

# ESPECIES DE *Trichoderma* PRODUCTORAS DE $\beta$ -GALACTOSIDASA EN SUELOS DE CULTIVO DE TACNA, PERÚ

Edgar Chaparro Aguilar<sup>1,a</sup>; Daladier Castillo Cotrina<sup>1,b</sup>;

## RESUMEN

**Objetivo.** Aislar y seleccionar especies de *Trichoderma* productoras de  $\beta$ -galactosidasa en suelos de cultivo de maíz en Tacna, Perú. **Materiales y métodos.** Se tomaron muestras de suelos de las localidades de Calana, Magollo, La Yarada 5 y 6, Tacna, Pocollay, Las Yaras, Pachía, y Los Palos. Las muestras fueron sembradas en agar Martín e incubadas a 25 °C hasta 7 días. Las colonias desarrolladas de *Trichoderma* fueron aisladas e identificadas considerando las claves taxonómicas como las de Kubicek & Harman (1998). Se obtuvo inóculos de  $15 \times 10^6$  ufc mL<sup>-1</sup>, de cada cultivo aislado y de uno donado por SENASA de *Trichoderma* sembrado previamente en PDA, para ser sembrados en el medio fermentativo Lactase Production Medium (LPM) e incubados a 28 °C con agitación durante 6 días para la producción de la  $\beta$ -galactosidasa. Al filtrado y centrifugado del medio fermentativo se le hizo determinación de proteínas totales y de la actividad enzimática de la  $\beta$ -galactosidasa. **Resultados.** Se aislaron 13 cultivos de *Trichoderma* que representó el 20,31 % de un total de 64 muestras de suelo del valle de Tacna, encontrándose 4,69 % con mayor frecuencia en las localidades de Calana y Magollo. Se identificaron tres especies: *T. harzianum*, *T. aureoviride* y *T. viride*. Todos los *Trichoderma* investigados fueron productoras de  $\beta$ -galactosidasa siendo *Trichoderma* sp. TT01, aislado de Tacna, el que tuvo la más alta actividad enzimática con 18.512 U mg<sup>-1</sup> proteína.

**Palabras clave:** *Trichoderma*,  $\beta$ -galactosidasa, actividad láctica

## SPECIES OF *Trichoderma* PRODUCERS OF $\beta$ -GALACTOSIDASE IN SOILS OF CULTURE OF TACNA, PERU

### ABSTRACT

**Objective.** Isolate and select *Trichoderma* species that produce  $\beta$ -galactosidase in corn cultivation soils in Tacna, Peru. **Methodology.** Soils from the towns of Calana, Magollo, La Yarada 5 and 6, Tacna, Pocollay, Las Yaras, Pachía, Los Palos were sampled. The soil samples were sown in Martin Agar and incubated at 25 °C for up to 7 days. The developed colonies of *Trichoderma* were isolated and identified considering taxonomic keys such as those of Kubicek & Harman (1998). Inocula of  $15 \times 10^6$  cfu mL<sup>-1</sup> was obtained from each isolated culture and from one donated by SENASA of *Trichoderma* previously sown in PDA, to be sown in the Lactase Production Medium (LPM) fermentation medium and incubated at 28 °C with shaking for 6 days for the production of  $\beta$ -galactosidase. The filtration and centrifugation of the fermentative medium was determined by total proteins and the enzymatic activity of  $\beta$ -galactosidase. **Results.** Thirteen *Trichoderma* crops were isolated, representing 20.31% of a total of 64 soil samples from the Tacna Valley, with 4.69% being found more frequently in the towns of Calana and Magollo. Three species were identified: *T. harzianum*, *T. aureoviride* and *T. viride*. All the *Trichoderma* investigated were producing  $\beta$ -galactosidase being *Trichoderma* sp. TT01, isolated from Tacna, which had the highest enzyme activity with 18.512 U mg<sup>-1</sup> protein.

**Keywords:** *Trichoderma*,  $\beta$ -galactosidase, lactatic activity.

<sup>1</sup> Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna, Perú.

<sup>a</sup> Maestro En Ciencias, Especialidad: Mención en Gerencia, Auditoria y Gestión Ambiental

<sup>b</sup> Doctor

## INTRODUCCIÓN

El género *Trichoderma* según Kubicek & Harman<sup>(1)</sup> comprende un conjunto de especies sin fase sexual evidente. Presenta micelio septado, conidias generalmente ovaladas, conidióforo hialino no verticilado, fiálides singulares o en grupos, conidio unicelular coloreado, de rápido desarrollo en medios sintéticos, la colonia se muestra de color verde, básicamente es saprofitica, muy común en suelos<sup>(2-4)</sup> y madera.

En general, las especies de *Trichoderma* son similares sin muchas variaciones obvias, como en muchos otros géneros grandes de *Hyphomycetes* que ofrecen solo unos pocos caracteres del valor taxonómico. Las especies de *Trichoderma* se muestran como un grupo, solapando caracteres, y esto también da un esfuerzo para clasificar a los aislados<sup>(5)</sup>. Las especies de *Trichoderma* pueden tener colonias débilmente flocosas o sólidamente compactas, con bastantes intermedios entre los extremos, los dos de ellos pueden ocurrir de vez en cuando en la misma colonia. En la mayoría de los cultivos el crecimiento es en forma distintiva y con anillos característicos que determinan zonas. Cuando las colonias son un poco más viejas la zonación se pone menos obvia porque pueden formarse los nuevos conidióforos fuera de las áreas primarias. En algunos aislados la zonación de colonias flocosas solo puede verse en las fases muy jóvenes. El color de la colonia se debe a la pigmentación de fialósporas. Típicamente, colonias de *T. viride* tienen el colorido verde oscuro, pero en otras especies puede variar de amarillo al verde amarillento. Además de la pigmentación de fialósporas hay otros factores que afectan el color de la colonia; por ejemplo, la cantidad de producción de la espora hace que las colonias parezcan más oscuras o más pálidas. Algunos aislados pueden producir cristales o secretar un pigmento que difunde al medio dando tonalidades diversas<sup>(1)</sup>.

La enzima  $\beta$ -galactosidasa comúnmente es conocida como lactasa  $\beta$ -galactosidasa mientras que el nombre sistemático es más usado cuando es necesaria una identificación exacta de la enzima, pero tiene el inconveniente de ser largo, mientras que el nombre común es corto y de uso práctico, ya que hace referencia a alguna característica general; especialmente porque cataliza una reacción bioquímica más importante<sup>(6)</sup>.

La lactosa está formada por glucosa y galactosa<sup>(7)</sup>, reduce el reactivo de Fehling y se hidroliza por la  $\beta$ -galactosidasa según Crueger & Crueger<sup>(8)</sup>. La fuente de la lactosa es la leche, que puede aparecer durante el embarazo en la orina. La lactosa es conocida como O –  $\beta$  – D – galactopiranosil – (1 – 4) –  $\beta$  – D – glucopiranososa<sup>(9)</sup>. El mecanismo de acción de la  $\beta$ -galactosidasa sobre la lactosa es la capacidad de acelerar la reacción de hidrólisis del enlace que mantiene unidas a las moléculas de glucosa y galactosa; y el mecanismo de acción sobre la ONPG (ortonitrofenil –  $\beta$  – D – galactopiranosido), análogo de la lactosa, es de hidrolizarlo para originar como productos galactosa y ONP (ortonitrofenil)<sup>(10)</sup>. Entre los hongos miceliales reportados como productores de  $\beta$ -galactosidasa están *Fusarium*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Trichoderma*. La actividad enzimática de la  $\beta$ -galactosidasa de las especies de estos hongos difiere entre ellos<sup>(11, 7)</sup>. El objetivo de este trabajo fue aislar y seleccionar especies de *Trichoderma* productoras de  $\beta$ -galactosidasa en suelos de cultivo de maíz en Tacna, Perú.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron muestras de suelo de campos de maíz, cultivo de temporada, de las localidades de Pachía, Calana, Pocollay, Tacna, Magollo, Las Yaras, La Yarada 5-6 y Los Palos, durante los meses de febrero y marzo de 2006.

Se muestrearon ocho campos de cultivo por localidad, en cada campo se seleccionaron cinco puntos para la recolección de muestra, empleando el propuesto por Singleton *et al.*<sup>(12)</sup>, que se encontraban de manera equidistante a lo largo de la forma de W.

Las muestras fueron recolectadas siguiendo el procedimiento de Alexander<sup>(13)</sup> y Gilman<sup>(14)</sup>. Se introdujo un barrilejo limpio de manera diagonal sobre la superficie del suelo y a una profundidad de 10 a 15 cm, esto se repitió en cada punto, con ello se obtuvo un promedio de 100 a 150 g de suelo agrícola, la cual constituyó la muestra de una zona o de un campo de cultivo. La muestra fue tamizada y colocada en bolsas de polietileno de primer uso y transportadas al laboratorio de micología-virología para el aislamiento de cepas de *Trichoderma* spp.

Las muestras fueron sembradas por el método de dilución en placa<sup>(12,13,15)</sup>, es decir, se homogeneizó 1 g de suelo en 9 mL de agua tamponada fosfatada (ATP), a partir de la cual se realizó una dilución seriada hasta  $10^{-3}$ . La siembra se realizó por la técnica en superficie<sup>(16, 17)</sup>, colocando 0,1 mL de la última dilución sobre la superficie de una placa Petri con agar Martín para hongos con 0,5 mg L<sup>-1</sup> de solución Rosa de Bengala y 1 mL de cloranfenicol a una fracción de 100 mg L<sup>-1</sup>; la cual se distribuyó homogéneamente con la espátula de Drigalsky. Las placas sembradas fueron incubadas a 25 °C durante 3 a 7 días con observaciones periódicas. Las colonias que se desarrollaron en las placas con características morfológicas compatibles a *Trichoderma* fueron seleccionadas de acuerdo con recomendaciones de investigaciones anteriores<sup>(1, 18, 19)</sup>. Para la purificación de las colonias seleccionadas se aplicó el método del cultivo monospórico<sup>(18)</sup>; los viales con el hongo de forma pura fueron codificados y conservados a temperatura de refrigeración hasta el momento de su identificación y masificación. La identificación de los cultivos de *Trichoderma* se hizo de acuerdo a sus características morfológicas macroscópicas (color, textura, olor, diámetro en PDA 25 °C, crecimiento a 35 °C, presencia de pústulas, presencia de gotas de agua) y microscópicas (forma de hifas; forma y tamaño de conidióforos; tamaño de fiálides; color, forma, textura y tamaño de conidia; disposición de clamidosporas; ascas; ascosporas) propuestas en las claves taxonómicas de Kubicek & Harman<sup>(1)</sup>.

Para la investigación de la producción de  $\beta$ -galactosidasa a partir de los cultivos de *Trichoderma* seleccionados, se trabajó también como control

con *Trichoderma harzianum* proporcionado por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA). Se sembró cada uno de los cultivos de *Trichoderma spp.* en tubos con agar papa dextrosa (PDA) en pico de flauta y se les incubó a 25 °C durante cinco días. Las esporas producidas en los tubos fueron resuspendidos en 5 mL de agua tamponada fosfatada y cuantificada empleando la cámara de Neubauer, se realizaron diluciones seriadas hasta obtener inóculos de  $15 \times 10^6$  ufc mL<sup>-1</sup> para cada cultivo de *Trichoderma*.

Para la producción de la enzima, considerando la fermentación por triplicado, se prepararon 42 matraces de 250 mL con 50 mL del medio Lactase Production Medium (LPM) (lactosa 10 g L<sup>-1</sup>, peptona 1.5 g L<sup>-1</sup>, extracto de levadura 1.0 g L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g L<sup>-1</sup>, (NH<sub>4</sub>) H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 7.0 g L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1,0 g L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 0.3 g L<sup>-1</sup>, pH 5)<sup>(20, 21)</sup>, con lactosa al 1% como única fuente de carbono. Una vez esterilizado en autoclave, al caldo fermentativo se le agregó 1 mL del inóculo de conidias de *Trichoderma* conteniendo  $15 \times 10^6$  ufc mL<sup>-1</sup> y se incubó a 28 °C con agitación durante 6 días, los matraces fueron cubiertos con papel Kraft con el fin de reducir la esporulación. Luego, al caldo filtrado y centrifugado de estas fermentaciones se les determinó las proteínas y actividad enzimática de la  $\beta$ -galactosidasa.

Para cuantificar la producción de proteínas totales se aplicó el método colorimétrico de Lowry según Salgado & Jover<sup>(22)</sup>, se preparó una batería de ocho tubos a los que se agregaron los diferentes reactivos en el orden y concentraciones indicadas en la Tabla 1, las absorbancias fueron leídas en el espectrofotómetro a 580 nm.

**Tabla 1.** Protocolo para la determinación de proteínas mediante el método de Lowry

Tubos	Agua (mL)	BSA (2mgmL <sup>-1</sup> )	Muestra (mL)	Reactivo C (mL)	Folin Ciocalteau (mL)
1	0,5	0,0	-	5	0,5
2	0,4	0,1	-	5	0,5
3	0,3	0,2	-	5	0,5
4	0,2	0,3	-	5	0,5
5	0,1	0,4	-	5	0,5
6	0,0	0,5	-	5	0,5
7	0,5	-	0,5	5	0,5
8	0,7	-	0,3	5	0,5

Con las absorbancias obtenidas se construyó una curva patrón, la que fue corregida por regresión lineal simple mediante el método de mínimos cuadrados empleando el software Excel 98: la concentración de proteínas en los caldos fermentativos se determinó interpolando las absorbancias experimentales con la curva patrón corregida.

Para determinar la presencia y actividad de la β- D- galactosidasa producida por los cultivos de *Trichoderma* se realizó la prueba de la ONPG<sup>(21)</sup>, que utiliza como sustrato artificial el orto-nitrofenil- β- D – galactopiranosido, compuesto similar a la lactosa, pero que presenta el orto-nitrofenol en lugar de la glucosa; el cual al liberarse al medio por acción de la β- D – galactosidasa produce un color amarillo. Se utilizó el kit Lactase Fluka de acuerdo al siguiente procedimiento: a) se preparó para cada caldo fermentativo de *Trichoderma* un tubo de ensayo al cual se le agregó los componentes, según el protocolo de la tabla 2; b) los tubos fueron incubados durante 5 minutos a 45 °C y pH 5 luego leídos a una absorbancia de 420 nm en el espectrofotómetro.

**Tabla 2.** Protocolo de la prueba ONPG

Tubo	Componentes		
	ONPG	Filtrado	NaCO <sub>3</sub> 10%
Control	1 mL	-	1 mL
Experimental	1 mL	0,2 mL	1 mL

Los resultados de la actividad enzimática se determinaron mediante la siguiente ecuación:

$$AE = 380 \frac{DOw}{t \cdot W}$$

Donde:

- AE = Actividad enzimática (U mg<sup>-1</sup> de proteína).
- DOw = Absorbancia a 420 nm de la muestra.
- t = Tiempo de incubación (minutos).
- W = peso de la proteína presente en la muestra del caldo fermentativo (mg).
- 380 = factor de corrección.

Los resultados obtenidos de las diferentes pruebas fueron procesados estadísticamente mediante el análisis de varianza ANOVA con el fin de determinar las diferencias significativas entre los tratamientos; la diferencia de los promedios fueron determinados por la prueba de significancia de Duncan, a un nivel de confianza del 95 %.

## RESULTADOS

Se observó a *Trichoderma* en un 20,31% de las muestras recolectadas del valle de Tacna; el mayor porcentaje se encontró en las localidades de Calana y Magollo con 4,69%; en menor porcentaje en las localidades de Pocollay, Las Yaras y Pachía con 1,56% cada una (Tabla 3).

**Tabla 3.** Porcentaje de aislamientos de *Trichoderma* obtenidos en las localidades del valle de Tacna

Localidad	N.º de muestras	N.º de aislamientos	Porcentaje (%)
Calana	8	3	4,69
Magollo	8	3	4,69
La Yarada 5 y 6	8	2	3,13
Tacna	8	2	3,13
Pocollay	8	1	1,56
Las Yaras	8	1	1,56
Pachía	8	1	1,56
Los Palos	8	0	0,00
Total	64	13	20,31

Se aislaron trece cultivos de *Trichoderma* entre ellos se identificaron tres especies (*T. harzianum*, *T. viride*, *T. aureoviride*) y cuatro solo hasta género; a todos los cultivos se les asignó un código (Tabla 4 y Figuras 1-6).

**Tabla 4.** Cultivos de *Trichoderma* aislados en las diferentes localidades del valle de Tacna

Número de cultivo	Localidad	Nombre del cultivo identificado
1	Pachía	<i>T. harzianum</i> TPO1
2	Calana	<i>T. harzianum</i> TCO1
3		<i>Trichoderma</i> sp. TCO2
4		<i>T. viride</i> TCO3
5	Pocollay	<i>Trichoderma</i> sp. TPYO1
6	Tacna	<i>Trichoderma</i> sp. TTO1
7		<i>Trichoderma aureo-viride</i> TTO2
8	Magollo	<i>T. harzianum</i> TMO1
9		<i>T. harzianum</i> TMO2
10		<i>T. harzianum</i> TMO3
11	Las Yaras	<i>Trichoderma</i> sp. TYO1
12	Yarada 5 y 6	<i>T. harzianum</i> TLYO1
13		<i>T. aureoviride</i> TLYO2

**Figura 1.** *T. harzianum* (V. macroscópica)**Figura 2.** *T. harzianum* (V. microscópica)**Figura 3.** *T. harzianum* (V. macroscópica)**Figura 4.** *T. harzianum* (V. microscópica)**Figura 5.** *T. harzianum* (V. macroscópica)**Figura 6.** *T. harzianum* (V. microscópica)

Los valores de proteínas totales producidos por los cultivos de *Trichoderma* en el líquido fermentado muestran que *T. harzianum*, (SENASA), produjo el más alto valor con 0,371 mg L<sup>-1</sup> seguido de *T. harzianum* TP01, aislado de Pachía, con 0,310 mg L<sup>-1</sup> (Tabla 5).

**Tabla 5.** Proteínas totales producidas por los cultivos de *Trichoderma* aislados en el valle de Tacna

Cultivos	Proteínas totales (mg mL <sup>-1</sup> )			
	Repeticiones			Promedio
	R1	R2	R3	
<i>T. harzianum</i> TPO1	0,316	0,291	0,322	0,310
<i>T. harzianum</i> TCO1	0,259	0,223	0,232	0,238
<i>Trichoderma</i> sp. TCO2	0,298	0,187	0,278	0,254
<i>T. viride</i> TCO3	0,178	0,154	0,122	0,151
<i>Trichoderma</i> sp. TPYO1	0,238	0,214	0,222	0,225
<i>Trichoderma</i> sp. TTO1	0,177	0,147	0,181	0,168
<i>Trichoderma aureoviride</i> TTO2	0,280	0,298	0,275	0,284
<i>T. harzianum</i> TMO1	0,218	0,222	0,201	0,214
<i>T. harzianum</i> TMO2	0,226	0,208	0,212	0,215
<i>T. harzianum</i> TMO3	0,263	0,271	0,251	0,262
<i>Trichoderma</i> sp. TYO1	0,341	0,305	0,298	0,315
<i>T. harzianum</i> TLYO1	0,310	0,294	0,308	0,304
<i>T. aureoviride</i> TLYO2	0,251	0,244	0,231	0,242
<i>T. harzianum</i>	0,354	0,373	0,383	0,371

Por análisis de varianza, los cultivos de *Trichoderma* aislados del valle de Tacna presentaron en la producción de proteínas totales diferencias significativas entre los promedios obtenidos a un nivel de confianza del 95%.

Por la prueba de significancia de Duncan los

cultivos de *Trichoderma* presentaron diferencias de promedios; siendo los cultivos con más alto valor *T. harzianum* con 0,371 mg mL<sup>-1</sup> de proteínas totales, seguido de *Trichoderma* sp. TY1 con 0,315 mg mL<sup>-1</sup> y de *T. harzianum* TP1 con 0,309 mg mL<sup>-1</sup>, y los de más bajo valor *Trichoderma* sp. TT01 con 0,168 mg mL<sup>-1</sup> y *T. viride* TCO3 con 0,151 mg mL<sup>-1</sup> (Tabla 6).

**Tabla 6.** Prueba de significancia de Duncan para las proteínas totales producidas por los cultivos de *Trichoderma* aislados en el valle de Tacna

Número	Cultivos	Promedios (mg mL <sup>-1</sup> )	Significancia (0,05)
1	<i>T. harzianum</i>	0,371	a
2	<i>Trichoderma</i> sp. TYO1	0,315	b
3	<i>T. harzianum</i> TPO1	0,309	bc
4	<i>T. harzianum</i> TLYO1	0,304	bcd
5	<i>Trichoderma aureoviride</i> TTO2	0,284	Bcde
6	<i>T. harzianum</i> TMO3	0,262	Bcdef

Número	Cultivos	Promedios (mg mL <sup>-1</sup> )	Significancia (0,05)
7	<i>Trichoderma</i> sp. TCO2	0,254	Bcdefg
8	<i>T. aureoviride</i> TLYO2	0,242	Defgh
9	<i>T. harzianum</i> TCO1	0,238	Defgh
10	<i>Trichoderma</i> sp. TPY01	0,225	Fgh
11	<i>T. harzianum</i> TMO2	0,215	Fghi
12	<i>T. harzianum</i> TMO1	0,214	Ghi
13	<i>Trichoderma</i> sp. TTO1	0,168	I
14	<i>T. viride</i> TCO3	0,151	I

Por el análisis de varianza los promedios de la actividad enzimática de la  $\beta$  – galactosidasa de los cultivos de *Trichoderma* mostraron diferencias significativas a un nivel de confianza del 95%.

Por la prueba de significancia de Duncan para la actividad enzimática de la  $\beta$  – galactosidasa de los cultivos de *Trichoderma* se encontró que hubo

diferencia de promedios entre ellas hasta en diez niveles; siendo que el cultivo *Trichoderma* sp. TP01, tuvo la mejor actividad enzimática con 18,512 U mg<sup>-1</sup> de proteína seguido de *Trichoderma* sp. TCO2 con 17,031 U mg<sup>-1</sup>, a diferencia de los cultivos de *Trichoderma* sp. TPY01 y *T. harzianum* TLY01 que presentaron la menor actividad enzimática (Tabla 7).

**Tabla 7.** Prueba de significancia de Duncan para la actividad enzimática de la  $\beta$  – galactosidasa producida por los cultivos de *Trichoderma* aisladas en el valle de Tacna

Número	Tratamientos	Promedios (U mg <sup>-1</sup> proteína)	Significancia
1	<i>Trichoderma</i> sp. TTO1	18,512	A
2	<i>Trichoderma</i> sp. TCO2	17,031	Ab
3	<i>T. harzianum</i> TMO1	16,368	Abc
4	<i>T. harzianum</i> TMO2	14,468	Cd
5	<i>T. viride</i> TCO3	12,048	De
6	<i>T. harzianum</i> TCO1	11,823	E
7	<i>Trichoderma aureoviride</i> TTO2	11,760	Ef
8	<i>T. aureoviride</i> TLYO2	10,673	Efg
9	<i>T. harzianum</i>	9,176	Gh
10	<i>T. harzianum</i> TM03	8,013	Ghi
11	<i>T. harzianum</i> TPO1	6,381	Ij
12	<i>Trichoderma</i> sp. TY01	4,474	JK
13	<i>Trichoderma</i> sp. TPY01	3,382	K
14	<i>T. harzianum</i> TLY01	3,00	K

## DISCUSIÓN

En la actualidad se conoce la existencia de microorganismos procariontes y eucariontes, como las bacterias, actinomicetos y hongos, que son utilizados en la microbiología industrial para la producción de compuestos farmacéuticos, aditivos alimentarios, enzimas y compuestos químicos; lo cual ha llevado a la búsqueda de nuevas cepas de interés industrial con el fin de evaluar su capacidad y mejorarlas mediante procesos de mutación o recombinación <sup>(23)</sup>.

Los hongos son un grupo de organismos eucariontes que agrupan a las levaduras y mohos filamentosos, caracterizados por presentar una pared celular rígida, reproducción sexual y asexual, metabolismo externo, debido a que liberan sus enzimas sobre los substratos para obtener energía y fuentes de carbono y a la vez pueden ser aislados de diferentes ambientes en donde forman grandes comunidades <sup>(4, 15, 23, 24, 25)</sup>.

Los mohos filamentosos más utilizados industrialmente pertenecen a los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Humicola*, *Cephalosporium* y *Trichoderma* <sup>(8)</sup>; Kubicek & Harman <sup>(1)</sup> mencionan que las especies del género *Trichoderma* producen un gran número de enzimas intracelulares y extracelulares de interés industrial como las dextranasas, celulasas, xilanasas, entre otras; razón por la cual, en este se buscó cultivos nativos de *Trichoderma* capaces de producir la enzima  $\beta$  – galactosidasa y seleccionar a las mejores para que con estudios posteriores complementarios puedan ser utilizados en el deslactosado de la leche.

La baja frecuencia del número de aislamientos de *Trichoderma* (Tabla 3) puede deberse, en parte, a los factores medioambientales en las zonas de cultivo durante la estación de verano, donde hubo variaciones de marcada humedad relativa y temperatura; según Deacon <sup>(24)</sup> los hongos necesitan una humedad relativa del 70% para desarrollarse, y que valores por debajo de este disminuye su crecimiento, nosotros recolectamos las muestras de suelo en la estación de verano donde la humedad relativa promedio fue del 62,4% de acuerdo a los datos meteorológicos del SENAMHI; además, las zonas de cultivo se secaban rápidamente a consecuencia de la alta radiación solar y riesgos distanciados.

Por otro lado, la temperatura máxima promedio osciló entre 27,6 a 29,5 °C y según Deacon <sup>(24)</sup> y Atlas <sup>(26)</sup> la mayoría de los hongos mesófilos crecen en el rango de 25 a 35 °C; estas variaciones de humedad y temperatura pudieron inducir a la formación de estructuras de resistencia como clamidosporas y limitar su número poblacional; del mismo modo, Kubicek & Harman <sup>(1)</sup> indican que la temperatura óptima para *Trichoderma* está en el rango de 25 a 30 °C y que las diferentes especies desarrollan óptimamente a diferentes valores de temperatura, como en *T. hamatum*, *T. koningii* y *T. harzianum* especies que crecen rápidamente a 25 °C desplazando a otras; a diferencia de *T. viride* y *T. polysporum* que son más competitivos a temperaturas inferiores a 25 °C; estas variaciones de temperatura pudieron incidir en nuestros resultados debido a que aislamos seis especies de *T. harzianum*, dos de *T. aureoviride* y una de *T. viride* (Tabla 4); además, el aislamiento primario se realizó bajo condiciones de laboratorio donde la temperatura varió entre 25 a 26 °C.

El número limitado de especies de *Trichoderma* aisladas puede deberse a varias razones. Los suelos de las localidades en donde se realizó el muestreo son escasos en materia orgánica y la fertilización es exclusivamente a base de compuestos inorgánicos, esto limita el crecimiento del hongo debido a que *Trichoderma* es un saprófito que se encuentra y desarrolla en la materia orgánica en descomposición formando comunidades con otros microorganismos <sup>(1, 15, 24)</sup>.

También se puede sospechar de la presencia de fungistáticos o fungicidas empleados en campañas anteriores para mitigar el ataque de mohos fitopatógenos como *Fusarium*, *Phyium* y *Rhizoctonia*; lo cual pudo reducir su presencia, al respecto Agrios <sup>(27)</sup> manifiesta que el uso de compuestos a base de cobre y heterocíclicos como las acilacininas (Ridomil) o benzimidazoles (Benlate) son fungicidas de amplio espectro que tienen un efecto directo sobre los fitopatógenos y saprófitos, según algunos agricultores son los más utilizados en el valle de Tacna, a propósito Kubicek & Harma <sup>(1)</sup> indican que muchas esporas responden mediante mecanismos de defensa inhibiendo su germinación y que alrededor del 10% de las conidias se forman no viables y son difíciles de reactivar.

Rifai<sup>(5)</sup> y Kubicek & Harman<sup>(1)</sup> indican que el género *Trichoderma* es ubicuo, encontrándola en casi todas las regiones del mundo, lo cual fue corroborado en nuestra investigación al aislar tres especies del género *Trichoderma* (Tabla 4): *T. harzianum*, *T. aureoviride* y *T. viride*, según García<sup>(28)</sup> y Castillo<sup>(29)</sup> reportan la especie de *T. aureoviride* en la localidad de la Yarada 5 y 6 lo que corrobora que es una especie nativa de esa localidad, la presencia de seis cultivos de *T. harzianum* en las zonas de muestreo puede deberse a que sean oriunda de esas zonas o que hayan ingresado como parte del programa de control biológico promovido por el SENASA a nivel nacional al vender a los agricultores preparados fúngicos a base de *T. harzianum*, esto a razón de que existen reportes previos que indican la presencia de esta especie en los suelos de la región de Tacna.

Para Gacesa & Hubble<sup>(6)</sup>, la producción de  $\beta$  – galactosidasa o lactasa a partir de levaduras y mohos filamentosos utilizando leche o suero de leche como medio de fermentación, ha despertado gran interés en la industria alimentaria ya que se obtiene un producto de mayor dulzor a consecuencia de la glucosa y galactosa; mejora su solubilidad, digestibilidad y representa una conversión adecuada a bajo costo en la industria alimentaria; esto motivó la realización de evaluaciones sobre la producción de  $\beta$  – galactosidasa por los cultivos de *Trichoderma* aislados en el valle de Tacna.

En la Tabla 6 se observa que el cultivo control *T. harzianum* produce 0,371 mg mL<sup>-1</sup> de proteínas totales seguido del *Trichoderma* sp. TY01 con 0,315 mg mL<sup>-1</sup> y 0,309 en *T. harzianum* TP01 a diferencia de *Trichoderma* sp. TT01 y *T. viride* TC03 que presentan los valores más bajos con 0,168 mg mL<sup>-1</sup> y 0,151 mg mL<sup>-1</sup> respectivamente. El orden de estos valores no son correspondientes al de la actividad enzimática de cada *Trichoderma* (Tabla 7); el más alto valor de proteínas totales no significa que corresponda al más alto valor de actividad enzimática; es que las proteínas totales encontradas solo nos da una indicación probable de la producción de la  $\beta$  – galactosidasa, puede haber otros tipos más de proteínas<sup>(30)</sup>.

La determinación de proteínas totales se realizó tomando en cuenta los trabajos de Seyis & Aksoz<sup>(21)</sup>, quienes manifiestan que gran parte de las proteínas evaluadas en el fermentador corresponden a la enzima debido a que la lactosa induce su síntesis,

al servir como fuente de carbono la que utilizó el hongo para su desarrollo, esto fue corroborado con la prueba de la ONPG.

La presencia de peptona y extracto de levadura como componentes del medio de fermentación LPM obviamente debió inducir al hongo a sintetizar otras enzimas con el fin de captar una fuente nitrógeno y carbono para formar estructuras en el anabolismo microbiano. En bacterias y levaduras se tiene el reporte de la presencia de la  $\beta$ –galactosido permeasa, enzima que interviene en el transporte de la lactosa al interior de la célula; en los filtrados obtenidos de caldos fermentativos de origen bacteriano lo cual obviamente incrementa la presencia de proteínas totales<sup>(30)</sup>.

Los valores de proteínas totales producidos por los cultivos de *Trichoderma* son significativos (Tabla 6). Según Crueger & Crueger<sup>(8)</sup> esto indica que a nivel de los mohos, el 80% de la enzima  $\beta$  – galactosidasa es liberada al exterior a diferencia de las levaduras *Kluyveromyces lactis*, *K. fragilis* y *K. marxianus* que llevan a cabo la hidrólisis a nivel citoplasmático, lo que dificulta y encarece el aislamiento de esta enzima.

En la Tabla 7 se muestran los valores promedio de la actividad enzimática de la  $\beta$  – galactosidasa de los cultivos de *Trichoderma*, donde *Trichoderma* sp. TT01 aislado de la localidad de Tacna ocupa el primer lugar con 18,512 U mg<sup>-1</sup> seguido de *Trichoderma* sp. TC02 procedente de calana con 17,031 U mg<sup>-1</sup> y *T. harzianum* TM01 de Magollo con 16,368 U mg<sup>-1</sup>, estos valores se encuentran dentro del rango normal para cultivos nativos del género *Trichoderma* como lo reporta Seyis & Aksoz<sup>(21)</sup> al evaluar cepas nativas de *Trichoderma*, *Aspergillus* y *Penicillium* encontraron que *T. harzianum* 1073D2, *T. harzianum* 1620D2 y *T. viride* presentan una actividad de 10 U mg<sup>-1</sup> a 20 U mg<sup>-1</sup>, valores similares a los nuestros, pero menores a las cepas mejoradas de *T. harzianum* 1073D3 y *T. viride* ATCC32098 que presentaron valores de 40 hasta 60 U mg de proteína.

Macris & Markakus<sup>(11)</sup> reportaron que los cultivos nativos de los géneros *Fusarium*, *Rhizopus*, *Penicillium* y *Aspergillus* que ellos aislaron presentaron una actividad entre 7,5 U mg<sup>-1</sup> a 15 U mg, valores intermedios a los nuestros.

Los diferentes valores de actividad enzimática de la  $\beta$  – galactosidasa de los cultivos de *Trichoderma* aislados, inclusive de aislamientos de un mismo lugar que se muestran (Tabla 4) era de esperar; Crueger & Crueger <sup>(8)</sup>, Wainwright <sup>(25)</sup> y Madigan *et al.* <sup>(23)</sup> indican que los cultivos nativos muestran una  $\beta$  – galactosidasa con poca actividad, debido a la influencia del medioambiente donde se desarrollan; se pueden encontrar microorganismos dentro de un mismo género que producen la misma enzima con diferente grado de estabilidad, a condiciones extremas; esto puede apreciarse en el presente trabajo, donde los cultivos aislados de una misma localidad no tienen el mismo comportamiento, ejemplo es el caso de *Trichoderma* sp. TT01 que tiene una actividad 18,512 U mg<sup>-1</sup> en tanto que *T. aureoviride* TT02 presenta una menor actividad de 11,760 U mg<sup>-1</sup> ambas aisladas de la localidad de Tacna, observándose comportamientos similares en los otros cultivos.

Dado que las  $\beta$  – galactosidasas producidas por los cultivos de *Trichoderma*, aisladas de la localidad de

Tacna presenta un rango de actividad enzimática aceptable y considerando que las  $\beta$  – galactosidasas de hongos miceliales son más utilizadas como las de *A. oryzae* y *A. niger*; además de las levaduras *Kluyveromyces fragilis* y *Torula cremoris*. Otro microorganismo como es la bacteria *Escherichia coli* fue bastante estudiado en cuanto a la producción de la enzima. Se sugiere la conservación y la mejora genética de cultivos de *Trichoderma* aislados para el incremento de la producción de la  $\beta$  – galactosidasa <sup>(6, 8)</sup>.

## CONCLUSIONES

Se aislaron 13 cultivos de *Trichoderma* que representó el 20,31 % de un total de 64 muestras de suelo del valle de Tacna, encontrándose 4,69 % con mayor frecuencia en las localidades de Calana y Magollo. Se identificaron tres especies: *T. harzianum*, *T. aureoviride* y *T. viride*. Todos los *Trichoderma* investigados fueron productoras de  $\beta$  – galactosidasa siendo *Trichoderma* sp. TT01, aislado de Tacna, el que tuvo la más alta actividad enzimática con 18,512 U mg<sup>-1</sup> proteína.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kubicek C. & Harman G. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 1, Basic biology, taxonomy, 1998. Copyright Taylor and Francis. USA.
2. Torres-De la Cruz Magdiel et al. Diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. Revista Mexicana de biodiversidad. 2015. Vol 86. Issue 4.
3. Nawaz Kiran *et al.* Diversity of *Trichoderma* species in Chili rhizosphere that promote vigor and antagonism against virulent *Phytophthora capsici*. Elsevier. Scientia horticulturae. 2018. Vol. 239. Pp242-252.
4. Díaz C. Yohana. Aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Bacillus* spp. y *Trichoderma* spp. de la rizósfera de cafeto con potencial antagonista frente a *Fusarium oxysporum* del valle de Monzón Huánuco-Perú. Tesis para obtener título profesional. Universidad Nacional Mayor de San Marcos- Perú. 2019.
5. Rifai M.A. A revisión of the genus *Trichoderma*. Mycological papers N° 116. Commonwealth Mycological Institute. 1969. England.
6. Gacesa P. & Hubble J. Tecnología de las enzimas. Editorial Acribia S. A. 1990. Zaragoza. España.
7. Hassan Noor *et al.* Fungi in acidic fire: a potencial source of industrially important enzymes. Elsevier. Fungal biology reviews. 2019. 33, 58-71.
8. Crueger W. & Crueger A. Biotecnología: Manual de microbiología industrial. Editorial Acribia. 1993. Zaragoza. España.
9. Murray R., Mayes P., Granner D. & Rodusell V. Bioquímica de Harper. 16va. Edición. Editorial Manuel Moderno. 2004. México.
10. Gekas V. & López-Leiva M. Hydrolysis of lactose. Process Biochem. 1985. 2:2-12. USA.
11. Macris B., Markakus P. Characterization of extracellular  $\beta$  – D – Galactosidase from *Fusarium moniliforme* grow in whey. 1981. Michigan state University. Greece.
12. Singleton L. Mihail J. & Rush C. Methods for research on soil-borne Phytopathogenic fungi. APS PRESS. 1992. Minnesota. USA.
13. Alexander M. Introducción a la Microbiología de suelos. AGT Editor S.A. 1980. México.
14. Gilman J. Manual de los hongos del suelo. 2da. Edición. Compañía Editorial Continental S. A. 1963. México.
15. Carrillo L. Microbiología agrícola. Editorial Ateneo. 2003. Buenos Aires. Argentina.
16. ICMSF. 2000. Microbiología de los alimentos I. Su significado y

- métodos de enumeración. 2da. Edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. 2000. España.
17. Shalini B., Narayan K. & Kulas-thane A. *Trichoderma* isolates inhibiting pathogenic fungi *Rhizoctonia solani*. African Journal of biotechnology. 2006. (8): 580-584. Africa.
  18. Carrillo L. Hongos Micotoxigénicos: aislamiento y purificación. Editorial El Ateneo. 1998. Buenos Aires. Argentina.
  19. Barnett H. & Hunter B. Illustrated genera of imperfect fungi 4th. APES PRES. 1998. Minnesota. USA.
  20. Fiederuck J. & Ilezuk Z. Producción de lactosa por *Aspergillus niger*. Acta microbiológica. 2001. Turquía.
  21. Seyis I. & Aksoz N. Production of lactase by *Trichoderma* sp. Papers N° 42. Hacettepe University, Department of Biology, 2004. Ankara Turkey.
  22. Salgado J. & Jover R. Biología celular y molecular. Guía de prácticas de Laboratorio. UNMSM. 2005. Lima . Perú.
  23. Madigan M., Martrinko J. & Parker J. Brock: Biología de los microorganismos. 8va. Edición. Editorial Printice Hall. 1998. España.
  24. Deacon J. W. Introducción a la micología moderna. Editorial Limusa. 1990. México.
  25. Wainwright M. Introducción a la biotecnología de los hongos. Editorial Acribia, S.A. 1995. Zaragoza. España.
  26. Atlas R. Microbiología: Fundamentos y aplicaciones. Compañía Editorial Continental S.A.C. 1991. México.
  27. Agrios G. Fitopatología. Editorial Limusa S.A. 1996. México.
  28. García F. Antagonismo de *Trichoderma aureoviride* en el control de *Fusarium oxysporum* en *Allium cepa* L. Tesis. FACI. UNJBG. 2001. Tacna.
  29. Castillo D. Evaluación del crecimiento y desarrollo de *Trichoderma aureoviride* TAT-1 en una fermentación de estado sólido sobre substrato arroz. FACI. COIN. UNJBG. 2005. Tacna. Perú.
  30. Shalkh S., Khire J. & Khan M. Acta characterization of a thermostable extracelular  $\beta$  - galactosidase from thermophilic fungus *Rhizopus*. Biochin Biophys. 2004. ( 2 ): 314 - 322.

---

**Correspondencia**

Daladier Castillo Cotrina  
 Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann - Av. Miraflores s/n., Tacna 32000 - Perú  
 daladiercastillo@hotmail.com