



Original

Efecto de la formulación sobre la vida útil de bioplaguicidas a base de dos aislamientos colombianos de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y *Trichoderma asperellum* Th034

Adriana Santos*, Magda García, Alba Marina Cotes y Laura Villamizar

Laboratorio de Control Biológico, Centro de Biotecnología y Bioindustria, Corporación colombiana de investigación agropecuaria CORPOICA, Mosquera, Cundinamarca, Colombia

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 30 de abril de 2011

Aceptado el 9 de noviembre de 2011

On-line el 22 de noviembre de 2011

Palabras clave:

Bioplaguicida

Trichoderma spp.

Agente de control biológico

Vida útil

Formulación

Biocontrol

R E S U M E N

Antecedentes: Se desarrollaron 4 prototipos de bioplaguicidas formulados como polvos secos para espolvoreo y granulados dispersables a base de 2 aislamientos colombianos de *Trichoderma koningiopsis* cepa Th003 y *Trichoderma asperellum* cepa Th034, microorganismos con actividad antagonista frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Rhizoctonia solani*, con una reducción de la incidencia de entre el 70 y el 100% en cultivos de tomate y papa, respectivamente.

Objetivo: Determinar el efecto de la formulación sobre la vida útil de 4 bioplaguicidas a base de *T. koningiopsis* Th003 y *T. asperellum* Th034 a 3 temperaturas diferentes.

Métodos: El efecto de la formulación se determinó mediante la evaluación de la germinación de los conidios sin formular y formulados (granulado dispersable y polvo para espolvoreo) almacenados a 8, 18 y 28 °C durante 18 meses. Con las cinéticas de germinación obtenidas se estimó la vida útil de los productos utilizando diferentes modelos matemáticos (orden cero, primer orden, segundo orden, modelo de Higuchi, modelo de Korsmeyer-Peppas y modelo polinomial).

Resultados: Los productos presentaron una alta estabilidad de la germinación de los conidios cuando se almacenaron a 8 y 18 °C, con vidas útiles de 14,4 y 13,9 meses para el polvo para espolvoreo a base de Th003 y de 12,0 y 10,8 meses para la formulación en polvo a base de Th034, respectivamente. Los prototipos formulados como granulados dispersables almacenados a las mismas temperaturas (8 y 18 °C) presentaron menor vida útil, con valores de 11,6 y 10,9 meses para el producto de Th003 y de 10,7 y 7,2 meses para el granulado a base de Th034. En cuanto a los conidios sin formular, estos redujeron significativamente su germinación en todas las temperaturas de almacenamiento evaluadas.

Conclusiones: El tipo de formulación afectó la estabilidad de los conidios de los 2 aislamientos colombianos de *Trichoderma* spp., siendo el polvo para espolvoreo el bioplaguicida que presentó la mayor estabilidad y vida útil en todas las temperaturas evaluadas.

© 2011 Revista Iberoamericana de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

The effect of the formulation on the shelf-life of biopesticides based on two colombian isolates of *Trichoderma koningiopsis* Th003 and *Trichoderma asperellum* Th034

A B S T R A C T

Background: Four biopesticide prototypes formulated as dispersible granules and dry powders based on 2 Colombian isolates of *Trichoderma koningiopsis* (Th003) and *T. asperellum* (Th034) were developed. These microorganisms have antagonist activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *Rhizoctonia solani* with a reduction in incidence of between 70 and 100% in tomato crops and potato crops, respectively.

Aim: To determine the effect of the formulation on the shelf-life of 4 biopesticides based on *T. koningiopsis* Th003 and *Trichoderma asperellum* Th034 at 3 different temperatures.

Keywords:

Biopesticide

Trichoderma spp.

Biological control agent

Shelf-life

Formulation

Biocontrol

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: adrianitasantos@yahoo.com (A. Santos).

Methods: The formulation effect was determined by evaluating the germination of unformulated and formulated conidia (dispersible granules and dry powder) stored at 8, 18 and 28 °C for 18 months. Germination kinetics were used to estimate the shelf-life by using different mathematical models (zero order, first order, second order, Higuchi model, Korsmeyer-Peppas model and polynomial model).

Results: The products showed high stability of the conidia germination when they were stored at 8 and 18 °C, with shelf-lives of 14.4 and 13.9 months for dry powder based on Th003, and 12.0 and 10.8 months for dry powder based on Th034, respectively. Prototypes formulated as dispersible granules stored at the same temperatures (8 and 18 °C) showed lower shelf-lives, with values of 11.6 and 10.9 months for the Th003 product, and 10.7 and 7.2 months for the dispersible granules based on Th034. Significant reductions in germination were observed on unformulated conidia at all storage temperatures evaluated.

Conclusions: The formulation type affected the conidia stability of the 2 *Trichoderma* spp. Colombian isolates. Dry powder was the prototype with the highest stability and shelf-life at all temperatures evaluated.

© 2011 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Una de las alternativas más promisorias para disminuir el impacto ambiental causado por el frecuente uso de productos químicos para el control de plagas y enfermedades de plantas se centra en la utilización de agentes de control biológico². Dentro de estos agentes destacan los hongos del género *Trichoderma*, microorganismos que han sido evaluados contra diversos patógenos foliares y del suelo y como promotores de crecimiento en cultivos de importancia económica como tomate, banano, manzana y papa en almacenamiento, en semillero y en condiciones de campo³⁷.

La producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, el micoparasitismo y la competencia por espacio y nutrientes, son los mecanismos de acción clave de *Trichoderma*³⁷. Estos mecanismos de acción pueden actuar de manera sinérgica sobre diversos fitopatógenos como *Septoria triticii* en trigo³¹, *Sclerotinia sclerotiorum* en soya y lechuga¹⁷, *Rhizoctonia solani* en soya¹³, *Sclerotium rolfsii* en pepino cohombro¹⁷, *Alternaria alternata*³³ y *Fusarium* spp. en tomate²⁰ y *Pythium splendens* en frijol¹⁰. Además, las especies del género *Trichoderma* son los antagonistas más utilizados a nivel mundial debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aisladas y cultivadas, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos y a que no son patógenas de plantas^{6,37}.

Para la utilización de estos microorganismos como agentes de control biológico es necesario desarrollar sistemas de producción y formulación que permitan contar con productos de la misma o mayor eficacia que los productos químicos, siendo uno de los requisitos para la aceptación y comercialización de un producto biológico su estabilidad bajo condiciones de almacenamiento⁵. Esta característica se ve influenciada por factores externos como la temperatura, la humedad relativa y el tipo de empaque utilizado, lo que determina el tiempo durante el cual se mantienen las características iniciales del agente biológico y por lo tanto su actividad biocontroladora². Para establecer la vida útil de un producto se realizan estudios en condiciones de estrés que permiten hacer predicciones sobre la estabilidad. Estos estudios se basan en la evaluación de las características del producto a través del tiempo, utilizando diferentes condiciones de almacenamiento y analizando los resultados mediante el uso de modelos matemáticos que interpretan el comportamiento³.

Para productos a base de microorganismos biocontroladores, la vida útil puede depender de varios factores como las características de la cepa, el sistema de producción, el tipo de formulación y la temperatura de almacenamiento recomendada. En el caso específico de *Trichoderma* spp., los productos registrados a nivel mundial cuyas formas de presentación son polvos mojables, granulados dispersables, concentrados emulsionables y pellets, tienen vidas útiles cercanas a los 6 meses cuando son almacenados al vacío y a temperaturas inferiores a 18 °C⁸. Por ejemplo, para una formulación líquida a base de *T. asperellum*, Kolombet et al. (2007) establecieron una vida útil de 6 meses cuando el producto es almacenado a 20 °C.

Papavizas et al. (1984) demostraron que conidios de *Trichoderma viride*, principio activo del producto Pyrax, presentan una vida útil inferior a 5 meses cuando se almacena a 30 °C. Otros productos como Trichidex®, *Trichoderma* 2000® y RootShield® presentan vidas útiles cercanas a los 6 meses si se almacenan entre 10 y 25 °C⁸.

Los aislamientos colombianos de *T. koningiopsis* Th003 y *T. asperellum* Th034 han demostrado una alta eficiencia para el control de patógenos foliares y del suelo²⁷. Por ejemplo, la aplicación de Th003 disminuyó entre un 70 y 75% la incidencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y de *R. solani* en plántulas de tomate¹¹ y entre un 87,7 y un 92% la incidencia de *S. sclerotiorum* en el cultivo de lechuga¹². En otro trabajo, Beltrán et al. determinaron que plántulas de papa tratadas con los aislamientos Th003 y Th034 presentaron un aumento en el tamaño y una reducción del 70% en la incidencia de *R. solani*¹. En el control de patógenos foliares como *Oidium lycopersicum* y *Botrytis cinerea*, la aplicación de conidios de Th003 disminuyó la incidencia de dichos fitopatógenos entre un 41 y un 60%^{28,29}. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con dichos aislamientos de *Trichoderma*, se desarrollaron 4 prototipos de bioplaguicidas formulados como polvos para espolvoreo y granulados dispersables. El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de la formulación sobre la estabilidad de los conidios de los 2 aislamientos colombianos de *Trichoderma* spp., mediante la estimación de la vida útil de los 4 prototipos de bioplaguicidas almacenados durante 18 meses a 8, 18 y 28 °C.

Materiales y métodos

Microorganismos

T. koningiopsis Th003 (aislado de suelo agrícola del municipio de Subachoque, Cundinamarca, Colombia) y *T. asperellum* Th034 (aislado de suelo agrícola del municipio de Cucaita, Cundinamarca, Colombia) fueron suministrados por el Banco de Germoplasma de Microorganismos con Interés en Control Biológico de CORPOICA.

Producción y formulación

La producción masiva de los microorganismos se realizó empleando un sustrato previamente estandarizado a base de arroz cocido estéril³⁸. Para la elaboración del granulado dispersable, el sustrato esporulado se mezcló con silicato de aluminio coloidal de calidad industrial (Bell-Chem International S.A.) utilizado como diluyente, almidón de calidad alimenticia (Bell-Chem International S.A.) empleado como desintegrante, y proteína de leche (Colanta®) que fue utilizada como agente protector de secado. Una vez mezclada la biomasa con los excipientes (tabla 1) se realizó su granulación vía húmeda por medio de una criba con poros de 1 mm y el producto húmedo se secó en estufa a 25 ± 1 °C por 24 horas.

Tabla 1
Composición del granulado dispersable y el polvo para espolvoreo a base de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y *Trichoderma asperellum* Th034

Componente	Formulación	
	Granulado dispersable	Polvo para espolvoreo
Biomasa fúngica	20	0,8
Silicato de aluminio coloidal	55	-
Almidón	15	-
Proteína de leche	10	1,195
Colorante rojo	-	0,005
Silicato de magnesio	-	98,0

La composición está dada en porcentaje de peso en base seca.

Para el polvo para espolvoreo, el sustrato esporulado fue lavado con una solución de Tween® 80 al 0,1%, y la suspensión obtenida se centrifugó a 3.075 g durante 30 minutos. La biomasa húmeda obtenida fue mezclada con silicato de magnesio USP calidad farmacéutica (Bell-Chem International S.A.) utilizado como diluyente, proteína de leche (Colanta®) empleada como protector de secado y un colorante rojo de alimentos (Bell-Chem International S.A.) utilizado como absorbente de la radiación ultravioleta (tabla 1), para su posterior secado en estufa a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 horas. El material seco fue posteriormente pulverizado con un molino de cuchillas IKA modelo A11. Antes de almacenar los bioplaguicidas se realizó el control de calidad de los mismos determinando la concentración de conidios, la germinación y el porcentaje de humedad por triplicado. Para determinar la germinación, se puso 1 g del producto en un tubo de ensayo con 9 ml de Tween 80® al 0,1% y se realizaron diluciones seriadas que se sembraron por triplicado en cajas de Petri con medio agar extracto de malta y se incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas, tiempo después del cual se cuantificó el número de conidios germinados y no germinados mediante observación al microscopio de 10 campos ópticos, por unidad experimental¹⁴. Para la concentración del principio activo se cuantificaron los conidios en una de las diluciones mediante recuento en cámara de Neubauer. El porcentaje de humedad se determinó por medio de la técnica de pérdida de peso por secado en una balanza de humedad OHAUS MB¹⁴.

Estudio de la estabilidad en almacenamiento

Para el estudio de la vida útil de los bioplaguicidas se evaluó la viabilidad expresada como la capacidad de germinación de los conidios formulados como granulado dispersable y polvo para espolvoreo, durante 18 meses de almacenamiento.

Los tratamientos correspondientes a los conidios formulados (1 g/bolsa) y los conidios secos sin formular (0,1 g/bolsa) se empaquetaron en bolsas de aluminio selladas al vacío. Las muestras fueron almacenadas a $8 \pm 2^\circ\text{C}$, $18 \pm 2^\circ\text{C}$ y $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y las evaluaciones se realizaron cada 3 meses, determinando el porcentaje de germinación de los conidios siguiendo la metodología previamente descrita.

Tabla 2
Porcentajes de germinación de los conidios de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y *Trichoderma asperellum* Th034 en prototipos de bioplaguicidas almacenados durante 18 meses a 8°C

Cepa	Formulación	Tiempo de almacenamiento (meses)					
		0	3	6	9	12	18
<i>T. koningiopsis</i> Th003	Conidios sin formular	94,7 ab	93,4 ab	95,4 a	79,0 d	80,5 d	0,0 i
	Granulado dispersable	92,8 ab	95,7 a	96,5 a	87,0 c	86,6 c	70,6 ef
	Polvo para espolvoreo	97,5 a	96,1 a	95,4 a	95,7 a	89,2 bc	65,9 f
<i>T. asperellum</i> Th034	Conidios sin formular	94,7 ab	95,4 a	95,3 a	76,0 de	77,1 d	0,0 i
	Granulado dispersable	94,8 a	94,8 a	95,1 a	80,0 d	82,8 d	45,3 g
	Polvo para espolvoreo	97,0 a	94,6 a	93,1 ab	91,1 ab	89,6 bc	51,8 g

Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).

El diseño del estudio fue completamente al azar, con medidas repetidas en el tiempo y arreglo factorial. Para cada análisis se emplearon 3 unidades experimentales por tratamiento.

Análisis de resultados

La normalidad y la homogeneidad de la varianza de los resultados fueron determinadas mediante las pruebas de Shapiro Wilk (95%) y Bartlett (95%), respectivamente. Una vez demostrados estos principios, se procedió a un análisis de varianza ANOVA y a una prueba de comparación de medias de Tukey (95%) utilizando el programa Statistix versión 7.0 (Analytical Software, Florida, EE. UU.).

Adicionalmente, las germinaciones de cada producto fueron correlacionadas con el tiempo utilizando diferentes modelos matemáticos para determinar la vida útil de los mismos, que fue definida como el tiempo en el cual la germinación fue igual al 85%²². Los modelos evaluados fueron³²:

$$\text{Orden cero}^{19}: y = kt$$

$$\text{Primer orden}^{16}: \ln(y) = kt$$

$$\text{Segundo orden}^{19}: \frac{1}{y} = kt$$

$$\text{Modelo de Higuchi}^{36}: y = k\sqrt{t}$$

$$\text{Modelo de Kosmeyer-Peppas}^{36}: y = kt^n$$

$$\text{Modelo polinomial}^{25}: y = k + kt + kt^2 + kt^3 + \dots + kt^n$$

Donde y corresponde a la variable germinación, t al tiempo de almacenamiento y k a una constante.

Resultados y discusión

Cuando los productos fueron almacenados a las diferentes temperaturas se evidenció una disminución progresiva en la capacidad de germinación de los conidios durante los 18 meses de almacenamiento, como se puede observar en las tablas 2-4. Todas las formulaciones almacenadas a 8°C presentaron germinaciones superiores al 80% durante el primer año del estudio, valores que se encontraron dentro de lo establecido por algunos estándares nacionales e internacionales de calidad, que sugieren dicha viabilidad como límite mínimo de aceptación para este tipo de bioplaguicidas²². Sin embargo, a partir del noveno mes de almacenamiento se presentaron diferencias significativas ($F = 115,28$, $df = 35$, $p < 0,0001$) entre las germinaciones iniciales y las correspondientes a dicho tiempo, tanto para los conidios sin formular como para la formulación granular de las 2 cepas. Para la formulación en polvo, la germinación se redujo significativamente a partir de los 12 meses de almacenamiento (tabla 2).

El granulado dispersable y el polvo para espolvoreo a base de *T. koningiopsis* (Th003) y de *T. asperellum* (Th034) almacenados a 18°C presentaron un comportamiento similar al observado a 8°C , ya que las germinaciones iniciales y las observadas en el noveno mes de almacenamiento fueron estadísticamente diferentes ($F = 128,81$, $df = 35$, $p < 0,0001$) entre sí, tanto para los conidios sin formular, como para las formulaciones granuladas de las 2 cepas y para la formulación en polvo de Th034. Por el contrario, para la formulación en

Tabla 3

Porcentajes de germinación de los conidios de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y *Trichoderma asperellum* Th034 en prototipos de bioplaguicidas almacenados durante 18 meses a 18 °C

Cepa	Formulación	Tiempo de almacenamiento (meses)					
		0	3	6	9	12	18
<i>T. koningiopsis</i> Th003	Conidios sin formular	94,7 ab	94,0 ab	93,0 abc	70,2 gh	73,4 gh	0,0 l
	Granulado dispersable	92,8 abc	95,6 a	94,6 ab	85,7 cde	83,5 de	65,6 h
	Polvo para espolvoreo	97,5 a	94,8 ab	92,8 abc	91,4 abc	82,8 ef	52,1 i
<i>T. asperellum</i> Th034	Conidios sin formular	94,7 ab	95,1 ab	95,1 ab	67,7 h	14,1 k	0,0 l
	Granulado dispersable	94,8 ab	96,4 a	95,9 a	81,0 ef	30,1 j	10,2 k
	Polvo para espolvoreo	97,0 a	93,5 ab	91,1 abcd	87,7 bcde	75,7 fg	32,5 j

Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).

polvo a base de Th003 sólo se detectaron diferencias significativas a partir de los 12 meses de almacenamiento (tabla 3).

Con respecto a los conidios sin formular de las 2 cepas (Th003 y Th034), estos presentaron una pérdida significativa de la capacidad para germinar al noveno mes de almacenamiento, comportamiento que no se evidenció en los productos formulados. Lo anterior sugiere un efecto protector de las formulaciones sobre los conidios, posiblemente relacionado con los excipientes empleados para la elaboración de los bioplaguicidas, dentro de los que se encuentran sustancias protectoras de secado y compuestos que tienen un efecto osmorregulador sobre el microorganismo. Varios autores han evidenciado este efecto positivo de las formulaciones, por ejemplo Melin et al. (2006) evaluaron la viabilidad y la concentración de formulados líquidos a base de la levadura *Pichia anomala*, almacenados a diferentes temperaturas y a los cuales se les incorporaron sustancias protectoras de la desecación. En este trabajo la formulación presentó entre un 75 y un 90% de viabilidad después de 4 semanas de almacenamiento a 4 y 10 °C, respectivamente. Sin embargo, la incorporación de lactosa o trealosa aumentó la viabilidad después de 12 semanas de almacenamiento en todas las temperaturas evaluadas (-20 a 30 °C). Los autores concluyeron que este efecto se debió posiblemente a que la lactosa y la trealosa estabilizaron las proteínas y los lípidos de la membrana celular cuando la célula fue sometida al proceso de desecación.

Las formulaciones de los 2 hongos almacenados a 28 °C presentaron un descenso en la capacidad de germinación del principio activo desde el tercer mes de almacenamiento, siendo la germinación final significativamente inferior ($F = 263,03$, $df = 35$, $p < 0,0001$) a la obtenida cuando se inició el estudio de estabilidad (tabla 4). Sin embargo, tanto para el granulado dispersable como para el polvo para espolvoreo a base de *T. koningiopsis* (Th003) y *T. asperellum* (Th034) almacenados a esta temperatura, la germinación evaluada después de 48 horas de incubación fue mayor que la obtenida a las 24 horas (datos no mostrados). Burges argumenta que el retraso en la germinación de los conidios posiblemente se debe a la deshidratación de los mismos durante el tiempo de almacenamiento, lo cual incrementa la tensión superficial⁴. Para mejorar la estabilidad de los bioproductos y disminuir los estados de latencia en el momento de aplicación, Jackson et al. recomendaron la utilización de soluciones

de rehidratación que incluyeran sustancias como dextrinas, disacáridos y monosacáridos, que reducen la tensión superficial y facilitan la rehidratación de los conidios²¹.

En general, se observó que los bioplaguicidas a base de Th003 y Th034 almacenados a las 3 temperaturas (8, 18 y 28 °C) presentaron una disminución progresiva en la capacidad de germinación de los conidios durante los 18 meses de almacenamiento. Sin embargo, el efecto más drástico se presentó cuando los bioplaguicidas a base de las 2 cepas fueron almacenados a 28 °C³⁰. Este resultado permite concluir que a mayor temperatura de almacenamiento, mayor pérdida de viabilidad, comportamiento descrito para diferentes microorganismos^{7,9,15,18,23,24,34,39}. El efecto negativo de las altas temperaturas sobre la viabilidad de los microorganismos durante el almacenamiento podría deberse a que a mayor temperatura existe una mayor reactividad de las moléculas, presentándose reacciones o procesos de degradación de los auxiliares de formulación, cuyos productos pueden ser tóxicos para el principio activo⁷. De igual manera, el metabolismo celular a una temperatura alta puede permanecer activo, lo que causa que los conidios almacenen metabolitos tóxicos que reducen drásticamente su viabilidad⁹.

Resultados similares a los obtenidos en el presente estudio fueron descritos por Elzien et al. (2004), quienes evaluaron la viabilidad del producto Pesta, cuyo principio activo es *F. oxysporum* (Foxy 2), durante 6 y 12 meses de almacenamiento. Este producto presentó una reducción de la viabilidad de entre el 21 y el 32%. Los autores atribuyeron este resultado a la pérdida de las reservas endógenas de carbono cuando el microorganismo fue almacenado a 25 °C. La disminución con el tiempo de la concentración de los principios activos de los bioplaguicidas también ha sido evidenciada por Kinay y Yildiz (2008), quienes evaluaron formulaciones a base de las levaduras *Metschnikowia pulcherrima* y *Pichia guilliermondii*, observando que las formulaciones almacenadas a 4 °C fueron más estables que las almacenadas a 24 °C. En dicho trabajo se concluyó que 4 °C es la temperatura de almacenamiento adecuada para mantener la estabilidad de las levaduras y aumentar la vida útil de las formulaciones, ya que a 24 °C la vida útil de las mismas disminuyó a partir de los 2 primeros meses de almacenamiento.

Para estimar la vida útil de los productos ensayados, se evaluó el ajuste de los porcentajes de germinación de los conidios en

Tabla 4

Porcentajes de germinación de los conidios de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y *Trichoderma asperellum* Th034 en prototipos de bioplaguicidas almacenados durante 18 meses a 28 °C

Cepa	Formulación	Tiempo de almacenamiento (meses)					
		0	3	6	9	12	18
<i>T. koningiopsis</i> Th003	Conidios sin formular	94,7 ab	85,5 cde	83,2 def	64,8 ij	4,8 mn	0,0 n
	Granulado dispersable	92,8 abc	86,8 cd	76,2 gh	70,7 hi	8,8 m	0,0 n
	Polvo para espolvoreo	97,5 a	82,0 defh	76,9 fgh	61,9 j	8,4 mn	0,0 n
<i>T. asperellum</i> Th034	Conidios sin formular	94,7 ab	87,6 cd	86,6 cd	57,9 jk	3,5 mn	0,0 n
	Granulado dispersable	94,8 ab	85,1 de	84,2 def	75,9 gh	5,6 mn	0,0 n
	Polvo para espolvoreo	97,0 a	85,9 cd	78,1 efg	50,9 l	6,6 mn	0,0 n

Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).

Tabla 5
Ajuste de los datos de germinación vs. tiempo de almacenamiento a diferentes modelos matemáticos

Cepa	Formulación	Temperatura (°C)	Coeficiente de determinación (R ²)					
			Orden cero	Primer orden	Segundo orden	Higuchi	Korsmeyer-Peppas	Polinómica
<i>Trichoderma koningiopsis</i> Th003	Conidios sin formular	8	0,695	0,699	0,171	0,539	0,617	0,997
		18	0,759	0,750	0,002	0,592	0,715	0,995
		28	0,770	0,602	0,163	0,562	0,503	0,985
	Granulado dispersable	8	0,525	0,535	0,747	0,325	0,599	0,949
		18	0,699	0,698	0,790	0,478	0,742	0,981
		28	0,691	0,581	0,170	0,456	0,509	0,942
	Polvo para espolvoreo	8	0,689	0,599	0,634	0,489	0,391	0,984
		18	0,720	0,606	0,538	0,519	0,398	0,934
		28	0,905	0,675	0,009	0,490	0,469	0,955
<i>Trichoderma asperellum</i> Th034	Conidios sin formular	8	0,737	0,728	0,114	0,546	0,704	0,995
		18	0,724	0,620	0,146	0,482	0,550	0,961
		28	0,800	0,622	0,192	0,577	0,531	0,962
	Granulado dispersable	8	0,712	0,709	0,641	0,522	0,686	0,943
		18	0,643	0,588	0,747	0,408	0,528	0,911
		28	0,657	0,562	0,170	0,425	0,493	0,931
	Polvo para espolvoreo	8	0,674	0,645	0,607	0,555	0,468	0,996
		18	0,776	0,749	0,692	0,584	0,548	0,996
		28	0,920	0,925	0,014	0,800	0,788	0,985

los tiempos de almacenamiento a diferentes modelos matemáticos (tabla 5). El mejor ajuste correspondió al modelo polinomial (tablas 5 y 6), de forma similar a lo observado en trabajos previos²⁵.

Una vez definido el modelo más adecuado para interpretar el comportamiento de los datos, se procedió a establecer la vida útil de los productos, calculando mediante la ecuación determinada el tiempo en el cual la germinación de los conidios alcanza el 85%. Este límite se definió según lo recomendado por Jenkins y Grzywacz (2000), quienes establecieron que para garantizar la calidad y eficacia de bioplaguicidas fúngicos durante el almacenamiento se requiere una viabilidad mínima del 85%, estimada como germinación de conidios o recuento de unidades formadoras de colonias. En este sentido, en la tabla 6 se muestran los valores de vida útil estimados para las distintas formulaciones de los 2 agentes de control biológico evaluados.

Para los productos a base de *T. koningiopsis* Th003 y *T. asperellum* Th034, los mayores tiempos de vida útil se obtuvieron con el prototipo en polvo almacenado a 8 y 18 °C, con valores entre 10,8 y 14,4 meses. La temperatura de 28 °C causó un efecto negativo sobre los microorganismos, obteniéndose las menores vidas útiles, que oscilaron entre 2,9 y 5,2 meses, tanto para los productos en polvo como para los granulados dispersables. Estos resultados concuerdan con los descritos por Papavizas et al., quienes demostraron

que los conidios *T. viride*, principio activo del producto Pyrax, no lograron mantenerse viables por un tiempo superior a 20 semanas (5 meses) cuando fueron almacenados a 30 °C, valor de vida útil similar a los obtenidos en el presente estudio para algunos tratamientos almacenados a 28 °C.

Los conidios sin formular presentaron vidas útiles inferiores a las obtenidas para los productos formulados en todas las temperaturas evaluadas. Estos resultados confirman el efecto protector que ejercieron los excipientes sobre el principio activo, mejorando su estabilidad durante el tiempo de almacenamiento y protegiendo el producto de condiciones ambientales desfavorables. Además, se observó un efecto del tipo de formulación sobre la estabilidad de los conidios, obteniendo mayores tiempos de vida útil para los 2 hongos con el producto en polvo que con los granulados dispersables.

Este efecto diferencial de la formulación sobre la germinación de los conidios almacenados podría estar relacionado con las diferencias en la composición de los productos o en los procesos utilizados para su manufactura. En este sentido, el granulado dispersable se elaboró mezclando directamente el sustrato esporulado con los auxiliares de formulación, quedando en este prototipo de bioplaguicida metabolitos secundarios producto de la fermentación y fuentes de carbono disponibles debido al consumo incompleto del

Tabla 6
Ecuación del modelo polinomial y vida útil estimada con dicho modelo, para los productos formulados y los conidios sin formular a base de *Trichoderma koningiopsis* (Th003) y *Trichoderma asperellum* (Th034)

Cepa	Formulación	Temperatura (°C)	Ecuación del modelo	Vida útil (meses)
<i>T. koningiopsis</i> Th003	Conidios sin formular	8	$y = -0,0017x^5 + 0,0631x^4 - 0,818x^3 + 4,0019x^2 - 6,2916x + 94,547$	7,9
		18	$y = -0,0019x^5 + 0,0708x^4 - 0,8805x^3 + 3,9024x^2 - 5,3135x + 94,502$	6,9
		28	$y = 0,0034x^5 - 0,1688x^4 + 2,9223x^3 - 20,115x^2 + 34,023x + 95,878$	2,9
	Granulado dispersable	8	$y = 0,0036x^3 - 0,1969x^2 + 1,0565x + 94,494$	11,6
		18	$y = 0,0021x^3 - 0,1598x^2 + 0,6133x + 94,654$	10,9
		28	$y = 0,006x^4 - 0,1605x^3 + 0,8201x^2 - 2,8207x + 93,498$	4,6
	Polvo para espolvoreo	8	$y = -0,015x^3 + 0,2461x^2 - 1,316x + 97,78$	14,4
		18	$y = -0,0259x^3 + 0,5101x^2 - 3,2291x + 98,625$	13,9
		28	$y = 0,0545x^3 - 1,4912x^2 + 3,9272x + 93,164$	4,6
<i>T. asperellum</i> Th034	Conidios sin formular	8	$y = -0,0014x^5 + 0,0509x^4 - 0,6224x^3 + 2,6148x^2 - 2,8342x + 94,512$	7,5
		18	$y = 0,0018x^4 + 0,0058x^3 - 1,3371x^2 + 6,8063x + 92,924$	6,4
		28	$y = 0,0038x^4 - 0,0641x^3 - 0,5066x^2 + 2,4325x + 92,904$	5,2
	Granulado dispersable	8	$y = -0,0137x^3 + 0,1778x^2 - 1,4598x + 96,29$	10,7
		18	$y = 0,043x^3 - 1,3804x^2 + 6,475x + 93,564$	7,2
		28	$y = 0,0867x^3 - 2,5117x^2 + 12,082x + 90,523$	3
	Polvo para espolvoreo	8	$y = -0,0226x^3 + 0,3886x^2 - 2,2291x + 97,751$	12
		18	$y = 0,0038x^4 - 0,1413x^3 + 1,3774x^2 - 4,6671x + 98,175$	10,8
		28	$y = 0,061x^3 - 1,6173x^2 + 4,1576x + 93,185$	4,2

sustrato (arroz). Se ha sugerido que estos factores podrían mantener activo el metabolismo celular y reducir la viabilidad de los conidios durante el tiempo de almacenamiento¹⁸. Por el contrario, para la elaboración del polvo para espolvoreo que presentó mayor estabilidad, la biomasa fue separada del sustrato de crecimiento mediante lavado y centrifugación, lo que posiblemente contribuyó a mejorar la tolerancia de las células a las condiciones de estrés del almacenamiento. Este efecto positivo de la separación de los conidios del sustrato fue descrito por Guijarro et al. (2007), quienes concluyeron que dicho proceso aumenta las reservas endógenas de las células haciéndolas más resistentes, especialmente a la desecación.

Para todos los prototipos de bioplaguicidas y los conidios sin formular, las mayores vidas útiles se obtuvieron cuando el almacenamiento fue a 8 °C, temperatura que permite reducir la actividad metabólica de los conidios, evitando la producción de metabolitos tóxicos y el agotamiento de nutrientes^{15,26}. Este efecto fue evidenciado por Shabana et al., quienes concluyeron que para mantener la viabilidad de *F. oxysporum*, utilizado como principio activo de un bioherbicida, es necesario almacenarlo a bajas temperaturas, ya que después de un año a 3 y 25 °C se obtuvieron viabilidades finales del 93 y del 55%, respectivamente³⁵.

En el mercado mundial existen diferentes productos a base de *Trichoderma harzianum* como RootShield® WG, PlantShield® WP y Rootmate® WG, para los que los fabricantes estimaron una vida útil de 6 meses a temperaturas entre 10 y 25 °C y de 9 meses si el almacenamiento se realiza entre 0 y 10 °C⁸. Teniendo en cuenta lo anterior, los bioplaguicidas evaluados en el presente estudio son competitivos con respecto a los disponibles comercialmente, ya que se puede recomendar el almacenamiento de los productos de las 2 cepas a una temperatura promedio de 18 ± 2 °C con vidas útiles superiores a 7 meses, valores similares a los presentados por los productos que se encuentran disponibles en el mercado internacional.

Es interesante resaltar que la vida útil obtenida para el polvo para espolvoreo a base de Th003 es mayor a un año tanto a 8 como a 18 °C, valor superior al que presentan la mayoría de bioplaguicidas a base de hongos biocontroladores⁸. Estos resultados son favorables para el posicionamiento comercial de las formulaciones en polvo evaluadas en el presente trabajo, ya que no requieren cadena de refrigeración para su transporte y almacenamiento, manteniendo una vida útil aceptable y disminuyendo los costes de producción y comercialización.

Financiación

El presente trabajo ha recibido apoyo financiero del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia el apoyo financiero a este trabajo.

Bibliografía

- Beltrán C, Cotes AM, Paris A. Selection of isolates of *Trichoderma* spp. with biocontrol activity over *Rhizoctonia solani* in potato. IOBC/WPRS Bull. 2007;30:55-8.
- Boyetchko S, Hynes R. Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations. Soil Bio Biochem. 2006;38:845-9.
- Branch S. Guidelines from the International Conference on Harmonisation (ICH). J Pharm Biomed Anal. 2005;38:798-805.
- Burges HD, editor. Formulation of microbial pesticides, beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 1998. p. 2-26.
- Butt TM, Jackson C, Magan B. Fungi as biocontrol agent: progress, problems and potential. Wallingford, United Kingdom: CAB International; 2001.
- Candela ME, Egea-Gilbert C, Ezziyiani M, Requena ME. Biological control of *Phytophthora* root of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination. J Phytopathol. 2007;155:342-9.
- Chen A, Zhangyan S, Zhang L. The effects of some storage conditions on viability of *Lecanicillium lecanii* conidia to whitefly (Homoptera: *Trialeurodes vaporariorum*). Biocontrol Sci Tech. 2008;18:267-78.
- Copping L. The biopesticide manual. Londres, Reino Unido: The British Crop Protection Council; 2001. p. 224-50.
- Costa J, Teixido U, Torres R, Viñas I. Effect of package and storage conditions on viability and efficacy of the freeze-dried biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2. J Appl Microbiol. 2002;92:873-8.
- Cotes AM, Lepoivre P, Semal J. Correlation between hydrolytic enzyme activities measured in bean seedlings after *Trichoderma koningii* treatment combined with pregermination and the protective effect against *Pythium splendens*. Europ J Plant Pathol. 1996;102:497-506.
- Cotes AM, Cárdenas A, Pinzón H. Effect of seed priming in the presence of *Trichoderma koningii* on seed and seedling disease induced in tomato by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. IOBC/WPRS Bull. 2001;24:259-563.
- Cotes AM, Moreno CA, Molano LF, Villamizar L, Piedrahita W. Prospects for integrated management of *Sclerotinia sclerotiorum* in lettuce. IOBC/WPRS Bull. 2007;30:391-4.
- Dal Soglio FK, Bertagnolli BL, Sinclair JB, Yu GY, Eastburn DM. Production of chitinolytic enzymes and endoglucanase in the soybean rhizosphere in the presence of *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*. Biol Control. 1998;12:111-7.
- Ekesi S, Maniania NK, Ampong-Nyarko K. Effect of temperature on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Megalurothrips sjostedti*. Biocontrol Sci Tech. 1999;9:177-85.
- Elzein A, Kroschel J, Müller-Stöver D. 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 Sci Tech. 2004;14:545-59.
- García DA, Ramos V, Sanchis S, Marín S. Predicting mycotoxins in foods: a review. Food Microbiol. 2009;26:757-69.
- Ghisalberti E, Sivasithamparam K. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. Soil Bio Biochem. 1991;23:1011-20.
- Guijarro B, Melgarejo P, De Cal A. Effect of stabilizers on the shelf-life of *Penicillium frequentans* conidia and their efficacy as a biological agent against peach brown rot. Inter J Food Microb. 2007;113:117-24.
- Hadjioannou TP, Christian GD, Koupparis MA, Macheras PE. Quantitative calculations in pharmaceutical practice and research. Nueva York, EE. UU.: VCH Publishers Inc; 1993. p. 345-8.
- Harman G, Howell C, Viterbo A, Chet I, Lorito M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat Rev Microbiol. 2004;2:43-56.
- Jackson M, Poprawski T. Influence of formulation additives on the desiccation tolerant and storage stability of blastospores of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). Biocontrol Sci Tech. 2007;16:61-75.
- Jenkins N, Grzywacz J. Quality control of fungal and viral biocontrol agents - Assurance of product performance. Biocontrol Sci Tech. 2000;10:753-77.
- Kinay P, Yildiz M. The shelf life and effectiveness of granular formulations of *Metschnikowia pulcherrima* and *Pichia guilliermondii* yeast isolates that control postharvest decay of citrus fruit. Biol Control. 2008;45:433-40.
- Kolombet L, Zhigletsova Z, Kosareva I, Bystrova N, Derbyshev V, Krasnova P, et al. Development of an extended shelf-life, liquid formulation of the biofungicide *Trichoderma asperellum*. World J Microbiol Biotechnol. 2007;24:123-31.
- Lahlialia R, Serrhini MN, Jijakl MH. Studying and modelling the combined effect of temperature and water activity on the growth rate of *P. expansum*. Inter J Food Microb. 2006;103:315-22.
- Melin P, Hakansson S, Eberhard T, Schnurer J. Survival of the biocontrol yeast *Pichia anomala* after long-term storage in liquid formulations at different temperatures, assessed by flow cytometry. J Appl Microb. 2006;100:264-71.
- Moreno CA, Castillo F, Gonzalez A, Bernal D, Jaimes Y, Chaparro M, et al. Biological and molecular characterization of the response of tomato plants treated with *Trichoderma koningiopsis*. Physiol Mol Plant Pathol. 2009;74:111-20.
- Moreno CA, Cotes AM, Guevara E. Biological control of foliar diseases in tomato greenhouse crop in Colombia: selection of antagonists and efficacy tests. IOBC/WPRS Bull. 2007;30:59-62.
- Moreno CA, Cotes AM. Survival in the phylloplane of *Trichoderma koningii* and biocontrol activity against tomato foliar pathogens. IOBC/WPRS Bull. 2007;30:557-61.
- Papavizas G, Dunn M, Lewis J, Beagle J. Liquid fermentation technology for experimental production of biocontrol fungi. Phytopathol. 1984;74:1171-5.
- Perello A, Monaco C, Cordo C. Evaluation of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium roseum* in controlling leaf blotch of wheat (*Septoria tritici*) under in vitro and greenhouse conditions. Z Pflanzankr Pflanzenschutz. 1997;2:588-98.
- Prandini A, Sigolo A, Filippi L, Battilani P, Piva P. Review of predictive models for *Fusarium* head blight and related mycotoxin contamination in wheat. Food Chem Toxicol. 2008;47:927-31.
- Roco A, Pérez L. In vitro biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* on *Alternaria alternata* in the presence of growth regulators. Electron J Biotechnol. 2001;4:68-73.

34. Sabaratnam S, Traquair J. Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplants. *Biol Control*. 2002;23:245–53.
35. Shabana Y, Muller-Stuover D, Sauerborn J. Granular pest formulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *orthoceras* for biological control of sunflower broomrape: efficacy and shelf-life. *Biol Control*. 2003;26:189–201.
36. Shoaib MH, Tazeen J, Merchant HA. Evaluation of drug release kinetics from ibuprofen matrix tablets using HPMC. *Pak J Pharm Sci*. 2006;19:119–24.
37. Verma M, Brar K, Tyagi R, Surampalli T, Valero J. Antagonistic fungi *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochem Eng J*. 2007;37:1–20.
38. Villamizar L, Cotes AM. Efectos de las condiciones de cultivo sobre parámetros del modo de acción de *Metarhizium anisopliae*. *Rev Colomb Entomol*. 2003;29:121–6.
39. Zhang S, Schisler D, Jackson M, Boehm M, Slininger P, Lewis L. Cold shock during liquid production increases storage shelf-life of *Cryptococcus nodaensis* OH 182.9 after air-drying. *Biocontrol Sci Tech*. 2006;16:281–93.