

REACTIVACIÓN DEL HONGO BIOCONTROLADOR *Trichoderma harzianum* EN UN MEDIO DE FERMENTACIÓN DE SUSTRATO DE ARROZ (*Oryza sativa*)

Reactivation of the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* in a rice (*Oryza sativa*) substrate fermentation médium

(Artículo de investigación)

Eddy Raúl Quispe Choque¹, José Eduardo Oviedo Farfán²

Resumen

El estudio se centró en evaluar la efectividad de utilizar una fermentación sólida a base de arroz con sustrato sólido para la reproducción y reactivación de *Trichoderma harzianum*, el hongo benéfico utilizado mayormente en el control biológico de enfermedades en las plantas. La preparación del sustrato únicamente arroz y se inoculó con una cepa de *Trichoderma harzianum* y una incubación a temperatura de 22.8 °C. La evaluación se realizó cada semana, inicialmente en la primera semana se observó un crecimiento lento del hongo, sin embargo, al aumentar la concentración de inoculado y también ajustar la temperatura se logró un mejor rendimiento micelial. No obstante, algunos cultivos se contaminaron, lo que afectó los resultados finales. Factores que influyeron en el resultado final, contaminación. La calidad del arroz y la edad del inóculo original fueron factores que influyeron en el éxito de la reproducción. La recomendación se sugiere optimizar las condiciones de cultivo, como el pH del sustrato y la temperatura, para mejorar la eficiencia del proceso.

Palabras clave: *Trichoderma harzianum*, biocontrol, sustrato, fermentación sólida.

Abstract

The study focused on evaluating the effectiveness of using solid-state fermentation based on rice as a solid substrate for the propagation and reactivation of *Trichoderma harzianum*, the beneficial fungus most commonly used in the biological control of plant diseases. The substrate consisted solely of rice and was inoculated with a strain of *Trichoderma harzianum* and incubated at a temperature of 22.8 °C. Evaluations were conducted weekly. Initially, during the first week, slow fungal growth was observed; however, by increasing the inoculum concentration and adjusting the temperature, better mycelial growth was achieved. Nevertheless, some cultures became contaminated, which affected the final results. Factors influencing the final result: contamination. The quality of the rice and the age of the original inoculum were factors that influenced the success of the propagation. It is recommended to optimize cultivation conditions, such as substrate pH and temperature, to improve the efficiency of the process.

Keywords: *Trichoderma harzianum*, biological control, substrate, solid-state fermentation.

INTRODUCCIÓN

Los biocontroladores *Trichoderma* han desarrollado la capacidad de interactuar simultáneamente con plantas y patógenos fúngicos, pueden usarse como microorganismos modelo para estudiar interacciones complejas, existen varios elicitores que estimulan la respuesta inmune de las plantas y el micoparasitismo ocasionado por *Trichoderma*; es decir, la inhibición del crecimiento de un hongo fitopatógeno por otro hongo antagonista” (Andrade-Hoyos, 2023).

El género *Trichoderma* spp. ha llamado la atención de varios investigadores e incluyendo a los agricultores por sus distintas aplicaciones, su capacidad de producir una variedad de metabolitos bioactivos, como enzimas y compuestos antimicrobianos, lo convierten en un agente ideal para el control biológico de enfermedades de plantas y reparación de suelos, además su eficiencia de degradar materia lignocelulósica le da el lugar como un organismo de la biotecnología industrial (Hernández-Melchor et al., 2019).

¹ Estudiante, Carrera de Ingeniería en Producción y Comercialización Agropecuaria, Universidad Mayor de San Andrés, Bolivia. eddy9329@gmail.com

² Docente, Carrera de Ingeniería en Producción y Comercialización Agropecuaria, Universidad Mayor de San Andrés, Bolivia. jeoviedo@umsa.bo.
<https://orcid.org/0000-0002-3921-145X>

Trichoderma siendo un hongo imperfecto que carece de estructuras de reproducción sexual, se encuentra en suelos agrícolas y en ambientes como madera que decae, por su capacidad reproductiva, el crecimiento y propagación de este hongo es notorio en presencia de materia orgánica y humedad, siendo tolerantes a temperaturas extremas, pH y salinidad; la mayoría pertenece a un género de hongos saprofitos, siendo habitantes comunes del suelo (Argumedo-Delira et al., 2009).

Trichoderma harzianum estimula el crecimiento de las plantas porque contiene metabolitos que promueven su crecimiento, ayuda a descomponer la materia orgánica y convierte los nutrientes en formas disponibles para las plantas, por lo que tiene un efecto indirecto en su nutrición, se puede aplicar en el proceso de compostaje o descomposición de materia orgánica para acelerar la maduración de estos materiales, por lo que contendrá una gran cantidad de microorganismos beneficiosos y también realiza la función de esterilización biológica, promueve la propagación de organismos benéficos del suelo, como otros hongos hostiles (Díaz-Medina et al., 2019).

Troya y Vaca (2014) establecieron un protocolo para la reproducción de cepas nativas de *Trichoderma* spp., determina el procedimiento correcto de la preparación de medio de cultivo de *Trichoderma* en laboratorio artesanal usando como sustrato principal el arroz (*Oryza sativa*) en estado sólido, llegando a establecerlo en 13 provincias del Ecuador. Flores et al. (2018) en su estudio de producción de *Trichoderma* spp., en diferentes sustratos, cultivó el hongo en frascos con sustrato de arroz, enfocándose en desarrollar un método sencillo y efectivo para que los agricultores familiares puedan producir su propio biofertilizante a partir del hongo benéfico *Trichoderma harzianum* “se verifico que el sustrato que permitió mayor desarrollo del hongo fue el arroz pre-cocido” este hongo ayuda a controlar enfermedades en las plantas de forma natural, reduciendo la necesidad de pesticidas químicos.

Sivila y Alvarez (2013) en el proyecto SECTER Cod. 08/A129 y proyecto de experimentación adaptativa para la agricultura familiar, realizaron la reproducción de *Trichoderma* spp., en botella e indicaron que la selección del sustrato adecuado para la producción y reproducción de hongos *Trichoderma* spp. es el arroz, con la recomendación de utilizar arroz para reducir costos; cereales de trigo y maíz, quinua y el amaranto, son idóneos por sus nutrientes en el cultivo de *Trichoderma* spp.

La producción de *Trichoderma* se puede llevar a cabo de dos maneras: mediante la fermentación sumergida (en líquido) o mediante la fermentación en estado sólido. Ambos métodos tienen sus ventajas y desventajas, pero los procesos sumergidos son más sencillos de manejar y automatizar, en la mayoría de las fermentaciones líquidas, la concentración del sustrato se sitúa generalmente dentro de un intervalo que va desde un 0.5 % hasta un 6.0 %. Esta concentración específica depende de factores como la densidad del sustrato y las posibles complicaciones reológicas que puedan surgir. (Chávez-García et al., 2008).

Trichoderma reduce impacto ambiental, los fungicidas químicos pueden tener efectos negativos en el medio ambiente, como la contaminación del agua y la eliminación de organismos benéficos. Los *Trichoderma* spp., al ser organismos vivos, son parte del ecosistema del suelo y contribuyen a su equilibrio, donde estos son desarrollados y usados como una herramienta en el desempeño de la agricultura sostenible, debido a su capacidad para combatir una amplia variedad de problemas fitosanitarios, debido a que los hongos *Trichoderma* spp., no son tóxicos el medio ambiente, humanos y animales.

El objetivo de la investigación es realizar la reactivación y multiplicación exponencial de hongo biocontrolador *Trichoderma harzianum* en un medio de fermentación sólido sustrato de (arroz).

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

El trabajo de investigación es realizado en el Laboratorio Bioquímica de la Carrera de Ingeniería en Producción y Comercialización Agropecuaria, dependiente de la Facultad de Agronomía de la Universidad Mayor de San Andrés, Bolivia.

Metodología

Los materiales utilizados se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Materiales utilizados.

Materiales	Cantidad
Cepas de <i>Trichoderma harzianum</i>	10 g
Envases de vidrio	3 unidades
Arroz	350 g
Agua destilada	200 mL
Autoclave	1 unidad
Vasos de plástico	1 unidad
Balanza de precisión	1 unidad
Recipiente	3 unidades
Cucharilla	1 unidad
Olla	1 unidad
Varilla de vidrio	1 unidad
Papel aluminio	1 hoja de 21.59 cm x 35.56 cm
Pipeta	1 unidad

Procedimientos para la reproducción de cepas en estado (solido)

En un recipiente, 375 g el arroz fue lavado para que esté libre de impurezas (Figura 1), es recomendable lavarlo tres veces, posteriormente se realiza la precocción en una olla durante cinco minutos en punto de ebullición. Se lavó los tres frascos, vaso de precipitado, varilla y cucharilla con agua y jabón. Después de que el arroz esté lavado y libre de impurezas, se lo escurre en un recipiente/bañador.



Figura 1. Arroz lavado y escurrido.

Proceso de esterilización (autoclavado)

Se puso agua en la autoclave con 15 cm de altura, se elaboraron tapas de aluminio para los frascos; se introdujeron los frascos tapados con aluminio, la varilla, el vaso de precipitado, la cucharilla y jeringa, en la base del autoclave para esterilizarlos.



Figura 2. Autoclave y esterilización de materiales.

El autoclave es cerrado, así como su válvula y disponerlo a fuego alto, se esperó a que la presión aumente y el manómetro marque 15 psi o 121 °C por 15 min. Una vez finalizando la esterilización se enfría el autoclave, cuidando de no sacar todo el vapor para que el manómetro no llegue a 0 °C, ya que tiende a comprimirse el autoclave; posterior se sacó con cuidado los materiales esterilizados.



Figura 3. Autoclave cerrado y enfriado.

Preparación del arroz y siembra de matríces

Una vez extraído los materiales esterilizados, se esperó a que se enfríen. El sustrato (arroz) fue pesado (125 g) y dispuesto para cada frasco, tapándolo con aluminio.

Inoculación de *Trichoderma harzianum* en el frasco con sustrato

Trichoderma harzianum (para su reactivación) fue proveniente de Santa Cruz, (hongo proporcionado por el Ing.M.Sc José Eduardo Oviedo Farfán). En la balanza, tarar el vaso de precipitado y pesar 2 g de *Trichoderma harzianum*, posteriormente se diluyó 2 g de *Trichoderma* en 100 mL en agua destilada. Se diluyó 50 mL hasta que este homogenizada en el vaso de precipitado. Luego se agregó el restante 50 mL, completando los 100 mL de agua destilada, homogenizando con la varilla de vidrio. El inoculado fue realizado en una cámara de flujo laminar. Posterior, en una jeringa se puso 20 mL del *Trichoderma* diluido, esto para distribuir la solución diluida en el sustrato primero 10 mL y luego otros 10 mL, completando 20 mL de *Trichoderma* diluido.



Figura 4. Dilución de *Trichoderma harzianum* y jeringa con 20 mL de *Trichoderma*.

Se desinfectó el mechero, y se inoculó el sustrato con la solución (*Trichoderma* diluida) primero 10 mL y luego otros 10 mL, distribuyendo para que la solución llegue a todo en sustrato. Posterior, el frasco fue sellado con su tapa de aluminio. El procedimiento fue el mismo para los tres frascos; donde para cada frasco se tuvo 125 g de arroz con 2 g de *Trichoderma* spp. diluido y agitado hasta que se homogeneizó enérgicamente la mezcla.



Figura 5. Desinfección, sellado de frascos y homogenización de la mezcla.

Almacenamiento de los frascos

Los frascos fueron puestos en la cámara de incubación con una temperatura de 20.6 °C.



Figura 6. Cámara de incubación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dinámica de crecimiento y colonización (semanas 1 a 3)

Durante la primera semana de evaluación (día 6), las tres unidades experimentales (P-1, P-2 y P-3), compuestas por 125 g de sustrato de arroz inoculado con 2 g de *Trichoderma* spp. diluido, no evidenciaron signos macroscópicos de colonización miceliar.

A la segunda semana, se constató un inicio de desarrollo incipiente con trazas de micelio en los frascos P-1 y P-3. Sin embargo, en el frasco P-2 el crecimiento se detuvo de manera prematura, lo cual se atribuyó a la aparición de contaminaciones incipientes en el medio. Hacia la tercera semana, las muestras se mantuvieron estacionarias, sin presentar aumentos significativos en la densidad de cobertura sobre el grano de arroz.

Reinoculación y evaluación a la cuarta semana

Ante la lentitud del proceso observada en el período previo, al inicio de la semana cuatro se procedió a reajustar los parámetros ambientales y a incrementar la carga inoculante. Se preparó una suspensión de 8 g de *Trichoderma harzianum* en 50 ml de agua destilada, dosificando 10 ml de dicho inóculo por frasco, y se estabilizó la temperatura de la cámara de incubación en 22.8 °C. La evaluación posterior a este ajuste mostró comportamientos diferenciados en las unidades:

Primer frasco (P-1): se evidenció un progreso gradual en la colonización del sustrato arrocero, requiriendo continuidad en el monitoreo para alcanzar la cobertura total del medio.

Segundo frasco (P-2): el frasco sufrió un proceso severo de contaminación microbiana exógena, provocando la degradación física del grano y la pérdida total de la estructura del sustrato (formación de masa putrefacta).

Tercer frasco (P-3): presentó una tasa de desarrollo acorde a los parámetros esperados de colonización sobre el grano, aconsejando un seguimiento continuo para consolidar el ciclo.



Figura 15. Muestra del frasco 2.

Evaluación final en la quinta semana

En la quinta semana de seguimiento, tanto P-1 como P-3 experimentaron un cese definitivo del desarrollo y posterior inviabilidad del hongo, igualando el cuadro de pérdida total observado en P-2. El análisis multicausal de este resultado sugiere que la falla en el proceso de reactivación no responde a un único factor, sino a la convergencia de variables críticas:

Viabilidad del inóculo: el factor determinante en la merma del potencial biológico radica en la longevidad del material genético empleado. Los lotes de *Trichoderma harzianum*, originarios de la región de Santa Cruz, superaban ampliamente su período de vida útil óptimo (con fecha de caducidad datada en 2014). A pesar de antecedentes previos de reactivación exitosa con cepas de este mismo origen, la senectud prolongada del propágulo redujo drásticamente su capacidad germinativa y su vigor competitivo frente a contaminantes.

Condiciones fisicoquímicas y de sustrato: se identifican como variables influyentes el pH del medio (el cual debe mantenerse en un rango óptimo de 6.5 a 7.8), las fluctuaciones en la humedad relativa interna del frasco y la calidad nutricional o presencia de impurezas en el grano de arroz comercial utilizado.

CONCLUSIONES

La reproducción de *Trichoderma* spp. mediante fermentación sólida utilizando arroz (*Oryza sativa*) como sustrato ha demostrado ser un método efectivo, respaldado por un protocolo de multiplicación adecuado. Sin embargo, para optimizar los ensayos futuros y evitar la pérdida de viabilidad o la contaminación de los cultivos, es fundamental implementar un monitoreo más riguroso y constante de las variables ambientales y fisicoquímicas, prestando especial atención al control estricto del pH del sustrato, ya que un valor inadecuado puede inhibir directamente el desarrollo del hongo. Asimismo, se concluye que resulta indispensable verificar de manera rigurosa la vigencia y la fecha de caducidad del material biológico antes de iniciar cualquier proceso de reactivación, garantizando así la calidad y viabilidad del inóculo para asegurar los resultados esperados.

BIBLIOGRAFÍA

- Andrade-Hoyos, P., Rivera-Jiménez, M. N., Landero-Valenzuela, N., Silva-Rojas, H. V., Martínez-Salgado, S. J., & Romero-Arenas, O. (2023). Beneficios ecológicos y biológicos del hongo cosmopolita *Trichoderma* spp. En la agricultura: una perspectiva en el campo mexicano. *Revista Argentina de Microbiología*, 55(4), 366-377. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2023.06.005>
- Argumedo-Delira, R., Alarcon, A., Ferrera-Cerrato, R., & Peña-Cabriales, J. J. (2009). El género fúngico *Trichoderma* y su relación con los contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 25(4), 257-269. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992009000400006

- Chávez-García, M., Montaña-Lara, J. S., Martínez-Salgado, M. M., Mercado-Reyes, M., Rodríguez, M. X., & Quevedo-Hidalgo, B. (2008). Efecto del sustrato y la exposición a la luz en la producción de una cepa de *Trichoderma* sp. *Universitas Scientiarum*, 13(3), 245-251. <https://www.redalyc.org/pdf/499/49913014003.pdf>
- Flores, E., Huanca, G., Onofre, X., Jiménez, P., Torrez, M., Guarachi, H., Condori, X., Mamani, Y., Misto, N., Alfaro, N., Choque, R., Cruz, A., Cruz, D., & Fernández Chávez, C. M. (2022). Producción de *Trichoderma* spp, en diferentes sustratos: Flores E; Huanca G; Onofre X; Jiménez P; Torrez M; Guarachi H; Condori X; Mamani Y; Misto N; Alfaro N; Choque R; Cruz A; Cruz D. y Celia M. Fernández Chávez. *Revista Estudiantil AGRO-VET*, 2(2), 220–224. Recuperado a partir de <https://agrovet.umsa.bo/index.php/AGV/article/view/96>
- Hernández-Melchor, D. J., Ferrera-Cerrato, R., & Alarcón, A. (2019). *Trichoderma*: importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 35(1), 98-112. <http://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902019005000205>
- Troya, C., & Vaca, L. (2014). Protocolo para la reproducción de cepas nativas de *Trichoderma* spp. en laboratorios artesanales. Proyecto de innovación tecnológica participativa y productiva agrícola PITPPA. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca Ecuador. <https://www.agricultura.gob.ec/wp-content/uploads/2016/01/MANUAL-labos-para-web.pdf>