



Aplicaciones del *Bacillus* y *Trichoderma* en la agroindustria

Rodríguez Alessandri

Universidad Politécnica Territorial del Yaracuy Arístides Bastidas, Venezuela

<https://orcid.org/0000-0001-9493-088x> Alessandri.rodriguez71@gmail.com

ASA/Ensayo

doi: <http://doi.org/10.5281/zenodo.7365481>

Recibido: 02-02-2022

Aceptado: 01-11-2022

RESUMEN

En este ensayo se pretende crear una reflexión de la crisis alimentaria que vivimos y de cómo la biotecnología representa una alternativa viable para paliar esta grave crisis que según la FAO se agravaría en las próximas décadas. Se enfoca en la revisión de artículos científicos recientes para realizar un análisis comparativo considerando el uso, aplicaciones, ventajas e impactos de microorganismos como el *Bacillus thuringiensis* y el *Trichoderma* como biocontroladores y como productores de enzimas glucoamilasas para la producción de bioetanol a partir de residuos agroindustriales.

Palabras clave: Biocontroladores; Glucoamilasas; Bioetanol.



Applications of *Bacillus* and *Trichoderma* in agribusiness

ABSTRACT

This essay aims to create a reflection of the food crisis we are experiencing and how biotechnology represents a viable alternative to tackle this serious crisis that, according to the FAO, would worsen in the coming decades. It focuses on the review of recent scientific articles to carry out a comparative analysis considering the use, applications, advantages and impacts of microorganisms such as *Bacillus thuringiensis* and *Trichoderma* as biocontrollers and as producers of glucoamylase enzymes for the production of bioethanol from agro-industrial waste.

Keywords: Biocontrollers; Glucoamylases; Bioethanol.

INTRODUCCIÓN

El término Biotecnología fue utilizado por primera vez por el agrónomo Karl Ereky en 1919, quien la definió como

“La ciencia de los métodos que permiten la obtención de productos a partir de materia prima, mediante la intervención de organismos vivos”.

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) la definen como:

“El conjunto de técnicas que permiten al hombre aprovechar la capacidad de ciertos seres vivos para la producción de bienes y servicios que satisfagan las necesidades de la sociedad”.

También, en el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) la define como:

“...toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos”.

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO,2019) afirma que

“...alrededor de 113 millones de personas en 53 países experimentaron inseguridad alimentaria aguda en 2018, en comparación con 124 millones en 2017”.

De acuerdo con el informe mundial presentado por la FAO (2019):

“La inseguridad alimentaria sigue siendo un reto global. Por ello, entre 2014 y 2020, la UE habrá destinado cerca de 9 000 millones de euros a iniciativas sobre seguridad alimentaria y nutricional y agricultura sostenible en más de 60 países. El Informe Mundial de hoy subraya la necesidad de fortalecer la cooperación entre los actores humanitarios, de desarrollo y de la paz para revertir y prevenir las crisis alimentarias. Una Red Mundial más fuerte puede ayudar a lograr cambios sobre el terreno para las personas que realmente los necesitan.”

Por su parte el Banco Mundial (2018) presenta un informe en donde señala que:

“Se espera que la demanda de alimentos en el mundo aumente como mínimo en 20 % durante los próximos 15 años; (i) las mayores alzas se prevén en África al sur del Sahara, Asia meridional y Asia oriental. Sin embargo, el capital natural se está agotando a tasas sin precedentes y el cambio climático podría provocar una disminución considerable en la producción de alimentos, especialmente en las regiones con mayor inseguridad alimentaria.

Según estimaciones de 2016, 1 de cada 9 personas (PDF) sufre de hambre crónica, y en 2014 el 12,9 % de la población de los países en desarrollo padecía desnutrición.”

En este orden de ideas, otro informe presentado por la FAO (2018) describe la situación como:

“La contaminación del agua por prácticas agrícolas insostenibles plantea una grave amenaza para la salud humana y los ecosistemas del planeta, un problema que a menudo subestiman tanto los responsables de las políticas como los agricultores. En muchos países, la mayor fuente de contaminación del agua es la agricultura -no las ciudades o la industria-, mientras que, a nivel mundial, el contaminante químico más común en los acuíferos subterráneos son los nitratos procedentes de la actividad agrícola, advierte el informe Más gente, más alimentos, ¿peor agua? La agricultura moderna es responsable del vertido de grandes cantidades de agroquímicos, materia orgánica, sedimentos y sales en los cuerpos de agua, dice el informe.”

En este contexto, es necesario hacer uso eficiente de los recursos naturales disponibles de manera amigable con el ambiente, y así lograr una producción agrícola sostenible que garantice la soberanía alimentaria de la población más vulnerable. Con el objetivo de brindar herramientas que ayude a los productores a producir sin utilización de

agroquímicos. El uso de Biocontroladores representa una alternativa viable para tal fin.

Los biocontroladores son productos, de origen biológico, que actúan como antagonistas frente a microorganismos patógenos que producen daño en los cultivos. Tienen la característica de no dejar residuos, y no ser perjudiciales para la salud humana, como tampoco para el medio ambiente. El Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Argentina (INTA,2018) reseña lo siguiente:

“Desde INTA consideramos que el control biológico es una alternativa para el control de plagas y enfermedades, consiste en el uso de un organismo vivo para controlar a otro. Con esto buscamos que los productores reduzcan el uso de químicos que, mal utilizados, son perjudiciales tanto para la salud del productor, como la del consumidor y el medioambiente.”

Tomando en cuenta lo anteriormente dicho, es evidente que existen una gran cantidad de aplicaciones de las técnicas biotecnológicas en el campo de la agricultura y de la agroindustria, que podrían mejorar los procesos. Por ejemplo, se pueden producir productos comerciales biocontroladores y convertir los residuos de cosechas en productos con un alto valor agregado, como explicaremos más adelante.

Desarrollo

En este sentido, se seleccionaron artículos científicos recientes para realizar un análisis comparativo considerando el uso, las aplicaciones, ventajas e impactos de microorganismos como el *Bacillus thuringiensis* y el *Trichoderma* como biocontroladores y como productor de enzimas glucoamilasas respectivamente.

***Bacillus thuringiensis* como biocontrolador, aspectos básicos**

Entre los artículos relacionados con el *Bacillus thuringiensis* encontramos que en una investigación realizada para controlar dos especies de moscas de las frutas (*Ceratitis capitata* y *Anastrepha frateculuses*) con el objetivo de evaluar la patogenicidad de dos biocontroladores (*Beauveria bassiana* y *Bacillus thuringiensis*) concluyen que los dos microorganismos utilizados causan mortalidad a adultos de esta plaga (Montes, 2021). Esta bacteria también es utilizada como controlador biológico contra el cogollero (*Spodoptera frugiperda*) en el cultivo del maíz (*Zea mays*) según (Guevara, 2020). *Bacillus thuringiensis* produce durante su fase de esporulación una o varias formas cristalinas, que contienen las proteínas “Cry” y “Cyt” (del inglés crystal y cytolytic). Mientras que en su fase vegetativa la bacteria produce las proteínas llamadas Vip (del inglés

vegetative insecticidal proteins). Desde el punto de vista del control de plagas, las principales toxinas insecticidas utilizadas son las proteínas formadoras de poro Cry y Vip por su alta especificidad de acción. Las proteínas citolíticas Cyt ha sido poco estudiadas, aunque se utilizan en el control de dípteros (Peralta,2017).

El modo de acción de estas proteínas insecticidas según (Areco et al. 2019) indican que:

“En lo que respecta a las toxinas Cry, la mayoría de ellas, y las más estudiadas, se corresponden a la familia conocida como proteínas Cry de 3 dominios, por un conjunto de 3 secuencias aminoacídicas conservadas que constituyen los dominios amino terminales o de perforación, central, y carboxilo terminal. Estos tres dominios poseen roles clave responsables de la actividad insecticida de estas proteínas. El dominio amino terminal (I) participa de la formación del poro, el dominio central (II) participa en las interacciones toxina-receptor mientras que el dominio carboxilo terminal (III) colaboraría con los dominios anteriores en la unión de la toxina al receptor y en la formación del poro. (p.13)

***Trichoderma* como controlador biológico**

En cuanto a los artículos seleccionados para el análisis comparativo del entomopatógeno *Trichoderma*, se hace referencia al estudio

realizado por Sharon Acosta y Jorge Villa en el año 2016 en Santo Domingo, Antioquía (Colombia), en una finca productora de cacao, donde se seleccionaron 17 árboles en 3 lotes, se aplicó un control biológico correspondiente a un lixiviado combinado con el hongo *Trichoderma spp.*, asperjado al árbol (n=6). Un tratamiento de síntesis química, inductor de resistencia (K3PO3) inyectado en el tronco del árbol (n=5) y un control sin aplicación (n=6). Luego de la aplicación, se contaron las mazorcas sanas y enfermas y se registró el peso húmedo de las semillas durante un periodo de 2 meses en cada uno de los tratamientos. Los resultados arrojaron que no se encontró diferencia significativa en las fracciones de mazorcas sanas y el rendimiento, aun así, el control biológico mostró una mejora con relación al control, lo cual indica su potencial como una alternativa de bajo costo para plantaciones de pequeña escala.

Los hongos antagonistas resultan importantes para el control biológico de los fitopatógenos. En este aspecto, las especies del género *Trichoderma* se destacan entre las más utilizadas para el biocontrol de patógenos fúngicos del suelo. Estas especies presentan diferentes modos o mecanismos de acción que le permiten el control de los fitopatógenos. Entre estos mecanismos se encuentran:

competencia por el sustrato, micoparasitismo, antibiosis, desactivación de enzimas del patógeno, resistencia inducida, entre otros. Mientras mayor sea la probabilidad de que un aislamiento de *Trichoderma*, manifieste varios modos de acción; más eficiente y duradero será el control sobre el patógeno, aspectos que no poseen los plaguicidas químicos.

Es un género de hongos del suelo que engloba a más de 200 especies con un gran oportunismo medioambiental. Muchas de sus cepas son destacadas productoras de metabolitos antimicrobianos y de gran cantidad y variedad de enzimas hidrolíticas (Hermosa-Prieto, 2017).

Las bacterias y hongos referidos en los artículos anteriores tienen como principio el control de plagas que afectan a los cultivos, para evitar o reducir las pérdidas económicas que estas ocasionan. No se trata de un insecticida, ni fungicida, ni herbicida; estamos hablando de controladores biológicos, que controlan otras formas de vida e inhiben el crecimiento de fitopatógenos de los cultivos. Presentan la ventaja de no generar un impacto ambiental negativo, no son tóxicos ni perjudiciales para la salud humana ni para el medio natural, ya que son de actividad específica para fitopatógenos, presentan una excelente relación beneficio/costo por ser más

económicos que los métodos químicos de control de plagas, representan una alternativa a la producción sostenible y respetuosa con el medio ambiente. Estos dos microorganismos se interrelacionan y producen hormonas, sideróforos, metabolitos secundarios, vitaminas y aminoácidos, favoreciendo el desarrollo y producción de los cultivos. Tomando en cuenta que, en Venezuela, la legislación vigente prohíbe explícitamente el uso de tecnologías recombinantes, el desarrollo de productos comerciales biocontroladores puede representar una alternativa viable y económica para la producción de alimentos desde el punto de vista agrosostenible que garantice la soberanía agroalimentaria de todos los sectores de la sociedad, que ayude a erradicar el hambre y contribuya con el desarrollo de una agricultura más respetuosa con el ambiente y la supervivencia de nuestra especie en el planeta.

Aplicaciones agroindustriales del género *Bacillus* y *Trichoderma*.

En cuanto a las aplicaciones biotecnológicas del género *Bacillus* y *Trichoderma* en la agroindustria para convertir los residuos de cosechas en productos con un alto valor agregado. Podemos citar el trabajo realizado por Mendoza Edder y Martínez Melanie titulado “Producción de alfa amilasa por

fermentación en estado sólido de residuos agroindustriales (Cáscara de Banano) utilizando *Bacillus subtilis*” realizado en el 2018, en la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad de Guayaquil, Ecuador. Esta investigación tiene como objetivo producir la enzima alfa amilasa a través del proceso de fermentación en estado sólido de los residuos agroindustriales (Cáscara de bananos) utilizando bacterias *Bacillus subtilis*.

La metodología utilizada por Mendoza y Martínez, (2018) indica que: Se inocula el *Bacillus subtilis* en el momento de presentar una tasa de crecimiento exponencial de 10^6 UFC/ml, en un medio líquido de sal mineral, adicionando 30 gramos de harina de cáscara de banano con una granulometría de 250 μ m. Se evalúan las variables independientes de pH, tiempo y temperatura versus las variables dependientes de actividad enzimática y rendimiento. Posteriormente se hace la extracción de enzimas alfa amilasas del medio sólido fermentativo con solución buffer de fosfato de sodio pH 6.9, se filtra y se centrifuga. El líquido sobrenadante representa el extracto crudo enzimático al cual se le determina la actividad enzimática utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) luego se construye una curva patrón con su respectiva ecuación.

Para determinar la cantidad real de maltosa liberada por acción enzimática, el valor de la absorbancia se extrapoló en la curva patrón de glucosa, obteniendo los miligramos de maltosa producidos durante el tiempo de reacción enzimática; se puede utilizar también la ecuación de la curva para estos cálculos.

En cuanto a los resultados obtenidos los autores señalan que, según el tiempo de incubación en la producción de enzima, la actividad enzimática se comportó de la siguiente manera: en 24 horas 8.13 Unidades Enzimáticas (UE)/ml, en 48 horas fue de 7.7 UE/ml y en 72 horas es de 5.15 UE/ml. Según la variable de temperatura, los resultados obtenidos indican que a 30°C la actividad enzimática fue de 5.58 UE/ml, a 35°C fue de 8.13 UE/ml y a 40°C es de 5.02 UE/ml. En relación a la variable pH del medio, los resultados obtenidos indican que a un pH de 6 la actividad enzimática fue de 6.62 UE/ml, a un pH de 7 la actividad enzimática obtenida es de 8.13 UE/ml y finalmente a un pH de 8 se obtuvo una actividad de 6.75 UE/ml.

Creación de productos de alto valor agregado a partir de residuos de cosechas y biocontroladores

Estos resultados, se pueden emplear como referentes en la elaboración de un proyecto

para la producción de alcohol neutro tipo Vodka a escala industrial, a partir de materias primas amiláceas catalogadas como desechos agroindustriales o de residuos celulósicos de cosechas como el bagacillo de las cañas de azúcar, residuos vegetales de las cosechas de maíz, entre otros, los cuales son de fácil ubicación, baratos y abundantes. Ya que para la hidrólisis de este tipo de sustrato una de las enzimas requeridas es la alfa amilasa, y como mencionamos anteriormente son producidas por bacterias del género *Bacillus*. Estas enzimas actuarán sobre los enlaces alfa 1,4 de las moléculas de amilopectina y amilosa.

Sin embargo, para lograr que las moléculas de los polímeros naturales más abundantes de la naturaleza, como lo son el almidón y la celulosa, se conviertan en bioetanol, es necesario, utilizar aparte de las alfa amilasa, algún otro tipo de enzimas que completen el proceso hidrolítico de estas moléculas tan complejas, es decir, es necesario unas enzimas más potentes que lo desdoblén a moléculas más sencillas, estas son las glucoamilasas, que van a actuar sobre los enlaces alfa 1,4 y alfa 1,6 de amilopectina. Para que posteriormente puedan ser metabolizadas por las levaduras del género *Saccharomyces*, las cuales van a metabolizar las moléculas de glucosa y fructosa en etanol

a través de la vía de la fermentación alcohólica.

Estudios recientes señalan que estas enzimas glucoamilasas se pueden producir microbiológicamente con hongos del género *Trichoderma*. Entre estos estudios, encontramos el trabajo realizado por Carlos Garay y Natalia Peña cuyo título es “Obtención de azúcares reductores por medio de fermentación sólida a partir de cascara de piña” realizado en la Fundación Universidad de América Facultad de Ingenierías Programa de Ingeniería Química en Bogotá, Colombia en el año 2018, cuyo objetivo es obtener azúcares reductores por medio de fermentación sólida a partir de cáscaras de piña Golden (*Ananas comosus*).

La metodología utilizada por Garay y Peña, (2018) indica que: Se realiza un pretratamiento físico de la concha de piña el cual consiste en un lavado, secado a 80 +/- 2 °C, molienda y tamizado hasta obtener una harina con una granulometría menor a 0.6 mm, luego se introducen en cada reactor 100g de harina de la harina obtenida y se ajusta su humedad a 70%, posteriormente, los reactores con los residuos se esterilizan en autoclave a 15psi, 120°C, durante 30 min, se dejan enfriar hasta 22°C y en forma aséptica se inocula una solución de medio de cultivo de $5,06 \times 10^6$ esporas/mL de *Trichoderma reesei*. La

variable temperatura de incubación debe ser de 20°C, la cual es controlada por medio de un indicador de temperatura ubicado en el interior de los biorreactores, el tiempo de contacto con el sustrato fue de 20 días aproximadamente.

Para la adecuación de la muestra hidrolizada se tomaron 10 gramos de sustrato hidrolizado de cada biorreactor, y se lavaron con 100mL de agua destilada, se agitaron a 130 rpm a temperatura de 28°C durante 2 horas en una incubadora de agitación marca N-BIOTEK modelo NB-205L. La mezcla se filtró a través de una tela de nailon de malla 200 haciendo uso de una bomba de vacío. La porción sólida se resuspendió en buffer citrato de sodio 0,05M, se agitó a 150 rpm por 2h a 4°C en una incubadora de agitación, la porción líquida fue llevada a centrifugación en un equipo marca DAMON modelo IEC HN-S a 10.800g durante 15 minutos a 4°C. El mismo procedimiento se siguió para las cáscaras de piña molidas y tamizadas sin hidrolizar y el sobrenadante obtenido se utilizó como blanco en la determinación de azúcares reductores.

Posteriormente se determinó la cantidad de azúcares reductores a los hidrolizados de concha de piña mediante la técnica del DNS, para calcular la eficiencia de la aireación forzada en el medio. La actividad enzimática de celulasas totales se realizó siguiendo la

metodología descrita por Mosier et al. (2017) al sobrenadante obtenido de la centrifugación a 10800g.

Los mejores resultados se obtuvieron en el sobrenadante de la muestra obtenida en el reactor con aireación forzada con 22,29FPU/mL seguida del sobrenadante obtenido de la muestra del reactor sin aireación forzada con 18,32FPU/mL, utilizando aireación forzada de 120mL/min.

Comentarios finales

En conclusión, del análisis de los trabajos de investigación citados, se puede inferir que en nuestro país es viable desarrollar este tipo de técnicas biotecnológicas para producir lo que se conoce actualmente como bioetanol de tercera generación, el cual es obtenido de residuos agroindustriales, convirtiendo un problema ambiental como lo es la disposición de residuos agroindustriales en un producto de alto valor agregado como el etanol. Lamentablemente en Venezuela la legislación prohíbe el uso de las tecnologías recombinantes para la creación de organismos genéticamente modificados, de lo contrario, sería factible, la creación de una levadura con genes recombinantes que expresen las potencialidades del *Trichoderma* en cuanto a la producción de enzimas glucoamilasas. Por los momentos es viable la producción de las

enzimas celulasas de origen microbiano a través de los métodos descritos anteriormente. En general, este tipo de enzimas se importan, pero se plantea el reto de producirlas a nivel nacional. Además, se lograría un impacto ambiental positivo al convertir residuos agroindustriales en un producto final muy solicitado en el mercado licorero nacional, como lo es el alcohol neutro. Este proyecto puede activar la economía regional y nacional, ya que produciría empleos directos e indirectos y generaría mayores impuestos regionales y nacionales.

REFERENCIAS

- Acosta, S., y Villa, J. (2016). Evaluación de *Trichoderma spp* como Control Biológico en una Plantación a Pequeña Escala de Cacao. *Journal of agriculture and Animal Sciences*, 5(2), 8-18.
- Areco, V., Peralta, C., y Palma, L. (2019). *Bacillus thuringiensis se hace mayor, más de medio siglo como alternativa a los insecticidas de síntesis*. CONICET DIGITAL. Recuperado de: https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/129316/CONICET_Digital_Nro.81a64a63-1f8b-466f-90eb-46f8cfdd84c4_B-p%C3%A1ginas-3%2C10-17.pdf?sequence=5&isAllowed=y
- Banco Mundial. (2018). *Seguridad Alimentaria*. Recuperado de: <https://www.bancomundial.org/es/topic/food-security>

- Garay, C. y Hernández, N. (2018). *Obtención de azúcares reductores por medio de fermentación sólida a partir de cáscaras de piña*. [Tesis de Grado, Fundación Universidad de América Facultad de Ingenierías Programa de Ingeniería Química Bogotá D.C.]. Archivo digital. Recuperado de: <https://repository.uamerica.edu.co/handle/20.500.11839/6928>
- Guevara, Y. (2020). *Control biológico del cogollero (*Spodoptera frugiperda*) en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.), en la comunidad de Santiago, Aymaraes*. REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL DE LA UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LOS ANDES. Recuperado de: <http://www.repositorio.utea.edu.pe/handle/utea/265>
- Hermosa-Prieto, M. (2017). TRICHODERMA: UN AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO QUE AYUDA A LAS PLANTAS A TOMAR DECISIONES CORRECTAS. *Farma Journal*, 2(2), 141-142.
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Argentina. (INTA). (2018). *Biocontroladores: una herramienta para el control de plagas y enfermedades*. Recuperado de: <https://inta.gob.ar/noticias/biocontroladores-una-herramienta-para-el-control-de-plagas-y-enfermedades>
- Martínez, M. y Mendoza, E. (2020). *Producción de alfa amilasa por fermentación en estado sólido de residuos agroindustriales (cáscaras de banano) utilizando *Bacillus subtilis**. [Tesis de Grado, Universidad de Guayaquil]. Archivo digital. Recuperado de: <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/33219>
- Montes, J. (2021). *Evaluación de entomopatógenos para el control de moscas de la fruta*. REPOSITORIO UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL. Recuperado de: <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/53210>
- Mosier, N., et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *BIORESOURCE TECHNOLOGY*, 96(6), 673-686.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2019). *Informe mundial sobre las crisis alimentarias: el hambre aguda sigue afectando a más de 100 millones de personas*. Recuperado de: <https://www.fao.org/news/story/es/item/1188071/icode/>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2018). *Los contaminantes agrícolas: una grave amenaza para el agua del planeta*. Recuperado de: <https://www.fao.org/in-action/agronoticias/detail/es/c/114195/5/>
- Peralta, C. (2017). *¿Está superando el mundo de los insectos la eficacia del *Bacillus thuringiensis*?* MDPI. Recuperado de: <https://translate.google.com/website?sl=en&tl=es&nui=1&prev=search&u=https://doi.org/10.3390/toxins9010039>