

DISEÑO Y DESARROLLO DE UN PROTOTIPO DE FORMULACIÓN A BASE DE *Pseudomonas fluorescens* Ps006

Jenny Carolina Ruiz¹, Laura Villamizar, Martha Isabel Gómez y
Alba Marina Cotes

¹Laboratorio de Control Biológico, Centro de Biotecnología y Bioindustria, CBB,
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica.
lvillamizar@corpoica.org.co

Introducción

Los bioplaguicidas microbianos son productos que contienen un microorganismo o un componente de este como ingrediente activo (Fernández y Juncosa, 2002), cuya adecuada formulación los hace resistentes a condiciones abióticas tales como exposición a la luz UV, oscilaciones repentinas de temperatura, pH y humedad relativa, entre otras (Burges, 1998).

Para el desarrollo de un bioplaguicida es necesario llevar a cabo diferentes etapas tecnológicas, entre las que se destaca la preformulación, cuyo objetivo principal es la determinación de las características físicas, químicas y biológicas del principio activo (microorganismo) y de los cambios que este pueda sufrir solo o en combinación con los auxiliares de formulación necesarios para la elaboración del producto final (Gómez *et al.*, 2000).

El laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de Corpoica ha venido trabajando durante los últimos años en la búsqueda de microorganismos con potencial para el control biológico de diversos patógenos, en diferentes cultivos, seleccionando la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006 por su potencial para el control de *Olpidium virulentus* en plántulas de lechuga (*L. sativa*), por su capacidad para producir biosurfactantes y por sus actividades solubilizadora de fósforo y zoosporicida (Sastoque, 2010). Por estas

razones, el aislamiento Ps006 fue escogido como candidato para convertirse en el ingrediente activo de un bioinsumo con posible actividad antagonista de fitopatógenos e inductor del crecimiento vegetal, para el que se diseñó un sistema de entrega sólido [polvo mojable (WP)] para un principio activo a base de Ps006.

Materiales y métodos

Diseño y caracterización química, biológica y microbiológica del principio activo a base de *P. fluorescens* Ps006

Una vez determinado el tiempo óptimo de fermentación de *P. fluorescens* Ps006, se realizó la caracterización de tres lotes de dos principios activos diferentes; el primero correspondió al caldo de fermentación con células, y el segundo, al caldo sin células, retiradas filtrando el caldo de cultivo con filtros de 0,22 μm . La caracterización se realizó evaluando la concentración celular en unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL), el pH, la masa seca y la actividad biológica *in vitro*, por triplicado para cada lote.

Concentración celular: Se determinó la concentración del principio activo con células por el método de recuento en placa en medio LB. Los datos se promediaron y se determinó la desviación estándar de los mismos.

Determinación del pH. El pH de los dos principios activos se midió con un potenciómetro marca Hanna Instruments, previamente calibrado. Los datos se promediaron y se determinó la desviación estándar de los mismos.

Masa seca: Con el uso de una balanza halógena de humedad marca *KERN* se determinó el porcentaje de humedad de una alícuota de 1 mL, de cada uno de los lotes, de los dos principios activos por triplicado, estimándose el porcentaje de masa seca en el principio activo. Los datos se promediaron y se determinó la desviación estándar de los mismos.

Actividad biológica *in vitro*: La actividad biológica *in vitro* se estimó como la inhibición del crecimiento diametral de cuatro fitopatógenos modelo, por su facilidad de mantenimiento en medio de cultivo artificial y mediante la inhibición de la germinación de conidios de *Botrytis cinerea* Bo008.

Para medir la inhibición del crecimiento diametral se utilizaron los patógenos *Fusarium oxysporum* MAP5 aislado de cultivos de uchuva, *Rhizoctonia solani* Rh200, *Sclerotinia sclerotiorum* Sc021 - papa, *Botrytis cinerea* Bo008 - mora y los tratamientos evaluados (posibles principios activos del bioinsumo); fueron el caldo de fermentación con las células de Ps006 y el caldo de fermentación sin células, después de removerlas por filtración (0,22 μm). Muestras de 100 μL de cada uno de los tratamientos se sembraron en medio agar PDA y se colocó, en

el centro de la caja sobre el medio de cultivo, un disco de cinco mm de diámetro de medio de cultivo crecido con los hongos fitopatógenos de ocho días de edad. Se utilizaron tres cajas de Petri para cada uno de los hongos, con cada uno de los tratamientos provenientes de cada uno de los lotes de fermentación. El tratamiento control consistió en medio agar PDA sin inóculo bacteriano, pero inoculado con los hongos fitopatógenos de la forma descrita previamente. Las cajas se incubaron ocho días a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y transcurrido dicho tiempo se midió el diámetro de la colonia formada, realizando cuatro mediciones, una horizontal, una vertical y las dos diagonales; posteriormente se promediaron dichos datos para obtener el valor de crecimiento diametral medio de cada colonia.

Para la evaluación del efecto de los tratamientos sobre la germinación de los conidios de *B. cinerea* Bc008 se preparó una suspensión de conidios en una solución de Tween 80 al 0,5% y se ajustó a una concentración de 1×10^5 conidios/mL mediante recuento en cámara de Neubauer. Se inocularon 50 μL de la suspensión de conidios y 50 μL del tratamiento en cajas de Petri con medio agar agua y se incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 16 horas; la germinación se detuvo con una gota de azul de lactofenol. Como tratamiento control se sembraron 50 μL de la suspensión de conidios y 50 μL de medio LB estéril en cajas Petri con agar agua. El experimento contó con tres repeticiones por tratamiento.

Una vez se verificó la normalidad de los datos (Shapiro Wilk, 95%) y la homogeneidad de varianzas (Prueba de Barlett, 95%) de los mismos, los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANAVA) y una comparación de medias de Tukey, con un nivel de confianza del 95%, empleando el programa estadístico Statistix 8.0.

Desarrollo de la formulación mediante la selección del soporte sólido (vehículo) más compatible con el principio activo a base de *P. fluorescens* Ps006

Se evaluaron tres soportes sólidos denominados S1, S2 y S3 a dos humedades cada uno (10% y 20%). Para los tratamientos con 10% de humedad se mezclaron homogéneamente 180 g de cada uno de los soportes sólidos con 25,5 mL del principio activo seleccionado. Posteriormente se dispensaron muestras de 1 g de soporte inoculado con el principio activo en viales de vidrio previamente esterilizados, los cuales se sellaron con tapones de caucho y agrafes metálicos y se almacenaron a temperaturas de $8 \pm 2^\circ\text{C}$, $18 \pm 2^\circ\text{C}$ y $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Para los tratamientos correspondientes al 20% de humedad, se realizó el mismo procedimiento, cambiando únicamente la relación soporte–principio activo, para lo cual se mezclaron 150 g de soporte con 21,25 mL de caldo de fermentación (principio activo) y 21,25 mL de tampón fosfato pH 7,5.

Antes de iniciar el almacenamiento y pasados 1, 2 y 3 meses de almacenamiento se evaluó la viabilidad de *P. fluorescens* Ps006 por el método de recuento en placa

descrito previamente (resultados expresados en UFC/mL), el pH y la actividad frente a *S. sclerotiorum* Sc021 como hongo modelo. La muestra contenida en cada vial se mezcló con 9 mL de Tween 80 al 0,5% y se agitó para su posterior homogenización. Para la evaluación de la actividad biocontroladora de cada tratamiento, muestras de 100 µL de cada uno de los tratamientos reconstituidos se sembraron en cajas de Petri con medio agar PDA y se colocó, en el centro de la caja sobre el medio de cultivo, un disco de cinco mm de diámetro de medio crecido con *S. sclerotiorum* Sc021. Se utilizaron tres cajas de Petri por cada uno de los tratamientos. El tratamiento control negativo para la evaluación de la inhibición de crecimiento diametral consistió en el medio agar PDA sin inóculo bacteriano. Las cajas se incubaron ocho días a 25 ± 2°C y transcurrido dicho tiempo se determinó el crecimiento diametral como se describió anteriormente.

Antes de mezclar el principio activo con los soportes se evaluó su viabilidad y su actividad biológica sobre el crecimiento diametral de *S. sclerotiorum* Sc021. Como control negativo se determinó también la actividad de los soportes solos, mezclados con agua estéril sobre el crecimiento de dicho patógeno. Con los resultados iniciales y finales se calculó la pérdida de viabilidad y la actividad biocontroladora, utilizando las siguientes fórmulas:

$$\text{Pérdida de viabilidad (\%)} = \frac{(\text{Viabilidad inicial} - \text{Viabilidad final})}{\text{Viabilidad inicial}} * 100$$

$$\text{Pérdida de actividad (\%)} = \frac{(\% \text{ inhibición inicial del patógeno} - \% \text{ inhibición final del patógeno})}{\% \text{ inhibición inicial del patógeno}} * 100$$

El diseño fue completamente al azar con medidas repetidas en el tiempo. En cada tiempo de medición se evaluaron dos viales de cada tratamiento por triplicado. Una vez se verificó la normalidad de los datos (Shapiro Wilk, 95%) y la homogeneidad de varianzas (Prueba de Barlett, 95%) de los mismos, los resultados se analizaron mediante un ANAVA y una comparación de medias de Tukey, con un nivel de confianza del 95%, empleando el programa estadístico Statistix 8.0.

Resultados y discusión

Diseño y caracterización química, biológica y microbiológica del principio activo a base de P. fluorescens Ps006

Los resultados obtenidos al caracterizar los dos posibles principios activos se presentan en la Tabla 1:

Tabla 1. Características químicas y microbiológicas de tres lotes de principios activos a base de Ps006

Tratamiento	Características	Lote A	Lote B	Lote C	Promedio	DS
Caldo de fermentación con células	Concentración de Ps006 (UFC/mL)	6,73x10 ⁹	8,07x10 ⁹	8,93x10 ⁹	7,91x10 ⁹	7,32x10 ⁸
	pH	8,68	8,65	8,64	8,66	0,020
	Peso seco (%)	1,85	1,68	1,59	1,71	0,13
Caldo de fermentación sin células	pH	8,44	8,43	8,46	8,44	0,015
	Peso seco (%)	1,51	1,34	1,33	1,40	0,10

En la Figura 1 se observa la actividad biocontroladora *in vitro* del principio activo con células y sin células, frente a los cuatro patógenos evaluados. Se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos en los que se usó el principio activo con células y en los que se usó el principio activo sin células, con los cuales no se obtuvo inhibición de crecimiento diametral en ningún caso, en comparación con el caldo de fermentación con células que causó inhibiciones de *R. solani* Rh200, *B. cinerea* Bc008, *S. sclerotiorum* Sc021 y *F. oxysporum* MAP5 del 87,40%, 90,89%, 93,64% y 55,21%, respectivamente.

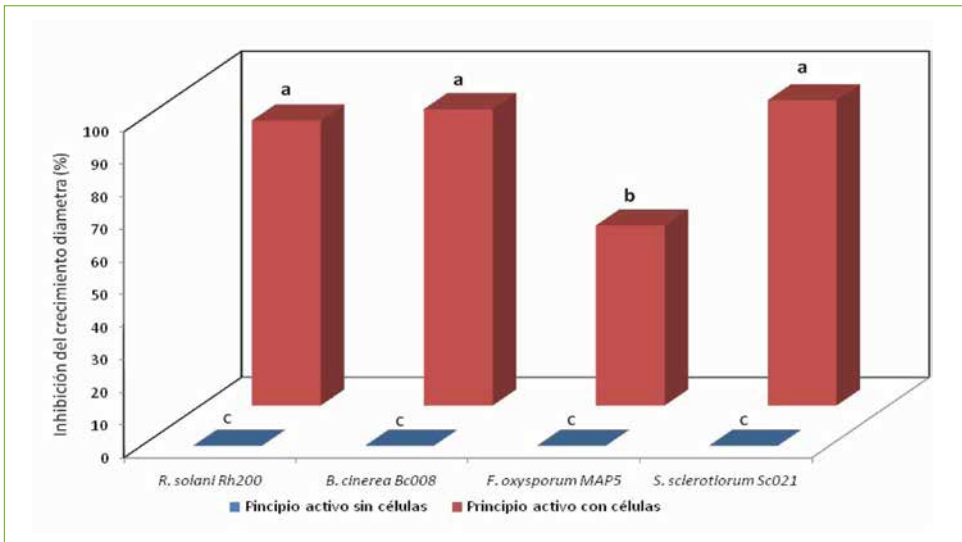


Figura 1. Actividad biocontroladora *in vitro* de dos principios activos a base de Ps006: inhibición del crecimiento diametral. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey (95%).

La actividad antagonista de *P. fluorescens* contra *Fusarium* sp., *Botrytis* sp., *Sclerotinia* sp. y *Rhizoctonia* sp. ya ha sido descrita anteriormente; por ejemplo, para *F. oxysporum* se obtuvo un control del 81,21% en condiciones de campo

(Manikandan *et al.*, 2003), para *R. solani* se observaron disminuciones de la intensidad de la enfermedad del 42% (Rabrindran *et al.*, 1996) y del 47,89% (Commare *et al.*, 2002) en condiciones de invernadero, para *Botrytis* sp. se obtuvo una disminución del crecimiento *in vitro* del 67,7% (Mikani *et al.*, 2008) y para *S. sclerotiorum* una reducción de la incidencia de la enfermedad del 26,3% en condiciones de campo (Fernando *et al.*, 2007), lo que demuestra el potencial que tiene *P. fluorescens* para emplearse como principio activo de bioplaguicidas para diferentes patosistemas.

En cuanto a la actividad biocontroladora evaluada como la inhibición de la germinación de los conidios de *B. cinerea* Bc008, el principio activo con células causó una reducción de la germinación del 46,10%, valor que fue significativamente mayor ($F=29,1$; $df=1$; $P=0,0001$) que el obtenido con el principio activo sin células con un 4,68% de inhibición (Figura 2). En la Figura 3 se observa que el tubo germinal de los conidios expuestos al principio activo con células de Ps006 tienen un tamaño considerablemente menor que el de los conidios del tratamiento control y aquellos que se expusieron al principio activo sin células, evidenciándose también un efecto sobre la extensión del tubo germinal y en consecuencia sobre el crecimiento del micelio.

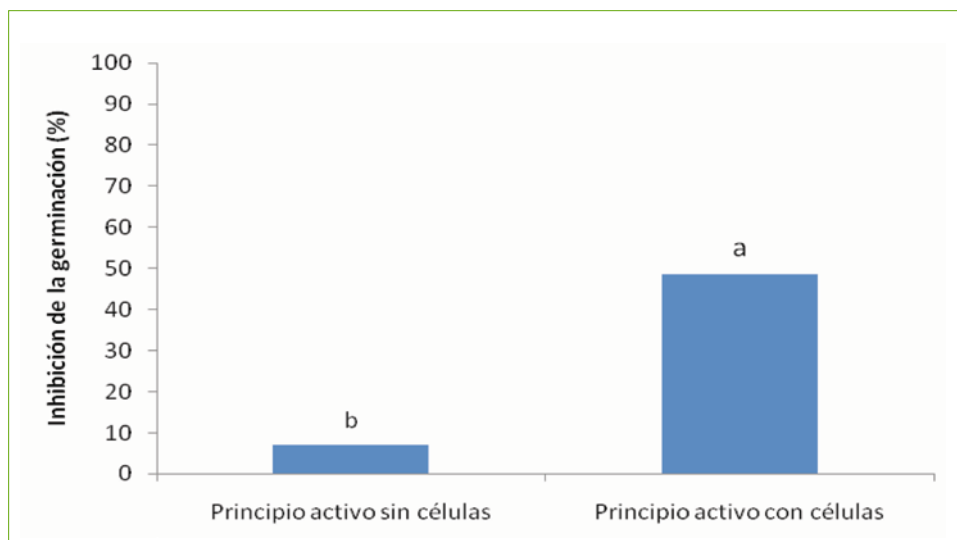


Figura 2. Actividad biocontroladora *in vitro* de dos principios activos a base de Ps006: inhibición de la germinación de *B. cinerea* Bc008. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de DMS (95%).

Estos resultados permiten concluir que la actividad antagonista es ejercida por las células bacterianas y no por el medio de cultivo o los metabolitos excretados a este durante la fermentación. Este efecto fue sugerido por Commare y colaboradores (2002), que atribuyeron la actividad antagonista de formulaciones

de talco con *P. fluorescens* como principio activo, a la competencia por espacio, evidenciándose un control de *R. solani* del 47,9% en condiciones de invernadero. En estudios realizados por Valencia y colaboradores (2005) también se concluyó que la actividad de *P. fluorescens* ZUM80 sobre *F. oxysporum* se debió a la competencia por nutrientes, al privarlo del hierro disponible en el medio con la producción de sideróforos, capacidad antagónica que se vio favorecida cuando la bacteria tuvo un tiempo de preexposición en el medio. Sin embargo, en estudios realizados por Khanam y colaboradores (2005) se encontró que el ácido salicílico que produce *P. fluorescens* inhibe la formación de estructuras de infección, tales como el tubo germinal y los apresorios en *B. cinerea*, lo que sugiere que además del efecto competitivo que ejerce *Pseudomonas* sp. sobre los patógenos, existe la producción de ciertos metabolitos con actividad antagónica efectiva.

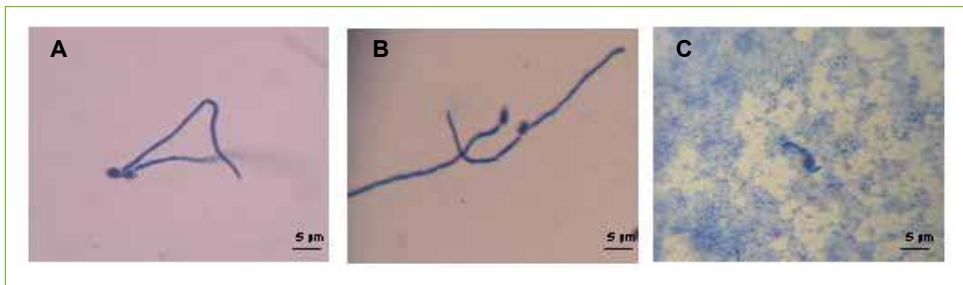


Figura 3. Germinación de los conidios de *B. cinerea* Bc008 a las 16 horas de incubación. **A.** Tratamiento control. **B.** Principio activo sin células. **C.** Principio activo con células.

Se seleccionó el caldo de fermentación completo de 48 h de incubación, incluyendo la biomasa de *P. fluorescens* Ps006 como el principio activo para iniciar el desarrollo del bioplaguicida, debido a que este presentó una mayor actividad biológica frente a los patógenos evaluados, que la obtenida con el caldo de fermentación sin células.

Desarrollo de la formulación mediante la selección del soporte sólido (vehículo) más compatible con el principio activo a base de *P. fluorescens* Ps006

pH:

El pH del sistema con el soporte S1 osciló entre 7,83 y 8,99 para las diferentes humedades y temperaturas de almacenamiento. Para el soporte S2 el pH estuvo entre 5,70 y 7,03, y para el soporte S3 osciló entre 8,55 y 9,66. Se evidenció que el soporte S2 tiene un carácter más ácido que los soportes S1 y S3. El pH de los tratamientos cambió significativamente ($F=1072$; $df=23$, $P<0,0001$) a través del tiempo a las tres temperaturas evaluadas para la mayoría de los tratamientos (Figura 4). Sin embargo, con el soporte S2 al 20% no se evidenció un cambio significativo del pH durante los tres meses de almacenamiento.

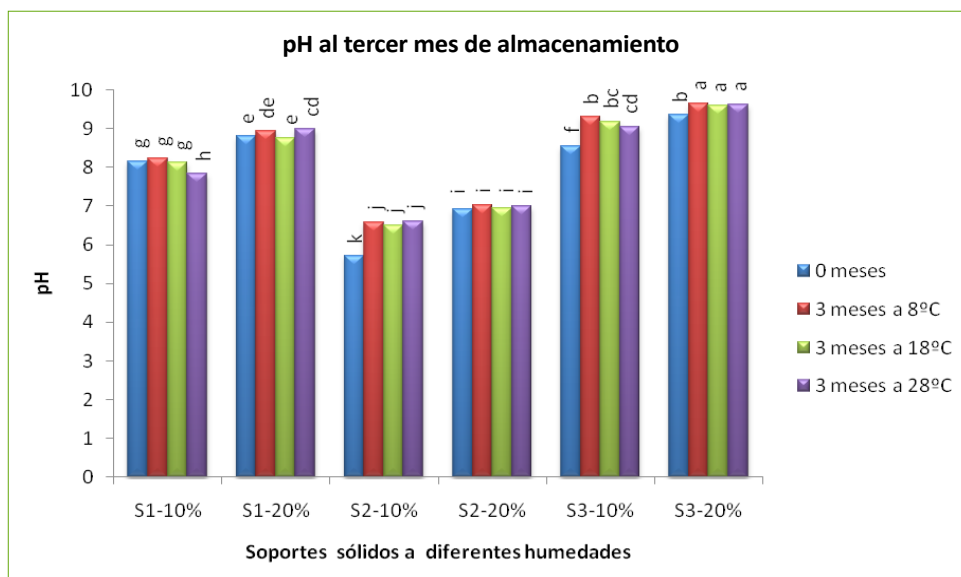


Figura 4. Cambio del pH de la mezcla del principio activo de Ps006 con soportes sólidos después de tres meses de almacenamiento a diferentes temperaturas. S1-10%: soporte 1 al 10% de humedad. S1-20%: soporte 1 al 20% de humedad. S2-10%: soporte 2 al 10% de humedad. S2-20%: soporte 2 al 20% de humedad. S3-10%: soporte 3 al 10% de humedad. S3-20%: soporte 3 al 20% de humedad. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey (95%).

El principio activo mezclado con el soporte S2 al 20% de humedad fue el sistema que presentó valores de pH más cercanos a la neutralidad (6,92 - 7,03), lo que probablemente favoreció la estabilidad del principio activo, considerando que las bacterias del género *Pseudomonas* tienen un pH óptimo cercano a 7 (Madigan *et al.*, 2009). Adicionalmente, esta característica fue estable durante los tres meses de almacenamiento, así como lo fue la viabilidad y la actividad, lo que podría sugerir que la estabilidad de la biomasa de Ps006 en almacenamiento se ve influenciada de manera importante por el pH del medio.

Viabilidad

Las viabilidades iniciales del principio activo con el soporte S1 al 10% y al 20% de humedad, el soporte S2 al 10% y al 20% de humedad y el soporte S3 al 10% y al 20% de humedad fueron de $1,4 \times 10^9$ UFC/g, $1,6 \times 10^9$ UFC/g, $1,7 \times 10^6$ UFC/g, $2,6 \times 10^7$ UFC/g, $1,3 \times 10^9$ UFC/g y $1,2 \times 10^9$ UFC/g, respectivamente. Después de tres meses de almacenamiento a una temperatura de 8°C se obtuvo para el soporte S1-10% una viabilidad de $7,7 \times 10^7$ UFC/g y para S1-20% de $2,3 \times 10^8$ UFC/g. Para el soporte S2 y S3 al 10% de humedad la viabilidad se redujo a $1,0 \times 10^2$ UFC/g, para S2-20% a $1,4 \times 10^7$ UFC/g y finalmente para el soporte S3-20% la viabilidad final fue de $5,8 \times 10^6$ UFC/g (Figura 5).

Los resultados expresados en UFC/g fueron analizados mediante una prueba de comparación de medias de Tukey (95%). Todos los tratamientos presentaron una disminución de la viabilidad a través del tiempo de almacenamiento. Sin embargo, esta reducción fue estadísticamente significativa ($F=23$; $df=23$; $P<0,0001$) para los soportes S1 y S3 a las dos humedades evaluadas y S2 al 10%, pero no para el soporte S2 al 20%, sugiriendo que a esta temperatura el principio activo fue más estable cuando se mezcló con el soporte S2 a la mayor humedad evaluada.

A $18 \pm 2^\circ\text{C}$ las viabilidades finales de Ps006 después de tres meses de almacenamiento fueron para el soporte S1-10% de $1,2 \times 10^7$ UFC/g y de $4,7 \times 10^7$ UFC/g para S1-20%. Para el soporte S2-10% fue de $1,0 \times 10^2$ UFC/g y para S2-20% de $2,1 \times 10^7$ UFC/g. Finalmente, para el soporte S3-10% fue de $1,0 \times 10^2$ UFC/g y de $2,6 \times 10^6$ UFC/g para S3-20%. Tanto a $18 \pm 2^\circ\text{C}$ como a $8 \pm 2^\circ\text{C}$ se evidenció una reducción progresiva y significativa ($F=231$; $df=23$; $P<0,0001$) de la viabilidad a través del tiempo de almacenamiento con los soportes S1 y S3 en las dos humedades evaluadas. Nuevamente el principio activo con el soporte S2 fue el tratamiento más estable, ya que no presentó diferencias significativas entre la viabilidad inicial y la obtenida después de tres meses de almacenamiento.

Cuando el almacenamiento se realizó a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ se obtuvo una viabilidad promedio a los tres meses de almacenamiento de $1,6 \times 10^6$ UFC/g para el soporte S1-10% y de $3,1 \times 10^6$ UFC/g para dicho soporte al 20% de humedad. Para el soporte S2-10% la viabilidad fue de $1,0 \times 10^2$ UFC/g y de $1,0 \times 10^7$ UFC/g para S2-20% y para el soporte S3-10% la viabilidad se redujo a $1,0 \times 10^2$ UFC/g y a $1,03 \times 10^3$ UFC/g para S3-20%. A $28 \pm 2^\circ\text{C}$ se observó la misma tendencia que en las temperaturas $8 \pm 2^\circ\text{C}$ y $18 \pm 2^\circ\text{C}$, con una disminución progresiva y significativa ($F=255$; $df=23$; $P<0,0001$) de la viabilidad a través del tiempo para los soportes S1 y S3 en las dos humedades evaluadas y el soporte S2 a la menor humedad. El soporte S2-20% nuevamente fue con el que se obtuvo la mayor estabilidad.

En la Figura 5 se presenta la pérdida total de viabilidad del principio activo después de tres meses de almacenamiento a las tres temperaturas evaluadas, donde se observa que para el soporte S1-10% se obtuvieron porcentajes de pérdida entre el 14% y el 31,9%, y para S1-20% entre el 9,6% y el 33,2%. Para el soporte S2-10% a las tres temperaturas se obtuvo una pérdida de viabilidad del 67,7% y para S2-20% la reducción de la viabilidad osciló entre el 2,3% y el 9,4%. Finalmente para el soporte S3-10% en las tres temperaturas se obtuvo una pérdida del 78,1% y para S3-20% de humedad reducciones entre el 25,7% y el 69,6%.

Con esta variable se evidencia que las humedades del 10% y 20% tuvieron un efecto en la estabilidad de Ps006, siendo la pérdida de viabilidad con los soportes S2 y S3 al 10%, significativamente ($F=402$; $df=17$; $P<0,0001$) mayor que para los

sistemas con el 20% de humedad. Esto puede deberse a que los tratamientos con el 20% de humedad incluyeron en sus componentes un tampón pH 7,5, el cual ejerce un control en el estado iónico de la formulación haciéndolo menos susceptible a cambios bruscos de pH. Esto posiblemente brindó mayor estabilidad al principio activo, ya que las fluctuaciones bruscas de pH pueden afectar la envoltura celular, la morfología celular y desnaturalizar enzimas.

Con el soporte S1 a las dos humedades y con los soportes S2 y S3 al 20% de humedad se observó que la pérdida de la viabilidad aumentó a medida que aumentó la temperatura de almacenamiento. Este efecto lo describieron Kinay y Ildis (2008), que evaluaron formulaciones de *Pichia guilliermondii* y observaron que las almacenadas a 4°C fueron más estables que las almacenadas a 24°C. Esto podría deberse a que a bajas temperaturas la velocidad de crecimiento de los microorganismos disminuye y los períodos de latencia se alargan considerablemente.

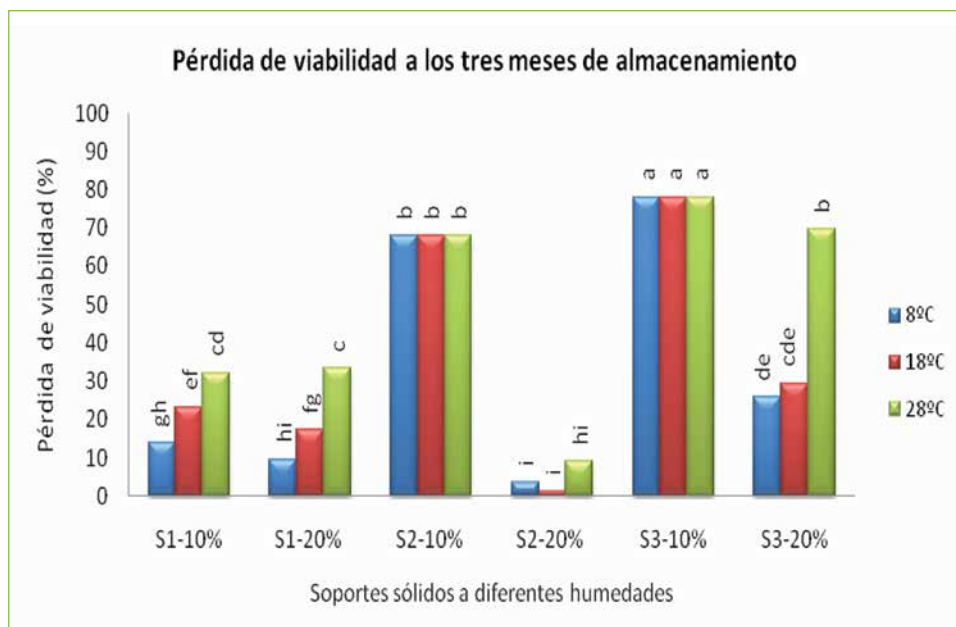


Figura 5. Pérdida de viabilidad del principio activo de *P. fluorescens* Ps006 almacenado con los soportes sólidos durante tres meses. S1-10%: soporte 1 al 10% de humedad. S1-20%: soporte 1 al 20% de humedad. S2-10%: soporte 2 al 10% de humedad. S2-20%: soporte 2 al 20% de humedad. S3-10%: soporte 3 al 10% de humedad. S3-20%: soporte 3 al 20% de humedad. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey (95%).

Actividad biocontroladora

Para el soporte S1-10% la actividad se redujo entre el 76,4% y el 97,6%, y para S1-20% entre el 79,5% y el 100% a las tres temperaturas evaluadas. Respecto a los

soportes S2 y S3 al 10% de humedad se obtuvo una pérdida total de actividad después de tres meses de almacenamiento a las tres temperaturas (Figura 6). Para el soporte S2-20% se presentaron pérdidas del 16,1% al 41,7%. Finalmente, para el soporte S3-20% a $8 \pm 2^\circ\text{C}$ se obtuvo una pérdida de actividad antagónica del 10,2% a $18 \pm 2^\circ\text{C}$ del 13,7% y a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ del 100%.

Se observó que la temperatura no tuvo un efecto significativo sobre la pérdida de la actividad antagónica para los tres soportes evaluados a las humedades del 10% y del 20%, a excepción del soporte S3-20%, con el que se obtuvo una pérdida significativamente mayor a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ que a $8 \pm 2^\circ\text{C}$ y a $18 \pm 2^\circ\text{C}$. La humedad de los sistemas tuvo un efecto significativo sobre la actividad antagónica del principio activo de Ps006 mezclado y almacenado con los soportes S2 y S3, siendo más estables las mezclas con el 20% de humedad. La pérdida de viabilidad del soporte S2 con una humedad del 20% fue significativamente menor que la del resto de los tratamientos, resultado coherente con el obtenido para la variable pérdida de actividad biocontroladora, con la cual fue el tratamiento más estable.

Resultados similares observaron Wiyono y colaboradores (2008), que reportaron que formulaciones de *P. fluorescens* B5 en soportes sólidos como aserrín, tierra de diatomeas, bentonita, harina de algodón y turba con un contenido de humedad del 60%, tuvieron mayor actividad antagónica que aquellas con un contenido de humedad del 10%.

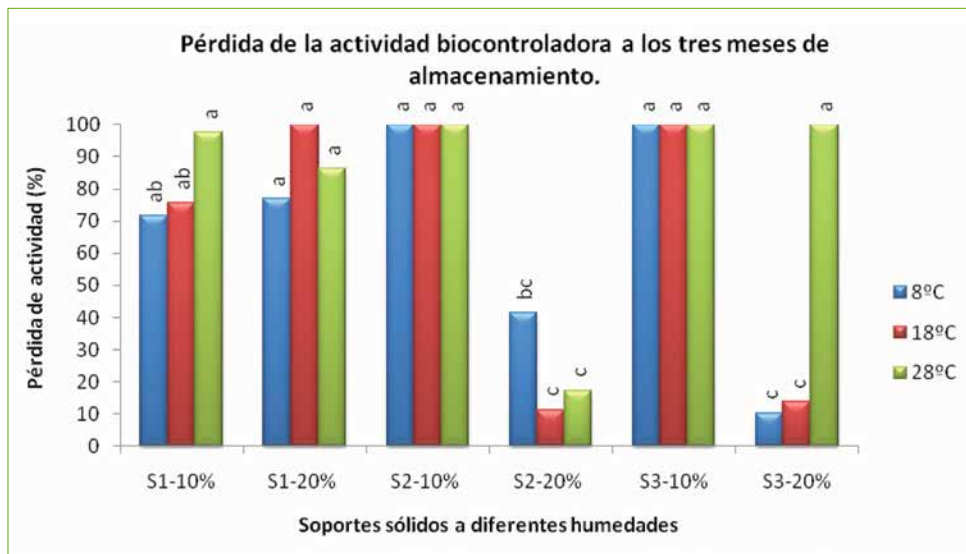


Figura 6. Pérdida de la actividad biocontroladora del principio activo de *P. fluorescens* Ps006 almacenado con soportes sólidos durante tres meses. S1-10%: soporte 1 al 10% de humedad. S1-20%: soporte 1 al 20% de humedad. S2-10%: soporte 2 al 10% de humedad. S2-20%: soporte 2 al 20% de humedad. S3-10%: soporte 3 al 10% de humedad. S3-20%: soporte 3 al 20% de humedad. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey (95%).

Aunque la inhibición del crecimiento diametral de *S. sclerotiorum* Sc021 no fue significativa en ciertos tratamientos, se observó el estrés causado por la presencia de Ps006 sobre el crecimiento del hongo. Como se evidencia en la Figura 7A, el crecimiento del patógeno fue irregular, con presencia de estructuras de resistencia (esclerocios). En la Figura 7B se observa la colonia estresada que formó estructuras de resistencia muy cerca al punto de inoculación del patógeno, después se observa una zona de escaso crecimiento micelial que llega hasta el borde de la caja Petri y en toda la superficie del medio de cultivo se puede apreciar el crecimiento de Ps006, como pequeñas colonias color crema. En la Figura 7C se observa un claro efecto inhibitorio en el crecimiento de la colonia de *S. sclerotiorum* Sc021, y alrededor de esta se puede evidenciar el abundante crecimiento de Ps006.

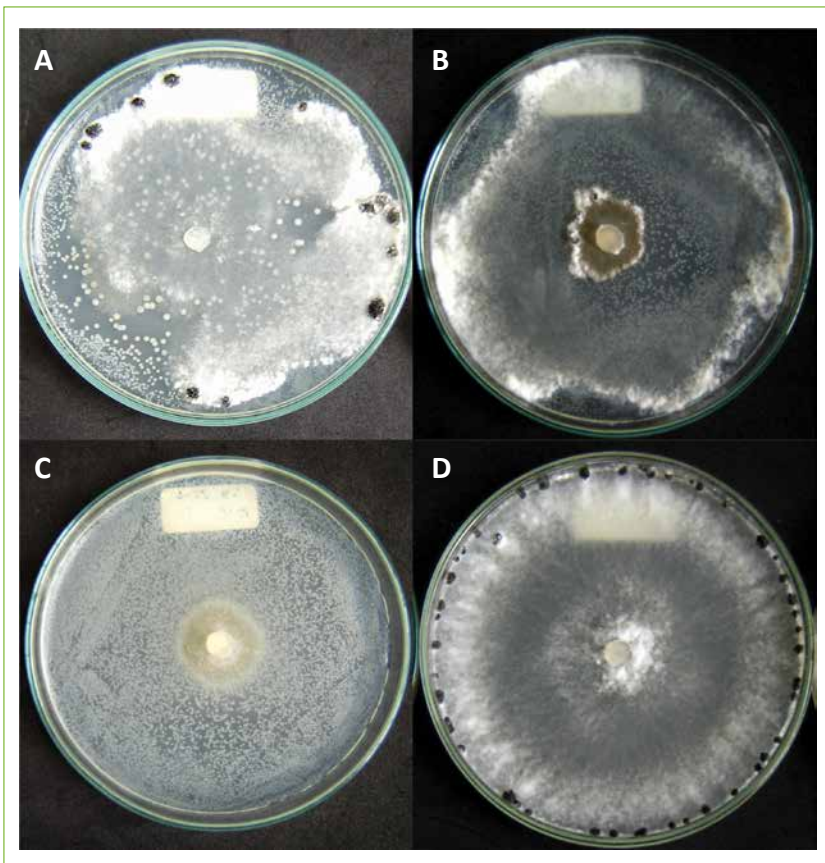


Figura 7. Inhibición del crecimiento diametral de *S. sclerotiorum* Sc021 por efecto del principio activo de Ps006 mezclado con soportes sólidos después de tres meses de almacenamiento. **A.** S1-10% a 18°C. **B.** S2-20% a 8°C. **C.** S3-20% a 8°C. **D.** Tratamiento control (sin inóculo bacteriano).

Finalmente, en la Figura 7D se presenta el crecimiento en el tratamiento control, con un completo desarrollo de la colonia sobre toda la superficie del medio de cultivo hasta el borde de la caja Petri, con una marcada producción de estructuras de resistencia en el perímetro de la colonia.

Los resultados del estudio de compatibilidad permitieron seleccionar el principio activo con células, mezclado con el soporte S2 al 20% de humedad, como el sistema de entrega base para el desarrollo de un bioplaguicida para el control de fitopatógenos.

Referencias bibliográficas

1. Burges, H.D. 1998. *Formulation of microbial biopesticides, beneficial microorganisms, nematodes and seed treatment*. Gran Bretaña: Kluwer Academic Publishers. 412 p.
2. Commare, R. Nandakumar, R. Kandan, A. Suresh, S. Bharathi, M. Raguchander, T. & Samiyappan, R. 2002. *Pseudomonas fluorescens* based Bio-formulation for the management of sheath blight disease and leafhopper insect in rice. *Crop Protection*. 21. Pp. 671-677.
3. Fernández, C. & Juncosa, R. 2002. Biopesticidas: ¿la agricultura del futuro? *Phytoma*. 141. Pp. 14-19.
4. Fernando, W.G. Nakkeeran, S. Zhang, Y. & Savchuk, S. 2007. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* species on canola petals. *Crop Protection*. 26. Pp. 100-107.
5. Gómez, M.I. Díaz, A. Forero, M. & Pérez, O. 2000. *Producción masiva, separación, secado y formulación de microorganismos biocontroladores*. Manual de prácticas de laboratorio y campo. I Curso Taller Internacional. Control Biológico. Corpoica, Centro de Investigación Tibaitatá, Colombia. Pp. 46-53.
6. Khanam, N.N. Ueno, M. Kihara, J. Honda, Y. & Arase, S. 2005. Suppression of red light-induced resistance in broad beans to *Botrytis cinerea* by salicylic acid. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 66. Pp. 20-29.
7. Kinay, P. & Ildis, M. 2008. The shelf life and effectiveness of granular formulations of *Metschnikowia pulcherrima* and *Pichia guilliermondii* yeast isolates that control postharvest decay of citrus fruit. *Biological Control*. 45. Pp. 433-440.
8. Madigan, M. T. Martinko, M. Dunlap, P.V. & Claric, D.P. 2009. *Brock biología de los microorganismos*. Edición 12. Madrid, España: Pearson Educación, S. A. 1296 p.
9. Manikandan, R. Saravanakumar, D. Rajendran, L. Raguchander, T. & Samiyappan R. 2003. Standardization of liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pf1 for its efficacy against *Fusarium* wilt of tomato. *Biological Control*. 54. Pp. 83-89.
10. Mikani, A. Etebarian, H.R. Sholberg, P.L. O'Gorman, D.T. Stokes, S. & Alizadeh, A. 2008. Biological control of apple gray mold caused by *Botrytis mali* with *Pseudomonas fluorescens* strains. *Postharvest Biology and Technology*. 48. Pp. 107-112.
11. Rabrindran, R. & Vidhyasekaran, P. 1996. Development of a formulation of *Pseudomonas fluorescens* PfALR2 for management of rice sheath blight. *Crop Protection*. 15 (8). Pp. 715-721.

12. Sastoque, E. 2010. *Producción, caracterización y evaluación de la actividad biológica de biosurfactantes (Ramnolípidos) a partir rizobacterias de fique (Furcraea spp)*. Tesis de maestría en ciencias biológicas. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 146 p.
13. Valencia, E. Villegas, J. Sánchez, J. Peña, J. & Fariás, R. 2005. Inhibición de *Fusarium oxysporum* por cepas mutantes de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 incapaces de producir sideróforos. *Terra Latinoamericana*. 23 (1). Pp. 81-88.
14. Wiyono, S. Schulz, D.F. & Wolf, G.A. 2008. Improvement of the formulation and antagonistic activity of *Pseudomonas fluorescens* B5 through selective additives in the pelleting process. *Biological Control*. 46. Pp. 348-357.