

EVALUACIÓN DE LA ARCILLA COMO MEDIO PARA LA CONSERVACIÓN DE *Trichoderma harzianum* Y *Trichoderma longibrachiatum*

Cristhian Junior Burgos Cobeña¹ & Ángel Monserrate Guzmán Cedeño Ms.C^{1,2}

¹Carrera de Ingeniería Agrícola, Escuela Superior politécnica agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, Campus Politécnico El Limón, Km 2.7 Vía Calceta-El Limón

²Coordinación de Investigación Científica, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, Campus Politécnico El Limón, Km 2.7 Vía Calceta-El Limón

Contacto: crisjunior94@hotmail.com

RESUMEN

La investigación se realizó en la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, con el objetivo de conservar viable en el tiempo a los hongos *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* empleando como medio de soporte arcilla proveniente de suelos orgánicos. El factor en estudio fue tiempo de secado de la arcilla con diferentes niveles de evaluación: 1, 2, 3, 4 y 6 horas de secado del portador, las unidades experimentales fueron tarrinas resistentes a altas temperaturas con capacidad para 1000 gramos. Las variables medidas fueron; evaluación del crecimiento de Unidades Formadoras de Colonias durante el secado, porcentaje de germinación de esporas, porcentaje de pureza, seguimiento de la supervivencia de los hongos inoculados en arcilla y porcentaje de humedad del portador. La evaluación durante el secado mostró que el hongo *T. harzianum* fue superior en cuanto al número de Unidades Formadoras de Colonias en todos los tiempos de secado y se mantuvo superior durante los 120 días de evaluación. Los tratamientos 1,2 y 3 horas de secado de la arcilla no cumplieron con los parámetros de calidad por altos contenidos de humedad, en cuanto al tratamiento 6 horas de secado resultó con la humedad exageradamente baja, lo cual no permitió que la mayoría de conidios llegaran con vida al proceso de evaluación; por lo tanto se concluyó que el mejor tratamiento fue el 4 horas de secado de la arcilla por contar con un adecuado porcentaje de humedad y un 95 por ciento de viabilidad de los microorganismos.

Palabras clave: Arcilla, soporte, portador, bioinsumo, viabilidad.

ABSTRACT

The research was carried out at Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, with the objective of keeping viable in time the fungi *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma longibrachiatum* using as clay support medium from organic soils. The study factor was the drying time of the clay with different levels of evaluation, which were 1, 2, 3, 4 and 6 hours of drying of the carrier, the experimental units were high temperature resistant pots with capacity for 1000 grams. The measured variables were; evaluation of growth during drying, percentage of spore germination, percentage of purity, monitoring of the survival of fungi inoculated in clay and percentage of humidity. The evaluation during drying showed that the fungus *Trichoderma harzianum*, was superior in the amount of colony forming units at all drying times and remained higher during the 120 days of evaluation. The treatments 1, 2 and 3 hours of clay drying did not meet the quality parameters due to the high moisture contents, as for the treatment 6 hours of drying resulted with the excessively low humidity, which did not allow the majority of the conidia will come alive to the evaluation process; therefore, it was concluded that the best treatment was the 4 hours of clay drying by having an adequate percentage of humidity and a 95 percent viability of the microorganisms.

KEYWORDS: Clay, support, carrier, bio-fuel, viability.

1. INTRODUCCIÓN

Debido a los daños ocasionados por el indiscriminado uso de agroquímicos de síntesis en el ecosistema y en la salud del ser humano, cobra mayor importancia el desarrollo de sistemas agroproductivos que involucren el uso de biofertilizantes, capaces de incorporar al suelo las cantidades necesarias de nitrógeno, fósforo, potasio y microelementos que requieren las plantas para su desarrollo y producción, además el uso de microorganismos antagónicos competitivos para la protección de los cultivos ante patógenos fúngicos del suelo. En especial se reportan especies de hongos del género *Trichoderma* como agente de biocontrol (Rey *et al.*, 2014).

Los estudios realizados en la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López han comprobado las diversas funciones de los hongos filamentosos *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* como aceleradores en el proceso de degradación en compostajes, así como también en el biocontrol de *Fusarium oxiporum*. y *Phytophthora* sp. (Tarazona *et al.*, 2014; Guzmán, 2015; Burgos *et al.*, 2016).

Por esa razón resulta necesaria la obtención de formulaciones sólidas de bajo costo económico para la conservación de estos microorganismos además que favorezcan su transportación y almacenamiento para su posterior uso en campo, indiscutiblemente la arcilla es un suelo de textura muy fina y es una alternativa para usarla como vehículo para la conservación de microorganismos beneficios ya que además de contar con las características deseadas se encuentra en abundancia en los suelos del valle del río carrizal.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló durante los meses marzo-septiembre del año 2017, se utilizó arcilla proveniente de suelos con cultivos orgánicos la cual fue molida y pasada por un tamiz de 0,02 mm con características fisicoquímicas detalladas en el cuadro 1 y 2; el portador se esterilizó en autoclave a una temperatura de 121°C y 15 libras de presión (15 min), durante tres días consecutivos. El secado de la arcilla se efectuó en estufa a una temperatura de 70°C por 24 horas.

Cuadro 1. Resultados de los parámetros químicos en ppm.

N	P	K	Ca	Mg	S	B	Zn	Cu	Fe	Mn
39	156	903	5410,5	923,6	15	0,66	9,8	10,5	79	39,1

Cuadro 2. Resultados de los parámetros físicos

pH	% MO	DA
7,4	3,2	0,98

a) Preparación del preinóculo

Los hongos utilizados en este estudio se tomaron de los resultados de un proyecto de investigación de la Politécnica de Manabí titulado: ***Contribución al desarrollo de una producción agropecuaria eficiente y sostenible en Ecuador con el uso de bioproductos microbianos autóctonos***. Se obtuvieron cajas Petri con abundante crecimiento de *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* y se removieron los conidios con solución de tween 80 al 0,5% y con la solución resultante se ejecutaron diluciones seriadas con base 10 hasta 10^{-9} y con las últimas tres diluciones se llevó a cabo el recuento de conidios en la cámara de Neubauer, este procedimiento se realizó cinco veces. La concentración conocida de conidios fue incubada en 500 mL de caldo arroz al 3% p/v con agitación de 250 revoluciones por minutos (rpm) durante 72 horas a una temperatura de incubación de 30°C (González y Rondón 1998 citados por Rey *et al.*, 2014).

b) Inoculación de la arcilla

Se realizó en tarrinas plásticas resistentes a altas temperaturas con capacidad para 1000 g y se utilizó 500 g de arcilla por tarrina con 225 mL de agua destilada, estas tarrinas fueron sometidas a un proceso de esterilización en autoclave durante 10 minutos a 121°C tres veces consecutivas, luego se agregó 25 mL de cultivo líquido de *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* al portador estéril y se designó como control una tarrina con el portador estéril sin inocular (Matos y Zúñiga 2003).

VARIABLES DE CALIDAD ANALIZADAS DEL INOCULANTE BIOLÓGICO A BASE DE ARCILLAS

a) Evaluación del crecimiento durante el secado

El secado se realizó en estufa a 45°C y a diferentes tiempos de evaluación (1, 2, 3, 4 y 6 horas) los cuales estuvieron codificados bajo la siguiente nomenclatura (A1= 1 hora; A2= 2 horas; A3= 3 horas; A4= 4 horas; A5= 6 horas). Después de cada tiempo de evaluación se efectuaron diluciones seriadas para su posterior siembra y recuento de UFC en placas; el medio de cultivo utilizado fue agar sabouraud (Stanier e Ingraham, 1996).

b) Porcentaje de germinación (18–24 horas)

El porcentaje de germinación de esporas se realizó en una cámara de crecimiento, que consistió en una caja de Petri que contenía papel absorbente, un triángulo de vidrio, un porta objeto y cubre objeto; se colocó un cuadrado de medio de cultivo PDA (1 cm x 1 cm) en el porta objeto, y sobre él, se aplicó una suspensión de esporas de baja concentración, con el asa de platino con diámetro de 4 mm, se efectuaron 3 observaciones con el microscopio 0, 18 y 24 horas para determinar el número de esporas germinadas (Godoy *et al.*, 2007).

c) Porcentaje de pureza

Se calculó el porcentaje de pureza mediante la metodología expuesta por Gómez y Mendoza (2014) que consistió en utilizar el medio de cultivo agar sabouraud y colocar de 10 a 15 mL por caja Petri esterilizada. Luego se tomaron los tubos de la dilución 10^{-3} de cada submuestra, se agitan en el vortex durante un minuto y se toma 50 μ L para inocular en cada caja, dispersando el inóculo con la ayuda de un rastrillo bacteriológico esterilizado. Las cajas inoculadas se incubaron a una temperatura de 27°C por 72 horas, con el fin de promover el desarrollo de las unidades formadoras de colonias (UFC). Luego se identificó el hongo deseado, se anota el número de UFC de *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* y el número de UFC de otros microorganismos (hongos, bacterias y levaduras). Para el cálculo de pureza (P) se utiliza la siguiente formula:

$$\% P = \frac{\text{UFC del hongo deseado}}{\text{UFC totales}} \times 100$$

d) Seguimiento de la sobrevivencia del hongo *T. harzianum* y *T. longibrachiatum*.

A los 7, 15, 30, 60, 90 y 120 días de almacenamiento se evaluó la sobrevivencia de las cepas fúngicas *T. harzianum* y *T. longibrachiatum*, determinando el número de unidades formadoras de colonia (UFC) por el método de dilución decimal y el recuento en placa; el medio de cultivo utilizado fue agar sabouraud.

e) Calculo del porcentaje de humedad

La determinación de humedad se la obtuvo mediante la siguiente formula:

$$Ss(\%) = \frac{(m_2 - m)}{(m_1 - m)} \times 100$$

Siendo:

Ss(%)= sustancia seca en porcentaje

m= masa de la capsula en gramos

m1= masa de la capsula con la muestra en gramos

m2= masa de la capsula con la muestra después del secado, en gramos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con tres repeticiones, los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza y prueba de Tukey, utilizando el software estadístico "infoStat" versión 2014 (Di Rienzo *et al.*, 2014).

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Variables de calidad del producto final

a) Evaluación del crecimiento durante el secado

Según López (2011) el hongo *Trichoderma* de especie *Harzianum* es más fácil reproducirlo frente a otros hongos de su mismo género ya que puede colonizarse en distintos medios de cultivos y en muchos casos si las condiciones ambientales son favorables puede crecer agresivamente en el campo; en este estudio previo a cuatro meses de evaluación de viabilidad de los hongos *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* inoculados en arcilla con 2 mm de tamaño se comprobó que el hongo *T. harzianum* obtuvo un mayor número de UFC por g de arcilla y fue superior en todos los tiempos de secado (Grafico 1).

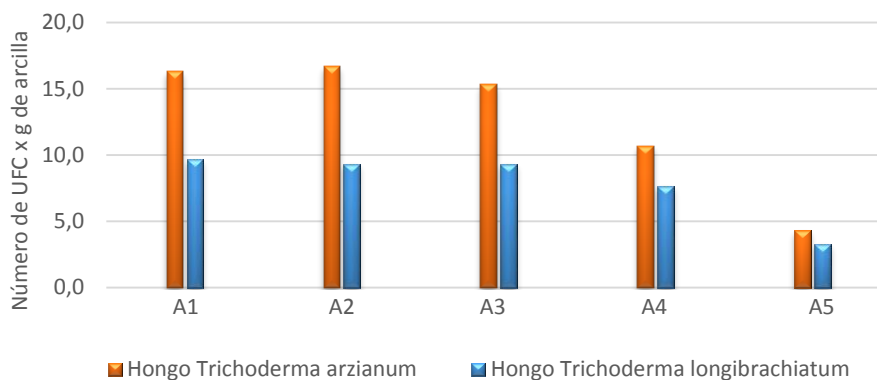


Grafico 1. Sobrevivencia de *Trichodermas* inoculados en arcilla a 45°C de temperatura y a diferentes tiempos de secado.

No obstante ambos hongos mantienen su viabilidad en todos los tiempos de secado durante la primera semana de evaluación, estos resultados pudieran deberse a que la humedad del soporte aun es alta. Según Zambrano *et al.* (2015) mencionan que cuando la humedad del vehículo permanece elevada estimula la continuidad del crecimiento de los microorganismos.

b) Porcentaje de germinación (18–24 horas)

En el cuadro 3 se detallan resultados parciales y finales de los porcentajes de germinación de esporas de *T. longibrachiatum* y *T. harzianum*, los cuales fueron levemente diferentes hasta las 18 horas, mientras que al final de la evaluación (24 horas) los porcentajes de germinación variaron notablemente con respecto a la última evaluación realizada a las 18 horas.

Cuadro 3. Porcentajes de germinación de esporas

Evaluación a las 18 horas	
Esporas	% de germinación
<i>T. harzianum</i>	39
<i>T. longibrachiatum</i>	27
Evaluación a las 24 horas	
<i>T. harzianum</i>	94
<i>T. longibrachiatum</i>	90

Según Martínez *et al.* (2013) las esporas no germinan hasta pasada las 15 horas después de la siembra debido a que durante este tiempo se completan los procesos de división celular en las hifas.

c) Porcentaje de pureza

La cantidad de UFC dentro de las cajas Petri inicialmente solo fueron de los hongos *T. longibrachiatum* y *T. harzianum* ya que no se encontraron UFC de otros microorganismos, este resultado lo corroboró el testigo (tarrina de arcilla sin inoculación de hongos) quien mantuvo un resultado de cero UFC en las cajas Petri; por lo que se testifica que la pureza inicial fue del 100% (cuadro 4).

Cuadro 4. Porcentaje de pureza inicial del bioinsumo.

Tratamientos	UFC en cajas Petri			% de pureza
	<i>T. Harzianum</i>	<i>T. Longibrachiatum</i>	Otras colonias	
A1	16,33	9,7	0	100
A2	16,7	9,3	0	100
A3	15,3	9,3	0	100
A4	10,7	7,7	0	100
A5	9,3	6,3	0	100
Testigo	0	0	0	Sin contaminación

Para el final del experimento los resultados variaron sutilmente, se mantuvieron cantidades de UFC altas y pocas UFC de otros microorganismos (cuadro 5).

Cuadro 5. Porcentaje de pureza final del bioinsumo.

Tratamientos	UFC en cajas Petri			% de pureza
	<i>T. Harzianum</i>	<i>T. Longibrachiatum</i>	Otras colonias	
A1	12,9	7,4	1,4	84
A2	12,7	7,3	1,4	83,9
A3	11,7	7,1	1,2	85,54
A4	9,9	7,4	0,5	93,7
A5	4	3	0	100
testigo	0	0	1	contaminado

d) Seguimiento de la sobrevivencia del hongo *T. harzianum* y *T. longibrachiatum*.

A través del tiempo se apreció un descenso en la viabilidad de las cepas fúngicas *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* en todos los tiempos de secado tal como lo muestran los gráficos 2, 3, 4, 5 y 6.

Sin embargo se observó un ligero incremento de UFC en los tratamientos A1, A2 y A3 durante los primeros 7 días, según Matos y Zúñiga (2003) quienes realizaron estudios similares utilizando compost y suelo orgánico indicaron que el incremento de UFC durante los primeros días es debido a la presencia de nutrientes y la humedad que aun contienen estos tipos de soportes. El tratamiento A1 con 28% de humedad obtuvo 79% de viabilidad de UFC para el *T. harzianum* y 76% para el *T. longibrachiatum* (Grafico 2); resultados que no son satisfactorios ya que una buena conservación debe mantener una viabilidad no menor al 95% (Lemus *et al.*, 2008). Cabe indicar que para obtener los resultados de porcentaje de viabilidad de los hongos se tomó como el 100% el número de UFC inicial y se comparó con el número de UFC final del bioinsumo.

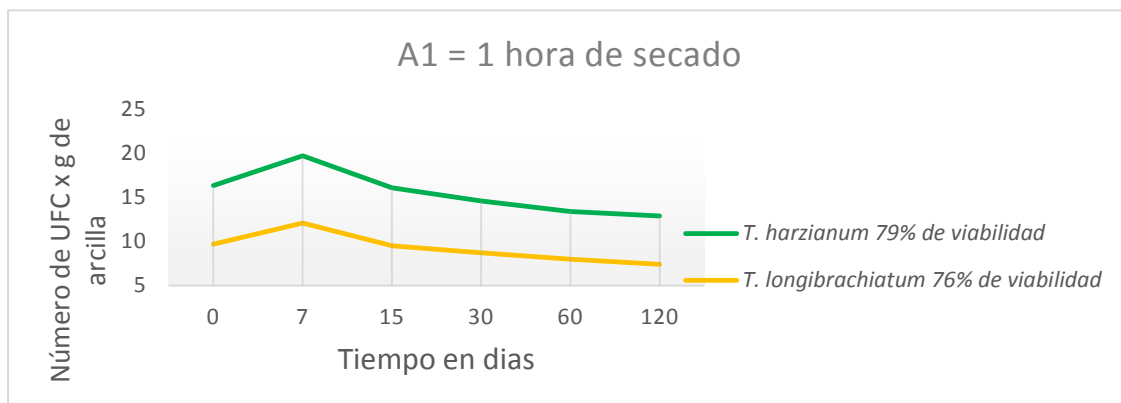


Grafico 2. UFC y viabilidad de *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* inoculados en arcilla conservados a temperatura ambiente.

El grafico 3 muestra resultados del tratamiento A2 que obtuvo una viabilidad de 76% para *T. harzianum* y 78% para *T. longibrachiatum*, dichos resultados tampoco alcanzaron la viabilidad ideal, además de mantener alto porcentaje de humedad de 21%.

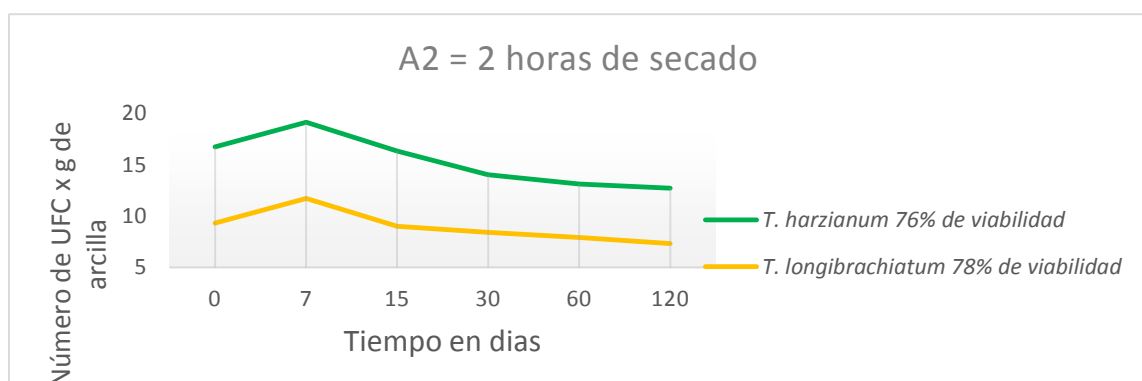


Grafico 3. UFC y viabilidad de *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* inoculados en arcilla conservados a temperatura ambiente.

Los resultados del tratamiento A3 (Gráfico 4) no son diferentes de los resultados anteriores ya que este solo obtuvo 75% viable el hongo *T. harzianum* y 76% el *T. longibrachiatum*, y humedad final fue de 16% y no es la adecuada para la latencia de los microorganismos.

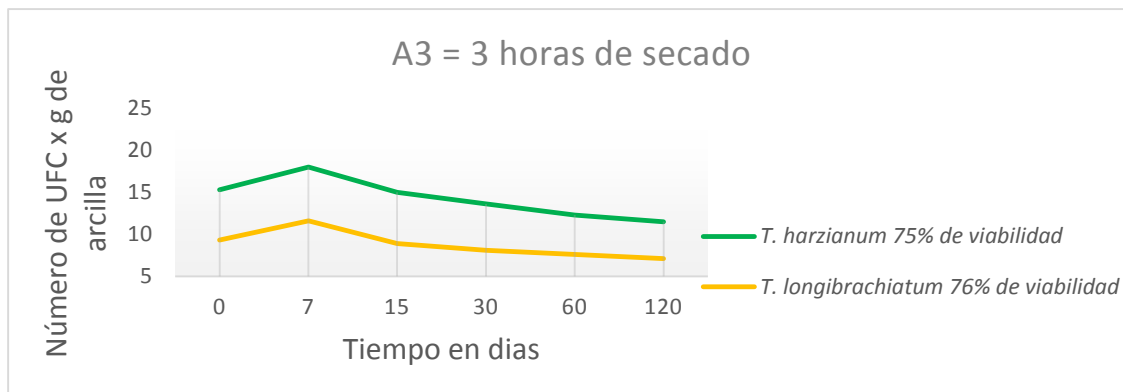


Gráfico 4. UFC y viabilidad de *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* inoculados en arcilla conservados a temperatura ambiente.

Varios autores como Lemus *et al.* (2008) y Estrada (2008) manifiestan que un vehículo o soporte debe mantener los microorganismos con una viabilidad no menor al 95%. En el gráfico 5 se muestran resultados del tratamiento A4 donde se puede observar que el hongo *T. harzianum* mantuvo una viabilidad del 95% y 96% el hongo *T. longibrachiatum*, Rodríguez (2016) indica que la humedad, la temperatura y el pH son fundamentales en el proceso de latencia de un organismo vivo, en el tratamiento A4 la humedad final fue de 6% lo que permitió que los microorganismos detengan sus actividades biológicas y entren en un periodo de latencia, lo que permitirá mantenerlos viables por mucho más tiempo; dichos resultados factibles los corroboran Lemus *et al.* (2008) quienes sustentan que la humedad final contenida en el vehículo debe estar entre 4 y 6% para que los microorganismos detengan su actividad biológica.

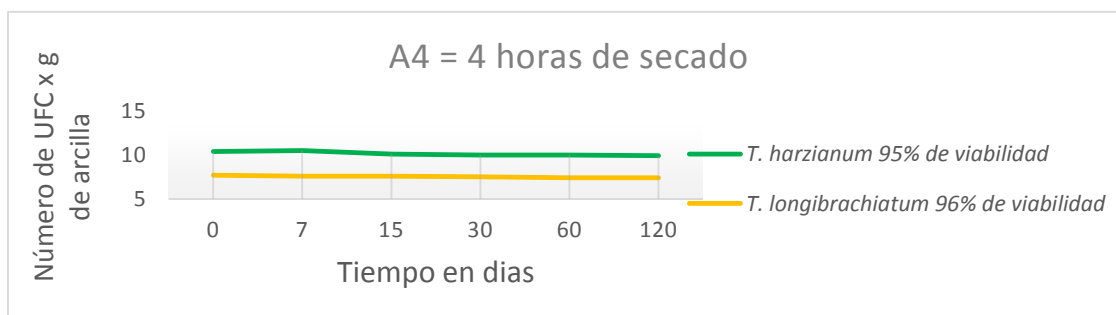


Gráfico 5. UFC y viabilidad de *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* inoculados en arcilla conservados a temperatura ambiente.

Los resultados del Tratamiento A5 (Gráfico 6) obtuvo una viabilidad del hongo *T. harzianum* de 93% e igual porcentaje de viabilidad para el hongo *T. longibrachiatum*; resultados que no son de variabilidad con respecto a la cantidad de UFC, ya que *T. harzianum* inició con un promedio de 4,3 UFC y finalizó con un promedio de 4 UFC, de la misma manera el hongo *T. longibrachiatum* inició con un promedio de 3,3 UFC y finalizó con 3 UFC; los bajos resultados de UFC pueden deberse a la prolongación del tiempo que se expuso el portador en la estufa a 45°C y provocar la muerte de la mayoría de conidios ya que el contenido de humedad final fue de 2,3%, contribuyendo a los expresado por Gómez y Mendoza (2014) quienes mencionan que con humedad menor a 3% es casi imposible de mantener vivo un microorganismo.

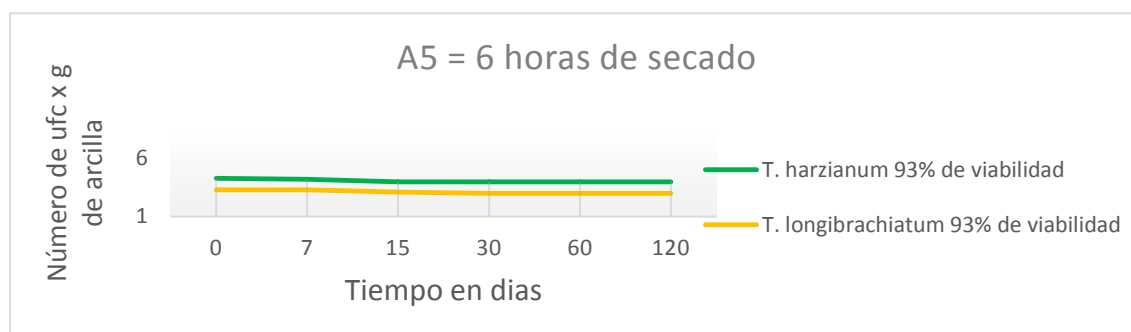


Gráfico 6. UFC y viabilidad de *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* inoculados en arcilla conservados a temperatura ambiente

e) Análisis de varianza

Según la prueba paramétrica del ANOVA muestra que en los tratamientos existe diferencia estadística tal como lo muestra el cuadro 6 de acuerdo a las medias estipuladas por el test de tukey.

Cuadro 6. ANOVA diferencias estadísticas de los promedios de viabilidad entre los tratamientos.

Tratamientos	% de viabilidad	E.E
A4	95,50	a 0,12
A5	93,00	a 0,12
A1	77,50	b 0,12
A2	77,00	b 0,12
A3	75,5	b 0,12

Probabilidad 0,0001

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

f) Humedad

Según las normas NTE INEN-ISO 11294 los inoculantes agrícolas sólidos no deben superar el 8% de humedad; en el cuadro 7 se puede observar el efecto del secado del vehículo en estufa a los cual según la prueba paramétrica de Tukey todos los tratamientos son diferentes, donde indiscutiblemente los tratamientos A1, A2 y A3 superan el contenido de humedad permisible, por otra parte Gómez y Mendoza (2014) menciona que con humedad menor a 3% es casi imposible mantener vivo un microorganismo, lo que dejaría fuera de rango el tratamiento A5 no solo por su baja humedad, sino que además consta con un bajo nivel de UFC conservados a lo largo de 120 días, quedando como mejor tratamiento el A4.

Cuadro 7. Diferencias estadísticas de promedios de los porcentajes de humedad entre tratamientos

Tratamientos	% de humedad		E.E
A4	6	a	0,12
A5	2,3	b	0,12
A3	16	c	0,12
A2	21	d	0,12
A1	28	e	0,12
Probabilidad 0,0001			

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

4. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se determinó que:

- El mejor tratamiento para la conservación de las cepas de hongos *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* fue A4 (cuatro horas de secado) por mantener un 95% de los microorganismos viables y una húmeda del 6% la cual estuvo dentro de los rangos permisibles.
- El hongo *T. harzianum* fue superior en todos los tiempos de secado en cuanto a UFC frente a *T. longibrachiatum* y se mantuvo superior durante los 120 días de evaluación.

5. LITERATURA CITADA

- Burgos, C. Tarazona, N. Zambrano, D. Guzmán, A. 2016. Evaluación de un inoculo nativo en el proceso de maduración del compostaje de residuos orgánicos agropecuarios. Calceta-Manabí-Ecuador. Universidad en el siglo XXI. ISBN 978-9942-8595-4-9.
- Estrada, H. 2008. Calidad de inoculantes almacenados a diferentes temperaturas: efecto sobre la población, humedad y pH del producto. Tesis Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, COL. p. 28.
- Di Rienzo, J. Casanova, F. Balzarini, M. Gonzales, L. Tablada, M. Robledo, C. 2014. Grupo infoStat. Fca, Universidad Nacional de Córdoba Argentina.
- Godoy, J. Valera, R. Guédez, C. cañizales, L. Castillo, C. 2007. Determinación de temperatura y humedad óptima para la germinación y esporulación de cinco aislamientos de *Beauveria bassiana*. Caracas. Revista Facultad de Agronomía. Vol. 24. N° 3. p 415-425.
- Gómez, P. Mendoza J. 2014. Guía para la producción de *Metarhizium anisopliae*. Ecuador. Revista CINCAE. Publicación técnica N° 1.
- Guzmán-Cedeño, A. M. 2015. Comportamiento del compost de residuos agropecuarios con la inoculación de un preparado microbiano autóctono de Manabí, Ecuador. Tesis. Ph.D. Ciencias Agrícolas. Universidad de Matanzas. Matanzas. Cuba. pp. 100.
- INEN. (Instituto Nacional Ecuatoriano de Normalización). 1982. Mecánica del suelo. Determinación del contenido de agua. Método de secado al horno. (En línea). Consultado 16 de enero del 2017. Formato PDF. Disponible en: <https://archive.org/details/ec.nte.0690.1982>
- Lemus, Y. Rodríguez, Ginna. Cuervo, R. Duran, J. Zuluga, C. Rodríguez, Gloria. 2008. Determinación de la factibilidad del hongo *Metarhizium anisopliae* para ser usado como control biológico contra hormigas. Colombia. Revista Científica Guillermo de Ockhan. Vol. 6. N° 1. p 91-98.
- López M., R. 2011. Detección y cuantificación de *Trichoderma harzianum*, y evaluación de su actividad biocontrol frente a la Fusariosis vascular del melón mediante la aplicación de herramientas moleculares. Tesis Doctoral. Universidad de Alicante. España.
- Martínez B.; D. Infante; Y. Reyes. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Protección Vegetal. Vol. 28. p 1.
- Matos, G. C. y Zúñiga, D. D. 2003. Variabilidad de cepas de rizobios en inoculantes basados en soportes no estériles. Revista Ecología Aplicada. Vol. 2 N° 1. p 81-85.
- Rey, A. D. Chamorro, D. R. Barahona, R. 2014. Efecto del medio de soporte en la estabilidad biológica de dos cepas de *Frankia* aisladas de *Alnus acuminata* H. B. K. Matanzas. Pastos y Forrajes. Vol. 37. N° 3. p 305-312.
- Rodríguez, M. 2016. Variabilidad de la inactivación microbiana y de la fase de latencia de los microorganismos supervivientes a un proceso de acidificación. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Madrid-España. p 75
- Stanier, R. & Ingraham, J. 1996. Microbiología. Ed. Reverté S.A. p 195.
- Tarazona, N. Zambrano, E. Lucas, L. Vélez, S. 2014. Capacidad antagonista de hongos celulolíticos frente a *Fusarium* sp. Y *Macrophomina* sp. Rev. ESPAMCIENCIA. Vol. 5 N° 2. p 118-126.
- Zambrano, D. Guzmán, A. Rondón, A. Laurencio M. 2015. Evaluación preliminar de la arcilla para la producción de inoculantes de *Trichoderma longibratium* en condiciones de laboratorio Calceta-Manabí-Ecuador. Universidad en el siglo XXI. ISBN 978-9942-8525-8-8.