



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ
MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

CARRERA AGRÍCOLA

**TESIS PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÍCOLA**

TEMA:

**EVALUACIÓN DE LOS TIEMPOS DE SECADO DE LA ARCILLA
COMO MEDIO PARA LA CONSERVACIÓN DE *Trichoderma*
harzianum Y *Trichoderma longibrachiatum***

AUTOR:

CRISTHIAN JUNIOR BURGOS COBEÑA

TUTOR:

ING. ÁNGEL MONSERRATE GUZMÁN CEDEÑO, PhD.

CALCETA, OCTUBRE 2017

DERECHOS DE AUTORÍA

Cristhian Junior Burgos Cobeña, declara bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, y que hemos consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración cedemos los derechos de propiedad intelectual a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual y su reglamento.

.....
CRISTHIAN JUNIOR BURGOS COBEÑA

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

Ángel Monserrate Guzmán Cedeño, certifica haber tutelado la tesis **EVALUACIÓN DE LOS TIEMPOS DE SECADO DE LA ARCILLA COMO MEDIO PARA LA CONSERVACIÓN DE *Trichoderma harzianum* Y *Trichoderma longibrachiatum***, que ha sido desarrollada por Cristhian Junior Burgos Cobeña, previa la obtención del título de Ingeniero Agrícola, de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TESIS DE GRADO DE TERCER NIVEL** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

.....
ING. ÀNGEL MONSERRATE GUZMÁN CEDEÑO PH.D.

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes del tribunal correspondiente, declaran que han APROBADO la tesis **EVALUACIÓN DE LOS TIEMPOS DE SECADO DE LA ARCILLA COMO MEDIO PARA LA CONSERVACIÓN DE *Trichoderma harzianum* Y *Trichoderma longibrachiatum***, que ha sido propuesta, desarrollada y sustentada por Cristhian Junior Burgos Cobeña, previa la obtención del título de Ingeniero Agrícola, de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TESIS DE GRADO DE TERCER NIVEL** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

.....
ING. ANGEL FROWEN CEDEÑO SACON
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

.....
ING. FABRICIO ENRINQUE ALCIVAR INTRIAGO
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

.....
ING. GONZALO BOLIVAR CONSTANTE TUBAY
PRESIDENTE

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por darme la vida, la fuerza y la perseverancia en mis estudios, a mis padres por ser quienes me han llevado por el camino del bien, del amor, de la justicia y de la sabiduría, que han sabido educarme, amarme, respetarme y sobre todo apoyarme incondicionalmente, a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López que me dio la oportunidad de una educación superior de calidad y en la cual he forjado mis conocimientos profesionales día a día; .

A mis catedráticos que al igual que mis padres también aportaron con mi educación y a mi tutor por ayudarme y apoyarme en la realización de esta tesis.

Cristhian Junior Burgos Cobeña
Autor

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios contando con su bendición, y por haberme dado la vida, la fortaleza, el coraje, la valentía y el ánimo de seguir adelante sin depender de nadie a excepción de mis padres. A mis padres por apoyarme siempre y porque me han inculcado las buenas costumbres llevándome por el camino correcto, justo y moral. A mis hermanos que siempre están conmigo en las buenas y malas situaciones,

CRISTHIAN JUNIOR BURGOS COBEÑA

CONTENIDO

DERECHOS DE AUTORÍA.....	ii
CERTIFICACIÓN DEL TUTOR.....	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
DEDICATORIA.....	vi
CONTENIDO.....	vii
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
CAPITULO I. ANTECEDENTES.....	1
1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	1
1.2. JUSTIFICACIÓN.....	2
1.3. OBJETIVOS.....	3
1.3.1. Objetivo General.....	3
1.3.2. Objetivos Específicos.....	3
1.4. HIPÓTESIS.....	3
CAPITULO II. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. LOS BIOPLAGUICIDAS.....	4
2.1.1. Formulación de insumos biológicos.....	5
2.1.2. Formulación basada en quitina y sus derivados.....	7
2.1.3. Sustratos descritos por otros autores.....	7
2.2. VEHÍCULO O MEDIO DE CONSERVACIÓN PARA MICRORGANISMOS EFICIENTES UTILIZADOS EN LA AGRICULTURA.....	8
2.2.1. Arcilla como vehículo de conservación.....	9
2.2.2. Condiciones de almacenamiento.....	10
2.3. OBTENCIÓN MASIVA DE INÓCULOS.....	10
CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO.....	13
3.1. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	13
3.2. DELINEAMIENTO EXPERIMENTAL.....	13
3.3. MANEJO DEL EXPERIMENTO.....	14
3.4. VARIABLES DE CALIDAD ANALIZADAS DEL INOCULANTE BIOLÓGICO A BASE DE ARCILLAS.....	15
CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	18
4.1. VARIABLES DE CALIDAD DEL PRODUCTO FINAL.....	18
CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	27

5.1. CONCLUSIONES	27
5.2. RECOMENDACIONES	27
BIBLIOGRAFÍA.....	28
ANEXOS	32

CONTENIDO DE CUADROS Y GRÁFICOS

Cuadros:

CUADRO 2.1. TIPOS Y DESCRIPCIÓN DE LAS PRINCIPALES FORMULACIONES.....	6
CUADRO 3.1. RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS QUÍMICOS EN PPM.....	14
CUADRO 3.2. RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS FÍSICOS.....	14
CUADRO 4.1. PORCENTAJES DE GERMINACIÓN DE ESPORAS.....	19
CUADRO 4.2. PORCENTAJE DE PUREZA INICIAL DEL BIOINSUMO.....	19
CUADRO 4.3. PORCENTAJE DE PUREZA FINAL DEL BIOINSUMO.....	20
CUADRO 4.4. ANOVA DIFERENCIAS ESTADÍSTICAS DE LOS PROMEDIOS DE VIABILIDAD ENTRE LOS TRATAMIENTOS.....	24
CUADRO 4.5. DIFERENCIAS ESTADÍSTICAS DE PROMEDIOS DE LOS PORCENTAJES DE HUMEDAD ENTRE TRATAMIENTOS.....	24
CUADRO 4.6. COSTOS DIRECTOS E INDIRECTOS PARA LA PRODUCCIÓN DEL BIOINSUMO.....	25

Gráficos:

GRAFICO 4.1. SOBREVIVENCIA DE TRICHODERMAS INOCULADOS EN ARCILLA A 45°C DE TEMPERATURA Y A DIFERENTES TIEMPOS DE SECADO.....	18
GRAFICO 4.2. VIABILIDAD DE T. HARZIANUM Y T. LONGIBRACHIATUM INOCULADOS EN ARCILLA Y CONSERVADOS A TEMPERATURA AMBIENTE.....	21
GRAFICO 4.3. UFC DE T. HARZIANUM Y T. LONGIBRACHIATUM INOCULADOS EN ARCILLA Y CONSERVADOS A TEMPERATURA AMBIENTE.....	21
GRAFICO 4.4. UFC DE T. HARZIANUM Y T. LONGIBRACHIATUM INOCULADOS EN ARCILLA Y CONSERVADOS A TEMPERATURA AMBIENTE.....	22
GRAFICO 4.5. UFC DE T. HARZIANUM Y T. LONGIBRACHIATUM INOCULADOS EN ARCILLA Y CONSERVADOS A TEMPERATURA AMBIENTE.....	23
GRAFICO 4.6. UFC DE T. HARZIANUM Y T. LONGIBRACHIATUM INOCULADOS EN ARCILLA CONSERVADOS A TEMPERATURA AMBIENTE.....	23

RESUMEN

La investigación se realizó en la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, con el objetivo de conservar viable en el tiempo a los hongos *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* empleando como medio de soporte arcilla proveniente de suelos orgánicos. El factor en estudio fue tiempo de secado de la arcilla con diferentes niveles de evaluación: 1, 2, 3, 4 y 6 horas de secado del portador, las unidades experimentales fueron tarrinas resistentes a altas temperaturas con capacidad para 1000 gramos. Las variables medidas fueron; evaluación del crecimiento de Unidades Formadoras de Colonias durante el secado, porcentaje de germinación de esporas, porcentaje de pureza, seguimiento de la supervivencia de los hongos inoculados en arcilla y porcentaje de humedad del portador. La evaluación durante el secado mostró que el hongo *T. harzianum* fue superior en cuanto al número de Unidades Formadoras de Colonias en todos los tiempos de secado y se mantuvo superior durante los 120 días de evaluación. Los tratamientos 1,2 y 3 horas de secado de la arcilla no cumplieron con los parámetros de calidad por altos contenidos de humedad, en cuanto al tratamiento 6 horas de secado resultó con la humedad exageradamente baja, lo cual no permitió que la mayoría de conidios llegaran con vida al proceso de evaluación; por lo tanto se concluyó que el mejor tratamiento fue el 4 horas de secado de la arcilla por contar con un adecuado porcentaje de humedad y un 95 por ciento de viabilidad de los microorganismos.

PALABRAS CLAVE: Arcilla, soporte, portador, bioinsumo, viabilidad.

ABSTRACT

The research was carried out at Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, with the objective of keeping viable in time the fungi *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma longibrachiatum* using as clay support medium from organic soils. The study factor was the drying time of the clay with different levels of evaluation, which were 1, 2, 3, 4 and 6 hours of drying of the carrier, the experimental units were high temperature resistant pots with capacity for 1000 grams. The measured variables were; evaluation of growth during drying, percentage of spore germination, percentage of purity, monitoring of the survival of fungi inoculated in clay and percentage of humidity. The evaluation during drying showed that the fungus *Trichoderma harzianum*, was superior in the amount of colony forming units at all drying times and remained higher during the 120 days of evaluation. The treatments 1, 2 and 3 hours of clay drying did not meet the quality parameters due to the high moisture contents, as for the treatment 6 hours of drying resulted with the excessively low humidity, which did not allow the majority of the conidia will come alive to the evaluation process; therefore, it was concluded that the best treatment was the 4 hours of clay drying by having an adequate percentage of humidity and a 95 percent viability of the microorganisms

KEYWORDS: Clay, support, carrier, bio-fuel, viability.

CAPITULO I. ANTECEDENTES

1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

La agricultura convencional cada vez gana más territorio a nivel mundial, debido al crecimiento poblacional y por ende la demanda de alimentos; por aquello ha aumentado la mecanización agrícola, así como el indiscriminado uso de plaguicidas y fertilizantes químicos de síntesis, lo cual conlleva a la resistencia de los agentes patógenos, además de provocar la contaminación ambiental y toxicidad en los suelos de uso agrícola, induciendo el deterioro de la fauna microbiana benéfica del suelo, lo que a futuro dejará como resultado suelos estériles sin actividad biológica, poca descomposición de materia orgánica y finalmente suelos desérticos (Rey *et al.*, 2014).

Los mismos autores mencionan que debido a los altos costos de los fertilizantes químicos de síntesis, cobra mayor importancia el desarrollo de sistemas agroproductivos que involucren el uso de biofertilizantes, capaces de incorporar al suelo las cantidades necesarias de nitrógeno, fósforo, potasio y microelementos que requieren las plantas para su desarrollo y producción; y por otro lado el uso de microorganismos antagónicos competitivos para la protección de los cultivos ante patógenos fúngicos del suelo. En especial se reportan especies del genero *Trichoderma* como agente de biocontrol.

Por otra parte Arianna, (2009) menciona que es de vital importancia la obtención de formulaciones sólidas que aumenten la estabilidad en el tiempo y favorezcan su transportación y almacenamiento para la comercialización de los microorganismos eficientes.

Actualmente, en el mercado local y nacional existen pocos productos para el control biológico de plagas en cultivares, y los que existen tienen un alto costo económico para el agricultor, esto se debe al elevado costo de producción de los bioinsumos ya que no se disponen de medidas de soporte (vehículo) de bajos costos que garanticen la sobrevivencia en estado inactivo de los microorganismos

antagonistas hasta su uso en prácticas agrícolas de biocontrol. Por lo expuesto se plantea la siguiente interrogante:

¿Qué material se podría utilizar para crear un vehículo que garantice la viabilidad de *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* en el tiempo?

1.2. JUSTIFICACIÓN

Los estudios realizados en la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López han comprobado las diversas funciones de los hongos filamentosos *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* como aceleradores en el proceso de degradación en compostajes, así como también en el biocontrol de *Fusarium oxiporum*. y *Phytophthora* sp. (Tarazona *et al.*, 2014; Guzmán, 2015; Burgos *et al.*, 2016).

Por ello resulta necesaria la obtención de formulaciones sólidas que aumenten la estabilidad en el tiempo y favorezcan la transportación y almacenamiento de estos microorganismos como agentes biofertilizantes, biocontrol de patógenos o degradadores de residuos sólidos agropecuarios con fines de compostaje (Arianna, 2009). Para la comercialización de los biofertilizantes es importante conservar su calidad el mayor tiempo posible, de lo cual depende la aceptación del producto en la cadena productiva, además que el medio brinde protección y los requerimientos necesarios que mantengan viable al microorganismo (Pallo y Velastegui, 2011). Es necesario contar con métodos de preservación adecuados que permitan mantener a las cepas microbianas viables, de tal forma que no se modifiquen sus características morfológicas, fisiológicas y genéticas (Morales *et al.*, 2010).

Según Rosas y Méndez (sf) las características de los soportes para microorganismos deben ser: de textura fina, baja porosidad, y baja densidad aparente $<1.5 \text{ g/cm}^3$, por las características expuestas se toma como principal opción la arcilla que es abundante en el valle del Rio Carrizal, disminuyendo los costos de producción del bioinsumo.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Conservar viable en el tiempo a los hongos *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* empleando como medio de soporte la arcilla.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el tiempo óptimo de secado de la arcilla para la conservación de *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* a temperatura ambiente.
- Estimar el costo de producción del bioinsumo y precio de venta al público.

1.4. HIPÓTESIS

Al menos uno de los tiempos de secado de la arcilla mantendrá las cepas de hongos viable y con buenas características para la conservación.

CAPITULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. LOS BIOPLAGUICIDAS

Los biopesticidas son derivados de materiales naturales como animales, plantas, microorganismos y minerales. Los bioplaguicidas son altamente específicos contra las plagas objetivo y generalmente representan poco o ningún riesgo para las personas o el medio ambiente. Los pesticidas tradicionales, por el contrario, en general son materiales sintéticos, que no sólo afectan a la plaga objetivo, sino también organismos no deseados, tales como insectos benéficos, la vegetación circundante y la vida silvestre (EPA, 2010).

Sin embargo, existen algunos inconvenientes en cuanto al uso de los bioinsecticidas, por ejemplo, estos pueden ser dañinos para otros organismos que no son el objetivo, o si se trata de un organismo bio regulador, este elimine a otro que es importante en la cadena trófica de un ecosistema, lo que repercutiría en la población de individuos que se alimentan del insecto plaga que se está tratando de regular (Kehrli y Wratten, 2011; Simberloff, 2012). Por lo tanto, se debe tener cuidado cuando se quiera utilizar algún bioinsecticida o introducir algún organismo para este fin.

Los bioplaguicidas son eficaces en el control de plagas agrícolas, sin causar daños graves al ambiente o empeorar la contaminación del medio ambiente. La investigación y el desarrollo de su aplicación práctica en el campo se enfocan a mitigar la contaminación ambiental causada por residuos de plaguicidas químicos, aunque por su naturaleza biológica también promueven el desarrollo sustentable de la agricultura. El desarrollo de nuevos bioplaguicidas estimula la modernización de la agricultura y sin duda, va a reemplazar gradualmente a una cantidad de los plaguicidas químicos. En la producción agrícola, en ambientes libres de contaminación, los bioplaguicidas son sustitutos ideales para sus homólogos químicos tradicionales (Leng *et al.*, 2011).

Los bioplaguicidas se dividen en general en dos grandes grupos: agentes o plaguicidas microbianos, que incluyen las bacterias, hongos, virus y protozoos, y agentes o plaguicidas bioquímicos, que comprenden los atrayentes, hormonas, reguladores del crecimiento de plantas e insectos, enzimas y sustancias de señalización química, muy importantes en la relación planta-insecto (Alfonso, 2002).

El hongo del genero *Trichoderma* tiene una gran importancia a nivel de tecnologías agrícolas, dentro de ella se ha comprobado que el hongo tiene la capacidad de incrementar la tolerancia de plantas al estrés, ya que promueve la proliferación de raíces, participan en la solubilización y asimilación de nutrientes inorgánicos, activa los mecanismos de resistencia de las plantas e inactiva las enzimas de los patógenos (Altomarre *et al.*, 1999; Harman, 2000).

2.1.1. FORMULACIÓN DE INSUMOS BIOLÓGICOS

Actualmente el uso de hongos entomopatógenos (HEP) es reconocido como una alternativa eficiente para el control de plagas de importancia agrícola y su utilización ha ido en aumento, ya sea a través de formulaciones artesanales o comerciales. Dentro de los HEP destacan los géneros *Metarhizium* y *Beauveria*, los que se encuentran distribuidos con amplitud en la naturaleza y en las más diversas zonas climáticas. Varias características hacen de estos hongos los más frecuentemente utilizados como controladores biológicos de insectos (Urtubia y France, 2007).

Los mismos autores mencionan que entre ellas destacan el poseer ciclos reproductivos cortos, la simplicidad de cultivarlos en forma masiva y su abundante producción de conidias (esporas) desde los cadáveres de insectos parasitados, las que posteriormente son diseminadas con facilidad por el aire y quedan disponibles para iniciar un nuevo ciclo infectivo.

Lemus *et al.* (2008) manifiestan que la formulación del hongo entomopatógeno es un proceso mediante el cual el ingrediente activo ya sea conidias o micelio se mezcla con ciertos materiales inertes, tales como vehículos, solventes, emulsificantes o gelificantes, y otros aditivos que pueden ser nutrientes o

estimulantes. Estos materiales favorecen la longevidad del hongo ya sea protegiéndolo del medio ambiente, aumentando su vida útil o mejorando su viabilidad y ayudan a su desarrollo una vez aplicado en el suelo.

Ellos también indican que los insumos utilizados en la formulación deben cumplir con ciertos requisitos, tales como no afectar la actividad del hongo; no tener actividad biológica sobre animales, plantas o insectos benéficos; ser inocuos para el medio ambiente, y presentar características físico-químicas adecuadas para mezclarse con el ingrediente activo. Cabe destacar que, para ser formulado, la viabilidad del hongo no debe ser menor de 95% y el contenido de humedad debe estar entre 4 y 6%. Existen diferentes tipos de formulación, sólidas y líquidas, que pueden ser aplicadas al suelo en forma directa o previamente diluidas en agua. Las principales de ellas se describen en el cuadro 2.1.

Cuadro 2.1. Tipos y descripción de las principales formulaciones

Tipo de formulación	Descripción
Suspensión concentrada	Líquido con el ingrediente activo en suspensión, para aplicar diluido en agua.
Concentrado emulsionable	Líquido homogéneo para ser aplicado como emulsión, luego de ser diluido en agua.
Polvo soluble	Polvo para aplicación luego de dilución de la(s) sustancia(s) activa(s) en agua, en forma de solución verdadera.
Polvo mojable	Polvo para aplicar como suspensión, luego de ser dispersado en agua.
Granulado dispersable	Gránulos para aplicación en forma de suspensión, luego de su desintegración y dispersión en agua.
Polvo seco	Formulación sólida, uniforme, en forma de polvo con buena movilidad, únicamente para aplicación directa en forma de espolvoreo.
Granulado	Formulación sólida, uniforme, en forma de gránulos con dimensiones bien definidas, para aplicación directa.
Granulado encapsulado	Gránulos para aplicación directa, que poseen una cobertura para protección o para liberación controlada de la(s) sustancia(s) activa(s).
Macrogranulado	Gránulos con rango de tamaño entre 2.000 y 6.000 μm
Microgranulado	Gránulos con rango de tamaño entre 100 y 600 μm
Líquido	Producto líquido para aplicar directamente, sin dilución previa.

Fuente: (Lemus *et al.*, 2008).

2.1.2. FORMULACIÓN BASADA EN QUITINA Y SUS DERIVADOS

Según Meyling y Eilenberg (2007) los hongos entomopatógeno tienen la habilidad de parasitar insectos porque pueden hidrolizar la quitina, este compuesto corresponde a una sustancia presente en el exoesqueleto de los insectos y que da la dureza a sus cuerpos. Por consiguiente, la presencia de quitina junto a una formulación de HEP puede favorecer algunos de los requisitos de los hongos.

Los mismos autores mencionan que el desarrollo de formulaciones de HEP de eficacia evaluada permitirá mejorar la persistencia y propagación de estos organismos y, en consecuencia, el control efectivo de las plagas. La presencia de quitina aumentaría la patogenicidad de los hongos, mientras que los otros componentes, junto con facilitar su aplicación, mejorarían la protección contra efectos ambientales, tales como la luz ultra violeta y la deshidratación por viento que sufren las esporas cuando son aplicadas en el campo.

Finalmente manifiestan que los hongos entomopatógeno presentan un reconocimiento cada vez mayor en la biodiversidad de los ecosistemas donde prestan importantes servicios ecosistémicos en la producción agrícola como por ejemplo mantener las plagas en niveles que no ocasionan daños a los cultivos.

2.1.3. SUSTRATOS DESCRITOS POR OTROS AUTORES

En estudios realizados por Fajardo y Sarmiento (2007) hallaron resultados favorables con la melaza de caña de azúcar como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae* a una concentración del 20% p/v.

Por otra parte, Gonzales *et al.* (2007) manifiestan que el jugo de *Aloe vera* es un sustrato vegetal que puede ser utilizado como medio de propagación *in vitro* para las especies probióticas *Lactobacillus plantarum* y *L. casei* obteniendo tasas de crecimiento del orden de 10^9 y 10^{11} , respectivamente.

2.2. VEHÍCULO O MEDIO DE CONSERVACIÓN PARA MICRORGANISMOS EFICIENTES UTILIZADOS EN LA AGRICULTURA

La preservación de microorganismos es un paso muy importante, debido a que estos seres vivos representan un potencial biotecnológico enorme, así que, si se guarda a estos agentes benéficos, de cierta forma se está resguardando dicho potencial, para la correcta conservación de los diferentes microorganismos se debe tomar en consideración tres recomendaciones: ¹Se deben evitar posibles contaminaciones durante el proceso de conservación, ²Durante el tiempo en que los microorganismos permanezcan conservados conviene que sobrevivan en números elevados y ³Los microorganismos conservados deben permanecer genéticamente estables (García y Uruburu, 2000 citado por Morales *et al.*, 2010).

Existen métodos de conservación variados para los distintos microorganismos y es importante mencionar que ninguno de ellos es universal, por lo que se debe elegir el método que más se ajuste a las exigencias del microorganismo que se quiera conservar, la infraestructura del laboratorio y al microorganismo que se desea preservar. El resguardo de las bacterias puede realizarse de tres formas generales preservación a corto, mediano y largo plazo.

Es importante mencionar que la forma de preservar los hongos ha sido poco explorada y mucho del conocimiento que se tiene recabado en la actualidad se ha obtenido de forma empírica (García y Uruburu, 2000; Uruburu, 2003).

La preservación a corto plazo se utiliza cuando los laboratorios no tienen un potencial económico suficiente, por ejemplo, no hay ultras congeladores, el método comúnmente usado es la resiembra continua, el microorganismo en cuestión se siembra en su medio adecuado y una vez crecido se guarda a 4°C donde se mantiene para su uso y se vuelve a resembrar en un tiempo no mayor a un mes. El gran problema de la resiembra continua de un microorganismo, es que se pueden generar mutaciones y adaptación al medio de cultivo, lo que termina generando cepas “domesticadas” cuyo comportamiento ya no representa a la especie inicialmente aislada (Cooper, 2002; González *et al.*, 2007).

En el Ecuador y particularmente en Manabí, se ofertan inóculos importados, como aceleradores del proceso de compostaje; sin embargo, no se ha comprobado su eficiencia e inocuidad. Por lo tanto, no es posible referir con especificidad los resultados de su uso (MAGAP, 2008 citado por Guzmán *et al.*, 2015).

2.2.1. ARCILLA COMO VEHÍCULO DE CONSERVACIÓN

En resultados obtenidos por Zambrano *et al.* (2015) la sobrevivencia del cultivo de *T. longibrachiatum* inoculados en arcilla a 45°C de temperatura, se observó que el hongo mantiene la viabilidad durante tres meses.

En La Habana Cuba se encontró una buena tolerancia a la humedad en conidios almacenados con una humedad relativa del 4-5%; este nivel de secado puede dificultar la aplicación práctica en sistemas de baja tecnología o artesanales, por ello se han empleado diversos tipos de arcillas para incrementar la viabilidad de los microorganismos en almacenamiento lo que ha dejado buenos resultados en cuanto a la estabilidad y efectividad en campo (Moore y Higgins, 1997 citado por Gato, 2010).

Por otra parte, Lemus *et al.* (2008) mencionan que uno de los recursos naturales que muestran excelentes características para el almacenamiento de microorganismos es la arcilla, por su abundancia y bajo costo.

En los ensayos realizados por Rey *et al.* (2014) se utilizó como soporte una mezcla de turba y cascarilla de arroz, con una proporción de 1:3, la cual fue molida y tamizada en una malla de 0,16 mm. Dicho soporte se esterilizó en una autoclave, a 121°C y 15 libras de presión (15 min), durante tres días consecutivos, de acuerdo con las características del pH inicial del soporte (5,3), se realizó la corrección a un pH cercano a 6,5, mediante la adición de CaCO₃ lo que presentó resultados positivos en cuanto a viabilidad durante un año de microorganismos del genero *Trichoderma*.

2.2.2. CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Para Estrada (2008) un adecuado almacenamiento debe poseer las siguientes características:

a) Características físicas y químicas

Los inoculantes se deben esterilizar fácilmente y en lo posible deben ser uniformes en cuanto a sus características químicas y físicas. También deben tener una calidad constante, una alta capacidad de retención de agua (para los soportes húmedos) y ser adecuados para el mayor número de especies y cepas bacterianas como sea posible.

b) Características ambientales

Aparte de ser biodegradable, no debe ser tóxico, ni contaminante, reduciendo al mínimo el riesgo al medio ambiente, como la dispersión de células a la atmósfera o aguas subterráneas.

c) Calidad en el almacenamiento

Debe tener suficiente período de vida (uno o dos años a temperatura ambiente a menudo es necesario para el éxito de la integración en el sistema de distribución agrícola en algunos países).

2.3. OBTENCIÓN MASIVA DE INÓCULOS

Ulla (2015) indica que la producción de inoculantes empieza con la obtención de cepas de microorganismos deseados, los cuales se los encuentra comúnmente en cuatro tipos de soporte como son:

- a) Cultivos sobre soportes sólidos en bandejas, frascos o bolsas. En este tipo de formulaciones se incluye un soporte sólido, que ocupa el mayor volumen del recipiente; el proceso de secado se da por diversas técnicas como congelación, silicagel y/o liofilización. Proporcionan una vida útil larga ya que mantiene las células en estado seco.

- b) Cultivos líquidos agitados (fermentación sumergida). Se desarrolla sobre sustratos sólidos a los cuales se les puede añadir agua o caldo nutritivos que contengan microorganismos antagonistas.
- c) Cultivos líquidos en condiciones estáticas. Se emplean subproductos de la industria azucarera y de la agricultura, se lo realiza en frascos que se colocan en cámaras de reposo con temperatura controlada.
- d) Cultivos bifásicos. Se realiza el inóculo en forma líquida agitado o estático y posteriormente se pasa a soporte sólido.

Según Rey *et al.* (2014) un preinóculo se prepara de acuerdo a las exigencias del organismos objetivo, en general como medio de establecimiento un preinóculo debe contener en 500 mL de medio líquido extracto de raíces de leguminosas, levadura y melaza (extracto de raíz de *A. acuminata*, 0,1 mL/L; 50 g de extracto de carne bovina en 1 L de agua; 100 mL de medio BAP disuelto en 1 L de agua; solución stock de micronutrientes (g/L): $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 1,81 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0,025; solución stock de vitaminas (mg/100 mL): tiamina HCL 10, piridoxina HCL 5, ácido nicotínico 50, biotina 22,5, ácido fólico 10, riboflavina 10; solución buffer KH_2PO_4 1 mL, K_2HPO_4 1 mL).

Luego se agita constante (150 rpm) con una temperatura de 36°C durante cinco días. Posteriormente el preinóculo se introducirá en 1000 mL de medio de cultivo, por cinco días, en las mismas condiciones de incubación. Asimismo, los cultivos se homogenizan con agitador magnético y plancha mecánica hasta lograr el rompimiento de las colonias.

Lozano *et al.* (2016) mencionan que la viabilidad es la medida de la cantidad de estructuras (conidios) que tengan la capacidad de germinar, expresada en porcentaje. El estándar recomendado para la utilización de hongos entomopatógenos como agentes de control biológico es de una viabilidad mayor del 80%. La viabilidad o proporción de conidios vivos disminuye con el tiempo, esto depende de las condiciones en las cuales son almacenados, esta prueba debe ser realizada al momento de la extracción y formulación del material, a diferentes intervalos de tiempo durante el periodo de almacenamiento y antes de ser usado, de hecho, diferentes factores nutricionales y factores ambientales

como la temperatura, luz y pH afectan la viabilidad, germinación, crecimiento vegetativo y esporulación.

Las formulaciones a base de HEP tienen un tiempo de vida media entre 6 y 12 meses, una de las razones por el cual presentan un tiempo corto es su débil estabilidad a altas temperaturas. Sin embargo, es posible que la edad y condiciones del inóculo usados para almacenar, puedan contribuir en la viabilidad y estabilidad morfológica en periodos largos (Borman *et al.*, 2006 citado por Lozano *et al.*, 2016).

Según García *et al.* (2006) el hongo *Trichoderma* logra mantener una viabilidad de hasta 95%; además en experimentos en campo muestran antagonismo por parasitismos, antibiosis y competencia por espacio en pruebas de contraste *in vitro* contra los hongos patogénicos *Sclerotium cepivorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxiporum* y *Phytophthora* sp. Por otra parte, mencionan que el hongo se puede almacenar formulado en diferentes medios inertes orgánicos e inorgánicos, con una estabilidad mantenida por 2 años.

CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

3.1. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La investigación se desarrolló durante los meses marzo-septiembre del año 2017, en el laboratorio de Biología Molecular de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, situada en el sitio El Limón, parroquia Calceta, cantón Bolívar, provincia de Manabí, geográficamente localizada en las siguientes coordenadas: Latitud Sur: 0° 49'27.9", y 80°10'27" Longitud Oeste, y una Altitud de 15 msnm ^{1/}.

3.2. DELINEAMIENTO EXPERIMENTAL

a) Factor en estudio

Tiempos de secados de la arcilla (A)

b) Niveles del factor

1, 2, 3, 4 y 6 horas de secado de la arcilla.

c) Tratamientos

Códigos	Tiempos de secado (horas)
A 1	1
A 2	2
A 3	3
A 4	4
A 5	6

d) Material experimental

- *T. harzianum*
- *T. longibrachiatum*

e) Unidad experimental

Tarrina plástica (1000 g).

1/. Estación Agrometeorológica de Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

f) Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con tres repeticiones, los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza y prueba de Tukey, utilizando el software estadístico “infoStat” versión 2014 (Di Rienzo *et al.*, 2014).

3.3. MANEJO DEL EXPERIMENTO

a) Análisis físico-químico de la arcilla

Se tomó una muestra de un kg y se la envió a la Estación Experimental Tropical “Pichilingue” laboratorios de suelos, tejidos vegetales y agua, situados en el kilómetro 5 de la vía Quevedo-El Empalme obteniendo las siguientes características físico-químicas descritas en los cuadros 3.1 y 3.2:

Cuadro 3.1. Resultados de los parámetros químicos en ppm.

N	P	K	Ca	Mg	S	B	Zn	Cu	Fe	Mn
39	156	903	5410,5	923,6	15	0,66	9,8	10,5	79	39,1

Cuadro 3.2. Resultados de los parámetros físicos

pH	% MO	DA
7,4	3,2	0,98

b) Elaboración de soporte

El soporte fue elaborado a base de suelo arcilloso recolectado del área orgánica correspondiente a la ESPAM MFL; el suelo fue molido y pasado por un tamiz de 0,02 mm; el portador se esterilizó en autoclave a una temperatura de 121°C y 15 libras de presión (15 min), durante tres días consecutivos. El secado de la arcilla se efectuó en estufa a una temperatura de 70°C por 24 horas.

c) Preparación del preinóculo

Los hongos utilizados en este estudio se tomaron de los resultados de un proyecto de investigación de la Politécnica de Manabí titulado: ***Contribución al desarrollo de una producción agropecuaria eficiente y sostenible en Ecuador con el uso de bioproductos microbianos autóctonos***. Se obtuvieron cajas Petri con abundante crecimiento de *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* y se removieron los conidios con solución de tween 80 al 0,5% y con la solución resultante se ejecutaron diluciones seriadas con base 10 hasta 10^{-9} y con las últimas tres diluciones se llevó a cabo el recuento de conidios en la cámara de Neubauer de 0 a 100 mm, este procedimiento se realizó cinco veces. La concentración conocida de conidios fue incubada en 500 mL de caldo arroz al 3% p/v con agitación de 250 revoluciones por minutos (rpm) durante 72 horas a una temperatura de incubación de 30°C (González y Rondón 1998 citados por Rey *et al.*, 2014).

a) Inoculación de la arcilla

Se realizó en tarrinas plásticas resistentes a altas temperaturas con capacidad para 1000 g y se utilizó 500 g de arcilla por tarrina con 225 mL de agua destilada, estas tarrinas fueron sometidas a un proceso de esterilización en autoclave durante 10 minutos a 121°C tres veces consecutivas, luego se agregó 25 mL de cultivo líquido de *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* al portador estéril y se designó como control una tarrina con el portador estéril sin inocular (Matos y Zúñiga 2003).

3.4. VARIABLES DE CALIDAD ANALIZADAS DEL INOCULANTE BIOLÓGICO A BASE DE ARCILLAS

a) Evaluación del crecimiento durante el secado

El secado se realizó en estufa a 45°C y a diferentes tiempos de evaluación (1, 2, 3, 4 y 6 horas). Después de cada tiempo de evaluación se efectuaron diluciones seriadas para su posterior siembra y recuento de UFC en placas; el medio de cultivo utilizado fue agar sabouraud (Stanier e Ingraham, 1996).

b) Porcentaje de germinación (18–24 horas)

El porcentaje de germinación de esporas se realizó en una cámara de crecimiento, que consistió en una caja de Petri que contenía papel absorbente, un triángulo de vidrio, un porta objeto y cubre objeto; se colocó un cuadrado de medio de cultivo PDA (1 cm x 1 cm) en el porta objeto, y sobre él, se aplicó una suspensión de esporas de baja concentración, con el asa de platino con diámetro de 4 mm, se efectuaron 3 observaciones con el microscopio 0, 18 y 24 horas para determinar el número de esporas germinadas (Godoy *et al.*, 2007).

c) Porcentaje de pureza

Se calculó el porcentaje de pureza mediante la metodología expuesta por Gómez y Mendoza (2014) que consistió en utilizar el medio de cultivo agar sabouraud y colocar de 10 a 15 mL por caja Petri esterilizada. Luego se tomaron los tubos de la dilución 10^{-3} de cada submuestra, se agitan en el vortex durante un minuto y se toma 50 μ L para inocular en cada caja, dispersando el inóculo con la ayuda de un rastrillo bacteriológico esterilizado. Las cajas inoculadas se incubaron a una temperatura de 27°C por 72 horas, con el fin de promover el desarrollo de las unidades formadoras de colonias (UFC). Luego se identificó el hongo deseado, se anota el número de UFC de *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* y el número de UFC de otros microorganismos (hongos, bacterias y levaduras). Para el cálculo de pureza (P) se utiliza la siguiente formula:

$$\% P = \frac{\text{UFC del hongo deseado}}{\text{UFC totales}} \times 100$$

d) Seguimiento de la sobrevivencia del hongo *T. harzianum* y *T. longibrachiatum*.

A los 7, 15, 30, 60, 90 y 120 días de almacenamiento se evaluó la sobrevivencia de las cepas fúngicas *T. harzianum* y *T. longibrachiatum*, determinando el número de unidades formadoras de colonia (UFC) por el método de dilución decimal y el recuento en placa; el medio de cultivo utilizado fue agar sabouraud.

e) Calculo del porcentaje de humedad

La determinación de humedad se la obtuvo mediante la siguiente formula:

$$Ss(\%) = \frac{(m2-m)}{(m1-m)} \times 100$$

Siendo:

Ss(%)= sustancia seca en porcentaje

m= masa de la capsula en gramos

m1= masa de la capsula con la muestra en gramos

m2= masa de la capsula con la muestra después del secado, en gramos.

f) Costo de producción del bioinsumo

Se realizó teóricamente considerando los costos de producción del bioinsumo y tomando como punto de referencia el mejor tratamiento, el trabajo durante un mes de producción por una persona y los beneficios calculados con base en el nivel de concentración y vida útil de los microorganismos en la arcilla.

CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. VARIABLES DE CALIDAD DEL PRODUCTO FINAL

a) Evaluación del crecimiento durante el secado

Según López (2011) el hongo *Trichoderma* de especie *Harzianum* es más fácil reproducirlo frente a otros hongos de su mismo género ya que puede colonizarse en distintos medios de cultivos y en muchos casos si las condiciones ambientales son favorables puede crecer agresivamente en el campo; en este estudio previo a cuatro meses de evaluación de viabilidad de los hongos *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* inoculados en arcilla con 2 mm de tamaño se comprobó que el hongo *T. harzianum* obtuvo un mayor número de UFC por g de arcilla y fue superior en todos los tiempos de secado (Grafico 4.1).

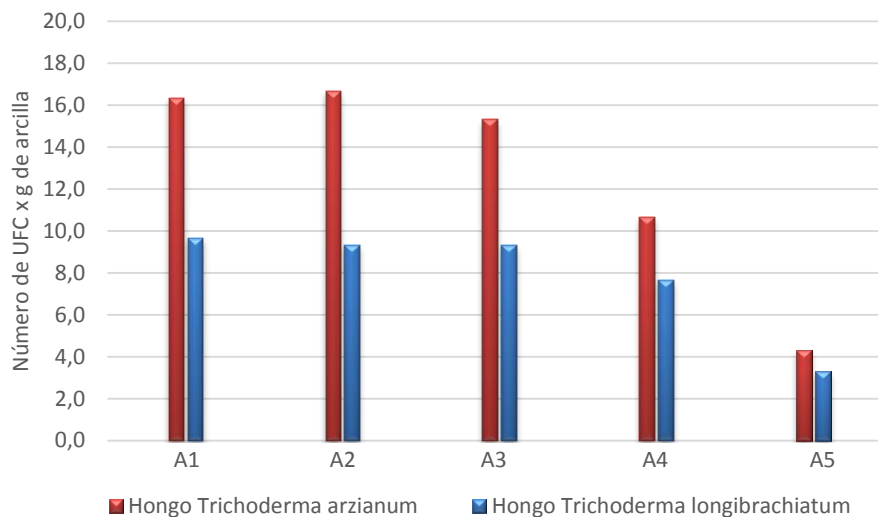


Grafico 4.1. Supervivencia de *Trichoderma* inoculados en arcilla a 45°C de temperatura y a diferentes tiempos de secado.

No obstante ambos hongos mantienen su viabilidad en todos los tiempos de secado durante la primera semana de evaluación, estos resultados pudieran deberse a que la humedad del soporte aun es alta. Según Zambrano *et al.* (2015) mencionan que cuando la humedad del vehículo permanece elevada estimula la continuidad del crecimiento de los microorganismos.

b) Porcentaje de germinación (18–24 horas)

En el cuadro 4.1 se detallan resultados parciales y finales de los porcentajes de germinación de esporas de *T. longibrachiatum* y *T. harzianum*, los cuales fueron levemente diferentes hasta las 18 horas, mientras que al final de la evaluación (24 horas) los porcentajes de germinación variaron notablemente con respecto a la última evaluación realizada a las 18 horas (Véase anexo 3).

Cuadro 4.1. Porcentajes de germinación de esporas

Evaluación a las 18 horas	
Esporas	% de germinación
<i>T. harzianum</i>	39
<i>T. longibrachiatum</i>	27
Evaluación a las 24 horas	
<i>T. harzianum</i>	94
<i>T. longibrachiatum</i>	90

Según Martínez *et al.* (2013) las esporas no germinan hasta pasada las 15 horas después de la siembra debido a que durante este tiempo se completan los procesos de división celular en las hifas.

c) Porcentaje de pureza

La cantidad de UFC dentro de las cajas Petri inicialmente solo fueron de los hongos *T. longibrachiatum* y *T. harzianum* ya que no se encontraron UFC de otros microorganismos, este resultado lo corroboró el testigo (tarrina de arcilla sin inoculación de hongos) quien mantuvo un resultado de cero UFC en las cajas Petri; por lo que se testifica que la pureza inicial fue del 100% (cuadro 4.2).

Cuadro 4.2. Porcentaje de pureza inicial del bioinsumo.

Tratamientos	UFC en cajas Petri			% de pureza
	<i>T. Harzianum</i>	<i>T. Longibrachiatum</i>	Otras UFC	
A1	16,33	9,7	0	100
A2	16,7	9,3	0	100
A3	15,3	9,3	0	100
A4	10,7	7,7	0	100
A5	9,3	6,3	0	100
Testigo	0	0	0	Sin contaminación

Para el final del experimento los resultados variaron sutilmente, se mantuvieron cantidades de UFC altas y pocas UFC de otros microorganismos (cuadro 4.3).

Cuadro 4.3. Porcentaje de pureza final del bioinsumo.

Tratamientos	UFC en cajas Petri			% de pureza
	<i>T. Harzianum</i>	<i>T. Longibrachiatum</i>	Otras UFC	
A1	12,9	7,4	1,4	84
A2	12,7	7,3	1,4	83,9
A3	11,7	7,1	1,2	85,54
A4	9,9	7,4	0,5	93,7
A5	4	3	0	100
testigo	0	0	1	contaminado

d) Seguimiento de la sobrevivencia del hongo *T. harzianum* y *T. longibrachiatum*.

A través del tiempo se apreció un descenso en la viabilidad de las cepas fúngicas *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* en todos los tiempos de secado tal como lo muestran los gráficos 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 y 4.6. Sin embargo se observó un ligero incremento de UFC en los tratamientos A1, A2 y A3 durante los primeros 7 días, según Matos y Zúñiga (2003) quienes realizaron estudios similares utilizando compost y suelo orgánico indicaron que el incremento de UFC durante los primeros días es debido a la presencia de nutrientes y la humedad que aun contienen estos tipos de soportes. El tratamiento A1 con 28% de humedad obtuvo 79% de viabilidad de UFC para el *T. harzianum* y 76% para el *T. longibrachiatum* (Grafico 4.2); resultados que no son satisfactorios ya que una buena conservación debe mantener una viabilidad no menor al 95% (Lemus *et al.*, 2008). Cabe indicar que para obtener los resultados de porcentaje de viabilidad de los hongos se tomó como el 100% el número de UFC inicial y se comparó con el número de UFC final del bioinsumo.

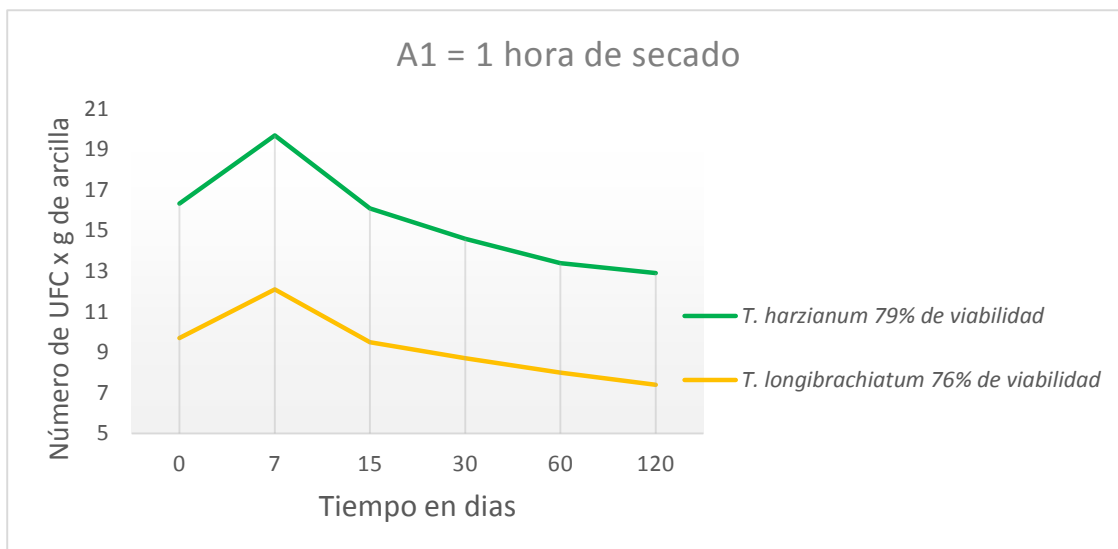


Grafico 4.2. UFC de *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* inoculados en arcilla conservados a temperatura ambiente.

El grafico 4.3 muestra resultados del tratamiento A2 que obtuvo una viabilidad de 76% para *T. harzianum* y 78% para *T. longibrachiatum*, dichos resultados tampoco alcanzaron la viabilidad ideal, además de mantener alto porcentaje de humedad de 21%.

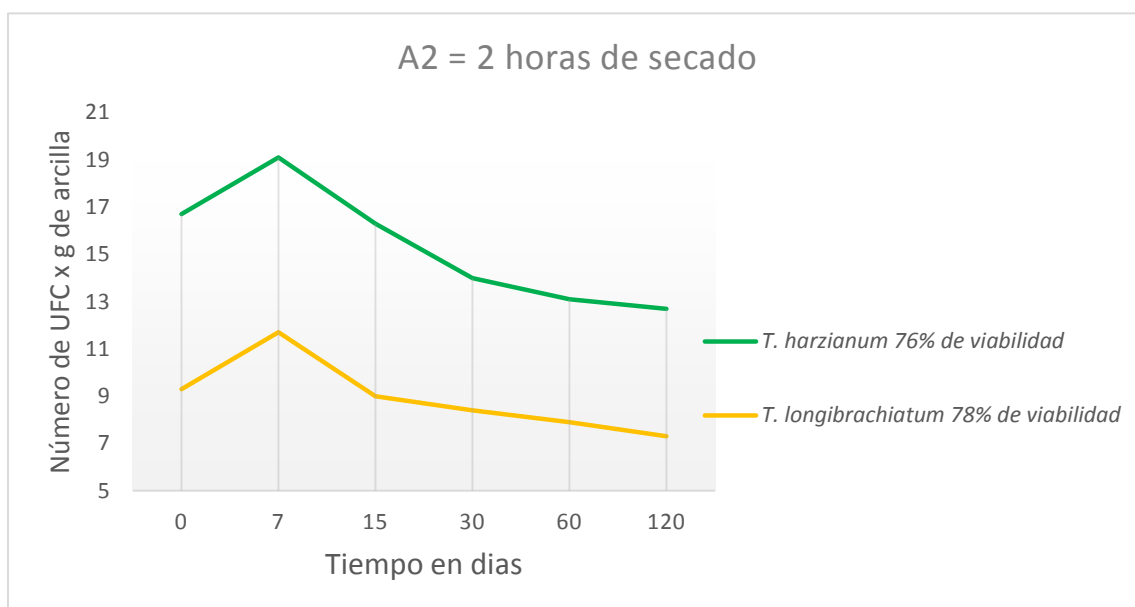


Grafico 4.3. UFC de *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* inoculados en arcilla conservados a temperatura ambiente.

Los resultados del tratamiento A3 (Gráfico 4.4) no son diferentes de los resultados anteriores ya que este solo obtuvo 75% viable el hongo *T. harzianum* y 76% el *T. longibrachiatum*, y humedad final fue de 16% y no es la adecuada para la latencia de los microorganismos.

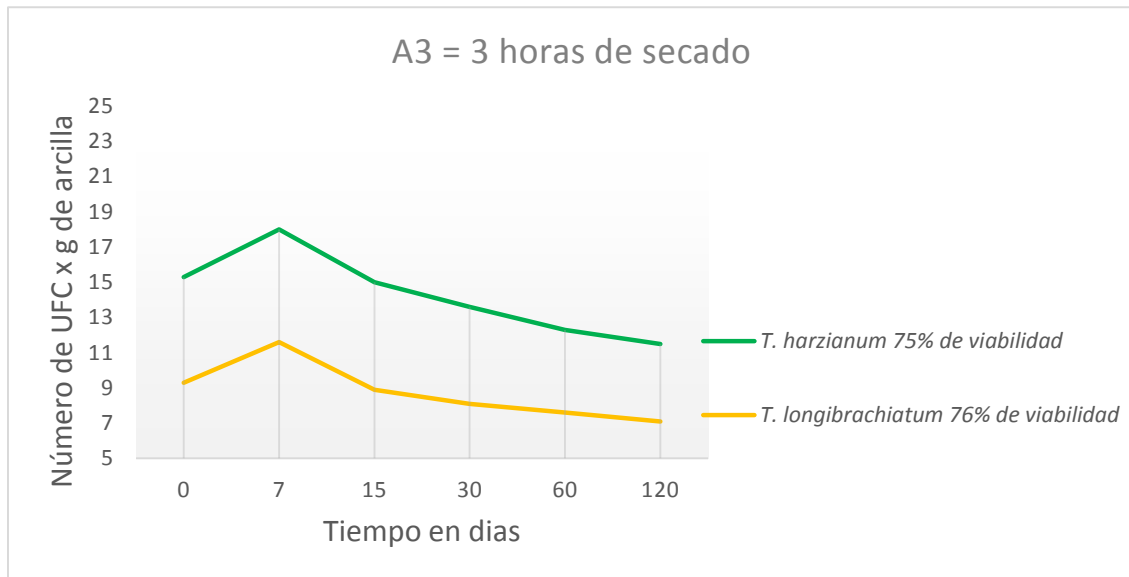


Gráfico 4.4. UFC de *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* inoculados en arcilla conservados a temperatura ambiente.

Varios autores como Lemus *et al.* (2008) y Estrada (2008) manifiestan que un vehículo o soporte debe mantener los microorganismos con una viabilidad no menor al 95%. En el gráfico 4.5 se muestran resultados del tratamiento A4 donde se puede observar que el hongo *T. harzianum* mantuvo una viabilidad del 95% y 96% el hongo *T. longibrachiatum*, Rodríguez (2016) indica que la humedad, la temperatura y el pH son fundamentales en el proceso de latencia de un organismo vivo, en el tratamiento A4 la humedad final fue de 6% lo que permitió que los microorganismos detengan sus actividades biológicas y entren en un periodo de latencia, lo que permitirá mantenerlos viables por mucho más tiempo; dichos resultados factibles los corroboran Lemus *et al.* (2008) quienes sustentan que la humedad final contenida en el vehículo debe estar entre 4 y 6% para que los microorganismos detengan su actividad biológica.

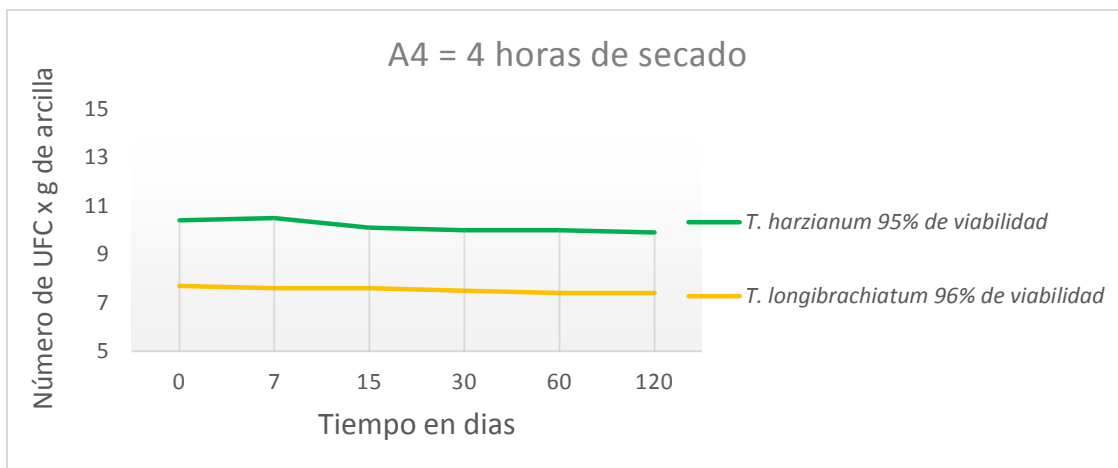


Grafico 4.5. UFC de *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* inoculados en arcilla conservados a temperatura ambiente.

Los resultados del Tratamiento A5 (Gráfico 4.6) obtuvo una viabilidad del hongo *T. harzianum* de 93% e igual porcentaje de viabilidad para el hongo *T. longibrachiatum*; resultados que no son de variabilidad con respecto a la cantidad de UFC, ya que *T. harzianum* inició con un promedio de 4,3 UFC y finalizó con un promedio de 4 UFC, de la misma manera el hongo *T. longibrachiatum* inició con un promedio de 3,3 UFC y finalizó con 3 UFC; los bajos resultados de UFC pueden deberse a la prolongación del tiempo que se expuso el portador en la estufa a 45°C y provocar la muerte de la mayoría de conidios ya que el contenido de humedad final fue de 2,3%, contribuyendo a los expresado por Gómez y Mendoza (2014) quienes mencionan que con humedad menor a 3% es casi imposible de mantener vivo un microorganismo.

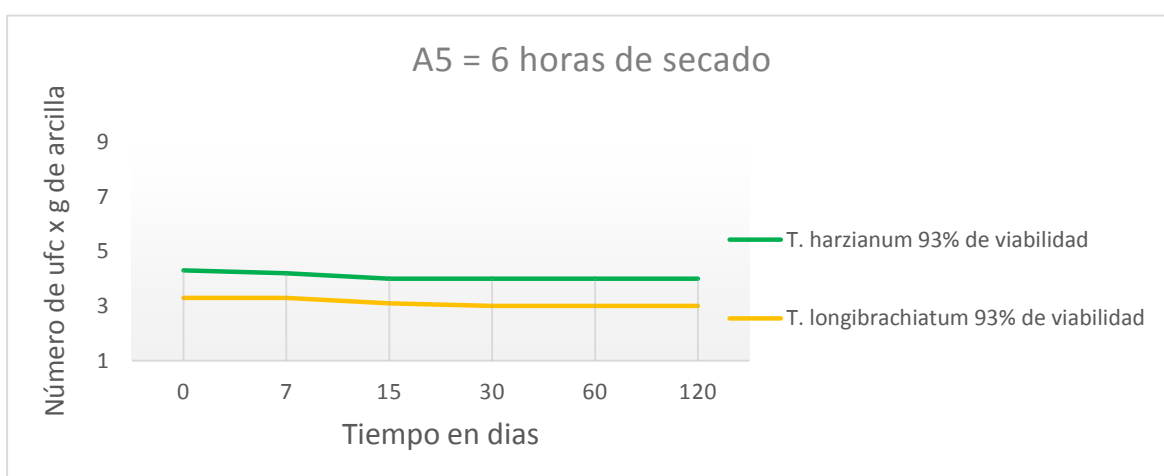


Grafico 4.6. UFC de *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* inoculados en arcilla conservados a temperatura ambiente

e) Análisis de varianza

Según la prueba paramétrica del ANOVA muestra que en los tratamientos existe diferencia estadística tal como lo muestra el cuadro 4.4 de acuerdo a las medias estipuladas por el test de tukey.

Cuadro 4.4. ANOVA diferencias estadísticas de los promedios de viabilidad entre los tratamientos.

Tratamientos	% de viabilidad		E.E
A4	95,50	a	0,76
A5	93,00	a	0,76
A1	77,50	b	0,76
A2	77,00	b	0,76
A3	75,5	b	0,76
Probabilidad 0,073			

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

f) Humedad

Según las normas NTE INEN-ISO 11294 los inoculantes agrícolas sólidos no deben superar el 8% de humedad; en el cuadro 4.5 se puede observar el efecto del secado del vehículo en estufa a los cual según la prueba paramétrica de Tukey todos los tratamientos son diferentes, donde indiscutiblemente los tratamientos A1, A2 y A3 superan el contenido de humedad permisible, por otra parte Gómez y Mendoza (2014) menciona que con humedad menor a 3% es casi imposible mantener vivo un microorganismo, lo que dejaría fuera de rango el tratamiento A5 no solo por su baja humedad, sino que además consta con un bajo nivel de UFC conservados a lo largo de 120 días, dejando como mejor tratamiento el A4.

Cuadro 4.5. Diferencias estadísticas de promedios de los porcentajes de humedad entre tratamientos

Tratamientos	% de humedad		E.E
A1	28	a	0,12
A2	21	b	0,12
A3	16	c	0,12
A4	6	d	0,12
A5	2,3	e	0,12
Probabilidad 0,0001			

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

g) Costos de producción del bioinsumo

➤ Análisis

Los costos para la producción del bioinsumo estuvieron divididos en dos secciones los cuales fueron costos directos y costos indirectos, en el cuadro 4.6 en el apartado costos directos se detallan las cantidades y materiales que se utilizaron para su elaboración, incluyendo el sueldo de una persona que teóricamente producirá el bioinsumo desde la recolección de la arcilla hasta envasar el producto durante 30 días consecutivos y justificar su sueldo, mientras que los costos indirectos dependerán si se posee o no equipos de laboratorios: mencionado esto se tendrá como inversión un total de \$ 904.

Cuadro 4.6. Costos directos e indirectos para la producción del bioinsumo

CANTIDAD	MATERIA PRIMA	COSTOS EN \$
2	Libra de arroz	2
1	Rollo de papel aluminio	3
500	Kilogramos de arcilla	---
10	Cajas Petri con <i>Trichodermas</i>	20
1000	Tarrinas plásticas resistentes a temperaturas	80
1	Sueldo básico (mano de obra)	380
	Sub total	485
	GASTOS IMPREVISTOS	
1	Alquiler del laboratorio	300
1	Gastos imprevistos	200
	Sub total	500
	TOTAL	985

➤ **Rendimiento en producción**

Según la cantidad de arcilla recolectada y la experiencia durante la ejecución del proyecto es posible producir 1000 tarrinas del bioinsumo durante un mes, con un peso de 1 libra por tarrina y una concentración de 17,3 UFC de dos tipos de *Trichodermas* por gramo de arcilla con una viabilidad del 95% durante 4 meses.

➤ **Estimación del precio**

De acuerdo a la cantidad de dinero invertido por mes se obtiene un rendimiento de 1000 tarrinas de bioinsumo listas para su comercialización; por lo que se estimaría la venta de cada tarrina de producto en \$ 1,5.

➤ **Rentabilidad**

Teóricamente si se vendiera el bioinsumo por unidad se tendría un ingreso total de \$ 1500 y descontando los \$ 985 de inversión inicial se obtendría una ganancia de \$ 515; no obstante se tendría la opción de vender el producto al por mayor a una casa comercial y dejando el precio en \$1,25 y aun se obtendría una ganancia de \$ 265.

CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se determinó que:

- El mejor tratamiento para mantener las cepas de hongos *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* fue A4 (cuatro horas de secado) por mantener un 95% de los microorganismos viables y una húmeda del 6% la cual estuvo dentro de los rangos permisibles.
- El hongo *T. harzianum* fue superior en todos los tiempos de secado en cuanto a UFC frente a *T. longibrachiatum* y se mantuvieron los resultados durante los 120 días de evaluación.

5.2. RECOMENDACIONES

- Probar el bioinsumo en campo.
- En caso de funcionar los experimentos en campo, realizar un estudio de mercado y percibir la factibilidad para la formación de una empresa productora del bioinsumo a base de arcilla inoculada con *T. harzianum* y *T. longibrachiatum*.
- Ampliar el tiempo de evaluación del mejor tratamiento A4 (más de 120 días).

BIBLIOGRAFÍA

- Alfonso, M. 2002. Los plaguicidas botánicos y su importancia en la agricultura orgánica. *Agricultura Orgánica* 2. 26-30 pp.
- Altomarre, C.; W. A. Norvell; T. Björkman; G. E. Harman. 1999. Solubilization of Phosphates and Micronutrients by the Plant-Growth Promoting and Biocontrol Fungus *Trichoderma harzianum* Rifai, *Appl. Env. Microbiol.* N° 65. p 2926-2933
- Arianna, N. 2009. Turba y zeolita como soportes de inoculantes microbianos con acción fertilizante. La Habana, Cuba. ICIDCA. Vol. XLIII. N° 3. p 22-27.
- Burgos, C. Tarazona, N. Zambrano, D. Guzmán, A. 2016. Evaluación de un inóculo nativo en el proceso de maduración del compostaje de residuos orgánicos agropecuarios. Calceta-Manabí-Ecuador. Universidad en el siglo XXI. ISBN 978-9942-8595-4-9.
- Cooper, V. 2002. Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. X. Quantifying the fundamental and realized niche. *BMC Evol. Biol.* Vol. 2. p 12.
- Di Rienzo, J. Casanova, F. Balzarini, M. Gonzales, L. Tablada, M. Robledo, C. 2014. Grupo infoStat. Fca, Universidad Nacional de Córdoba Argentina.
- EPA (Environmental protection agency). 2010. Code of Federal Regulation 40, parts 150 to 189. Washington, DC U.S. p 718. (En línea). Disponible en: <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/CFR-2010-title40-vol23/pdf/CFR-2010-title40-vol23-part152.pdf>
- ESPAM MFL. (Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López). 2016. Estación Agrometeorológica.
- Estrada, H. 2008. Calidad de inoculantes almacenados a diferentes temperaturas: efecto sobre la población, humedad y ph del producto. Tesis Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogota, COL. p. 28.
- Fajardo, E. y Sarmiento, S. 2007. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- García, MD. y Uruburu, F. 2000. La conservación de cepas microbianas. *SEM* Vol. 30. p 12-16.
- García, R., Riera, R., Zambrano, C. y Gutiérrez, L. 2006. Desarrollo de un fungicida biológico a base de una cepa del hongo *Trichoderma harzianum* proveniente de la región andina venezolana fitosanidad. Vol. 10, N° 2. p 115-121.

- Gato, C. 2010. Métodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum*. Revista Fitosanidad. Vol 14. Nº 3. p 189-195.
- Godoy, J. Valera, R. Guédez, C. cañizales, L. Castillo, C. 2007. Determinación de temperatura y humedad óptima para la germinación y esporulación de cinco aislamientos de *Beauveria bassiana*. Caracas. Revista Facultad de Agronomía. Vol. 24. Nº 3. p 415-425.
- Gómez, P. Mendoza J. 2014. Guía para la producción de *Metarhizium anisopliae*. Ecuador. Revista CINCAE. Publicación técnica Nº 1.
- González, A., Deza, C. R., Jesus, M. 2007. Factores que condicionan el proceso de compostaje. (En línea). Consultado 30 de enero de 2017. Formato PDF. Disponible en: https://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/eeymar/default_archivos/5%20FACTORES%20PROCESO%20%282%29.pdf
- Guzmán-Cedeño, A. M. 2015. Comportamiento del compost de residuos agropecuarios con la inoculación de un preparado microbiano autóctono de Manabí, Ecuador. Tesis. Ph.D. Ciencias Agrícolas. Universidad de Matanzas. Matanzas. Cuba. pp. 100.
- Guzmán, M. Zambrano, D. Rivera, R. Rondón, A. J. Laurencio, M. y Quintaba, M. 2015. Aislamiento y selección de bacterias autóctonas de Manabí-Ecuador con actividad celulolítica. Cuba. CU. Revista Cultivos tropicales. Vol. 36. Nº 1. p 5-14.
- Harman, G. E. 2000. «The Myths and Dogmas of Biocontrol. Changes in Perceptions Derived from Research on *Trichoderma harzianum* Strain T-22», Plant Disease. Vol. 84 Nº 4. p 377-393.
- INEN. (Instituto Nacional Ecuatoriano de Normalización). 1982. Mecánica del suelo. Determinación del contenido de agua. Método de secado al horno. (En línea). Consultado 16 de enero del 2017. Formato PDF. Disponible en: <https://archive.org/details/ec.nte.0690.1982>
- Kehrli, P., Wratten, S. D. 2011. A perspective on the consequences for insect herbivores and their natural enemies when they share plant resources. International scholarly research network. Article ID 480195, 6 pages doi:10.5402/2011/480195.
- Lemus, Y. Rodríguez, Ginna. Cuervo, R. Duran, J. Zuluga, C. Rodríguez, Gloria. 2008. Determinación de la factibilidad del hongo *Metarhizium anisopliae* para ser usado como control biológico contra hormigas. Colombia. Revista Científica Guillermo de Ockhan. Vol. 6. Nº 1. p 91-98.
- Leng, P., Zhang, Z., Pan G., Zhao, M. 2011. Applications and development trends in biopesticides. African Journal of Biotechnology. Vol. 10. Nº 86. p 19864-19873.

- López M., R. 2011. Detección y cuantificación de *Trichoderma harzianum*, y evaluación de su actividad biocontrol frente a la Fusariosis vascular del melón mediante la aplicación de herramientas moleculares. Tesis Doctoral. Universidad de Alicante. España.
- Lozano, Y. Serrano, M. Cuapio, A. 2016. Control de plagas agrícolas con hongos entomopatógeno. (En línea). Ec. Consultado el 17 de enero del 2017. Formato HTML. Disponible en: <https://testlapallitesoem.wordpress.com/2016/05/13/control-de-plagas-agricolas-con-hongos-entomopatogenos/>
- Martínez B.; D. Infante; Y. Reyes. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Protección Vegetal*. Vol. 28. p 1.
- Matos, G. C. y Zúñiga, D. D. 2003. Variabilidad de cepas de rizobios en inoculantes basados en soportes no estériles. *Revista Ecología Aplicada*. Vol. 2 N° 1. p 81-85.
- Meyling, N. y Eilenberg, J. 2007. Ecología de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en agroecosistemas templados: potencial para el control biológico de la conservación. *Revista Biological Control*. Vol. 43. p 145 -155.
- Morales Y. Duque E, Rodríguez O. De la Torre J. Martínez R. Pérez R. Muñoz, J. 2010. Bacterias Preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. *Rev. Biotecnología Aplicada*. Vol.14 N° 2. p 11-29.
- Pallo, Y. Velastegui, M. 2011. "Evaluación de soportes sólidos y líquidos, para la producción de un biofertilizante a base de *Azospirillum* spp. Aplicable al cultivo de maíz (*Zea mays*, L.)".(En línea). EC. Consultado 07 de sep. 2017. Formato PDF. Disponible en: <http://redi.uta.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/1866/1/BQ%2022.pdf>
- Rey, A. D. Chamorro, D. R. Barahona, R. 2014. Efecto del medio de soporte en la estabilidad biológica de dos cepas de *Frankia* aisladas de *Alnus acuminata* H. B. K. *Matanzas. Pastos y Forrajes*. Vol. 37. N° 3. p 305-312.
- Rodríguez, M. 2016. Variabilidad de la inactivación microbiana y de la fase de latencia de los microorganismos supervivientes a un proceso de acidificación. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Madrid-España. p 75
- Rosas, L. y Méndez, G. (sf). Selección del medio soporte para un reactor SBR Anaerobio/Aerobio. Instituto de ingeniería UNAM. Coyocán Mexico. (En línea). Consultado 30 de enero del 2016. Formato PDF. Disponible en: http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/veracruz01/trabajos/area_vi/cvi-70.pdf
- Simberloff, D. 2012. Risks of biological control for conservation purposes. *BioControl*. Vol 57. p 263–276.

- Stanier, R. & Ingraham, J. 1996. Microbiología. Ed. Reverté S.A. p 195.
- Tarazona, N. Zambrano, E. Lucas, L. Vélez, S. 2014. Capacidad antagonista de hongos celulolíticos frente a *Fusarium* sp. Y *Macrophomina* sp. Rev. ESPAMCIENCIA. Vol. 5 N° 2. p 118-126.
- Ulla, E. 2015. Producción de inoculantes fúngicos. (En línea). Ec. Consultado 19 de enero del 2017. Formato PDF. Disponible en: <file:///C:/Users/Junito/Downloads/1045832988.Tema%204.%20Prod.%20inoculantes%20f%C3%BAngicos.%20Presentaci%C3%B3n.pdf>
- Uruburu, F. 2003. History and services of culture collections. Int. Microbiol. Vol 6. p 101-103.
- Urtubia, I. y France, A. 2007. Formulaciones de hongos entomopatógenos para control de plagas en agricultura. (En línea). EC. Consultado el 16 de enero del 2017. Formato PDF. Disponible en: <http://www2.inia.cl/medios/quilamapu/pdf/tadentro/TA77ND0207.pdf>
- Zambrano, D. Guzmán, A. Rondón, A. Laurencio M. 2015. Evaluación preliminar de la arcilla para la producción de inoculantes de *Trichoderma longibratium* en condiciones de laboratorio Calceta-Manabí-Ecuador. Universidad en el siglo XXI. ISBN 978-9942-8525-8-8.

ANEXOS

Anexo 1. Preparación de bioinoculante líquido en caldo arroz

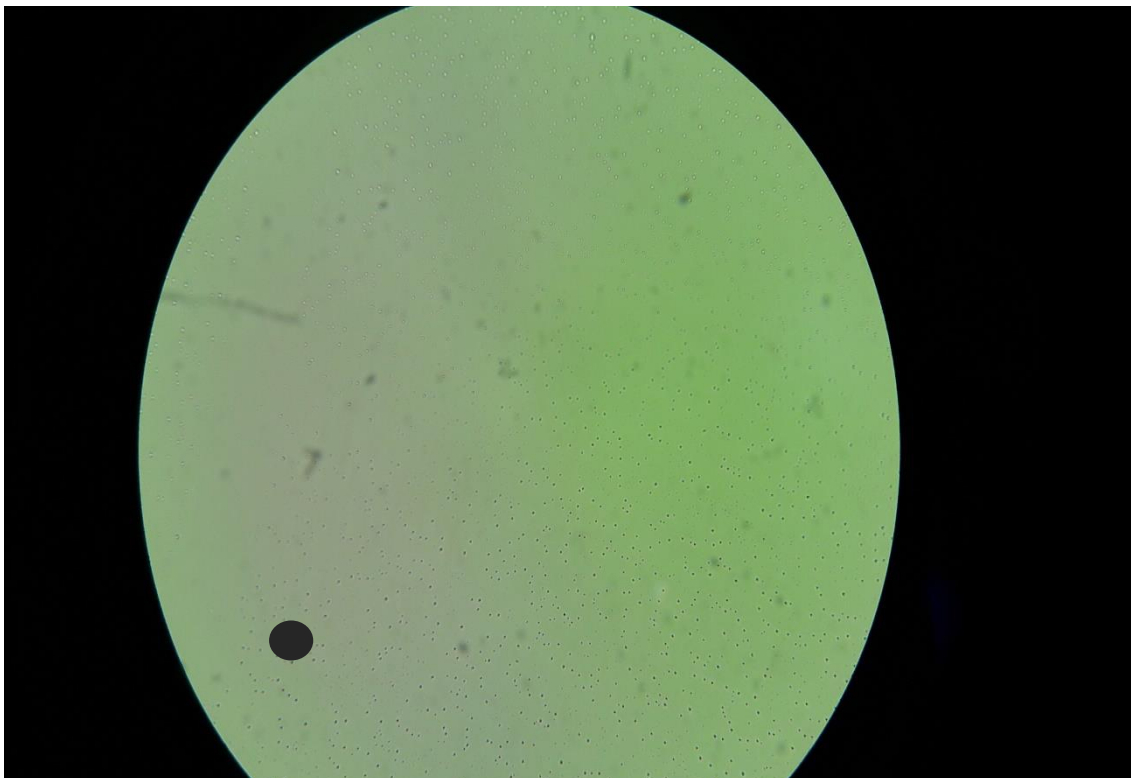


Anexo 2. Inoculación de las tarrinas con *T. harzianum* y *T. longibrachiatum*

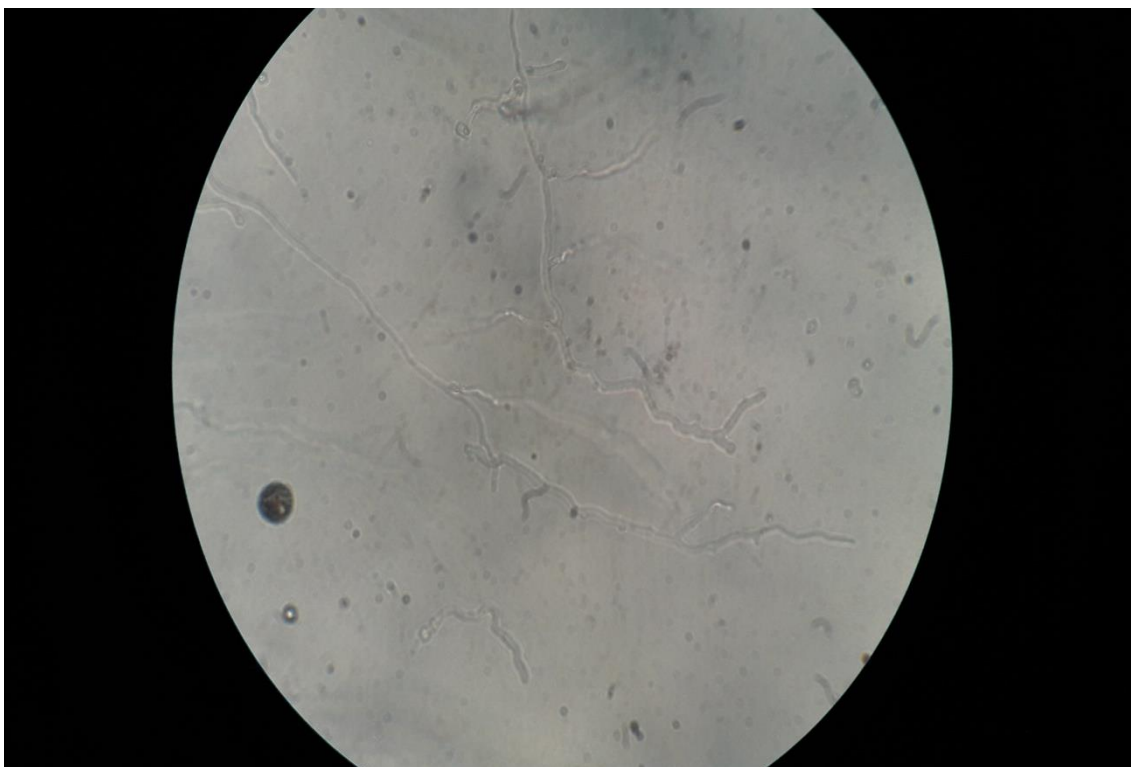


Anexo 3. Porcentaje de germinación de esporas de hongo *T. harzianum*

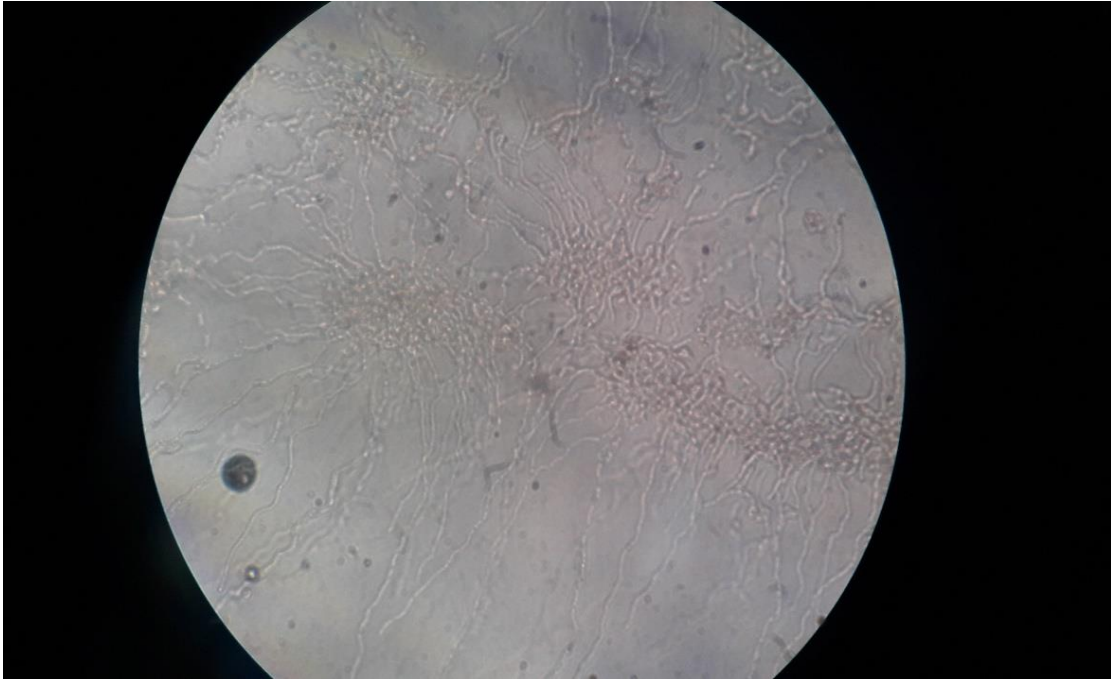
Observación microscópica a las 0 horas



Observación microscópica a las 18 horas

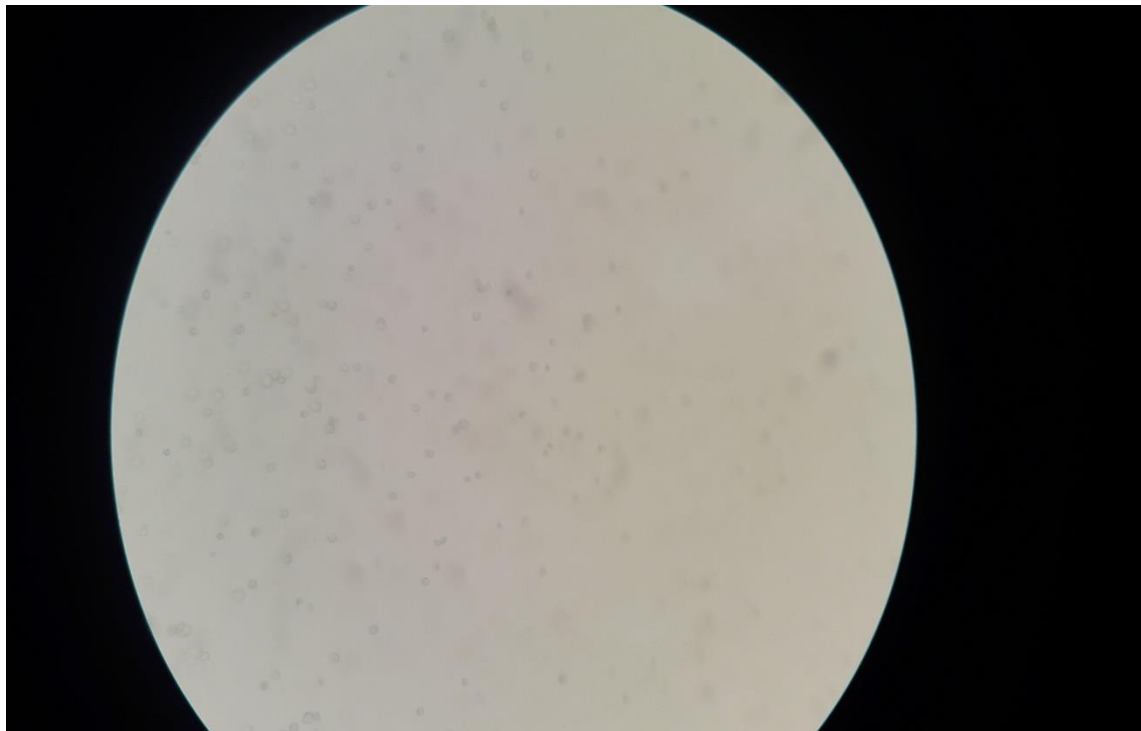


Observación microscópica a las 24 horas

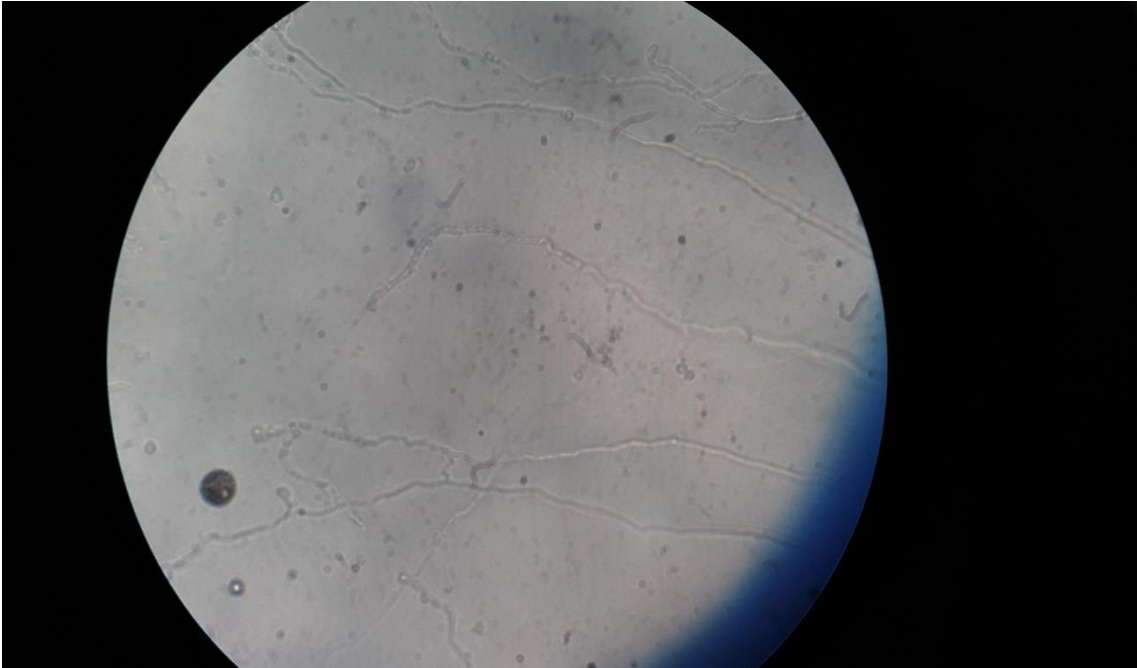


Anexo 2. Porcentaje de germinación de esporas de hongo *T. longibrachiatum*

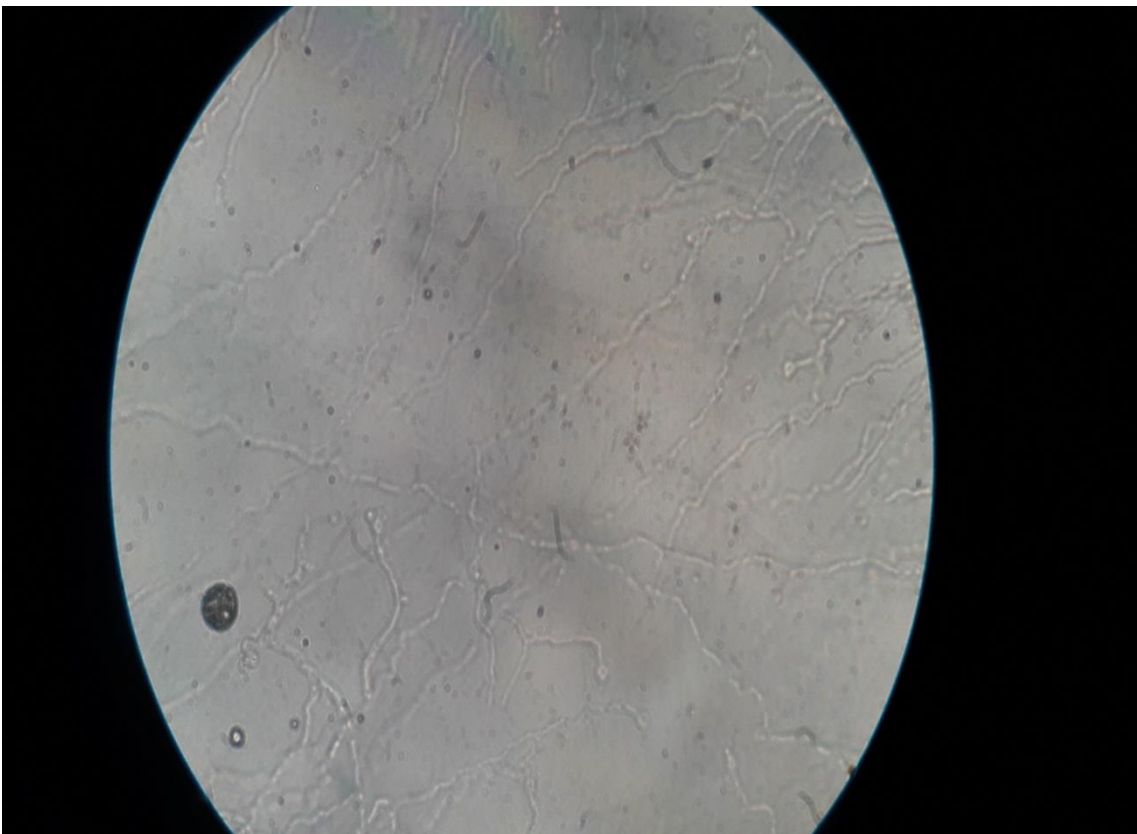
Observación microscópica a las 0 horas



Observación microscópica a las 18 horas



Observación microscópica a las 24 horas



Anexo 4. Tarrinas inoculadas con *Trichoderma* después del secado en estufa



Diferencias de humedad entre los distintos tiempos de secado del vehículo

