



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**



**Centro Universitario UAEM Tenancingo**



**Evaluación de sustratos por fermentación líquida, sólida y bifásica para la producción de *Trichoderma asperellum* cepa TFR3**

**T E S I S**

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENER EL TÍTULO DE:  
INGENIERO AGRÓNOMO EN FLORICULTURA**

**P R E S E N T A**

**DULCE MARÍA CORTES DE LEÓN**

**DIRECTORES**

**Dr. en C. Rómulo García Velasco**

**Dra. en C. Barbarita Companioni González**

**ASESORA**

**M. en C. Grisel Domínguez Arizmendi**

**Tenancingo, Estado de México 2023**

## CONTENIDO

<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>v</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>vii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
2.1. Taxonomía del género <i>Trichoderma</i> spp. ....	3
2.2. Características morfológicas .....	3
2.3. Condiciones óptimas de desarrollo .....	4
2.4. Mecanismos de acción .....	4
2.4.1. Competencia por el espacio y nutrientes .....	4
2.4.2. Micoparasitismo .....	5
2.4.3. Antibiosis .....	6
2.4.4. Desactivación de las enzimas de patógenos .....	7
2.4.5. Estimulación del crecimiento vegetal .....	7
2.4.6. Inducción de resistencia sistémica .....	8
2.5. Producción masiva de <i>Trichoderma</i> spp. ....	8
2.5.1. Tipos de fermentación para la obtención de biopreparados .....	9
2.5.2. Fermentación líquida .....	10
2.5.3. Fermentación sólida .....	12
2.5.4. Fermentación bifásica .....	13
2.6. Condiciones necesarias para su reproducción masiva .....	14
2.7. Sustratos utilizados para la producción masiva de <i>Trichoderma</i> spp. ....	17
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>21</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>22</b>
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
5.1. Objetivo general .....	23
5.2. Objetivos específicos .....	23
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
6.1. Localización de la investigación .....	24

6.2.	Selección de la cepa de <i>Trichoderma</i> .....	24
6.2.1.	Reactivación de <i>Trichoderma asperellum</i> cepa TFR3 .....	24
6.3.	Fermentación líquida.....	25
6.3.1.	Obtención de inóculo .....	25
6.3.2.	Preparación del medio líquido para la producción masiva de <i>T. asperellum</i> cepa TFR3.....	25
6.3.3.	Cuantificación de la producción de conidios en el medio líquido .....	26
6.4.	Fermentación sólida .....	27
6.4.1.	Preparación del inóculo de TFR3 .....	27
6.4.2.	Preparación del medio sólido para la producción masiva de <i>T. asperellum</i> cepa TFR3.....	28
6.4.3.	Inoculación de la cepa TFR3 en el medio sólido .....	30
6.4.4.	Cuantificación de la producción de conidios de TFR3 .....	30
6.4.5.	Cuantificación de la biomasa .....	32
6.4.6.	Evaluación de la viabilidad de los conidios .....	33
6.4.7.	Pureza de la biomasa .....	36
6.5.	Fermentación bifásica .....	37
6.5.2.	Cuantificación de conidios en el sustrato, obtención de la biomasa y cuantificación de conidios de TFR3 .....	37
6.6.	Diseño experimental y análisis estadístico .....	39
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
7.1.	Fermentación líquida.....	40
7.2.	Fermentación sólida .....	41
7.2.1.	Producción de conidios por gramo de sustrato.....	41
7.2.2.	Cantidad de biomasa.....	42
7.2.3.	Conidios por gramo de biomasa .....	43
7.2.4.	Viabilidad de la biomasa .....	44
7.2.5.	Pureza de la biomasa .....	46
7.3.	Fermentación bifásica .....	48
7.3.1.	Producción de conidios por gramo de sustrato.....	48
7.3.2.	Producción de biomasa .....	49

7.3.3. Conidios por gramo de biomasa .....	50
7.4. Conidios de <i>T. asperellum</i> cepa TFR3 por fermentación líquida, sólida y bifásica.....	51
7.5. Conidios por gramo de biomasa de <i>T. asperellum</i> cepa TFR3 por medio de fermentación sólida y bifásica .....	52
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	<b>58</b>
<b>9. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>59</b>
<b>10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>60</b>
<b>11. ANEXOS</b> .....	<b>73</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Sustratos evaluados en la producción de un biopreparado con <i>T. asperellum</i> cepa TFR3.	<b>28</b>
<b>Cuadro 2.</b> Concentración de conidios de TFR3 por medio de fermentación líquida.	<b>40</b>
<b>Cuadro 3.</b> Producción de conidios de <i>T. asperellum</i> cepa TFR3 por gramo de por gramo de sustrato obtenido de fermentación sólida.	<b>41</b>
<b>Cuadro 4.</b> Producción de conidios por gramo de biomasa obtenida de fermentación sólida en 21 días.	<b>43</b>
<b>Cuadro 5.</b> Porcentaje de viabilidad de la germinación de conidios de la biomasa obtenida de fermentación sólida en 21 días.	<b>44</b>
<b>Cuadro 6.</b> Producción de conidios de <i>T. asperellum</i> por gramo de sustrato en fermentación bifásica en 21 días.	<b>48</b>
<b>Cuadro 7.</b> Producción de conidios por gramo de biomasa obtenida de fermentación bifásica en 21 días.	<b>50</b>
<b>Cuadro 8.</b> Producción de conidios de la cepa TFR3 por medio de fermentación líquida, sólida y bifásica.	<b>51</b>
<b>Cuadro 9.</b> Conidios de <i>T. asperellum</i> cepa TFR3 por gramo de biomasa obtenida a través de la fermentación bifásica y sólida.	<b>52</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Medio líquido A) medio líquido estéril, B) posición del medio líquido inoculado con *T. asperellum* cepa TFR3 durante la incubación. **26**
- Figura 2.** Inoculación de los sustratos con *T. asperellum* cepa TFR3; A) caja de Petri con la cepa TFR3, B) obtención de las esporas de TFR3 para inocular el medio sólido. **28**
- Figura 3.** Proceso de escurrimiento para eliminar el exceso de agua en los sustratos de sorgo, trigo, arroz en grano entero y triturado. **29**
- Figura 4.** Incubación de los sustratos, siete días de la inoculación con *T. asperellum* cepa TFR3. **30**
- Figura 5.** Proceso de cuantificación de conidios: A) sorgo esporulado con *T. asperellum* cepa TFR3, B) pesado del sustrato, C) agitación de la suspensión y D) muestra de la suspensión en cámara de Neubauer para el recuento de conidios. **31**
- Figura 6.** Recuento de esporas en cámara de Neubauer con microscopio compuesto a 40x. **32**
- Figura 7. A)** Biomasa obtenida de *T. asperellum*, B) almacenamiento de la biomasa en bolsas de aluminio para su conservación a 2 °C. **33**
- Figura 8.** Caja de Petri con disposición de las alícuotas de conidios de *T. asperellum* y disposición de cubreobjetos para la observación a microscopio óptico. **35**

- Figura 9.** Vista a 40x de conidios de *T. asperellum* germinados para la evaluación de la viabilidad. **35**
- Figura 10.** Vista de conidios de *T. asperellum* para la determinación de la pureza bajo microscopio compuesto a 40x. **36**
- Figura 11.** Fermentación bifásica para la reproducción masiva de la cepa TFR3. A) lavado y pesado de los sustratos sólidos, B) inoculación del medio líquido en el medio sólido estéril, c) incubación de los sustratos a 28° C con luz blanca, D) pesado de sustrato para el conteo de conidios de TFR3, E) secado del sustrato para la obtención de la biomasa y D) biomasa obtenida. **38**
- Figura 12.** Peso de la biomasa de *Trichoderma asperellum* cepa TFR3 obtenida de los sustratos por medio de fermentación sólida. **42**
- Figura 13.** Germinación de conidios sobre medio de cultivo PDA. Conidio germinado y tubo germinativo de *T. asperellum* cepa TFR3. **45**
- Figura 14.** Pureza de los conidios de TFR3 obtenidos de la biomasa en la fermentación sólida en 21 días. **46**
- Figura 15.** Vista a microscopio (40x) de la pureza de la biomasa de *T. asperellum* cepa TFR3, sobre medio PDA. **47**
- Figura 16.** Peso de la biomasa de *Trichoderma asperellum* cepa TFR3 obtenida de los sustratos por medio de fermentación bifásica. **49**

## RESUMEN

En los cultivos se presentan enfermedades causadas por hongos, bacterias, nematodos y virus. El principal método de manejo de estas enfermedades es mediante el control químico con la aplicación de fungicidas, pero resulta costoso y dañino para el medio ambiente; por ello es necesaria la búsqueda de alternativas sustentables como el control biológico a través de microorganismos nativos, tal es el caso de *Trichoderma asperellum* cepa TFR3. Para poder aplicar este microorganismo en campo es necesario reproducirlo masivamente por medio de fermentación líquida, sólida y bifásica. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar el potencial de granos enteros y triturados de trigo, sorgo y arroz como sustratos para la producción de biomasa de *T. asperellum* cepa TFR3, mediante las técnicas de fermentación líquida, bifásica y sólida. La mayor producción de conidios fue en trigo triturado con  $7.11 \times 10^8$  conidios  $g^{-1}$  de sustrato en fermentación bifásica, el mayor peso de biomasa fue obtenido de fermentación sólida en arroz entero con 1.61 g, la mayor concentración de conidios por gramo de biomasa fue de  $3.80 \times 10^9$  conidios  $g^{-1}$  en sorgo entero. La viabilidad de la germinación de conidios de la biomasa obtenida a través de la fermentación sólida fue mayor en el arroz triturado con 93.50 % y menor en grano de trigo triturado con 1.88 %. La pureza de la biomasa de *T. asperellum* obtenida de los sustratos por medio de fermentación sólida fue del 100 % para todos los tratamientos, excepto para trigo triturado con 89 %.

## 1. INTRODUCCIÓN

En los cultivos se presentan enfermedades causadas por diversos microorganismos, entre los que se encuentran hongos, bacterias, nematodos y virus (Santana-Hernández *et al.*, 2017). El principal método de manejo de estas enfermedades es mediante el control químico con la aplicación de fungicidas, pero resulta costoso y dañino para el medio ambiente; en este sentido, varios autores plantean que este método de control no brinda resultados satisfactorios debido a la aparición de resistencia en los patógenos (Schirawski y Perlin, 2018; Stringlis *et al.*, 2018; Companioni-González *et al.*, 2019). Sin embargo, existen microorganismos nativos antagonistas, a partir de lo cual es posible disminuir el uso de fertilizantes y pesticidas (Cruz-Cárdenas *et al.*, 2021).

La utilización de microorganismos para el manejo de plagas y enfermedades constituye una alternativa viable para asegurar la producción de los cultivos de forma amigable con el medio ambiente; entre estos destaca el género *Trichoderma* por ser considerado como uno de los antagonistas más utilizado en la agricultura moderna sostenible (Youseff *et al.*, 2016; Pineda-Insuasti *et al.*, 2017). En estudios previos, García-Velasco *et al.* (2021) aislaron a *Trichoderma asperellum* cepa TFR3 y demostraron el efecto antagónico *in vitro* frente a los hongos fitopatógenos *Rosellinia necatrix*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea*, siendo una alternativa de control biológico frente a estas enfermedades.

Como parte del uso de *Trichoderma* spp. en campo es necesaria su reproducción masiva, para ello es necesario un proceso de fermentación que puede ser líquida, sólida o bifásica, los últimos dos procesos involucran sustratos para que el hongo se desarrolle (Pineda-Insuasti *et al.*, 2017). Para *Trichoderma* spp. se han reportado los siguientes sustratos: grano entero de arroz, cáscaras de tomate, cascarilla de arroz, cáscara de ajo, cáscara de cacao, cáscara de ajonjolí, cáscara de cacahuete, cáscara de café, vaina de frijol, rastrojo de soya y maíz, olote de maíz, y granos de

arroz, de sorgo, de alpiste y de maíz quebrado (Michel-Aceves *et al.*, 2008; Pineda-Insuasti *et al.*, 2017), paja de arroz, paja de trigo (Fernández-Larrea, 2001; Pineda-Insuasti *et al.*, 2017), estiércol de granja, pseudotallo de plátano, hojas de plátano secas (Thangavelu *et al.*, 2004), entre otros. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar el potencial de granos enteros y triturados de trigo, sorgo y arroz como sustratos para la producción de biomasa de *T. asperellum* cepa TFR3, mediante tres técnicas de fermentación.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Taxonomía del género *Trichoderma* spp.

El género *Trichoderma* fue descrito por primera vez por Persoon en 1794 (Martínez *et al.*, 2015). En la mayoría de las especies solo se conoce el estado anamorfo perteneciendo al género *Trichoderma*, mientras que cuando se presenta el estado teleomorfo pertenecen al género *Hypocrea* (Argumedo *et al.*, 2009). De acuerdo con Kirk *et al.* (2018), el género *Trichoderma* se ubica en la siguiente clasificación taxonómica:

**Reino:** Fungi

**Phylum:** Ascomycota

**Clase:** Sordariomycetes

**Orden:** Hypocreales

**Familia:** Hypocreaceae

**Género:** *Trichoderma*

**Especie:** *Trichoderma asperellum*  
Samuels, Lieckf y Nirenberg

### 2.2. Características morfológicas

Las especies pertenecientes al género *Trichoderma* spp. son hongos de rápido crecimiento, con hifas hialinas septadas y ramificadas; fiálides en forma de matraz; conidióforos hialinos, generalmente ramificados que se forman de hifas en ángulos de 90° y en ocasiones presentan disposición piramidal; y los conidios son unicelulares, redondos y de pigmentación verdosa. En medios de cultivo con

condiciones restringidas algunas especies pueden formar clamidosporas que suelen ser globosas (Sánchez, 2009) y como estructuras de resistencia suelen desarrollar microesclerocios (Kobori *et al.*, 2015).

### **2.3. Condiciones óptimas de desarrollo**

Las especies de *Trichoderma*, en general son de rápido crecimiento, producen conidios abundantes y tienen amplia gama de enzimas que les permiten habitar en casi todos los suelos agrícolas y en otros ambientes, por lo que tienen una gran plasticidad ecológica. Se distribuyen por todas las latitudes, desde zonas polares hasta ecuatoriales, se caracterizan por ser saprófitas ya que sobreviven en suelos con diferentes cantidades de materia orgánica. En lo que respecta a sus requerimientos de oxígeno, en determinadas condiciones pueden ser anaerobias facultativas (Howell, 2003; Martínez *et al.*, 2015).

### **2.4. Mecanismos de acción**

Las especies de este género presentan diferentes mecanismos frente a fitopatógenos, entre los que se encuentran: competencia por el espacio y nutrientes, micoparasitismo, antibiosis, desactivación de enzimas del patógeno, inducción de resistencia sistémica, entre otros (Infante *et al.*, 2009; Companioni-González *et al.*, 2019). En este apartado se mencionan en qué consisten los mecanismos y cuales se han presentado en cepas de *T. asperellum* Samuels.

#### **2.4.1. Competencia por el espacio y nutrientes**

La competencia por el sustrato es definida como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento (por ejemplo, sustrato y nutrientes), siempre y cuando su utilización reduzca la cantidad o espacio disponible para los demás (Infante *et al.*, 2009).

Camacho-Luna *et al.* (2021), encontraron que un aislado de *T. asperellum* a nivel *in vitro* presentó inhibición del crecimiento micelial de *Alternaria porri* Ellis en un 53 % en el cultivo de cebolla (*Allium cepa* L.); en el mismo cultivo, Rivera-Méndez *et al.* (2020), evaluaron tres cepas (BCC1, BCF2 y BCF7) a nivel *in vitro* de *T. asperellum*, de las cuales, la cepa BCC1 mostró un porcentaje de 89.86 % de inhibición contra el patógeno *Sclerotium cepivorum* Berk, siendo significativamente más alto en comparación con las cepas BCF2 y BCF7. De igual manera, en el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.), Andrade-Hoyos *et al.* (2019), determinaron que *T. asperellum* inhibió el crecimiento de *Fusarium oxysporum* en 88.25 % de inhibición.

Asimismo, la cepa TFR3 de *T. asperellum* a nivel *in vitro* por el mecanismo de competencia sobrecreció por completo al patógeno *Botrytis cinerea* con un porcentaje de inhibición del 67,7 %, de igual modo sobrecreció a *Rosellinia necatrix* con el 86.5 % de inhibición y frente a *Verticillium dahliae* con un porcentaje de 70.6 % (Alonso, 2020; García-Velasco *et al.*, 2021).

#### **2.4.2. Micoparasitismo**

El micoparasitismo es definido como una relación antagónica en la que un organismo se nutre de otro por lo que le provoca daño, en este se encuentran implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas y celulasas, las cuales componen y dan estructura a las paredes celulares de los hongos parasitados. El micoparasitismo consta de cuatro fases: a) crecimiento quimiotrófico, b) reconocimiento, c) adhesión y enrollamiento y d) actividad lítica (Infante *et al.*, 2009).

El crecimiento quimiotrófico consiste en el desarrollo directo hacia algún estímulo químico, seguido por el reconocimiento por medio de interacciones lectinas-carbohidratos. Una vez que el reconocimiento es positivo, las hifas de *Trichoderma* spp. se adhieren a las del hospedante por procesos enzimáticos y se enrollan alrededor de ellas. Posteriormente ocurre la activación lítica a través de enzimas

extracelulares que degradan las paredes celulares del hospedante y posibilitan la penetración de *Trichoderma* spp. para que este absorba los nutrientes del hongo fitopatógeno (Infante *et al.*, 2009).

Camacho-Luna *et al.* (2021), observaron las cuatro fases que conforman el proceso de micoparasitismo de *T. asperellum* frente a *A. porri* en el cultivo de cebolla, igualmente, Andrade-Hoyos *et al.* (2019), observaron micoparasitismo por parte de *T. asperellum* frente a los patógenos del chile *F. oxysporum* y *Phytophthora capsici* Leonian. En la cepa TFR3 de *T. asperellum* observaron micoparasitismo frente a *B. cinerea* y *V. dahliae* (Alonso, 2020; García-Velasco *et al.*, 2021).

### **2.4.3. Antibiosis**

La antibiosis se debe a la producción de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles (Infante *et al.*, 2009), a partir de los cuales, sin necesidad de contacto físico se inhibe el crecimiento de otros microorganismos (Infante *et al.*, 2009; Hernández-Lauzardo *et al.*, 2007); es importante considerar que no debe ser el único mecanismo de acción frente al patógeno, puesto que pueden aparecer cepas del patógeno con resistencia a tales antibióticos (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2007).

Zeilinger *et al.* (2016), hacen mención que los principales metabolitos secundarios volátiles y no volátiles del género *Trichoderma* spp. están conformados por péptidos no ribosómicos (peptaibióticos y dicetopiperazinas), policétidos, diterpeno tetracíclico harziandiona, sesquiterpenos como los tricotecenos, trichodermina y harzianum A, y el triterpeno viridin, pironas y metabolitos de isociana. En algunos estudios a nivel *in vitro*, se ha demostrado que algunas cepas de *T. asperellum* inhiben el crecimiento de *A. solani*, por medio de antibiosis con metabolitos volátiles y no volátiles (Ronnie-Gakegne y Martínez-Coca, 2018). La cepa TFR3 inhibió al patógeno *R. necatrix* mediante metabolitos volátiles (Alonso, 2020; García-Velasco *et al.*, 2021).

#### **2.4.4. Desactivación de las enzimas de patógenos**

Uno de los mecanismos de acción indirectos de *Trichoderma* spp. es la desactivación de enzimas del patógeno, en este caso su potencial enzimático puede ser mayor al secretar más de 70 metabolitos, entre ellos estimuladores de crecimiento de las plantas (Martínez *et al.*, 2013).

#### **2.4.5. Estimulación del crecimiento vegetal**

Algunos de los metabolitos secretados por *Trichoderma* spp. pueden estimular el crecimiento de una gran diversidad de plantas, incluyendo cultivos de ornamentales, frutales y forestales; el nivel de promoción del crecimiento puede aumentar hasta 200 % en la biomasa total, en comparación con las plantas no inoculadas (Companioni *et al.*, 2019).

Harman *et al.* (2004), mencionan que durante muchos años se supo de la capacidad del género *Trichoderma* para estimular el crecimiento de las plantas, en especial el sistema radicular, lo que a su vez puede mejorar la productividad de los cultivos. Por su parte Singh *et al.* (2015), estudiaron el efecto de la cepa T42 de *T. asperellum* sobre las plantas de chícharo (*Pisum sativum*), como resultados reportan que las semillas tratadas presentaron mayor tasa de germinación (85-90 %) en contraste con el control (65-75 %); asimismo, observaron desarrollo inducido de raíces y brotes, además el aumento en el contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofila), carotenoides, azúcar total y proteínas en comparación con las plantas control.

En otro estudio, Tchameni *et al.* (2011), evaluaron la cepa PR11 de *T. asperellum*, en plántulas de cacao (*Theobroma cacao* L.) bajo condiciones de invernadero, los autores reportan que se obtuvo aumento significativo en la altura de las plantas, el peso fresco de raíces y brotes, así como en la absorción de fósforo en comparación con las plantas control no inoculadas.

Por otra parte, González-Marquetti *et al.* (2019), observaron estimulación de crecimiento al inocular cuatro cepas (Ta. 13, Ta.78, Ta.85 y Ta.90) de *T. asperellum* en semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y todas las plantas inoculadas germinaron al tercer día de la siembra mientras que las plantas control lo hicieron al quinto día.

#### **2.4.6. Inducción de resistencia sistémica**

Otro mecanismo del género *Trichoderma* spp. es la resistencia sistémica inducida (RSI), la cual aumenta la expresión de genes relacionados con la defensa en toda la planta a corto plazo, y por tanto es similar a la resistencia sistémica adquirida (Harman *et al.* ,2004). En cebolla, se ha demostrado la inducción de resistencia sistémica de *T. asperellum* frente a *Sclerotium rolfsii* Sacc derivado del incremento de la actividad enzimática en bulbo y raíz, pero no en las hojas; además, la respuesta sistémica inducida por *T. asperellum* no se modifica por la presencia del patógeno, es decir *T. asperellum* induce la resistencia en presencia o no del patógeno (Guzmán, 2012).

#### **2.5. Producción masiva de *Trichoderma* spp.**

El uso de microorganismos antagonistas para el manejo de enfermedades en plantas se plantea en dos enfoques importantes: en primer lugar, la conservación por medio de la estimulación y el manejo de los antagonistas presentes en el entorno de la planta; y en segundo lugar, por la introducción artificial de antagonistas contra los patógenos (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2007).

*Trichoderma* spp. produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y esporas (Vassilev y Mendes, 2018), además de microesclerocios como estructuras de resistencia (Kobori *et al.*, 2015). Para su producción masiva, los conidios son más viables, ya que se caracterizan por tener pared gruesa constituida por tres capas

que protegen el protoplasto: endospora, epispora y perispora (Vassilev y De Oliveira, 2018).

La producción de hongos antagonistas se realiza mediante la fermentación con la finalidad de obtener la mayor cantidad de conidios ya que son los propágulos más estables que se pueden utilizar y almacenar para su posterior uso en los cultivos (Pineda-Insuasti *et al.*, 2017), los métodos de fermentación existentes se describen a continuación.

### **2.5.1. Tipos de fermentación para la obtención de biopreparados**

La FAO (2010), menciona que “Los biopreparados son productos elaborados a partir de restos de origen vegetal o sustancias de origen mineral o animal, que ayudan a disminuir los problemas de plagas y enfermedades y mejorar el desarrollo de los cultivos”. También señala que se pueden clasificar de acuerdo con su modo de acción en: bioestimulantes, biofertilizantes, biofunguicidas y bioinsecticidas o biorepelentes. Estos biopreparados se elaboran a partir de agentes de control biológico, entre los que se encuentran bacterias, hongos, virus, entre otros. Dentro de estos se encuentra *Trichoderma* spp., el cual representa una alternativa como biofungicida; su producción masiva se realiza de forma artesanal o industrial por medio de la fermentación líquida, fermentación sólida y la fermentación bifásica (Pineda-Insuasti *et al.*, 2017).

De acuerdo con Chen (2013), la fermentación es un proceso mediante el cual los microorganismos catalizan nutrientes, sintetizan metabolitos secundarios y completan otras actividades fisiológicas en condiciones anaeróbicas o aeróbicas. Durante el proceso se acumulan los microorganismos o metabolitos microbianos deseados; por lo tanto, hay tres elementos importantes que deben ser considerados en estudios enfocados en la fermentación: el producto objetivo claro, la cepa productora y el ambiente de evaluación deseado (nutrientes, temperatura,

humedad, oxígeno, etc.). Los objetivos de las fermentaciones se dividen en cuatro tipos: producción de biomasa (material celular viable), producción de metabolitos extracelulares (compuestos químicos), producción de elementos enzimáticos (enzimas y proteínas) y transformación del sustrato, en la que el sustrato reelaborado es en sí mismo el producto (Vuppala *et al.*, 2015).

### **2.5.2. Fermentación líquida**

Es una técnica para el crecimiento de microorganismos y para la multiplicación de la biomasa en un medio líquido, donde todos los nutrientes se encuentran disueltos en el medio de cultivo y el proceso se lleva a cabo bajo condiciones fisicoquímicas controladas (García *et al.*, 2006; López, 2018). El medio de cultivo líquido básico para la producción de hongos antagonistas debe contener una fuente de carbohidratos, fuente de nitrógeno y antibióticos para inhibir el crecimiento de bacterias (Jaronski y Jackson, 2012; López, 2018). Lo recomendable es que el medio sea económico, de fácil adquisición y con buen balance nutricional, siendo los más utilizados las melazas y caldos de cultivo ricos en sales minerales, vitaminas y azúcares, entre otros (Hernández-Melchor *et al.*, 2019).

La fermentación líquida a gran escala se lleva a cabo en tanques especializados (biorreactores), en las que el suministro de aire puede realizarse mediante un sistema de agitación neumática o mecánica, o su combinación (Vuppala *et al.*, 2015). Actualmente, los problemas de la fermentación líquida, como el alto consumo de energía y la contaminación grave son cada vez más prominentes, lo que limita el desarrollo sostenible de la fermentación (Chen, 2013).

Para la fermentación líquida de *T. asperellum* es necesario la provisión de una fuente de energía y de oxígeno para la preservación de la formulación, ya que el micelio en formulación se puede almacenar durante mucho tiempo (hasta medio año y más) si se proporciona una reposición continua de nutrientes y acceso libre

de oxígeno, siendo requisitos difíciles de cumplir para un producto comercial (Kolombet *et al.*, 2008). Sin embargo, la fermentación líquida de *Trichoderma* spp. es una alternativa cuando la demanda es alta, ya que de esta manera se acelera el proceso de producción masiva y se obtiene el producto en un tiempo más corto con mayor cantidad y variedad de propágulos, lo cual indiscutiblemente aumenta su eficiencia (García *et al.*, 2006).

La mayoría de los trabajos relacionados con la producción masiva de unidades formadoras de colonias (UFC) están enfocados a la producción de conidios. Sin embargo, recientemente se está poniendo atención en la producción de microesclerocios (MS) como una estructura de mayor resistencia y adaptabilidad a las condiciones adversas; la inducción para la formación de esta estructura está relacionada con las condiciones nutricionales, principalmente del C y N y su relación a la proporción, sin dejar de lado la consideración de materiales de bajo costo para la producción de MS. Bajo estas consideraciones Locatelli *et al.* (2022), estudiaron dos cepas de *T. asperellum* (cepas BRM-29576 y BRM-29104) originarias del Brasil, evaluaron la fuente y concentración de C, fuente de N, relación C:N y cepa fúngica; donde obtuvieron que las condiciones nutricionales óptimas para mejorar el rendimiento de MS se lograron usando sacarosa y levadura autolizada en una concentración de C a  $20 \text{ g L}^{-1}$  y relación C:N de 10:1 para la cepa BRM-29104, que superó a la otra cepa y alcanzó hasta  $2.5 (\pm 0.9) \times 10^4 \text{ MS mL}^{-1}$  dentro de los siete días de la fermentación líquida. Además, la filtración al vacío de la biomasa (MS) a través de un filtro de nailon (malla  $200/74 \mu\text{m}$ ) aumentó la concentración de MS, lo que resultó en hasta  $1.8 (\pm 0.2) \times 10^5 \text{ MS g}^{-1}$ . Los autores sostienen que esta propuesta en medio líquido es rentable para lograr altos rendimientos de MS con la cepa BRM-29104 en combinación con un método fácil de cosechar y concentrar MS a partir de caldo de cultivo para un mayor desarrollo de la formulación.

### 2.5.3. Fermentación sólida

La fermentación sólida se divide en dos categorías según los requisitos de los microorganismos: un proceso de cultivo puro o no puro. Un proceso de cultivo no puro (compostaje, ensilado, etc.) gestiona las poblaciones microbianas mediante el control de las condiciones ambientales como el oxígeno, la temperatura y la humedad; sin embargo, en cultivos puros todas las reacciones biológicas son realizadas por un solo tipo de microorganismo, consecuentemente, a menudo requieren una variedad de características deseables para adaptarse a las demandas de la producción industrial, especialmente para la producción de enzimas, ácidos orgánicos, antibióticos y otros metabolitos (Chen, 2013).

Para la producción de microorganismos tales como *Trichoderma* spp. se busca un proceso de fermentación pura, que consiste en promover el crecimiento del microorganismo en un sustrato o medio sólido, la selección de sustratos se realiza con base al costo, la disponibilidad local y los requerimientos nutricionales de la cepa. A ese sustrato se le adiciona una fuente de N y sales mineralizadas (ricas en macro y micronutrientes), bajo ciertas condiciones de humedad, pH, aireación y temperatura. Este tipo de fermentación no requiere agua libre, pero sí necesita de ciertos parámetros de humedad para su viabilidad (Borrás-Sandoval y Torres-Vidales, 2016) en el que la cantidad de agua no debe exceder la capacidad de saturación del sólido en el cual crecerá el microorganismo (Hernández-Melchor *et al.*, 2019). Es importante destacar que la actividad del agua se relaciona con la germinación de las esporas, la extensión del micelio, la formación de esporas, la generación de otros metabolitos y muchos otros aspectos (Chen, 2013).

La fermentación sólida a pequeña escala es poco costosa, pero es voluminosa debido a que requiere de un amplio espacio para la producción, inoculación y almacenamiento, además del secado y la molienda (Hernández-Melchor *et al.*, 2019); por otro lado, la principal ventaja de la fermentación en estado sólido es un

suministro suficiente de oxígeno. Cabe señalar que se tiene menos agua residual orgánica y mayor rendimiento del producto en la fermentación en estado sólido; además, el ambiente sólido es más similar al hábitat natural de los hongos filamentosos (Chen, 2013).

Chávez-García *et al.* (2009), realizaron un estudio en el que, por medio de fermentación sólida empleando como sustrato arroz-agua destilada a 25° C obtuvieron la mayor concentración de conidios con 96 % de germinación a 24 horas y una pureza estimada de 92.1 %, mientras que en la fermentación líquida produjo una pureza del 76.8 % y la germinación de conidios del 91.2 % después de 24 horas, mostrando un porcentaje inferior de pureza en comparación con la fermentación sólida.

#### **2.5.4. Fermentación bifásica**

La fermentación bifásica como su nombre lo indica, consiste secuencialmente de dos fases: una líquida y otra sólida, al combinarlas el tiempo de fermentación se acorta y a por lo tanto también el proceso de producción masiva de *Trichoderma* spp. Generalmente, en la fermentación bifásica el hongo crece inicialmente en un medio líquido hasta el final de la fase de crecimiento exponencial para obtener un buen inóculo y posteriormente se transfiere esta biomasa a un sustrato sólido (Cruz, 2007).

En la primera fase el medio líquido contiene una concentración adecuada de C y N, los cuales son esenciales para el crecimiento del hongo. En la segunda fase, el sustrato sólido provee una alta área superficial para la aireación y también da soporte físico al hongo para la producción de estructuras germinativas o conidios aéreos y puede ser usado como fuente de nutrientes (Cruz, 2007). Al combinar ambas fases de fermentación aumenta el rendimiento; al respecto, Wei *et al.* (2006), reportaron que en medio líquido se producen sustancias promotoras del crecimiento

de la planta, tales como ácido indolacético, ácido giberélico, citoquininas y vitaminas. Además, es conocido que los conidios son más resistentes que las clamidosporas y se producen en mayor cantidad por fermentación; en sustratos sólidos y en medios líquidos estáticos y agitados (García *et al.*, 2006).

En los sistemas de fermentación bifásicos siempre se debe optimizar el cultivo de la fase líquida para que promueva el rápido crecimiento de la cepa. Además, es la más utilizada a nivel mundial debido a que se obtiene una fuente de inóculo de alta calidad y, además, se acorta el tiempo cuando la fase líquida se hace por cultivo líquido en agitación (Elósegui, 2006).

Una vez que se realizó el proceso de fermentación, ya sea líquida, sólida o bifásica, se requiere de un proceso de secado. El secado es uno de los métodos más antiguos de anticorrosión y conservación de los productos jugando un papel sumamente importante. Según los diferentes productos, los métodos de secado se pueden resumir de la siguiente manera: 1) secado natural (secado al aire); 2) secado con aire caliente; 3) secado por aspersión; 4) secado al vacío; y 5) secado por congelación. Existen tres factores que influyen en la velocidad del secado: el contenido de agua del material, el medio de secado y el equipo de secado; otros factores son: 1) la naturaleza y la forma del material que involucra la estructura física, composición química y el modo de unión mutua de los materiales; 2) la temperatura del material; 3) el contenido de humedad inicial en el material; 4) la temperatura, la humedad y la velocidad del flujo del aire de secado; y 5) estructura del secador (Chen, 2013).

## **2.6. Condiciones necesarias para su reproducción masiva**

Entre las condiciones de importancia para la reproducción masiva de *Trichoderma* spp. se han reportado las siguientes:

a) Fuente de carbono: este hongo degrada polímeros de carbono muy complejos como almidón, pectina y celulosa, entre otros; por lo que se emplean sustratos fácilmente degradables como lactosa o celobiosa (Pineda-Insuasti *et al.*, 2017).

b) Fuente de nitrógeno: tiene la capacidad de asimilar compuestos nitrogenados como aminoácidos, urea, nitritos, amoniacó y sulfato de amonio. Sin embargo, exceso de nitrógeno causa inhibición del crecimiento del hongo (Pineda-Insuasti *et al.*, 2017).

c) Relación carbono-nitrógeno: en el medio de cultivo, mientras el contenido de nitrógeno sea limitado, la fuente carbono debe estar en exceso, lo que inhibe el crecimiento micelial y desencadena el proceso de esporulación (Pineda-Insuasti *et al.*, 2017).

d) Microelementos: solo se requieren cantidades de hierro, cobre, zinc, manganeso y molibdeno en concentraciones cercanas a  $1 \times 10^{-9}$  (Pineda-Insuasti *et al.*, 2017).

e) Vitaminas: entre las que se encuentran tiamina (B1), piridoxina (B6), ácido nicotínico (B3), ácido pantoténico (B5), riboflavina (B2), cianocobalina (B12) y ácido aminobenzoico (Pineda-Insuasti *et al.*, 2017).

f) Humedad: *Trichoderma* presenta poca tolerancia osmótica, por ello el exceso de humedad y poca disponibilidad de oxígeno limitan su desarrollo debido a la compactación del sustrato sólido. En cambio, baja humedad inhibe el desarrollo del hongo al no absorber los nutrientes necesarios para su desarrollo y secar el micelio, los intervalos de humedad van desde los 30 a 35 % y del 70 a 80 % (Pineda-Insuasti *et al.*, 2017).

g) Temperatura: la relación entre la temperatura y el desarrollo de *Trichoderma* spp., al parecer, depende de la especie y del propio aislamiento (Martínez *et al.*, 2013). *Trichoderma* es resistente a altos cambios de temperatura que van de 10 a 40 °C;

no obstante, temperatura inferior a 10 °C y superior a 40 °C su desarrollo no es el adecuado ya que se pierde sus mecanismos de acción y con ello la viabilidad de sus esporas (Pineda-Insuasti *et al.*, 2017). De acuerdo con Fernández *et al.* (2017), la temperatura es un factor limitante en el crecimiento y aspecto de la colonia de *T. asperellum*, siendo la temperatura óptima de crecimiento entre 25 °C a 28 °C.

h) pH: es un parámetro crítico en la viabilidad del hongo (Flores *et al.*, 2003; Pineda-Insuasti *et al.*, 2017). La mayoría de las especies del género pueden crecer en un amplio intervalo de pH de 2 a 6, con un óptimo de 4. El pH se puede ajustar con ácido acético 10 % o con NaOH 2N durante la hidratación del sustrato para fermentación sólida o en la preparación del medio líquido (Pineda-Insuasti *et al.*, 2017).

i) Aireación: la aireación ocasional va a permitir el desarrollo y la esporulación de *Trichoderma* spp., concentraciones de CO<sub>2</sub> superiores al 10 % inhiben su crecimiento. En fermentación líquida es recomendable usar bombas impulsoras para una mejor aireación (Pineda-Insuasti *et al.*, 2017).

j) Empaque: para efectos de facilidad de manipulación se prefiere la presentación sólida, principalmente: polvos humedecibles, polvos secos, formulaciones en aceite y encapsulados que contienen esporas del hongo (Pineda-Insuasti *et al.*, 2017).

Aunado a esto, es de importancia mencionar que el género *Trichoderma* presenta rápido crecimiento y esporulación a exposición constante de luz (Chávez–García *et al.*, 2009).

Sui Ming *et al.* (2019), realizaron un estudio con el objetivo de determinar el efecto de diferentes fuentes de Ca, N y iones de sal inorgánico sobre el índice de biomasa (determinado a partir del peso seco del micelio de *Trichoderma* spp.). De esta manera determinaron que las fuentes de carbono más efectivos fueron la maltosa

con  $1.03 \text{ g } 100^{-1} \text{ mL}$ , seguido de la sacarosa, glucosa, glicerol y lactosa con 0.96, 0.86, 0.83 y  $0.79 \text{ g } 100^{-1} \text{ mL}$ , respectivamente; esto comparado con el testigo que presentó  $0.27 \text{ g } 100^{-1} \text{ mL}$  de biomasa en fermentación líquida, utilizando una dosis de las fuentes de  $20 \text{ g L}^{-1}$ , a excepción del glicerol ( $2 \text{ mL } 100^{-1} \text{ mL}$ ). En relación con las fuentes de N, la biomasa difirió con las fuentes utilizadas, siendo el nitrógeno orgánico más favorable que el nitrógeno inorgánico; en este sentido, las fuentes de nitrógeno orgánico que promovieron el mayor peso de la biomasa fueron la peptona con  $0.89 \text{ g } 100^{-1} \text{ mL}$  y el extracto de levadura con  $0.83 \text{ g } 100^{-1} \text{ mL}$ , ambos a dosis de  $30 \text{ g L}^{-1}$ ; comparados con el nitrato de potasio a dosis de  $3 \text{ g L}^{-1}$ , el cual alcanzó  $0.28 \text{ g } 100^{-1} \text{ mL}$  y el testigo  $0.25 \text{ g } 100^{-1} \text{ mL}$  de micelio seco. Con respecto, a las fuentes de los iones de sal inorgánica, los autores reportaron que el sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ) y cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) a dosis de  $2 \text{ g L}^{-1}$  promovieron significativamente el crecimiento del micelio de *Trichoderma* spp., con  $1.05$  y  $0.82 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$  respectivamente y en consecuencia el peso seco de la biomasa, lo que indica que *Trichoderma* spp. tiene una mayor demanda de iones de Mg.

## **2.7. Sustratos utilizados para la producción masiva de *Trichoderma* spp.**

Para la fermentación bifásica se requiere del medio líquido, algunos de los medios que se han reportado son: una solución acuosa de melaza y levadura (*Saccharomyces cerevisiae*); medios constituidos por glucosa, sulfato de amonio y sales minerales; medios con celulosa, inulina, quitina, pectina y almidón; además se reportan el extracto de levadura, lactosa y ácido lactobiónico en el cual existe producción de celulasas (Pineda-Insuasti *et al.*, 2017, Sandle, 2014). El hongo también se desarrolla en sustratos más complejos como suero de leche, hidrocarburos del petróleo e incluso plaguicidas, favoreciendo potencialmente a su degradación (Guoweia *et al.*, 2011).

La selección de los sustratos dependerá de su disponibilidad local y el costo, así como de las características de la cepa a reproducir (Elósegui, 2006). Como sustratos sólidos se han usado diversos como agentes nutritivos, tales como los reportados para la producción masiva para los conidios de *Trichoderma* spp.: granos de arroz, trigo, sorgo, maíz y alpiste; bagazo de caña, melaza, café, pulpa de remolacha, harina de trigo; así como cáscara de arroz, tomate, ajo, cacao, ajonjolí, cacahuate, algodón y café; olote de maíz; rastrojo de soya, maíz, y vaina de frijol (López, 2018; Agamez *et al.*, 2008; Michel-Aceves *et al.*, 2008).

También se pueden utilizar sustratos inertes como la vermiculita, gránulos de minerales arcillosos, tela, etc., en combinación con soluciones nutritivas en los que estas se embeben, las soluciones pueden ser balanceadas cuidadosamente para asegurar una completa utilización de los nutrientes. Una vez determinado el sustrato a utilizar, puede ser humedecido previa esterilización o inoculación, dependiendo del tipo de materia prima o combinación de estas y ajustes realizados (Elósegui, 2006). Uno de los sustratos ampliamente utilizado es el grano entero de arroz, pero en la búsqueda de producción de *Trichoderma* más económica y accesible se han propuesto otras alternativas. Michel-Aceves *et al.* (2008), han demostrado que se obtiene mayor concentración de conidios en el olote de maíz triturado con  $4.43 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$  seguido del grano de arroz con  $3.13 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ . Un estudio más reciente realizado por López *et al.* (2022), evaluaron sustratos para la producción de esporas de *T. harzianum* (72TG-11) por medio de fermentación sólida alcanzando una producción de  $3.30 \times 10^6$  esporas en arroz y  $1.74 \times 10^6$  en olote de maíz, confirmando que estos dos sustratos (arroz y olote de maíz) son los mejores en la obtención de conidios. Respecto a la viabilidad de conidios (germinación de conidios) en el sustrato, el olote de maíz presenta un 99 % de viabilidad, seguidos por el grano de arroz con 97.5 %, la cascarilla de arroz con 97 % y la cáscara de ajonjolí con 95.5 % (Michel-Aceves *et al.*, 2008).

Benites y Marroquín (2013), evaluaron sorgo, maíz, olote y bagazo de caña para el crecimiento de *T. harzianum*, por tanto, obtuvieron que el crecimiento fue rápido, alcanzando a cubrir toda la superficie del medio de cultivo a las 120 horas en el sorgo y maíz, con una producción de conidios a los seis días de  $6.7 \times 10^6$  esporas  $g^{-1}$  y  $8.3 \times 10^8$  esporas  $g^{-1}$ , respectivamente, destacando el sorgo en esporulación y viabilidad de germinación con 96 % y el sustrato con menor porcentaje de viabilidad fue el olote de maíz con 93 % existiendo diferencias estadísticamente significativas.

Por otro lado, se encuentran los subproductos de origen orgánico-animal o vegetal que se originan después de ser utilizados para la generación de energía, tanto térmica como eléctrica a partir de biogás conocidos como “digestato”, los cuales también pueden ser utilizados como enmiendas orgánicas ya que proporcionan importantes beneficios al sistema suelo, estos permiten el aumento de la carga bacteriana, nutren y aportan materia orgánica. Sin embargo, las enmiendas presentan gran variabilidad en su contenido nutricional, debido a que contienen nutrientes mineralizados en diversas formas, algunos de ellos ligados orgánicamente, con una lenta mineralización. Esto, en comparación con los fertilizantes minerales, se traduce en diferencias en las tasas de liberación al suelo y consecuente disponibilidad a lo largo del tiempo (Erlwein y Sotomayor, 2020). No obstante, la disponibilidad de estos recursos orgánicos ricos en diferentes nutrientes dependiendo de su origen, pueden ser utilizados como sustratos para la producción de biomasa de *Trichoderma* spp. tal y como lo plantean Bulgari *et al.* (2023), quienes utilizaron un digestato agrícola de la producción de biogás anaeróbico mezclado con desechos de alimentos (manzana, plátano y uva) al emplearlo como sustrato para cultivar *T. reesei*, cepa RUT-C30 y *T. atroviride*, cepa Ta13 en fermentación en estado sólido y producir bioproductos de alto valor, como moléculas bioactivas para ser utilizados como ingredientes para bioestimulantes en plantas. Los autores reportan que las especies de *Trichoderma* spp. alcanzaron su máximo crecimiento

en la fermentación en estado sólido después de seis y tres días, respectivamente. Ambas especies de *Trichoderma* fueron capaces de producir celulasa, esterasa y ácidos cítrico y málico; mientras que *T. atroviride* además produjo giberelinas y oxilipinas. En la evaluación experimental de los parámetros de germinación destacó la promoción significativa de la germinación de semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) y el alargamiento de la raíz inducida por extractos crudos de *T. atroviride* Ta13. Los sustratos reportados por la literatura con los mejores resultados para la formulación de biopreparados con *Trichoderma* spp. es el grano entero de arroz (Pineda-Insuasti *et al.*, 2017). Sin embargo, los granos de sorgo y trigo han demostrado ser una alternativa viable tal como lo describe López (2018).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El principal método de manejo de enfermedades en los cultivos es mediante la aplicación de pesticidas que a lo largo de los años pierden la efectividad frente a los patógenos; y que debido al uso excesivo han llegado a provocar estragos en los recursos naturales y afecciones a la salud de quienes los aplican y se encuentran expuestos. Por tal motivo, es necesario la búsqueda de alternativas que permitan lograr la producción sostenible de los cultivos de una forma sana y segura; entre las que se encuentran el uso de agentes de control biológico como *Trichoderma* spp. En trabajos previos (Alonso, 2020), se obtuvieron cepas nativas de *Trichoderma* spp. que mostraron ser promisorias para su utilización contra los patógenos *R. necatrix*, *V. dahliae* y *B. cinerea*, entre las que destaca *T. asperellum* cepa TFR3. Los métodos de reproducción masiva más conocidos para el género *Trichoderma* son la fermentación líquida, sólida y bifásica (Pineda-Insuasti *et al.*, 2017). De igual manera se han trabajado sustratos para la reproducción masiva del género *Trichoderma*, en los que destacan el grano de arroz, maíz, trigo, sorgo y olote de maíz, paja de arroz, trigo y estiércol de granja (Pineda-Insuasti *et al.*, 2017; Elósegui, 2006). Por esta razón, evaluar el potencial de granos enteros y triturados de trigo, sorgo y arroz como sustratos para la producción de biomasa de *T. asperellum* cepa TFR3, mediante tres técnicas de fermentación contribuye al desarrollo sostenible en la región del Sur del Estado de México.

#### **4. HIPÓTESIS**

Los granos de arroz, trigo, sorgo enteros y triturados, son potenciales para ser utilizados en la producción masiva de biomasa de *Trichoderma asperellum* cepa TFR3, por los métodos de fermentación líquida sólida y bifásica.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

Evaluar el potencial de granos enteros y triturados de trigo, sorgo y arroz como sustratos para la producción de biomasa de *Trichoderma asperellum* cepa TFR3, mediante tres técnicas de fermentación.

### 5.2. Objetivos específicos

- Cuantificar la producción de conidios de *Trichoderma asperellum* cepa TFR3 utilizando como sustrato granos enteros y triturados de trigo, sorgo y arroz.
- Cuantificar la producción de conidios de *Trichoderma asperellum* cepa TFR3 utilizando la técnica de fermentación líquida, bifásica y sólida.
- Cuantificar la producción de biomasa de *Trichoderma asperellum* cepa TFR3 sobre cada uno de los sustratos evaluados.
- Determinar la viabilidad y pureza de conidios de *Trichoderma asperellum* cepa TFR3 producidos mediante las técnicas de fermentación líquida, bifásica y sólida.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Localización de la investigación

La presente investigación se llevó a cabo 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 18.9680180000 y longitud -99.6138990000.

### 6.2. Selección de la cepa de *Trichoderma*

Se utilizó la cepa de *T. asperellum* TFR3, que pertenece a la colección del Laboratorio de Fitopatología del Centro Universitario UAEM Tenancingo. Como antecedentes, fue aislada por Alonso (2020) a partir de suelo en un bosque de encino deteriorado de San Simonito, Tenancingo, Estado de México, México (latitud 18.990538 y longitud -99.542815). Cabe señalar que ha sido sometida a múltiples estudios a nivel *in vitro* a partir de los cuales se conoce que es efectiva frente a patógenos del rosal (Alonso, 2020; García-Velasco *et al.*, 2021); además, se ha determinado que es tolerante a la presencia de fungicidas tales como Tiofanato metílico, Benomilo, Captan, Quintozeno + thiram, Fluazinam a nivel *in vitro* (Rojas, 2020; García-Velasco *et al.*, 2022).

#### 6.2.1. Reactivación de *Trichoderma asperellum* cepa TFR3

A partir de un tubo de ensayo que contenía la cepa TFR3 en aceite mineral, con ayuda una aguja de disección se tomó un fragmento de medio de cultivo PDA (papa, dextrosa y agar) de aproximadamente 5 mm con micelio y esporas, y se colocó sobre papel absorbente estéril para retirar el exceso de aceite mineral y con una pinza estéril se sembró en cajas de Petri con medio de cultivo PDA. Posteriormente se incubó en posición invertida a temperatura de  $25 \pm 3$  °C por un periodo de siete a 12 días (López, 2018).

### **6.3. Fermentación líquida**

#### **6.3.1. Obtención de inóculo**

Después de reactivar la cepa TFR3 en medio de cultivo PDA, a la caja Petri se le adicionaron 10 mL de agua destilada estéril y con el apoyo de una varilla de aluminio se removieron los conidios. La suspensión fue recuperada con una micropipeta y se colocó en un frasco para conservarla hasta su uso.

#### **6.3.2. Preparación del medio líquido para la producción masiva de *T. asperellum* cepa TFR3**

El incremento del inóculo de la cepa TFR3 en medio de cultivo líquido se realizó en una solución acuosa de 100 mL de melaza al 5 %, aforada a 2000 mL con agua destilada, se ajustó el pH a 5.5 con NaOH (2 N) y se vertieron 200 mL en frascos de 500 mL. La solución se esterilizó en autoclave (Felisa<sup>®</sup>) a 121 °C durante 20 min, se dejó reposar a temperatura ambiente por 24 h y se añadió levadura (Tradipan<sup>®</sup>) al 5 % bajo condiciones asépticas (García *et al.*, 2006; Pineda-Insuasti *et al.*, 2017; Flores *et al.*, 2003).

Del inóculo previamente obtenido de *T. asperellum*, se realizó una suspensión de conidios a una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC ajustada con ayuda de la cámara de Neubauer. De esta, se tomaron 3 mL y se inocularon a cada frasco que contenía el medio líquido estéril, se cubrió con algodón y papel aluminio estériles. Los frascos inoculados se agitaron manualmente y se incubaron (Lindberg/blue<sup>®</sup>) a 26 °C en oscuridad en forma estática inclinada durante 14 días (Figura 1); periodo en el que fueron agitados cada tercer día con la finalidad de homogenizar el medio con el crecimiento y así obtener producción de conidios al término del periodo de incubación (Flores *et al.*, 2003).



**Figura 1.** Medio líquido A) medio líquido estéril, B) posición del medio líquido inoculado con *T. asperellum* cepa TFR3 durante la incubación.

### 6.3.3. Cuantificación de la producción de conidios en el medio líquido

Catorce días después de la inoculación de *T. asperellum* en el medio líquido, se realizó la cuantificación de los conidios; para esto, se tomó 1 mL de la suspensión y se mezcló en 9 mL de agua destilada estéril (1:10), posteriormente, se higienizó en un vórtex (Genie Scientific Industries<sup>®</sup>) e inmediatamente con ayuda de una micropipeta se tomó una alícuota que se colocó sobre una cámara de Neubauer, se dejó reposar durante 1 min y se realizó el conteo de conidios con microscopio compuesto (Carl Zeiss<sup>®</sup>) con el objetivo 40x.

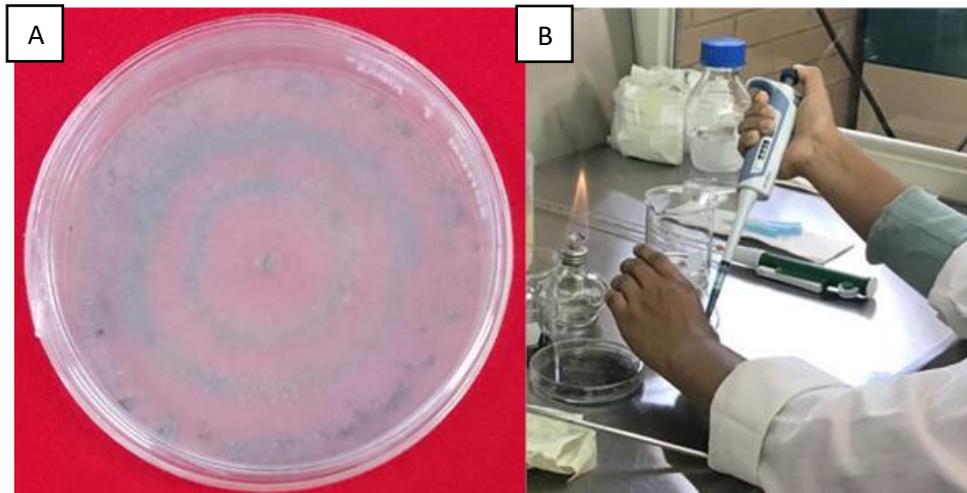
El conteo de los conidios en la cámara de Neubauer se llevó a cabo en el mm<sup>2</sup> central, para lo cual se contabilizó el número de conidios en los cuatro grupos de las esquinas y en el central. Posteriormente se sumó el total de conidios de los cinco cuadrantes y se aplicó la siguiente fórmula: a) Número de conidios contados x 50 = número de conidios / mm<sup>3</sup>

b) Número de conidios/mm<sup>3</sup> x 1 000 = número de conidios / mL o cc

#### **6.4. Fermentación sólida**

##### **6.4.1. Preparación del inóculo de TFR3**

Se utilizaron colonias de siete días de edad crecidas en medio de cultivo PDA a 25 ± 3 °C, las cuales tenían desarrollo de esporas. A una de las cajas de Petri se les agregaron 10 mL de agua destilada estéril, posteriormente con ayuda de una varilla de aluminio se removió el crecimiento para la liberación de las esporas (Figura 2). Después se recuperó la suspensión de esporas y se colocó en un tubo de ensayo y se homogeneizó en un vórtex, enseguida se tomó una alícuota y se observó en una cámara de Neubauer para el conteo de conidios, a partir de lo cual la suspensión se ajustó a una concentración de 1X10<sup>7</sup> UFC.



**Figura 2.** Inoculación de los sustratos con *T. asperellum* cepa TFR3; A) caja de Petri con la cepa TFR3, B) obtención de las esporas de TFR3 para inocular el medio sólido.

#### 6.4.2. Preparación del medio sólido para la producción masiva de *T. asperellum* cepa TFR3

Los sustratos utilizados para la reproducción masiva de *T. asperellum* (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Sustratos evaluados en la producción de un biopreparado con *T. asperellum* cepa TFR3.

Tratamientos	Sustratos
T1	Arroz entero
T2	Trigo entero
T3	Sorgo entero
T4	Arroz triturado
T5	Trigo triturado
T6	Sorgo triturado

El triturado de los granos se llevó a cabo en un molino manual, una vez reducido el tamaño de los granos se procedió a esterilizarlos siguiendo la metodología propuesta por López (2018), según lo indicado a continuación: los sustratos se lavaron tres veces consecutivas con agua potable.

Posteriormente, el arroz se hidrató durante 30 minutos, mientras que el sorgo y el trigo por 45 minutos; en todos los casos la hidratación se realizó a través de la inmersión en agua con cloranfenicol a 500 ppm. A continuación, se eliminó el exceso de agua dejándola drenar por 20 minutos en el caso del arroz, y para el sorgo y trigo durante 30 min (Figura 3). Una vez escurridos los sustratos, se pesaron 250 g de cada uno y se colocaron en bolsas de polietileno, se les hizo un nudo en la parte superior y se llevaron a esterilización durante 15 minutos a 121 °C. Una vez estériles se colocaron en una campana de flujo laminar durante 24 horas para su enfriamiento.



**Figura 3.** Proceso de escurrimiento para eliminar el exceso de agua en los sustratos de sorgo, trigo, arroz en grano entero y triturado.

#### 6.4.3. Inoculación de la cepa TFR3 en el medio sólido

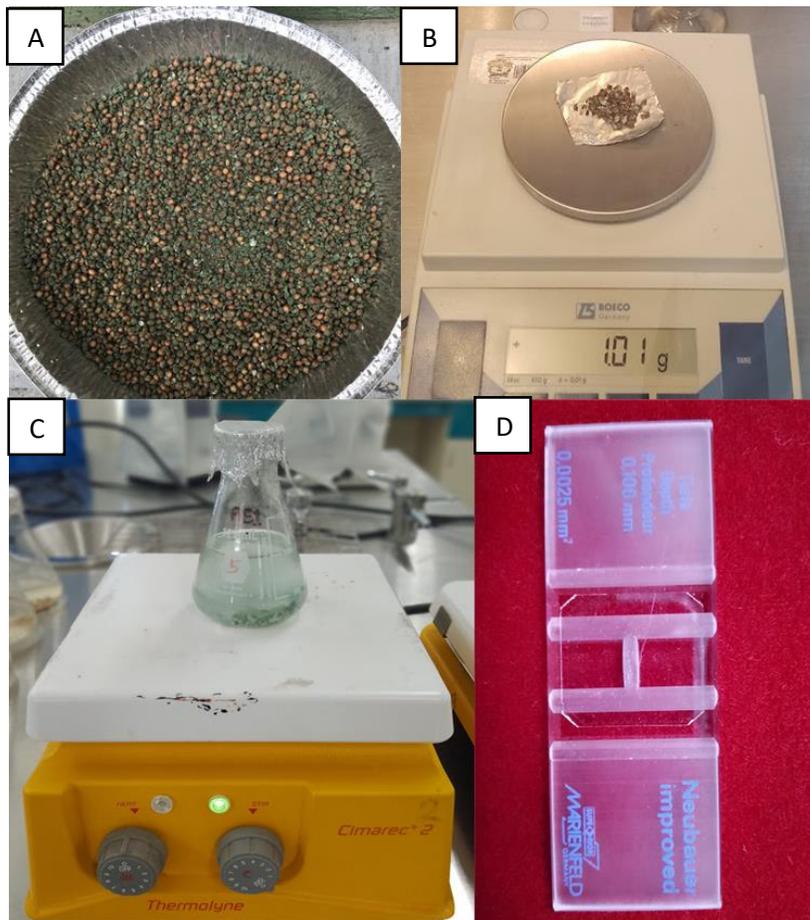
A partir de la suspensión de conidios realizada en el apartado 6.4.1. se tomaron 3 mL que fueron inoculados en las bolsas con los sustratos previamente esterilizados (López, 2018). Una vez realizada la inoculación de la cepa TFR3, las bolsas se incubaron durante un periodo de 21 días a 28 °C con luz blanca; es importante señalar que, para mejorar la dispersión y oxigenación del hongo en los sustratos, durante el periodo de incubación se removieron cada tercer día (Figura 4).



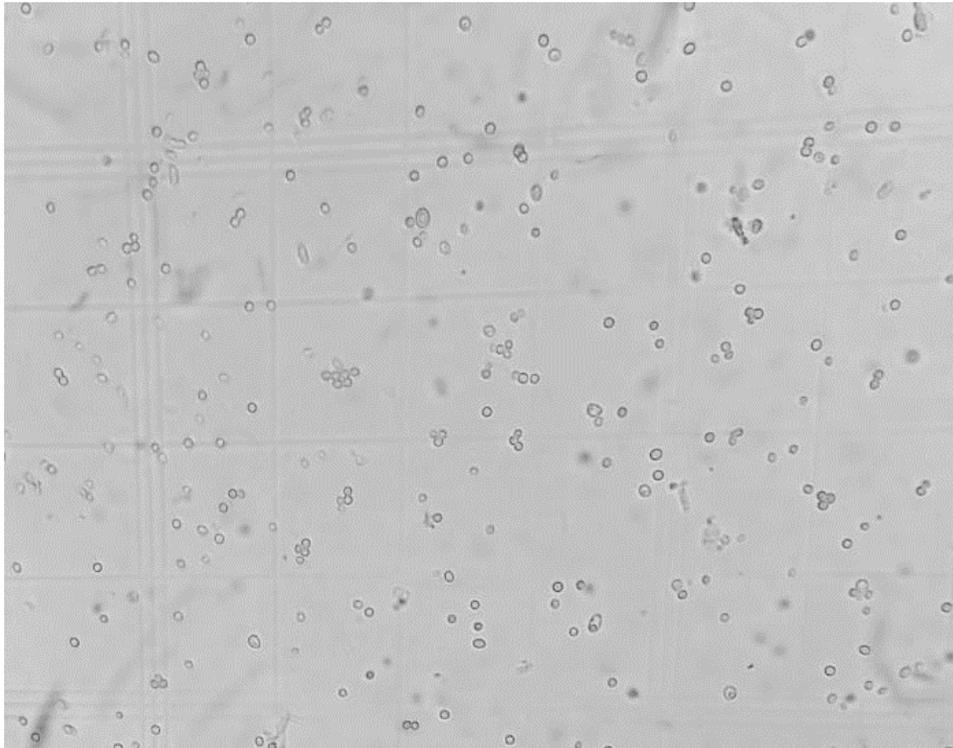
**Figura 4.** Incubación de los sustratos, siete días de la inoculación con *T. asperellum* cepa TFR3.

#### 6.4.4. Cuantificación de la producción de conidios de TFR3

Una vez concluido el periodo de incubación se llevó a cabo la cuantificación de conidios a través del siguiente proceso: por separado se pesó 1 g de cada sustrato en una balanza granataria (Boeco<sup>®</sup>) y se adicionó a un matraz con 100 mL de agua destilada estéril + Tween 20 (0.1%), la mezcla se mantuvo en agitación (Thermolyne Cimarec<sup>®</sup>) durante cinco minutos para homogenizar la suspensión. Enseguida, con una micropipeta se tomó una alícuota de la suspensión que fue colocada en una cámara de Neubauer (Figura 5) para el conteo de los conidios (Figura 6) bajo microscopio compuesto (Pineda-Insuasti *et al.*, 2017).



**Figura 5.** Proceso de cuantificación de conidios: A) sorgo esporulado con *T. asperellum* cepa TFR3, B) pesado del sustrato, C) agitación de la suspensión y D) muestra de la suspensión en cámara de Neubauer para el recuento de conidios.



**Figura 6.** Recuento de esporas en cámara de Neubauer con microscopio compuesto a 40x.

El conteo de los conidios se llevó a cabo en el  $\text{mm}^2$  central de cada cámara. Se contabilizó el número de conidios en los 4 grupos de las esquinas y en el central. Posteriormente se sumaron el total de conidios de los 5 grupos, se promedió y se aplicó la siguiente fórmula:

- a)  $\text{Número de conidios contados} \times 50 = \text{número de conidios} / \text{mm}^3$
- b)  $\text{Número de conidios/mm}^3 \times 1\,000 = \text{número de conidios} / \text{mL o cc}$

#### **6.4.5. Cuantificación de la biomasa**

Para cuantificar la biomasa en cada uno de los sustratos, se llevó a cabo un proceso de eliminación de la humedad; para lo cual, el contenido de las bolsas (repeticiones) de cada sustrato se vertió por separado en una bandeja de aluminio y se mantuvo

a 28 °C por 10 días, teniendo la precaución de remover el sustrato cada tres días con la finalidad de homogeneizar la pérdida de humedad. Para cada repetición de los respectivos tratamientos se llevó a cabo la obtención de la biomasa haciendo uso de un tamiz (FIICSA<sup>®</sup>) del número 100 y mediante frotación y agitación se desprendieron y separaron los conidios del sustrato, el material retenido por el tamiz se consideró como desecho, mientras que la biomasa fue pesada en una balanza analítica y depositada en bolsas de aluminio que se mantuvieron en refrigeración a 2° C para prolongar su viabilidad (Figura 7) (López, 2018; Monzón, 2001).



**Figura 7.** A) Biomasa obtenida de *T. asperellum*, B) almacenamiento de la biomasa en bolsas de aluminio para su conservación a 2 °C.

#### **6.4.6. Evaluación de la viabilidad de los conidios**

La viabilidad de los conidios se determinó con base al porcentaje de germinación ocho días después de la obtención de la biomasa; para lo cual se realizó una suspensión utilizando 1 g de biomasa y este se agregó a un tubo de ensayo con 9 mL de agua destilada estéril con Tween 20 (0.1%). La suspensión se agitó en un vórtex y posteriormente se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^5$  conidios mL<sup>-1</sup>.

Se utilizaron tres cajas de Petri con medio de cultivo PDA, estas fueron marcadas con cinco puntos en la parte externa inferior; después, con una micropipeta se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de la solución y se depositaron en cada punto de las cajas de Petri (250  $\mu\text{L}$  por caja); posteriormente, las cajas se etiquetaron e incubaron a  $25 \pm 3$  °C durante un periodo de 16 a 20 horas.

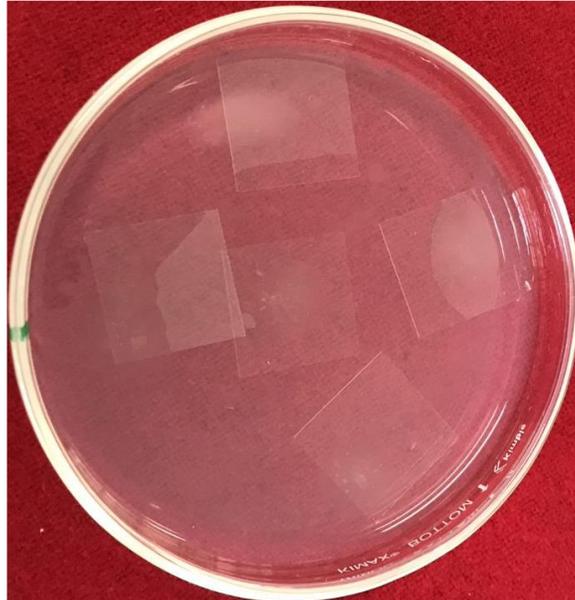
Transcurrido el tiempo de incubación se colocaron cubreobjetos en cada uno de los puntos donde se depositaron las alícuotas de la suspensión de conidios (Figura 8) para su observación bajo microscopio compuesto con el objetivo de 40x y en cada punto se revisaron 100 conidios a partir de los cuales se registró el número de conidios germinados y no germinados, considerando como germinados aquellos en los que la longitud del tubo germinativo era el doble del diámetro de los conidios (Figura 9) (Cardona *et al.*, 2014). A partir de estos datos se determinó el porcentaje de viabilidad a través de la siguiente fórmula (Agus *et al.*, 2015).

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

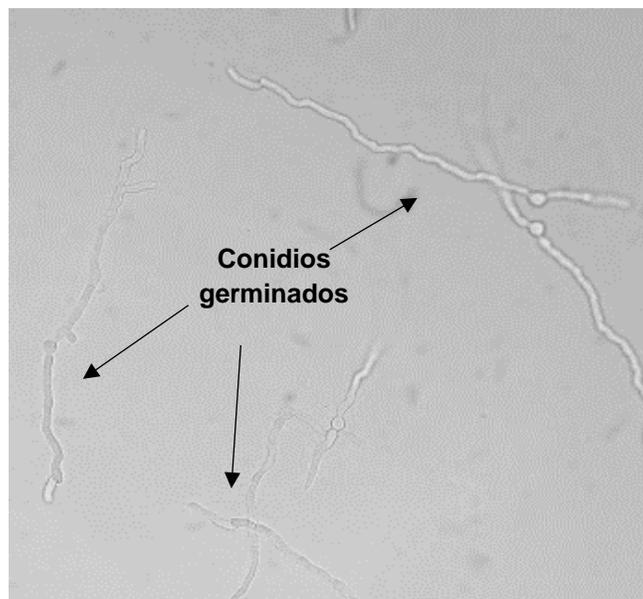
Donde:

$\alpha$  = Número de conidios germinados.

b = Número de conidios no germinados.



**Figura 8.** Caja de Petri con disposición de las alícuotas de conidios de *T. asperellum* y disposición de cubreobjetos para la observación a microscopio óptico.

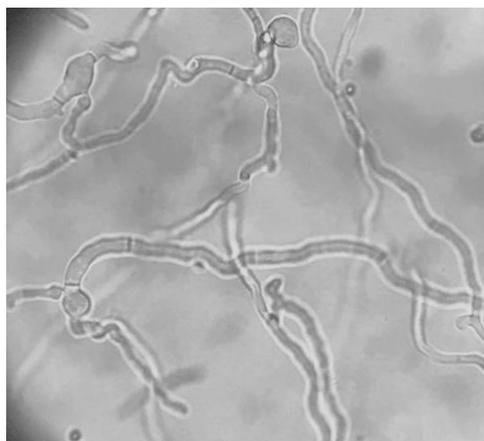


**Figura 9.** Vista a 40x de conidios de *T. asperellum* germinados para la evaluación de la viabilidad.

#### 6.4.7. Pureza de la biomasa

El porcentaje de pureza (% P) de la biomasa fue evaluado con las siembras utilizadas para determinar la viabilidad de conidios. Se utilizaron tres cajas de Petri con medio de cultivo PDA que fueron marcadas con cinco puntos en la parte externa inferior; después, con una micropipeta se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de la solución de *T. asperellum* con una concentración de  $1 \times 10^5$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  y se depositaron en cada punto de las cajas de Petri (250  $\mu\text{L}$  por caja); se etiquetaron e incubaron a  $25 \pm 3$   $^{\circ}\text{C}$  durante un periodo de 16 a 20 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se colocaron cubreobjetos en cada uno de los puntos donde se depositaron las alícuotas de la suspensión de conidios. Posteriormente se realizaron las observaciones utilizando un microscopio compuesto con el objetivo de 40x (Figura 10). Después de 16 a 20 horas de incubación, se determinó el % P se calculó como una relación de unidades formadoras de colonias (UFC) con la siguiente fórmula (Cardona *et al.*, 2014):

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



**Figura 10.** Vista de conidios de *T. asperellum* para la determinación de la pureza bajo microscopio compuesto a 40x.

Para tener un parámetro de comparación se utilizó el producto comercial TRIANUM-P<sup>®</sup>, sometido a las mismas condiciones de laboratorio y procedimientos, a partir del cual se realizaron pruebas de cuantificación de conidios por gramo, porcentaje de viabilidad y porcentaje de pureza.

## **6.5. Fermentación bifásica**

### **6.5.1. Preparación del medio sólido e inoculación con el medio líquido para la reproducción masiva de *T. asperellum***

Los sustratos fueron triturados, lavados y esterilizados siguiendo la metodología descrita en la fermentación sólida. Posteriormente se dejaron enfriar por 24 horas a temperatura ambiente y con la producción de conidios en el medio líquido (apartado 6.3.3), se llevó a cabo la inoculación en los sustratos sólidos. Para ello se realizó un ajuste de concentración de conidios con ayuda de la cámara de Neubauer hasta obtener una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC de esta suspensión se tomaron 3 mL y fueron inoculados en las bolsas con los sustratos previamente esterilizados (López, 2018). Una vez realizada la inoculación con la cepa TFR3 se incubaron durante un periodo de 21 días a 28 °C con luz blanca, entre este periodo de tiempo se removieron los sustratos cada tercer día para mejor dispersión del hongo en todo el sustrato (Figura 11).

### **6.5.2. Cuantificación de conidios en el sustrato, obtención de la biomasa y cuantificación de conidios de TFR3**

Para la cuantificación de conidios por gramo de sustrato, obtención de la biomasa y producción de conidios por gramo de biomasa se realizó de la misma manera que en la metodología descrita para el proceso de fermentación sólida (Figura 11) (Pineda *et al.*, 2017; López, 2018; Monzón, 2001).

Evaluación de sustratos por fermentación líquida, sólida y bifásica para la producción de *Trichoderma asperellum* cepa TFR3

---



**Figura 11.** Fermentación bifásica para la reproducción masiva de la cepa TFR3. A) lavado y pesado de los sustratos sólidos, B) inoculación del medio líquido en el medio sólido estéril, c) incubación de los sustratos a 28° C con luz blanca, D) pesado de sustrato para el conteo de conidios de TFR3, E) secado del sustrato para la obtención de la biomasa y D) biomasa obtenida.

### **6.6. Diseño experimental y análisis estadístico**

Las variables de número de conidios  $g^{-1}$  de sustrato, conidios  $g^{-1}$  de biomasa y el peso de la biomasa aplican para los métodos de fermentación sólida y bifásica. El experimento se condujo bajo un diseño completamente al azar con cinco repeticiones por tratamiento, con seis tratamientos: 1) arroz entero, 2) arroz triturado, 3) trigo entero, 4) trigo triturado, 5) sorgo entero y 6) sorgo triturado. Las variables evaluadas fueron: a) conidios  $g^{-1}$  de sustrato, b) peso de la biomasa, c) conidios  $g^{-1}$  de biomasa, d) porcentaje de viabilidad y e) pureza.

Los datos de las variables número de conidios  $g^{-1}$  de sustrato y conidios  $g^{-1}$  de biomasa fueron transformados para su análisis a logaritmo ( $\ln$ ), la variable peso de biomasa a raíz cuadrada ( $\sqrt{\phantom{x}}$ ) y la variable porcentaje de viabilidad a raíz cuadrada más 0.5 ( $\sqrt{\phantom{x}}+0.5$ ) y fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias Tukey ( $P < 0.05$ ) utilizando el programa InfoStat versión estudiantil.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Fermentación líquida

La cantidad de conidios mL<sup>-1</sup> de la cepa TFR3 en el medio de fermentación líquida oscilo entre 14, 075,000 y 17, 025,000 mL<sup>-1</sup>; teniendo en promedio 15, 930,000 conidios mL<sup>-1</sup> (Cuadro 2). El tiempo en que se alcanzó esta concentración de conidios fue de tan solo 14 días, en un espacio reducido con requerimientos mínimos de agua destilada, melaza y levadura.

**Cuadro 2.** Concentración de conidios de TFR3 por medio de fermentación líquida.

Repetición	Conidios mL <sup>-1</sup>
1	17,025,000
2	14,075,000
3	16,550,000
4	16,725,000
5	15,275,000
Promedio	15,930,000

## 7.2. Fermentación sólida

### 7.2.1. Producción de conidios por gramo de sustrato

En cuanto a la producción de conidios por medio de la fermentación sólida sobre los sustratos, se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) respecto a los tratamientos. Entre estos destacó el tratamiento de arroz entero con una producción de 3, 741,666.66 conidios  $g^{-1}$  de sustrato. En el segundo lugar se encontraron los sustratos de sorgo y arroz triturados con una producción de 1, 960,416.66 y 1, 572,916.68 conidios  $g^{-1}$  de sustrato respectivamente. Un tercer grupo en el que se integraron los sustratos de sorgo y trigo enteros con 591,666.68 y 441,666.68 conidios  $g^{-1}$  de sustrato. Finalmente, en el sustrato de trigo triturado se obtuvo la menor producción de conidios con 216,666.68  $g^{-1}$  de sustrato (Cuadro 3). El tiempo para obtener esta producción de conidios fueron 21 días a 28 °C con luz blanca permanente.

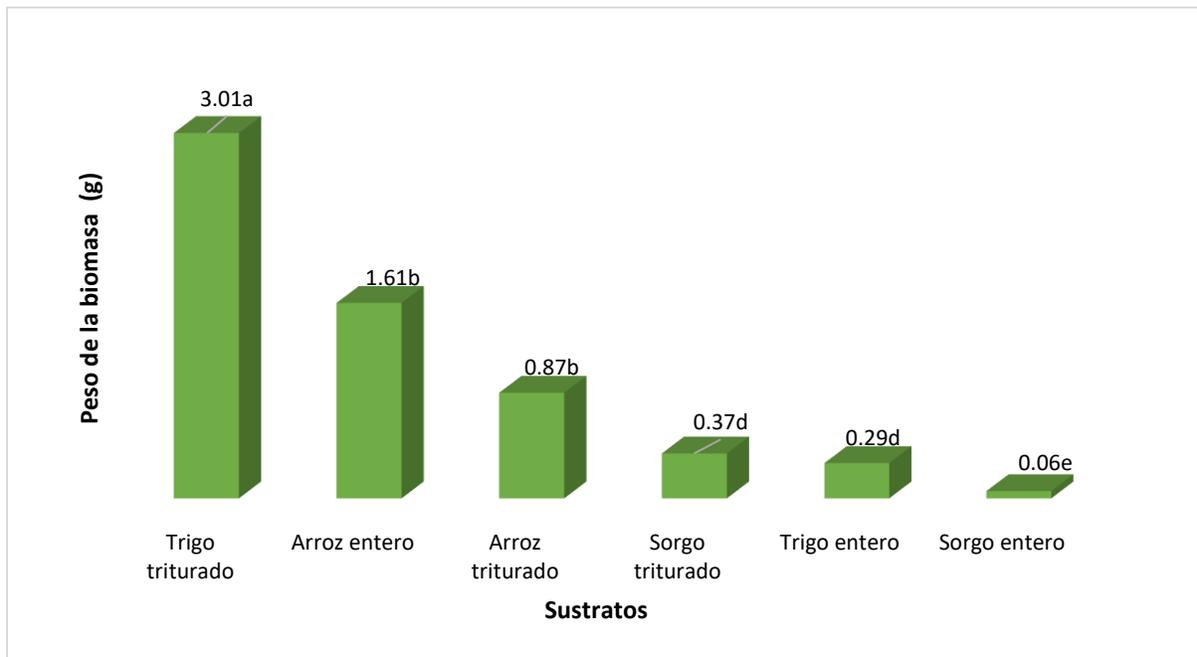
**Cuadro 3.** Producción de conidios de *T. asperellum* cepa TFR3 por gramo de sustrato obtenido de fermentación sólida.

Sustratos	Conidios $g^{-1}$ de sustrato*
Arroz entero	3,741,666.66 <sup>a</sup>
Sorgo triturado	1,960,416.66 <sup>b</sup>
Arroz triturado	1,572,916.68 <sup>b</sup>
Sorgo entero	591,666.68 <sup>c</sup>
Trigo entero	441,666.68 <sup>c</sup>
Trigo triturado	216,666.68 <sup>d</sup>

\*Cifras con diferente literal indican diferencias estadísticamente significativas. Comparación de medias Tukey ( $P < 0.05$ ).

### 7.2.2. Cantidad de biomasa

Respecto al peso de la biomasa obtenida de los sustratos se encontraron diferencias estadísticas (P < 0.05), el sustrato con el mayor peso de biomasa fue el trigo triturado con 3.01 g, sin embargo, el alto valor se atribuye a que la harina de este grano paso a través del tamiz, motivo por el cual no se consideró y se desechó. Resultando así, como el sustrato con la mayor producción de biomasa el arroz entero con 1.61 g y el arroz triturado con 0.87 g. En seguida de los anteriores tratamientos, se encontraron el sorgo triturado y el trigo entero con 0.37 y 0.29 g respectivamente en los cuales no existieron diferencias estadísticas (P < 0.05) entre ambos. El tratamiento con el menor peso de biomasa fue el sorgo entero con 0.06 g (Figura 12).



**Figura 12.** Peso de la biomasa de *Trichoderma asperellum* cepa TFR3 obtenida de los sustratos por medio de fermentación sólida.

\*Cifras con diferente literal indican diferencias estadísticas significativas.

Comparación de medias Tukey (P<0.05).

### 7.2.3. Conidios por gramo de biomasa

Con relación a la cantidad de conidios en la biomasa obtenida de los sustratos, de acuerdo con el análisis estadístico los tratamientos se separaron en cuatro grupos ( $P < 0.05$ ). El primer grupo se incluye los granos enteros del arroz y el trigo con los valores más altos de conidios y la diferencia numérica entre ellos es de tan solo 57,500.000 conidios  $g^{-1}$  de sustrato. El segundo grupo se considera los tratamientos con sorgo entero y triturado con una producción de 194, 625,000 y 194, 500,000 conidios  $g^{-1}$  de biomasa, respectivamente. Finalmente, los sustratos con la menor cantidad de UFC fueron el arroz triturado con 46, 625,00 y el de trigo triturado con apenas 2, 800,000 de conidios  $g^{-1}$  de biomasa (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Producción de conidios por gramo de biomasa obtenida de fermentación sólida en 21 días.

Sustratos	Conidios $g^{-1}$ biomasa*
Arroz entero	698,125,000.00 <sup>a</sup>
Trigo entero	640,625,000.00 <sup>a</sup>
Sorgo entero	194,625,000.00 <sup>b</sup>
Sorgo triturado	194,500,000.00 <sup>b</sup>
Arroz triturado	46,625,000.00 <sup>c</sup>
Trigo triturado	2,800,000.00 <sup>d</sup>

\*Cifras con diferente literal indican diferencias estadísticas significativas. Comparación de medias Tukey ( $P < 0.05$ ).

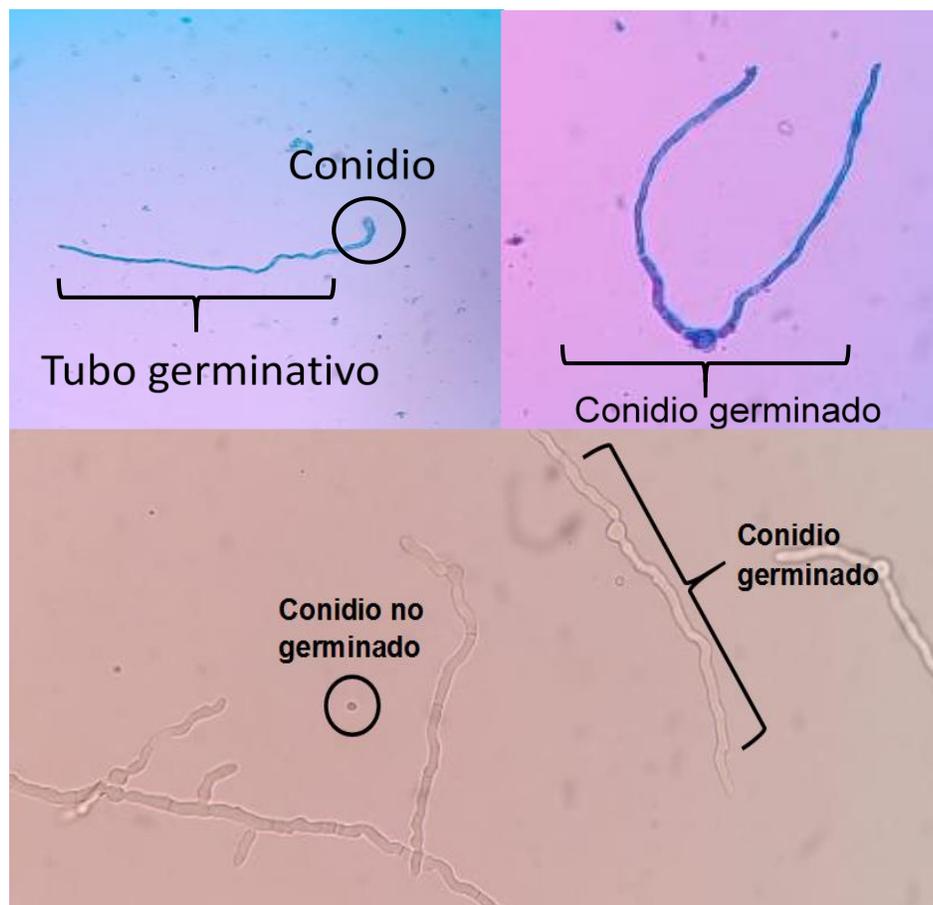
#### 7.2.4. Viabilidad de la biomasa

La determinación de la viabilidad se realizó conforme a la cantidad de conidios germinados y no germinados (Figura 13). De acuerdo con el análisis estadístico existieron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos dividiéndose en cuatro grupos, el primero y más sobresaliente fue el arroz triturado con un porcentaje de conidios germinados de 93.50 %. Seguido de este, se encontró el grupo formado por arroz y sorgo enteros y sorgo triturado con 89.46 a 82 % de germinación, en el tercer grupo se halló el trigo entero con 77.30 % de germinación y en el cuarto y último lugar se encontró el trigo triturado con 1.88 % de viabilidad. Los resultados obtenidos se compararon con la viabilidad de conidios del producto TRIANUM-P® de la empresa Koppert formulado a base de *T. harzianum* el cual presentó un 90.40 % de germinación; estadísticamente igual ( $P < 0.05$ ) al segundo grupo conformado por arroz entero, sorgo entero y sorgo triturado (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Porcentaje de viabilidad de la germinación de conidios de la biomasa obtenida de fermentación sólida en 21 días.

Sustratos	Viabilidad*
Arroz triturado	93.50 <sup>a</sup>
Producto TRIANUM-P Koppert®	90.40 <sup>ab</sup>
Arroz entero	89.46 <sup>ab</sup>
Sorgo entero	86.04 <sup>ab</sup>
Sorgo triturado	82.00 <sup>ab</sup>
Trigo entero	77.30 <sup>b</sup>
Trigo triturado	1.88 <sup>c</sup>

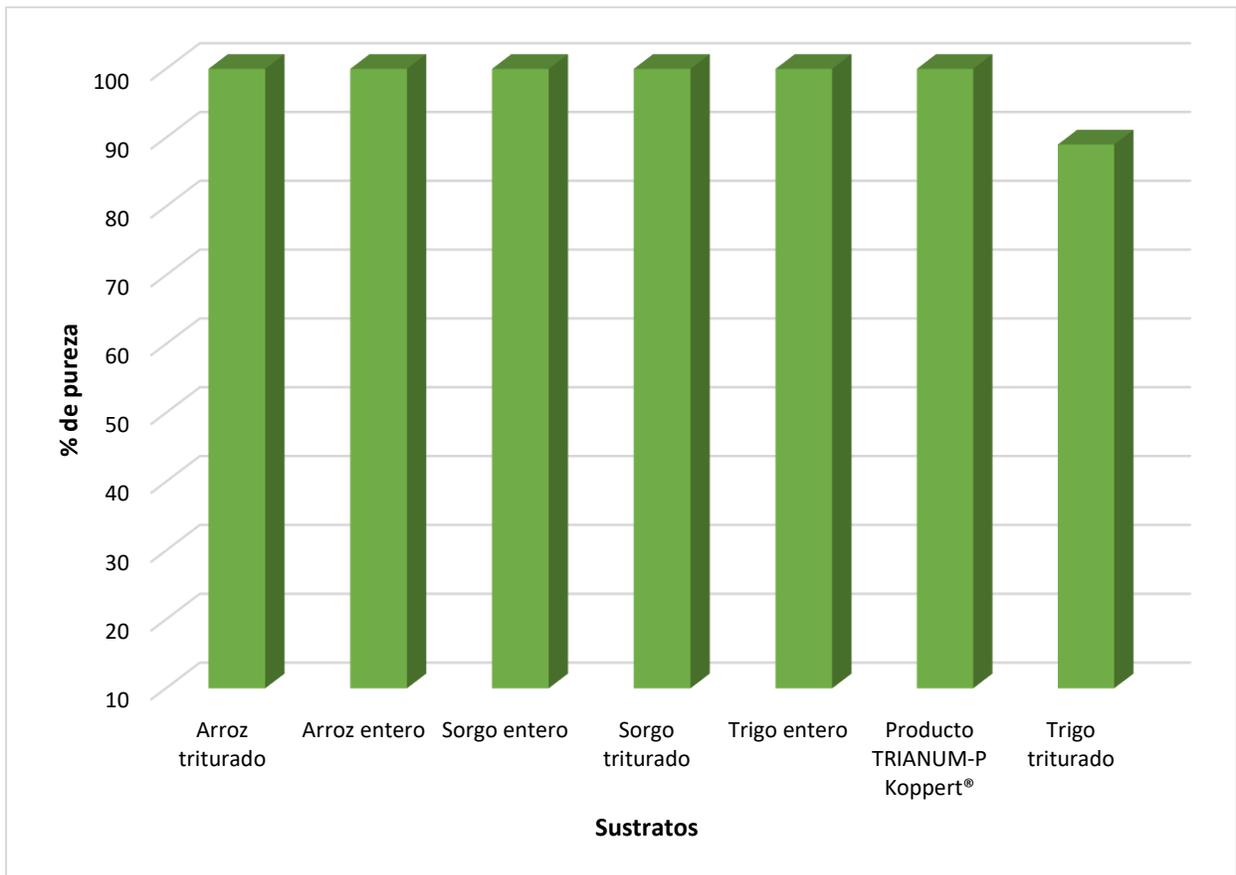
\*Cifras con diferente literal indican diferencias estadísticas significativas. Comparación de medias Tukey ( $P < 0.05$ )



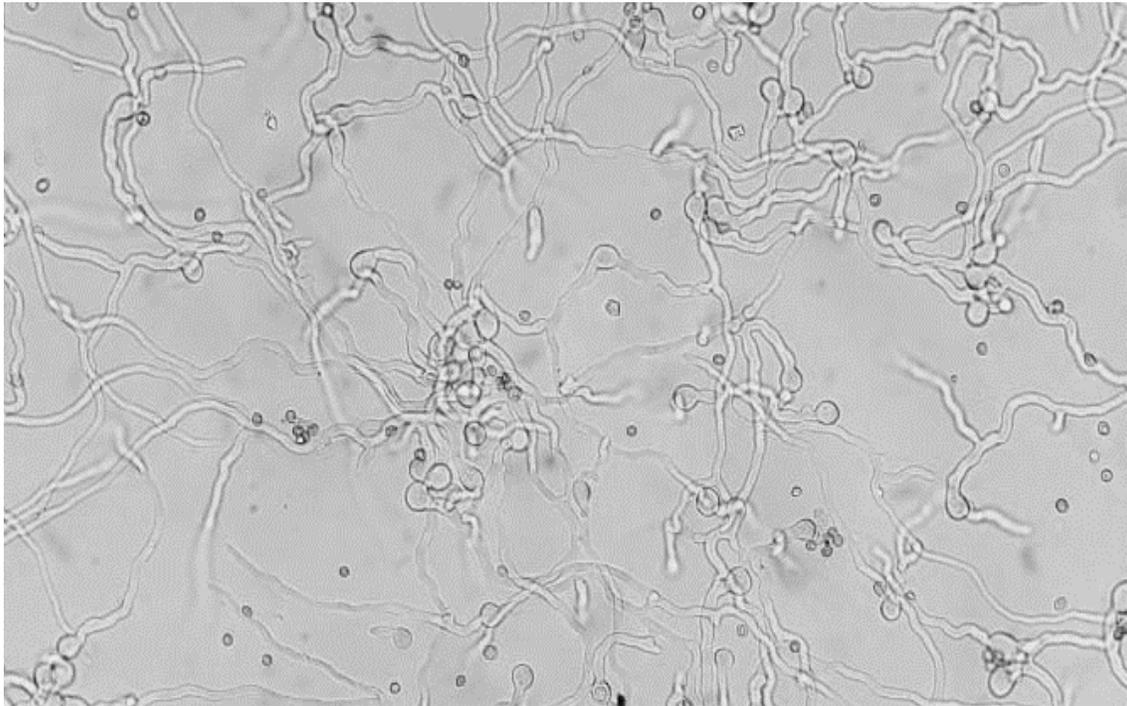
**Figura 13.** Germinación de conidios sobre medio de cultivo PDA. Conidio germinado y tubo germinativo de *T. asperellum* cepa TFR3.

### 7.2.5. Pureza de la biomasa

En la evaluación realizada para el porcentaje de viabilidad en un periodo de 16 a 20 horas se alcanzó una pureza del 100 % para todos los tratamientos excepto para el sustrato de trigo triturado en el que la pureza fue de 89 % (Figuras 14 y 15).



**Figura 14.** Pureza de los conidios de TFR3 obtenidos de la biomasa en la fermentación sólida en 21 días.



**Figura 15.** Vista a microscopio (40x) de la pureza de la biomasa de *T. asperellum* cepa TFR3, sobre medio PDA.

### 7.3. Fermentación bifásica

#### 7.3.1. Producción de conidios por gramo de sustrato

De acuerdo con el análisis estadístico existen diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ) en la producción de conidios  $g^{-1}$  de sustrato en las versiones de grano entero y triturado. Por presentar la mayor concentración, destacó el tratamiento de trigo triturado con 7, 109,375.02 de conidios  $g^{-1}$  de sustrato, seguido por el sorgo entero con 2, 901,666.68 conidios  $g^{-1}$  de sustrato; seguido de estos estuvieron los sustratos de sorgo triturado, arroz entero y arroz triturado con 1, 978,333.32 conidios  $g^{-1}$ , 1,856,250.02 conidios  $g^{-1}$ , y 1,701.666.66 conidios  $g^{-1}$ , respectivamente, entre los cuales no existieron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). El sustrato con la menor cantidad de conidios fue el trigo entero con 1, 333,333.30 de conidios  $g^{-1}$  de sustrato (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Producción de conidios de *T. asperellum* por gramo de sustrato en fermentación bifásica en 21 días.

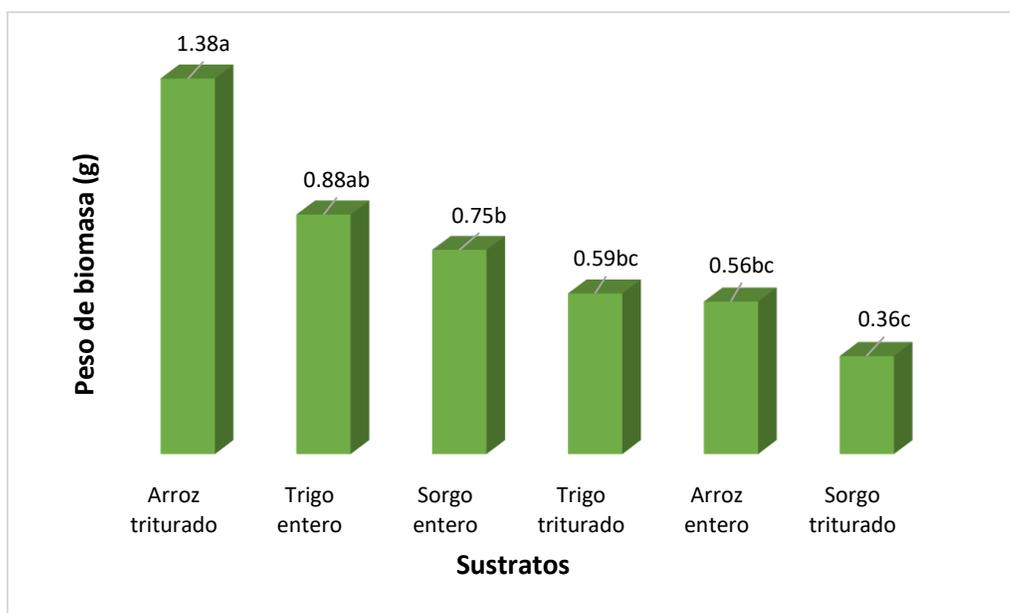
Sustratos	Conidios $g^{-1}$ de sustrato*
Trigo triturado	7,109,375.02 <sup>a</sup>
Sorgo entero	2,901,666.68 <sup>b</sup>
Sorgo triturado	1,978,333.32 <sup>c</sup>
Arroz entero	1,856,250.02 <sup>c</sup>
Arroz triturado	1,701,666.66 <sup>c</sup>
Trigo entero	1,333,333.30 <sup>d</sup>

\*Cifras con diferente literal indican diferencias estadísticas significativas.

Comparación de medias Tukey ( $P < 0.05$ ).

### 7.3.2. Producción de biomasa

En cuanto a la producción de biomasa obtenida por fermentación bifásica existieron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre el peso obtenido en cada sustrato. El tratamiento con el mayor peso de biomasa fue el arroz triturado con 1.38 g, que estadísticamente no tuvo diferencias ( $P < 0.05$ ) con el sustrato de trigo entero del que se obtuvo 0.88 g de biomasa. Los tratamientos conformados por los sustratos de trigo entero, sorgo entero, trigo triturado y arroz entero conformaron un grupo sin diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ ), en los cuales se obtuvo un peso de biomasa en un intervalo de 0.88 a 0.56 g de biomasa. Por otro lado, estadísticamente se formó un último grupo el cual se conformó por el trigo triturado, arroz entero y sorgo triturado, finalmente el sustrato de sorgo triturado fue el que produjo la menor cantidad de biomasa con 0.36 g (Figura 16).



**Figura 16.** Peso de la biomasa de *Trichoderma asperellum* cepa TFR3 obtenida de los sustratos por medio de fermentación bifásica.

\*Cifras con diferente literal indican diferencias estadísticas significativas.

Comparación de medias Tukey ( $p < 0.05$ ).

### 7.3.3. Conidios por gramo de biomasa

En la variable conidios g<sup>-1</sup> de biomasa en los sustratos, de acuerdo con el análisis estadístico los resultados se dividieron en tres grupos. La mayor cantidad de conidios se presentó en el primer grupo conformó por los siguientes sustratos: sorgo entero, sorgo triturado, trigo triturado y por último el trigo entero que osciló entre los 379, 506, 666.60 y 293, 483,333.40 conidios g<sup>-1</sup> de biomasa. En el segundo lugar se encontró el arroz triturado con una producción de 152,595, 833.26 conidios g<sup>-1</sup> de biomasa; y por último arroz entero, en el que se obtuvo la menor producción con 72,025, 000.00 conidios g<sup>-1</sup> de biomasa (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Producción de conidios por gramo de biomasa obtenida de fermentación bifásica en 21 días.

Sustratos	Conidios g <sup>-1</sup> de biomasa*
Sorgo entero	379,506,666.60 <sup>a</sup>
Sorgo triturado	343,387,500.00 <sup>a</sup>
Trigo triturado	323,676,666.60 <sup>a</sup>
Trigo entero	293,483,333.40 <sup>a</sup>
Arroz triturado	152,595,833.26 <sup>b</sup>
Arroz entero	72,025,000.00 <sup>c</sup>

\*Cifras con diferente literal indican diferencias estadísticas significativas.

Comparación de medias Tukey (P < 0.05).

#### 7.4. Conidios de *T. asperellum* cepa TFR3 por fermentación líquida, sólida y bifásica

En relación con las técnicas para la producción de conidios se presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) entre ellas, relacionadas con los sustratos. La técnica con la mayor producción de UFC fue la fermentación líquida con 15, 930,000 conidios mL<sup>-1</sup>, sacando una ventaja del 55.4 % más a la técnica que le sigue en cuanto a la cantidad de conidios producidos. En la fermentación bifásica la producción más alta se encontró en el trigo triturado con 7,109,375.00 y la producción más baja en trigo entero con 1,333,333.30 conidios g<sup>-1</sup>. Mientras que, en la fermentación sólida el sustrato con la mayor producción de conidios fue el arroz entero con 3, 741,666.66 conidios g<sup>-1</sup> y la producción más baja fue en trigo triturado con 216,666.68 conidios g<sup>-1</sup> (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Producción de conidios de la cepa TFR3 por medio de fermentación líquida, sólida y bifásica.

<b>Fermentación – Sustrato</b>	<b>Conidios por mL o g de sustrato*</b>
Líquida-Melaza, Agua y Levadura	15,930,000.00 <sup>a</sup>
Bifásica - Trigo triturado	7,109,375.00 <sup>b</sup>
Sólida - Arroz entero	3,741,666.66 <sup>c</sup>
Bifásica - Sorgo entero	2,901,666.68 <sup>cd</sup>
Bifásica - Sorgo triturado	1,978,333.32 <sup>de</sup>
Sólida - Sorgo triturado	1,960,416.66 <sup>de</sup>
Bifásica - Arroz entero	1,856,250.00 <sup>de</sup>
Bifásica - Arroz triturado	1,701,666.66 <sup>de</sup>
Sólida - Arroz triturado	1,572,916.68 <sup>e</sup>
Bifásica - Trigo entero	1,333,333.30 <sup>e</sup>
Sólida - Sorgo entero	591,666.68 <sup>f</sup>
Sólida - Trigo entero	441,666.68 <sup>f</sup>
Sólida - Trigo triturado	216,666.68 <sup>g</sup>

\*Cifras con diferente literal indican diferencias estadísticas significativas. Comparación de medias Tukey ( $p < 0.05$ ).

### 7.5. Conidios por gramo de biomasa de *T. asperellum* cepa TFR3 por medio de fermentación sólida y bifásica

Al someter los datos a los análisis estadísticos, este indicó diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ). La biomasa con el mayor contenido de conidios fue mediante fermentación sólida, destaco con el sustrato de arroz entero con  $6.98125 \times 10^8$  seguida con el trigo entero  $6.40625 \times 10^8$  conidios  $g^{-1}$  de biomasa, estadísticamente iguales ( $P < 0.05$ ). En la fermentación bifásica, la biomasa con mayor número de conidios fue proveniente del sorgo entero con  $3.80 \times 10^8$  conidios  $g^{-1}$  biomasa, seguido por, sorgo triturado, trigo triturado y trigo entero los cuales fueron estadísticamente ( $P < 0.05$ ) iguales. Finalmente, la biomasa con menor número de conidios ( $2.8 \times 10^6$ ) fue de trigo triturado mediante fermentación sólida (Cuadro 9).

**Cuadro 9.** Conidios de *T. asperellum* cepa TFR3 por gramo de biomasa obtenida a través de la fermentación bifásica y sólida.

Fermentación – Sustrato	Conidios $g^{-1}$ de biomasa*
Sólida - Arroz entero	698,125,000.00 <sup>a</sup>
Sólida - Trigo entero	640,625,000.00 <sup>ab</sup>
Bifásica - Sorgo entero	379,506,666.60 <sup>bc</sup>
Bifásica - Sorgo triturado	343,387,500.00 <sup>c</sup>
Bifásica - Trigo triturado	323,676,666.60 <sup>cd</sup>
Bifásica - Trigo entero	293,483,333.40 <sup>cd</sup>
Sólida-Sorgo entero	194,625,000.00 <sup>de</sup>
Sólida - Sorgo triturado	194,500,000.00 <sup>de</sup>
Bifásica - Arroz triturado	152,595,833.26 <sup>e</sup>
Bifásica - Arroz entero	72,025,000.00 <sup>f</sup>
Sólida - Arroz triturado	46,625,000.00 <sup>f</sup>
Sólida - Trigo triturado	2,800,000.00 <sup>g</sup>

\*Cifras con diferente literal indican diferencias estadísticas significativas. Comparación de medias Tukey ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluaron tres sustratos y tres técnicas de propagación masiva de *T. asperellum* cepa TFR3; como sustratos se utilizaron granos enteros y triturados de arroz, trigo y sorgo, utilizando las técnicas de propagación en medios líquido, sólido y bifásico. Sustentado en que el incremento masivo de propágulos de *Trichoderma* spp. se realiza en mayor medida a través de medios líquidos, sólidos o bifásicos, los cuales le sirven de soporte y como fuente de nutrientes para el desarrollo del hongo, en los que forma conidios como estructuras encargadas de incrementar la población del hongo, además de ser las estructuras deseables para la formulación de productos comerciales y su aplicación en campo (Pineda-Insuasti *et al.*, 2017). Sin embargo, con base a la literatura disponible sobre el tema se puede inferir que el mejor sustrato a utilizar y la mejor técnica a aplicar para su reproducción masiva va a depender de dos factores básicos: la especie de *Trichoderma* spp. y los materiales disponibles en la zona y sus costos. Así, por ejemplo, Antomarchi *et al.* (2023), mencionan los residuos agroindustriales como el afrecho cervecero (subproducto de la cebada que resulta de la elaboración de cerveza) y el aserrín de pino blanco, entre otros.

La fermentación líquida es una de las técnicas para aumentar los propágulos de *Trichoderma* de manera eficaz; en esta investigación fue evaluado el medio líquido utilizando melaza y levadura en el cual se obtuvo una producción promedio de  $1.59 \times 10^7$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  de *T. asperellum* cepa TFR3. Con esta técnica, García *et al.* (2006), reportan haber obtenido concentraciones de conidios desde  $5.7 \times 10^7$  con la cepa comercial Bioagrícola<sup>®</sup> de la especie *T. harzianum* y hasta  $1.81 \times 10^9$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  de la cepa *T. harzianum* T12. En un estudio realizado por De Rezende *et al.* (2020), en el que utilizaron la fermentación líquida con un pH inicial de 3.5, 30 °C de temperatura, luz constante, relación de carbono C: N = 160:1, consiguieron una reproducción de  $8.35 \times 10^7$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  de *T. asperelloides* LQC-96 que, además, fueron efectivos en la colonización de esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum*. Por

otra parte, estudios como el de Kobori *et al.* (2015), reportan la formación de conidios y microesclerocios por *T. harzianum* Rifai cepa T-22 mediante fermentación de cultivo líquido enriquecido con carbono y nitrógeno en tan solo siete días. En un estudio más reciente realizado por Locatelli *et al.* (2022), se confirma la inducción para la formación de microesclerocios de dos cepas de *Trichoderma asperellum* por fermentación líquida sumergida, enriquecida con sacarosa y levadura autolizada en un periodo corto de siete días.

En la fermentación sólida se realiza la inoculación del hongo directamente en el sustrato estéril, con base en los datos registrados en este trabajo y tipo de fermentación se obtuvo mayor cantidad de conidios en el sustrato de arroz entero con una producción de  $6.98 \times 10^8$  conidios  $\text{g}^{-1}$  de biomasa en 21 días, en tanto que la cantidad de conidios por gramo de sustrato fue de  $3.74 \times 10^6$ . Resultados similares fueron reportados por López (2018), quien alcanzó la producción de UFC de *T. asperellum* en un rango de  $5.48 \times 10^8$  a  $8.845 \times 10^8$  conidios  $\text{g}^{-1}$  de sustrato de arroz en fermentación sólida, variando el tiempo de esterilización y % de humedad del sustrato, todo este proceso le tomó 28 días; algo semejante a lo reportado por López *et al.* (2022), con  $3.30 \times 10^6$  a  $1.03 \times 10^8$  conidios  $\text{g}^{-1}$  de sustrato con diferentes cepas de *T. harzianum* y  $2.44 \times 10^7$  conidios  $\text{g}^{-1}$  de sustrato con *T. longibrachiatum* en sustrato de arroz entero en un periodo de 26 días. Mientras que, autores como Allori *et al.* (2017), reportan haber alcanzado  $17.8 \times 10^8$  conidios  $\text{g}^{-1}$  de *T. atroviride* en arroz hervido, al décimo día de incubación. El sustrato que ocupó el segundo lugar en este estudio en cuanto a la producción de conidios fue el sorgo triturado con una producción de  $1.96 \times 10^6$  conidios  $\text{g}^{-1}$  de sustrato, en tanto que sobre grano entero fue de apenas  $5.91 \times 10^5$  (Cuadro 3). López (2018), mediante la fermentación sólida con *T. asperellum* y como sustrato granos de sorgo entero variando la humedad del sustrato a través del tiempo de esterilización alcanzó un rango de producción de  $5.4 \times 10^7$  a  $8.09 \times 10^7$  conidios  $\text{g}^{-1}$  de sustrato en 26 días. Rai *et al.* (2023), al utilizar como sustrato granos de sorgo enteros reportan una producción

de  $5.24 \times 10^8$  conidios  $\text{g}^{-1}$  de *T. asperellum* y  $8.31 \times 10^8$  conidios  $\text{g}^{-1}$  de grano entero de sorgo adicionado con 2 % de azúcar morena. Por su parte Hewavitharana *et al.* (2018), al evaluar cinco diferentes especies de *Trichoderma*, entre ellos, *T. asperellum* sobre diferentes sustratos sólidos polvo de coco, aserrín y granos de arroz precocidos (arroz sancochado), y enriquecidos con estiércol de ave seco, azúcar, con 40% de humedad en los sustratos, reportan el mayor potencial para el arroz sancochado con  $5 \times 10^6 - 8 \times 10^6$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  desde el día 20 al 180 para las cinco especies de *Trichoderma* (1 g de sustrato en 10 mL de agua llevados a seriaciones de  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ ).

En la fermentación bifásica se combina la fermentación líquida y la fermentación sólida para obtener el producto final que es la biomasa. Por lo que, esta técnica se divide en dos etapas, la primera consiste en la fermentación líquida que sirve como fuente de inóculo para llevar a cabo la segunda etapa para la producción masiva de UFC del antagonista *Trichoderma* spp. La selección de los sustratos está en función de su disponibilidad en el sitio donde se desea realizar la producción y al presupuesto. En este estudio se utilizaron granos enteros y triturados de arroz, trigo y sorgo como sustratos sólidos, debido a que son materiales que se encuentran disponibles y al alcance del presupuesto donde se realizó la producción de la cepa TFR3. De esta manera la mayor producción de conidios fue sobre trigo triturado en el que se obtuvieron  $7.1 \times 10^6$  conidios  $\text{g}^{-1}$  de sustrato, mientras que en arroz entero se obtuvo una producción de  $1.8 \times 10^6$  conidios  $\text{g}^{-1}$  de sustrato, y de  $1.70 \times 10^6$  en arroz triturado (Cuadro 6). En un estudio similar realizado por López *et al.* (2022), obtuvieron una producción de  $3.9 \times 10^7$  a  $1.37 \times 10^8$  conidios  $\text{g}^{-1}$  de *T. harzianum* en sustrato de arroz en fermentación bifásica y  $2.5 \times 10^7$  conidios  $\text{g}^{-1}$  con *T. longibrachiatum*. Estos datos, confirman que la cantidad de conidios obtenidos en la producción masiva del antagonista *Trichoderma* spp. está influenciado principalmente por características intrínsecas de la especie y en segundos términos el sustrato y la técnica.

El peso de la biomasa obtenida por medio de la fermentación bifásica fue mayor en el sustrato de arroz triturado con 1.38 g siendo estadísticamente igual al trigo entero con una biomasa de 0.88 g. Por medio de la fermentación sólida el sustrato que destacó con el mayor peso de biomasa fue arroz entero con 1.61 g y arroz triturado con 0.87 g. En este orden de ideas, estos resultados coinciden con los reportados por López (2018), en el sentido del mayor peso de biomasa en los mismos sustratos, aunque es clara la diferencia en el peso de biomasa obtenida 9.95 g en 100 g de sustrato esporulado en arroz, y la menor cantidad de biomasa con 0.56 g en 100 g de sustrato esporulado de sorgo.

Otro de los parámetros que la literatura considera para seleccionar los sustratos con el mayor potencial para la reproducción masiva del antagonista *Trichoderma* spp. es la cantidad de conidios por gramo de biomasa obtenida. En este estudio destacó el arroz entero con  $6.9 \times 10^8$  seguido por trigo entero con  $6.4 \times 10^8$  conidios  $g^{-1}$  de biomasa en la fermentación sólida, mientras que en la fermentación bifásica destacó el sorgo entero con  $3.7 \times 10^8$  conidios  $g^{-1}$  de biomasa (Cuadro 9); estos datos en relación con el número de conidios por gramo de biomasa difieren con lo reportado por López (2018), quien consiguió una producción de  $2.74 \times 10^{10}$  conidios  $g^{-1}$  de biomasa del antagonista *T. asperellum*. Sin embargo, ambos estudios coinciden en que el mejor sustrato para la producción de *T. asperellum* es el arroz entero.

La viabilidad de conidios más alta se presentó en la biomasa obtenida del sustrato de arroz triturado con el 93.50 % de germinación, seguida por la viabilidad del producto TRIANUM-P® de Koopert con el 90.40 % formulado con conidios de *T. harzianum*-T-22. Con respecto a la pureza de la biomasa obtenida fue del 100 % para todos los sustratos, excepto para el trigo triturado en el que se obtuvo el 89 % de pureza en la fermentación sólida. Para el caso de la biomasa obtenida por medio de la técnica de fermentación bifásica no fue posible determinar estas variables, razón por la que no aparecen en el apartado correspondiente. Autores como Michel-Aceves *et al.* (2008), reportan el 99 % de viabilidad de conidios de *T. harzianum* de

la biomasa obtenida a través de olote de maíz; así mismo, Arévalo *et al.* (2017), evaluaron los sustratos de cascarilla de arroz y cacahuate, arroz entero y triturado enriquecidos con agua, carbonato de calcio y urea, ellos reportan porcentajes de germinación de conidios de *T. harzianum* con niveles superiores al 85 %, siendo los tratamientos enriquecidos con agua los que presentaron valores de germinación mayores a 90 % y con el 100 % de pureza en todos los tratamientos. Por su parte, López (2018), obtuvo de sustrato de arroz entero una viabilidad de conidios de 86.36 % y un porcentaje de pureza de 98.41 % coincidiendo con los resultados obtenidos en el presente estudio.

Las técnicas de fermentación líquida, sólida y bifásica presentan múltiples ventajas; utilizando la técnica de fermentación líquida se reporta la producción de sustancias promotoras de crecimiento vegetal, tales como ácido indolacético, ácido giberélico, citoquininas y vitaminas (Pineda-Insuasti *et al.*, 2017), además, la fermentación líquida es funcional para cubrir altas demandas debido a que su reproducción es más rápida (García *et al.*, 2006). En contraste, a través de fermentación sólida se tienen menos líquidos residuales y por ende se facilita el proceso de secado (Hernández-Melchor *et al.*, 2019), mientras que, en la fermentación bifásica combinan ambas técnicas. En el presente estudio destacó la técnica de la fermentación líquida con una producción de  $1.5 \times 10^7$  mL<sup>-1</sup> en un periodo de 14 días; le siguió la técnica de fermentación bifásica con el sustrato trigo triturado con  $7.1 \times 10^6$  conidios g<sup>-1</sup> de sustrato (Cuadro 8). Sin embargo, no correspondió a la biomasa con el mayor número de conidios g<sup>-1</sup>, ya que el número más alto  $6.9 \times 10^8$  se registró para la técnica de fermentación sólida con el sustrato de arroz entero (Cuadros 9). No obstante, Pineda-Insuasti *et al.* (2017), señalan a la técnica de fermentación bifásica como la más recomendada para la reproducción masiva de *Trichoderma* spp.

## 8. CONCLUSIONES

- Los sustratos en los que se obtuvo la mayor cantidad de conidios fueron el trigo triturado con  $7.11 \times 10^6$  conidios  $g^{-1}$  de sustrato mediante la fermentación bifásica, seguido por el arroz entero con  $3.74 \times 10^6$  conidios  $g^{-1}$  obtenidos de la fermentación sólida.
- El sustrato en el que se obtuvo el mayor peso de biomasa de *T. asperellum* cepa TFR3 fue en el arroz entero con 1.61 g, seguido de arroz triturado con 1.38 g por medio de la fermentación bifásica.
- La biomasa con el mayor número de conidios fue el arroz entero con  $6.98 \times 10^8$  conidios  $g^{-1}$ , seguido por el trigo entero con  $3.79 \times 10^8$  conidios  $g^{-1}$ , ambos obtenidos por la técnica de fermentación bifásica.
- El mayor porcentaje de viabilidad de conidios de *T. asperellum* cepa TFR3 fue del 93.50 % proveniente del arroz triturado mediante la fermentación sólida. La pureza de la biomasa de *T. asperellum* obtenida de los sustratos por medio de fermentación solida fue del 100% para todos los tratamientos (arroz entero, arroz triturado, sorgo entero, sorgo triturado, trigo entero) excepto para el trigo triturado el cuál presentó el 89% de pureza.

## 9. RECOMENDACIONES

1. Para trabajos posteriores y siguiendo la línea de investigación, se recomienda seguir perfeccionando el dominio de las técnicas de fermentación líquida, sólida y bifásica para la producción masiva del antagonista *Trichoderma asperellum* y otras especies.
2. Con base a los resultados obtenidos, se recomienda trabajar únicamente con los sustratos conformados por los granos enteros de arroz, sorgo y trigo.
3. Trabajar con los sustratos conformados por el arroz, sorgo y trigo enriquecidos con complementos orgánicos e inorgánicos relación (C: N) para incrementar la producción de biomasa y conidios g<sup>-1</sup> de sustrato.
4. Evaluar viabilidad de la biomasa a diferentes tiempos y condiciones de almacenamiento en frío y al ambiente.
5. Evaluar la efectividad biológica de la biomasa obtenida en diferentes cultivos y contra diferentes fitopatógenos.
6. Tomando en consideración los mejores resultados de las recomendaciones anteriores llevar la biomasa a la formulación de un producto con miras a la comercialización y/o disponibilidad de los productores de la región.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agamez, R. E.Y., Zapata, N.R.I., Oviedo, Z. L.E. y Barrera, V. J.L. (2008). Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, (2), 23-34. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77610204>
- Agus, N., Saranga, A.P., Rosmana, A. y Sugiarti A. (2015). Viability and conidial production of entomopathogenic fungi *Penicillium* sp. *International Journal of Scientific & Technology Research*, 4(1), 193-195. Recuperado de: <http://repository.unhas.ac.id/handle/123456789/21085>
- Allori, S., Yasem de Romero, M.G., y Ploper, L.D. (2017). Evaluación de sustratos para la producción de esporas de *Trichoderma* y estudio del crecimiento en arroz de las cepas antagonistas TPT03, TPT02, MRT35 y MRT40. *Revista agronómica del noroeste argentino*, 37(1), 57-66. Recuperado de: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2314369X2017000100006&lng=es&tlng=s](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2314369X2017000100006&lng=es&tlng=s)
- Alonso, B, A. (2020). Actividad antagónica *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a *Rosellinia necatrix*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea*, patógenos del cultivo de rosa. [Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de México]. México. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/20.500.11799/105592>
- Andrade-Hoyos, P., Luna-Cruz, A., Osorio-Hernández, E., Molina-Gayosso, E., Landero-Valenzuela, N, y Barrales-Cureño, H.J. (2019). Antagonismo de *Trichoderma* spp. vs hongos asociados a la marchitez de chile. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(6), 1259-1272. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i6.1326>

- Antomarchi, O.Y., Tamayo, R. E, Guerra, B. J. L., Mas, D. S.M., Barrera, A. A.L. (2023). Producción de hongo *Trichoderma harzianum* A-34 en sustratos sólidos alternativos. *Revista Científica Arbitrada Multidisciplinaria Pentaciencias*, 5 (1), 259-267. Recuperado de: <https://www.editorialalema.org/index.php/pentaciencias/article/view/440>
- Arévalo, E., Cayotopa, J., Olivera, D., Gárate, M., Trigoso, E., Costa, D. B. y Leon, B. (2017). Optimización de sustratos para la producción de conidias de *Trichoderma harzianum*. Por fermentación sólida en la región de San Martín. Perú. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 19(2), 135-144. <https://dx.doi.org/10.18271/ria.2017.272>
- Argumedo, D.R.; Alarcón, A.; Ferrera, C.R. y Pena, C.J. (2009). El género fúngico *Trichoderma* y su relación con los contaminantes orgánico e inorgánico. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 25(4), 257-269. Recuperado de: [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S018899920090004400006&script=sci\\_abstract](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S018899920090004400006&script=sci_abstract)
- Benites, B. C.M. y Marroquín, L.C. (2013). Producción de *Trichoderma harzianum* en diferentes sustratos orgánicos. *Revista Portal de la Ciencia*, (4), 68-74. DOI: <https://doi.org/10.5377/pc.v4i0.1864>
- Borrás-Sandoval, L. M. y Torres-Vidales, G. (2016). Producción de alimentos para animales a través de fermentación en estado sólido – *Fes. Ornoquia*, 20(2), 47-54. Recuperado de: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S012137092016000200007&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012137092016000200007&lng=en&tlng=es)
- Bulgari, D.; Alias, C., Peron, G.; Ribaudó, G.; Gianoncelli, A.; Savino, S.; Bouregghda, H., Bouznad, Z., Monti, E., y Gobbi, E. (2023). Solid-State Fermentation of *Trichoderma* spp.: A New Way to Valorize the Agricultural Digestate and

Produce Value-Added Bioproducts. *J. Agric. Food Chem.* 2023, 71, 3994–4004. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c07388>

Camacho-Luna, V., Flores-Moctezuma, H. E., Rodríguez-Monroy, M., Montes-Belmont, R., & Sepúlveda-Jiménez, G. (2021). Inducción de la respuesta de defensa de plantas de cebolla en la interacción con *Trichoderma asperellum* y *Alternaria porri*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12(4), 685–698. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i4.2683>

Cardona, N. L., Borrego, D.A., Fernández, E. P., Sánchez, J., Cardona, V. y Montoya, G. (2014). Evaluación microbiológica y patogenicidad de una bioformulación líquida del hongo *Purpureocillium* sp. (cepa UdeA 0109) en estadios *Meloidogyne incognita-javanica*. *Bioteología Aplicada*, 31(3), 210-215. Recuperado de: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S102728522014000300003&lng=es&tlng=en](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102728522014000300003&lng=es&tlng=en).

Chávez-García, M., Montaña –Lara, J. S., Martínez-Salgado, M.M., Mercado-Reyes, M., Rodríguez, H. M.X. y Quevedo-Hidalgo, 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. Recuperado de: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0122-74832008000300003&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-74832008000300003&lng=en&tlng=es)

Chen, H. (2013). *Biotechnology Principles of Solid-State Fermentation*. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-6043-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-007-6043-1_2)

Companioni, G. B., Domínguez, A. G. y García, V. R. (2019). *Trichoderma*: su potencial en el desarrollo sostenible de la agricultura. *Bioteología Vegetal*, 19(4), 237-248. Recuperado de: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S207486472019000400237&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S207486472019000400237&lng=es&tlng=es)

Cruz-Cárdenas, C. I., Zelaya, M. L. X., Sandoval, C. G., Santos, V. S, Rojas, A. E., Chávez, D. I. F. y Ruíz, R. S. (2021). Utilización de microorganismos para una agricultura sostenible en México: consideraciones y retos. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 12(5), 899-913. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i5.2905>

Cruz, M. L. C. (2007). *Estandarización del proceso de producción masiva del hongo Trichoderma koningii Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto*. [Trabajo de grado, Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias, Microbiología Industrial]. Colombia. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10.554/8237>

De Rezende, L.C, De Andrade, C.A.L., Costa, L.B., De Almeida Halfeld-Vieira, B., Silva, L.G., Pinto, Z.V., Morandi, M.A.B., De Medeiros, F.H.V., Mascarin, G.M. y 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. doi: 10.1007/s11274-020-02882-7. PMID: 32656684.

Elósegui, C.O. 2006. Métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas. *Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal*, 1-61. Recuperado de: <https://docplayer.es/14276979-Metodos-artesanales-de-produccion-de-bioplaguicidas-a-partir-dehongos-entomopatogenos-y-antagonistas.html>

Erlwein, A., Sotomayor, E. (2020). Análisis técnico-económico de alternativas de gestión de digestato y producción de fertilizantes – Brief Report. Grupo Central Agrícola. Recuperado de: <https://ledslac.org/wp-content/uploads/2020/10/Brief-report-Central-Agricola-UACH-espanol-vF1.pdf>

Fernández, G. M. A., Maidana, O.M. y Enciso, M.G. (2017). Identificación molecular y tasa de crecimiento de cepas nativas de *Trichoderma* spp. aisladas de la Región Norte del Paraguay. *Investig. Agrar.* 19(2), 127-132. Recuperado de: <https://www.agr.una.py/revista/index.php/ria/article/view/418>

Fernández-Larrea Vega, O. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas Costa Rica*, 62, 96 - 100. Recuperado de: <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/6578>

Flores, C., Hassan, M., Corkidi, G., Galindo, E., Serrano-Carreón, L. (2003). Producción de biomasa viable de *Trichoderma harzianum* bajo diferentes esquemas y condiciones de fermentación. *Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería*, (1), 1-2. Recuperado de: [https://smbb.mx/congresos%20smbb/puertovallarta03/TRABAJOS/AREA\\_II/CARTEL/CII-12.pdf](https://smbb.mx/congresos%20smbb/puertovallarta03/TRABAJOS/AREA_II/CARTEL/CII-12.pdf)

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

García-Velasco, R., Alonso-Bahena, A., Domínguez- Arizmendi, G., Aguilar-Medel, S., Mora-Herrera, M, E., Companioni-González, B. (2021). Efecto antagónico de cepas nativas de *Trichoderma* spp. contra el hongo fitopatógeno *Rosellinia necatrix* en México. *Agronomía Tropical*, 71. DOI: 10.5281/zenodo.4605221

García-Velasco, R., Alonso-Bahena, A., Domínguez- Arizmendi, G., Aguilar-Medel, S., Mora-Herrera, M, E. y Companioni-González, B. (2021). Efecto antagónico de cepas nativas de *Trichoderma* spp. contra el hongo fitopatógeno *Rosellinia necatrix* en México. *Agronomía Tropical* 71: e4605221. DOI: 10.5281/zenodo.4605221.

García-Velasco, R., Rojas-Tapia G., Domínguez-Arizmendi, G., Companioni-González, B. (2022). Sensibilidad *in vitro* de cinco cepas nativas de *Trichoderma* spp. a diferentes fungicidas. *Agronomía Tropical*, 71, 1-12. DOI: 10.5281/zenodo.5515702

Gómez-García, R., Roussos, S., Medina-Morales, M., Farruggia, B. y Aguilar, C.N. (2019). Producción de Enzimas de *Trichoderma harzianum* por Fermentación de Residuos Lignocelulósicos. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 11(22), 15-20. Recuperado de: <http://www.biochemtech.uadec.mx/wpcontent/uploads/2022/01/Produccion-de-enzimas.pdf>

González-Marquetti, I., Infante-Martínez, D., Arias-Vargas, Y., Gorrita-Ramírez, S., Hernández-García, T., de la Noval-Pons, B. M., Martínez-Coca, B. y Peteira, B. (2019). Efecto de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg sobre indicadores de crecimiento y desarrollo de *Phaseolus vulgaris* L. cultivar BAT-304. *Revista de Protección Vegetal*, 34(2). Recuperado de: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S101027522019000200004&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S101027522019000200004&lng=es&tlng=es)

Guoweia, S., Man, H., Shikai, W. and Chen, H. (2011). Effect of some factors on production of cellulase by *Trichoderma reesei* HY07. *Procedia Environmental Sciences* 8, 357 – 361. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2011.10.056>

Guzmán Valle, P. (2012). *Inducción de la resistencia a Sclerotium rolfsii en cebolla por la aplicación de Trichoderma asperellum*. [Tesis de maestría, Instituto Politécnico Nacional]. México. <http://tesis.ipn.mx/handle/123456789/12740>

- Harman, G., Howell, C., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review Microbiology*, 2(43) - 56. <https://doi.org/10.1038/nrmicro797>.
- Hernández-Melchor, D.J., Ferrera-Cerrato, R. y Alarcón, A. (2019). *Trichoderma*: Importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean J. Agric. Anim. Sci., ex Agro-Ciencia*, 35(1), 98-112. <http://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902019005000205>
- Hernández-Lauzardo, A.N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M.G., y Hernández-Rodríguez, A. (2007). Uso de Microorganismos Antagonistas en el Control de Enfermedades Postcosecha en Frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25(1), 66-74. Recuperado de: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S018533092007000100009&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018533092007000100009&lng=es&tlng=es)
- Hewavitharana, N., Kannangara, S.D.P. and Senanayake, S.P. (2018). Solation, Identification and Mass production of five *Trichoderma* spp. on Solid and Liquid Carrier Mediafor Commercialization. *Internastional Journal Applied Sciences and Biotechnology*, 6(4), 285-293. DOI: 10.3126/ijasbt.v6i4.22128.
- Howell C. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, 87(1) ,4-10. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.1.4>
- Infante, D., Martínez, B., González, N. y Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), 14-21. Recuperado de:

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S101027522009000100002&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S101027522009000100002&lng=es&tlng=es)

- Jaronski, S. y Jackson, M. (2012). Mass production of entomopathogenic Hypocreales. Lawrence A. Lacey (2 Ed.) *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, 255-284. Recovered from: <https://www.sciencedirect.com/book/9780123868992/manualoftechniques-in-invertebrate-pathology#book-info>
- Kirk, P. M., Roskov, Y., Abucay, L., Orrell, T., Nicolson, D., Bourgoin, T. and De Wever, A. (2018). Catalogue of life: Taxonomic classification of the genus *Trichoderma*. Recovered from: <https://www.catalogueoflife.org/data/taxon/63W3K>
- Kobori, N.N., Mascarín, G.M., Jackson, M.A. and Schisler, D.A. (2015). Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. *Fungal Biology*, 119(4), 179-190. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.12.005>.
- Kolombet, L.V, Zhigletsova, S.K., Kosareva, N.I., Bystrova, E.V., Derbyshev, V.V., Krasnova, S.P. y Schisler, D. (2008). Development of an extended shelf life, liquid formulation of the biofungicide *Trichoderma asperellum*. *World J. Microbiol Biotechnol*, 24, 123-131. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9449-9>
- Locatelli, O. G., Pimentel, M. F.M, Bueno, A. L., Lobo, J.M., Mascarín, M. G. and Luna, L. C. (2022). Production of microsclerotia by *Trichoderma asperellum* through submerged liquid fermentation using low-cost nitrogen and carbon sources. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 44. <https://doi.org/10.1016/j.bca b.2022.102455>

López, A. Y. M. (2018). *Producción y formulación de Trichoderma asperellum para el manejo de patógenos de la raíz de caña de azúcar*. [Tesis de maestría, Universidad Autónoma del Estado de Morelos]. México. Recuperado de: <http://riaa.uaem.mx/xmlui/bitstream/handle/20.500.12055/646/LOAYLN08T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

López, M.T.A., Paramo, A. L.A., Delgado, S.HD. (2022). Reproducción masiva de hongos *Trichodermas* previamente identificados de suelos nicaragüenses en diferentes sustratos orgánicos. *Revista Nexo*, 35(3), 700-712. <https://doi.org/10.5377/nexo.v35i03.15000>

Martínez, B., Infante, D. & Peteira, B. (2015). Taxonomía polifásica y variabilidad en el género *Trichoderma*. *Rev. Protección Veg.* 30: 11-22. Recuperado de: <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v30s1/rpv004s15.pdf>

Martínez, B., Infante, D. y Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*, 28(1), 1-11. Recuperado de: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S101027522013000100001&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S101027522013000100001&lng=es&tlng=es)

Martínez-Coca, B., Infante, D., Caraballo, W., Duarte-Leal, Y. y Echevarría-Hernández, A. (2018). Antagonismo de cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg contra aislamientos de *Fusarium* spp. de garbanzo. *Revista de Protección Vegetal*, 33(2). Recuperado de: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S101027522018000200007&lng=es&tlng=en](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S101027522018000200007&lng=es&tlng=en)

Michel-Aceves, A.C., Otero-Sánchez, M.A., Martínez-Rojero, R.D., Rodríguez-Morán, N.L., Ariza-Flores, R., y Barrios-Ayala, A. (2008). Producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en diferentes sustratos

orgánicos. *Revista Chapingo Serie horticultura*, 14(2), 185-191. Recuperado de: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1027152X2008000200012&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027152X2008000200012&lng=es&tlng=es)

Mishra, P.K. y Khan, F.N. (2015). Effect of Different Growth Media and Physical Factors on Biomass Production of *Trichoderma Viride*. *People's Journal of Scientific Research*, 8 (2), 11–17. Recuperado de: <https://pjsr.org/PDF/3.pdf>

Monzón, C. A. (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica). 63,95-103. Recuperado de: <http://www.bionica.info/biblioteca/Monzon2001HongoEntomopatogenos.pdf>

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO. (2010). Biopreparados para el manejo sostenible de plagas y enfermedades en la agricultura urbana y periurbana (1ª Edición). Recuperado de: <https://www.fao.org/3/as435s/as435s.pdf>

Pineda-Insuasti, J.A., Benavides-Sotelo, E.N., Duarte-Trujillo, A.S., Burgos-Rada, C. A., Soto-Arroyave, C.P., Pineda-Soto, C.A., Fierro-Ramos, F.J., Mora-Muñoz, E.S, Álvarez-Ramos, S.E. (2017). Producción de biopreparados de *Trichoderma* spp: una revisión. *ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar* 51(1), 47-52. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223153894008>

Rai, D., Ranjan, R.K. y Kumar, M. (2023). Evaluación de sustratos sólidos y líquidos locales para el crecimiento y esporulación de *Trichoderma asperellum*. *Innovación farmacéutica*, 12(3) ,15-18. Recuperado de: <https://www.thepharmajournal.com/archives/?year=2023&vol=12&issue=3&ArticleId=19268>

Rivera-Méndez, W., Obregón, M., Morán-Diez, M.E., Hermosa, R. y Monte, E. (2020). *Trichoderma asperellum* biocontrol activity and induction of systemic defenses against *Sclerotium cepivorum* in onion plants under tropical climate conditions. *Biological Control*, 141, 1049-9644. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104145>

Rojas, T. G. (2020). Sensibilidad in vitro de cinco aislados de *Trichoderma* spp., a fungicidas. [Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de México]. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/20.500.11799/109309>

Ronnie-Gakegne, E. y Martínez-Coca, B. (2018). Antibiosis y efecto de pH-temperatura sobre el antagonismo de cepas de *Trichoderma asperellum* frente a *Alternaria solani*. *Revista de Protección Vegetal*, 33(2), 2224-469. Recuperado de: <http://opn.to/a/0XV5m>

Samuels, G. J., Lieckfeldt, E. and Nirenberg, H. I. (1999). *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia, and redescription of *T. viride*. *Sydowia*, 51(1), 71-88. Recuperado de: [https://www.zobodat.at/pdf/Sydowia\\_51\\_0071-0088.pdf](https://www.zobodat.at/pdf/Sydowia_51_0071-0088.pdf)

Sánchez, P.M.I. (2009). Aislamiento y caracterización molecular y agronómica de *Trichoderma* spp. nativos del norte de Tamaulipas. [Tesis de maestría, Instituto Politécnico Nacional]. México. Recuperado de <http://tesis.ipn.mx:8080/xmlui/handle/123456789/8464>.

Sandle, T., Batt, C.A. y Tortorello, L. (2014). *Trichoderma*, Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition), Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00337-2>.

Santana-Hernández, E., Marcet-García, E., Martínez-Padrón, E., Carrillo-Ulloa, R. y Marcet-Sánchez, M.E (2017). El jugo de caña de azúcar como aditivo en

la reutilización del bagazo de malta. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 51 (3), 28-34.

Singh, B.N, Singh, A., Singh, G.S y Dwivedi, P. (2015). Papel potencial de la cepa T42 de *Trichoderma asperellum* en el crecimiento de plantas de guisantes para una agricultura sostenible. *J Pure Appl Microbiol*, 9(2), 1069-1074. Recuperado de: <https://microbiologyjournal.org/potential-role-of-trichoderma-asperellum-t42-strain-in-growth-of-pea-plant-for-sustainable-agriculture/#>

Sui Ming., Guan, Y., Wu X., Zhang, Y., Li J., Rong, J., Zhou, R. and Li, G. (2019). Optimization of *Trichoderma* Fermentation Medium. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering*. doi:10.1088/1757-899X/612/2/022075

Tchameni, S.N. Ngonkeu, M.E.L. Begoude, M.A.L., Wakam, L. Fokom R., Owona, A.D, Mbarga, J.B., Tchana, T., Tondje, P.R., Etoa, F.X. y Kuate, J. (2011). Effect of *Trichoderma asperellum* and arbuscular mycorrhizal fungi on cacao growth and resistance against black pod Disease. *Crop Protection*, 30(10), 1321-1327. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.05.003>

Thangavelu, R., Palaniswami, A., Velazhahan, R. 2004. Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing fusarium wilt of banana. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 259–263. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2003.09.026>

Vassilev, N. y de Oliveira, M. G. (2018). Solid-State Fermentation and Plant-Beneficial Microorganisms. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier, 435-450. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00019-0>.

Vuppala, G., Krishna, R. y Murthy, K. (2015). Fermentation industrial. *Research and Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology*, 4(1), 2320-3528.

Recuperado de: <https://www.rroij.com/open-access/industrial-fermentation.pdf>

Wei, L., Liang, Z.H., Zhang, Z.G. and Luo, H. R. (2006). Effects of Peptide in the Fermentation Liquid of *Trichoderma harzianum* on Nodule Microstructure and Function of Cowpea. *Acta Laser Biology*, 1(1). Recuperado de: [http://en.cnki.com.cn/Article\\_en/CJFDTTotal-JGSW200601014.htm](http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTTotal-JGSW200601014.htm)

Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R. and Mukherjee, P. (2016). Secondary metabolism in *Trichoderma*. *Chemistry meets genomics, Fungal Biology Reviews*, 30(2), 1749-4613. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.05.001>

## 11. ANEXOS

### Anexo 1. Estimación de costos para la producción de *T. asperellum* cepa TFR3 por medio de fermentación líquida, sólida y bifásica.

Los costos de producción para cada tipo de fermentación (líquida, sólida y bifásica), se manejan como independientes; así como, los materiales para cada tipo de fermentación.

#### Fermentación líquida

Para realizar el medio líquido para la obtención de conidios de *Trichoderma asperellum* se necesitan los siguientes materiales: melaza, levadura y agua destilada. Estos materiales tienen los siguientes costos en la zona de Tenancingo, Estado de México, sumando un total de \$167.5 para obtener dos litros de biopreparado con esporas de *T. asperellum* en 14 días (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Costo de materiales para la fermentación líquida de *T. asperellum*.

Material	Costo unitario en \$	Unidades	Costo total \$
Melaza (L)	12.50	1	12.50
Levadura (g)	20.00	4	80.00
Agua destilada (L)	25.00	3	75.00
		<b>TOTAL</b>	<b>167.50</b>

### Fermentación sólida

Para realizar la fermentación sólida se requirieron de los sustratos arroz, trigo y sorgo, a estos costos solo se les adicionó el costo del molino manual (mecánico) para la trituración de los sustratos, el costo de las bolsas y de las charolas de aluminio. El costo de la producción de *T. asperellum* por medio de fermentación solida es de \$1438 (Cuadro 2). Finalmente se obtuvieron 15 kg de sustrato esporulados de *T. asperellum*.

**Cuadro 2.** Costo de los materiales para la fermentación sólida de *T. asperellum*.

<b>Materiales</b>	<b>Costo unitario en \$</b>	<b>Unidades</b>	<b>Costo total en \$</b>
Arroz (kg)	20.00	5	100.00
Trigo (kg)	16.00	5	80.00
Sorgo (kg)	13.00	5	65.00
Molino de mano (pza.)	585.00	1	585.00
Charola de aluminio (pzas.)	15.00	30	450.00
Escurreidores (pzas.)	15.00	6	90.00
Bolsas (kg)	68.00	1	68.00
		<b>TOTAL</b>	<b>1438.00</b>

### Fermentación bifásica

Para la producción de *T. asperellum* por medio de fermentación bifásica se necesita de un medio líquido constituido por melaza, levadura y agua destilada, por otro lado, un medio sólido compuesto por arroz, trigo y sorgo. A estos materiales se les agrego el costo de un kilogramo de bolsas en las que se resguardan los sustratos para posteriormente ser vaciados en charolas de aluminio para su secado, las cuales también ostentan un costo. Además, en este caso al utilizar la versión triturada de los sustratos (arroz, trigo y sorgo) también se colocó el costo de un molino manual utilizado para la disminución del tamaño de los granos con un costo único, el costo de la producción por fermentación bifásica fue de \$1605.50 pesos (Cuadro 3). Se obtuvieron 15 kg de sustrato esporulado con *T. asperellum*.

**Cuadro 3.** Costo de materiales para la fermentación bifásica de *T. asperellum*.

<b>Materiales</b>	<b>Costo unitario en \$</b>	<b>Unidades</b>	<b>Costo total en \$</b>
Melaza (L)	12.50	1	12.50
Levadura (g)	20.00	4	80.00
Agua destilada (L)	25.00	3	75.00
Arroz (kg)	20.00	5	100.00
Trigo (kg)	16.00	5	80.00
Sorgo (kg)	13.00	5	65.00
Molino de mano (pza.)	585.00	1	585.00
Charola de aluminio (pzas.)	15.00	30	450.00
Escurreidores (pzas.)	15.00	6	90.00
Bolsas (kg)	68.00	1	68.00
		<b>TOTAL</b>	<b>1,605.50</b>

### **Costos totales de las técnicas de fermentación líquida, sólida y bifásica**

De acuerdo con la cantidad y el costo de los materiales la fermentación líquida fue la que tuvo un menor costo de producción, seguida de la fermentación sólida y por último la fermentación más costosa fue la fermentación bifásica (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Costos de producción de *T. asperellum* por medio de fermentación líquida, bifásica y sólida.

<b>Tipo de fermentación</b>	<b>Costo de producción en \$</b>
Líquida	167.50
Sólida	1438.00
Bifásica	1,605.50