PRODUCCIÓN DE HONGO *TRICHODERMA HARZIANUM* A-34 EN SUSTRATOS SÓLIDOS ALTERNATIVOS

PRODUCTION OF THE MUSHROOM TRICHODERMA HARZIANUM A-34 IN ALTERNATIVE SOLID SUBSTRATUMS

Ms.C Yanet Antomarchi Obregón^{1*}

¹ Grupo Empresarial Labiofam Sucursal Santiago de Cuba. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2564-8861>. Correo: antomarchiyanet@gmail.com

Elisabeth Tamayo Rosales²

² Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal Santiago de Cuba. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6499-433X>.

Juan Luis Guerra Buenaño³

³ Escuela Superior Politécnica del Chimborazo - Facultad de Recursos Naturales Email: juan.guerra@esPOCH.edu.ec

Dr.C. Siannah Maria Mas Diego⁴

⁴ Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado, Universidad de Oriente. Santiago de Cuba

Ing. Alejandro Lamberto Barrera Antomarchi⁵

⁵ Empresa Agroforestal Gran Piedra Baconao. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3235-5442>. Correo: lambertoantomarchi@gmail.com

* Autor para correspondencia: antomarchiyanet@gmail.com

Resumen

En el establecimiento del nuevo modelo agrícola en que Cuba está empeñada, una de las tareas más urgentes es encontrar vías para reducir el uso de plaguicidas sintéticos para el manejo de plagas. Una de estas vías es el control biológico, que, además de reducir el impacto ambiental en la actividad agropecuaria, permite asegurar la sostenibilidad agrícola. Entre los métodos de control biológico, se encuentra la utilización de

Trichoderma harzianum A-34 como fungicida, por su actividad antagónica frente a fitopatógenos. 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 servirle 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 realizaron las pruebas de calidad: Pureza microbiológica (%), Viabilidad por tubo germinativo (%), Concentración (células/g de sustrato) y Antagonismo. *Trichoderma harzianum* A-34 incrementó significativamente el conteo de conidios en un 29,87 % sobre aserrín de pino blanco y afrecho cervecero con respecto a *Trichoderma harzianum* 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* A-34.

Palabras clave: plaguicidas; control biológico; agricultura sostenible; fitopatógenos; conidio.

Abstract

*In the new agricultural model's establishment in that Cuba is determined, one of the most urgent tasks is to find roads to reduce the use of synthetic plaguicidas for the handling of plagues. One of these roads is the biological control that, besides reducing the environmental impact in the agricultural activity, it allows to assure the agricultural sustainability. Among the methods of biological control, it is the use of *Trichoderma harzianum* A-34 as fungicide, for their antagonistic activity in front of phytopathogens. It is produced in a handmade way in solid state, static and two-phase liquid (liquidate-solid). In our country the cane trash and the bunch of rice are used for their production. In this work agroindustrial residuals of good readiness and low cost were used in the market; sawdust of white pine and bran brewer, substratums that besides serving themselves from support to the mushroom for their growth, they contribute the necessary nutrients for their appropriate development. These residual ones constitute potential sources of contamination for what their use preserves the integrity of the environment. They were carried out the tests of quality: Purity microbiological (%), Viability for germinative tube (%), Concentration (substratum cells/g) and Antagonism (%). *Trichoderma harzianum* A-34 increased the conidia count significantly in 29,87% it has more than enough sawdust of white pine and bran brewer with regard to *Trichoderma harzianum* A-34 taken place in cane trash enriched with bunch of rice. You conclude that these substratums can be employees as an alternative for the massive production of *Trichoderma harzianum* A-34.*

Keywords: pesticides, biological Control, agricultural sustainability, phytopathogens, conidia.

Fecha de recibido: 28/11/2022

Fecha de aceptado: 19/01/2023

Fecha de publicado: 20/01/2023

Introducción

Hace más de 60 años que se comenzaron a producir y comercializar los plaguicidas de síntesis química esperando encontrar una solución a los problemas existentes en la agricultura, la realidad mostró resultados bien diferentes a los esperados, produciendo el uso intensivo de estos productos un impacto negativo en los ecosistemas, contaminando el agua y afectando a los microorganismos y a la salud humana, constituyendo 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 el impacto ambiental en la actividad agrícola, mediante el uso de agentes biológicos para el control de plagas, que además, permiten asegurar la sostenibilidad agrícola (Vinale, 2014) siendo este método de control una opción complementaria eficiente y económica para el control de enfermedades y plagas agrícolas. Entre los métodos de control biológico se encuentra la utilización de hongos entomopatógenos. Colmenárez y James (2014) plantean que su producción ha sido desarrollada en varios países de América Latina como Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Costa Rica, Cuba, Venezuela entre otros. En los últimos años en Cuba, el uso de plaguicidas biológicos para el control de plagas agrícolas ha tenido gran auge y existen varios productos obtenidos mediante tecnologías nacionales.

En este grupo de hongos se encuentran las especies del género *Trichoderma*, género muy utilizado debido a la gran gamma de usos agrícolas que posee. Valdés (2014), Srivastava et al (2015) sostienen que 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. En Brasil; Rodríguez et al (1999) emplearon bagazo, melaza de caña y compuestos ricos en nitrógeno como urea en la producción de esporas de *Trichoderma harzianum*. García y Riera (2006) en Venezuela utilizaron como sustrato melaza de caña de azúcar y levadura panadera granulada (*Saccharomyces cerevisiae*) para la producción de biomasa de *Trichoderma* en fermentación líquida. En Argentina, Sivila et al (2017) evaluaron la producción artesanal de conidios de una cepa local de *Trichoderma* sobre cinco sustratos (arroz, quinua, amaranto, trigo y avena) obteniendo resultados favorables, Michel et al (2008) evaluaron 15 sustratos orgánicos en la reproducción masiva y viabilidad de conidios de *Trichoderma harzianum* y obtuvieron resultados muy alentadores tanto de producción como de en la germinación de este hongo.

Actualmente en nuestro país para producir este hongo se utiliza como fuente de nitrógeno la cabecilla de arroz, subproducto derivado de la industria arrocera pero debido a la tecnificación del proceso de molinaje de este cereal por la introducción de nuevas tecnologías de procedencia china y vietnamita se ha visto afectada la obtención de este residuo, el cual no está disponible en cantidades suficientes para producir este hongo, además Santiago de Cuba no es una provincia productora de arroz y tiene que transportarse este subproducto encareciéndose el proceso, es por ello que buscando alternativas que faciliten la producción de este hongo este trabajo tiene como objetivo producir *Trichoderma harzianum* A-34 con nuevos sustratos, disponibles en cantidad suficiente y que le aporten los nutrientes necesarios a este hongo para su rápido crecimiento y desarrollo, de esta manera también se minimiza el impacto negativo que acarrearán estos desechos de la industria al medio ambiente.

El carbono es una fuente de energía para los microorganismos y el nitrógeno es un elemento necesario para la síntesis proteica. Una relación adecuada entre estos dos nutrientes, favorecerá un buen crecimiento y reproducción. Los requerimientos nutricionales de este hongo filamentoso son pocos, aunque su crecimiento es favorecido por la materia orgánica, y su humedad y temperatura óptimas de crecimiento. Según plantean García et al (2011) el bagazo de caña aporta 56,68 % de Carbono; el aserrín de pino presenta una relación C-N de 458:3 según Rojas et al (2005), en estudios realizados por Arias et al (2010) señalan que la cabecilla de arroz tiene relación C-N de 106:4 y el Afrecho cervecero 4,6 % de Nitrógeno.

Materiales y métodos

Este estudio se realizó en el Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Santiago de Cuba (LAPROSAV) sito en Carretera de Siboney Km 6 La Redonda. Santiago de Cuba. El microorganismo *Trichoderma harzianum* A-34 procedió del banco de cepas del Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal (LAPROSAV) con una viabilidad de $2,9 \times 10^9$ células/g. Se evaluaron cuatro subproductos; bagazo de caña y aserrín de pino blanco como fuentes carbonadas y cascarilla de arroz y bagazo de malta o afrecho cervecero como fuentes nitrogenadas. El bagazo de caña se tomó del Centro de Reproducción de Entomófagos (CREE) La República de Santiago de Cuba en fecha 6/9/2017; la cabecilla de arroz se tomó del Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal el 5/9/2017; el aserrín de Pino Blanco se tomó del aserrío El Brujo perteneciente a la Empresa Forestal Integral Gran Piedra-Baconao en fecha 8/9/2017 y el bagazo de malta o afrecho cervecero se tomó de la Cervecería Hatuey de Santiago de Cuba en fecha 20/9/2017. Se determinaron las características físico-químicas de los sustratos a utilizar en la UEB Laboratorio de la Empresa Geominera de Oriente perteneciente al Ministerio de Energías y Minas, la reproducción del *Trichoderma harzianum* A-34 se realizó a través de la técnica descrita en la metodología N° 275/2013 del Instituto de Sanidad Vegetal (INISAV), se utilizó un diseño factorial 2^2 , con 4 tratamientos; cada uno de ellos con 4 réplicas para un total de 16 unidades experimentales. Se realizó el control de calidad de este hongo una vez producido mediante las pruebas de Viabilidad (%), Concentración (células $\times 10^9$) y Antagonismo (%). Para el antagonismo se enfrentó *Trichoderma harzianum* A-34 frente al *Fusarium oxysporum*, microorganismo perteneciente al banco de cepas del Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal.

Para el procesamiento de los datos se utilizó una PC y el paquete estadístico Statgraphics XV.

Resultados y discusión

En la figura 1 de efectos principales se observó que en ambos factores; las fuentes carbonadas y las fuentes nitrogenadas la viabilidad fue siempre mayor cuando se utilizaron los sustratos alternativos, es decir, el aserrín de pino blanco como fuente de carbono y el afrecho cervecero como fuente de nitrógeno, que al utilizar bagazo de caña y cabecilla de arroz, además al tener mayor pendiente las fuentes de carbono tienen mayor significación que las fuentes de nitrógeno para la producción de *Trichoderma harzianum* A-34, la mezcla de aserrín de pino y afrecho cervecero aporta un total de 104.23 % de carbono y 4.7% de nitrógeno, según plantean Allori et al (2017) estos nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de los hongos.

García et al (2006) en Venezuela obtuvieron por fermentación sólida en forma artesanal *Trichoderma harzianum*, utilizaron como sustrato arroz entre 5 y 7 % de granos partidos y la viabilidad obtenida fue de 95 %, a diferencia de nuestro trabajo, utilizaron *T. harzianum* formulado en polvo mojable con concentración de 2×10^{12} . En México; Romero et al (2013) valoraron la producción masiva de conidios de *Trichoderma* en 5 sustratos agrícolas; granos de alpiste, de arroz, lentejas, maíz y trigo, fue cuantificado cual fue el mejor sustrato en cuanto a viabilidad y producción de conidios, los mejores resultados se obtuvieron cuando se usó granos de maíz molido con una viabilidad del 99 % seguido de los granos de lenteja con un 98 %, en este caso la concentración de *Trichoderma* se encontró en el orden de 10^4 , a diferencia de nuestro estudio que fue 10^9

Fuente C: -1. Bagazo de caña 1: Aserrín Pino Blanco
Fuente N: -1: Cabecilla de arroz 1: Afrecho cervecero

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

Existe una tendencia al aumento del efecto en el antagonismo (Fig. 2) cuando se utilizan los sustratos aserrín de pino blanco y afrecho cervecero que cuando se utilizan el bagazo de caña y la cabecilla de arroz, sugiriendo esto que el *Trichoderma* producido con aserrín de pino enriquecido con afrecho cervecero como fuente de nitrógeno tuvo una actividad antagonista mayor sobre el *Fusarium oxysporum* que el *Trichoderma* producido sobre bagazo de caña y cabecilla de arroz.

Pérez et al (2017) analizaron el potencial antagonista de 6 cepas de distintas especies de *Trichoderma* y diferentes ensayos in vitro realizados en dos medios de cultivo (PDA y MM). La mayor actividad micoparasitaria se observó en la cepa *T. parareesei* frente a *Fusarium Oxysporum* en PDA, los volátiles producidos en MM por las 6 cepas inhibieron un 50-60 % el crecimiento de *Fusarium oxysporum*. A diferencia de este trabajo se utilizaron cepas diferentes de 2 especies de *Trichoderma*, cultivadas en medios PDA y MM, en este trabajo se utilizó sustratos sólidos no convencionales. Fernández y Suárez (2009) efectuaron el enfrentamiento de 3 cepas de *Trichoderma harzianum* frente a *Fusarium oxysporum* aislado directamente de plantas enfermas de maracuyá mediante cultivo dual, se obtuvo que todos los aislamientos de *Trichoderma* superaron en crecimiento a *F. Oxysporum* con radios de 7.42 cm, mientras que el patógeno mostró un radio de 1.99 cm las cepas de *Trichoderma* expresaron los mejores radios al crecer 4 veces más rápido que *Fusarium oxysporum*.

Según Martínez, et al. (2013) uno de los medios donde se puede encontrar de forma natural *Trichoderma sp.*, en el suelo es en madera, de forma general estos resultados en cuanto al antagonismo se atribuyen a que este hongo presenta una alta especificidad por los sustratos utilizados en este estudio, que le aportan los nutrientes para la formación de las estructuras infectivas, además este hongo es un excelente competidor por nutrientes y espacio.

Fuente C: -1. Bagazo de caña 1: Aserrín Pino Blanco
Fuente N: -1: Cabecilla de arroz 1: Afrecho cervecero

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

Se obtiene mayor concentración de esporas para *Trichoderma* producido con la fuente de carbono aserrín de pino blanco y con la fuente de nitrógeno afrecho cervecero que se proponen como opción alternativa (Figura 3), esto pudo deberse a la mezcla que se realizó de las materias primas, el aserrín es un sustrato rico en carbono, representado aproximadamente por 70% de almidón, según Guyat, et al (2005) aporta 46.50 % de carbono y 0.10 % de nitrógeno y Arias (2010) plantea que el afrecho cervecero aporta 57.73 % de carbono y 4.6 % de nitrógeno, al mezclar estos residuos industriales la relación C/N se eleva, relación esencial para las fermentaciones de hongos, de la cual dependerá la formación de los propágulos deseados. En el caso de los hongos se necesita que la fuente de C esté en exceso en el medio y el contenido de N sea el factor limitante del crecimiento, esto es lo que desencadena el proceso esporulativo, Elósegui (2006).

Resultados similares obtuvieron Agamez et al (2008) cuando evaluaron un aislado nativo del hongo *Trichoderma sp* en 13 sustratos y 2 procesos de fermentación sólida, con semillas de *Artocarpus incisa* y desechos agroindustriales como cascarilla de arroz y algodón. La mejor producción de conidios se registró en el sustrato compuesto por cascarilla de algodón enriquecida con soluciones de melaza y semillas de *Artocarpus incisa* y las más bajas concentraciones se presentaron en la cascarilla de arroz, esto a diferencia de nuestro trabajo donde no se utilizaron fuentes nutritivas para enriquecer los sustratos. En Perú Arévalo et al, (2017) optimizaron la producción de conidios de *Trichoderma*, que fue superior a 1×10^{10} conidios $\cdot g^{-1}$ de sustrato en residuos agrícolas que fueron mezclados con Ñelen, superando estadísticamente al sustrato convencional (arroz entero). Allori et al (2017) obtuvieron mayor concentración de conidios por gramo al décimo día de incubación en los sustratos constituidos por granos de arroz y el conformado por bagazo de caña humedecido con una solución de melaza al 10 %, se utilizaron cepas nativas de *Trichoderma*

afroharzianum. Estos resultados se atribuyen a que en estos estudios los autores enriquecen los sustratos con diferentes fuentes nutritivas y en nuestro trabajo solo se utilizamos cabecilla de arroz y afrecho cervecero como fuentes de nitrógeno.

Fuente C: -1. Bagazo de caña 1: Aserrín Pino Blanco
Fuente N: -1: Cabecilla de arroz 1: Afrecho cervecero

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

En la Figura 4 se observa que la concentración de conidios incrementó significativamente un 29,87 % en el tratamiento 4 donde se utilizaron los sustratos alternativos aserrín de pino blanco como fuente de carbono enriquecido con afrecho cervecero como fuente de nitrógeno con respecto al tratamiento control con bagazo de caña y cabecilla de arroz

Figura 4. Efecto de diferentes sustratos en la viabilidad de *Trichoderma harzianum* A-34

Conclusiones

Hemos llegado a la conclusión con este trabajo que el sustrato propuesto para el crecimiento y desarrollo del *Trichoderma harzianum* A-34, aserrín de pino blanco como fuente de carbono y afrecho cervecero como fuente de nitrógeno, reúnen las condiciones para que este microorganismo pueda desarrollarse por medio de fermentación sólida mejor que con el sustrato control, bagazo de caña y cabecilla de arroz, ya que las variables evaluadas se comportaron mejor con los sustratos alternativos, en el caso de la concentración de conidios (estructura infectiva del *Trichoderma*) hubo un incremento significativo de un 29,87 % por encima del control, por lo que es posible utilizar los residuos de estas industrias que tanto afectan al medio ambiente, para lograr producciones más limpias y asegurar mediante la utilización de este hongo la sostenibilidad agrícola.

Referencias

- Agamez E et al (2008). Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10 (2), 23-24
- Allori S et al., (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
- Arévalo E et al (2017). Optimización de sustratos para la producción de conidios de *Trichoderma harzianum* por fermentación sólida en la Región de San Martín, Perú. *Revista Investigaciones Altoandín*, 19 (2), 135-144.
- Arias T et al., (2010). Caracterización ambiental del combinado industrial Hatuey (I Parte). *Tecnología Química*, 30(3), 53-66
- Colmenárez Y et al., (2014). Control Biológico de Enfermedades de Plantas en América Latina y el Caribe.
- Elósegui O (2006). Métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV).
- Fernández R y Suarez C (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. *Revista Facultad Nacional de Agronomía de Medellín* 62 (1), 4743-4748
- García R et al., (2006). Producción de biomasa de *Trichoderma harzianum* por fermentación líquida. *Fitosanidad*. 10(4), 295-298.
- García R et al., (2006). Desarrollo de un fungicida biológico a base de una cepa del hongo *Trichoderma harzianum* proveniente de la región andina venezolana. *Fitosanidad*, 10 (2), 115-121.
- García T et al., (2011). Uso de cachaza y bagazo de caña de azúcar en la remoción de hidrocarburos en suelo contaminado. *Revista Internacional Contaminación Ambiental*, 27(1), 31-39.
- Guyat M et al., (2005). Producción de energía y biofertilizante a partir del aserrín. *Revista Forestal Baracoa*, 24 (1), 93-97.

- Martínez H et al., (2017). Control biológico de fitopatógenos mediante aislados de *Trichoderma* sp. *Agroproductividad*, 10 (3), 9-14.
- Michel A et al., (2008). Producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en diferentes sustratos orgánicos. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 14 (2), 185-191
- Pérez A et al., (2017). Actividades de biocontrol de *Trichoderma* frente a ascomicetos fitopatógenos. *FarmaJournal*, 2 (1), 85-93.
- Rodríguez J et al., (1999). Production of Spores of *Trichoderma harzianum* on Sugar Cane Molasses and Bagasse Pith in Solid State Fermentation for Biocontrol. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 42(1), 21-25
- Rojas C et al., (2005). Fitotoxicidad de extractos de residuos orgánicos y sus efectos sobre el índice de germinación de rabanito y pepino. *Fitotoxicidad de extractos de residuos orgánicos* 4(2), 61-66
- Romero O et al., (2013). Massive production of Mexican stains of *Trichoderma* spp in different agricultural substrates. *European Journal of Experimental Biology*, 3 (6), 73-79
- Sivila N et al., (2017). Producción artesanal de *Trichoderma* spp. sobre diferentes sustratos y empleo de dos tipos de contenedores. 4° Congreso Argentino de Fitopatología, 19-21 de abril de 2017, Argentina
- Srivastava M et al., (2015). *Trichoderma*: A scientific approach against soil borne pathogens. *African Journal of Microbiology Research*, 9(50), 2377-2384
- Valdés E, (2014). Caracteres principales, ventajas y beneficios agrícolas que aporta el uso de *Trichoderma* como control biológico." *Agroecosistemas*, 2(1), 254-264
- Vinale F et al., (2014). *Trichoderma* Secondary Metabolites Active on Plants and Fungal Pathogens". *The Open Mycology Journal*, 8, 127-139.