

Producción de biopreparados de *Trichoderma* spp: una revisión

Julio Amilcar Pineda-Insuasti^{1*}, Edmundo Napoleón Benavides-Sotelo¹, Astrid Stefanía Duarte - Trujillo², Cristian Alejandro Burgos-Rada², Claudia Patricia Soto-Arroyave³, Camilo Alejandro Pineda-Soto⁴, Fernando Javier Fierro-Ramos⁵, Elsa Sulay Mora-Muñoz⁵, Sandra Elizabeth Álvarez-Ramos⁵

1 Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA). Periférico Sur s/n, Fincas San Agustín (San Antonio), Ibarra, Ecuador.

*cebaecuador@gmail.com

2 Universidad de los Llanos (UNILLANOS). Km 12 vía Puerto López, Vereda Barcelona, Villavicencio, Colombia.

3 Universidad Católica de Oriente (UCO). Sector 3, cra. 46 No. 40B 50, Rionegro, Colombia.

4 Escuela Politécnica Nacional (EPN). Ladrón de Guevara E11-253, Quito, Ecuador.

5 Universidad Técnica del Norte (UTN). Av 17 de Julio 5-21, Ibarra, Ecuador.

RESUMEN

Trichoderma spp. es un hongo cosmopolita, habitante natural del suelo, que ha mostrado ser un efectivo biocontrolador de hongos fitopatógenos. La producción de biopreparados a partir de las esporas de este hongo contribuye al desarrollo sostenible de la agricultura y permite ofertar alimentos libres de fungicidas a los consumidores. Por ello, el objetivo de este trabajo fue describir aspectos claves de la producción de biopreparados de *Trichoderma* spp., mediante una revisión de la literatura que permita el óptimo aprovechamiento de los recursos locales. Los biopreparados se pueden producir por fermentación sólida, líquida agitada, líquida estática o bifásica; y su eficiencia depende principalmente de la concentración de inóculo y la viabilidad-estabilidad de las esporas en el tiempo. Adicionalmente deben presentar bajos costos de producción, por lo que el empleo de residuos agroindustriales es una buena alternativa. PALABRAS CLAVE: biocontrolador, fermentación, viabilidad, estabilidad.

ABSTRACT

Trichoderma spp. is a cosmopolitan fungus, natural soil inhabitant, which has shown to be an effective biocontrol of plant pathogenic fungi. Production of mycopesticides from spores of this fungus contributes to sustainable development of agriculture and allows fungicides offer free food to consumers. Therefore, the aim of this study was to describe key aspects of the production of biological preparations of *Trichoderma* spp., through a literature review that allows optimal use of local resources. Mycopesticides can be produced by solid, liquid agitated, liquid static or bi-phasic fermentation; and its efficiency depends mainly on the concentration of inoculum and viability-stability of the spores in time. Additionally they must have low production costs, so that the use of agro-industrial waste is a good alternative.

KEYWORDS: biocontrol, fermentation, viability, stability.

INTRODUCCIÓN

El género *Trichoderma* spp. es un hongo cosmopolita, habitante natural del suelo con abundante materia orgánica y altas densidades de raíces, que también se puede encontrar asociado a la superficie de plantas y cortezas de madera descompuesta (1). Las especies de este género son de gran interés agrícola debido a las características antagónicas que presentan frente a hongos fitopatógenos; para ello ejecutan tres meca-

nismos de biocontrol: competencia por nutrientes o espacio, antibiosis y micoparasitismo (2-4); siendo este último su mecanismo principal de acción (5). Adicionalmente, está reportado que las celulasas producidas por este hongo son las más eficientes para la degradación de sustratos celulósicos en monómeros de glucosa (6). Por lo que se considera a *Trichoderma* spp. como uno de los hongos más útiles en la producción de enzimas industriales, la agricultura y la biorremediación (7).

A pesar de que las especies de *Trichoderma spp.* han sido evaluadas durante más de 70 años como antagonistas de hongos fitopatógenos, sólo hasta inicios del siglo XXI se empezaron a comercializar como biocontroladores agrícolas; probablemente a causa del cambio de los requerimientos del mercado de los alimentos, que exige cada vez más menor trazas de fungicidas en ellos. Las especies más comunes para este fin son *T. viride* y *T. harzianum* (8), que constituyen el ingrediente principal de los bioinsumos comercializados; siendo efectivos contra los hongos *P. nicotianae*, *R. solani*, *Pythium spp.*, *P. aphanidermatum*, *P. parasítica*, *P. capsici*, *R. rolfsii*, entre otros (9). Se conoce que aproximadamente el 90 % de los actuales micoplaguicidas para biocontrol de hongos fitopatógenos tiene como principio activo las esporas (conidios y clamidiosporas) de *Trichoderma spp.* (10,11). El tratamiento de las semillas es la forma más extensiva del uso de *Trichoderma spp.* porque asegura la protección inmediata de la plántula naciente (12). Harman (13) comparó el desarrollo de varias plantas con y sin aplicación de biocontroladores, demostrando que *Trichoderma spp.* no sólo protege la planta sino que estimula su crecimiento y absorción de nutriente.

La producción de biopreparados fúngicos para control biológico agentes tiene como objetivo transportar el mayor número posible de propágulos (esporas, para este caso) viables que pueden infectar a los hongos patógenos. Para la formulación de biopesticidas estables las estructuras morfológicas deben permanecer viables durante mucho tiempo antes y después de uso, con un tiempo mínimo de caducidad de 18 meses a 20 ° C (14). Su uso contribuye al desarrollo sostenible de la agricultura, permite responder a la demanda orgánica de alimentos y protege el entorno ecológico de la zona urbana (12). Sin embargo, uno de las mayores limitaciones de su uso y comercialización es la formulación adecuada de los biopreparados, lo que implica, asegurar su fácil aplicación, bajos costos de producción, concentración suficiente de inóculo, viabilidad de las esporas (15) y mantenimiento de la densidad de inóculo, una vez que aplicado en el suelo o sustrato, tras un período de tiempo de medio a largo plazo (16).

Bajo este contexto el objetivo de este trabajo es describir aspectos claves de la producción de biopreparados de *Trichoderma spp.*, mediante una revisión de la literatura que permita el óptimo aprovechamiento de los recursos locales y promueva el uso de biocontroladores en el agro.

PRODUCCIÓN DE BIOPREPARADOS

Existen cuatro formas fundamentales de producción: cultivos bifásicos, fermentación en estado

sólido, fermentación líquida estática y líquida agitada (17). Por lo general para la reproducción masiva de las cepas promisorias de *Trichoderma spp.* se utilizan métodos bifásicos, líquido-líquido y líquido-sólido (9). La bifásica es la más rápida, porque se produce el inóculo por fermentación líquida; que luego se usa para fermentar el sustrato sólido (18); además, está reportado que en medio líquido se producen sustancias promotoras del crecimiento de la planta como ácido indolacético, ácido giberélico, citoquininas y vitaminas (19). A continuación se exponen las principales formas de producción.

Producción por fermentación en estado sólido

Sustratos: la elección de los sustratos depende de su costo, la disponibilidad local y de los requerimientos nutricionales de la cepa (17). Por lo general se emplea el grano entero de arroz, pero tiene un costo relativamente alto en comparación con varios residuos agroindustriales (20). Por ende, se han evaluado otros sustratos como cáscaras de tomate, cascarilla de arroz, cáscara de ajo, cáscara de cacao, cáscara de ajonjolí, cáscara de cacahuete, cáscara de café, vaina de frijol, rastrojo de soya y maíz, olote de maíz, y granos de arroz, de sorgo, de alpiste y de maíz quebrado (21), paja de arroz, paja de trigo (5), estiércol de granja, pseudotallo de plátano, hojas de plátano secas (22), entre otros. Las hojas de banano enriquecidas con azúcar morena en solución a ebullición presentan la más alta producción de esporas de *Trichoderma spp.* (4.6×10^{32} UFC/g material) (22).

Preparación de inóculos: se reactivan las cepas en Agar Papa Dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) durante siete días a una temperatura de 25-28 °C, o hasta que el micelio esporule. Luego, para pruebas de germinación, se deposita un cubito de agar colonizado (0,5 cm diámetro) en 10 ml de agua destilada estéril con Tween 80 al 0,1 % y se homogeniza en un agitador vibratorio durante 30 segundos; se realizan diluciones seriadas decimales con la adición de Tween 80 al 0,1 % hasta obtener la dilución apropiada (10^{-3}) y se contabiliza en número de conidios en cámara de Newbauer (23) o en un hemocitómetro con un microscopio de contraste de fase (24). También se reportan inóculos sobre sustratos sólidos como avena, vermiculita y bentonita, homogenizados con agua (16).

Preparación de las materias primas: algunas materias primas deben sufrir un proceso de reducción de tamaño hasta obtener un tamaño de partícula de 0,5-3,0 mm (25). El sustrato molido o entero, dependiendo del caso, se lava para retirar

impurezas y se hidrata por inmersión en agua con antibiótico cloranfenicol a 500 ppm durante 45 minutos. Luego se filtra y se deposita en la bolsa de poliestireno la cantidad de sustrato apropiada para llenar sólo una tercera parte de su volumen (26). Luego se esteriliza en autoclave durante 30 minutos a una presión de 103 421 Pascales (26), aunque también se reportan condiciones de esterilización de 115 °C a 5 171 Pa durante 15 min (25) y de 120 °C por 30 minutos (27). Algunos autores mencionan que los sustratos se pueden enriquecer con melaza y urea, las cuales se disuelven en el agua de inmersión durante la hidratación de la materia prima por 2 horas (25).

Inoculación e incubación: el sustrato estéril se enfría e inocula con un cubo de agar colonizado y se incuba durante 21 días a 25 °C con suministro de aire cada cinco días (21). También se reportan 26 a 28 °C durante 8 días (25).

Formulación: formular un bioinsumo de origen fúngico consiste en adicionarle al hongo determinados compuestos como agentes humectantes, dispersantes, reguladores de la viscosidad, protectores de luz UV, atrayentes, tensoactivos, solventes, emulsificantes o gelificantes, y otros aditivos que pueden ser nutrientes o estimulantes, para favorecer la estabilidad del producto, la longevidad del hongo, mejorar su desempeño como biocontrolador y facilitar su aplicación (28). Existen aditivos dañinos a corto o mediano plazo con la pared celular de las esporas, haciéndolas inviables en pocas semanas; tal es el caso de los aceites vegetales (29,30).

Almacenamiento: el bioinsumo debe ser estable durante 6 a 18 meses bajo condiciones normales de almacenamiento, para que resulte factible la comercialización (31). La biodegradabilidad del producto está muy influenciada por la humedad y la temperatura, por lo que la tecnología de empaque es esencial para garantizar una humedad relativa baja a una temperatura de almacenamiento menor de 20 °C. Lo óptimo es almacenar los productos a humedades relativas menores del 1 % y temperaturas de refrigeración de 5 °C; sin embargo no es económicamente viable (17,29).

Rendimiento: El hongo *Trichoderma* sp, produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y conidiosporas (32); siendo estos últimos los más estables (33) gracias a su gruesa pared tricapa que les permite sobrevivir a condiciones adversas hasta que encuentren las propicias para germinar (34). Debido a esto, la viabilidad se mide como la germinación de esporas (conidios) en el sustrato. El maíz triturado (27) y el olote de maíz presentan un 99,0 % de viabilidad, seguidos por el grano de arroz con 97,5 %, la cascarilla de arroz con 97,0 % y la cáscara de ajonjolí con 95,5 % (21). En la tabla 1 se listan algunos de los medios empleados y la correspondiente producción de esporas en ellos.

Producción por fermentación líquida

Producción del inóculo: reactivar las cepas en PDA e incubar a 27 °C durante tres a cinco días, luego adicionar 10 mL de agua destilada estéril, agitar un poco, remover la suspensión de esporas en un frasco y conservar (18).

Preparación del medio de cultivo: preparar una solución acuosa de melaza al 5 %, ajustar a pH 5,5 y vertir en frascos de vidrio, llenando sólo el 40 % de su volumen. Esterilizar la solución en autoclave a 121 °C y 5 171 Pa durante 20 min, dejar reposar por 24 h y añadir 5 % de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). Finalmente, adicionar aproximadamente 5 mL de inóculo por frasco, tapar con algodón y papel aluminio, e incubar en forma estática inclinada durante 14 días (18). También se reporta a mayor escala medios de cultivo "base" constituidos por glucosa, sulfato de amonio y sales minerales (35); orujo de uva agotado al 4 %, suplementado con urea y H₃PO₄ (36). Medios con celulosa, extracto de levadura, lactosa y ácido lactobiónico promueven la producción de celulasas (24).

Rendimientos: con biorreactores alimentados se van suministrando los nutrientes de acuerdo a los requerimientos del hongo, mientras que con biorreactores en lote se suministra por única vez un medio de cultivo rico y la fermentación termina cuando este se agote. Los biorreactores

Tabla 1. Sustratos empleados para la producción de esporas de *Trichoderma* spp.

Sustrato	Suplemento	Producción de esporas (10 ⁸ ml ⁻¹)	Referencia
Olote de maíz		4,43	(21)
Grano de arroz		3,13	(21)
Cascarilla de arroz		1,47	(21)
Cáscara de ajonjolí		1,11	(21)
Cascarilla de algodón	Melaza, urea	2,10	(25)
Semillas del árbol del pan (<i>Artocarpus incisa</i>)	Melaza, urea	8,38	(25)

alimentados presentan una producción de biomasa 3,6 veces mayor que los de lote (35).

Parámetros de control

Fuente de carbono: este hongo degrada polímeros de carbono muy complejos como almidón, pectina y celulosa entre otros, gracias al complejo de enzimas hidrolíticas que produce (37). Si se emplean sustratos muy rígidos como aserrín se retarda el crecimiento del hongo; pero si por el contrario se emplean sustratos fácilmente degradables como lactosa o celobiosa, se inhibe su actividad celulasa (6).

Fuente de nitrógeno: puede asimilar compuestos nitrogenados como aminoácidos, urea, nitritos, amoníaco y sulfato de amonio (37). Sin embargo, un exceso en la concentración de nitrógeno causa inhibición del crecimiento del hongo (35).

Relación carbono-nitrógeno: la fuente carbono debe estar en exceso en el medio de cultivo mientras el contenido de nitrógeno sea limitado, lo que inhibe el crecimiento micelial y desencadena el proceso esporulativo (17).

Microelementos: los minerales, sales y vitaminas no son indispensables en grandes cantidades para el desarrollo del hongo (32) porque pasan de ser inductores a tóxicos (38); sólo se requieren trazas de hierro, cobre, zinc, manganeso y molibdeno en concentraciones cercanas a 1×10^{-9} M. Adicionalmente son necesarias las siguientes vitaminas: tiamina (B6), piridoxina (B6), ácido nicotínico (B3), ácido pantoténico (B5), riboflavina (B2), cianocobalina (B12) y ácido aminobenzoico (37). Se reportan que concentraciones de 1 a 10 mmol/L de Cd^{2+} generan cambios morfológicos y desaceleración de la tasa de crecimiento del hongo; mientras concentraciones de 1 a 5 mmol/L de Hg^{2+} generan sólo inhibición del crecimiento más mutaciones (39).

Humedad: *Trichoderma spp.* presenta bajo nivel de tolerancia osmótica (40). Un exceso de humedad baja la disponibilidad de oxígeno, limitando desarrollo del hongo, y compacta el sustrato impidiendo su colonización total. Por otro lado, una baja humedad inhibe el desarrollo del hongo al no permitir la movilidad de nutrientes en solución y secar el micelio (17). El hongo puede crecer en un rango de humedad del medio del 30 al 75 % (41), aunque algunos autores recomiendan una humedad del 70-80 % (25).

Temperatura: se han efectuado varios estudios para evaluar la influencia de la temperatura en el desarrollo de la biomasa fúngica; encontrándose que *Trichoderma spp.* puede desarrollarse en un rango de temperatura de 10-40 °C, fuera de este rango puede ocurrir desnaturalización

de proteínas, inhibición de enzimas, supresión o promoción de metabolitos, pérdida de viabilidad y muerte celular. Por otro lado, la temperatura óptima de crecimiento depende de la especie, que por lo general se ubica en un rango más estrecho, de 15-30 °C. (40,42), y la temperatura óptima de producción de celulasas está entre 25-28 °C (6).

pH: es un parámetro crítico en la viabilidad del hongo (35). La mayoría de las especies del género pueden crecer en un amplio rango de pH de 2,0-6,0, con un óptimo de 4; aunque algunos autores sugieren un rango de 4,6 a 6,8 para el crecimiento de la biomasa. Para producción de enzimas los óptimos son pH=5,0 para β -glucosidasa y celobiohidrolasa; pH=3,0 para β -xilosidasa; y pH=6,0-7,0 para proteasas (40,43). El pH se puede ajustar con ácido acético 10 % o con NaOH 2 N durante la hidratación del sustrato para fermentación sólida o en la preparación del medio líquido para fermentación sumergida (21,35).

Aire: la aireación ocasional permite un buen crecimiento y esporulación del hongo (21), ya que concentraciones de dióxido de carbono en el aire superiores al 10-15 %, producto de la respiración celular, inhiben el crecimiento (37). Para fermentación líquida se recomiendan impulsores grandes, que permiten una mejor transferencia de oxígeno (35).

Empaque: La forma de presentación de los bioproductos puede variar. Para efectos de facilidad de manipulación se prefiere la presentación sólida, principalmente: polvos humedecibles, polvos secos, formulaciones en aceite y encapsulados que contienen esporas del hongo. Sin embargo, la presentación líquida representa una alternativa para cuando la demanda es alta, ya que la producción es masiva y más rápida (18).

Biorreactores: escala semi-industrial se reportan bioceldas de poliestireno de 25x34 cm (21) y bandejas plásticas rectangulares de 30 x 15 cm (23). Agamez *et al.* (2008) modificaron estas bandejas con orificios de 2 cm de diámetro, ubicados en la parte superior de un lado de la bandeja. En estos orificios introdujeron tubos de PVC de 5,0 cm de longitud acondicionados con algodón y gasa humedecida con alcohol al 95 %. A escala industrial se reportan biorreactores de 14 L equipados con turbinas Rushton (35), biorreactores de 16 L.

CONCLUSIONES

Trichoderma spp. es un género de hongo usualmente empleado para control biológico. Biopreparados de sus esporas en solución son pro-

ducidos para pregerminar semillas o para aplicación directa en el suelo, mediante cuatro tipos de fermentación: sólida, líquida agitada, líquida estática y bifásica. La eficiencia del biopreparado depende principalmente de la concentración de inóculo y la viabilidad-estabilidad de las esporas

en el tiempo; que constituyen puntos críticos de control. Esto debe cumplir el requerimiento de unos bajos costos de producción, por lo que el empleo de residuos agroindustriales es una buena alternativa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Harman GE. The Rhizosphere. New York: Wiley and Sons; 1990. 259-280 p.
2. Chet I, Ibar J, Hadar I. Fungal antagonistic and mycoparasites. En: Wick Low DT, Soderstrom B, editores. The Mycota IV: Environmental and microbial relationships. 1a ed. New York: Springer Verlag; 1997. p. 165-92.
3. Harman GE, Kubicek C. *Trichoderma* and *Gliocladium*. 1 V, editor. London: Taylor and Francis; 1998. 25-40. p.
4. Bélanger RR, Dufour N, Caron J, Benhamou N. Chronological Events Associated with the Antagonistic Properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: Indirect Evidence for Sequential Role of Antibiosis and Parasitism. *Biocontrol Sci techol*. 1995;5(December 2012):41-53.
5. Fernández-Larrea O V. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integr Plagas (Costa Rica) [Internet]. 2001;(62):96-100. Recuperado a partir de: <http://www.sidalc.net/repdoc/A2120e/A2120e.pdf>
6. Esterbauer H, Steiner W, Labudova I, Hermann A, Hayn M. Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory and pilot scale. *Bioresour Technol*. 1991;36(1):51-65.
7. Rey M, Llobell A, Monte E, Scala F, Lorito M. 9 - Genomics of *Trichoderma*. En: Applied Mycology and Biotechnology. 2004. p. 225-48.
8. Castro C, Monte E. Molecular Characterization and Identification of Biocontrol Isolates of *Trichoderma spp*. *Molecular Characterization and Identification of Biocontrol Isolates of Trichoderma spp*. 2000;66(5):1890-8.
9. Stefanova M. Producción y aplicación de *Trichoderma spp*. como antagonista de hongos fitopatógenos. La Habana, Cuba: INISAV; 2003.
10. Woo SL, Scala F, Ruocco M, Lorito M. The Molecular Biology of the Interactions Between *Trichoderma spp.*, Phytopathogenic Fungi, and Plants. *Phytopathology*. 2006;96(2):181-5.
11. Fernandez-Larrea VO. Temas interesantes acerca del control microbiológico de plagas. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV); 2001.
12. Marusia S. Biopreparados de *Trichoderma*: Una forma de lucha efectiva contra patógenos fúngicos del suelo. *Agric Orgánica*. 1997;(2-3):24-6.
13. Harman GE. Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on. *Plant Dis*. 2000;84(4):377-93.
14. Deshpande M V. Mycopesticide Production by Fermentation?: Potential and Challenges. *Crit Rev Microbiol*. 1999;25(3):229-43.
15. Fravel DR. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu Rev Phytopathol* [Internet]. 2005;43:337-59. Recuperado a partir de: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924>
16. Martínez-Medina A, Roldán A, Lloret E, Pascual J. Formulación de *Trichoderma harzianum rifai* en la producción ecológica de plántulas de melón en semillero para el control de la fusariosis vascular. En: VIII Congreso científico de SEAE "Agricultura y Alimentación Ecológica". Bullas, España: Sociedad Española de Agricultura Ecológica (SEAE); 2008. p. 1-10.
17. Elósegui O. Métodos artesanales de Producción de Bioplaguicidas a partir de Hongos Entomopatógenos y Antagonistas. La Habana, Cuba: Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV); 2006. p. 61.
18. García R. Producción de biomasa de *Trichoderma harzianum* por fermentación líquida. *Fitosanidad*. 2006;10(4):295-8.
19. Wei L, Liang Z-H, Zhang Z-G, Luo H-R. Effects of Peptide in the Fermentation Liquid of *Trichoderma harzianum* on Nodule Microstructure and Function of Cowpea. *Acta Laser Biol Sin* [Internet]. 2006;1(1). Recuperado a partir de: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotol-JGSW200601014.htm
20. Fernandez-Larrea VO. Tecnologías para la producción de biopesticidas a base de hongos entomopa-

- tógenos y su control de la calidad. La Habana, Cuba: Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV); 2004. 10 p.
21. Michel-Aceves AC, Otero-Sánchez MA, Martínez-Rojero RD, Rodríguez-Morán NL, Ariza-Flores R, Barrios-Ayala A. Producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en diferentes sustratos orgánicos. Rev Chapingo Ser Hortíc. 2008;14(2):185-91.
 22. Thangavelu R, Palaniswami A, Velazhahan R. Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing *fusarium* wilt of banana. Agric Ecosyst Environ. 2004;103(1):259-63.
 23. Fernández-Larrea O V. Microorganismos en el control fitosanitario en Cuba: tecnologías de producción. En: III Encuentro Nacional de Agricultura Orgánica - ACAO. Villa Clara, Cuba: Universidad Central de Las Villas; 1997.
 24. Ahamed A, Vermette P. Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. Biochem Eng J. 2008;40(3):399-407.
 25. Agamez EY, Zapata RI, Oviedo LE, Barrera JL. Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma sp* . Evaluating solid fermentation processes and substrates for producing *Trichoderma sp* . spores. Rev colomb biotecnol. 2008;10(2):23-34.
 26. Michel-Aceves AC, Reyes-De la Cruz A, Otero-Sánchez M, Rebolledo-Domínguez O, Lezama-Gutiérrez R. Potencial Antagónico de *Trichoderma spp.* sobre *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. f. sp. lycopersici (Sacc.) Snyder y Hansen y *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) in vitro e Invernadero. Rev Mex Fitopatol. 2005;23(3):284-91.
 27. Leal J. A, Romero-Arenas O, Rivera T., Huerta LM. A1-223 Producción de *Trichoderma viride* en diferentes sustratos agrícolas. En: V Congreso Latinoamericano de Agroecología. La Plata, Argentina; 2015. p. 1-5.
 28. Gato Y. Métodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum* Rifai. Rev Fitosanidad. 2010;14(3):189-95.
 29. Jenkins NE, Grzywacz D. Towards the standardization of Quality Control of Fungal and Viral Biocontrol Agents. En: Lenteren van J, editor. Quality Control and Production of Biological Control Agents: Theory and Testing Procedures. Wallingford, England: CAB International; 2003.
 30. Sanyang S, Van Emden HF, Moore D. Laboratory shelf life studies of oil-formulated conidia of a locust and grasshopper pathogen *Metarhizium flvoviride* Gams & Rozsypa, in mixtures with the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin insecticide. Int J Pest Manag. 2000;46(3):165-8.
 31. Caraballo M. Formulación de hongos entomopatógenos. Manejo Integr Plagas. 1998;47:1-4.
 32. Papavizas GC. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. Ann Rev Phytopathol. 1985;23:23-54.
 33. Elad Y, Zimand G, Aviv T, Chet I. Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mould (*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse conditions. Plant Pathol. 1993;42:324-32.
 34. Elad Y, Kirshner B. Survival in the phylloplane of an introduced biocontrol agent (*Trichoderma harzianum*) and populations of the plant pathogen *Botrytis cinerea* as modified by abiotic conditions. Phytoparasitica [Internet]. 1993;21(4):303-13. Recuperado a partir de: <http://link.springer.com/10.1007/BF02981048>.
 35. Flores C, Hassan M, Corkidi G, Galindo E, Serrano-Carreón L. Producción de biomasa viable de *Trichoderma harzianum* bajo diferentes esquemas y condiciones de fermentación. En: XVI Congreso de Biotecnología y Bioingeniería de la SMMB. Puerto Vallarta, México: Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería; 2003. p. 2-3.
 36. Vaccarino C, Lo Curto RB, Tripodo MM, Patané R, Ragno A. Grape marc as a source of feedstuff after chemical treatments and fermentation with fungi. Bioresour Technol. 1992;40(1):35-41.
 37. Moore-Landecker E. Fundamentals of the Fungi. 4a ed. New Jersey: Prentice Hall; 1996. 574 p.
 38. Somashekar RK, Kulashekar MD, Prabhu MS. Toxicity of heavy metals to some fungi. Int J Environ Stud [Internet]. 1983;21(3-4):277-80. Recuperado a partir de: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0021058711&partnerID=40&md5=7db2768c27ba6ffa4f461477afc79541>
 39. Frank V, Támová G, Takácsová L. Effects of cadmium and mercury on growth and differentiation of *Trichoderma viride*. Zentralbl Mikrobiol. 1993;148:229-32.
 40. Kredics L, Antal Z, Manczinger L, Szekeres A, Kevei F, Nagy E. Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. Food Technol Biotechnol. 2003;41(1):37-42.
 41. Pérez-Guerra N, Torrado-Agrasar A, López-Macias C, Pastrana L. Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. Electron J Environ Agric Food Chem. 2003;2(3):343-50.
 42. Nampoothiri KM, Baiju T V., Sandhya C, Sabu A, Szakacs G, Pandey A. Process optimization for anti-fungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. Process Biochem. 2004;39(11):1583-90.
 43. Jackson AM, Whipps JM, Lynch JM. Effects of temperature, pH and water potential on growth of four fungi with disease biocontrol potential. World J Microbiol Biotechnol. 1991;7(4):494-501.