

Caracterización de prototipos de bioplaguicidas granulados a base de *Metarhizium anisopliae* para el control de *Ancognatha scarabaeoides* (Coleoptera: Melolonthidae)

Characterization of granular biopesticide prototypes based on *Metarhizium anisopliae* for the control of *Ancognatha scarabaeoides* (Coleoptera: Melolonthidae)

PAULA MARIÑO¹, LAURA VILLAMIZAR², CARLOS ESPINEL³, ALBA MARINA COTES⁴

Revista Colombiana de Entomología 30 (1): 43-49 (2004)

Resumen. La especie *Ancognatha scarabaeoides* es un coleóptero cuyas larvas rizófagas pueden causar daños en cultivos de frijol, maíz, cebolla, arracacha y papa, entre otros. Ocasiona pérdidas entre el 10 y el 80% del total del cultivo. Para su control se utilizan métodos culturales y principalmente métodos químicos, mediante productos altamente tóxicos. Ante los altos costos económicos y ambientales que ocasiona el uso de estos productos, se tiene como alternativa promisoría el uso de insecticidas biológicos a base de hongos entomopatógenos tales como *Metarhizium anisopliae*. Dado que mediante investigaciones previas en Corpoica se seleccionó una cepa de este hongo (Mt 020) con una actividad biocontroladora del 76,6% contra *A. scarabaeoides*, con ésta se desarrollaron tres preformulados de presentación granulada para aplicación al suelo. Por esto se tuvo como objetivo determinar sus características físicas, microbiológicas y su actividad biocontroladora. Para tal fin, la cepa se produjo masivamente y se formularon tres granulados (GR1, GR2, y GR3) diferentes entre sí en los que se variaron sus componentes y sus concentraciones. A cada granulado se le determinó el tamaño de partícula, voluminosidad, porosidad, fluidez, humedad y pH; así como la concentración en conidios.g⁻¹ y la viabilidad expresada como UFC.g⁻¹. Los prototipos y el principio activo se almacenaron a tres temperaturas (8, 18 y 28°C) y mensualmente se evaluó la viabilidad del hongo. La actividad biocontroladora se determinó mediante bioensayos realizados en casa de malla. De acuerdo con los resultados obtenidos, se seleccionó el granulado GR1 por tener características físicas adecuadas, con valores iguales o inferiores a los límites óptimos para cada una de ellas. Presentó 0,31% de polvos finos, es decir que el gránulo no es de consistencia frágil; 3,44 ml.g⁻¹ de voluminosidad, lo que establece que no presentará problemas de manipulación; 18% de porosidad, este porcentaje indicaría que el gránulo podría resistir la manipulación sin fracturarse; también se pudo establecer que el producto fluye fácilmente (ángulo de reposo 27,2°), en consecuencia no presentaría problema en el llenado y empaque de cantidades grandes. Posee una humedad de 9,7%, lo que garantiza la reducción de procesos metabólicos, y pH de 5,5. Además, la pérdida máxima de viabilidad a las tres temperaturas presentada durante los seis meses de almacenamiento fue de 20,7% y produjo niveles de mortalidad de la plaga promisorios y estables llegando hasta el 43%.

Palabras clave: Preformulación. Granulado. Chiza. Control biológico.

Summary. The species *Ancognatha scarabaeoides* is a coleopteran whose rhizophagous larvae can cause damage in bean, maize, onion, and potato crops, among others. It causes losses between 10 and 80% of the total crop. Cultural methods and especially chemical methods with highly toxic insecticides are used for its control. Considering the high economic and environmental costs caused by the use of these products, a promising alternative is the use of biological insecticides based on entomopathogenic fungi like *Metarhizium anisopliae*. Giving that in previous research at Corpoica, a strain of this fungus (Mt 020) was selected, due to its biocontrol activity of 76,6% against *A. scarabaeoides* three granular biopesticide prototypes were developed for soil application. Therefore the objective of this work was to determine their physical and microbiological characteristics, and biocontrol activity. For this purpose, the strain was mass produced and three different granulars (GR1, GR2, and GR3) that varied in components and concentrations were produced. For each granular the particle size, voluminosity, porosity, fluidity, humidity and pH were determined; as well as the concentration in conidia.g⁻¹ and the viability expressed as UFC.g⁻¹. The prototypes and the active source were stored at three temperatures (8, 18 and 28°C) and the viability of the fungus was evaluated monthly. The biocontrol activity was measured in bioassays carried out in the screen house. According to the results obtained, the granular GR1 was selected because of its appropriate physical characteristics, which were equal or inferior to the optimal limits established for each of them. It had 0,31% fine powder, which means that the granule is not fragile; 3,44 ml.g⁻¹ of voluminosity establishing that it will not have manipulation problems; 18% porosity, this small percentage indicates that the granule can resist manipulation without fracturing; it was also established that the product flows easily (angle of repose 27,2°), and so it will not present problems in the filling and packing of large quantities. It had 9,7% humidity, which guarantees the reduction of metabolic processes, and pH of 5,5. In addition, the maximum loss of viability at the three temperatures presented over the six months of storage was 20,7%, and it produced promising and stable levels of pest mortality of up to 43%.

Key words: Preformulation. Granular. White grub. Biological control.

1 Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana.

2 Química Farmacéutica. M. Sc. Investigadora Laboratorio de Control Biológico. CORPOICA. C.I. Tibaitatá. E-mail: laurafernandav@yahoo.es

3 B.Sc. Investigador. Laboratorio de Control Biológico. Corpoica. C.I. Tibaitatá. E-mail: cespinel@yahoo.com

4 Autor para correspondencia: Ph.D. Fitopatología. Investigadora Principal. Laboratorio de Control Biológico. Corpoica. C.I. Tibaitatá. Km. 14 vía Mosquera. Teléfono 3443156. E-mail: acotes@corpoica.org.co

Introducción

Dentro de las plagas que causan el daño mayor en extensas zonas de cultivos en diferentes departamentos del país se encuentra la chiza o mojoy. Este es un insecto cuyo estado larval ataca el sistema radicular de frijol, maíz, pastos, zanahoria, cebolla, flores, papa, espárragos, entre otros cultivos (Londoño 1998).

El complejo chiza en Colombia abarca un gran número de especies. Las especies de chiza predominantes parecen estar relacionadas con la altura sobre el nivel del mar, es así como a altitudes superiores a 2.500 metros predomina el género *Ancognatha*, con dominancia de la especie *Ancognatha scarabaeoides* Erichson (Coleoptera: Scarabaeoidea; Melolonthidae). Esta especie se encuentra ampliamente distribuida en los cultivos de tierra fría y en las regiones altas de clima medio en Colombia (Alvarado 1977). Desde hace algunos años se vienen aumentando los niveles de población de este insecto, lo cual es atribuido al uso indiscriminado de plaguicidas y a cambios en el medio ambiente, que afectan los factores de regulación natural bióticos y abióticos, favoreciendo de este modo el aumento de la población del insecto (Londoño 1998). Las pérdidas ocasionadas por esta especie son considerables, y llegan hasta el 100% en algunos cultivos como fresa, hortalizas y flores (Rodríguez 1997). Para el control de este insecto, se han venido utilizando métodos culturales, tales como la rotación de cultivos y las aradas profundas, sin obtener resultados satisfactorios (Alvarado 1977).

Sin embargo, a nivel nacional, comúnmente se han utilizado plaguicidas químicos, varios de los cuales son productos altamente tóxicos, es el caso de Carbofurán, Diazinon y Hostation, entre otros (Orellana 1983). Estos productos, además de representar costos económicos altos pueden causar problemas de equilibrio en los ecosistemas incidiendo negativamente en el control ejercido por enemigos naturales (Rodríguez 1983). El uso de dichos insecticidas en Colombia tienen un costo aproximado de medio billón de dólares cada año; representando solamente un 5% de la inversión realizada en agentes microbianos de control (Gómez y Villamizar 1996).

Una alternativa promisoría para el control de esta plaga es la utilización de métodos biológicos (Rodríguez 1983), debido a que su uso ha tenido notable impacto en los últimos años especialmente en cultivos perennes. Estas alternativas biológicas incluyen el uso de depredadores, parasitoides y microorganismos entomopatógenos (Londoño 1998).

A nivel mundial se han utilizado con éxito microorganismos entomopatógenos para el control de esta plaga, tales como *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y bacterias como *Bacillus popilliae* que causa una enfermedad denominada muerte lechosa (Londoño y Ríos 1997). Por su parte, los hongos entomopatóge-

nos tales como *M. anisopliae* penetran en el hospedero directamente degradando su cutícula y no necesitan ser ingeridos, presentan más especificidad que los químicos, crecen fácilmente en sustratos simples y económicos haciendo factible su producción masiva con costos bajos y, hasta el momento, no se le conocen efectos adversos sobre el ambiente, los animales y el hombre (Galán y Támez 1993).

Existen diferentes tipos de presentación para los bioinsecticidas de aplicación al suelo y su diseño depende de los hábitos y del comportamiento de la plaga objeto de control (Gómez *et al.* 1997). Algunos tipos de formulaciones existentes para dichos bioinsecticidas son: polvos para espolvoreo, polvos humectables, líquidos emulsionables y granulados; estos últimos presentan mayor facilidad en su manipulación y aplicación al suelo, ya que permiten que el producto entre en contacto directo con plagas de hábito rastrero y favorecen la diseminación y persistencia del biocontrolador en el suelo (Gómez *et al.* 1997). Sin embargo, para la formulación de un bioplaguicida de aplicación al suelo destinado al control de plagas tales como *A. scarabaeoides*, se deben tener en cuenta las condiciones ambientales en las cuales se encuentra el cultivo. Por lo tanto, se hace necesario que la formulación garantice la absorción de la humedad del medio ambiente, para facilitar la germinación del microorganismo y conferirle a éste un sustrato adecuado para su establecimiento en el suelo. Igualmente es importante tener en cuenta, que la formulación, especialmente si es un granulado, posea características físicas adecuadas, tales como fluidez, humectabilidad, tamaño de partícula, voluminosidad, humedad y pH (ICONTEC 1992, 1998). Dichas características pueden garantizar la viabilidad del microorganismo en condiciones de almacenamiento y permiten detectar si los granulados presentan problemas, ya sea por su difícil manipulación o por dificultades en los procesos de llenado de los recipientes en que se almacena (Voight y Borns 1979).

En Colombia la producción de bioplaguicidas es realizada en muchos casos en forma artesanal, sin estudios que respalden la utilización de cepas con actividad biocontroladora alta. Algunos de estos productos carecen de una caracterización adecuada que asegure su efectividad y cumplimiento de las especificaciones de la etiqueta; por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue el de determinar las características físicas, microbiológicas y la actividad biocontroladora de preformulados granulados a base de *M. anisopliae* para el control de la chiza *A. scarabaeoides*.

Materiales y Métodos

En el presente estudio se utilizó la cepa del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* Mf020, proveniente de Enviga-

do (Antioquia), aislada directamente de larvas de *Ancognatha scarabaeoides*. Esta cepa fue suministrada por el Centro de Investigaciones La Selva de Corpoica.

Con el propósito de mantener el material biológico, la cepa se incorporó al Banco de Germoplasma del Laboratorio de Control Biológico de Corpoica C.I. Tibaitatá, en viales con Agar Papa Dextrosa (PDA) a una temperatura de 4°C y antes de ser utilizada en los ensayos biológicos fue reactivada en larvas de tercer instar de *A. scarabaeoides*.

Producción masiva del principio activo. La producción masiva del principio activo *Metarhizium anisopliae* (cepa Mf020), para la posterior formulación de los granulados, se realizó en bandejas de aluminio de 20 cm de largo por 14 cm de ancho y 3 cm de profundidad que contenían 34 g de salvado y 150 ml de extracto de arroz. Las bandejas se cubrieron con papel de aluminio y se esterilizaron durante 20 minutos. Posteriormente, cada bandeja se inoculó con 5 ml de una suspensión de *M. anisopliae* que contenía 10⁷ conidios.ml⁻¹ y se cubrieron con una lámina plástica permeable al gas para evitar posibles contaminaciones y para permitir intercambio de gases, facilitando el crecimiento del hongo. Estas bandejas se incubaron en un cuarto de crecimiento con luz constante y con un temperatura de 25°C durante 15 días. Al cabo de este tiempo el plástico que cubría las bandejas se cambió por toallas de papel, para permitir un mejor intercambio gaseoso con el fin de iniciar el proceso de secado del principio activo, el cual se llevó a cabo en una estufa con corriente de aire a una temperatura de 28°C durante 2 días. Una vez que la biomasa se encontró seca, se molió y fue pasada por una malla de 100 micrómetros para obtener un tamaño de partícula adecuado.

Preparación de los excipientes y proceso de formulación de los granulados. Los excipientes se mezclaron con el principio activo de acuerdo con las composiciones indicadas en la tabla 1. Una vez se obtuvo una masa uniforme, ésta se granuló por extrusión a través de una malla con un tamaño de poro de 1 mm aproximadamente. Posteriormente, los granulados se secaron durante dos días a 28°C en un estufa con corriente de aire; posteriormente, se regranularon para obtener un tamaño de partícula uniforme.

Caracterización física de los granulados. Se evaluaron las propiedades físicas de voluminosidad, fluidez, tamaño de partícula, porosidad, humedad y pH.

La determinación del tamaño de partícula se llevó a cabo mediante la técnica de gravimetría (Voight y Borns 1979). La determinación de la voluminosidad se realizó por el método de peso constante - volumen variable (Voight y Borns 1979). Para determinar la porosidad se pesaron 25 gramos de cada uno de los granulados y

Tabla 1. Composición de los granulados a base de *M. anisopliae* evaluados

| Granulados | Principio activo | Pasta aglutinante | Diluyente | Coadyuvante |
|------------|------------------|-------------------|-----------|-------------|
| GR1 | 39,40% | 60,20% | -- | 0,29% |
| GR2 | 28,80% | 59,30% | 11,50% | 0,29% |
| GR3 | 43,70% | 48,60% | 7,20% | 0,29% |

se colocaron en una probeta, se leyó el volumen ocupado por el material (V1) y posteriormente, se apisonó el material levantando la probeta hasta la altura máxima permitida y dejándola caer libremente sobre una base de madera, esta operación se repitió hasta el momento en que no se presentó variación en el volumen dado por la probeta (Vf). La porosidad se calculó utilizando la fórmula matemática: Porosidad = $1 - (a/v)$, en donde **a** es la densidad global de la muestra (W muestra / V1) y **v** es la densidad real de la muestra (W muestra / Vf) (Voight y Borns 1979).

La fluidez se determinó por el método de fluidez estática (Voight y Borns 1979; Helman 1982, ICONTEC 1992). La determinación del porcentaje de humedad se realizó por el método de pérdida de peso por secado (USP XXIII 1995). Para la determinación del pH, se realizó una suspensión 1:10 P/V de cada granulado en agua destilada y se midió el pH con un potenciómetro Cöle - Parmer, previamente calibrado (CENICAFÉ 1996).

El diseño experimental de todas las pruebas de caracterización física fue completamente al azar, con tres repeticiones para cada granulado, utilizando una sola réplica a través del tiempo por ser sólo un lote de producción. Con los resultados obtenidos fue posible establecer los límites óptimos de aceptación para cada una de las características de los diferentes granulados.

Caracterización microbiológica de los granulados

Concentración y viabilidad. En la determinación de la concentración expresada como conidios.g⁻¹ de cada uno de los granulados se quiso asegurar la desintegración de los gránulos y una mejor obtención de conidios, por lo que se pesó un gramo de cada uno de los granulados, el cuál fue homogeneizado en 2.000 ml de agua destilada durante un minuto. Posteriormente, se llevó a cabo la cuantificación de conidios en cámara de Neubauer.

La viabilidad se determinó realizando diluciones sucesivas en tubos que contenían 9 ml de Tween 80 al 0,1%, posteriormente, se inocularon 0,1ml de las diluciones 10⁻⁶, 10⁻⁷ y 10⁻⁸ en cajas de Petri que contenían Agar Saboureaud Rosa de Bengala (SBR). Estas cajas fueron incubadas durante 8 días, tiempo después del cual se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonia (UFC), expresando

finalmente los resultados como UFC.g⁻¹ de granulado.

Estabilidad microbiológica de los granulados. Para evaluar el efecto de diferentes temperaturas de almacenamiento sobre el hongo, se realizó un ensayo de estabilidad de los granulados a tres temperaturas (8, 18 y 28°C) durante seis meses, para lo cual, se almacenaron muestras de 0,1 g de cada granulado y 0,1 g del tratamiento control que consistió en principio activo puro (*Metarhizium anisopliae*), en viales estériles sellados con tapón y agrafe, cada mes de almacenamiento se tomó una muestra y se evaluó la viabilidad de cada uno de los granulados mediante la técnica descrita previamente.

Actividad biocontroladora de los granulados. La evaluación de la estabilidad biocontroladora de cada uno de los granulados sobre el insecto blanco se realizó por medio de un bioensayo realizado bajo condiciones de casa de malla a una temperatura de 25°C y una humedad relativa del 80% en promedio.

El diseño experimental fue completamente al azar, y se utilizaron seis tratamientos, cada uno con tres repeticiones y 11 individuos por repetición. Los tratamientos consistieron en los tres preformulados granulados por evaluar (T1, T2, T3), el hongo sin formular, es decir, el principio activo (T4), el testigo tratado (T5), el cual consistió en una formulación del granulado sin principio activo utilizando todos los excipientes con el fin de verificar que éstos no produjeran la muerte al insecto y el testigo absoluto (T6). Las larvas se recolectaron 15 días antes del inicio del bioensayo; se trasladaron a la casa de malla y se ubicaron en cubetas con suelo y suministro de alimento con el propósito de brindarles un tiempo para su adaptación a las condiciones experimentales.

Cada unidad experimental consistió en una cubeta plástica de 38 cm de largo, 28 cm de ancho y 15 cm de profundidad, en la cual se colocaron 5 kg de suelo tamizado, incorporando la cantidad determinada de cada uno de los granulados para ajustar en cada cubeta el doble de la CL₅₀ (1,58 x 10⁷ conidios.g⁻¹ de suelo) determinada para esta cepa en estudios preliminares realizados en el Laboratorio de Control Biológico de Corpoica. Posteriormente, se ubicaron en cada cubeta 11 larvas de tercer instar de *A. scarabaeoides*, debido que en ensayos previos se estableció este número de insectos como el adecuado para

evitar una sobrepoblación que acarrearía un posible ataque entre ellas. En cada cubeta se ubicó un cespedón de pasto Kikuyo (*Penisetum clandestinum*) como soporte para la alimentación de los insectos durante el bioensayo.

Se realizó el registro de mortalidad de larvas al día seis y al día 12 del inicio del bioensayo y a partir de este último, cada 10 días. Las larvas muertas se sometieron a cámara húmeda, que consistieron en cajas de Petri estériles, que tenían en su base una toalla de papel húmeda, la cual se cambiaba todos los días con el fin de evitar contaminación. Las cajas se mantuvieron a una temperatura promedio de 18°C con el propósito de evidenciar la esporulación típica de este entomopatógeno.

Los resultados netos de mortalidad se corrigieron con el testigo mediante la fórmula de Schneider - Orelli (Ciba - Geygi 1973):

$$\text{Porcentaje de eficacia} = ((b - k) / (100 - k)) \times 100$$

Donde **b** equivale al porcentaje de individuos muertos en el tratamiento y **k** equivale al porcentaje de individuos muertos en el testigo.

Adicionalmente, estos resultados se sometieron a un análisis de varianza y a comparación múltiple de medias de Tukey, con el fin de evidenciar diferencias significativas entre cada uno de los tratamientos.

Resultados y Discusión

Producción masiva del principio activo. En el medio de cultivo utilizado (salvado - extracto de arroz), el hongo formó un micelio firme y de color blanco que se evidenció a los cuatro días de incubación, el cual se fue tornando verde oscuro a medida que se producía la esporulación, la cual se empezó a observar a partir del décimo día de incubación. Posteriormente, fue tomando una apariencia polvosa y al décimo quinto día de incubación se suspendió la misma, ya que todo el medio estuvo colonizado y con una abundante producción de conidios. Las bandejas fueron secadas y molidas. Una vez se obtuvo el principio activo puro (medio con el hongo), después de los procesos de secado y molido, se determinó la concentración y viabilidad del mismo, siendo la primera de 1,7x10¹⁰ conidios.g⁻¹ y la segunda de 3,5x10¹¹ UFC.g⁻¹. Es importante resaltar que la producción masiva se realizó en salvado de trigo, ya que este sustrato tiene un efecto inductor de la virulencia de *M. anisopliae* (Villamizar 1998).

Caracterización física de los granulados. Se evaluaron las propiedades físicas de voluminosidad, fluidez, tamaño de partícula, porosidad, humedad y pH.

Tamaño de Partícula. En el proceso de producción de los granulados, se tuvieron en cuenta dos etapas indispensables para la obtención de un tamaño de partícula uni-

forme, los procesos de granulación y regranulación.

Los resultados de tamaño de partícula de los granulados fueron obtenidos mediante la técnica de gravimetría (Tabla 2), se analizaron mediante una distribución de frecuencias, encontrándose que para los tres granulados el porcentaje mayor de peso retenido se obtuvo en el tamiz 18 con tamaño de poro de 0,84 mm, con porcentajes de 88,3, 86,5 y 87,1%; para los granulados GR1, GR2 y GR3, respectivamente; por otra parte, los porcentajes de peso retenido en el tamiz inmediatamente anterior (10), el cual tiene un tamaño de poro de 1,42 mm fueron del 0,22, 0,13 y 0,77% para los granulados GR1, GR2 y GR3, respectivamente; por consiguiente, estos datos permiten afirmar que la mayoría de las partículas de los tres granulados se encuentran en un rango de tamaño de partícula entre 0,84 mm y 1,42 mm.

Valencia (2000) encontró, para cuatro preformulaciones granulares a base del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* para el control del gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax*, un tamaño de partícula entre 1,5 mm y 2 mm y al ser evaluada su actividad biocontroladora, los porcentajes de control fueron 100, 100, 96,5 y 89,6%, indicando que dicho tamaño fue adecuado para este tipo de productos. Los granulados de *Metarhizium anisopliae* tienen un tamaño de gránulo menor al obtenido por Valencia, lo cual podría mejorar el cubrimiento y distribución del producto en la aplicación, repercutiendo directamente sobre la actividad biocontroladora. Además, los preformulados granulados de *M. anisopliae* presentaron un tamaño de partícula similar a la del bioplaguicida comercial BIO 1020 (0,8 mm) a base de *M. anisopliae*, indicando que los granulados desarrollados poseen características adecuadas para este tipo de formulaciones de aplicación al suelo.

De acuerdo con los resultados obtenidos en cuanto a la proporción de polvos finos de cada uno de los granulados, se presentaron porcentajes muy bajos con valores de 0,31, 0,25 y 0,11% respectivamente, para los granulados GR1, GR2 y GR3; indicando que ninguno de los preformulados posee una consistencia frágil en el gránulo, posiblemente debido a que en el proceso de manufactura se utilizó la cantidad y concentración adecuada de agente aglutinante, lográndose una adhesión alta de las partículas. Además, los granulados elaborados mediante la técnica de extrusión manual tienden a presentar una dureza alta y por lo tanto fragilidad baja, por esto, se espera que los granulados no presenten problemas en el producto terminado cuando sea almacenado por períodos de tiempo prolongados, evitándose su compactación en la base, lo que impediría el flujo libre del producto y la utilización total del mismo (Morales 1993).

Adicionalmente, la presencia baja de polvos finos en los productos aseguran que una mayor cantidad de los mismos lleguen al sitio blanco, ya que el gránulo por su peso, cae directamente en el sitio de aplicación, mientras que los polvos finos son arrastrados por el viento y además podrían ocasionar obstrucción de las vías respiratorias de las personas que manipulan el producto en su manufactura y aplicación (Valencia 2000).

Voluminosidad. Los granulados GR1, GR2 y GR3 presentaron una voluminosidad adecuada, con valores de 3,44, 3,25 y 3,6 ml.g⁻¹ respectivamente (Tabla 3), ya que no fueron significativamente diferentes del límite máximo para dicho parámetro, el cual debe ser de 3 ml/g para que los materiales no presenten problemas durante la manipulación (Martín 1967). Resultado que permite sugerir que posiblemente ninguno de los tres granulados presentará problemas en los procesos de llenado de los recipientes, mezcla y transporte del producto terminado a escala industrial.

Valencia (2000) obtuvo voluminosidades de 1,68, 1,65, 1,86 y 1,65 ml.g⁻¹ para cuatro granulados a base de *B. bassiana*, debido a que utilizó excipientes y principio activo (arroz esporulado y molido) con voluminosidad baja. Sin embargo, a pesar de haber usado para los granulados de *M. anisopliae* excipientes de baja voluminosidad, el principio activo es un homogeneizado del medio de cultivo esporulado, el cual está constituido en su mayoría por salvado de trigo que por ser un material muy voluminoso pudo ser la causa de que

esta característica estuviera por encima del límite óptimo.

Porosidad. Esta característica es de gran importancia para los granulados, ya que es la medida de los espacios intraparticulares de un sólido y determina su fragilidad.

Los resultados obtenidos en esta prueba fueron de 18, 19 y 25% para los granulados GR1, GR2 y GR3; esto indica que hay una pequeña proporción de espacios entre partículas que forman los gránulos y por lo tanto, se espera que puedan resistir la manipulación sin fracturarse, conservando su tamaño de partícula y sin producir polvos finos que generen pérdidas del producto. El valor óptimo para esta característica es inferior a 30% y los tres granulados se encuentran por debajo de este valor, lo que permitiría deducir que los tres formulados son más compactos, característica deseable para que el producto no sea arrastrado por el viento en el momento de su aplicación.

Fluidez. Los valores de los ángulos de reposo obtenidos para los granulados GR1 y GR3, fueron los menores, siendo éstos de 27,2° y 29,8° respectivamente, y el GR2 presentó un mayor ángulo de reposo con un valor de 30,6° (Tabla 3).

De acuerdo con el valor óptimo para esta característica (< 30°), valor por debajo del cual se considera que un producto posee alta fluidez (Voight y Borns 1979), los resultados obtenidos para los granulados GR1 y GR3 se encuentran por debajo de dicho límite, sugiriendo que los granulados

Tabla 2. Distribución de frecuencias para la determinación del tamaño de partícula de los granulados por la técnica de gravimetría

| Tamiz N° | Tamaño de poro | Frecuencia (Peso retenido %) | | |
|----------|----------------|------------------------------|------|------|
| | Mm | GR1 | GR2 | GR3 |
| 10 | 1,42 | 0,2 | 0,1 | 0,7 |
| 18 | 0,84 | 88,3 | 86,5 | 87,1 |
| 20 | 0,63 | 3,5 | 7,9 | 5,2 |
| 35 | 0,59 | 4,6 | 5,3 | 4,9 |
| 50 | 0,27 | 1,8 | 1,7 | 1,4 |
| 100 | 0,25 | 0,5 | 0,5 | 0,4 |
| Finos | < 0,25 | 0,3 | 0,2 | 0,1 |

Tabla 3. Características de los granulados de *Metarhizium anisopliae*

| Características | GR1 | GR2 | GR3 | Valores óptimos |
|---|-----------------------|------------------------|------------------------|-----------------|
| Concentración (conidios.g ⁻¹) | 4,8 X 10 ⁹ | 5,2 X 10 ⁹ | 6,8 X 10 ⁹ | |
| Viabilidad (UFC.g ⁻¹) | 1,5 X 10 ⁹ | 2,5 X 10 ¹⁰ | 5,3 X 10 ¹⁰ | |
| Voluminosidad (ml.g ⁻¹) | 3,44 | 3,25 | 3,6 | < 3 |
| Porosidad (%) | 18 | 19 | 25 | < 30 |
| Ángulo de reposo | 27,2° | 30,6° | 29,8° | < 30° |
| Humedad (%) | 9,7 | 6 | 3,3 | < 10 |
| pH | 5,53 | 5,49 | 5,51 | 5-7 |

fluyen fácilmente y no presentarán problemas cuando sean manipulados en grandes cantidades en los procesos de llenado y empaque principalmente durante una producción industrial, además, la alta fluidez de los formulados favorecería la aplicación del producto por parte del agricultor pues permitiría una manipulación fácil.

Humedad. La humedad residual de un producto granulado, desarrollado a base de un hongo, es de gran importancia ya que influye directamente en la viabilidad del mismo. Los resultados de la prueba de humedad obtenidos para los tres granulados presentaron valores aceptables, siendo éstos del 9,7, 6 y 3,3% para los granulados GR1, GR2 y GR3, respectivamente (Tabla 3). Aunque el valor de porcentaje de humedad del GR1 es mayor comparado con los otros dos granulados, éste no sobrepasa el valor sugerido para este tipo de productos, el cual es inferior al 10%, para asegurar que se reduzcan al mínimo los procesos metabólicos del microorganismo y así no se produzcan pérdidas considerables de la viabilidad durante el almacenamiento (Valencia 2000).

pH. Los valores de pH para los granulados GR1, GR2 y GR3 fueron de 5,5, 5,4 y 5,5, respectivamente (Tabla 3); valores adecuados para estos productos ya que se encuentran entre 5 y 7, rango óptimo para el buen desarrollo de este tipo de microorganismos (Cenicafé 1996); lo que indica que este parámetro posiblemente no afectará la viabilidad de *Metarhizium anisopliae*.

Caracterización microbiológica de los granulados

Determinación de la concentración. La determinación de la concentración de cada

uno de los granulados expresada como conidios.g⁻¹, se evaluó desintegrándolos en agua destilada y llevando a cabo la cuantificación de conidios en cámara de Neubauer.

Las concentraciones para los granulados GR1, GR2 y GR3 fueron de 4,8 x 10⁹ conidios.g⁻¹, 5,2 x 10⁹ conidios.g⁻¹ y 6,8 x 10⁹ conidios.g⁻¹, respectivamente (Tabla 3). Este resultado indica que a pesar de las diferencias en la composición de los preformulados, todos presentan una concentración similar y adecuada para este tipo de producto, considerando que los productos comerciales a base de hongos entomopatógenos presentan concentraciones que oscilan entre 10⁷ conidios.g⁻¹ y 10¹⁰ conidios.g⁻¹.

Estabilidad microbiológica de los granulados

Uno de los aspectos básicos a evaluar en un bioplaguicida es la estabilidad de la viabilidad del microorganismo cuando éste es almacenado, ya que las condiciones de almacenamiento, pueden afectar dicha característica e influir directamente en la actividad biocontroladora del producto.

Los resultados obtenidos en las pruebas de estabilidad de la viabilidad de *M. anisopliae* a las tres temperaturas de almacenamiento (8, 18 y 28°C) para los tres granulados y para el principio activo (hongo sin formular) mostraron una pérdida de la misma a través del tiempo (seis meses), la cual osciló entre el 16 y el 36% (Fig. 1).

A 28°C, los granulados GR2 y GR3 presentaron pérdidas de la viabilidad del 32,7 y 32,9%, respectivamente; en comparación con el granulado GR1 y con el control

(principio activo) que presentaron pérdidas del 20,7 y 22%, respectivamente. La prueba de comparación múltiple de medias de Tukey con un $\alpha=0,05$, no detectó diferencias significativas entre las pérdidas de viabilidad de los granulados y del principio activo, indicando que posiblemente ninguna de las formulaciones o los procesos incluidos en la formulación, confirieron estabilidad a los conidios cuando se almacenaron bajo estas condiciones.

Por otra parte, los resultados obtenidos con los diferentes tratamientos almacenados a 18°C, mostraron un comportamiento similar al que se obtuvo a 28°C, en que los granulados GR2 y GR3 presentaron pérdidas considerables de la viabilidad del 36,5 y del 33,2% respectivamente; mientras que el granulado GR1 y el control (principio activo) presentaron pérdidas de viabilidad inferiores, las cuales, fueron del 21,9 y del 17%, respectivamente (Fig. 1). La prueba de comparación múltiple de medias de Tukey con un $\alpha=0,05$ determinó que no hubo diferencias significativas entre la pérdida de viabilidad de los tres granulados, pero sí entre las del granulado GR3 y el control (principio activo), lo que sugiere que a esta temperatura, algunos de los excipientes utilizados en el granulado GR3 podrían haber afectado la estabilidad del microorganismo bajo estas condiciones de almacenamiento. A pesar de no encontrarse diferencias estadísticas entre la viabilidad de los granulados GR1, GR2 y el principio activo, se observó que los granulados presentaron una mayor pérdida de la viabilidad, sugiriendo que de igual forma que con el granulado GR1, alguno de los excipientes o de las operaciones involucradas en el proceso de manufactura, tuvieron un efecto negativo sobre la viabilidad del hongo.

La viabilidad a la temperatura de 8°C para los diferentes granulados fue la que presentó mayor estabilidad durante el almacenamiento. Para los granulados GR1, GR2 y GR3 hubo pérdidas de la viabilidad del 16,2, 23,1 y 21%, respectivamente, mientras que para el control (principio activo) ésta fue del 8,7%. El análisis estadístico con un $\alpha=0,05$ no detectó diferencias significativas entre las pérdidas de viabilidad de los tres preformulados y el principio activo, resultado que sugiere que a esta temperatura la viabilidad del microorganismo no se ve afectada por los excipientes o por el proceso de formulación en los tres granulados y dicha pérdida podría deberse a un efecto del tiempo de almacenamiento (seis meses).

La prueba de comparación múltiple de medias de Tukey no detectó diferencias significativas para cada uno de los tratamientos a las tres temperaturas de almacenamiento, este resultado sugiere que la temperatura no tuvo un efecto determinante en la pérdida de viabilidad del microorganismo. Sin embargo, en todos los casos las pérdidas fueron superiores cuando el almacenamiento se realizó a 28°C, seguidas por las pérdidas encontradas a

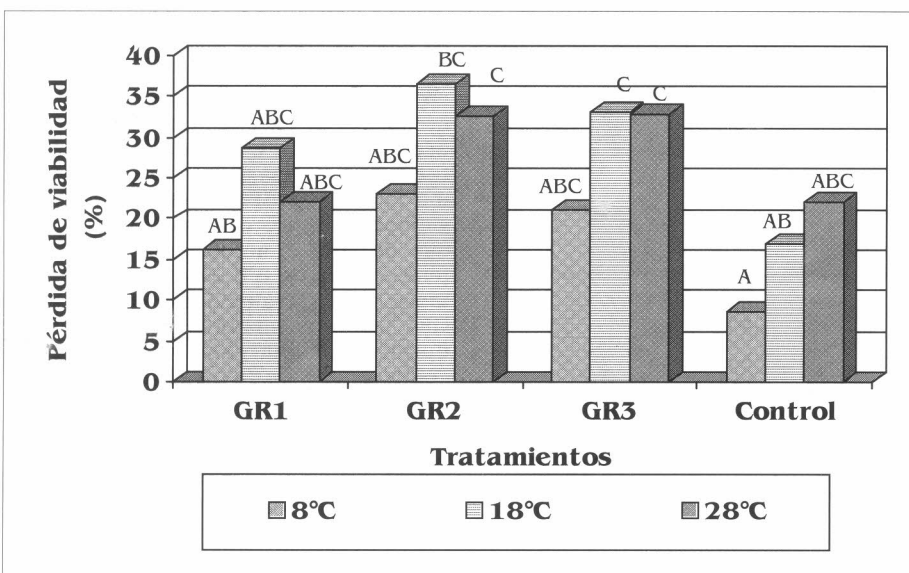


Figura 1. Pérdida de la viabilidad de preformulados a base de *M. anisopliae* bajo condiciones de almacenamiento a tres temperaturas (Tratamientos con letras iguales no presentan diferencias significativas; Tukey $\alpha=0,05$).

18°C y por último las producidas durante el almacenamiento a 8°C; esto se puede atribuir a que a temperatura ambiente y superiores a ésta, el metabolismo del microorganismo se podría encontrar aún activo y la humedad baja y la falta de nutrientes y oxígeno podrían producir la muerte celular, siendo recomendable a partir de estos resultados, el almacenamiento de los preformulados o del principio activo a 8°C para disminuir las pérdidas de viabilidad.

Resultado similar registró Valencia (2000) con los granulados de *B. bassiana* para el control del gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax*, en que las menores pérdidas de viabilidad se presentaron después de seis meses de almacenamiento a una temperatura de 8°C, las cuales fueron del 8%, mientras que a 18 y 28°C las pérdidas fueron del 10,6 y 10,1%, respectivamente. Este resultado confirma que la temperatura tiene un efecto negativo sobre la viabilidad de los microorganismos bajo condiciones de almacenamiento.

Las pérdidas mayores de viabilidad de *M. anisopliae* a las tres temperaturas se registraron en los granulados GR2 y GR3, los cuales tuvieron porcentajes de humedad inferiores al presentado por el granulado GR1. Este factor también podría ser causal de la pérdida de viabilidad, ya que un excesivo secado puede ocasionar una pérdida de agua intracelular y afectar negativamente la estabilidad de la célula, tal como lo encontró Valencia (2000), cuando almacenó un granulado con un porcentaje de humedad muy bajo (2,21%), y encontró pérdida de viabilidad máxima de 17,3%.

Actividad biocontroladora de los granulados

Cuando se realizó la evaluación de la actividad biocontroladora de los granulados, los porcentajes de mortalidad acumulada obtenida 32 días después de iniciado el bioensayo para los tratamientos GR1, GR2, GR3, principio activo y testigo tratado (excipientes) fueron del 42,4, 48,4, 27,2,

27,2 y 30,3%, respectivamente (Fig. 2). Estos porcentajes de mortalidad son bajos si se tiene en cuenta que el bioensayo se realizó en condiciones controladas, por lo que se esperarían porcentajes de control superiores, ya que se le están proporcionando al microorganismo, todas las condiciones para que ejerza su actividad biocontroladora. Sin embargo, en general, los resultados señalados de control de chiza con hongos entomopatógenos son bajos. Londoño y Ríos (1997) cuando evaluaron diferentes cepas de *M. anisopliae* y *B. bassiana* para el control de dos especies de chizas predominantes en Antioquia, *Phyllophaga obsoleta* y *Anomala undulata*, obtuvieron porcentajes de mortalidad acumulada del 40% después de 20 días de iniciado el bioensayo.

El porcentaje de mortalidad obtenido en el testigo absoluto para este bioensayo fue del 12,1%; un valor de mortalidad aceptable para ensayos biológicos (CIBA-GEIGY 1973) y posiblemente se puede atribuir a factores tales como el estrés causado por el confinamiento de las chizas en las cubetas y al efecto de las nuevas condiciones ambientales.

La prueba de comparación múltiple de medias de Tukey ($\alpha=0,2$) determinó que existieron diferencias significativas entre los porcentajes de mortalidad ocasionados por los granulados GR1, GR2 y los excipientes con respecto a los resultados obtenidos con el granulado GR3, el principio activo y el testigo, pero no detectó diferencias entre estos últimos. Los porcentajes de mortalidad producidos por los granulados GR1 y GR2 fueron superiores y significativamente diferentes de los producidos por el principio activo por lo que se sugeriría que la formulación potencializa la actividad biocontroladora del microorganismo, posiblemente porque el granulado posee un soporte nutricional que le brinda al hongo la posibilidad de crecimiento. Además, los granulados incluyen en su formulación un acondicionador de humedad que les proporciona una mayor posibilidad de captación de agua

para que el microorganismo pueda activar sus procesos metabólicos rápidamente y por ende desarrollar su actividad biocontroladora con más eficacia.

Se observó que los excipientes tienen actividad sobre el insecto, ya que el porcentaje de mortalidad producido por este tratamiento fue superior y significativamente diferente del obtenido con el principio activo puro y con el testigo absoluto. Esto se podría atribuir a un efecto nocivo del diluyente, el cual es una arcilla que podría tener efecto ligeramente corrosivo sobre la delicada cutícula del insecto, básicamente causando una resequead excesiva de la misma. Este efecto de los excipientes no tendría impacto sobre el hombre, pero posiblemente sí sobre otros estadios larvales de insectos que puedan ser susceptibles al mencionado efecto físico.

En el tratamiento que corresponde al granulado GR3 se presentó una mortalidad inferior y significativamente diferente de la obtenida con los otros granulados. Sin embargo, el porcentaje de mortalidad para este preformulado no fue estadísticamente diferente del obtenido con el principio activo puro; lo que indicaría que la formulación de este prototipo no mejora la actividad biocontroladora del microorganismo sobre el insecto. A pesar de que este granulado también contiene los excipientes que posiblemente tienen un efecto sobre la chiza, es probable que la concentración de éstos en el prototipo, o las características físicas producidas por su combinación no afecten la actividad biocontroladora del microorganismo.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esta etapa de la investigación, se sugiere integrar varios microorganismos en el manejo de poblaciones de chiza y la utilización de otras alternativas de control dentro de un programa de manejo integrado de plagas.

De acuerdo con las características físicas de cada uno de los granulados, su actividad biocontroladora y su estabilidad en condiciones de almacenamiento, el granulado GR1 presentó los valores más adecuados para cada una de las características físicas, un porcentaje de mortalidad del 42% y pérdidas no considerables en los porcentajes de viabilidad durante el almacenamiento a una temperatura de 8°C. Además, es importante tener en cuenta que el granulado GR1 tiene los menores costos de producción, ya que esta formulación no contiene uno de los excipientes que sí está incluido en los granulados GR2 y GR3, lo que permitiría concluir que el granulado GR1 es el preformulado que exhibe las propiedades más adecuadas para ser optimizado y evaluado en estudios posteriores.

Conclusiones

- Los tres preformulados granulados a base de *Metarhizium anisopliae* presentaron

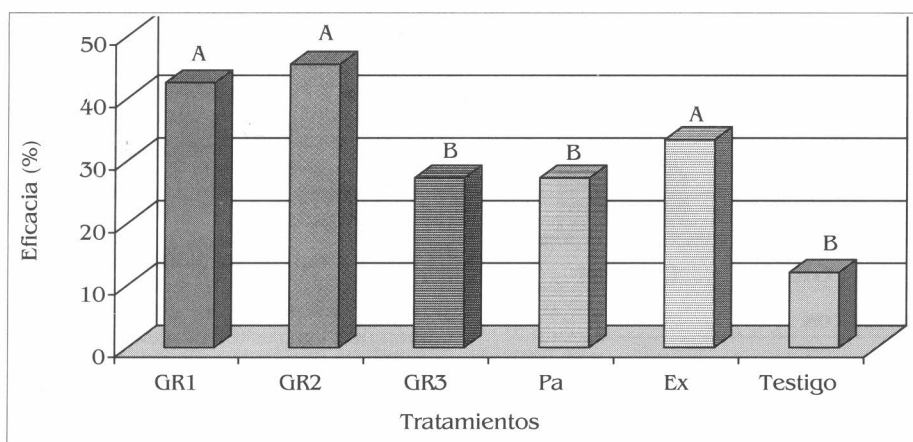


Figura 2. Efecto biocontrolador de preformulados granulados a base de *M. anisopliae* sobre *A. scarabaeoides* (GR = Granulados, Pa = Principio Activo, Ex = Excipientes) (Tratamientos con letras iguales no presentan diferencias significativas; Tukey $\alpha=0,02$).

características físicas y microbiológicas adecuadas para este tipo de productos.

- Los excipientes utilizados afectaron la estabilidad de la viabilidad del hongo bajo condiciones de almacenamiento a 8, 18 y 28°C.

- La estabilidad de la viabilidad del hongo se afectó en menor medida en la temperatura de almacenamiento de 8°C.

- Los preformulados GR1 y GR2 mostraron actividad biocontroladora promisoría sobre larvas de *A. scarabaeoides*.

- Se seleccionó el granulado GR1 por exhibir los valores óptimos para las características físicas y microbiológicas y una promisoría actividad biocontroladora.

Literatura citada

- ALVARADO, L. 1977. Prácticas culturales en papa. Instituto Colombiano Agropecuario ICA. Programa Tuberosas. Estación Experimental Obonuco. p. 58, 59.
- CENICAFÉ. 1996. Metodología para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Disciplina de Entomología. Chinchiná, Caldas.
- CIBA - GEIGY. 1973. Como realizar un bioensayo. En: Manual de ensayos de campo. p. 2-10.
- GALÁN, L.; TÁMEZ, R. 1993. Estado actual y perspectivas de bioinsecticidas microbianos, Biotecnología para la producción de bioinsecticidas microbianos centrada en *Bacillus thuringiensis*. Universidad Nacional Autónoma de México. México. p. 97-100.
- GÓMEZ, M.; VILLAMIZAR, L. 1996. Estudio tecnológico para producción masiva y preformulación del hongo entomopatógeno *Metarhizium* spp. para el control biológico de la langosta de los Llanos Orientales Trabajo de Grado. Químico Farmacéutico. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia. Bogotá. p. 40-44.
- GÓMEZ, M.; VILLAMIZAR, L.; COTES, A. 1997. Optimización de un preformulado a base del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* para el control biológico de la langosta llanera *Rhammatocerus schistocercoides*. Resúmenes XXIV Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. p. 107-108. Pereira.
- HELMAN, H. 1982. Farmacotecnia teórica y práctica. De Continental. México. p. 1687-1720.
- INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. 1992. Productos químicos industriales para uso agropecuario, Plaguicidas granulados. ICONTEC. Norma Técnica 3350. Bogotá. p. 4.
- INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. 1998. Agentes biológicos para el control de plagas, agentes microbianos a base de hongos y bacterias. Producción. ICONTEC. Norma Técnica 4422-1. Bogotá.
- LONDOÑO, M. E. 1998. La chiza o mojoyo, un modelo de investigación entomológica. Cuarto Seminario Técnico Regional. Medellín. p. 48-55.
- LONDOÑO, M. E.; RÍOS, A. M. 1997. Efecto de diferentes agentes de control biológico sobre *Phyllophaga obsoleta* y *Anomala undulata* (Coleoptera: Melononthidae). Aconteceres Entomológicos. Grupo GEUN. Universidad Nacional sede Medellín. p. 35-42.
- MARTÍN, A. 1967. Physical Pharmacy. Lea and Febiger, Philadelphia, p. 611-635.
- MORALES, L. 1993. Formulación de Bioinsecticidas, Biotecnología para la producción de bioinsecticidas microbianos centrada en *Bacillus thuringiensis*. Universidad Nacional Autónoma de México. México. p. 85-89.
- ORELLANA, H. S. 1983. Plaguicidas. La prevención del riesgo en su uso. OPS. México. p. 41-51.
- RODRÍGUEZ, S. D. A. 1983. Programa de entomología. C.I. Tibaitatá Mosquera (Cundinamarca). ICA. Informe de labores 1982 B1983 A. p. 23.
- RODRÍGUEZ, S. D. A. 1997. Biología y manejo de chizas. ICA. Boletín de Sanidad Vegetal 21. Bogotá, p. 5-24.
- USP 23. 1995. United States Pharmacopeia. Convention Rockville.
- VALENCIA, C. 2000. Control de calidad físico, biológico y microbiológico de preformulados a base del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bálsamo) utilizados a nivel experimental para el control biológico del gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* (Hustache). Trabajo de Grado. Carrera de Microbiología Agrícola y Veterinaria. Facultad de Ciencias Básicas. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. p. 42-77.
- VILLAMIZAR, L. F. 1998. Efecto de la composición del medio de cultivo en la virulencia de *Metarhizium anisopliae* sobre la langosta llanera *Rhammatocerus schistocercoides*. Tesis. M.Sc. en Microbiología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. p. 70-78.
- VOIGHT, R.; BORNES, M. 1979. Tratado de tecnología farmacéutica. Acirbia, Zaragoza, España, p. 181-194.

Recibido: Abr. 22 / 2003

Aceptado: Jul. 30 / 2003