



MICOL. NEOTROP. APL. 2: 3-17, 1989.

PRODUCCION, CONSERVACION Y VIABILIDAD DE INOCULO DE HONGOS FILAMENTOSOS PARA LAS FERMENTACIONES SOLIDAS

S. ROUSSOS (1), M.A. AQUIAHUATL (2), M.A. BRIZUELA (3), A. OLMOS (2), W. RODRIGUEZ (2) y G. VINIEGRA (2)

- (1) Institut Francais de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM), 213 Rue Lafayette, 75010 Paris, Francia.
- (2) Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-1), Apartado Postal 55-535, Iztapalapa, 09340 México, D.F.
- (3) Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), Vía Blanca y Carretera Central 804, San Miguel del Padron, Zona Postal 10, La Habana, Cuba.

PRODUCTION, CONSERVATION AND VIABILITY OF FILAMENTOUS FUNGI INOCULUM FOR SOLID SUBSTRATE FERMENTATIONS

SUMMARY

The study of the sporulation physiology with regard to the quantitative production of conidiospores, allowed to define the environmental conditions and to optimize the media composition to produce conidiospores of Aspergillus niger, A. terreus and Trichoderma harzianum in bulk. The pilot plant scale production of conidiospores of these fungi was carried out by two new methods: 1) conidiospore production with disk fermenters and 2) conidiospore production on a support. In disk fermenters, optimal production of conidiospores was obtained after 7 days of incubation for A. terreus and T. harzianum, yielding a particularly high sporulation of  $3.5 \times 10^{10}$  conidiospores per gram of substrate. In a column type reactor, spore production of A. niger and T. harzianum on a support was studied, reaching yields up to  $1.1 \times 10^{10}$  spores per gram of substrate. Conidiospore conservation was carried out by refrigeration (4°C), freezing (-4°C) and drying (40°C). Best results were obtained by conidiospore refrigeration. The kinetics of viability of refrigerated conidiospores of A. niger, A. terreus and T. harzianum showed the possibility of a reliable utilization of these strains with a 90% viability, even after two months of harvesting.

RESUMEN

14 SEP. 1994

O.R.S.T.O.M. Fonds Documentaire

N°: 40 202 ex. 1

Cnte: B

El estudio de la fisiología de la esporulación, en relación con la producción cuantitativa de conidiosporas, permitió definir las condi-

ciones medio ambientales y optimizar la composición de los medios de cultivo para la producción masiva de conidiosporas de Aspergillus niger, A. terreus y Trichoderma harzianum. La producción de conidiosporas de A. niger, A. terreus y T. harzianum a nivel de planta piloto, se realizó por medio de dos nuevos procedimientos: 1) producción de conidiosporas en un fermentador de discos y 2) producción de conidiosporas sobre soporte. En el fermentador de discos, la producción óptima de conidiosporas se obtuvo después de 7 días de incubación para A. terreus y T. harzianum, con un rendimiento de esporulación particularmente elevado de  $3.5 \times 10^{10}$  conidiosporas por gramo de sustrato. En el fermentador de tipo columna, se estudió la producción de esporas sobre soporte por A. niger y T. harzianum. Los rendimientos de esporulación fueron también elevados, con  $1.1 \times 10^{10}$  conidiosporas producidas. La conservación de conidiosporas se realizó por refrigeración ( $4^{\circ}\text{C}$ ), congelación ( $-4^{\circ}\text{C}$ ) y secado en rotavapor ( $40^{\circ}\text{C}$ ). Los mejores resultados de conservación, se obtuvieron en las conidiosporas refrigeradas. Las cinéticas de viabilidad de conidiosporas de A. niger, A. terreus y T. harzianum conservadas en refrigeración, muestran que es posible la utilización confiable de éstas cepas con un 90% de viabilidad, aún después de 2 meses de su cosecha.

## INTRODUCCION

En nuestros laboratorios tres hongos filamentosos, a saber: Aspergillus niger, A. terreus y Trichoderma harzianum, se utilizan con más frecuencia para las fermentaciones en medio sólido, utilizando como sustrato o soporte el bagazo de caña de azúcar, con el objetivo de producir biomasa o enzimas.

La producción de conidiosporas de A. niger, A. terreus y T. harzianum, se lleva a cabo durante la conidiogénesis, etapa fisiológica importante de reproducción asexual para estos hongos imperfectos. Varios factores físico-químicos, ambientales y nutricionales influyen sobre la producción cuantitativa de las conidiosporas; tales como fuentes de carbono y nitrógeno (Martinelli, 1976; Vezina et al., 1965; Roussos, 1985), concentración de sales minerales y oligoelementos (Jerebzooff et al., 1976; Gindrat, 1977), humedad y aereación de los cultivos (Maheva et al., 1984; Roussos, 1985; Roussos y Olmos, 1987).

Se conocen diferentes técnicas para la producción de conidiosporas a nivel de planta piloto o industrial. Las más antiguas se refieren al uso de botellas de Roux o de charolas (Vezina y Sing, 1975). En los últimos 10 años, se propusieron varios procesos nuevos en fermentadores líquidos (Broderick y Greenshields, 1982), en fermentadores de discos (Raimbault y Roussos, 1985) y sobre soporte (Roussos y Olmos, 1987).

La conservación de conidiosporas de hongos filamentosos para cepas de colección a nivel de laboratorio, se lleva a cabo mediante congelación ( $-18^{\circ}\text{C}$  o  $-196^{\circ}\text{C}$  en nitrógeno líquido) y secado en suelo

estéril o liofilización (Butler, 1980; Tommerup y Kidby, 1979; Dahmen *et al.*, 1983). Estas técnicas de conservación, se utilizan con éxito para mantener pequeñas cantidades de conidiosporas, pero el elevado costo del equipo y funcionamiento, las hacen de uso limitado para escalas mayores.

En este trabajo, se presenta una síntesis de los estudios realizados sobre la optimización de tres cepas de hongos filamentosos (*A. niger*, *A. terreus* y *T. harzianum*). A continuación se presenta el efecto de los principales factores que influyen en la esporulación de éstas cepas. Asimismo, se desarrollan dos nuevos procesos de producción masiva de conidiosporas en un fermentador de discos y sobre soporte. Para la conservación de éstas conidiosporas se utilizaron diferentes técnicas estudiando su viabilidad en cada caso.

## MATERIALES Y METODOS

### Microorganismos

Se estudiaron en este trabajo *Aspergillus niger* van Tieghem, cepa ORSTOM-10 (Raimbault, 1980); *A. terreus* Thom, cepa del ICIDCA (Roussel *et al.*, 1987) y la cepa CCMF-470 (CCM= Czechoslovak Collection of Microorganisms) de *Trichoderma harzianum* Rifai ampliamente descrita por Roussos (1985).

### Medios de cultivo y de esporulación

Las cepas se resembraron cada 6 meses en papa dextrosa agar (PDA) y se incubaron a 29 °C durante 7 días, para posteriormente conservarlas en refrigeración (4 °C) durante mas o menos 6 meses.

### Producción de esporas en matraces

Se colocaron 20 g de medio de cultivo con diferentes concentraciones de fuentes de carbono, en matraces de 250 ml, los cuales se esterilizaron a 110 °C durante 30 minutos. La composición del medio de cultivo puede observarse en la Tabla 1. Las fuentes de carbono estudiadas fueron glucosa, sacarosa, celulosa, harina de yuca y melaza. Los medios de cultivo esterilizados, todavía líquidos, se inocularon en masa con  $1 \times 10^6$  esporas/matraz y se incubaron durante una semana a varias temperaturas (29 °C para *T. harzianum*, 35 °C para *A. niger*; 30 °C para *A. terreus*). Posteriormente, se agregaron 100 ml de agua con Tween 80 y se contaron las esporas con una cámara de Malassez. El índice de esporulación (Ie) se determinó como el número de esporas producidas por gramo de fuente de carbono inicial.

### Producción de esporas en un fermentador de discos

El fermentador de discos rotatorios (Fig. 1), así como su funcionamiento, se han descrito ampliamente por Raimbault y Roussos (1985). Este fermentador conteniendo 600 ml de medio de cultivo, se esteriliza en un autoclave a 110 °C durante 40 min y se inocula en masa con  $3 \times 10^7$  conidiosporas/g de substrato carbonado, cuando la temperatura del medio llega a mas o menos 45 °C; posteriormente se homogeniza mediante agitación mecánica. Pasado el tiempo de incubación de 7 días, se cosechan las conidiosporas agregando al fermentador de

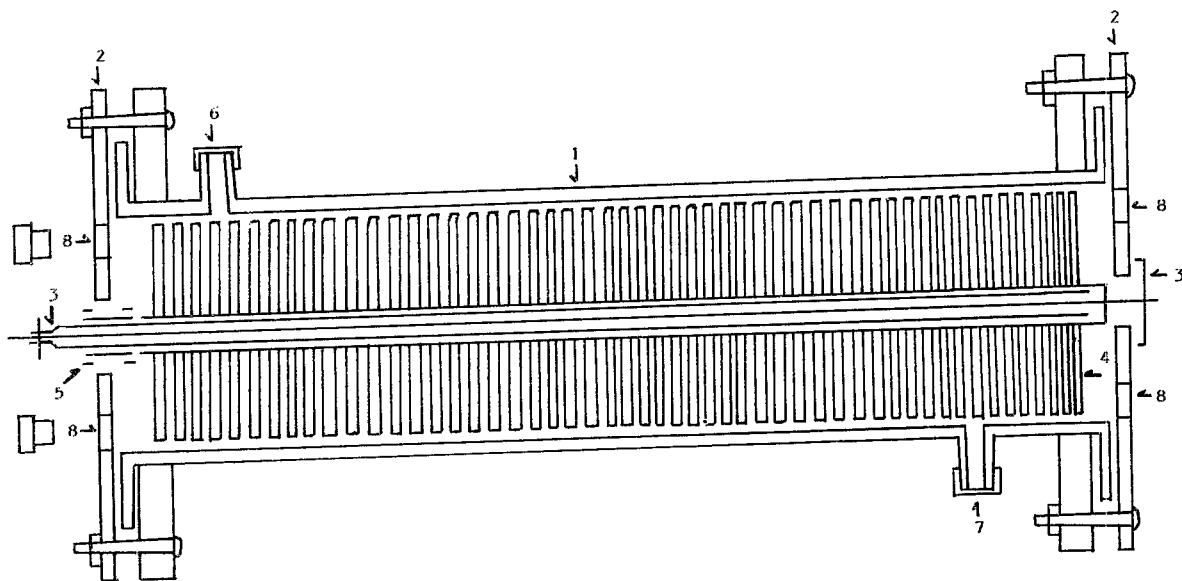


Fig. 1. Esquema detallado del fermentador de discos rotatorios. 1: columna, 2: platina, 3: eje, 4: discos, 5: soporte del eje, 6: entrada alta de la columna, 7: salida baja de la columna, 8: entradas y salidas fijas.

Tabla 1. Composición del medio de cultivo utilizado para la selección de la fuente de carbono mas adecuada, el cual se ajustó a un pH de 5.6.

SUBSTANCIA	CANTIDAD
Fuente de carbono*	4.00 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.16 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.32 g
Urea	0.08 g
Agar	15.00 g
Agua	1000 ml

\* Fuente de carbono: glucosa, sacarosa, celulosa, yuca, melaza.

discos 2 l de agua estéril adicionada con Tween 80 (0.1%) y agitándolo durante 10 min.

#### Producción de esporas sobre soporte

Se utilizó una mezcla de bagazo de caña de azúcar (70 g) como soporte y harina de yuca (30 g) como fuente de carbono. A dicha mezcla, se le agregó una solución de sales [ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.5 g;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 3 g; Urea 0.75 g y  $\text{CaCl}_2$ , 2 g], con la cual se ajustó la humedad de la mezcla al 50%. Después de homogenizarla, se esterilizó en un autoclave a  $110^\circ\text{C}$  durante 30 min. El medio de cultivo así preparado se inoculó con  $3 \times 10^7$  conidiosporas/g de substrato en peso seco. 14 g del medio inoculado se repartieron en cada fermentador de tipo columna, los cuales se colocaron en baño maría ( $29^\circ\text{C}$  para *T. harzianum*,  $30^\circ\text{C}$  para *A. terreus* y  $35^\circ\text{C}$  para *A. niger*) para llevar a cabo la fermentación y los estudios de cinéticas de producción de conidiosporas, mediante los dispositivos descritos por Raimbault y Alazard (1980).

#### Métodos de conservación

La suspensión de conidiosporas cosechada de un fermentador de discos, se filtró con gasa estéril y se separó en tres lotes. El primer lote se distribuyó en botellas o matraces previamente esterilizados, los cuales se mantuvieron en refrigeración ( $4^\circ\text{C}$ ); el segundo lote se distribuyó igual que el primero, pero manteniéndose en congelación ( $-4^\circ\text{C}$ ); mientras que el tercer lote se procedió a secarlo en un rotavapor a diferentes temperaturas ( $30, 40, 50$  y  $60^\circ\text{C}$ ), sin soporte y con soporte (1.5 g de bagazo estéril por 100 ml de una suspensión de conidiosporas). Como testigo se utilizó la suspensión inicial de conidiosporas sin tratamiento, la cual se tomó como referencia para el cálculo del porcentaje de germinación y viabilidad de las mismas (Roussos et al., 1985).

#### Evaluación de la viabilidad

La viabilidad de las conidiosporas mantenidas en conservación, se evaluó mediante la enumeración (cuenta indirecta) de las colonias de

A. terreus y T. harzianum, que aparecen sobre el medio de Douglas et al., (1979), después de sembrar 0.2 ml de diluciones sucesivas de la suspensión original e incubándolas a 29°C, durante 2 a 4 días. Al evaluar la viabilidad, se realizaron también conteos directos de esporas en cámara de Malassez. El porcentaje de viabilidad, se determinó mediante la relación del número de esporas viables determinadas al tiempo del muestreo, con respecto de aquellas determinadas al inicio del período de conservación.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Se ha demostrado que la manera de inoculación de los medios de cultivo (en la superficie o en la masa del medio), tiene influencia sobre la producción de conidiosporas de Trichoderma harzianum (Roussos, 1985). En este trabajo, se inocularon los medios en la masa y se estudió la producción de conidiosporas en matraces, en fermentador de discos y sobre soportes. También se estudiaron los principales factores (fuente de carbono, relación carbono/nitrógeno y tiempo de incubación) que influyen sobre la conidiogénesis de Aspergillus terreus y T. harzianum, así como los métodos de conservación de esporas.

### Producción de esporas en matraces

Varios autores han demostrado la importancia de la fuente de carbono sobre la conidiogénesis de hongos filamentosos (Vezina et al., 1965; Martinelli, 1976). En la Tabla 2, puede observarse que los mejores índices de esporulación (Ie) de A. terreus se obtuvieron con harina de yuca o con melaza, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Raimbault (1980) para A. niger y por Roussos (1985) para T. harzianum.

El efecto de la concentración de la fuente de carbono sobre el Ie, de A. terreus y T. harzianum, se presenta en la Tabla 3. Las altas concentraciones de sustrato (superiores a 20 g/l) en los medios de cultivo, ejercieron una inhibición de la esporulación en ambas especies. Aunque no se observó el mismo efecto para A. niger,

Tabla 2. Índice de esporulación (Ie x 10<sup>3</sup>) y producción de conidiosporas de Aspergillus terreus en matraces, utilizando diferentes fuentes de carbono.

Índice de esporulación	Fuente de Carbono				
	Glucosa	Sacarosa	Melaza	Yuca	Celulosa
Ie x 10 <sup>3</sup>	20.5	14.1	41.6	46.7	27.40

Tabla 3. Efecto de la concentración del sustrato sobre el índice de esporulación (Ie) de Aspergillus terreus y Trichoderma harzianum.

Concentración del sustrato* (g/l)	<u>A. terreus</u>	<u>T. harzianum</u>
	Ie x 10 <sup>9</sup>	Ie x 10 <sup>9</sup>
1	1.95	26.66
5	9.95	13.01
10	14.20	16.20
20	10.80	4.62
25	8.32	5.95
40	0.76	9.12
50	0.73	8.24
100	0.33	1.34

\* Melaza para A. terreus y harina de yuca para T. harzianum.

donde los valores de Ie no son afectados a concentraciones altas del sustrato (100 g/l).

Cuando la relación C/N es aproximadamente de 20, se obtuvieron los mejores Ie para T. harzianum (Tabla 4). En los valores de C/N menores a 10, se obtuvo un Ie muy bajo, después de 7 o 20 días de incubación. En este caso, la concentración elevada de nitrógeno podría ejercer algún tipo de inhibición aún no definida sobre la esporulación. En cambio, cuando los valores de C/N eran mayores de 30, se observó un retardo importante en la etapa de conidiogénesis, la cual se llevó a cabo hasta los 14 días de cultivo. Esto parece

Tabla 4. Efecto de la relación C/N del medio de cultivo, sobre el índice de esporulación (Ie) de Trichoderma harzianum, cultivada en matraces a 29 °C.

Relación C/N	Índice de esporulación	
	Ie x 10 <sup>9</sup>	
	7 días de cultivo	20 días de cultivo
7.1	7.71	10.27
14.2	7.38	24.40
20.9	14.80	20.90
27.4	7.18	20.00
32.53	0.16	11.80

estar relacionado con la disponibilidad de nitrógeno en el medio de cultivo, ya que éste sería utilizado en su totalidad para la producción de biomasa.

La cinética de esporulación de *A. terreus*, sobre diferentes fuentes de carbono, muestra valores de  $I_e$  diferentes para cada sustrato (Fig. 2). El óptimo de esporulación, se obtuvo después de 15 días de incubación para los sustratos estudiados. Los mayores valores del  $I_e$ , se obtuvieron con melaza, yuca y celulosa; mientras que los menores fueron sobre glucosa y sacarosa, confirmando los resultados antes presentados (Tabla 2).

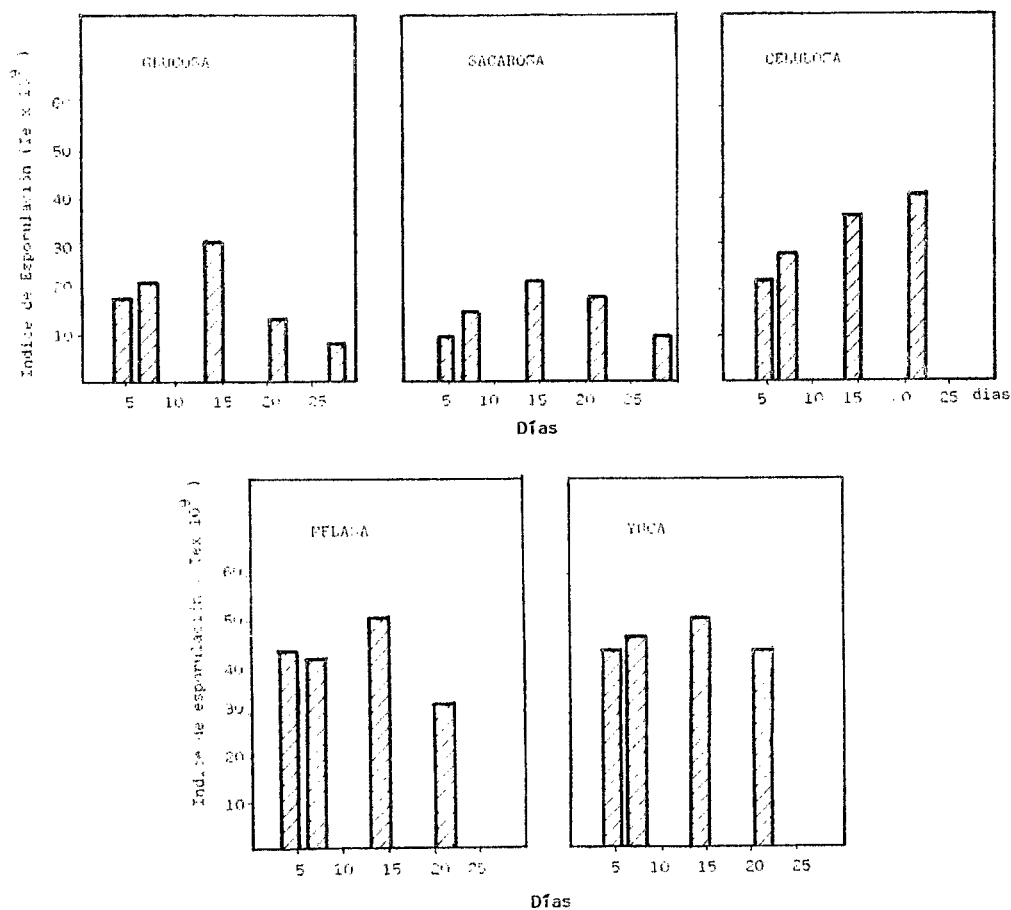


Fig. 2. Cinéticas de esporulación de *Aspergillus terreus* sobre diferentes fuentes de carbono (cultivos en matraces a 30°C).



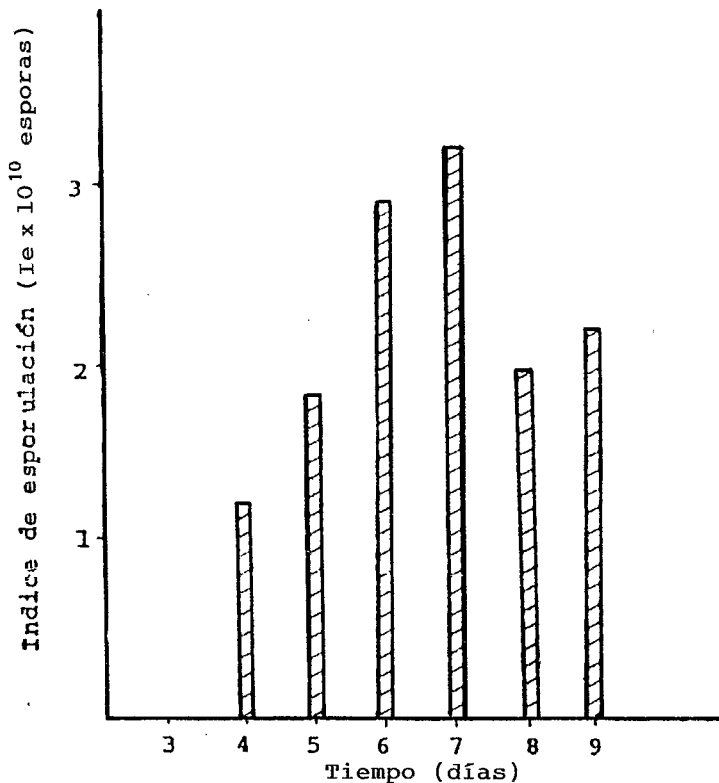


Fig. 3. Producción de conidiosporas de Trichoderma harzianum en relación con el tiempo de incubación, obtenidas en cultivo sobre harina de yuca en un fermentador de discos a 29°C.

#### Producción de esporas en fermentador de discos

La cinética de esporulación de T. harzianum obtenida sobre medio optimizado en fermentador de discos, se muestra en la figura 3. La producción de conidiosporas se inicia a partir del cuarto día, incrementándose hasta el séptimo día, cuando se obtuvo el mejor Ie ( $3.31 \times 10^{10}$  conidiosporas/g). Después de este tiempo, se observó una notable disminución del Ie. Por otro lado, en A. terreus la conidiogénesis se inicia a partir del segundo día, incrementándose de manera regular hasta el séptimo día. Aunque no se determinó el Ie máximo, se observó una producción de conidiosporas importante (Fig. 4).

#### Producción de esporas sobre soporte

El estudio comparativo entre la producción de conidiosporas sobre soporte en matraces y columnas empacadas para A. niger y T. harzianum, demostró que los valores de Ie máximos se obtuvieron después de 7 días de incubación en columnas y de 14 días en matra-

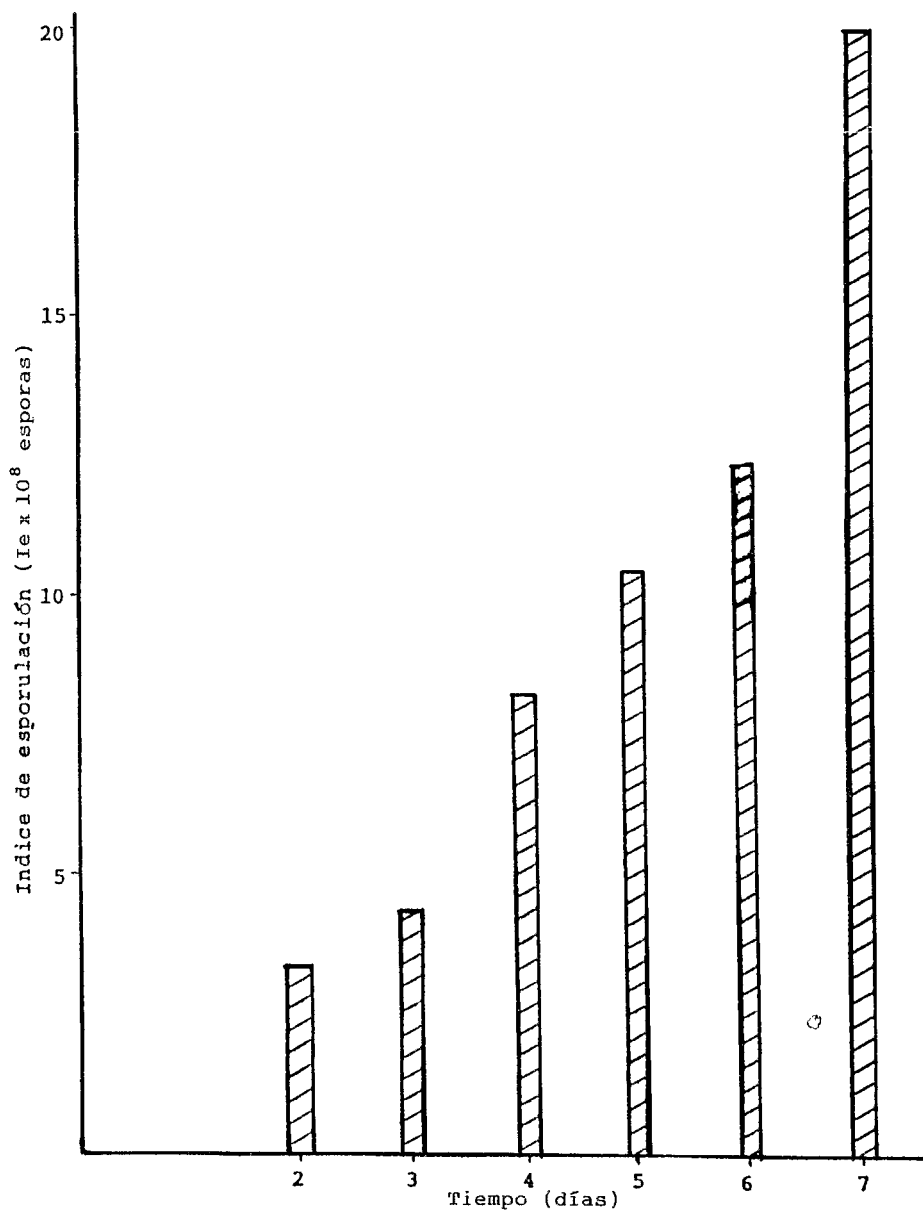


Fig. 4. Cinética de esporulación de *Aspergillus terreus* en cultivo sobre melaza, en un fermentador de discos a 30°C.

Tabla 5. Viabilidad de las conidiosporas de Aspergillus niger, A. terreus y Trichoderma harzianum producidas en un fermentador de discos y conservadas en suspensión a 4°C durante 2 meses.

Conservación (días)	Viabilidad* (%)		
	<u>A. niger</u>	<u>A. terreus</u>	<u>T. harzianum</u>
1	98.5	94.6	92.3
26	96.4	76.6	83.2
53	95.8	90.0	84.4

\* Suspensión inicial de esporas de  $2.3 \times 10^9$ .

ces, para ambas cepas (Roussos y Olmos, 1987). Para T. harzianum, la producción de esporas fué mejor en columnas, comparada con la obtenida en matraces, a humedades menores de 76% (Fig. 5). En A. niger fué al contrario, ya que los resultados obtenidos fueron mejores para los cultivos en matraces, a las mismas humedades iniciales de los medios de cultivo (Fig. 5). Los valores de los Ie obtenidos en columna fueron elevados para ambas cepas, del orden de  $1.4 \times 10^{10}$  conidiosporas/g de substrato (T. harzianum) y de  $4.5 \times 10^9$  conidiosporas/g de substrato (A. niger). Estos valores del Ie fueron tres veces menores a los obtenidos en el fermentador de discos.

#### Conservación y viabilidad de esporas

Los resultados de conservación de esporas en congelación a -4°C de A. niger y T. harzianum, mostraron pérdida importante de su viabilidad, como puede observarse en la figura 6. En el caso de conservación de esporas en suspensión, por refrigeración a 4°C, se observó que se mantuvo una viabilidad importante (85-95%) de las esporas hasta por dos meses en las cepas estudiadas (Tabla 5).

Con respecto al método de conservación de esporas por secado en rotavapor, se observó que en el secado de esporas sin soporte, la temperatura tiene un efecto negativo mas importante sobre la viabilidad, que el observado en el secado con soporte (Tabla 6).

#### CONCLUSIONES

La optimización de los medios de cultivo para la producción masiva de conidiosporas, demostró que cada cepa experimentada (A. niger, A. terreus, T. harzianum) tiene características fisiológicas de esporulación propias. Los mejores índices de esporulación se obtuvieron sobre medios de cultivo óptimos, en los cultivos en fermentador de discos, para las tres cepas. Aunque los rendimientos de esporula-

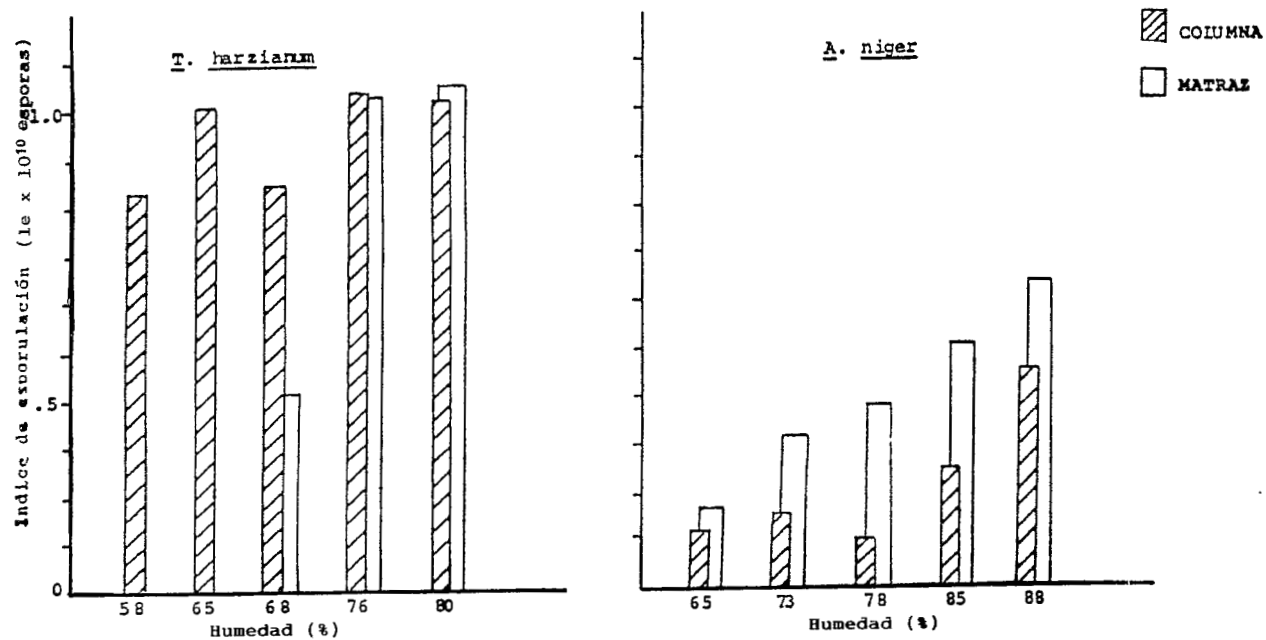


Fig. 5. Influencia de la humedad sobre el índice de esporulación de *Trichoderma harzianum* y *Aspergillus niger*, a los 9 y 7 días de producción sobre soporte, respectivamente.

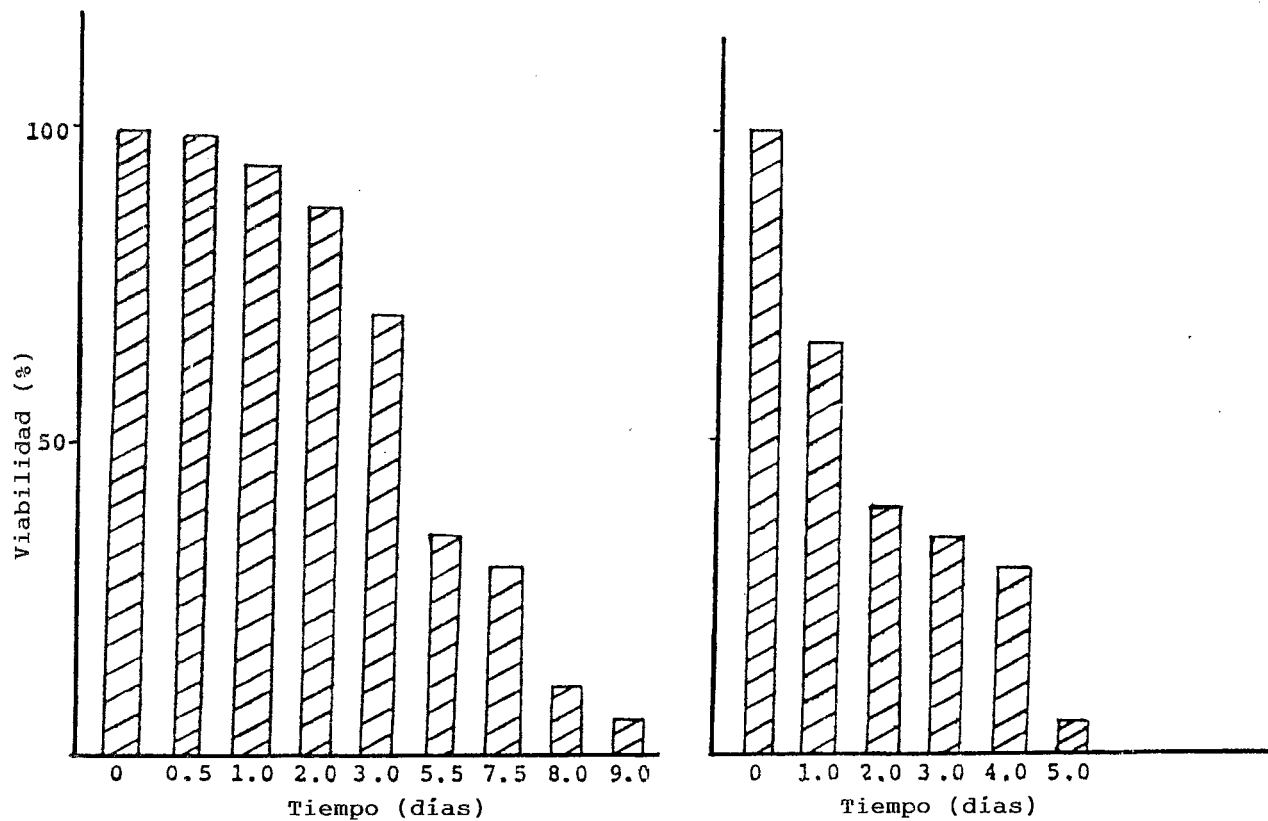


Fig. 6. Cinética de conservación de esporas de *Aspergillus niger* y *Trichoderma harzianum*, en congelación a -4 C.

Tabla 6. Viabilidad de las conidiosporas de Trichoderma harzianum, conservadas por secado en un rotavapor a diferentes temperaturas con o sin soporte.

Temperatura de secado (°C)	Viabilidad* (%)	
	sin soporte	con soporte
40	9.35	38.75
50	0.81	20.00
60	0.56	5.75

\* Suspensión inicial de  $5.75 \times 10^9$  conidiosporas/ml.

ción obtenidos con los cultivos sobre soporte, fueron también altos. De las técnicas de conservación experimentadas (secado, congelación y refrigeración), se seleccionó la de refrigeración para mantener las conidiosporas por un tiempo de dos meses, con un porcentaje de viabilidad importante del 85-95%.

#### LITERATURA CITADA

- BRODERICK, A.J. y R.N. GREENSHIELDS, 1982. Semi-continuous and continuous production of Aspergillus niger spores in submerged liquid culture. J. Gen. Microbiol. 128: 2639-2645.
- BUTLER, E.E., 1980. A method for long-time culture storage of Rhizoctonia solani. Phytopathol. 70: 820-821.
- DAHMEN, H., T. STAUB y F.J. SCHWINN, 1983. Technique for long-term preservation of phytopathogenic fungi in liquid nitrogen. Phytopathol. 73: 241-246.
- DOUGLAS, K.A., A.D. HOKING y J.I. PITT, 1979. Dichloran rose bengal medium for enumeration and isolation of molds of foods. Appl. Environ. Microbiol. 37: 959-964.
- GINDRAT, D., 1977. Effets de concentration élevées de sels sur la croissance, la sporulation et la pigmentation de Trichoderma spp. Can. J. Microbiol. 23: 607-616.
- JEREBZOFF, S., S. JEREBZOFF-QUINTIN y E. LAMBERT, 1976. L'induction du rythme endogène de sporulation chez Aspergillus niger: rôles du rapport glucose/potassium et de micro-éléments. Physiol. Plant. 36: 279-286.
- MAHEVA, E., G. DJELVEH, C. LARROCHE y J.B. GROS, 1984. Sporulation of Penicillium roqueforti in solid substrate fermentation. Biotechnol. Lett. 6: 97-102.
- MARTINELLI, S.D., 1976. Conidiation of Aspergillus nidulans in submerged culture. Trans. Br. Mycol. Soc. 67: 121-128.
- RAIMBAULT, M., 1980. Fermentation in milieu solide. Croissance de champignons filamenteux sur substrat amilacé. Thèse d'Etat. Université Paul Sabatier, Toulouse, Francia.

- RAIMBAULT, M. y D. ALAZARD, 1980. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 9: 199-209.
- RAIMBAULT, M. y S. ROUSSOS, 1985. Procédé de production de spores de champignons filamenteux. Brevet Francais No. 85.08555.
- ROUSSOS, S., 1985. Croissance de Trichoderma harzianum par fermentation en milieu solide: physiologie, sporulation et production de cellulases. Thèse d'Etat, Université de Provence, Francia.
- ROUSSOS, S., A. OLMOS, M.A. AQUIAHUATL, W. RODRIGUEZ, M. RAIMBAULT y G. VINIEGRA, 1985. Un método de secado y conservación de las esporas de Trichoderma harzianum. XVI Congreso Nacional de Microbiología, Durango, México.
- ROUSSOS, S. y A. OLMOS, 1987. Producción de esporas de hongos filamentosos sobre soporte en medio sólido. XVIII Congreso Nacional de Microbiología, Acapulco, México.
- TOMMERUP, I.C. y D.K. KIDBY, 1979. Preservation of spores of vesicular arbuscular endophytes by L-drying. Appl. Environ. Microbiol. 37: 831-835.
- VEZINA, C., S. KARTAR y S.N. SEHGAL, 1965. Sporulation of filamentous fungi in submerged culture. Mycologia 57: 722-736.
- VEZINA, C. y K. SING, 1975. Transformation of organic compounds by fungi spores. In: Smith, J.E. y D.R. Berry (Eds.). The filamentous fungi, I. Industrial mycology. Edward Arnold, Londres.