Effect of aeration, temperature and carrot substrate on the production of *Trichoderma sp*. in a solid-state bioreactor

Helí Miranda-Chávez[1], Angélica Miranda-Jara[2], Pedro Arteaga-Llacza[2], Félix Carbajal-Gutiérrez[3], César Herbozo-y Romero[3], Alberto Palacios-Miñano[5], Henry Obregón-Tinoco[5]

[1]Universidad Nacional de Trujillo, hmirandch@gmail.com
[2] Universidad Nacional Federico Villarreal, amiranda@unfv.edu.pe, parteaga@unfv.edu.pe
[3] Universidad Nacional de Ingeniería, felix.carbajal.g@uni.edu.pe, cherbozo@uni.edu.pe
[4] Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, alberto.palacios@upc.pe
[5] Pontificia Universidad Católica del Perú, hobregon@pucp.edu.pe

Abstract– ***The effect of aeration, temperature and substrate for the maximum production of conidia of Trichoderma sp. was investigated. through solid state fermentation. A Box-Behnken design was used, with three independent variables: aeration (0, 1 and 2 VVM); temperature (22, 27 and 32°C); carrot zest substrate (0.3, 0.6 and 0.9 g.cm^{-2}), which was spread on the beds of a modified stack-type bioreactor; and inoculum extracted from Trichoderma sp., with a conidia suspension of 10 x 10^{8}.mL^{-1} for each bed of the bioreactor. Experiments were incubated for up to seven days under white fluorescent light. The average of the highest production values was used as the conidia production value for each experiment, which was repeated in three identical bioreactors. A computational analysis of the production values of each experiment was performed. Ideal conditions of 2 VVM of aeration, 22 °C temperature and 0.72 g.cm^{-2} of substrate were established to achieve a maximum production of conidia of 4,357 x 10^{9} per gram of substrate; In addition, statistically significant effects were identified at both the main and interactive levels on conidial production.***

Keywords- Solid-state fermentation, conidium, Daucus carota, Box-Behnken.

Efecto de la aireación, temperatura y sustrato zanahoria en la producción de *Trichoderma sp*. en biorreactor de estado sólido

Helí Miranda-Chávez[1], Angélica Miranda-Jara[2], Pedro Arteaga-Llacza[2], Félix Carbajal-Gutiérrez[3], César Herbozo-y Romero[3], Alberto Palacios-Miñano[5], Henry Obregón-Tinoco[5]

[1]Universidad Nacional de Trujillo, hmirandch@gmail.com
[2] Universidad Nacional Federico Villarreal, amiranda@unfv.edu.pe, parteaga@unfv.edu.pe
[3] Universidad Nacional de Ingeniería, felix.carbajal.g@uni.edu.pe, cherbozo@uni.edu.pe
[4] Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, alberto.palacios@upc.pe
[5] Pontificia Universidad Católica del Perú, hobregon@pucp.edu.pe

Resumen*– Se investigó el efecto de la aireación, temperatura y sustrato para la producción máxima de conidios de Trichoderma sp. mediante fermentación en estado sólido. Se utilizó un diseño Box-Behnken, con tres variables independientes: aireación (0, 1 y 2 VVM); temperatura (22, 27 y 32°C); sustrato de ralladura de zanahoria (0,3, 0,6 y 0,9 g.cm^{-2}), que se esparció en las camas de un biorreactor modificado tipo pila de discos; e inóculos extraídos del Trichoderma sp., con una suspensión de conidios de 10 x 10^{8}/mL por cada cama del biorreactor. Los experimentos se incubaron durante un máximo de siete días con luz blanca fluorescente. El promedio de los valores más altos de producción se utilizó como valor de producción de conidios para cada experimento, que se repitió en tres biorreactores idénticos. Se realizó un análisis computacional de los valores de producción de cada experimento. Se establecieron condiciones ideales de 2 VVM de aireación, 22 °C de temperatura y 0.72 g.cm^{-2} de sustrato para conseguir una producción máxima de conidios de 4.357 x 10^{9} por gramo de sustrato; además, se identificaron efectos significativos estadísticamente tanto a nivel principal como interactivo sobre la producción de conidios.

Palabras clave—Fermentación en estado sólido, conidio, Daucus carota, Box-Behnken.

I. Introducción

La problemática del uso de fungicidas para controlar los hongos fitopatógenos, que incluye la resistencia a los fungicidas [1,2] la polución ambiental y el daño a la salud pública [3], así como su alto costo [4] ha incentivado la indagación de métodos eficaces y no dañinos para luchar contra los hongos fitopatógenos. Se sabe que el uso de microorganismos fúngicos antagónicos competitivos, también conocidos como fungicidas biológicos o agentes de biocontrol, es una posible solución para este problema. Un ejemplo de esto son las especies del género Trichoderma, las cuales han sido objeto de un considerable interés por su función como agentes de biocontrol [5] y no representan una amenaza para los seres humanos ni los animales ni para las plantas.

En varios países, como Estados Unidos, Japón, Alemania, Israel y Cuba, se emplea el Trichoderma para luchar contra distintas especies fúngicas de los géneros Rhizoctonia, Pythium, Botrytis, Fusarium y Sclerotium [5]. Estas especies son responsables de provocar enfermedades en cultivos de relevancia económica.

Las colonias de los Trichoderma son reconocibles por su rápido crecimiento y la producción de grupos de filamentos esporulantes (conidióforos) que se agrupan en color blanco, verde o amarillo. Los conidióforos producen ramificaciones laterales cortas (fiálides) que lucen como un verticilo, sobre las cuales se generan sucesivamente desde los extremos esporas unicelulares (conidios) que forman pequeñas masas húmedas [6]. Este género incluye diversas especies, como: *T. koningii*, *T. hamatum*, *T. viride*, *T. polysporum*, *T. harzianum* y *T. polyspermun* [7].

El hongo Trichoderma puede desarrollar en diversos medios de cultivo artificiales como: en Agar Sabouraud Dextrosa (que contiene: peptona, 10 g; dextrosa, 40 g; agar-agar, 15 g; agua destilada, 1 L),en Agar Czapec (compuesto por: sulfato de magnesio, 0,5 g; cloruro de potasio, 0,5 g; fosfato dipotásico, 1 g; sulfato ferroso, 0,01 g; nitrato de sodio, 2 g; sacarosa, 30 g ; agar-agar, 15 g ; agua destilada 1 L) ,y en otros medios como en Agar Papa Dextrosa, Agar Juice V-8, Agar Extracto de Levadura, Agar Malta, Agar de Extractos Vegetales los cuales son vertidos en las placas Petri en una cantidad aproximada por área de superficie de la placa de 0,2 mLcm^{-2} [8].

Este hongo también se desarrolla en medios de cultivo naturales, que están compuestos por partes vegetales, las cuales pueden ser simplemente hojas y tallos o partes suculentas como raíces, frutas, tubérculos, etc., enteras o en pedazos dependiendo de lo que se necesite [9]. Por eso, usar zanahoria (la raíz comestible del *Daucus carota*) como medio de cultivo para Trichoderma representa una opción atractiva, especialmente si tomamos en cuenta que está disponible durante todo el año y suele tener un precio bajo.

En lo que respecta a la zanahoria, no se han hallado informes publicados en relación con ella como medio de cultivo.

La zanahoria tiene: agua (88,2%), carbohidratos (9,7%), proteínas (1,1%), sodio (47 mg.100 g^{-1}), calcio (37 mg.100 g^{-1}), fósforo (36 mg.100 g^{-1}), hierro (0,7 mg.100 g^{-1}) y potasio (341

mg.100 g^{-1}). Ácido ascórbico (0.8 mg.100 g^{-1}) y A (11000 Ul.100 g^{-1}). Algunos componentes adicionales, como el niacina (0,1-3 mg.100 g^{-1}), el ácido nicotínico (0,56 – 11 mg.100 g^{-1}), la tiamina (56 – 101 µg.100 g^{-1}) y la riboflavina (50 – 90 µg.100 g^{-1}), se incluyen en otros análisis. Zinc (0,2 mg.100 g^{-1}), vitamina E (0,5 mg.100 g^{-1}), fibra (3 g.100 g^{-1}) y calorías (43 kcal.100 g^{-1}) [10].

El Trichoderma para su desarrollo y esporulación necesita de valores adecuados de aireación, humedad, luz, temperatura y pH, además de determinados medios de cultivo o substratos y un período suficiente de incubación [11].

Entre los parámetros o condiciones con las que se ha trabajado para generar sus conidios, se encuentran: aireación de 0.1 a 10 VVM para volúmenes de medio líquido de cultivo entre 50 y 100L; humedad alta en medio líquido o baja en medio sólido; luz continua, ya sea fluorescente o incandescente, o luz solar para un reactor transparente; temperatura de: 20°C, entre 25 y 30°C, o la del ambiente; pH entre 5.8 y 7; medio con fuente carbonada (polisacáridos, oligosacáridos y hexosas simples), fuente de nitrógeno, MgSO4, FeCl2, MnSO4, ZnSO4 y KCI; y duración de: uno cinco días, dos días y media semana, seis días y siete días [12–14].

La producción a gran escala de conidios de Trichoderma puede llevarse a cabo en bioprocesos que se fundamentan en técnicas bifásicas, incluyendo los métodos líquido-líquido y líquido-sólido, así como en métodos sobre soporte sólido. El último es el más frecuente y prioriza como sustrato los residuos agrícolas o de la industria azucarera que son más abundantes en la zona. Permite obtener un producto que puede ser almacenado a temperatura ambiente durante 3 a 4 semanas, lo cual no ocurre con los bioproductos obtenidos mediante métodos líquidos, y produce una concentración de conidios por gramo del sustrato de 2-3 x 10^9, que es mayor en comparación con lo obtenido en los métodos líquidos (de 2 a 3 x 10^8 o de 5 x 10^8 conidios por mL del medio [15].

Por lo tanto, el procedimiento que emplea un soporte sólido como substrato, también conocido como bioproceso de estado o substrato sólido, es el más adecuado para la producción masiva de conidios [16]. Sin embargo, es esencial determinar las condiciones bajo las cuales se debe operar en este tipo de bioproceso, así como en cualquier otro. Estas condiciones pueden incluir factores como el tipo y la concentración del substrato, la aireación y la temperatura, entre otros componentes [17].

El proceso en sustrato sólido utiliza un medio sólido que contiene entre el 10 y el 85 % de agua, el agua libre está prácticamente ausente y suele propiciar el desarrollo de hongos filamentosos como Trichoderma. El riesgo de contaminación se ve disminuido por la baja cantidad de agua; las condiciones para el crecimiento fúngico son parecidas a las que se encuentran en los hábitats naturales de los hongos; la inversión de capital es reducida; todos los tipos de propágulos crecen, lo que permite que las esporas tengan la capacidad de transformarse y multiplicarse con facilidad en la superficie del sustrato sólido; y el medio utilizado suele ser sencillo y económico [18].

El biorreactor puede ser diseñado de diferentes maneras, aunque en un proceso con substrato sólido, el diseño del biorreactor puede ser de pila de discos, donde la fermentación ocurre sobre camas fijas; o bien de niebla; lecho empacado; lecho sólido fluidizado con aire; o cilindro rotatorio. teniendo en cuenta para ello diversos elementos o factores: 1) cómo se logra la mezcla requerida del substrato sólido, 2) el grado de aireación necesario, 3) el índice requerido de calor, 4) la medición y control de las variables del proceso, 5) el tipo y características del substrato, 6) la esterilización,7) el modo de operación del biorreactor, 8) los criterios de escalamiento que se utilizarán, y 9) el capital y gastos de explotación [19].

En este trabajo, se consideró la importancia de la producción de conidios de Trichoderma, su variación en las cantidades producidas según los parámetros a los que está expuesto y la falta de informes sobre cómo optimizar las condiciones para maximizar la producción de conidios. Con esto en mente, se establecieron como metas: analizar el impacto de la aireación (0, 1, 2 VVM) y la temperatura (22, 27, 32 °C) y substrato de zanahoria (0,3, 0,6 y 0,9 g.cm^{-2}) en la producción de conidios de *Trichoderma sp*. para establecer las condiciones ideales de estas variables que permitan una producción máxima de conidios.

II. Materiales y métodos

A. *Cultivo fúngico y sustrato*

Se empleó un cultivo de *Trichoderma sp*. en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional de Trujillo – Perú. El cultivo fue repicado en agar papa sacarosa. Como sustrato para el biorreactor se utilizó la raíz comestible de *Daucus carota* obtenida del Mercado Mayorista de la ciudad de Trujillo de una edad máxima de 1 semana de post-cosecha y con un tamaño que osciló de 0.10 a 0.17 m.

B. *Procedimiento experimental*

El estudio se realizó según el Diseño Box Behnken con 3 factores y 15 corridas. Se consideraron los siguientes factores: Aireación (A), Temperatura (T) y Substrato (S) y como variable de respuesta a la producción de conidios de *Trichoderma sp*. (Tabla 1).

TABLA I
Diseño experimental Box-Benhken

N°	Aireación (vvm)	Temperatura (°C)	Sustrato (g.cm^{-2})	Conidios (unidad. g^{-1})
1	0	22	0.6	2.58
2	2	22	0.6	4.74
3	0	32	0.6	2.24
4	2	32	0.6	3.54
5	0	27	0.3	3.83
6	2	27	0.3	2.02
7	0	27	0.9	1.67
8	2	27	0.9	1.71

9	1	22	0.3	3.49
10	1	32	0.3	1.73
11	1	22	0.9	3
12	1	32	0.9	1.13
13	1	27	0.6	1.67
14	1	27	0.6	1.02
15	1	27	0.6	1.74

C. Preparación de inóculo de Trichoderma sp.

Se preparó en 5 mL de agua destilada una suspensión del micelio esporulado del *Trichoderma sp*., se agitó fuertemente la suspensión anterior y se usó 0,1 mL para cada experimento, sobre la superficie del medio agar papa sacarosa. Se incubó a 22 °C por 5 días hasta esporulación, en presencia de luz permanente proveniente de un fluorescente de 22 watts de potencia nominal. Se cosecharon las esporas con 5 mL de agua destilada estéril. Se humedecieron 30 perlas de vidrio de 4 mm de diámetro en promedio con movimientos de rotación a la placa hasta obtener una suspensión densa de color verde. La suspensión obtenida se vertió a un frasco de boca ancha de 200 mL de capacidad y se diluyó 1/10 en agua destilada estéril. Con 0,5 mL de esta solución se realizó el conteo de los conidios, empleando una cámara Neubauer y microscopio binocular doble lámpara (CX23 Led, Olympus, Japón). A partir del conteo se diluyó la suspensión de conidios con agua destilada estéril hasta alcanzar 1.0 x10^6 conidios por mL. Esta suspensión fue distribuida en volúmenes de 1 mL en frascos estériles. Cada frasco con 1 mL de suspensión de conidios conteniendo una concentración de 1.0 x 10^6

conidios por mL constituyó el inóculo para cada cama del biorreactor que se utilizó en cada experimento. Las zanahorias se lavaron con agua potable y se secaron inmediatamente con papel toalla. Luego, fueron rayadas totalmente utilizando un rayador rectangular de acero inoxidable que permitió obtener tamaños de partículas en promedio de 14 x 1.5 x 0,6 mm. La rayadura de zanahoria constituyó el sustrato para el biorreactor, los cuales presentaron un pH promedio de 5.65 ± 0.84 y un contenido promedio de agua de 89.90 ± 1.56 % en peso.

El biorreactor conteniendo el sustrato se esterilizó en autoclave a 121 °C y a 15 psi durante 15 minutos.

Se sembró el inóculo utilizando un rociador manual, el inóculo de 1 mL de 1.0 x 10^6 conidios/mL de *Trichoderma sp*. bajo condiciones estériles.

Para controlar la temperatura se introdujo el biorreactor en una estufa (UF55, Memmert, Alemania), con su interior iluminado de manera permanente con luz blanca flourescente; y luego se le conectó a una bomba de pecera (Elite 801, Hagen, Canadá) para inyectar un flujo de aire de 1600 cm^3/min, considerando los vvm según el diseño experimental. La bomba contaba con un sistema de purificación de aire, constituido por un frasco que contuvo 200 mL de agua con NaCl 23%. El sistema fermentativo se repitió en tres biorreactores iguales para cada experimento. Se esperó una semana desde la instalación del biorreactor para realizar las mediciones de producción de conidios.

D. *Medición de la variable de respuesta*

Se tomaron dos muestras por muestreo de cada cama del biorreactor en un experimento. Los muestreos se realizaron en condiciones estériles, hasta un tiempo máximo de 7 días. Las dos muestras de cada cama juntas fueron depositadas en frascos de penicilina con 5 mL de agua destilada. Los frascos luego fueron agitados intensamente para lograr el desprendimiento total de los conidios y el posterior conteo. Se cuantificaron el número de conidios, de cada frasco, empleando una pipeta Pasteur, la cámara de Neubauer, y el microscopio con objetivo de 40x. El valor del número de conidios para cada conteo fue luego multiplicado por cinco, dividido entre dos, y entre el valor del nivel de substrato del respectivo experimento que se estuvo realizando, para que el conteo de conidios se expresara en número de conidios por gramo de sustrato. El valor de este conteo correspondió a un solo muestreo de una sola cama del biorreactor.

I. Análisis estadístico

Se aplicó estadística inferencial, para estimar la normalidad y la homogeneidad de varianzas, así como el análisis de varianza para un diseño Box - Behnken usando el software Minitab en versión de prueba. Se consideró en la Ecuación Polinómica base del Diseño de Box – Behnken [20]:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 \ldots (1)$$

Se determinaron los coeficientes de regresión del Modelo Matemático de la Ecuación Polinomial Cuadrática General utilizando los valores de producción de conidios por gramo de substrato de los 15 experimentos establecidos en el Diseño de Box Behnken con sus respectivos valores de las variables aireación, temperatura, y sustrato (Tabla 1). Los valores de los coeficientes de regresión determinados (Tabla 2) permitió establecer las condiciones óptimas del proceso.

II. Resultados

En la Tabla II se muestra un valor de p de 0.349 que indica que, bajo un polinomio de segundo orden completo con todas las interacciones, la cantidad de ruido experimental o variación no explicada es relativamente alta en comparación con el efecto de las variables principales dentro del rango estudiado. Por otro lado, el R^2 es alto para un modelo con 3 variables (R2 = 72.64%). En adición, al ser mayor a 0.05 (p > 0.05), la falta de ajuste es no significativa. Esto es un excelente indicador técnico. Significa que, a pesar de que los efectos de las variables no son masivos, el modelo matemático lineal-cuadrático no está omitiendo ningún término estructural mayor (como una interacción de orden superior) y describe adecuadamente la tendencia de tus datos experimentales sin sesgarlos [20]. Si se observan los valores p individuales de cada término, se puede

identificar cuáles tienen mayor peso o tendencia sobre la esporulación del *Trichoderma sp*. La Temperatura (T) en su término lineal (p = 0.113) y su término cuadrático T^2 (p = 0.124) son los que muestran mayor cercanía a la significancia estadística. Esto sugiere fuertemente que la temperatura ejerce el control principal sobre la cinética de crecimiento y posterior conidiogénesis del hongo dentro de los límites que se fijaron [21]. En cuanto a la aireación, su término cuadrático (p = 0.134) tiene más peso que el lineal (p = 0.557). Esto suele indicar una tendencia a la curvatura; es decir, que la aireación óptima podría estar localizada cerca del centro del rango experimental y que valores muy bajos o altos tienden a desfavorecer la producción. Por otro lado, el sustrato en su término lineal (p = 0.243) y su interacción con la aireación (p = 0.375) muestran efectos moderados, mientras que su término cuadrático (p = 0.918) no tiene impacto, sugiriendo un comportamiento más bien lineal de esta variable en la respuesta.

TABLA II
ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL DISEÑO BOX-BENHKEN

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Model	9	11.9951	1.33278	1.47	0.349
VVM (A)	1	0.357	0.35701	0.4	0.557
Temperatura (T)	1	3.3411	3.34111	3.7	0.113
Sustrato (S)	1	1.5842	1.5842	1.75	0.243
A^2	1	2.8865	2.88646	3.19	0.134
T^2	1	3.0857	3.08566	3.41	0.124
S^2	1	0.0105	0.0105	0.01	0.918
A*T	1	0.1849	0.1849	0.2	0.67
A*S	1	0.8556	0.85562	0.95	0.375
T*S	1	0.003	0.00302	0	0.956
Error	5	4.5184	0.90369		
Falta de ajuste	3	4.2032	1.40106	8.89	0.103
Error puro	2	0.3153	0.15763		
Total	14	16.5135			

GL: Grados de libertad, SC: Suma de cuadrados, CM: Cuadrados medios, F: valor F y P: valor p.
R2: 72.64%

El modelo matemático postulado es adecuado y estadísticamente válido (Fig. 1), dado que los residuos satisfacen satisfactoriamente los tres supuestos fundamentales de la regresión y el análisis de varianza: normalidad, varianza constante e independencia. No se necesita aplicar ninguna transformación matemática (como el logaritmo o la raíz cuadrada) a los datos de conidios [20].

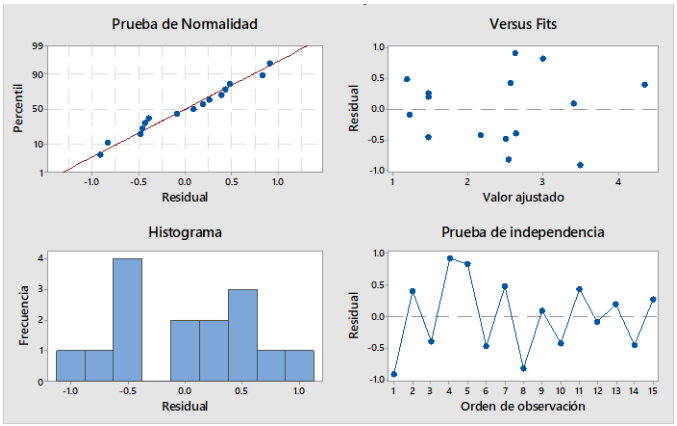


Fig. 1. Gráfica de residuos para producción de conidios

Los efectos lineales negativos en T (-0.646) y S (-0.445), confirman matemáticamente lo que se vio en los efectos principales; a nivel general, un aumento en la temperatura o en el sustrato reduce la producción media de los conidios. Los efectos cuadráticos positivos en A^2 (+0.884) y T2 (+0.914), indican que las parábolas que se abren hacia arriba en forma de "U". Nótese que, para todos los términos, el FIV se encuentra entre 1.0 o 4.0 [20]. En estadística, esto significa que no existe multicolinealidad (correlación) entre las variables independientes. Esta es la enorme ventaja técnica de haber elegido un diseño Box-Behnken, que, al ser un diseño ortogonal, garantiza que el efecto de la temperatura no se confunda con el del sustrato o la aireación. Esto le da una solidez metodológica a esta investigación. Esto valida por qué el optimizador migrará hacia los extremos del diseño para encontrar la producción máxima. En cuanto, a la interacción positiva A*S (+0.925), es el coeficiente más alto de las interacciones y cuantifica matemáticamente el sinergismo que se descubrió entre la aireación alta que compensa y rescata la producción de conidios cuando se trabaja con concentraciones elevadas de sustrato.

TABLA III
COEFICIENTES PARA EL MODELO CUADRÁTICO

Términos	Efecto	Coeficiente	SE	T	P	FIV
Constante		1.477	0.549	2.69	0.043	
A	0.423	0.211	0.336	0.63	0.557	1
T	-1.293	-0.646	0.336	-1.92	0.113	1
S	-0.89	-0.445	0.336	-1.32	0.243	1
A2	1.768	0.884	0.495	1.79	0.134	1.01
T2	1.828	0.914	0.495	1.85	0.124	1.01
S2	-0.107	-0.053	0.495	-0.11	0.918	1.01
A*T	-0.43	-0.215	0.475	-0.45	0.67	1
A*S	0.925	0.462	0.475	0.97	0.375	1
T*S	-0.055	-0.027	0.475	-0.06	0.956	1

SE: error estándar, T: valor t-student, p: valor p, A: aireación, T: temperatura, S: sustrato, FIV: factor de inflación de la varianza.

Ecuación de regresión en unidades sin codificar:
Conídios = 32.4 - 1.32 A - 2.05 T - 1.8 S + 0.884 A^2 + 0.0366 T^2 - 0.59 S^2 - 0.0430 A*T + 1.54 A*S - 0.018 T*S

La gráfica de efectos principales (Fig. 2) revela que la aireación muestra una curvatura de tipo cóncava (forma de "U"). El rendimiento cae al pasar de 0 a aproximadamente 1 (donde alcanza un mínimo de cerca de 1.5 x 10^9 conidios), pero luego sube de manera muy pronunciada al aumentar hacia 2 VVM, superando una media de 2.5 x 10^9 conidios. Esto justifica por qué su término cuadrático tenía tanto peso en el ANVA (Tabla II). Sugiere un comportamiento bifásico. En procesos de fermentación de *Trichoderma sp.*, niveles muy bajos de aireación pueden inducir un estrés metabólico que a veces activas rutas alternativas de esporulación, pero el verdadero potencial productivo se dispara cuando el hongo cuenta con una alta disponibilidad de oxígeno (2 VVM), estimulando un metabolismo aeróbico vigoroso enfocado en la conidiogénesis [22]. En cuanto a la temperatura se observa una caída drástica en la producción desde los 22°C (donde alcanza el punto más alto de toda la gráfica, aproximadamente los 3.0 x 10^9 conidios) hasta llegar a un mínimo cerca de los 29 °C. A partir de ahí, muestra una ligera tendencia a subir al acercarse a los 32 °C. Esto confirma que la temperatura es un factor crítico de control (tal como sugerían sus bajos valores p). El hongo prefiere ambientes notablemente más frescos dentro del rango evaluado para la producción de esporas. Las temperaturas cercanas a 22 °C favorecen notablemente la acumulación de biomasa reproductiva, mientras que temperaturas moderadas-altas (26 a 30 °C) deprimen severamente la conidiogénesis de esta cepa en particular [23]. En adición, la concentración de sustrato muestra una tendencia prácticamente lineal decreciente. A menor concentración de sustrato (cerca de 0.3), la producción es óptima (alrededor de 1.8 x 10^9 conidios), y decae linealmente conforme el sustrato sube hacia 0.9, bajando hasta un mínimo de 1.0 x 10^9. Esto explica por qué su término cuadrático tenía un valor p de 0.918 (ninguna curvatura). Desde el punto de vista biológico, esto es un claro indicio de inhibición por sustrato o represión catabólica. Al añadir demasiado sustrato, se incrementa la presión osmótica en el medio o se satura metabólicamente al hongo con fuentes de carbono/nitrógeno de fácil asimilación, lo que hace que prefiera seguir creciendo vegetativamente (micelio) en lugar de estresarse para formar conidios [24,25]. El hongo necesita un agotamiento controlado o concentraciones moderadas de nutrientes para activar eficientemente la esporulación [26].

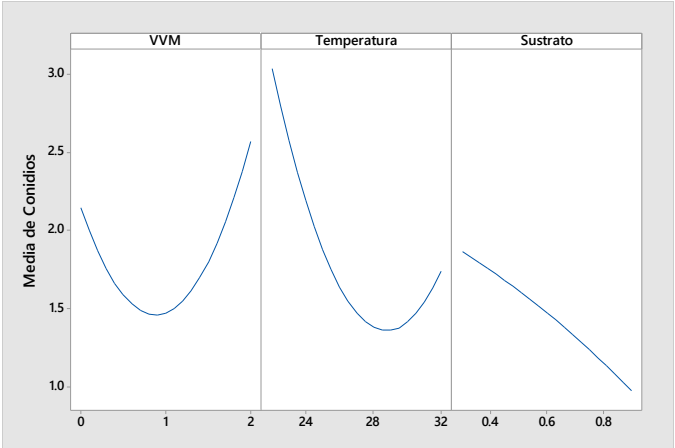


Fig. 2. Gráfica de efectos principales para producción de conidios

La Fig. 3 de interacciones de los factores en el crecimiento de los conidios de *Trichoderma sp.* muestra que existe un claro efecto cooperativo. La alta disponibilidad de oxígeno (2.0 VVM) mitiga ligeramente el impacto negativo de las altas temperaturas, pero el verdadero potencial metabólico del hongo para la conidiogénesis se desata cuando combinamos el suministro máximo de aireación con su temperatura óptima de crecimiento templado (22 °C) [27]. La interacción aireación y sustrato es un hallazgo valioso para la investigación. Significa que el exceso de sustrato (0.9) satura y deprime la esporulación *únicamente si el sistema está mal aireado*. Si se incrementa la agitación/aireación hasta 2.0 VVM, el hongo es capaz de procesar metabólicamente la alta carga de nutrientes de manera aeróbica, eliminando la represión catabólica y alcanzando la misma tasa de conidios que con un sustrato bajo [27,28]. La interacción temperatura sustrato demuestra que la preferencia de *Trichoderma sp.* por un medio con menor concentración de nutrientes (o un agotamiento controlado de los mismos para inducir la fase estacionaria y reproductiva) se mantiene constante de forma independiente a la temperatura del incubador o biorreactor [23,24,29].

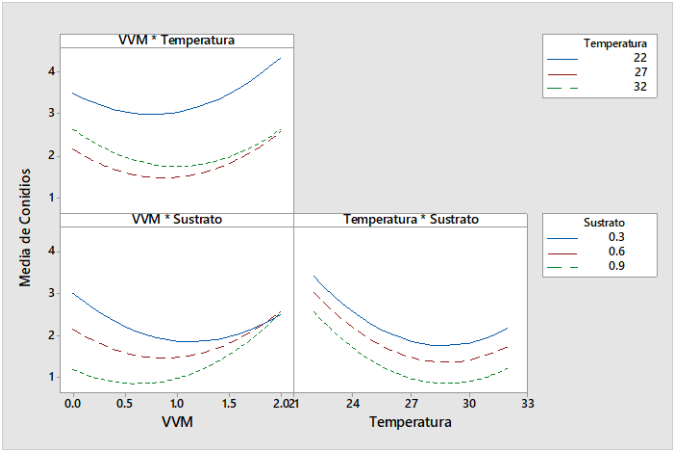


Fig. 3. Gráfica de interacciones de conidios

La Fig. 4 permite observar que la forma elíptica/parabólica del panel temperatura – aireación demuestra que el efecto de la temperatura depende críticamente de la tasa de aireación. Una menor temperatura en el biorreactor (22 °C) se complementa con un flujo alto de oxígeno (2.0 VVM) para disparar la conidiogénesis. La zona verde clara (3.5 - 4.0) del panel sustrato aireación aparece en la esquina inferior izquierda (baja aireación y bajo sustrato), pero la tendencia principal se desplaza de manera diagonal hacia la derecha. Cuando se alcanza el máximo de aireación (2.0 VVM), el sistema tolera concentraciones de sustrato mucho más elevadas (alrededor de 0.70 - 0.75) manteniéndose en la franja de alta productividad (azul claro, 2.0 - 2.5).

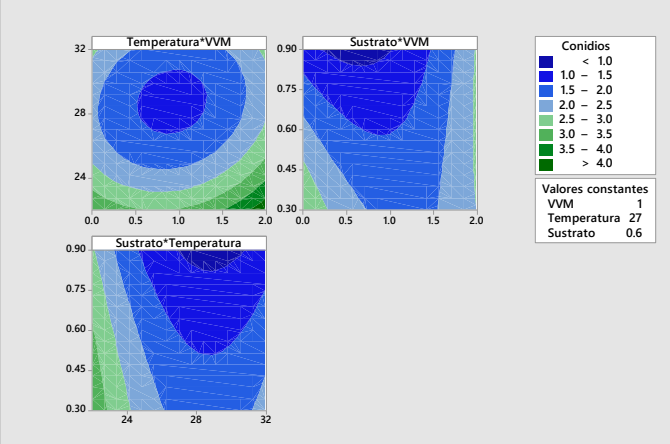


Fig. 4. Gráfica de contornos de conidios

El panel sustrato temperatura confirma visualmente que la temperatura actúa como el factor de control primario o limitante en este plano: si el sistema opera por encima de 26 °C, ninguna manipulación en la concentración del sustrato logrará rescatar la producción de conidios de *Trichoderma sp*.

Al igual que con los mapas de contorno, las proyecciones 3D de las superficies de respuesta (Fig. 5) se calcularon manteniendo la tercera variable congelada en sus valores del centro del diseño ($VVM = 1$, $Temperatura = 27\ °C$, $Sustrato = 0.6$). La pendiente tan pronunciada conidios vs. temperatura y aireación confirma la fuerte sensibilidad de *Trichoderma sp.* a la interacción de estos dos factores ambientales. La superficie conidios vs. sustrato y aireación muestra una curvatura tipo "torsión" o "silla de montar" muy interesante, que ilustra tridimensionalmente lo que se dedujo anteriormente: el flujo de aire actúa como un "escudo metabólico" que contrarresta la pérdida de productividad provocada por la saturación de nutrientes. La superficie conidios vs. sustrato y temperatura es casi una rampa curvada que se maximiza la cresta izquierda a los 22 °C.

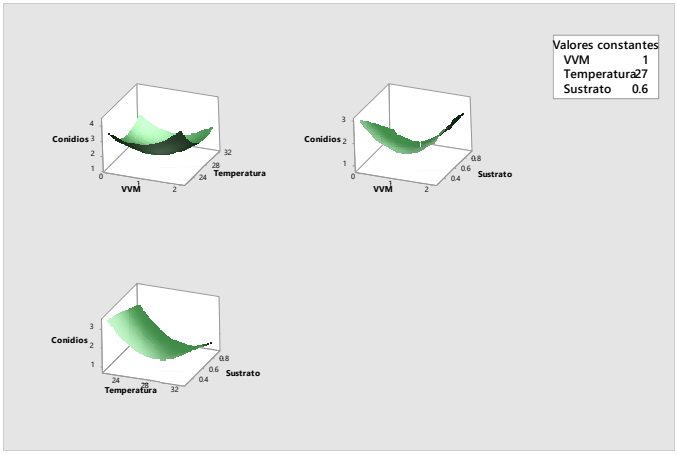


Fig. 5. Gráfica de superficies de conidios

La Fig. 6 muestra los valores óptimos de las variables independientes en estudio. Esto indica una temperatura de 22 °C, que favorece la ruta enzimática y estructural de la conidiogénesis. La aireación en 2.0 VVM puesto que suministro de oxígeno crítico para sostener el esfuerzo energético de la esporulación y contrarrestar la inhibición nutricional. Y el sustrato en 0.3 $g.cm^{-2}$, que previene la represión catabólica por exceso de nutrientes, aunque si se requiere usar 0.9 por diseño de proceso, la aireación a 2.0 VVM compensará esa pérdida. En optimización, la deseabilidad es un índice que va de 0 a 1 [20]. Un valor de 0.897 es excelente (cercano al 90%), indica que la combinación de variables hallada cumple de forma sumamente eficiente y robusta con el objetivo de maximizar la respuesta, reduciendo al mínimo la variabilidad o el riesgo de caer en zonas de baja producción. Los valores establecidos como condiciones óptimas para la producción máxima de conidios (Fig. 6) representan un primer aporte de valores predictivos en las condiciones trabajadas para Trichoderma.

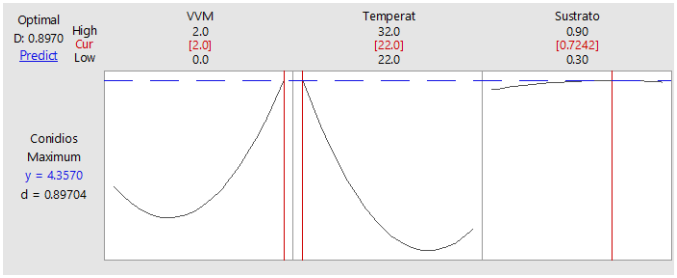


Fig. 6. Optimizador de producción de conidios

El estudio de Fonseca-López et al. [30] se centra específicamente en el uso de la zanahoria (*Daucus carota* L.) como sustrato principal para un proceso de fermentación en estado sólido (FES), con el objetivo fue elaborar un alimento para ganado bovino utilizando zanahorias de desecho (asociadas a tamaño reducido o deformaciones) como sustrato sólido, aprovechando su aporte de azúcares para el desarrollo de microorganismos. Aunque el estudio utiliza el término

"fermentación en estado sólido", el proceso se llevó a cabo empacando las mezclas de zanahoria y otros ingredientes en bolsas plásticas herméticas que luego se colocaron en una incubadora a 20°C durante 72 horas. Otro trabajo menciona y cita investigaciones previas sobre FES que utilizan biorreactores de lecho empacado (packed-bed bioreactor), como el de Biz et al. [31], aunque en ese caso específico el sustrato eran residuos de cítricos y bagazo de caña, no zanahoria. Alias et al. [32] y Bulgari et al. [33] utilizan *Trichoderma reesei* RUT-C30 y *Trichoderma atroviride* Ta13 en fermentación en estado sólido (FES) y como sustrato digestato agrícola mezclado con residuos de frutas como manzana, banano y uva, pero no mencionan la zanahoria.

Mora-Villalobos et al. [34] mediante fermentación en estado sólido (FES) evaluaron las condiciones iniciales de pH y humedad de un sustrato compuesto por cáscaras de zanahoria y residuos de cáscara de maíz (tusa) para obtener enzimas celulasas. Observaron que la actividad de la enzima endoglucanasa incrementó con el tiempo y se favoreció por una humedad del 75% y un pH de 5.2, alcanzando valores superiores a 300 U/mg de proteína. Sin embargo, no se observaron tendencias significativas en la actividad de la exocelulasa relacionadas con los factores del estudio. La combinación de residuos de zanahoria y maíz como sustrato para la producción de celulasa utilizando *Cladosporium sp*. _V3 (GenBank No. PP931187), aislado de residuos de piña, ha sido poco caracterizado.

El valor de 4,357 x 10^9 conidios por g de substrato determinado como el más alto valor de producción de conidios constituye bajo las condiciones trabajadas un aporte importante. Entre los reportes encontrados se sabe que en procesos de fermentación de sustrato sólido se han obtenido producciones de conidios de Trichoderma de 2 a 3 × 10^9 por g de substrato [35]. Por lo cual el proceso bajo las condiciones trabajadas constituye un proceso alternativo recomendable para la producción de conidios de *Trichoderma sp*.

IV. Conclusiones

En el proceso de optimización, bajo las condiciones trabajadas, para la producción máxima de conidios de *Trichoderma sp* por fermentación de estado sólido, se concluye que la aireación, la temperatura y el substrato tienen significativo efecto principal sobre la producción de conidios y la aireación-substrato tienen efecto de interacción. Las condiciones óptimas para la producción máxima de conidios de *Trichoderma sp*. encontrada de 4,357 x 10^9 conidios. g^{-1} de sustrato son: 2 VVM de aireación, 22°C de temperatura y 0,72 g/cm^2 de substrato. Se debe considerar el proceso desarrollado como recomendable para la producción de conidios de Trichoderma, y se debe evaluar la calidad de los conidios producidos de *Trichoderma sp*. bajo las condiciones trabajadas.

Referencias

[1] F. Cai, K. Dou, P. Wang, K. Chenthamara, J. Chen, I.S. Druzhinina, The Current State of Trichoderma Taxonomy and Species Identification, in: 2022: pp. 3–35. https://doi.org/10.1007/978-3-030-91650-3_1.

[2] P. Guzmán-Guzmán, A. Kumar, S. de los Santos-Villalobos, F.I. Parra-Cota, Ma. del C. Orozco-Mosqueda, A.E. Fadiji, S. Hyder, O.O. Babalola, G. Santoyo, Trichoderma Species: Our Best Fungal Allies in the Biocontrol of Plant Diseases—A Review, Plants 12 (2023) 432. https://doi.org/10.3390/plants12030432.

[3] Md.M.I. Mollah, N. Hassan, Efficacy of Trichoderma harzianum, as a biological fungicide against fungal diseases of potato, late blight and early blight, Journal of Natural Pesticide Research 5 (2023) 100047. https://doi.org/10.1016/j.napere.2023.100047.

[4] E. Vindas-Reyes, R. Chacón-Cerdas, W. Rivera-Méndez, Trichoderma Production and Encapsulation Methods for Agricultural Applications, AgriEngineering 6 (2024) 2366–2384. https://doi.org/10.3390/agriengineering6030138.

[5] N. Manzar, A.S. Kashyap, R.S. Goutam, M.V.S. Rajawat, P.K. Sharma, S.K. Sharma, H.V. Singh, Trichoderma: Advent of Versatile Biocontrol Agent, Its Secrets and Insights into Mechanism of Biocontrol Potential, Sustainability 14 (2022) 12786. https://doi.org/10.3390/su141912786.

[6] K.M. Báez-Parra, E. Salazar-Villa, J. León-Félix, M.Á. Angulo-Escalante, I. Rojo-Báez, Morphological and molecular characterization of Trichoderma strains isolated from the BioHumisol ® biofertilizer, Revista Mexicana de Fitopatología 44 (2026). https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2407-3.

[7] A. Sharma, B. Gupta, S. Verma, J. Pal, Mukesh, Akanksha, P. Chauhan, Unveiling the biocontrol potential of Trichoderma, Eur. J. Plant Pathol. 167 (2023) 569–591. https://doi.org/10.1007/s10658-023-02745-5.

[8] Á.R. Ceballos-Chávez, B.E. López-Valenzuela, F.A. Valenzuela-Escoboza, E. López-Bautista, H.A. Marquez-Lujan, L.E. Chávez-García, Reproducción conidial de Trichoderma asperelloides en medios de cultivo y sustratos orgánicos, Rev. Mex. De Cienc. Agric. 16 (2025) e3510. https://doi.org/10.29312/remexca.v16i1.3510.

[9] Y. Martinez, J. Ribera, F.W.M.R. Schwarze, K. De France, Biotechnological development of Trichoderma-based formulations for biological control, Appl. Microbiol. Biotechnol. 107 (2023) 5595–5612. https://doi.org/10.1007/s00253-023-12687-x.

[10] N.A. Butt, F. Shaikh, S.M. Sohail, Nutritional Aspects of Carrot By-products, in: Importance of Plant Based Byproducts: Nutritional and Functional Properties, Springer Nature Switzerland, Cham, 2026: pp. 139–157. https://doi.org/10.1007/978-3-032-03503-5_6.

[11] Md. Abuhena, Md.G. Kabir, Md.F. Azim, J. Al-Rashid, N.M. Rasul, Md.A. Huq, A stressing method for producing high-density Trichoderma spores in a dual-layer by utilizing a starch-based medium in a reconditioning approach, Bioresour. Technol. Rep. 19 (2022) 101165. https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101165.

[12] L.S. Angeles-Vega, H.G. Ramos-Jaimes, J. Espitia-López, P.M. Garza-López, A. Angel-Cuapio, Fermentación sólida de Metarhizium robertsii: sustrato y condiciones de cultivo en la producción de conidios y la eficacia biológica, Rev. Mex. De Cienc. Agric. 16 (2025) e3596. https://doi.org/10.29312/remexca.v16i3.3596.

[13] C. Zhang, R.A. Ali Khan, H. Wei, R. Wang, J. Hou, T. Liu, Rapid and mass production of biopesticide Trichoderma Brev T069 from cassava peels using newly established solid-state fermentation bioreactor system, J. Environ. Manage. 313 (2022) 114981. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.114981.

[14] J.D. Narwade, A.A. Odaneth, S.S. Lele, Solid-state fermentation in an earthen vessel: Trichoderma viride spore-based biopesticide production using corn cobs, Fungal Biol. 127 (2023) 1146–1156. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2023.06.007.

[15] H. Liu, D. Hao, Y. Li, X. Wang, J. Chen, Approaches for the establishment of optimized co-culture system of multiple Trichoderma strains for culture metabolites highly effective in cucumber growth promotion, Front. Microbiol. 13 (2022). https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1020077.

[16] N. Lombardi, A. Pironti, G. Manganiello, R. Marra, F. Vinale, S. Vitale, M. Lorito, S.L. Woo, Trichoderma Species Problematic to the Commercial Production of Pleurotus in Italy: Characterization,

Identification, and Methods of Control, Microbiol. Res. (Pavia). 14 (2023) 1301–1318. https://doi.org/10.3390/microbiolres14030088.
[17] A. Rimkus, A. Namina, M.T. Dzierkale, O. Grigs, M. Senkovs, S. Larsson, Impact of Growth Conditions on the Viability of Trichoderma asperellum during Storage, Microorganisms 11 (2023) 1084. https://doi.org/10.3390/microorganisms11041084.
[18] L. Yafetto, Application of solid-state fermentation by microbial biotechnology for bioprocessing of agro-industrial wastes from 1970 to 2020: A review and bibliometric analysis, Heliyon 8 (2022). https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2022.E09173.
[19] P.S. Yadav, B.V.S. Prasad, M.S. Chandra, N.R. Maddela, R. Prasad, Leaching Approach for β-Glucosidase Extraction from Fermented Rice Husk in Solid State Cultivation by Aspergillus protuberus, Curr. Microbiol. 81 (2024) 140. https://doi.org/10.1007/s00284-024-03641-9.
[20] R.H. Myers, D.C. Montgomery, C.M. Anderson-Cook, Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments, John Wiley & Sons, 2016.
[21] E.R. Omuse, S. Niassy, J.M. Wagacha, G.O. Ong'amo, A.G.A. Azrag, T. Dubois, Suitable models to describe the effect of temperature on conidial germination and mycelial growth of Metarhizium anisopliae and Beauveria bassiana, Biocontrol Sci. Technol. 32 (2022) 281–298. https://doi.org/10.1080/09583157.2021.1993133.
[22] R. De la Cruz-Quiroz, F. Robledo-Padilla, C.N. Aguilar, S. Roussos, Forced Aeration Influence on the Production of Spores by Trichoderma strains, Waste Biomass Valorization 8 (2017) 2263–2270. https://doi.org/10.1007/s12649-017-0045-4.
[23] R.J.B. Cordero, E.R. Mattoon, Z. Ramos, A. Casadevall, The hypothermic nature of fungi, Proceedings of the National Academy of Sciences 120 (2023). https://doi.org/10.1073/pnas.2221996120.
[24] S.S. Samant, V.A. Jagtap, Fundamentals of Fungal Biology, in: Fungal Biotechnology, CRC Press, 2025: pp. 1–9.
[25] J. Wildman, A. Shea, V. Cascione, D. Henk, Mould susceptibility of bio-based insulation materials in modern construction, Npj Mater. Degrad. 10 (2026) 29. https://doi.org/10.1038/s41529-026-00742-7.
[26] M. Ajmal, A. Hussain, A. Ali, H. Chen, H. Lin, Strategies for Controlling the Sporulation in Fusarium spp., Journal of Fungi 9 (2022) 10. https://doi.org/10.3390/jof9010010.
[27] S. Ishibashi, S. Susukida, K. Muto, K. Miyazawa, S. Zhang, A. Yoshimi, E. Tabata, K. Abe, Using pure oxygen aeration to increase recombinant protein production by an Aspergillus oryzae hyphal dispersion strain, J. Biosci. Bioeng. 141 (2026) 98–107. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2025.10.011.
[28] S.W. Kim, H.J. Hwang, C.P. Xu, J.W. Choi, J.W. Yun, Effect of aeration and agitation on the production of mycelial biomass and exopolysaccharides in an enthomopathogenic fungus Paecilomyces sinclairii, Lett. Appl. Microbiol. 36 (2003) 321–326. https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01318.x.
[29] P.K. Mukherjee, K. Raghu, Effect of temperature on antagonistic and biocontrol potential of shape Trichoderma sp. on Sclerotium rolfsii, Mycopathologia 139 (1997) 151–155. https://doi.org/10.1023/A:1006868009184.
[30] D. Fonseca-López, G. Saavedra-Montañéz, C.E. Rodríguez-Molano, Elaboración de un alimento para ganado bovino a base de zanahoria (<i>Daucus carota</i> L.) mediante fermentación en estado sólido como una alternativa ecoeficiente, Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas 12 (2018) 175–182. https://doi.org/10.17584/rcch.2018v12i1.7416.
[31] A. Biz, A.T.J. Finkler, L.O. Pitol, B.S. Medina, N. Krieger, D.A. Mitchell, Production of pectinases by solid-state fermentation of a mixture of citrus waste and sugarcane bagasse in a pilot-scale packed-bed bioreactor, Biochem. Eng. J. 111 (2016) 54–62. https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.03.007.
[32] C. Alias, D. Bulgari, E. Gobbi, It Works! Organic-Waste-Assisted Trichoderma spp. Solid-State Fermentation on Agricultural Digestate, Microorganisms 10 (2022) 164. https://doi.org/10.3390/microorganisms10010164.
[33] D. Bulgari, C. Alias, G. Peron, G. Ribaudo, A. Gianoncelli, S. Savino, H. Boureghda, Z. Bouznad, E. Monti, E. Gobbi, Solid-State Fermentation of *Trichoderma* spp.: A New Way to Valorize the Agricultural Digestate and Produce Value-Added Bioproducts, J. Agric. Food Chem. 71 (2023) 3994–4004. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c07388.
[34] V. Mora-Villalobos, M. González-Vargas, C. Cortés-Herrera, C. Velázquez-Carrillo, M.E. Koschny, N. Barboza, Cellulase production using a combination of carrot peel and corn husk (tusa) residues under solid-state fermentation, Systems Microbiology and Biomanufacturing 5 (2025) 843–853. https://doi.org/10.1007/s43393-024-00319-y.
[35] M. Stefanova-Nalimova, Introducción y eficacia del biocontrol con fitopatógenos con Trichoderma spp. en Cuba, Fitosanidad 3 (2007) 75–79. https://www.redalyc.org/pdf/2091/209116023011.pdf (accessed July 5, 2026).