

VALORIZACIÓN DE RESIDUOS AGRÍCOLAS PARA PRODUCCIÓN DE ESPORAS DE *Trichoderma* MEDIANTE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

Utilization of agricultural waste for the production of *Trichoderma* spores via solid-state fermentation

Solangel Wendy Casilla¹, Carla Crespo Melgar²

RESUMEN

La producción de *Trichoderma* sp. mediante fermentación en estado sólido representa una estrategia para la obtención de bioinsumos en la agricultura. En este estudio se evaluaron dos residuos agrícolas como sustrato para la producción de esporas de *Trichoderma* sp., coronta de maíz y cáscara de café sometidos a hidrólisis alcalina (NaOH 2.4 % 30 min) y tratamiento térmico (90 °C, 10 min). Además, se evaluó la suplementación de nutrientes [KH₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, urea y CaCl₂]. Arroz precocido (90 °C, 5 min), utilizado convencionalmente fue empleado como control. La producción de esporas se evaluó durante 20 días y se determinó la viabilidad conidial, el rendimiento en peso y la pureza microbiológica del producto. Los resultados mostraron un incremento de la producción de esporas durante el periodo de incubación. Los mayores rendimientos se obtuvieron empleando cáscara de café sometida a tratamiento térmico y con suplementación de nutrientes, alcanzando 5.04×10¹⁰ esporas/g de sustrato, con viabilidad superior al 98 %, rendimiento en peso seco de 3.35 % y pureza microbiológica del 100 %. De manera similar, el tratamiento térmico de coronta de maíz y suplementación de nutrientes alcanzó 4.83×10¹⁰ esporas/g de sustrato, con viabilidad del 98 %, rendimiento del 3.07 % y pureza microbiológica del 100 %. En el caso del control, el arroz con nutrientes presentó valores de 5.1×10¹⁰ esporas/g, con pureza microbiológica del 100 % y rendimientos de peso seco entre 3.8 %. Los resultados demostraron que estos residuos sometidos a tratamiento térmico constituyen sustratos eficientes representando una alternativa viable a los sustratos convencionales.

Palabras clave: residuos agrícolas, *Trichoderma* sp., bioinsumos.

ABSTRACT

Trichoderma sp. production through solid-state fermentation represents a promising strategy for agricultural bioinputs. In this study, two agricultural residues, corn cob and coffee husk, were evaluated as substrates for *Trichoderma* sp. spores production. Both substrates were subjected to alkaline hydrolysis (2.4 % NaOH for 30 min) and heat treatment (90 °C for 10 min). In addition, the effect of nutrient supply with KH₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, urea, and CaCl₂ was evaluated. Precooked rice (90°C for 5 min), conventionally used for fungal production, was used as control substrate. Spore production was monitored over a 20-day incubation period. Conidial viability, dry weight yield, and axenicity of the final product were determined. The results showed a progressive increase in sporulation throughout the incubation period. The highest yield was obtained with heat-treated coffee husk supplemented with nutrients, reaching 5.04 × 10¹⁰ spores/g of substrate, with conidial viability above 98 %, a dry weight yield of 3.35 %, and no detectable microbial contamination. Similarly, heat-treated corn cob supplemented with nutrients achieved 4.83 × 10¹⁰ spores/g of substrate, with viability above 98 %, a dry weight yield of 3.07 %, and no detectable microbial contamination. The control treatment consisting of nutrient-supplemented rice produced 5.10 × 10¹⁰ spores/g of substrate, with no detectable microbial contamination and a dry weight yield of 3.8 %. These results show that the agricultural residues, particularly when subjected to heat treatment and nutrient supplementation, are suitable substrates for efficient production of *Trichoderma* sp., being an alternative to conventional substrates.

Keywords: agricultural residues, *Trichoderma* sp., bioinputs.

Artículo original

DOI: <https://doi.org/10.53287/pisv7978xx72f>

Recibido: 30/04/2026

Aceptado: 15/06/2026

¹ Investigadora, Carrera de Bioquímica, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, Bolivia. <https://orcid.org/0009-0001-7753-3011.swcasilla@umsa.bo>

² Investigadora, Área de Biotecnología Microbiana, Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas "Dr. Luis Enrique Terrazas Siles", Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, Bolivia. <https://orcid.org/0000-0003-3619-2967.cfcrespo@umsa.bo>

INTRODUCCIÓN

La producción biotecnológica de bioinsumos agrícolas a partir de hongos filamentosos de rápida colonización y notable capacidad de adaptación del género *Trichoderma* ha cobrado creciente importancia por su efectividad como agente de control biológico, promotor del crecimiento vegetal y mejorador del suelo (Contreras-Cornejo et al., 2016). Su eficacia se debe a diversos mecanismos de acción, entre ellos el micoparasitismo, la producción de metabolitos antifúngicos y la competencia por nutrientes y espacio (Zin y Badaluddin, 2020). Estas propiedades convierten a *Trichoderma* sp. en una herramienta prometedora para el desarrollo de bioinsumos sostenibles orientados al manejo agroecológico de plagas y enfermedades.

Para la producción masiva de conidios, la fermentación en estado sólido (FES) demostró ser una estrategia eficiente que proporciona condiciones similares al ambiente natural de crecimiento del hongo y permite alcanzar altos rendimientos de esporulación. Sin embargo, el éxito de esta técnica depende en gran medida del tipo de sustrato utilizado, su composición química, granulometría, contenido de humedad y los tratamientos previos aplicados. El arroz (*Oryza sativa*) precocido ha sido empleado con frecuencia como sustrato en la producción de *Trichoderma* sp. debido a su alto contenido de almidón y facilidad de colonización; no obstante, su costo puede limitar su aplicación en procesos de producción a gran escala (Michel-Aceves et al., 2008).

Por ello, se ha intensificado la investigación biotecnológica orientada a la valorización de subproductos agrícolas como matrices alternativas en procesos de FES. El olote de maíz, término utilizado en las fuentes para la coronta emerge como un sustrato de alta viabilidad técnica debido a su carácter de desecho de cosecha. No obstante, su aprovechamiento óptimo para la reproducción masiva de hongos del género *Trichoderma* requiere protocolos de acondicionamiento físico-químico para mejorar la disponibilidad de nutrientes y asegurar una esporulación exitosa con concentraciones comparables a sustratos convencionales (López et al., 2022). De manera similar, la cáscara de café (*Coffea arabica*) representa otro residuo agrícola generado durante el procesamiento del grano, particularmente en regiones productoras de café. Este material posee un elevado contenido de nutrientes que lo convierten en un sustrato potencial para procesos de FES orientados a la producción de microorganismos de interés agrícola (Murthy y Naidu, 2012).

Diversos estudios han señalado que la aplicación de pretratamientos y la suplementación de nutrientes, puede mejorar la accesibilidad al sustrato, favoreciendo la

colonización micelial y aumentando significativamente la producción de conidios (Moreno, 2024). Asimismo, para garantizar la eficacia y seguridad de los bioinsumos obtenidos, es necesario evaluar parámetros de calidad microbiológica del producto final, mediante la detección de posibles microorganismos contaminantes.

En este contexto, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar residuos agrícolas como sustratos alternativos para la producción de esporas viables de *Trichoderma* sp. mediante FES, comparando el desempeño de coronta de maíz y cáscara de café frente a un sustrato convencional. Adicionalmente, se evaluó el efecto de diferentes pretratamientos del sustrato y de la suplementación de nutrientes sobre la producción de conidios, así como la calidad microbiológica del polvo de esporas obtenido, mediante ensayos de control de contaminación en medios de cultivo selectivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

El presente estudio se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB), perteneciente a la Universidad Mayor de San Andrés, ubicado en la ciudad de La Paz, Bolivia. Todos los ensayos microbiológicos y experimentos de fermentación se realizaron bajo condiciones controladas de laboratorio, manteniendo estrictos criterios de asepsia para evitar contaminaciones externas durante la manipulación de los cultivos fúngicos y los sustratos experimentales.

Metodología

Sustratos

Se emplearon dos residuos agrícolas como sustratos experimentales para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. coronta de maíz y cáscara de café, ambos sustratos fueron obtenidos de mercados la ciudad de La Paz, Bolivia.

Los residuos fueron sometidos inicialmente a un proceso de lavado con agua corriente para eliminar polvo y materia orgánica adherida. Posteriormente se secaron a 50 °C durante 48 horas hasta alcanzar una humedad residual inferior al 10 %. Una vez secos, fueron triturados mecánicamente, obteniendo partículas con un tamaño superior a 2 mm. El material triturado fue almacenado en condiciones secas hasta su procesamiento. Como sustrato de referencia se empleó arroz obtenido de mercados de la ciudad de La Paz, previamente lavado con agua destilada y sometido a tratamiento térmico 90 °C por 5 min antes de su uso según procedimiento descrito por Allori et al. (2017).

Trichoderma sp. y preparación del inóculo

Se empleó una cepa criopreservada de *Trichoderma* sp. perteneciente al cepario del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB). Un disco criopreservado de *Trichoderma* sp. fue reactivado mediante siembra en placas Petri que contenían medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA). Las placas se incubaron a 25 ± 2 °C durante un periodo de siete días, permitiendo el desarrollo completo del micelio y la formación de estructuras reproductivas.

Para la obtención del inóculo fúngico, se emplearon cultivos de *Trichoderma* sp. desarrollados en medio PDA, tras un periodo de incubación de siete días a 25 ± 2 °C hasta alcanzar una esporulación completa. La recolección de Las esporas se realizó mediante el raspado superficial de con un asa de siembra y la adición de agua destilada estéril (Allori et al., 2017). La concentración de esporas se determinó mediante recuento directo en un hemocitómetro (cámara de Neubauer) bajo microscopio óptico, contabilizando los conidios presentes en cinco cuadrículas del cuadrado central del hemocitómetro, de acuerdo con la metodología descrita por Nugra (2018). La concentración de esporas se calculó mediante la Ecuación 1. Posteriormente, la suspensión fue ajustada a una concentración de 2×10^7 esporas/mL siguiendo la concentración de inóculo recomendada por Moreno (2024).

$$C_{esp} = \frac{\text{Número de esporas totales} \times 10000}{\left(\frac{5}{25}\right) \cdot \text{dilución}} \quad (1)$$

Diseño experimental

El estudio se desarrolló mediante un diseño experimental comparativo orientado a evaluar la producción de esporas de *Trichoderma* sp. considerando tres factores: tipo de sustrato, pretratamiento y suplementación de nutrientes. El factor A: tipo de sustrato, se empleó coronta de maíz, cáscara de café y arroz. El factor B: pretratamiento del sustrato. En el caso de la coronta de maíz se siguió el procedimiento descrito por Moreno (2024), 25 g fueron sometidos a hidrólisis alcalina con

125 ml de NaOH al 2.4 % (p/v) durante 30 minutos, seguida de lavado con agua destilada hasta neutralidad luego se escurrió y se secó en horno a 105 °C durante seis horas. La hidrólisis alcalina fue incluida como pretratamiento debido a que los tratamientos alcalinos son utilizados para modificar materiales lignocelulósicos, promoviendo la remoción parcial de lignina y hemicelulosa y aumentando la disponibilidad de carbohidratos estructurales (Kumar et al., 2009). Paralelamente, se realizó un tratamiento control con coronta de maíz tratada con agua destilada en lugar de NaOH. Así mismo, otros 25 g se sometieron a tratamiento térmico mediante ebullición a 90 °C durante 10 minutos. Este procedimiento fue adaptado a partir de la metodología descrita por Allori et al. (2017), quienes emplearon un proceso de precocción para acondicionar residuos agroindustriales utilizados como sustrato en fermentación sólida. Aunque dicho estudio no evaluó específicamente coronta de maíz, el tratamiento fue incorporado con el propósito de determinar si la precocción podía favorecer la producción de esporas de *Trichoderma* sp. en este residuo. Asimismo, el tiempo de tratamiento fue ajustado hasta obtener una consistencia más suave y una mayor hidratación del material, similar a la observada en el arroz. Para la cáscara de café, 25 g solo se sometieron a la aplicación de tratamiento térmico mediante ebullición 90 °C durante 5 minutos. El factor C: correspondió a la suplementación nutricional del sustrato, evaluándose la adición de nutrientes compuesta por: 1.5 g/L KH_2PO_4 , 3 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.75 g/L urea y 2 g/L CaCl_2 , siguiendo modificaciones al protocolo de Moreno (2024) en la cual se omitió la adición de 0.5 g de carbonato de calcio (CaCO_3). Los factores evaluados fueron seleccionados considerando que las características fisicoquímicas del sustrato, los pretratamientos aplicados y la disponibilidad de nutrientes constituyen variables determinantes en el metabolismo, crecimiento y esporulación de *Trichoderma* sp. durante procesos de FES

Las diferentes combinaciones entre el tipo de sustrato, el pretratamiento aplicado y la suplementación nutricional se realizaron en doce tratamientos de acuerdo a la Tabla 1.

Tabla 1. Tratamientos experimentales para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. mediante fermentación en estado sólido.

Tratamiento	Factor A: sustrato	Factor B: pretratamiento	Factor C: suplementación nutricional
T1	Coronta de maíz	Sin tratamiento	Nutrientes
T2		Sin tratamiento	Sin nutrientes
T3		Tratamiento térmico	Nutrientes
T4		Tratamiento térmico	Sin nutrientes
T5		Hidrólisis alcalina	Nutrientes
T6		Hidrólisis alcalina	Sin nutrientes
T7	Cáscara de café	Sin tratamiento	Nutrientes
T8		Sin tratamiento	Sin nutrientes

T9		Tratamiento térmico	Nutrientes
T10		Tratamiento térmico	Sin nutrientes
T11	Arroz	Tratamiento térmico	Nutrientes
T12		Tratamiento térmico	Sin nutrientes

Preparación del sustrato para fermentación

Para cada tratamiento experimental se utilizaron 25 g de sustrato seco (coronta de maíz, cáscara de café o arroz) previamente acondicionado a un tamaño de partícula >2 mm. Los sustratos fueron sometidos a los pretratamientos correspondientes según la Tabla 1, incluyendo hidrólisis alcalina mediante NaOH al 2.4 % durante 30 min o tratamiento térmico a 90 °C, aplicado durante 10 min para la coronta de maíz y 5 min para la cáscara de café. Posteriormente el sustrato fue humedecido con 125 mL de solución de nutrientes o agua destilada estéril según el tratamiento asignado. El material se dejó en reposo durante dos horas. Posteriormente, se eliminó el exceso de líquido mediante decantación (Agamez et al., 2008).

El sustrato humedecido fue transferido a bolsas de polipropileno resistentes al calor y sometido a esterilización por calor húmedo a 121 °C durante una hora. Después de la esterilización se verificó el contenido de humedad del sustrato mediante análisis gravimétrico, ajustando el nivel de humedad final a un rango entre 50-55 % valor que permitió compensar el incremento de humedad asociado a la etapa de inoculación y aproximar las condiciones del sistema al rango óptimo descrito para FES de *Trichoderma* sp. (60–80 %) (Pineda-Insuasti, 2017; Perdomo et al., 2021).

Finalmente, cada unidad experimental fue inoculada asépticamente con 5 mL de una suspensión de conidios con una concentración de 2×10^7 esporas/mL. Los sustratos inoculados fueron incubados a una temperatura controlada de 25 ± 2 °C temperatura seleccionada por encontrarse dentro del rango reportado como favorable para la actividad metabólica de *Trichoderma* sp. Pineda-Insuasti (2017) señala que la producción de enzimas celulolíticas alcanza valores óptimos en este intervalo térmico, durante un periodo total de veinte días. Durante el proceso de fermentación se monitoreó el desarrollo del micelio y la formación de esporas con el fin de evaluar la dinámica de crecimiento y esporulación del hongo, se realizaron muestreos periódicos a los días 3, 7, 10, 13, 17 y 20 posteriores a la inoculación.

Cuantificación de esporas

En cada muestreo se tomó 1 g de sustrato colonizado, el cual fue transferido a tubos que contenían 9 mL de agua destilada estéril. Las muestras fueron agitadas vigorosamente durante un minuto y se realizó el recuento

de conidios en la suspensión resultante, mediante hemocitómetro bajo microscopio óptico. Se estimó la concentración de esporas en cada tratamiento, expresado como número de conidios por gramo de sustrato, se graficaron curvas de esporulación de *Trichoderma* sp.

Evaluación de la viabilidad de esporas

La viabilidad de los conidios producidos se evaluó mediante la técnica de recuento directo de conidios germinados (Serpa, 2015). Para ello, se prepararon diluciones seriadas de las suspensiones de esporas (10^8) y se inoculó 1 mL de cada dilución en placas Petri con agar agua. Posteriormente se añadió medio PDA fundido aproximadamente a 45 °C. Las placas se incubaron a 25 ± 2 °C durante 48 horas. La viabilidad se determinó mediante observación, considerando como conidios viables aquellos que presentaban germinación visible. El porcentaje de viabilidad fue estimado con la ecuación (2) de acuerdo a (Serpa, 2015).

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{N}^\circ \text{ conidios germinados}}{\text{N}^\circ \text{ conidios totales}} \times 100 \quad (2)$$

Recolección y cuantificación de esporas

Una vez finalizado el periodo de incubación, las bolsas de cultivo fueron abiertas y el material esporulado fue transferido a sobres de papel estériles. Posteriormente, las muestras fueron secadas a 40 °C hasta reducir el contenido de humedad a valores al 10-12 % (Elósegui et al., 2009; Posada-Flórez, 2008). El sustrato colonizado seco fue sometido a un proceso de tamizado manual y la biomasa recolectada fue pesada utilizando balanza analítica para estimar el peso seco de esporas producidas en cada tratamiento (Elósegui et al., 2009).

Control de calidad microbiológico del polvo de esporas

Con el fin de evaluar la calidad microbiológica del producto obtenido, se realizaron ensayos de control de contaminación. Para ello, 0.1 g de polvo de esporas fue resuspendido en 9.9 mL de una solución estéril de Tritón X-100 al 0.1 %, se realizaron diluciones seriadas (10^7) ajustando su concentración final a 20-100 conidios por mL y luego se sembró 100 uL por extensión superficial con asa de drigalsky en placas Petri con medios de cultivo. Para la detección de bacterias se empleó agar nutritivo suplementado con fluconazol. Para la detección de hongos contaminantes se utilizó agar Sabouraud–Rosa de Bengala, mientras que para la detección de levaduras se

empleó medio extracto de levadura y malta suplementado. Todos los medios de cultivo fueron preparados en agua destilada y esterilizados por calor húmedo a 121 °C durante 15 min. La evaluación microbiológica se realizó siguiendo la metodología descrita por Báez et al. (2019). Las placas inoculadas fueron incubadas a 25 ± 2 °C y observadas a las 24 horas para bacterias y 48 horas para detectar hongos y levaduras contaminantes. La ausencia o presencia de crecimiento microbiano fue utilizada como indicador de la calidad microbiológica del bioproducto obtenido.

Análisis estadístico

Los datos de producción de esporas fueron transformados en escala logarítmica para cumplir los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Posteriormente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) considerando las combinaciones experimentales de sustrato, tratamiento y condición de nutrientes. Las diferencias entre medias fueron evaluadas mediante la

prueba de Tukey ($p = 0.05$). Los resultados se presentan como media $\pm$ error estándar. El análisis estadístico y las representaciones gráficas se realizaron en el software R, versión 4.4.2.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Dinámica de producción de esporas durante la fermentación en estado sólido

La dinámica de producción de esporas de *Trichoderma* sp. en los diferentes tratamientos evaluados se presenta en la Figura 1, donde se observa el incremento de la concentración de conidios (esporas/g) durante el periodo de incubación comprendido entre los días 0 y 20. En todos los tratamientos se evidenció un incremento progresivo en la concentración de esporas a lo largo del tiempo de fermentación.

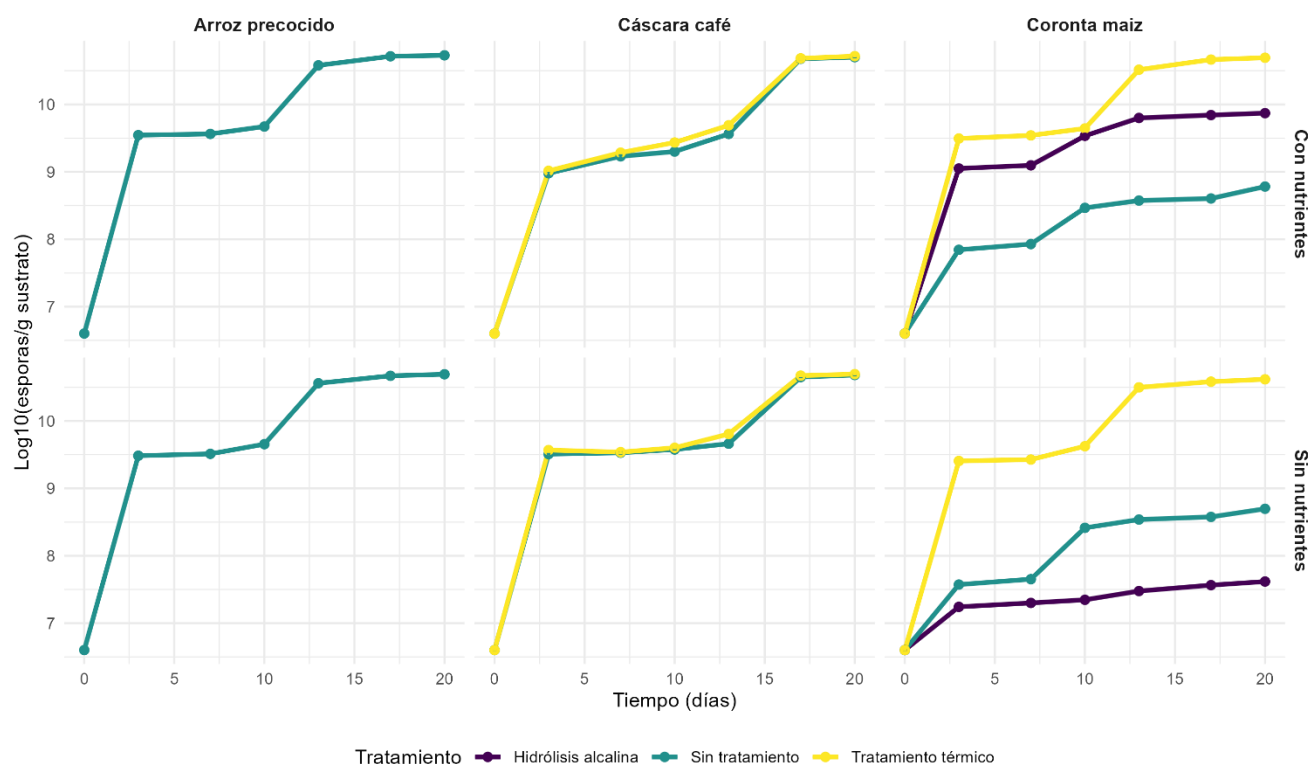


Figura 1. Curva de crecimiento y producción de esporas de *Trichoderma* sp. en diferentes sustratos y tratamientos durante fermentación en estado sólido (0-20 días).

A partir de un inóculo inicial de 4×10^6 esporas/g, la esporulación se incrementó de manera sostenida desde los primeros días de incubación, lo cual indica una adecuada adaptación del microorganismo al sustrato y el establecimiento del crecimiento micelial durante FES. Este comportamiento es consistente con lo descrito por Pandey (2003) que señala que durante FES los hongos presentan

una rápida colonización del sustrato seguida por una fase de intensa esporulación.

Durante el día tres de incubación, algunos tratamientos mostraron incrementos importantes en la concentración de esporas, particularmente aquellos que incluyeron tratamiento térmico del sustrato, en los cuales se alcanzaron concentraciones superiores a 10^9 esporas/g.

Diversos estudios han demostrado que residuos agrícolas sometidos a acondicionamiento previo pueden favorecer la producción de esporas de *Trichoderma* en FES. Por ejemplo, Narwade et al. (2023) reportaron que la coronta de maíz puede emplearse eficientemente como sustrato para la producción de esporas de *Trichoderma viride*, alcanzando concentraciones cercanas a 2.5×10^9 esporas/g. Asimismo, se ha demostrado que la optimización de las condiciones de fermentación sólida puede generar concentraciones superiores a 10^{10} esporas/g en *Trichoderma harzianum* (Zhang y Yang, 2015), valores comparables a los obtenidos en el presente estudio.

Entre los días 10 y 20 se observó un incremento más pronunciado de la esporulación, alcanzándose las concentraciones máximas hacia el final del periodo de incubación (Figura 1). Este patrón coincide con lo reportado por Harman et al. (2004) describen que la producción de conidios en especies de *Trichoderma* suele incrementarse durante las fases finales del crecimiento cuando las condiciones del sustrato favorecen la diferenciación reproductiva.

Los valores más altos de producción de esporas se registraron en los tratamientos con cáscara de café y en el sustrato control, donde las concentraciones finales

superaron 5×10^{10} esporas/g al día 20. Resultados similares también se observaron en los tratamientos de coronta de maíz sometida a tratamiento térmico, los cuales alcanzaron concentraciones cercanas a 4.9×10^{10} esporas/g. Estos resultados sugieren que los residuos lignocelulósicos adecuadamente acondicionados pueden constituir sustratos eficientes para la producción de *Trichoderma*, tal como ha sido señalado por Bandikari et al. (2014) y Lima et al. (2024), que reportan que diversos residuos agroindustriales pueden emplearse como sustratos alternativos para la producción masiva de conidios mediante FES.

La evaluación macroscópica de los sustratos permitió evidenciar diferencias en el grado de colonización y esporulación de *Trichoderma* entre los tratamientos evaluados (Figura 2). Los sustratos que presentaron mayores concentraciones de esporas, como la cáscara de café y la coronta de maíz sometida a tratamiento térmico, mostraron una coloración verde intensa y homogénea, característica de una alta producción de conidios. La intensidad de la coloración verde en cultivos de *Trichoderma* se asocia directamente con la formación de conidios, por lo que constituye un indicador cualitativo del nivel de esporulación en sistemas de FES.

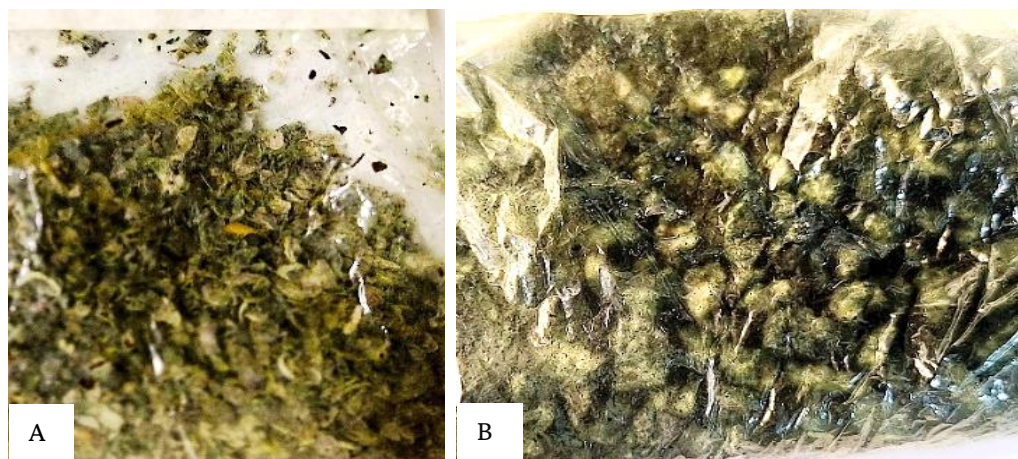


Figura 2. Colonización y esporulación de *Trichoderma* sp. en sustratos agrícolas a los 20 días de fermentación en estado sólido: (A) cáscara de café y (B) coronta de maíz.

Análisis comparativo de la producción de esporas

Para evaluar la influencia del tipo de sustrato y de los tratamientos aplicados sobre la producción de esporas de *Trichoderma* sp., se realizó un análisis comparativo en función del tipo de sustrato, el pretratamiento aplicado y

la suplementación nutricional a lo largo del tiempo de incubación (Figura 3).

El análisis de varianza (ANOVA) evidenció una interacción significativa entre los factores experimentales y el tiempo de fermentación.

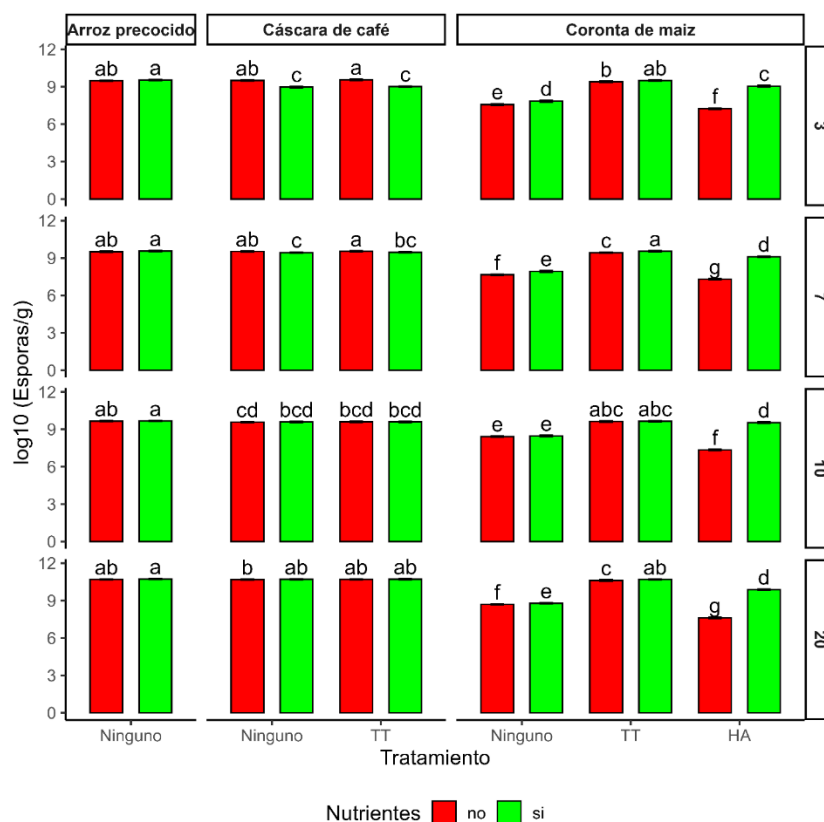


Figura 3. Análisis comparativo de la producción de esporas de *Trichoderma* sp. en distintos sustratos, tratamientos y condiciones de suplementación a 3, 7, 10 y 20 días. TT: tratamiento térmico; HA: hidrólisis alcalina. Los datos corresponden a la media $\pm$ error estándar (EE; n = 2). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.01$).

Durante los primeros tres días de incubación, el control (arroz precocido) con nutrientes alcanzó aproximadamente 3.50×10^9 esporas/g, mientras que el control sin nutrientes presentó valores cercanos a 3.05×10^9 esporas/g; sin embargo, no existe diferencia significativa entre ambos tratamientos ($p > 0.01$). No obstante, tratamientos paralelos con cáscara de café y coronta de maíz no difirieron significativamente respecto al control de acuerdo con la prueba de Tukey ($p = 0.05$). En particular, los tratamientos de cáscara de café sin suplementación, tanto con tratamiento térmico como sin él, alcanzaron 3.70×10^9 y 3.23×10^9 esporas/g, respectivamente sin diferencias significativas ($p > 0.01$) respecto al control. De manera similar, la coronta de maíz con tratamiento térmico y nutrientes presentó valores alrededor de 3.13×10^9 esporas/g ($p > 0.01$) respecto al sustrato control. Estos resultados sugieren que, en la fase inicial del cultivo, la disponibilidad de nutrientes fácilmente asimilables y las propiedades físicas del sustrato, como la porosidad y la capacidad de retención de humedad, desempeñan un papel determinante en la colonización micelial temprana y en la formación inicial de conidios (Bulgari et al., 2023; Brijwani y Vadlani, 2011). La estructura lignocelulósica de estos residuos proporciona una matriz favorable para el establecimiento del micelio,

permitiendo una rápida adaptación del microorganismo al sustrato.

A los siete días de incubación se evidenció un incremento general en la producción de esporas en la mayoría de los tratamientos evaluados, alcanzando valores superiores a los registrados en la fase inicial. El control con nutrientes alcanzó aproximadamente 3.65×10^9 esporas/g, mientras que el arroz sin nutrientes presentó valores cercanos a 3.25×10^9 esporas/g sin presentar diferencias significativas entre ambos tratamientos ($p > 0.01$). Sin embargo, de manera paralela tratamientos basados en cáscara de café mostraron producciones comparables o incluso superiores, en particular, la cáscara de café sin suplementación alcanzó 3.45×10^9 esporas/g con tratamiento térmico y 3.38×10^9 esporas/g sin tratamiento térmico, donde no se observaron diferencias significativas respecto al control ($p > 0.01$). Este comportamiento puede explicarse por el efecto de la relación carbono: nitrógeno (C:N) del sustrato sobre la regulación de la esporulación en *Trichoderma* (Gao et al., 2007) por lo que sería interesante realizar un análisis proximal a los sustratos evaluados. Se ha reportado que condiciones con menor disponibilidad relativa de nitrógeno pueden estimular la formación de esporas, mientras que concentraciones elevadas favorecen el

crecimiento vegetativo (Seyi-Amole y Onilude, 2018). Asimismo, los tratamientos basados en coronta de maíz sometidos a tratamiento térmico mostraron un comportamiento estable, con producciones cercanas a 3.48×10^9 esporas/g con nutrientes ($p > 0.01$) y 2.68×10^9 esporas/g sin suplementación ($p < 0.01$) respecto al tratamiento control.

A los diez días de incubación se observó diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.01$) con un incremento sostenido en la producción de esporas. En esta etapa, el control con nutrientes alcanzó aproximadamente 4.70×10^9 esporas/g, mientras que el control sin nutrientes presentó valores cercanos a 4.53×10^9 esporas/g ($p > 0.01$) entre tratamientos. Los tratamientos basados en coronta de maíz con tratamiento térmico mantuvieron producciones comparables, alcanzando aproximadamente 4.40×10^9 esporas/g con nutrientes y 4.23×10^9 esporas/g sin suplementación ($p > 0.01$) respecto al sustrato control. Por su parte, los tratamientos con cáscara de café destacaron especialmente cuando fueron suplementados con nutrientes, alcanzando valores cercanos a 3.9×10^9 esporas/g tanto con tratamiento térmico como sin él ($p < 0.01$) respecto al sustrato control. Este comportamiento refleja la transición del crecimiento vegetativo hacia la fase de conidiación, en la cual la acumulación de biomasa micelial permite una mayor diferenciación celular y formación de estructuras reproductivas (Steyaert et al., 2010).

Finalmente, a los veinte días de incubación se registraron las mayores concentraciones de esporas en todos los tratamientos, con diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.01$) evidenciando el máximo desarrollo del proceso de esporulación en el sistema. El control con nutrientes alcanzó aproximadamente 5.35×10^{10} esporas/g, mientras que el control sin nutrientes presentó valores cercanos a 4.93×10^{10} esporas/g ($p > 0.01$) entre tratamientos. No obstante, varios tratamientos lograron igualar o superar estos valores. En particular, la cáscara de café con tratamiento térmico y nutrientes alcanzó aproximadamente 5.20×10^{10} esporas/g, sin diferencias significativas respecto al control ($p > 0.01$), mientras que la cáscara de café sin tratamiento térmico con nutrientes registró valores cercanos a 5.03×10^{10} esporas/g ($p > 0.01$) respecto al control. Asimismo, la coronta de maíz sometida a tratamiento térmico con nutrientes alcanzó aproximadamente 4.93×10^{10} esporas/g ($p > 0.01$) respecto al control. El efecto positivo del tratamiento térmico puede atribuirse a modificaciones estructurales del material lignocelulósico que incrementan la accesibilidad de los polímeros para el metabolismo fúngico (Kumar et al., 2009).

En contraste, los tratamientos que involucraron hidrólisis alcalina sin nutrientes de la coronta de maíz presentaron las menores producciones de esporas durante todo el periodo de incubación, con concentraciones finales del orden de 10^7 esporas/g. Este comportamiento puede estar relacionado con los cambios fisicoquímicos inducidos por el tratamiento alcalino, el cual provoca la solubilización parcial de lignina y hemicelulosa y altera la estructura de la celulosa, afectando propiedades como la porosidad, la cristalinidad y la disponibilidad de nutrientes (Rahnama et al., 2013). Estas modificaciones pueden influir negativamente en el metabolismo de *Trichoderma* durante FES, limitando la producción de enzimas y la formación de conidios. De hecho, estudios previos han reportado que ciertos sustratos lignocelulósicos pretratados químicamente pueden presentar menor actividad metabólica en comparación con sustratos no tratados (Kucharska et al., 2018).

Los valores de producción de esporas obtenidos en el presente estudio superan ampliamente los reportados en la literatura para sistemas de FES con especies del género *Trichoderma*, donde generalmente se registran concentraciones entre 10^8 y 10^9 esporas/g. Por ejemplo, Yang et al. (2020) reportaron una producción máxima de 8.5×10^9 esporas/g utilizando mezclas de residuos agrícolas, mientras que Narwade et al. (2023) reportaron valores en el rango de 10^9 esporas/g en sistemas similares. En comparación, los resultados obtenidos en este estudio, especialmente en tratamientos con cáscara de café y coronta de maíz con tratamiento térmico, alcanzaron valores del orden de 10^{10} esporas/g, evidenciando una eficiencia superior del sistema evaluado.

Esto demuestra que el tipo de sustrato, el pretratamiento aplicado y la suplementación nutricional influyen significativamente en la producción de esporas de *Trichoderma* sp. durante FES. Los tratamientos basados en cáscara de café y coronta de maíz sometidos a tratamiento térmico mostraron el mayor potencial, alcanzando producciones comparables o superiores a las obtenidas con arroz como sustrato tradicional, lo que respalda su uso como alternativas sostenibles para la producción de bioinsumos.

Viabilidad de esporas de *Trichoderma* sp.

Los resultados evidenciaron diferencias entre los tratamientos evaluados (Tabla 2). El tratamiento control basado en arroz con nutrientes presentó altos niveles de viabilidad. El arroz es uno de los sustratos más utilizados para la producción experimental y comercial de *Trichoderma* en sistemas de FES debido a su alto

contenido de carbohidratos y a su estructura física, que facilita la colonización micelial y la formación de conidios (García et al., 2006). Sin embargo, en muchos sistemas de producción el arroz se utiliza tradicionalmente sin suplementación adicional de nutrientes, lo que lo convierte en un punto de referencia común para evaluar la eficiencia de otros sustratos.

En el presente estudio, aunque el arroz con nutrientes presentó altos porcentajes de viabilidad ($95.3 \pm 2.4 \%$) y una concentración de 5.1×10^{10} esporas viables/g de sustrato, algunos tratamientos basados en residuos agrícolas mostraron valores comparables o superiores, lo que evidencia el potencial de estos materiales como alternativas para la producción de bioinsumos basados en *Trichoderma*. Los tratamientos basados en cáscara de café mostraron porcentajes de viabilidad conidial particularmente altos, todos superiores al 95 %, independientemente de la aplicación de tratamiento

térmico o de la suplementación con nutrientes. En particular, el tratamiento térmico de cáscara de café y suplementación de nutrientes se ubicó dentro de los grupos superiores, con una viabilidad de $98.2 \pm 0.9 \%$ y una concentración de 5.04×10^{10} esporas viables/g de sustrato.

La cáscara de café es un residuo lignocelulósico con alto potencial biotecnológico debido a su composición rica en carbohidratos estructurales, incluyendo celulosa, hemicelulosa y pectinas, fracciones más fácilmente asimilables por *Trichoderma*, que favorecen una rápida colonización inicial. Adicionalmente, su estructura porosa contribuye a una adecuada retención de humedad y aireación (Mussatto et al., 2011). La capacidad de *Trichoderma* para colonizar estos materiales está asociada a su amplio repertorio de enzimas líticas que permiten la degradación de los componentes estructurales de los residuos vegetales (Kubicek et al., 2011).

Tabla 2. Concentración de esporas viables y porcentaje de viabilidad de *Trichoderma* obtenidas en diferentes sustratos durante fermentación en estado sólido.

Ensayo	Esporas viables (esporas/g)	Viabilidad (%)
T1	$5.48 \times 10^8 \pm 9.57 \times 10^6$	90.5 ± 1.9
T2	$4.43 \times 10^8 \pm 1.50 \times 10^7$	88.9 ± 3.1
T3	$4.83 \times 10^{10} \pm 1.26 \times 10^9$	98.0 ± 2.9
T4	$3.83 \times 10^{10} \pm 1.50 \times 10^9$	92.1 ± 1.3
T5	$7.10 \times 10^9 \pm 2.94 \times 10^8$	95.6 ± 0.9
T6	$1.23 \times 10^7 \pm 1.71 \times 10^6$	29.5 ± 4.2
T7	$4.88 \times 10^{10} \pm 1.03 \times 10^9$	97.1 ± 1.9
T8	$4.77 \times 10^{10} \pm 6.83 \times 10^8$	99.4 ± 0.8
T9	$5.04 \times 10^{10} \pm 8.33 \times 10^8$	98.2 ± 0.9
T10	$1.84 \times 10^8 \pm 7.30 \times 10^6$	96.8 ± 1.4
T11	$5.10 \times 10^{10} \pm 1.63 \times 10^9$	95.3 ± 2.4
T12	$4.80 \times 10^{10} \pm 8.16 \times 10^8$	97.5 ± 1.3

Valores expresados como media $\pm$ desviación estándar (n = 4).

En los tratamientos basados en coronta de maíz, aquellos sometidos a tratamiento térmico y suplementados con nutrientes presentaron porcentajes de viabilidad elevados ($98 \pm 2.9 \%$) y una concentración de 4.83×10^{10} esporas viables/g de sustrato. Este comportamiento podría estar asociado al efecto del tratamiento térmico sobre la estructura del sustrato, el cual puede aumentar su porosidad y facilitar el acceso de los microorganismos a los polímeros estructurales de la biomasa (Kumar et al., 2009), favoreciendo tanto el crecimiento micelial como la formación de estructuras reproductivas viables (Hamrouni et al., 2025).

Por otro lado, los tratamientos que involucraron hidrólisis alcalina de la coronta de maíz presentaron resultados contrastantes dependiendo de la suplementación con nutrientes. Mientras que el tratamiento con hidrólisis alcalina y nutrientes mostró porcentajes de viabilidad de (95.6 ± 0.9), el tratamiento

sin nutrientes presentó los valores más bajos del estudio, con un porcentaje de viabilidad del (29.5 ± 4.2). Estos resultados sugieren que la suplementación nutricional podría desempeñar un papel importante en la calidad fisiológica de las esporas producidas cuando el sustrato es sometido a pretratamientos químicos.

Rendimiento de peso seco de esporas

Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron que el rendimiento de peso seco de esporas varió considerablemente entre los diferentes tratamientos evaluados, con valores que oscilaron entre 0.20 % y 3.96 %, lo que evidencia que la naturaleza del sustrato, el tratamiento previo aplicado y la suplementación nutricional influyen significativamente en la producción de esporas durante FES. Los mayores rendimientos se observaron en el tratamiento control con nutrientes con

un promedio cercano al 3.8 %, seguido por cáscara de café con tratamiento térmico y nutrientes (3.35 %) y coronta con tratamiento térmico y nutrientes (3.07 %).

Estos resultados sugieren que la combinación de un pretratamiento del sustrato y la suplementación con nutrientes minerales favorece el desarrollo del micelio y la posterior esporulación del hongo. El mayor rendimiento observado en los tratamientos con tratamiento térmico podría explicarse por la modificación de la estructura lignocelulósica del sustrato, lo que facilita la disponibilidad de nutrientes para el crecimiento del hongo.

Este resultado confirma que residuos agrícolas, como la cáscara de café y la coronta de maíz, pueden ser utilizados eficientemente como sustratos alternativos para la producción de *Trichoderma* mediante FES. La utilización de estos materiales no solo permite obtener esporas

viabiles con alto potencial biológico, sino que también contribuye a la valorización de residuos agrícolas y a la reducción de costos de producción en la elaboración de bioinsumos (Brijwani y Vadlani, 2011).

Control de calidad microbiológico

El análisis microbiológico del polvo de esporas a los 20 días en los diferentes tratamientos permitió evaluar la pureza del producto obtenido y la presencia de microorganismos contaminantes potenciales, incluyendo bacterias, mohos y levaduras (Tabla 3). Los resultados demuestran que la mayoría de los tratamientos presentaron niveles de pureza mayores al 99 % lo que evidencia un predominio casi exclusivo de *Trichoderma* sp. en el sistema de fermentación.

Tabla 3. Calidad microbiológica del polvo de esporas de *Trichoderma* sp. a los 20 días.

Ensayo	Bacterias (UFC/g)	Mohos (UFC/g)	Levaduras (UFC/g)	Pureza (%)	Contaminantes (%)
T1	0	0	6.7×10^6	99.9	0.03
T2	0	0	1.4×10^7	99.9	0.07
T3	0	0	0	100.0	0.00
T4	0	6.9×10^8	0	98.3	1.60
T5	5.0×10^4	0	0	99.9	0.00
T6	3.0×10^5	0	4.0×10^5	99.9	0.02
T7	5.0×10^4	0	0	99.9	0.00
T8	0	0	0	100.0	0.00
T9	5.0×10^4	0	0	99.9	0.00
T10	0	0	0	100.0	0.00
T11	0	0	0	100.0	0.00
T12	0	0	0	100.0	0.00

UFC/g = unidades formadoras de colonias por gramo de sustrato.

Los tratamientos que incluyeron pretratamiento térmico del sustrato, particularmente en coronta de maíz, pulpa de café tratada y arroz precocido, presentaron ausencia detectable de bacterias, mohos y levaduras, alcanzando valores de 100 % de pureza microbiológica. Este comportamiento sugiere que el acondicionamiento térmico del sustrato permitió reducir de manera efectiva la microbiota nativa presente en los residuos agrícolas, favoreciendo la dominancia del microorganismo inoculado durante el proceso de fermentación.

En contraste, algunos tratamientos sin tratamiento térmico presentaron presencia limitada de microorganismos contaminantes, principalmente levaduras. En el tratamiento correspondiente a coronta sin tratamiento y sin nutrientes se registraron aproximadamente 1.4×10^7 UFC/g de levaduras, mientras que en coronta sin tratamiento con nutrientes se observaron valores próximos a 6.7×10^6 UFC/g de levaduras. No obstante, incluso en estos casos la pureza

del sistema se mantuvo superior al 99 %, lo que indica que *Trichoderma* sp. continuó siendo el microorganismo dominante en el sustrato.

Desde el punto de vista regulatorio, los valores de pureza obtenidos se encuentran dentro de los criterios establecidos para productos microbianos utilizados en agricultura. De acuerdo con la Resolución 698 del Instituto Colombiano Agropecuario (Instituto Colombiano Agropecuario, 2011), los bioinsumos microbianos deben contener al menos 95 % del microorganismo activo dentro de la composición microbiológica total, además de no presentar microorganismos contaminantes o patógenos que puedan representar riesgos para humanos, animales o plantas.

De manera similar, lineamientos técnicos utilizados en la evaluación de productos biológicos agrícolas establecen límites máximos de microorganismos contaminantes para garantizar la estabilidad y eficacia del producto. Documentos técnicos elaborados por

CropLife, sugieren como referencia valores inferiores a 10^5 UFC/g para bacterias aeróbicas y aproximadamente 10^3 UFC/g para levaduras y mohos en productos microbiológicos destinados a uso agrícola. (CropLife International, 2012) Estos límites son utilizados como referencia técnica para el control microbiológico de biopesticidas y bioinsumos agrícolas.

Asimismo, metodologías oficiales para el recuento de agentes microbianos y contaminantes biológicos en productos de control de plagas, como las establecidas por el Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile (2022) mediante la Resolución Exenta No 723/2022, recomiendan la cuantificación sistemática de microorganismos contaminantes como parte del control de calidad de bioplaguicidas microbianos. Los resultados obtenidos en el presente estudio cumplen con este enfoque metodológico al evaluar bacterias, mohos y levaduras como indicadores de pureza microbiológica del producto.

En términos de calidad del bioinsumo, manuales técnicos especializados en formulaciones con hongos biocontroladores señalan que valores de pureza superiores al 90 % y niveles de contaminantes inferiores al 0.1 % son considerados adecuados para garantizar la estabilidad y eficacia del producto durante su almacenamiento y aplicación en campo (Báez et al., 2019). En el presente estudio, todos los tratamientos evaluados presentaron valores de pureza superiores a este criterio, lo que sugiere que el proceso de producción permitió obtener un material microbiológicamente estable.

Adicionalmente, estándares internacionales para bioinsumos agrícolas, que establecen límites máximos tolerables de aproximadamente 1×10^4 UFC/g de microorganismos contaminantes en productos microbianos destinados a aplicaciones agrícolas (Food and Agriculture Organization, 2012). Los resultados observados en la mayoría de los tratamientos se encuentran dentro de estos rangos de referencia, lo que respalda la calidad microbiológica del producto obtenido.

CONCLUSIONES

La fermentación en estado sólido permitió la producción eficiente de esporas de *Trichoderma* sp. en los diferentes sustratos evaluados, observándose un incremento progresivo de la esporulación durante el periodo de incubación y alcanzando las mayores concentraciones a los 20 días de fermentación.

La cáscara de café y la coronta de maíz sometidas a tratamiento térmico demostraron ser sustratos adecuados para la producción de *Trichoderma* sp., alcanzando concentraciones de hasta 5.04×10^{10} y 4.83×10^{10} esporas viables/g de sustrato, respectivamente, valores comparables a los obtenidos con el arroz precocido

utilizado como control. El tratamiento térmico favoreció el desempeño de ambos residuos agroindustriales, mientras que la hidrólisis alcalina de la coronta de maíz mostró un efecto desfavorable sobre la producción de esporas, especialmente en ausencia de suplementación nutricional.

Los conidios obtenidos presentaron elevados porcentajes de viabilidad en la mayoría de los tratamientos, alcanzando valores superiores al 95 % lo que evidencia una adecuada calidad fisiológica del material producido y su potencial para aplicaciones posteriores como bioinsumo agrícola.

El rendimiento de peso seco de esporas varió entre 0.20 % y 3.96 %, registrándose los mayores valores en los tratamientos que combinaron tratamiento térmico y suplementación nutricional, lo que demuestra la influencia de estos factores sobre la acumulación de biomasa fúngica.

El control de calidad microbiológico evidenció niveles de pureza entre 98.35 % y 100 %, con baja o nula presencia de bacterias, mohos y levaduras contaminantes, indicando que el proceso permitió obtener un producto microbiológicamente estable y de calidad adecuada.

BIBLIOGRAFÍA

- Agamez, E. Y., Zapata, R. I., Oviedo, L. E., & Barrera, J. L. (2008). Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. Revista Colombiana de Biotecnología, 10(2), 23-34. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77610204>
- Allori, E., Yasem, 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(1), 57-66. <https://www.ranar.org/index.php/RANAR/article/view/139>
- Bandikari, R., Poondla, V., & Obulam, V. S. R. (2014). Enhanced production of xylanase by solid state fermentation using *Trichoderma koenigii* isolate: effect of pretreated agro-residues. 3 Biotech, 6, 655-664. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0239-4>
- Báez, F., Perdomo, C., Pincay, A., Tello, C., Villamizar, L., Trevor, J., Jaronski, S., & Viera, W. (2019). Manual para el análisis de calidad de formulaciones de hongos benéficos (Manual N.º 112). INIAP - Estación Experimental Santa Catalina. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/5553>
- Brijwani, K., & Vadlani, P. V. (2011). Cellulolytic enzymes production via solid-state fermentation: effect of pretreatment methods on physicochemical characteristics of Substrate. Enzyme Research, 2011, 1-10. <https://doi.org/10.4061/2011/860134>
- Bulgari, D., Alias, C., Peron, G., Ribaud, G., Gianoncelli, A., Savino, S., Boureggha, H., Bouznad, Z., Monti, E., & Gobbi, E. (2023). Solid-State fermentation of *Trichoderma* spp.: a new way to valorize the agricultural digestate and produce value-added bioproducts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 71(9), 3994-4004. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c07388>

- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., del-Val, E., & Larsen, J. (2016). Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: Interactions with plants. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(4). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw036>
- CropLife International. (2012). Microbial pest control agents: Best practice guidelines for microbial contamination limits in biological products. CropLife International. https://croplife.org/wp-content/uploads/2024/04/MCPMAB-Biologicals-Final.pdf?utm_source=chatgpt.com
- Elósegui Claro, O., Fernández-Larrea Vega, O., Ponce Grijuela, E., Borges Marín, G., Rovesti, L., & Jiménez Ramos, J. (2009). Colecta de esporas de *Trichoderma harzianum* Rifai cepa A34 por lecho fluidizado y ciclón dual y por tamizaje vibratorio. *Fitosanidad*, 13(4), 265-270. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1562-30092009000400007
- Food and Agriculture Organization (FAO). (2012). Guidance for Harmonizing pesticide regulatory management in southeast asia. Food and Agriculture Organization. <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/3c5bbd6e-b630-4d5d-8dab-cdff0c34132d/content>
- Gao, L., Sun, M. H., Liu, X. Z., & Che, Y. S. (2007). Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. *Mycological Research*, 111(1), 87-92. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.07.019>
- 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(2), 115-121. <https://fitosanidad.edicionescervantes.com/index.php/fitosanidad/article/view/705>
- Hamrouni, R., Walker, V., Farnet-Da Silva, A.M., Bresson, H., Roussos, S., & Dupuy, N. (2025). Biopesticide Production from *Trichoderma harzianum* by Solid-State Fermentation: Impact of Drying Process on Spore Viability. *Fermentation*, 12(1), 19. <https://doi.org/10.3390/fermentation12010019>
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 43-56. <https://doi.org/10.1038/nrmicro797>
- Instituto Colombiano Agropecuario. (2011). Resolución 698 de 2011: Por medio de la cual se establecen los requisitos para el registro de bioinsumos de uso agrícola. Instituto Colombiano Agropecuario. https://www.icbf.gov.co/cargues/avance/compilacion/docs/resolucion_ica_0698_2011.htm
- Kubicek, C. P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D. A., Druzhinina, I. S., Thon, M., Zeilinger, S., Casas-Flores, S., Horwitz, B. A., Mukherjee, P. K., Mukherjee, M., Kredics, L., Alcaraz, L. D., Aerts, A., Antal, Z., Atanasova, L., Cervantes-Badillo, M. G., Challacombe, J., Chertkov, O., & Grigoriev, I. V (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biology*, 12, R40. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-4-r40>
- Kucharska, K., Rybarczyk, P., Hołowacz, I., Łukajtis, R., Glinka, M., & Kamiński, M. (2018). Pretreatment of lignocellulosic materials as substrates for fermentation processes. *Molecules*, 23(11), 2937. <https://doi.org/10.3390/molecules23112937>
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48(8), 3713-3729. <https://doi.org/10.1021/ie801542g>
- Lima, P. C., Karimian, P., Johnston, E., & Hartley, C. J. (2024). The use of *Trichoderma* spp. for the bioconversion of agro-industrial waste biomass via fermentation: a review. *Fermentation*, 10(9), 442. <https://doi.org/10.3390/fermentation10090442>
- López Martínez, T. A., Páramo Aguilera, L. A., & Delgado Silva, H. D. (2022). Reproducción masiva de hongos trichodermas previamente identificados de suelos Nicaragüenses en diferentes sustratos orgánicos. *Nexo Revista Científica*, 35(3), 700-712. <https://doi.org/10.5377/nexo.v35i03.15000>
- Michel-Aceves, A. C., Otero-Sánchez, M. A., Martínez-Rojero, R. D., Rodríguez-Morán, N. L., Ariza-Flores, R., & Barrios-Ayala, A. (2008). Producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en diferentes sustratos orgánicos. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 14(2), 185-191. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2008000200012
- Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. (2022). Resolución Exenta N.º 723/2022: Aprueba metodología de recuento de agentes microbianos de control de plagas y de contaminantes biológicos en productos microbianos de control de plagas (Código D-RIS-RAI-PA-002). Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/res_723-2022.pdf
- Moreno, R (2024). Efecto de desechos agroindustriales utilizados como sustratos en la producción de esporas de *Trichoderma harzianum* por fermentación en sustrato sólido. Universidad Nacional de Trujillo. <https://hdl.handle.net/20.500.14414/22161>
- Murthy, P. S., & Naidu, M. M. (2012). Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—a review. *Resources, Conservation And Recycling*, 66, 45-58. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2012.06.005>
- Mussatto, S. I., Machado, E. M. S., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2011). Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 661-672. <https://doi.org/10.1007/s1947-011-0565-z>
- Narwade, J.D., Odaneth, A.A., & Lele, S.S. (2023). Solid-state fermentation in an earthen vessel: *Trichoderma viride* spore-based biopesticide production using corn cobs. *Fungal Biology*, 127(7-8), 1146-1156. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2023.06.007>
- Nugra, A. N. (2018). *Evaluación de sustratos orgánicos para la propagación del Trichoderma spp.* Universidad Politécnica Salesiana Cuenca. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15121/1/UPS-CT007457.pdf>
- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 81-84. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00121-3](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00121-3)
- Perdomo, C. E., Villamizar, L. F., Báez, F. J., Viera, W. F., & Jackson, T. (2021). Evaluación de la estabilidad de cuatro sistemas de liberación para la formulación de conidios de *Trichoderma asperellum*. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 47(2), 249-258. <https://www.scielo.org.ar/pdf/ria/v47n2/0325-8718-RIA-47-02-00249.pdf>

- Pineda-Insuasti, J. A., Benavides-Sotelo, E. N., Duarte-Trujillo, A. S., Burgos-Rada, C. A., Soto-Arroyave, C. P., Pineda-Soto, C. A., Fierro-Ramos, F. J., Mora-Muñoz, E. S., & Álvarez-Ramos, S. E. (2017).
- Producción de biopreparados de *Trichoderma* spp.: Una revisión ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar. 2017;51(1):47-52. <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223153894008.pdf>
- Posada-Flórez, F. J. (2008). Production of beauveria bassiana fungal spores on rice to control the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, in Colombia. Journal Of Insect Science, 8(41). <https://doi.org/10.1673/031.008.4101>
- Rahnama, N., Mamat, S., Md Shah, U. K., Ling, F. H., Abdul Rahman, N. A., and Ariff, A. B. (2013). Effect of alkali pretreatment of rice straw on cellulase and xylanase production by local *Trichoderma harzianum* SNRS3 under solid state fermentation. BioRes, 8(2), 2881-2896. <https://doi.org/10.15376/biores.8.2.2881-2896>
- Serpa, M (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.), Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. <https://dspace.esPOCH.edu.ec/items/f0288a92-3bb9-44cc-ae43-ea6e76fa564b>
- Seyi-Amole, D., & Onilude, A.A. (2018). Influence of carbon and nitrogen sources on the spore yield of *Trichoderma harzianum* in fed-batch culture. International Journal of Microbiology and Mycology, 7(1), 18-23. https://innspub.net/download/?target=wp-content/uploads/2022/07/IJMM-V7-No1-p18-23.pdf_17733
- Steyaert, J. M., Weld, R. J., & Stewart, A. (2010). Ambient pH intrinsically influences *Trichoderma* conidiation and colony morphology. Fungal Biology, 114(2-3), 198-208. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2009.12.004>
- Yang, D., Yang, C., Zhang, X., Pan, D., Li, J., & Chen, Z. (2020). Response surface methodology applied to spores production by solid-state fermentation of *Trichoderma viride*. Chinese Agricultural Science Bulletin, 36(36), 84-92. <https://doi.org/10.11924/j.issn.1000-6850.casb20200100045>
- Zhang, J.D., & Yang, Q. (2015). Optimization of solid-state fermentation conditions for *Trichoderma harzianum* using an orthogonal test. Genetics And Molecular Research, 14(1), 1771-1781. <https://www.geneticsmr.org/articles/optimization-of-solidstate-fermentation-conditions-for-trichoderma-harzianum-using-an-orthogonal-test.pdf>
- Zin, N. A., & Badaluddin, N. A. (2020). Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. Annals of Agricultural Sciences, 65(2), 168-178. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2020.09.003>