

Producción de *Trichoderma harzianum* A-34 en sustratos sólidos alternativos

Production of *Trichoderma harzianum* A-34 on alternative solid substrates

Yanet Antomarchi Obregón¹, Elisabeth Tamayo Rosales² y Siannah María Mas Diego³

¹ Grupo Empresarial Labiofam Sucursal Santiago de Cuba, yantomachi@uo.edu.cu

² Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal Santiago de Cuba

³ Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba

RESUMEN

La producción y empleo de bioplaguicidas es una de las vías principales para reducir el consumo de plaguicidas en la agricultura. El antagonista *Trichoderma harzianum* Rifai A-34 es ampliamente utilizado para el control de patógenos de suelo, el cual es producido de forma artesanal en estado sólido, líquido estático y bifásico líquido-sólido. En nuestro país se utilizan el bagazo de caña y la cabecilla de arroz para su producción. En este trabajo se utilizaron residuos agroindustriales de buena disponibilidad y bajo costo en el mercado, aserrín de pino blanco y afrecho cervecero, sustratos que además de servir de soporte al hongo para su crecimiento aportan los nutrientes necesarios para su adecuado desarrollo. Estos residuales constituyen fuentes potenciales de contaminación, por lo que su uso preserva la integridad del medio ambiente. Se probó la pureza microbiológica (%), la viabilidad por tubo germinativo (%), concentración (células • g de sustrato⁻¹), el antagonismo frente a *Fusarium oxysporum* Cooke. *Trichoderma harzianum* Rifai A-34 incrementó significativamente en un 34 % el conteo de conidios sobre aserrín de pino blanco y afrecho cervecero con respecto a *Trichoderma harzianum* Rifai A-34 producido en bagazo de caña enriquecido con cabecilla de arroz. Se concluye que estos sustratos pueden ser empleados como una alternativa para la producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai A-34.

Palabras claves: control biológico, *Trichoderma harzianum* Rifai A-34, fermentación sólida, sustratos alternativos.

ABSTRACT

In the establishment of the new agricultural model in which Cuba is engaged, one of the most urgent tasks is to find ways to reduce the use of synthetic pesticides for the management of pests. One of these alternatives is biological control, which, besides reducing the environmental impact on agricultural activity, allows agricultural sustainability. Among the methods of biological control, is the use of *Trichoderma harzianum* Rifai A-34 as a fungicide, for its antagonistic activity against phytopathogens. It is produced in solid state, static liquid and two-phase liquid-solid fermentation. In our country, sugarcane bagasse and rice rind are used for its production. In this work agroindustrial residues of good availability and low cost were used: white pine sawdust and beer bran. Besides supporting the fungus for its growth, these substrates provide the necessary nutrients for its proper development. These residuals are potential sources of contamination, so their use preserves the integrity of the environment. Microbiological purity (%), viability by germinative tube (%), concentration (cells • g of substrate⁻¹) and antagonism against *Fusarium oxysporum* Cooke were tested and the quality control was guaranteed. *Trichoderma harzianum* Rifai A-34 significantly increased by 34% the count of conidia on white pine sawdust and beer bran compared to *Trichoderma harzianum* Rifai A-34 produced on sugarcane bagasse enriched with rice rind. It is concluded that these substrates can be used as alternatives for the mass production of *Trichoderma harzianum* Rifai A-34.

Keywords: biological control, *Trichoderma harzianum* Rifai A-34, solid fermentation, alternative substrates.

INTRODUCCIÓN

Hace más de sesenta años se comenzaron a producir y comercializar los plaguicidas de síntesis química para encontrar una solución a los problemas existentes en la agricultura. El uso intensivo de estos productos produjo un impacto negativo en los ecosistemas, se contaminó el agua y afectó a los microorganismos y a la salud humana, por lo que constituye esto uno de los problemas más críticos que enfrentan hoy los agricultores a nivel mundial.

En la actualidad han surgido nuevas alternativas de soluciones que tratan de reducir este impacto mediante el uso de agentes biológicos para el control de plagas (Vinale *et al.*, 2014). Entre los métodos de control biológico se encuentra la utilización de hongos entomopatógenos. Su producción ha sido desarrollada en varios países de América Latina como Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Costa Rica, Cuba y Venezuela, entre otros (Bettiol *et al.*, 2014). En este

grupo de hongos se encuentran las especies de *Trichoderma*, género muy utilizado debido a la gran gama de usos agrícolas que posee. Puede ser fácilmente aislado y cultivado debido a su rápido crecimiento en un gran número de sustratos, por lo que para su producción se necesita entre otros factores la selección de sustratos idóneos donde pueda crecer de forma rápida y viable (Valdés, 2014; Srivastava *et al.*, 2015). Varios autores evalúan la producción de este hongo en sustratos alternativos provenientes de residuos agroindustriales (García *et al.*, 2006; Agamez Ramos *et al.*, 2008; Sivila *et al.*, 2017).

En nuestro país se utiliza como fuente de nitrógeno para producir este hongo la cabecilla de arroz, subproducto derivado de la industria arrocera. Debido a la tecnificación del proceso de molinaje de este cereal, se ha visto afectada la obtención de este residuo, el cual no está disponible en cantidades suficientes. Santiago de Cuba no es una provincia productora de arroz y tiene que transportar este subproducto, lo que encarece el proceso. Es por ello que este trabajo tiene como objetivo producir *Trichoderma harzianum* Rifai A-34, en cantidad suficiente, con nuevos sustratos disponibles que le aporten los nutrientes necesarios para su rápido crecimiento y desarrollo. De esta manera también se minimiza el impacto negativo que tienen estos desechos de la industria al medio ambiente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluaron cuatro subproductos: bagazo de caña y aserrín de pino blanco como fuentes carbonadas, y cascarilla de arroz y afrecho cervecero como fuentes nitrogenadas. La producción de *T. harzianum* Rifai

A-34 se realizó en el Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Santiago de Cuba (LAPROSAV), según metodología descrita para la reproducción por fermentación en estado sólido en Márquez Gutiérrez *et al.* (2010).

Se tomó como resultado de referencia el obtenido con el sustrato formado por el 86 % de bagazo de caña y el 14 % de cabecilla de arroz, ya que esta es la composición empleada actualmente en los centros de reproducción de Santiago de Cuba.

Se empleó un diseño experimental factorial 2^2 (Tabla 1) con cuatro réplicas de cada uno de los experimentos para un total de 16 unidades experimentales. Se realizó el control de calidad de este hongo mediante las pruebas de pureza microbiológica (%), viabilidad (%), concentración (conidios \cdot g de sustrato⁻¹) y antagonismo por cultivo dual (%). Para el antagonismo se enfrentó *T. harzianum* A-34 a *Fusarium oxysporum* Cooke, microorganismo perteneciente al Banco de Cepas del Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal (Fernández Barbosa and Suárez Meza, 2009).

Para el procesamiento de los datos se utilizó el paquete estadístico Statgraphics Centurion, versión 15.2.14 (2007). La prueba empleada fue la comparación de medias para grupos homogéneos mediante un análisis de varianza (ANOVA) simple ($p \leq 0,05$) seguido por pruebas de rangos múltiples, procedimiento de HSD (Honestly-Significant-Difference) de Tukey, después de efectuadas las pruebas para comprobar la normalidad y homogeneidad de las varianzas (Montgomery, 2017). Las barras de error de los gráficos y los intervalos que aparecen en las tablas están referidos a la desviación estándar de los datos experimentales.

Tabla 1. Factores y dominio experimental

Factores	Dominio experimental	
	Nivel 1	Nivel 2
X ₁ : Fuentes de carbono	Bagazo de caña (-1)	Aserrín de pino blanco (+1)
X ₂ : Fuentes de nitrógeno	Cabecilla de arroz (-1)	Afrecho cervecero (+1)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al cabo de siete días, el color de *T. harzianum* A-34 cambió de blanco a blanco-verdoso, y hacia el final de la fermentación a un color verde oscuro opaco, lo que coincide con lo reportado por Schuster and Schmoll (2010). Al realizar la observación al microscopio óptico

se distinguen los conidios típicos de la especie (Gams and Bissett, 1998). La pureza microbiológica fue de un 100 % para todas las muestras.

Cuando se analizan los resultados obtenidos para la viabilidad (Fig 1), se observa que los mayores valores corresponden a los experimentos en los que se utilizaron

aserrín de pino blanco y afrecho cervecero. El afrecho cervecero está compuesto por un 4,6 % de nitrógeno (Arias Lafargue and Reyes Yola, 2010), superior a la proporción presente en la cabecilla de arroz (1,24 % de nitrógeno), según reportan Figueroa and Sánchez (1997). Este nutriente es esencial para el crecimiento y desarrollo

de *Trichoderma* (Jackson *et al.*, 1991), y al combinarlo con aserrín de pino blanco (0,10 % de nitrógeno), según Guyat Dupuy *et al.* (2005) el aporte total de nitrógeno es mayor que el suministrado por el medio compuesto por bagazo de caña (0,23 %, según García-Torres *et al.* (2011), enriquecido con cabecilla de arroz.

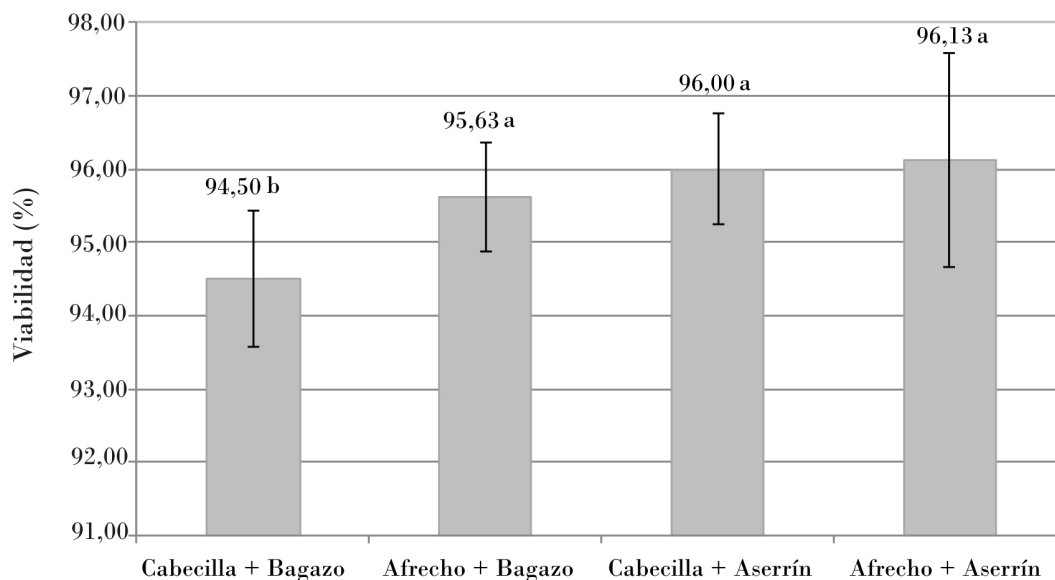


Figura 1. Efecto de diferentes sustratos en la viabilidad de *Trichoderma harzianum* A-34.

Serpa Barahona (2015) obtuvo el 98,0 % de viabilidad en el tratamiento con cascarilla de arroz humedecida por 24 h. Arévalo *et al.* (2017) realizaron mezclas de residuos agrícolas para optimizar la producción de conidios de *T. harzianum*. El porcentaje de germinación de conidios mostró niveles superiores al 85 %. Al incrementar la humedad del sustrato al 50 %, los valores fueron superiores al 90 %.

Se observó que *T. harzianum* A-34 producido con aserrín de pino blanco y afrecho cervecero tuvo una mayor actividad antagonista frente a *F. oxysporum* que el producido sobre bagazo de caña y cabecilla de arroz (Fig. 2). Hay influencia significativa de las fuentes de nitrógeno sobre las fuentes de carbono en el desarrollo de las estructuras infectivas de este microorganismo. Jackson *et al.* (1991) reportaron la influencia decisiva de la presencia de una fuente de nitrógeno orgánico en la esporulación de *T. pseudokoningii*, *T. viride* (IMI 322659) y *T. viride* (IMI 322663).

Agamez Ramos *et al.* (2009) evaluaron la capacidad antagonista de nueve aislados de *Trichoderma* y su

producción de conidios en medios de cultivo líquido estático frente a dos hongos fitopatógenos: *Fusarium* sp. y *Rhizoctonia* sp. Se obtuvo la mayor capacidad antagonista frente al hongo *Fusarium* sp., con un porcentaje de inhibición del 78,30 %. Fernández Barbosa and Suárez Meza (2009) realizaron el enfrentamiento de tres cepas de *T. harzianum* con *F. oxysporum* aislado directamente de plantas enfermas de maracuyá mediante cultivo dual. Se obtuvo que todos los aislamientos de *T. harzianum* superaron en crecimiento a *F. oxysporum* con un diámetro promedio de 7,42 cm en cultivo dual, mientras que las colonias del patógeno crecieron con un diámetro promedio de 1,99 cm.

Se obtiene mayor concentración de conidios en *Trichoderma harzianum* A-34 producido con la fuente de carbono aserrín de pino blanco y afrecho cervecero como fuente de nitrógeno que con bagazo de caña y cabecilla de arroz (Fig. 3). Esta mayor producción de conidios pudo deberse a la composición del medio de cultivo. El aserrín de pino es una fuente de carbohidratos estructurales (celulosa, hemicelulosa y lignina, esta última puede representar del 27 al 30 %)

(Guerra-Medina *et al.*, 2010), necesarios para el crecimiento de *Trichoderma* sp. El aporte del 0,92 % de nitrógeno del afrecho cervecero incrementó los niveles de estos nutrientes esenciales para el adecuado crecimiento y desarrollo de *T. harzianum* A-34.

Según Elósegui Claro (2006), en los hongos se necesita que la fuente de carbono esté en exceso en el medio y el contenido de nitrógeno sea el factor limitante del crecimiento, lo que desencadena el proceso esporulativo.

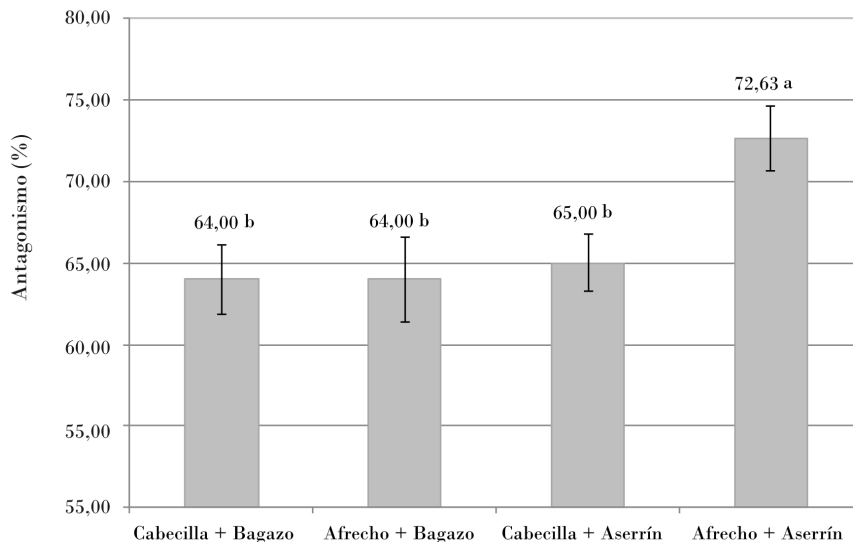


Figura 2. Efecto de diferentes sustratos en la capacidad de enfrentamiento de *T. harzianum* A-34 contra *Fusarium oxysporum* Cooke.

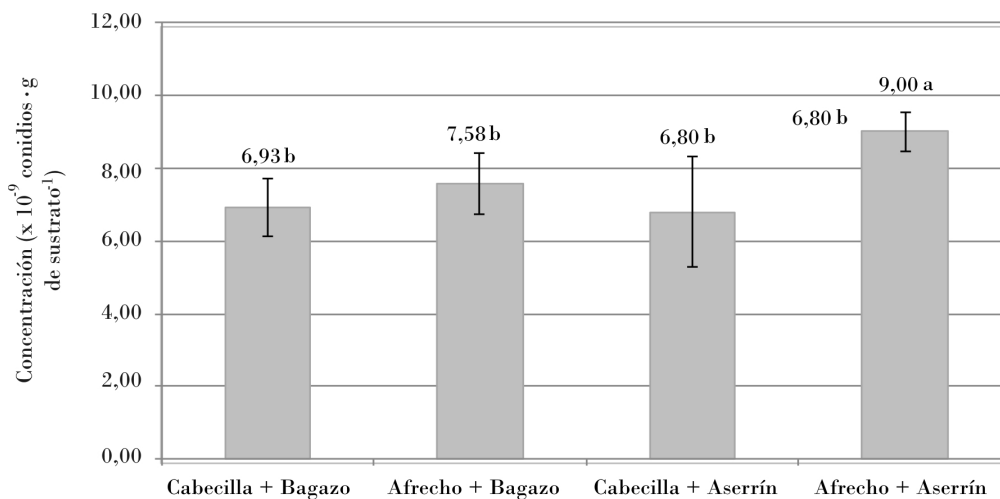


Figura 3. Efecto de diferentes sustratos en la concentración final de conidios de *Trichoderma harzianum* A-34.

En estudios realizados por Allori Stazonelli *et al.* (2017), los sustratos donde se produjo mayor concentración de conidios por gramo, al décimo día de incubación, fueron el constituido por granos de arroz ($17,8 \cdot 10^8$ conidios \cdot g de sustrato⁻¹) y el conformado por bagazo humedecido con solución de melaza al 10 % ($14,4 \cdot 10^8$ conidios \cdot g de sustrato⁻¹). Benites Bellino and Marroquín (2013) evaluaron la producción de *Trichoderma harzianum* en diferentes sustratos y obtuvieron a las 120 h concentraciones de conidios desde $6,7 \cdot 10^6$ conidios \cdot g de sustrato⁻¹ hasta $8,3 \cdot 10^8$ conidios \cdot g de sustrato⁻¹. Agamez Ramos *et al.* (2009) alcanzaron mayor producción de conidios con harina de plátano y levadura sin *buffer* con una concentración de $1,1 \cdot 10^9$ conidios \cdot mL⁻¹. García *et al.* (2006) obtuvieron alta capacidad de desarrollo y producción de conidios en un 7 % de arroz en ocho días, con una concentración final de $2 \cdot 10^{10}$ conidios \cdot g de sustrato⁻¹.

CONCLUSIONES

- El sustrato compuesto por aserrín de pino blanco y afrecho cervecero reúne las condiciones para el crecimiento y desarrollo de *Trichoderma harzianum* A-34. La concentración de conidios se incrementó significativamente en un 34 % por encima del producido con sustrato compuesto por bagazo de caña enriquecido con cabecilla de arroz, por lo que es posible utilizar los residuos de estas industrias en producciones más limpias y asegurar, mediante la utilización de este hongo, la sostenibilidad agrícola.

REFERENCIAS

Agamez Ramos, E., Barrera Violeth, J. & Oviedo Zumaqué, L. 2009. Evaluación del antagonismo y multiplicación de *Trichoderma* sp. en sustrato de plátano en medio líquido estático. *Acta Biológica Colombiana*, 14, 61-70.

Agamez Ramos, E. Y., Zapata Navarro, R. I., Oviedo Zumaque, L. E. & Barrera Violeth, J. L. 2008. Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, X, 23-34.

Allori Stazonelli, E., Yasem De Romero, M. G. & 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, 57-66.

Arévalo, E., Cayotopa, J., Olivera, D., Gárate, M., Do Bomfim Costa, E. T. & 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, 135-144.

Arias Lafargue, T. & Reyes Yola, O. 2010. Caracterización ambiental del Combinado Industrial Hatuey (I Parte). *Tecnología Química*, 30, 53-66.

Benites Bellino, C. M. & Marroquín, L. C. 2013. Producción de *Trichoderma harzianum* en diferentes sustratos orgánicos. *Portal de la Ciencia*, 4, 68-74.

Bettiol, W., Rivera, M. C., Mondino, P., Montealegre A., J. R. & Colmenárez, Y. C. (eds.) 2014. *Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe*, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo, Argentina: Embrapa Meio Ambiente-(ALICE).

Elósegui Claro, O. 2006. *Metodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas.*, Ciudad de La Habana, Cuba, Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV).

Fernández Barbosa, R. J. & Suárez Meza, C. L. 2009. Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp *passiflorae* en maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. Flavicarpa) del Municipio zona bananera colombiana. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*, 62, 4743-4748.

Figuerola, V. & Sánchez, M. (eds.) 1997. *Tratamiento y utilización de residuos de origen animal, pesquero y alimenticio en la alimentación animal* La Habana, Cuba: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

Gams, W. & Bissett, J. 1998. Morphology And Identification Of *Trichoderma*. In: Kubicek, C. P. & Harman, G. E. (eds.) *Trichoderma and Gliocladium*. Taylor & Francis Ltd.

García-Torres, R., Ríos-Leal, E., Martínez-Toledo, Á., Ramos-Morales, F. R., Cruz-Sánchez, J. S. & Cuevas-Díaz, M. D. C. 2011. Uso de cachaza y bagazo de caña de azúcar en la remoción de hidrocarburos en suelo contaminado. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 27, 31-39.

García, R., Riera, R., Zambrano, C. & Gutiérrez, L. 2006. Desarrollo de un fungicida biológico a base de una cepa del hongo *Trichoderma harzianum* proveniente de la región andina venezolana. *Fitosanidad*, 10, 115-121.

Guerra-Medina, C. E., Cobos-Peralta, M. A., Montañez-Valdez, O. D. & Pérez-Sato, M. 2010. Uso de aserrín de pino (*Pinus patula*) como fuente de fibra en dietas para borregos en cebo. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12, 667-673.

Guyat Dupuy, M. A., Alderete Rosell, E., Velázquez Viera, D., Manzanares Ayala, K. & López Escobar, I. 2005. Producción de energía y biofertilizante a partir del aserrín. *Revista Forestal Baracoa*, 24, 91-97.

Jackson, A. M., Whipps, J. M., Lynch, J. M. & Bazin, M. J. 1991. Effects of some carbon and nitrogen sources on spore germination, production of biomass and antifungal metabolites by species of *Trichoderma* and *Gliocladium virens* antagonistic to *Sclerotium cepivorum*. *Biocontrol Science and Technology*, 1, 43-51.

Márquez Gutiérrez, M. E., Fernández-Larrea Vega, O., Jiménez Ramos, J., Elósegui Claro, O., Gómez González, R., Carreras Solís, B., Laguardia Urrutia, E., Monzón Chávez, S., Ayala Sifontes, J. L., Massó Villalón, E., Veitia Rubio, M., Borges Marín, G. & Baró Robaina, Y. (eds.) 2010. *Formas de obtención de controladores biológicos microbianos para su uso en el sistema de producción agrícola del MINAG*, La Habana: Cidisav.

Montgomery, D. C. 2017. *Design and analysis of experiments*, Arizona State University, John Wiley & Sons, Inc.

Schuster, A. & Schmoll, M. 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 87, 787-799.

Serpa Barahona, M. J. 2015. *Eficiencia de crecimiento del hongo Trichoderma harzianum Rifai para la producción de bioplaguicida, aprovechando el residuo agroindustrial de cáscara de haba (Vicia faba L.)*. Ingeniero en Biotecnología Ambiental Trabajo de Diploma, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

- Sivila, N., Álvarez, S. & Bonillo, M. 2017. Producción artesanal de *Trichoderma* spp. sobre diferentes sustratos y empleo de dos tipos de contenedores. 4° Congreso Argentino de Fitopatología. Argentina.
- Srivastava, M., Shahid, M., Pandey, S., Kuma, V., Singh, A., Trivedi, S. & Srivastava, Y. 2015. *Trichoderma*: A scientific approach against soil borne pathogens. *African Journal of Microbiology Research*, 9, 2377-2384.
- Valdés, E. L. 2014. Caracteres principales, ventajas y beneficios agrícolas que aporta el uso de *Trichoderma* como control biológico. *Agroecosistemas*, 2, 254-264.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Woo, S. L., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., Pascale, A., Ruocco, M., Lanzuise, S., Manganiello, G. & Lorito, M. 2014. *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *The Open Mycology Journal*, 8, 127-139.