su patogenicidad.

Se utilizó como medio de conservación Agar Papa Dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés): Extracto de patata 4,0 g·L⁻¹, Dextrosa 20,0 g·L⁻¹, Agar-agar 15,0 g·L⁻¹. Se ajustó el pH a 5,5 ± 0,2 con NaOH o HCl 1M y se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 1 atm y 121 °C. 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.

Para la fermentación en estado sólido se emplearon biorreactores tipo columna empacada con carga de 100 g. En el fondo de cada uno se colocó una base de acrílico con 32 orificios como soporte del sustrato. El aire se distribuyó a cada columna en forma controlada en 2 vkgm (L de aire por kg de medio por min). El proceso de cultivo del hongo fue de 14 días, durante el cual se tomó

una unidad experimental cada 12 h. Se homogenizó el contenido de la columna para garantizar la representatividad de la muestra. Se realizaron tres réplicas por cada experimento.

Se empleó como sustrato para la fermentación en estado sólido bagazo de caña (86 % w/w) proveniente del central “Paquito Rosales”, zafra 2016 – 2017, enriquecido con polvo de arroz (14 % w/w). Se empleó un tamaño de partícula (-3,00 +0,85) mm de bagazo previamente esterilizado durante 40 min a 1 atm y 121 °C. Se ajustó la humedad del medio a 50 %.

Se estudió el crecimiento de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) tratado con campo magnético y se comparó con el experimento control.

Se realizó el ajuste de los modelos mediante el programa OriginPro (OriginLab Inc.) versión 9.4 (2017). Los modelos seleccionados se muestran en la tabla 1 con la ecuación según la forma que aparece en el programa. No se realizó la reparametrización de los mismos porque estos modelos permiten realizar inferencias directas sobre la interpretación biológica de sus parámetros ^(12; 13).

Tabla 1
Ecuaciones de los modelos matemáticos aplicados para la estimación del crecimiento de *T. harzianum* Rifai (A-34) a 30 °C en fermentación en estado sólido aireada

Modelos	Ecuación
Gompertz	$y = \frac{a}{1 + e^{-k(x-x_c)}}$ (1)
Logístico	$y = \frac{a}{1 + e^{-k(x-x_c)}}$ (2)

donde

y es la variable dependiente, equivalente al número de células contadas [conidios · g de sustrato⁻¹];

x es la variable independiente, equivalente al tiempo de fermentación, t [h];

a es el valor asintótico cuando el tiempo crece indefinidamente (aproximadamente equivalente a la concentración final de microorganismos);

k es la tangente en el punto de inflexión de la curva de crecimiento, equivalente a la velocidad específica de crecimiento máximo del microorganismo μ_m [h⁻¹] y

x_c es el tiempo en que se alcanza el punto de inflexión o de máxima velocidad de crecimiento [h].

Para la validación estadística de los modelos, se estudiaron los valores residuales por los criterios: Criterio de Información de Akaike (AIC, por sus siglas en inglés), R^2 ajustado, χ^2 (Chi-cuadrado), Mínimo cuadrado de los residuos y Prueba de Fisher. Se comprobó la normalidad de los residuos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov [5].

Resultados y discusión

Se obtuvo el comportamiento del conteo de conidios en función del tiempo de fermentación de los experimentos tratados magnéticamente y sin tratamiento magnético (figura 1). El número de conidios inicial fue de $2,79 \cdot 10^7 \pm 7,59 \cdot 10^6$ conidios/g de sustrato. El crecimiento alcanzó un valor máximo de $1,26 \cdot 10^9$ conidios/g de sustrato en el experimento con tratamiento magnético para 120 h de fermentación. Los resultados obtenidos en el presente estudio son similares a los obtenidos por Cruz Martínez [14] en un fermentador de bandejas para *Trichoderma koningii* en un sustrato compuesto por arroz y salvado de trigo, que obtuvieron valores de concentración de conidios entre 10^8 y 10^9 conidios/g de sustrato. Agamez Ramos *et al.* [15] obtuvieron valores de concentración de conidios en el orden de 10^9 conidios/g de sustrato en la fermentación en estado sólido de *Trichoderma sp.* sobre sustratos a base de cabecilla de arroz y de semilla de algodón enriquecidos con melaza y urea. Elósegui Claro *et al.* [16] reportaron valores del orden de 10^9 conidios/g de sustrato para *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) con arroz partido y cáscara de arroz como sustrato. En el presente estudio se logran valores similares de concentración de conidios con un sustrato que, a diferencia del arroz, no tiene uso como suplemento alimenticio y esto es un valor añadido de este trabajo.

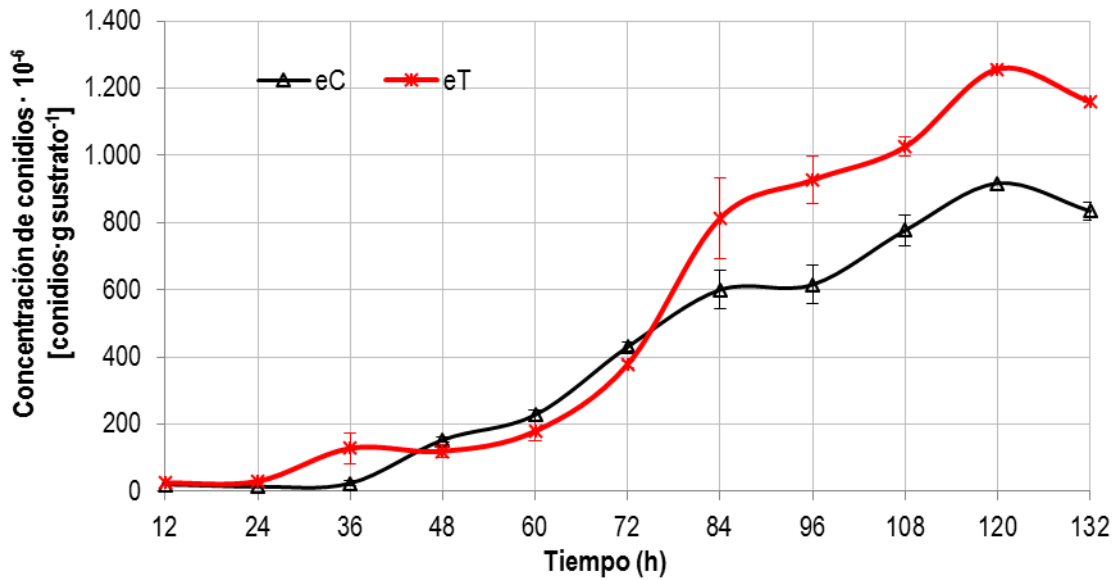


Fig. 1- Efecto del campo magnético en la concentración de conidios de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) en la fermentación en estado sólido aireada sobre bagazo de caña a 30 °C.

donde

eT: Biorreactor con *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) tratado magnéticamente y eC: Biorreactor con *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) sin tratamiento.

Se obtuvieron los coeficientes que describen el modelo de Gompertz y Logístico para los datos de la concentración de biomasa de *T. harzianum* Rifai (A-34) para el experimento control y el desarrollado con el hongo tratado con campos magnéticos en fermentación en estado sólido aireada a 30 °C (tablas 2 y 3).

Tabla 2

Ajuste del modelo de Gompertz para los datos de la concentración de biomasa de *T. harzianum* (A-34) para el experimento control y el desarrollado con el hongo tratado con campos magnéticos en fermentación en estado sólido aireada a 30 °C

	$a \pm$ Error Estándar	$x_c \pm$ Error Estándar	$k \pm$ Error Estándar	X^2 Red.	Suma C. Resid.	R^2 Ajust.
Control	$9,66 \cdot 10^8 \pm 7,14 \cdot 10^7$	$67,3490 \pm 3,0371$	$0,0371 \pm 0,0062$	$1,89 \cdot 10^{15}$	$1,89 \cdot 10^{16}$	0,9846
Tratado	$1,28 \cdot 10^9 \pm 9,13 \cdot 10^7$	$72,6349 \pm 2,5576$	$0,0504 \pm 0,0102$	$5,23 \cdot 10^{15}$	$5,23 \cdot 10^{16}$	0,9781

Tabla 3

Ajuste del modelo Logístico para los datos de la concentración de biomasa de *T. harzianum* (A-34) para el experimento control y el desarrollado con el hongo tratado con campos magnéticos en fermentación en estado sólido aireada a 30 °C

	$a \pm$ Error Estándar	$x_c \pm$ Error Estándar	$k \pm$ Error Estándar	X^2 Red.	Suma C. Resid.	R^2 Ajust.
Control	$8,91 \cdot 10^8 \pm 4,45 \cdot 10^7$	$75,460 9 \pm 2,888 6$	$0,062 6 \pm 0,008 5$	$2,06 \cdot 10^{15}$	$2,06 \cdot 10^{16}$	0,983 2
Tratado	$1,22 \cdot 10^9 \pm 5,50 \cdot 10^7$	$79,345 1 \pm 2,326 9$	$0,077 8 \pm 0,011 1$	$3,94 \cdot 10^{15}$	$3,94 \cdot 10^{16}$	0,983 5

Existen diferencias significativas entre los valores de velocidad específica máxima de crecimiento de *T. harzianum* Rifai (A-34) para el experimento control y el desarrollado con el hongo tratado con campos magnéticos en fermentación en estado sólido aireada a 30 °C obtenido mediante los dos modelos. Pla *et al.* [17] reportaron valores mayores de velocidad específica máxima del crecimiento de *Listeria monocytogenes* CECT 4031 cuando se emplean los modelos Logístico ($0,22 \text{ h}^{-1}$) y Richards ($0,32 \text{ h}^{-1}$) comparados con los determinados por el método gráfico ($0,15 \text{ h}^{-1}$). Para seleccionar el modelo que mejor ajusta los datos experimentales se realizó la validación estadística de los mismos (tablas 4 y 5).

Tabla 4

Criterio de Información de Akaike para los modelos que describen la concentración de biomasa de *T. harzianum* (A-34) en fermentación en estado sólido aireada a 30 °C

	Suma Cuadrados Residuos	N	Parámetros	AIC	Peso de Akaike
Gompertz	$2,65 \cdot 10^{16}$	13	3	471,268 4	0,014 8
Logístico	$1,39 \cdot 10^{16}$	13	3	462,870 8	0,985 2

Como puede observarse en la tabla 4, el modelo Logístico tiene un menor valor de AIC por lo que es más probablemente correcto.

Tabla 5

Criterio de Información Bayesiano para los modelos que describen la concentración de biomasa de *T. harzianum* (A-34) en fermentación en estado sólido aireada a 30 °C

	Suma Cuadrados Residuos	N	Parámetros	BIC	Diferencia BIC
Gompertz	$2,65 \cdot 10^{16}$	13	3	468,528 2	8,397 5
Logístico	$1,39 \cdot 10^{16}$	13	3	460,130 6	0

A partir de los datos reflejados en la tabla 5, se puede concluir que el modelo Logístico tiene un menor valor de BIC por lo que es más probablemente correcto.

El modelo Logístico ajustó más adecuadamente los datos experimentales, por lo que se selecciona para describir los datos de concentración de biomasa para el experimento control (ecuación 1) y para los datos del hongo tratado con campos magnéticos en fermentación en estado sólido aireada a 30 °C (ecuación 2).

$$X = \frac{8,91 \cdot 10^8}{1 + e^{-0,0626(t-75,4609)}} \quad (1)$$

$$X = \frac{1,22 \cdot 10^9}{1 + e^{-0,0778(t-79,3451)}} \quad (2)$$

Los valores de k en el modelo representan la velocidad específica máxima de crecimiento y, como se observa, estos resultan superiores para el experimento desarrollado con el hongo tratado con campos magnéticos ($0,08 \text{ h}^{-1}$) comparados con el experimento desarrollado con el hongo sin tratamiento ($0,06 \text{ h}^{-1}$).

Zapata M. *et al.* [18] indicaron que los campos magnéticos estáticos de moderada intensidad alteran el flujo de iones a través de la membrana plasmática, lo que genera como resultado neto una modificación en la velocidad de reproducción celular.

Al comparar los valores de la constante a de ambas ecuaciones se puede apreciar que la mayor formación de biomasa se encontró para la muestra tratada con $1,22 \cdot 10^9$ conidios $\cdot \text{g}$ de sustrato $^{-1}$, lo que representa 1,4 veces más que el obtenido para la muestra control.

Aunque no hay una teoría generalmente aceptada concerniente a las reacciones de microorganismos al campo magnético estático de moderada intensidad, estas son usualmente interpretadas en términos de los cambios ocurridos en la permeabilidad de las membranas. Se ha sugerido que los

mecanismos de los efectos campo-inducción en células pueden ser explicados en términos de la cinética de las reacciones bioquímicas, de los enlaces químicos, los estados físicos de las macromoléculas y la modificación indirecta de las reacciones intermedias [4].

Conclusiones

Las expresiones obtenidas en este trabajo, son un aporte importante para describir la cinética microbiana bajo condiciones de estimulación del crecimiento de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) por la acción del campo magnético en la fermentación a partir bagazo de caña en la fermentación en estado sólido.

Referencias bibliográficas

1. MÁS-DIEGO, S., M.; GONZÁLEZ MORLÁ, A., CAMPOS-SOFÍA, M.; CABEZA PULLÉS, D. "Growth of *Trichoderma reesei* on static and dynamic solid substrate fermentation under electromagnetic fields." En: ROUSSOS, S.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A.; AUGUR, C. ed. *New Horizons in Biotechnology*. Dordrecht: Springer Science+Business Media, 2003, pp. 57-62. ISBN 978-90-481-6468-4.
2. COTES PRADO, A. M. Producción masiva y formulación de microorganismos biocontroladores de fitopatógenos. En *Proceedings of the Seminario Internacional Control Biológico de Fitopatógenos*, Santafé de Bogotá (Colombia), 997, AGROPECUARIA, C.C.D.I. ed. CORPOICA, 18-23.
3. KUMAR, S.; THAKUR, M.; RANI, A. "*Trichoderma*: Mass production, formulation, quality control, delivery and its scope in commercialization in India for the management of plant diseases". *African Journal of Agricultural Research*. 2014, 9, pp. 3838-3852.
4. CAYRÉ, M., E.; VIGNOLO, G.; GARRO, O. A. *Validación y comparación de modelos de crecimiento microbiano*. Argentina: Universidad Nacional del Nordeste, 2001. 4 p.

5. GUERRA, C., W.; CABRERA, A.; FERNÁNDEZ, L. "Criterios para la selección de modelos estadísticos en la investigación científica". *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 2003, 37(1), pp. 3-10.
6. CAYRÉ, M., E; VIGNOLO, G. M; GARRO, Oscar A. "Selección de un modelo primario para describir la curva de crecimiento de bacterias lácticas y *Brochothrix thermosphacta* sobre emulsiones cárnicas cocidas". *Información tecnológica*. 2007, 18(3), pp. 23-29.
7. TREMARIN, A.; ARAGÃO, G. M. F.; SALOMÃO, B. C. M.; BRANDÃO, Teresa R. S., *et al.* "Modeling the soluble solids and storage temperature effects on *Byssochlamys fulva* growth in apple juices". *Food and Bioprocess Technology*. April 01 2017, 10(4), pp. 720-729.
8. ESSER, D., S.; LEVEAU, J. H. J.; MEYER, K. M. "Modeling microbial growth and dynamics". *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015/11/01 2015, 99(21), pp. 8831-8846.
9. TJØRVE, E; TJØRVE, Kathleen M. C. "A unified approach to the Richards-model family for use in growth analyses: Why we need only two model forms". *Journal of theoretical biology*. 12/7/ 2010, 267(3), pp. 417-425.
10. BARANYI, J. "Modelling and parameter estimation of bacterial growth with distributed lag time". Tesis doctoral inédita. ROBERTS, T. (dir.) University of Szeged 2010.
11. HILLS, BP; WRIGHT, KM. "A new model for bacterial growth in heterogeneous systems". *Journal of theoretical biology*. 1994, 168(1), pp. 31-41.
12. ZWIETERING, MH; JONGENBURGER, II; ROMBOUTS, FM; VAN'T RIET, K. "Modeling of the bacterial growth curve". *Applied and Environmental Microbiology*. 1990, 56(6), pp. 1875-1881.
13. FERNÁNDEZ, T. J.; MUÑIZ, J. A.; PEREIRA, A. A.; MUÑIZ, Fabiana Rezende, *et al.* "Parameterization effects in nonlinear models to describe growth curves". *Acta Scientiarum*. 2015, 37(4), pp. 397-402.
14. CRUZ MARTÍNEZ, L. C. "Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* Th003 mediante fermentación bifásica

a escala piloto". Tesis de Grado inédita. DÍAZ GARCÍA, A.; COTES PRADO, A.M. (dir.) Pontificia Universidad Javeriana, 2007.

15. AGAMEZ RAMOS, E. Y.; ZAPATA NAVARRO, Raúl Ignacio; OVIEDO ZUMAQUE, L. E.; BARRERA VIOLETH, J. L. "Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp.". *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2008, 10(2), pp. 23-34.

16. ELÓSEGUI CLARO, O.; FERNÁNDEZ-LARREA VEGA, O., PONCE GRIJUELA, E.; BORGES MARÍN, G., *et al.* "Colecta de esporas de *Trichoderma harzianum* Rifai cepa A34 por lecho fluidizado y ciclón dual". *Fitosanidad*. 2009, 13(4), pp. 265-269.

17. PLA, María-Leonor; OLTRA, Sandra; ESTEBAN, María-Dolores; ANDREU, Santiago, *et al.* "Comparison of primary models to predict microbial growth by the plate count and absorbance methods". *BioMed Research International*. 2015, pp. 14.

18. ZAPATA M., J., E; MORENO O., G.; MÁRQUEZ F., E. J. "Efectos de los campos magnéticos sobre el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*". *Interciencia*. 2002, 27, pp. 544-550.

19. ROSEN, A., D. "Studies on the Effect of Static Magnetic Fields on Biological Systems". *PIERS Online*. 2010, 6, pp. 133-136.