

Ensayos de estabilidad de BOTANIGARD[®], biopesticida a base de esporas de un hongo entomopatígeno

I. Troytíño, C. Fernández, M. Louis, J.M., Lara (Departamento de Investigación y Desarrollo, FUTU-RECO BIOSCIENCE, SL).

Se evaluó la estabilidad microbiológica de muestras comerciales de BOTANIGARD[®] S.C, una suspensión concentrada de conidias del hongo entomopatígeno *Beauveria bassiana* cepa GHA en matriz oleosa. Sobre una muestra de uno de los lotes, se hizo el seguimiento de la capacidad germinativa de las conidias cuando se almacenaban a diferentes temperaturas (T^a): 4°C, 26°C y T^a ambiente. Los resultados se contrastaron frente a muestras de lotes comerciales de distintas edades mantenidos a T^a ambiente. El análisis de los datos demostró que BOTANIGARD[®] es una formulación que mantiene viables las esporas de *Bb* durante más de 500 días cuando es almacenado sin refrigeración. Esta característica es única entre formulaciones de biopesticidas similares basadas en hongos entomopatógenos y responde a una de las principales desventajas que han tenido estos productos frente a los insecticidas químicos.

INTRODUCCIÓN

Las plagas agrícolas han sido controladas durante años mediante el empleo de plaguicidas químicos de fuerte impacto negativo sobre los organismos benéficos. En los últimos años, gran parte de la investigación realizada en agricultura se han orientado hacia la reducción del efecto perjudicial de los pesticidas sobre el medio ambiente, dando lugar al desarrollo de productos biopesticidas basados en microorganismos como una de las opciones de mayor interés.

Para utilizar microorganismos como insecticidas, primero deben producirse cantidades masivas de éstos con capacidad de mantener sus propiedades infectivas durante un período de tiempo considerable. Una buena formulación es la base para el éxito de un bioinsecticida y la posibilidad de lograrla depende de las características propias del microorganismo y su relación con los componentes de la formulación (excipientes) y del ambiente de almacenamiento (TANZINI, *et al.* 2001). Además de garantizar un periodo de estabilidad, la formulación tiene como objetivo ayudar a mejorar el contacto entre las unidades infectivas y la plaga objetivo; aumentar o mantener la virulencia y permitir su aplicación con equipos agrícolas convencionales (CARBALLO, 1998). Existen cuatro funciones básicas de la formulación:

- Estabilizar el organismo durante la producción, distribución y almacenamiento.
- Ayudar al manejo y aplicación del producto para que pueda llegar fácilmente hasta la plaga.
- Proteger el organismo de los factores medioambientales nocivos incrementando la persistencia.
- Mejorar la actividad del organismo en el sitio de contacto a través del incremento de su actividad, reproducción, contacto e interacción con la plaga u enfermedad objetivo.

Se ha considerado que el periodo mínimo de vida media, comercialmente aceptable, para un biopesticida debería ser de 18 meses. Esto solo ha sido posible hasta ahora con algunos productos de *Bacillus thuringiensis* y esporas de hongos entomopatógenos almacenados en refrigeración. Por el contrario, la mayoría de pesticidas químicos tienen periodos de vida media de hasta 2 años, y algunos llegan incluso a cuatro (almacenados a temperatura ambiente). Para los insecticidas químicos, una prolongada vida media puede alcanzarse con relativa facilidad.

dad usando aditivos apropiados, por ejemplo, antioxidantes. Los biopesticidas contienen microorganismos que usualmente están vivos, la mayoría de las veces en estado latente, resultando menos estables que los compuestos sintéticos (Burgess, 1998).

Esta escasa estabilidad es vista como una de las principales razones para la penetración de los biopesticidas en los mercados, ya que los hace menos aceptables para los distribuidores y consumidores finales, acostumbrados a pesticidas químicos más estables y de fácil manipulación. La meta final de la investigación y desarrollo sobre un agente de control biológico es llegar a un producto capaz de competir con los pesticidas químicos, siendo la pérdida de viabilidad durante el almacenamiento una de las barreras más difíciles de superar. Las matrices de formulación pueden jugar entonces un papel muy importante para mejorar la supervivencia como se ha demostrado en numerosas investigaciones recientes (SANDOVAL-CORONADO *et al*, 2001).

BOTANIGARD® es un bioinsecticida utilizado con éxito en programas de manejo integrado de plagas en varios países. Consiste en esporas del hongo *Beauveria bassiana* (cepa GHA de la colección de hongos entomopatógenos del Departamento de Agricultura de EE UU (ARS-USDA)). Fruto del desarrollo tecnológico empleado en su fabricación, se ha obtenido una formulación líquida con grandes ventajas, en términos de concentración y estabilidad (por tanto, eficacia), respecto a muchos productos similares del mercado. El fabricante sostiene que esta formulación no necesita refrigeración, puede aplicarse sin necesidad de coadyuvantes, y mantiene la viabilidad de sus unidades infectivas durante al menos 24 meses. En este trabajo se verificó su estabilidad mediante un seguimiento periódico de la calidad de las esporas mantenidas a diferentes temperaturas de almacenamiento.

Materiales y métodos

Para la evaluación se utilizaron 3 lotes del producto comercial BOTANIGARD®: ESO 060502, ESO 050402 y ESO 050501, procedentes de diferentes partidas comercializadas en España. Cada muestra consistía de una botella de 1 L en envase de polietileno de alta densidad almacenada a T° ambiente. La concentración promedio de las muestras era de $2,0 \times 10^{10}$ conidias/mL de producto final.

La muestra del lote ESO 050501 se dividió en tres fracciones de 100 mL y cada una se almacenó a una temperatura diferente: 4°C, T° ambiente y T° constante (26°C). Durante casi dos años, se tomaron mensualmente muestras de 1 mL de cada fracción determinando la capacidad germinativa del hongo. Para ello, se preparaba una suspensión 1:1.000 de la muestra en agua destilada estéril, se homogenizaba, y se inoculaban cinco gotas de 5 µL en puntos previamente señalados en una placa con medio PDA. La placa se incubaba a 26°C en oscuridad durante 10 h, y al cabo de ese tiempo se adicionaba una gota de azul de lactofenol para detener el crecimiento y teñir las esporas. Las secciones de agar que contenían las alícuotas se observaban al microscopio óptico (100X) y se contaban las esporas germinadas y no germinadas, aplicando el criterio que una espora germinada es la que se observa hidratada y con el tubo germinativo emergiendo de ella con una longitud por lo menos igual al diámetro de la espora. Se efectuó un recuento total sobre 1.000 esporas en cada una de las muestras (Figura 1).

El porcentaje de viabilidad se determinaba como la relación entre las esporas germinadas y el número total de esporas:

$$\% G = eG / (eG + eNG)$$

% G = Porcentaje de Germinación correspondiente a la viabilidad; eG = N° de esporas Germinadas; eNG = N° de esporas No Germinadas.

Una vez establecido el perfil de estabilidad de las esporas a diferentes temperaturas, se verificaron los resultados analizando la estabilidad de los otros lotes almacenados a temperatura ambiente durante diferentes tiempos.

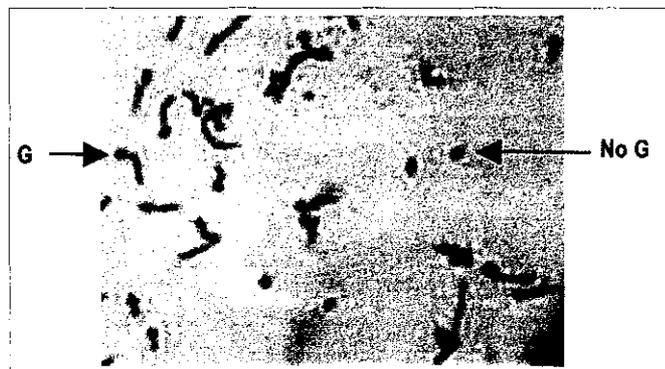
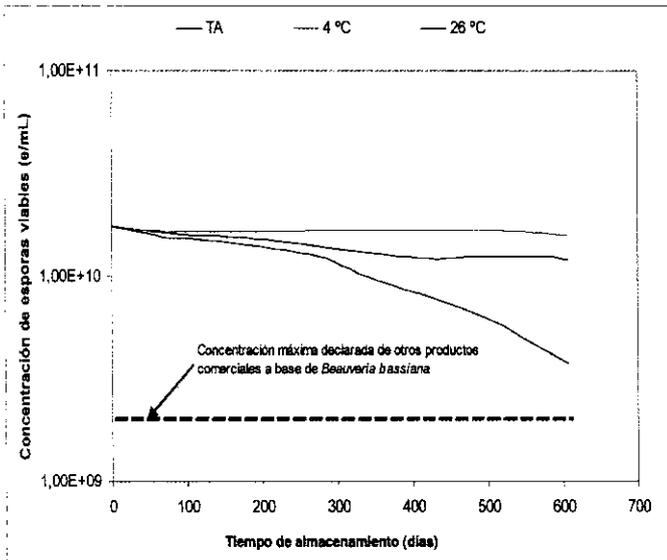


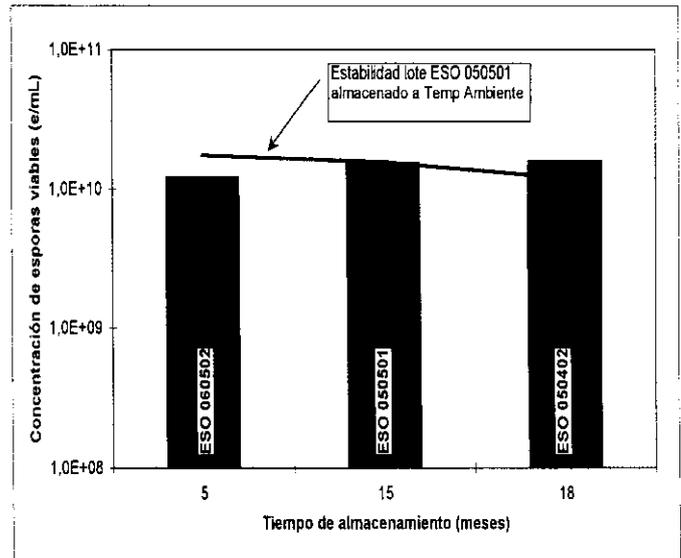
Figura 1. Esporas germinadas (G) y no germinadas (No G) de *Beauveria bassiana* cepa GHA.

Resultados y discusión

La forma en que se formulan las esporas de *B. bassiana* en el producto BOTANIGARD® ha permitido que un porcentaje muy alto de estas unidades infectivas (>80%) mantenga su capacidad germinativa durante casi dos años cuando se almacena a 4°C, superando la barrera de los 18 meses de estabilidad deseada comercialmente para un biopesticida. Además, cuando se almacena a temperatura ambiente, después de 20 meses más del 60% de las esporas permanecen viables (Gráfica 1). Teniendo en cuenta que la concentración inicial del producto es de $2,1 \times 10^{10}$ conidias/mL, el mantenimiento de la capacidad germinativa a temperatura ambiente, permite que al cabo de 20 meses la cantidad de esporas viables sea de $1,2 \times 10^{10}$ esporas/mL, una concentración diez veces más alta que la que tienen inicialmente (sin almacenamiento) productos formulados con otras cepas de *B. bassiana*, las cuales declaran en torno a $2,0 \times 10^9$ esporas/mL (suponiendo una viabilidad del 100% lo que es poco frecuente). La estabilidad a temperatura ambiente se ratificó cuando se comparó con lotes almacenados durante 5 y 18 meses (Gráfica 2). Esta mayor concentración y capacidad de mantenimiento, sin duda redundan en mayores probabilidades de éxito en las aplicaciones de campo, al tiempo que facilita la comercialización al poder manipularse como los insecticidas sintéticos tradicionales.



Gráfica 1. Variación en el tiempo de la concentración de esporas viables del producto BOTANIGARD® almacenado a diferentes temperaturas.



Gráfica 2. Comparación del análisis de estabilidad individual (lote ESO 050501) frente a otros lotes almacenados a temperatura ambiente durante diferente tiempo.

Único registrado (ROPF 22.648)

FuturEco BotaniGard SC

INSECTICIDA BIOLÓGICO



Bioinsecticida eficaz para el control de mosca blanca y otras plagas.
No necesita refrigeración, coadyuvantes ni reguladores del pH.
Evita resistencias y residuos.



BIOTECNOLOGÍA APLICADA A LA
PROTECCIÓN Y NUTRICIÓN DE LOS CULTIVOS






Laboratorios de I+D de FUTURECO

En la muestra almacenada a 26°C, se observó una caída casi lineal de la viabilidad a lo largo del tiempo. Sin embargo nuevamente se determinó que, aún después de prácticamente dos años, la concentración de unidades infectivas era cercana a $5,0 \times 10^9$ esporas /mL, nivel más que suficiente para ejercer una buena acción controladora en campo. Esta concentración es el doble que la de otros productos a base de *B. bassiana* recién formulados.

La estabilidad alcanzada con este producto es una novedad. Otros bioinsecticidas basados en *Beauveria bassiana* y otros hongos declaran una estabilidad de un año, si se almacenan a 4°C. Sin embargo, la forma de entender el mercado de los biopesticidas también está cambiando. Inicialmente fueron considerados una alternativa directa que desplazaría a los insecticidas químicos, algo que nunca llegó a materializarse. Organizaciones como la IOBC (*International Or-*

ganization for Biological Control) o la IBMA (*International Biopesticide Manufacturing Association*) promueven la idea de considerar el control de plagas a través de agentes de control biológico, como un modelo que no tiene nada que ver con la forma como hasta ahora se han interpretado las sustancias insecticidas. Los resultados de estas pruebas demuestran en todo caso que productos como BOTANIGARD® empiezan a romper paradigmas de los biopesticidas, como su escasa vida media o la obligatoriedad de mantenerlos refrigerados para conservar su funcionalidad.

BIBLIOGRAFÍA

- BURGES, H.D. 1998. *Formulation of microbial biopesticides*. Kluwer Academic Publis., Netherlands. Pp. 132-135
- CARBALLO, M. 1998. *Formulación de hongos entomopatógenos*. Rev. Manejo Integrado de Plagas, 47: 1-4
- SANDOVAL-CORONADO, C.F., H.A. LUNA-OLVERA, K. AREVALO-MINO, M.A. JACKSON, T.J. POPRAWSKI & L.J. GALAN-WONG. 2001. *Drying and formulation of blastospores of Paecilomyces fumosoroseus (Hyphomycetes) produced in two different liquid media*. World J. Microbiol. Biotechnol. 17: 423-428.
- TANZINI, M.R., BATISTA, S., SETTEN, A., TOSCHI, N. 2001. *Compatibilidad de agentes tensoactivos con Beauveria bassiana y Metarrhizium anisopliae*. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica), 59: 15-18


Cómo disminuir o eliminar los
residuos de plaguicidas
en frutas, hortalizas
y alimentos transformados

Formulación
de plaguicidas
en frutas, hortalizas
y alimentos transformados

Con Control
Tecnológico
PHYTOMA

NOVEDAD EDITORIAL

Cómo disminuir o eliminar los residuos de plaguicidas

en frutas, hortalizas
y alimentos transformados