

Evaluación de sustratos por fermentación líquida, sólida y bifásica para la producción de *Trichoderma asperellum*

Rómulo García-Velasco¹, Dulce María Cortes de-León¹, Grisel Domínguez-Arizmendi¹, Martha Elena Mora-Herrera^{1*}, Barbarita Companioni-González², Jesús Ricardo Sánchez-Pale³

¹Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario Tenancingo, México. Carretera Tenancingo–Villa Guerrero Km 1.5, Tenancingo, Estado de México C.P. 52400.

²Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila. Calzada Antonio Narro No. 1923, Colonia Buenavista Saltillo, Coahuila, México. C.P. 25315. ³Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Ciencias Agrícolas, Carretera Toluca - Ixtlahuaca Kilómetro 15.5, El Cerrillo. El Cerrillo Piedras Blancas, 50200 Toluca de Lerdo, Méx.

*e mail marthaelenam@gmail.com

Resumen

Un grave problema en los cultivos agrícolas, son las enfermedades causadas por microorganismos fitopatógenos, cuyo principal método es el control químico, que es costoso y perjudicial tanto para el ambiente como para la salud humana. Por ello, es necesario proponer alternativas sustentables, como el biocontrol mediante microorganismos antagonistas nativos, como *Trichoderma* sp., lo cual implica su producción a gran escala con fines de aplicación en campo. Por lo que, el objetivo de esta investigación fue evaluar el potencial de granos de cereales enteros y triturados como sustratos para la producción de biomasa utilizando técnicas de fermentación líquida, sólida y bifásica; para esto se utilizó melaza y levadura en la fermentación líquida; para la sólida se emplearon granos enteros o triturados de trigo, sorgo y arroz, y para la fermentación bifásica se combinaron la líquida y la sólida. En todos los tratamientos, se inocularon 3 mL de una suspensión de *Trichoderma asperellum* con una concentración de 1×10^7 conidios mL⁻¹. La mayor producción de biomasa de *T. asperellum*, fue con el sustrato de arroz entero en la fermentación bifásica alcanzando 7.2025×10^8 UFC conidios g⁻¹, y con la fermentación sólida 6.98125×10^8 g⁻¹, con viabilidad de conidios de 91.1 y 89.4%, respectivamente. En fermentación líquida se obtuvo 1.593×10^7 conidios mL⁻¹ y 85.8% de viabilidad. El tiempo para la producción de biomasa fue de 14 días en fermentación líquida, 31 días en fermentación sólida y 45 días en bifásica.

Palabras Claves: antagonista, biomasa, sustentable, sustrato.

Abstract

Agricultural crops are affected by diseases caused by phytopathogenic microorganisms. Until now, the main method for their management has been chemical control, which is costly and harmful to both the environment and human health. Therefore, it is necessary to propose sustainable alternatives, such as biocontrol using native antagonistic microorganisms, such as *Trichoderma* sp. This implies their mass reproduction for field application. The objective of this research was to evaluate the potential of whole and crushed grains as substrates for biomass production using liquid, solid, and biphasic fermentation techniques. For this, molasses and yeast were used in liquid fermentation; for solid fermentation, whole and crushed grains of wheat, sorghum, and rice were used, and for biphasic fermentation, liquid and solid fermentation were combined. In all cases, inoculation with *Trichoderma asperellum* consisted of 3 mL of a 1×10^7 mL⁻¹ conidia suspension. The best substrate for *T. asperellum* production, was whole rice, reaching 7.2025×10^8 g⁻¹ of biomass with biphasic fermentation, and 6.98125×10^8 g⁻¹ with solid fermentation, with conidia viability of 91.1 and 89.4%, respectively. In liquid fermentation, 1.5930×10^7 mL⁻¹ and 85.8% viability were obtained. The time for biomass production was 14 days in liquid fermentation, 31 days in solid fermentation and 45 days in biphasic fermentation.

Key Words: antagonist, biomass, sustainable, substrate.

Introducción

La agricultura es una de las actividades primarias que desarrolla el ser humano para la supervivencia, esto ha llevado al uso excesivo de plaguicidas para combatir plagas y enfermedades que atacan a los cultivos poniendo en riesgo la inocuidad alimentaria, ocasionando altos costos de producción, y perjudicando en general a los ecosistemas, por la generación de residuos químicos. Por ello en los últimos años se buscan biocontroles como una alternativa para una producción agrícola sostenible (Tanaka & Kahmann, 2021). En este sentido, se ha demostrado que existen hongos antagonistas como los del género *Trichoderma* spp., que pueden controlar fitopatógenos como hongos y oomicetos a través de diversos mecanismos de acción como micoparasitismo, antibiosis, competencia por nutrientes y espacio; así como la inducción de resistencia sistémica de las plantas (Li *et al.*, 2019). Este género es cosmopolita y se adapta a diferentes condiciones edafoclimáticas, además, se ha demostrado que favorecen la producción de metabolitos, enzimas, compuestos promotores de crecimiento, entre otras funciones biológicas (Hernández-Melchor *et al.*, 2019), lo que los hace una posibilidad para el diseño de estrategias de manejo integrado de los cultivos.

Un criterio para la selección de hongos utilizados como agentes de control biológico, radica en su capacidad para la producción de propágulos (conidios, microesclerocios, clamidosporas) sobre sustratos líquidos, sólidos o la combinación de estos (bifásico) que sean de fácil acceso y de bajo costo; además, otro aspecto relevante es que las cepas sean nativas de donde se pretende utilizarlas. La aplicación en el campo requiere de un escalamiento para una producción masiva. Al respecto, Hernández-Melchor *et al.* (2019) señalan que además de los diversos métodos de reproducción es necesaria la evaluación de sustratos para favorecer el desarrollo del antagonista; de manera particular, Antomarchi *et al.* (2023), refieren que para la producción de *Trichoderma* spp., los sustratos deben ser recursos de fácil disponibilidad, ricos en nutrientes y que no generen altos costos de producción, lo que resultará en la producción de suficiente biomasa que contenga propágulos viables y tolerantes para la inoculación en campo.

Con el objetivo de encontrar el mejor sustrato para el desarrollo que promueva una alta producción de propágulos de *Trichoderma* spp., se han realizado estudios que han demostrado que esto depende tanto de la cepa evaluada como de los sustratos empleados. En general, se han evaluado diferentes sustratos como: grano entero de arroz, cascarilla de arroz, cáscaras obtenidas de productos como tomate, ajo, cacao, ajonjolí, cacahuete, café, rastrojo de soya y maíz, olote de maíz y maíz quebrado, vaina de frijol, granos de sorgo y alpiste, con resultados que además dependen de otros factores como la especie, el tiempo, etc. (Pineda-Insuasti *et al.*, 2017).

Para la selección del sustrato son esenciales las técnicas de fermentación; las cuales, de acuerdo con Ipiales *et al.* (2021), consisten en el proceso mediante el cual los sustratos líquidos o sólidos son metabolizados por microorganismos lo que proporcionan nutrientes y soporte a *Trichoderma* spp., para su crecimiento micelial y posterior generación masiva de propágulos como conidios, microesclerocios y clamidosporas. La fermentación en estado sólido (SSF) es un proceso mediante el cual se fermenta un sustrato insoluble con suficiente humedad, pero sin agua libre. Por el contrario, en la fermentación en estado líquido (LSF) o también conocida como fermentación sumergida (FS), el sustrato se solubiliza o se mantiene en suspensión en forma de partículas finas dentro de un gran volumen de agua. En la mayoría de los procesos de LSF, se emplean concentraciones de sustrato que oscilan entre el 0.5 y el 6 %, dependiendo de la densidad del propio sustrato. La SSF no requiere controles complejos y presenta numerosas ventajas frente a la LSF; no obstante, conlleva sus propios problemas inherentes (Chahal, 1985; Pandey, 2003; Singhania *et al.*, 2009). La fermentación bifásica se desarrolla secuencialmente en dos etapas: una fase líquida y una fase sólida. En este proceso, el hongo se cultiva inicialmente en un medio líquido hasta alcanzar el final de la fase de crecimiento exponencial; posteriormente, la biomasa obtenida se transfiere a un sustrato sólido, donde continúa su desarrollo y producción de estructuras reproductivas.

Por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar el potencial de los granos de trigo,

sorgo y arroz, como sustratos para la producción de biomasa de *Trichoderma asperellum* cepa TFR3, mediante las técnicas de fermentación líquida, sólida y bifásica.

Materiales y métodos

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Fitopatología del Centro Universitario UAEM Tenancingo, ubicado en la Carretera Estatal Libre Tenancingo-Villa Guerrero Km. 1.5, Santa Ana Ixtlahuatzingo, Tenancingo, Estado de México; con latitud 18° 58' 07" N y longitud 99° 36' 42" O.

Selección y reactivación de *T. asperellum* cepa TFR3

Trichoderma asperellum cepa TFR3 pertenece de una colección del Laboratorio de Fitopatología del Centro Universitario UAEM Tenancingo; que fue aislada a partir de suelo proveniente de un cultivo de *Rosa* sp., infectado con *Rosellinia necatrix* en el Municipio de Tenancingo, Estado de México, México. Esta cepa ha demostrado en condiciones *in vitro* su acción antagónica frente a patógenos del rosal, como; *R. necatrix* (García-Velasco *et al.*, 2021a); *V. dahliae* y *B. cinerea* (García-Velasco *et al.*, 2021b); además, de tolerancia en condiciones *in vitro* a fungicidas como; tiofanato metílico, benomilo, captan, quintozeno + thiram, fluazinam (García-Velasco *et al.*, 2021c).

La cepa TFR3 de *Trichoderma asperellum* se cultivó previamente en medio PDA durante siete días. Posteriormente, se preparó una

suspensión con una concentración de 1×10^7 conidios mL^{-1} , la cual se utilizó como fuente de inóculo.

Fermentación líquida

Este tipo de fermentación se llevó a cabo en un medio compuesto por agua destilada suplementada con melaza de caña de azúcar (25 mL L^{-1}). El pH del medio se ajustó a 5.5 con NaOH (2 N) y posteriormente se distribuyeron a 200 mL en frascos de vidrio con capacidad de 500 mL. Los frascos se cerraron con tapones de algodón cubiertos con papel aluminio y se esterilizaron en autoclave a 121 °C y 15 psi durante 20 min. Tras 24 h de enfriamiento y bajo condiciones asépticas, se adicionaron 10 g de *Saccharomyces cerevisiae* a cada frasco, seguidos de la inoculación con 3 mL de una suspensión de conidios de la cepa TFR3 de *Trichoderma asperellum* ajustada a una concentración de 1×10^7 conidios mL^{-1} . Finalmente, los cultivos se incubaron a 25 ± 2 °C en oscuridad durante 14 días, con agitación manual cada tercer día (García *et al.*, 2006).

Cuantificación de la producción de conidios

La cuantificación de los conidios se realizó de una dilución 1:10, sobre una cámara de Neubauer en el mm^2 central; cuatro grupos de las esquinas y en el central, en un microscopio compuesto (objetivo 40x). Se utilizó la fórmula propuesta por Troya & Vaca (2014):

$$\text{Cuantificación de conidios} = \frac{\text{Total de conidios en los dos campos}}{\text{Superficie recontada } \text{mm}^2 \times \text{Profundidad mm} \times \text{Dilución}}$$

Fermentación sólida

Para la fermentación sólida se utilizaron como sustratos granos enteros o triturados de arroz, trigo y sorgo; los cuales se lavaron tres veces con agua potable, seguido de un proceso de hidratación en una solución de agua + cloranfenicol (500 ppm) por 30-45 min, el exceso de humedad fue retirado mediante escurrimiento, de cada sustrato se tomaron 250 g y se depositaron en bolsas de polipapel de alta densidad, se sellaron y se esterilizaron a 121 °C y 15 psi durante 20 min; se dejaron enfriar durante 24 h en condiciones asépticas.

Posteriormente, los sustratos correspondientes a cada tratamiento se inocularon con 3 mL de una suspensión de conidios de la cepa TFR3 (1×10^7 conidios mL^{-1}). Los cultivos se incubaron a 25 ± 2 °C bajo iluminación con luz blanca durante 21 días. Con el propósito de favorecer la distribución homogénea del inóculo y mejorar la aireación del cultivo, las bolsas se mezclaron manualmente cada tercer día durante todo el periodo de incubación (López, 2018).

Obtención de la biomasa

Para cuantificar la biomasa y producción de conidios por tratamiento, se llevó a cabo un proceso de secado de los sustratos, estos se colocaron en bandeja de aluminio y durante 10 días se mantuvieron a 25 ± 3 °C, y se removió cada tercer día. La biomasa se obtuvo haciendo uso de un tamiz del número 100 y mediante frotación y agitación se desprendieron los conidios; la biomasa se recolectó, pesó y depositó en bolsas de aluminio para su almacenamiento a 2-4°C (López, 2018).

Cuantificación de conidios y determinación de su viabilidad y la pureza

Se realizó una suspensión de conidios utilizando 0.1 g de biomasa con 9.9 mL de agua destilada estéril con Tween 20 (0.1%), se agitó en un vortex y se realizó el conteo de conidios en una cámara de Neubauer visualizada bajo microscopio compuesto con

el objetivo 40x. Los datos se extrapolaron a conidios g⁻¹ de biomasa.

La viabilidad de los conidios se determinó con base al porcentaje de germinación; para tal efecto se ajustó la suspensión a una concentración de 1×10^5 conidios mL⁻¹, de la que se sembraron tres cajas de Petri colocando 50 µL en cinco puntos equidistantes (250 µL en cada caja) y se incubaron a 25 ± 3 °C durante 16-20 horas. Después, se colocó un portaobjetos sobre en cada uno de los puntos de siembra para su revisión bajo microscopio compuesto (objetivo 40x) y se contabilizaron 100 conidios clasificándolos como germinados o no germinados. El criterio para considerar a los conidios germinados fue aquellos que han desarrollado un tubo germinativo con longitud del doble del diámetro de los conidios (Figura 1) (Cardona *et al.*, 2014). El porcentaje de viabilidad se calculó mediante la fórmula propuesta por Agus *et al.* (2015).

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{a}{(a + b)} \times 100$$

Donde:

a= Número de conidios germinados

b= Número de conidios no germinados

Pureza de la biomasa

El porcentaje de pureza de la biomasa (%P) se determinó utilizando las mismas siembras empleadas para la evaluación de la viabilidad de los conidios. La pureza se calculó como la

proporción de unidades formadoras de colonias (UFC), correspondientes a conidios viables, de acuerdo con la ecuación propuesta por Cardona *et al.* (2014).

$$\% P = \frac{\text{Conidios del hongo de interés}}{\text{Conidios totales}} \times 100$$

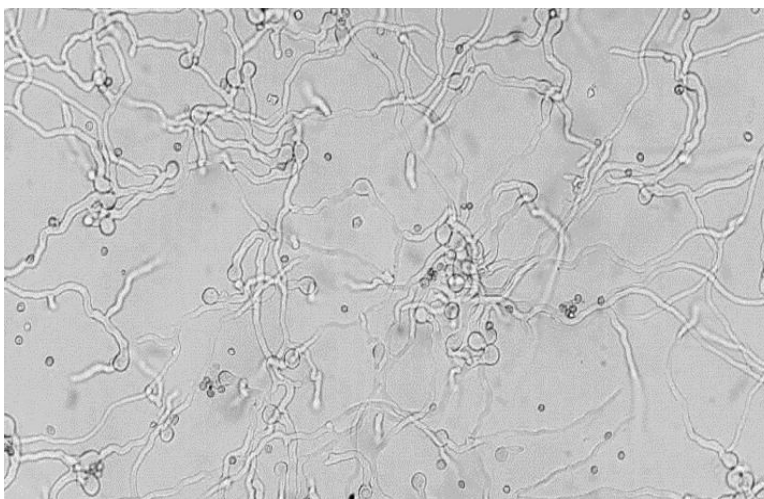


Figura 1. Germinación de conidios y pureza de la biomasa de la cepa TFR3, sobre medio PDA. Vista a microscopio compuesto con el objetivo 40x.

Fermentación bifásica

La fermentación bifásica (fermentación líquida seguida de fermentación sólida) se llevó a cabo utilizando los procedimientos previamente descritos para cada etapa. Los sustratos correspondientes a cada tratamiento fueron lavados y esterilizados conforme a la metodología empleada en la fermentación sólida. Como inóculo se utilizaron los conidios obtenidos durante la fermentación líquida, realizada durante 14 días. La suspensión de conidios se ajustó a una concentración de $1 \times$

10^7 conidios mL^{-1} , y de esta se inocularon 3 mL en bolsas que contenían los sustratos previamente esterilizados. Posteriormente, los cultivos se incubaron durante 21 días bajo las condiciones establecidas para la fermentación sólida y, al término de este periodo, el sustrato se secó durante 10 días. Finalmente, se recuperó la biomasa y se evaluaron las mismas variables cuantificables descritas para la fermentación sólida (Figura 2).



Figura 2. Fermentación bifásica para la reproducción de biomasa de la cepa TFR3. A) Lavado y pesado de los sustratos sólidos, B) fermentación líquida, C) inoculación del medio líquido en el medio sólido estéril, D) incubación de los sustratos inoculados, E) secado del sustrato para la obtención de la biomasa y F) biomasa.

Diseño experimental y análisis estadístico

Para los experimentos de fermentación sólida y bifásica se empleó un diseño completamente al azar con seis tratamientos: arroz entero (AE), sorgo entero (SE), trigo entero (TE), arroz triturado (AT), sorgo triturado (ST) y trigo triturado (TT), cada uno con cinco repeticiones. Las variables evaluadas fueron: a) peso de la biomasa, b) producción de conidios (conidios g^{-1} de biomasa), c) porcentaje de viabilidad y d) pureza de la biomasa. Los datos se sometieron a las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene para verificar los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, respectivamente. Cuando dichos supuestos no se cumplieron, los datos se transformaron antes del análisis estadístico. Posteriormente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y

las medias se compararon mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), utilizando el software InfoStat v. 2020 (versión estudiantil). En el experimento de fermentación líquida no se utilizó un diseño experimental; por lo tanto, no se realizó un análisis inferencial y únicamente se cuantificó la producción de conidios, expresada como conidios mL^{-1} .

Resultados y discusión

Fermentación líquida

En la fermentación líquida se obtuvieron en promedio 1.593×10^7 conidios mL^{-1} , en 14 días; con una viabilidad promedio de 85.8%, y una pureza del 100%, ya que no se observó el crecimiento de microorganismos diferentes a la cepa TFR3 en el medio de cultivo PDA (Tabla 1). Y, aunque estos resultados difieren por la baja producción de conidios en

comparación con los reportados en trabajos relacionados con esta técnica de fermentación es importante destacar que se realiza en un espacio reducido y se requiere un mínimo de recursos de agua destilada, melaza y levadura. Las ventajas de esta metodología para la producción de *Trichoderma* spp., fue confirmada en este trabajo, por esta razón es la técnica más utilizada debido a su fácil proceso y bajos costos de producción, además de ventajas en el tiempo de cultivo corto, control riguroso de los parámetros de fermentación, menos espacio físico, bajo nivel de contaminación y menor cantidad de mano de obra (Locatelli *et al.*, 2022). A través de esta técnica Becker *et al.* (2024), reportaron concentraciones de $3.8 \times 10^7 \pm 1.4 \times 10^7$ conidios mL⁻¹ utilizando melaza + 0.5% de extracto de levadura y de $6.7 \times 10^7 \pm 1.7 \times 10^7$ conidios mL⁻¹ utilizando como medio únicamente la melaza, señalando que el extracto de levadura no aportó beneficio alguno para mejorar el crecimiento de *Trichoderma* spp., por lo que aseveran que utilizar levadura puede representar un incremento innecesario en los costos de producción en esta técnica.

Son varios los estudios en los que se ha evaluado la fermentación líquida con algunas variantes, así se reporta que para la producción *T. asperelloides* LQC-96, a pH de 3.5, relación carbono nitrógeno 160:1, sin glicerol e incubada durante siete días a 30 °C bajo luz constante, se obtuvo una concentración de hasta 8.35×10^7 conidios mL⁻¹ (Castro *et al.*, 2020). Aplicando esas mismas condiciones, García *et al.* (2006) evaluaron 10 cepas de *T. harzianum* mediante la técnica de fermentación líquida estática, utilizando melaza fresca y levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) con lo cual obtuvieron una producción de conidios de 1.8×10^9 mL⁻¹ en ocho días y 2.6×10^8 al día 14 posterior a la inoculación, evidenciando que la respuesta de producción de conidios es dependiente de la especie y del tiempo.

La fermentación líquida permite el uso de diversas fuentes de carbono y nutrientes que favorecen el crecimiento micelial y la esporulación. En este contexto, Locatelli *et al.* (2022) demostraron que un medio compuesto por sacarosa y levadura autolizada promovió la formación de microesclerocios en dos cepas de *T. asperellum* tras siete días de incubación. Asimismo, un medio formulado con 2% de pulpa de papa + 2% de azúcar sin

refinar permitió alcanzar una producción de 10.20×10^7 conidios mL⁻¹ en el mismo periodo (Rai *et al.*, 2023). En conjunto, estos resultados muestran que la composición del medio de cultivo desempeña un papel determinante en la productividad de *Trichoderma* bajo condiciones de fermentación líquida.

La ventaja que se le puede atribuir a esta técnica es que al tener un alto volumen de fermentación líquido se puede inocular altos volúmenes de sustrato sólido, tal y como lo mencionan García *et al.* (2006) al señalar que con este proceso se acelera la obtención de inóculo del hongo para el proceso de producción de conidios.

Fermentación sólida

La mayor cantidad de biomasa de *Trichoderma asperellum* se obtuvo mediante la técnica de fermentación sólida con el sustrato de arroz entero (Sólida-AE) con 1.61 g, seguido con 1.38 g mediante la técnica Bifásica-AT. Los tratamientos AE (arroz entero) y TE (trigo entero), incrementaron significativamente la producción de conidios por g de biomasa siendo de 6.98125×10^8 y 6.40625×10^8 respectivamente seguidos por los sustratos de SE y ST con una producción de 1.94625×10^8 y 1.945×10^8 , respetivamente. El tratamiento que produjo la menor cantidad de conidios fue TT con 2.8×10^6 (Tabla 1).

El mayor porcentaje de viabilidad de los conidios ocurrió en los que procedían del sustrato en el AT 93.5%, y el AE de 89.4%, aunque no fue significativo entre estos. En contraste, los tratamientos TE y TT presentaron estadísticamente el menor porcentaje de conidios germinados. Con relación a la pureza de la biomasa, los datos indican el 100% para todos los tratamientos a excepción de TT en el que la pureza fue de 89% (Tabla 1).

La reproducción de *Trichoderma* spp., varía considerablemente según la especie y los sustratos utilizados para su cultivo, en este trabajo con la fermentación sólida utilizando arroz como sustrato se obtuvo la mayor cantidad de conidios, similar a lo encontrado por López (2018), que reportó una producción de 8.845×10^8 conidios g⁻¹ en *T. asperellum* con arroz entero en 28 días, producción relativamente mayor que lo encontrado en este trabajo, posiblemente por la sensibilidad de estas especies a las variables en la

producción. En contraste en otra investigación en la que también utilizó arroz como sustrato y tras 21 días de la incubación de *T. harzianum*, se obtuvo una producción de 3.30×10^6 hasta 1.03×10^8 conidios en 0.5 g de sustrato, mientras que para *T. longibrachiatum* y *Trichoderma* spp. fue de 2.44×10^7 y 7.525×10^6 conidios, respectivamente (López *et al.*, 2022), que es menos producción que lo encontrado en este trabajo aún en condiciones similares. En la especie *T. asperelloides* se obtuvo una producción de 1×10^7 hasta 1×10^9 conidios g^{-1} de sustrato en un periodo de 12 a 14 días (Ceballos-Chávez *et al.*, 2025).

En este trabajo los granos utilizados como sustrato presentan diferentes respuestas, como el sorgo entero o triturado en las técnicas sólida y bifásica generan una producción estable de conidios y con mayor pureza y viabilidad a los obtenidos con el trigo (Tabla 1). Aunque, López (2018) reporta que al utilizar granos de sorgo entero obtiene mayor número de conidios g^{-1} de *T. asperellum*; y Naeimi *et al.* (2020) obtuvieron 6.4×10^{10} conidios g^{-1} para *T. harzianum* AS12-2. Por otro lado; Rai *et al.* (2023) reportaron que siete días después de la inoculación con *T. asperellum*, se tuvo una producción de 5.24×10^8 conidios g^{-1} de sustrato, aumentando hasta 8.31×10^8 al adicionar 2% de azúcar sin refinar; lo que demuestra que el tiempo y variables como el tipo de grano usado como sustrato y la especie es determinante para incrementar el número de conidios.

Fermentación bifásica

En el caso de la fermentación bifásica el sustrato con arroz entero (AE) presentó la mayor producción de 7.2025×10^8 conidios g^{-1} de biomasa respecto a los otros tratamientos, aunque el peso de biomasa fue de los más bajos de tan solo 0.56 g, sin embargo, el tratamiento AT (arroz triturado) que tuvo estadísticamente la menor producción de conidios, fue la que presentó el mayor peso de biomasa de 1.38 g. También el tratamiento AE presentó el más alto porcentaje de viabilidad (91.1%) y el

tratamiento TT el menor (63.5%), con respecto a los otros tratamientos (Tabla 1).

En lo que respecta a la fermentación bifásica, autores como Pineda-Insuasti *et al.*, (2017) destacan que es una técnica rápida de reproducción, ya que primero se produce el inóculo mediante fermentación líquida para posteriormente utilizarlo como inóculo para fermentar sustratos en medio sólido; complementariamente, los autores consideran que la selección de sustratos debe estar en función de su disponibilidad en la zona que se pretende hacer la reproducción de *Trichoderma* spp. En este sentido, se difiere con la rapidez señalada por los autores, ya que por medio de esta técnica tomó 45 días obtener la biomasa como producto final (14 días fase líquida + 21 días fase sólida + 10 días de secado de los sustratos). En lo relativo a la producción de conidios por esta técnica, la mayor concentración se obtuvo con AE como sustrato, con el que se alcanzó una concentración de 7.2025×10^8 conidios g^{-1} de biomasa; mientras que por fermentación sólida en el sustrato en 28 días se produjo una concentración de 6.98125×10^8 conidios g^{-1} de biomasa, siendo ambos resultados no diferentes estadísticamente ($p < 0.05$).

De acuerdo con lo anterior se refuerza la teoría de que, para la producción de biomasa en la formulación de biopreparados con *Trichoderma* spp., es primordial evaluar sustratos, técnicas de fermentación, condiciones de temperatura, luz y humedad de los sustratos, los cuales estarán determinados por la especie y cepa de *Trichoderma* spp. Los resultados generados contribuyen a la toma de decisiones con relación a sustratos y técnicas para la obtención de biomasa con fines de formulación de bioproductos. Al respecto Pineda-Insuasti *et al.* (2017) señalan, que, de manera comercial, las presentaciones de los biopreparados pueden ser variables para una mejor manipulación del producto; en este sentido mencionan que es preferible la fermentación sólida para la formulación de polvos húmedos, polvos secos, formulaciones en aceite y encapsulados de esporas de *Trichoderma* spp.

Artículos

Tabla 1. Producción de conidios, viabilidad y pureza de la cepa TFR3 obtenidos mediante las técnicas de fermentación líquida, sólida y bifásica.

Fermentación – Sustrato	Peso de biomasa en g	Conidios g ⁻¹ de biomasa	% de viabilidad	% de pureza
Líquida	-----**	15 930 000.0**	85.8abc	100
Sólida - AE	1.61a	698 125 000.0a	89.4ab	100
Sólida - TE	0.29de	640 625 000.0a	77.3bcd	100
Sólida - SE	0.42cde	194 625 000.0c	86.0abc	100
Sólida - ST	0.37de	194 500 000.0c	82.0abc	100
Sólida - AT	0.87b	46 625 000.0d	93.5a	100
Sólida - TT	0.10e	2 800 000.0e	1.9e	89
Bifásica - AE	0.56bcd	720 250 000.0a	91.1ab	100
Bifásica - SE	0.75bc	379 506 666.6b	84.4abc	100
Bifásica - ST	0.36de	343 387 500.0b	81.4abc	100
Bifásica - TT	0.59bcd	323 676 666.6b	63.5d	100
Bifásica - TE	0.88b	293 483 333.4b	75.3cd	100
Bifásica - AT	1.38a	152 595 833.3c	87.3abc	100

Los valores representan las medias; letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas (Tukey, $p \leq 0.05$). AE= arroz entero, SE= sorgo entero, TE= trigo entero, AT= arroz triturado, ST= sorgo triturado y TT= trigo triturado.

**Para esta técnica los conidios fueron cuantificados en 1 mL de la muestra líquida ya que no se obtuvo biomasa.

Conclusiones

La producción de *Trichoderma asperellum* cepa TFR3 estuvo influenciada por el sistema de fermentación y el tipo de sustrato. El arroz entero destacó como el sustrato más favorable, ya que en fermentación sólida permitió obtener la mayor cantidad de biomasa (**1.61 g**) y una elevada producción de conidios (**6.98125×10^8 conidios g⁻¹ de biomasa**) con una viabilidad del 89.4%, mientras que la fermentación bifásica con este mismo sustrato alcanzó la mayor producción de conidios (**7.2025×10^8 conidios g⁻¹ de biomasa**) y 91.1% de viabilidad. En conjunto, estos resultados demuestran el potencial del arroz entero para la producción de biomasa y conidios de *T. asperellum* TFR3.

Referencias

Agus N, Saranga AP, Rosmana A, Sugiarti A (2015) Viability and conidial production of entomopathogenic fungi *Penicillium* sp. International Journal of Scientific and Technology Research 4(1): 193-195 <https://www.ijstr.org>.

Antomarchi OY, Tamayo RE, Guerra BJL, Siannah MMD, Barrera AAL (2023) Producción de hongo *Trichoderma harzianum* a-34 en sustratos sólidos alternativos. Revista Científica Arbitrada Multidisciplinaria Pentaciencias 5(1): 259-267 <http://editorialalema.org/index.php/pentaciencias/article/view/440/572>

Becker P, Esker P, Umaña-Rojas G (2024) Fermentation of *Trichoderma* for biological control using local inputs in Costa Rica. Agronomía Mesoamericana 35(1):A55761. <https://doi.org/10.15517/am.2024.55761>

Cardona NL, Borrego DA, Fernández EP, Sánchez J, Cardona V, Montoya G (2014) Evaluación microbiológica y patogenicidad de una bioformulación líquida del hongo *Purpureocillium* sp. (cepa UdeA 0109) sobre estadios de *Meloidogyne incognita-javanica*. Biotecnología aplicada 31(3):1-6. <https://www.researchgate.net/publication/330523185>

Castro DRL, De Andrade CAL, Costa LB, De Almeida HVB, Guedes SL, Vegette PZ, Boechat MMA, Vasconcelos De MFH, Moura MG, Bettiol W (2020) Optimizing mass production of *Trichoderma asperelloides* by submerged liquid fermentation and its antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. World J Microbiol Biotechnol 36(8):113. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-020-02882-7>

Ceballos-Chávez ÁR, López-Valenzuela BE, Valenzuela-Escoboza FA, López-Bautista E, Marquez-Lujan H, Chávez-García LE (2025) Reproducción conidial de *Trichoderma asperelloides*, en medios de cultivo y sustratos orgánicos. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 16(1): e3510 <https://doi.org/10.29312/remexca.v16i1.3510>

Artículos

Chahal SD (1985) Solid-State fermentation with *Trichoderma* cellulase production. Applied and Environmental Microbiology 49(1): 205-210.

García-Velasco R, Alonso-Baena A, Domínguez-Arismendi G, Aguilar-Medel S, Mora-Herrera ME, Companioni-González B (2021a) Antagonismo de cepas nativas de *Trichoderma* spp. para el control de *Rosellinia necatrix* en el cultivo de la rosa. Agronomía Tropical 71(1):1-15.
<https://doi.org/10.5281/zenodo.4605221>

García-Velasco R, Alonso-Baena A, Domínguez-Arismendi G, Aguilar-Medel S, Mora-Herrera ME, Companioni-González B (2021b) Antagonismo *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. contra *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea* en el Estado de México. Agronomía Tropical 71(1): 1-13.
<https://doi.org/10.5281/zenodo.5091830>

García-Velasco R, Rojas-Tapia G, Domínguez-Arismendi G, Companioni-González B (2021c) Sensibilidad *in vitro* de cinco cepas nativas de *Trichoderma* spp. a diferentes fungicidas. Agronomía Tropical 71(1):1-12
<https://doi.org/10.5281/zenodo.5515702>

García R, Durán MA, Riera R (2006) Producción de biomasa de *Trichoderma harzianum* por fermentación líquida. Fitosanidad 10(4):295-298.
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209116183008>

Hernández-Melchor DJ, Ferrera-Cerrato R, Alarcón A (2019) *Trichoderma*: Importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. Chilean Journal of Agricultural and Animal Sciences 35(1):98-112.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902019005000205>

Ipiates JJP, Pineda IJA, Barrigas RDA, Muñoz PFA, Pineda SCA (2021) Producción del hongo-moho (*Trichoderma harzianum*): una revisión. Revista Biorefinería 4(4):1-16.
<https://cebaecuador.org/wp-content/uploads/2022/01/14.pdf>

Li N, Islam MT, Kang S (2019) Secreted

metabolite-mediated interactions between rhizosphere bacteria and *Trichoderma* biocontrol agents. PLOS ONE 14(12).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227228>

Locatelli GO, Pimentel MF, Bueno LA, Júnior ML, Mascarín GM, Luna Frinkler CL (2022) Production of microsclerotia by *Trichoderma asperellum* through submerged liquid fermentation using low-cost nitrogen and carbon sources. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 44. 102455.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1878818122001827>

López AYM (2018) Producción y formulación de *Trichoderma asperellum* para el manejo de patógenos de la raíz de caña de azúcar. Tesis Maestría en Biología y Química. Universidad Autónoma del Estado de Morelos Centro De Investigaciones Biológicas. Cuernavaca Morelos. pp. 1-108.
<http://riaa.uaem.mx/xmlui/handle/20.500.12055/646>

López MTA, Páramo ALA, Delgado SHD, Delgado SHD (2022) Reproducción masiva de hongos *Trichodermas* previamente identificados de suelos nicaragüenses en diferentes sustratos orgánicos. Revista Científica Nexa 35(03):700-712
<https://doi.org/10.5377/nexo.v35i03.15000>

Naeimi S, Khosravi V, Varga A, Vágvolgyi C, Kredics L (2020) Screening of organic substrates for solid-state fermentation, viability and bioefficacy of *Trichoderma harzianum* AS12-2, a biocontrol strain against rice sheath blight disease. Agronomy 10(9):1258.
<https://doi.org/10.3390/agronomy10091258>

Pandey A (2003) Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3): 81-84. DOI [10.1016/S1369-703X\(02\)00121-3](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00121-3)

Pineda-Insuasti JA, Benavides-Sotelo EN, Duarte-Trujillo AS, Burgos-Rada CA, Soto-Arroyave CP, Pineda-Soto CA, Fierro-Ramos FJ, Mora-Muñoz ES, Álvarez-Ramos SE (2017) Producción de biopreparados de *Trichoderma* spp: una revisión. ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar 51(1):47-52
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223153894008>

Rai PD, Ranjan RK, Kumar RM (2023)

Artículos

Evaluation of local solid and liquid substrates for growth and sporulation of *Trichoderma asperellum*. The Pharma Innovation Journal 12(3):15-18.

<https://doi.org/10.22271/tpi.2023.v12.i3a.19268>

[Singhania](#) RR, [Patel](#) KA, [Socco](#) RC, [Pandey](#) A (2009) Recent advances in solid-state fermentation. [Biochemical Engineering Journal](#) 44(1): 13-18.

<https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.019>

Tanaka S, Kahmann R (2021) Cell Wall-associated effectors of plant-colonizing fungi.

Micology 113(2):247-260.

<https://doi.org/10.1080/00275514.2020.1831293>

Troya C, Vaca GL (2014) Protocolo para la producción de cepas nativas de *Trichoderma* spp. en laboratorios artesanales. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. Ed. Planta Central MAGAP. Ecuador. 42.

<https://www.agricultura.gob.ec/wp-content/uploads/2016/01/MANUAL-labos-para-web.pdf>. Consultado en 2024.