

Efecto del sustrato y la exposición a la luz en la producción de una cepa de *Trichoderma* sp.

Mónica Chávez-García¹; José Salvador Montaña-Lara³; María Mercedes Martínez-Salgado¹; Marcela Mercado-Reyes²; María Ximena Rodríguez³; Balkys Quevedo-Hidalgo¹

¹Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial, ²Grupo de Enfermedades Infecciosas, ³Unidad de Investigaciones Agropecuarias. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Cra. 7 N° 40-62. Bogotá. D.C., Colombia
bquevedo@javeriana.edu.co

Recibido: 07-03-2008; Aceptado 29-01-2009

Resumen

Con el fin de evaluar el efecto de las condiciones de luz sobre la producción de biomasa de una cepa de *Trichoderma* sp. en fermentación sólida y sumergida, se probaron medios arroz 53% (p/p), arroz 53% (p/p)-melaza 3% (p/p) y arroz 53% (p/p)-melaza 10% (p/p) en agua destilada, con incubación 25°C y períodos de luz constante y fotoperíodo 24 h luz/24 h oscuridad durante 8 días. Los parámetros estimados fueron densidad poblacional (conidios/mL), germinación de esporas a 24 horas y porcentaje de pureza. Los resultados indicaron que el proceso de fermentación sólida empleando como sustrato arroz-agua destilada a 25°C y la exposición constante a la luz permitió mayor recuperación de conidios (45×10^{18} conidios/mL), con 96% de germinación a 24 horas y una pureza estimada de 92,1%. En la fermentación sumergida se obtuvo un porcentaje de pureza del 76,8% y la germinación de conidios a las 24 h fue de 91,2%, mostrando como desventaja un bajo porcentaje de pureza frente a la fermentación sólida.

Palabras clave: arroz, biocontrolador, esporulación, germinación, fermentación sólida.

Abstract

Effects of substrate and light exposition in the production of *Trichoderma* sp. In order to evaluate the effect of temperature and light conditions on biomass production of a *Trichoderma* sp. strain, three culture media were tested: rice 53% (w/w), rice 53% (w/w) -molasses 3% (w/w) and rice 53% (w/w)-molasses 10% (w/w) in distilled water. Incubation conditions were: 25°C, constant light and a photoperiod of 24 h light/24 h darkness during 8 days. The evaluated parameters were population density (conidia/mL), spore germination after 24 hours and purity percentage. The results showed that solid fermentation using rice - distilled water as substrate at 25°C and constant light, allowed the highest conidia yield (45×10^{18} conidia/mL), 96% germination after 24 hours, and 92.1% purity. The liquid fermentation rendered a purity of 76.8% and conidia germination of 91.2% after 24 hours, showing a disadvantageous lower purity percentage compared to solid fermentation.

Key words: rice, biocontroller, sporulation, germination, solid fermentation.

Resumo

Efeito de substrato e exposição à luz na produção de uma cepa de *Trichoderma* sp. Com a finalidade de avaliar o efeito das condições de luz sobre a produção de biomassa de uma cepa de *Trichoderma* sp, em fermentação sólida e submersa, foram testados diferentes meios: arroz 53% (p/p), arroz 53% (p/p)-melaço 3% (p/p) e arroz 53% (p/p)-melaço 10% (p/p) em água destilada, com incubação 25°C e períodos de luz constante e fotoperíodo 24 h luz/24 h escuridão durante 8 dias. Os parâmetros estimados foram densidade populacional (conídios/mL), germinação de esporas a 24 horas e porcentagem de pureza. Os resultados indicaram que o processo de fermentação sólida usando como substrato arroz-água destilada a 25°C e exposição constante à luz, permitiu maior recuperação de conídios (45×10^{18} conídios/mL), com 96% de germinação a 24 horas e uma pureza estimada de 92,1%. Na fermentação submersa obteve-se um percentual de pureza de 76,8% e a germinação de conídios as 24 h foi de 91,2%, mostrando como desvantagem um baixo percentual de pureza frente à fermentação sólida.

Palavras chave: arroz, biocontrolador, esporulação, germinação, fermentação sólida.

INTRODUCCIÓN

Las especies de *Trichoderma* han sido reconocidas desde hace muchos años como agentes de control biológico (BCA) pero sólo hace cerca de 10 años se inició la comercialización de las mismas. Su importancia se reconoce por efecto micoparasítico y antagónico asociado a la producción de enzimas líticas (Harman *et al.*, 2004); la producción de antibióticos con características antifúngicas (Ghisalberti y Rowland, 1993; Brunner *et al.*, 2005); bioherbicidas como viridiol (rápida velocidad de crecimiento lo que hace que sea buen competidor en suelo, promotor de crecimiento vegetal (Imbar *et al.*, 1994) e indicador de resistencia (De Meyer *et al.*, 1998; Rey *et al.*, 2000; Howell, 2003; Ezziyani *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004). Igualmente este microorganismo es buen productor de xilanasas, β -glucanasas que industrialmente se sintetizan para llevar a cabo el proceso y terminado de telas denim (Buchert y Hikinheimo, 1998; Suito y Tomita, 2001). La producción de *Trichoderma* sp. se ha realizado mediante fermentación sólida, sumergida o bifásica y ha sido estudiada con diferentes sustratos como arroz, avena, soya, trigo, cebada, entre otros. Estos procesos representan una alternativa viable para producción tanto industrial como artesanal de este inoculante biológico, ya que el resultado es de alta calidad y consecuentemente el efecto del mismo en campo es apreciable. Así, al aplicar este hongo a las semillas, al sustrato en vivero, a las plantas en vivero, recién trasplantadas o plantas establecidas, éste coloniza las raíces formando una capa protectora sobre ellas por medio de diversos mecanismos.

La producción de *Trichoderma* sp. a nivel industrial y semindustrial se ha propuesto empleando diferentes sustratos sólidos como zanahoria (Castillo, 2001), bagazo de caña, cascarilla de café, arroz o mezclas de las misma fuente de carbono, teniendo en cuenta que concentraciones de carbono menores a 50 g/L pueden inhibir la conidiogénesis (Astudillo *et al.*, 1999). Igualmente se han planteado diversos tipos de fermentación, como sólida, líquida con agitación y bifásica (Lomer y Lomer, 2002), destacando como ventajas de la fermentación sólida los bajos costos. En este sistema, la humedad y tamaño de partícula en el material juega un papel fundamental (Pandey, 2003), así como otros parámetros como luz y temperatura, sabiendo que *Trichoderma* sp., es fotosensible (Domsch *et al.*, 1980) y se comporta mejor con condiciones de luz día o UV tipo A 366 nm (Fonseca, 1998), y temperaturas cercanas a los 25°C, aunque todos estos parámetros pueden variar de acuerdo con los aislamientos.

En la mayoría de fermentaciones líquidas, la concentración del sustrato se encuentra en un rango de 0,5 a 6%; esta

concentración depende de la densidad del sustrato y de los problemas reológicos que pueda causar. Esta fermentación se caracteriza por la facilidad de obtención de biomasa representada en micelio, estructuras no aptas para sobrevivir a condiciones adversas y en consecuencia débiles para el establecimiento en nuevos hábitats (Chahal, 1985; Pandey, 2003).

Aprovechando los aislamientos logrados en cultivos de crisantemo en la Sabana de Bogotá (Mantilla, 2007), el objetivo de esta investigación fue evaluar las condiciones de cultivo apropiadas para la obtención de conidios del hongo *Trichoderma* sp., en diferentes procesos fermentativos, sustrato y exposiciones a la luz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo

La cepa de *Trichoderma* sp., fue aislada a partir de suelos franco arcillosos, de un cultivo de crisantemo de 20 semanas de desarrollo (Mantilla, 2007), propagada sobre agar PDA (agar papa dextrosa) e incubada a 25°C por 8 días.

Proceso de producción de *Trichoderma* sp.

El inóculo empleado para los procesos de fermentación se preparó, a partir de un cultivo en PDA (agar papa dextrosa) con abundante crecimiento de *Trichoderma* sp., se adicionó una solución de tween 80 a 0,5% (v/v) para el desprendimiento de los conidios. La suspensión resultante se utilizó para realizar el recuento de conidios en cámara de Neubauer y posteriormente en un erlenmeyer de 1000 mL, se inoculó el 10% (v/v) de esta suspensión con concentración conocida de conidios en 200 mL de caldo arroz al 3% (p/v) (Otálora, 2001). El cultivo fue agitado a 100 rpm y 25°C durante 3 días, determinando la concentración de conidios por siembra en agar PDA mediante diluciones seriadas.

Fermentación sólida de *Trichoderma* sp.

El proceso se llevó a cabo en bolsas de polipropileno de alta densidad, depositando 200 g de arroz en cada bolsa con 176 mL de agua destilada. Éstas fueron esterilizadas en autoclave durante 7 minutos a 121°C e inoculadas con 20 mL de una solución de *Trichoderma* sp. con una concentración de 14×10^8 conidios/mL. Transcurridos 8 días de incubación en oscuridad, la matriz de arroz fue homogeneizada y se tomaron 10 g de cada bolsa, que fueron diluidos en 90 mL de una solución de tween 80 a 0,5% (v/v) para realizar la remoción de conidios y posterior recuento en cámara de Neubauer. La evaluación del porcentaje de germinación de conidios y de pureza del producto se llevó a cabo siguiendo la metodología de Vélez *et al.*

(1997). Este procedimiento se realizó con seis repeticiones en el tiempo.

Fermentación sumergida de *Trichoderma* sp.

Esta fermentación fue llevada a cabo en erlenmeyer de 500 mL, donde se adicionaron 90 mL de caldo arroz estéril 3% (p/v) y se inocularon 10 mL de la suspensión de conidios obtenida a partir del inóculo. La incubación se llevó a cabo en un agitador orbital termostataado a 100 rpm y se mantuvo a 25°C durante 8 días. Luego de este tiempo se hizo un recuento de conidios en cámara de Neubauer. La evaluación del porcentaje de germinación de conidios y de pureza del producto se realizó siguiendo la metodología de Vélez *et al.* (1997) y cada procedimiento se realizó con 6 repeticiones en el tiempo.

Evaluación de sustratos de producción

Una vez seleccionado el mejor proceso de fermentación, se procedió a evaluar el arroz como sustrato único y en mezclas con melaza como fuente adicional de C y sales. Se establecieron los tratamientos T1: arroz 53% (p/p) en agua destilada; T2: arroz 53% (p/p), Melaza 3% (p/p) y agua destilada 44% (p/p); T3: arroz 53% (p/p), melaza 10% (p/p) y agua destilada 37% (p/p) (Pérez y Ramírez, 2000). Las condiciones de fermentación fueron 25°C durante 8 días en oscuridad (Altomare *et al.*, 1999). Las variables evaluadas fueron porcentaje de pureza, porcentaje de fermentación y concentración de conidios.

Evaluación del efecto de la exposición de luz

Seleccionado el mejor sustrato y tipo de fermentación se procedió a evaluar el efecto de tres condiciones de luz a una temperatura de 25°C (**Tabla 1**), utilizando un bombillo incandescente de luz visible de 60 vatios. Finalizado cada procedimiento se determinó el recuento de conidios, el porcentaje de germinación de conidios y de pureza del producto.

Tabla 1. Tratamientos para evaluación de condiciones de luz a temperatura de 25°C

Tratamiento	Condiciones de luz
T1	Luz constante durante ocho días
T2	Oscuridad constante durante ocho días
T3	Períodos alternos de 24 h luz y 24 h oscuridad durante ocho días

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La selección del proceso de producción de *Trichoderma* sp, incluyó los siguientes parámetros: (I) densidad poblacional (concentración de conidios), (II) porcentaje de germinación de conidios a 24 horas, y (III) porcentaje de pureza. Cada uno de estos parámetros fue analizado estadísticamente de manera individual. La comparación de medias para porcentaje de pureza y densidad poblacional se realizó con el test de Wilcoxon Rank, mientras que la germinación de conidios a 24 horas se realizó mediante una prueba de hipótesis (T test para dos muestras).

En la selección del sustrato, en las pruebas de densidad poblacional y porcentaje de pureza se empleó para el análisis estadístico una prueba no paramétrica Kruskal Wallis, mientras que los resultados obtenidos en las pruebas de germinación a 24 horas fueron analizados estadísticamente por medio de una prueba de ANOVA (Daniel, 2004). El programa estadístico usado fue Stata 6.0.

La evaluación de los parámetros en la selección de las condiciones de exposición de luz, se realizó por medio de una prueba de ANOVA para los datos obtenidos en las variables densidad poblacional y germinación de esporas a 24 horas; en la variable porcentaje de pureza se empleó una prueba no paramétrica Kruskal Wallis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Proceso de producción de *Trichoderma* sp.

El inóculo inicial producido en medio Papa Dextrosa presentó una concentración de 14×10^8 conidios/mL y se incrementó al cabo de 8 días de fermentación alcanzando 24×10^{16} conidios/g en fermentación sumergida con agitación constante y 91,2% de germinación a 24 horas, cumpliendo con este parámetro; sin embargo, el porcentaje de pureza fue de 76,8%, valor no aceptado por normas de calidad (Vélez *et al.*, 1997). En la fermentación sólida se evidenció un crecimiento abundante del hongo así como una rápida colonización del sustrato en seis días, relacionado con una coloración verde oscura con una concentración de 52×10^{15} conidios/g (**Tabla 2**) y con parámetros de porcentaje de germinación y de pureza aceptados por las normas de calidad. Además presentó un aroma dulce característico, similar a coco (Harman *et al.*, 2004). El proceso de conidiogénesis en *Trichoderma* sp., bajo condiciones de cultivo sólido, está asociado a factores como el tamaño de partícula y Aw del material, que resultan adecuados cuando se emplea arroz solo o suplementado con factores de crecimiento como vitaminas, alcanzando concentracio-

nes superiores a 10^{10} conidios/g (Pandey, 2003). En el proceso de fermentación sumergida, la apariencia inicial del sustrato sólo presentó algunos cambios poco aparentes en la coloración del medio de cultivo, pero no se evidenció el color verde presentado en la fermentación sólida.

Para determinar la diferencia de los parámetros evaluados entre la fermentación sólida y la fermentación sumergida con agitación se emplearon pruebas paramétricas (t-student) y pruebas no paramétricas (Wilcoxon) según el caso, bajo un nivel de significancia del 5%. Se observaron diferencias en la concentración de conidios ($p=0,0001$) y en el porcentaje de pureza ($p=0,0001$).

Los resultados obtenidos durante la fermentación sólida confirmaron lo propuesto por Pérez - Guerra *et al.* (2003), quienes recomiendan el proceso de fermentación sólida para la obtención de biomasa fúngica, debido a su relativa alta tolerancia a bajas actividades de agua, su alto potencial para secretar enzimas hidrolíticas y a su morfología.

Del mismo modo los resultados obtenidos durante la fermentación sumergida, indican que este procedimiento, a pesar de producir una mayor cantidad de conidios/g de arroz que en la fermentación sólida, presenta inconvenientes como la contaminación bacteriana, que la hace poco interesante para la producción industrial. Desde el punto de vista de control, la producción en sistema de fermentación sólida tiene mayores ventajas que aquellas realizadas en medios líquidos, ya que la pared celular de los conidios es mucho más gruesa, persiste por más tiempo en condiciones adversas y las esporas exhiben propiedades hidrofóbicas por la acumulación de proteínas en la pared, lo que asegura una mayor adherencia a la superficie de las plantas, sustratos y otros hongos. Las formulaciones líquidas, por el contrario, poseen esporas con una pared celular más delgada, son más susceptibles a la deshidratación y radia-

ción solar, y por encontrarse en un medio líquido, las proteínas responsables de mantener la espora hidrófoba, se disuelven en el medio. Lo anterior genera menor adherencia en las esporas lo que impide su permanencia sobre el tejido vegetal, perdiéndose gran cantidad de inóculo (Howell, 2003).

Existen diferentes formulaciones de hongos antagonistas y su uso depende del modo de acción. Para uso comercial el material seco es el preferido por la importancia del peso y la manipulación de los productos durante la comercialización. Las hifas son poco resistentes al secado, por lo cual se trabaja en las formulaciones de las formas reproductoras (conidios y clamidosporas) como polvos humectables, polvo seco, formulaciones en aceite y encapsulados que contienen el hongo. Las clamidosporas son más resistentes que los conidios, pero éstos se producen en mayor cantidad por diferentes medios (Fernández-Larrea, 2001).

Evaluación del sustrato de producción para *Trichoderma* sp.

Respecto al sustrato arroz modificado, se presentaron diferencias significativas entre los tres medios de cultivo en los tres parámetros evaluados, evidenciándose que el medio de arroz al 53% (p/p) en agua destilada representa una mejor opción para la producción de este hongo, cumpliendo con los requisitos establecidos por Vélez *et al.* (1997) y por Monzón (2001) para el control de calidad de formulaciones de hongos (Tabla 3). En relación con los medios en los que se empleó melaza, los valores obtenidos no cumplen con los requerimientos de control de calidad, debido a que éste es un medio rico en nutrientes y por lo tanto, facilita el crecimiento de diferentes microorganismos. Adicionalmente, este producto puede contener sales como NaCl, KCl, los cuales han sido reportados como inhibidores de la conidiogénesis en *Trichoderma*.

Tabla 2. Parámetros evaluados en la selección de proceso de producción durante 8 días

	Fermentación sólida	Fermentación sumergida con agitación (erlenmeyer)	p*
Concentración			
de conidios (conidios/mL)	40 x 10^{16}	37 x 10^{15}	0,0001
Porcentaje germinación 24 h	92,0	91,2	0,2830
Porcentaje pureza	92,3	76,8	0,0001
(conidios/g arroz)	52 x 10^{15}	24 x 10^{16}	0,0001

*NS>0.05.

Tabla 3. Resultados evaluación de sustratos para producción de *Trichoderma* sp. en fermentación sólida

	Arroz 53% (p/p) - Agua destilada	Arroz 53%(p/p) - Melaza 3% (p/p)	Arroz 53%(p/p) - Melaza 10% (p/p)	P
Conidios/mL	40 x 10 ¹⁶	23 x 10 ¹⁰	50 x 10 ¹⁰	0,0001**
Porcentaje germinación (24h)	92,00	61,24	65,10	0,00001*
Porcentaje de pureza	92,30	42,20	38,50	0,00001**

* No paramétrica Kruskall Wallis.

** Datos paramétricos Test ANOVA.

Según los resultados de las pruebas estadísticas, se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tres tratamientos. Adicionalmente, se puede observar que la mayor concentración de conidios se obtuvo en la fermentación con medio arroz 53% (p/p) cumpliendo con los parámetros de calidad establecidos por Vélez *et al.* (1997).

En el medio de cultivo con arroz 53% (p/p) en agua destilada, *Trichoderma* sp., creció de manera abundante y uniforme sobre la superficie del sustrato con mezcla manual diaria; inicialmente se evidenció la formación de micelio de color blanco y posteriormente, se observó un cambio gradual en la coloración a verde oscuro debido a la generación de conidios. La alta producción de conidios pudo deberse a que el arroz es un sustrato rico en carbono, representado por almidón, aproximadamente 70% (FENDA, 2003), proteínas y todos los elementos traza (Mg, Zn y Cu) que requiere *Trichoderma* sp., para su crecimiento (Moore - Landecker, 1996).

Selección de las condiciones de exposición de luz para la producción de *Trichoderma* sp.

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos durante la evaluación de las condiciones de exposición a la luz. En la fermentación sólida hay un incremento de la temperatura debido a la respiración, siendo la generación de calor una desventaja del sistema de fermentación sólida (Nampoothiri *et al.*, 2004).

Se observan diferencias entre los tratamientos para la variable concentración de conidios ($p < 0.0001$), a expensas del tratamiento en oscuridad. Con respecto a las variables porcentaje de germinación y porcentaje de pureza no se observan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

A 25°C se observó una alta producción de conidios siendo la exposición a la luz un factor favorable para la conidiogénesis, con 96% de germinación y 92% de pureza.

Tabla 4. Parámetros evaluados en la selección de las condiciones de exposición de luz a 25°C en la producción de *Trichoderma* sp., por fermentación sólida

Tratamiento/Parámetros	Luz	Oscuridad	Períodos alternos (24 h luz / 24 h oscuridad)	p*
Conidios/mL	45 x 10 ¹⁸	13 x 10 ¹⁶	13 x 10 ¹⁸	<0,0001
Porcentaje de germinación (24 h)	96,0	93,6	93,1	>0,05
Porcentaje de pureza	92,1	92,7	92,5	>0,05

Datos correspondientes a tres repeticiones.

* Nivel de significancia 0,05.

za. Como reporta Moore - Landecker (1996), la luz afecta la esporulación de muchos hongos pudiendo ser inhibitoria o estimulando la producción de propágulos, y al igual que lo propuesto por este autor, la luz posee un especial efecto estimulante en la producción de esporas en algunas especies de *Trichoderma* sp., ya que la exposición permanente a la luz genera una distribución constante y uniforme de conidios en el medio, mientras que la oscuridad si bien no afecta de manera negativa el crecimiento de este hongo, no estimula el proceso de producción de conidios y por el contrario lo inhibe (Betina, 1995).

CONCLUSIONES

El proceso de fermentación sólida utilizando como sustrato arroz y agua destilada, resultó ser el método más apropiado al comparar con la fermentación sumergida para la producción de conidios del hongo *Trichoderma* sp. y cumpliendo con las normas de calidad requeridas para este tipo de productos. Estadísticamente los tratamientos que presentaron las condiciones más apropiadas para la producción del hongo biocontrolador *Trichoderma* sp., fueron T1 (exposición permanente de luz a 25°C) y T3 (períodos alternos luz/oscuridad a 25°C).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Vicerrectora Académica de la Pontificia Universidad Javeriana por su apoyo financiero para la elaboración de este trabajo (proyecto 1966).

LITERATURA CITADA

- ALTMARE, C.; NORVELL, W.A.; BJÖRKMAN, T.; HARMAN, G.E. Solubilization of Phosphates and Micronutrients by the Plant-Growth-Promoting and Biocontrol Fungus *Trichoderma harzianum* Rifai1295-22. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65 (7): 2926-2933.
- ASTUDILLO, M.; BLANCO, B.; MARTÍNEZ, M. *Establecimiento de parámetros de producción semi-industrial de T. harzianum usado en control biológico*. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana, 1999.
- BETINA, V. Photoinduced conidiation in *Trichoderma viride*. *Folia Microbiologica*; 1995, 40 (3): 219-224.
- BRUNNER, K.; ZEILINGER, S.; CILIENTO, R.; SHERIDIAN, W.; LORITO, M.; KUBICEK, C.; MARCH, R. Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviridae* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71: 3959-3965.
- BURCHERTH, J. y HIKINHEIMO, L. Cellulases processes for the textile industry. *Carbohydrate Europe*, 1998, 22: 32-34.
- CASTILLO, C. *Optimización de algunos parámetros para la producción de conidios de Trichoderma spp. en estado sólido*. Trabajo de grado. Universidad Nacional de Trujillo, Perú, 2001.
- CHAHAL, D. Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 49 (1): 205-210.
- DANIEL, W. *Bioestadística*. Cuarta edición. Limusa Weley, México, 2004, 755 págs.
- DE MEYER, G.; BIGIRIMANA, J.; ELAD y HOFLE, M. Induced systemic resistance in *T. harzianum* T39 biocontrol of *B. cynerea*. *European Journal Plant Pathology*, 1998, 104: 279-286.
- DOMSCH, K.; ANDERSON, W.; YERSON, I. *Compendium of soil fungi*. Revision of the genus *Trichoderma*. Academic Press, London, 1980, 136: 794-810.
- EZZIYYANI, M.; PÉREZ, C.; AHMED, A.; REQUENA, M. y CANDELA, M. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.). *Anales de Biología*, 2004, 26: 35-45.
- FENDA. Tablas FENDA de composición y valor nutritivo de alimentos para la formulación de piensos compuestos. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid, España, 2003, 423 págs.
- FERNÁNDEZ-LARREA, O. *Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario*. Manejo integrado de plagas. Costa Rica, 2001, 62: 96-100.
- FONSECA, L. Estudio preliminar sobre la dinámica poblacional del biocontrolador *Trichoderma* spp. en el suelo. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., 1998.
- GHISALBERTI, E. y ROWLAND, G. Antifungal metabolites from *T. harzianum*. *The Journal of Natural Products*, 1993, 56: 1799-1804.
- HARMAN, G.; HOWELL, C.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species - Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review*, 2004, 2: 43-56.
- HERMOSA, M.; GRONDONA, E.; ITURRIAGA, E.; DÍAZ-MINGUEZ, J.; CASTRO, C.; MONTE, E.; GARCÍA-ACHA, I. Molecular Characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000, 66 (5): 1890-1898.
- HOWELL, C. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, 2003, 87 (1): 4-10.
- IMBAR, J.; ABRAMSHY, S.; COHEN, D.; CHET, I. Plant growth enhancement and disease control by *T. harzianum* in

- vegetable seedlings grown under commercial conditions. *European Journal Plant Pathology*, 1994, 100: 337-346.
- LOMER, H. y LOMER, C. Pathologie insectes. Ed. Lubilosa . 2002, 244 págs.
- MANTILLA, M. *Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de crisantemo (Chrysanthemum morifolium var. yoko ono) en período de enraizamiento*. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2007.
- MONZÓN, A. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo integrado de plagas*, 2001, 63: 95-103.
- MOORE - LANDECKER, E. Fundamentals of the fungi. Ed. Prentice Hall. New Jersey, USA, 1996, 574 págs.
- NAMPOOTHIRI, K.; BAIJU, T.; SANDHYA, C.; SABU, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. *Process Biochemistry*, 2004, 39: 583-590.
- OTALORA, A. Evaluación de medios de cultivo alternos para la producción de *Trichoderma harzianum*. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2001.
- PANDEY, A. Solid Fermentation State. *Biochemical Engineering Journal*, 2003, 13: 81-84.
- PÉREZ-GUERRA, N.; TORRADO-AGRASAR, A.; LÓPEZ-MACÍAS, C.; PASTRANA, L. Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 2 (3): 343-350.
- PÉREZ, L. y RAMÍREZ, C. Efecto de las variables, condiciones de la fermentación y del sustrato en la producción de *Trichoderma harzianum*. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C. 2000.
- REY, M.; DELGADO - JARANA, J.; RINCÓN, A.; LIMON, C. y BENÍTEZ, T. Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. *Revista Iberoamericana de Micología*, 2000, 17: S31-S36.
- SUITO, M.; TOMITA, F. Review: Introduction and catabolic repression mechanism of cellulase in fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001, 92: 305-311.
- THANGAVELU, R.; PALANISWAMI, A. y VELAZHAHAN, R. Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing *Fusarium* wilt of banana. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 2004, 103 (1): 259-263.
- VÉLEZ, A.; POSADA, F.; MARÍN, M.; GONZÁLEZ, G.; OSORIO, V.; BUSTILLO, P. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Centro Nacional de Investigaciones del Café. *Boletín Técnico*, 1997, 17, 37 págs.