



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS PUEBLA

POSTGRADO EN ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

EXTRACTOS NATURALES DE *Trichoderma* CON PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS DE APLICACIÓN POTENCIAL EN LA AGRICULTURA REGENERATIVA

YOSELINE PERALTA MÉNDEZ

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRA EN CIENCIAS

PUEBLA, PUEBLA

2022

La presente tesis, titulada: **Extractos naturales de *Trichoderma* con propiedades antibacterianas de aplicación potencial en la agricultura regenerativa**, realizada por la alumna: **Yoseline Peralta Méndez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:


DR. DANIEL CLAUDIO MARTÍNEZ CARRERA

ASESOR:


DRA. MARÍA EUGENIA MENESES ÁLVAREZ

ASESOR:


DR. MIGUEL SÁNCHEZ HERNÁNDEZ

ASESOR:


DR. ISAAC TELLO SALGADO

Puebla, Puebla, México, 18 de febrero del 2022

EXTRACTOS NATURALES DE *Trichoderma* CON PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS DE APLICACIÓN POTENCIAL EN LA AGRICULTURA REGENERATIVA

Yoseline Peralta Méndez, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2022

RESUMEN

Actualmente, se promueve el desarrollo de innovaciones tecnológicas en México para una agricultura libre de agroquímicos tóxicos que afectan el ambiente, la salud humana, y la productividad de los cultivos agrícolas. La capacidad antimicrobiana de diversos microorganismos puede ser útil para la regeneración del suelo, así como para el control biológico potencial de plagas y enfermedades. En este trabajo, se estudió la producción de biomasa de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, a partir de la cual se obtuvo un extracto hidroalcohólico (EH) y un extracto acuoso (EA). Los extractos se caracterizaron fisicoquímicamente y se analizaron sus propiedades antimicrobianas. Se obtuvo un rendimiento en el EH de 110.56 mg/mL, con pH de 6.09 y azúcares disueltos de 21.9 °Brix. En el EA, el rendimiento fue de 110.44 mg/mL, con pH de 3.96 y azúcares disueltos de 10.96 °Brix. El EH tuvo efecto bacteriostático a una concentración de 55.28-27.64 mg/mL contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, con excepción de *Staphylococcus aureus*. En contraste, el EA mostró efecto bacteriostático contra *S. aureus* y *P. aeruginosa*, a una concentración de 55.22-13.80 mg/mL, mientras que contra *B. subtilis* y *E. coli* a 55.22-6.90 mg/mL. En el EH, se registró efecto bactericida a una concentración de 55.28 mg/mL sobre las bacterias estudiadas. Por su parte, el efecto bactericida del EA en *S. aureus*, se observó a una concentración de 55.22-27.61 mg/mL, mientras que para *B. subtilis*, *E. coli* y *P. aeruginosa* se registró a 55.22-13.80 mg/mL. Tanto el EH como el EA tuvieron propiedades bacteriostáticas y bactericidas con efectos diferenciados (EA: 55.22-6.90 mg/mL; EH: 55.28-27.64 mg/mL). Estas evidencias indicaron que los extractos naturales de *T. aggressivum* f. *aggressivum* tienen potente actividad antimicrobiana, por lo que se propone una estrategia con potencial de aplicación en la agricultura regenerativa.

Palabras clave: extracto acuoso, extracto hidroalcohólico, propiedades antibacterianas, *Trichoderma* spp.

NATURAL EXTRACTS OF *Trichoderma* HAVING ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF
POTENTIAL APPLICATION IN REGENERATIVE AGRICULTURE

Yoseline Peralta Méndez, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2022

ABSTRACT

Currently, the development of technological innovations in Mexico is promoted for an agriculture free of toxic agrochemicals that affect the environment, human health, and agricultural crops productivity. The antimicrobial capacity of various microorganisms can be useful for soil regeneration, as well as for the biological potential control of pests and diseases. In this research, the biomass production of *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, from which a hydroalcoholic extract (EH) and an aqueous extract (EA) were obtained. The extracts were characterized physicochemically and their antimicrobial properties were analyzed. An EH yield of 110.56 mg/mL was obtained, with pH of 6.09 and dissolved sugars of 21.9 °Brix. In the EA, the yield was 110.44 mg/mL, with pH of 3.96 and dissolved sugars of 10.96 °Brix. EH had bacteriostatic effect at a concentration of 55.28-27.64 mg/mL against *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, with the exception of *Staphylococcus aureus*. In contrast, EA showed bacteriostatic effect against *S. aureus* and *P. aeruginosa*, at a concentration of 55.22-13.80 mg/mL, against *B. subtilis* and *E. coli* at 55.22-6.90 mg/mL. In EH, a bactericidal effect was recorded at a concentration of 55.28 mg/mL on the bacteria studied. On the other hand, the bactericidal effect of EA on *S. aureus* was observed at a concentration of 55.22-27.61 mg/mL, while for *B. subtilis*, *E. coli* and *P. aeruginosa* was recorded at 55.22-13.80 mg/mL. Both EH and EA had bacteriostatic and bactericidal properties with differentiated effects (EA: 55.22-6.90 mg/mL; EH: 55.28-27.64 mg/mL). These evidences indicated that the natural extracts of *T. aggressivum* f. *aggressivum* have powerful antimicrobial activity, so a strategy with potential application in regenerative agriculture is proposed.

Key words: aqueous extract, hydroalcoholic extract, antibacterial properties, *Trichoderma* spp.

DEDICATORIA

A mi **mamá** Margarita Méndez Romero, por ser el pilar principal para lograr esta meta tan importante en mi vida, porque nunca me ha dejado sola en mis decisiones y porque en todo momento confía en mí ciegamente, por darme ese cariño y apoyo incondicional, por preocuparse en todo momento por mí y porque siempre ha hecho hasta lo imposible para que yo logre mis metas. Te dedico esta tesis mami y muchas gracias por todo, siempre te he dicho que eres mi mejor ejemplo a seguir en esta vida, TE AMO CON TODO MI CORAZÓN.

A mi **papá** David Peralta Ortega por brindarme su apoyo, escucharme, ser mi confidente y por creer en todo momento en mí, TE AMO.

A mis hermanos... **Erick** gracias por ser más que un hermano mayor, eres como un segundo padre para mí, gracias por todas esas cosas que hemos vivido que hicieron más amena esta etapa de mi vida, gracias por siempre cuidarme, preocuparte y sobre todo por ser parte de esto. **David** te admiro muchísimo por ser tan fuerte, gracias por cuidarme y sobre todo por estar en los momentos más importantes de mi vida como este. Son los mejores hermanos que Dios me pudo haber obsequiado, los AMO CON TODO MI CORAZÓN.

A mis sobrinos... **Dana, Celeste, Yahel, Brandon y Fernanda** que en algún momento de su vida esto sea una fuente de inspiración para lograr todo lo que se propongan, nada es imposible. Y sobre todo para Danita y Yahel que hacen mi vida tan alegre con esas ocurrencias, por las muestras de cariño y mensajes que hicieron más amena esta etapa de mi vida, saben que los amo muchísimo con todo mi corazón.

A **Anais** por creer en mí, por todo tu apoyo incondicional y por animarme en todo momento, muchas gracias sabes que te amo muchísimo con todo mi corazón.

A mis amigos y colegas... **Arlet, Yulma, Lili, Maricela, Edson, Gerardo, Eduardo, Jesús, Isaac, Pablo Uziel**, con mucho cariño para ustedes, gracias por su apoyo y por esa amistad sincera que a pesar del tiempo aún sigue presente. LOS AMO AMIGOS.

A **Alfonso** por estar conmigo al comienzo y al final de esta etapa, por su apoyo y comprensión en todo momento, gracias por ser parte de mi vida, TE AMO CON TODO MI CORAZÓN.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** que hasta el momento me ha brindado salud y cuidado en cada paso que doy; por darme fuerza y fortaleza para llegar hasta donde estoy y por permitirme cumplir una meta más en mi vida, demostrándose una vez más que con fe, paciencia y esmero las cosas llegan por sí solas en el momento indicado.

A **cada uno de los mexicanos que pagan impuestos**, quienes a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), han financiado parte de mis estudios de Maestría en Ciencias en el Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla.

Al **Colegio de Postgraduados, Campus Puebla** y a la **Línea de Generación y/o Aplicación de Conocimiento (LGAC) 2: aprovechamiento y manejo de sistemas agroalimentarios y recursos naturales para el desarrollo rural sostenible**, por la formación académica que recibí durante estos 2 años, por brindarme la oportunidad de adquirir nuevas experiencias y conocer a personas increíbles que contribuyeron en mi crecimiento académico y personal.

Al **Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera** por ser mi profesor consejero, por darme la oportunidad y confianza de realizar mi trabajo de investigación en el Centro de Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales (CB-HCFM), gracias por los conocimientos compartidos y la ayuda brindada en todo momento, además de que me guió durante la realización de este proyecto de investigación, sus consejos fueron fundamentales y determinantes.

A los integrantes de mi consejo particular: **Dra. María Eugenia Meneses Álvarez** por haberme brindado sus conocimientos y en todo momento mostrar disponibilidad e interés en este trabajo. **Dr. Miguel Sánchez Hernández** por la formación académica, los consejos, observaciones y conocimientos compartidos para el desarrollo de esta investigación. **Dr. Isaac Tello Salgado** por haberme brindado sus conocimientos, consejos, observaciones y sobre todo su tiempo para la realización de una de las etapas de esta investigación.

A los integrantes del Centro de Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales (CB-HCFM): a la **M. C. Myrna Bonilla**, **M. C. Nora Eva Fernández**, **M. C. Iván Omar Castillo** por su apoyo y disposición para la realización de este trabajo y en especial a la **M. C. Beatriz Inés Petlascalco** por sus conocimientos compartidos, revisiones, observaciones, su disponibilidad para aclarar cualquier duda y sobre todo por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE CUADROS	xviii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	4
2.1 Hipótesis.....	4
2.2 Objetivo general.....	4
2.3 Objetivos específicos	4
III. REVISIÓN DE LITERATURA	5
3.1 Biotecnología y desarrollo.....	5
3.2 Generalidades de los mohos	6
3.3 Estado del arte de <i>Trichoderma</i>	8
3.3.1 Generalidades	8
3.3.2 Aplicaciones biotecnológicas	10
3.3.3 Interacción en el suelo.....	11
3.3.4 Metabolitos secundarios.....	11
3.3.5 Contaminación por <i>Trichoderma</i>	13
3.4 Agricultura regenerativa.....	15
3.4.1 Plagas y enfermedades microbianas	15
3.4.2 Manejo integrado de plagas.....	17
3.4.3 Agentes de control biológico.....	20
3.5 Extractos naturales	21
3.5.1 Clasificación	22
3.5.2 Importancia y aplicaciones.....	23
3.6 Propiedades antimicrobianas de extractos del moho <i>Trichoderma</i>	23
3.7 Productos comerciales a base de <i>Trichoderma</i>	25
3.7.1 Producción comercial en México	26
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	28
4.1 Material biológico.....	30

4.2 Aislamiento y purificación de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	31
4.2.1 Caracterización macroscópica y microscópica de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	31
4.3 Evaluación de los diferentes tratamientos para la obtención de biomasa de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (CPM-115)	32
4.3.1 Caracterización macroscópica y obtención de biomasa de los tratamientos.....	34
4.3.2 Caracterización fisicoquímica del sobrenadante de los tratamientos	35
4.3.3 Análisis estadístico.....	35
4.4 Obtención de biomasa de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	35
4.4.1 Caracterización morfológica y cosecha de la biomasa de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (CPM-115).....	36
4.4.2 Preparación de la muestra de biomasa seca de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	37
4.4.3 Preparación de la muestra del sobrenadante de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	38
4.5 Obtención de los extractos de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	39
4.5.1 Maceración de biomasa seca de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	39
4.5.2 Concentración del macerado	39
4.5.2.1 Muestra de biomasa seca de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	39
4.5.2.2 Muestra de sobrenadante de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	40
4.6 Esterilización de los extractos de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	41
4.7 Caracterización fisicoquímica del sobrenadante y extractos de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	42
4.7.1 pH, conductividad, resistividad y sólidos disueltos totales	42

4.7.2	Azúcares disueltos (°Bx)	42
4.7.3	Rendimiento por gravimetría (mg/mL).....	42
4.8	Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por el método de microdilución para el extracto hidroalcohólico (EH) y el extracto acuoso (EA) de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum f. aggressivum</i>	43
4.8.1	Cepas de bacterias estudiadas.....	43
4.8.2	Preparación de medios de cultivo	43
4.8.2.1	Medio de cultivo semisólido Agar Müller Hinton.....	43
4.8.2.2	Medio de cultivo líquido Caldo Müller Hinton.....	43
4.8.3	Obtención del inóculo bacteriano	44
4.8.4	Arreglo del bioensayo en la microplaca.....	45
4.8.5	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de <i>Trichoderma aggressivum f. aggressivum</i> (CPM-115) sobre el crecimiento de cuatro bacterias de interés ambiental y clínico.....	46
4.8.6	Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de <i>Trichoderma aggressivum f. aggressivum</i> (CPM-115) sobre el crecimiento de cuatro bacterias de interés ambiental y clínico	48
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
5.1	Identificación y caracterización macroscópica y microscópica de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum f. aggressivum</i>	50
5.2	Evaluación de los diferentes tratamientos para la obtención de biomasa de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum f. aggressivum</i>	51
5.2.1	Caracterización macroscópica de la biomasa de los tratamientos	51
5.2.2	Caracterización fisicoquímica del sobrenadante de los tratamientos	57
5.3	Caracterización de la biomasa de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum f. aggressivum</i> en medio de cultivo líquido	70
5.3.1	Caracterización morfológica macroscópica de la biomasa	70
5.3.2	Determinación de biomasa (mg/mL) de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum f. aggressivum</i>	75
5.3.3	Caracterización fisicoquímica del sobrenadante (pH y azúcares disueltos)	76

5.4	Caracterización fisicoquímica de los extractos de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (CPM-115).....	76
5.4.1	Rendimiento por gravimetría (mg/mL).....	76
5.4.2	pH, conductividad, resistividad, sólidos disueltos totales (TDS) y azúcares disueltos.....	77
5.5	Prueba de susceptibilidad antimicrobiana de los extractos de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (CPM-115) sobre cuatro cepas de bacterias de interés clínico y ambiental.....	78
5.5.1	Concentración de los extractos de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (CPM-115) en las diferentes diluciones de la microplaca.....	78
5.5.2	Efecto bacteriostático de los extractos hidroalcohólico (EH) y acuoso (EA) de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (CPM-115) contra <i>Staphylococcus aureus</i> CPB-2	79
5.5.3	Efecto bactericida de los extractos hidroalcohólico (EH) y acuoso (EA) de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (CPM-115) contra <i>Staphylococcus aureus</i> CPB-2	81
5.5.4	Efecto bacteriostático de los extractos hidroalcohólico (EH) y acuoso (EA) de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (CPM-115) contra <i>Bacillus subtilis</i> CPB-5.....	84
5.5.5	Efecto bactericida de los extractos hidroalcohólico (EH) y acuoso (EA) de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (CPM-115) contra <i>Bacillus subtilis</i> CPB-5.....	86
5.5.6	Efecto bacteriostático de los extractos hidroalcohólico (EH) y acuoso (EA) de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (CPM-115) contra <i>Escherichia coli</i> CPB-8.....	89
5.5.7	Efecto bactericida de los extractos hidroalcohólico (EH) y acuoso (EA) de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (CPM-115) contra <i>Escherichia coli</i> CPB-8.....	90
5.5.8	Efecto bacteriostático de los extractos hidroalcohólico (EH) y acuoso (EA) de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (CPM-115) contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CPB-13.....	93
5.5.9	Efecto bactericida de los extractos hidroalcohólico (EH) y acuoso (EA) de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (CPM-115) contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CPB-13.....	95
VI.	CONTRASTACIÓN DE HIPOTESIS.....	99

VII. CONCLUSIONES	100
VIII. ESTRATEGIA PARA LA OBTENCIÓN DE EXTRACTOS NATURALES DEL MOHO <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> CON POTENCIAL DE APLICACIÓN EN LA AGRICULTURA REGENERATIVA	102
IX. LITERATURA CITADA	110
X. ANEXOS	116
10.1 Anexo A	116
10.2 Anexo B	118

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formación y desarrollo de hongos filamentosos. En los cuadros se muestran los tipos de hifas y el micelio vegetativo y reproductor (Emeterio et al., 2002)	7
Figura 2. Primeros metabolitos aislados de <i>Trichoderma</i> spp	12
Figura 3. Metabolitos secundarios aislados y caracterizados de <i>Trichoderma hypoxylon</i>	13
Figura 4. Diagrama de flujo para determinar un mejor tratamiento para la producción de biomasa de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (primera etapa).....	29
Figura 5. Diagrama de flujo para la extracción de compuestos bioactivos de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (segunda etapa).....	30
Figura 6. Obtención de inóculo puro de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (CPM-115).	31
Figura 7. Inoculación de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB) en caja de Petri para la obtención de biomasa.....	36
Figura 8. Cosecha de biomasa de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> , a los 10 días de incubación	37
Figura 9. Proceso de molido de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	38
Figura 10. Proceso de filtrado estéril por diferentes poros del sobrenadante de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (CPM-115).....	38
Figura 11. Proceso de prensado y filtración del macerado de la muestra de biomasa seca de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (CPM-115).....	39
Figura 12. A: Concentración del macerado de biomasa seca de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (CPM-115) en rotavapor. B: Extracto hidroalcohólico al 32% de la biomasa seca de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	40
Figura 13. A: Concentración del macerado del sobrenadante de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (CPM-115) en rotavapor. B: Extracto acuoso (sobrenadante concentrado), obtenido del sobrenadante de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	41

Figura 14. Esterilización por filtración en acrodisco de 0.20 μm y almacenamiento a 4 $^{\circ}\text{C}$ del extracto de la biomasa de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (CPM-115)	41
Figura 15. Caracterización fisicoquímica de los extractos de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (CPM-115).	42
Figura 16. Ajuste de la cantidad de las bacterias a una concentración de 1×10^8 UFC/mL para el diseño experimental y de 1×10^4 UFC/mL para verificar el inóculo con 50 Unidades Formadoras de Colonias (UFC), en cajas de Petri con medio de cultivo Agar Müller Hinton.	45
Figura 17. Distribución de las microdiluciones en la microplaca para la prueba de susceptibilidad bacteriana.	46
Figura 18. Especificaciones de la inoculación de la bacteria en estudio para realizar la prueba de susceptibilidad bacteriana.	47
Figura 19. Forma en que se colocó la microplaca para evitar la pérdida de humedad	48
Figura 20. Inoculación de la caja de Petri con medio de cultivo Agar Müller Hinton para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> en los diferentes disolventes (disolvente hidroalcohólico al 32% y agua destilada estéril), sembrado con las cepas bacterianas en estudio	49
Figura 21. Morfología macroscópica de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> del día 0, 5 y 10 de incubación cultivada en medio de cultivo semisólido PDA + Cloranfenicol (20 $\mu\text{l}/\text{mL}$).	50
Figura 22. Morfología microscópica de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> , cultivada en medio de cultivo semisólido PDA + Cloranfenicol (20 $\mu\text{l}/\text{mL}$).	51
Figura 23. Crecimiento y morfología macroscópica de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> de los diferentes subtratamientos del tratamiento 1, cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB) en agitación	55
Figura 24. pH final del sobrenadante de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> de los subtratamientos del tratamiento 1, a los 10 días de	

incubación, cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB)	58
Figura 25. Sólidos disueltos totales del sobrenadante de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> de los cinco subtratamientos del tratamiento 1, a los 10 días de incubación cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB)	59
Figura 26. Conductividad eléctrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$) del sobrenadante de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> de los cinco subtratamientos del tratamiento 1, a los 10 días de incubación cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB)	60
Figura 27. Resistividad eléctrica (Ω) del sobrenadante de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> de los cinco subtratamientos del tratamiento 1, a los 10 días de incubación cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB)	61
Figura 28. Azúcares disueltos ($^{\circ}\text{Bx}$) del sobrenadante de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> de los cinco subtratamientos del tratamiento 1, a los 10 días de incubación cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB)	62
Figura 29. Biomasa seca (mg/mL) de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> de los cinco subtratamientos del tratamiento 1, a los 10 días de incubación, cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB)	63
Figura 30. pH final del sobrenadante de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> del tratamiento 2 al tratamiento 5, a los 10 días de incubación cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB)	65
Figura 31. Azúcares disueltos ($^{\circ}\text{Bx}$) del sobrenadante de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> del tratamiento 2 al tratamiento 5, a los 10 días de incubación, cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB)	66

Figura 32. Biomasa seca (mg/mL) de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> del tratamiento 2 al tratamiento 5, a los 10 días de incubación, cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB).....	67
Figura 33. Color de la biomasa de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> en los días 5 y 10 de la cinética de crecimiento, cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB).	71
Figura 34. Color y textura de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB) en los días 5 y 10 de incubación en estado estático.	71
Figura 35. Textura de la biomasa de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> en los días 5 y 10 de incubación, cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB).	72
Figura 36. Densidad de la biomasa de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> en los días 5 y 10 de incubación, cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB).	73
Figura 37. Proporción de esporulación (%) de la biomasa de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> en los días 5 y 10 de incubación, cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB).....	74
Figura 38. Biomasa húmeda y seca de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB) en estado estático.....	76
Figura 39. Efecto bacteriostático del extracto hidroalcohólico al 32% de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i> CPB-2 a las 24 horas de incubación bacteriana	80
Figura 40. Efecto bacteriostático del extracto acuoso de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i> CPB-2 a las 24 horas de incubación bacteriana.....	81
Figura 41. Efecto bactericida del extracto hidroalcohólico al 32% de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i> (CPB-2), a las 48 horas de incubación.....	82

Figura 42. Efecto bactericida del extracto acuoso de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i> (CPB-2), a las 48 horas de incubación.	82
Figura 43. Cultivo y conteo de las unidades formadoras de colonia (UFC) de la cepa CPB-2 de <i>Staphylococcus aureus</i> por microdilución en medio de cultivo Agar Müller Hinton, a las 24 horas de incubación.	84
Figura 44. Efecto bacteriostático del extracto hidroalcohólico al 32% de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> sobre <i>Bacillus subtilis</i> CPB-5, a las 24 horas de incubación bacteriana.....	85
Figura 45. Efecto bacteriostático del extracto acuoso de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> sobre <i>Bacillus subtilis</i> CPB-5 a las 24 horas de incubación bacteriana.....	86
Figura 46. Efecto bactericida del extracto hidroalcohólico al 32% de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> contra <i>Bacillus subtilis</i> CPB-5 a las 48 horas de incubación	87
Figura 47. Efecto bactericida del extracto acuoso de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> sobre <i>Bacillus subtilis</i> CPB-5, a las 48 horas de incubación.	87
Figura 48. Cultivo y conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) de la cepa CPB-5 <i>Bacillus subtilis</i> por microdilución en medio de cultivo Agar Müller Hinton a las 24 horas de incubación.....	88
Figura 49. Efecto bacteriostático del extracto hidroalcohólico al 32% de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> sobre <i>Escherichia coli</i> CPB-8, a las 24 horas de incubación bacteriana.....	89
Figura 50. Efecto bacteriostático del extracto acuoso (sobrenadante concentrado) de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> sobre <i>Escherichia coli</i> CPB-8 a las 24 horas de incubación bacteriana.....	90
Figura 51. Efecto bactericida del extracto hidroalcohólico al 32% de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> contra <i>Escherichia coli</i> CPB-8, a las 48 horas de incubación	91

Figura 52. Efecto bactericida del extracto acuoso (sobrenadante concentrado) de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> contra <i>Escherichia coli</i> CPB-8, a las 48 horas de incubación.....	91
Figura 53. Cultivo y conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) de la cepa CPB-8 <i>Escherichia coli</i> por microdilución en medio de cultivo Agar Müller Hinton, a las 24 horas de incubación.....	93
Figura 54. Efecto bacteriostático del extracto hidroalcohólico al 32% de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CPB-13, a las 24 horas de incubación bacteriana.....	94
Figura 55. Efecto bacteriostático del extracto acuoso (sobrenadante acuoso) de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CPB-13, a las 24 horas de incubación bacteriana.....	95
Figura 56. Efecto bactericida del extracto hidroalcohólico al 32% de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CPB-13, a las 48 horas de incubación.....	96
Figura 57. Efecto bactericida del extracto acuoso (sobrenadante concentrado) de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CPB-13, a las 48 horas de incubación	96
Figura 58. Cultivo y conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) de la cepa CPB-13 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por microdilución en medio de cultivo Agar Müller Hinton a las 24 horas de incubación.	98
Figura 59. Actores de la estrategia para la producción de extractos naturales de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> con propiedades antimicrobianas y alto potencial de aplicación en la agricultura regenerativa.....	106
Figura 60. Metodología para la obtención de extractos naturales de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	109

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación del género <i>Trichoderma</i>	9
Cuadro 2. Constante dieléctrica (25 °C) de los disolventes más utilizados en extracciones (Santos, 2000).	21
Cuadro 3. Empresas productoras de formulaciones de <i>Trichoderma</i> en México (León y Mier, 2010; Melchor et al., 2019).	27
Cuadro 4. Cepa de <i>Trichoderma</i> spp. utilizada en el estudio.....	31
Cuadro 5. Características morfológicas del crecimiento micelial de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> a los 5 días de incubación.	32
Cuadro 6. Tratamiento 1, obtención de biomasa de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (CPM-115).	32
Cuadro 7. Tratamientos del 2 al 5 para la obtención de biomasa de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (CPM-115).	33
Cuadro 8. Características macroscópicas evaluadas a los 5 y 10 días de crecimiento de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	37
Cuadro 9. Cepas de bacterias utilizadas en el estudio.	43
Cuadro 10. Distribución de la prueba de susceptibilidad bacteriana usando el extracto hidroalcohólico al 32% y el extracto acuoso (sobrenadante concentrado) de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> , como agente antimicrobiano	47
Cuadro 11. Características morfológicas macroscópicas de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> de los cinco subtratamientos del tratamiento 1, cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB), (día 10 de incubación).	52
Cuadro 12. Caracterización macroscópica del tratamiento 2 al tratamiento 5 para la obtención de biomasa de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> , cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB), (día 10 de incubación).	56
Cuadro 13. Caracterización fisicoquímica del sobrenadante y biomasa seca de la cepa CPM-115 <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> en los diferentes tratamientos estudiados.	69

Cuadro 14. Caracterización morfológica macroscópica de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> en los días 5 y 10 de incubación, cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB) en estado estático.....	75
Cuadro 15. Caracterización fisicoquímica del sobrenadante de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	76
Cuadro 16. Rendimiento por gravimetría (mg/mL) del extracto hidroalcohólico al 32% y extracto acuoso (sobrenadante concentrado) de la cepa CPM-115 de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>	77
Cuadro 17. Caracterización fisicoquímica del extracto hidroalcohólico al 32% y el extracto acuoso (sobrenadante concentrado) de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (CPM-115).....	78
Cuadro 18. Concentración de los extractos de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (CPM-115) en las diferentes microdiluciones estudiadas en la microplaca.....	79
Cuadro 19. Actores de la estrategia para la producción de extractos naturales de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> con potencial de aplicación en la agricultura regenerativa.....	103

I. INTRODUCCIÓN

Entre el 20% y 30% de la producción agrícola anual es afectada por plagas y enfermedades, siendo los principales agentes causales algunas bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* presentes en el suelo y agua. Debido a esta problemática, se ha dado un uso intensivo de agroquímicos en los cultivos agrícolas generando problemas frecuentes de resistencia a plaguicidas y patógenos microbianos, causando serios problemas que afectan la calidad del medio ambiente e incluso la salud humana. Uno de los objetivos principales de la agricultura regenerativa es lograr la reducción o eliminación de la aplicación de agroquímicos mediante el uso de organismos antagonistas, como es el caso del hongo del género *Trichoderma*. Varias especies producen metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana y, gracias a sus mecanismos de acción, pueden actuar sobre diversos patógenos. Su empleo es una alternativa sustentable para disminuir los efectos negativos de las enfermedades microbianas en la productividad y calidad de los cultivos agrícolas, lo cual resulta en un menor uso de agroquímicos y en la reducción de la contaminación de suelos y mantos acuíferos. Esto permite la producción de alimentos inocuos y disminuye los costos de la producción agrícola. Sin embargo, hace falta desarrollar nuevos productos de la misma o mayor eficacia que los productos químicos y, principalmente, que mantenga las características iniciales del agente biológico, sin importar el tiempo y condiciones de almacenamiento, sistema de producción y presentación del bioinsumo.

Por las razones descritas, el presente trabajo tuvo como objetivo general analizar las propiedades antibacterianas de los extractos hidroalcohólico y acuoso de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, con el fin de desarrollar nuevos productos naturales con potencial de aplicación para controlar plagas y enfermedades en la agricultura regenerativa.

Este trabajo de investigación comienza con el planteamiento de la siguiente hipótesis: la correcta identificación y caracterización de la especie *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* permitirá obtener extractos naturales con propiedades antibacterianas a través de diferentes solventes. Posteriormente, se presenta el objetivo general y los objetivos específicos de esta investigación, así como una revisión de literatura acerca de las generalidades de los mohos, haciendo énfasis en el estado del arte de *Trichoderma*, donde se abarcan temas como sus generalidades, aplicaciones biotecnológicas, interacción en el suelo y la producción de metabolitos secundarios. Se presenta

una definición sobre agricultura regenerativa, así como la importancia de combatir plagas y enfermedades microbianas a partir del empleo de agentes de control biológico, como es el caso de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*. Se menciona una definición de los extractos naturales, así como su clasificación, importancia y aplicaciones potenciales. Se citan algunos estudios actuales acerca de las propiedades antimicrobianas de extractos del hongo *Trichoderma*, así como las presentaciones comerciales de productos a base de dicho hongo y se hace referencia a la producción comercial en México.

Se estableció una metodología que constó de dos etapas, en la primera etapa se definió el tratamiento adecuado para la producción de biomasa con esporas de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*. Para esto, se realizó una caracterización macroscópica y microscópica de dicha cepa, posteriormente se realizó una caracterización macroscópica de la biomasa y caracterización fisicoquímica del sobrenadante de cada uno de los tratamientos. Para evaluar las diferencias de la obtención de biomasa entre los tratamientos, se realizó un diseño experimental con un análisis estadístico completamente al azar. A partir de la selección del tratamiento para la producción de biomasa con esporas de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, se realizó la segunda etapa de esta investigación que consistió en la obtención de un extracto hidroalcohólico y un extracto acuoso (sobrenadante concentrado), se siguió la metodología de extractos obtenidos por Martínez-Carrera et al. (2014), con el método patentado estandarizado de extracción de compuestos bioactivos utilizando solvente hidroalcohólico (32%) y agua destilada estéril. A los extractos se les realizó una caracterización fisicoquímica (determinación de rendimiento por gravimetría, pH, sólidos totales, conductividad, resistividad y azúcares disueltos), posteriormente se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB) frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, y *Pseudomonas aeruginosa*.

Los resultados demostraron que el extracto hidroalcohólico con un rendimiento de 110.56 ± 4.34 mg/mL y el extracto acuoso con un rendimiento de 110.44 ± 1.68 mg/mL, presentaron propiedades bacteriostáticas y bactericidas de efectos diferenciados en una concentración de 55.22-6.90 mg/mL para el extracto acuoso y 55.28-27.64 mg/mL para el extracto hidroalcohólico, frente a las cuatro cepas de bacterias evaluadas de importancia clínica y ambiental. Finalmente, se presenta una estrategia para el aprovechamiento y aplicación potencial de los extractos naturales de

Trichoderma aggressivum f. *aggressivum* con propiedades antimicrobianas en la agricultura regenerativa libre de agroquímicos.

II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Hipótesis

La correcta identificación y caracterización de la especie *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* permitirá obtener extractos naturales con propiedades antibacterianas a través de diferentes solventes.

2.2 Objetivo general

Analizar las propiedades antibacterianas de extractos naturales de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, con el fin de desarrollar nuevos productos naturales con potencial de aplicación para controlar plagas y enfermedades en la agricultura regenerativa.

2.3 Objetivos específicos

1. Producir biomasa de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* en cultivo estático, para la obtención de extractos hidroalcohólico y acuoso.
2. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los extractos obtenidos de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, en relación con cuatro cepas bacterianas de importancia clínica y ambiental (suelo, agua, hortalizas).
3. Diseñar una estrategia para desarrollar nuevos productos naturales de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, con impacto potencial en la agricultura regenerativa libre de agroquímicos.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Biotecnología y desarrollo

Biotecnología es un término acuñado en 1919 por Karl Ereky, ingeniero agrónomo húngaro, que tuvo la visión de una época en la que la biología podía fusionarse con la tecnología. Por lo que en ese momento el término biotecnología incluía todos los procesos mediante los cuales se obtenían productos a partir de materias primas con la ayuda de organismos vivos (Brandenberg et al., 2011). Sin embargo, a principios de la década de los sesenta el término biotecnología fue empleado con mayor frecuencia para describir toda una serie de procesos de naturaleza biológica que tienen presencia desde hace 3000-6000 a.C., los cuales fueron caracterizados por haber sido desarrollados industrialmente durante este siglo, con base en un amplio conocimiento de aspectos bioquímicos y microbiológicos involucrados. Gracias a los grandes avances que ha tenido la biología molecular en específico en la ingeniería genética aplicados a la biotecnología durante la segunda mitad de la década de los setenta dieron al término biotecnología, un gran impacto entre la opinión del público en general y en particular en la comunidad científica, logrando que el término biotecnología se adoptará para describir una mayor gama de actividades del sector químico-biológico (Bisang et al., 2009; Garibay et al., 2004).

Actualmente, según el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB), define Biotecnología como “cualquier aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos, organismos vivos o sus derivados, para fabricar o modificar productos o procesos para usos específicos”. Los organismos vivos o derivados de los mismos (células, enzimas, entre otros) utilizados con mayor frecuencia incluyen microorganismos, animales y plantas. Son empleados para procesar sustancias, generalmente otros materiales renovables, o servir como fuentes de sustancias o bienes valiosos. La definición que establece el CDB es aplicable tanto a la biotecnología “tradicional” como a la “nueva” o “moderna” (Bisang et al., 2009; Brandenberg et al., 2011).

La nueva biotecnología representa un importante progreso científico y experimentado por la biología y la genética molecular ofreciendo una gran perspectiva de cambios para nuestra vida (Muñoz, 2001). Las aplicaciones de la biotecnología son desarrolladas por una colección de actividades de investigación multidisciplinaria, comúnmente denominadas tecnologías habilitadoras. La base de estas tecnologías habilitadoras son las disciplinas científicas de biología

molecular, genética, microbiológica, bioquímica, química de proteínas, ingeniería química y de procesos e informática. Desde el avance de la tecnología del ADN recombinante, se han desarrollado varias técnicas y aplicaciones que benefician a la humanidad en las áreas de agricultura, medicina, medio ambiente, industria, medicina forense, entre otras (Brandenberg et al., 2011). El desarrollo de la industria biotecnológica ha sido muy importante en los últimos años y a su vez ha tenido un gran impacto en distintos sectores económicos, por lo que el flujo de conocimiento desde el sistema de investigación hacia el sector industrial es muy complejo, siendo un indicador importante el número y el contenido de las patentes (Gómez y Martínez, 2008). Por lo tanto, la biotecnología se puede entender como un conjunto de técnicas que permiten la aplicación de las propiedades de los seres vivos para producir bienes y servicios.

3.2 Generalidades de los mohos

Los mohos se encuentran clasificados en el reino *Fungi* y son uno de los grupos más diversos e importantes, se aíslan prácticamente de cualquier ambiente, superficie y organismo vivo (animales, plantas, invertebrados, etc.). En medios de cultivo sólido y cualquier superficie natural en la que crecen producen colonias algodonosas con esporas que dan un aspecto pulverulento. En medios de cultivo líquido forman conglomerados que se depositan en las paredes y en el fondo del recipiente (Hernández, 2018).

Microscópicamente, se observan estructuras tubulares, formadas por múltiples células, que se denominan hifas, las cuales pueden ser septadas (forman compartimentos) o cenocíticas (sin compartimentos). Las hifas de los hongos septados suelen tener un diámetro de 2-5 μm y las cenocíticas de 10-15 μm . Las hifas se desarrollan a partir de esporas y también pueden originarse de fragmentos de otras hifas, se ramifican hasta formar el micelio y colonizar el substrato donde crecen. En una colonia de hongos filamentosos se producen diversas funciones, el micelio vegetativo penetra en el substrato para degradar y obtener nutrientes, mientras que el micelio aéreo se propaga y origina las estructuras reproductoras, como se muestra en la Figura 1 (Emeterio et al., 2002).

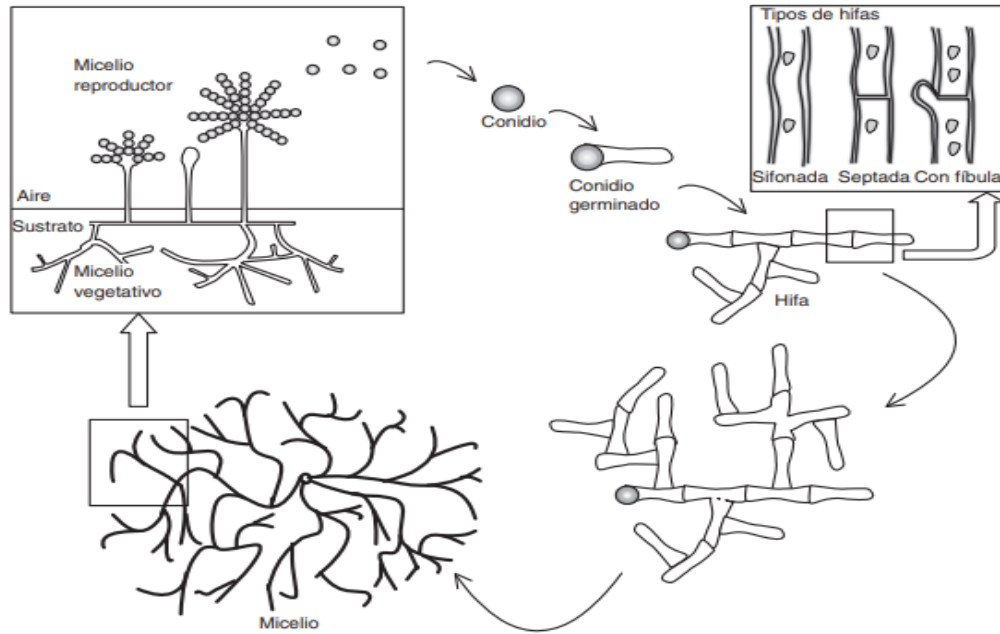


Figura 1. Formación y desarrollo de hongos filamentosos. En los cuadros se muestran los tipos de hifas y el micelio vegetativo y reproductor (Emeterio et al., 2002).

Los mohos generalmente se reproducen asexualmente y las estructuras sexuales solo aparecen cuando las circunstancias son favorables o se encuentran micelios compatibles. Los hongos anamórficos generan esporas asexuales por mitosis, que tienen diversas formas o son mono o pluricelulares. El color de la mayoría de los mohos se debe a sus esporas asexuales (conidios), que suelen desarrollarse en diversas estructuras y que están diseñadas para su dispersión en el aire, germinar y crecer en un ambiente adecuado (Hayer et al., 2014).

Los hongos filamentosos tienen una gran diversidad de aplicaciones en el área médica, alimentaria, biotecnológica, fitosanitaria, agrícola e industrial. Por mencionar algunos ejemplos, como el primer antibiótico, la penicilina, aislada del hongo filamentoso *Penicillium notatum*. En la producción de quesos como el roquefort o el camembert, el vino, el pan y la cerveza, el empleo de hongos filamentosos en la biodegradación de ecosistemas contaminados. Por otro lado, los mohos también producen enfermedades en las plantas y son contaminantes frecuentes del maíz, arroz, tomate, trigo, hongos comestibles y otros cultivos provocando grandes pérdidas económicas estimadas en miles de millones de dólares anuales (Hernández, 2018).

3.3 Estado del arte de *Trichoderma*

3.3.1 Generalidades

La primera descripción taxonómica del género *Trichoderma* fue propuesta por Persoon en 1794 para cuatro especies de hongos similares entre sí por sus características microscópicas. Las cuatro especies descritas como *Trichoderma*, fueron *Trichoderma aureum*, *Trichoderma nigrescens*, *Trichoderma roseum* y *Trichoderma viride*, las cuales fueron clasificadas como una sola especie, *Trichoderma viride*. En 1969, Rifai subdividió estas especies a partir del desarrollo de un concepto de identificación. Desde entonces, nuevas especies de *Trichoderma* han sido descubiertas, en 2006 el género ya comprendía más de 100 especies definidas filogenéticamente (Schuster y Schmoll, 2010). Los continuos esfuerzos y avances tecnológicos que se han logrado para explicar la gran diversidad geográfica de *Trichoderma* han dado como resultado publicaciones sobre el género en todo el mundo. La base de datos del *Index Fungorum* actualmente tiene registrados 515 nombres diferentes para especies de *Hypocrea* y 485 registros para *Trichoderma* (Asociación de Index Fungorum, 2021). Sin embargo, un gran número de cepas de *Trichoderma*, cuyas secuencias se han depositado en el *GenBank*, no han sido identificadas a profundidad y aún queda mucho por estudiar más a fondo sobre esta especie.

El género *Trichoderma* se encuentra en el grupo de los hongos filamentosos de la familia *Moniliaceae* (Cuadro 1), se caracteriza por predominar y colonizar fácilmente en ecosistemas terrestres y acuáticos. Algunas especies de este hongo son de vida libre en el suelo, oportunistas, simbiontes de plantas, y otras son micoparásitas. Pueden colonizar distintos ambientes, debido a su alta capacidad reproductiva y los pocos requerimientos nutrimentales que necesitan para su crecimiento, aunque su crecimiento es favorecido por la materia orgánica, humedad y temperatura óptimas. También se pueden adaptar y sobrevivir a condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad (Schuster y Schmoll, 2010).

Cuadro 1. Clasificación del género *Trichoderma*

Superreino: <i>Eucaryota</i>
Reino: <i>Fungi</i>
División: <i>Eumycota</i>
Subdivisión: <i>Deuteromycotina</i>
Clase: <i>Hyphomycetes</i>
Orden: <i>Moniliales</i>
Familia: <i>Moniliaceae</i>
Género: <i>Trichoderma</i>

Algunos rasgos característicos de *Trichoderma* spp., es que presenta un crecimiento rápido y radial homogéneo, micelio de consistencia esponjosa abundante, aterciopelada o algodonosa, presenta anillos concéntricos bien definidos que van de una tonalidad de color blanco a color verde claro, verde amarillo y verde oscuro profundo cercano a gris. Microscópicamente, muestran una estructura de conidióforos ramificados repetidamente en forma de penachos compactados que forman anillos con un sistema de ramas irregular de manera piramidal, hialinos, fiálides individuales o en grupos donde se forman las esporas asexuales o conidios, los cuales van de una forma globosa a subglobosa, elipsoidal u oblonga, menores de 5 μm de largo y ancho. Las clamidosporas tienden a ser globosas a subglobosas, terminales o intercalares de 15 μm de diámetro (Samuels et al., 2010).

La producción y reactivación de *Trichoderma* spp. en laboratorio, se realiza en medios de cultivo sintéticos ya sean sólidos como Agar con Papa y Dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés), Sabouraud, o líquidos como Caldo de Papa y Dextrosa (PDB, por sus siglas en inglés). A nivel industrial y semi-industrial, se ha realizado la producción de *Trichoderma* mediante fermentación sólida, sumergida o bifásica, empleando como substrato sólido principalmente el grano de arroz, pero también se utilizan otros substratos orgánicos como la zanahoria, cáscara de tomate, cascarilla de café, cascarilla de arroz, cáscara de ajo, cáscara de cacao, cáscara de ajonjolí, cáscara de cacahuete, vaina de frijol, rastrojo de soya y maíz, olote de maíz, maíz quebrado, hojas de plátano secas, entre otros substratos que son ricos principalmente en carbohidratos. En medios líquidos se emplean substratos como caldo de arroz, melaza, remolacha y caldo de azúcar morena (Michel-Aceves et al., 2008). Las condiciones de crecimiento varían dependiendo de la especie, pero por

lo general crecen a una temperatura óptima de 25 °C a 30 °C, pH ácido de 4-6.5, existe fotosensibilidad comportándose mejor en condiciones de luz o UV tipo A 366 nm, y crecen en un rango de tiempo de 5 hasta 10 días, pudiendo mantenerse vivos por más de 15 días.

3.3.2 Aplicaciones biotecnológicas

Trichoderma spp. es un hongo con múltiples aplicaciones biotecnológicas en diferentes sectores como la alimentación, médica, industrial, agrícola, contaminación ambiental, entre otros. La más importante y por la que se caracteriza este género es que ha sido ampliamente utilizado como agente de control biológico contra otros microorganismos fitopatógenos de gran importancia en la agricultura, el cual ejercen a través de varios mecanismos distintos, como son la competencia por espacio y los nutrientes, la antibiosis, el micoparasitismo, la producción de sustancias antibióticas, y la inducción de resistencia sistémica a patógenos. Esto genera beneficios al suelo, tales como el crecimiento de las plantas, una mejor germinación de semillas y estimulación a la altura de la planta, contribuyendo a los cambios del suelo al inducir la resistencia sistémica o localizada de las plantas a través de la producción de compuestos bioactivos como los péptidos, proteínas, compuestos de bajo peso molecular y las enzimas que degradan la pared celular de las plantas (Li et al., 2022). *Trichoderma* tiene el potencial de sintetizar y liberar una gran variedad de enzimas como son polisacaridasas, celulasas, xilanasas y quitinasas, las cuales han sido aprovechadas y explotadas tanto en la industria, y comercialmente para la producción de algunos productos de uso diario como el detergente de ropa, aceite de oliva, vino, cerveza, jugos, alimentos para animales y en la producción de algunos combustibles (Argumedeo-Delira et al., 2009).

También pueden producir diversos metabolitos primarios y secundarios dentro de los que se encuentran las toxinas, como la gliotoxina y hormonas de crecimiento como auxinas y giberelinas, siendo capaces de incrementar el crecimiento de las plantas. Uno de los primeros metabolitos secundarios caracterizados de *Trichoderma* spp. fue el péptido antibiótico paracelsina. Posteriormente, se identificaron una amplia variedad de peptaiboles en *Trichoderma*, la producción eficiente de estos compuestos ocurre en cultivos sólidos y se correlaciona con la producción de esporas (Schuster y Schmoll, 2010). *Trichoderma* es empleado en la biorremediación de suelos y agua, ya que este género es resistente a varios agroquímicos, hidrocarburos aromáticos policíclicos y metales pesados como cadmio (Cd), cobre (Cu), mercurio (Hg), zinc (Zn) y plomo (Pb). Esta resistencia ha provocado que *Trichoderma* sea considerado

como un recurso genético interesante para explorar la biorremediación de lodos residuales, sedimentos y sitios mineros (Juniors et al., 2020).

3.3.3 Interacción en el suelo

La competencia por los principales elementos químicos que se encuentran en el suelo, como el carbono, el nitrógeno, entre otros elementos importantes, así como la competencia por el espacio o sitios de infección específicos, permiten a los agentes de biocontrol la posibilidad de controlar los patógenos de las plantas. *Trichoderma* spp. se encuentra entre los agentes de biocontrol más estudiados y empleados como bioplaguicidas, biofertilizantes y mejoras del suelo, ya que tiene una gran capacidad para movilizar y absorber los nutrientes del suelo, siendo más eficiente y competitivo que muchos otros microorganismos presentes en el suelo, protegiendo así a las plantas de enfermedades (Vinale et al., 2008).

Además de los efectos benéficos que produce la interacción suelo-*Trichoderma*, algunas especies de *Trichoderma* son capaces de colonizar la superficie de las raíces y provocar cambios sustanciales en el metabolismo de las plantas, algunas de las ventajas que se pueden mencionar son: promueven el crecimiento de las plantas y raíces, aumenta la disponibilidad de nutrientes, mejoran la producción de cultivos y aumentan la resistencia a enfermedades. Se ha observado mediante microscopía electrónica que la interacción física entre *Trichoderma* y la planta se limita a las primeras capas celulares de la epidermis de la planta y la corteza exterior de la raíz. Las hifas de *Trichoderma* penetran en la corteza de la raíz, pero la colonización se detiene, esta interacción evoluciona hacia una relación simbiótica más que parasitaria entre el hongo y la planta, por lo que el hongo ocupa un nicho nutricional y la planta está protegida de enfermedades (Vinale et al., 2008).

3.3.4 Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son compuestos orgánicos sintetizados a partir de excedentes del metabolismo primario producidos por bacterias, hongos y plantas. Son un grupo heterogéneo de compuestos naturales químicamente diferentes, relacionados con funciones de supervivencia para el organismo productor, tales como competencia contra microorganismos, macroorganismos, simbiosis, transporte de metales, diferenciación, etc. Los metabolitos secundarios son divisibles en varias agrupaciones como policétidos, terpenos, terpenoides, pirógenos, fenoles y alcaloides

derivados de compuestos indólicos y péptidos no ribosómicos, los cuales en general reflejan su origen y biosíntesis. En este grupo se incluyen los antibióticos, que son productos naturales capaces de inhibir el crecimiento microbiano. La producción de antibióticos a menudo está correlacionada con la capacidad del control biológico y la aplicación de antibióticos purificados (Vinale et al., 2008).

Trichoderma spp. al encontrarse comúnmente en el suelo y raíces de las plantas, ha permitido el aislamiento y caracterización de diversos metabolitos secundarios, debido a su actividad como antimicrobianos. La expresión y producción de los metabolitos secundarios de *Trichoderma* spp. depende de las características genéticas y ambientales (Harman y Kubicek, 2014; Keswani et al., 2014). Los primeros estudios de metabolitos aislados del género *Trichoderma* fueron realizados por Weindling en 1932, donde obtuvo un compuesto cristalino antibiótico de *Trichoderma lignorum* UAMH 5068 antagónico a otros hongos. Dicho compuesto fue denominado gliotoxina, junto con otro compuesto aislado denominado viridino que presentaron actividad fungicida (Figura 2) (Andrade et al., 1992). Uno de los primeros metabolitos secundarios caracterizados de *Trichoderma* spp. fue el péptido antibiótico paracelsina, posteriormente se identificó una amplia variedad de peptaiboles en *Trichoderma* (Schuster y Schmoll, 2010).

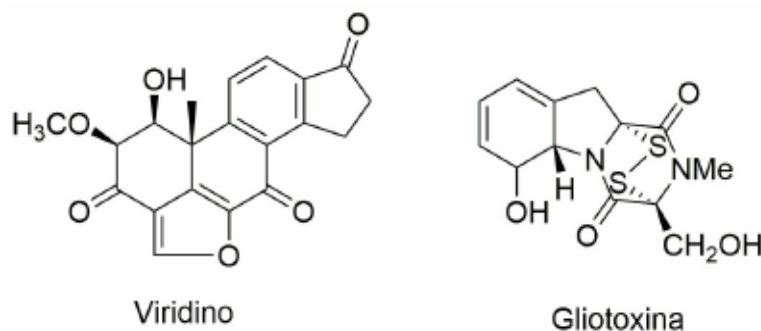


Figura 2. Primeros metabolitos aislados de *Trichoderma* spp.

Los metabolitos secundarios de *Trichoderma* spp. fueron clasificados en 1991 por Ghisalberti y Sivasithamparam en tres categorías: 1) antibióticos volátiles, como el 6-pentil- α -pirona (6PP) y la mayoría de los derivados de isocianuro; 2) compuestos solubles en agua, como el ácido heptelídico o ácido koningico; 3) peptaiboles, que son oligopéptidos lineales de 12-22 aminoácidos ricos en ácido α -aminoisobutírico, N-acetilado en el extremo N-terminal y que contienen un aminoalcohol en el extremo C. A partir de las estructuras químicas de los antibióticos de *Trichoderma*, se

sugieren dos mecanismos de acción diferentes; la producción de compuestos volátiles no polares de bajo peso molecular como 6PP, da como resultado una alta concentración de antibióticos en el medio ambiente del suelo, que tienen un rango de influencia relativamente largo en las especies microbianas. Por el contrario, un efecto de corta distancia puede deberse a que los antibióticos polares y los peptaiboles actúan muy cerca de las hifas productoras. El sinergismo que existe entre enzimas y antibióticos polares está estrictamente relacionado con su mecanismo de acción. Aunque la importancia y efectos de los peptaiboles son claros, el modo de acción de otros metabolitos secundarios de *Trichoderma* como las pironas y sus posibles sinergias con otros compuestos aún no se han estudiado a fondo (Harman y Kubicek, 2014; Vinale et al., 2008).

Trichoderma hypoxylon CGMCC 3.17906, ha sido estudiado mediante un análisis químico, en el cual se observó una riqueza de metabolitos tipo tricotecenos y epipolítio dicetopiperazinas, donde los principales compuestos aislados y caracterizados fueron Harzianum B, Aspergilazina C, Aspergilazina A, Trichodermamida A (Figura 3), con una versatilidad molecular que los hace bastante interesantes en la comprensión del estilo de vida del hongo y el rol ecológico de *T. hypoxylon* en la naturaleza. Estos metabolitos pueden sobre expresarse o combinarse con cepas de biocontrol apropiadas, para obtener nuevas formulaciones que puedan ser más eficaces en el control de enfermedades de plantas y en la protección de frutos post-cosecha (Sun et al., 2016).



Figura 3. Metabolitos secundarios aislados y caracterizados de *Trichoderma hypoxylon*.

3.3.5 Contaminación por *Trichoderma*

En la década de 1980, se descubrió que una mezcla de cepas inicialmente identificadas como *Trichoderma harzianum* causaba contaminación en granjas productoras de hongos comestibles, con pérdidas entre el 30% y el 100% de la producción. En realidad, estas cepas eran dos nuevas

especies actualmente identificadas como *Trichoderma aggressivum* f. *europaeae* y *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (Samuels et al., 2002). Los primeros estudios reportaron que *Trichoderma viride* era la especie más común, que se encontraba como colonizador del compost de los hongos comestibles, especialmente si este tenía un elevado contenido de carbohidratos, por este motivo se encuentra la mayoría de veces en los cereales empleados para la “semilla” de los hongos comestibles (Carrasco, 2010).

Por lo tanto, *Trichoderma* spp. o “moho verde” es considerado un contaminante (competidor) en los cultivos de hongos comestibles, aunque puede confundirse fácilmente con contaminaciones por *Aspergillus* y *Penicillium*, debido a que los substratos empleados para el cultivo de hongos comestibles en la mayoría de ocasiones no son pasteurizados adecuadamente y presentan una excesiva humedad. Esto provoca un ambiente adecuado para el crecimiento de *Trichoderma*, ya que acidifica el sustrato y dificulta el crecimiento del micelio, teniendo la capacidad de inhibir y reducir la fructificación de los hongos comestibles (Komón-Zelazowka et al., 2007; Schuster y Schmoll, 2010). *Trichoderma* suele aparecer en los primeros días de crecimiento como un moho de color blanco, pero entre el día 2 y 9 cambia su color a verde debido a la maduración de sus esporas. Crece bien en un rango entre 22-27 °C y es favorecido por diversos factores como una humedad mayor al 70% en el sustrato ya preparado, por un pH ácido (menor a 6), o por un sustrato con poco N, así como una alta cantidad de carbohidratos disponibles y una relación C/N de 22-23 (Quintanar, 2013). Esto ha ocasionado contaminación y graves pérdidas económicas en las plantas productoras de hongos comestibles.

Se ha demostrado que la enfermedad del moho verde es causada principalmente por *Trichoderma pleurotum*, *Trichoderma pleuroticola* en cultivos de *Pleurotus ostreatus* (seta ostra) y *Trichoderma aggressivum* en cultivos de *Agaricus bisporus* (champiñón). No obstante, también se han detectado otras especies como *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma ghanense*, *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma atroviride* en substratos de compost de *Agaricus* y *Pleurotus*, pero no se ha demostrado una colonización agresiva del sustrato para estas especies. Esta enfermedad presente en la producción comercial de hongos comestibles, también ha llevado recientemente al desarrollo de métodos para la detección rápida y específica de estos mohos contaminantes de substratos de cultivo (Hatvani et al., 2007).

3.4 Agricultura regenerativa

La agricultura regenerativa se define como “la rehabilitación del suelo con el objetivo de mantenerlo productivo el mayor tiempo posible para evitar la expansión a nuevas áreas”, se debe entender como un método y una estrategia agrícola de reconversión, que parte de la conservación, la revitalización, el incremento, y el mejoramiento de la capacidad de producción de los ecosistemas a partir de la regeneración del suelo, logrando una mayor infiltración y retención de agua y aumentando la biodiversidad replicando el proceso de sucesión natural. Por lo tanto, la agricultura regenerativa permite producir más con menos cantidad de insumos (Naranjo, 2021; Vrska, 2019).

Según Lal (2021), los principios fundamentales de la agricultura regenerativa, son los relacionados con la conservación de los recursos e incluyen la siembra directa, la reutilización de los residuos de las cosechas como abono natural, el empleo de cultivos de coberturas, el manejo integrado de nutrientes y de plagas, la rotación de cultivos y la integración de la agricultura con los bosques y la ganadería.

La agricultura regenerativa reúne y concilia dos de los desafíos cruciales que enfrenta el mundo; producir alimentos adecuados y nutritivos, por un lado, así como el de restaurar ecosistemas deteriorados por la actividad humana, por el otro. Se trata de una forma de producir, a través de buenas prácticas, para poder cumplir su misión de alimentar a la creciente población mundial al tiempo que no deteriora los suelos y, por el contrario, contribuye a su salud y recuperación. En este sentido la agricultura regenerativa está basada en la salud del suelo, que es una entidad biológicamente activa, de la que depende no solo la seguridad alimentaria y nutricional de la humanidad, sino también la calidad del aire, la purificación del agua, la retención de carbono y la conservación de la biodiversidad (Casar, 2021; Lal, 2021).

3.4.1 Plagas y enfermedades microbianas

Uno de los objetivos principales de la agricultura regenerativa es la reducción del uso de agroquímicos, fertilizantes sintéticos, insecticidas, fungicidas y pesticidas en los cultivos agrícolas hasta su completa eliminación, ya que esto es lo que marca una gran diferencia entre la agricultura regenerativa de la agricultura tradicional. Sin embargo, aproximadamente entre el 20% y 30% de la producción agrícola anual es afectada por plagas y enfermedades, siendo los hongos, nematodos,

virus, insectos y bacterias los principales agentes causales (Villarreal-Delgado et al., 2018). Debido a esta problemática se ha dado un uso intensivo de agroquímicos en los cultivos agrícolas, generando problemas frecuentes de resistencia a plaguicidas en plagas de insectos y patógenos microbianos, causando serios problemas que afectan no sólo a la salud humana sino también a la calidad del medio ambiente (Pérez-García et al., 2011).

Actualmente, México está enfrentado diversos y severos problemas de abastecimiento de agua, como escasez y contaminación, en específico en las aguas de riego ya que no son tratadas correctamente (Haro et al., 2012), ocasionando enfermedades como manchas foliares en los cultivos agrícolas de verduras, frutas y principalmente hortalizas, como la cebolla, rábanos, cilantro, lechuga, perejil y espinacas (Jacinto et al., 2009). Estas enfermedades y plagas también se pueden generar en cualquier punto de la cadena de producción, desde el empleo de agua de riego muchas veces contaminada, el uso de desechos químicos sólidos como fertilizantes, pesticidas sin tratamiento o con tratamiento inadecuado, la presencia de animales enfermos o con mala alimentación en las áreas de cultivo, la proximidad a zonas de acumulación de aguas residuales e industriales o sólidos orgánicos, una inadecuada higiene por parte de los agricultores y de las instalaciones, malas prácticas de higiene y manipulación de los alimentos, falta de lavado, desinfección, mala preparación y cocción de los alimentos por parte del consumidor.

La contaminación del agua es una de las principales fuentes de transmisión de enfermedades microbiológicas, principalmente ocasionadas por bacterias, como es el caso de *Escherichia coli*. Esta bacteria pertenece al grupo de coliformes y es uno de los principales patógenos presentes en la capa superficial del agua o en los sedimentos, su transmisión se da de manera fecal-oral, lo que ocasiona que esta bacteria se encuentre principalmente en un 90-100% en la microbiota intestinal y por ende en las heces de animales y humanos (Olivas et al., 2013). *Bacillus subtilis* comúnmente se encuentra en el suelo, agua dulce y salada, en la materia vegetal y en el tracto gastrointestinal de los animales y en ocasiones puede llegar a contaminar algunos alimentos causando raramente intoxicación alimenticia (Sánchez et al., 2017). *Pseudomonas aeruginosa* se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza en específico en el agua, aguas residuales, en el suelo, vegetales, alimentos húmedos, y también en ocasiones forma parte de la microbiana normal saprófita de las zonas húmedas de la piel (axilas, conducto auditivo, región perineal y mucosas). *Staphylococcus aureus* está distribuida ampliamente en la naturaleza, por lo que se puede encontrar

en el aire, agua, residuos, animales y personas muertas o heridas, en maquinaria y superficies de la industria alimentaria, y es muy persistente en alimentos crudos, con contenido alto en sales y azúcares (DATABio, 2021).

Escherichia coli, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* se han encontrado principalmente como contaminantes en el almacenamiento de trigo, arroz, cebada, caña de azúcar, avena y sorgo, debido a la microbiota del suelo, el alto contenido de humedad en los granos, la temperatura y el tiempo de almacenamiento (Melchor y Marmolejo, 2017). Estos cereales y granos son de suma importancia ya que son utilizados como sustratos para la producción de hongos comestibles, si estos sustratos no tienen una correcta humedad y esterilización por ende presentarán contaminación por alguna de estas bacterias, causando pérdidas económicas y de producción.

Las bacterias anteriormente mencionadas son altamente patógenas ocasionando un impacto ambiental tanto en el suelo como en el agua y en la mayoría de los casos terminan causando graves enfermedades en humanos de tipo gastrointestinal y enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Este tipo de enfermedades son uno de los principales problemas de salud en México. La creciente búsqueda de un suministro de alimentos saludables, orgánicos, rentables e inocuos está generando una demanda creciente del empleo y desarrollo de métodos nuevos, seguros y amigables con el medio ambiente para reemplazar o al menos completar las estrategias de control ya existentes para los agricultores.

3.4.2 Manejo integrado de plagas

El Manejo Integrado de Plagas (MIP), es un concepto que se ha desarrollado desde hace 60 años, sin embargo, hoy en día aún es un tema de discusión sobre su utilización en la agricultura. En la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo (UNCED, por sus siglas en inglés) celebrada en Río de Janeiro en 1992, se especificó el MIP como una “forma eficiente para disminuir el efecto negativo de las actividades agrícolas sobre el medio ambiente, garantizando la continuidad del proceso de producción de alimentos y fibras”; en dicha conferencia se exhortó a los gobiernos a que adoptaran el MIP como una tecnología primordial en la protección de los cultivos (Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria, 2020).

El Manejo Integrado de Plagas (MIP), actualmente es considerado una alternativa a la problemática planteada sobre los daños ambientales y a la salud humana, vegetal y animal. Es un concepto bastante amplio que se puede entender como una aplicación de diversas técnicas disponibles para el control y manejo de plagas agrícolas, como la integración de medidas que mantengan en un margen bajo las poblaciones de plagas, desde un punto de vista de sistemas, poblaciones y fomentando el uso de información con base en evidencias científicas, métodos y técnicas combinadas en forma armónica para prevenir y mitigar el desarrollo de agentes dañinos al cultivo, con la finalidad de reducir al mínimo el riesgo a la salud humana, de la flora, fauna y la contaminación ambiental (Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria, 2020).

El MIP incorpora factores económicos, sociales y ambientales, con la aplicación de diversas técnicas de manejo sostenible para proveer productos agrícolas asegurando la soberanía y seguridad alimentaria para el presente sin arriesgar su abastecimiento para las futuras generaciones. La importancia de mantener controladas las diversas plagas agrícolas es primordial, razón por la cual la FAO estableció al año 2020 como el Año Internacional de la Sanidad Vegetal, con la finalidad de tomar acciones y concientizar sobre la protección de la salud de las especies vegetales, debido a que constituyen el 80% de los alimentos que se consumen en el planeta. Las pérdidas en los cultivos que ocasionan las diversas plagas agrícolas tienen un costo de más de 220 mil millones de dólares, es decir, una merma en la producción de hasta un 40%, lo que causa vulnerabilidad en el sistema alimentario mundial (Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria, 2020).

El MIP considera diversas técnicas para mantener las poblaciones de plagas en un mínimo. Para incorporar la técnica que mejor se ajuste al problema es necesario conocer el tipo de plaga tomando en cuenta el aspecto físico, hábitos y ciclo evolutivo, daños y efectos que causa sobre el cultivo, prácticas de manejo que se hayan realizado con anterioridad y que no resolvieron el problema. Para combatir favorablemente las plagas se recomienda utilizar diversas técnicas en el mismo ciclo de cultivo, las principales técnicas que se utilizan en el MIP son las siguientes:

- Control mecánico

Consiste en remover y destruir las plagas presentes y las partes de las plantas infectadas, así como las malezas que se presenten en el cultivo, por medio de herramientas mecánicas o técnicas manuales. Es eficiente para superficies pequeñas, no presenta residuos, no es tóxico y no genera resistencia a las plagas, sin embargo, requiere mucha mano de obra y aumenta el costo de producción en grandes extensiones. Se emplean los siguientes métodos: eliminación manual (eliminar con la mano las partes infectadas o enfermas), barreras (barrera natural y barrera artificial) y trampas (se utilizan para monitoreo y pronóstico de plagas) (Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria, 2020).

- Control biológico

Se utilizan los enemigos naturales de las plagas que pueden ser insectos, hongos u cualquier organismo que combata a la plaga. Esta técnica requiere de un estudio preliminar, para evaluar si es posible utilizarse o podría causar daño ecológico (Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria, 2020).

- Control cultural

Son prácticas agronómicas de manipulación directa del agroecosistema con el fin de disminuir el daño económico de las plagas. Las prácticas que se llevan a cabo son la preparación del suelo, manejo del agua, fechas de siembra, densidad de cultivo, fertilización, asociación de cultivos y rotación, cultivos trampa y de barrera, uso de semillas sanas, manejo cultural adecuado y descanso de los suelos. Estas prácticas no requieren costos adicionales, ya que se realizan de manera habitual, son métodos simples, rutinarios, no generan residuos tóxicos, contaminación ambiental y funcionan con cualquier plaga. Sin embargo, no presentan efectos inmediatos, se requiere un conocimiento amplio en el manejo de plagas y las medidas pueden controlar ciertos tipos de plaga, pero desgraciadamente favorecer a otras (Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria, 2020).

- Control químico

El MIP no excluye el uso de plaguicidas químicos, pero pretende limitar su uso y son herramientas indispensables que se deben utilizar racionalmente. Los plaguicidas de uso agrícola son “formulados de uso directo en vegetales que se destinan a prevenir, repeler, combatir y destruir los

organismos biológicos nocivos a estos”. El control químico requiere de conocimientos técnicos y químicos para su uso, además de la capacitación del personal que lo va a aplicar para evitar intoxicaciones u otros problemas de salud y ambientales (Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria, 2020).

3.4.3 Agentes de control biológico

Para lograr la reducción o eliminación de las aplicaciones de agroquímicos en la agricultura, uno de los medios más prometedores para lograr este objetivo de la agricultura regenerativa, es mediante el uso de nuevas herramientas basadas en Agentes de Control Biológico (ACB o BCA). Es decir, el uso de organismos antagonistas naturales como una alternativa sustentable para mitigar los efectos negativos en la productividad y calidad de los cultivos agrícolas causadas por distintas enfermedades, lo cual resulta en el uso nulo de productos químicos, disminuyendo la resistencia de los organismos fitopatógenos, y reduciendo la contaminación de suelos y mantos acuíferos. Esto permite la producción de alimentos inocuos y disminuye los costos de producción agrícola (Pérez-García et al., 2011; Vinale et al., 2008).

Hasta la fecha, se han registrado varios ACB pertenecientes a géneros de hongos como *Gliocladium*, *Ampelomyces*, *Candida*, *Coniothyrium*, pero sobre todo destaca el género *Trichoderma* (Vinale et al., 2008). Microorganismos de este género que han sido evaluados contra diversos patógenos foliares y del suelo y como promotores de crecimiento en cultivos de importancia económica como tomate, manzana, papa y plátano, tanto en almacenamiento, en semillero y en condiciones de campo. Gracias a la producción de metabolitos secundarios de *Trichoderma* con actividad antimicrobiana y a sus mecanismos de acción, pueden actuar de manera sinérgica sobre diversos fitopatógenos que se encuentran en cultivos de trigo, soya, lechuga, pepino cohombro, frijol, entre otros. Además, las especies del género *Trichoderma* son los antagonistas más utilizados a nivel mundial debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aislados, cultivados, a su crecimiento rápido en gran número de sustratos y principalmente porque no son patógenos de plantas. Para la utilización y empleo de *Trichoderma* como agente de control biológico, es necesario desarrollar productos de la misma o mayor eficacia que los productos químicos y principalmente que mantenga las características iniciales del agente biológico, sin importar el tiempo y condiciones de almacenamiento, sistema de producción y presentación del bioinsumo a base del microorganismo biocontrolador (Santos et al., 2012).


3.5 Extractos naturales

Los extractos naturales son productos obtenidos de la maceración de muestras orgánicas (partes de una planta o hongo) en un disolvente, seleccionados por técnicas especializadas de extracción o concentración.

La obtención exitosa de un extracto natural depende de la selección del disolvente a ser usado en el proceso, para esto es necesario tomar en cuenta los aspectos relacionados con la selectividad, la facilidad de manipulación, el precio, la seguridad, los riesgos en cuanto a una posible contaminación ambiental por el grado de toxicidad del disolvente, pero principalmente depende del uso y aplicación que se le vaya a dar al extracto obtenido. El disolvente seleccionado penetra en las células de la muestra orgánica a extraer, dando inicio al proceso extractivo. La penetración del disolvente en la célula induce un momento dipolar en las moléculas de los compuestos que van a ser extraídos. De esta manera, las sustancias extraíbles se adhieren a las moléculas del disolvente. Esta capacidad de asociación puede expresarse en términos de la constante dieléctrica (cuantifica la capacidad de un material para acumular carga eléctrica y por tanto energía). Si se desea obtener un extracto cuya composición química contenga la mayor parte de los constituyentes químicos de la muestra orgánica, se usa un disolvente de naturaleza general, de alta polaridad, como el alcohol etílico o el metanol. O si se quiere obtener un extracto que contenga solamente constituyentes químicos con una determinada característica, se emplea un disolvente selectivo, de menor polaridad como el hexano. Por lo tanto, cuanto más polar sea un disolvente mayor será su respectiva constante dieléctrica, en el Cuadro 2 se muestran los disolventes utilizados en el proceso de extracción, del más polar al menos polar con su respectiva constante dieléctrica (Santos, 2000).


Cuadro 2. Constante dieléctrica (25 °C) de los disolventes más utilizados en extracciones (Santos, 2000).

Disolventes	Constante dieléctrica (25 °C)
Hexano	1.89 Menos polar
Ciclohexano	2.02
1, 4-dioxano	2.21
Tetracloruro de carbono	2.24
Benceno	2.28
Tolueno	2.38
Acetonitrilo	3.88
Éter etílico	4.34
Acetato de etilo	6.02
Ácido acético	6.15
Diclorometano	9.14 Más polar



Cuadro 3, continuación. Constante dieléctrica (25 °C) de los disolventes más utilizados en extracciones (Santos, 2000).

Disolventes	Constante dieléctrica (25 °C)
Piridina	12.3 Menos polar
2-butanol	15.8
1-butanol	17.8
2-propanol	18.3
1-propanol	20.1
Acetona	20.7
Etanol	24.3
Metanol	33.6
Glicerina	43.0
Agua	78.3 Más polar



Los disolventes más utilizados en las industrias de productos naturales y fitoterapéuticos son el alcohol etílico, la glicerina, el propilenglicol, mezclas de estos líquidos, pero en específico se utilizan mezclas hidroalcohólicas y agua apta para el consumo humano, que no contenga una dureza excesiva y tenga pureza microbiológica. En la industria de aislamiento de productos naturales puros, los disolventes más utilizados son los hidrocarburos, hidrocarburos clorados, alcoholes, ésteres, cetonas y aceites. Dependiendo de la finalidad deseada, el disolvente utilizado extrae, selectivamente o no, cierta clase de compuestos (Santos, 2000).

3.5.1 Clasificación

Los extractos naturales de acuerdo al disolvente en que sean macerados también se pueden clasificar en:

- Extractos glicólicos

Son formulaciones de materias primas naturales maceradas principalmente en propilenglicol y especialmente formulados para que sean compatibles con la mayoría de los cosméticos base de naturaleza polar o que contengan una fase polar. Son utilizados como componentes en formulaciones de higiene y belleza como cremas, geles, lociones, shampoos, enjuagues, jabones (líquidos-sólidos), mascarillas, etc. (Lotz, 2013).

- Extractos hidroalcohólicos o tinturas

Son compuestos macerados en alcohol etílico o mezcla de alcohol y agua de diferentes graduaciones que dependen de los compuestos que se desean extraer durante la maceración.

- Extractos oleosos

Compuestos macerados en disolventes como los aceites orgánicos o vegetales, ya que ciertos compuestos principalmente plantas transfieren mejor sus principios activos a los aceites que al agua o al alcohol y sirve como conservante (Berdonces, 2019).

- Extractos hidrosolubles

Son aquellos en los que se utiliza glicerina y/o agua como disolventes para macerar muestras orgánicas y extraer diferentes compuestos.

3.5.2 Importancia y aplicaciones

Los extractos naturales tienen una gran importancia debido a su contenido de compuestos bioactivos, en específico por la presencia de metabolitos secundarios, que les confieren a los extractos naturales propiedades antimicrobianas, que se atribuyen a algunos de sus componentes como los terpenos, compuestos fenólicos, fenilpropanoides, estilbenos, alcaloides, saponinas y flavonoides. Estos metabolitos secundarios tienen la ventaja de ser rápidamente degradados en el suelo, generalmente no presentan un efecto tóxico y pueden ser empleados en los sistemas de agricultura para combatir plagas y enfermedades en diferentes cultivos, funcionar como estimulantes en el desarrollo y crecimiento de las plantas y la activación de sus ciclos bioquímicos para la producción de sustancias específicas (Celis et al., 2008). Junto a su actividad antimicrobiana los extractos naturales poseen otras aplicaciones, entre las que podemos destacar: anti-inflamatorias, inmunomoduladoras, espasmolíticos y sedantes, en general en las áreas médicas, alimentos, cosméticos, industrial y agrícola.

3.6 Propiedades antimicrobianas de extractos del moho *Trichoderma*

Se han caracterizado antibióticos (peptaiboles) con actividad antimicrobiana producidos por *Trichoderma koningii* SMF2, el sobrenadante que se obtuvo del substrato de crecimiento se sometió a filtración en gel y cromatografía líquida de alta resolución (columna Pharmadex LH20) con agua destilada como eluyente y como disolvente se empleó metanol. El extracto crudo

obtenido permitió identificar, los metabolitos activos Trichokonin VI, VII y VIII, conocidos comercialmente como tricoconinas. Estas son estables y permanecen biológicamente activas en diferente pH y temperatura, incluso no pierden su actividad después de ser esterilizadas en autoclave, pero son insensibles a las enzimas proteolíticas. Trichokonin VI adquiere una estructura helicoidal típica y su estructura cambia sólo ligeramente a diferentes temperaturas y valores de pH. Se demostró actividad antimicrobiana contra los agentes infecciosos como *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia carotovora*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, y *Candida albicans* (Xiao-Yan et al., 2006).

Leelavathi et al. (2014) evaluaron la actividad antimicrobiana de *Trichoderma harzianum* mediante el método de difusión de pozos y la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), a partir del sobrenadante empleado como extracto crudo frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumiga*, y *Aspergillus clavatus*, obteniendo actividad antagonista en la concentración de 50 y 100 µl y en la CMI las mejores concentraciones fueron 100 y 150 µl, tanto para los hongos como las bacterias antes mencionadas.

El micelio de *Trichoderma atroviride* y *Trichoderma virens* se ha probado con acetato de etilo (EtOAc) como disolvente, para la obtención de un extracto seco de EtOAc, la actividad inhibitoria que mostró fue de un 100% con la concentración de 100 µg/10 µl de extracto y en la CMI las mejores concentraciones fueron 100 µg/10 µl y 10 µg/10 µl de extracto frente a *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora infestans*, *Phytophthora nicotianae* y *Phytophthora sojae* (Bae et al., 2016).

A partir del micelio de *Trichoderma atroviride* concentrado en metanol al 80%, se obtuvo un extracto concentrado, del cual se extrajeron metabolitos no citotóxicos con potencial antibacteriano y antioxidante. La prueba de discos estériles presentó mejores resultados de inhibición con la concentración de 25 µg/mL del extracto, contra *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, y *Enterobacter aerogenes* (Saravanakumar et al., 2018).

Tchameni et al. (2020), evaluaron la actividad antimicrobiana y la participación de enzimas líticas extracelulares producidas por *Trichoderma erinaceum*, *Trichoderma gamsii*, *Trichoderma*

afroharzianum, y *Trichoderma harzianum*. A partir del sobrenadante de cada cepa, se extrajeron con acetato de etilo los metabolitos orgánicos, obteniendo un extracto orgánico crudo, el cual mostró inhibición frente a *Pythium myriotylum* a una concentración de 80 µg/µl del extracto crudo, la cepa que presentó mejores resultados de inhibición fue *Trichoderma harzianum* con 63.3%.

Se ha evaluado el efecto de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma virens* en la eclosionabilidad de huevos de especies de *Ancylostoma*, a partir de cuatro extractos: extracto crudo (sobrenadante), extracto filtrado (sobrenadante filtrado), extracto macerado crudo (micelio macerado en nitrógeno líquido), y extracto macerado filtrado (micelio macerado en nitrógeno líquido, sometido a filtración). El extracto que mostró mayor reducción de eclosión fue el macerado crudo con 1 mL de extracto por cada 103 huevos de *Ancylostoma*, mostrando 68.4% de eclosión (Hofstätter et al., 2016).

3.7 Productos comerciales a base de *Trichoderma*

Trichoderma spp. se encuentra en el mercado de la agricultura como bioplaguicida, biofertilizante, como solubilizador de nutrientes en campos agrícolas o descomponedor de materia orgánica, promotor del rendimiento y crecimiento vegetal. Este es producido principalmente en formulaciones sólidas y líquidas a base de las especies de *Trichoderma viride*, *Trichoderma virens* y en mayor proporción de *Trichoderma harzianum* a partir de hifas, clamidosporas y conidias. Ambas formulaciones requieren de secado, a escala industrial se emplea el secado por aspersion por su bajo costo, eficiencia y para obtener un producto estable con prolongada vida de anaquel (Cumagun, 2014; Melchor et al., 2019).

Trichoderma spp. se encuentra comercialmente en formulaciones como talcos, vermiculita-salvado de trigo, gránulos de pesta (masa cohesiva hecha de harina de trigo, rellenos y otros aditivos que contienen al hongo), polvos mojables, granulados dispersables, aceite vegetal o mineral, en polvo, Pyrex-biomasa, pellets de alginato, concentrados emulsionables, aerosoles, entre otros. Es recomendable emplear formulaciones en aerosol o líquidas, ya que estos favorecen la supervivencia del agente fúngico durante períodos más largos (6 meses almacenados a 20 °C), a diferencia de las formulaciones en polvo que provocan la desecación de conidios y la pérdida de viabilidad a los tres o seis meses de almacenamiento. Otros productos como Trichidex®,

Trichoderma 2000® y Rootshield® presentan vidas útiles cercanas a los 6 meses, si se almacenan entre 10 °C y 25 °C (Santos et al., 2012).

A nivel mundial, India es el país con mayor distribución de este tipo de formulaciones, destacando el uso de especies como *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma gamsii*, *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma polysporum*, *Trichoderma virens* y *Trichoderma viride*. Utilizan diferentes vehículos orgánicos e inorgánicos, mediante tecnologías de fermentación líquida o sólida, se administran mediante tratamiento de semillas, bioimprimación (tipo de recubrimiento o tratamiento de semillas que implica la hidratación de estas y la inoculación con microorganismos beneficiosos), inmersión de plántulas, aplicación directa al suelo y aspersión foliar (Kumar et al., 2014). Por otro lado, destacan otros países con una menor distribución como Bélgica, Chipre, Francia, Italia, España, Suecia, Eslovenia, Reino Unido, Turquía, Estados Unidos de América, Canadá, Sudáfrica, Marruecos, Vietnam, Australia y Nueva Zelanda. El 67% de las formulaciones comerciales que hay en el mercado están constituidas por una sola especie de *Trichoderma*, el resto incluye combinaciones de dos o más especies del mismo género, o en su defecto una mezcla con especies de hongos formadores de micorrizas, bacterias y otros compuestos biológicos (Melchor et al., 2019).

3.7.1 Producción comercial en México

En México, las principales formulaciones son a base de *Trichoderma* spp., en polvo soluble, polvo humectante, gránulo dispersable e hidrosoluble en agua y suspensión acuosa (León y Mier, 2010). Comercialmente existe un producto llamado PHC® T-22, un biofungicida biológico preventivo para el control de enfermedades de tomate y chile, entre un gran número de especies vegetales a cielo abierto o invernadero, su ingrediente activo es *Trichoderma harzianum* cepa T-22, proporcionando protección contra hongos patógenos como *Phythium*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Cylindrocladium*, *Sclerotinia*, *Phytophthora*, y *Thielaviopsis* (Plant Health Care de México, 2021).

La producción comercial de formulaciones de *Trichoderma* spp., se realiza aproximadamente en 68 plantas industriales, en las que se reproducen 37 agentes de control biológico. De estos agentes, 14 son especies del género *Trichoderma* en específico de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* y *Trichoderma fasciculatum*, utilizadas como ingredientes activos en la formulación de

bioplaguicidas, a los cuales se les adiciona un ingrediente inerte, una sustancia o coadyuvante que facilita su manejo, aplicación y efectividad (León y Mier, 2010). En el Cuadro 3, se muestran ejemplos de empresas mexicanas que producen especies de *Trichoderma* spp. para control biológico.

Cuadro 4. Empresas productoras de formulaciones de *Trichoderma* en México (León y Mier, 2010; Melchor et al., 2019).

Cepa	Planta productora
<i>Trichoderma fasciculatum</i>	Laboratorio Nafex, Estado de México
	Leticia de Paz Hernández, Estado de México
<i>Trichoderma harzianum</i>	Agricultura Nacional, S.A. de C.V., Puebla
	Agrobiológicos del Noroeste, S.A. de C.V., Sinaloa
	Agrobiosol de México, S.A. de C.V., Sinaloa
	Alta Tecnológica Agrotécnica, S.P.R. de R.L. de C.V., Jalisco
	Bio-Bich Uruapan, Michoacán
	Control Biológico, A.C., Chihuahua
	Desarrollo Lácteo, S.P.R de R.L., Durango
	Laboratorio Nafex, Estado de México
	Laboratorio y Servicios Agrobiológicos, S.A. de C.V., Sinaloa
	Leticia de Paz Hernández, Estado de México
	Naturalmente Puresa, S.A. de C.V., Durango
	Nocon, S.A. de C.V., Estado de México
<i>Trichoderma</i> spp.	Agro Fisher, S.P.R. de R.I., Michoacán
	Agroindustria Fungi-Agrícola de Oriente, S.P.R. de R.I., Tepeaca, Puebla
	Ultraquimia Agrícola, S.A. de C.V., Ciudad de México
<i>Trichoderma viride</i>	Islavel, S.A. de C.V., Puebla
	Leticia de Paz Hernández, Estado de México
	Nocon, S.A. de C.V., Estado de México

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Centro de Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales (CB-HCFM) del *Campus* Puebla del Colegio de Postgraduados, consistió en dos etapas de investigación.

En la primera etapa, se realizaron cinco tratamientos con diferentes condiciones de crecimiento para determinar en cual se obtenía mayor cantidad de biomasa seca. En el tratamiento 1 se realizaron cinco subtratamientos sin replica, en agitación (90 rpm), se emplearon diferentes volúmenes de medio de cultivo y diferente capacidad del recipiente (frascos de vidrio) y se colocó 1 círculo de micelio de 0.5 cm de diámetro por cada 100 mL de medio de cultivo líquido PDB. En el tratamiento 2 en agitación (40 rpm) y en el tratamiento 3 en estado estático, se realizaron para cada tratamiento 4 réplicas, se colocaron 100 mL de medio de cultivo líquido PDB en frascos de vidrio de 1000 mL (80 x 180 mm), se inocularon con 4 círculos de micelio de 0.5 cm de diámetro. En el tratamiento 4, se realizaron 2 réplicas en estado estático, se colocaron 300 mL de medio de cultivo líquido PDB en frascos de vidrio de 1000 mL (80 x 180 mm), se inocularon con 12 círculos de micelio de 0.5 cm de diámetro. En el tratamiento 5, se realizaron cinco replicas en estado estático, se colocaron 50 mL de medio de cultivo líquido PDB en cajas de Petri de vidrio de 250 mL (150 x 15 mm), se inocularon con 2 círculos de micelio de 0.5 cm de diámetro. A partir de estos cinco tratamientos, se definió el tratamiento adecuado para la obtención de biomasa de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (Figura 4).

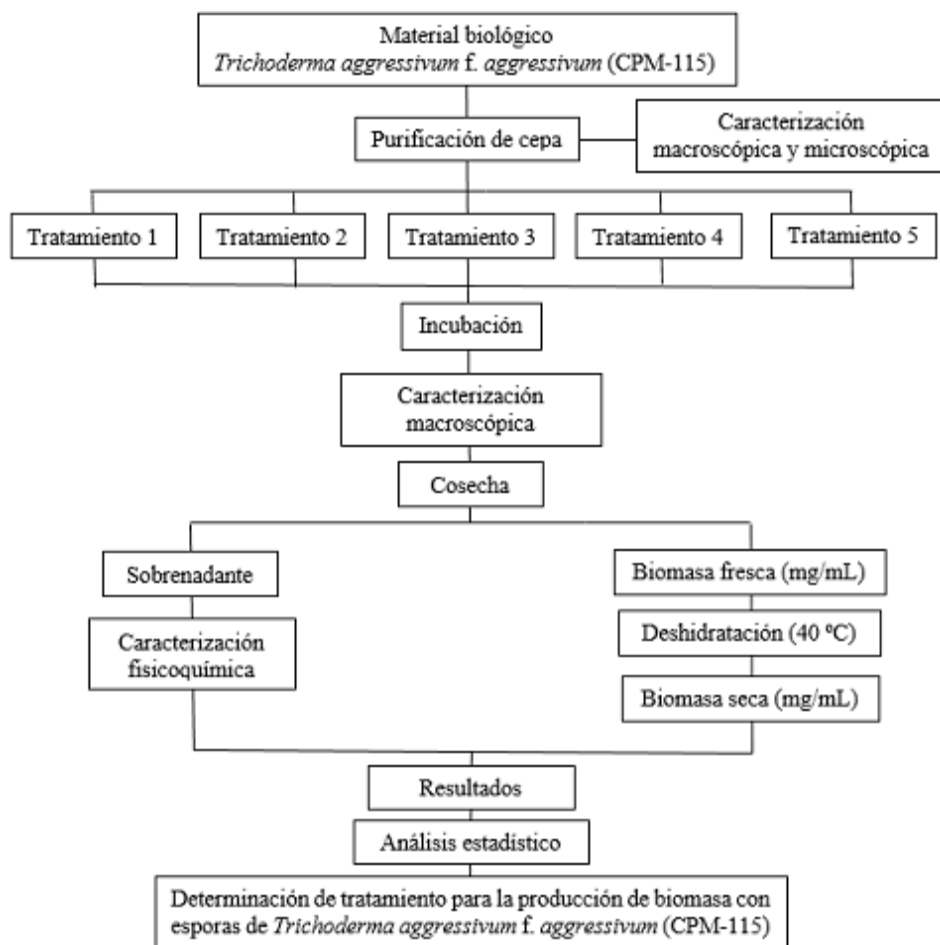


Figura 4. Diagrama de flujo para determinar un mejor tratamiento para la producción de biomasa de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (primera etapa).

A partir del análisis estadístico realizado en la etapa 1 de esta investigación, se seleccionó el tratamiento 5 para ser empleado en la segunda etapa, ya que en este tratamiento se obtuvo mayor cantidad de biomasa seca de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, a partir de la cual se obtuvo un extracto hidroalcohólico al 32% y un extracto acuoso, siguiendo la metodología de extractos obtenidos por Martínez-Carrera et al. (2014) con el método patentado estandarizado de extracción de compuestos bioactivos (Figura 5).

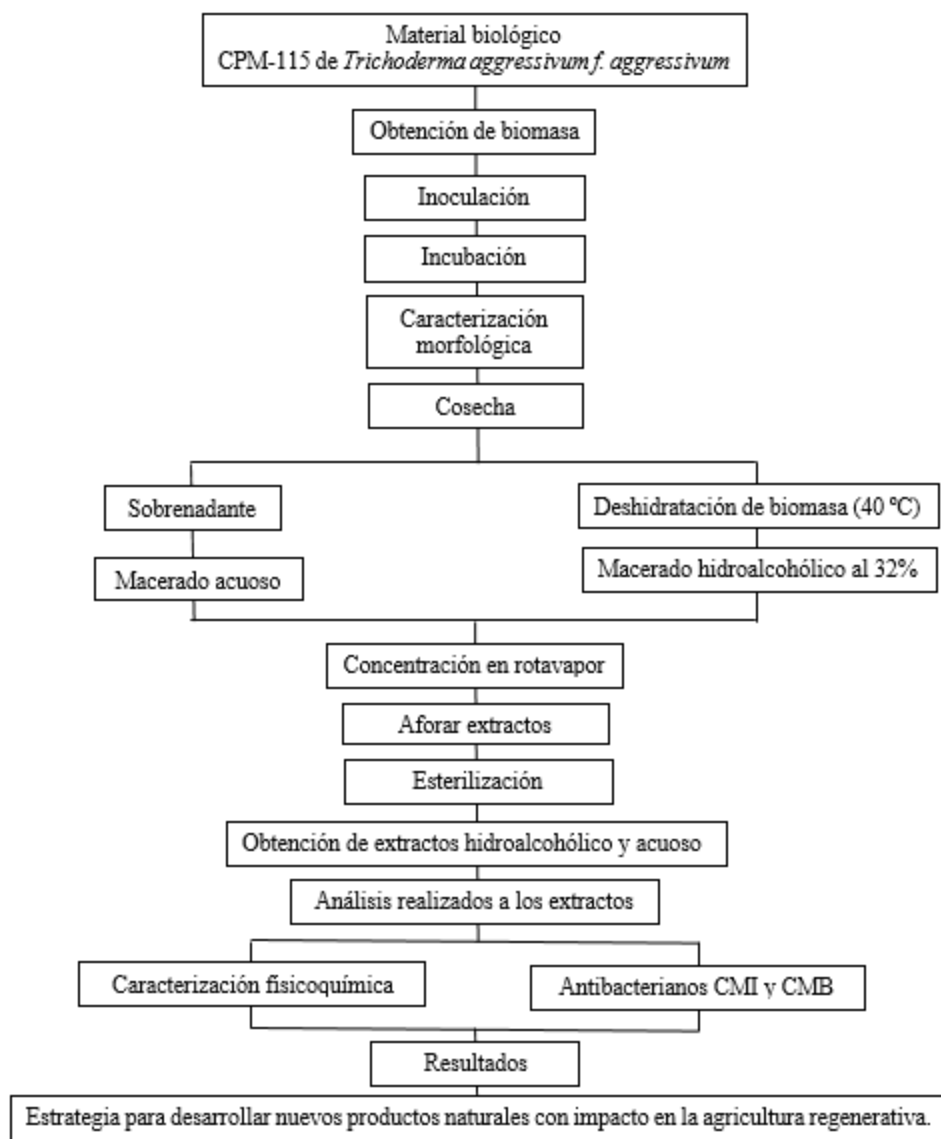


Figura 5. Diagrama de flujo para la extracción de compuestos bioactivos de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum f. aggressivum* (segunda etapa).

4.1 Material biológico

El material biológico empleado en esta investigación fue obtenido del Centro de Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales (CB-HCFM) del *Campus* Puebla del Colegio de Postgraduados. En el Cuadro 4 se enlista la cepa de hongo utilizado.

Cuadro 5. Cepa de *Trichoderma* spp. utilizada en el estudio.

Registro	Género y Especie	Procedencia (Estado)	Cultivo asociado
CPM-115	<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> Samuels y W. Gams	Guanajuato	<i>Pleurotus</i> spp.

CPM=Colegio de Postgraduados, Mohos.

4.2 Aislamiento y purificación de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*

Para la obtención del inóculo micelial de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, se sembró inicialmente en medio de cultivo semisólido Agar con Papa y Dextrosa (PDA, Bioxon), adicionado con antibiótico cloranfenicol (20 µl/mL) en cajas de Petri de 60 x 15 mm, para la obtención de un cultivo puro. Se realizaron 5 réplicas e incubaron a temperatura ambiente por 5 días (Figura 6), para su posterior uso en la obtención de biomasa.



Figura 6. Obtención de inóculo puro de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115).

4.2.1 Caracterización macroscópica y microscópica de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*

Se realizó una descripción de las características morfológicas de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115), para la determinación del color de la colonia se empleó como instrumento de medición la carta de colores *Royal Horticultural Society* (2015). Para la caracterización microscópica, se utilizó un microscopio estereoscópico marca Zeiss, con el objetivo de verificar y medir las estructuras sexuales características de dicha especie; la medición se llevó a cabo con ayuda de la regla del microscopio. Las variables que se evaluaron para la caracterización macroscópica y microscópica se describen en el Cuadro 5.

Cuadro 6. Características morfológicas del crecimiento micelial de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* a los 5 días de incubación.

Variables		Característica
Macroscópicas	Color	Color de la colonia (Carta de colores RHS, 2015)
	Textura	Lanosa, algodonosa, pulverulenta, aterciopelada
	Densidad	Escaso, regular, abundante
	Micelio aéreo	Escaso, abundante
Microscópicas	Hifas	Diámetro, pigmento, tabique
	Fiálides	Diámetro
	Esporas	Forma, diámetro

RHS= Carta de colores *Royal Horticultural Society*, 2015.

4.3 Evaluación de los diferentes tratamientos para la obtención de biomasa de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115)

Se realizaron cinco tratamientos con diferentes condiciones de crecimiento para determinar en cual se obtenía mayor cantidad de biomasa seca de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, como se muestra en los Cuadros 6 y 7.

Cuadro 7. Tratamiento 1, obtención de biomasa de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115).

Número	Subtratamientos (Clave)	Condición	Volumen de medio de cultivo PDB (mL)	Capacidad del recipiente (mL) (d x h mm)	Número de inóculos (0.5 cm de diámetro)	Número de réplicas
1	FA1.1	Agitación (90 rpm)	1000	2000 (136 x 206)	10	n=1
	FA1.2		500	2000 (136 x 206)	5	
	FA1.3		500	1000 (101 x 225)	5	
	FA1.4		100	500 (86 x 176)	1	
	FA1.5		100	250 (70 x 138)	1	

PDB= Medio de cultivo líquido Caldo de Papa Dextrosa. d= Diámetro. h= Altura. FA= Frasco de vidrio en agitación.

Cuadro 8. Tratamientos del 2 al 5 para la obtención de biomasa de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115).

Número	Clave de réplica	Condición	Volumen de medio de cultivo PDB (mL)	Capacidad del recipiente (mL) (d x h mm)	Número de inóculos (0.5 cm de diámetro)	Número de réplicas
2	FA1-100	Agitación (40 rpm)	100	1000 (80 x 180)	4	n= 4
	FA2-100					
	FA3-100					
	FA4-100					
3	FE1-100	Estático	100	1000 (80 x 180)	4	n=4
	FE2-100					
	FE3-100					
	FE4-100					
4	FE1-300	Estático	300	1000 (80 x 180)	12	n=2
	FE2-300					
5	CPE1	Estático	50	250 (150 x 15)	2	n=5
	CPE2					
	CPE3					
	CPE4					
	CPE5					

PDB= Medio de cultivo líquido Caldo de Papa Dextrosa. d= Diámetro. h= Altura. FA-100= Frasco de vidrio en agitación con 100 mL de medio de cultivo líquido PDB. FE-100= Frasco de vidrio estático con 100 mL de medio de cultivo líquido PDB. CPE= Caja de Petri de vidrio en estado estático.

En el tratamiento 1 se realizaron cinco subtratamientos sin réplica, los cuales se identificaron con las siguientes claves FA1.1, FA1.2, FA1.3, FA1.4 y FA1.5, cada uno con diferentes condiciones de crecimiento. Se colocaron 1000 mL de medio de cultivo Caldo de Papa Dextrosa (PDB) en un frasco de vidrio (FA1.1) de 2000 mL (136 x 260 mm), 500 mL de medio de cultivo PDB en un frasco de vidrio (FA1.2) de 2000 mL (136 x 260 mm), 500 mL de medio de cultivo PDB en un frasco de vidrio (FA1.3) de 1000 mL (101 x 225 mm), 100 mL de medio de cultivo PDB en un frasco de vidrio (FA1.4) de 500 mL (860 x 0176 mm) y 100 mL de medio de cultivo en un frasco de vidrio (FA1.5) de 250 mL (70 x 138 mm). Del inóculo previamente preparado en medio de cultivo semisólido PDA + cloranfenicol (20 µl/mL), se fraccionó el micelio joven con un popote estéril en inóculos de 0.5 cm de diámetro y con ayuda de una aguja de disección estéril se retiró el micelio del agar semisólido y se colocó un inóculo de micelio por cada 100 mL de medio de cultivo PDB en cada uno de los frascos de vidrio. Se dejaron en incubación a 27 °C con luz blanca a 90 rpm durante 10 días.

En el tratamiento 2 y tratamiento 3, se colocaron 100 mL de medio de cultivo líquido PDB en frascos de vidrio de 1000 mL (80 x 180 mm), se realizaron 4 réplicas en cada tratamiento a las cuales se les asignaron las claves de identificación FA1-100, FA2-100, FA3-100 y FA4-100 para el tratamiento 2 y las claves asignadas para las réplicas del tratamiento 3 fueron FE1-100, FE2-100, FE3-100 y FE4-100. En el tratamiento 4 (estático) se colocaron 300 mL de medio de cultivo líquido PDB en frascos de vidrio de 1000 mL (80 x 180 mm), se realizaron dos réplicas con las claves FE1-300 y FE2-300, cada una de las réplicas de los tratamientos antes mencionados se inocularon con 4 círculos de micelio de 0.5 cm de diámetro por cada 100 mL de medio de cultivo. El tratamiento 2 se incubó a $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ en agitación a 40 rpm, los tratamientos 3 y 4 se incubaron en estado estático a temperatura ambiente ($26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), durante 10 días.

En el tratamiento 5 (estático), se colocaron 50 mL de medio de cultivo líquido PDB en cajas de Petri de vidrio de 250 mL (150 x 15 mm), se realizaron 5 réplicas con las claves de identificación CPE1, CPE2, CPE3, CPE4 y CPE5, se colocaron 2 inóculos de micelio de 0.5 cm de diámetro en cada caja de Petri de vidrio. Se incubaron a temperatura ambiente ($26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 10 días.

4.3.1 Caracterización macroscópica y obtención de biomasa de los tratamientos

En los cinco tratamientos, se realizó una evaluación de las características macroscópicas en los días 1, 4, 5, 6 y 10 de incubación de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, las variables que se evaluaron fueron color usando como instrumento de medición la carta de colores *Royal Horticultural Society* (2015), textura (algodonosa, aterciopelada, pulverulenta o lanosa), densidad (escaso, regular o abundante), porcentaje de esporulación y porcentaje de contaminación.

En el día 10 de incubación, se realizó la obtención de biomasa de la cepa CPM-115 *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* de cada uno de los tratamientos, en condiciones de esterilidad se realizó un filtrado con ayuda de papel filtro de poro convencional, obteniendo la biomasa húmeda de cada uno de los tratamientos y a su vez el sobrenadante recuperado durante el filtrado se colocó en frascos de vidrio estériles de 1 L. La biomasa obtenida se colocó en charolas previamente llevadas a peso constante, para la determinación de biomasa húmeda. Posteriormente, se colocaron en un horno de secado a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas para la determinación de biomasa seca por gravimetría de acuerdo al protocolo del CB-HCFM.

4.3.2 Caracterización fisicoquímica del sobrenadante de los tratamientos

El sobrenadante que se obtuvo de la filtración de la biomasa húmeda de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* del tratamiento 1, se caracterizó fisicoquímicamente evaluando los siguientes parámetros: pH, sólidos disueltos totales (TDS), conductividad y resistividad eléctrica con ayuda de un potenciómetro (Mettler Toledo E.U.A), de cada muestra de sobrenadante se tomaron 2 mL, con la ayuda de una pipeta y se colocaron en una probeta de 10 mL. Para la determinación de azúcares disueltos (°Bx), con una micropipeta de 1000 µl, se tomaron 5 réplicas de 200 µl de sobrenadante de cada uno de los tratamientos, cada muestra se colocó en el lector del refractómetro (PAL-1 ATAGO), previamente calibrado con agua destilada.

Del tratamiento 2 al tratamiento 5, sólo se determinaron los siguientes parámetros: pH, azúcares disueltos y biomasa seca por gravimetría (mg/mL), para evitar contaminación cruzada con los equipos del CB-HCFM, ya que en este tratamiento el sobrenadante obtenido visualmente contenía mayor cantidad de esporas lo que podía provocar contaminación en el área y en los equipos utilizados.

4.3.3 Análisis estadístico

Para evaluar las diferencias estadísticas entre los tratamientos de obtención de biomasa de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, se realizó un diseño experimental con un análisis estadístico completamente al azar, en el que se observaron las diferencias significativas de cada uno de los parámetros fisicoquímicos evaluados, se realizaron cinco réplicas para la determinación de cada uno de estos parámetros. Los resultados se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y para la comparación de medias se siguió el criterio de la prueba de Tukey con un nivel de significancia de $\alpha= 0.05\%$. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa InfoStat 2020.

4.4 Obtención de biomasa de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*

A partir de los resultados obtenidos del análisis estadístico de la obtención de biomasa de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* de los diferentes tratamientos evaluados en la primera etapa de investigación, se seleccionó el tratamiento 5 para la realización de la

segunda etapa de este trabajo, debido a la cantidad de biomasa seca que se obtuvo en este tratamiento.

Para la obtención de biomasa de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, se colocaron 50 mL de medio de cultivo líquido Caldo de Papa Dextrosa (PDB, Dixon) en tubos de ensayo de 75 mL (26 x 200 mm), con tapón de rosca tipo baquelita, se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 25 minutos. En condiciones de esterilidad, se colocaron 50 cajas de Petri de vidrio de 250 mL (15 x 150 mm) previamente esterilizadas, a las cuales se les vertió el medio de cultivo líquido PDB estéril de cada tubo y se dejaron reposar por 24 horas como prueba de esterilidad.

Del inóculo previamente preparado en medio de cultivo PDA + cloranfenicol (20 µl/mL), se fraccionó el micelio joven con un popote estéril en inóculos de 0.5 cm de diámetro. Con ayuda de una aguja de disección estéril, se retiró el micelio del agar semisólido y se colocaron dos inóculos en el centro de cada caja de Petri. Una vez inoculadas, selladas y rotuladas las 50 cajas de Petri, se incubaron a temperatura ambiente por 10 días en una superficie plana en estado estático (Figura 7).



Figura 7. Inoculación de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB) en caja de Petri para la obtención de biomasa.

4.4.1 Caracterización morfológica y cosecha de la biomasa de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115)

Se realizó una evaluación de las características macroscópicas a los 5 y 10 días de crecimiento de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115), de las 50 cajas de Petri (réplicas) previamente inoculadas; las variables que se evaluaron se muestran en el Cuadro 8.

Cuadro 9. Características macroscópicas evaluadas a los 5 y 10 días de crecimiento de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*.

Variable	Característica
Color	Color de la colonia (Carta de colores RHS, 2015)
Textura	Algodonosa, aterciopelada, pulverulenta, lanosa
Densidad	Escaso, regular, abundante
Porcentaje de esporulación	0-40% (escaso), 40-80% (regular), 80-100% (abundante)
Porcentaje de contaminación	0% (No hay contaminación), 100% (Contaminación)

RHS= Carta de colores *Royal Horticultural Society*, 2015.

En el día 10 de incubación, se realizó la cosecha de biomasa de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115). En condiciones de esterilidad, se realizó un filtrado por separado de cada una de las cajas de Petri inoculadas, con ayuda de papel filtro de poro convencional y embudos estériles, obteniendo de esta manera la biomasa y recuperando el sobrenadante en un frasco de vidrio estéril de 1 L, como se muestra en la Figura 8. A la biomasa obtenida, se le retiró el exceso de agua con papel filtro de poro convencional estéril.



Figura 8. Cosecha de biomasa de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, a los 10 días de incubación.

4.4.2 Preparación de la muestra de biomasa seca de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*

La biomasa fresca obtenida de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, se colocó en charolas previamente llevadas a peso constante y se colocaron en un horno de secado a una temperatura de 40 ± 5 °C, durante 48 horas, para deshidratar por completo la biomasa. Transcurrido este tiempo, se retiraron las charolas del horno de secado y se colocaron en un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente, para determinar la biomasa seca por gravimetría,

de acuerdo al protocolo del CB-HCFM. La biomasa seca obtenida se almacenó en una bolsa de polietileno sellada herméticamente con la menor cantidad de aire posible a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta su uso. A partir de la obtención de biomasa seca del hongo, se pesaron y colocaron 10 g de muestra en un mortero de porcelana, la muestra se trituroó en seco hasta obtener un tamaño de partícula lo más fina posible, evitando aplicar un exceso de fuerza para que la muestra no se calentara. Una vez obtenida la muestra molida, se colocaron 10 g de muestra en un sobre de papel filtro poro medio de $6.5 \times 9.0\text{ cm}$, con las orillas cosidas con hilo blanco marca Seralón (Figura 9).

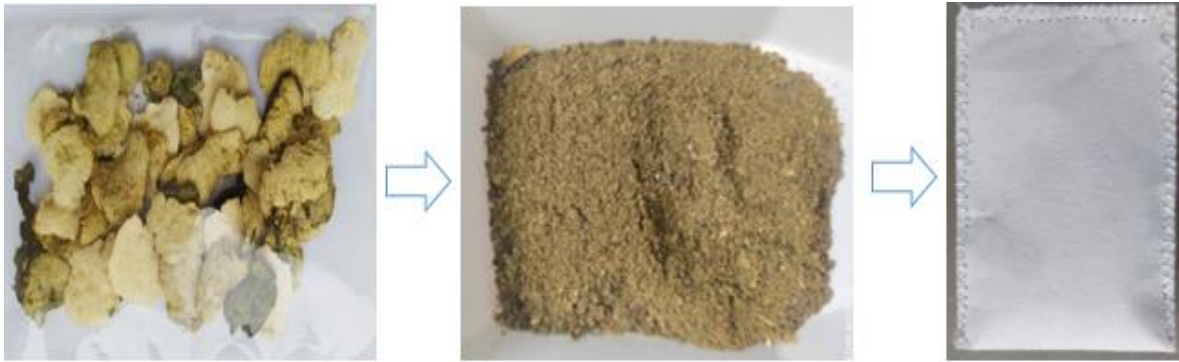


Figura 9. Proceso de molido de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum f. aggressivum*.

4.4.3 Preparación de la muestra del sobrenadante de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum f. aggressivum*

El sobrenadante obtenido de la filtración de la biomasa fresca de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum f. aggressivum*, se filtró previamente al vacío y en condiciones de esterilidad. Se utilizaron los siguientes filtros estériles de diferentes tamaños de poro: $14\text{ }\mu\text{m}$, $11\text{ }\mu\text{m}$, y $0.45\text{ }\mu\text{m}$, en este orden indicado se fue filtrando el sobrenadante. Posteriormente, el sobrenadante filtrado estéril recuperado, se colocó en frascos de vidrio estériles de 1 L y se almacenó a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 10).

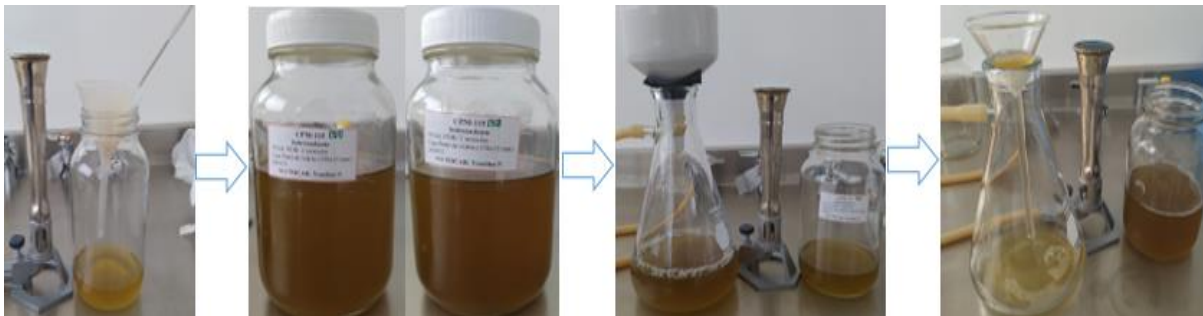


Figura 10. Proceso de filtrado estéril por diferentes poros del sobrenadante de *Trichoderma aggressivum f. aggressivum* (CPM-115).

4.5 Obtención de los extractos de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*

Para la obtención de los extractos, se siguió la metodología para la obtención de extractos desarrollada por Martínez-Carrera et al. (2014), la cual consiste en un método patentado estandarizado de extracción de compuestos bioactivos utilizando el solvente hidroalcohólico (32%).

4.5.1 Maceración de biomasa seca de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*

En un frasco de vidrio de 250 mL con boca ancha y tapa de rosca, se colocó el sobre de papel filtro con la muestra de hongo molido a extraer y 150 mL del disolvente hidroalcohólico al 32%. La muestra se dejó reposar por 24 horas a temperatura ambiente, en estado estático y oscuridad. Transcurrido el tiempo de maceración, se vertió la fase líquida en un vaso de precipitado, en condiciones de esterilidad, se presionó manualmente el sobre de papel filtro con la muestra de hongo molido y, posteriormente, con una prensa manual, hasta retirar por completo el exceso de líquido macerado. El macerado recuperado, se midió con una probeta y se filtró antes de concentrar en el rotavapor con papel filtro de poro convencional como se muestra en la Figura 11.

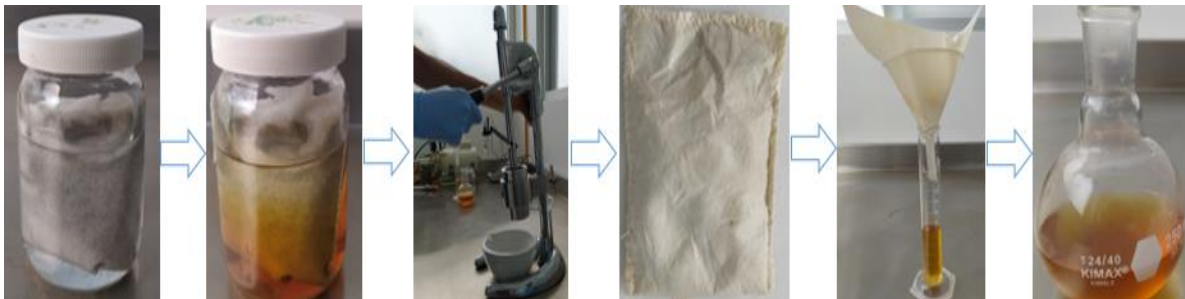


Figura 11. Proceso de prensado y filtración del macerado de la muestra de biomasa seca de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115).

4.5.2 Concentración del macerado

4.5.2.1 Muestra de biomasa seca de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*

El macerado obtenido de la biomasa seca de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115), se concentró en un rotavapor (Modelo HS-2000NS, Hahn Shin Scientific Co.), a presión

reducida, a 40 °C y 90 rpm (Figura 12A), hasta obtener un volumen final aproximadamente de 7 mL del concentrado. Posteriormente, se recuperó el extracto con una pipeta Pasteur utilizando el mismo disolvente hidroalcohólico al 32% para lavar el matraz, en el cual se concentró el macerado, y se aforó a 10 mL en un matraz aforado con el mismo tipo de disolvente. Se obtuvo así el extracto hidroalcohólico al 32% (EH) de la biomasa seca de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115), como se muestra en la Figura 12B.



Figura 12. A: Concentración del macerado de biomasa seca de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115) en rotavapor. B: Extracto hidroalcohólico al 32% de la biomasa seca de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, aforado en un matraz de 10 mL.

4.5.2.2 Muestra de sobrenadante de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*

El litro de sobrenadante obtenido de la cosecha de biomasa, se concentró en dos partes con un volumen de 500 mL, cada macerado se concentró en un rotavapor (Modelos HS-2000NS, Hahn Shin Scientific Co.), a presión reducida, a 40 °C y 90 rpm (Figura 13A), hasta obtener un volumen final de aproximadamente 15 mL del concentrado. Posteriormente, se recuperó el extracto con una pipeta Pasteur utilizando el mismo disolvente, en este caso agua destilada estéril, para lavar el matraz bola, en el cual se concentró el macerado y se aforó a 25 mL en un matraz aforado con el mismo tipo de disolvente (agua destilada estéril). Se obtuvieron, de esta manera 50 mL de sobrenadante concentrado del cultivo de la cepa CPM-115 *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, como se muestra en la Figura 13B. Para fines prácticos de comparación en este trabajo el sobrenadante concentrado se rotuló como extracto acuoso (EA).

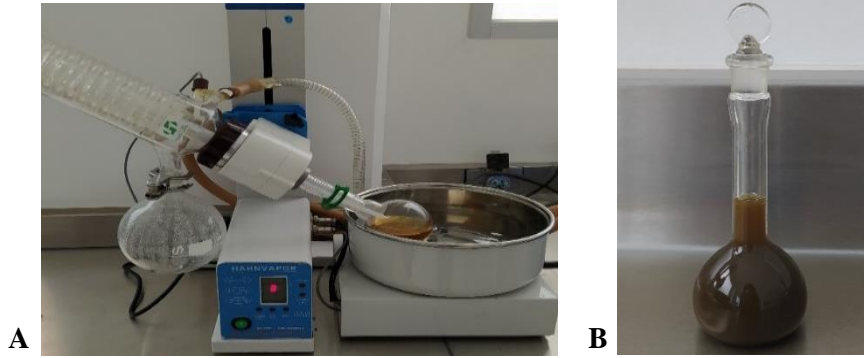


Figura 13. A: Concentración del macerado del sobrenadante de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115) en rotavapor. B: Extracto acuoso (sobrenadante concentrado), obtenido del sobrenadante de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, aforado en un matraz de 25 mL.

4.6 Esterilización de los extractos de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*

Tanto el extracto hidroalcohólico al 32%, como el extracto acuoso, de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, se esterilizaron por microfiltración con un acrodisco hidrofílico Dismic-25 AS (Advantec) de 0.20 μm , colocándose directamente en tubos Falcón estériles de 50 mL en condiciones de esterilidad, se conservaron en refrigeración a 4 °C para su posterior caracterización fisicoquímica (Figura 14).

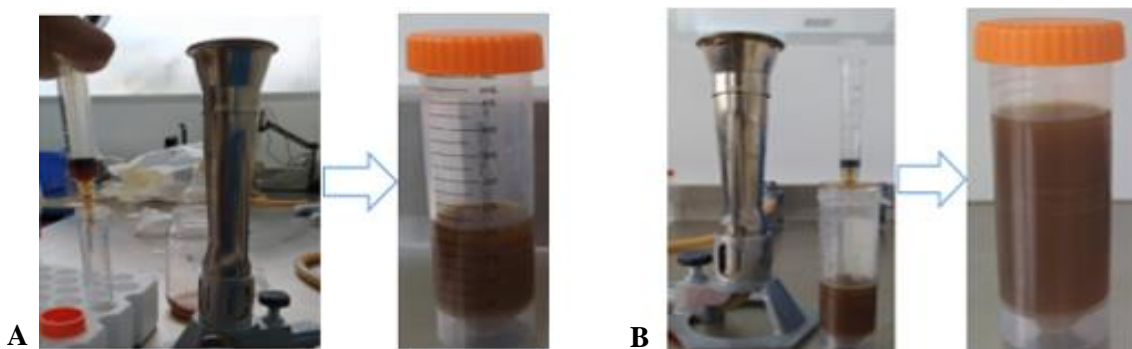


Figura 14. Esterilización por filtración en acrodisco de 0.20 μm y almacenamiento a 4 °C del extracto de la biomasa de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115). A: Extracto hidroalcohólico. B: Extracto acuoso (sobrenadante concentrado).

4.7 Caracterización fisicoquímica del sobrenadante y extractos de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*

4.7.1 pH, conductividad, resistividad y sólidos disueltos totales

La caracterización fisicoquímica del sobrenadante, extracto hidroalcohólico al 32% y extracto acuoso (sobrenadante concentrado), se realizó mediante la determinación de pH, conductividad, resistividad y sólidos disueltos totales con un potenciómetro (Mettler Toledo, E.U.A), como se muestra en la Figura 15, de cada muestra se tomaron 2 mL con la ayuda de una pipeta y se colocaron en una probeta de 10 mL (n= 5).



Figura 15. Caracterización fisicoquímica de los extractos de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115).

4.7.2 Azúcares disueltos (°Bx)

Con una micropipeta de 1000 μ l, se tomaron 5 réplicas de 200 μ l de cada extracto y del sobrenadante de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*. Cada muestra se colocó en el lector del refractómetro (PAL-1 ATAGO), previamente calibrado con agua destilada.

4.7.3 Rendimiento por gravimetría (mg/mL)

Con ayuda de una micropipeta de 1000 μ l, se colocaron 200 μ l de cada extracto en charolas previamente llevadas a peso constante, se realizaron 5 réplicas de cada muestra y se colocaron en un horno de secado a 40 °C por 48 horas hasta la evaporación del solvente y peso constante. Finalmente, se realizaron las operaciones correspondientes para calcular el rendimiento por gravimetría en mg/mL del extracto hidroalcohólico y extracto acuoso (sobrenadante concentrado).

4.8 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por el método de microdilución para el extracto hidroalcohólico (EH) y el extracto acuoso (EA) de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*

El estudio se realizó de acuerdo a la metodología desarrollada por Adebayo et al., 2018.

4.8.1 Cepas de bacterias estudiadas

Las cepas de bacterias, empleadas en esta investigación, fueron seleccionadas y obtenidas del Centro de Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales (CB-HCFM) del Campus Puebla del Colegio de Postgraduados. En el Cuadro 9 se enlista el material biológico utilizado.

Cuadro 10. Cepas de bacterias utilizadas en el estudio.

Registro	Especie	Procedencia
CPB-2	<i>Staphylococcus aureus</i> Rosenbach	Donación
CPB-5	<i>Bacillus subtilis</i> (Ehrenberg) Cohn	Donación
CPB-8	<i>Escherichia coli</i> (Migula) Castellani y Chalmers	American Type Culture Collection (ATCC) 25922
CPB-13	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Schroeter) Migula	American Type Culture Collection (ATCC) 27853

CPB=Colegio de Postgraduados, Bacterias.

4.8.2 Preparación de medios de cultivo

4.8.2.1 Medio de cultivo semisólido Agar Müller Hinton

Se disolvieron 38 g de medio de cultivo semisólido Agar Müller Hinton, marca BD Bioxon, en un litro de agua destilada, a temperatura de ebullición de 3 a 5 minutos en un horno de microondas. Una vez disuelto el medio de cultivo, se esterilizó en una olla de presión (All American) durante 25 minutos a 121 °C. Posteriormente, se vació el medio de cultivo (1000 mL) en cajas de Petri de 60 x 15 mm, se dejaron solidificar y se almacenaron.

4.8.2.2 Medio de cultivo líquido Caldo Müller Hinton

Se disolvieron 21 g de medio de cultivo líquido Müller Hinton, marca Difco, en un litro de agua destilada, se hirvió de 3 a 5 minutos en un horno de microondas. Se colocaron 20 mL del caldo en matraces Erlenmeyer con tapa de rosca de 125 mL y se esterizaron bajo las mismas condiciones que el medio de cultivo Agar Müller Hinton.

4.8.3 Obtención del inóculo bacteriano

De cada una de las bacterias en estudio (CPB-2, CPB-5, CPB-8, CPB-13), se utilizó un cultivo puro con 24 horas de incubación a 35 °C, del cual se tomó una asada para inocular un matraz Erlenmeyer de 125 mL con 20 mL de medio de cultivo Caldo Müller Hinton estéril. El matraz (Matraz 1) se incubó por 24 horas a 120 rpm a 35 °C, en una incubadora orbital con agitación (Thermo Scientific, modelo MAXQ 4000). Transcurrido el tiempo de incubación, se tomaron del “Matraz 1” 100 µl (n= 3) con una micropipeta (Finnpipete) y se colocaron en una microplaca para leerla en el espectrofotómetro (Epoch, BIOTEK Instruments), a una longitud de onda de 600 nm. Una vez obtenidas las lecturas de absorbancia, se procesaron en el programa Excel para obtener un valor promedio y conocer la concentración de bacterias/mL cultivadas en el “Matraz 1”. Conocida la concentración del Matraz 1, se pudo determinar la alícuota o volumen de cultivo necesario para diluirlo en otro matraz (Matraz 2), con 20 mL de medio de cultivo estéril y obtener una concentración de 1×10^8 UFC/mL. Para la confirmación de esta concentración, se determinó en el programa Excel el volumen de cultivo necesario para inocular otro matraz (Matraz 3) con medio de cultivo estéril y obtener una concentración de 1×10^4 UFC/mL (Figura 16). A partir de este matraz, se tomaron 3 réplicas con los microlitros calculados para cada una de las bacterias de estudio y se sembraron en cajas de Petri con medio de cultivo semisólido Agar Müller Hinton para confirmar una población de 30-50 Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

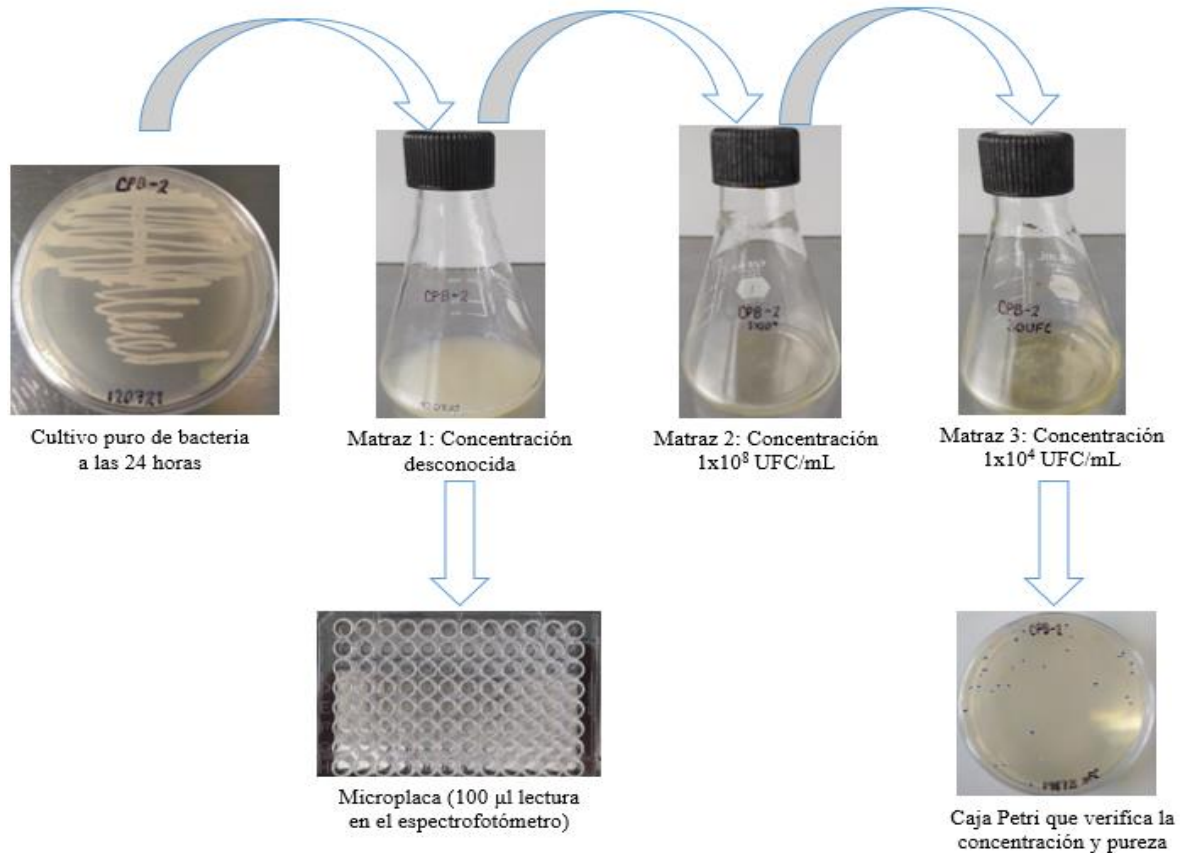


Figura 16. Ajuste de la cantidad de las bacterias a una concentración de 1×10^8 UFC/mL para el diseño experimental y de 1×10^4 UFC/mL para verificar el inóculo con 50 Unidades Formadoras de Colonias (UFC), en cajas de Petri con medio de cultivo Agar Müller Hinton.

4.8.4 Arreglo del bioensayo en la microplaca

Los ensayos se realizaron en microplacas transparentes de 96 pozos (Corning), a todos los pozos de la microplaca se le agregaron 100 µl de Agar Müller Hinton estéril. Con el fin de poder probar el efecto tanto del extracto hidroalcohólico al 32% y el extracto acuoso (sobrenadante concentrado) de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* como agentes antibacterianos (tratamiento), se establecieron controles positivos y negativos para la bacteria, el disolvente y los extractos de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (tratamiento). El control positivo de la bacteria, también llamado control de crecimiento bacteriano, muestra la viabilidad de la bacteria en estudio. El control positivo del disolvente, muestra el efecto del disolvente sobre el crecimiento de la bacteria. El blanco positivo del tratamiento, es el tratamiento sin la bacteria, cuyo valor de D.O. se resta a la lectura del tratamiento. El control de esterilidad comprueba que no hubo contaminación durante la prueba. El control negativo del disolvente determina el valor de la D.O.

que tiene el disolvente, el cual se restó al control positivo del disolvente para cada dilución en estudio. El tratamiento (extracto hidroalcohólico y extracto acuoso de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*) demuestra la actividad antibacteriana sobre la bacteria (Figura 17).

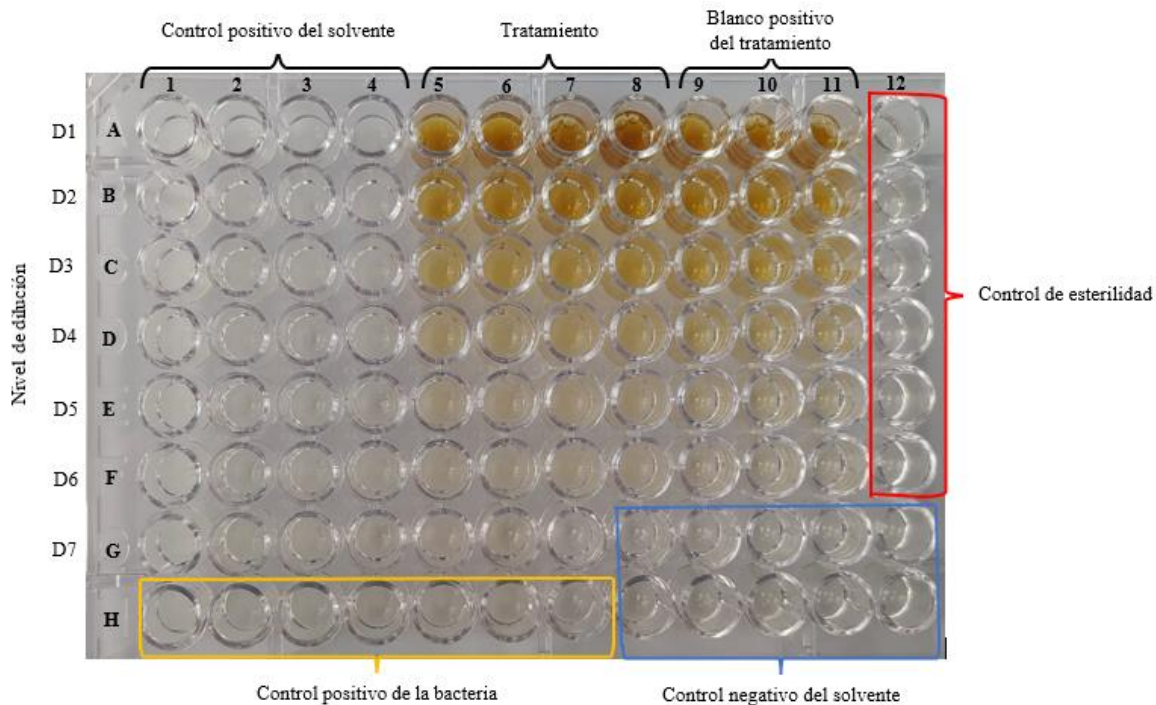


Figura 17. Distribución de las microdiluciones en la microplaca para la prueba de susceptibilidad bacteriana.

4.8.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115) sobre el crecimiento de cuatro bacterias de interés ambiental y clínico

En la Figura 17, se muestra la adaptación de la microplaca en este estudio y los colores que presentan las diferentes diluciones de los controles del solvente, del medio de cultivo y los extractos de la cepa CPM-115 *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (tratamiento). Realizada la distribución se procedió a inocular la microplaca con 2 μ l de inóculo bacteriano (B), como se muestra en la Figura 18. El volumen final de cada pozo fue de 102 μ l.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	B	B	B	B	B	B	B				
B	B	B	B	B	B	B	B	B				
C	B	B	B	B	B	B	B	B				
D	B	B	B	B	B	B	B	B				
E	B	B	B	B	B	B	B	B				
F	B	B	B	B	B	B	B	B				
G	B	B	B	B	B	B						
H	B	B	B	B	B	B						

Figura 18. Especificaciones de la inoculación de la bacteria en estudio para realizar la prueba de susceptibilidad bacteriana.

En el Cuadro 10, se describe el contenido de la microplaca basada en el rótulo de la placa para relacionar las lecturas con los resultados y poder procesarlos en la base de datos.

Cuadro 11. Distribución de la prueba de susceptibilidad bacteriana usando el extracto hidroalcohólico al 32% y el extracto acuoso (sobrenadante concentrado) de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, como agente antimicrobiano. Toda la placa contenía 100 µl de medio de cultivo líquido Müller Hinton (MH) estéril.

Descripción	Microdiluciones (soluciones)	Ubicación (pozos)
Control positivo del solvente	Solvente + 2 µl de inóculo bacteriano	A1-G4
Tratamiento	Extracto + 2 µl de inóculo bacteriano	A5-F8 y G5-G6
Blanco positivo del tratamiento	Extractos	A9-F11
Control de esterilidad	Müller Hinton	A12-F12
Control positivo de la bacteria	Müller Hinton + 2 µl de inóculo bacteriano	H1-H6
Control negativo del solvente	Solvente	G7-G12 y H7-H12

Para realizar las diluciones se mezcló cada pozo y se tomaban 100 µl para ser transferidos a la siguiente fila y así sucesivamente, hasta el último pozo de cada tratamiento; los últimos 100 µl de cada pozo se desecharon.

Al finalizar el llenado de la microplaca (Corning), esta fue colocada en un recipiente de plástico hermético acondicionado para evitar que las muestras se evaporarán durante la incubación de la microplaca. Se empleó agua destilada estéril para mantener humedad dentro del recipiente, simulando una cámara húmeda (Figura 19A). La microplaca se incubó por 24 horas a 35 °C en una

incubadora (Biometra, modelo OV5) (Figura 19B). Después de las 24 horas transcurridas, se leyó la microplaca en el espectrofotómetro (Epoch, BIOTEK Instruments), a una longitud de onda de 600 nm. Los valores de densidad óptica (D.O.) de cada dilución fueron procesados en el programa Excel, para determinar si el extracto hidroalcohólico al 32% y el extracto acuoso (sobrenadante concentrado) de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* tenían efecto antimicrobiano sobre las bacterias estudiadas en sus diferentes diluciones con sus respectivas concentraciones.

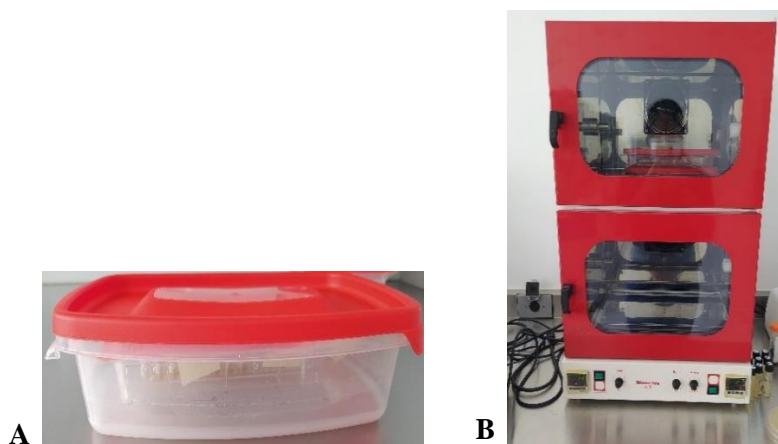


Figura 19. Forma en que se colocó la microplaca para evitar la pérdida de humedad. A: Cámara húmeda. B: Incubadora donde se colocó la cámara húmeda con la microplaca durante 24 horas.

4.8.6 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115) sobre el crecimiento de cuatro bacterias de interés ambiental y clínico

Después de leer en el espectrofotómetro la placa de la prueba de susceptibilidad bacteriana (24 horas de incubación) y para comprobar la concentración mínima inhibitoria (CMI), se realizó una resiembra (n= 3) de 1.0 µl en medio de cultivo semisólido Agar Müller Hinton de cada dilución, tanto del extracto hidroalcohólico al 32%, como del extracto acuoso (sobrenadante concentrado), de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* con la bacteria. Se tomaron muestras de los pozos que contenían las microdiluciones del tratamiento (indicadas como D1 a la D7) y ubicadas en los pozos 5A, 6A y 7A al 5G, 6G y 7F, el control de esterilidad (C.E.) tomado de los pozos 12A al 12F, el control de crecimiento (C.C.) de la bacteria en estudio tomado de los pozos 1H al 6H y del extracto estéril tomado de los pozos 9A al 11A, como se muestra en la Figura

20. La placa se incubó por 24 horas a 35 °C, para determinar el efecto de crecimiento de cada extracto (extracto hidroalcohólico al 32% y extracto acuoso de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*) sobre la bacteria y de esta forma conocer la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB).

Se comprobó la CMI cuando el extracto hidroalcohólico al 32% o el extracto acuoso (sobrenadante concentrado) de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* inhiben la bacteria después de 24 horas de incubación de la caja de Petri. Se estableció como actividad bactericida (CMB), aquella concentración de los extractos de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115) que induce la muerte de la población bacteriana a las 48 horas de realizada la prueba de susceptibilidad.

Basándose en el mismo principio que la CMI, se definió como actividad bacteriostática a la concentración del extracto hidroalcohólico al 32% o del extracto acuoso (sobrenadante concentrado) de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* que inhibió el crecimiento de las bacterias a las 24 horas de incubación de la caja de Petri, pero que permite el crecimiento de las bacterias a las 48 horas de realizada la prueba de susceptibilidad bacteriana.

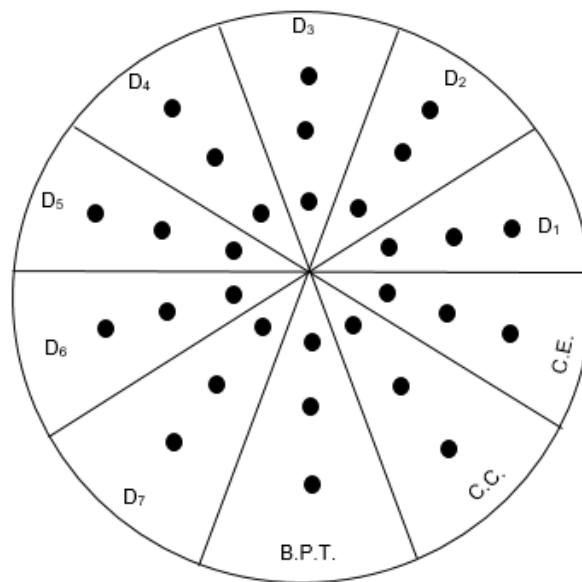


Figura 20. Inoculación de la caja de Petri con medio de cultivo Agar Müller Hinton para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* en los diferentes disolventes (disolvente hidroalcohólico al 32% y agua destilada estéril), sembrado con las cepas bacterianas en estudio. C.E.= Control de esterilidad del medio de cultivo Müller Hinton. C.C. = Control de crecimiento bacteriano (Blanco positivo de la bacteria). B.P.T.= Blanco positivo del tratamiento (Extracto). D= Dilución.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Identificación y caracterización macroscópica y microscópica de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*

Se realizó una caracterización macroscópica en los días 5 y 10 de incubación de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* cultivada en medio de cultivo semisólido PDA + Cloranfenicol (20 µl/mL). Para evaluar el color de la cepa se utilizó como instrumento de medición la carta de colores de *Royal Horticultural Society* (2015). En el día cinco de incubación, *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* presentó un crecimiento radial, textura algodonosa, borde regular, densidad abundante en las esporas de color blanco (RHS2015 157A) y densidad escasa en el micelio aéreo de color verde amarillo pálido (RHS2015 194A). En el día diez de incubación, se formaron anillos concéntricos hacia el borde de la colonia, la coloración de las esporas y del micelio aéreo cambió de verde amarillo pálido (RHS2015 157A) a un verde amarillo grisáceo (RHS2015 194A), como se observa en la Figura 21. Estos resultados coinciden con lo reportado por Carrasco (2010), describiendo un micelio blanco con esporas amarillo limón a verde oscuras y textura algodonosa, en específico para la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*.

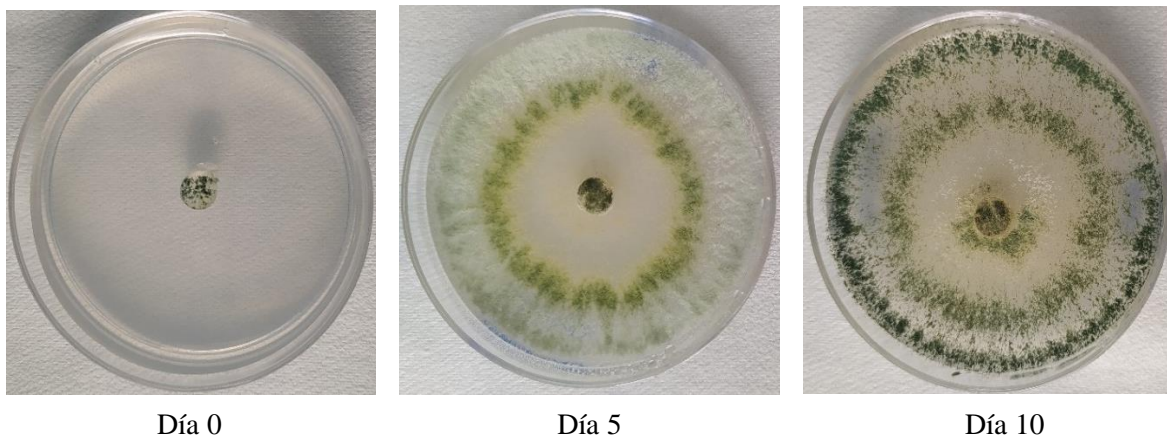


Figura 21. Morfología macroscópica de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* del día 0, 5 y 10 de incubación cultivada en medio de cultivo semisólido PDA + Cloranfenicol (20 µl/mL).

La morfología microscópica de la cepa CPM-115, se llevó a cabo en el tercer día de incubación. Se pudieron observar hifas septadas, hialinas de 2-3 µm de diámetro y 14 µm de largo, esporas poco elipsoidales con un tamaño de 1-2 µm de ancho y 2 µm de largo. La estructura asexual

observada en el microscopio fueron fiálides, las cuales terminaban en conidios apicales (Figura 22). Lo obtenido coincide con lo reportado por Carrasco (2010), observó microscópicamente hifas septadas de 2-4 μm de ancho y presencia de clamidosporas de 6-10 μm . También coincide con Arenas et al. (2009), quienes reportaron que la mayoría de especies de *Trichoderma* spp. presentan conidióforos de 62.5-69.0 x 3.0-4.7 μm y diversas ramificaciones perpendiculares, en algunos casos se observa la formación de ramas laterales en grupos de dos a tres. Las fiálides son largas y delgadas, asimétricas, de 6.3-15.6 x 2.7-3.4 μm , los conidios son de 3.8-4.0 x 3.1-3.7 μm , con forma citriforme y subglobosos.

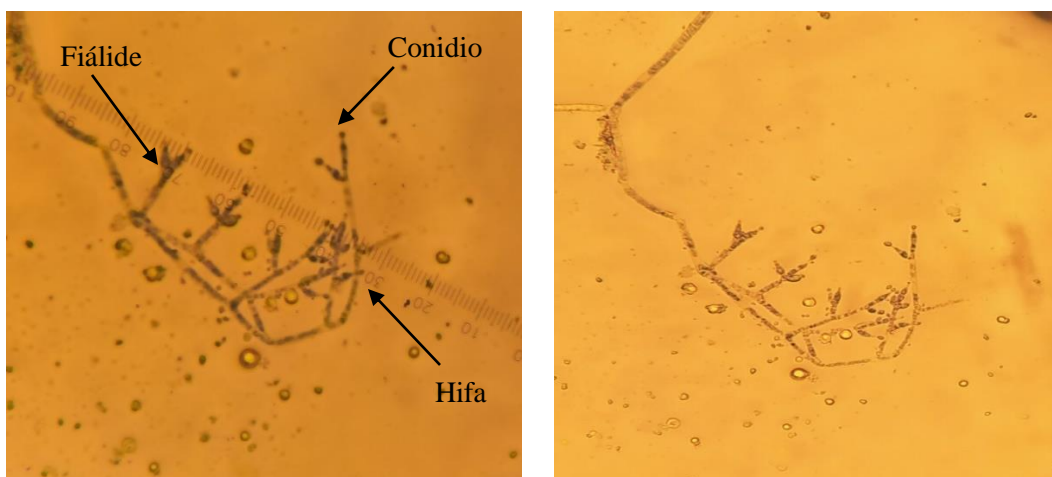


Figura 22. Morfología microscópica de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, cultivada en medio de cultivo semisólido PDA + Cloranfenicol (20 $\mu\text{l/mL}$).

5.2 Evaluación de los diferentes tratamientos para la obtención de biomasa de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*

5.2.1 Caracterización macroscópica de la biomasa de los tratamientos

Se realizó una caracterización macroscópica y monitoreo en los días 1, 4, 5, 6 y 10 de incubación de los cinco tratamientos analizados en este trabajo.

Tratamiento 1

La cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* a 27 °C, con luz blanca a 90 rpm, durante diez días de incubación, presentó en los cinco subtratamientos sin réplica, crecimiento de biomasa en forma de pellets aglomerados, esféricos y en cadena de color blanco (RHS2015 NN

155D) a blanco amarillento (RHS2015 155B), densidad abundante, textura algodonosa y aterciopelada. El subtratamiento FA1.1 en el día seis de incubación presentó escasa producción de esporas en la superficie del frasco de vidrio, sin embargo, en los demás subtratamientos no se observó presencia de esporas (Cuadro 11).

Cuadro 12. Características morfológicas macroscópicas de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* de los cinco subtratamientos del tratamiento 1, cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB), (día 10 de incubación).

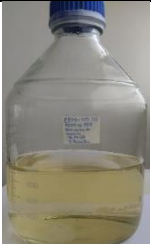

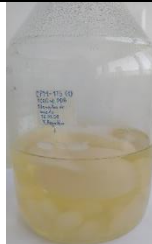





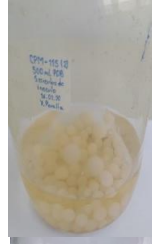
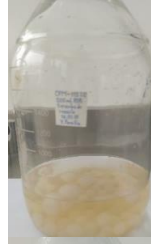

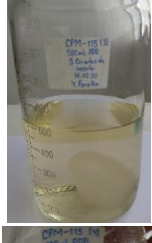
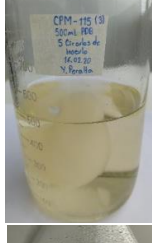
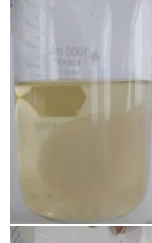
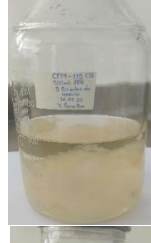
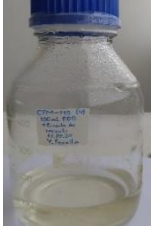

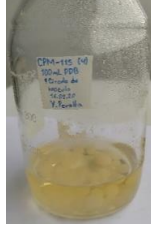

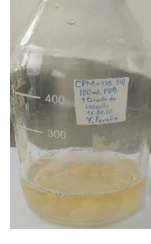
Subtratamientos	Tratamiento 1				
	Color (RHS, 2015)	Textura	Densidad	Forma de pellets	Presencia de esporas
FA1.1	Blanco (RHS2015 NN 155D)	Algodonosa	Abundante	Aglomerados	Sí (escasas)
FA1.2	Blanco amarillento (RHS2015 155B)	Algodonosa	Abundante	Esféricos	No
FA1.3	Blanco (RHS2015 NN 155D)	Aterciopelada	Abundante	Aglomerados	No
FA1.4	Blanco amarillento (RHS2015 155B)	Algodonosa	Abundante	Esféricos	No
FA1.5	Blanco (RHS2015 NN 155D)	Algodonosa y aterciopelada	Abundante	Esféricos y en cadena	No

Tratamiento 1= Frascos de vidrio de diferente capacidad a 27 °C con luz blanca a 90 rpm durante diez días de incubación. Subtratamiento FA1.1= Frasco de vidrio (2000 mL) en agitación con 1000 mL PDB + 10 inóculos de 0.5 cm de diámetro de micelio. Subtratamiento FA1.2= Frasco de vidrio (2000 mL) en agitación con 500 mL PDB + 5 inóculos de 0.5 cm de diámetro de micelio. Subtratamiento FA1.3= Frasco de vidrio (1000 mL) en agitación con 500 mL PDB + 5 inóculos de 0.5 cm de diámetro de micelio. Subtratamiento FA1.4= Frasco de vidrio (500 mL) en agitación con 100 mL PDB + 1 inóculo de 0.5 cm de diámetro de micelio. Subtratamiento FA1.5= Frasco de vidrio (250 mL) en agitación con 100 mL PDB + 1 inóculo de 0.5 cm de diámetro de micelio. RHS= Carta de colores *Royal Horticultural Society*, 2015.

En la Figura 23, se observa el crecimiento y morfología macroscópica de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* monitoreada en diferentes días de incubación (1, 4, 5, 6 y 10 días). El subtratamiento FA1.1, que corresponde al frasco de vidrio de 2000 mL (136 x 260 mm), en agitación con 1000 mL de medio de cultivo líquido PDB + 10 inóculos de 0.5 cm de diámetro de micelio. Se observó en el día uno de incubación turbidez en el medio de cultivo y crecimiento de micelio de forma aglomerada, con textura de apariencia algodonosa. A partir del día dos al cuatro de incubación, se observó mayor producción biomasa de color blanca (RHS2015 NN 155D), en forma de cadena y textura algodonosa. En el día seis de incubación aparecieron las primeras esporas en la superficie y en las paredes del frasco de vidrio. En el día diez de incubación, no se observó mayor producción de biomasa y las pocas esporas producidas se encontraban en las paredes del frasco. El subtratamiento FA1.2, corresponde al frasco de vidrio de 2000 mL (136 x

260 mm), en agitación con 500 mL de medio de cultivo líquido PDB + 5 inóculos de 0.5 cm de diámetro de micelio, en el día uno de incubación se pudo apreciar turbidez en el medio de cultivo, los inóculos se encontraban por separado con poco crecimiento de biomasa. A partir del día dos al cuatro de incubación, hubo crecimiento abundante de biomasa en forma de pellets esféricos de diferente tamaño (pequeños y medianos) dispersos en todo el medio de cultivo, de color blanco amarillento (RHS2015 155B) y textura algodonosa. Entre los días cinco y seis de incubación, se observó mayor cantidad de biomasa en forma de pellets esféricos de tamaño uniforme dispersos en el medio de cultivo líquido. En los días nueve y diez de incubación, tanto en el medio de cultivo como en la biomasa ya no se observó ningún cambio. El subtratamiento FA1.3, corresponde al frasco de vidrio de 1000 mL (101 x 225 mL), en agitación con 500 mL de medio de cultivo líquido PDB + 5 inóculos de 0.5 cm de diámetro de micelio, en el día uno de incubación el medio de cultivo líquido PDB presentó muy poca turbidez, los inóculos se apreciaban de forma aglomerada con poco crecimiento de micelio. A partir del día dos al cuatro de incubación, el medio de cultivo ya estaba completamente turbio y se observó un crecimiento abundante de biomasa de forma aglomerada de textura algodonosa y color blanco (RHS2015 NN 155D), dispersa en la parte inferior del frasco de vidrio. En el día diez de incubación la biomasa aún mostraba crecimiento, ya no se visualizaba de forma aglomerada y empezó a cambiar la textura de algodonosa a aterciopelada. En el subtratamiento con clave de identificación FA1.4, que corresponde al frasco de vidrio de 500 mL (860 x 176 mm), en agitación con 100 mL de medio de cultivo líquido PDB + 1 inóculo de 0.5 cm de diámetro de micelio, en el día uno de incubación el medio de cultivo se observó turbio y el crecimiento de biomasa era en forma de pellets esféricos. Del día dos al día cuatro de incubación, se observó abundante crecimiento de biomasa en forma de pellets esféricos, los cuales tenían un tamaño de aproximadamente 1 cm de diámetro, textura algodonosa y color blanco amarillento (RHS2015 155B). En el día seis de incubación el medio de cultivo líquido PDB presentó un grado de turbidez alto, provocando que cambiara de un color transparente a un color ámbar. En el día diez de incubación, se incrementó la producción de biomasa y algunos pellets esféricos se veían más grandes que otros, el medio de cultivo ya no presentó ningún cambio de color. En el subtratamiento con clave de identificación FA1.5, corresponde al frasco de vidrio de 250 mL (70 x 138 mm), en agitación con 100 mL de medio de cultivo líquido PDB + 1 inóculo de 0.5 cm de diámetro de micelio, a partir del día uno de incubación se observó producción de biomasa y se podía apreciar un solo pellet esférico de aproximadamente 3 cm de diámetro, textura

algodonosa y color blanco (RHS2015 NN 155D). Del día dos al cinco de incubación, la biomasa se fue haciendo más grande sin perder la forma de pellet esférico y manteniendo un solo pellet como en el día uno. Del día seis al día nueve de incubación, se observó un crecimiento de biomasa masivo, provocando que se desarrollaran más pellets algunos de forma esférica y otros en forma de cadena, textura algodonosa y color blanco (RHS2015 NN 155, D). En el día diez de incubación se observó que aún había producción de biomasa, aunque algunos pellets, sobre todo los que eran en forma de cadena, empezaron a mostrar una textura aterciopelada con desprendimiento de micelio en las orillas.

Tratamiento 1	Tiempo de incubación (días)				
	Subtratamientos	1	4	5	6
FA1.1					
					
					
					

FA1.5

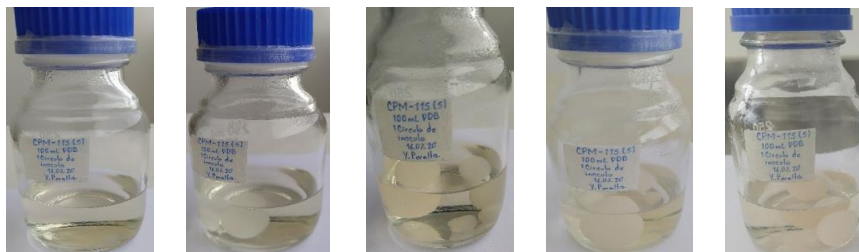
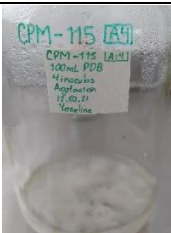


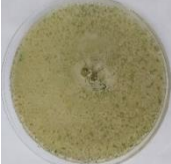


Figura 23. Crecimiento y morfología macroscópica de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* de los diferentes subtratamientos del tratamiento 1, cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB) en agitación. Tratamiento 1= Frascos de vidrio de diferente capacidad a 27 °C, con luz blanca, a 90 rpm, durante diez días de incubación. Subtratamiento FA1.1= Frasco de vidrio (2000 mL), en agitación con 1000 mL PDB + 10 inóculos de 0.5 cm de diámetro de micelio. Subtratamiento FA1.2= Frasco de vidrio (2000 mL), en agitación con 500 mL PDB + 5 inóculos de 0.5 cm de diámetro de micelio. Subtratamiento FA1.3= Frasco de vidrio (1000 mL), en agitación con 500 mL PDB + 5 inóculos de 0.5 cm de diámetro de micelio. Subtratamiento FA1.4= Frasco de vidrio (500 mL), en agitación con 100 mL PDB + 1 inóculo de 0.5 cm de diámetro de micelio. Subtratamiento FA1.5= Frasco de vidrio (250 mL), en agitación con 100 mL PDB + 1 inóculo de 0.5 cm de diámetro de micelio.

En el Cuadro 12, se muestra la caracterización macroscópica de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* en el día diez de incubación, cultivada en diferentes condiciones de crecimiento (tratamientos 2 al 5). En base a los resultados obtenidos, *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* en frascos de vidrio de 1000 mL (80 x 180 mm) con 100 mL de medio de cultivo líquido PDB, inoculados con 4 círculos de 0.5 cm de diámetro de micelio incubado a 27 °C en agitación a 40 rpm (Tratamiento 2), presentó una biomasa en forma de pellets en cadena y aglomerados de color blanco (RHS2015 NN 155D), textura algodonosa, densidad de regular a abundante con escasa producción de esporas. Sin embargo, en frascos de vidrio de 1000 mL (80 x 180 mm) con 100 mL y 300 mL de medio de cultivo líquido PDB, inoculados con 4 círculos y 12 círculos de 0.5 cm de diámetro de micelio (Tratamiento 3 y Tratamiento 4, respectivamente), incubados a temperatura ambiente (26 °C) en estado estático, en estas condiciones de crecimiento *T. aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115) presentó una producción masiva de biomasa con esporas formando una capa en la parte superior del medio de cultivo líquido PDB, de coloración verde amarillo pálido (RHS2015 157A) a verde amarillo grisáceo (RHS2015 194B), textura algodonosa y densidad abundante. Por lo tanto, la producción de biomasa como las características macroscópicas observadas fueron muy similares entre ambos tratamientos, se puede deducir que la cepa CPM-115 mantiene las mismas características morfológicas sin interferir la cantidad de inóculo y el volumen de substrato empleado para la producción de biomasa. Por otra parte, la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* en 50 mL de medio de cultivo PDB en caja

de Petri de vidrio de 250 mL (150 x 15 mm), inoculada con 2 círculos de 0.5 cm de diámetro de micelio, incubada a temperatura ambiente (26 °C) en estado estático (Tratamiento 5), se observó crecimiento de micelio y esporas de color verde amarillento (RHS2015 193A), presentó la misma textura y densidad que en los tratamientos 3 y 4. Sin embargo, en este tratamiento, se observó mayor producción de esporas desde el día tres de incubación, en comparación con los tratamientos 3 y 4 donde la producción de esporas se observó a partir del día cinco.

Cuadro 13. Caracterización macroscópica del tratamiento 2 al tratamiento 5 para la obtención de biomasa de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB), (día 10 de incubación).

Características macroscópicas de los tratamientos					
Número de tratamiento	Color (RHS, 2015)	Textura	Densidad	Presencia de esporas	Apariencia
2	Blanco (RHS2015 NN 155D)	Algodonosa	Abundante y regular	Escasas	
3	Verde amarillo pálido (RHS2015 157A) Verde amarillo grisáceo (RHS2015 194B)	Algodonosa	Abundante	Abundante	
4	Verde amarillento (RHS2015 193A) Verde amarillo grisáceo (RHS2015 194B)	Algodonosa	Abundante	Abundante	
5	Verde amarillento (RHS2015 193A)	Algodonosa	Abundante	Abundante	

Tratamiento 2= Frasco de vidrio de 1000 mL (80 x 180 mm), en agitación (40 rpm), a 27 °C, con 100 mL PDB + 4 círculos de 0.5 cm de diámetro de micelio (n= 4). Tratamiento 3= Frasco de vidrio de 1000 mL (80 x 180 mm), en estado estático, a 26 °C, con 100 mL PDB + 4 círculos de 0.5 cm de diámetro de micelio (n= 4). Tratamiento 4= Frasco de vidrio de 1000 mL (80 x 180 mm), en estado estático, a 26 °C, con 300 mL PDB + 12 círculos de 0.5 cm de diámetro de micelio (n= 2). Tratamiento 5= Cajas de Petri de vidrio de 250 mL (150 x 15 mm), en estado estático a 26 °C, con

50 mL PDB + 2 círculos de 0.5 cm de diámetro de micelio (n= 5). RHS= Carta de colores *Royal Horticultural Society*, 2015.

Al realizar la comparación entre los cinco tratamientos para la obtención de biomasa con esporas de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, se observó que en el tratamiento 1 con sus respectivos subtratamientos y en el tratamiento 2, la biomasa obtenida de dichos tratamientos fue en forma de pellets sin producción de esporas, lo cual coincide con lo reportado por Carrasco (2010), quien reportó que *Trichoderma* spp. en medio de cultivo líquido con extracto de levadura (CYM) desarrolla pellets de diferentes formas dependiendo de la especie y condiciones de crecimiento. Sin embargo, en cuanto a los resultados obtenidos de la caracterización macroscópica de los tratamientos 3, 4 y 5 no fueron muy distintos entre ellos, ya que la textura algodonosa, densidad de micelio abundante y producción abundante de esporas fue igual en los tres tratamientos, solo la coloración cambio entre cada tratamiento de verde amarillo pálido (RHS2015 157A) a verde amarillento grisáceo (RHS2015 194B). El tratamiento que presentó resultados más favorables en cuanto a las características macroscópicas y producción aparente de biomasa con esporas fue el tratamiento 5, debido al área de crecimiento, la cantidad de substrato y de inóculo empleado en el tratamiento, la cepa CPM-115 de *T. aggressivum* f. *aggressivum* degradó con mayor facilidad los nutrientes del substrato provocando que en el día dos y día tres, el moho empezará a colonizar y a producir esporas en toda el área de crecimiento (caja de Petri de vidrio de 250 mL).

5.2.2 Caracterización fisicoquímica del sobrenadante de los tratamientos

El sobrenadante recuperado de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* de cada uno de los subtratamientos (FA1.1, FA1.2, FA1.3, FA1.4 y FA1.5) del tratamiento 1, se caracterizó fisicoquímicamente, evaluando los siguientes parámetros pH, sólidos disueltos totales (TDS), conductividad, resistividad, azúcares disueltos y determinación de biomasa seca por gravimetría (mg/mL).

En la Figura 24, se muestra la variación de pH del sobrenadante obtenido de la filtración de biomasa de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* a los 10 días de incubación. Dicha variación se observa en un rango de 4.97 ± 0.02 (FA1.3) a 4.53 ± 0.00 (FA1.4), los cambios de pH entre los subtratamientos fueron mínimos, existiendo una diferencia del 8.85% entre el subtratamiento FA1.3 y subtratamiento FA1.4. Sin embargo, el subtratamiento FA1.3

presentó el valor de pH más alto de 4.97 ± 0.02 , mostrando una diferencia del 7.80% respecto al blanco con un valor de $pH = 5.39 \pm 0.02$. Los resultados mostraron que la cepa en estudio durante su crecimiento excreta compuestos en el medio de cultivo, provocando que el sobrenadante (substrato) se acidifique.

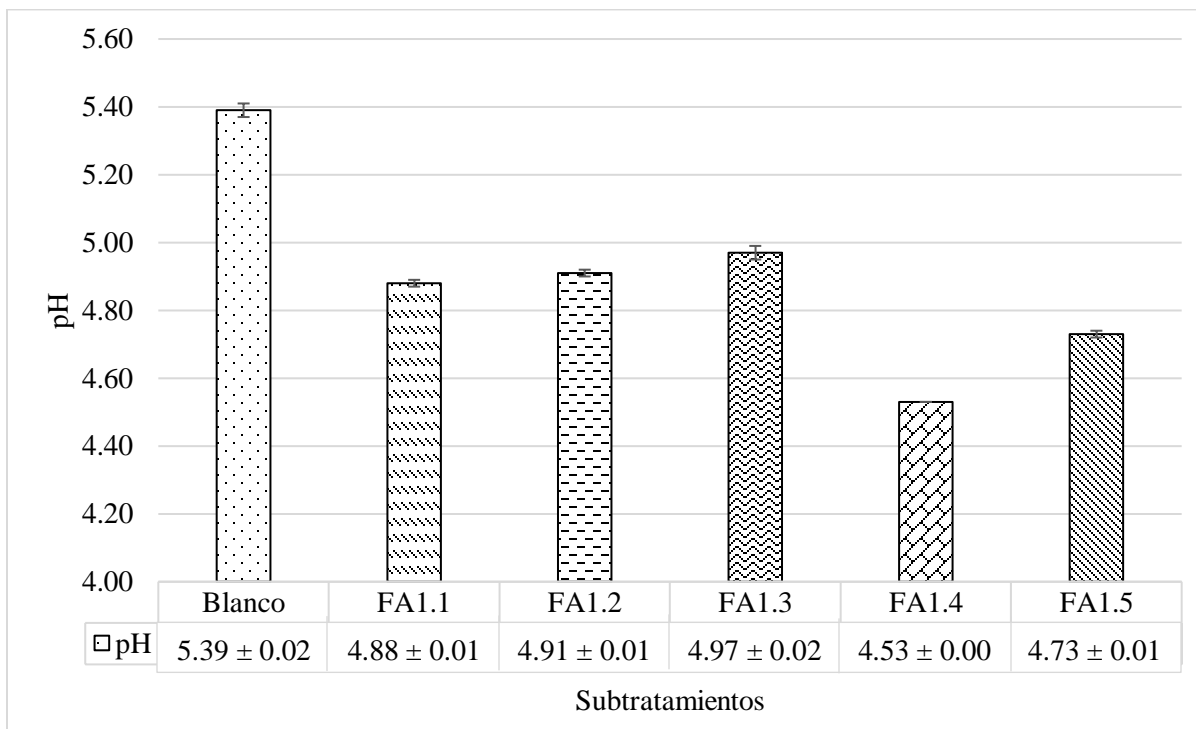


Figura 24. pH final del sobrenadante de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* de los subtratamientos del tratamiento 1, a los 10 días de incubación, cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB). Blanco= Medio de cultivo líquido PDB. Subtratamiento FA1.1= Frasco de vidrio (2000 mL), en agitación con 1000 mL PDB + 10 inóculos de 0.5 cm de diámetro de micelio. Subtratamiento FA1.2= Frasco de vidrio (2000 mL), en agitación con 500 mL PDB + 5 inóculos de 0.5 cm de diámetro de micelio. Subtratamiento FA1.3= Frasco de vidrio (1000 mL), en agitación con 500 mL PDB + 5 inóculos de 0.5 cm de diámetro de micelio. Subtratamiento FA1.4= Frasco de vidrio (500 mL), en agitación con 100 mL PDB + 1 inóculo de 0.5 cm de diámetro de micelio. Subtratamiento FA1.5= Frasco de vidrio (250 mL), en agitación con 100 mL PDB + 1 inóculo de 0.5 cm de diámetro de micelio.

En la Figura 25, se muestra la variación de sólidos disueltos totales (TDS mg/L) del sobrenadante de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* a los 10 días de incubación de los subtratamientos (FA1.1, FA1.2, FA1.3, FA1.4 y FA1.5) estudiados del tratamiento 1. Destaca el subtratamiento FA1.2 con el valor más alto, siendo de $2,122.2 \pm 0.78$ mg/L, por lo que en este subtratamiento las condiciones de crecimiento ayudaron a incrementar en 2.96% la producción de sólidos disueltos totales respecto al blanco. Por el contrario, el subtratamiento FA1.5 presentó el

valor más bajo de TDS= $1,932.9 \pm 0.69$ mg/L, mostrando una disminución del 6.21% de sólidos disueltos totales respecto al blanco.

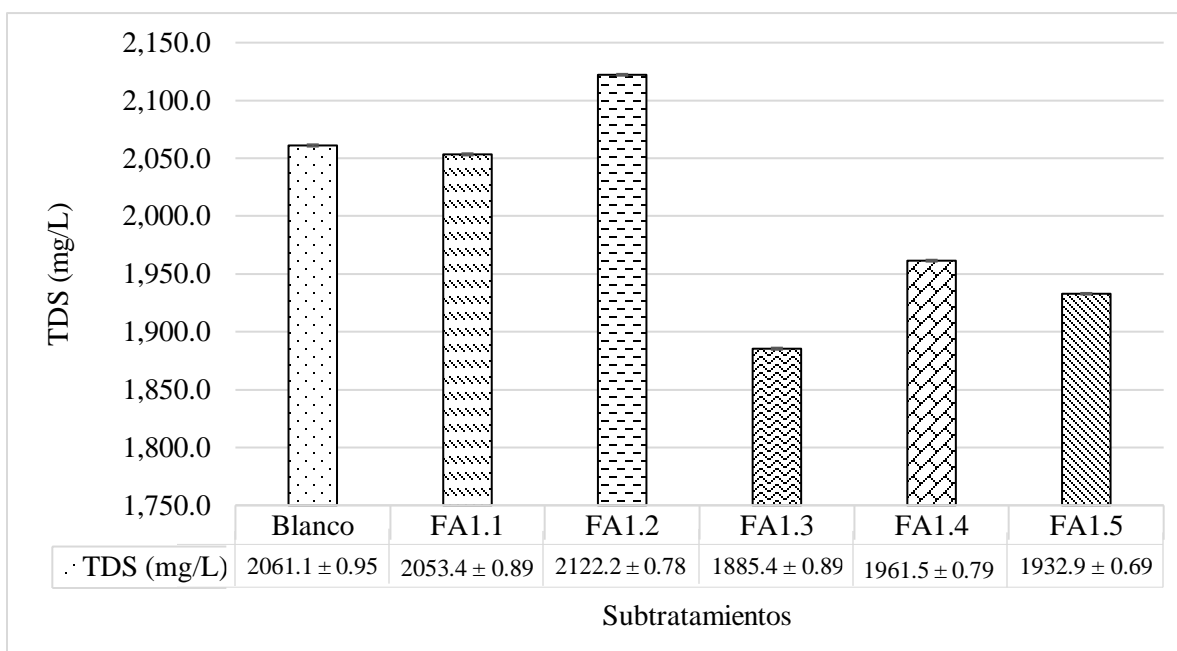


Figura 25. Sólidos disueltos totales del sobrenadante de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* de los cinco subtratamientos del tratamiento 1, a los 10 días de incubación cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB). Blanco= Medio de cultivo líquido PDB. Subtratamiento FA1.1= Frasco de vidrio (2000 mL), en agitación con 1000 mL PDB + 10 inóculos de 0.5 cm de diámetro de micelio. Subtratamiento FA1.2= Frasco de vidrio (2000 mL), en agitación con 500 mL PDB + 5 inóculos de 0.5 cm de diámetro de micelio. Subtratamiento FA1.3= Frasco de vidrio (1000 mL), en agitación con 500 mL PDB + 5 inóculos de 0.5 cm de diámetro de micelio. Subtratamiento FA1.4= Frasco de vidrio (500 mL), en agitación con 100 mL PDB + 1 inóculo de 0.5 cm de diámetro de micelio. Subtratamiento FA1.5= Frasco de vidrio (250 mL), en agitación con 100 mL PDB + 1 inóculo de 0.5 cm de diámetro de micelio.

En la Figura 26, se observan los valores de la variación de conductividad eléctrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$) del sobrenadante de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, a los 10 días de incubación de los cinco subtratamientos del tratamiento 1. El valor más alto correspondió al subtratamiento FA1.2, con un valor de $5,402.7 \pm 0.67$ $\mu\text{S}/\text{cm}$, en tanto que el menor valor fue de $4,874.6 \pm 0.53$ $\mu\text{S}/\text{cm}$ en el subtratamiento FA1.4, mostrando una disminución o poca cantidad de iones del 7.65% respecto al blanco. En el subtratamiento FA1.2, se observó una conductividad eléctrica alta, debido a los iones o moléculas de bajo peso molecular excretadas por el hongo en el sobrenadante, mostrando un aumento del 4.90% respecto al blanco.

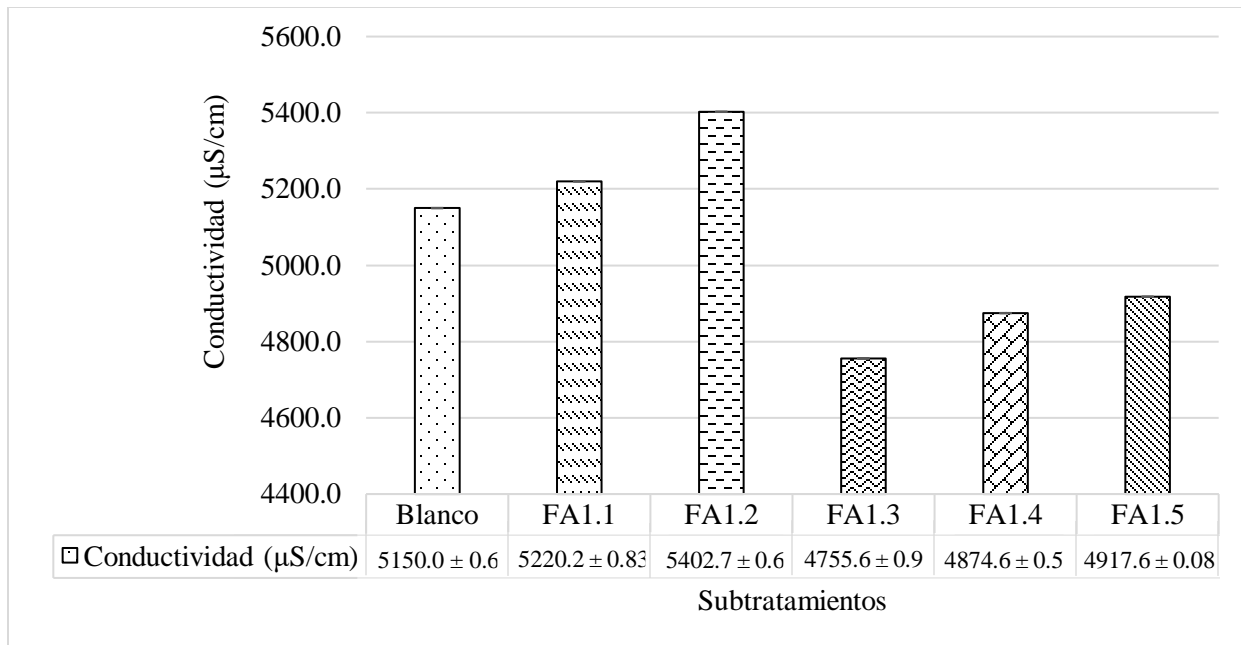


Figura 26. Conductividad eléctrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$) del sobrenadante de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* de los cinco subtratamientos del tratamiento 1, a los 10 días de incubación cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB). Blanco= Medio de cultivo líquido PDB. Subtratamiento FA1.1= Frasco de vidrio (2000 mL), en agitación con 1000 mL PDB + 10 inóculos de 0.5 cm de diámetro de micelio. Subtratamiento FA1.2= Frasco de vidrio (2000 mL), en agitación con 500 mL PDB + 5 inóculos de 0.5 cm de diámetro de micelio. Subtratamiento FA1.3= Frasco de vidrio (1000 mL), en agitación con 500 mL PDB + 5 inóculos de 0.5 cm de diámetro de micelio. Subtratamiento FA1.4= Frasco de vidrio (500 mL), en agitación con 100 mL PDB + 1 inóculo de 0.5 cm de diámetro de micelio. Subtratamiento FA1.5= Frasco de vidrio (250 mL) en agitación con 100 mL PDB + 1 inóculo de 0.5 cm de diámetro de micelio.

En la Figura 27, se muestran los resultados de resistividad eléctrica (Ω) del sobrenadante de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* a los 10 días de incubación, que se obtuvieron en los diferentes subtratamientos del tratamiento 1, por lo que el valor más alto de resistividad eléctrica correspondió al subtratamiento FA1.3 ($118 \pm 0.45 \Omega$), en tanto que el menor valor de resistividad eléctrica se presentó en el subtratamiento FA1.2 ($106 \pm 0.71 \Omega$), existiendo una variación de resistividad eléctrica del 10.16% entre el subtratamiento FA1.3 y el subtratamiento FA1.2. Los resultados del subtratamiento FA1.3 ($118 \pm 0.45 \Omega$) muestran un aumento de resistividad eléctrica del 3.50% respecto al blanco. La resistividad eléctrica describe el comportamiento de un material frente al paso de corriente, de acuerdo a los resultados obtenidos en los diferentes subtratamientos, al ser valores bajos esto indica que el sobrenadante de la cepa CPM-115 *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* es un buen conductor de corriente eléctrica.

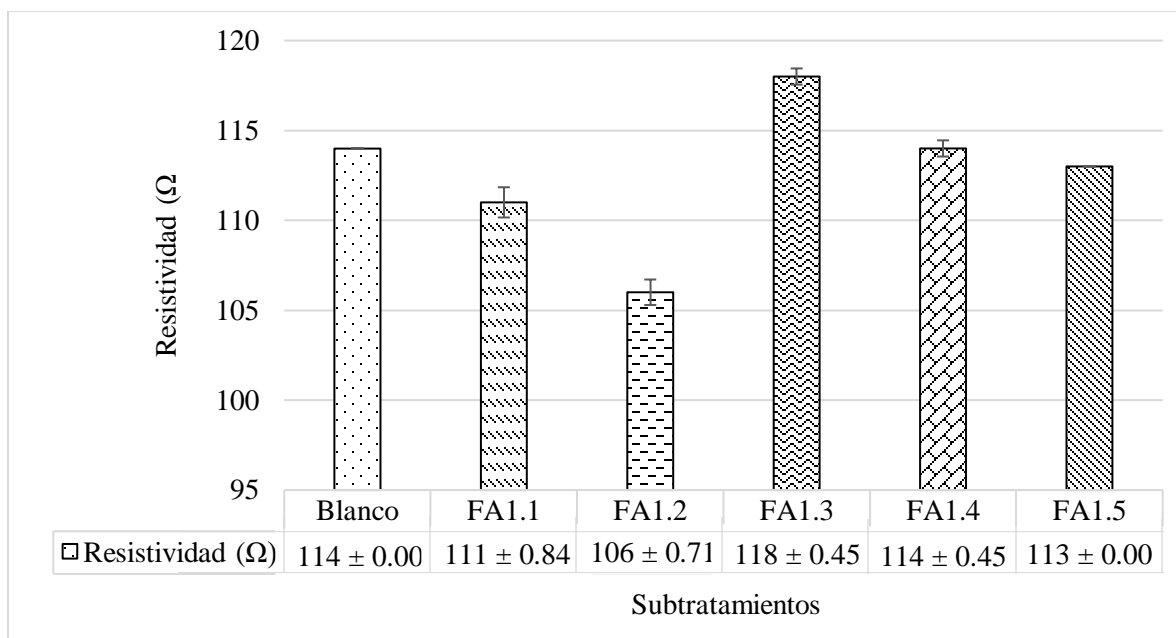


Figura 27. Resistividad eléctrica (Ω) del sobrenadante de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* de los cinco subtratamientos del tratamiento 1, a los 10 días de incubación cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB). Blanco= Medio de cultivo líquido PDB. Subtratamiento FA1.1= Frasco de vidrio (2000 mL), en agitación con 1000 mL PDB + 10 inóculos de 0.5 cm de diámetro de micelio. Subtratamiento FA1.2= Frasco de vidrio (2000 mL), en agitación con 500 mL PDB + 5 inóculos de 0.5 cm de diámetro de micelio. Subtratamiento FA1.3= Frasco de vidrio (1000 mL), en agitación con 500 mL PDB + 5 inóculos de 0.5 cm de diámetro de micelio. Subtratamiento FA1.4= Frasco de vidrio (500 mL), en agitación con 100 mL PDB + 1 inóculo de 0.5 cm de diámetro de micelio. Subtratamiento FA1.5= Frasco de vidrio (250 mL), en agitación con 100 mL PDB + 1 inóculo de 0.5 cm de diámetro de micelio.

En la Figura 28, se observa la variación de azúcares disueltos ($^{\circ}\text{Bx}$) del sobrenadante de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, a los 10 días de incubación de los cinco subtratamientos (FA1.1, FA1.2, FA1.3, FA1.4 y FA1.5) del tratamiento 1. Se observó una tendencia de descenso del blanco con un valor de 2.7 ± 0.07 $^{\circ}\text{Bx}$ hacia cada uno de los diferentes subtratamientos, mostrando una diferencia del 29.62% respecto al subtratamiento FA1.3 que destacó con el valor más alto de azúcares disueltos, siendo de 1.9 ± 0.00 $^{\circ}\text{Bx}$. Por su parte, el menor valor de azúcares disueltos fue en el subtratamiento FA1.4 con 1.3 ± 0.04 $^{\circ}\text{Bx}$, mostrando una reducción de azúcares disueltos del 51.85% respecto al blanco. Entre el subtratamiento FA1.3 (1.9 ± 0.00 $^{\circ}\text{Bx}$) y el subtratamiento FA1.4 (1.3 ± 0.04 $^{\circ}\text{Bx}$) presentaron una diferencia de azúcares disueltos del 31.57%. Esta disminución de azúcares disueltos, se atribuye principalmente al consumo por parte del hongo *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* para su vital crecimiento.

Por otro lado, se debe al gasto de energía y estrés metabólico en el que se encuentre el hongo durante su crecimiento.

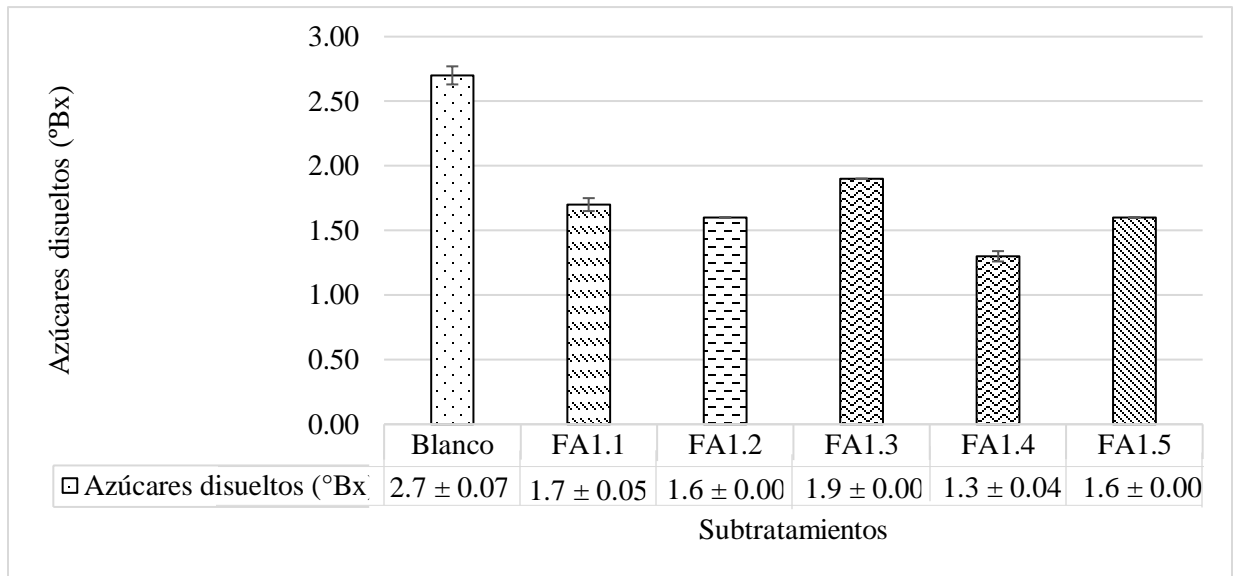


Figura 28. Azúcares disueltos (°Bx) del sobrenadante de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* de los cinco subtratamientos del tratamiento 1, a los 10 días de incubación cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB). Subtratamiento FA1.1= Frasco de vidrio (2000 mL), en agitación con 1000 mL PDB + 10 inóculos de 0.5 cm de diámetro de micelio. Subtratamiento FA1.2= Frasco de vidrio (2000 mL), en agitación con 500 mL PDB + 5 inóculos de 0.5 cm de diámetro de micelio. Subtratamiento FA1.3= Frasco de vidrio (1000 mL), en agitación con 500 mL PDB + 5 inóculos de 0.5 cm de diámetro de micelio. Subtratamiento FA1.4= Frasco de vidrio (500 mL), en agitación con 100 mL PDB + 1 inóculo de 0.5 cm de diámetro de micelio. Subtratamiento FA1.5= Frasco de vidrio (250 mL), en agitación con 100 mL PDB + 1 inóculo de 0.5 cm de diámetro de micelio.

En la Figura 29, se muestra la producción de biomasa seca de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* de los cinco subtratamientos del tratamiento 1, durante 10 días de incubación, cultivada en medio de cultivo líquido PDB. En el subtratamiento FA1.4, se observó la máxima producción de biomasa seca con 1.70 mg/mL y en el subtratamiento FA1.3 se observó la menor producción de biomasa seca con 1.10 mg/mL, mostrando una disminución de producción de biomasa (mg/mL) del 35.29% respecto al subtratamiento FA1.4. En el tratamiento 1, con sus respectivos subtratamientos se obtuvo un total de 7.18 mg/mL de biomasa seca de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*.

En el subtratamiento FA1.1, se obtuvo un valor de 1.48 mg/mL de biomasa seca, mostrando una reducción de producción de biomasa seca del 12.94% respecto al subtratamiento FA1.4, en el cual

se obtuvo mayor cantidad de biomasa seca (1.70 mg/mL) a pesar de tener menor cantidad de sustrato (100 mL de medio de cultivo líquido PDB) y de inóculo (1 círculo de 0.5 cm de diámetro de micelio) en comparación con el subtratamiento FA1.1. Este subtratamiento tuvo condiciones diferentes para favorecer el crecimiento del moho, es decir tenía mayor cantidad de sustrato (1000 mL de medio de cultivo líquido PDB) y de inóculo (10 círculos de 0.5 cm de diámetro de micelio), a partir de esto se pudo determinar que a menor cantidad de sustrato e inóculo empleados se obtendrá mayor cantidad de biomasa seca de *Trichoderma aggressivum f. aggressivum*.

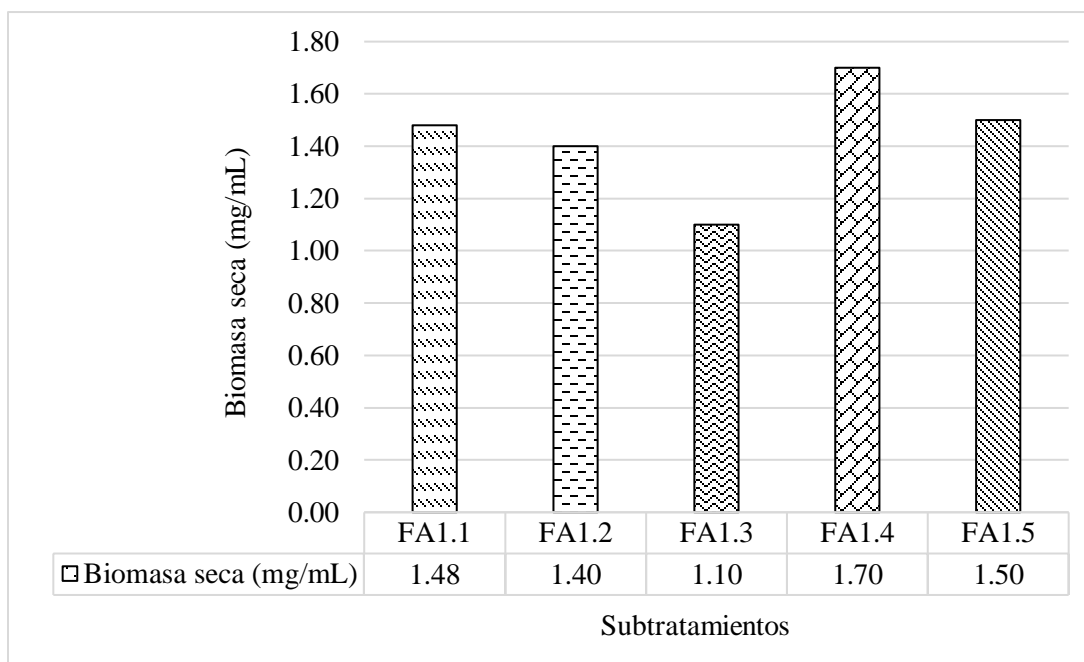


Figura 29. Biomasa seca (mg/mL) de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum f. aggressivum* de los cinco subtratamientos del tratamiento 1, a los 10 días de incubación, cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB). Subtratamiento FA1.1= Frasco de vidrio (2000 mL), en agitación con 1000 mL PDB + 10 inóculos de 0.5 cm de diámetro de micelio. Subtratamiento FA1.2= Frasco de vidrio (2000 mL), en agitación con 500 mL PDB + 5 inóculos de 0.5 cm de diámetro de micelio. Subtratamiento FA1.3= Frasco de vidrio (1000 mL), en agitación con 500 mL PDB + 5 inóculos de 0.5 cm de diámetro de micelio. Subtratamiento FA1.4= Frasco de vidrio (500 mL), en agitación con 100 mL PDB + 1 inóculo de 0.5 cm de diámetro de micelio. Subtratamiento FA1.5= Frasco de vidrio (250 mL), en agitación con 100 mL PDB + 1 inóculo de 0.5 cm de diámetro de micelio.

A partir de los resultados obtenidos tanto de la caracterización morfológica macroscópica de la biomasa, como de la caracterización fisicoquímica del sobrenadante de los cinco subtratamientos del tratamiento 1, se pudo determinar que la producción de biomasa seca de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum f. aggressivum*, depende en gran medida de las condiciones de

crecimiento, tales como la capacidad del recipiente (mL) para el desarrollo del hongo, los nutrientes disponibles en el sustrato y la cantidad de inóculo, lo cual se comprobó con el subtratamiento FA1.4 que presentó mayor producción de biomasa seca de acuerdo a sus condiciones de crecimiento. Por lo tanto, se estableció que en el tratamiento 2 y tratamiento 3 se deben emplear 100 mL de medio de cultivo líquido PDB para la obtención de biomasa seca de la cepa CPM-115.

El sobrenadante recuperado de la obtención de biomasa de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* del tratamiento 2 al tratamiento 5, se caracterizó fisicoquímicamente evaluando los siguientes parámetros: pH, azúcares disueltos y determinación de biomasa seca por gravimetría (mg/mL).

En la Figura 30, se muestran los resultados obtenidos de la variación de pH de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, derivados del análisis estadístico del diseño completamente al azar realizado a los tratamientos, donde se aprecia que el valor máximo correspondió al tratamiento 5 con un valor de $\text{pH} = 6.00 \pm 0.14$, mostrando un incremento de pH del 12% respecto al blanco. El valor mínimo de pH se presentó en el tratamiento 2 con un valor de 4.59 ± 0.14 , mostrando una reducción de pH del 14.84% respecto al blanco. En el análisis de varianza se obtuvo un coeficiente de variación de 2.23%, lo que indica que estadísticamente la dispersión entre los datos fue mínima a una $p < 0.0001$, por lo tanto, existe diferencia altamente significativa entre los tratamientos analizados. Esto se verificó con los grupos obtenidos estadísticamente, los cuales fueron el grupo A, B y C; en el grupo A se encuentra el tratamiento 5 (6.00 ± 0.14), el cual superó tanto estadísticamente como numéricamente a todos los tratamientos y por ende al resto de los grupos. El grupo B está conformado por el tratamiento 3 (5.30 ± 0.12) y el tratamiento 4 (5.18 ± 0.01), lo que indica que estadísticamente son iguales, pero numéricamente el tratamiento que presenta el mejor valor de pH en este grupo es el tratamiento 3. En el grupo C, solo se encuentra el tratamiento 2 (4.59 ± 0.14).

A partir de estos resultados se pudo determinar que la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* crece favorablemente tanto en estado estático como en agitación, en un rango de pH ácido a neutro (4.59-6.00). Esto coincide con lo reportado por Arenas et al. (2009) y Martínez et al. (2013), quienes indicaron que las especies de *Trichoderma* spp. se caracterizan por preferir un pH ácido con valores óptimos de crecimiento entre 5.5-6.5, es decir en un medio ligeramente

ácido. Sin embargo, la cepa en estudio presentó valores de pH neutro con una capacidad de crecimiento reducida, como es el caso de la caja de Petri de vidrio (250 mL), debido probablemente al excesivo contenido de humedad acumulado y la acumulación de bióxido de carbono.

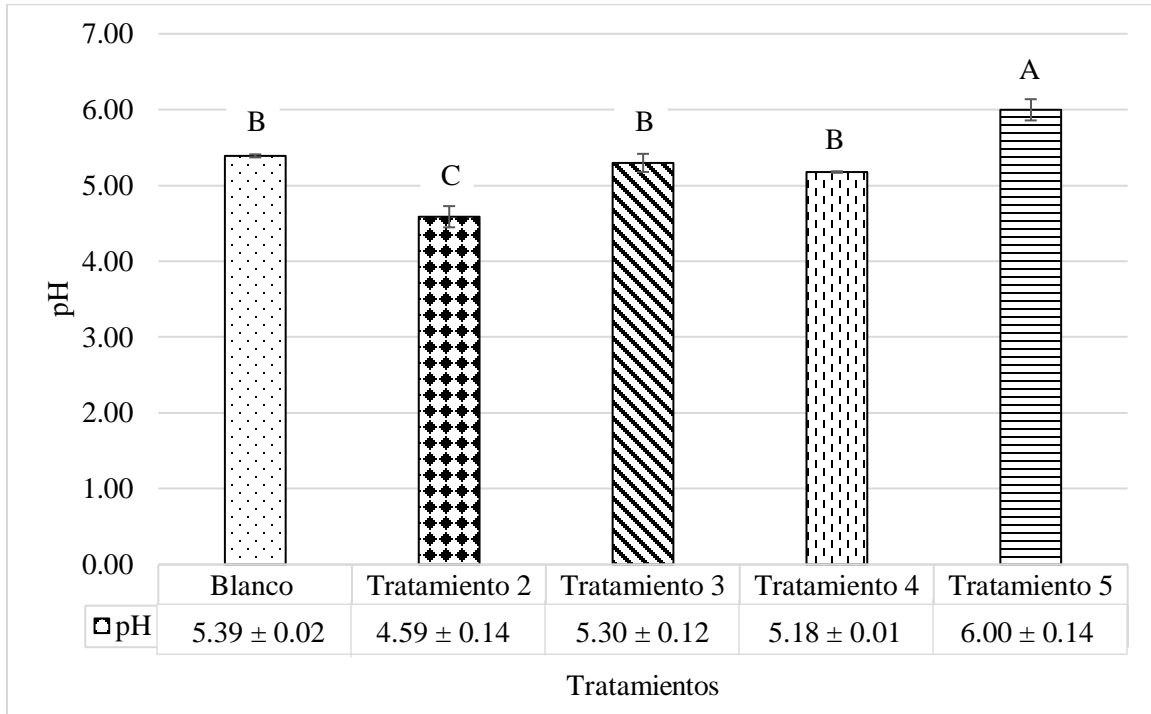


Figura 30. pH final del sobrenadante de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* del tratamiento 2 al tratamiento 5, a los 10 días de incubación cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB). Medias en una columna mostrando letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa de acuerdo a la prueba de Tukey, $p < 0.05$. Tratamiento 2= Frasco de vidrio de 1000 mL (80 x 180 mm), en agitación (40 rpm) a 27 °C, con 100 mL PDB + 4 círculos de 0.5 cm de diámetro de micelio (n= 4). Tratamiento 3= Frasco de vidrio de 1000 mL (80 x 180 mm), en estado estático a 26 °C, con 100 mL PDB + 4 círculos de 0.5 cm de diámetro de micelio (n= 4). Tratamiento 4= Frasco de vidrio de 1000 mL (80 x 180 mm), en estado estático a 26 °C, con 300 mL PDB + 12 círculos de 0.5 cm de diámetro de micelio (n= 2). Tratamiento 5= Cajas de Petri de vidrio de 250 mL (150 x 15 mm), en estado estático a 26 °C, con 50 mL PDB + 2 círculos de 0.5 cm de diámetro de micelio (n= 5).

En la Figura 31, se observan las variaciones de azúcares disueltos ($^{\circ}\text{Bx}$) en el sobrenadante de los tratamientos estudiados, a los 10 días de incubación, por parte de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*. Se observó que el valor máximo se obtuvo en el tratamiento 4 con un valor de azúcares disueltos de 1.9 ± 0.00 $^{\circ}\text{Bx}$, mostrándose una disminución de azúcares disueltos del 29.62% respecto al blanco. El valor mínimo de azúcares disueltos se obtuvo en el tratamiento 5, con un valor de 0.5 ± 0.15 $^{\circ}\text{Bx}$, existiendo una diferencia del 81.48% respecto al blanco. A partir del análisis estadístico del diseño completamente al azar realizado del tratamiento 2 al tratamiento

5, se obtuvo una $p < 0.0001$, por lo tanto, existe diferencia altamente significativa entre los tratamientos en estudio. Se obtuvieron cuatro grupos estadísticos de los cuales el grupo A, está conformado por el blanco, en el grupo B se encuentra el tratamiento 4, el cual supera tanto estadísticamente como numéricamente al grupo C y al grupo D, es decir a los tratamientos 2, 3 y 5. Por consiguiente, *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* requiere de una gran cantidad de energía durante su crecimiento, sobre todo en superficies de crecimiento reducidas como se observó en el tratamiento 5 (Caja de Petri de vidrio de 250 mL). En cambio, en superficies de crecimiento amplias como es el caso del tratamiento 4 (Frascos de vidrio de 1000 mL), *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, presentó un alto consumo de carbohidratos. Sin embargo, presentó una producción considerable de azúcares y sólidos disueltos, como es el caso de compuestos de bajo peso molecular, tales como algunos metabolitos primarios, metabolitos secundarios, enzimas y toxinas excretadas por el hongo *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* en el medio de cultivo líquido (sobrenadante).

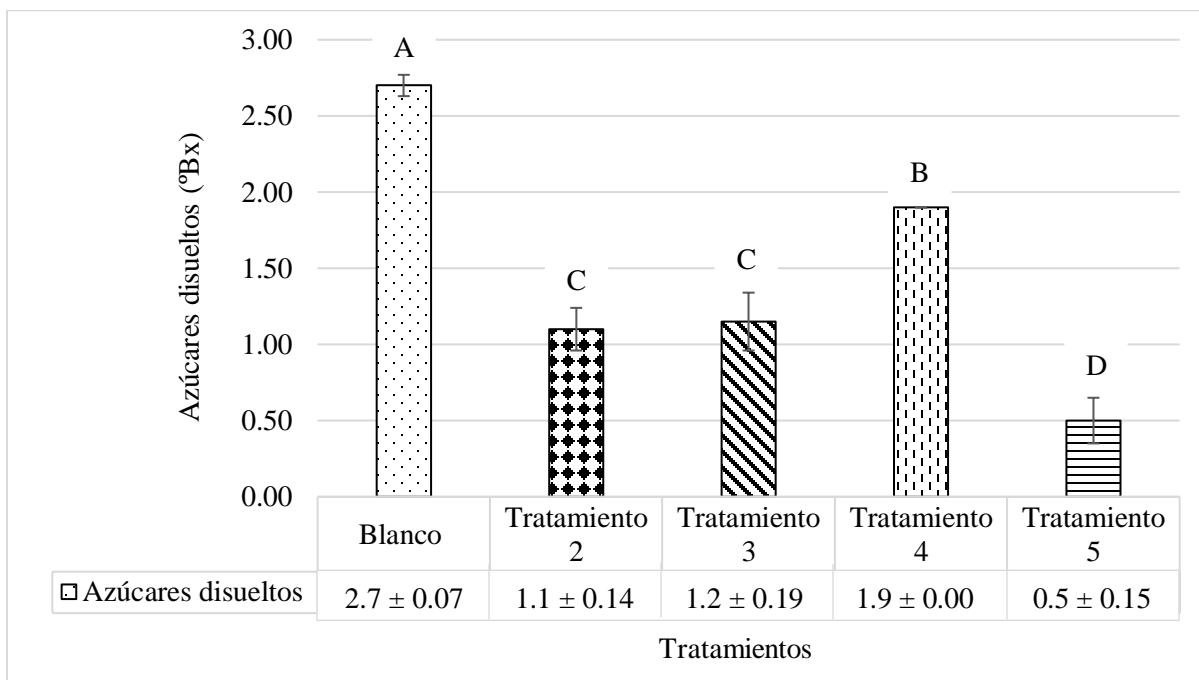


Figura 31. Azúcares disueltos (°Bx) del sobrenadante de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* del tratamiento 2 al tratamiento 5, a los 10 días de incubación, cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB). Medias en una columna mostrando letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa de acuerdo a la prueba de Tukey, $p < 0.05$. Tratamiento 2= Frasco de vidrio de 1000 mL (80 x 180 mm), en agitación (40 rpm) a 27 °C, con 100 mL PDB + 4 círculos de 0.5 cm de diámetro de micelio (n= 4). Tratamiento 3= Frasco de vidrio de 1000 mL (80 x 180 mm), en estado estático a 26 °C, con 100 mL PDB + 4 círculos de 0.5 cm de diámetro de micelio (n= 4). Tratamiento 4=

Frasco de vidrio de 1000 mL (80 x 180 mm), en estado estático a 26 °C, con 300 mL PDB + 12 círculos de 0.5 cm de diámetro de micelio (n= 2). Tratamiento 5= Cajas de Petri de vidrio de 250 mL (150 x 15 mm), en estado estático a 26 °C, con 50 mL PDB + 2 círculos de 0.5 cm de diámetro de micelio (n= 5).

En la Figura 32, se muestran los resultados obtenidos de los diferentes tratamientos en estudio, se realizó una comparación de medias a partir de la prueba de Tukey con un nivel de significancia de $\alpha= 0.05\%$. En el tratamiento 5, se obtuvo la máxima producción de biomasa seca con un valor de 2.82 ± 0.33 mg/mL y en el tratamiento 4 se observó un descenso de producción de biomasa seca con un valor de 1.09 ± 0.14 mg/mL (61% menor de producción de biomasa seca en comparación con el tratamiento 5). De los resultados del análisis de medias de la biomasa seca obtenida de los diferentes tratamientos, se obtuvo un coeficiente de variación de 14.14%, $p < 0.0001$, por lo tanto, se registró una diferencia altamente significativa entre los tratamientos comparados. Los tratamientos 2 y 5 estadísticamente pertenecen al grupo A, por lo que pueden llegar a producir la misma cantidad de biomasa seca, pero numéricamente el que sigue presentando mayor producción de biomasa seca es el tratamiento 5. Por lo tanto, el grupo A supera estadísticamente y numéricamente a los tratamientos del grupo B y C.

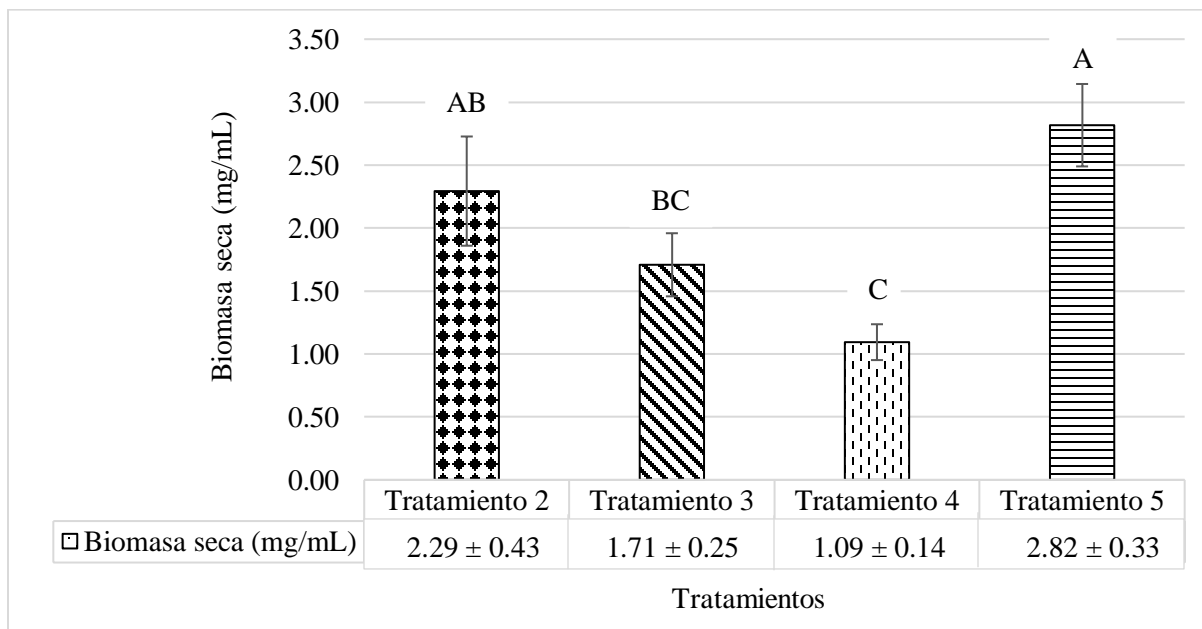
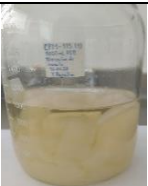


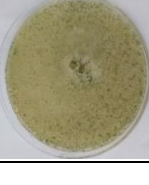


Figura 32. Biomasa seca (mg/mL) de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* del tratamiento 2 al tratamiento 5, a los 10 días de incubación, cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB). Medias en una columna mostrando letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa de acuerdo a la prueba de Tukey, $p < 0.05$. Tratamiento 2= Frasco de vidrio de 1000 mL (80 x 180 mm), en agitación (40 rpm) a 27 °C, con 100 mL PDB + 4 círculos de 0.5 cm de diámetro de micelio (n= 4). Tratamiento 3= Frasco de vidrio de 1000 mL (80 x 180 mm), en estado estático

a 26 °C, con 100 mL PDB + 4 círculos de 0.5 cm de diámetro de micelio (n= 4). Tratamiento 4= Frasco de vidrio de 1000 mL (80 x 180 mm), en estado estático a 26 °C, con 300 mL PDB + 12 círculos de 0.5 cm de diámetro de micelio (n= 2). Tratamiento 5= Cajas de Petri de vidrio de 250 mL (150 x 15 mm), en estado estático a 26 °C, con 50 mL PDB + 2 círculos de 0.5 cm de diámetro de micelio (n= 5).

En el Cuadro 13, se muestran de forma general los resultados obtenidos de la caracterización fisicoquímica del sobrenadante (pH y azúcares disueltos) y los resultados de la biomasa seca promedio (mg/mL) y la biomasa seca total (mg/mL) obtenida por cada tratamiento. Se especifica si hubo o no presencia de esporas y una foto como evidencia de cada uno de los tratamientos de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*.

Cuadro 14. Caracterización fisicoquímica del sobrenadante y biomasa seca de la cepa CPM-115 *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* en los diferentes tratamientos estudiados.

No.	Clave de identificación Subtratamiento	Condición	pH	Azúcares disueltos (°Bx)	Biomasa seca (mg/mL)	Biomasa seca total (mg/mL)	Presencia de esporas	Apariencia
1	FA1.1	Agitación	4.88±0.01	1.7±0.05	1.48	7.18	No	
	FA1.2		4.91±0.02	1.6±0.00	1.40			
	FA1.3		4.97±0.02	1.9±0.00	1.10			
	FA1.4		4.53±0.00	1.3±0.04	1.70			
	FA1.5		4.73±0.01	1.6±0.01	1.50			
2	Réplicas		Agitación	4.59±0.01	1.1±0.14	2.29±0.43	9.17	No
	FA1-100							
	FA2-100							
	FA3-100							
	FA4-100							
3	FE1-100	Estática	5.30±0.12	1.2±0.19	1.71±0.25	6.83	Sí (escasa)	
	FE2-100							
	FE3-100							
	FE4-100							
4	FE1-300	Estática	5.18±0.01	1.9±0.00	1.09±0.14	2.18	Sí (abundante)	
	FE2-300							
5	CPE1	Estática	6.00±0.14	0.5±0.15	2.82±0.33	14.08	Sí (abundante)	
	CPE2							
	CPE3							
	CPE4							
	CPE5							

A partir de los datos obtenidos tanto de la caracterización macroscópica como del análisis estadístico de la caracterización fisicoquímica de cada uno de los tratamientos, se pudo determinar que *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* presenta mayor producción de biomasa seca en estado estático (2.82-1.09 mg/mL) en un rango de pH= 5.30-6.00 (ácido a neutro), con una producción de azúcares disueltos de 1.9-0.5 °Bx. Al comparar los cinco tratamientos analizados, se logró determinar que el mejor tratamiento para ser empleado en la etapa 2 de este trabajo de investigación corresponde al tratamiento 5, por ser el más eficaz en cuanto a la producción de biomasa seca empleando una cantidad mínima de sustrato (50 mL de medio de cultivo PDB) e inóculo (2 círculos de 0.5 cm de micelio), a los 10 días de incubación.

5.3 Caracterización de la biomasa de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* en medio de cultivo líquido

5.3.1 Caracterización morfológica macroscópica de la biomasa

A partir de las 50 cajas de Petri de vidrio de 250 mL (150 x 15 mm) empleadas para la producción de biomasa con 50 mL de medio de cultivo líquido PDB, inoculadas con *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* e incubadas durante 10 días en estado estático, se realizó una caracterización macroscópica de las siguientes variables color, textura, densidad y proporción (%) de esporulación en el día 5 y día 10 de incubación. Los datos obtenidos de estas variables cualitativas de escala de medición nominal y ordinal, se analizaron mediante estadística descriptiva por medio de métodos gráficos.

En la Figura 33, se muestra la frecuencia absoluta del color de la biomasa que presentaron las 50 réplicas, en el día 5 de incubación 43 cajas de Petri presentaron un micelio y esporas de color verde amarillento (RHS2015 193A) y las 7 cajas de Petri restantes presentaron un micelio y esporas de color verde amarillento (RHS2015 193A) y verde amarillo grisáceo (RHS2015 194B). En el día 10 de incubación se observaron tres colores de diferente tonalidad en las 50 cajas de Petri, de las cuales 40 presentaron un micelio y esporas de color verde amarillento (RHS2015 193A), 3 presentaron micelio y esporas de color verde amarillento (RHS2015 193A) a verde amarillo grisáceo (RHS2015 194B) y 7 cajas de Petri presentaron micelio y esporas de color verde amarillo grisáceo (RHS2015 194B), un verde más intenso debió a la madurez de las esporas. Por lo tanto, en los días 5 y 10 de incubación el color predominante en el micelio y esporas de *Trichoderma*

aggressivum f. *aggressivum* fue el color verde amarillento (RHS2015 193A), característico de esta especie.

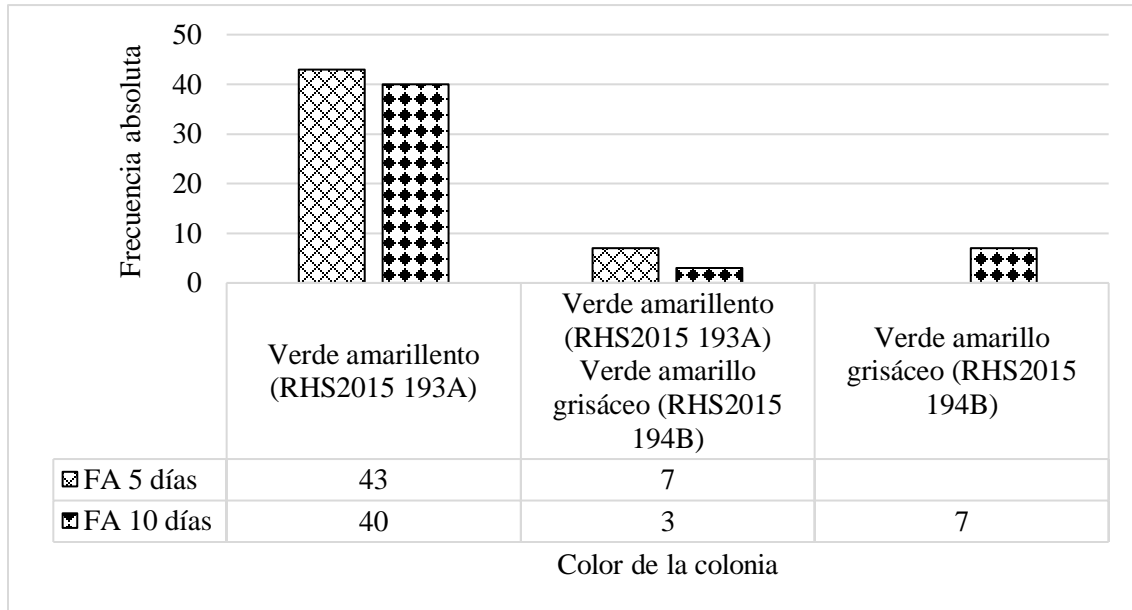


Figura 33. Color de la biomasa de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* en los días 5 y 10 de la cinética de crecimiento, cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB).

En la Figura 34, se muestra el color, textura y esporulación de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* en los días 5 y 10 de incubación.

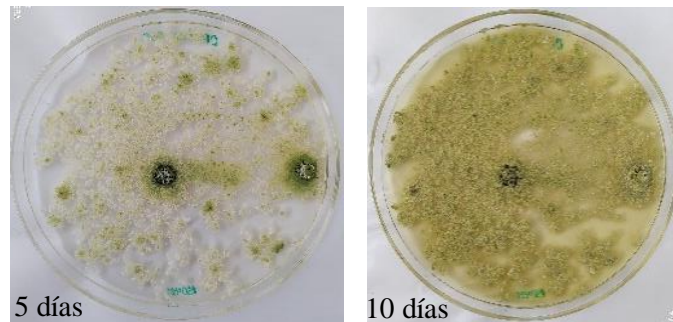


Figura 34. Color y textura de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB) en los días 5 y 10 de incubación en estado estático.

En la Figura 35, se muestra la frecuencia absoluta de los dos tipos de texturas presentes en la biomasa de la cepa CPM-115, en el día 5 de incubación de las 50 cajas de Petri evaluadas, 31 cajas de Petri presentaron un micelio con textura algodonosa y 19 presentaron textura aterciopelada. En

el día 10 de incubación, se observó que 32 cajas de Petri presentaron micelio de textura algodonosa y 18 un micelio de textura aterciopelada. Por lo tanto, en los días 5 y 10 de crecimiento la textura que tuvo mayor presencia en el micelio de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* fue la textura algodonosa.

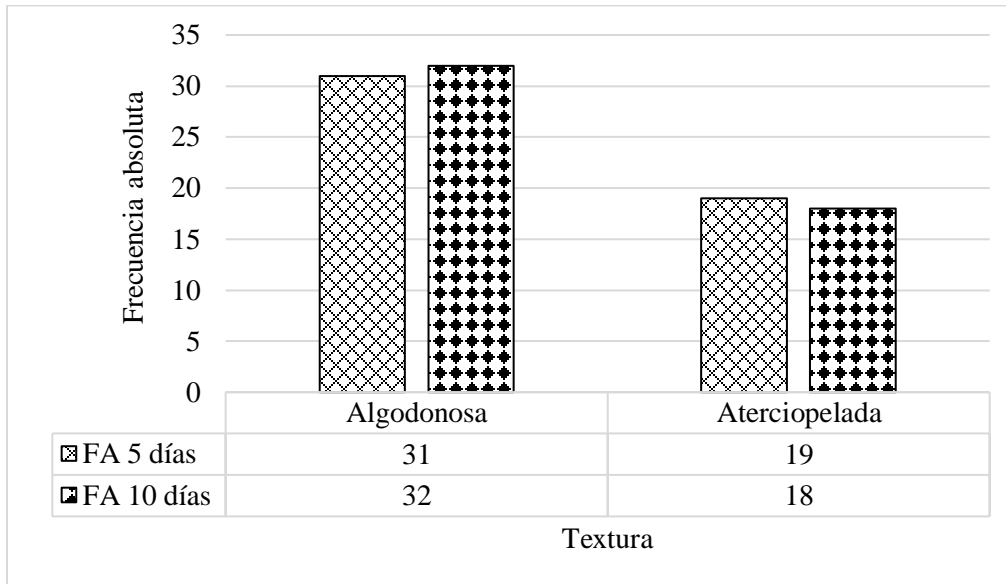


Figura 35. Textura de la biomasa de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* en los días 5 y 10 de incubación, cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB).

En la Figura 36, se muestra la frecuencia absoluta de la densidad de la biomasa que se observó en las 50 réplicas, la cual se clasificó en tres categorías: escasa, regular y abundante. En el día 5 de incubación de las 50 cajas de Petri, el 52% (26) de las cajas de Petri presentó una densidad abundante, el 6% (3) presentó densidad escasa y el 42% (21) presentó densidad regular. En el día 10 de incubación de las 50 cajas de Petri, el 92% (46) presentó densidad abundante, el 6% presentó densidad escasa y el 2% presentó densidad regular. De acuerdo a los resultados obtenidos, se pudo determinar que en el día 10 de crecimiento *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* logró desarrollar una densidad de micelio abundante.

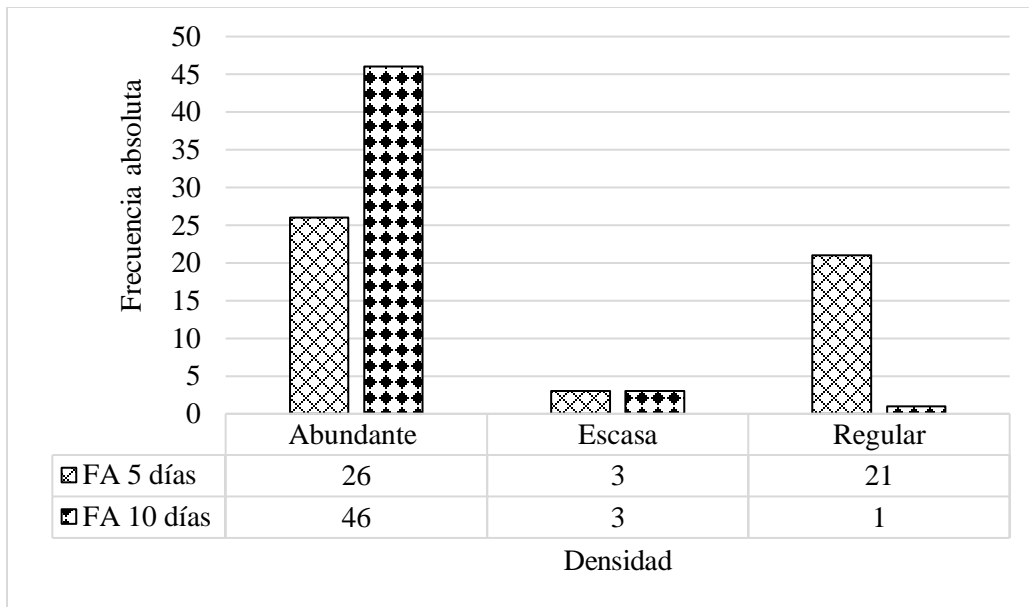


Figura 36. Densidad de la biomasa de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum f. aggressivum* en los días 5 y 10 de incubación, cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB).

En la Figura 37, se muestra la frecuencia absoluta de la proporción (%) de esporulación que se presentó en las 50 réplicas. La proporción de esporulación se clasificó en tres clases que fueron del 10-40% de esporulación si había poca o escasa presencia de esporas, del 40-70% de esporulación (regular) y del 70-100% de esporulación abundante. En el día 5 de incubación de las 50 cajas de Petri, 45 presentaron un porcentaje de esporulación del 70-100%, dos cajas de Petri presentaron del 40-70% de esporulación y tres cajas de Petri presentaron del 10-40% de esporulación. En el día 10 de incubación, cuarenta y siete cajas de Petri presentaron un porcentaje de esporulación del 70-100%, dos cajas de Petri presentaron un porcentaje de esporulación del 40-70% y solo una caja de Petri se ubicó en la categoría de 10-40% de esporulación. Conforme a los resultados obtenidos se pudo determinar que en los días 5 y 10 de incubación, se observaron cantidades abundantes de esporas con un 70-100% de esporulación, siendo el décimo día de incubación cuando se presentó un mayor porcentaje de esporulación (90-95%).

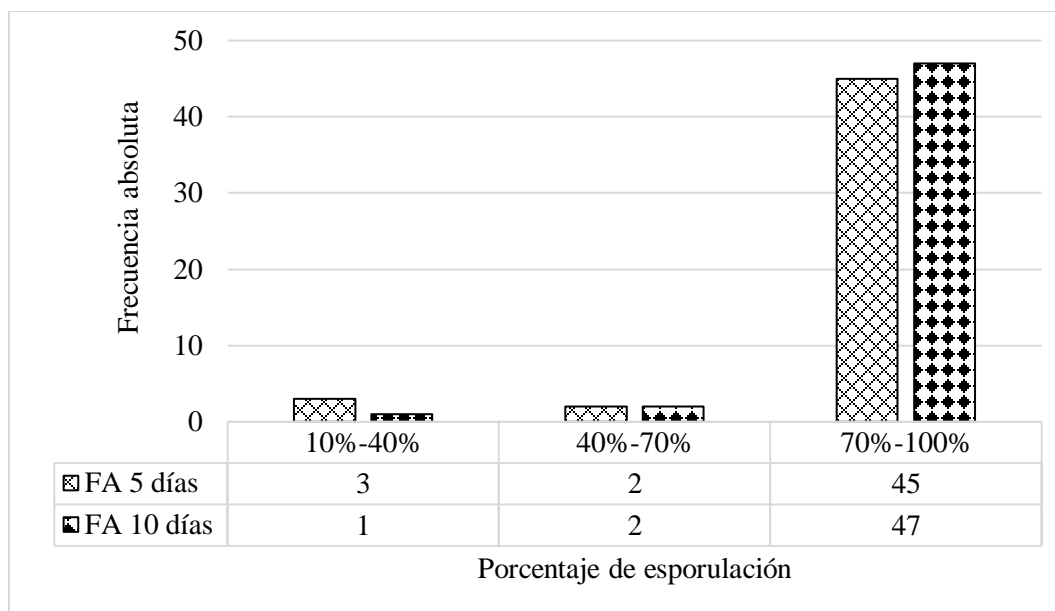




Figura 37. Proporción de esporulación (%) de la biomasa de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* en los días 5 y 10 de incubación, cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB).

Las características macroscópicas, microscópicas y los requerimientos de crecimiento para *Trichoderma* spp. han sido estudiados y publicados ampliamente en la literatura (Samuels et al, 2010; Michel-Aceves et al., 2008). Sin embargo, no existe información y evidencia suficiente en cuanto a las características macroscópicas de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* cultivada en medio de cultivo líquido, hasta ahora solo se ha reportado la producción y caracterización macroscópica de *Trichoderma* spp. en medios semisólidos y líquidos sintéticos y substratos orgánicos. Las características macroscópicas que presentó la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* tanto en el día 5 como en el día 10 de incubación no mostraron una variación o cambio en su morfología, mostrando un color verde amarillento (RHS2015 193A), textura algodonosa, densidad de micelio abundante y una proporción de esporulación del 70-100% (Cuadro 14), lo cual coincide con lo reportado por Samuels et al. (2010) para cepas del género *Trichoderma* spp. Se tomaron fotografías en los días 5 y 10 de incubación de cada una de las réplicas (n= 50) como evidencia de las características macroscópicas evaluadas, las cuales se muestran en los Anexos A-B.

Cuadro 15. Caracterización morfológica macroscópica de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* en los días 5 y 10 de incubación, cultivada en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB) en estado estático.

Días de incubación	Color (RHS, 2015)	Textura	Densidad	Porcentaje de esporulación	Apariencia
5	Verde amarillento (RHS2015 193A)	Algodonosa	Abundante	70-100%	
10	Verde amarillento (RHS2015 193A)	Algodonosa	Abundante	70-100%	

CPM=Colegio de Postgraduados, Mohos. RHS= Carta de colores *Royal Horticultural Society*, 2015.

5.3.2 Determinación de biomasa (mg/mL) de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*

En la Figura 38, se muestra la producción de biomasa húmeda y biomasa seca por parte de las 50 cajas Petri (réplicas) inoculadas con la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, cultivada en 50 mL de medio de cultivo líquido PDB, en estado estático durante 10 días de incubación, se obtuvo un valor promedio de biomasa húmeda de 15.17 ± 2.32 mg/mL, la cual se deshidrató durante 48 horas a 40 °C, obteniéndose un valor promedio de biomasa seca de 3.39 ± 0.42 mg/mL. Se obtuvo un total de 169.4 mg/mL de biomasa seca (8.4711 g) de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115), a partir de las 50 réplicas elaboradas.

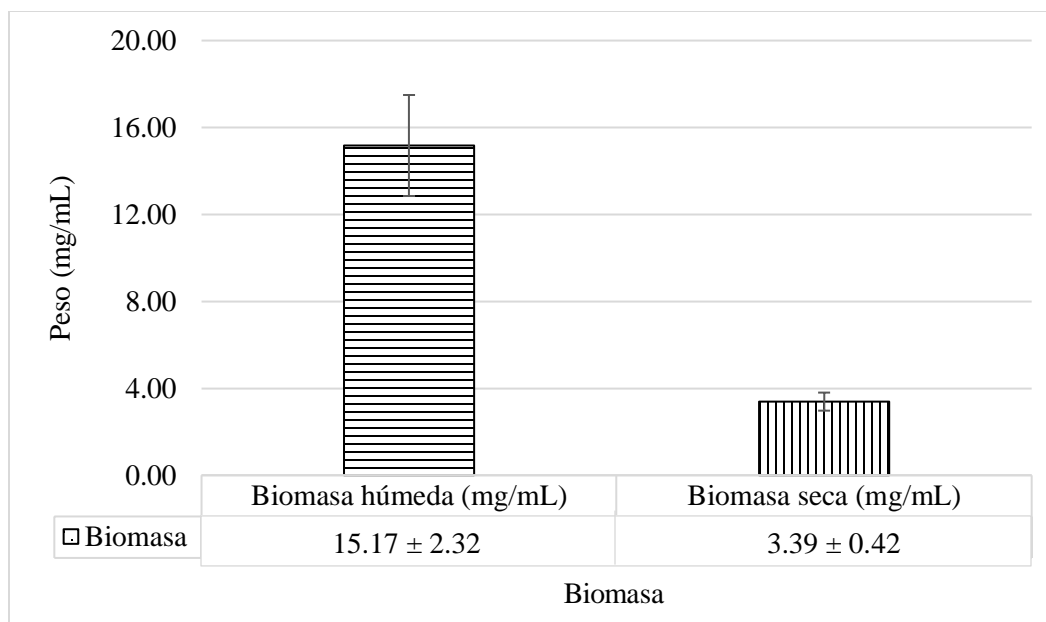


Figura 38. Biomasa húmeda y seca de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum f. aggressivum* en medio de cultivo líquido caldo de papa dextrosa (PDB) en estado estático.

5.3.3 Caracterización fisicoquímica del sobrenadante (pH y azúcares disueltos)

De las 50 cajas Petri (réplicas) empleadas para la obtención de biomasa seca de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum f. aggressivum*, se obtuvo 1 L de sobrenadante al cual se le realizó una caracterización fisicoquímica obteniendo un valor de pH= 5.70 ± 0.56 , azúcares disueltos= 0.8 ± 0.52 °Bx y una temperatura de 27.2 ± 0.53 °C (Cuadro 15).

Cuadro 16. Caracterización fisicoquímica del sobrenadante de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum f. aggressivum*.

	pH	Azúcares disueltos (°Bx)	Temperatura (°C)
Sobrenadante	5.70 ± 0.56	0.8 ± 0.52	27.2 ± 0.53

5.4 Caracterización fisicoquímica de los extractos de *Trichoderma aggressivum f. aggressivum* (CPM-115)

5.4.1 Rendimiento por gravimetría (mg/mL)

El rendimiento que se obtuvo en el extracto hidroalcohólico al 32% de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum f. aggressivum* fue de 110.56 ± 4.34 mg/mL. El sobrenadante concentrado (extracto acuoso) obtenido presentó un rendimiento inicial de 8.52 ± 0.41 mg/mL, por

lo que se llevó a la misma concentración del extracto hidroalcohólico al 32%, obteniendo un rendimiento de 110.44 ± 1.68 mg/mL en el sobrenadante concentrado (extracto acuoso), como se muestra en el Cuadro 16. Esto se realizó con la finalidad de poder comparar sus características fisicoquímicas y actividad antimicrobiana, tanto del extracto hidroalcohólico al 32% como del extracto acuoso (sobrenadante concentrado) de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, contra las bacterias de importancia ambiental y clínica estudiadas en este trabajo.

Cuadro 17. Rendimiento por gravimetría (mg/mL) del extracto hidroalcohólico al 32% y extracto acuoso (sobrenadante concentrado) de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*.

Extracto	Rendimiento inicial (mg/mL)	Rendimiento final (mg/mL)
Extracto hidroalcohólico al 32%	110.56 ± 4.34	110.56 ± 4.34
Extracto acuoso (sobrenadante concentrado)	8.52 ± 0.41	110.44 ± 1.68

5.4.2 pH, conductividad, resistividad, sólidos disueltos totales (TDS) y azúcares disueltos

Se realizó una prueba de análisis de varianza de Tukey con un $\alpha = 0.05$ de las características fisicoquímicas de los extractos de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115). Todos los parámetros evaluados mostraron diferencia significativa entre los extractos. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 17, donde se observan los valores de variación de pH entre los extractos, el valor máximo correspondió al extracto hidroalcohólico al 32% con un pH ligeramente ácido (6.09 ± 0.01), en tanto que el menor valor fue en el extracto acuoso (sobrenadante concentrado) con un pH ácido (3.96 ± 0.01). En los resultados obtenidos de TDS y conductividad eléctrica, los valores máximos en dichos parámetros se obtuvieron en el extracto acuoso con un valor de TDS = $18,098.37 \pm 0.01$ mg/L y $45,213.26 \pm 0.77$ μ S/cm y los valores mínimos de dichos parámetros se obtuvieron en el extracto hidroalcohólico al 32% con un valor de $12,832.04 \pm 0.50$ mg/L y $32,049.76 \pm 0.39$ μ S/cm, respectivamente. En los parámetros de resistividad y azúcares disueltos los valores máximos se obtuvieron en el extracto hidroalcohólico al 32% con un valor de 17.00 ± 0.00 Ω y 21.90 ± 0.00 °Bx, respectivamente para cada parámetro, y los valores mínimos para ambos parámetros se obtuvieron en el extracto acuoso con un valor de 12.20 ± 0.45 Ω y 10.86 ± 0.05 °Bx.

Cuadro 18. Caracterización fisicoquímica del extracto hidroalcohólico al 32% y el extracto acuoso (sobrenadante concentrado) de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115).

Extracto	pH	Sólidos disueltos totales (mg/L)	Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Resistividad (Ohms)	Azúcares disueltos ($^{\circ}\text{Bx}$)
EH	6.09 \pm 0.01 A	12,832.04 \pm 0.50 B	32,049.7 \pm 0.39 B	17.00 \pm 0.00 A	21.90 \pm 0.00 A
EA	3.96 \pm 0.01 B	18,098.37 \pm 0.81 A	45,213.2 \pm 0.77 A	12.20 \pm 0.45 B	10.86 \pm 0.05 B

EH= Extracto hidroalcohólico al 32%. EA= Extracto acuoso (sobrenadante concentrado). Medias en una columna mostrando letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa de acuerdo a la prueba de Tukey, $p < 0.05$.

A partir de los resultados obtenidos de la caracterización fisicoquímica de los extractos de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, se pudo determinar que *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* produce mayor cantidad de compuestos bioactivos como metabolitos primarios, secundarios y enzimas con actividad antimicrobiana en el sobrenadante (substrato), comparativamente con la biomasa seca. Por esta razón, el extracto acuoso o sobrenadante concentrado presenta una cantidad mayor de sólidos disueltos totales y conductividad eléctrica que el extracto hidroalcohólico al 32% de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*. Sin embargo, el extracto acuoso (sobrenadante concentrado) presentó una menor producción de azúcares disueltos del 49.58% respecto al extracto hidroalcohólico al 32%, debido al disolvente empleado durante la concentración de biomasa seca de la cepa CPM-115.

5.5 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana de los extractos de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115) sobre cuatro cepas de bacterias de interés clínico y ambiental

5.5.1 Concentración de los extractos de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115) en las diferentes diluciones de la microplaca

El extracto de 10 g de biomasa seca de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, se concentró y aforó a 10 mL, con el disolvente hidroalcohólico al 32%, en una concentración inicial de un gramo de hongo seco por mililitro. El extracto de 1 L de sobrenadante se concentró y aforó a 25 mL, con el disolvente de agua destilada estéril, obteniendo como volumen final 50 mL de extracto acuoso (sobrenadante concentrado). El volumen y la concentración de cada extracto correspondiente a cada nivel de dilución en la microplaca para *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115) se muestra en el Cuadro 18.

Cuadro 19. Concentración de los extractos de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115) en las diferentes microdiluciones estudiadas en la microplaca.

Dilución	Extracto (μl)	Extracto hidroalcohólico al 32% (mg/mL)	Extracto acuoso (mg/mL)
D0	100	110.56	110.44
D1	50	55.28	55.22
D2	25	27.64	27.61
D3	12.50	13.82	13.80
D4	6.25	6.91	6.90
D5	3.125	3.455	3.451
D6	1.563	1.727	1.725
D7	0.781	0.863	0.862

5.5.2 Efecto bacteriostático de los extractos hidroalcohólico (EH) y acuoso (EA) de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115) contra *Staphylococcus aureus* CPB-2

El efecto del extracto hidroalcohólico (EH) y del sobrenadante concentrado o extracto acuoso (EA) sobre la bacteria *Staphylococcus aureus* CPB-2 a una concentración constante de 1×10^4 bacterias/mL, se observó por medio de la lectura de la absorbancia (D.O.) de cada muestra. El extracto hidroalcohólico al 32% no tuvo efecto bacteriostático sobre *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, en la dilución 1 con una concentración de 55.28 mg/mL y en la dilución 2 con una concentración de 27.64 mg/mL, se pudo observar una disminución de crecimiento bacteriano del 78.25% y 30.04%, respectivamente, en comparación con el control de crecimiento bacteriano positivo. En la Figura 39, se muestran las diferentes diluciones de la solución y el crecimiento de la bacteria.

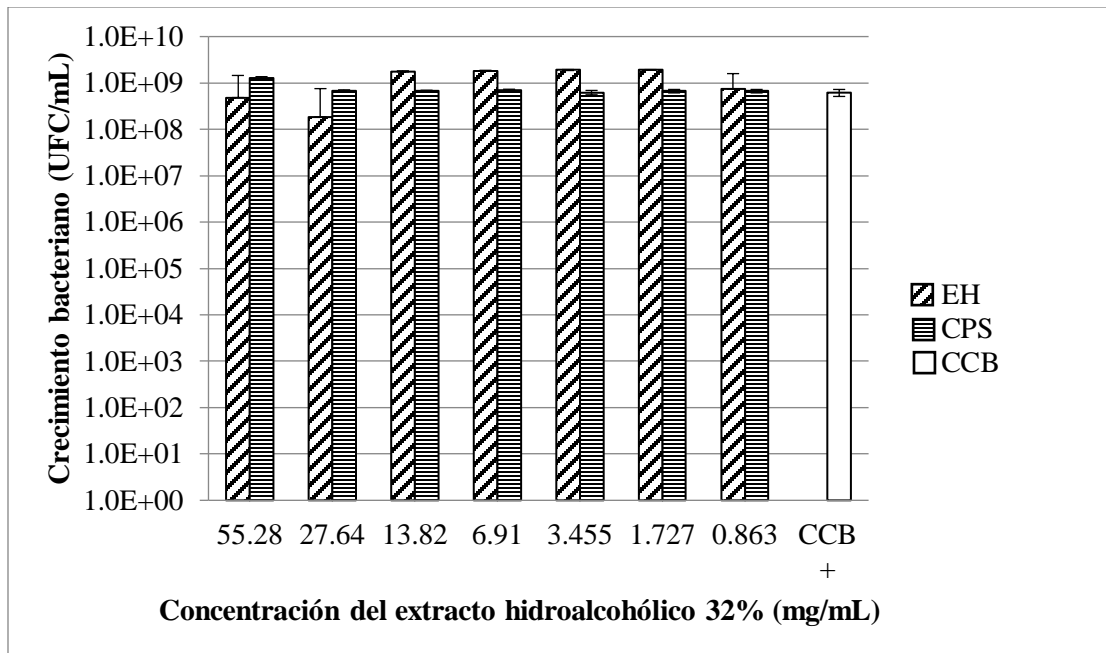


Figura 39. Efecto bacteriostático del extracto hidroalcohólico al 32% de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* sobre *Staphylococcus aureus* CPB-2 a las 24 horas de incubación bacteriana. EH= Extracto hidroalcohólico. CPS= Control positivo del solvente. CCB= Control de crecimiento bacteriano.

En la Figura 40, se observa el efecto bacteriostático del extracto acuoso (sobrenadante concentrado) de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* sobre *Staphylococcus aureus* CPB-2, a una concentración de 55.22-13.80 mg/mL (dilución 1 a la dilución 3). En la dilución 4 con una concentración de 6.90 mg/mL, se pudo observar una disminución de crecimiento bacteriano del 9.67%, respecto al control de crecimiento bacteriano positivo.

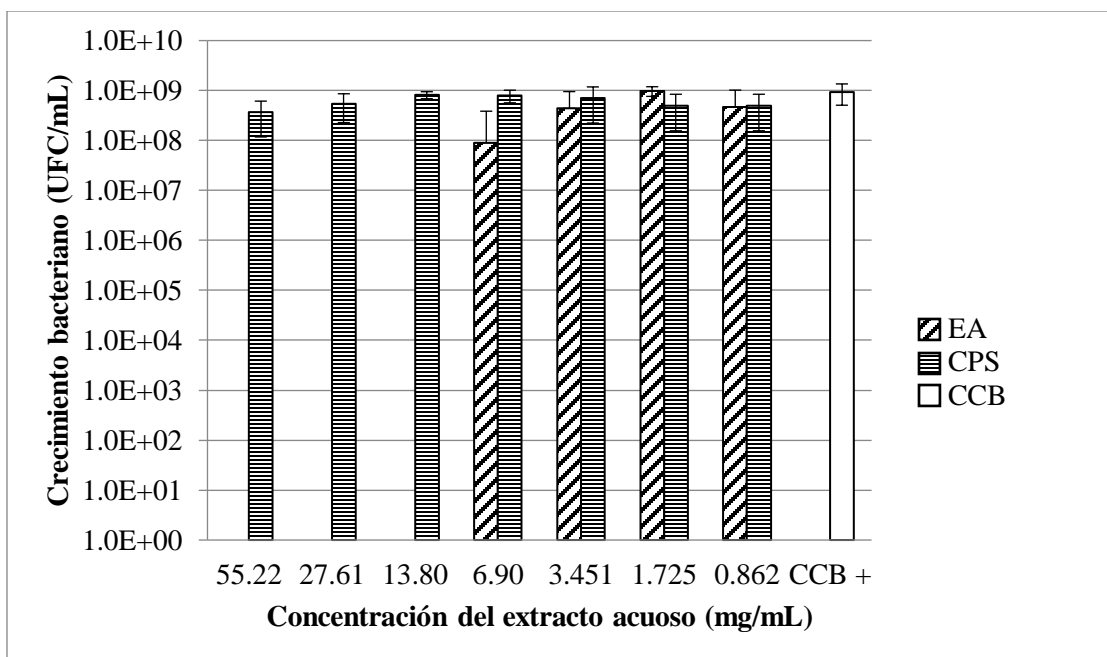


Figura 40. Efecto bacteriostático del extracto acuoso de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* sobre *Staphylococcus aureus* CPB-2 a las 24 horas de incubación bacteriana. EA= Extracto acuoso (sobrenadante concentrado). CPS= Control positivo del solvente. CCB= Control de crecimiento bacteriano.

5.5.3 Efecto bactericida de los extractos hidroalcohólico (EH) y acuoso (EA) de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115) contra *Staphylococcus aureus* CPB-2

El extracto hidroalcohólico al 32% de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* presentó efecto bactericida sobre *Staphylococcus aureus* CPB-2 en la dilución 1 con una concentración de 55.28 mg/mL, por lo que en esta concentración el extracto hidroalcohólico induce la muerte de la población bacteriana a las 48 horas de realizada la prueba de susceptibilidad bacteriana. Sin embargo, de la dilución 2 a la dilución 7 (27.64-0.863 mg/mL), se registró crecimiento bacteriano a las 48 horas de realizada la prueba de susceptibilidad, por lo que a estas concentraciones el extracto hidroalcohólico no presentó efecto bactericida (Figura 41).

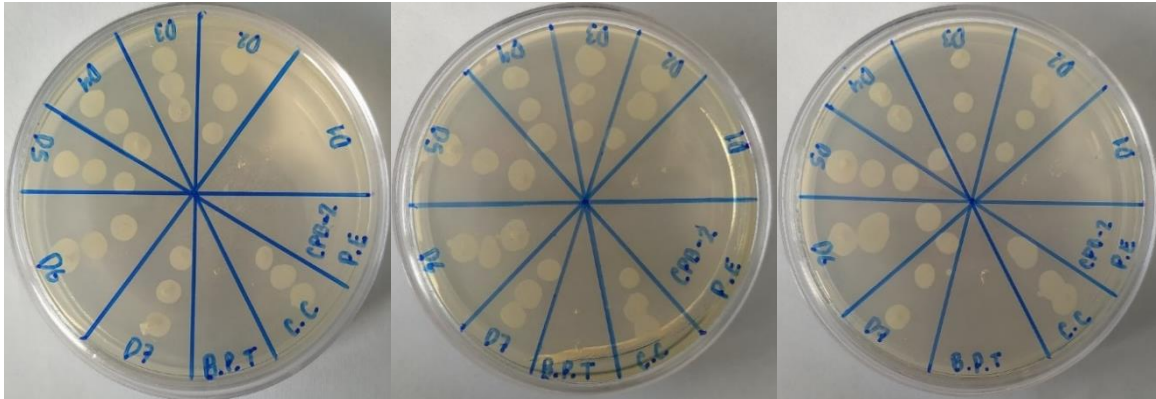


Figura 41. Efecto bactericida del extracto hidroalcohólico al 32% de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* sobre *Staphylococcus aureus* (CPB-2), a las 48 horas de incubación.

En la Figura 42, se muestra el efecto bactericida del extracto acuoso (sobrenadante concentrado) de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* sobre *Staphylococcus aureus* CPB-2 en la dilución 1 y dilución 2 con una concentración de 55.22 y 27.61 mg/mL, respectivamente. Por lo tanto, a dichas concentraciones el extracto acuoso induce la muerte de la población bacteriana a las 48 horas de realizada la prueba de susceptibilidad.

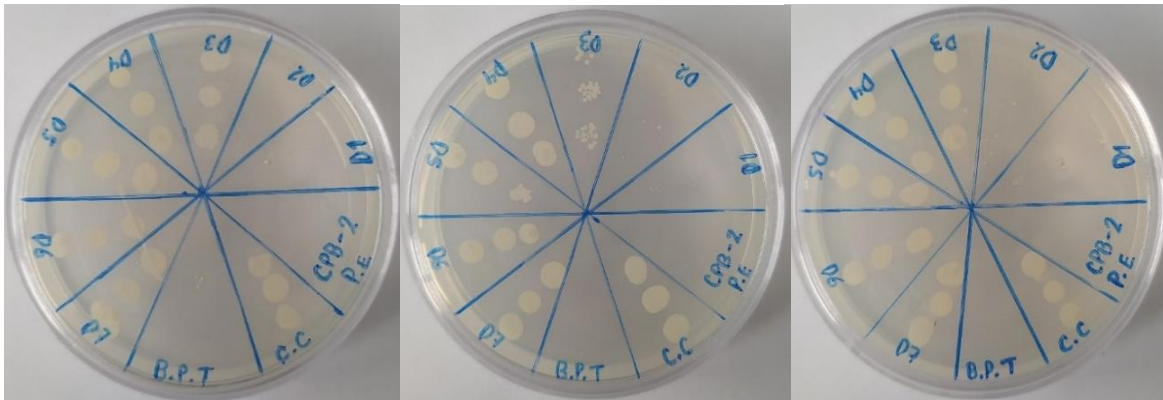


Figura 42. Efecto bactericida del extracto acuoso de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* sobre *Staphylococcus aureus* (CPB-2), a las 48 horas de incubación.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el extracto que presentó mayor efecto bacteriostático y bactericida frente a *Staphylococcus aureus* CPB-2, fue el extracto acuoso (sobrenadante concentrado), a una concentración de 55.22-13.80 mg/mL en la CMB, mientras que en la CMI se observó a una concentración de 55.22-27.61 mg/mL de extracto acuoso de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115). Leelavathi et al. (2014) realizaron un extracto a partir del

sobrenadante de *Trichoderma harzianum*, el cual denominaron como extracto crudo. La actividad antimicrobiana de este extracto se determinó mediante CMI colocando aproximadamente 1.5×10^8 bacterias/mL en cada pozo y empleando las siguientes concentraciones 10, 50, 100, 150 y 200 $\mu\text{L/mL}$ de extracto crudo de *Trichoderma harzianum* frente a *Staphylococcus aureus*, obteniendo que las mejores concentraciones fueron 100, 150 y 200 $\mu\text{L/mL}$ de extracto crudo. Por otro lado, Xiao-Yan et al. (2006) obtuvieron un extracto crudo a partir de la biomasa de *Trichoderma koningii* SMF2 obtenida en cultivo sólido de salvado de trigo seco, la cual se extrajo con agua destilada estéril, se realizó una filtración y posteriormente se centrifugó a 10 000 g durante 20 minutos, empleando el sobrenadante obtenido de *T. koningii* SMF2 como extracto crudo. La actividad antimicrobiana se evaluó mediante el ensayo de difusión en disco de agar contra *Staphylococcus aureus*, el nivel antimicrobiano se estimó midiendo el tamaño de la zona de inhibición de la cepa, por lo que el extracto acuoso de *T. koningii* SMF2 presentó un amplio espectro de acción de 13 a 17 mm de diámetro de zona de inhibición a una concentración de 100 μL de extracto crudo. De acuerdo a estas investigaciones previas y comparado con lo obtenido en esta investigación, se puede decir que tanto el extracto hidroalcohólico al 32% como el extracto acuoso de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* presentaron una excelente actividad antimicrobiana a una menor concentración (55.22-13.80 mg/mL) frente a *Staphylococcus aureus* (1×10^8 bacterias/mL). Esto en comparación con el extracto crudo de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma koningii* SMF2, ya que estos presentaron actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* a una concentración de 100 $\mu\text{L/mL}$ (100 mg/mL) de cada extracto crudo. Puede concluirse que, dependiendo de la especie de *Trichoderma* empleada en la elaboración del extracto, éste presentará actividad antimicrobiana en una menor o mayor concentración de extracto. A pesar de que *Trichoderma harzianum* es por excelencia un agente de control biológico, no se reportó efecto de éste a menores concentraciones, comparativamente con el caso de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115).

En la Figura 43, se muestra el crecimiento de las colonias de la cepa CPB-2 de *Staphylococcus aureus*, después de diluir 2.7×10^9 bacterias/mL en medio de cultivo Caldo Müller Hinton. Esta prueba se realizó principalmente para verificar el número de bacterias inoculadas en cada pozo del experimento, en este caso fueron 1×10^4 bacterias/mL, lo cual se comprobó a las 24 horas de incubación de la caja de Petri con el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) realizado por triplicado para esta bacteria, obteniéndose como resultado 36 ± 1 UFC, lo cual se encuentra

dentro del rango establecido en la metodología (30-50 UFC). Esta prueba, por otro lado, permitió validar la pureza del cultivo de la bacteria, su morfología macroscópica y la concentración correcta empleada en la determinación de la CMI y la CMB.

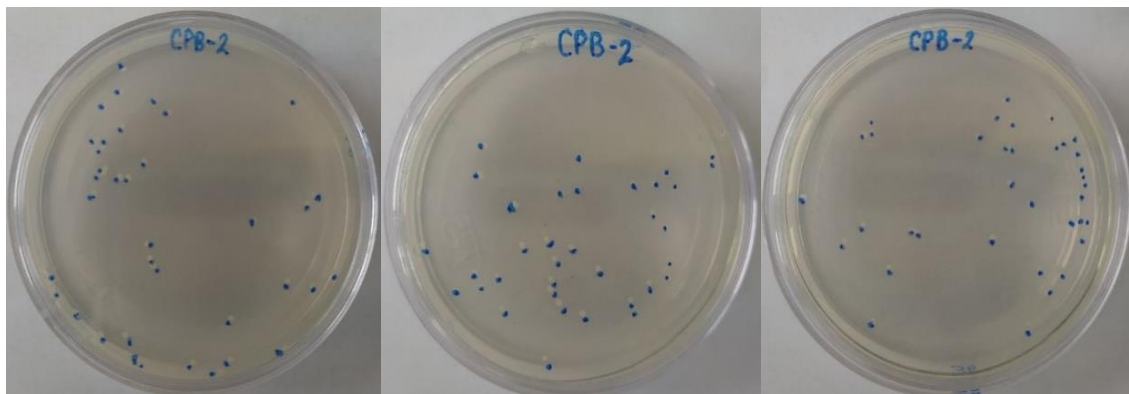


Figura 43. Cultivo y conteo de las unidades formadoras de colonia (UFC) de la cepa CPB-2 de *Staphylococcus aureus* por microdilución en medio de cultivo Agar Müller Hinton, a las 24 horas de incubación.

5.5.4 Efecto bacteriostático de los extractos hidroalcohólico (EH) y acuoso (EA) de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115) contra *Bacillus subtilis* CPB-5

El efecto del EH y EA sobre la bacteria *Bacillus subtilis* CPB-5 a una concentración de 1×10^4 bacterias/mL, se observó por medio de la lectura de la D.O. de cada muestra. El extracto hidroalcohólico presentó efecto bacteriostático sobre *Bacillus subtilis* CPB-5 a una concentración de 55.28 y 27.64 mg/mL (dilución 1 y dilución 2, respectivamente), en la dilución 3 con una concentración de 13.82 mg/mL se observó una disminución de crecimiento bacteriano del 8.83% respecto al control de crecimiento bacteriano positivo. En la Figura 44, se muestran las diferentes diluciones empleadas del extracto hidroalcohólico al 32% y el crecimiento de la bacteria *Bacillus subtilis* CPB-5.

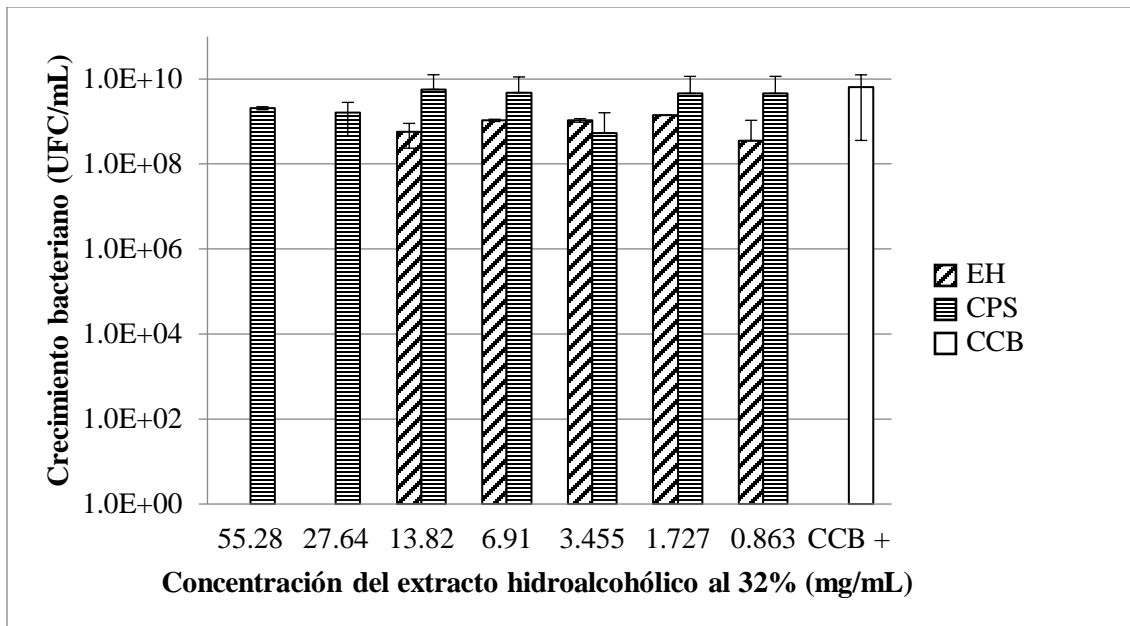


Figura 44. Efecto bacteriostático del extracto hidroalcohólico al 32% de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* sobre *Bacillus subtilis* CPB-5, a las 24 horas de incubación bacteriana. EH= Extracto hidroalcohólico. CPS= Control positivo del solvente. CCB= Control de crecimiento bacteriano.

En la Figura 45, se muestra el efecto bacteriostático del extracto acuoso (sobrenadante concentrado) de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* contra *Bacillus subtilis* CPB-5, registrado en las siguientes concentraciones 55.22, 27.61, 13.80 y 6.90 mg/mL (dilución 1 a la dilución 4). En la dilución 5 con una concentración de 3.451 mg/mL, se observó una disminución de crecimiento bacteriano del 0.64% respecto al control de crecimiento bacteriano positivo. Por lo tanto, de la dilución 1 a la dilución 4, el extracto acuoso de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* inhibió el crecimiento de la bacteria *Bacillus subtilis* CPB-5 a las 24 horas de incubación.

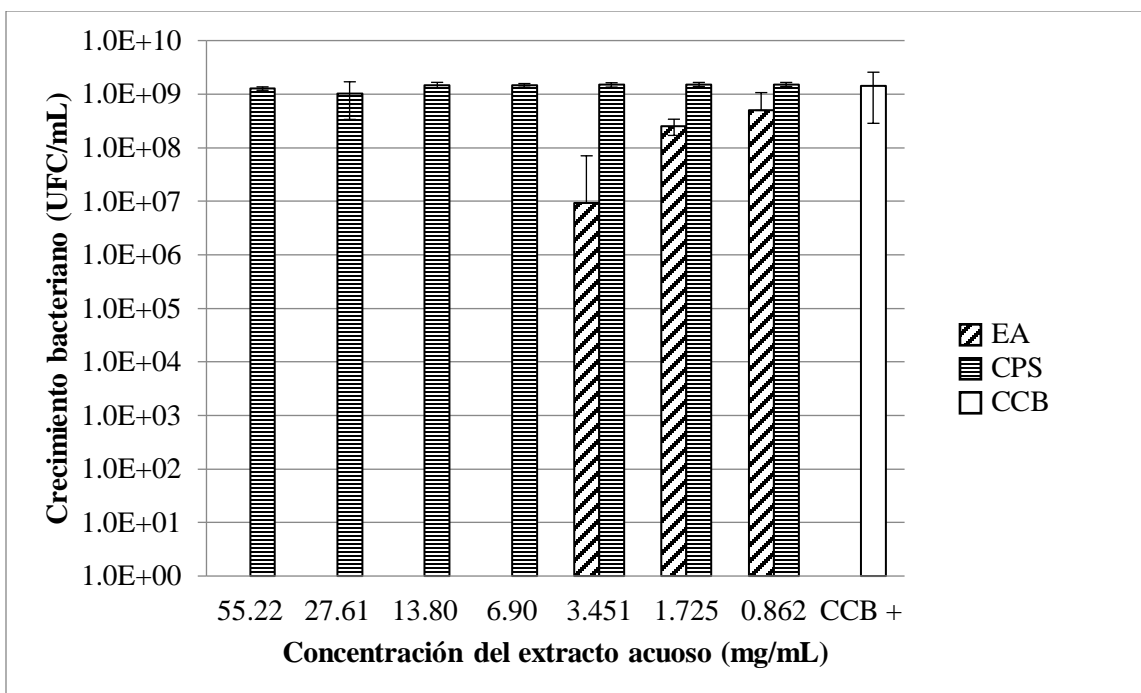


Figura 45. Efecto bacteriostático del extracto acuoso de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* sobre *Bacillus subtilis* CPB-5 a las 24 horas de incubación bacteriana. EA= Extracto acuoso. CPS= Control positivo del solvente. CCB= Control de crecimiento bacteriano.

5.5.5 Efecto bactericida de los extractos hidroalcohólico (EH) y acuoso (EA) de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115) contra *Bacillus subtilis* CPB-5

En la Figura 46, se muestra el efecto bactericida del extracto hidroalcohólico al 32% de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* contra *Bacillus subtilis* CPB-5, a una concentración de 55.28 mg/mL (dilución 1) y en las concentraciones 27.64-0.863 mg/mL (dilución 2 a la dilución 7). Se observa crecimiento de la bacteria a las 48 horas de realizada la prueba de susceptibilidad bacteriana, por lo que a estas concentraciones el extracto hidroalcohólico al 32% de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* no presenta efecto bactericida frente a *Bacillus subtilis*.

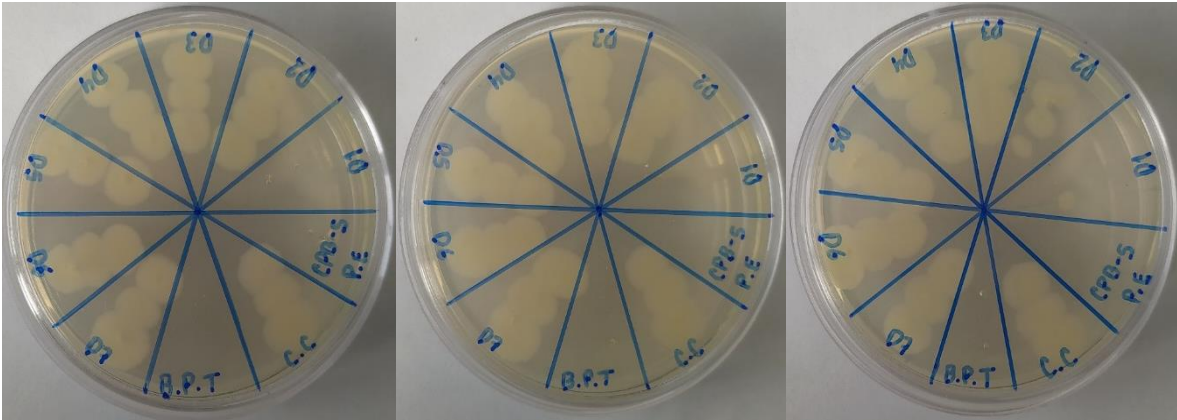


Figura 46. Efecto bactericida del extracto hidroalcohólico al 32% de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* contra *Bacillus subtilis* CPB-5 a las 48 horas de incubación.

En la Figura 47, se muestra el efecto bactericida del extracto acuoso de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115) contra *Bacillus subtilis* CPB-5 en las siguientes concentraciones 55.22, 27.61 y 13.80 mg/mL (dilución 1 a la dilución 3). Por lo tanto, a dichas concentraciones el extracto acuoso (sobrenadante concentrado) induce la muerte de la población bacteriana a las 48 horas de realizada la prueba de susceptibilidad.

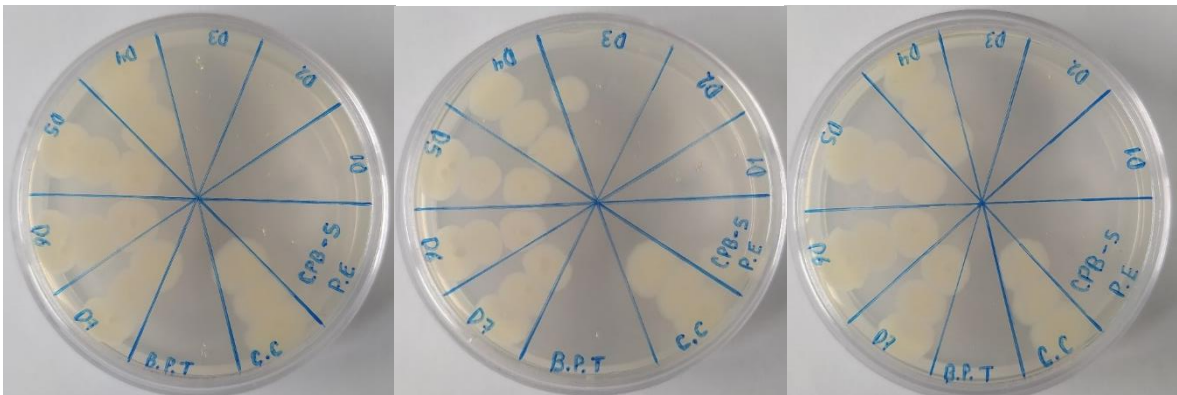


Figura 47. Efecto bactericida del extracto acuoso de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* sobre *Bacillus subtilis* CPB-5, a las 48 horas de incubación.

El extracto que presentó mejores resultados en cuanto al efecto bacteriostático y el efecto bactericida contra *Bacillus subtilis* CPB-5 fue el extracto acuoso de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115). En la CMB, las concentraciones 55.22-6.90 mg/mL (dilución 1 a la dilución 4) presentaron inhibición de crecimiento de la bacteria *B. subtilis* a las 24 horas de incubación y en la CMI el extracto acuoso indujo la muerte de la población bacteriana a las 48

horas de realizada la prueba de susceptibilidad bacteriana de la dilución 1 a la dilución 3 (55.22, 27.61 y 13.80 mg/mL, respectivamente). En un trabajo previo de extractos de *Trichoderma*, se evaluó la actividad antimicrobiana de un extracto acuoso de *Trichoderma koningii* SMF2 frente a *Bacillus subtilis* CGMCC1.140, presentando una zona de inhibición de 8 a 12 mm de diámetro y *Bacillus subtilis* CGMCC1.398 no presentó zona de inhibición, ambos a una concentración de 100 µl de extracto crudo (Xiao-Yan et al., 2006). Los resultados obtenidos de la CMB y CMI, tanto del extracto hidroalcohólico al 32% como del extracto acuoso, de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* presentaron resultados favorables, debido a que se emplea una menor concentración de extracto (EH: 55.28-27.64 mg/mL; EA: 55.22-6.90 mg/mL) contra *Bacillus subtilis*, en comparación con el estudio de Xiao-Yan et al. (2006) que utilizaron una concentración de extracto crudo de 100 µl o 100 mL, para la inhibición de la bacteria *Bacillus subtilis*.

En la Figura 48, se muestra el crecimiento de las colonias de la cepa CPB-5 *Bacillus subtilis*, después de diluir 2×10^9 bacterias/mL en medio de cultivo Caldo Müller Hinton. Esta prueba se realizó para verificar el número de bacterias inoculadas en cada pozo del experimento, en este caso fueron 1×10^4 bacterias/mL. Sin embargo, a las 24 horas de incubación de la caja de Petri, no se pudo realizar el conteo de UFC debido a que esta bacteria crece rápidamente y de forma no homogénea, por lo que las colonias no eran cuantificables, aunque de acuerdo a la D.O. correspondía a 1×10^8 bacterias/mL. Esta prueba permite validar la pureza del cultivo de la bacteria, su morfología macroscópica y la concentración correcta empleada en la determinación de la CMI y la CMB.

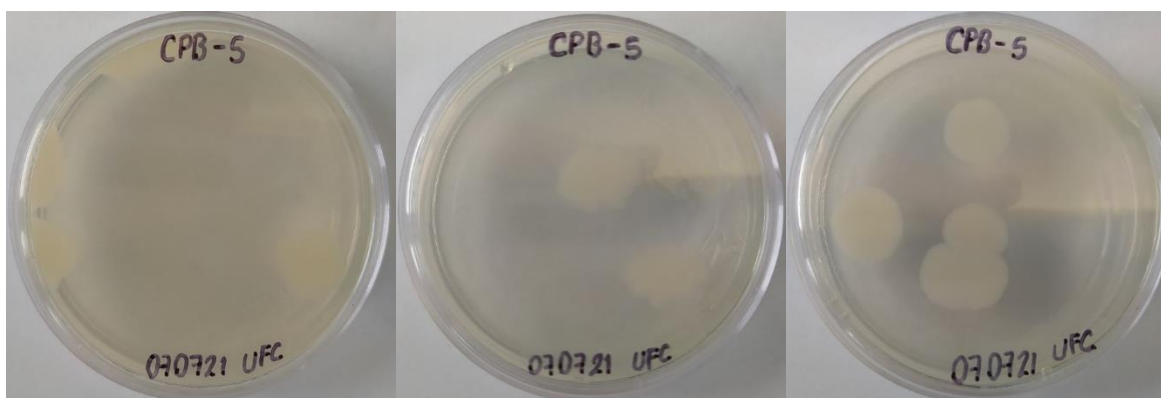


Figura 48. Cultivo y conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) de la cepa CPB-5 *Bacillus subtilis* por microdilución en medio de cultivo Agar Müller Hinton a las 24 horas de incubación.

5.5.6 Efecto bacteriostático de los extractos hidroalcohólico (EH) y acuoso (EA) de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115) contra *Escherichia coli* CPB-8

El efecto bacteriostático del extracto hidroalcohólico al 32% de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115) sobre la bacteria *Escherichia coli* CPB-8, a una concentración constante de 1×10^4 bacterias/mL en cada pozo, se observó por medio de la lectura de la absorbancia (D.O.) de cada muestra. En la Figura 49, se muestra que el extracto hidroalcohólico al 32% presentó efecto bacteriostático en la dilución 1 y dilución 2 con una concentración de 55.28 y 27.64 mg/mL, respectivamente, contra *Escherichia coli* CPB-8. En la dilución 3 con una concentración de 13.82 mg/mL se observó una disminución de crecimiento bacteriano del 44.04% respecto al control de crecimiento bacteriano positivo.

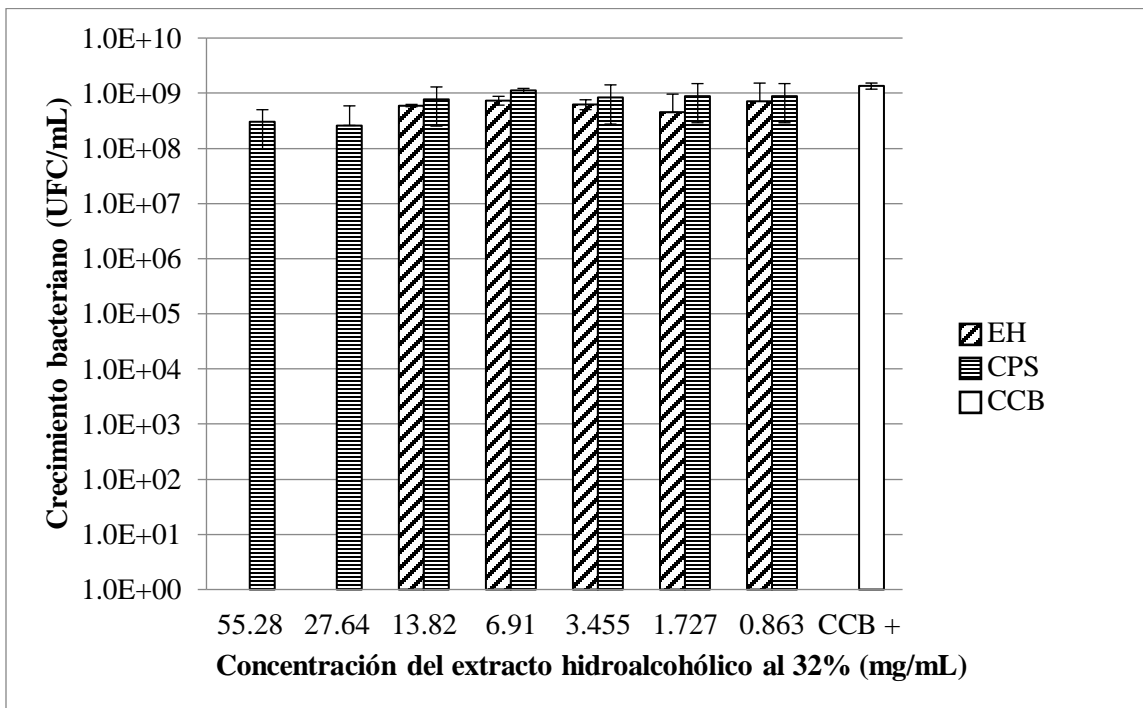


Figura 49. Efecto bacteriostático del extracto hidroalcohólico al 32% de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* sobre *Escherichia coli* CPB-8, a las 24 horas de incubación bacteriana. EH= Extracto hidroalcohólico. CPS= Control positivo del solvente. CCB= Control de crecimiento bacteriano.

En la Figura 50, se muestra el efecto bacteriostático del extracto acuoso (sobrenadante concentrado) de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115) contra *Escherichia coli* CPB-8, en las siguientes concentraciones 55.22, 27.61, 13.80 y 6.90 mg/mL (dilución 1 a la

dilución 4), inclusive en la dilución 5 con una concentración de 3.451 mg/mL. Se observó una disminución de crecimiento bacteriano del 27.25% respecto al control de crecimiento bacteriano positivo. Por lo tanto, el extracto acuoso de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115), a una concentración de 55.22-6.90 mg/mL, inhibió el crecimiento de la bacteria *Escherichia coli* CPB-8 a las 24 horas de incubación.

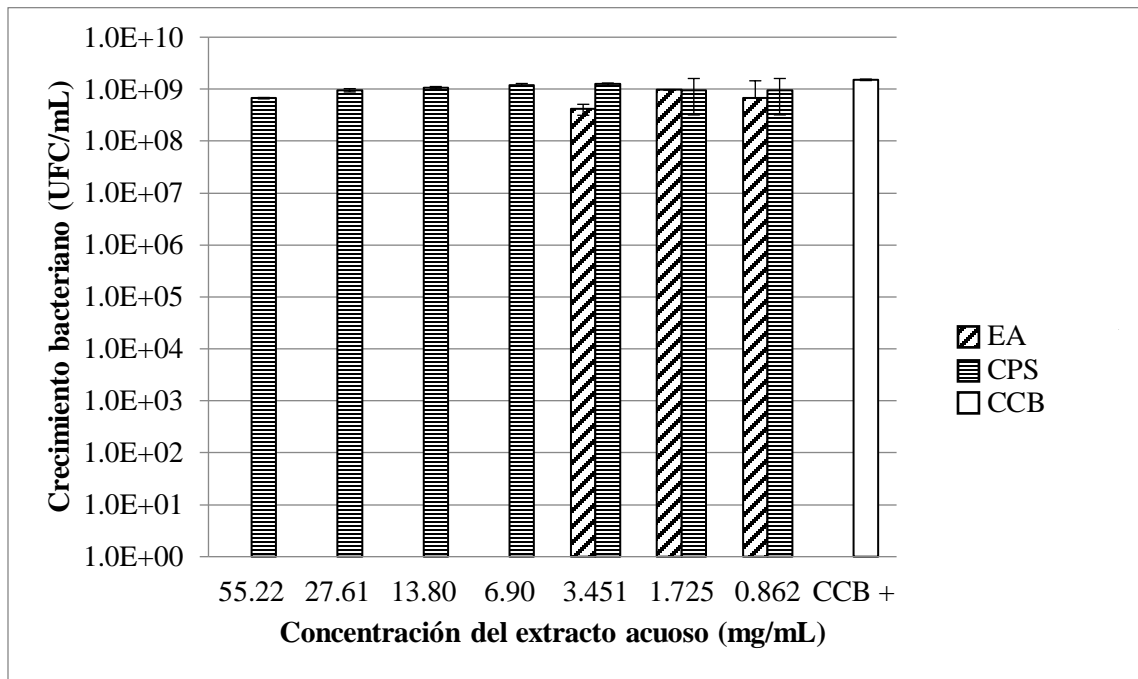


Figura 50. Efecto bacteriostático del extracto acuoso (sobrenadante concentrado) de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* sobre *Escherichia coli* CPB-8 a las 24 horas de incubación bacteriana. EA= Extracto acuoso (sobrenadante concentrado). CPS= Control positivo del solvente. CCB= Control de crecimiento bacteriano.

5.5.7 Efecto bactericida de los extractos hidroalcohólico (EH) y acuoso (EA) de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115) contra *Escherichia coli* CPB-8

En la Figura 51, se muestra el efecto bactericida del extracto hidroalcohólico al 32% de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115) contra *Escherichia coli* CPB-8, en la dilución 1 con una concentración de 55.28 mg/mL. En el resto de las diluciones (dilución 2 a la dilución 7), se observó crecimiento de la bacteria a las 48 horas de realizada la prueba de susceptibilidad, por lo que a una concentración de 27.64-0.863 mg/mL de extracto hidroalcohólico

al 32% de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* no se registró efecto bactericida frente a *Bacillus subtilis*.



Figura 51. Efecto bactericida del extracto hidroalcohólico al 32% de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* contra *Escherichia coli* CPB-8, a las 48 horas de incubación.

El extracto acuoso (sobrenadante concentrado) de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115) presentó efecto bactericida sobre *Escherichia coli* CPB-8 en las siguientes concentraciones 55.22, 27.61 y 13.80 mg/mL (dilución 1 a la dilución 3), como se muestra en la Figura 52. Por lo tanto, a dichas concentraciones el extracto acuoso induce la muerte de la población bacteriana a las 48 horas de realizada la prueba de susceptibilidad.

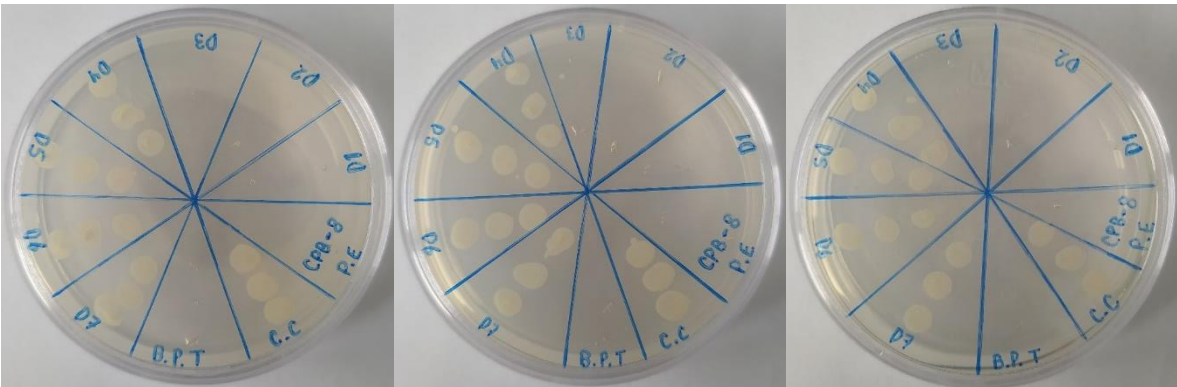


Figura 52. Efecto bactericida del extracto acuoso (sobrenadante concentrado) de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* contra *Escherichia coli* CPB-8, a las 48 horas de incubación.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el extracto que presentó un mayor efecto bacteriostático y bactericida frente a *Escherichia coli* CPB-8, fue el extracto acuoso (sobrenadante concentrado) de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115). En la CMB las concentraciones 55.22-6.90

mg/mL (dilución 1 a la dilución 4) presentaron inhibición de crecimiento de la bacteria *E. coli* CPB-8 a las 24 horas de incubación y en la CMI el extracto acuoso indujo la muerte de la población bacteriana a las 48 horas de realizada la prueba de susceptibilidad de la dilución 1 a la dilución 3 (55.22-13.80 mg/mL, respectivamente). En comparación con investigaciones previas, se observó que a partir del micelio de *Trichoderma atroviride* concentrado en metanol al 80%, se obtuvo un extracto al que se le evaluó su actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* mediante el método de difusión en disco a diferentes concentraciones (5-25 µg/mL). La mejor concentración fue de 25 µg/mL mostrando una zona máxima de inhibición de 14.25±0.25 mm contra *E. coli* (Saravanakumar et al., 2018). Comparados estos resultados con los obtenidos en esta investigación, el extracto hidroalcohólico al 32% de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* presenta poca diferencia en cuanto a la concentración empleada del extracto de metanol al 80% de *Trichoderma atroviride*. Sin embargo, el extracto acuoso (sobrenadante concentrado) de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* en comparación con el extracto de metanol al 80% de *T. atroviride* y el extracto hidroalcohólico al 32% de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, presenta mejor efecto bacteriostático y bactericida a una concentración de 55.22-6.90 mg/mL.

En la Figura 53, se muestra el crecimiento de las colonias de la cepa CPB-8 de *Escherichia coli*, después de diluir 3.21×10^9 bacterias/mL en medio de cultivo Caldo Müller Hinton. Esta prueba se realizó para verificar el número de bacterias inoculadas en cada pozo de la microplaca que en este caso fueron 1×10^4 bacterias/mL, lo cual se comprobó a las 24 horas de incubación de la caja de Petri con el conteo de UFC realizado por triplicado para esta bacteria, obteniéndose como resultado 56 ± 9.17 UFC, que corresponde a 1×10^8 bacterias/mL y coincide con lo establecido en la metodología (30-50 UFC).

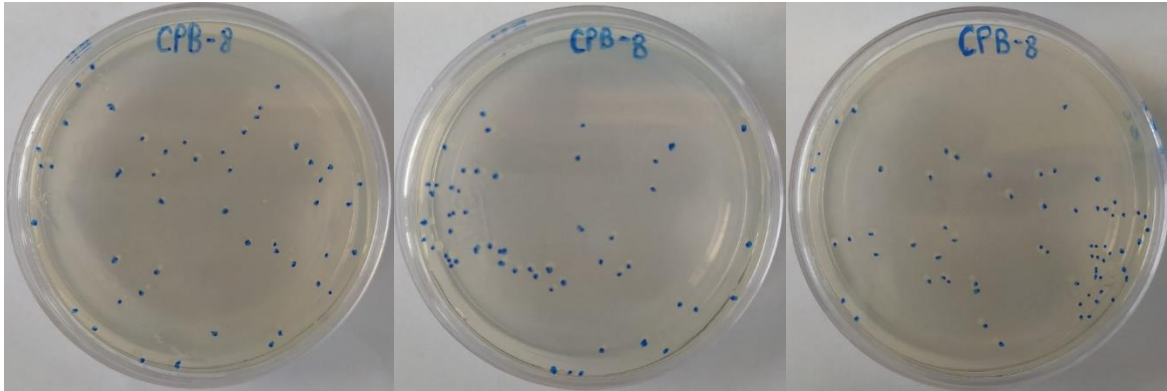


Figura 53. Cultivo y conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) de la cepa CPB-8 *Escherichia coli* por microdilución en medio de cultivo Agar Müller Hinton, a las 24 horas de incubación.

5.5.8 Efecto bacteriostático de los extractos hidroalcohólico (EH) y acuoso (EA) de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115) contra *Pseudomonas aeruginosa* CPB-13

El efecto del extracto hidroalcohólico y el extracto acuoso sobre la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* CPB-13, a una concentración constante de 1.5×10^4 bacterias/mL, se observó por medio de la lectura de la D.O. de cada muestra. El extracto hidroalcohólico al 32% de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* presentó efecto bacteriostático contra *Pseudomonas aeruginosa* a una concentración de 55.28 y 27.64 mg/mL (dilución 1 y dilución 2, respectivamente), en la Figura 54 se muestran las diferentes diluciones empleadas del extracto hidroalcohólico al 32% y el crecimiento bacteriano de *Pseudomonas aeruginosa*.

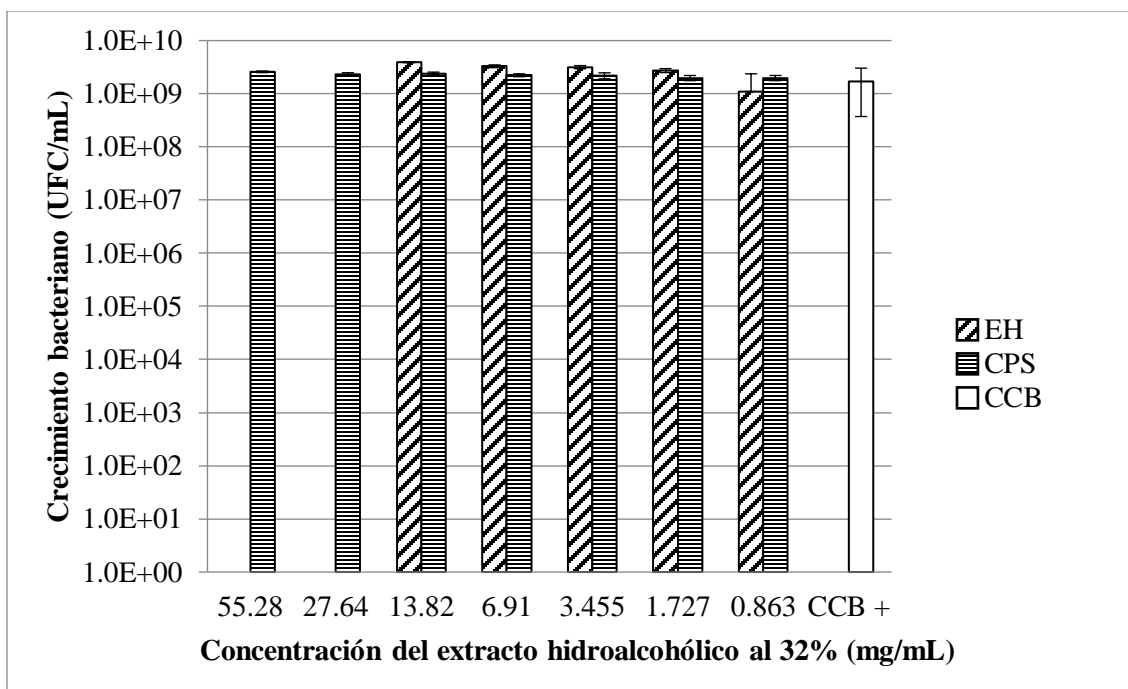


Figura 54. Efecto bacteriostático del extracto hidroalcohólico al 32% de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* sobre *Pseudomonas aeruginosa* CPB-13, a las 24 horas de incubación bacteriana. EH= Extracto hidroalcohólico. CPS= Control positivo del solvente. CCB= Control de crecimiento bacteriano.

En la Figura 55, se muestra el efecto bacteriostático del extracto acuoso (sobrenadante concentrado) de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* sobre *Pseudomonas aeruginosa* CPB-13 en las siguientes concentraciones 55.22, 27.61 y 13.80 mg/mL (dilución 1 a la dilución 3, respectivamente), mientras que en la dilución 4 a una concentración de 6.90 mg/mL se observó una disminución de crecimiento bacteriano del 81.88% respecto al control de crecimiento bacteriano positivo. Por lo tanto, de la dilución 1 a la dilución 3 el extracto acuoso (sobrenadante concentrado) de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* inhibió el crecimiento de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* CPB-13 a las 24 horas de incubación.

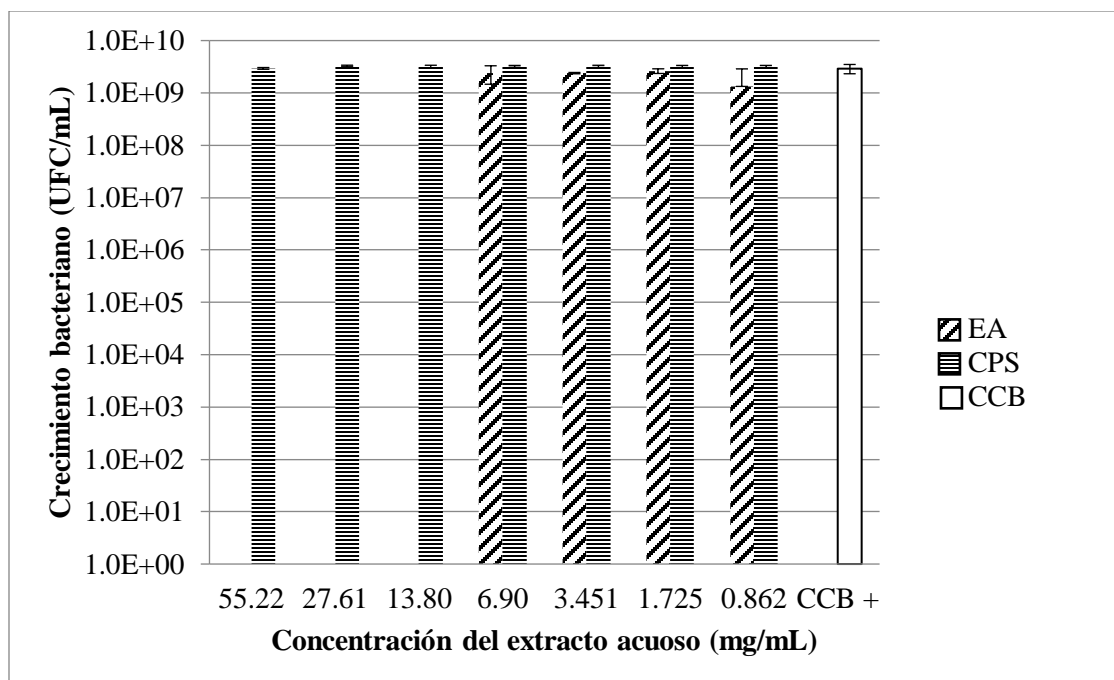


Figura 55. Efecto bacteriostático del extracto acuoso (sobrenadante acuoso) de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* sobre *Pseudomonas aeruginosa* CPB-13, a las 24 horas de incubación bacteriana. EA= Extracto acuoso (sobrenadante concentrado). CPS= Control positivo del solvente. CCB= Control de crecimiento bacteriano.

5.5.9 Efecto bactericida de los extractos hidroalcohólico (EH) y acuoso (EA) de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115) contra *Pseudomonas aeruginosa* CPB-13

En la Figura 56, se muestra el efecto bactericida del extracto hidroalcohólico al 32% de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* sobre *Pseudomonas aeruginosa* CPB-13 en la concentración 55.28 mg/mL (dilución 1). Sin embargo, en las concentraciones 27.64-0.863 mg/mL (dilución 2 a la dilución 7), se observó crecimiento bacteriano a las 48 horas de realizada la prueba de susceptibilidad.

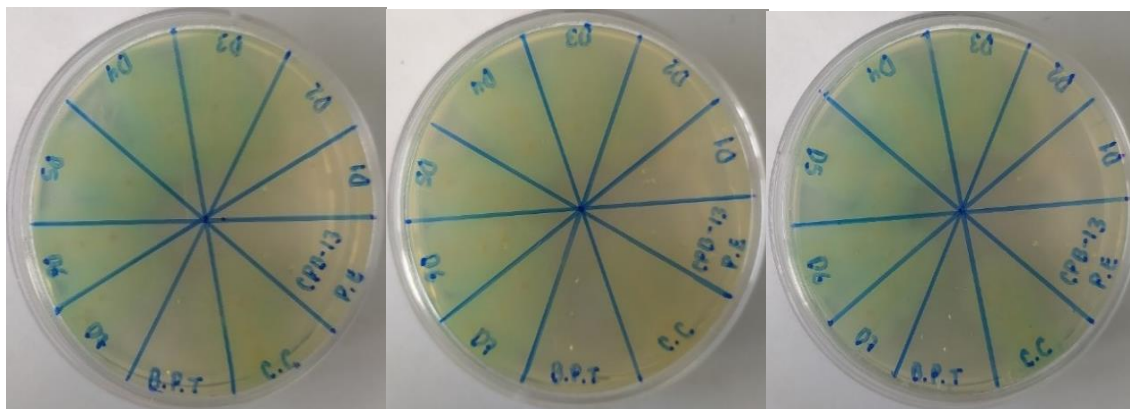


Figura 56. Efecto bactericida del extracto hidroalcohólico al 32% de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* sobre *Pseudomonas aeruginosa* CPB-13, a las 48 horas de incubación.

El extracto acuoso (sobrenadante concentrado) de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115) tuvo efecto bactericida sobre *Pseudomonas aeruginosa* CPB-13, en las siguientes concentraciones 55.22, 27.61 y 13.80 mg/mL (dilución 1 a la dilución 3, respectivamente) como se muestra en la Figura 57. Por lo tanto, a dichas concentraciones el extracto acuoso induce la muerte de la población bacteriana a las 48 horas de realizada la prueba de susceptibilidad.

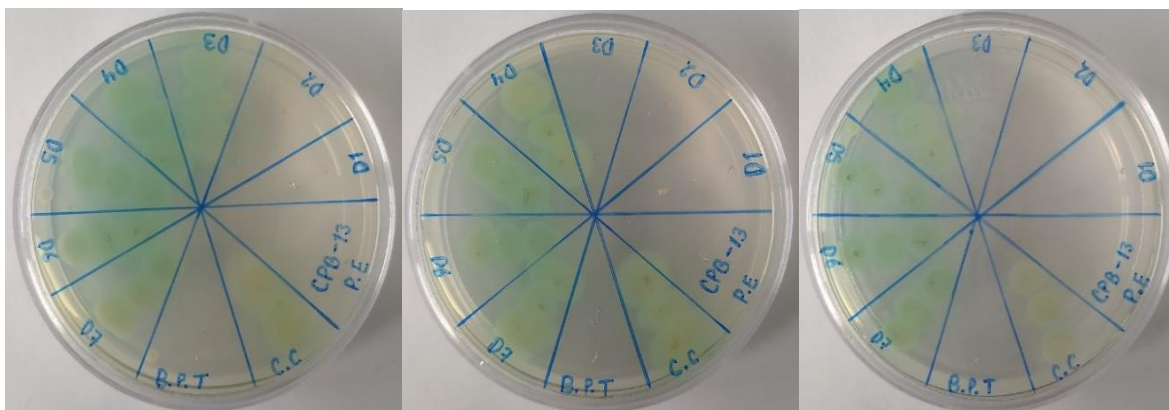


Figura 57. Efecto bactericida del extracto acuoso (sobrenadante concentrado) de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* sobre *Pseudomonas aeruginosa* CPB-13, a las 48 horas de incubación.

De acuerdo a los resultados obtenidos del efecto bacteriostático y bactericida frente a *Pseudomonas aeruginosa* CPB-13, el extracto acuoso (sobrenadante concentrado) de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* fue el que presentó excelente efecto antibacteriano, a una concentración de 55.22-13.80 mg/mL (dilución 1 a la dilución 3), tanto en la determinación de la CMB como en la CMI. Sin embargo, Ayala (2010) elaboró un extracto acetónico a partir del

sobrenadante de cultivo de la cepa *Trichoderma brevicompactum* crecida en medio de cultivo PDB, se evaluó su actividad antibacteriana frente a *Pseudomonas aeruginosa* por medio de la CMI, empleando 90 µl de la dilución de la bacteria y 10 µl del extracto acetónico en cada pozo de la microplaca. Se obtuvo como resultado que el extracto acetónico no generó inhibición frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Xiao-Yan et al., (2006) obtuvieron un resultado parecido a la investigación anterior, ya que a partir de un extracto crudo del sobrenadante de *Trichoderma koningii*, se evaluó su actividad antimicrobiana mediante el ensayo de difusión en disco frente a *Pseudomonas aeruginosa*, obteniendo ausencia de inhibición de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* frente al extracto crudo de *T. koningii*. De acuerdo a estas investigaciones previas y los resultados obtenidos en esta investigación se pudo comprobar, que dependiendo de la especie de *Trichoderma* y el tipo de disolvente empleados para la elaboración de un extracto, se observa efecto antimicrobiano frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

En la Figura 58, se muestra el crecimiento de las colonias de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* CPB-13, después de diluir 3.43×10^{10} bacterias/mL en medio de cultivo Caldo Müller Hinton. Esta prueba se realizó para verificar el número de bacterias inoculadas en cada pozo del experimento, que en este caso fueron 1.5×10^4 bacterias/mL, a las 24 horas de incubación de la caja de Petri. No se pudo realizar el conteo de UFC debido al rápido crecimiento que presenta esta bacteria, pero de acuerdo a la lectura de absorbancia (D.O.) correspondía a 1.5×10^8 bacterias/mL. Esta prueba permite validar la pureza del cultivo de la bacteria, su morfología macroscópica y la concentración correcta empleada en la determinación de CMI y CMB. Esta bacteria es muy fácil de identificar macroscópicamente por presentar una coloración verde que se vuelve más intensa conforme el transcurso del tiempo de incubación, lo cual es característico de *Pseudomonas aeruginosa*.

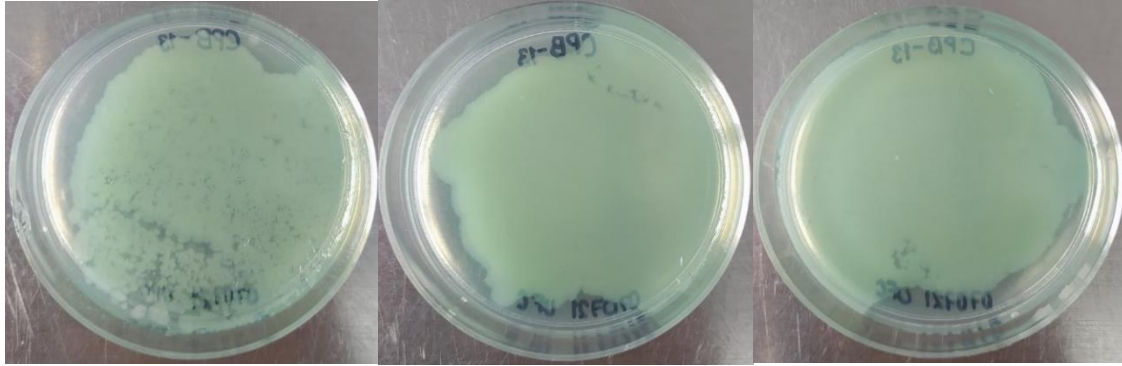


Figura 58. Cultivo y conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) de la cepa CPB-13 *Pseudomonas aeruginosa* por microdilución en medio de cultivo Agar Müller Hinton a las 24 horas de incubación.

Los resultados presentados anteriormente están enfocados principalmente a la obtención de un extracto hidroalcohólico y un extracto acuoso de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* con efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Contribuyendo de esta manera en el Manejo Integrado de Plagas (MIP) con la incorporación de técnicas de producción sostenibles, basadas en conocimientos científicos, el respeto al medio ambiente y la salud humana. A partir de los extractos de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, se puede controlar de manera sostenible plagas y enfermedades bacterianas principalmente, con el fin de proveer cosechas agrícolas para el presente, pero sin poner en riesgo el abastecimiento para las futuras generaciones. Por otro lado, es de suma importancia contar con políticas públicas coherentes que promuevan la aplicación de diversas técnicas de manejo sostenible en la producción agrícola para asegurar la soberanía y seguridad alimentaria en todo el mundo.

De esta manera se estaría apoyando y cumpliendo uno de los objetivos principales que propone la agricultura regenerativa que es la reducción del uso de agroquímicos, fertilizantes sintéticos, insecticidas, fungicidas y pesticidas en los cultivos agrícolas hasta su completa eliminación, ya que esto es lo que marca una gran diferencia entre la agricultura regenerativa de la agricultura tradicional. Por otro lado, se cumpliría el objetivo planteado del MIP, que es el de obtener cosechas sanas y nutritivas mediante la integración de técnicas y prácticas que mantengan o reduzcan al mínimo las poblaciones de plagas en los cultivos y disminuyan los costos monetarios para su control, además de que contribuyan a minimizar el riesgo a la salud de las personas, plantas y animales, a partir del respeto y cuidado del medio ambiente haciendo frente a la degradación de la biodiversidad, del suelo y del agua a fin de mitigar el efecto del cambio climático.

VI. CONTRASTACIÓN DE HIPOTESIS

Se evaluó el crecimiento y la producción de biomasa de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (CPM-115) en diferentes condiciones de crecimiento en medio de cultivo líquido PDB, así como la producción de un extracto hidroalcohólico al 32% a partir de la biomasa seca y un extracto acuoso del sobrenadante concentrado para evaluar su actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Contrastando la hipótesis planteada en este trabajo, la correcta identificación y caracterización del hongo *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* permitió obtener extractos naturales con propiedades antibacterianas a través de diferentes solventes.

VII. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, se concluye lo siguiente:

1. Para la obtención de biomasa de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, se recomienda realizarlo en estado estático (tratamiento 5), ya que se obtiene una gran cantidad de biomasa seca a bajo costo, es un tratamiento eficaz y adecuado, debido a la poca cantidad de substrato e inóculo empleado.
2. El moho verde, *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, es un importante recurso genético con propiedades antibacterianas con potencial de aplicación en la agricultura regenerativa.
3. Tanto el extracto acuoso como el extracto hidroalcohólico presentaron propiedades bacteriostáticas y bactericidas de efectos diferenciados (EA: 55.22-6.90 mg/mL; EH: 55.28-27.64 mg/mL) contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.
4. Con base en los resultados obtenidos en la presente investigación, se recomienda utilizar el sobrenadante de la obtención de biomasa como materia prima para la obtención de un extracto acuoso (sobrenadante concentrado), en lugar de la biomasa seca, ya que se obtiene mayor concentración de los metabolitos secundarios y por consiguiente el efecto antimicrobiano es mayor. Sin embargo, es necesario realizar experimentos en microcosmos y macrocosmos para evaluar *in situ* la efectividad antimicrobiana de los extractos estudiados.
5. El extracto acuoso (sobrenadante concentrado) de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* presentó una mayor actividad antimicrobiana a una concentración de 55.22-6.90 mg/mL, en comparación con el extracto hidroalcohólico al 32%. Sin embargo, el extracto acuoso requirió mayor tiempo de concentración de aproximadamente 24 horas y el extracto hidroalcohólico sólo requirió aproximadamente 6 horas para su concentración.
6. El extracto acuoso (sobrenadante concentrado) de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* tan sólo requirió 6.90 mg/mL en el efecto bacteriostático y 13.80 mg/mL para el efecto bactericida contra *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*.

7. La metodología de obtención de extractos desarrollada por Martínez-Carrera et al., (2014), con el método patentado estandarizado de extracción de compuestos bioactivos utilizando disolvente hidroalcohólico (32%), se puede emplear para obtener eficientemente extractos de hongos filamentosos con excelente rendimiento.
8. El extracto hidroalcohólico al 32% y el extracto acuoso (sobrenadante concentrado) de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* son extractos naturales con potencial de aplicación en la agricultura regenerativa para combatir enfermedades principalmente aquellas causadas por bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. De esta manera, se logra la eliminación o reducción del uso de agroquímicos en la agricultura, lo que puede contribuir a reducir la contaminación ambiental derivada de las actividades agrícolas.

VIII. ESTRATEGIA PARA LA OBTENCIÓN DE EXTRACTOS NATURALES DEL MOHO *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* CON POTENCIAL DE APLICACIÓN EN LA AGRICULTURA REGENERATIVA

Actualmente, en México se están enfrentando diversas problemáticas en la agricultura industrial, tradicional y urbana, debido al mal manejo y aplicación excesiva de agroquímicos para combatir la creciente proliferación de plagas y enfermedades, cada vez más difíciles de controlar debido a que rápidamente generan resistencia a los productos químicos, tales como los fertilizantes, insecticidas, fungicidas, pesticidas, entre otros. Esto causa alteraciones en el medio ambiente y en la inocuidad de las cadenas agroalimentarias, lo cual tiene implicaciones en la salud humana. La agricultura regenerativa propone eliminar o reducir la aplicación de agroquímicos mediante el uso de organismos antagonistas, como una alternativa sustentable para mitigar estas problemáticas en la productividad y calidad de los cultivos agrícolas. Éste es el caso del hongo *Trichoderma*, el cual se caracteriza por colonizar fácilmente ecosistemas acuáticos y terrestres, así como por su alta capacidad para degradar diversos compuestos orgánicos, debido a la producción de enzimas y metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana.

A partir de este panorama planteado, se propone una estrategia de innovación tecnológica que se refiere a la creación o mejora de un nuevo producto o servicio dirigido a los consumidores y productores principalmente, esta no solo atiende las modificaciones dentro de las tecnologías, sino también los cambios que se producen en muchos otros sectores importantes dentro de la estrategia, es decir, las actividades científicas, culturales, financieras y comerciales (Business School OBS, 2020). El objetivo de esta estrategia es que se puedan ofrecer nuevos productos y servicios en el mercado local, incluso nacional. Se propone una estrategia de innovación tecnológica que ayude principalmente a mitigar y controlar enfermedades microbianas en suelos agrícolas o en las partes aéreas de las plantas, de manera sustentable mediante la formulación, producción y aplicación de extractos naturales a base de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* con efecto antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. También se trata de contribuir con la degradación de compuestos orgánicos contaminantes de los suelos, así como incrementar y promover el crecimiento de las plantas cultivadas, para disminuir la contaminación ambiental y obtener cultivos agrícolas inocuos y de alta calidad para el consumo humano.

En la presente investigación, se analizaron los insumos necesarios para la producción de extractos hidroalcohólico y acuoso de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, evaluando sus propiedades antimicrobianas lo que da evidencia y sustento científico del potencial antibacteriano y uso como agente de control biológico, diferenciándolo de los productos comerciales agroquímicos que existen en el mercado sin regulación sanitaria provocando daños en los suelos agrícolas de México.

Es importante difundir los conocimientos y resultados obtenidos de la experimentación y análisis en laboratorio, a través de paquetes e innovaciones tecnológicas para el control de enfermedades bacterianas en suelos agrícolas, mediante el intercambio y trabajo coordinado de los diferentes actores involucrados en la estrategia para la producción, aplicación y comercialización de los extractos naturales de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*. A partir de esto se puede determinar y efectuar los principales actores involucrados en la estrategia se presentan en el Cuadro 19.

Cuadro 20. Actores de la estrategia para la producción de extractos naturales de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* con potencial de aplicación en la agricultura regenerativa.

Actores	Recursos	Actividad	Fines
Población de las localidades	-Conocimiento tradicional. -Voluntad y compromiso. -Organización.	-Manejo y cuidado. -Participación comunitaria. -Reducir el uso de agroquímicos.	-Uso sustentable de los cultivos y suelos. -Reducción de contaminación en suelos y mantos acuíferos. -Evitar enfermedades bacterianas en la población. -Difusión de información en la población sobre el uso excesivo de agroquímicos.
Responsables de la contaminación (agricultores y empresas)	-Organización. -Capital. -Investigación y coordinación. -Política pública.	-Manejo y cuidado de agroquímicos. -Participación colaborativa. -Pagar multas.	-Disminuir o eliminar la aplicación de agroquímicos. -Regulación de productos comerciales. -Responsabilidad de remediar y disminuir el impacto ambiental y los daños en la salud humana.

Cuadro 19, continuación. Actores de la estrategia para la producción de extractos naturales de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* con potencial de aplicación en la agricultura regenerativa.

Actores	Recursos	Actividad	Fines
Agricultores	-Tierras o suelos cultivables con o sin enfermedades bacterianas. -Mano de obra. -Conocimiento tradicional. -Organización. -Capital.	-Aplicación de bioinsumos (extractos naturales). -Manejo y cuidado de los cultivos.	-Suelos y cultivos sanos. -Productos agrícolas inocuos y de alta calidad. -Eliminación o reducción del empleo de insumos agroquímicos. -Ingresos. -Aprovechamiento sustentable de los recursos naturales. -Aprendizaje y uso de la tecnología por el productor.
Instituciones gubernamentales (CONAGUA, COFEPRIS, PROFEPA, SEMARNAT)	-Apoyo gubernamental. -Política pública. Investigación -Divulgación -Coordinación	-Impartir asesorías. -Realizar talleres y pláticas. -Prácticas de aplicación de bioinsumos e insumos agroquímicos.	-Brindar apoyo e información a los agricultores. -Contrarrestar la problemática de contaminación de suelos. -Establecer normas y reglamentos para fomentar el empleo de bioinsumos (extractos naturales).
Instituciones de investigación (Centros de investigación, universidades públicas o privadas)	-Investigación. -Divulgación. -Coordinación. -Equipos y reactivos para la producción de hongos <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> y extractos naturales.	-Impartir asesorías. -Realizar talleres, cursos y pláticas.	-Generación innovadora de tecnología. -Aprendizaje y uso de la tecnología por el agricultor o productor. -Mejorar producción e ingresos de agricultores.

A continuación, se enlistan y describen a detalle los principales actores implicados en la estrategia para la producción de extractos naturales de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* con potencial de aplicación en la agricultura regenerativa.

1. Población en general, personas afectadas directa o indirectamente por el uso de insumos agroquímicos, que causan contaminación en suelos y mantos acuíferos, incluso

enfermedades en la salud humana. Este sector tiene la responsabilidad de participar y estar conscientes de las acciones para remediar o minimizar esta problemática.

2. Responsables de la contaminación como los agricultores, personas en general y empresas que están involucradas en los problemas de contaminación por el exceso o mal uso de insumos agroquímicos, así como la falta de regulación de los productos comerciales que existen en el mercado para combatir las plagas y enfermedades presentes en los suelos. Se tienen la responsabilidad de remediar, eliminar o disminuir el impacto ambiental y los riesgos de salud provocados en la población.
3. Agricultores que tomen la decisión y estén interesados en la aplicación de bioinsumos sustentables para controlar las plagas y enfermedades presentes en sus cultivos agrícolas, mediante la aplicación de extractos naturales de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* con efecto antimicrobiano sin causar daños ambientales y ofrecer productos agrícolas inocuos y de alta calidad, logrando así la eliminación o minimización del empleo de insumos agroquímicos.
4. Instituciones gubernamentales como CONAGUA, COFEPRIS, PROFEPA y SEMARNAT que pueden brindar apoyo e información a la población y en especial a los agricultores agrícolas sobre el uso y aplicación correcta de insumos agroquímicos, para contrarrestar la problemática de contaminación de suelos y mantos acuíferos. Por otro lado, instituciones como la SADER y Ley General de Salud pueden establecer normas y reglamentos para fomentar el empleo de bioinsumos en la agricultura como los extractos naturales a base del hongo *T. aggressivum* f. *aggressivum* con propiedades antimicrobianas.
5. Instituciones de investigación como el Centro de Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales (CB-HCFM), el Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla, universidades y centros de investigación públicos y privados, para dar información sustentada científicamente, así como garantizar y apoyar en la obtención de la biomasa del hongo *T. aggressivum* f. *aggressivum* para generar y transferir de esta manera el paquete tecnológico necesario para la producción de extractos naturales de dicho hongo con aplicación antimicrobiana en la agricultura regenerativa.

6. Consumidor el cual podrá adquirir productos agrícolas de alta calidad e inocuos libre de agroquímicos y enfermedades bacterianas, por ende, sin efectos secundarios en la salud humana.

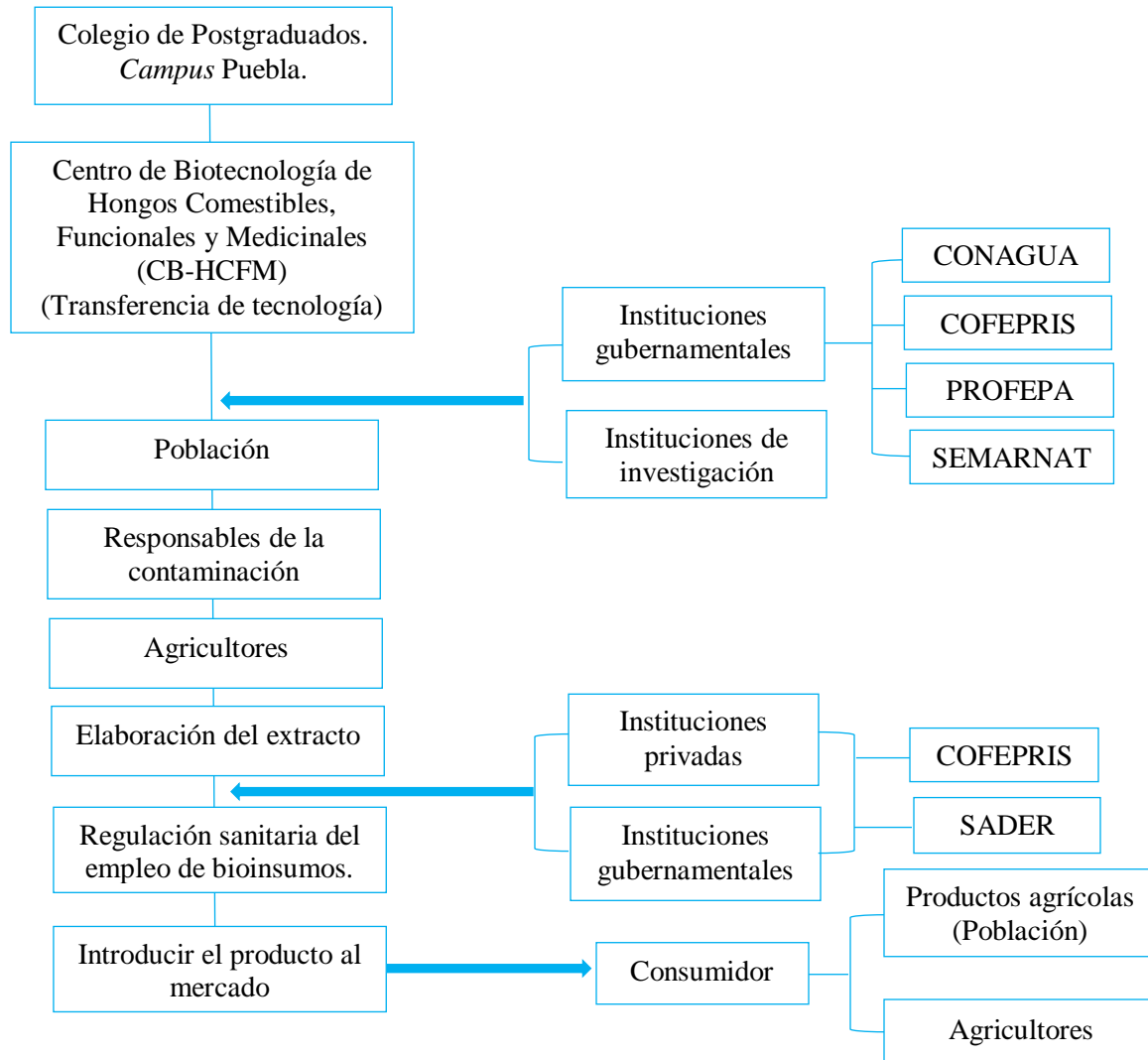


Figura 59. Actores de la estrategia para la producción de extractos naturales de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* con propiedades antimicrobianas y alto potencial de aplicación en la agricultura regenerativa.

La transferencia de tecnología de la aplicación de extractos naturales de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* es un modelo que puede aplicarse por parte de los agricultores a sus suelos agrícolas incluso sin tener problemas de plagas y enfermedades, ya que *Trichoderma* es un recurso genético con importante relevancia gracias a la producción de metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas.

Equipos requeridos para el procesamiento a partir de la cosecha de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*.

1 Báscula granataria

1 Frasco de vidrio de 250 mL (por muestra)

1 Matraz balón de 250 mL boca 24/40 (por muestra)

1 Matraz aforado 10 mL, dependiendo de la cantidad de muestra a concentrar

1 Embudo filtración rápida

1 papel filtro poro medio para el embudo de filtración (por muestra o solvente)

1 Rotavapor

1 Bomba de vacío

1 Trampa de vacío (para proteger la bomba de vacío)

1 Sistema de enfriamiento de agua para el serpentín del rotavapor o destilador

1 Campana de flujo

1 Filtro acrodisco hidrofílico de 0.20 μm

Obtención de la muestra

A partir del cultivo de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* en medio de cultivo líquido PDB, se obtiene la biomasa seca la cual es molida y acondicionada en un sobre de papel filtro poro convencional con 10 g, se usa un frasco de vidrio con tapón de rosca de 250 mL, al cual se le adicionan 150 mL de disolvente hidroalcohólico al 32%. Por otra parte, durante la cosecha de biomasa se obtiene el sobrenadante, el cual se filtra al vacío en diferentes tamaños de poro (14, 11 y 0.45 μm) y es acondicionado en frascos de vidrio con tapón de rosca de 1 L.

Obtención de extractos

El tiempo de maceración es de 24 horas en oscuridad y a temperatura ambiente. Al término de la maceración, los macerados se decantan y filtran por papel filtro poro convencional, el sobre de papel filtro se presiona con una prensa manual, hasta retirar por completo el exceso de líquido. Posteriormente el macerado hidroalcohólico al 32% y el macerado acuoso, se concentran por separado en un rotavapor a 40 °C y 90 rpm, hasta la obtención del extracto hidroalcohólico y extracto acuoso, con un volumen final de 7 mL. Se afora a 10 mL cada extracto y se esteriliza por microfiltración con un acrodisco hidrofílico Dismic-25 AS (Advantec) de 0.20 µm; los extractos son conservados a 4 °C para su caracterización fisicoquímica, control de esterilidad y cálculo de rendimiento por gravimetría, a partir del cual se realiza la evaluación de propiedades antimicrobianas. El envasado debe ser en frasco de vidrio color ámbar y tapa con sello que evite la evaporación del solvente. Estos extractos obtenidos requieren de nuevas investigaciones científicas, básicas y aplicadas, para demostrar estas propiedades *in situ* y puedan ser comercializados como extracto hidroalcohólico al 32% y extracto acuoso de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* para ser aplicados directamente o por aspersion en los cultivos agrícolas que presenten o no problemas de plagas y enfermedades bacterianas causadas por *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Para la comercialización y producción de estos extractos naturales es fundamental cumplir con las reglamentaciones y normas establecidas por las instituciones gubernamentales del país y de esta manera ofrecer al agricultor un bioinsumo a partir de un extracto natural con potencial de aplicación en la agricultura regenerativa, obteniendo productos de mayor calidad e inocuos libres de agroquímicos.

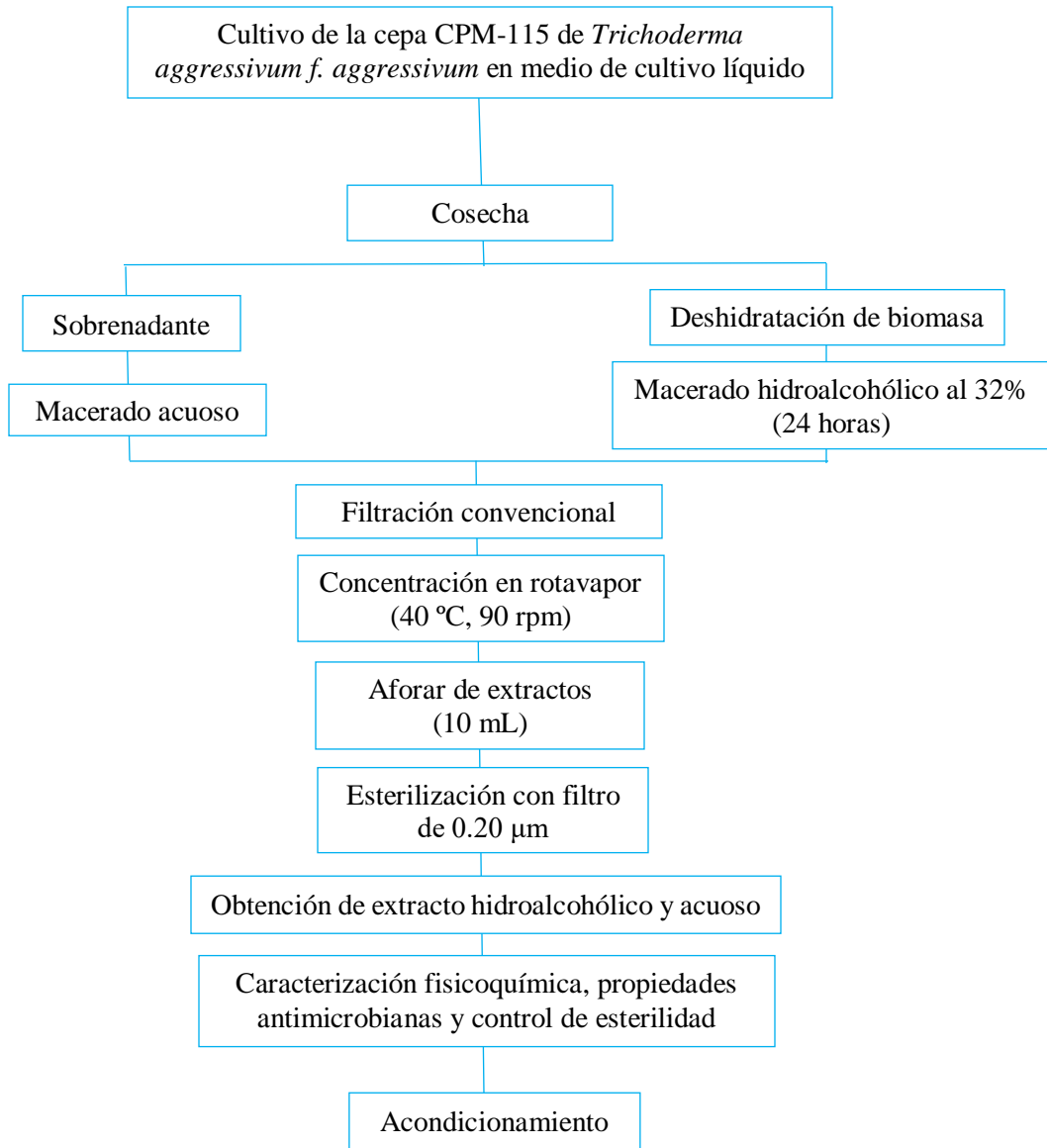


Figura 60. Metodología para la obtención de extractos naturales de *Trichoderma aggressivum f. aggressivum*.

IX. LITERATURA CITADA

- Adebayo, E. A., D. Martínez-Carrera, P. Morales, M. Sobal, H. Escudero, M. E. Meneses, A. Avila-Nava, I. Castillo y M. Bonilla. 2018. Comparative study of antioxidant and antibacterial properties of the edible mushrooms *Pleurotus levis*, *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, and *P. tuber-regium*. *International Journal of Food Science and Technology* 53(5): 1316-1330. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13712>
- Andrade, R., W. A. Ayer y P. P. Mebe. 1992. The metabolites of *Trichoderma longibrachiatum*. Part 1. Isolation of the metabolites and the structure of trichodimerol. *Canadian Journal of Chemistry* 70(10): 2526-2535.
- Arenas, O., R. M. H. Lara, M. A. Huato, F. D. Hernández y D. A. Victoria. 2009. Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *Revista Colombiana de Biotecnología XI* (2): 143-151.
- Argumedo-Delira, R., A. Alarcón, R. Ferrera-Cerrato y J. J. Peña-Cabriales. 2009. El género fúngico *Trichoderma* y su relación con los contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 25(4): 257-269.
- Asociación de Index Fungorum. (2021). *Index Fungorum*. Obtenido de Index Fungorum: <http://www.indexfungorum.org/names/names.asp>
- Ayala, A. T. 2010. Aislamiento, caracterización y análisis funcional del gen Tbtri5 de *Trichoderma brevicompactum*. España: Universidad de Salamanca. Departamento de microbiología y genética.
- Bae, S. J., T. K. Mohanta, J. Y. Chung, M. Ryu, G. Park, S. Shim, H. Seung-Beom, H. Seo, B. Dong-Won, I. Bae, K. Jong-Joo y H. Bae. 2016. *Trichoderma* metabolites as biological control agents against Phytophthora pathogens. *Biological Control* 92: 128-138.
- Berdonces, J. L. 2019. Enciclopedia de fitoterapia y plantas medicinales. España: RBA Integral.
- Bisang, R., M. Campi y V. Cesa. 2009. *Biotecnología y desarrollo*. Naciones Unidas : Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL).
- Brandenberg, O., Z. Dhlamini, A. Sensi, K. Ghosh, y A. Sonnino. 2011. *Biosafety Resource Book*. Roma, Italia : Food and Agriculture Organization of the United Nations .
- Business School OBS. 2020. *OBS Business School* . Obtenido de OBS Business School: <https://obsbusiness.school/int/blog-investigacion/sistemas/innovacion-tecnologica-tipos-y-caracteristicas-principales>

- Carrasco, A. P. 2010. Recursos genéticos de los "Hongos del Maguey" (*Pleurotus* sp.) de la región central de México: caracterización y selección de genotipos con potencial para la producción rural. Tesis de Doctorado en Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional. Colegio de Postgraduados, *Campus Puebla*. Pp. 21-24.
- Casar, M. L. 2021. Agricultura regenerativa: aliada para un futuro sostenible. *Revista de Investigaciones Agropecuarias (RIA)* 47(2): 155-158.
- Celis, Á., C. Mendoza, M. Pachón, J. Cardona, W. Delgado y L. E. Cuca. 2008. Plant extracts used as biocontrol with emphasis on Piperaceae family. A review. *Agronomía Colombiana* 26(1): 97-106.
- Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria. 2020. *Manejo integrado de plagas, una alternativa ante el uso de los plaguicidas*. México.
- Cumagun, C. J. 2014. Advances in Formulation of *Trichoderma* of Biocontrol. V. G. Gupta, M. Schmoll, A. Herrera-Estrella, R. Upadhyay, I. Druzhinina y M. Tuohy. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Pp. 527-531. Ámsterdam: ELSEVIER.
- DATABio. 2021. *Fichas de agentes biológicos-DATABio*. Obtenido de: <https://www.insst.es/documents/94886/353495/Pseudomonasaeruginosa2017.pdf/>
- Emeterio, J. P., T. E. Lara, G. Q. Andrés. 2002. Características generales de los hongos. Estructura, clasificación y reproducción. En J. L. Ureña, *Microbiología oral*. Pp. 221-229. España: McGraw-Hill Interamericana de España.
- Garibay, M. G., Ramírez, R. Q., y Canales, A. L. M. 2004. *Biotecnología alimentaria*. México: Editorial Limusa.
- Gómez, L. P., y Martínez, A. A. 2008. Investigación en biotecnología y generación de patentes de interés sanitario. *Medicina clínica*, 131(5), 55-59.
- Harman, G. E. y C. P. Kubicek. 2014. *Trichoderma and Gliocladium. Basic Biology, Taxonomy and Genetics* (1). London: CRC Press.
- Haro, J. A., G. Nubes y J. R. Ortiz. 2012. Riesgos sanitarios en calidad bacteriológica del agua. Una evaluación en diez estados de la república mexicana. *Región y Sociedad* (3): 257-288.
- Hatvani, L., Z. Antal, L. Manczinger, A. Szekeres, I. S. Druzhinina. C. P. Kubicek. L. Kredics. 2007. Green molds diseases of *Agaricus* and *Pleurotus* spp. are caused by related but phylogenetically different *Trichoderma* species. *Phytopathology*, 97(4): 532-537.

- Hayer, K., M. Stratford y D. B. Archer. 2014. Germination of *Aspergillus niger* conidia is triggered by nitrogen compounds related to L-Amino Acids. *American Society for Microbiology*, Pp. 6046-6053.
- Hernández, Ó. Z. 2018. Los hongos microscópicos ¿Amigos o enemigos? Madrid: Catarata.
- Hofstätter, B. D., A. O. Fonseca, F. D. Filho, J. D. Silveira, B. M. Persici, L. Pötter y D. I. Pereira. 2016. Effect of *Paecilomyces lilacinus*, *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma virens* fungal extracts on the hatchability of *Ancylostoma* eggs. *Revista Iberoamericana de Micología*, 28-31.
- Jacinto, M. R., C. R. Ulloa y J. L. Orbegoso. 2009. Contaminación fecal en hortalizas que se expenden en mercados de la ciudad de Cajamarca, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 26(1): 45-48.
- Juniors. E., V. Camacho, P. Ocampo, M. Monroy y G. Sepúlveda. 2020. Tolerance to oxidative stress caused by copper (Cu) in *Trichoderma asperellum* To. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 29, 101783.
- Keswani, C., S. Mishra, B. K. Sarma, S. Pratap y H. B. Singh. 2014. Unraveling the efficient application of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. *Applied Microbiology Biotechnology*, 533-544.
- Komón-Zelazowka, M., J. Bissett, D. Zafari, L. Hatvani, L. Manczinger, S. Woo y I. S. Druzhinina. 2007. Genetically closely related but phenotypically divergent *Trichoderma* species cause green mold disease in oyster Mushroom farms worldwide. *American Society for Microbiology* 73(22), 7415-7426.
- Kumar, S., M. Thakur y A. Rani. 2014. *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* 9(53): 3838-3852.
- Lal, R. 2021. *Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura IICA*. Obtenido de Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura IICA: <https://iica.int/es/prensa/noticias/agricultura-regenerativa-es-posible-producir-alimentos-y-contribuir-la-salud-del>
- Leelavathi, M. S., L. Vani y P. Reena. 2014. Antimicrobial activity of *Trichoderma harzianum* against bacteria and fungi. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3: 96-103.

- León, S. G. y T. Mier. 2010. Visión general de la producción y aplicación de bioplaguicidas en México. *Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente* 10(20): 37-63.
- Li, H., R. Toh, Y. Wei, Y. Wang, J. Hu, S. An y M. D. Denton. 2022. Microbiomes across root compartments are shaped by inoculation with a fungal biological control agent. *Applied Soil Ecology* 170, 104230.
- Lotz, G. 2013. Aplicación de extractos vegetales. S. Schwartzman y M. I. Cestilli. Dermatocosmética. *Criterios de formulación: Enfoque estético y terapéutico*. Córdoba: Editorial Universidad Católica de Córdoba.
- Martínez, B., D. Infante y Y. Reyes. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal* 28(1): 1-11.
- Martínez-Carrera, D., B. Pérez-Armendáriz, Y. Mayett, M. Sobal, P. Morales, P. Ramírez y I. Tello. 2014. Propiedades funcionales agregadas al tequila, otros mezcales y destilados de Agave convencionales, derivadas del extracto de un hongo comestible de uso tradicional en México (*Lentinula boryana*). COLPOS) IMPI-MX/ 009/042387.
- Melchor, D. J., R. F. Cerrato y A. Alarcón. 2019. *Trichoderma*: Importancia agrícola, biotecnológica y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean journal of agricultural and animal sciences* 35(1): 98-112.
- Melchor, O. Y. y E. N. Marmolejo. 2017. Inocuidad en Granos. *Inocuidad y Trazabilidad en los alimentos mexicanos*. Pp. 187-204. México: CIATEJ.
- Michel-Aceves, A. C., M.A. Otero-Sánchez, R. D. Martínez-Rojero, N. L. Rodríguez-Morán, R. Ariza-Flores y A. Barrios-Ayala. 2008. Producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en diferentes sustratos orgánicos. *Revista Chapingo. Serie Horticultura* 14(2): 185-191.
- Muñoz, E. 2001. *Biotecnología y sociedad: Encuentros y desencuentros. Volumen 1 de Ciencia, Tecnología, Sociedad e Innovación*. Madrid. Ediciones AKAL.
- Naranjo, A. B. 2021. *Gobierno de México*. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. Obtenido de: <https://www.gob.mx/imta/es/articulos/agua-suelo-y-agricultura-regenerativa>
- Olivas, A. L., J.L. Salinas, Ó. R. Villa, H. M. Flores, C. R. Ayala, R. A. Ramírez, y M. A. Peña. 2013. Calidad microbiológica del agua obtenida por condensación de la atmósfera en Tlaxcala, Hidalgo y Ciudad de México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 29(2): 167-175.

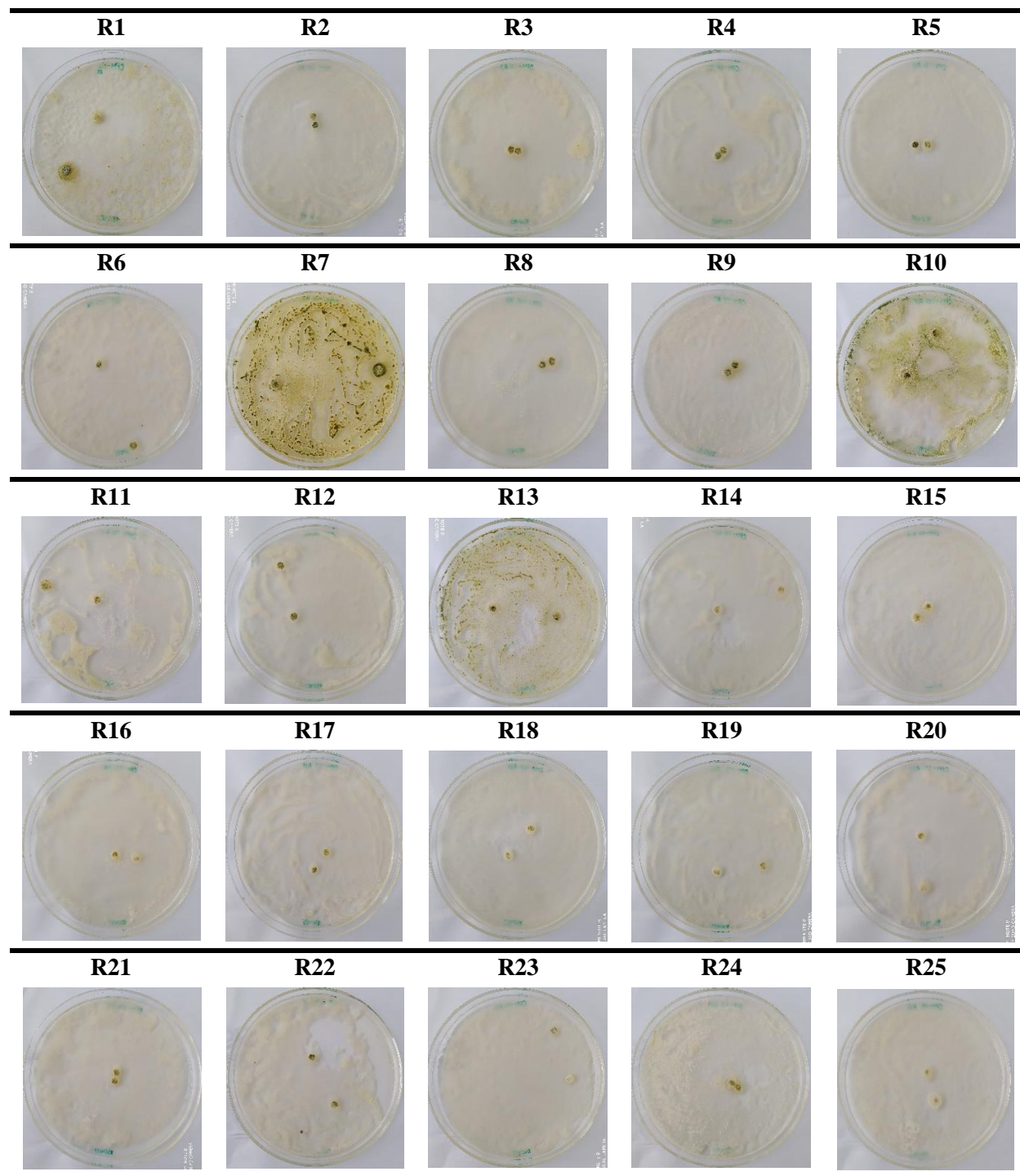
- Pérez-García, A., D. Romero y A. D. Vicente. 2011. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacillus* in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology* 22(2): 187-193.
- Plant Health Care de México. 2021. *PLANT HEALTH CARE MÉXICO*. Obtenido de: <http://www.phcmexico.com.mx/phclanzamiento.html>
- Quintanar, C. K. 2013. Propiedades antifúngicas diferenciadas de extractos vegetales como estrategia potencial para la prevención, manejo y control del "moho verde" (*Trichoderma* spp.) en el cultivo de los hongos comestibles (*Lentinula*, *Pleurotus*). Tesis de Doctorado en Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional. Colegio de Postgraduados, Campus Puebla.
- Royal Horticultural Society. 2015. *RHS Colour Chart* (Sexta edición ed.). Londres, Reino Unido: RHS Media.
- Samuels, G. J., A. Ismaiel, M. C. Bon, S. D. Respinis y O. Petrini. 2010. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. *Mycology* 102(4): 944-966.
- Samuels, G. J., L. Sarah L, W. G. Dodd, L. A. Castlebury y O. Petrini. 2002. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycology* 94(1): 146-170.
- Sánchez, A. D., M. D. Ramírez y M. D. Cruz. 2017. *Bacillus cereus*: Food, health and biotechnology. *Agroproductividad* 10(10): 3-9.
- Santos, A., M. García, A. M. Cotes y L. Villamizar. 2012. Efecto de la formulación sobre la vida útil de bioplaguicidas a base de los aislamientos colombianos de *Trichoderma Koningiopsis* Th003 y *Trichoderma asperellum* Th034. *Revista Iberoamericana de Micología* 29(3): 150-156.
- Santos, E. V. 2000. Extracción de materias primas vegetales. N. Sharapin, *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*: 27-60. Colombia: Convenio Andrés Bello.
- Saravanakumar, K., R. Chelliah, S. R. Ramakrishnan, K. Kathiresan, D. H. Oh y M. H. Wang. 2018. Antibacterial and antioxidant potentials of non-cytotoxic extract of *Trichoderma atroviride*. *Microbial Pathogenesis* 115, 338-342.
- Schuster, A. y M. Schmoll. 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol* 87, 787-799.

- Sun, J., Y. Pei, W. L. Erwei Li, K. D. Hyde, W. B. Yin y X. Liu. 2016. A new species of *Trichoderma hypoxylon* harbours abundant secondary metabolites. *Scientific Reports* 6, (37369).
- Tchameni, S. N., M. Cotarlet, I. O. Ghinea, B. M. Bendine, M. L. Sameza, D. Borda y R. M. Dinica. 2020. Involvement of lytic enzymes and secondary metabolites produced by *Trichoderma* spp. in the biological control of *Pythium myriotylum*. *International Microbiology*, 179-188.
- Villarreal-Delgado, M. F., E. D. Villa-Rodríguez, L. A. Cira-Chávez y M. I. Estrada-Alvarado. 2018. The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implication in the agricultural biosecurity. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1): 95-130.
- Vinale, F., K. Sivasithamparam, E. L. Ghisalberti, R. Marra, S. L. Woo y M. Lorito. 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 1-10.
- Vrska, I. P. 2019. Regenerative agriculture and the problem of sustainability. Contributions for a discussion. *Textual. Economics and public policies* 74, 51-85.
- Xiao-Yan, S., S. Qing-Tao, X. Shu-Tao, C. Xiu-Lan, S. Cai-Yun y Z. Yu-Zhong. 2006. Broad-spectrum antimicrobial activity and high stability of Trichokonins form *Trichoderma koningii* SMF2 against plant pathogens. *FEMS Microbiology Letters* 26(1): 119-125.

X. ANEXOS

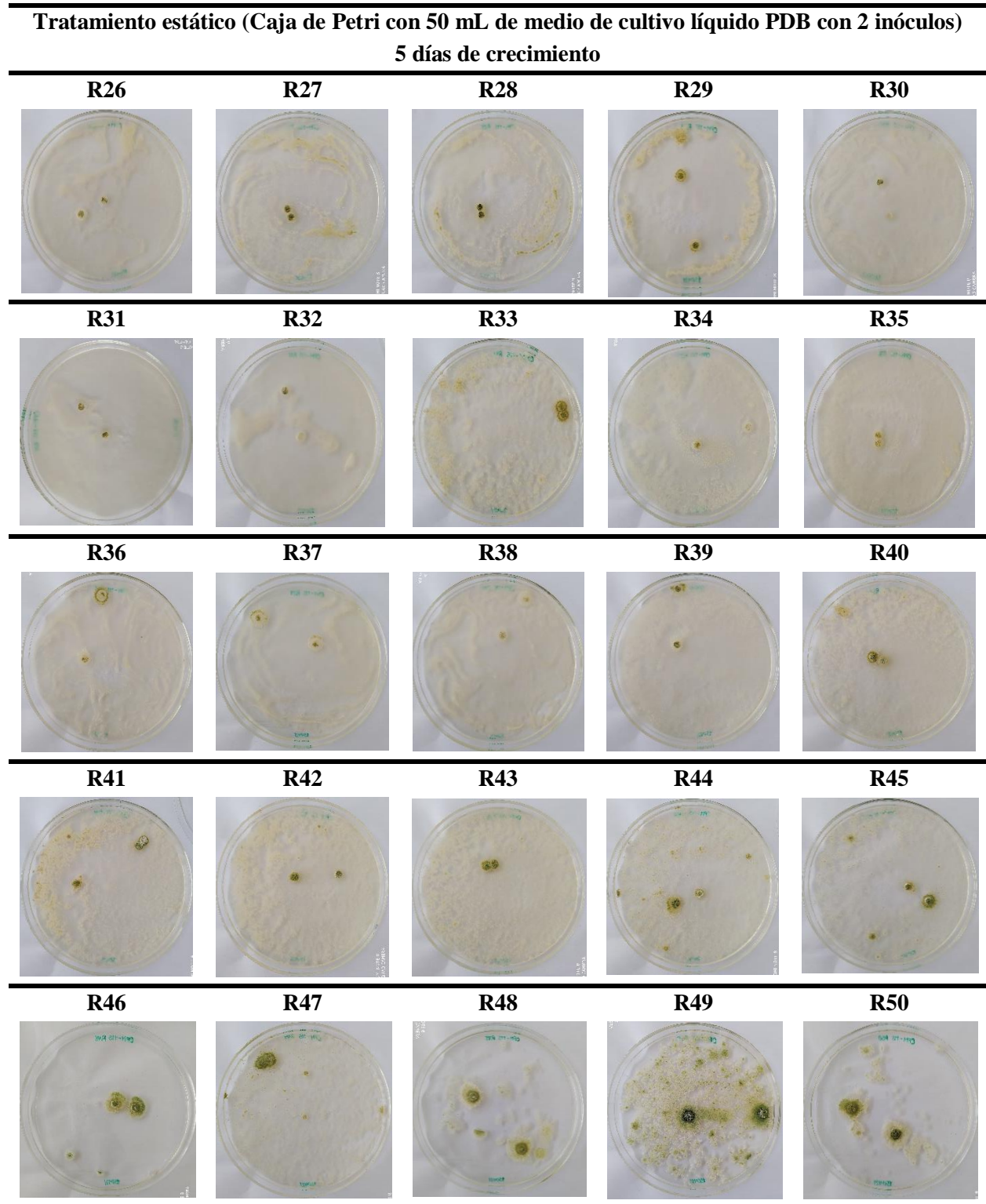
10.1 Anexo A

Cuadro A1. Morfología macroscópica de la biomasa de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* del día 5 de incubación, de la réplica 1 a la réplica 25 (R1-R25, n=50).



PDB= Medio de cultivo líquido Caldo de Papa Dextrosa. R= Réplica.

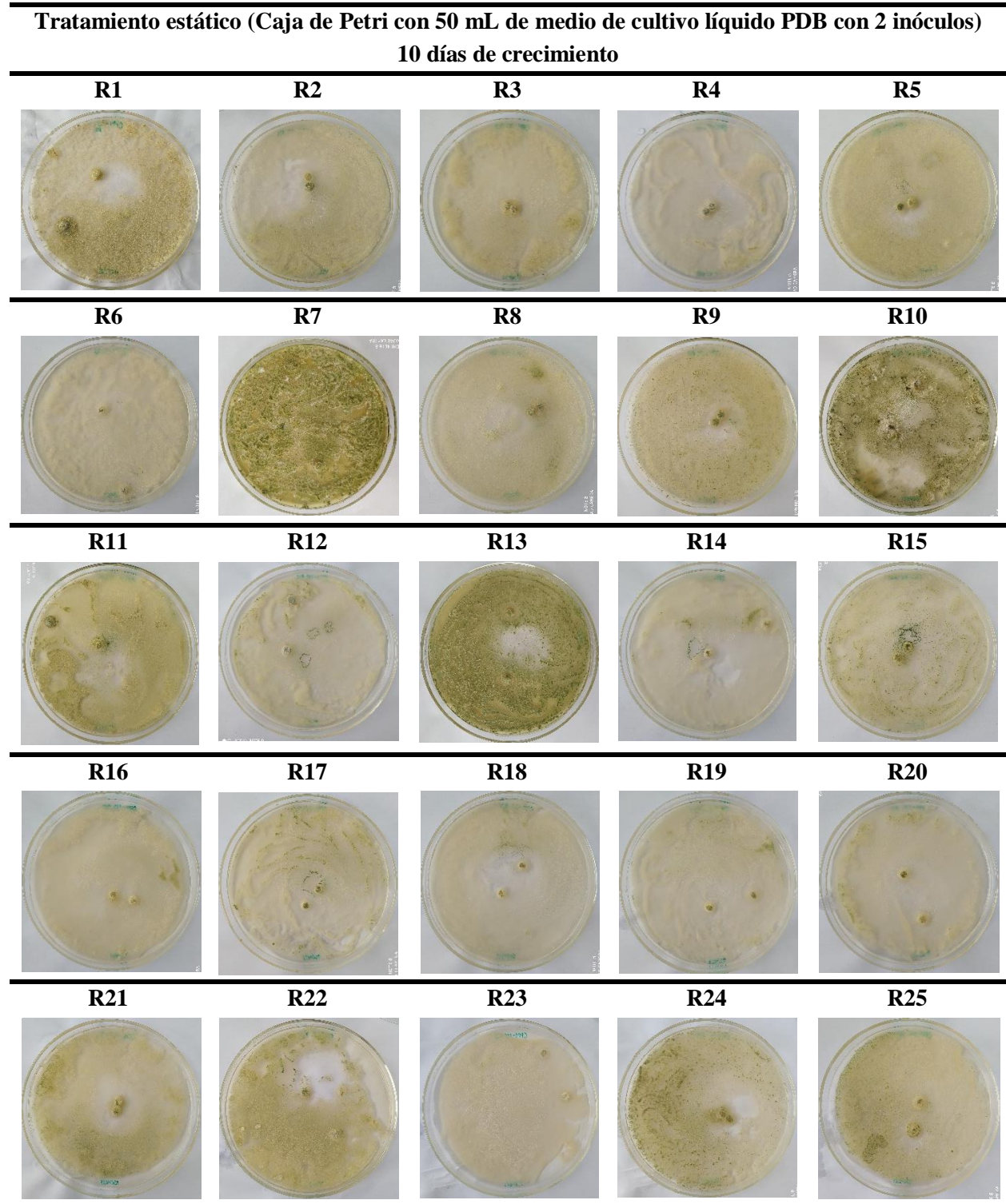
Cuadro A2. Morfología macroscópica de la biomasa de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* del día 5 de incubación, de la réplica 26 a la réplica 50 (R26-R50, n=50).



PDB= Medio de cultivo líquido Caldo de Papa Dextrosa. R= Réplica.

10.2 Anexo B

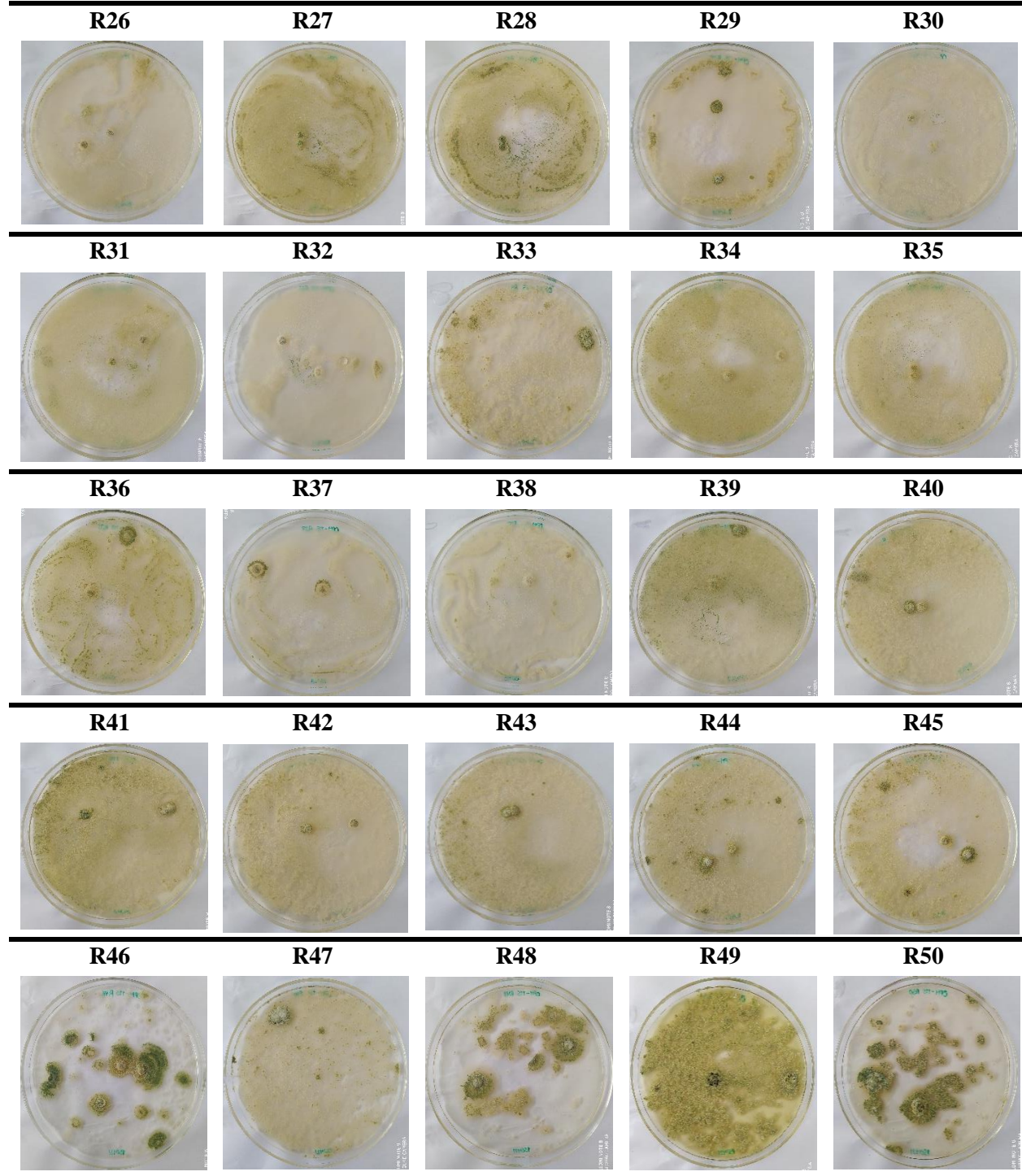
Cuadro B1. Morfología macroscópica de la biomasa de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* del día 10 de incubación, de la réplica 1 a la réplica 25 (R1-R25, n=50).



PDB= Medio de cultivo líquido Caldo de Papa Dextrosa. R= Réplica.

Cuadro B2. Morfología macroscópica de la biomasa de la cepa CPM-115 de *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* del día 10 de incubación, de la réplica 26 a la réplica 50 (R26-R50, n=50).

**Tratamiento estático (Caja de Petri con 50 mL de medio de cultivo líquido PDB con 2 inóculos)
10 días de crecimiento**



PDB= Medio de cultivo líquido Caldo de Papa Dextrosa. R= Réplica.