

DESARROLLO DE MICROECONOMÍAS REGIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE ACEITES ESENCIALES COSECHADOS EN SUELOS MINEROS - ATN/RF 16110

Producto 15: Informe sobre biomasa de microorganismos entomopatógenos, antagonistas y/o biofertilizantes en formulaciones simples

Juan Diego Medina
David Granada

2021





Códigos JEL: Q16

FONTAGRO (Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria) es un programa de cooperación administrado por el Banco Interamericano de Desarrollo (BID), pero con su propia membresía, estructura de gobernabilidad y activos. Las opiniones expresadas en esta publicación son de los autores y no necesariamente reflejan el punto de vista del Banco Interamericano de Desarrollo, FONTAGRO, de sus Directores Ejecutivos ni de los países que representan.

El presente documento ha sido preparado por Juan Diego Medina y David Granada.

Copyright © 2021 Banco Interamericano de Desarrollo. Esta obra se encuentra sujeta a una licencia Creative Commons IGO 3.0 Reconocimiento-NoComercial- SinObrasDerivadas (CC-IGO 3.0 BY-NC-ND) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/igo/legalcode>) y puede ser reproducida para cualquier uso no comercial otorgando el reconocimiento respectivo al BID. No se permiten obras derivadas. Cualquier disputa relacionada con el uso de las obras del BID que no pueda resolverse amistosamente se someterá a arbitraje de conformidad con las reglas de la CNUDMI (UNCITRAL). El uso del nombre del BID para cualquier fin distinto al reconocimiento respectivo y el uso del logotipo del BID no están autorizados por esta licencia CC-IGO y requieren de un acuerdo de licencia adicional. Note que el enlace URL incluye términos y condiciones adicionales de esta licencia.

Esta publicación puede solicitarse a:

FONTAGRO

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org

www.fontagro.org



Tabla de Contenidos

Resumen	4
Introducción.....	6
Metodología.....	8
Resultados.....	19
Discusión	39
Conclusiones	40
Referencias Bibliográficas.....	42
Instituciones participantes	43



Resumen

Se probaron y seleccionaron aislados microbianos obtenidos en el departamento del Cesar y se seleccionaron dos aislados por su capacidad sobresaliente como antagonista y uno como entomopatógeno (*Trichoderma reesei*, *Trichoderma sp.*, y *Beauveria bassiana*, respectivamente). Se diseñaron métodos de fermentación en sustrato sólido y fermentación líquida o sumergida, de acuerdo con el rendimiento de cada aislado en la producción de conidias. Estos métodos se optimizaron de manera satisfactoria.

En una primera etapa la producción de los microorganismos se hizo bajo condiciones de matraz. Se evaluaron diferentes fuentes de carbono, nitrógeno y sus respectivas concentraciones por el método de “un factor a la vez”. Se emplearon además diseños de superficie de respuesta (Plackett-Burman, diseño de máximo ascenso, y Box-Behnken). Dichos diseños abarcan un conjunto de técnicas avanzadas de diseño de experimentos (DOE) que ayudan a entender mejor y optimizar la respuesta, en este caso, rendimiento de conidias. Para el caso de *Beauveria bassiana* el método de propagación más eficiente fue en medio líquido, el cual alcanzó un rendimiento promedio de $2,4 \times 10^9$ conidias/mL⁻¹ a los 4 días de fermentación. Para los aislados de *Trichoderma* la fermentación líquida no resultó ser adecuada, por lo cual se usó un medio sólido a base de sustrato de arroz y otros compuestos definidos por las metodologías ya mencionadas. Con el uso de sustrato de arroz los aislados de *Trichoderma* alcanzaron concentraciones promedio de $2,1 \times 10^9$ conidias/g luego de 8 días de crecimiento. El modelo se validó en condiciones de biorreactor para el hongo *Beauveria bassiana*, mostrando un rendimiento de $2,2 \times 10^{10}$ conidias mL⁻¹ luego de 6 días, en un volumen final de 3L.

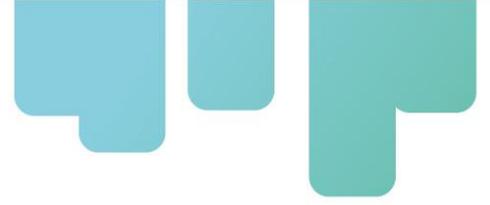
La segunda etapa, la cual está en proceso, se ha enfocado en establecer una metodología de formulación que permita la conservación de los microorganismos y puedan llevarse masivamente a campo. Se están evaluando formulaciones tipo de emulsión con el fin de facilitar su uso por parte del agricultor o técnico de campo. Para alcanzar dicho objetivo se propagaron los microorganismos con las metodologías estandarizadas. Luego se prepararon emulsiones agua en aceite (W/O) con la ayuda de un emulsificador de alta velocidad. Entre los excipientes usados se encuentran benzoato de sodio, goma xantán, Tween 80, ácido láctico, agua y aceite vegetal de bajo costo. La emulsión y el fermentado líquido se combinaron en una relación 1:1 (50mL de fermentación del hongo y 50mL de emulsión) y se almacenaron a temperatura ambiente. Se realizó seguimiento de viabilidad en diferentes tiempos (0, 8, 15, 20, y 30 días). Luego de ajustar la formulación y de resultados negativos en términos de concentración del hongo, se logró una emulsión que ha conservado adecuadamente las conidias del hongo por 15 días. Con los resultados de esta primera fase de formulación se tomaron los datos hallados y se está llevando a cabo una segunda etapa de formulación usando diseños de experimentos (Plackett-Burman, Diseño factorial 3x3) con el fin de evaluar diferentes variables implicadas en la formulación. Se



diseñaron 2 tipos de formulación una líquida tipo emulsión y una sólida tipo polvo mojable para los microorganismos *Beauveria bassiana* y *Trichoderma reesei*, ambos casos llevan un mes aproximadamente en evaluación con resultados promisorios que permitirán ajustes en el modelo del diseño experimental.

Palabras Clave:

Fermentación, optimización, hongos, biocontrol, diseño de experimentos, formulaciones, biorreactor.



Introducción

En el presente informe se detallarán los resultados relacionados con las actividades a cargo que van desde la etapa de la formulación de los microorganismos de interés (Periodo de ejecución 2019-2020). En esta parte se centró en evaluar los hongos en dos tipos de formulaciones, solida tipo polvo mojable y líquida tipo emulsión mediante el cual el ingrediente activo ya sea conidias o micelio se mezcla con ciertos materiales inertes, tales como vehículos, solventes, emulsificantes o gelificantes, y otros aditivos que pueden ser nutrientes o estimulantes. Estos materiales favorecen la longevidad del hongo ya sea protegiéndolo del medio ambiente, aumentando su vida útil o mejorando su viabilidad y ayudan a su desarrollo una vez aplicado en el suelo. Las tecnologías de identificación, evaluación y fermentación, son fundamentales para determinar si el microorganismo seleccionado, en teoría altamente eficaz, pueda convertirse en un bioinsumo viable, de aquí que durante el proceso se hayan usado herramientas estadísticas para predecir y calcular puntos óptimos de producción y conservación de los microorganismos. En esta etapa de desarrollo, es clave lograr el escalado eficiente del proceso basado en los elementos fundamentales de requerimientos nutricionales y físicos de cada microorganismo, teniendo en cuenta no solo la cantidad de biomasa a obtener sino también la producción de metabolitos secundarios y/o enzimas u otros componentes para dar un valor agregado al producto final.

La implementación de estas técnicas que van desde conocer el microorganismo hasta llevarlo a una formulación son los objetivos que se están desarrollando con el propósito de potenciar y mejorar la producción de estos bienes agrícolas que pueden ir paulatinamente sustituyendo los agroquímicos sintéticos y potenciar que se proteja la vida en todas sus expresiones: la de consumidores que acceden a alimentos más sanos, la de agricultores y campesinos que laboran en ambientes menos contaminados y la de polinizadores, biocontroladores y microorganismos benéficos, fundamentales para la productividad de los agroecosistemas.



Objetivos

- Determinar los medios apropiados para la propagación y formulación de los microorganismos de interés.



Metodología

PROPAGACIÓN DE MICROORGANISMOS Y FORMULACIÓN

1. PROPAGACIÓN DE MICROORGANISMOS

Diseño simple: Un factor a la vez (fuente de carbono y nitrógeno) *Beauveria bassiana*.

Teniendo como base las condiciones estandarizadas se tomó el protocolo establecido para validar las condiciones de crecimiento, para ello se partió de la siguiente información: Se realizó un diseño simple para la selección de la fuente de carbono y nitrógeno. Se evaluaron 6 fuentes de carbono, glucosa, extracto de malta, lactosa, glicerol 85%, almidón y puré de papa, modificando algunas de las ya reportadas (Feng, Liu, & Tzeng, 2000) y además teniendo como criterio el bajo costo para una producción industrial. Se pesaron; 1,25 g de cada fuente de carbono en 50 mL de agua. El medio de cultivo base consistió en una solución de extracto de levadura y extracto de malta. (1,25 g de ambos en 800 mL de agua), ajuste del pH del 6,5. Se tuvo en total 18 erlenmeyer bafleados, 3 por fuente de carbono, cada erlenmeyer se llenó con 20 mL del medio base (extracto de levadura y extracto de malta), más 1 mL de la suspensión del hongo y 5 mL de la fuente de carbono, el montaje se llevó a agitación en shaker a 130 rpm para hacer lectura a las 72 horas, con temperatura promedio de 25°C. El control consistió en el medio base sin fuente de carbono. Una vez se halló la mejor fuente de carbono se evaluó con suplemento de las 5 fuentes de nitrógeno, nitrato de potasio, sulfato de amonio, proteína aislada de soya, extracto de levadura y urea. De cada fuente de nitrógeno se pesó 0,25 g suspendidos en 50 mL de agua en frasco ámbar. Se tuvo un medio de cultivo base con extracto de malta, puré de papa (fuente de carbono escogida de acuerdo al nivel de concentración de conidios/mL): Se pesó 0,625 g de extracto de malta, y 3,125 g (puré de papa), estos pesos se suspendieron en 500 mL de ADE con ajuste del pH a 6,5. Se tuvo en total 18 erlenmeyer bafleados, 3 por fuente de nitrógeno, cada erlenmeyer se llenó con 20 mL del medio base (extracto de malta y puré de papa), más 1 mL de la suspensión del hongo y 5 mL de la fuente de nitrógeno, el montaje se llevó a agitación en shaker a 130 rpm para hacer lectura a las 72 horas, con temperatura promedio de 25°C. El control consistió en el medio base sin fuente de nitrógeno.

Evaluación de cribado (Plackett-Burman) *Beauveria bassiana*.

El diseño de Plackett-Burman es una herramienta para rastrear y determinar rápidamente las variables importantes que tienen una influencia significativa en la respuesta de producción. Este método es muy útil para detectar los factores más importantes de una larga lista de factores candidatos. En este trabajo, se reunieron diferentes parámetros de cultivo que están directamente relacionados con el crecimiento de *Beauveria bassiana* (tamaño del inóculo, pH



inicial, la temperatura de incubación, y el tiempo de incubación) y los componentes del medio (extracto de malta, puré de papa, proteína aislada de soya, sulfato Magnesio y cloruro de Calcio). Cada factor se examinará sobre la base de Plackett-Burman diseño factorial: -1 y +1 para el nivel bajo y alto, respectivamente, como se muestra a continuación en la tabla 1. (Ji, Li, Xin, Wang, & Cao, 2015).

Tabla 1. Atributos del diseño Plackett-Burman

<i>Factores</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Unidades</i>	<i>Continuo</i>
Malta	0,5	2,0	g/L	Si
Papa	2,5	7,5	g/L	Si
Soya	0,5	2,0	g/L	Si
Magnesio	10,0	100,0	uL	Si
Calcio	10,0	100,0	uL	Si
Temperatura	21,0	28,0	°C	Si
Cinocul exp6	0,1	5,0	conidias/mL	Si
pH	5,5	7,5		Si
Tiempo	3,0	6,0	d	Si

Evaluación Diseño de máximo ascenso (Steepest Ascent) *Beauveria bassiana*.

El diseño de Máximo ascenso es un método mediante el cual se procede secuencialmente a lo largo de un camino de respuesta, es decir un ascenso en las variables de respuesta, con el fin de observar algunas variaciones en la estandarización del medio de cultivo permitiendo ver significativamente las variables influenciadas por la producción de conidias. Para este diseño se realizaron 4 experimentos con 3 réplicas, las variables en evaluación fueron el puré de papa, proteína aislada de soya y temperatura con las características que se muestran en la tabla 2, se incubo en shaker a 130 rpm, pH 5,5, por 3 días, estas condiciones ya establecidas en los diseños anteriores.

Tabla 2. Atributos del diseño de máximo ascenso.

Run	^a X ₂	^a X ₃	^a X ₆	Conidial production. mL ⁻¹
1	6	1.5	23	
2	8	2	25	
3	10	2.5	27	
4	12	3	29	

X₂: Potato mashed (g L⁻¹)
 X₃: Isolated soy protein (g L⁻¹)
 X₆: T (° C)

Optimización por superficie de respuesta (Box-Behnken) *Beauveria bassiana*.

Un diseño de Box-Behnken es un tipo de diseño de superficie de respuesta que no tiene un diseño factorial o factorial fraccionado incrustado, Los diseños de Box-Behnken tienen



combinaciones de tratamiento que están en los puntos medios de los bordes del espacio experimental y requieren al menos tres factores continuos, con él se busca determinar los niveles óptimos de las 3 variables independientes hallas en el diseño Plackett- Burman para *Beauveria bassiana* (puré de papa, proteína aislada de soya y la temperatura). La tabla 3 muestra el diseño de la matriz y los datos del experimento con lectura de concentración a los 3 días donde la variable respuesta es la concentración de conidias.

Tabla 3. Atributos del diseño de Box-Behnken.

<i>Factores</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Unidades</i>	<i>Contimio</i>
Pure papa	8,0	16,0	g/L	Si
Prot. soya	2,0	8,0	g/L	Si
Temperatura	24,0	30,0	°C	Si

<i>Respuestas</i>	<i>Unidades</i>
Concet. conidias	conidias/mL

Condiciones de crecimiento *Trichoderma sp.*

Se realizó la optimización de las condiciones de cultivo para incrementar la producción de conidias en fermentación sólida a partir del aislamiento *Trichoderma sp.* Para esto, se tomó como punto de partida un medio básico que contenía: 30 g de arroz como sustrato y fuente de carbono, 9 mL de agua destilada (30% p/v), 0.105 g de CaCO₃ (0.03% p/p). Se investigó el efecto de la adición de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, así como el efecto de diferentes concentraciones de inóculo y diferentes volúmenes de agua. Se utilizaron diferentes metodologías de optimización para determinar los principales factores del medio.

Diseño simple: Un factor a la vez *Trichoderma sp.*

Se realizaron fermentaciones en estado sólido a escala erlenmeyer del aislamiento, utilizando el medio base descrito anteriormente. Se evaluaron inicialmente como fuentes de carbono soluciones de: glucosa, extracto de papa, glicerol, sacarosa, lactosa y maltosa; a las concentraciones de 5, 15 y 30 g/kg de arroz. Posteriormente, luego de definir la fuente de carbono y la concentración de partida, se evaluó la influencia de la adición de diferentes fuentes de nitrógeno en la producción de conidias por parte del hongo.

Evaluación de cribado (Plackett-Burman) *Trichoderma sp.*

Los factores lactosa, sulfato de amonio, carbonato de calcio, agua, cloruro de magnesio y el volumen de inóculo fueron seleccionados para optimizar la producción de esporas de *Trichoderma sp.* en fermentación en estado sólido. Cada factor fue evaluado en un nivel alto, medio y bajo.



Optimización por superficie de respuesta (Box-Behnken) *Trichoderma* sp.

Un diseño (BBD) fue empleado para identificar el valor óptimo de los tres factores más influyentes (Lactosa, calcio y agua). En este diseño, las combinaciones de tratamiento se encuentran en los puntos medios de los bordes del espacio de proceso y en el centro. Los rangos de lactosa (4, 8, 12 g/kg), carbonato de calcio (0.1, 0.3, 0,5 g/kg), agua (10, 20, 30 mL/30 g arroz), fueron seleccionados de acuerdo a los resultados obtenidos en los experimentos del diseño PB y un factor a la vez.

2. FORMULACIÓN

Primera fase

Fermentación líquida de *Beauveria bassiana*.

Suspensión del hongo: Esta se realizó tomando un cuadrado de 1 cm² aproximadamente del hongo (*Beauveria bassiana*) conservado a 4°C en medio de cultivo PDA en caja de Petri (Figura 1). De aquí se llevó a un tubo falcón con 25 ml de agua destilada estéril, y se hizo lectura de la concentración en la cámara de Neubauer. El inóculo inicial para los experimentos siempre en base de 10⁶ conidias/mL⁻¹.

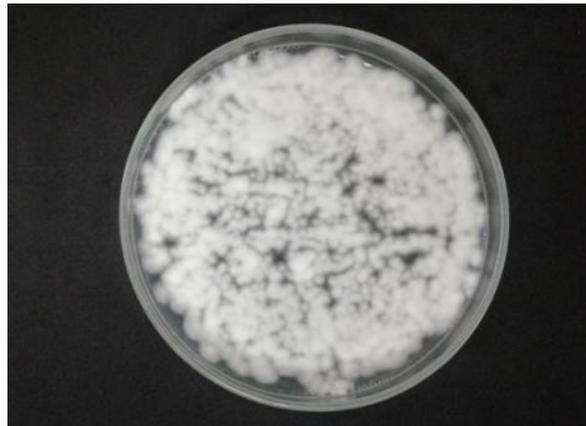


Figura 1. Cultivo de *Beauveria bassiana* en PDA para inóculo en medio líquido.

La preparación para el medio líquido fue la siguiente:

- Puré de papa: 16 g/L
- Proteína Aislada de Soya: 8 g/L
- Extracto de malta: 2 g/L
- Cloruro de calcio: 100 µL



Sulfato de Magnesio: 10 μ L
Se ajustó el pH a 5,5.

Se sirve en erlenmeyer aproximadamente 25 mL del medio y se realiza el inculo del microorganismo. El proceso de fermentación se lleva a cabo durante 3-4 días en agitación de 130 rpm y 26°C. (Figura 2).

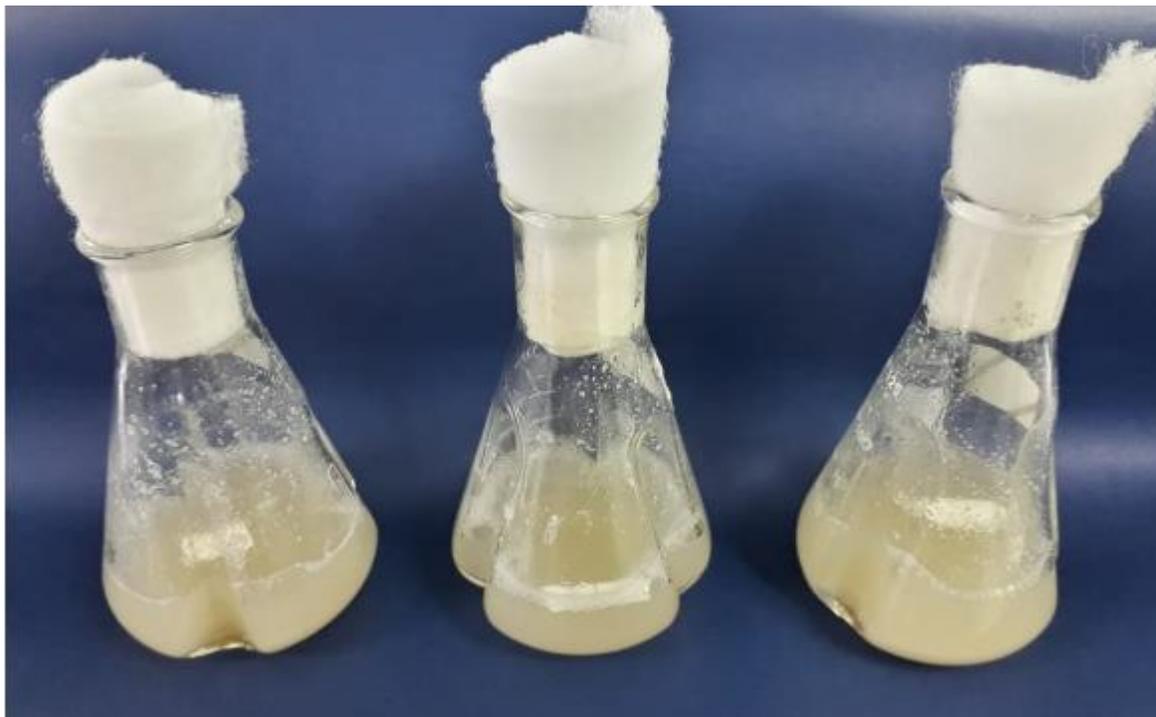


Figura 2. Fermentación líquida de *Beauveria bassiana*.

Fermentación Solida de *Trichoderma* sp.

En erlenmeyer de 250 mL se agregaron 30 g de arroz más 13 mL de agua y se envió a esterilización por 15 min. Previamente se debe tener esterilizada una solución stock de cada uno de los siguientes componentes:

- ✓ Sulfato de amonio 20%
- ✓ Lactosa 20%
- ✓ Carbonato de calcio 5%

En 3 tubos Falcon de 50 mL se agregó para cada *Trichoderma*:

- ✓ 750 μL de Lactosa
- ✓ 225 μL de Sulfato de amonio
- ✓ 300 μL de Carbonato de calcio
- ✓ 275 μL de inculo de cada microorganismo en 1×10^6 conidias/ mL^{-1}

Suspensión del hongo: Esta se realizó tomando un cuadrado de 1 cm^2 aproximadamente de las 3 cepas de *Trichoderma* sp conservado a 4°C en medio de cultivo PDA en caja de Petri (Figura 3a). De aquí se llevó a un tubo falcón con 25 ml de agua destilada estéril, y se hizo lectura de la concentración en la cámara de Neubauer. El inculo inicial para los experimentos siempre en base de 10^6 conidias/ mL^{-1} .



Figura 3. a. Cepas de *Trichoderma* sp para inculo. **b.** Erlenmeyer con sustrato de arroz para inculo de *Trichoderma* sp.



Metodología de formulación en proceso de estandarización.

Luego de varios montajes con diferentes componentes se presenta a continuación una de las formulaciones que mejores resultados a presentado. Para la preparación de la emulsión se tuvo los siguientes componentes para un volumen final de 500 ml en una relación 1:1 (350 agua: 350 aceite vegetal):

- ✓ Goma xantana 0,05%
- ✓ Benzoato de sodio 0,5%
- ✓ Tween 80%

En la fase acuosa de 250 mL de agua destilada estéril (ADE) se agregan la goma xantana, el benzoato de sodio, el Tween 80 de modo que queden en las concentraciones indicadas para un volumen final de 700 mL de emulsión. En este proceso se ajustó el pH a 5,5 con ácido láctico al 25%. Luego se llevó a emulsificador a 2500 rpm durante 5 min agregando los 250 mL de aceite vegetal. (Figura 4). Se envaso en frascos de vidrio de 200 mL previamente esterilizados. (Figura 5). A cada recipiente se le realizan pruebas de pureza, la cual tiene como finalidad establecer la proporción del agente biológico en la fermentación e identificar los microorganismos contaminadores, contribuyendo a mejorar el proceso de producción, para ello se preparó cajas con PDA sin acidificar, luego se tomó la dilución 10^{-4} , 10^{-5} , previamente preparadas y se sembró por duplicado. Se tomaron 100 μ l y se siembran en la superficie de las cajas con PDA y se esparcen de manera homogénea. Las cajas sembradas se incubaron a temperatura ambiente con el fin de desarrollar unidades formadoras de colonias, se hizo seguimiento durante 7 días para asegurar el crecimiento del microorganismo de interés y de cualquier tipo de contaminante de haberlo. El porcentaje de pureza se calculó de la siguiente manera:

$$\%P = \frac{UFC \text{ del Hongo evaluado}}{UFC \text{ Totales}} \times 100$$

De verse colonización completa del microorganismo en estudio se reporta el 100%. Se considera que las fermentaciones deben tener un porcentaje de pureza mayor al 90% (Velez *et al.*, 1997).



Figura 4. Emulsión aplicada a la fermentación de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma* sp.



Figura 5. Frascos con emulsión y microorganismos para almacenar

Segunda fase

De acuerdo a los resultados obtenidos en la primera fase de formulación se tomaron algunos de los valores experimentales usados y se diseñó un experimento para los hongos en evaluación. En esta fase se está evaluando dos tipos de formulación: Líquida y Solida tipo polvo mojable.

1. Formulación líquida tipo emulsión.

Mediante el diseño Plackett-Burman se planteó el diseño experimental para el hongo *Beauveria bassiana* presentado en la tabla 4. Se tuvieron en total 15 corridas de los experimentos es decir 15 emulsiones con diferentes características dadas por las combinaciones de los factores en evaluación. La variable respuesta es la viabilidad de conidias en el tiempo. Se evaluaron diferentes tiempos (0, 15 días, 20 días, 1 mes y se sigue con periodos intermitentes).

Nota: Se repite la metodología de la primera fase, pero siguiendo los atributos presentados en la tabla 4.

Tabla 4. Atributos del diseño Plackett-Burman para formulación líquida de *Beauveria bassiana*.

	FACTORES					Variable Respuesta
	% Goma Xantan	%Tween	% Benzoato de Sodio	pH	Aceite	viabilidad de conidias
Nivel alto	0,1	0,75	1,5	6	2	
Nivel bajo	0,05	0,25	0,5	5	1	
Puntos medios	0,075	0,5	1	5,5	1.5	



2. Formulación Solida tipo polvo mojable.

Para la formulación solida se puso en crecimiento el hongo *Trichoderma reesei* (Cesar) y el Hongo *Beauveria bassiana* ambos en sustrato de arroz siguiendo el protocolo establecido en la fase 1. Luego de 5 días de crecimiento en el sustrato sólido se trituró el arroz en un molino para tener una masa de los hongos a una concentración de 1×10^8 conidias/ml⁻¹ (Figura 6). Luego de este procedimiento se pasó a combinar 15 gramos de los hongos con los distintos gramos especificados en la tabla 5 hasta tener un peso total por experimento de 300 g (Figura 7). En total se montaron 9 experimentos por hongo para evaluación de viabilidad en distintos tiempos (0, 15 días, 20 días, 1 mes y se sigue con periodos intermitentes).

Tabla 5. Atributos del diseño 3x3 para la formulación solida de los hongos *Beauveria bassiana* y *Trichoderma reesei*.

Experimento	Gramos de hongo	gramos de benzoato de sodio (BS)	gramos Tixosil (T)	Masa final Hongo + (BS,T)	Masa final Hongo + (BS,T +Harina de Arroz)	PESO TOTAL (g)
1	15	3	6	24	276	300
2	15	3	12	30	270	300
3	15	3	18	36	264	300
4	15	6	6	27	273	300
5	15	6	12	33	267	300
6	15	6	18	39	261	300
7	15	9	6	30	270	300
8	15	9	12	36	264	300
9	15	9	18	42	258	300



Figura 6. Triturado en molino de los hongos *Beauveria bassiana* y *Trichoderma reesei*.

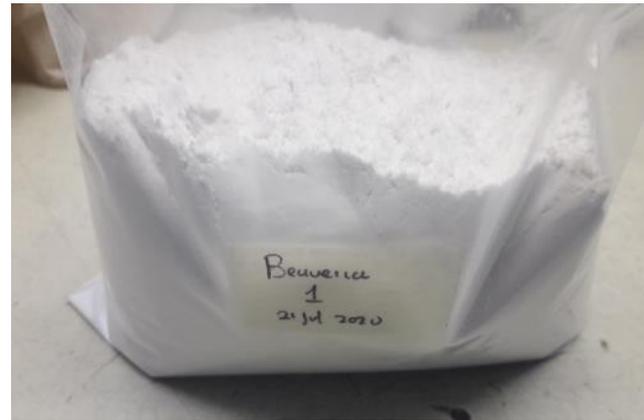


Figura 7. Formulación sólida de los hongos *Beauveria bassiana* y *Trichoderma reesei* en sustrato sólido con harina de arroz.

Resultados

PROPAGACIÓN DE MICROORGANISMOS

1. *Beauveria bassiana*.

Diseño simple: Un factor a la vez (fuente de carbono y nitrógeno) *Beauveria bassiana*.

Los resultados obtenidos en esta fase mostraron que el hongo *Beauveria bassiana* tuvo más afinidad, con el puré de papa como fuente de carbono, la concentración de conidias al adicionar puré de papa presentó diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos evaluados, alcanzando una concentración de $2,2 \times 10^8$ conidias/mL con respecto al tratamiento control el cual, alcanzó una producción de $2,5 \times 10^5$ conidias/mL. Teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionó el puré de papa como fuente de Carbono para la producción de conidias. Todo este análisis en un periodo de 3 días. (Figura 8).

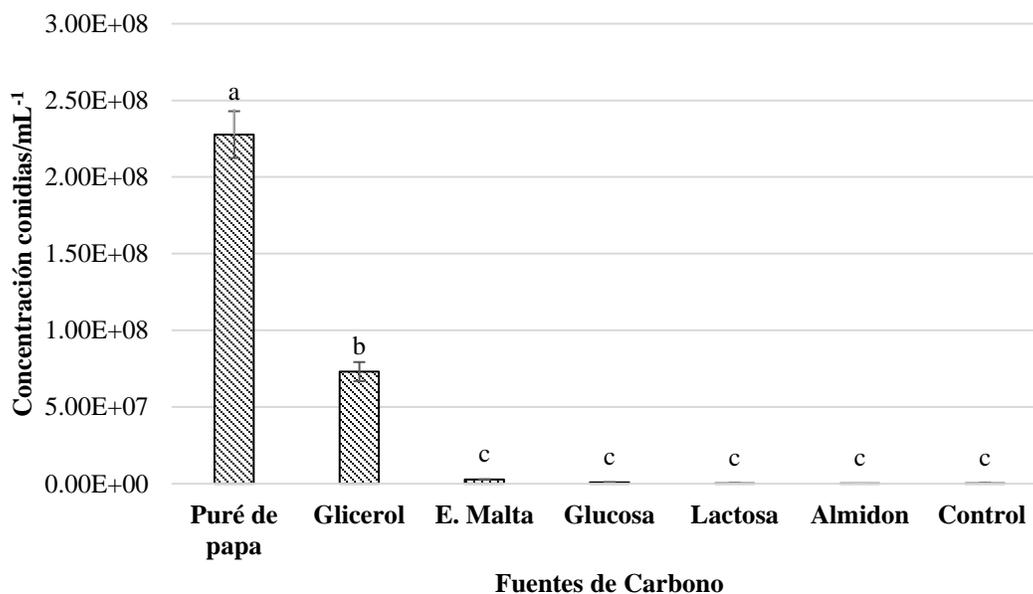


Figura 8. Efecto de fuentes de Carbono sobre el crecimiento del hongo *Beauveria bassiana* a las 72 horas de fermentación en medio líquido.

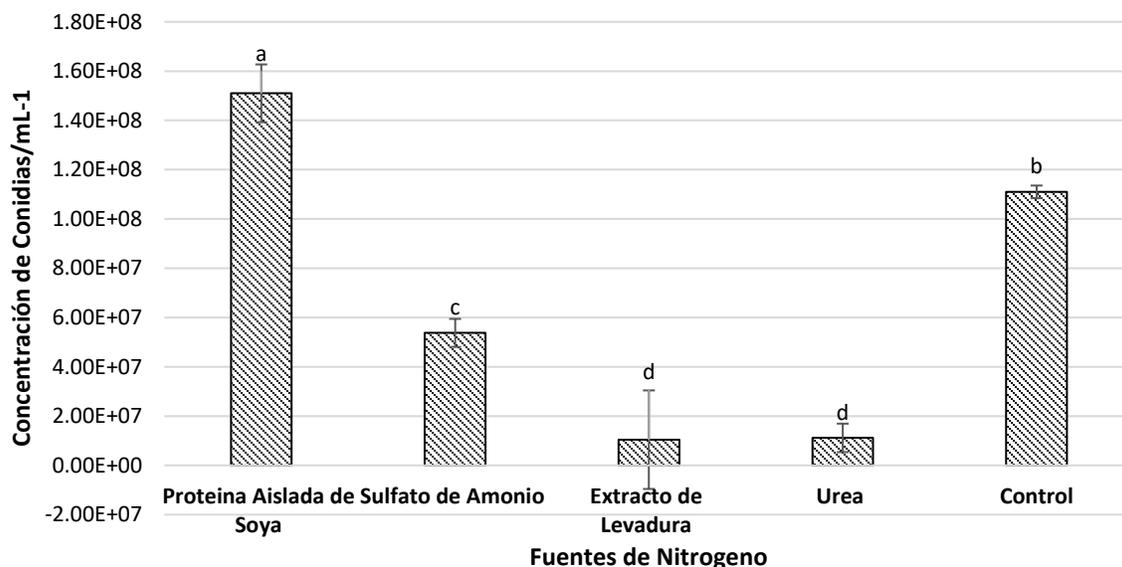


Figura 9. Efecto de fuentes de Nitrógeno sobre el crecimiento del hongo *Beauveria bassiana* a las 72 horas de fermentación en medio líquido.

Luego de determinar la fuente de carbono que favoreció al crecimiento del hongo, se procedió a evaluar las fuentes de nitrógeno, para ello se utilizaron diferentes fuentes de nitrógeno: nitrato de potasio, sulfato de amonio, proteína aislada de soya, extracto de levadura y urea. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre el tratamiento con proteína aislada de soya y las otras fuentes de nitrógeno evaluadas. El tratamiento con proteína aislada de soya presentó la mayor concentración de conidias al día 3 de fermentación líquida $1,51 \times 10^8$ conidias/mL, de aquí que se eligiera para realizar las próximas evaluaciones con dicho compuesto (Figura 9).

Evaluación de cribado (Plackett-Burman) *Beauveria bassiana*.

En la Tabla 6 se muestran los resultados promedio obtenidos en cuanto a el recuento de conidias, teniendo en cuenta las combinaciones arrojadas por el diseño Plackett Burman para un total de 12 experimentos que se realizaron por duplicado. Dentro de las variables evaluadas, se escogieron 3 para continuar la estandarización del medio de cultivo, Puré de papa (X_2) Proteína aislada de Soya (X_3) y Temperatura (X_6).



Tabla 6. Resultados diseño Plackett-Burman para concentración de conidias/mL⁻¹ promedio de *Beauveria bassiana*.

Run	Actual levels ^a									Conidial production (conidia mL ⁻¹)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	
1	0,8	4	0,8	0,4	0,4	21	2,20E+04	7.5	6	2.4 ± 0.1 E+08
2	0,8	12	0,2	4	0,4	21	4,40E+02	7.5	6	8.6 ± 0.4 E+07
3	0,2	12	0,8	0,4	4	21	4,40E+02	5.5	6	1.4 ± 0.2 E+08
4	0,8	4	0,8	4	0,4	28	4,40E+02	5.5	3	3.3 ± 2.8 E+08
5	0,8	12	0,2	4	4	21	2,20E+04	5.5	3	1.3 ± 0.2 E+08
6	0,8	12	0,8	0,4	4	28	4,40E+02	7.5	3	1.5 ± 0.3 E+09
7	0,2	12	0,8	4	0,4	27	2,20E+04	5.5	6	2.4 ± 0.2 E+09
8	0,2	4	0,8	4	4	21	2,20E+04	7.5	3	1.0 ± 0.05 E+08
9	0,2	4	0,2	4	4	27	4,40E+02	7.5	6	1.4 ± 0.1 E+08
10	0,8	4	0,2	0,4	4	27	2,20E+04	5.5	6	2.1 ± 0.1 E+08
11	0,2	12	0,2	0,4	0,4	28	2,20E+04	7.5	3	1.41 ± 0.0 E+08
12	0,2	4	0,2	0,4	0,4	21	4,40E+02	5.5	3	9.1 ± 0.7 E+07

X₁: Malt extract (g L⁻¹)

X₂: Potato mashed (g L⁻¹)

X₃: Isolated soy protein (g L⁻¹)

X₄: MgSO₄ (mM)

X₅: CaCl₂ (mM)

X₆: T (°C)

X₇: Inoculum concentration (conidia mL⁻¹)

X₈: pH

X₉: Incubation time (days)

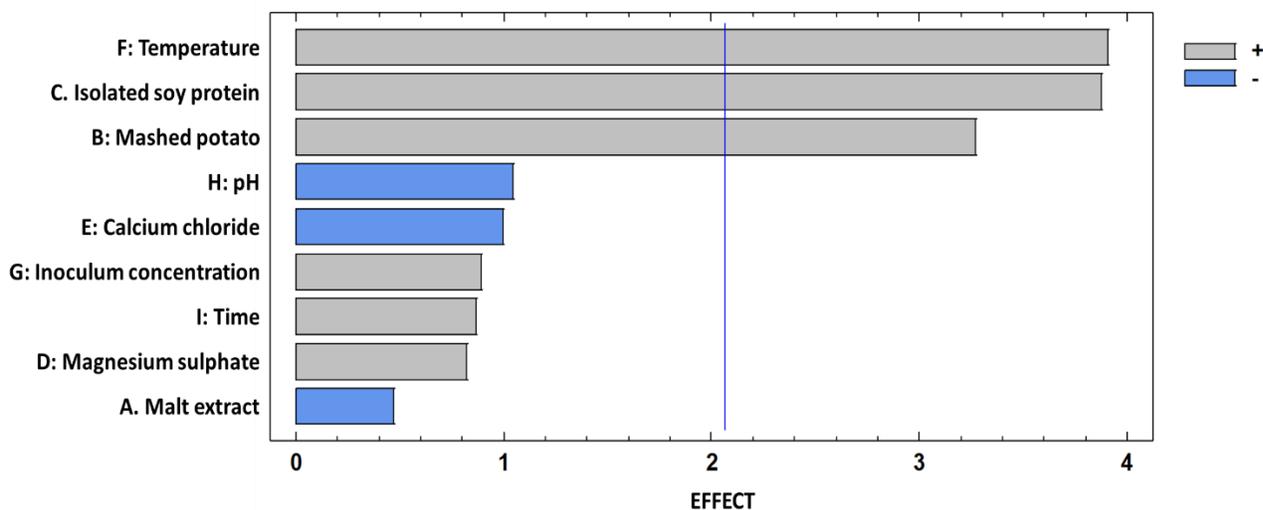


Figura 10. Diagrama de Pareto para concentración de conidias de *Beauveria bassiana* en medio de cultivo líquido mediante el Diseño Plackett-Burman.

La figura 10, se relacionan los resultados propiciados en la tabla 5, el diagrama Pareto, muestra los efectos en orden decreciente de significación, con una línea para determinar qué efectos son estadísticamente significativos (Puré de papa (X_2), Proteína aislada de Soya (X_3) y Temperatura (X_6)).

Evaluación Diseño de máximo ascenso (Steepest Ascent) *Beauveria bassiana*.

El diseño experimental Máximo ascenso se utilizó para acercarse a las mejores condiciones de fermentación. Tres factores se seleccionaron Puré de papa (X_2), Proteína aislada de Soya (X_3) y Temperatura (X_6). La concentración de los tres factores se estableció en función de su efecto, con el fin de incrementar y observar la respuesta del hongo en cuanto a la producción de conidias. (Tabla 7)

Tabla 7. Resultados diseño Máximo ascenso para concentración de conidias/ mL^{-1} promedio de *Beauveria bassiana*.

Run	^a x_2	^a x_3	^a x_6	Conidial production. mL^{-1}
1	6	1.5	23	$1.6 \pm 0.06 \text{ E}+09$
2	8	2	25	$1.9 \pm 0.2 \text{ E}+09$
3	10	2.5	27	$2.6 \pm 0.2 \text{ E}+09$
4	12	3	29	$2.5 \pm 0.06 \text{ E}+09$



Optimización por superficie de respuesta (Box-Behnken) *Beauveria bassiana*.

Los siguientes puntos óptimos (Tabla 8) fueron los hallados con el diseño del experimento. Con estos se validó condiciones en biorreactor.

Optimizar Respuesta

Meta: maximizar Conct. conidias

Valor óptimo = 3,41652E9

Tabla 8. Puntos óptimos para producción de conidias de *Beauveria bassiana*.

Factor	Bajo g/l	Alto g/l	Óptimo g/l
Puré papa	8,0	16,0	16,0
Prot. soya	2,0	8,0	7,99998
Temperatura	24,0	30,0	26,4689

Comparativo crecimiento entre cepas de *B. bassiana* en el medio de cultivo optimizado

Luego de tener las condiciones optimizadas se realizó un comparativo con distintas cepas de *B. bassiana*, encontrando un compartimiento muy similar (Figura 11).

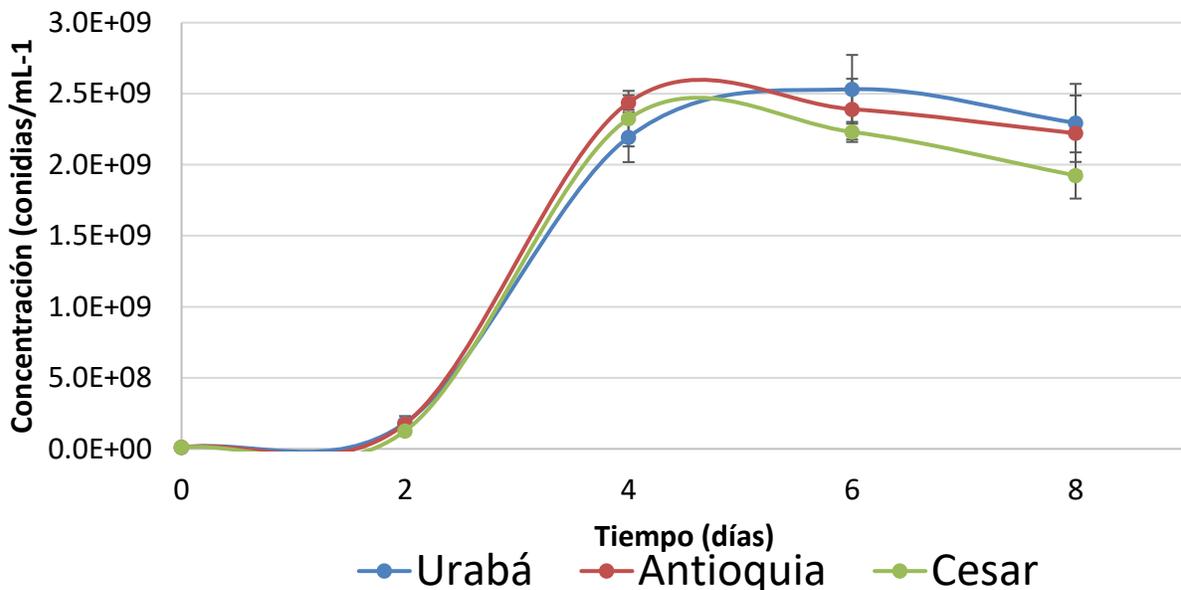


Figura 11. Concentración de conidias de cepas de *Beauveria bassiana* de 3 zonas geográficas de Colombia en medio de cultivo líquido optimizado.



2. *Trichoderma* sp.

Diseño simple: Un factor a la vez *Trichoderma* sp.

Se evaluó el efecto de la adición de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno en la producción de conidias a partir de *Trichoderma* sp. CSC11 en fermentación en estado sólido. Posterior a la adición de lactosa como fuente de carbono en cualquiera de las concentraciones evaluadas 5, 15, 30 gr/kg arroz se pudo observar un incremento en la producción de esporas luego de 8 días de fermentación, alcanzando valores hasta $4,5 \times 10^8 \pm 1,7 \times 10^8$, $4,4 \times 10^8 \pm 7,1 \times 10^7$ y $4,4 \times 10^8 \pm 1,4 \times 10^8$ conidias por gr de arroz respectivamente. (Figura 12).

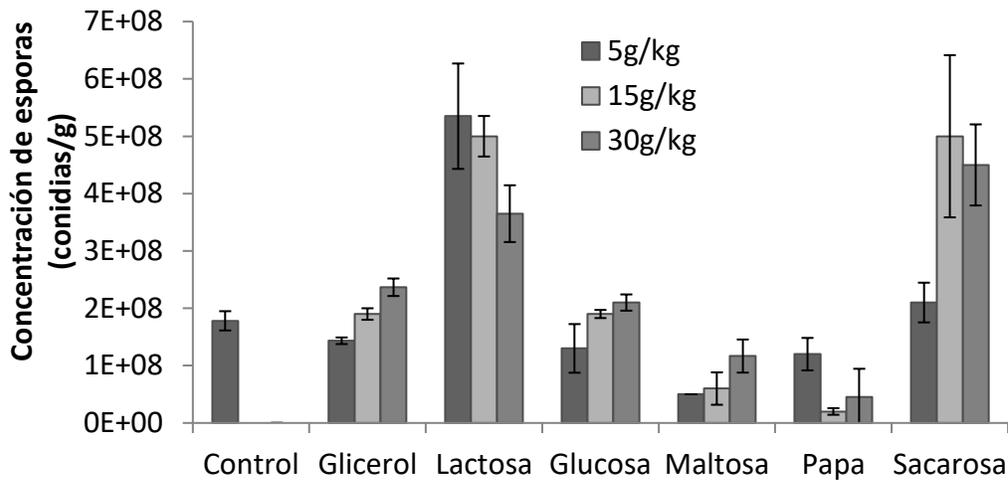


Figura 12. Evaluación de la adición de diferentes fuentes de carbono (Glicerol, Lactosa, Maltosa, Puré de papa y Sacarosa) a diferentes concentraciones a la fermentación en estado sólido del hongo *Trichoderma* sp.

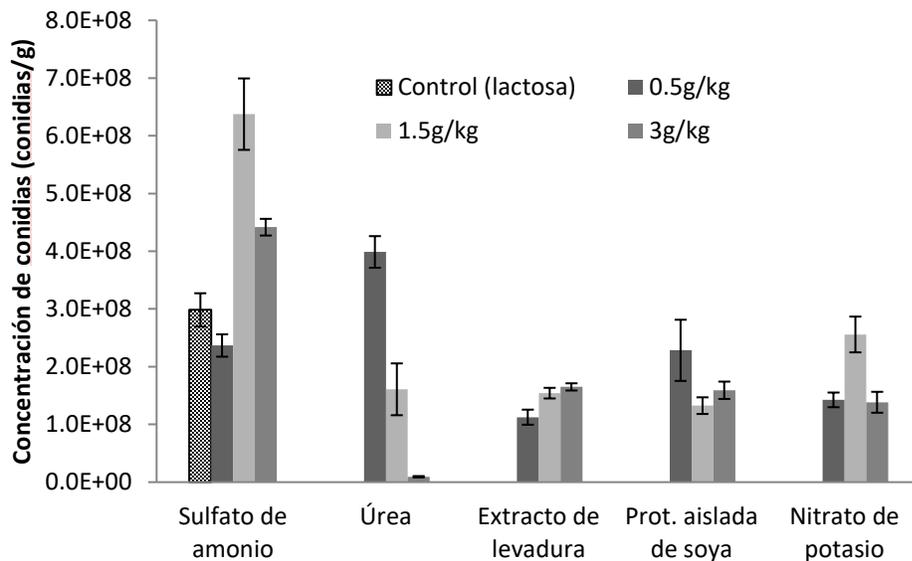


Figura 13. Evaluación de la adición de diferentes fuentes de nitrógeno (Sulfato de amonio, úrea, Extracto de levadura, Proteína aislada de Soya y Nitrato de potasio) a diferentes concentraciones a la fermentación en estado sólido del hongo *Trichoderma* sp.

Los requerimientos específicos del aislamiento permitieron identificar a la lactosa como fuente de carbono y el sulfato de amonio como fuentes adecuadas para potenciar la producción de conidias a partir de *Trichoderma* sp. (Figura 13).

Evaluación de cribado (Plackett-Burman) *Trichoderma* sp.

Los resultados confirman la influencia estadísticamente significativa de 3 factores sobre la variable respuesta con un $p < 0,05$. Los resultados son representados en diagrama de Pareto (Figura 14). El análisis estadístico de las 5 variables muestra que el efecto del agua, el carbonato de calcio y el cloruro de magnesio fueron significativos sobre la producción de conidias en fermentación en estado sólido de *Trichoderma* sp (Figura 14). Por otro lado, el factor cloruro de magnesio resultó influir de forma negativa. El incremento en la concentración de factores como sulfato de amonio, lactosa e inóculo no mostró un efecto significativo en la concentración de conidias generada en la fermentación.

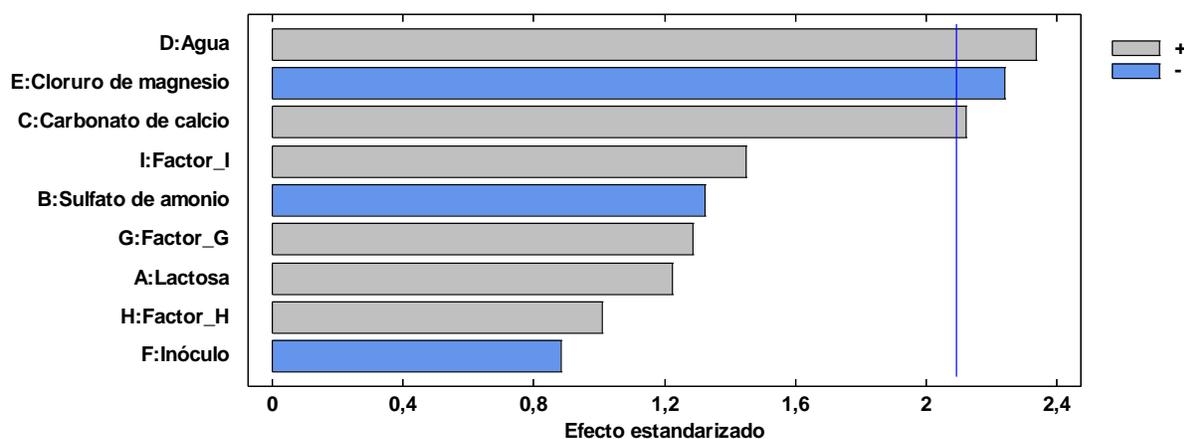


Figura 14. Diagrama de Pareto para concentración de conidias de *Trichoderma sp* en medio de cultivo sólido mediante el Diseño Plackett-Burman.

Optimización por superficie de respuesta (Box-Behnken) *Trichoderma sp.*

Para optimizar la producción de conidias a partir del aislamiento CSC11 en fermentación en estado sólido se utilizó un diseño Box Behnken con 3 factores. El diseño consistió en 17 puntos factoriales por duplicado y tres puntos centrales en un orden de corrida aleatorio. El diseño Box-Behnken permitió identificar los niveles apropiados de cada uno de los factores más importantes en la producción de conidias a partir de *Trichoderma sp.* Con el experimento se identificaron la lactosa, el carbonato de calcio y el agua como factores influyentes en la conidiogénesis a los niveles óptimos de 4 g/kg de lactosa, 0,5 g/Kg de carbonato de calcio y 23,02 mL de agua (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados diseño Box Behnken para concentración de conidias/g de *Trichoderma sp.*

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Lactosa	4	12	4
Calcio	0,1	0,5	0,5
Agua	10	30	23,0226
Valor óptimo	1,56577X10⁹		



FORMULACIÓN

Primera fase

Fermentación líquida de *Beauveria bassiana*- Fermentación Solida de *Trichoderma* sp.

En los diferentes procesos de fermentación se encontraron las concentraciones promedio de conidias presentadas en la tabla 10 y el crecimiento de cada microorganismo en el medio de fermentación líquido-sólido (Figura 15-16).

Tabla 10. Concentración promedio de conidias/mL.

Microorganismo	Concentración promedio conidias
<i>Beauveria bassiana</i>	$2,1 \times 10^9$ conidias/ML
<i>Trichoderma</i> sp. (Rio de Oro)	$2,2 \times 10^9$ conidias/g
<i>Trichoderma reesei</i> . (Cesar)	$2,3 \times 10^9$ conidias/g
<i>Trichoderma</i> sp. (González)	$2,2 \times 10^9$ conidias/g

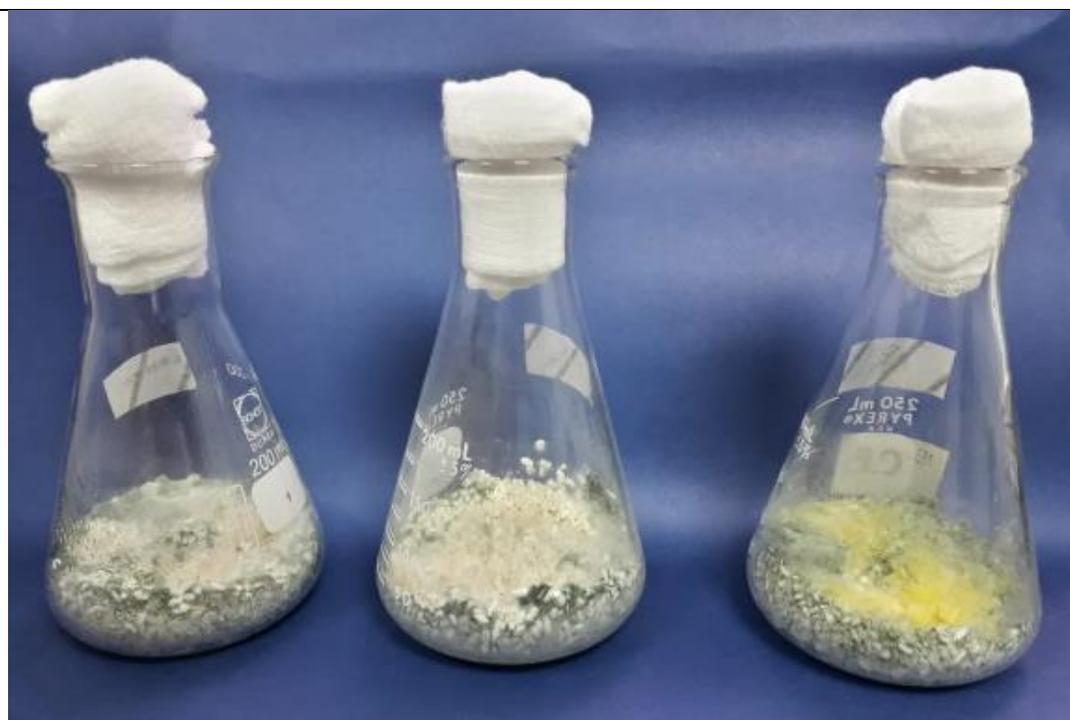


Figura 15. Colonización en sustrato de arroz de las 3 cepas de *Trichoderma* sp después de 8 en fermentación sólida.

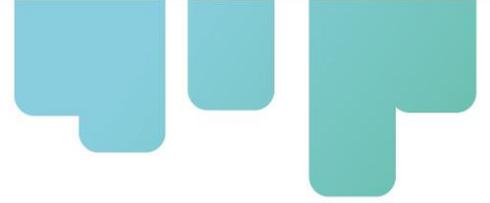


Figura 16. Fermentación líquida con crecimiento de *Beauveria bassiana*

Porcentaje de Pureza.

Se reportó el porcentaje de pureza total de las siembras de los microorganismos en cajas de Petri durante diferentes periodos de tiempo. (Tabla 11). Los detalles del crecimiento de los hongos y el control de la emulsión se muestran en las figuras 17 a la 21.

Tabla 11. Porcentaje de pureza de los tratamientos con la emulsión.

Tiempo (Días)	Microorganismo	% Pureza
Día 0	<i>Beauveria bassiana</i>	100
	<i>Trichoderma</i> sp. (Río de Oro)	99
	<i>Trichoderma reesei</i> . (Cesar)	100
	<i>Trichoderma</i> sp. (González)	100
	Control Emulsión	100
Día 8	<i>Beauveria bassiana</i>	100
	<i>Trichoderma</i> sp. (Río de Oro)	95
	<i>Trichoderma reesei</i> . (Cesar)	100
	<i>Trichoderma</i> sp. (González)	100
	Control Emulsión	100
Día 15	<i>Beauveria bassiana</i>	Sin crecimiento
	<i>Trichoderma</i> sp. (Río de Oro)	100
	<i>Trichoderma reesei</i> . (Cesar)	100
	<i>Trichoderma</i> sp. (González)	100
	Control Emulsión	100



Trichoderma sp. (González)

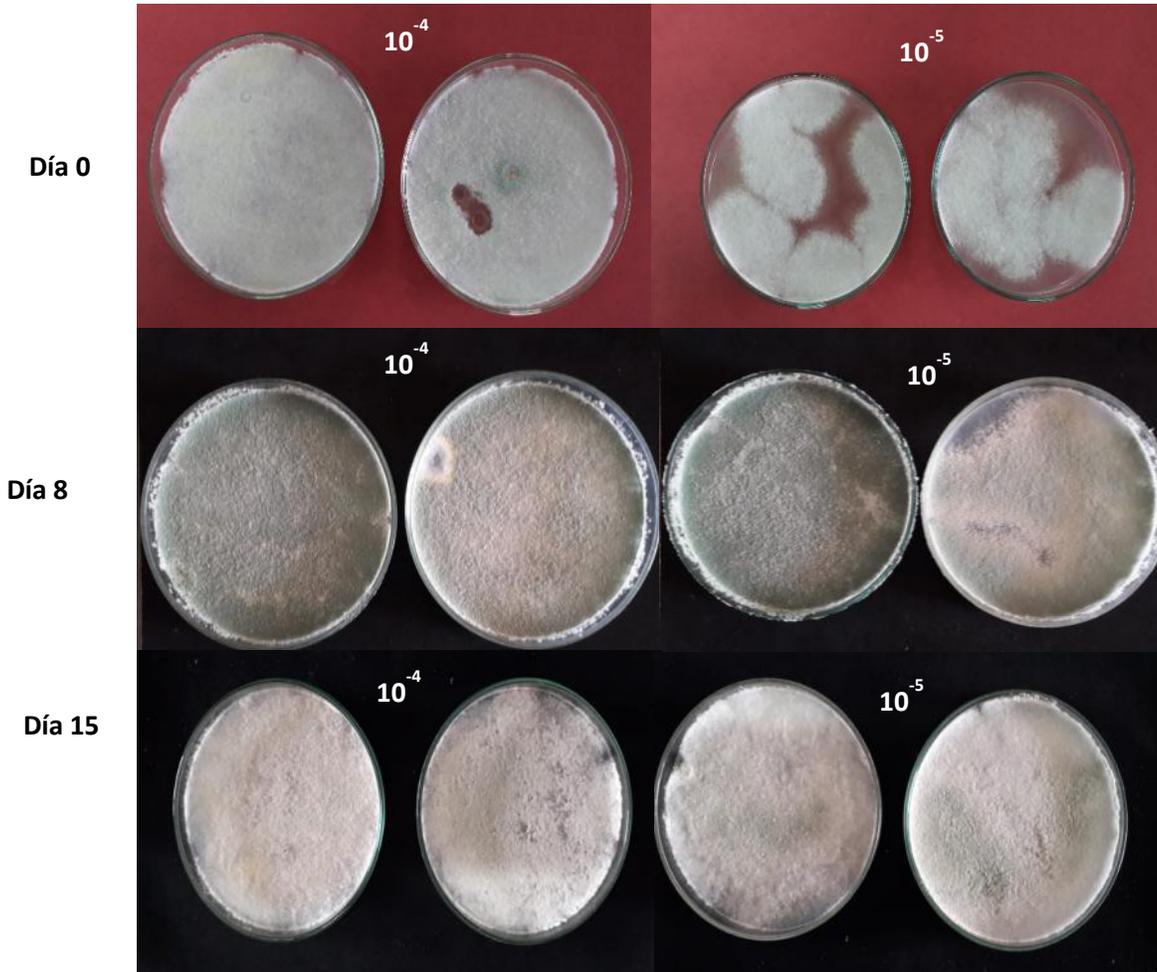


Figura 17. Crecimiento del hongo *Trichoderma* sp. (González) luego de estar en mezcla con la emulsión durante 15 días.



Trichoderma sp. (Río de Oro)

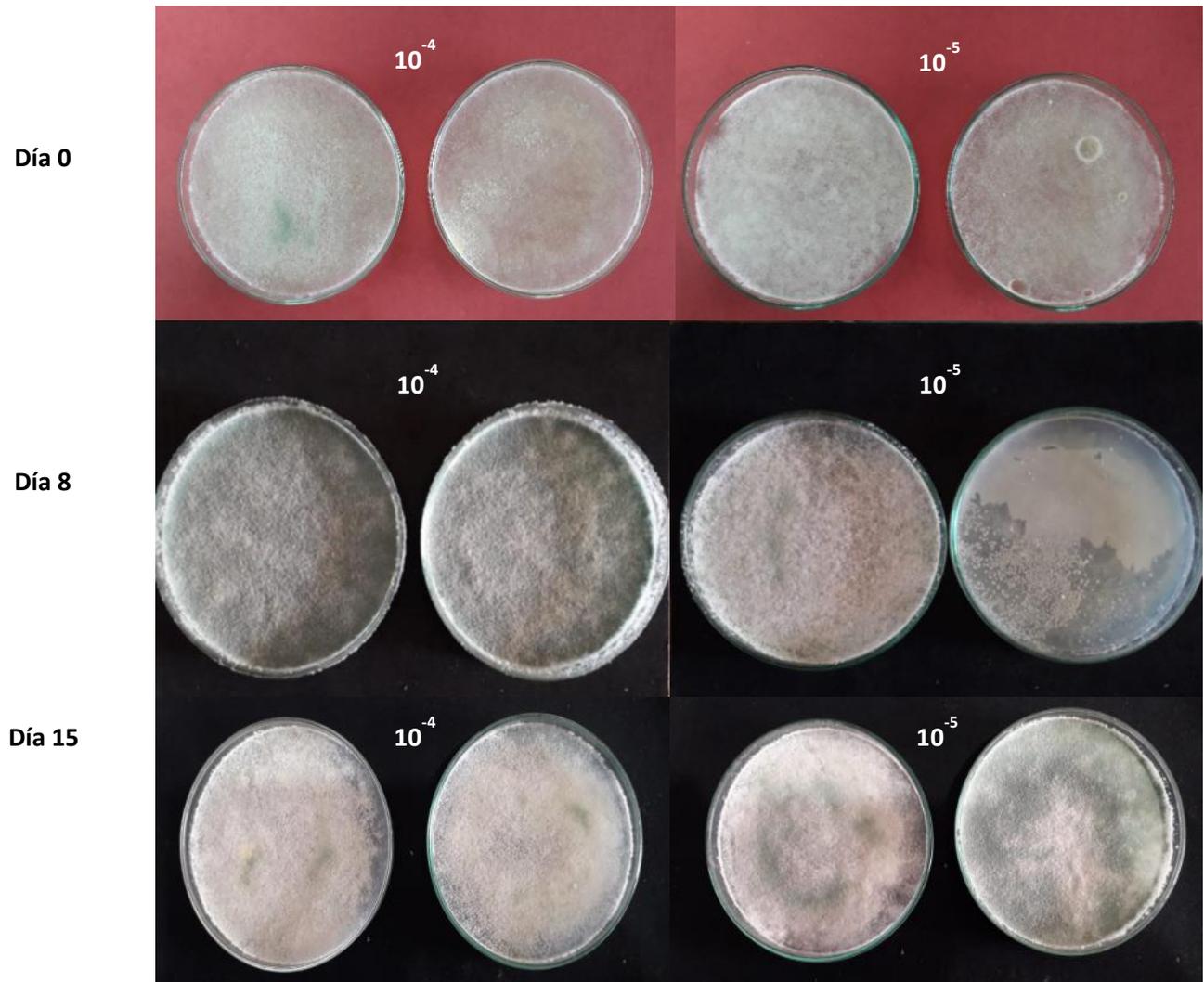


Figura 18. Crecimiento del hongo *Trichoderma* sp. (Río de Oro) luego de estar en mezcla con la emulsión durante 15 días.



Trichoderma reesei. (Cesar)

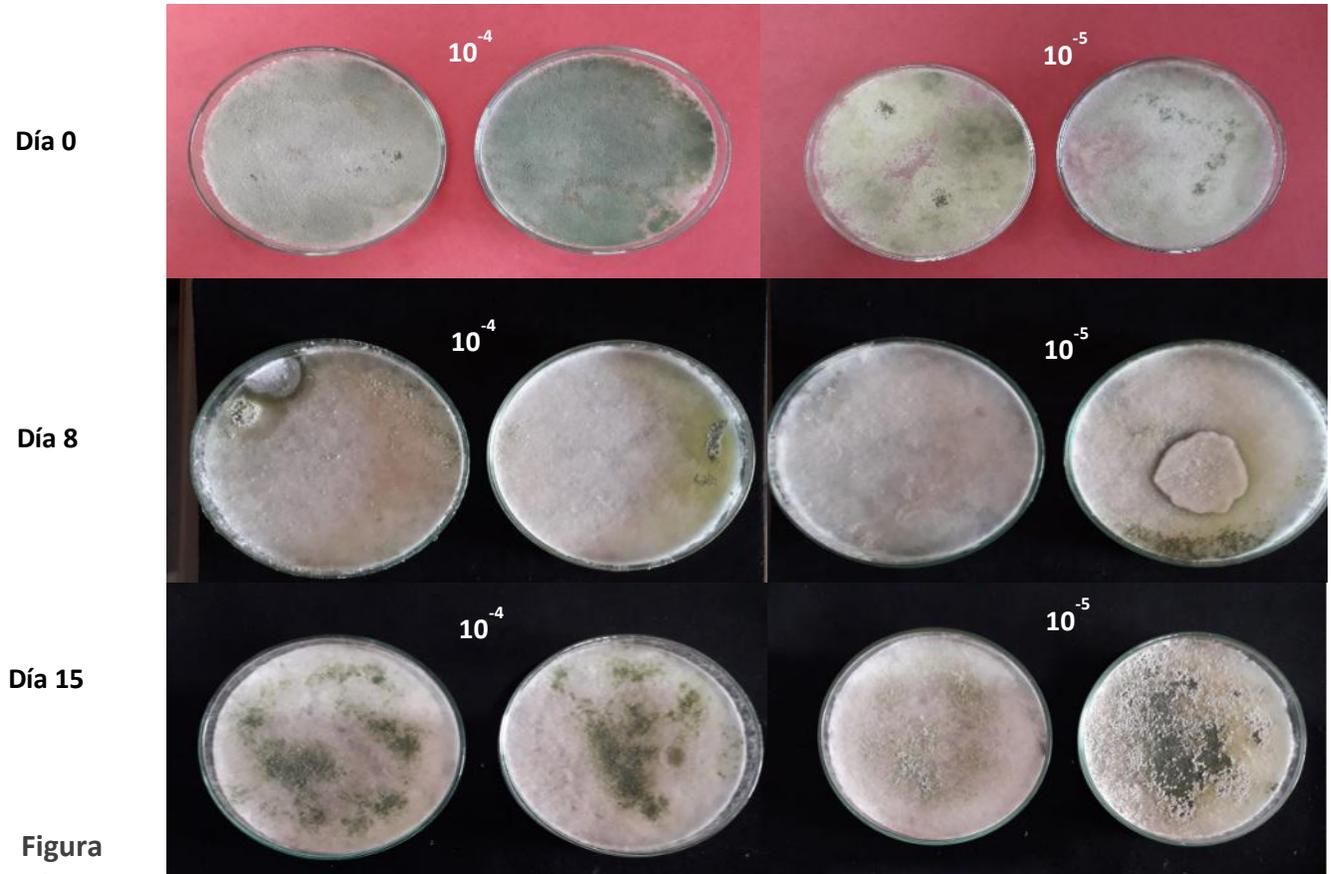


Figura 19.

Crecimiento del hongo *Trichoderma reesei* luego de estar en mezcla con la emulsión durante 15 días.

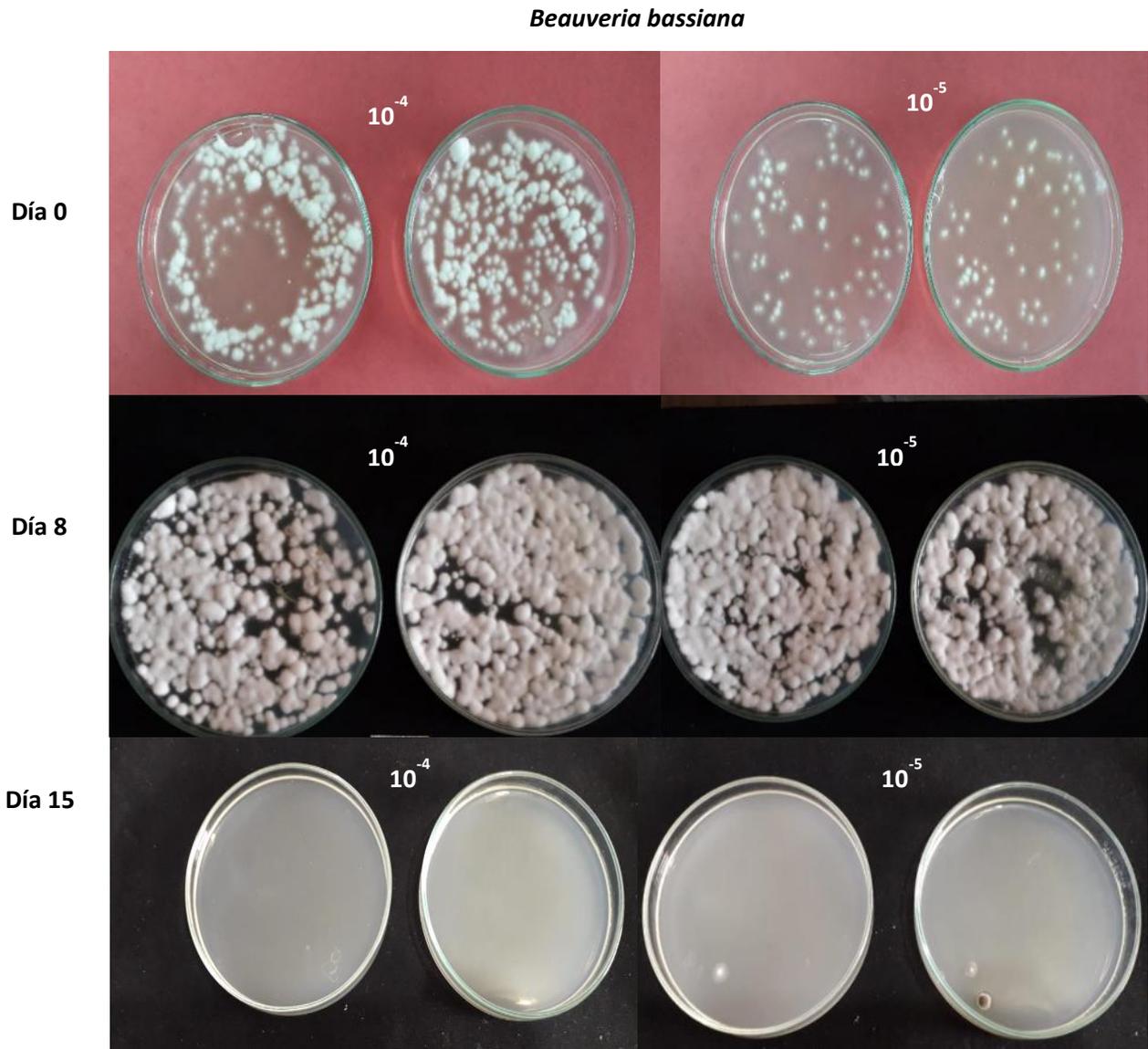


Figura 20. Crecimiento del hongo *Beauveria bassiana* luego de estar en mezcla con la emulsión durante 15 días.

Nota: Luego de 15 días el hongo *Beauveria bassiana* no presenta crecimiento en el medio de cultivo PDA. Por tal motivo se tendrá que modificar componentes de la formulación que podrían estar afectando su germinación.



Control Emulsión

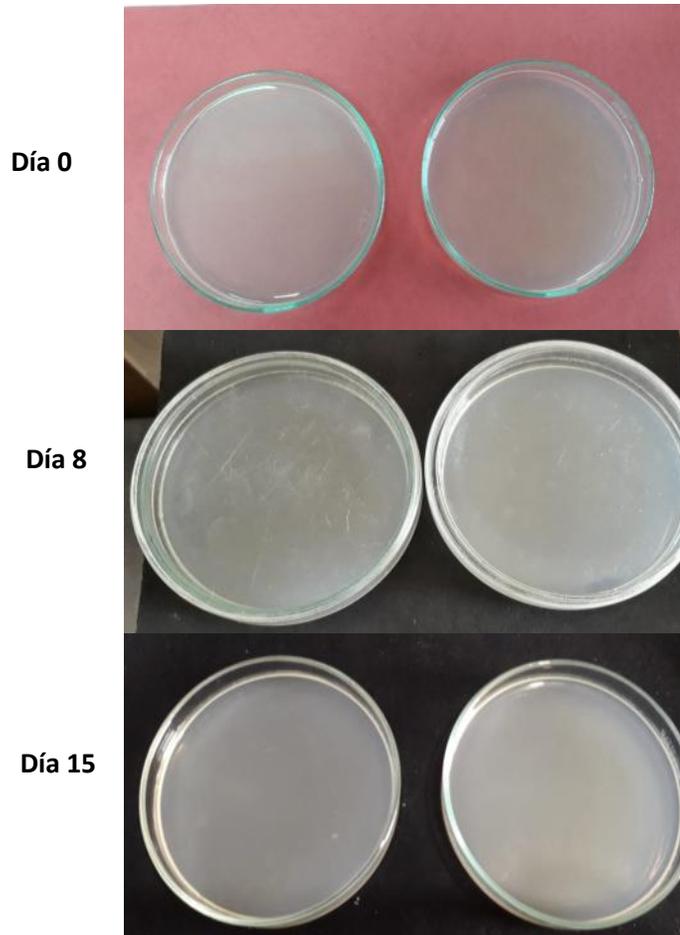


Figura 21. Control de la emulsión aplicada a la fermentación de los microorganismos.

Segunda fase

En esta etapa de experimentación se evaluaron dos tipos de formulaciones: Solidad tipo polvo mojable y líquida tipo emulsión.

Formulación líquida tipo emulsión: *Beauveria bassiana*.

La tabla 12 detalla los resultados preliminares del seguimiento hecho por un mes a las 15 formulaciones líquidas del hongo. En amarillo se resaltan aquellas que durante el tiempo conservan la viabilidad del microorganismo. Los detalles de los experimentos subrayados se muestran en la tabla 13 Las características del crecimiento en la emulsión se muestran en la figura 22.

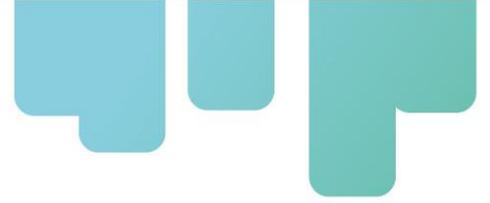


Tabla 12. Promedio de UFC para el hongo *Beauveria bassiana* en formulación líquida tipo emulsión.

Formulación	Microorganismo	Experimento	Dilución	Promedio UFC		
				T0	T15	T30
líquida	<i>Beauveria bassiana</i>	1	10 ⁵	177	0	0
líquida	<i>Beauveria bassiana</i>	2	10 ⁵	158	0	0
líquida	<i>Beauveria bassiana</i>	3	10 ⁵	184	77	35
líquida	<i>Beauveria bassiana</i>	4	10 ⁵	158	139	129
líquida	<i>Beauveria bassiana</i>	5	10 ⁵	143	0	0
líquida	<i>Beauveria bassiana</i>	6	10 ⁵	145	3	0
líquida	<i>Beauveria bassiana</i>	7	10 ⁵	101	0	0
líquida	<i>Beauveria bassiana</i>	8	10 ⁵	141	0	0
líquida	<i>Beauveria bassiana</i>	9	10 ⁵	169	0	0
líquida	<i>Beauveria bassiana</i>	10	10 ⁵	157	147	130
líquida	<i>Beauveria bassiana</i>	11	10 ⁵	139	105	0
líquida	<i>Beauveria bassiana</i>	12	10 ⁵	158	0	0
líquida	<i>Beauveria bassiana</i>	13	10 ⁵	182	80	0
líquida	<i>Beauveria bassiana</i>	14	10 ⁵	92	0	0
líquida	<i>Beauveria bassiana</i>	15	10 ⁵	83	0	0

Tabla 13. Atributos de los experimentos para la formulación líquida tipo emulsión para el hongo *Beauveria bassiana*.

Experimento	xantan %	Tween %	B. Sodio %	pH	Aceite: Agua
3	0,15	1	2	5,5	1,5:1
4	0,2	1,5	1	6	2:1
10	0,1	0,5	1	6	2:1

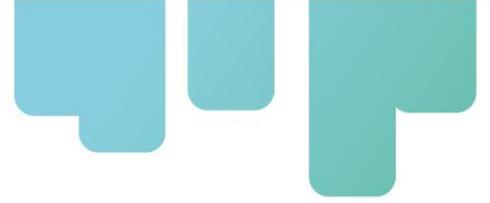


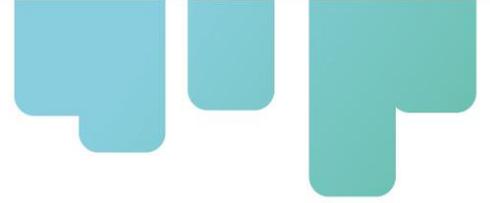
Figura 22. Ejemplo de crecimiento del hongo *Beauveria bassiana* en la formulación líquida tipo emulsión.

Formulación sólida tipo polvo mojable: *Beauveria bassiana*.

La formulación sólida en harina de arroz ha permitido la conservación del hongo *B. bassiana* hasta 30 días, identificando 4 experimentos con potencial a seguir modificando hasta encontrar puntos ideales de conservación. En la Tabla 14 se detallan los experimentos resaltados en verde como aquellos que mostraron mejores resultados, las características de estos se muestran en la tabla 15. En la figura 23 se muestra el crecimiento del hongo en la formulación.

Tabla 14. Promedio de UFC para el hongo *Beauveria bassiana* en formulación sólida tipo polvo mojable.

Formulación	Microorganismo	Experimento	Dilución	Promedio UFC		
				T0	T15	T30
Sólida	<i>Beauveria bassiana</i>	1	10 ⁵	7	0	0
Sólida	<i>Beauveria bassiana</i>	2	10 ⁵	40	37	32
Sólida	<i>Beauveria bassiana</i>	3	10 ⁵	101	41	6
Sólida	<i>Beauveria bassiana</i>	4	10 ⁵	61	35	10
Sólida	<i>Beauveria bassiana</i>	5	10 ⁵	110	45	16
Sólida	<i>Beauveria bassiana</i>	6	10 ⁵	55	0	0
Sólida	<i>Beauveria bassiana</i>	7	10 ⁵	91	25	23



Solida	<i>Beauveria bassiana</i>	8	10 ⁵	76	0	0
Solida	<i>Beauveria bassiana</i>	9	10 ⁵	87	26	0

Tabla 15. Atributos de los experimentos para la formulación solida tipo polvo mojable para el hongo *Beauveria bassiana*.

Experimento	gramos de benzoato	gramos Tixosil
2	3	12
4	6	6
5	6	12
7	9	6



Figura 23. Ejemplo de crecimiento del hongo *Beauveria bassiana* en la formulación solida tipo polvo mojable.

Formulación solida tipo polvo mojable: *Trichoderma reesei*.

Al igual que para el anterior microorganismo, para *Trichoderma reesei* se identificaron 9 experimentos en formulación sólida que han permitido un buen desarrollo del mismo. Solo 2 de los experimentos presentaron contaminación bacteriana en los 30 días de evaluación como se detalla en la Tabla 16. La figura 24 detalla cómo se observa el hongo cuando se evalúa la viabilidad en la formulación.

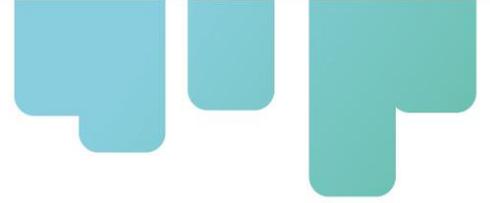


Tabla 16. Promedio de UFC para el hongo *Trichoderma reesei* en formulación solida tipo polvo mojable.

Formulación	Microorganismo	Experimento	Dilución	Promedio UFC		
				T0	T15	T30
Solida	<i>Trichoderma</i>	1	10 ⁵	100%	100%	100%
Solida	<i>Trichoderma</i>	2	10 ⁵	100%	100%	100%
Solida	<i>Trichoderma</i>	3	10 ⁵	100%	100%	100%
Solida	<i>Trichoderma</i>	4	10 ⁵	100%	100%	100%
Solida	<i>Trichoderma</i>	5	10 ⁵	100%	100%	100%
Solida	<i>Trichoderma</i>	6	10 ⁵	100%	100%	100%
Solida	<i>Trichoderma</i>	7	10 ⁵	100%	Bacteria	Bacteria
Solida	<i>Trichoderma</i>	8	10 ⁵	100%	100	100
Solida	<i>Trichoderma</i>	9	10 ⁵	100%	100	100

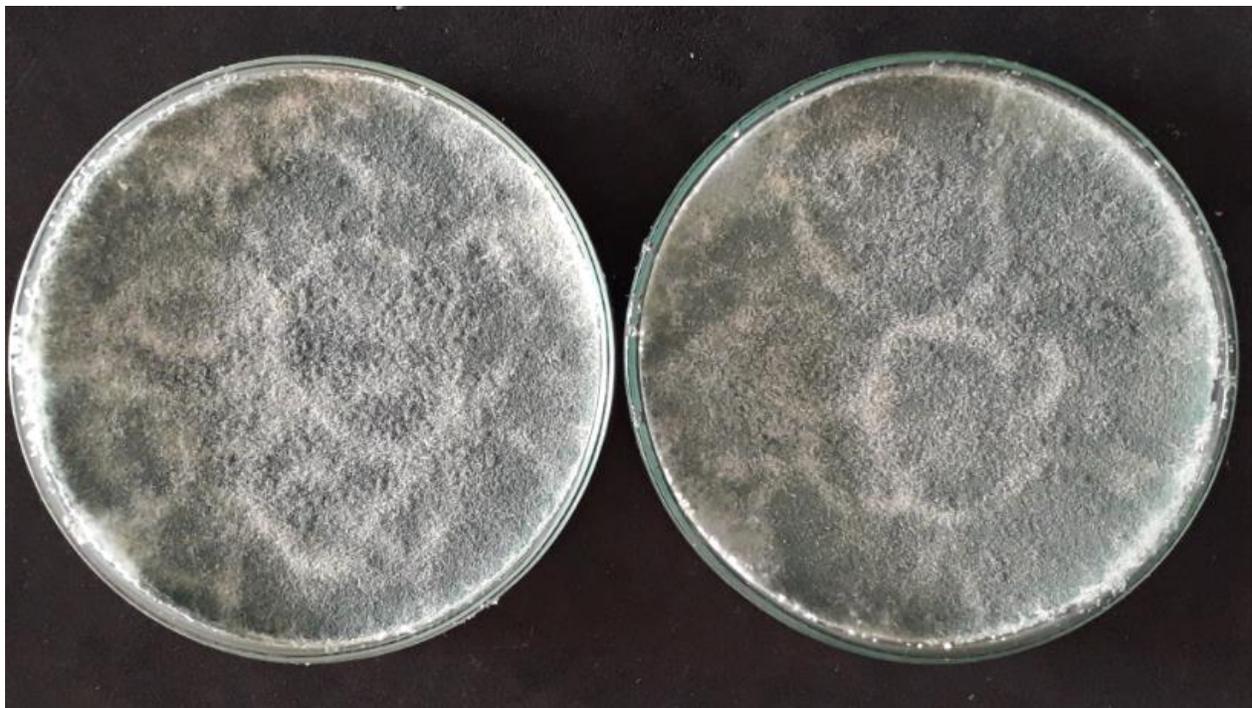
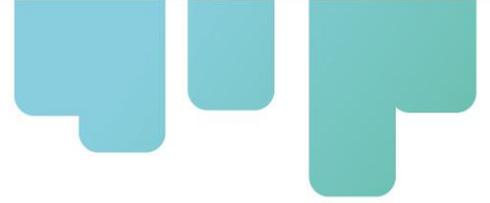


Figura 24. Ejemplo de crecimiento del hongo *Trichoderma reesei* en la formulación solida tipo polvo mojable.



Formulación en medio sólido para evaluaciones en campo.

Tanto para *Beauveria bassiana* y las cepas de *Trichoderma* spp. (tabla 17) y de acuerdo con los resultados obtenidos en las fases anteriores, se establecieron los siguientes puntos para su producción.

Tabla 17. Componentes para la formulación de microorganismos.

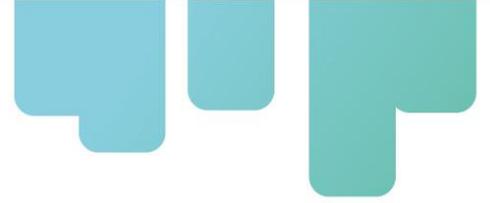
<i>Trichoderma reesei</i>	
Componentes de la formulación	Cantidad g/kg
Benzoato de sodio	10
Tixosil (Dióxido de silicio)	60
Harina de Arroz	450
Harina de Hongo triturada	500

<i>Beauveria bassiana</i>	
Componentes de la formulación	Cantidad g/kg
Benzoato de sodio	10
Tixosil (Dióxido de silicio)	40
Harina de Arroz	450
Harina de Hongo triturada	500

Con las formulaciones solidas producto de la combinación del microorganismo y los componentes se tuvieron resultados de viabilidad de hasta 2 meses en estante (Tabla 18). Algunas de estas formulaciones fueron enviadas a condiciones de campo para su aplicación.

Tabla 18. Resultado de las formulaciones en el tiempo y su concentración luego de 2 meses en estante.

Fecha de Formulación	Tipo de Formulación	Fermentación	Microorganismo	Dilución	promedio ufc				Promedio UFC/ml 2 meses
					T0	T20	T30	T60	
5-nov-20	Polvo mojable	Solida	<i>Beauveria bassiana</i>	10 ⁵	176	135	129	106	1,06E+08
5-nov-20	Polvo mojable	Solida	<i>Trichoderma reesei</i>	10 ⁵	100%	100%	100%	96%	99%
10-dic-20	Polvo mojable	Líquida	<i>Beauveria bassiana</i>	10 ⁵	159	145	136	113	1,13E+08
4-ene-21	Polvo mojable	Líquida	<i>Beauveria bassiana</i>	10 ⁵	167	156	143	128	1,28E+08



Discusión

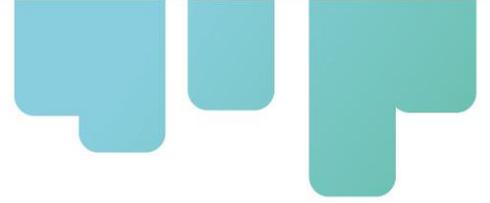
El uso de los microorganismos constituye una estrategia potencialmente viable. Hasta hace algunos años las investigaciones se habían limitado a la identificación de aquellos microorganismos importantes en la medicina. Hoy día las investigaciones incluyendo la presente están dirigidas a incrementar la tasa de producción para muchos más sectores, como el agrícola. El uso de microorganismos se muestra como una alternativa a solucionar problemáticas actuales y que se conviertan en opciones biocorrectivas como ejemplo para la recuperación de suelos degradados (Torres, 2003).

La utilización de microorganismos benéficos asociados al ecosistema, ya sea como controladores biológicos o como potenciadores de crecimiento vegetal, involucra una serie de procesos para su producción masiva. Procesos de los cuales se adelantaron durante el desarrollo del presente estudio. Desde la preparación del material y medios de cultivo, así como técnicas de asepsia para evitar contaminantes, y hasta la misma preservación e identificación de las cepas trabajadas y cuyo objetivo principal es la obtención de un bioinsumo y material promisorio para probar en condiciones de campo (Velez et al., 1997).

Dentro de los diseños de experimentos empleados se pueden observar como el diseño Plackett-Burman, el diseño máximo ascenso y el diseño Box-Behnken permitieron evidenciar factores que afectaron significativamente la producción de conidias en los medios de cultivo, tal y como se reporta en estudios anteriores donde Hallett *et al.*, 1997 pudieron constatar la importancia de ciertas variables y como por medio de estos se pudieron también identificar puntos óptimos de producción.

Si bien las formulaciones en evaluación han presentado valores fluctuantes, se pudo evidenciar que las formulaciones sólidas para el hongo *Trichoderma reesei* mantienen una viabilidad hasta el momento de evaluación de 30 días, la formulación sólida y líquida de *Beauveria bassiana* tiene algunos experimentos como base para ajustar el modelo y permitir un mejor crecimiento del microorganismo en las formulaciones. De acuerdo con estudios realizados por Ruíz *et al.*, (2015) las pérdidas de viabilidad de las formulaciones como las presentes en el informe almacenadas a temperatura ambiente son del 5% y se dan también de acuerdo a las características del microorganismo formulado.

En el presente estudio se muestra una vez más la enorme capacidad que tienen los microorganismos, de acá que su identificación y formulación sea de gran importancia para asegurar la viabilidad e integridad morfológica, fisiológica y genética para su posterior utilización en producción y que se mantengan así las características de las cepas evaluadas y se constituya una nueva vía de gran utilidad en la agricultura (Elvira Sánchez-Fernández et al., 2013; Khan, Bashir, & Ghosia, 2014).

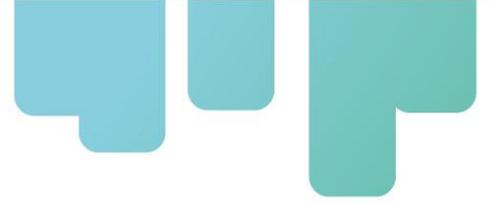


Conclusiones

- ✓ El presente estudio expone detalles de los experimentos realizados en el proyecto para la producción de microorganismos masivamente y su formulación.
- ✓ Se logró comprobar los medios óptimos de producción para los hongos de interés a concentraciones sobresalientes con respecto a lo que se reporta en la literatura.
- ✓ Los montajes de fermentación sólida para las cepas de *Trichoderma* sp. y la fermentación líquida para el hongo *Beauveria bassiana* permitieron evidenciar la optimización de los medios de cultivo y reproducibilidad de los mismos en el tiempo.
- ✓ Se usó para el proceso de estandarización de la formulación aceite vegetal para la conservación de los microorganismos en evaluación, el cual es un ingrediente de bajo costo que puede facilitar la producción en serie de esta formulación para su comercialización.
- ✓ Con 15 días en almacenamiento emulsión + microorganismo se mostró una respuesta positiva de las cepas de *Trichoderma* sp.
- ✓ La combinación del hongo *Beauveria bassiana* más la emulsión mostró germinación hasta el día 8 de evaluación.
- ✓ La formulación sólida con excipientes ha mantenido la viabilidad de los microorganismos por más de 1 mes y se muestra como una de las mejores alternativas para conservar las características microbiológicas de los hongos en evaluación.
- ✓ La formulación de los microorganismos se muestra como una alternativa potencial para su uso cuando sea requerido.
- ✓ Los bioinsumos como productos de origen biológico constituyen una de las atractivas banderas vinculadas a las soluciones sustentables que empresas del sector agro-biotecnológico incorporan para la mejora de las buenas prácticas agrícolas. Siendo de importancia en la generación de conocimiento y la base a futuras investigaciones en el tema.
- ✓ Los resultados de estas formulaciones están encaminadas a la obtención de bioinsumos más estables, amigables y seguros con la salud ambiental y de las personas. Así mismo abren la puerta para transferir la tecnología a empresas del sector agropecuario generando conocimiento e investigación, además se convertirse en un insumo para el desarrollo de las zonas de impacto del proyecto.
- ✓ Con la experiencia aportada en la ejecución de la presente investigación se puede pensar en soluciones sostenibles al alcance de las comunidades en problemáticas agroindustriales mediante el uso y aprovechamiento del microbioma de cada región en procesos de manejo integrado de plagas y enfermedades (MIPE).
- ✓ Bajo una mirada integradora de la temática se plantea la necesidad de incrementar el trabajo experimental en condiciones controladas de laboratorio y campo. Así mismo la calidad de las formulaciones facilitará la instalación de estos productos definitivamente en la agricultura extensiva.



- ✓ La Información presentada en el presente informe puede ser considerada un insumo para el abordaje de esta temática en cualquier escenario, donde hay un claro impacto en diferentes actores como: los productores y sus organizaciones, los investigadores en universidades e institutos, la industria de los bioinsumos, el estado con sus instituciones y la sociedad toda en sus múltiples facetas.



Referencias Bibliográficas

- Elvira Sánchez-Fernández, R., Lorena Sánchez-Ortiz, B., Monserrat Sandoval-Espinosa, Y. K., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., Claudia García-Méndez, M., & Lydia Macías-Rubalcava, M. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Tip*, 16(2), 132–146. [https://doi.org/10.1016/s1405-888x\(13\)72084-9](https://doi.org/10.1016/s1405-888x(13)72084-9)
- Feng, K. C., Liu, B. L., & Tzeng, Y. M. (2000). *Verticillium lecanii* spore production in solid-state and liquid-state fermentations. 23, 25–26.
- Hallett, X. Y. S. G., Watson, J. S. A. K., & Sheppard, J. (1997). Application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements for the production of *Colletotrichum coccodes* spores. 301–305.
- Ji, S., Li, W., Xin, H., Wang, S., & Cao, B. (2015). Improved Production of Sublancin 168 Biosynthesized by *Bacillus subtilis* 168 Using Chemometric Methodology and Statistical Experimental Designs. 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/687915>
- Khan, A. A., Bashir, A., & Ghosia, L. (2014). *biologically active secondary metabolites as chemical industries and genetic engineering for the production of biologically active secondary metabolites F ungi*. (September 2015). <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014APJTB-2014-0230>
- Osorio-Fajardo, A., & Canal, N. (2011). Selección de Cepas de Hongos Entomopatógenos para el Manejo de *Anastrepha obliqua* (Macquart, 1835)(Diptera: Tephritidae) en Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 64(2), 6129–6139. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0304-28472011000200010&script=sci_abstract
- Torres, D. (2003). El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos. *Ecosistemas*, XII(2), 5.
- Velez, P., Posada, F., Marín, P., González, M., Osorio, E., & Bustillo, A. (1997). *Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos*. (June).

Instituciones participantes



Instituto Nacional de
Tecnología Agropecuaria



Secretaría Técnica Administrativa



Con el apoyo de:



www.fontagro.org

FONTAGRO
Banco interamericano de Desarrollo
1300 New York Avenue, NW, Stop
W0502, Washington DC 20577
Correo electrónico: fontagro@iadb.org