

FORMULACIONES A BASE DE *Trichoderma koningiopsis*

Laura Villamizar, Magda García, Alba Marina Cotes

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 2

Una vez fue 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 diseñaron dos tipos de formulación: un granulado dispersable y un polvo mojable (Figura 5). El granulado dispersable fue diseñado teniendo en cuenta que pudiera ser aplicado directamente al suelo o después de ser reconstituido en agua en tratamiento de semillas y sustratos de siembra o directamente en

campo. Esta formulación incorporó varias fuentes nutricionales para favorecer la colonización del suelo por parte de *T. koningiopsis* y de esta forma darle una ventaja competitiva con respecto a los demás habitantes naturales del suelo. El polvo mojable consistió en una formulación diseñada principalmente para la aplicación foliar, donde la condición más limitante para la eficiencia del agente de biocontrol es el efecto de 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.



Figura 5. Bioplaguicidas a base de *Trichoderma koningiopsis* Th003 formulados como granulado dispersable (WG) y polvo mojable (WP).

La formulación granular presenta una concentración promedio de $5,8 \times 10^8$ conidios. g^{-1} y un porcentaje de germinación de 98% después de 16 horas de incubación. En cuanto a las características físicas, este granulado tiene un tamaño de partícula de 2 mm y un tiempo de desintegración inferior a 5 minutos. El producto en polvo presenta una concentración promedio de $1,0 \times 10^9$ conidios. g^{-1} , un porcentaje de germinación de 95% después de 16 horas de incubación y un tamaño de partícula menor a 100 μm .

Los dos prototipos de bioplaguicida fueron caracterizados y los resultados se presentan en la Tabla 2. Con dichos resultados se establecieron los límites de aceptación para todas las pruebas de control de calidad de producto terminado, los cuales son aplicados a cada lote de producción para asegurar la repetibilidad de los mismos. Las características de las dos formulaciones se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Características de las dos formulaciones a base de Th003

Característica	Granulado (WG)	Polvo (WP)
Viabilidad	1 x 10 ⁹ UFC/g	1 x 10 ⁹ UFC/g
Germinación	>80% en 24 horas	>80% en 24 horas
Contenido de contaminantes	< 5 x 10 ⁶ UFC/g	< 5 x 10 ⁶ UFC/g
Aspecto	Granular	Polvo
Tamaño de partícula	850 - 1500 µm	Inferior a 100 µm
Color	Verde	Verde claro a gris
Olor	Propio del producto	Propio del producto
Humedad	4 - 7%	4 - 7%
Densidad apisonada	600 - 620 Kg/L	500 Kg/L
pH	5 - 7	5 - 7
Protección ultravioleta ultravioleta	No incluye protección ultravioleta	Incluye filtros

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 y 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 a tener en cuenta para la aceptación y comercialización de un producto biológico es su vida útil, la que se ve influenciada por factores de almacenamiento, entre los que se encuentran la temperatura, la humedad relativa y el tipo de empaque, determinando el mantenimiento de las características del agente de control biológico. Por tal razón y como parte de los estudios de formulación, se determinó la vida útil de dos prototipos de bioplaguicida.

Determinación de la vida útil de los prototipos de bioplaguicida

El estudio de vida útil de los bioplaguicidas comprendió la evaluación durante 18 meses de dos

prototipos de bioplaguicida, un granulado dispersable y un polvo mojable, cuyo principio activo consistió en conidios de *Trichoderma koningii* Th003.

Metodología

La producción masiva del microorganismo se realizó empleando un sustrato de crecimiento previamente estandarizado por el Laboratorio de Control Biológico. Posteriormente se elaboraron los dos prototipos de bioplaguicida, a los cuales se les realizaron como pruebas de control de calidad la determinación de la concentración de conidios, la humedad y pruebas microbiológicas para establecer la pureza de los productos desarrollados siguiendo las metodologías establecidas por el Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas BIOTÉCNICA.

La unidad experimental consistió en bolsas metalizadas selladas al vacío en las que se colocó una muestra de cada uno de los tratamientos por evaluar correspondientes a 1g del prototipo granulado dispersable, 0,1g del prototipo polvo mojable y 0,1g de conidios secos del microorganismo sin formular; las muestras y contramuestras fueron almacenadas 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 la contramuestra) 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 al 0,1% y se realizaron diluciones seriadas en base 10 hasta 10^{-3} . A partir de las dos últimas diluciones se sembraron 100µl 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 determinó el porcentaje de germinación de los conidios mediante observación a microscopio de 10 campos ópticos.

Resultados

Los prototipos de los bioplaguicidas no presentaron una disminución de la germinación cuando fueron almacenados durante 18 meses a 4°C, mientras que los conidios sin formular redujeron su porcentaje de germinación del 96,97% al 20,1% para el noveno mes de almacenamiento. Este comportamiento sugiere que a una temperatura de 4°C los auxiliares de formulación de los dos prototipos 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 de los dos prototipos de bioplaguicida se encuentran algunas sustancias protectoras de secado y ciertos compuestos que tienen un efecto osmorregulador sobre el microorganismo. Los protectores de secado 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

augmentar 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 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 al 20%.

Compuestos de tipo poliol denominados solutos compatibles son comúnmente utilizados como protectores de secado. Estos compuestos son acumulados por las células permitiéndoles mantener el equilibrio osmótico intracelular, la integridad de las proteínas y protegiendo ciertas estructuras membranales. Dichos compuestos 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).

Cuando el almacenamiento se realizó a 18°C, el producto en polvo mantuvo estable su germinación durante los 18 meses de almacenamiento (Figura 6), obteniéndose valores de germinación que oscilaron entre el 94,8% y el 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 almacenamiento hasta obtener una germinación del 4,2% luego de 18 meses de almacenamiento. Un comportamiento similar fue observado para el producto granulado, el cual mantuvo su germinación por encima del límite de aceptación equivalente al 80%, hasta el noveno mes de evaluación. En el mes 12 se observó una reducción de la germinación, la cual presentó valores inferiores al 10%; con todo, después de incubar las muestras por 36 horas se alcanzaron niveles de germinación superiores al 95%, lo que

sugiere que el almacenamiento no causó la muerte celular sino que indujo al microorganismo en un estado de latencia o dormancia, que retardó la recuperación metabólica de las células y el proceso de germinación. 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 latencia es un estado en el que el microorganismo reduce su metabolismo dando lugar a una reactivación y recuperación fisiológica más lenta. Un comportamiento similar al presentado con *T. koningiopsis* Th003 fue observado por Moore *et al.* (1995) después de almacenar conidios de *Metarhizium flavoviride* durante 160 semanas a 8°C, los autores evidenciaron una reducción en la germinación del hongo la cual fue atribuida al hecho de que cada microorganismo posee una temperatura óptima para su desarrollo y cambios en ésta pueden generar una pérdida de su viabilidad y la entrada en estados de latencia.

En los resultados correspondientes a las muestras de bioplaguicida almacenadas a 28 °C se observó una reducción en la capacidad de germinación de *T. koningiopsis* tanto formulado como sin formular (Figura 6). Los conidios sin formular presentaron una disminución de su germinación del 93,6% luego de seis meses de almacenamiento, pero luego de incubar las muestras por 36 horas se alcanzó una germinación superior al 95%, lo que sugiere –al igual que cuando el almacenamiento se realizó a 18°C– que el microorganismo entró en un estado de latencia a causa del almacenamiento a 28°C. Para los dos prototipos de bioplaguicida la germinación se mantuvo por encima

del 80% hasta los seis meses de almacenamiento y a partir de dicho tiempo la germinación decayó drásticamente, siendo superior al 80% al incrementar los tiempos de incubación.

La temperatura de almacenamiento es un factor crítico que determina la conservación de la viabilidad y la actividad biocontroladora de los bioplaguicidas. Resultados similares a los obtenidos en el presente estudio fueron observados por Zahng *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 el almacenamiento a temperatura ambiente (25°C) provocó una reducción en el conteo de unidades formadoras de colonia hasta valores inferiores de 5 Log UFC g⁻¹ luego de 14 semanas de almacenamiento.

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 al 12% mantuvieron alta la viabilidad y actividad biocontroladora de una formulación granular a base de *Alternaria alternata* durante 20 meses de almacenamiento. Esta misma formulación al ser almacenada a 20°C presentó una reducción significativa en su eficacia y viabilidad luego de 12 meses de almacenamiento (Lawrie *et al.*, 2002). Asimismo, el producto Pesta –cuyo principio activo es *Fusarium oxysporum* Foxy 2– presentó una reducción del 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).

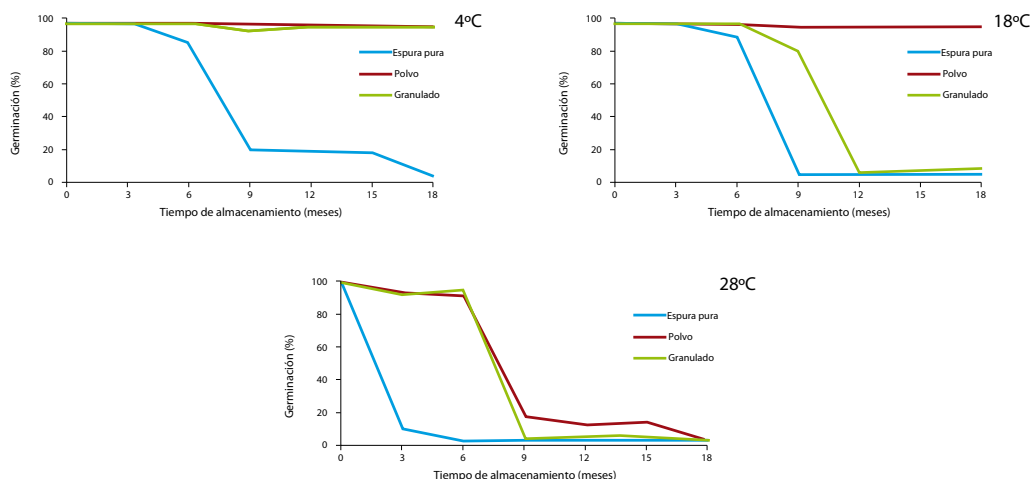


Figura 6. Cinética de la germinación de los conidios de *T. koningiopsis* Th003 formulados y sin formular, durante 18 meses de almacenamiento a diferentes temperaturas.

Por otra parte, formulaciones oleosas a base de *Metarhizium flavoviride* presentaron una disminución en la germinación y muerte de conidios luego de 8 horas de almacenamiento a temperaturas de 45°C, efecto atribuido por McClatche *et al.* (1994) al desarrollo de mecanismos de protección, como por ejemplo las proteínas de choque térmico. Al igual que en los ensayos anteriormente mencionados, *Trichoderma koningiopsis* Th003 mostró una mayor viabilidad y vida útil cuando fue almacenado a temperatura de 4°C, presentando una disminución en dichos valores a medida que se aumentó la temperatura de almacenamiento 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 sugiere que para aumentar la vida útil de los prototipos, estos deben ser almacenados 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

que se elaboró la línea de tendencia, sobre la cual se extrapoló la vida útil de cada producto, teniendo en cuenta una germinación mínima del 80%.

Los mayores tiempos de vida útil se obtuvieron con el prototipo en polvo almacenado a 4°C y 18°C, así como con el prototipo granulado a 4°C (Tabla 3). Por otra parte, la temperatura de 28°C presentó un efecto nocivo sobre el microorganismo, observándose tiempos de vida útil de 3,3 y 3,7 meses para los productos granulado y polvo respectivamente, y 0 meses para las esporas sin formular.

Estos resultados evidencian el efecto protector que tienen los excipientes sobre el microorganismo, 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.

Tabla 3. 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 granulado	4	18
Prototipo granulado	18	5,2
Prototipo granulado	28	3,3
Prototipo polvo	4	18
Prototipo polvo	18	18
Prototipo polvo	28	3,7

Aunque la mayoría de bioplaguicidas que se encuentran en el mercado internacional deben ser almacenados en condiciones de refrigeración, a partir de los resultados del estudio se puede re-

comendar el almacenamiento del prototipo en polvo a una temperatura promedio de 18°C. Para el prototipo granulado se recomienda el almacenamiento bajo condiciones de refrigeración.

- Abadías, M.; Teixido, N.; Usall, J.; Vine A.; 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.
- 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 (6) 545 - 559.
- Jackson, M.; 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(1), 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.
- McClatche, G.V.; Moore, D.; Bateman, R.P. & Prior, C. (1994). Effects of temperature on the conidia of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations. *Mycological Research* 9, 749 - 756.
- 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.
- Zhang, S.; Schisler, D.; Jackson, M.; Boehm, M.; Slininger, P.; Lewis L. (2006). Cold shock during liquid production increases storage shelf-life of *Cryptococcus nodaensis* OH 182.9 after air-drying. *Biocontrol Science and Technology*. 16(3): 281 - 293.