



## Reproducción masiva de hongos *trichodermas* previamente identificados de suelos Nicaragüenses en diferentes sustratos orgánicos

### Mass reproduction of previously identified *trichodermas* fungi from Nicaraguan soils in different organic substrates

Tatiana de los Ángeles López Martínez<sup>1</sup>, Leandro Alberto Páramo Aguilera<sup>2\*</sup> y Heysell Dodanig Delgado Silva<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Universidad Nacional de Ingeniería. Facultad de Ingeniería Química. Managua, Nicaragua.

<sup>2</sup> Universidad Nacional de Ingeniería. Programa de Investigación, Estudios Nacionales y Servicios del Ambiente (PIENSA). Managua, Nicaragua.

\*lparamo2014@gmail.com

(recibido/received: 11-mayo-2022; aceptado/accepted: 01-agosto-2022)

#### RESUMEN

Los hongos *Trichodermas* son de vital importancia para mantener los cultivos de plantas libres de hongos fitopatógenos, por ende, la presente investigación permitió determinar el mejor sustrato orgánico para la reproducción masiva de *Trichodermas*, previamente identificadas de suelos nicaragüenses. Utilizando sustratos como: Arroz (testigo), Maíz, Olote de maíz, Copra de coco y Melaza, con 5 cepas de hongos que fueron identificados como *Trichoderma harzianum* (72TG-11), *Trichoderma harzianum* (T3), *Trichoderma harzianum* (CVD-06), *Trichoderma sp.* (CIXD-11) y *Trichoderma longibrachiatum* (QIVD-12). Mediante fermentación sólida y bifásica, se realizó la producción de esporas por 26 y 15 días, respectivamente, obteniéndose que con olote de maíz se produjo concentraciones de esporas muy cercanos a los obtenidos con el arroz; la adición de melaza a los sustratos, produjo un ligero aumento en la concentración de esporas en comparación a los obtenidos sin melaza, excepto en las cepas T3 y CVD-06, lo cual aparentemente no muestra diferencias apreciables en el número de esporas obtenidos. Por otro lado, el olote de maíz es el mejor sustrato para la reproducción masiva de hongos *Trichodermas*, ya que se obtienen resultados satisfactorios en ambas fermentaciones y no compete con el alimento del ser humano.

**Palabras claves:** Acción antagónica, *Trichodermas*, sustrato orgánico, olote de maíz, copra de coco, esporas.

#### ABSTRACT

*Trichodermas* mushrooms are of vital importance to keep plant crops free of phytopathogenic fungi, so the present research consisted of finding the best organic substrate for the mass reproduction of *Trichodermas* fungi, previously identified from Nicaraguan soils. Substrates were used such as Rice in the control, Corn, Corn cob, Coconut Copra and Molasses as a supplement to the before mentioned substrates, with 5 strains, previously identified as *Trichoderma harzianum* (72TG-11), *Trichoderma harzianum* (T3), *Trichoderma harzianum* (CVD-06), *Trichoderma sp.* (CIXD-11) y *Trichoderma longibrachiatum* (QIVD-12).

Through solid and biphasic fermentation, the spore production process was carried out for 26 and 15 days, respectively; obtaining as a result that the corn cob substrate yielded spore concentration very close to those obtained with the rice substrate. With molasses addition to the different substrates, a slight increase of the concentration spores compared to those obtained in substrates without molasses was obtained, except with the strains T3 and CVD-06, where apparently there aren't appreciable difference in the number of spores obtained. In the other hand, corn cob substrate is the best substrate for mass reproduction of *Trichodermas* fungi, since satisfactory results are obtained in both fermentations and there aren't competition with human being food.

**Keywords:** Antagonistic action, *Trichodermas*, organic substrate, corn cob, coconut copra, spores.

## INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, se ha mostrado gran interés en estudiar el potencial de *Trichoderma* de parte de varios investigadores y algunas empresas, caracterizando dicho hongo como un controlador biológico de patógenos del suelo. Los hongos del género *Trichoderma sp.* son un grupo de microorganismos que habitan naturalmente en suelos agrícolas, con abundante materia orgánica en descomposición y alta densidad de raíces. *Trichoderma sp.* se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo, y también se encuentra en Nicaragua en grandes cantidades (Castillo, 2020).

Para la reproducción de esporas de *Trichodermas* en medio de cultivo Potato Dextrose Agar (PDA) presenta un crecimiento colonial rápido de 3 días entre 25-30°C. En este medio, las colonias son de aspecto algodonoso que se compactan con el tiempo. Cuando su desarrollo es alternado con períodos de luz y oscuridad, se aprecian las zonas de crecimiento correspondiente a cada período. En ausencia de luz el micelio es de color blanco algodonoso y en presencia de luz se observa la esporulación con tonalidades verdosas, dando la apariencia de anillos en forma concéntrica. Al crecer en medio de cultivo, se observa en el reverso de la placa petri, un color crema y en ocasiones una pigmentación amarillenta (Windham, *et al.*, 1986).

Chávez, *et al.*, 2009, probaron sustratos como: arroz 53% (p/p), arroz 53% (p/p)-melaza 3% (p/p) y arroz 53% (p/p)-melaza 10% (p/p), donde el porcentaje faltante es agua destilada. Los tratamientos se sometieron a cambios en períodos de luz constante y fotoperiodos 24 h luz/24 h oscuridad durante 8 días con incubación a 25°C. Los parámetros estimados fueron densidad poblacional (conidios/mL), germinación de esporas a 24 horas y porcentaje de pureza. Los resultados indicaron que el proceso de fermentación sólida empleando como sustrato arroz-agua destilada a 25°C y la exposición constante a la luz permitió mayor recuperación de conidios ( $40 \times 10^{16}$  conidios/mL), con 92% de germinación a 24 horas y una pureza estimada de 92.30%. Por otro lado, García, *et al.*, 2006 y Agamez, *et al.*, 2008, utilizaron melaza para la reproducción de biomasa de *Trichodermas* obteniendo valores entre  $10^8$  y  $10^9$ , sin embargo, para obtener un buen crecimiento adicionan levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y en otros casos Urea. Finalmente, Michel, *et al.*, 2008, utilizaron 15 sustratos orgánicos diferentes para la reproducir *Trichodermas* obteniendo como resultado que el mejor sustrato es el olote de maíz con una concentración de esporas de  $4.43 \times 10^8$  ml<sup>-1</sup>, además concluyeron que para el caso de la cepa *Trichoderma harzianum* tiene una buena producción en aquellos sustratos orgánicos que tienen alto porcentaje de humedad, bajo contenido de minerales, proteína y grasa, y un porcentaje intermedio de fibra. Por otro lado, Vaillant, *et al.*, 2016; Campos, 2009, y Osuna, *et al.*, 2012, realizaron el mismo procedimiento en fibra (copra) de coco, donde se obtuvo un buen crecimiento de los hongos *Trichodermas* adicionando materia orgánica.

El presente trabajo, tuvo por objeto, la evaluación de distintos sustratos para la reproducción de *Trichodermas* previamente aislados e identificados en el laboratorio de Biotecnología del PIENSA-UNI, procedentes de diferentes lugares de Nicaragua y con el fin de obtener el mejor de ellos en cuanto a producción de esporas y por, sobre todo, que éste no fuese de consumo humano. Finalmente, que el

producto obtenido se pudiera aplicar al campo para hacer uso de todos los beneficios que poseen estos hongos analizando la incidencia de algunos factores ( luz, humedad, temperatura, etc.) que afectan directamente el crecimiento de biomasa de una cepa de *Trichoderma sp.* en fermentación sólida y bifásica, utilizando los sustratos Arroz como testigo, Maíz triturado, Olote de maíz triturado y Copra de coco, además utilizando melaza como suplemento para los mismos sustratos. Por otro lado, no se obtuvo crecimiento en copra de coco, debido a que se necesitan otros nutrientes para que el hongo pueda reproducirse satisfactoriamente, los hongos *Trichodermas* toman nutrientes de otros hongos (a los cuales degradan) y de materiales orgánicos ayudando a su descomposición, por lo cual las incorporaciones de materia orgánica y el compostaje lo favorecen, por lo que en los casos donde se usa copra de coco como sustrato, contienen la mayor proporción de estos en su formulación (Ramírez, 2006).

## METODOLOGÍA

### *Cultivo monospórico y crecimiento radial*

Primeramente, se realizó una siembra de los hongos *Trichodermas* identificados en placas petri con medio sólido Potato Dextrose Agar (PDA) con un periodo de crecimiento de 48 horas, esto es con el fin de obtener cultivos metabólicamente activos y con un desarrollo óptimo de crecimiento (**Figura 1A**). Posteriormente, se realizan una serie de diluciones (**Figura 1B**) con el fin de obtener una sola espora totalmente aisladas de las demás (French y Hebert, 1980) (**Figura 1C**), además analizar el crecimiento radial del hongo cada 12 o 18 horas hasta llenar totalmente la placa petri (Gómez, *et al.*, 2013) (**Figura 1D**).

### *Preparación y esterilización de sustratos orgánicos*

Este procedimiento se realizó siguiendo la metodología descrita por Michel, *et al.*, 2008, tomándose en cuenta que cada uno de los sustratos se manipula de manera distinta, los sustratos utilizados fueron arroz como testigo, maíz triturado, olote de maíz triturado y copra de coco triturada, de la cual se pesaron 100 gramos de cada uno para ambas fermentaciones (sólida y bifásica). Para la fermentación sólida el sustrato pesado se dejó en remojo durante 15 minutos y posteriormente, se secó encima de papel craft cambiándolo periódicamente, mientras que para la fermentación bifásica el tiempo de remojo fue de 45 minutos. Al concluir la etapa de secado, se procedió a empacar los sustratos en bolsas plásticas, éstas fueron selladas con cintas de tela de algodón, para permitir aireación en el interior de la misma. Las bolsas debidamente selladas fueron sometidas a autoclave por 15 minutos a 121°C y 103.5 kPa (15psi), finalmente, se dejaron secar a temperatura ambiente durante 13 horas aproximadamente, donde posteriormente fueron inoculadas con los hongos (**Figura 1E**).

### *Fermentación sólida*

Una vez obtenida las placas Petri totalmente llenas y esporuladas con los hongos se le agregó 3 ml de Tween 80 al 0.1% y 4 ml de antibiótico (Amoxicilina MK 500 mg) (**Figura 1F**), luego con ayuda del asa digralsky con un ángulo de inclinación de 45° se realizó un arrastre de esporas suavemente para obtener una suspensión concentrada (**Figura 1G**), donde posteriormente fueron inoculadas en las bolsas que contenían los sustratos orgánicos estériles y se dejó crecer durante 21 días (Michel, *et al.*, 2008).

### *Fermentación bifásica*

En esta fermentación, se tomó en cuenta la humedad, por lo que se les agregó más líquido que en la fermentación sólida y esto podía desfavorecer el crecimiento de los hongos. Cada sustrato orgánico utilizado en el presente trabajo absorbía diferente cantidad de humedad por lo que el rango de melaza empleada en cada bolsa era de 5-40 mL, cabe mencionar que la inoculación tanto de la melaza y del hongo se llevan a cabo el mismo día y en el mismo momento. Una vez se terminaron de inocular todas las bolsas, se dejaron en crecimiento durante 14 días (Mas, *et al.*, 2019).

### Cosecha de esporas

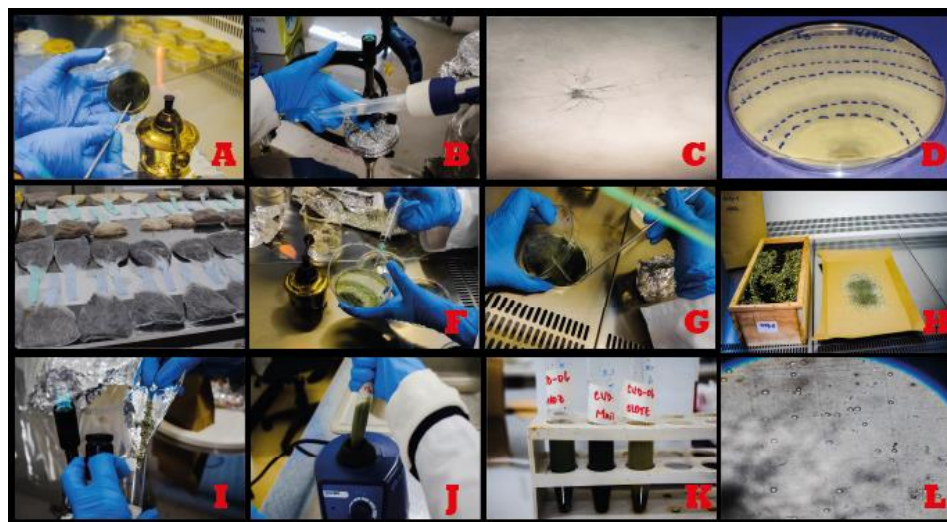
Finalmente, al tener el hongo completamente desarrollado en las bolsas se procedió a separar las esporas del hongo, del material utilizado como sustrato de cada una de las bolsas que contenían las diferentes cepas de *Trichodermas*, para así cuantificar el valor de la concentración de esporas que se obtuvieron en todo el proceso de reproducción masiva. Para la cosecha de esporas, se utilizó una mezcla que consiste en fécula de maíz con gelatina simple, con el fin de que ésta absorbiera la humedad que aun pudieran presentar las bolsas, de tal forma que se obtenga un polvillo mayormente de esporas correspondientes a la cepa *Trichoderma* (Gómez, *et al.*, 2013) (**Figura 1H**).

### Cuantificación de esporas

El conteo de esporas fue realizado en la cámara de Neubauer Modelo doble, siguiendo el procedimiento descrito por Gómez, *et al.*, 2013. Para ello, se pesaron 500 mg de cada muestra (**Figura 1I**), se disolvieron en 10 mL de agua estéril y se agitó con la ayuda de un vortex (**Figura 1J**), posteriormente, se realizó diluciones seriadas con el fin de disminuir la concentración de esporas, luego se tomó una muestra de 10  $\mu$ L de la última dilución (**Figura 1K**) y se colocó en la cámara de Neubauer. Finalmente, se colocó la cámara de Neubauer en el microscopio y se contaron las esporas, tomando en cuenta todas las esporas que se encuentran dentro del cuadrante y las que se encuentran en las líneas de borde superior e izquierda, las esporas que se encuentran en las líneas de borde inferior y derecha no se toman en cuenta (**Figura 1L**).

El modelo matemático utilizado para la cuantificación de esporas es la siguiente ecuación (1) (Gómez, *et al.*, 2013):

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{gramo}} = 10^4 * \left( \frac{\bar{X}}{4} \right) * \left( \frac{V \text{ (mL)}}{Y \text{ (g)}} \right) \quad (1)$$



**Figura 1.** Metodología utilizada para la reproducción de hongos *Trichodermas*. **A:** Activación metabólica de la cepa para el cultivo monospórico, **B:** Diluciones seriadas para obtener esporas separadas entre sí, **C:** Obtención del cultivo monospórico, **D:** Crecimiento radial del cultivo monospórico, **E:** Adición de Tween 80 al 0.1% y antibiótico, **F:** Arrastre de esporas con ayuda del aza digralsky, **G:** Preparación de sustratos orgánicos, **H:** Cosecha de esporas, **I:** muestra representativa para la cuantificación de esporas, **J:** Agitación en vortex de la suspensión concentrada de espóra, **K:** Suspensión de esporas de las cepas en los diferentes sustratos orgánicos y **L:** Cuantificación de esporas mediante la cámara de Neubauer.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los hongos utilizados para la reproducción masiva fueron 5, los cuales fueron seleccionados basándose en el lugar de procedencia y la especie de los *Trichodermas* (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de los hongos seleccionados para la reproducción masiva.

Código del Microorganismo	Lugar de procedencia	Especie
72TG-11	Terrabona, Matagalpa	<i>Trichoderma harzianum</i> .
T3	León	<i>Trichoderma harzianum</i> .
CVD-06	Ticuantepe, Managua	<i>Trichoderma harzianum</i> .
CIXD-11	Ticuantepe, Managua	<i>Trichoderma sp.</i>
QIVD-12	La libertad-Chontales	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> .

En el caso de las cepas 72TG-11, T3 y CVD-06 que corresponden a la especie de *Trichoderma harzianum*, se tomaron en cuenta debido a que el lugar de procedencia son diferentes y a pesar de ser una misma especie su comportamiento es diferente, tanto en su crecimiento en medio sólidos como en sustratos orgánicos. Por otro lado, las cepas CIXD-11 y QIVD-12, que corresponde a *Trichoderma sp.* y *Trichoderma longibrachiatum*, se tomaron en cuenta por ser identificado a nivel de género y una especie diferente de *Trichoderma*, respectivamente.

### Cultivo monospórico y crecimiento radial

Echeverría, 2006, utilizó el procedimiento de cultivo monospórico para separar una espóra de un cultivo multiespórico, de tal forma que asegure la procedencia de la germinación limpia y sin contaminantes del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. El método de cultivo monospórico garantiza la calidad del aislado y certifica que el mismo se encuentre libre de contaminación, esto fue realizado con la finalidad de obtener un crecimiento puro a partir de una espóra para cada hongo a reproducir y analizar su comportamiento mediante el crecimiento radial a través del tiempo (Figura 2).

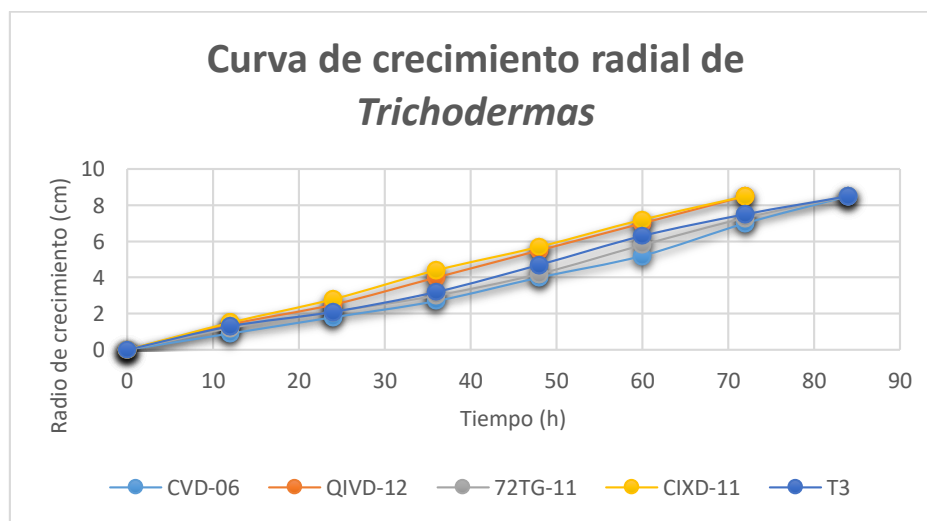
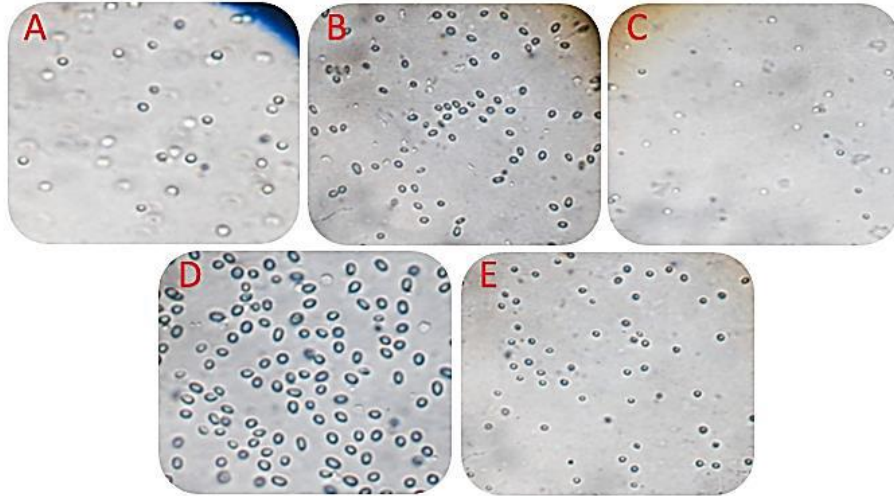


Figura 2. Curva de crecimiento radial de todos los hongos *Trichodermas* utilizados en la reproducción masiva.

En la **Figura 2** se puede observar las diferencias de crecimiento entre todas las cepas de *Trichodermas* que se utilizaron para la reproducción masiva. Siguiendo la leyenda que se encuentra en la parte inferior de la gráfica, se observa que el tiempo de crecimiento hasta que los hongos CIXD-11 (*Trichoderma sp.*) y QIVD-12 (*Trichoderma longibrachiatum*) llenaron la placa petri fue de 72 horas, por otro lado, los hongos T3, 72TG-11 y CVD-06 (todos identificados como *Trichodermas harzianum*) el tiempo que tomaron en llenar toda la placa petri fue de 84 horas. En cuanto al crecimiento radial se puede observar que el comportamiento de las cepas varía en dependencia de la especie y del lugar de procedencia, por ejemplo, los hongos CIXD-11 y QIVD-12 a las 24 horas después de inoculada la espora tienen un radio de crecimiento de 2.8 y 2.5 cm, respectivamente, aunque la diferencia entre los radios es mínima ambos tienen el máximo crecimiento radial de 8.5 cm a las 72 horas. Por último, con respecto a las cepas T3, 72TG-11 y CVD-06 después de las 24 horas de inoculada la espora tienen un radio de crecimiento de 2.1, 2.1 y 1.8 cm, respectivamente, donde el máximo crecimiento radial de 8.5 cm fue a las 84 horas. Chavarría, 2016, analizó el ritmo de crecimiento de aislados de *Trichodermas spp.* Concluyendo, que las especies de *Trichodermas* crecen diferentes y tienen un rango de crecimiento de 60 a 72 horas, lo cual son valores cercanos a los obtenidos en la presente investigación, sin embargo, las diferencias en cuanto al tiempo de crecimiento varían con el tipo de medio del cultivo que se utiliza para este fin, las condiciones de crecimiento, lugar procedencia, etc.

La cinética de crecimiento radial de un hongo permite tener la información del comportamiento del mismo en específico, en las condiciones con las que se requiere trabajar, para que de esta forma, se tenga un manejo total del hongo en cada etapa, para su máximo aprovechamiento; entender cuando esté totalmente desarrollado, en qué momento sus esporas estén en perfectas condiciones, etc. Las características del ritmo de crecimiento encontradas en los diferentes aislados utilizados en este trabajo, concuerdan con lo expresado por otros autores en que los hongos *Trichoderma* son de fácil aislamiento y de crecimiento rápido en muchos medios de cultivos y sustratos (Sivan & Chet, 1989). La cinética de crecimiento es una de las características principales a tomar en cuenta, para evaluar un agente de control biológico, el crecimiento rápido de un aislado es una característica importante al momento de realizar una reproducción masiva del hongo en sustratos orgánicos y para la obtención de un producto formulado, con intenciones de uso en programas de control biológico de hongos fitopatógenos. Cabe recalcar que cada bolsa que contenía el sustrato orgánico fue inoculada con una placa de hongo totalmente esporulada proveniente de una sola espora, esto se realizó con el fin de reducir contaminación por manipulación. En congruencia con esto, se realizó la observación al microscopio de todas las esporas de cada cepa a reproducir, antes de ser inoculadas (**Figura 3**).





**Figura 3.** Observación microscópica con objetivo de 50x de las esporas de los hongos utilizados en la reproducción masiva antes de ser inoculadas. **A:** 72TG-11 (*Trichoderma harzianum*), **B:** QIVD-12 (*Trichoderma longibrachiatum*), **C:** T3 (*Trichoderma harzianum*), **D:** CIXD-11 (*Trichoderma sp.*) y **E:** CVD-06 (*Trichoderma harzianum*).

En la **Figura 3**, las imágenes 3A, 3C y 3E corresponden a *Trichoderma harzianum* con los códigos 72TG-11, T3 y CVD-06, respectivamente, en el cual se puede observar que al tratarse de una misma especie la concentración de esporas vistas al microscopio varía grandemente entre ellas, lo que significa que necesitan más tiempo para su total crecimiento y esporulación en placa petri. Por otro lado, la imagen 3B que corresponde *Trichoderma longibrachiatum* con el código QIVD-12 se observa una concentración de esporas menor que la imagen 3D que corresponde al *Trichoderma sp.* con el código CIXD-11, con la diferencia que un hongo se logró identificar a nivel de especie (QIVD-12) y el otro hongo se identificó a nivel de género, cabe recalcar que ambos hongos su comportamiento es similar en cuanto a su crecimiento en placa petri como en sustratos sólidos, lo cual podría estarnos indicarnos que son una misma especie.

#### *Fermentación sólida*

A los 5 días después de la inoculación de las esporas provenientes de los cultivos monospóricos para cada uno de los hongos (**Figura 4A y B**), en las bolsas con arroz y con maíz se observó crecimiento mayormente de estructura micelar de color blanco característico de los *Trichodermas* (**Figura 4C**), por lo cual se rompieron estas estructuras (micelios) de forma manual para garantizar un crecimiento homogéneo en toda la bolsa y de esta forma se lograr estresar al hongo para que continúe en la etapa de esporulación (**Figura 4D**), por otro lado en las bolsas con olote de maíz triturado, se observó menor crecimiento en comparación a las bolsas con arroz y con maíz. A los 12 días de crecimiento con un cambio constante entre luz y oscuridad, se observó que las bolsas con arroz y maíz de la cepa CVD-06 (*Trichoderma harzianum*) tenían un color verde con blanco (**Figura 4E**), en la cepa 72TG-11 (*Trichoderma harzianum*) con los mismos sustratos tenían un color verde con blanco y amarillo (**Figura 4F**), mientras que la cepa T3 (*Trichoderma harzianum*) con los mismos sustratos ya se podían cosechar debido a que presentaban un color totalmente verde. En el caso de las bolsas con olote de maíz de las cepas 72TG-11 (*Trichoderma harzianum*) y T3 (*Trichoderma harzianum*) se observó bastante crecimiento de color verde, en cambio en la cepa CVD-06 (*Trichoderma harzianum*) presentó un crecimiento de color blanco (**Figura 4G**), la cepa CIXD-11 (*Trichoderma sp.*) presentó un crecimiento escaso y en la cepa QIVD-12 no hubo crecimiento. Por otro lado, en el sustrato copra de coco no hubo crecimiento alguno de las cepas de *Trichodermas*. Es importante mencionar que a los 19 días después de inoculadas las cepas en las bolsas ya presentaban mucho crecimiento, sin embargo, todavía presentaban altos contenidos de humedad, por lo que fue necesario secar

constantemente el contenido de sustrato inoculado con bolsas de papel craft durante 7 días (**Figura 4H**) las cuales absorbieron toda la humedad libre, también se utilizó una mezcla de fécula de maíz con gelatina simple lo que permitió que el proceso de cosecha de esporas fuera exitoso (**Figura 4I**), para un tiempo de crecimiento y secado de 26 días para esta variante.



**Figura 4.** Crecimiento masivo de las esporas de los hongos en fermentación sólida. **A:** Inoculación de las esporas en los sustratos, **B:** Crecimiento a las 24 horas después de inoculado el hongo, **C:** Crecimiento mayormente de micelios de los hongos a los 5 días después de inoculados, **D:** Destrucción de las estructuras de los hongos (micelio), **E:** Esporulación del hongo y crecimiento de micelios a los 12 días después de inoculada la cepa CVD-06, **F:** Coloración amarillenta del *T. harzianum* (72TG-11) en el sustrato maíz triturado, **G:** Crecimiento del *T. harzianum* (CVD-06) en el sustrato olote de maíz triturado, **H:** Secado del sustrato colonizado en bolsas de papel craft e **I:** Adición de la mezcla (fécula de maíz y gelatina simple) antes de su separación.

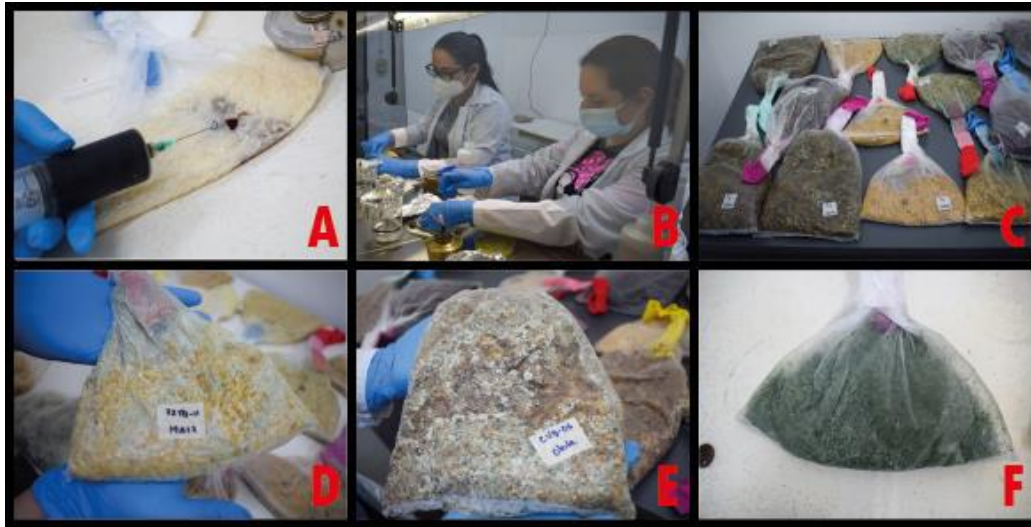
Gómez, 2017, realizó el procedimiento de reproducción masiva mediante fermentación sólida en varios sustratos orgánicos siendo el principal de ellos arroz, el proceso de crecimiento y secado fue durante 7 días cada uno. Por otro lado, Michel, *et al.*, 2008, realizó el mismo procedimiento en 15 sustratos orgánicos diferentes, entre ellos están, arroz, olote de maíz triturado y maíz triturado, donde se obtuvieron resultados excelentes en cuanto al crecimiento de los hongos, el periodo de crecimiento fue de 21 días. En ésta investigación se tomó más tiempo de crecimiento y secado del hongo con respecto a lo reportado por Gómez, 2017; y Michel, *et al.*, 2008 debido a que la humedad en el sustrato era elevada, también se debió a otros factores por ejemplo, temperatura del ambiente, agitación manual de las bolsas, técnica de aireación en el interior de las bolsas (abrir las bolsas para eliminar humedad) y principalmente la concentración inicial del inóculo. Los autores antes mencionados obtuvieron concentraciones de esporas entre  $10^7$  y  $10^8$ , lo que coincide con lo obtenido en la presente investigación.

#### *Fermentación bifásica (sustratos orgánicos con melaza)*

La fermentación bifásica se observó de igual forma y constancia que la fermentación sólida, a los 5 días pasados de inoculación del hongo y la melaza ya se presentaban rastros positivos de un crecimiento rápido en todas las bolsas de arroz, maíz (**Figura 4D**) y olote (**Figura 4E**) en todas las cepas, sin excepción, en comparación a la fermentación sólida. Ésta variante en particular se



cosechó a los 15 días después de haber sido inoculadas todas las cepas (**Figura 4F**), no se realizó el mismo proceso de secado en bolsas de papel craft gracias a que la humedad que presentaban las bolsas de sustrato era moderada, pero si se utilizó la mezcla de gelatina simple con fécula de maíz para la cosecha de las cepas.



**Figura 4.** Crecimiento masivo de las esporas de los hongos en los sustratos con melaza. **A:** Inoculación de la melaza en el sustrato, **B:** Inoculación del hongo en el sustrato con melaza, **C:** Crecimiento a las 24 horas después de la inoculación, **D:** Crecimiento mayormente de micelio de los hongos a los 5 días después de la inoculación, **E:** Rotura de las estructuras de los hongos (micelio) y **F:** Sustrato totalmente colonizado con esporas listas para ser cosechadas.

Gómez, *et al.*, 2013, realizan un método de producción de *Trichoderma spp.*, dónde preparan agua destilada en bolsas de arroz con 2 gramos de urea por cada litro de agua. Las bolsas una vez inoculadas, son llevadas a la sala de germinación la cual tiene una temperatura entre los 24 y 27°C, incubándose con variaciones de luz y oscuridad. Las bolsas son agitadas suavemente para favorecer la oxigenación del sustrato y se dejaron de 5 a 8 días para completar su esporulación. Finalmente se abren las bolsas en el centro para secar el sustrato y así bajar el contenido de humedad. La finalidad de la reproducción es de tener la solución directamente que se aplicará en el campo, por eso trabajan con agua destilada, hacen el conteo de las esporas luego de tener esa solución y lo aplican a los cultivos. Por otro lado, Pineda, *et al.*, 2017, realizó reproducción masiva de *Trichodermas* en diferentes sustratos orgánicos enriquecidos con melaza, demostrando que la humedad del sustrato juega un papel muy importante y por ende se reduce el tiempo de esporulación. En el presente trabajo utilizó melaza al 5% como suplemento para todos los sustratos orgánicos (arroz, maíz, olote de maíz y copra de coco) tomando en cuenta como factor importante la humedad ligada a los mismos, una vez que el hongo se adapta a las nuevas condiciones de crecimiento el proceso de esporulación es más rápido en comparación a la variante sin melaza, lo antes mencionado coincide con lo descrito por Pineda, *et al.*, 2017. Por otro lado, Castro y Rivillas, 2012, presentan que para el desarrollo del metabolismo de *Trichoderma*, este necesita fuentes de carbono difícilmente biodegradables, como ligninas y celulosa; en el caso de la copra de coco posee cantidades de lignina y celulosa en menor porcentaje que en el caso del arroz y el olote. Lo anterior indica que la copra de coco aún con melaza no le entrega los suficientes nutrientes al hongo para su reproducción en comparación con los otros tres sustratos. Por tanto, para la reproducción masiva de *Trichodermas* en copra de coco es necesario adicionar otro tipo de suplementos que disminuyan el contenido de fibra y a la misma vez que aporten la humedad que el hongo necesita para su desarrollo como lo reporta Vaillant, *et al.*, 2016.

*Cuantificación de esporas y evaluación de sustratos*

Agamez, *et al.*, 2008; Vega y Hernández, 2020; Michel, *et al.*, 2008; Cruz, 2007, Benites y Marroquín, 2015, utilizaron el método de conteo de esporas en Cámara de Neubauer, siendo éste el más sencillo de aplicar y se obtienen resultados confiables. En la presente investigación también se utilizó el mismo método, cabe recalcar que en cada investigación lo que varía es el modelo matemático utilizado para el conteo de esporas, esto es debido al tipo y marca de la cámara que se utilice. Los resultados obtenidos en este trabajo, se denotan en la **Tabla 2** donde se observan los valores diferenciados para cada especie de hongo *Trichoderma* y cada sustrato utilizado, tanto con melaza, y sin el uso de la melaza.

Tabla 2. Resultados de concentración de esporas en conidios/g en todos los *Trichodermas* de trabajo

Hongo	Sustrato	Sin melaza	Con melaza
		Concentración de Esporas	Concentración de Esporas
<i>Trichoderma harzianum</i> (72TG-11)	Arroz	3.30*10 <sup>6</sup>	3.9*10 <sup>7</sup>
	Maíz	2.49*10 <sup>6</sup>	4.1*10 <sup>7</sup>
	Olote	1.74*10 <sup>6</sup>	9.3*10 <sup>6</sup>
	Copra de Coco	0	0
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (QIVD-12)	Arroz	2.44*10 <sup>7</sup>	2.5*10 <sup>7</sup>
	Maíz	2.59*10 <sup>7</sup>	6.7*10 <sup>6</sup>
	Olote	0	2.16*10 <sup>7</sup>
	Copra de Coco	0	0
<i>Trichoderma sp.</i> (CIXD-11)	Arroz	7.525*10 <sup>6</sup>	2.4*10 <sup>7</sup>
	Maíz	2.84*10 <sup>7</sup>	2.06*10 <sup>7</sup>
	Olote	6.00*10 <sup>6</sup>	1.35*10 <sup>7</sup>
	Copra de Coco	0	0
<i>Trichoderma harzianum</i> (T3)	Arroz	1.03*10 <sup>8</sup>	1.37*10 <sup>8</sup>
	Maíz	1.29*10 <sup>7</sup>	8.1*10 <sup>7</sup>
	Olote	1.35*10 <sup>7</sup>	1.06*10 <sup>7</sup>
	Copra de Coco	0	0
<i>Trichoderma harzianum</i> (CVD-06)	Arroz	9.20*10 <sup>7</sup>	8.7*10 <sup>7</sup>
	Maíz	3.70*10 <sup>7</sup>	5.7*10 <sup>7</sup>
	Olote	3.30*10 <sup>6</sup>	6.1*10 <sup>6</sup>
	Copra de Coco	0	0

En la Tabla 2. El valor de las concentraciones de esporas obtenidas en los diferentes sustratos y en ambas fermentaciones están dentro del rango establecido para su aplicación al campo según lo que reporta Chiriboga, *et al.*, 2015, que para efectos prácticos de llevar soluciones de esporas de hongos *Trichodermas* al campo lo importante recae en el exponencial de la concentración de esporas, siendo la indicada valores mayores a  $1 \times 10^4$ . Por otro lado, con base en los resultados mostrados en la Tabla 2, se denota que la melaza aporta una variación en cuanto al exponente en las concentraciones de esporas lo cual indica que el uso de esta puede influir en obtener mejores concentraciones para una mayor escala. También se debe a que la melaza influye en el tiempo de crecimiento y desarrollo de los hongos, ya que en la fermentación bifásica la cosecha de esporas se realizó a los 15 días después de inoculadas las cepas y en la fermentación sólida se realizó a los 26 días después de inoculadas las cepas. Es importante recalcar que el trabajar sin melaza reduce grandemente el riesgo de una contaminación al momento de la reproducción masiva de los hongos, ya que es un sustrato en el cual crecen una amplia variedad de microorganismos por lo que la utilización de este requiere de mayor cuidado y un trabajo previo a dicha melaza antes de ser inoculada con los sustratos de reproducción.

Finalmente, la importancia de la comparación en la reproducción masiva de *Trichodermas*, recae en encontrar un sustrato que no sea competencia con el alimento de consumo humano como lo es el arroz

y el maíz. Con los resultados obtenidos anteriormente se concluye que el arroz es, en sí, el mejor sustrato para reproducción de esporas de *Trichodermas*, de igual forma la mejor cepa de reproducción es el *Trichoderma harzianum* con el código T3, el cual crece en grandes cantidades para todos los sustratos. Sin embargo, el olote de maíz por su parte es un desecho propiamente de la cosecha de maíz, y en términos de concentración de esporas, se obtienen resultados satisfactorios en cuanto a la reproducción de hongos *Trichodermas*, por lo que se concluye que el sustrato mayormente recomendado para llevar a cabo la reproducción masiva a escala de laboratorio y posiblemente en niveles muy grandes de producción es el olote de maíz triturado con la utilización de melaza, basándose en los resultados mostrados en la **Tabla 2** y considerando que este sustrato no significa competencia alguna con la alimentación humana.

## CONCLUSIONES

Durante la reproducción masiva de las diferentes cepas de *Trichoderma* y los distintos sustratos (arroz como testigo, copra de coco, maíz y olote de maíz), se determinó que el olote de maíz arroja concentraciones de esporas muy cercanos a los del arroz. *Trichoderma harzianum* (72TG-11), es donde se obtiene (en fermentación sólida) el valor de  $3.30 \times 10^6$  esporas en arroz y  $1.74 \times 10^6$  en olote, mostrando que el olote es un sustrato ideal para la reproducción de los hongos sin tener que utilizar un alimento del ser humano (como en el caso del arroz). Con el uso de la melaza, el *Trichoderma harzianum* (72TG-11), mostró estimulación en su producción de esporas ante arroz y maíz triturado, e inclusive ante olote de maíz pasando de  $10^6$  sin melaza a  $10^7$  con melaza. Similares resultados se obtuvieron para la mayoría de las variantes en estudio, salvo algunas excepciones como *Trichoderma harzianum* (T3) para los cuales la adición de melaza aparentemente no muestra diferencias apreciables en cuanto al número de esporas obtenidas. Con el sustrato de copra de coco triturada no se obtuvo crecimiento porque la copra de coco tanto en melaza, como sin melaza no aporta los suficientes nutrientes para el desarrollo de cepas *Trichodermas*. Finalmente, se concluye que la mejor cepa de reproducción es el *Trichoderma harzianum* con el código T3 y que el sustrato mayormente recomendado para llevar a cabo la reproducción masiva a escala de laboratorio y posiblemente en niveles muy grandes de producción es el olote de maíz triturado.

## REFERENCIAS

- Agamez, E., Zapata, R., Oviedo, L. y Barrera, J. (2008). Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma sp.* *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10(2), 23–34. ISSN: 1909-8758
- Benites, C. y Marroquín, L. (2015). Producción de *Trichoderma harzianum* en diferentes sustratos orgánicos. *Portal De La Ciencia*, 4(1), 68-74. doi: 10.5377/pc.v4i0.1864
- Camero, J., y Linares, F. (2013). *Implementación de un protocolo para la conservación de hongos filamentosos con potencial biotecnológico de la colección del laboratorio de química microbiológica de la Pontificia Universidad Javeriana* (Tesis de grado). Pontificia Universidad Javeriana, Colombia
- Campos, M. (2009). *Efecto de la inoculación de sustratos con Trichoderma spp. sobre el crecimiento y producción de plantas de chile dulce (Capsicum annum) Linn, bajo ambiente protegido* (Tesis de grado). Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica
- Castillo, D. (2020). *Determinación de la variabilidad genética de Trichoderma nativo de Nicaragua mediante el uso de rep-PCR y su potencial in vitro como antagonista de Fusarium spp.* (Tesis de grado). Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua

Castro, A. y Rivillas, C. (2012). *Trichoderma spp.* Modo de acción, eficacia y usos en el cultivo de café. *Cenicafé*, 53(9), 1-33. ISSN: 1098-6596

Chavarría, M. (2016). *Evaluación de aislados nativos de Trichoderma spp para el manejo de hongos causantes de mal del talluelo en tomate (Solanum lycopersicom L.)* (Tesis de grado). Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua

Chavez, M., Montaña, J., Chavez, M., Martínez, M., Mercado, M., Rodríguez, M. y Quevedo, B. (2009). Efecto del sustrato y la exposición a la luz en la producción de una cepa *Trichoderma spp.* *Universitas Scientiarum*, 13(3), 245-251. ISSN: 0122-7483

Chiriboga, H., Gómez, G. y Garcés, K. (2015). *TRICHODERMA SPP. PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE ENFERMEDADES.* Paraguay: IICA. Recuperado de: <https://repositorio.iica.int/bitstream/handle/11324/2647/BVE17038725e.pdf;jsessionid=FAE20E917A88F674C3FCEC4837B98B67?sequence=1>

Cruz, L. (2007). *Estandarización del proceso de producción masiva del hongo Trichoderma koningii mediante fermentación bifásica a escala piloto* (Tesis de grado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia

Echeverría, F. (2006). *Caracterización biológica y molecular de aislamientos del hongo entomopatógeno Beauveria bassiana (Bálsamo) Vuillemin* (Tesis de grado). Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica

French, E., y Hebert, T. (1980). *Métodos de investigación fitopatológica.* San José, Costa Rica: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, Cap. II, pp. 21-32. ISBN: 9290390247

García, R., Durán, M. y Riera, R. (2006). Producción de biomasa de *Trichoderma harzianum* por fermentación líquida. *Fitosanidad*, 10(4), 295-298. ISSN: 1562-3009

Gaitán, I. y García, E. (1998). *Prueba a nivel de campo y escalado a planta piloto del proceso de producción de biofertilizante* (Tesis de grado). Universidad Nacional de Ingeniería, Managua, Nicaragua

Gómez, H., Soberanis, W., Tenorio, M., y Torres, E. (2013). *Manual de Producción y Uso de Hongos Antagonistas.* Recuperado de <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2017/09/Manual-de-Producci%C3%B3n-y-Uso-de-Hongos-Antagonistas.pdf>

Gómez, P. y Mendoza, J. (2004). Guía para la producción de *Metarhizium anisopliae*. *Centro de Investigación de La Caña de Azúcar Del Ecuador*, 5(1), 1-13. doi: 10.1007/s10295-010-0865-8

Gómez, T. (2017). Evaluación de diferentes medios de cultivo y condiciones para la producción de conidios de *Trichoderma spp* mediante fermentación en líquido y sólido (Tesis de grado). Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica

Mas, S., Lobaina, E., Rodríguez, I., Tejera, H. y Núñez, E. (2019). Modelación de la formación de biomasa de *Trichoderma harzianum rifai* (A-34) en fase sólida. *Tecnología Química*, 39(2), 444-454. ISSN 2224-6185

Michel, A., Otero, M., Martínez, R., Rodríguez, N., Ariza, R., y Barrios, A. (2008). Producción masiva de *Trichoderma harzianum Rifai* en diferentes sustratos orgánicos. *Chapingo serie Horticultura*, 14(2), 185-191. ISSN 2007-4034

Osuna, F., Moreno, M., García, F., Ramírez, S. y Canul, J. (2012). Biocontrol de la pudrición de raíz de nochebuena de interior con *Trichoderma spp.* *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(3), 553-564. doi: 10.29312/remexca.v3i3.1449

Pineda, J., Benavides, E., Duarte, A., Burgos, C., Soto, C., Pineda, C., Fierro, F., Mora, E. y Álvarez, S. (2017). Producción de biopreparados de *Trichoderma spp:* una revisión. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 51(1), 47-52. ISSN: 0138-6204

Ramírez, N. (2006). *Efecto de la aplicación de Pencycuron y Pro-selective para el control de Rhizoctonia sp. y Fusarium sp. en el cultivo de melón y calabaza en parcelas de monitoreo de alternativas al Bromuro de Metilo, en la finca Los Yajes, Estanzuela, Zacapa* (Tesis de grado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala

Sivan, A. & Chet, I. (1989). The possible role of competition between of *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. *Phytopathology*, 79(2), 198-203. Doi: 10.1094 / Phyto-79-198

Vaillant, D., Almandoz, J., Gato, Y., Ramírez, R. y Díaz, J. (2016). Establecimiento de *Trichoderma spp.* en sustratos orgánicos empleados en casas de postura de Tecnología de Cultivo Protegido. *Fitosanidad*, 20(2), 95-96. ISSN: 1562-3009

Vega, M. y Hernández, R. (2020). Crecimiento de *Trichoderma* en rastrojo de piña para obtener esporas para uso agrícola. *Agronomía Mesoamericana*, 31(3), 597-608. doi:10.15517/am.v31i3.40275

Windham, M., Elod, Y and Baker, R. (1986). A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma spp.* *Phytopathology*, 76(3), 518-521. Doi: 10.1094/Phyto-76-518

## SEMBLANZA DE LOS AUTORES

Tatiana de los Ángeles López Martínez: Graduada como Ingeniera Química en la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI). Desarrolló proyecto de investigación dirigido al área de biotecnología para el desarrollo de la agricultura. Graduada del Instituto Tecnológico Nacional (INTECNA) como Bachiller técnico en Laboratorio y análisis químico.



Leandro Alberto Páramo Aguilera, Graduado como Ingeniero Químico con maestría en Ingeniería Química y énfasis en procesos biotecnológicos, en el Instituto Superior Politécnico “José Antonio Echeverría”, ISPJAE, de la Ciudad de la Habana, Cuba, en el año 1990. En 1997 se gradúa como Master en Microbiología y énfasis en bacteriología en la Universidad de Costa Rica, UCR. En junio del 2012, se gradúa como Doctor en Ciencias en el área de Biotecnología en el Centro de Biotecnología Genómica (CBG) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) de México. Amplia experiencia en el desarrollo de procesos biotecnológicos (biofertilizantes, bebidas alcohólicas, fermentados lácteos, bioprospección, compostaje, etc).



Heysell Dodanig Delgado-Silva: Graduada como Ingeniera Química en la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI), donde actualmente es responsable del Laboratorio de Biotecnología del Programa de Investigación Estudios Nacionales y Servicios del Ambiente (PIENSA). Desarrolló proyecto de investigación con interés en el área de biotecnología para el desarrollo de Bioprocesos industriales y agrícolas. Además, es graduada del Instituto Nacional Técnico para la Administración y Economía como Técnico General de Contabilidad, Inglés Básico y Cultura Emprendedora. Ha participado en varios congresos nacionales y latinoamericano en diversas áreas; XXII Congreso Latinoamericano de Estudiantes de Ingeniería y 2<sup>do</sup> y 3<sup>er</sup> foro de proyectos de investigación, desarrollo, innovación, posgrado y extensión de la UNI.