

DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN A BASE DE *Thichoderma koningiopsis*

Laura Fernanda Villamizar D.Sc.,
Magda García M.Sc.
y Alba Marina Cotes Ph.D.

Investigadores Laboratorio de Control Biológico,
Centro de Biotecnología y Bioindustria - CBB,
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Corpoica.
Km 14 vía Bogotá-Mosquera.
E-mail: lvillamizar@corpoica.org.co



CAPÍTULO 3

RESUMEN

La cepa nativa Th003 de *Trichoderma koningiopsis* ha mostrado alta eficacia para controlar fitopatógenos del suelo y foliares en diferentes patosistemas, por lo que el Laboratorio de Control Biológico de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria -Corpoica- desarrolló un prototipo de bioplaguicida formulado como un polvo mojable usando como principio activo conidios de este hongo. El producto fue caracterizado, demostrando adecuadas características microbiológicas y fisicoquímicas. El estudio de vida útil comprendió la evaluación durante 18 meses de la viabilidad del hongo formulado y sin formular, almacenado a tres temperaturas: 4 °C, 18 °C y 28 °C. Cada tres meses se evaluó el porcentaje de germinación del microorganismo en medio Agar Extracto de Malta, luego de 24 horas de incubación. El prototipo de bioplaguicida no presentó una disminución significativa de la germinación cuando fue almacenado durante 18 meses a 4 °C, mientras que los conidios sin formular redujeron su porcentaje de germinación de 97% a 20% para el noveno mes de almacenamiento. Cuando este se realizó a 18 °C, el producto en polvo mantuvo estable su germinación durante los 18 meses de almacenamiento; en contraste, el tratamiento correspondiente a los conidios sin formular presentó una disminución progresiva de la germinación a partir del sexto mes de almacenamiento, hasta obtener una germinación de 4% luego de 18 meses. Los resultados permitieron recomendar la conservación del prototipo en polvo a temperaturas entre 4 °C y 18 °C para asegurar la calidad y efectividad del mismo durante su vida útil.

3.1 INTRODUCCIÓN

Una formulación de alta calidad es la base para el éxito de un bioplaguicida de origen microbiano; la posibilidad de obtener productos adecuados depende de las propias características del microorganismo, de su relación con los componentes de la formulación y del ambiente de almacenamiento (Engormix, 2008).

Para el desarrollo de nuevos productos de origen biológico se deben tener en cuenta diferentes aspectos: definir un medio de cultivo óptimo y el mejor sistema para la obtención masiva del inóculo, para permitir una buena relación costo - rendimiento en la producción; establecer ensayos de producción a pequeña escala; garantizar la estabilidad del producto; determinar las condiciones de almacenamiento; poder utilizar la maquinaria estándar de cualquier explotación agrícola para su aplicación y ser efectivo en dosis parecidas a las utilizadas para los agroquímicos. Una vez se desarrolle una formulación, es necesario realizar bioensayos de laboratorio, invernadero y campo que confirmen la efectividad del producto una vez formulado (Engormix, 2008).

Una formulación óptima debe asegurar la estabilidad biológica y física del producto en condiciones de almacenamiento, debe optimizar la viabilidad y actividad biocontroladora del principio activo, debe mejorar las características físicas y químicas del producto para su aplicación, debe incrementar la capacidad del microorganismo biocontrolador para adaptarse a condiciones adversas del medio ambiente y debe garantizar el valor comercial del agente biocontrolador (Chiou & Wu, 2003).

En toda formulación se distinguen dos tipos de componentes: el principio activo responsable de la actividad biocontroladora (hongos filamentosos, levaduras, bacterias, virus o nematodos) y los excipientes. Estos últimos comprenden: el vehículo que puede ser sólido o líquido y los coadyuvantes que ayudan a mejorar o modificar la acción del ingrediente activo. Los excipientes deben ser inertes frente al microorganismo y frente a las plagas (Gómez & Villamizar, 2000).

Una de las razones que ha limitado la implementación de los agentes de control biológico en campo, ha sido la inactivación que en algunos casos sufre el principio activo (células, conidios, esporas o toxinas) como consecuencia de la acción de la radiación solar (Saxena *et al.*, 2002). Sin embargo, una estrategia para asegurar la estabilidad y la efectividad para el uso de estos agentes es su formulación (Niegel & Dylan, 2003). Uno de los factores a tener en cuenta en la formulación de bioplaguicidas es incrementar su resistencia a condiciones ambientales adversas tales como la lluvia y la degradación por la luz ultravioleta.

Un gran número de trabajos han sido dedicados a encontrar técnicas y materiales adecuados para inhibir o retardar la fotoinactivación de los microorganismos utilizados como agentes de control biológico. Entre los intentos por fotoprotger a los biocontroladores del daño producido por la radiación solar, se incluyen técnicas de encapsulación y formulaciones granulares, como también el uso de pantallas solares, materiales dispersantes, materiales fluorescentes y colorantes, entre otros (Cohen *et al.*, 2003).

La estabilidad en almacenamiento es otro de los problemas en el desarrollo de bioplaguicidas, ya que de ésta depende la viabilidad o actividad durante la distribución del producto en el mercado (Boyetchko y Hynes, 2006).

Durante el almacenamiento, los microorganismos pueden sufrir alteraciones debido a factores del proceso de manufactura del producto, como el medio de cultivo, el proceso de separación y secado y la utilización de agentes protectores de secado (Abadías *et al.*, 2001)

Factores ambientales como la temperatura y la humedad relativa y la forma de empaque pueden afectar la viabilidad y actividad del agente biocontrolador durante la fase de almacenamiento (Boyetchko y Hynes, 2006), siendo de gran importancia considerar y estudiar estos factores durante el desarrollo de un producto, para ofrecer al cliente final un producto de alta calidad.

3.2 METODOLOGÍA

3.2.1 Desarrollo de la formulación

Una vez desarrollado un sistema de fermentación para el aislamiento de *Trichoderma koningiopsis* Th003, se iniciaron los estudios de formulación de la biomasa. Considerando que dicho aislamiento en estudios previos demostró su eficiencia tanto para el control de patógenos foliares como de patógenos del suelo, se diseñó un prototipo de formulación en polvo mojable (WP), que permitiera su aplicación en agua mediante aspersión (Figura 1). En el diseño de esta formulación se consideró que una de las condiciones más limitantes para la eficiencia del agente de biocontrol, era la radiación ultravioleta del sol. Por tal razón, este prototipo incluyó en su composición, protectores solares y otros auxiliares de formulación como protectores de secado, adherentes y diluentes.

Una vez desarrollado el producto en polvo fue caracterizado y presentó una concentración promedio



Figura 1. Bioplaguicida a base de *Trichoderma koningiopsis* Th003 formulado como polvo mojable (WP).

Tabla 1. Características de la formulación polvo mojable a base de *T. koningiopsis* Th003.

Característica	Polvo (WP)
Viabilidad	1 x 10 ⁹ UFC/g
Germinación	>80% en 24 horas
Contenido de contaminantes	< 5 x 10 ⁶ UFC/g
Aspecto	Polvo
Tamaño de partícula	Inferior a 100 µm
Color	Verde claro a gris
Olor	Propio del producto
Humedad	4-7%
Densidad apisonada	500 Kg/L
pH	5-7
Protección ultravioleta	Incluye filtros ultravioleta

de 1,0 x 10⁹ conidios.g⁻¹, una germinación de 95% después de 16 horas de incubación y un tamaño de partícula menor a 100 µm (Tabla 1).

Posteriormente se elaboraron varios lotes del bioplaguicida, los cuales fueron caracterizados física, química y microbiológicamente (Tabla 1), y con los resultados se establecieron los límites de aceptación para todas las pruebas de control de calidad del producto terminado. Estos controles son aplicados a cada lote de producción para asegurar la calidad del producto y la repetibilidad en las características de todos los lotes.

El ideal en los productos biológicos es mantener viables y estables las características fisiológicas y de actividad biocontroladora del ingrediente activo; sin embargo, dadas las condiciones desfavorables para el microorganismo a nivel ambiental es preciso desarrollar formulaciones que mejoren su desempeño en campo, faciliten su manejo, su aplicación y permitan su almacenamiento en condiciones económicamente rentables, con una pérdida mínima de las cualidades iniciales del producto (Elzein *et al.*, 2004). Uno de los requerimientos para tener en cuenta para la aceptación y comercialización de un producto biológico es su vida útil, la cual se ve influenciada por factores de almacenamiento como la temperatura, la humedad relativa y el tipo de empaque, entre otros, determinando el mantenimiento de las

características del agente de control biológico. Por tal razón, como parte de los estudios de formulación se determinó la vida útil del bioplaguicida, bajo diferentes condiciones de almacenamiento.

3.2.2 Determinación de la vida útil del bioplaguicida

El estudio de vida útil comprendió la evaluación durante 18 meses de la estabilidad de la capacidad de germinación de los conidios de Th003 en el prototipo de bioplaguicida en polvo.

La producción masiva del microorganismo se llevó a cabo empleando un sustrato de crecimiento previamente estandarizado por el Laboratorio de Control Biológico. Posteriormente se elaboró el bioplaguicida y se determinó la concentración de conidios, la humedad y la germinación, siguiendo las metodologías establecidas por el Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas BIOTÉCNICA de Corpoica,

La unidad experimental consistió en bolsas metalizadas selladas al vacío (Figura 2) donde se colocó una muestra de 0,1g del prototipo polvo mojable y 0.1g de conidios secos del microorganismo sin formular. Las muestras y contra-muestras fueron guardadas a tres temperaturas: 4°C, 18 °C y 28 °C. Las evaluaciones se realizaron cada tres meses contando con seis repeticiones por tratamiento (3 de la muestra y 3 de



Figura 2. Muestras de los bioplaguicidas empleadas en el estudio de estabilidad.

la contra-muestra) y determinando en cada tiempo de evaluación el porcentaje de germinación del microorganismo en medio Agar Extracto de Malta. Las muestras fueron colocadas en tubos de ensayo con 9 ml de una solución de Tween 80 de 0,1% y se hicieron diluciones seriadas hasta 10^{-3} . A partir de las dos últimas diluciones se sembraron 100 μ l en tres cajas de Petri con el medio antes mencionado y se llevaron a incubación a 25 °C durante 24 horas, tiempo después del cual se estableció el porcentaje de germinación de los conidios mediante observación al microscopio de 10 campos ópticos.

3.3 RESULTADOS

El bioplaguicida no presentó disminución de la germinación cuando fue almacenado durante 18 meses a 4 °C, mientras que los conidios sin formular redujeron su porcentaje de germinación de 96,9% a 20,1% en el noveno mes de almacenamiento (Figura 3). Este comportamiento sugiere que a una temperatura de 4 °C los auxiliares de formulación del prototipo de bioplaguicida, posiblemente ejercieron un efecto positivo sobre los conidios del hongo durante el tiempo de almacenamiento impidiendo la inducción de fuertes estados de latencia.

Dentro de los auxiliares de formulación empleados para la elaboración del bioplaguicida se encuentran sustancias protectoras de secado y compuestos que tienen un efecto osmoregulador sobre el microorganismo. Tales protectores son principalmente sustancias que protegen la integridad de la membrana celular durante el proceso de deshidratación. Este

efecto fue reportado por Jackson *et al.*, (2006) quienes evaluaron diferentes formulaciones del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* con el propósito de aumentar su tolerancia a la desecación y su estabilidad durante el almacenamiento. Los autores observaron un aumento significativo de la viabilidad de las blastosporas del hongo al ser almacenado durante 12 meses a 4 °C y -20 °C, respuesta que atribuyeron a la adición de protectantes, como la leche descremada, a la formulación del bioplaguicida; a diferencia de ello, los conidios sin formular presentaron una disminución drástica en los porcentajes de germinación a partir del segundo mes de almacenamiento, llegando a obtener valores cercanos a 20%.

Compuestos de tipo poliol, denominados solutos compatibles, son comúnmente utilizados como protectores de secado. Estas sustancias son acumuladas por las células permitiéndoles mantener el equilibrio osmótico intracelular, la integridad de las proteínas y proteger los organelos. Dichos solutos son generalmente azúcares o alcoholes que están relacionados con la tolerancia del microorganismo ante el estrés osmótico que se puede generar en el proceso de elaboración del bioplaguicida (Abadías *et al.*, 2000).

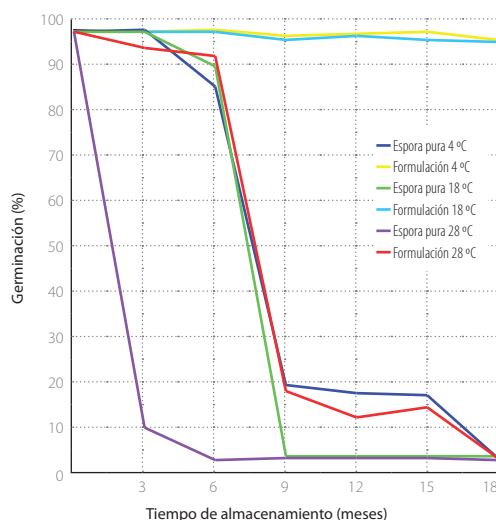


Figura 3. Cinética de la germinación de los conidios de *T. koningiopsis* Th003 formulados y sin formular, durante 18 meses de almacenamiento

Cuando el almacenamiento se realizó a 18 °C, el producto en polvo mantuvo estable su germinación durante 18 meses. (Figura 3), obteniéndose valores de germinación que oscilaron entre 94,8% y 96,8%. Por el contrario, el tratamiento correspondiente a los conidios sin formular presentó una disminución progresiva de la germinación a partir del sexto mes de estar almacenado hasta obtener una germinación de 4,2% luego de los 18 meses.

Las muestras de bioplaguicida conservadas a 28 °C mostraron una reducción en la capacidad de germinación de *T. koningiopsis* tanto formulado como sin formular (Figura 3). Los conidios sin formular presentaron una disminución en su germinación de 93,6% después de seis meses de almacenamiento. Sin embargo, luego de incubar las muestras por 36 horas se alcanzó una germinación superior a 95%, lo que sugiere, al igual que cuando se guardaron a 18 °C, que el microorganismo entró en un estado de latencia debido al almacenamiento a dichas temperaturas. Para el bioplaguicida la germinación se mantuvo por encima de 80% hasta los seis meses de guardado y a partir de allí ésta decayó drásticamente, pero fue superior a 80% al incrementar los tiempos de incubación. Algunos autores han establecido que las formulaciones de microorganismos requieren que el ingrediente activo (conidios del hongo) entre en un estado de latencia durante el almacenamiento para mantenerse estable y no pierda sus características fisiológicas y de actividad biocontroladora en el momento de su aplicación (Murillo *et al.*, 2003).

La temperatura de almacenamiento es un factor crítico que determina la conservación de la viabilidad y de la actividad biocontroladora de los bioplaguicidas. Resultados similares a los obtenidos en el presente estudio fueron observados por Zahnf *et al.*, en el 2006, quienes evaluaron el almacenamiento bajo dos temperaturas de una formulación a base de la levadura *Cryptococcus nodaensis*; los autores observaron una viabilidad del principio activo entre 7,8 y 8 Log UFC.g⁻¹ cuando el producto fue almacenado a 4 °C, mientras que a temperatura ambiente (25 °C) provocó una reducción en el conteo de unidades formadoras de colonia hasta valores inferiores a 5 Log UFC g⁻¹ luego de 14 semanas.

Factores ambientales como la temperatura y la humedad relativa determinan en gran medida la vida útil de los bioplaguicidas; es así como temperaturas de 4°C y humedades relativas cercanas a 12% mantuvieron alta la viabilidad y la actividad biocontroladora de una formulación granular a base de *Alternaria alternata* durante 20 meses de almacenamiento; esta misma formulación al ser conservada a 20 °C presentó una reducción significativa en su eficacia y viabilidad luego de 12 meses.(Lawrie *et al.*, 2002). Así mismo, el producto "Pesta," cuyo principio activo es *Fusarium oxysporum* Foxy 2, presentó una reducción de 32% y 21% en su viabilidad luego de seis y doce meses de almacenamiento respectivamente; los autores afirmaron que la pérdida rápida de las reservas endógenas de carbono fue una de las posibles causas que ocasionaron bajos niveles de viabilidad del microorganismo almacenado a 25 °C (Elzein *et al.*, 2004). Al igual que en los ensayos anteriormente mencionados, *Trichoderma koningiopsis* Th003 mostró mayor viabilidad y vida útil cuando fue guardado a una temperatura de 4 °C, presentándose una disminución en dichos valores a medida que se aumentó a 28 °C.

En todos los tratamientos evaluados en el presente estudio se observó que al aumentar la temperatura de almacenamiento, aumentó el efecto deletéreo sobre la germinación, lo que indica que para incrementar la vida útil de los prototipos, estos deben ser conservados a la menor temperatura posible.

Los resultados de las seis réplicas de la cinética de la germinación de cada tratamiento fueron sometidos a un análisis de regresión, a partir del cual se elaboró la línea de tendencia y sobre ella se extrapoló la vida útil de cada producto, teniendo en cuenta una germinación mínima de 80%.

Los mayores tiempos de vida útil se obtuvieron con el prototipo en polvo almacenado a 4 °C y 18 °C (Tabla 2). Por otra parte, la temperatura de 28 °C presentó un efecto nocivo sobre el microorganismo, obteniéndose una de vida útil de 3,7 meses para el formulado en polvo y de 0 meses para las esporas sin formular. Estos resultados evidencian el efecto protector que tienen los excipientes sobre el mi-

Tabla 2. Tiempo de vida útil de prototipos de bioplaguicida a base de Th003

Producto	Temperatura de almacenamiento (°C)	Tiempo de vida útil (meses)
Conidios sin formular	4	3,7
Conidios sin formular	18	3,3
Conidios sin formular	28	0
Prototipo polvo	4	18
Prototipo polvo	18	18
Prototipo polvo	28	3,7

croorganismo, asegurando su estabilidad durante el procesamiento y almacenamiento, ayudando a su aplicación en campo, protegiendo el producto de condiciones ambientales desfavorables y promoviendo la efectividad del bioplaguicida sobre el agente blanco.

Aunque la mayoría de bioplaguicidas que se encuentran en el mercado nacional e internacional deben ser preservados en condiciones de refrigeración, a partir de los resultados del estudio se puede recomendar la conservación del prototipo en polvo a una temperatura promedio de 18 °C.

AGRADECIMIENTOS

A Claudia Mesa y Gabriela Perdomo, auxiliares del Laboratorio de Control Biológico de Corpoica y a la estudiante Carolina Garzón, quienes colaboraron en el proceso de desarrollo de la formulación.

REFERENCIAS

- Abadías, M., Teixido, N., Usall, J., Vin, I., Magan, N. 2000. Solute stresses affect growth patterns, endogenous potentials and accumulation of sugars and cells of the biocontrol yeast *Candida sake*. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 1009-1017.
- Abadías, M., Teixido, N., Usall, J., Benabarre, A., Viñas, I. 2001. Viability, efficacy, and storage stability of freeze-dried biocontrol agent *Candida sake* using different protective and rehydration media. *Journal of food protection*, 64: 856-861.
- Boyetchko, S.; Hynes, R. 2006. Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations. *Soil Biology & Biochemistry*, 38: 845-849.
- Chiou, A. L., Wu, W.S. 2003. Formulation of *Bacillus amyloliquefaciens* B190 for control of Lily Grey Mould (*Botrytis elliptica*). *Journal of Phytopathology*, 151: 13-18.
- Cohen, E., Joseph, T., Wassermann-Golan, M. 2001. Photostabilization of biocontrol agents by berberine. *International Journal of Pest Management*, 47: 63-67.
- Elzein, A., Jurgen, K., Muller-stover, D. 2004. Optimization of storage conditions for adequate shelf-life of 'Pesta' formulation of *Fusarium oxysporum* 'Foxy 2', a Potential Mycoherbicide for Striga: Effects of Temperature, Granule Size and Water Activity. *Biocontrol Science and Technology*, 14: 545-559.
- ENGORMIX, 2008. Formulación de hongos entomopatógenos como control Biológico [On line]. http://www.engormix.com/formulacion_hongos_entomopato_genos_como_s_articulos_1315_AGR.htm. [Consulta: 26 febrero 2008].
- Gómez, M., Villamizar, L. 2000. Formulación de Bioplaguicidas. En: *Primer Curso Taller Internacional de Control Biológico*. CORPOICA. Bogotá. pp. 108-112.
- Jackson, M., Selim Erhan, s., Poprawski, T. 2006. Influence of formulation additives on the desiccation tolerance and storage stability of blastospores of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina:Hyphomycetes). *Biocontrol Science and Technology*, 16: 61-75
- Lawrie, J., Down, M., Greaves, P. 2001. Effects of Storage on Viability and Efficacy of Granular Formulations of the Microbial Herbicides *Alternaria alternata* and *Trematophoma lignicola*. *Biocontrol Science and Technology*, 11: 283- 295
- Moore, D., Bateman, P., Carey, M., Prior, C. 1995. Long term storage of *Metarhizium flavoviride* conidia in oil formulation for the control of locust and grasshoppers. *Biocontrol Science and Technology*, 5: 193-199.
- Murillo, R., Lasa, R., Goulson, D., Williams, T., Muñoz, D., Caballero, P., 2003. Effect of Tinopal LPW on the insecticidal properties and genetic stability of the nucleopolyhedrovirus of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 96: 1668-1674.
- Niegel, D. P., Dylan, G. J. 2003. Ecological roles of solar UV radiation: Towards an integrated approach (Review). *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 48-54.
- Saxena, D., Ben-Dov, E., Manasherob, R., Barak, Z., Boussiba, S., Zaritsky, A. 2002. A UV Tolerant Mutant of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* producing Melanin. *Current Microbiology*, 44: 25-30.
- Zhang, S., Schisler, D., Jackson, M., Boehm, M., Slininger, P., Liu, Z. 2006. Cold shock during liquid production increases storage shelf-life of *Cryptococcus nodaensis*. after air-drying. *16 (3): 281 - 293*.