



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

**“DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE VIABILIDAD Y
TIEMPO DE VIDA ÚTIL DE TRES BIOPLAGUICIDAS (TRIKOFUN,
NEMAKILL Y BAULKIL) PRODUCIDAS POR MIKROBEN DEL
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE
RECURSOS NATURALES ESPOCH”**

**Trabajo de titulación presentado para optar el grado académico de:
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL**

AUTORA: AGUIRRE LOZANO LUPE EDILMA

TUTORA: Dr. Cs. ROSA DEL PILAR CASTRO GÓMEZ

RIOBAMBA – ECUADOR

2016

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: **“DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE VIABILIDAD Y TIEMPO DE VIDA ÚTIL DE TRES BIOPLAGUICIDAS (TRIKOFUN, NEMAKILL Y BAUKILL), PRODUCIDAS POR “MIKROBEN” DEL DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE RECURSOS NATURALES “ESPOCH”**, de responsabilidad de la señorita Lupe Edilma Aguirre Lozano, ha sido minuciosamente revisada por los miembros del tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

Dr. Cs Rosa Castro
DIRECTORA
TRABAJO DE TITULACION

Dra. Mayra Espinoza
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Lupe Edilma Aguirre Lozano, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 31 de Marzo del 2016

Lupe Edilma Aguirre Lozano

0603894544

Yo, Lupe Edilma Aguirre Lozano, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación; y el patrimonio intelectual del trabajo de Titulación, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

Lupe Edilma Aguirre Lozano

DEDICATORIA

A Dios por su guía, a mis padres Ángel, Enma y mi Abuelita Rosalía por ser el soporte fundamental en mi vida, a mis hermanos Jorge, David, Martin, Carlos, Kleber y Jenny por su apoyo y colaboración y al hombre que Dios puso en mi camino Alejandro por creer en mí.

Lupita

AGRADECIMIENTO

A Dios, a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por los conocimientos adquiridos, a mis padres Ángel y Enma, pero uno muy especial a la Ing. Rosita Castro y a la Dra. Marcia Pesántez del Departamento de Fitopatología MIKROBEN de la Facultad de Recursos Naturales ESPOCH, que con sus enseñanzas y guía hicieron posible la culminación de este trabajo, A mis mejores amigas Vale, Vero, Karina, Margarita, Glenda por ser parte de mi formación académica.

Lupita A

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|------|
| ÍNDICE DE TABLAS..... | xii |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | xii |
| ÍNDICE DE ANEXOS..... | xv |
| RESUMEN..... | xvi |
| SUMMARY..... | xvii |
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| Situación Problemática..... | 1 |
| Formulación del Problema..... | 1 |
| Justificación teórica..... | 2 |
| Justificación práctica..... | 3 |
| OBJETIVOS..... | 4 |
| Objetivo General..... | 4 |
| Objetivos Específicos..... | 4 |
| CAPÍTULO I | |
| 1. MARCO TEÓRICO..... | 5 |
| 1.1. Marco filosófico o epistemológico de la investigación..... | 5 |
| 1.2. Antecedentes de investigación..... | 6 |
| 1.3.2 <i>Características de los hongos benéficos empleados en la agricultura (Trichoderma harzianum, Paecilomyces lilacinus, Beauveria bassiana)</i> | 9 |
| 1.3.3.1 <i>Temperatura</i> | 9 |
| 1.3.3.2 <i>Humedad</i> | 10 |
| 1.3.3.3 <i>Relación Carbono/Nitrógeno (C/N)</i> | 10 |
| 1.3.3.4 <i>pH</i> | 10 |
| 1.3.3.5 <i>Aireación</i> | 10 |
| 1.3.4 <i>Utilización de hongos para la elaboración de los biofungicidas</i> | 11 |
| 1.3.5 <i>TRIKOFUN</i> | 11 |
| 1.3.5.1 <i>Antecedentes Técnicos</i> | 12 |
| 1.3.5.2 <i>Propiedades físicas determinadas</i> | 12 |

| | |
|---|----|
| 1.3.5.3 <i>Características de Formulación</i> | 12 |
| 1.3.5.4 <i>Recomendaciones para su uso</i> | 12 |
| 1.3.5.5 <i>Preparación de la mezcla</i> | 13 |
| 1.3.5.6 <i>Compatibilidad</i> | 13 |
| 1.3.5.7 <i>Precauciones</i> | 13 |
| 1.3.5.8 <i>Trichoderma harzianum</i> | 13 |
| 1.3.5.8.1 <i>Generalidades</i> | 13 |
| 1.3.5.8.2 <i>Clasificación Taxonómica</i> | 14 |
| 1.3.5.8.3 <i>Mecanismo de acción</i> | 15 |
| 1.3.6 <i>NEMAKILL</i> | 16 |
| 1.3.6.1 <i>Antecedentes Técnicos</i> | 16 |
| 1.3.6.2 <i>Propiedades físicas determinadas</i> | 16 |
| 1.3.6.3 <i>Características de Formulación</i> | 16 |
| 1.3.6.4 <i>Recomendaciones para su uso</i> | 17 |
| 1.3.6.5 <i>Preparación de la mezcla</i> | 17 |
| 1.3.6.6 <i>Compatibilidad</i> | 17 |
| 1.3.6.7 <i>Precauciones</i> | 17 |
| 1.3.6.8 <i>Paecilomyces lilacinus</i> | 18 |
| 1.3.6.8.1 <i>Generalidades</i> | 18 |
| 1.3.6.8.2 <i>Clasificación Taxonómica</i> | 18 |
| 1.3.6.8.3 <i>Mecanismo de acción</i> | 19 |
| 1.3.7 <i>BAUKILL</i> | 20 |
| 1.3.7.1 <i>Antecedentes Técnicos</i> | 20 |
| 1.3.7.2 <i>Propiedades físicas determinadas</i> | 20 |
| 1.3.7.3 <i>Características de Formulación</i> | 21 |
| 1.3.7.4 <i>Recomendaciones para su uso</i> | 21 |
| 1.3.7.5 <i>Preparación de la mezcla</i> | 21 |
| 1.3.7.7 <i>Precauciones</i> | 21 |
| 1.3.7.8 <i>Beauveria bassiana</i> | 22 |
| 1.3.7.8.1 <i>Generalidades</i> | 22 |
| 1.3.7.8.2 <i>Clasificación Taxonómica</i> | 22 |
| 1.3.7.8.3 <i>Mecanismo de acción</i> | 23 |

CAPÍTULO II

| | |
|---|----|
| 2.MARCO METODOLÓGICO | 24 |
| 2.1 Metodología | 24 |
| 2.1.1 Tipo y diseño de la Investigación..... | 24 |
| 2.1.2 Lugar de la Investigación..... | 24 |
| 2.1.3 Diseño experimental..... | 25 |
| 2.1.4 Unidad de análisis | 25 |
| 2.1.5 Población de estudio | 26 |
| 2.1.6 Tamaño de la muestra | 26 |
| 2.1.7 Selección de la muestra..... | 26 |
| 2.1.7.1 Material biológico..... | 26 |
| 2.2.2 Tratamiento estadístico de datos | 27 |
| 2.3 Mecanismos..... | 27 |
| 2.3.1 Reactivación y purificación de cepas..... | 27 |
| 2.3.2 Preparación de los bioformulados..... | 28 |
| 2.3.3 Cuantificación de esporas de los formulados líquidos mediante la cámara de Neubauer..... | 30 |
| 2.3.4 Determinación del porcentaje de viabilidad del microorganismo en los bioformulados..... | 31 |
| | |
| CAPÍTULO III | |
| 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 33 |
| 3.1 Análisis e interpretación y discusión de resultados..... | 33 |
| 3.1.1 Determinación de las curvas de crecimiento del bioformulado Trikofun almacenados a tres temperaturas 4°C 18°C y 22°C | 33 |
| 3.1.2 Determinación de las curvas de crecimiento del bioformulado Trikofun 4°C | 33 |
| 3.1.3 Determinación de las curvas de crecimiento del bioformulado Trikofun a 18°C | 34 |
| 3.1.4 Determinación de las curvas de crecimiento del bioformulado Trikofun a 22°C | 36 |
| 3.1.5 Determinación de las curvas de crecimiento del bioformulado Trikofun a tres temperaturas 4°C 18°C y 22°C..... | 37 |
| 3.1.6 Concentración de esporas del bioformulado Trikofun a tres temperaturas 4°C 18°C y 22°C mediante la cámara de Neubauer | 39 |
| 3.2 Determinación del porcentaje de viabilidad del bioformulado Trikofun a tres temperaturas 4°C, 18°C y 22°C..... | 40 |
| 3.2.1 Determinación del porcentaje de viabilidad del bioformulado Trikofun a 4°C | 40 |
| 3.2.2 Determinación del porcentaje de viabilidad del bioformulado Trikofun a 18°C | 41 |
| 3.2.3 Determinación del porcentaje de viabilidad del bioformulado Trikofun a 22°C | 42 |

| | |
|---|----|
| 3.3 Determinación de las curvas de crecimiento del bioformulado NemaKill almacenado a tres temperaturas 4°C 18°C y 22°C | 43 |
| 3.3.1 Determinación de las curvas de crecimiento del bioformulado NemaKill a 4 °C..... | 43 |
| 3.3.2 Determinación de las curvas de crecimiento del bioformulado NemaKill a 18°C..... | 44 |
| 3.3.3 Determinación de las curvas de crecimiento del bioformulado NemaKill a 22°C..... | 46 |
| 3.3.4 Determinación de las curvas de crecimiento del bioformulado NemaKill a tres temperaturas 4°C 18°C y 22°C, mediante la cámara de Neubauer..... | 47 |
| 3.3.5 Concentración de esporas del bioformulado NemaKill a tres temperaturas 4°C 18°C y 22°C mediante la cámara de Neubauer | 49 |
| 3.4 Determinación del porcentaje de viabilidad del bioformulado NemaKill a tres temperaturas 4°C, 18°C y 22°C | 50 |
| 3.4.1 Determinación del porcentaje de viabilidad del bioformulado NemaKill a 4°C. | 50 |
| 3.4.2 Determinación del porcentaje de viabilidad del bioformulado NemaKill a 18 °C | 51 |
| 3.4.3 Determinación del porcentaje de viabilidad del bioformulado NemaKill a 22 °C | 52 |
| 3.5 Determinación de las curvas de crecimiento del Bioformulado BauKill almacenados a tres temperaturas 4°C 18°C y 22°C | 53 |
| 3.5.1 Determinación de las curvas de crecimiento del Bioformulado BauKill a 4°C | 53 |
| 3.5.2 Determinación de las curvas de crecimiento del bioformulado BauKill a 18 °C..... | 54 |
| 3.5.3 Determinación de las curvas de crecimiento del Bioformulado BauKill a 22°C | 56 |
| 3.5.4 Determinación de las curvas de crecimiento del Bioformulado BauKill a tres temperaturas 4°C 18°C y 22°C | 57 |
| 3.5.5 Concentración de esporas del bioformulado BauKill a tres temperaturas 4°C 18°C y 22°C mediante la cámara de Neubauer | 59 |
| 3.6 Determinación del porcentaje de viabilidad del bioformulado BauKill a diferentes temperaturas 4°C, 18°C y 22°C..... | 60 |
| 3.6.1 Determinación del porcentaje de viabilidad del bioformulado BauKill a 4°C | 60 |
| 3.6.2 Determinación del porcentaje de viabilidad del bioformulado BauKill a 18 °C..... | 61 |
| 3.6.3 Determinación del porcentaje de viabilidad del bioformulado BauKill a 22°C | 62 |

CONCLUSIONES

RECOMENDACIONES

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ABREVIATURAS

| | |
|-----|--|
| C/N | Relación Carbono – Nitrógeno |
| cc | Centímetros cúbicos |
| FRN | Facultad de Recursos Naturales |
| FAO | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura |
| EG | Esporas germinadas |
| NoG | Esporas no germinadas |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| UE | Unión Europea |
| CE | Certificación Europea |
| BCS | Agencia Certificadora de productos orgánicos |
| PDA | Papa dextrosa agar |
| pH | Potencial de hidrogeno |
| R1 | Conteo de esporas viables repetición uno |
| R2 | Conteo de esporas viables repetición dos |
| R3 | Conteo de esporas viables repetición tres |
| ha | Hectáreas |
| MO | Microorganismo |
| FBN | Fijación Biológica de Nitrógeno |
| L | Litros |
| mL | mililitros |
| min | minutos |
| μL | micro litros |
| UFC | Unidades formadoras de colonia |
| °C | grados centígrados |
| % | Porcentaje |
| %T | Porcentaje de esporas germinadas y no germinadas por 100 |
| g | gramos |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1-2: Número de tratamientos para la determinación del porcentaje de esporas viables y tiempo de vida útil | 26 |
|--|----|

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1-1 Bioformulado Líquido Trikofun..... | 11 |
| Figura 2-1 Aspecto microscópico de <i>Trichoderma harzianum</i> | 13 |
| Figura 3-1 Bioformulado líquidos NemaKill..... | 16 |
| Figura 4-1 Aspecto microscopio de <i>Paecilomyces lilacinus</i> | 18 |
| Figura 5-1 Bioformulado líquido BauKill..... | 20 |
| Figura 6-1 Aspecto microscopio de <i>Beauveria bassiana</i> | 22 |
| Figura 1-2 Cajas de cultivo puro <i>Trichoderma harzianum</i> | 27 |
| Figura 2-2 Cajas de cultivo puro de <i>Paecilomyces lilacinus</i> | 27 |
| Figura 3-2 Cultivo puro de <i>Beauveria bassiana</i> | 27 |
| Figura 4-2 Cascarilla en remojo | 28 |
| Figura 5-2 Empacado del sustrato..... | 28 |
| Figura 6-2 Sustrato empacado y sellado..... | 28 |
| Figura 7-2 Esterilización del sustrato..... | 28 |
| Figura 8-2 Cámara de Crecimiento..... | 29 |
| Figura 9-2 Crecimiento de masa conidial..... | 29 |
| Figura 10-2 Caldo nutritivo..... | 29 |
| Figura 11-2 Extracción de las esporas..... | 29 |
| Figura 12-2 Mezclado del caldo nutritivo con las esporas..... | 30 |
| Figura 13-2 Empacado del producto..... | 30 |
| Figura 14-2 Bioformulado líquido..... | 30 |
| Figura 15-2 Conteo de esporas en la cámara de Neubauer..... | 31 |

| | |
|---|----|
| Figura 16-2 Inoculación del hongo para la determinación de la viabilidad de los bioformulados..... | 32 |
| Figura 1-3 Curva de crecimiento del Bioformulado Trikofun a 4 °C. | 33 |
| Figura 2-3 Curva de crecimiento del Bioformulado Trikofun a 18 °C..... | 34 |
| Figura 3-3 Curva de crecimiento del bioformulado Trikofun a 22 °C..... | 36 |
| Figura 4-3 Curva de crecimiento del bioformulado Trikofun a 4°C 18°C y 22 °C..... | 37 |
| Figura 5-3 Concentración de esporas de Trikofun a 96 días de almacenamiento..... | 39 |
| Figura 6-3 Curva de regresión lineal en función del tiempo mediante el método de placa pobre conservada. 4°C. | 40 |
| Figura 7-3 Curva de regresión lineal en función del tiempo mediante el método de placa pobre conservada. 18°C..... | 41 |
| Figura 8-3 Curva de regresión lineal en función del tiempo mediante el método de placa pobre conservada a 22°C..... | 42 |
| Figura 9-3 Curva de crecimiento del bioformulado Nemakill a 4 °C..... | 43 |
| Figura 10-3 Curva de crecimiento del bioformulado Nemakill a 18 °C..... | 44 |
| Figura 11-3 Curva de crecimiento del bioformulado Nemakill a 22 °C..... | 46 |
| Figura 12-3 Curva de crecimiento del bioformulado Nemakill a 4°C 18°C y 22 °C..... | 47 |
| Figura 13-3 Concentración de esporas de Nemakill a 96 días de almacenamiento..... | 49 |
| Figura 14-3 Curva de regresión lineal en función del tiempo mediante el método de placa pobre conservada. 4°C..... | 50 |
| Figura 15-3 Curva de regresión lineal en función del tiempo mediante el método de placa pobre conservada. 18°C..... | 51 |
| Figura 16-3 Curva de regresión lineal en función del tiempo mediante el método de placa pobre conservada. 22°C..... | 52 |
| Figura 17-3 Curva de crecimiento del bioformulado Baukill a 4 °C..... | 53 |
| Figura 18-3 Curva de crecimiento del bioformulado Baukill a 18 °C..... | 54 |
| Figura 19-3 Curva de crecimiento del bioformulado Baukill a 22 °C..... | 56 |
| Figura 20-3 Curva de crecimiento del bioformulado Baukill a 4°C 18°C y 22 °C..... | 57 |

| | |
|---|----|
| Figura 21-3 Concentración de esporas de Baukill a 96 días de almacenamiento..... | 59 |
| Figura 22-3 Curva de regresión lineal en función del tiempo mediante el método de placa pobre conservada. 4°C..... | 60 |
| Figura 23-3 Curva de regresión lineal en función del tiempo mediante el método de placa pobre conservada. 18°C..... | 61 |
| Figura 24-3 Curva de regresión lineal en función del tiempo mediante el método de placa pobre conservada. 22°C..... | 62 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | | |
|-----------|--|----|
| Anexos A | Conteo de esporas viables del bioformulado TRIKOFUN A 4 ⁰ C..... | 71 |
| Anexos B | Conteo de esporas viables del bioformulado TRIKOFUN A 18 ⁰ C..... | 72 |
| Anexos C | Conteo de esporas viables del bioformulado TRIKOFUN A 22 ⁰ C..... | 73 |
| Anexos D | Porcentaje de viabilidad del bioformulado TRIKOFUN A 4 ⁰ C..... | 74 |
| Anexos F | Porcentaje de viabilidad del bioformulado TRIKOFUN A 18 ⁰ C..... | 75 |
| Anexos G | Porcentaje de viabilidad del bioformulado TRIKOFUN A 22 ⁰ C..... | 76 |
| Anexos H | Conteo de esporas viables del bioformulado NEMAKILL A 4 ⁰ C..... | 77 |
| Anexos I | Conteo de esporas viables del bioformulado NEMAKILL A 18 ⁰ C..... | 78 |
| Anexos J | Conteo de esporas viables del bioformulado NEMAKILL A 22 ⁰ C..... | 79 |
| Anexos K | Porcentaje de viabilidad del bioformulado NEMAKILL A 4 ⁰ C..... | 80 |
| Anexos L | Porcentaje de viabilidad del bioformulado NEMAKILL A 18 ⁰ C..... | 81 |
| Anexos Ll | Porcentaje de viabilidad del bioformulado NEMAKILL A 22 ⁰ C..... | 82 |
| Anexos M | Conteo de esporas viables del bioformulado BAUKILL 4 ⁰ C..... | 83 |
| Anexos N | Conteo de esporas viables del bioformulado BAUKILL 18 ⁰ C..... | 84 |
| Anexos O | Conteo de esporas viables del bioformulado BAUKILL 22 ⁰ C..... | 85 |
| Anexos P | Porcentaje de viabilidad del bioformulado BAUKIL A 4 ⁰ C..... | 86 |
| Anexos Q | Porcentaje de viabilidad del bioformulado BAUKIL A 18 ⁰ C..... | 87 |
| Anexos R | Porcentaje de viabilidad del bioformulado BAUKIL A 22 ⁰ C..... | 88 |
| Anexos S | Registro fotográfico..... | 89 |

RESUMEN

Se determinó el porcentaje de viabilidad y tiempo de vida útil de tres bioformulados TRIKOFUN (*Trichoderma harzianum*), NEMAKILL (*Paecilomyces lilacinus*) y BAUKIL (*Beauveria bassiana*), almacenados a tres temperaturas en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Se realizó la reactivación de las cepas de *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces lilacinus* y *Beauveria bassiana*, luego se prepararon los tres bioformulados líquidos los que fueron almacenados, por un periodo de 96 días a tres temperaturas 4°C, 18°C y 22°C. Se realizó la cuantificación de esporas mediante la cámara de Neubauer todos los días, y la viabilidad de las esporas mediante el micro cultivo cada tres días. Las curvas de crecimiento de los bioformulados TRIKOFUN, NEMAKILL Y BAUKILL, presentan cuatro fases: Fase de Latencia, Fase de crecimiento, Fase estacionaria y Fase de muerte. El número de las esporas viables de los bioformulados TRIKOFUN, NEMAKILL Y BAUKILL almacenados a 22°C presentan poblaciones altas con valores de 3.1x10⁹UFC/mL, 2.9 x10⁹UFC/mL, 3.15 x10⁹UFC/mL, respectivamente, mientras que los bioformulados almacenados a 4°C presentan poblaciones más bajas con concentración de 2.4x10⁹UFC/mL, 2.21x10⁹UFC/mL, 2.38 x10⁹UFC/mL por tiempos más prolongados. El tiempo de vida útil de TRIKOFUN y BAUKILL es de 166 y 104 días respectivamente a 22°C y NEMAKILL es de 189 días a una temperatura de 4°C. Transcurridos los 60 días de almacenamiento para los bioformulados TRIKOFUN y BAUKILL el mayor porcentaje de esporas viables se presenta a 22°C con valores de 84.28%, 76.77% y para NEMAKILL es a 4°C con un de valor de 82.46%. Por tanto para la práctica agrícola se recomienda la conservación de los bioformulados a 18°C como lo indique el fabricante.

Palabras claves: <TRIKOFUN [TRICHODERMA HARZIANUM]> <NEMAKILL [PAECILOMYCES LILACINUS]> <BAUKILL [BEAUVERIA BASSIANA.]> <BIOFORMULADOS> <HONGOS ENTOMOPATÓGENOS> <VIABILIDAD> <FORMULACIONES LIQUIDAS> <TIEMPO DE VIDA ÚTIL>

SUMMARY

It was determined the percentage of viability and life span of three bioformulados TRIKOFUN(*Trichoderma Harzianum*), NEMAKILL (*Paecilomyces lilacinus*) and BAUKILL (*Beauveria bassiana*), stored at three temperatures in the laboratory of Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. The strains of *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces lilacinus* and *Beauveria bassiana* were realized, then the three bioformulados liquids which were stored, were prepared for a period of 96 days at three temperatures 4°C and 18°C and 22°C. The quantification of spores were done by the Neubauer camera every day, and the viability of spores through the micro culture every three days, the curved phases: latency stage, stage of growth, stationary phase and death phase. The number of viable spores of the TRIKOFUN, NEMAKILL and BAUKILL bioformulados stored at 22°C present high populations with values of 3.1×10^9 UFC/mL, 2.9×10^9 UFC/mL, 3.15×10^9 UFC/mL, respectively, while the bioformulados stored at 4°C lower populations with concentration of 2.5×10^9 UFC/mL, 2.21×10^9 UFC/mL, 2.38×10^9 UFC/mL for times longer. The time of life of TRIKOFUN and BAUKILL is 166, 104 days respectively at 22°C and NEMAKILL 189 days of a 4°C. After 60 days of storage for the bioformulados TRIKOFUN and BAUKILL the percentage of viable spores occurs at 22°C with values of 84.28%, 76.77% NEMAKILL is at 4°C with a value of 82.46%. Therefore for agricultural practice is recommended the preservation of the bioformulados at 18°C as directed by the manufacturer.

KEYWOERDS: <TRIKOFUN [TRICHODERMA HARZIANUM]> <NEMAKILL [PAECILOMYCES LILACINUS]> <BAUKILL [BEAUVERIA BASSIANA.]> <BIOFORMULADOS> <ENTOMOPATHÓGENIC FUNGI> <VIABILITY> <FORMULATIONS LIQUID> <USEFULL LIFETIME>

INTRODUCCIÓN

Situación problemática

El continuo crecimiento de la población ha generado el uso de agentes químicos para el rendimiento de los cultivos y para el control de plagas. El incremento de plaguicidas hoy en día llega a afectar tanto al ambiente como a la salud humana, debido a que estos plaguicidas se acumulan en el suelo (González, 2010). El 30 % se queda en el suelo; el 1 % altera al organismo; 44 % va a la atmósfera y sistemas acuáticos, y el 25 %, es retenido en el follaje de las plantas por ende nos vemos afectados ya que la población se alimenta de dichas plantas, produciendo una serie de enfermedades tóxicas en el cuerpo (Crissman, 2012, p.12).

A nivel mundial alrededor de 2 millones de personas se envenenan con plaguicidas cada año, además de los daños colaterales a ríos, suelos y aire, lo que conlleva a un replanteamiento de tácticas de control de plagas. El uso cotidiano de esos químicos contribuye a la crisis de la agricultura que dificulta la preservación de los ecosistemas, los recursos naturales, y afecta la salud de las comunidades rurales y de los consumidores urbanos (FAO-OMS 2014).

La búsqueda de la productividad a corto plazo por encima de la sustentabilidad ecológica, practicada en las últimas décadas, ha dejado un saldo a nivel mundial de contaminación y envenenamiento donde el pretendido remedio universal ha resultado ser peor que la enfermedad (Salterain 2013,p.23).

Formulación del problema

¿La determinación del porcentaje de viabilidad y tiempo de vida útil de tres bioformulados (TRIKOFUN, NEMAKILL Y BAUKILL), producidos por “MIKROBEN” del Departamento de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales “ESPOCH”, promoverá la utilización de este tipo de productos y por tanto disminuirá el uso de agroquímicos tóxicos para el control de plagas y enfermedades en los cultivos?.

Justificación teórica

Es responsabilidad de la sociedad ecuatoriana el poner en práctica los postulados citados en el buen vivir, para alcanzar una relación armónica sustentable, entre el medio ambiente y la salud, que enmarque el camino en la producción de bioformulados microbianos que presenten características deseadas como agentes de biocontrol (Crissman, 2012, p. 7).

Si bien es cierto sin fungicidas, la mayoría de agricultores en el Ecuador sufren graves pérdidas en los rendimientos de cultivos, aunque en el país, como en muchos otros, está creciendo una preocupación generalizada sobre los impactos del uso de agroquímicos en el ambiente y en la salud. Pruebas de residuos en verduras frescas en el Ecuador demostraron la existencia de niveles superiores a los recomendados por la Guía de Seguridad Alimentaria de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura y la Organización Mundial de la Salud (FAO-OMS) y por el Código Alimentario (Vásquez R, 2013, p.8).

Para satisfacer las necesidades del sector productivo agrícola surge la necesidad de plantear soluciones viables para ayudar al agricultor a incorporar ideas sobre un enfoque de la agricultura más ligada al medio ambiente y más sensible socialmente que le permita una mejor producción y sostenibilidad ecológica (Altieri, 2010,p. 45).

El empleo de inoculantes biológicos definidos como bioformulados que contienen células vivas, es una alternativa viable para lograr un desarrollo agrícola ecológicamente sostenible, ya que permite una producción a bajo costo, no contamina el ambiente y mantiene la conservación del suelo desde el punto de vista de fertilidad y biodiversidad (Rakholiya,2010, p.406).

La unidad de producción de microorganismos benéficos MIKROBEN del Departamento de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales ESPOCH, ha logrado desarrollar presentaciones comerciales de microorganismos antagonistas y entomopatógenos de cepas nativas, para el control de plagas y enfermedades que afectan a los cultivos, permitidos según la norma de la Agricultura Ecológica de la Unión Europea (UE) definidas por el reglamento CE # 834/2014, 889/2008 de la misma y de la agencia certificadora BSC, bajo los nombres comerciales de TRIKOFUN, NEMAKILLY BAUKILL.

Justificación práctica

En la actualidad se conocen más de 1500 especies de microorganismos entre hongos, bacterias y virus que son patógenos de artrópodos y controladores de otras poblaciones microbianas directamente, que se usan rutinariamente en los programas de control de plagas (Vásquez M, 2013, p.7).

Una nueva opción al problema que se presenta con los pesticidas, es lo que hoy en día se conoce como control biológico, este método de manejo ecológico de las plagas, consiste en la utilización de cualquier agente biológico de control natural pero en forma dirigida, tales como: hongos, virus, bacterias o insectos benéficos predadores o parasitoides (Guédez, 2010,p.56). Los hongos son producidos para el uso como agentes biológicos de plagas y enfermedades, para lo cual se utilizan diferentes métodos de reproducción (Cavalcante *et al.*, 2010, p. 946).

El Departamento de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, con la unidad de Producción de Microorganismos Antagonistas y entomopatógenos (MIKROBEN) con 18 años de investigación a nivel de laboratorio y campo, cuenta con un grupo de profesionales especializados en la detección y tratamiento de enfermedades patológicas, los mismos que presentan como una alternativa la dosificación de microorganismos destinados al control biológico de plagas y enfermedades en plantas y suelos.

Mediante la investigación de la determinación del porcentaje de viabilidad y tiempo de vida útil de tres bioformulados (TRIKOFUN, NEMAKILL Y BAUKILL), producidas por “MIKROBEN” del Departamento de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales “ESPOCH”, promoverá la utilización de este tipo de productos y por tanto disminuirá el uso de agroquímicos tóxicos para el control de plagas y enfermedades en los cultivos.

En esta investigación se determinará el porcentaje de viabilidad en función del tiempo de estos formulados líquidos, a tres temperaturas (4,18 y 22)⁰C, con el objeto de determinar el tiempo óptimo en que estas formulaciones pueden ser utilizadas por los agricultores asegurando su eficacia en el tiempo y la calidad en las nuevas formulaciones.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar el porcentaje de viabilidad y tiempo de vida útil de tres bioformulados (TRIKOFUN, NEMAKILL Y BAUKILL), producidos por “MIKROBEN” del Departamento de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales “ESPOCH”.

Objetivos Específicos

- Determinar la curva de crecimiento de esporas viables en función del tiempo a tres temperaturas 4⁰C, 18⁰C y 22⁰C.
- Determinar el tiempo de consumo máximo de los bioformulados a tres temperaturas 4⁰C, 18⁰C y 22⁰C.
- Determinar el porcentaje de viabilidad de los tres bioformulados a tres temperaturas 4⁰C, 18⁰C y 22⁰C.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Marco filosófico o epistemológico de la investigación

Uso de tecnologías limpias y no contaminantes.- “El Estado promoverá, en el sector público y privado, el uso de tecnologías ambientalmente limpias y de energías alternativas de bajo impacto. La soberanía energética no se alcanzará en detrimento de la soberanía alimentaria, ni afectará el derecho del agua” (Constitución de la República del Ecuador 2008).

El desarrollo sustentable se refiere a la administración eficiente y racional de nuestros recursos naturales, con el objetivo de mejorar el bienestar de la población actual sin comprometer la calidad de vida de las generaciones futuras, la protección del ambiente y el desarrollo humano sustentable van de la mano y es necesario ampliar las investigaciones sobre la utilización de métodos biológicos para la protección de los cultivos; debido a que estos son atacados por insectos y enfermedades que reducen significativamente la producción (Riechmann, 2012,p 34)

Los hongos en particular despiertan el interés de empresas y organismos de investigación por su papel en el control de insectos y enfermedades, sin dañar el medio ambiente y la salud. Encontrar un producto con especificaciones bien definidas y con los procedimientos de control de calidad asegura un buen funcionamiento y su seguridad, la calidad se define como el conjunto de propiedades y características de un producto que lo hace apto para satisfacer las necesidades a las cuales va dirigida (Pérez, 2011)

Las normas y procedimientos para el control de calidad de los productos y procesos conjuntamente con los registros, constituyen la garantía para la validación de las producciones de bioformulados y promueven la estandarización de los costos de producción y garantiza su estabilidad en el mercado lo que conlleva a la ganancia y confianza en el consumidor (Vázquez R, 2013).

En forma natural los hongos satisfacen ciertos requerimientos nutricionales por la digestión enzimática de sus hospederos, estos requerimientos también pueden ser suplementados en cantidades adecuadas en un medio de cultivo para lograr un máximo crecimiento y esporulación,

aun cuando debe tenerse en cuenta que estos requerimientos pueden ser diferentes para la obtención de biomasa miceliar o conidios, por lo tanto las técnicas y procesos de producción más adecuados pueden variar para las diferentes especies de hongos (Martínez, 2010).

Una de las alternativas más promisorias para disminuir el impacto ambiental causado por el frecuente uso de productos químicos para el control de plagas y enfermedades de plantas se centra en la utilización de agentes de control biológico (Carrillo, 2011). Dentro de estos agentes se destacan los hongos del género *Trichoderma harzianum* Rifai, *Paecilomyces lilacinus* Thom y *Beauveria bassiana* Bassi.

La multiplicación de *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces lilacinus* y *Beauveria bassiana*, se puede realizar en forma artesanal o industrial, implementando distintas técnicas de fermentación líquida y sólida. Entre los sustratos naturales para la producción de éstos hongos antagonistas se encuentran granos de trigo, avena, cebada, centeno, arroz, maíz, soya y salvado de trigo (Sivila; Alvares, 2013). Las esporas de hongos son los elementos de perpetuación de la especie, pueden ser de origen asexual (mitosporas) o sexual (meiosporas) (Carrillo, 2011).

El recuento total de esporas viables es una prueba habitual de inspección de bioformulados. Esta prueba es una de las herramientas más sencillas que se utiliza para garantizar la calidad del producto, la cámara de Neubauer es un aparato de precisión hecho de vidrio óptico especial. Que se utiliza para contar células u otras partículas en suspensiones bajo el microscopio (Bradley, 2013).

1.2. Antecedentes de la investigación

La producción de hongos entomopatógenos, se basa en la multiplicación masiva del hongo y sus estructuras reproductivas (esporas o conidios) en un sustrato natural principalmente arroz, trigo, maíz, frijol y soya; siendo el arroz y el trigo los más utilizados actualmente (Castro R, 2015, p.30).

En el estudio realizado en el Estado de Guerrero, México, sobre esporas viables en la producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en diferentes sustratos orgánicos. Se obtuvieron

porcentajes de viabilidad altos, lo que significa que en ningún sustrato se generan sustancias que afecten negativamente la germinación de las esporas (Otero, 2010).

En la investigación realizada por Vargas Blanco Diego Alonso, del Laboratorio de Producción, Novagri S.A.C, Arequipa, en el tema de estudio sobre la evaluación de la viabilidad en el tiempo para muestras de esporas puras y formulación líquida de *Paecilomyces lilacinus*, se concluyó que las esporas puras almacenadas en refrigeración a 4-6°C a través del tiempo, aún a los 5 meses conservan una viabilidad superior al 91.85% (Vargas, 2011.)

Góngora Botero *et al.*, Federación nacional de cafeteros de Colombia, (Cenicafé), en la investigación claves para el éxito del hongo *Beauveria Bassiana* como controlador biológico de la broca del café. Utilizaron las pruebas de viabilidad y pureza para determinar si las esporas están vivas en tal formulación, utilizan también unidades formadoras de colonia, y a su vez se verificó que el crecimiento corresponde al hongo (Góngora; Marín, 2013).

Un estudio a nivel local en la provincia de Chimborazo, ESPOCH, Departamento de Sanidad Vegetal Fernández, R 2006, realizó la determinación del número de esporas viables en función del tiempo y temperatura de Trikofun, NemaKill, MethaKill, BauKill y Vertik, en formulados líquidos, para lo cual realizó la recopilación y la identificación de hongos entomopatógenos para la realización de los 5 Bioformulados a diferentes temperaturas 4°C, 18°C y 22°C, los resultados de esta investigación determinaron que existe un número de células viables en niveles que aseguran su actividad por un tiempo de dos meses de vida útil (Fernández, 2006).

1.3 Bases teóricas

1.3.1 Microorganismos antagonistas para la agricultura

Los microorganismos son aquellos seres vivos más diminutos que únicamente pueden ser apreciados a través de un microscopio. En este extenso grupo podemos incluir a los virus, las bacterias, hongos, levaduras y mohos que pululan por el planeta tierra (Agrios, 2005, p.10).

Respecto de su estructura biológica y a diferencia de lo que ocurre con las plantas o los animales, esta es sumamente elemental ya que son unicelulares, en lo que sí coinciden con los mencionados es en la individualidad que presentan y ostentan (Rakholiya, 2010).

Algunos microorganismos pueden ser los responsables del deterioro de algunos alimentos, incluso ocasionando graves enfermedades a aquellos que consumieron esos alimentos contagiados, pero paradójicamente y por otro lado hay otros que resultan ampliamente beneficios y que a propósito son utilizados en la elaboración de algunos alimentos con los objetivos de alargar sus vidas o bien de cambiar las propiedades de los mismos (Harman, 2011; Sivila; Alvares, 2013).

Los microorganismos benéficos se clasifican en dos grupos:

- **Acción directa:** agrupan microorganismos que habitan en algún componente de los tejidos vegetales, y por ello la acción benéfica se realiza en la planta y no en su medio circundante, es el caso de la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) y las micorrizas (Agrios, 2005, p.12).
- **Acción indirecta:** estos son aprovechados primero por el suelo y lo transmite hacia los cultivos, pertenecen a este grupo los mecanismos de acción que trabajan en la solubilización de nutrientes minerales (Agrios, 2005, p.13).

Los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de éstos es una característica importante para su selección como agentes de control biológico. Si el antagonista posee varios modos de acción reduce los riesgos de desarrollo de resistencia en el patógeno. Este riesgo de resistencia también se reduce mediante el uso de combinaciones de antagonistas con diferente modo de acción (Sivila; Alvares, 2013)

1.3.2 Características de los hongos benéficos empleados en la agricultura (*Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces lilacinus*, *Beauveria bassiana*)

Los hongos que presentan un rango estrecho de hospederos, pero que son muy virulentos, son generalmente los más difíciles de cultivar, aún más las especies que presentan fases parasíticas y saprofiticas en sus ciclos de vida (Fernández O, 2013).

En forma natural los hongos satisfacen ciertos requerimientos nutricionales por la digestión enzimática de sus hospederos (Agrios, 2005, p.16). Estos requerimientos también pueden ser suplementados en cantidades adecuadas en un medio de cultivo para lograr un máximo de crecimiento y esporulación, aun cuando debe tenerse en cuenta que estos requerimientos pueden ser diferentes para la obtención de biomasa micelial o conidios, por lo tanto las técnicas y procesos de producción más adecuados pueden variar para diferentes especies de hongos (Rakholiya, 2010).

Además de los problemas tecnológicos, hay que tener en cuenta el mecanismo de acción mediante el cual actúa el microorganismo, así como si su efecto se encuentra estrechamente vinculado a condiciones locales y micro ambientales y muy específicamente a condiciones de humedad y temperatura entre otros factores condicionantes (Verma *et al.*, 2012).

1.3.3 Factores ambientales que influyen en la proliferación y sobrevivencia de los microorganismos

1.3.3.1 Temperatura

Es el factor más importante que influye en la proliferación y sobre vivencia de los organismos, afectándolos en cualquiera de los dos sentidos. Si la temperatura aumenta, las reacciones químicas y enzimáticas dan lugar a velocidades cada vez más rápidas, al igual que la proliferación. Sin embargo más allá de cierta temperatura, las proteínas, los ácidos nucleicos y otros componentes celulares se vuelven sensibles a estas temperaturas elevadas y pueden inactivarse en forma irreversible. Cada organismo tiene una temperatura mínima, por debajo de la cual no tiene lugar la proliferación, una temperatura óptima, en la que el crecimiento es más rápido y una temperatura máxima, por encima de la cual no es posible el crecimiento (Cayré *et al.*, 2011).

1.3.3.2 Humedad

La actividad del agua es el factor que mejor describe el estado en que éste se encuentra presente y el grado de dificultad que pueden tener los diversos tipos de microorganismos para utilizarla para su crecimiento. Hay un valor mínimo de humedad necesaria para producir actividad microbiana, si presenta exceso de humedad, disminuyen los espacios libres en el material y se producirá una fermentación anaeróbica (Fernández O, 2013).

1.3.3.3 Relación Carbono/Nitrógeno (C/N)

La mayoría de los microorganismos usan aproximadamente 30 parte en peso de carbono por cada parte de nitrógeno, por lo que una relación aproximada de C/N 30 es la más conveniente para una fermentación sólida (Cayré, 2011).

1.3.3.4 pH

El pH juega un papel importante en la regulación de la producción de enzimas extracelulares. La mayoría de cepas de *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Beauveria*, tienen la habilidad de crecer en un amplio rango de pH de 2 a 6 con un óptimo de 4; y se ha reportado que la producción óptima de biomasa ocurre en un rango de pH entre 4.6 y 6.8 (Kredics, 2013).

1.3.3.5 Aireación

Dos componentes del aire son esenciales para los hongos: el oxígeno y el dióxido de carbono. Las especies de *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Beauveria*, como anaerobios facultativos, tienen la habilidad para crecer en hábitats como suelos profundos donde el oxígeno es relativamente insuficiente. Sin embargo en los cultivos de estos organismos es necesario tener en cuenta que altas concentraciones de dióxido de carbono resultado de la respiración celular se pueden acumular en ambientes cerrados y de esta forma inhibir el crecimiento de este microorganismo, los hongos usualmente son inhibidos en concentraciones de dióxido de carbono mayores de 10 a 15% (Moore, 2010, p.574).

1.3.4 Utilización de hongos para la elaboración de los biofungicidas

La creciente necesidad de reducir el uso de agroquímicos hace necesario desarrollar tecnologías que permitan de forma fácil, económica y efectiva obtener productos a partir de microorganismos con calidad y en cantidades suficientes para la aplicación masiva en las áreas de cultivo (Sivila; Alvares, 2013).

En toda producción de bioformulados se parte de un aislado con características deseadas como agentes de biocontrol, el cual es conservado previamente, los pre inóculos se desarrollan sobre sustratos sólidos como granos de arroz, trigo, cáscara de trigo y harina de maíz, incluyendo medios agarizados de melaza de caña de azúcar, la relación carbono- nitrógeno es esencial y de esto dependerá la propagación del microorganismo (A.C., *et al.*, 2005).

La producción de microorganismo en formulaciones líquidas, representan una alternativa para cuando la demanda es alta ya que de esta manera se acelera el proceso de producción masiva y se obtiene el producto en un tiempo más corto, con mayor cantidad y variedad de propágulos, lo cual aumenta su eficiencia (DEAQ, 2015).

1.3.5 TRIKOFUN

Información técnica



Figura 1-1 Bioformulado
Líquido Trikofun

Fuente: Lupe Aguirre

1.3.5.1 Antecedentes técnicos

- Nombre común: TRIKOFUN
- Acción fitosanitaria contra Fitopatógenos como: *Pythium*, *Fusarium sp*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Botrytis*, *Phytophthora*, *Mycosphaerella*, *Verticillium*, *Alternaria*, sigatoka en banano.
- Composición básica: *Trichoderma harzianum*
- Composición final: Sustrato líquido con microorganismos en latencia que a más de su acción fungicida recupera el balance del suelo.
- Registro MAG: 020611018 (Pesántez, 2015).

1.3.5.2 Propiedades físicas determinadas

- Líquido de color verde
- Soluble en agua
- Densidad de 1.0081g/ml (Pesántez, 2015).

1.3.5.3 Características de formulación

El uso que se destina es un fungicida inoculante recuperador de la flora microbiana y balanceador del ecosistema del suelo, su dosis de aplicación es de 1 a 1.5 L/ha, presenta una concentración de esporas de 2.5×10^9 UPC/mL de producto se debe conservar el producto en refrigeración a 4 °C.

Recomendable para cultivos de: tomate riñón, tomate de árbol, arveja, papas, col, lechuga, ajo, cebolla, babaco, mora, flores de exportación, palma, maracuyá, melón, naranjilla, sandía, pimiento, banano, café, cacao, caña de azúcar (Pesántez, 2015).

1.3.5.4 Recomendaciones para su uso

La aplicación se puede realizar con los métodos convencionales de aspersión, pudiendo aplicarse al suelo y al follaje utilizando una dosis de 1000 a 1500cc en cualquier etapa del ciclo vegetal. Aplicar en horas de la mañana o por la tarde (Pesántez, 2015).

1.3.5.5 Preparación de la mezcla

Utilice agua y un recipiente limpio, libre de residuos de fungicidas. Luego adicione el producto y agite hasta que se suspenda completamente. Utilice coadyuvantes compatibles en caso de ser necesarios. Vierta en la cantidad total de agua y agite vigorosamente (Pesántez, 2015).

1.3.5.6 Compatibilidad

Es compatible con herbicidas, insecticidas químicos, fertilizantes de reacción ácida e insecticidas biológicos cuya formulación sea a base de hongos, no es compatible con fungicidas, ni con productos desinfectantes del suelo (Pesántez, 2015).

1.3.5.7 Precauciones

Mantenga fuera del alcance de los niños, no fume o consuma alimentos durante el manejo, mezcla o uso de productos. El uso cuidadoso del producto es una buena práctica (Pesántez, 2015).

1.3.5.8 *Trichoderma harzianum*

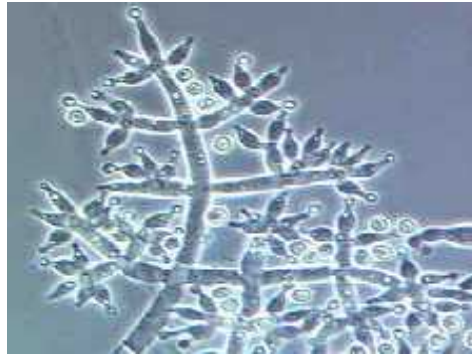


Figura 2-1: Aspecto microscópico de *Trichoderma harzianum*

Fuente: Verónica Tangarife 2011

1.3.5.8.1 Generalidades

Trichoderma harzianum es un tipo de hongo anaerobio facultativo que se encuentra de manera natural en un número importante de suelos agrícolas, se caracterizan por no poseer, o no presentar un estado sexual determinado, la mayoría de colonias en su inicio tienen color blanco, después se

torna a verde oscuro o amarillento, como consecuencia de una densa esporulación. De este microorganismo existen más de 30 especies, todas con efectos benéficos para la agricultura y otras ramas (Agrios, 2005, p. 30). *Trichoderma*, produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y esporas “conidias”. Las esporas son los más viables de los propágulos empleados en programas de biocontrol (Harman, 2011, p. 1991).

Este hongo se encuentra ampliamente distribuido en el mundo, y se presenta en diferentes zonas y hábitats, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, así mismo en residuos de cultivos, especialmente aquellos que son atacados por otros hongos (Agrios, 2005, p.31).

Estas especies son antagonistas de otros microorganismos que causan enfermedades en cultivos de importancia económica. Se emplean principalmente en el control de enfermedades fungosas del suelo. Su aplicación al suelo de forma preventiva en semilleros y diferentes etapas de los cultivos reduce la aparición de enfermedades provocadas por hongos en cultivos (Rakholiya, 2010).

Trichoderma es un hongo con una alta capacidad de tolerar un amplio rango de temperaturas, presentando una amplia distribución ecológica. Los valores óptimos para su crecimiento y esporulación oscilan alrededor de los 25°C. Un factor importante a tener en cuenta durante la multiplicación es la conveniencia de periodos alternados de luz y oscuridad, que favorecen la colonización del hongo sobre diferentes sustratos sólidos. (Sivila; Alvares, 2013)

1.3.5.8.2 Clasificación Taxonómica

Clasificación Taxonómica según Agrios, G. 2005

- Reino: Fungí
- División: Myxomicotina
- Clase: Hyphomicetes
- Orden: Hypocreales
- Familia: Hypocreaceae
- Género: *Trichoderma*
- Especie *harzianum*

1.3.5.8.3 Mecanismo de acción

El uso de *Trichoderma harzianum* como agente de biocontrol es preventivo, porque regula el desarrollo de los hongos fitopatógenos dianas. Entre los mecanismos de control están: el micoparasitismo, competencia por espacio y nutrientes, y la antibiosis, los que tienen una acción directa frente al hongo fitopatógeno (Sivila; Alvares, 2013).

El micoparasitismo se considera como un atributo de todas las especies de *Trichoderma* y el mejor mecanismo de control biológico de distintas enfermedades fúngicas. En el proceso de destrucción de los patógenos por el hongo de *T. harzianum*, intervienen una gran cantidad de enzimas que son capaces de segregar sustancias antibióticas. El mecanismo de competencia que poseen las cepas de *Trichoderma* se considera esencial para la prevención de enfermedades, pues la zona colonizada no podrá ser ocupada por ningún patógeno (Tijerino, 2010).

Estos mecanismos se ven favorecidos por la habilidad de los aislamientos de *Trichoderma* para colonizar la rizósfera de las plantas (Falconi, 2011, p.6). Este hongo hiperparásito actúa por medio de una combinación de competencia por nutrientes, producción de metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas, además produce sustancias promotoras de crecimiento de las plantas. El mismo coloniza las semillas y protege las plántulas en la fase post emergente de patógenos fúngicos, la aplicación directa al suelo ofrece incluso una protección mayor a los cultivos (Infante., et al., 2010).

La antibiosis de *Trichoderma* presenta otros mecanismos, cuya acción biorreguladora es de forma indirecta. Entre estos se pueden mencionar los que inducen mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos como es la activación en la planta de compuestos relacionados con la resistencia, con la detoxificación de toxinas excretadas por patógenos y la desactivación de enzimas de estos durante el proceso de infección; la solubilización de elementos nutritivos, que en su forma original no son accesibles para las plantas. Tienen la capacidad además, de crear un ambiente favorable al desarrollo radical lo que aumenta la tolerancia de la planta al estrés (Infante., et al. 2010).

1.3.6 NEMAKILL

Información técnica



Figura3-1: Bioformulado
Líquidos NemaKill

Fuente: Lupe Aguirre

1.3.6.1 Antecedentes técnicos

- Nombre común: NEMAKILL
- Acción fitosanitaria ejerce una acción nematicida de los géneros: *Radopholus*, *Meloidogyne*, *Pratylenchus*.
- Composición básica de *Paecilomyces lilacinus*
- Composición final sustrato líquido con microorganismos en latencia que a más de su acción nematicida recupera el balance del suelo.
- Registro MAG: 020611019 (Pesántez, 2015).

1.3.6.2 Propiedades físicas determinadas

- Líquido de color rosado
- Soluble en agua
- Densidad 1.033g/mL (Pesántez, 2015).

1.3.6.3 Características de formulación

- Uso que se destina es un nematicida, inoculante recuperador de la flora microbiana y balanceadora del ecosistema del suelo.

- Dosis de 1 a 1.5 L/ha
- Concentración de esporas de 2.5×10^9 UPC/ mL de producto
- Conservación del producto en refrigeración
- Para cultivos de tomate riñón, arveja, papas, col, lechuga, ajo, cebolla, babaco, mora, flores de exportación, palma, maracuyá, melón, sandía, pimiento, banano (Pesántez, 2015).

1.3.6.4 *Recomendaciones para su uso*

La aplicación se puede realizar con los métodos convencionales de aspersión, pudiendo aplicarse al suelo y al follaje, se puede usar en trampas. Su aplicación se la puede realizar en cualquier etapa del ciclo vegetal. Aplicar en horas de la mañana o por la tarde (Pesántez, 2015).

1.3.6.5 *Preparación de la mezcla*

Utilice agua y un recipiente limpio, libre de residuos de fungicidas. Luego adicione el producto y agite hasta que se suspenda completamente. Utilice coadyuvantes compatibles en caso de ser necesarios. Vierta en la cantidad total de agua y agite vigorosamente (Pesántez, 2015).

1.3.6.6 *Compatibilidad*

Es compatible con herbicidas, insecticidas químicos, fertilizantes de reacción acida e insecticidas biológicos cuya formulación sea a base de hongos, no es compatible con fungicidas, ni con productos desinfectantes del suelo (Pesántez, 2015).

1.3.6.7 *Precauciones*

Mantener fuera del alcance de los niños, no fume o consuma alimentos durante el manejo, mezcla o uso de productos (Pesántez, 2015).

1.3.6.8 *Paecilomyces lilacinus*

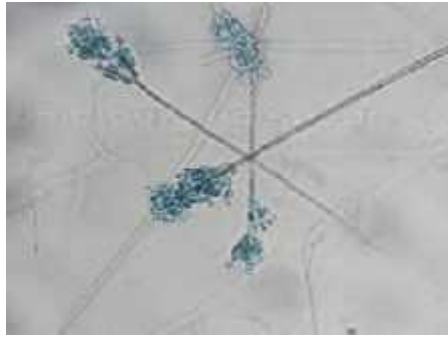


Figura 4-1: Aspecto microscopio de *Paecilomyces lilacinus*

Fuente: Verónica Tangarife 2011

1.3.6.8.1 Generalidades

Es un hongo filamentoso anamórfico, colonias con tonalidad violáceas, al reverso incoloro vináceo, heterótrofo, aerobio, con una pared celular compuesto por quitina, de rápido crecimiento que puede utilizar una gran variedad de sustratos complejos como celulosa, quitina, pectina y almidón como fuente de carbono. Muchas cepas crecen eficientemente en medios sólidos o líquidos y en un amplio rango de temperaturas, además son relativamente tolerantes a humedades bajas y tienden a crecer en suelos ácidos (Thom, 1974)

Es el enemigo natural de muchos géneros de nematodos y algunos insectos como mosca blanca y chinche. Es efectivo para nematodos de los géneros *Meloydoginae*, *Pratelynychus* y *Radopholus*. (Thom, 1974)

1.3.6.8.2 Clasificación Taxonómica

Clasificación Taxonómica según Thom Samson 1974 pertenece a:

- Reino: Fungí
- División: Ascomycota
- Clase: Eurotiomycetes
- Orden: Eruotiales
- Familia: Trichocomaceae
- Género: *Paecilomyces*
- Especie: *lilacinus*

1.3.6.8.3 *Mecanismo de acción*

El hongo parasita los huevos y larvas de nematodos provocando deformaciones, vacuolizaciones y pérdida de movimiento con la participación de enzimas líticas causando deformaciones, destrucción de ovarios y reducción de la eclosión. El hongo es capaz de penetrar el huevo, crecer dentro del mismo y destruir el embrión hasta causarle la muerte (Monzon, 2011). A valores de pH ligeramente ácidos, se producen toxinas que afectan el sistema nervioso de los nematodos (Thom, 1974).

El hongo *P. lilacinus* acciona al parasitar los huevos del nemátodos juveniles y adultos, durante esta etapa inicial no hay producción de toxinas, cuando las esporas del *Paecilomyces lilacinus* entran en contacto con los nemátodos se inicia el proceso de infección porque encuentran las condiciones ideales para iniciar el proceso de germinación, estas esporas producen enzimas que diluyen la cutícula y penetran al interior del nematodo (Avilac; Umaña ,2010)

A nivel de campo, es importante que dichas esporas presenten una alta viabilidad, patogenicidad y virulencia, que garanticen el buen manejo y la regulación de las poblaciones de nematodos gracias a una alta tasa de infección adhesión y posterior liberación de toxinas (Harman, 2011, p. 192). Teniendo en cuenta que el nemátodos es más frágil durante su primer estado, se recomienda hacer aplicaciones de *P. lilacinus* en forma de lavado del suelo al inicio del cultivo, vía fumigación o vía el sistema de irrigación (Thom, 1974).

Después de la aplicación del *P. lilacinus*, las esporas germinan y consumen los nemátodos como fuente de energía o alimento, reduciendo el daño en los cultivos a causa de este microorganismo. La eliminación de estos sucede en un lapso de 3 a 14 días, según las diversas condiciones que se presenten, y pueden preservar su control residual de 80 a 180 días (Thom, 1974). *Paecilomyces lilacinus* produce reducción de las poblaciones de nematodos y reducción de nodulaciones en el sistema radicular. Se presenta raíces nuevas con baja nodulación y bajo porcentaje de áreas necrosadas (Avilac; Umaña ,2010).

1.3.7 **BAUKILL**

Información técnica



Figura 5-1: Bioformulado
Líquido Baukill
Fuente: Lupe Aguirre

1.3.7.1 *Antecedentes técnicos*

- Nombre común BAUKILL
- Acción fitosanitaria ejerce acción insecticida, contra coleópteros como: broca de café, gusano blanco de la papa, picudo negro y rayado en banano
- Composición básica de *Beauveria bassiana*
- Composición final sustrato líquido con microorganismos en latencia que a más de su acción insecticida recupera el balance del suelo.
- Registro MAG 020611020 (Pesántez, 2015).

1.3.7.2 *Propiedades físicas determinadas*

- Líquido de color blanco cremoso
- Soluble en agua
- Densidad 1.020g/mL (Pesántez, 2015).

1.3.7.3 *Características de formulación*

- Uso que se destina Insecticida, inoculante recuperador de la flora microbiana y balanceador del ecosistema del suelo
- Dosis 1 a 1.5 L/ha
- Concentración 2.5×10^9 UPC/ mL de sustrato
- Conservación del producto Refrigeración
- Cultivos Tomate riñón, café, banano, arveja, papas, col, lechuga, ajo, cebolla, babaco, mora, flores de exportación, palma, maracuyá, melón, sandía, pimiento (Pesántez, 2015).

1.3.7.4 *Recomendaciones para su uso*

La aplicación se puede realizar con los métodos convencionales de aspersión, pudiendo aplicarse al suelo y al follaje, se puede usar en trampas. Su aplicación se la puede realizar en cualquier etapa del ciclo vegetal. Aplicar en horas de la mañana o por la tarde (Pesántez, 2015).

1.3.7.5 *Preparación de la mezcla*

Utilice agua y un recipiente limpio, libre de residuos de fungicidas. Luego adicione el producto y agite hasta que se suspenda completamente. Utilice coadyuvantes compatibles en caso de ser necesarios. Vierta en la cantidad total de agua y agite vigorosamente (Pesántez, 2015).

1.3.7.6 *Compatibilidad*

Es compatible con herbicidas, insecticidas químicos, fertilizantes de reacción ácida e insecticidas biológicos cuya formulación sea a base de hongos, no es compatible con fungicidas, ni con productos desinfectantes del suelo (Pesántez, 2015).

1.3.7.7 *Precauciones*

Mantenga fuera del alcance de los niños, no fume o consuma alimentos durante el manejo, mezcla o uso de productos (Pesántez, 2015).

1.3.7.8 *Beauveria bassiana*



Figura 6-1: Aspecto microscopio de *Beauveria bassiana*

Fuente: Dr. David Ellis 2015

1.3.7.8.1 *Generalidades*

Es un hongo deuteromiceto que crece de forma natural en los suelos de todo el mundo. Su poder entomopatógeno le hace capaz de parasitar a insectos de diferentes especies, causando la conocida enfermedad blanca de la muscardina (Agris, 2005). Pertenece a los hongos entomopatógenos y actualmente es utilizado como Insecticida biológico o biopesticida controlando un gran número de parásitos de las plantas como son las orugas, las termitas, las moscas blancas, los áfidos, los escarabajos o los tisanópteros (Thom, 1974).

Se caracteriza por presentar un crecimiento lento, circular, llegando alcanzar 20 mm de diámetro en 10 días. El aspecto de la colonia es lanoso y en forma de polvo debido a los abundantes conidios, es de color blanco en un principio, tornándose amarillenta posteriormente en la parte del centro, de textura blanda y superficie plana (Thom, 1974).

1.3.7.8.2 *Clasificación Taxonómica*

Clasificación Taxonómica según Thom Samson 1974 pertenece a:

- Reino: Fungí
- División: Mycota
- Clase: Deuteromycetes
- Orden: Moniliales
- Familia: Moniliaceae
- Género: *Bauveria Vuillemin*
- Especie: *bassiana*

1.3.7.8.3 *Mecanismo de acción*

Es un hongo facultativo, el cual posee conidias que constituyen la unidad infectiva del hongo. La reproducción de los hongos son mediante esporas o conidias, que usualmente son las que infectan a los insectos. El proceso de infección se puede dividir en tres etapas (Vázquez, 2013).

1. Adhesión de las esporas a la cutícula del insecto y germinación
2. Penetración de la cutícula del insecto y
3. Desarrollo del hongo en el interior del insecto y culmina con la muerte del insecto por micosis.

El insecto muerto queda momificándolo y bajo condiciones de humedad, se cubre posteriormente de una esporulación blanquecina – amarillenta. Su rango de acción es de 750 especies de insectos, así como el alto grado de conocimiento a nivel molecular entre la interacción hospedero- patógeno del desarrollo del sistema de producción de este hongo (Trabanino, 2010).

Además la mayoría de estos hongos producen sustancias líticas y toxinas que ayudan a la penetración y a inhibir los mecanismos de defensa de los insectos entre otras formas de actuar. Aun cuando muchas de estas toxinas se producen sólo en el interior del insecto, se ha demostrado que muchas especies de hongos pueden producir durante su reproducción metabolitos bioactivos con efecto insecticida, lo que potencia su acción, lo cual debe tenerse en cuenta al diseñar un esquema de producción (Thom, 1974)

El hongo *Beauveria bassiana* es usado para el control de un gran número de insectos plagas es de las especies más utilizadas en el mundo, las formulaciones consisten en una combinación de ingredientes, de tal forma que las esporas del hongo se mantienen estables, efectivas y fáciles de aplicar (Trabanino, 2010).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Metodología

2.1.1 Tipo y diseño de la investigación

Por el tipo de investigación: Aplicada, porque se persiguió un fin directo e inmediato. Se propuso determinar el porcentaje de esporas viables y el tiempo de vida útil de tres bioformulados, con el objeto de determinar el tiempo óptimo en que estas formulaciones pueden ser utilizadas por los agricultores, asegurando su eficacia.

Por la temporalidad: Longitudinal, ya que se recolectó datos a través del tiempo en periodos definidos para realizar el conteo y la determinación de esporas de los tres bioformulados.

Por el tipo de enfoque: Cuantitativo porque se recolectó datos físicos, químicos, microbiológicos, para probar una hipótesis con base a una relación numérica y el análisis estadístico.

Por el diseño de investigación: Experimental. Debido a que se manipulo variables como número de conidios germinados, número de conidios no germinados y el total de conidios. Para la Determinación del porcentaje de viabilidad y tiempo de vida útil de los tres bioformulados.

2.1.2 Lugar de la investigación

La investigación se ejecutó en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, se utilizó cepas nativas de *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces lilacinus*, *Beauveria bassiana*, procedentes de la unidad de Producción de Microorganismos Antagonistas y Entomopatógenos (MIKROBEN).

2.1.3 Diseño experimental

Se emplearon 9 tratamientos y 3 repeticiones para la determinación de las variables del porcentaje de esporas viables y tiempo de vida útil de los tres bioformulados (Trikofun, Nemarkill y Baukill), como se describe en la Tabla 1- 2.

Tabla 1-2 Número de tratamientos para la determinación del porcentaje de esporas viables y tiempo de vida útil

| Nº Tratamientos | Códigos | Descripción del tratamiento |
|-----------------|-------------------------------|--|
| 1 | P ₁ T ₁ | TRIKOFUN, <i>Trichoderma harzianum</i> , almacenado a 4 ⁰ C |
| 2 | P ₁ T ₂ | TRIKOFUN, <i>Trichoderma harzianum</i> , almacenado a 18 ⁰ C |
| 3 | P ₁ T ₃ | TRIKOFUN, <i>Trichoderma harzianum</i> , almacenado a 22 ⁰ C |
| 4 | P ₂ T ₁ | NEMAKILL, <i>Paecilomyces lilacinus</i> , almacenado a 4 ⁰ C |
| 5 | P ₂ T ₂ | NEMAKILL, <i>Paecilomyces lilacinus</i> , almacenado a 18 ⁰ C |
| 6 | P ₂ T ₃ | NEMAKILL, <i>Paecilomyces lilacinus</i> , almacenado a 22 ⁰ C |
| 7 | P ₃ T ₁ | BAUKILL, <i>Beauveria bassiana</i> , almacenado a 4 ⁰ C |
| 8 | P ₃ T ₂ | BAUKILL, <i>Beauveria bassiana</i> , almacenado a 18 ⁰ C |
| 9 | P ₃ T ₃ | BAUKILL, <i>Beauveria bassiana</i> , almacenado a 22 ⁰ C |

Fuente: Realizado por Lupe Aguirre

2.1.4 Unidad de análisis

- Bioformulado Trikofun, cepa de *Trichoderma harzianum*
- Bioformulado Nemarkill, cepa de *Paecilomyces lilacinus*
- Bioformulado Baukill, cepa de *Beauveria bassiana*

Fueron proporcionadas por MIKROBEN del Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Sanidad Vegetal de la Facultad de Recursos Naturales de la ESPOCH.

2.1.5 Población de estudio

Los tres Bioformulados: Trikofun, NemaKill y BauKill almacenados a las tres temperaturas 4 °C, 18°C y 22°C hasta los 96 días.

2.1.6 Tamaño de la muestra

Para el porcentaje de viabilidad se realizaron ensayos cada 3 días hasta los 30 días y posteriormente a los 45, 60 y 96 días. Con 9 tratamientos y 3 repeticiones para el porcentaje de esporas viables de tres bioplaguicidas (Trikofun, NemaKill y BauKill). El tiempo de vida útil son las lecturas diarias hasta los 30 días luego a los 45 y 60 días respectivamente.

2.1.7 Selección de la muestra

De las unidades almacenadas a las tres temperaturas 4 °C, 18°C y 22°C, diariamente se tomó una muestra para el conteo de esporas hasta los 30 días posteriormente a los 45, 60 y 96 días. Para el porcentaje de viabilidad se tomó una muestra cada tres días hasta los 30 días luego a los 45 y 60 días.

2.1.7.1 Material biológico

Las cepas de *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces lilacinus*, *Beauveria bassiana*, fueron proporcionadas por el banco de cepas del laboratorio de Fitopatología de Sanidad Vegetal de la Facultad de Recursos Naturales de la ESPOCH.

2.2 Técnica de recolección de datos

2.2.1 Fase de laboratorio

- Reactivación y purificación de las cepas de *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces lilacinus*, *Beauveria bassiana*.
- Preparación de los bioformulados líquidos TRIKOFUN; NEMAKILL y BAUKILL.
- Cuantificación de esporas mediante la cámara de Neubauer de los tres bioformulados.
- Determinación de la viabilidad de las esporas y tiempo de vida de los tres bioformulados líquidos mediante el micro cultivo.

2.2.2 Tratamiento estadístico de datos

- Curvas de crecimiento para la determinación del porcentaje de viabilidad de los tres formulados líquidos almacenados a 4°C, 18°C y 22 °C.
- Análisis de regresión lineal para la determinación del tiempo máximo de consumo de los tres bioformulados líquidos almacenados a 4°C, 18°C y 22 °C.

2.3 Mecanismos

2.3.1 Reactivación y purificación de cepas

Se emplearon cepas de *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces lilacinus*, *Beauveria bassiana*, provenientes del Banco de cepas del Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Sanidad Vegetal FRN ESPOCH.

Se reactivaron las cepas de *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces lilacinus*, *Beauveria bassiana*, en cajas Petri, que contenían 15 mL de PDA, *Beauveria bassiana*, fue reactivada en cajas Petri, que contenía 10 mL de medio Sabouraud a 27±1 °C.



Figura 1-2: Cajas de cultivo puro *Trichoderma harzianum*
Fuente: Lupe Aguirre



Figura 2-2: Cajas de cultivo puro *Paecilomyces lilacinus*
Fuente: Lupe Aguirre



Figura 3-2: Cultivo puro de *Beauveria bassiana*
Fuente: Lupe Aguirre

2.3.2 Preparación de los bioformulados

Se realizó la preparación del sustrato necesario para el crecimiento de cada uno de los microorganismos. Para lo cual se empleó arrozillo y cascarilla de arrozillo para *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces lilacinus*, y solo arrozillo para *Beauveria bassiana*. Posteriormente se inoculó cada uno de los microorganismos partiendo de cepas puras. Se colocaron los frascos en estufas de crecimiento durante 8 días a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Una vez que cada microorganismo creció en el sustrato se procedió a la preparación de los formulados líquidos.



Figura 4-2: Cascarilla en remojo
Fuente: Lupe Aguirre



Figura 5-2. Empacado del sustrato.
Fuente: Lupe Aguirre



Figura 6-2. Sustrato empacado y sellado
Fuente: Lupe Aguirre



Figura 7-2. Esterilización del sustrato
Fuente: Lupe Aguirre



Figura 8-2. Cámaras de crecimiento
Fuente: Lupe Aguirre



Figura 9-2. Crecimiento de masa conidial
Fuente: Lupe Aguirre

Para la obtención del bioformulado líquido de *Trichoderma harzianum* *Paecilomyces lilacinus* y *Beauveria bassiana*, preparamos una suspensión de elementos nutritivos a base de Carbono, Nitrógeno, Fósforo, Potasio, Azufre, Cobre, Magnesio, Manganeso, Hierro, Oligosacáridos y Fitohormonas. Para la multiplicación y sobrevivencia del antagonista los cuales ayudan a una rápida esporulación. Seguidamente se procede a partir del producto crecido en cascarilla de arroz + arrocillo a inocular el microorganismo en el caldo nutritivo. El producto así formulado es empacado en botellas plásticas de 1 litro.



Figura 10-2. Caldo nutritivo
Fuente: Lupe Aguirre



Figura 11-2. Extracción de esporas
Fuente: Lupe Aguirre



Figura 12-2. Mezclado del caldo nutritivo con las esporas
Fuente: Lupe Aguirre



Figura 13-2. Empacado del producto.
Fuente: Lupe Aguirre



Figura 14-2. Bioformulado líquidos
Fuente: Lupe Aguirre

2.3.3 Cuantificación de esporas de los formulados líquidos mediante la cámara de Neubauer

Para la determinación del número de esporas por mL de producto se tomó los formulados líquidos de Trikofun, NemaKill y BauKill, estas formulaciones fueron conservadas a tres temperaturas; 4°C, 18°C y 22 °C. Se preparó diluciones en serie (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) con el fin de facilitar el conteo de esporas en la cámara de Neubauer. La primera dilución (10^{-1}) se obtuvo transfiriendo con una pipeta estéril 1mL del formulado a un tubo de ensayo con 9 mL de agua estéril, se agitó fuertemente durante 1 min obteniendo la primera dilución.

Cada 24 horas se realizó el conteo de las esporas de los formulados manteniendo a las 3 temperaturas, hasta los 30 días. Luego se realizó el conteo a los 45 y 60 días. La concentración de esporas por mL de producto se calculó multiplicando la suma del número de esporas contadas en los

5 cuadrados secundarios, por el inverso de la dilución empleada y por el factor de la cámara. Según Castro (2015) para el cálculo del número de esporas por mililitro se emplea la siguiente formula:

$$\text{Número de esporas /mL} = \text{Suma de 5C.S} * \text{factor de dilución} * 50.000$$

Para el recuento de esporas se utilizó la cámara de Neubauer. Se tomó el tubo de las diluciones 10^{-3} de la muestra se agitó enérgicamente durante 30 segundos e inmediatamente se tomó la muestra de 10 μL (0.01 mL) con una pipeta automática para ser depositado en la cámara. Se dejó reposar medio minuto antes de proceder al conteo. Luego se llevó la cámara al microscopio y se procedió al conteo con el objetivo de 40X.



Figura 15-2. Conteo de esporas en la cámara de Neubauer
Fuente: Lupe Aguirre

2.3.4 Determinación del porcentaje de viabilidad del microorganismo en los bioformulados

Para conocer la viabilidad del hongo se preparó medio de cultivo Agar-Agua al 3 %. Este se esterilizó y posteriormente con una pipeta se depositó una alícuota del medio de cultivo en un porta objeto. Posteriormente con otra pipeta, se depositaron sobre las alícuotas del medio, alícuota de la suspensión del hongo. Finalmente este montaje es colocado en una cámara húmeda, la cual consiste en un plato Petri con papel filtro humedecido y se mantiene en un cuarto de crecimiento.

Todos los materiales utilizados en este procedimiento fueron esterilizados en autoclave a 1 atm de presión y 121 °C.

Las mediciones se realizaron entre las 24 y 72 horas después de realizado el montaje. Las observaciones se realizaron al microscopio, utilizando el objetivo de 40X.



Figura 16-2. Método de micro cultivo para la determinación de la viabilidad de los tres bioformulados

Fuente: Lupe Aguirre

2.3.4.1 Cálculo de viabilidad

Para realizar la cuantificación de la concentración de espora del microorganismo obtenido se realizó por conteo directo en la placa visto al microscopio a las 24 horas de incubación.

Según Castro (2015) para el porcentaje de viabilidad se calculó de la siguiente manera

$$\text{Viabilidad (\%)} = \frac{\text{Número de esporas germinadas} - \text{número de esporas no germinadas}}{\text{Número de esporas germinadas}} * 100$$

CAPÍTULO III

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis e interpretación y discusión de resultados

3.1.1 Determinación de las curvas de crecimiento del bioformulado Trikofun almacenado a tres temperaturas 4°C 18°C y 22°C

3.1.2 Determinación de las curvas de crecimiento del bioformulado Trikofun 4°C

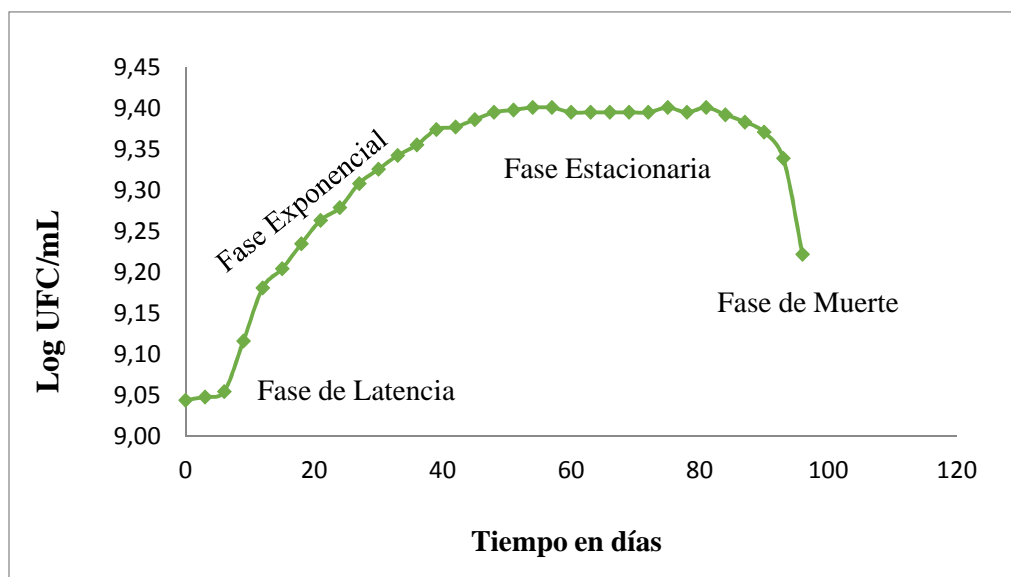


Figura 1-3. Curva de crecimiento del bioformulado Trikofun a 4°C
Fuente: Lupe Aguirre

En la figura 1-3 tenemos la curva de crecimiento del formulado líquido de Trikofun almacenado a de 4°C, presenta una fase de crecimiento hasta los 45 días con una población de 2.4×10^9 UFC / mL de formulado, seguida de una fase estacionaria que se extiende hasta los 81 días, con una concentración de 2.5×10^9 UFC / mL que permanece constante,

finalmente se presenta la fase de muerte, obteniéndose una población de 1.7×10^9 UFC/mL de formulado transcurridos los 96 días de almacenado el producto.

El incremento de las poblaciones es de 1.1×10^8 UFC/mL de formulado, mientras que el decremento es de 2.1×10^8 UFC/mL de formulado cada 3 días.

Los resultados obtenidos son superiores a los obtenidos por Fernández (2006), pues sus promedios a los 60 días fue de 7.13×10^8 UFC/mL con un incremento de las poblaciones de 4.95×10^8 UFC/mL de formulado, mientras que el decremento es de 7.63×10^8 UFC/mL de formulado cada 3 días, lo cual se puede deber a que la actual formulación en lo referente al caldo nutritivo empleado para el crecimiento del MO *Trichoderma harzianum* estimula la propagación y sobrevivencia del hongo en el bioformulado debido a que contiene un soporte o vehículo que puede ser sólida o líquida, coadyuvantes que tiene como función de ser protectora, dispersante y adherente y los macro y micro nutrientes como, Carbono, Fosforo, Potasio, Magnesio, Calcio y Manganeso. De acuerdo con Andrés France (2010) y Monzón (2014) la formulación del hongo es el proceso mediante el cual el ingrediente activo, es decir las conidias del hongo, se mezclan con materiales inertes, tales como vehículos, solventes, emulsificante y otros nutrientes que favorecen la longevidad del hongo ya sea protegiéndolo del medio ambiente y aumentando su vida útil o mejorando su viabilidad.

3.1.3 Determinación de las curvas de crecimiento del bioformulado Trikofun a 18°C

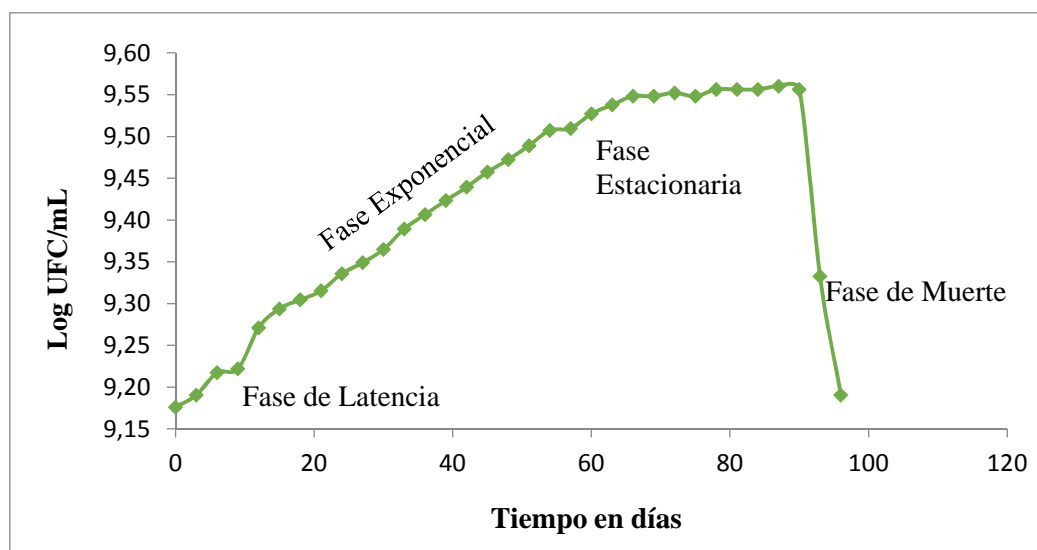


Figura 2-3. Curva de crecimiento del bioformulado Trikofun a 18 °C.
Fuente: Lupe Aguirre

La curva de crecimiento de Trikofun almacenado a 18°C, presenta la fase de crecimiento hasta los 60 días con una población de 3.4×10^9 UFC/mL de formulado, seguida de la fase estacionaria de que se extiende hasta los 90 días, en la cual la concentración permanece constante de 3.5×10^9 UFC/mL, finalmente se presenta la fase de muerte, obteniéndose una población de 1.6×10^9 UFC/mL de formulado transcurridos los 96 días de almacenamiento del producto. Como se evidencia en la figura 2-3

El incremento de las poblaciones es a razón de 9.2×10^7 UFC/mL de formulado, mientras que el decremento es de 1.0×10^9 UFC/mL de formulado cada 3 días.

Los resultados obtenidos son superiores a los obtenidos por Fernández (2006), pues sus promedios a los 60 días fue de 5.36×10^8 UFC/mL con un incremento de las poblaciones de 6.60×10^8 UFC/mL de formulado, mientras que el decremento es de 5.71×10^8 UFC/mL de formulado cada 3 días, lo cual se puede deber a que la actual formulación en lo referente al caldo nutritivo empleado para el crecimiento del microorganismo *Trichoderma harzianum* estimula la propagación y sobrevivencia del hongo en el bioformulado debido a que contiene un soporte o vehículo que puede ser sólida o líquida, coadyuvantes que tiene como función de ser protectora, dispersante y adherente y los macro y micro nutrientes como, Carbono, Fosforo, Potasio, Magnesio, Calcio y Manganeso. De acuerdo con Andrés France (2010) y Monzón (2014), la formulación del hongo es el proceso mediante el cual el ingrediente activo, es decir las conidias del hongo, se mezclan con materiales inertes, tales como vehículos, solventes, emulsificante y otros nutrientes que favorecen la longevidad del hongo ya sea protegiéndolo del medio ambiente y aumentando su vida útil o mejorando su viabilidad.

3.1.4 Determinación de las curvas de crecimiento del bioformulado *Trikofun* a 22°C

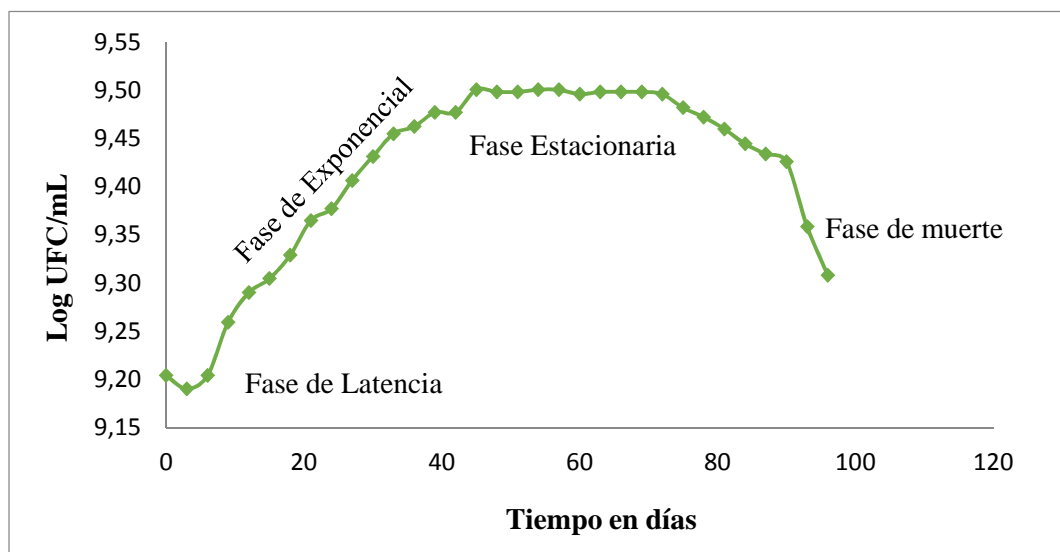


Figura 3-3. Curva de crecimiento del bioformulado *Trikofun* a 22 °C
Fuente: Lupe Aguirre

La curva de crecimiento del formulado líquido *Trikofun* almacenado a 22°C Figura 3-3, presenta la fase de crecimiento hasta los 48 días con una población de 3.1×10^9 UFC/mL de formulado, seguida de la fase estacionaria que se extiende hasta los 72 días, con una concentración de 3.15×10^9 UFC/mL que permanece constante, finalmente se presenta la fase de muerte, obteniéndose una población de 2.03×10^9 UFC/mL de formulado transcurridos los 96 días de almacenamiento del producto.

El incremento de las poblaciones es a razón de 1.06×10^8 UFC/mL de formulado, mientras que el decremento es de 1.13×10^8 UFC/mL de formulado cada 3 días.

Los resultados demuestran que la actual formulación en lo referente al caldo nutritivo empleado para el crecimiento del microorganismo *Trichoderma harzianum* estimula la propagación y sobrevivencia del hongo en el bioformulado ya que los resultados obtenidos son superiores a los obtenidos por Fernández (2006), pues sus promedios a los 60 días fue de 3.80×10^8 UFC/mL con un incremento de las poblaciones de 6.60×10^8 UFC/mL de formulado, mientras que el decremento es de 5.93×10^8 UFC/mL de formulado cada 3 días, lo cual se puede deber a que la actual formulación en lo referente al caldo nutritivo empleado para el crecimiento del MO *Trichoderma harzianum* estimula la propagación y sobrevivencia del hongo en el bioformulado debido a que contiene un

sopORTE o vehÍCulo que puede ser sÓlida o lÍquida, coadyuvantes que tiene como funciÓn de ser protectora, dispersante y adherente y los macro y micro nutrientes como, Carbono, Fosforo, Potasio, Magnesio, Calcio y Manganeso. De acuerdo con AndrĆs France (2010) y MonzÓn (2014) la formulaciÓn del hongo es el proceso mediante el cual el ingrediente activo, es decir las conidias del hongo, se mezclan con materiales inertes, tales como vehÍCulos, solventes, emulsificante y otros nutrientes que favorecen la longevidad del hongo ya sea protegiéndolo del medio ambiente y aumentando su vida Útil o mejorando su viabilidad.

3.1.5 DeterminaciÓn de las curvas de crecimiento del bioformulado Trikofun almacenado a tres temperaturas 4°C 18°C y 22°C

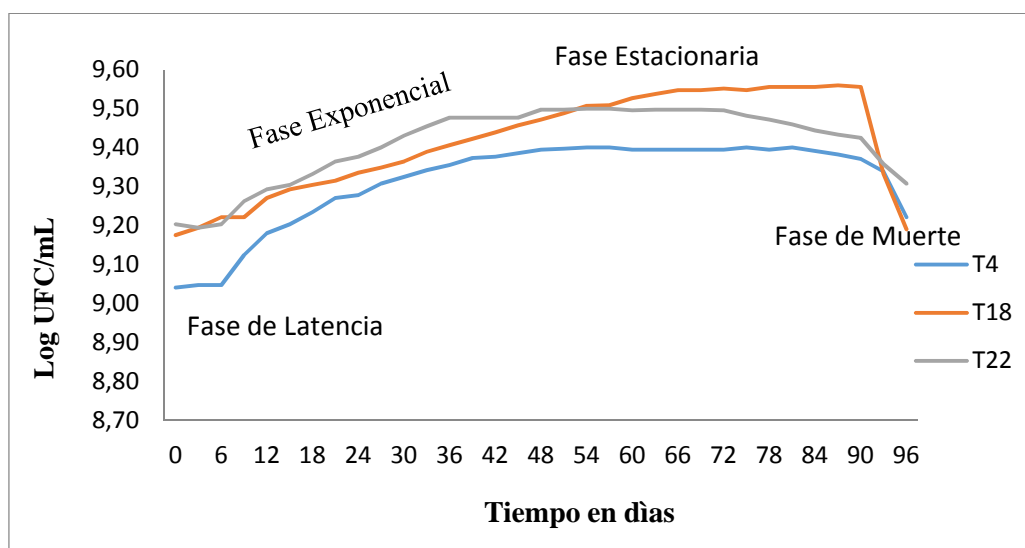


Figura 4-3. Curva de crecimiento del bioformulado Trikofun a 4°C 18°C y 22°C
Fuente: Realizado por Lupe Aguirre

Los grÁficos del bioformulado Trikofun Figura 4-3 a diferentes temperaturas 4°C, 18°C y 22°C, describen una tÍpica curva de crecimiento, en la que se distingue cuatro fases: fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte.

Las esporas del bioformulado Trikofun almacenado a 4°C, 18°C y 22°C, presenta una adaptaciÓn de 6, 9 y 6 dÍas respectivamente en la cual se debe a la fase de latencia que segÚn Bikandi (2014), es el perÍodo de adaptaciÓn de un MO a un nuevo medio de cultivo el crecimiento no suele comenzar de inmediato, representa un periodo de transiciÓn para los MO cuando son transferidos a una nueva condiciÓn. En esta fase se producen las enzimas necesarias para que ellos puedan crecer en un nuevo medio ambiente, no hay incremento de cĆlulas pero hay gran actividad metabÓlica.

Las curvas de crecimiento del bioformulado Trikofun almacenado a 4°C, 18°C y 22°C, presenta una concentración de esporas de 2.4×10^9 UFC/mL, 3.4×10^9 UFC/mL y 3.1×10^9 UFC/mL respectivamente, Bikandi (2014), observa un aumento progresivo del número de esporas como consecuencia de la división celular, mediante el cual el MO utiliza los nutrientes que se encuentran en el medio, la máxima concentración de esporas es de 2.5×10^9 UFC/mL T(4°C), 3.5×10^9 UFC/mL T(18°C), y 3.15×10^9 UFC/mL T(22°C), que se presenta de los 45 a 81 días a T(4°C), de 60 a 90 días T(18°C), de 48 a 72 días T(22°C), este periodo corresponde a la fase estacionaria, Bikandi (2014), menciona que hay limitación de nutrientes, la población permanece constante, ya que las células siguen en división celular, pero la aparición de nuevos individuos se compensa por la muerte de otros MO, que presento una duración de 36, 30 y 24 días T(4, 18 y 22°C), como se evidencia en la figura 4-3, la fase de muerte se presenta a menor velocidad, como consecuencia el bioformulado mantiene poblaciones activas de 1.7×10^9 UFC/mL T(4°C), 1.6×10^9 UFC/mL T(18°C), y 2.03×10^9 UFC/mL T(22°C), durante mayor tiempo, Bikandi (2014), en la fase de muerte los nutrientes indispensables se agotan, el oxígeno se reduce y los productos metabólicos se acumulan hasta alcanzar niveles tóxicos, lo que provoca la muerte celular. La velocidad de muerte celular es mayor que la velocidad de división celular como se evidencia en la figura 4-3.

Los resultados obtenidos por Fernández (2006), mantiene una mayor concentración de esporas de 4.53×10^9 UFC/mL hasta los 12 días de crecimiento durante el almacenamiento, con respecto a los formulados conservados a 18°C y 22°C con poblaciones de 4.41×10^9 UFC/mL y 4.60×10^9 UFC/mL respectivamente hasta los 9 días de crecimiento. Valores que resultan inferiores respecto al tiempo de crecimiento, debido a que el caldo nutritivo de la formulación de Trikofun es rico en nutrientes y coadyuvantes que ayuda al microorganismo mantenerse por tiempos más prolongados.

En el estudio realizado el bioformulado TRIKOFUN fue almacenado en un periodo de 96 días a una temperatura de 18°C presenta una fase de crecimiento de 60 días con una concentración mayor de esporas de 3.4×10^9 UFC/mL durante el almacenamiento, con respecto a los bioformulados almacenados a 22°C con poblaciones de 3.1×10^9 UFC/mL con una fase de crecimiento de 48 días y 4°C con una fase de crecimiento de 45 días con una concentración de 2.4×10^9 UFC/mL, demostrando así que la nueva formulación estimula la propagación, estabilidad y sobrevivencia del microorganismo *Trichoderma harzianum* para tiempos de almacenamiento más extensos. Como se evidencia en el Anexo A.

3.1.6 Concentración de esporas del bioformulado Trikofun almacenado a tres temperaturas 4°C 18°C y 22°C mediante la cámara de Neubauer

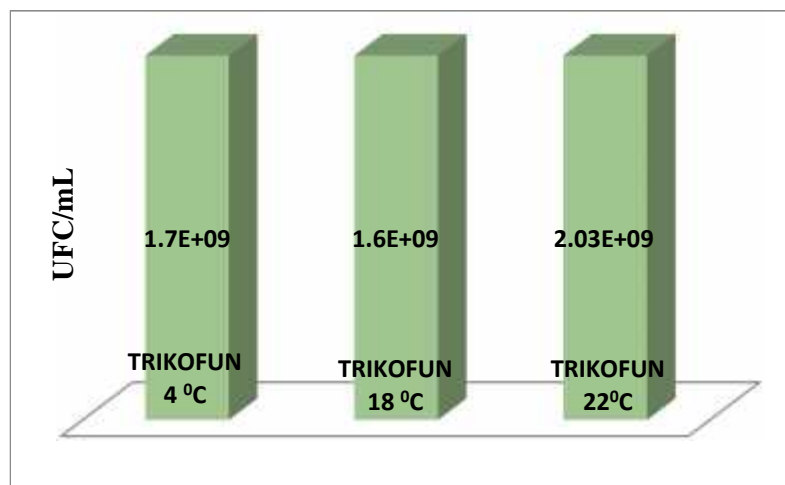


Figura 5-3. Concentración de esporas de Trikofun a 96 días de almacenamiento.

Fuente: Realizado por Lupe Aguirre

Se obtiene la mayor concentración de esporas del bioformulado líquido Trikofun a 22°C en un periodo de almacenamiento de 96 días con una población final de 2.03×10^9 UFC/mL con respecto a los formulados conservados a 18°C y 4°C con poblaciones de 1.6×10^9 UFC/mL y 1.7×10^9 UFC/mL respectivamente. Como se evidencia en la Figura 5-3

El bioformulado TRIKOFUN a base de *Trichoderma harzianum* producidas por MIKROBEN resulta competitivo, recomendable ya que puede ser almacenado a una temperatura promedio de 18 ± 2 °C presentando un tiempo de vida útil superior a los tres meses en las tres temperaturas ensayadas 4°C, 18°C y 22 °C, datos que son corroborados por Monte Vázquez (2013), menciona que una formulación líquida puede mantenerse concentrada diez veces, en condiciones de refrigeración a 4°C durante 1 año, a esta concentración se puede almacenar y transportar hasta su uso, (Santos., *et al.*, 2000; Fernández-Larrea, 2010), menciona que un pesticida microbiológico debe resultar estable al menos de 6 a 18 meses bajo condiciones normales de almacenamiento para que resulte posible la comercialización si se va a producir por demanda a un tiempo de 3 a 6 meses, puede ser aceptable.

En el mercado mundial existen diferentes productos a base de *Trichoderma harzianum* como DEAQ (2016), los fabricantes estimaron una vida útil de 6 meses a temperaturas entre 10 y 25 °C y de 9 meses si el almacenamiento se realiza entre 0 y 10 °C. Teniendo en cuenta lo anterior, los

bioformulados evaluados en el presente estudio son competitivos con respecto a los disponibles comercialmente, ya que se puede recomendar el almacenamiento de los productos a una temperatura promedio de $18 \pm 2^{\circ}\text{C}$ con vidas útiles superiores a 7 meses, valores similares a los presentados por los productos que se encuentran disponibles en el mercado internacional.

3.2 Determinación del porcentaje de viabilidad del bioformulado Trikofun almacenado a tres temperaturas 4°C , 18°C y 22°C

3.2.1 Determinación del porcentaje de viabilidad del bioformulado Trikofun a 4°C

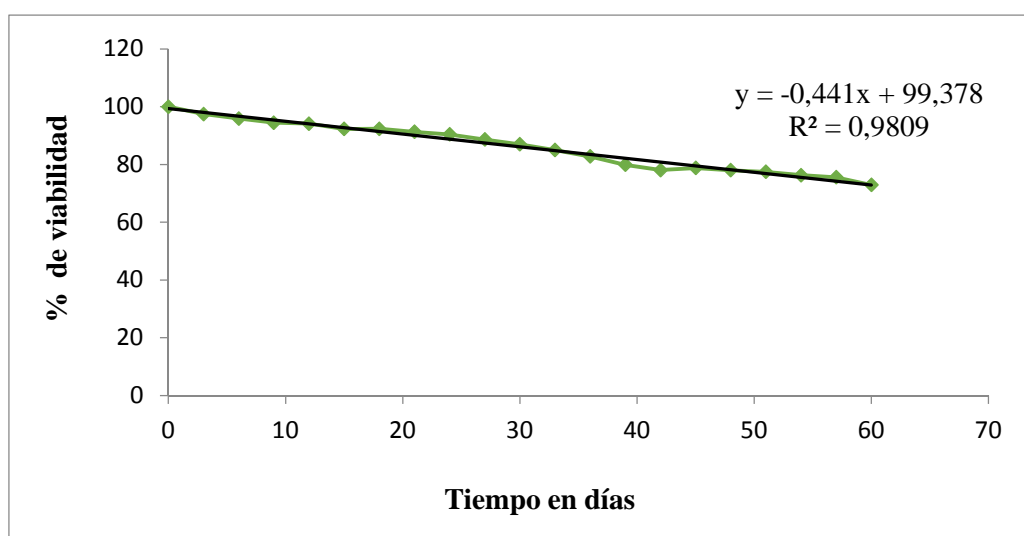


Figura 6-3. Curva de regresión lineal para el porcentaje de viabilidad de Trikofun en función del tiempo mediante el micro cultivo conservada a 4°C .

Fuente: Realizado por Lupe Aguirre

En la figura 6-3 en el análisis de regresión lineal se obtuvo el tiempo máximo de consumo del bioformulado TRIKOFUN almacenado en un periodo de tiempo de 60 días y conservado a 4°C que es de 89 días después de la fecha de elaboración del producto, es decir, el bioformulado es activo durante este período de tiempo. Transcurridos los 89 días de vida útil la población es de 60.13% responde a la ecuación de la curva de regresión ajustada en función del tiempo $y = -0,441x + 99,378$, por otro lado Fernández (2006), el tiempo máximo de consumo del bioformulado Trikofun almacenado en un tiempo de 60 días a 4°C es de 45 días, de acuerdo a la ecuación de la curva $y = -0,0694x + 9,128$, concluyendo así que el bioformulado contiene mayor cantidad de nutrientes y otros aditivos para que el microorganismo pueda desarrollarse y sobrevivir en tiempos más prolongados. El producto presenta un porcentaje de viabilidad de 60.13% en un

lapso de tiempo de 3 meses, siendo así que el bioformulado se encuentra en condiciones favorables para su almacenamiento y posterior distribución. Datos que son corroborados por Fernández C (2011), el mejoramiento del mezclado del caldo de fermentación y la adición de glucosa y amonio al medio de cultivo, logró mantener una viabilidad del 70% durante la fase exponencial de crecimiento del hongo.

3.2.2 Determinación del porcentaje de viabilidad del bioformulado Trikofun a 18°C

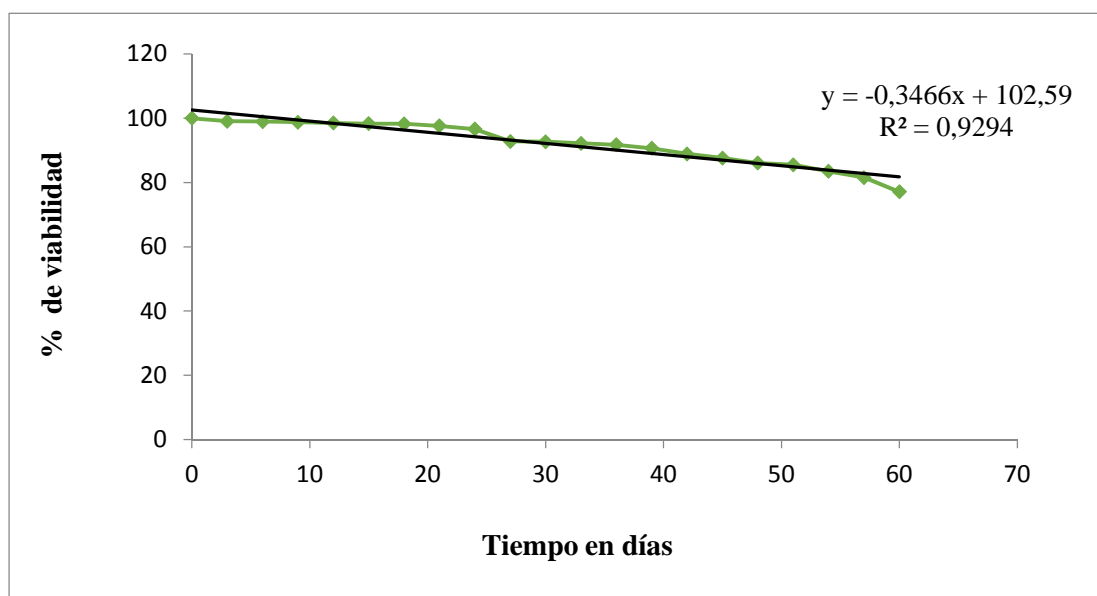


Figura 7-3. Curva de regresión para el porcentaje de viabilidad de Trikofun en función del tiempo mediante el micro cultivo conservada a 18°C
Fuente: Realizado por Lupe Aguirre

Para el bioformulado TRIKOFUN almacenado en un periodo de tiempo de 60 días y conservado a 18°C es de 122 días con dependencia a la ecuación de la curva de regresión que es $y = -0,3466x + 102,59$. Como se evidencia en la figura 7-4, transcurridos los 122 días de tiempo de vida útil el bioformulado presenta un porcentaje de viabilidad de 60.30%.

Los resultados obtenidos por Fernández R (2006), el tiempo máximo de consumo del bioformulado Trikofun almacenado a 60 días a una temperatura de 18°C es de 37 días, de acuerdo a la ecuación de la curva $y = -0,0835x + 9,1542$, demostrando así que el bioformulado contiene mayor cantidad de nutrientes y otros aditivos para que el microorganismo pueda desarrollarse y sobrevivir en tiempos más prolongados. Datos que son corroborados por Fernández C (2011), el mejoramiento del

mezclado del caldo de fermentación y la adición de glucosa y amonio al medio de cultivo, logró mantener la viabilidad del 70% durante la fase exponencial de crecimiento del hongo, el producto presenta una viabilidad de 60.30% en un lapso de tiempo de 4 meses, siendo así que el bioformulado se encuentra en condiciones favorables para su almacenamiento y posterior distribución.

3.2.3 Determinación del porcentaje de viabilidad del bioformulado Trikofun a 22°C

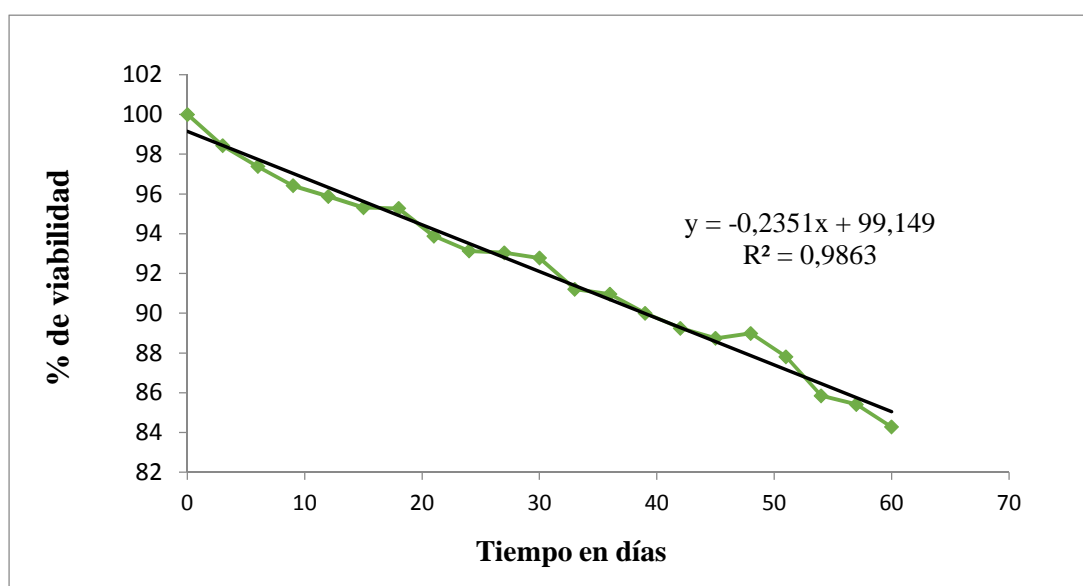


Figura 8-3. Curva de regresión para el porcentaje de viabilidad de Trikofun en función del tiempo mediante el micro cultivo conservada a 22°C

Fuente: Realizado por Lupe Aguirre

Mientras que para el bioformulado almacenado en un periodo de tiempo de 60 días y conservado a temperatura de 22°C es de 166 días con relación a la ecuación de la curva de regresión que es $y = -0,2351x + 99,149$. Transcurridos los 166 días de tiempo de vida útil el porcentaje de viabilidad es 60.12%. Como se evidencia en la figura 8-3.

Los resultados obtenidos por Fernández (2006), el tiempo máximo de consumo del bioformulado Trikofun almacenado en un lapso de tiempo de 60 días a 22°C es de 35 días, de acuerdo a la ecuación de la curva $y = -0,0888x + 9,1834$, demostrando así que el bioformulado contiene mayor

cantidad de nutrientes y otros aditivos para que el microorganismo pueda desarrollarse y sobrevivir en tiempos más prolongados. El producto presenta un porcentaje de viabilidad de 60.12 % en un lapso de tiempo de 6 meses, siendo así que el bioformulado se encuentra en condiciones favorables para su almacenamiento y posterior distribución. Datos que son corroborados por Gato (2010), la conservación de esporas a 22°C de *T. harzianum*, mantuvo una viabilidad entre el 50-75 % de las esporas hasta por dos meses.

3.3 Determinación de las curvas de crecimiento del bioformulado Nemakill almacenado a tres temperaturas 4°C 18°C y 22°C

3.3.1 Determinación de las curvas de crecimiento del bioformulado Nemakill a 4°C

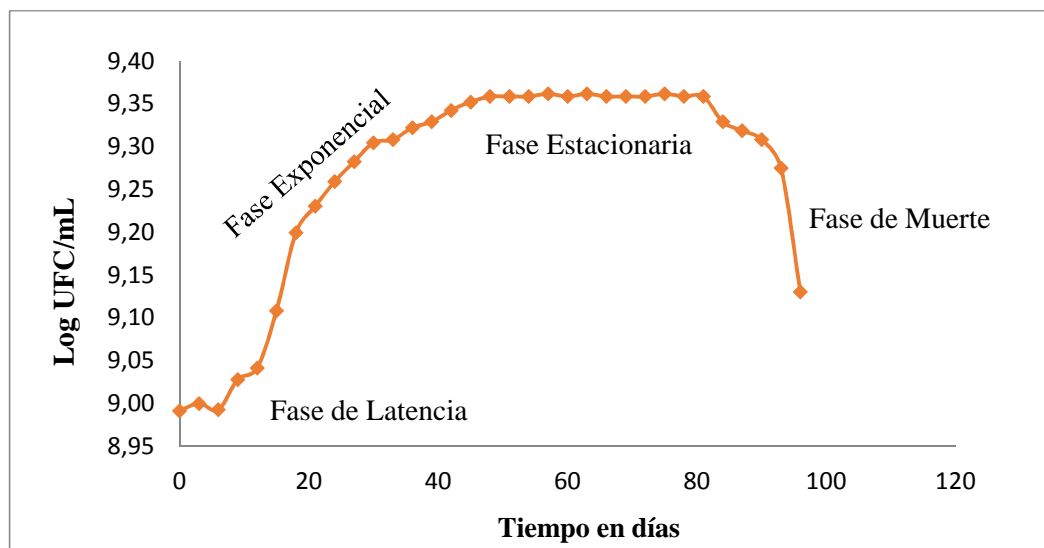


Figura 9-3. Curva de crecimiento del bioformulado Nemakill a 4 °C

Fuente: Realizado por Lupe Aguirre

La curva de crecimiento del bioformulado líquido Nemakill almacenado a 4°C, presenta la fase de crecimiento hasta los 45 días con una población de $2,25 \times 10^9$ UFC / mL de formulado, seguida de la fase estacionaria que se extiende hasta los 81 días, con una concentración de $2,28 \times 10^9$ UFC / mL que permanece constante, finalmente se presenta la fase de muerte, obteniéndose una población de $1,35 \times 10^8$ UFC/mL de formulado transcurridos los 96 días de almacenado el producto. Como se puede observar en la figura 9-3.

El incremento de las poblaciones es de 7.29×10^7 UFC/mL de formulado, mientras que el decremento es de 2.44×10^8 UFC/mL de formulado cada 3 días.

Los resultados obtenidos son superiores a los obtenidos por Fernández (2006), pues sus promedios a los 60 días fue de 6.44×10^8 UFC/mL con un incremento de las poblaciones es de 5.88×10^8 UFC/mL de formulado, mientras que el decremento es de 8.81×10^8 UFC/mL de formulado cada 3 días, lo cual se puede deber a que la actual formulación en lo referente al caldo nutritivo empleado para el crecimiento del MO *Paecilomyces lilacinus* estimula la propagación y sobrevivencia del hongo en el bioformulado debido a que contiene un soporte o vehículo que puede ser sólida o líquida, coadyuvantes que tiene como función de ser protectora, dispersante y adherente y los macro y micro nutrientes como, Carbono, Fosforo, Potasio, Magnesio, Calcio y Manganeso. De acuerdo con Andrés France (2010) y Monzón (2014) las formulación del hongo es el proceso mediante el cual el ingrediente activo, es decir las conidias del hongo, se mezclan con materiales inertes, tales como vehículos, solventes, emulsificante y otros nutrientes que favorecen la longevidad del hongo ya sea protegiéndolo del medio ambiente y aumentando su vida útil o mejorando su viabilidad.

3.3.2 Determinación de las curvas de crecimiento del bioformulado NemaKill a 18°C

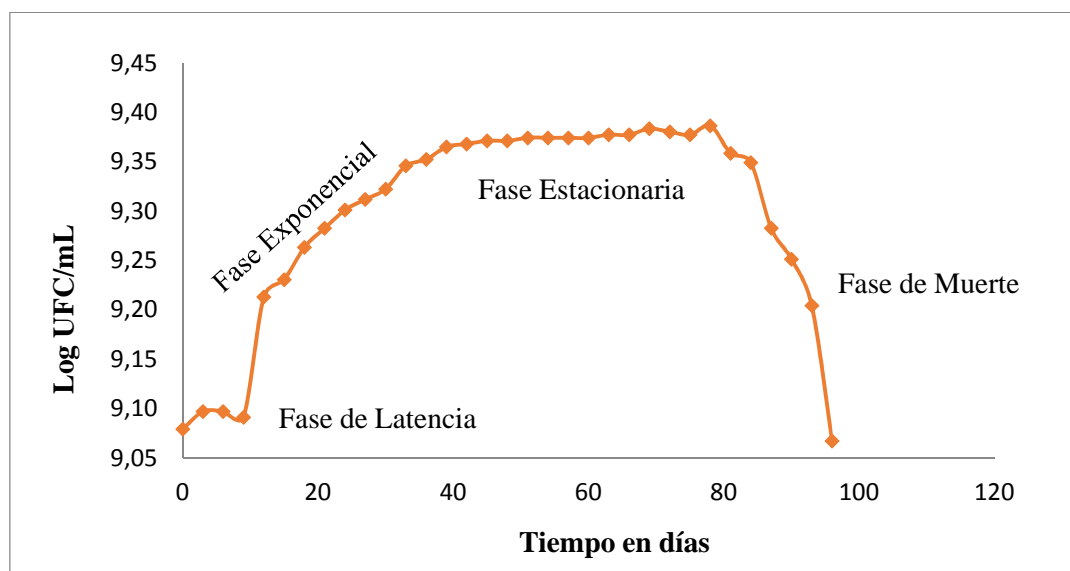


Figura 10-3. Curva de crecimiento del bioformulado NemaKill a 18 °C

Fuente: Realizado por Lupe Aguirre

La curva de crecimiento del bioformulado líquido NemaKill almacenado a 18°C, presenta la fase de crecimiento hasta los 48 días con una población de $2,3 \times 10^9$ UFC/ mL de formulado, seguida de la fase estacionaria que se extiende hasta los 81 días, con una concentración de $2,4 \times 10^9$ UFC/mL, que permanece constante, finalmente se presenta la fase de muerte, obteniéndose una población de $1,2 \times 10^9$ UFC/mL de formulado transcurridos los 96 días de almacenado el producto.

El incremento de las poblaciones es de 7.1×10^7 UFC /mL de formulado, mientras que el decremento es de 2.1×10^8 UFC /mL de formulado cada 3 días.

Los resultados obtenidos son superiores por Fernández (2006), pues sus promedios a los 60 días fue de 4.81×10^8 UFC/mL el incremento de las poblaciones es de 8.00×10^8 UFC/mL de formulado, mientras que el decremento es de 6.60×10^8 UFC/mL de formulado cada 3 días, lo cual se puede deber a que la actual formulación en lo referente al caldo nutritivo empleado para el crecimiento del MO *Paecilomyces lilacinus* estimula la propagación y sobrevivencia del hongo en el bioformulado debido a que contiene un soporte o vehículo que puede ser sólida o líquida, coadyuvantes que tiene como función de ser protectora, dispersante y adherente y los macro y micro nutrientes como, Carbono, Fosforo, Potasio, Magnesio, Calcio y Manganeso. De acuerdo con Andrés France (2010) y Monzón (2014) la formulación del hongo es el proceso mediante el cual el ingrediente activo, es decir las conidias del hongo, se mezclan con materiales inertes, tales como, solventes, emulsificantes y otros nutrientes que favorecen la longevidad del hongo ya sea protegiéndolo del medio ambiente y aumentando su vida útil o mejorando su viabilidad.

3.3.2 Determinación de las curvas de crecimiento del bioformulado Nemakill a 22°C.

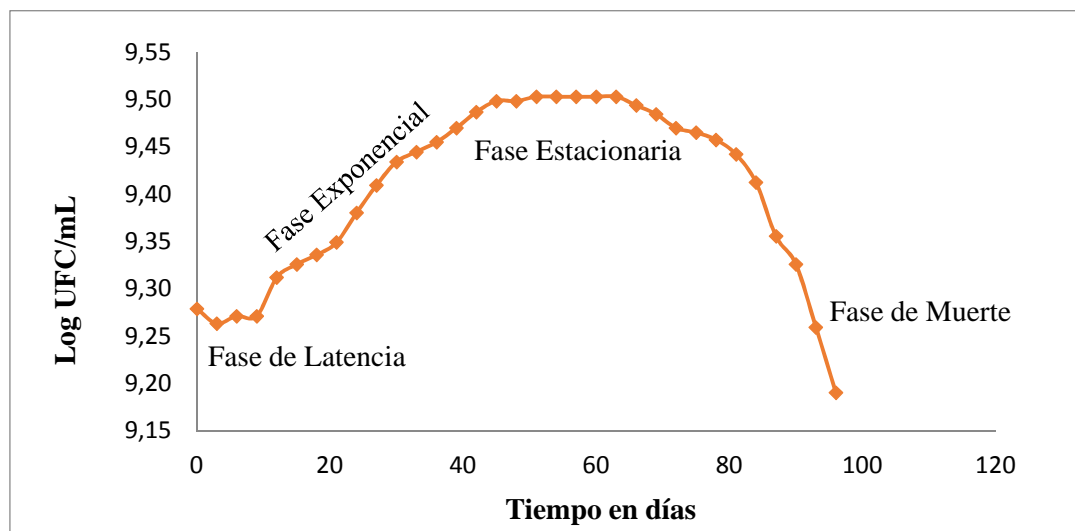


Figura 11-3. Curva de crecimiento del bioformulado Nemakill a 22 °C

Fuente: Realizado por Lupe Aguirre

La curva de crecimiento del bioformulado líquido Nemakill almacenado a 22°C, presenta la fase de crecimiento hasta los 45 días con una población de $2,9 \times 10^9$ UFC / mL de formulado, seguida de la fase estacionaria que se extiende hasta los 63 días, en la cual la concentración $3,2 \times 10^9$ UFC/mL que permanece constante, finalmente se presenta la fase de muerte, obteniéndose una población de $1,6 \times 10^9$ UFC/mL de formulado transcurridos los 96 días de almacenado el producto. Como se evidencia en la figura 11-3.

El incremento de las poblaciones es de $7,6 \times 10^7$ UFC/mL de formulado, mientras que el decremento es de $2,2 \times 10^8$ UFC/mL de formulado cada 3 días.

Los resultados obtenidos son superiores a los obtenidos por Fernández (2006), pues sus promedios a los 60 días fue de $5,1 \times 10^9$ UFC/ mL el incremento de las poblaciones es de $8,00 \times 10^8$ UFC/mL de formulado, mientras que el decremento de $6,74 \times 10^8$ UFC/mL de formulado cada 3 días, lo cual se puede deber a que la actual formulación en lo referente al caldo nutritivo empleado para el crecimiento del MO *Paecilomyces lilacinus* estimula la propagación y sobrevivencia del hongo en el bioformulado debido a que contiene un soporte o vehículo que puede ser sólida o líquida,

coadyuvantes que tiene como función de ser protectora, dispersante y adherente y los macro y micro nutrientes como, Carbono, Fosforo, Potasio, Magnesio, Calcio y Manganeso. De acuerdo con Andrés France (2010) y Monzón (2014) la formulación del hongo es el proceso mediante el cual el ingrediente activo, es decir las conidias del hongo, se mezclan con materiales inertes, tales como, solventes, emulsificantes y otros nutrientes que favorecen la longevidad del hongo ya sea protegiéndolo del medio ambiente y aumentando su vida útil o mejorando su viabilidad.

3.3.4 Determinación de las curvas de crecimiento del bioformulado Nemakill almacenado a tres temperaturas 4°C 18°C y 22°C, mediante la cámara de Neubauer

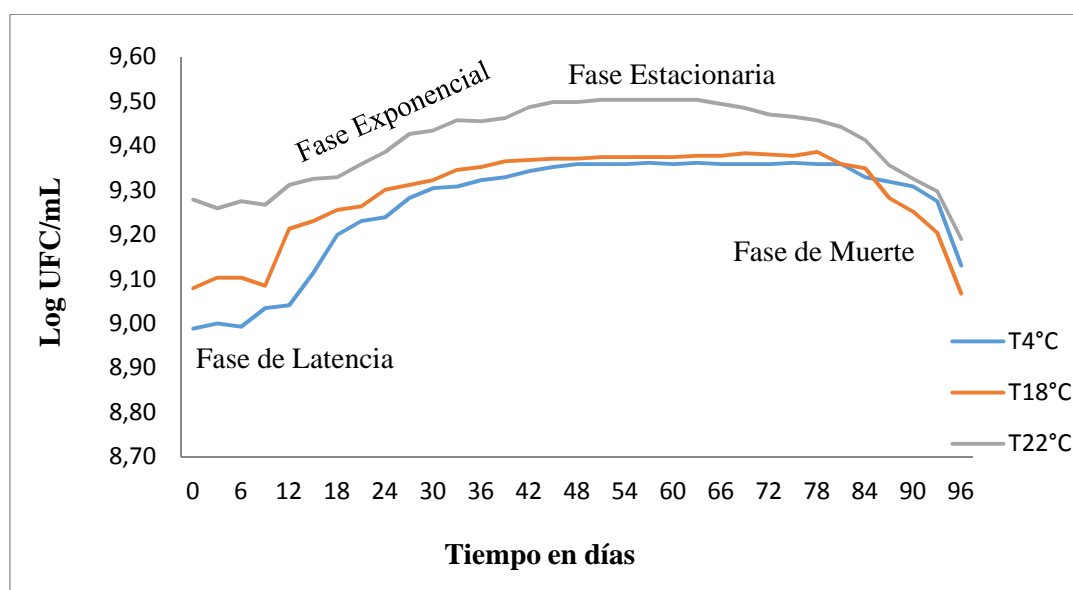


Figura 12-3. Curva de crecimiento del bioformulado Nemakill a 4°C 18°C y 22°C
Fuente: Realizado por Lupe Aguirre

En la figura 12-3 del bioformulado Nemakill a diferentes temperaturas 4°C 18°C y 22°C, se describe una típica curva de crecimiento, en la que se distingue cuatro fases: fases de latencia, fase de crecimiento, fase estacionaria y fase de muerte.

Las esporas del bioformulado Nemakill almacenado a 4°C, 18°C y 22°C, presentan una adaptación de 12, 9 y 6 días respectivamente en la cual se debe a la fase de latencia que según Bikandi (2014) es el período de adaptación de un microorganismo a un nuevo medio de cultivo el crecimiento no suele comenzar de inmediato, representa un periodo de transición para los microorganismos cuando

son transferidos a una nueva condición. En esta fase se producen las enzimas necesarias para que ellos puedan crecer en un nuevo medio ambiente, no hay incremento de células pero hay gran actividad metabólica.

El bioformulado NemaKill contiene una concentración de esporas de 2.21×10^9 UFC/mL T(4°C), 2.3×10^9 UFC/mL T(18°C) y 2.9×10^9 UFC/mL T(22°C), de acuerdo con Bikandi (2014), en la fase de crecimiento se observa un aumento progresivo del número de esporas como consecuencia de la división celular, mediante el cual el MO utiliza los nutrientes que se encuentran en el medio, la máxima concentración se presenta de los 45- 81 días a T(4°C), 48-81 días a T(18°C) y 45-63 días a T(22°C), este periodo corresponde a la fase estacionaria con una concentración de esporas de 2.28×10^9 UFC/mL, 2.4×10^9 UFC/mL T(18°C) y , 3.2×10^9 UFC/mL T(22°C) que presento una duración de 36, 33 y 18 días respectivamente, Bikandi (2014) menciona que en la fase estacionaria hay limitación de nutrientes, la población permanece constante, ya que las células siguen en división celular, pero la aparición de nuevos individuos se compensa por la muerte de otros microorganismos, la fase de muerte se presenta a menor velocidad, como consecuencia el bioformulado mantiene poblaciones activas de 1.35×10^8 UFC/mL T(4°C), 1.2×10^9 UFC/mL T(18°C) y 1.6×10^9 UFC/mL T(22°C) durante mayor tiempo, de acuerdo con Bikandi (2014), en la fase de muerte los nutrientes indispensables se agotan, el oxígeno se reduce y los productos metabólicos se acumulan hasta alcanzar niveles tóxicos, lo que provoca la muerte celular. La velocidad de muerte celular es mayor que la velocidad de división celular como se evidencia en la figura 12-3.

La temperatura óptima para el almacenamiento de bioformulado es de 18°C con una concentración de esporas de 2.3×10^9 UFC/mL de formulado en un periodo de 96 días de almacenamiento que presenta una fase de crecimiento hasta los 48 días con respecto a los formulados conservados a 22°C y 4°C con una fase de crecimiento de 45 días y presentan poblaciones de 2.9×10^9 UFC/mL y 2.25×10^9 UFC/mL respectivamente. Como se evidencia en el anexo G.

Los resultados obtenidos por Fernández (2006), los bioformulados almacenados en 60 días presenta una fase de crecimiento hasta los 12 días mantiene con concentración de esporas de 5.10×10^9 UFC/mL durante el almacenamiento en 22°C, con respecto a los formulados conservados a 18°C y

4°C con crecimiento de poblaciones de 5.10×10^9 UFC/mL hasta 9 días de almacenamiento y 5.05×10^9 UFC/mL hasta los 12 días de almacenamiento respectivamente, demostrando así que la nueva formulación respecto al tiempo de almacenamiento el bioformulado presenta condiciones adecuadas para el crecimiento, estabilidad y desarrollo del microorganismo, gracias a los nutrientes, emulsificantes y otros aditivos que contiene la nueva formulación de NemaKill.

3.3.5 Concentración de esporas del bioformulado NemaKill almacenado a tres temperaturas 4°C, 18°C y 22°C mediante la cámara de Neubauer

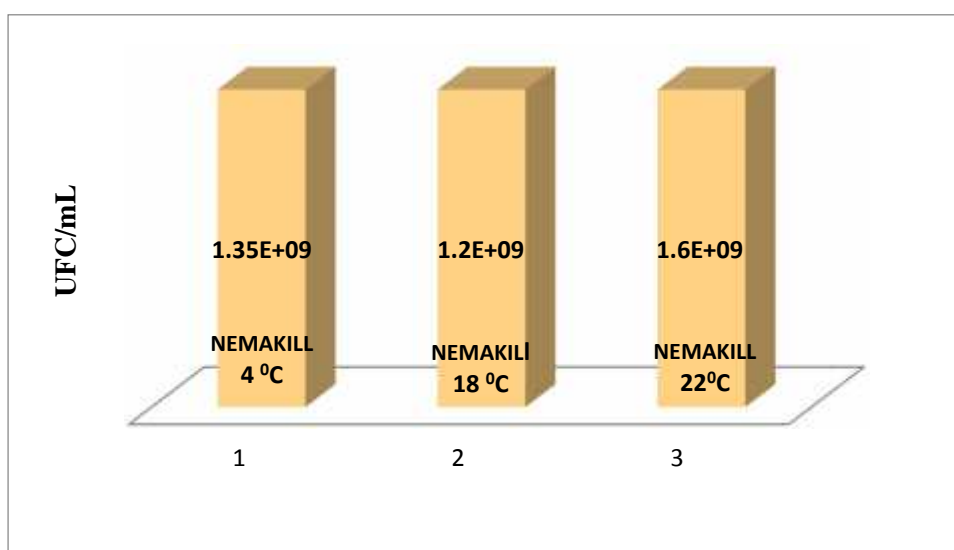


Figura 13-3. Concentración de esporas de NemaKill a 96 días de almacenamiento
Fuente: Realizado por Lupe Aguirre

Se obtiene la mayor concentración de esporas del bioformulado líquido NemaKill a 22°C en un periodo de almacenamiento de 96 días con una población final de 1.6×10^9 UFC/mL en relación a los formulados conservados a 18°C y 4°C con poblaciones de 1.2×10^9 UFC/mL y 1.35×10^9 UFC/mL respectivamente. Como se evidencia en la figura 13-3.

El bioformulado NEMAKILL a base de *Paecilomyces lilacinus* producidas por MIKROBEN resulta competitivo, recomendable ya que puede ser almacenado a las tres temperaturas ensayadas 4°C, 18°C y 22 °C presentando un tiempo de vida útil superior a los tres meses, datos que son corroborados por la casa comercial TRI_SIN CE Agrobionsa con el Insecticida Agrícola

Concentrado de *Paecilomyces f* con el Reg.: RSCO-INAC-0909-0290-009-5.7, que presenta una concentración final de 0.72×10^9 conidios/mL, determinando que el bioformulado con el principio activo *Paecilomyces lilacinus* evaluado en el presente estudio es competitivo con respecto a los disponibles comercialmente, con vida útil superior a los 7 meses, valores similares a los presentados por los productos que se encuentran disponibles en el mercado internacional.

3.4 Determinación del porcentaje de viabilidad del bioformulado NemaKill almacenado a tres temperaturas 4°C, 18°C y 22°C

3.4.1 Determinación del porcentaje de viabilidad del bioformulado NemaKill a 4°C.

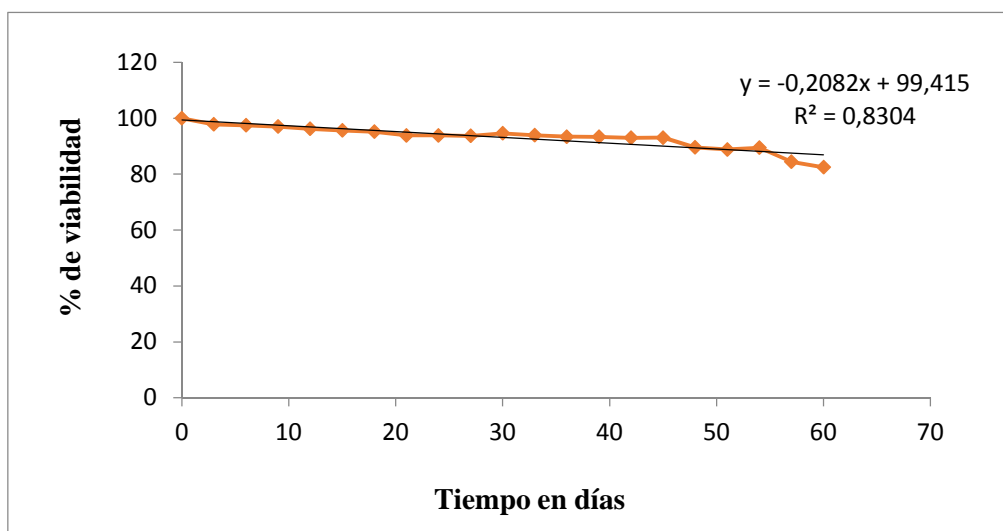


Figura 14-3. Curva de regresión para el porcentaje de viabilidad de NemaKill en función del tiempo mediante el micro cultivo conservada. 4°C

Fuente: Realizado por Lupe Aguirre

Mediante el análisis de regresión lineal para el bioformulado NemaKill almacenado a 4°C es de 189 días, después de la fecha de elaboración el bioformulado se vuelve inactivo, transcurridos los 189 días de tiempo de vida útil el porcentaje de viabilidad es de 60.01% con una ecuación de la curva de regresión $y = -0,2082x + 99,415$. Como se evidencia en la figura 14-3.

Los resultados obtenidos por Fernández (2006), el tiempo máximo de consumo del bioformulado NemaKill a 4°C es de 40 días, de acuerdo a la ecuación de la curva $y = -0,0808x + 9,3011$, manifestando así que el bioformulado presenta un tiempo de vida útil de 189 días (6 meses) debido

a la adición de nutrientes emulsificantes y aditivos a la nueva formulación que hace que el formulado sea más apto para la crecimiento, estabilidad y desarrollo del microorganismo en tiempos más prolongados y que su almacenamiento no afecta la viabilidad del producto. Kononova (1981) y Carranza (2011), menciona que estos requerimientos también pueden ser suplementados en cantidades adecuadas en un medio de cultivo para lograr un máximo de crecimiento y esporulación, aun cuando debe tenerse en cuenta que estos requerimientos pueden ser diferentes para la obtención de biomasa miceliar, por lo tanto las técnicas y procesos de producción más adecuados pueden variar para diferentes especies de hongos.

3.4.2 Determinación del porcentaje de viabilidad del bioformulado NemaKill a 18 °C

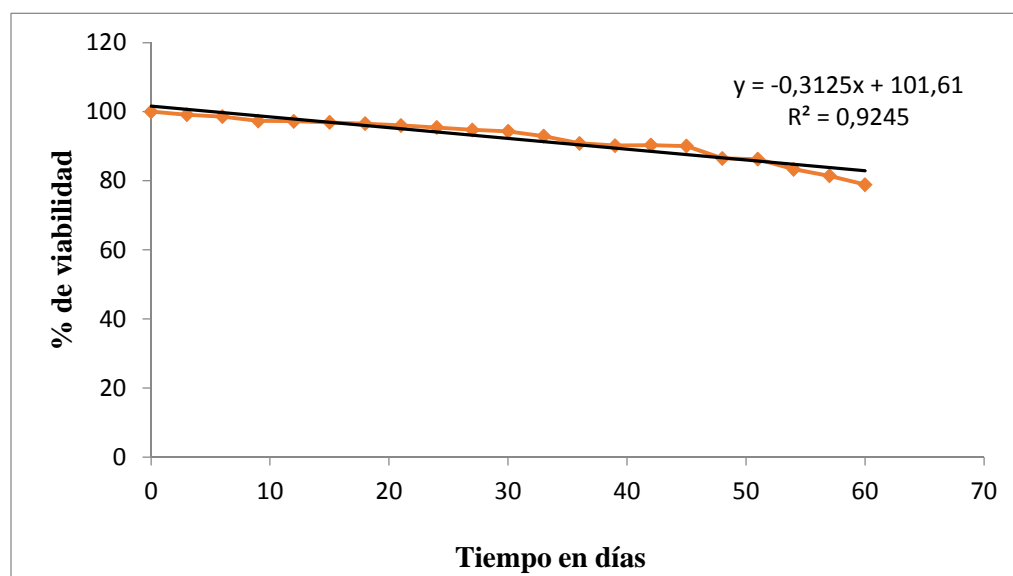


Figura 15-3. Curva de regresión para el porcentaje de viabilidad de NemaKill en del tiempo mediante el micro cultivo conservada. 18°C
Fuente: Realizado por Lupe Aguirre

Para el bioformulado conservado a 18°C es de 133 días con la ecuación de la curva de regresión $y = -0,3125x + 101,61$ como se puede observar en la figura 15-3 transcurridos los 133 días de tiempo de vida útil la población es de 60.05%.

Los resultados obtenidos por Fernández (2006), el tiempo máximo de consumo del bioformulado NemaKill a 18°C es de 36 días, de acuerdo a la ecuación de la curva $y = -9,0725x + 9,0725$, manifestando así que el bioformulado presenta un tiempo de vida útil de 133 días (4 meses) debido

a la adición de nutrientes emulsificantes y aditivos a la nueva formulación que hace que el formulado sea más apto para la crecimiento, estabilidad y desarrollo del microorganismo en tiempos más prolongados y que su almacenamiento no afecta la viabilidad del producto. Kononova (1981) y Carranza (2011), menciona que estos requerimientos también pueden ser suplementados en cantidades adecuadas en un medio de cultivo para lograr un máximo de crecimiento y esporulación, aun cuando debe tenerse en cuenta que estos requerimientos pueden ser diferentes para la obtención de biomasa miceliar, por lo tanto las técnicas y procesos de producción más adecuados pueden variar para diferentes especies de hongos.

3.4.3 Determinación del porcentaje de viabilidad del bioformulado NemaKill a 22 °C

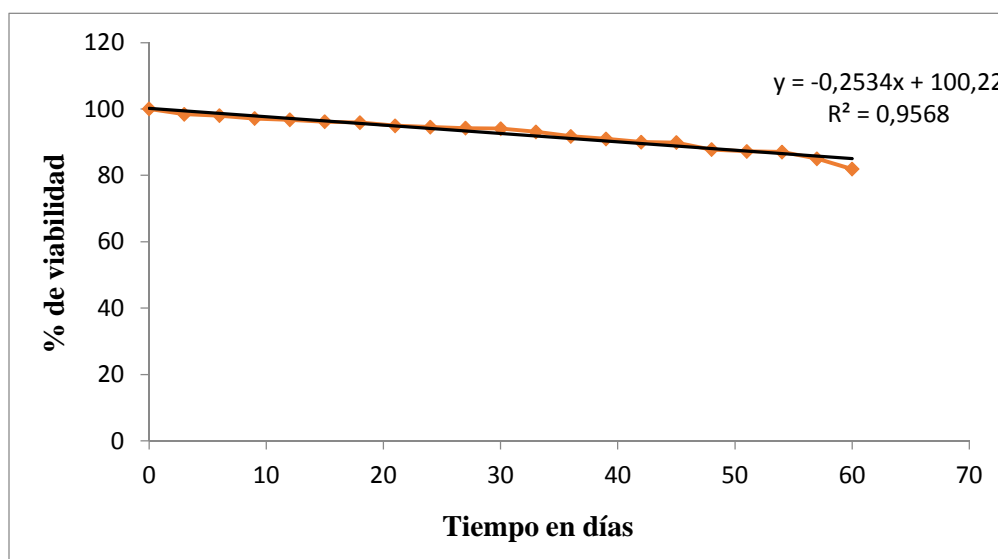


Figura 16-3. Curva de regresión para el porcentaje de viabilidad de NemaKill en función del tiempo mediante el micro cultivo conservado a 22°C
Fuente: Realizado por Lupe Aguirre

Mientras que para el bioformulado NemaKill almacenado a 22°C es de 159 días con una Ecuación de la curva de regresión $y = -0,2534x + 100,22$. Transcurridos los 159 días de tiempo de vida útil la población es de 59.9%. Como se evidencia en la figura 16-3.

Los resultados obtenidos por Fernández (2006), el tiempo máximo de consumo del bioformulado NemaKill a 22 °C es de 33 días, de acuerdo a la ecuación de la curva $y = -0,0907x + 9,0197$ resultan ser inferiores de acuerdo al tiempo de vida útil del bioformulado y nos permiten demostrando que

presenta mayor efectividad con un porcentajes de viabilidad de 59,9 % en 159 días (5 meses) de almacenamiento. Kononova (1981) y Carranza (2011), menciona que estos requerimientos también pueden ser suplementados en cantidades adecuadas en un medio de cultivo para lograr un máximo de crecimiento y esporulación, aun cuando debe tenerse en cuenta que estos requerimientos pueden ser diferentes para la obtención de biomasa micelial, por lo tanto las técnicas y procesos de producción más adecuados pueden variar para diferentes especies de hongos.

3.5 Determinación de las curvas de crecimiento del bioformulado Baukill almacenado a tres temperaturas 4°C 18°C y 22°C

3.5.1 Determinación de las curvas de crecimiento del bioformulado Baukill a 4°C

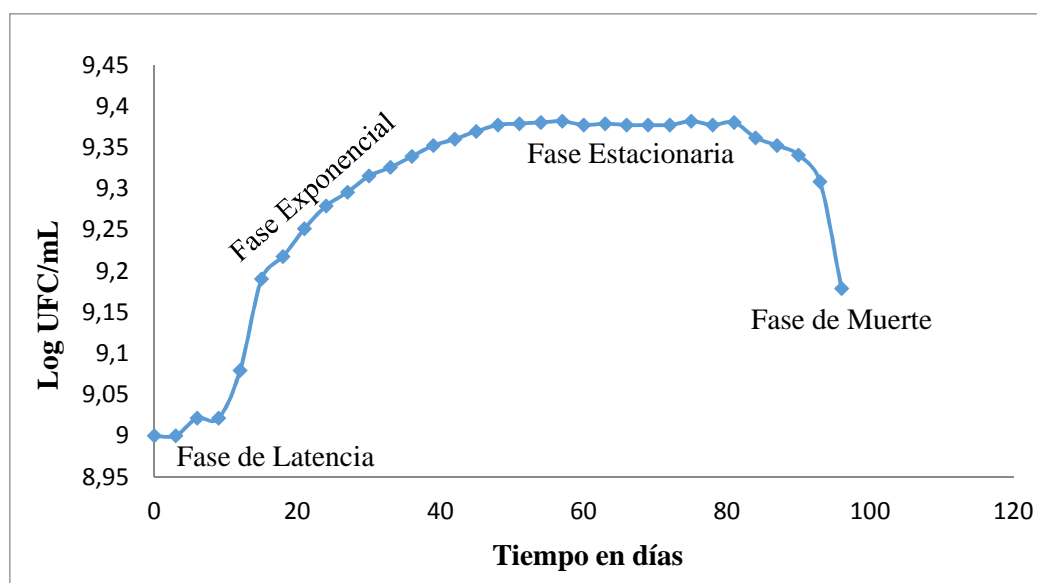


Figura 17-3. Curva de crecimiento del bioformulado Baukill a 4 °C
Fuente: Realizado por Lupe Aguirre

La curva de crecimiento del formulado líquido Baukill almacenado a 4°C, presenta la fase de crecimiento hasta los 48 días con una población de $2,38 \times 10^9$ UFC / mL de formulado, seguida de la fase estacionaria que se extiende hasta los 81 días, la concentración es de $2,39 \times 10^9$ UFC/mL que permanece constante, finalmente se presenta la fase de muerte, obteniéndose una población de $1,508 \times 10^9$ UFC/mL de formulado transcurridos los 96 días de almacenado el producto. Como se evidencia en la figura 17-3.

El incremento de las poblaciones es de 8.81×10^7 UFC/mL de formulado, mientras que el decremento es de 2.28×10^8 UFC/mL de formulado cada 3 días.

Los resultados obtenidos son superiores a los obtenidos por Fernández (2006), pues sus promedios a los 60 días fue de 7.04×10^8 UFC/mL con un incremento de las poblaciones de 4.63×10^8 UFC/mL de formulado, mientras que el decremento es de 6.89×10^8 UFC/mL de formulado cada 3 días, lo cual se puede deber a que la actual formulación en lo referente al caldo nutritivo empleado para el crecimiento del MO *Beauveria bassiana* estimula la propagación y sobrevivencia del hongo en el bioformulado debido a que contiene un soporte o vehículo que puede ser sólida o líquida, coadyuvantes que tiene como función de ser protectora, dispersante y adherente y los macro y micro nutrientes como, Carbono, Fosforo, Potasio, Magnesio, Calcio y Manganeso. De acuerdo con Andrés France (2010) y Monzón (2014) las formulación del hongo es el proceso mediante el cual el ingrediente activo, es decir las conidias del hongo, se mezclan con materiales inertes, tales como vehículos, solventes, emulsificante y otros nutrientes que favorecen la longevidad del hongo ya sea protegiéndolo del medio ambiente y aumentando su vida útil o mejorando su viabilidad.

3.5.2 Determinación de las curvas de crecimiento del bioformulado Baukill a 18 °C

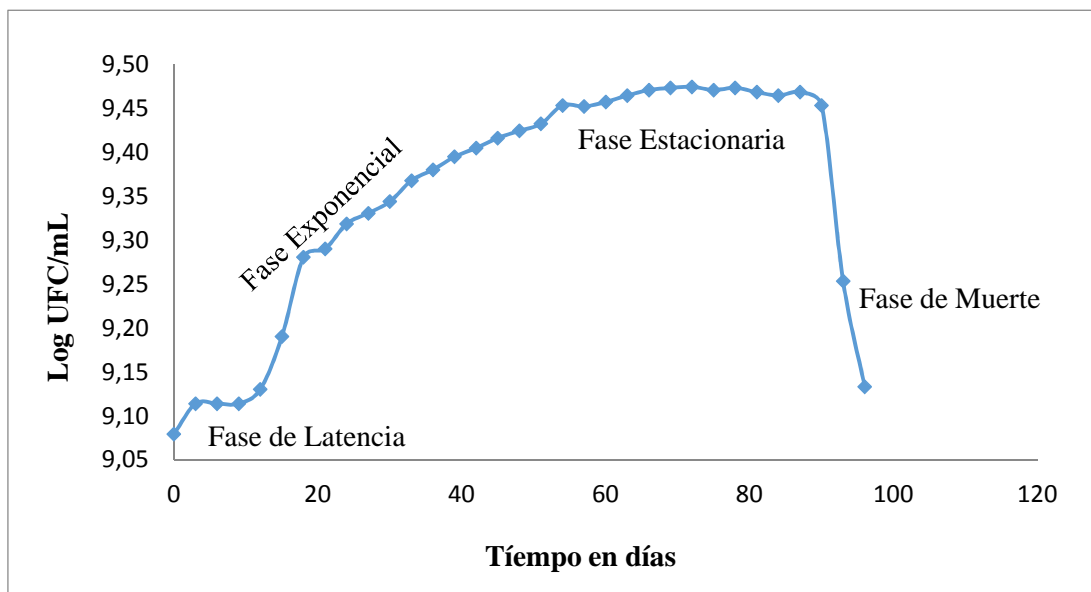


Figura 18-3. Curva de crecimiento del bioformulado Baukill a 18 °C
Fuente: Realizado por Lupe Aguirre

La curva de crecimiento del formulado líquido de Baukill almacenado a 18 °C, presenta la fase de crecimiento hasta los 54 días con una población de $2,84 \times 10^9$ UFC/mL de formulado, seguida de la

fase estacionaria que se extiende hasta los 87 días con una concentración de $2,92 \times 10^9$ UFC/mL, que permanece constante y finalmente se presenta la fase de muerte, obteniéndose una población de $1,36 \times 10^9$ UFC/mL de formulado transcurridos los 96 días de almacenado el producto. Como se observa en figura 18-3.

El incremento de las poblaciones es de $8,43 \times 10^7$ UFC/mL de formulado, mientras que el decremento es de $2,67 \times 10^8$ UFC/mL de formulado cada 3 días.

Los resultados obtenidos son superiores a los obtenidos por Fernández (2006), pues sus promedios a los 60 días fue de $5,85 \times 10^8$ UFC/mL con un incremento de las poblaciones es de $6,50 \times 10^8$ UFC/mL de formulado, mientras que el decremento es de $5,24 \times 10^8$ UFC/mL de formulado cada 3 días, lo cual se puede deber a que la actual formulación en lo referente al caldo nutritivo empleado para el crecimiento del MO *Beauveria bassiana* estimula la propagación y sobrevivencia del hongo en el bioformulado debido a que contiene un soporte o vehículo que puede ser sólida o líquida, coadyuvantes que tiene como función de ser protectora, dispersante y adherente y los macro y micro nutrientes como, Carbono, Fosforo, Potasio, Magnesio, Calcio y Manganeso. De acuerdo con Andrés France (2010) y Monzón (2014) la formulación del hongo es el proceso mediante el cual el ingrediente activo, es decir las conidias del hongo, se mezclan con materiales inertes, tales como vehículos, solventes, emulsificante y otros nutrientes que favorecen la longevidad del hongo ya sea protegiéndolo del medio ambiente y aumentando su vida útil o mejorando su viabilidad.

3.5.3 Determinación de las curvas de crecimiento del bioformulado Baukill a 22°C

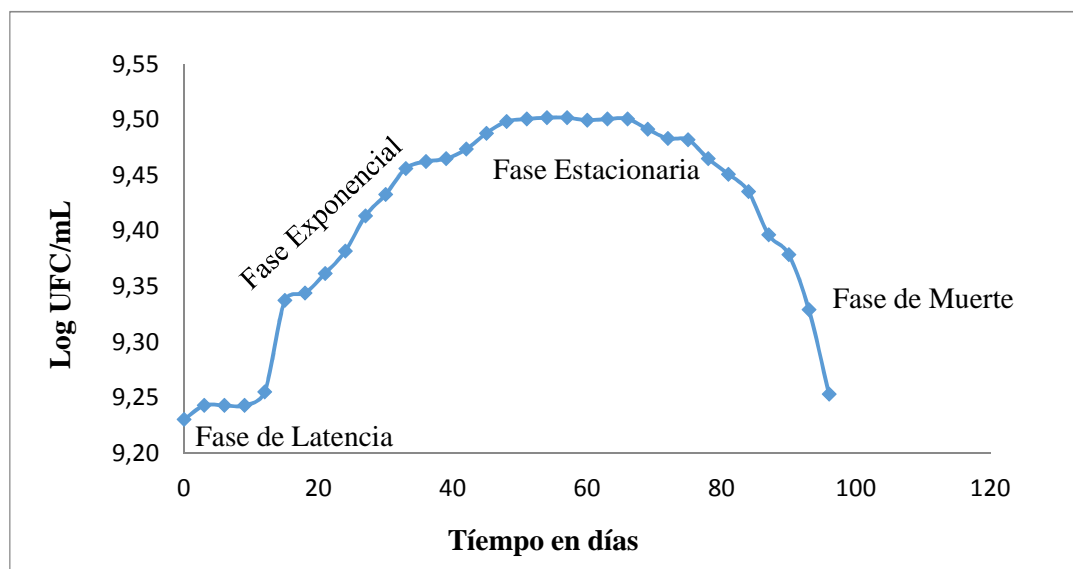


Figura 19-3. Curva de crecimiento del bioformulado Baukill a 22 °C
Fuente: Realizado por Lupe Aguirre

La curva de crecimiento del formulado líquido de Baukill almacenado a 22 °C, presenta la fase de crecimiento hasta los 48 días con una población de $3,15 \times 10^9$ UFC/mL de formulado, seguida de la fase estacionaria que se extiende hasta los 69 días, en la cual la concentración es de $3,16 \times 10^9$ UFC/ mL permanece constante, finalmente se presenta la fase de muerte, obteniéndose una población de $1,792 \times 10^9$ UFC/mL de formulado transcurridos los 96 días de almacenado el producto. Como se evidencia en la figura 19-3.

El incremento de las poblaciones es de $8,75 \times 10^7$ UFC/mL de formulado, mientras que el decremento es de $1,65 \times 10^8$ UFC/mL de formulado cada 3 días.

Los resultados obtenidos son superiores a los obtenidos por Fernández (2006), pues sus promedios a los 60 días fue de $3,90 \times 10^8$ UFC/mL con un incremento de las poblaciones es de $6,83 \times 10^8$ UFC/mL de formulado, mientras que el decremento es de $3,96 \times 10^8$ UFC/mL de formulado cada 3 días, lo cual se puede deber a que la actual formulación en lo referente al caldo nutritivo empleado para el crecimiento del MO *Beauveria bassiana* estimula la propagación y sobrevivencia del hongo en el bioformulado debido a que contiene un soporte o vehículo que puede ser sólida o líquida, coadyuvantes que tiene como función de ser protectora, dispersante y adherente y los macro y

micro nutrientes como, Carbono, Fosforo, Potasio, Magnesio, Calcio y Manganeso. De acuerdo con Andrés France (2010) y Monzón (2014) la formulación del hongo es el proceso mediante el cual el ingrediente activo, es decir las conidias del hongo, se mezclan con materiales inertes, tales como vehículos, solventes, emulsificante y otros nutrientes que favorecen la longevidad del hongo ya sea protegiéndolo del medio ambiente y aumentando su vida útil o mejorando su viabilidad.

3.5.4 Determinación de las curvas de crecimiento del bioformulado Baukill almacenado a tres temperaturas 4°C 18°C y 22°C

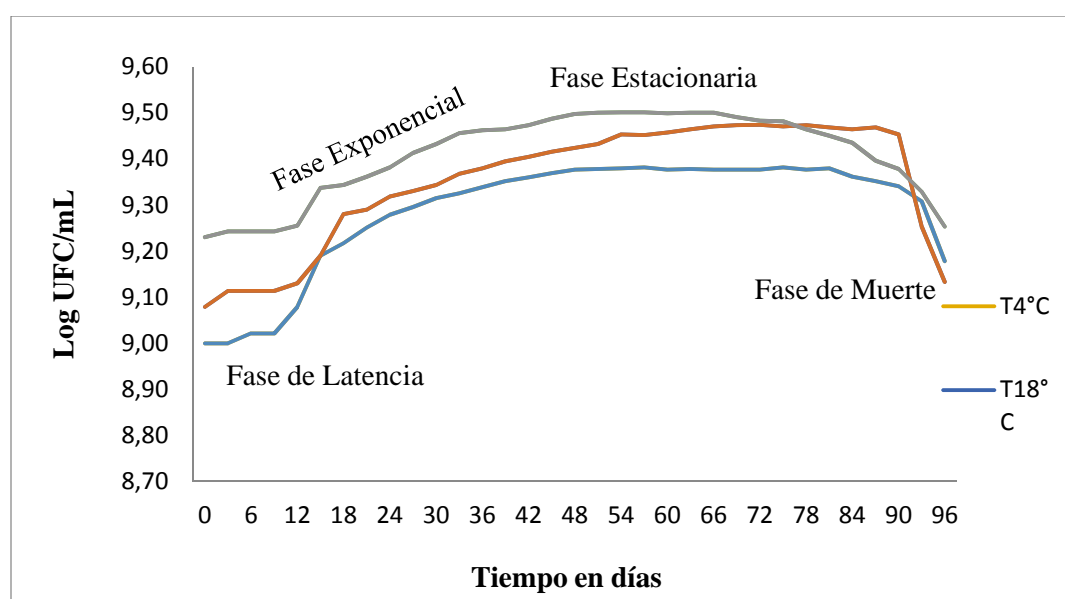


Figura 20-3. Curva de crecimiento del bioformulado Baukill a 4°C 18°C y 22°C
Fuente: Realizado por Lupe Aguirre

Los gráficos del bioformulado Baukill describe una típica curva de crecimiento, en la que se distingue cuatro fases: fase de latencia, fase de crecimiento, fase estacionaria y fase de muerte. Como se evidencia en la figura 20-3.

Las esporas del bioformulado Baukill almacenado a 4°C, 18°C y 22°C, presentan una adaptación de 9 días en la cual se debe a la fase de latencia que según Bikandi (2014) es el período de adaptación de un microorganismo a un nuevo medio de cultivo el crecimiento no suele comenzar de inmediato, representa un periodo de transición para los microorganismos cuando son transferidos a

una nueva condición. En esta fase se producen las enzimas necesarias para que ellos puedan crecer en un nuevo medio ambiente, no hay incremento de células pero hay gran actividad metabólica.

El bioformulado Baukill contiene una concentración de esporas de 2.38×10^9 UFC/mL T(4°C), 2.84×10^9 UFC/mL T(18°C) y 3.15×10^9 UFC/mL T(22°C), de acuerdo con Bikandi (2014), en la fase de crecimiento se observa un aumento progresivo del número de esporas como consecuencia de la división celular, mediante el cual el MO utiliza los nutrientes que se encuentran en el medio, la máxima concentración se presenta de los 48- 81 días a T(4°C), 54-87 días a T(18°C) y 48-69 días a T(22°C), este periodo corresponde a la fase estacionaria con una concentración de esporas de 2.39×10^9 UFC/mL, 2.92×10^9 UFC/mL T(18°C) y , 3.16×10^9 UFC/mL T(22°C) que presento una duración de 33, 33 y 21 días respectivamente, Bikandi (2014) menciona que en la fase estacionaria hay limitación de nutrientes, la población permanece contante, ya que las células siguen en división celular, pero la aparición de nuevos individuos se compensa por la muerte de otros microorganismos, la fase de muerte se presenta a menor velocidad, como consecuencia el bioformulado mantiene poblaciones activas de 1.508×10^8 UFC/mL T(4°C), 1.36×10^9 UFC/mL T(18°C) y 1.79×10^9 UFC/mL T(22°C) durante mayor tiempo, de acuerdo con Bikandi (2014), en la fase de muerte los nutrientes indispensables se agotan, el oxígeno se reduce y los productos metabólicos se acumulan hasta alcanzar niveles tóxicos, lo que provoca la muerte celular. La velocidad de muerte celular es mayor que la velocidad de división celular como se evidencia en la figura 30-3.

La temperatura óptima para el almacenamiento de bioformulado Baukill es de a 18°C y con una fase de crecimiento de 2.84×10^9 UFC/mL hasta los 54 días de formulado durante el almacenamiento con respecto a los formulados conservado a 22°C y 4 °C, con una población de $3,15 \times 10^9$ UFC/mL y 2.38×10^9 UFC/mL respectivamente, que presenta una fase de crecimiento hasta los 48 días.

Los resultados obtenidos por Fernández (2006), mantiene una mayor concentración de esporas de 4.15×10^9 UFC/mL hasta los 12 días durante el almacenamiento, con respecto a los formulados conservados a 18°C y 22°C con poblaciones de 4.25×10^9 UFC/mL y 4.35×10^9 UFC/mL respectivamente.

3.5.5 Concentración de esporas del bioformulado Baukill a tres temperaturas 4°C 18°C y 22°C mediante la cámara de Neubauer

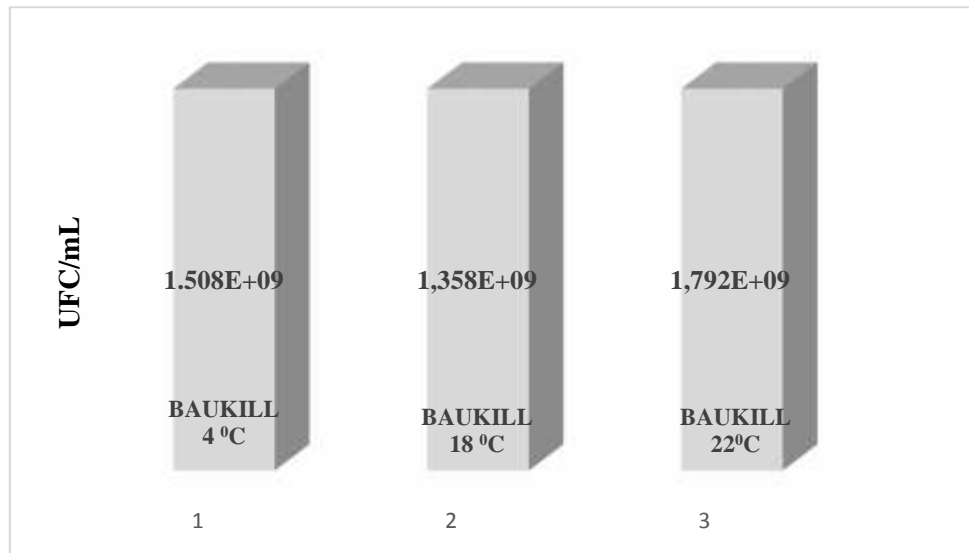


Figura 21-3. Concentración de esporas de Baukill a 96 días de almacenamiento.
Fuente: Realizado por Lupe Aguirre

Como se puede observar en la figura 21-3 se obtiene la mayor concentración de esporas del bioformulado líquido BAUKILL a 22°C en un periodo de almacenamiento de 96 días con una población final de 1.79×10^9 UFC/mL en relación a los formulados conservados a 18°C y 4°C con poblaciones de 1.35×10^9 UFC/mL y 1.508×10^9 UFC/mL respectivamente.

El bioformulado BAUKILL a base de *Beauveria bassiana* producidas por MIKROBEN resulta competitivo, recomendable ya que puede ser almacenado a las tres temperaturas ensayadas 4°C, 18°C y 22 °C presentando un tiempo de vida útil superior a los tres meses, datos que son corroborados por la casa comercial TRI_SIN CE Agrobionsa con el Insecticida Agrícola en suspensión líquida de *Beauveria bassiana* con el Reg.: RSCO-INAC-0195-0236-315-2.5, que presenta una concentración final de 1.2×10^9 conidios/mL, determinando que el bioformulado evaluado en el presente estudio es competitivo con respecto a los disponibles comercialmente, dichos productos presentan una vida útil superior a los 7 meses, valores similares a los presentados por los productos que se encuentran disponibles en el mercado internacional.

3.6 Determinación del porcentaje de viabilidad del bioformulado Baukill almacenado a tres temperaturas 4°C, 18°C y 22°C

3.6.1 Determinación del porcentaje de viabilidad del bioformulado Baukill a 4°C

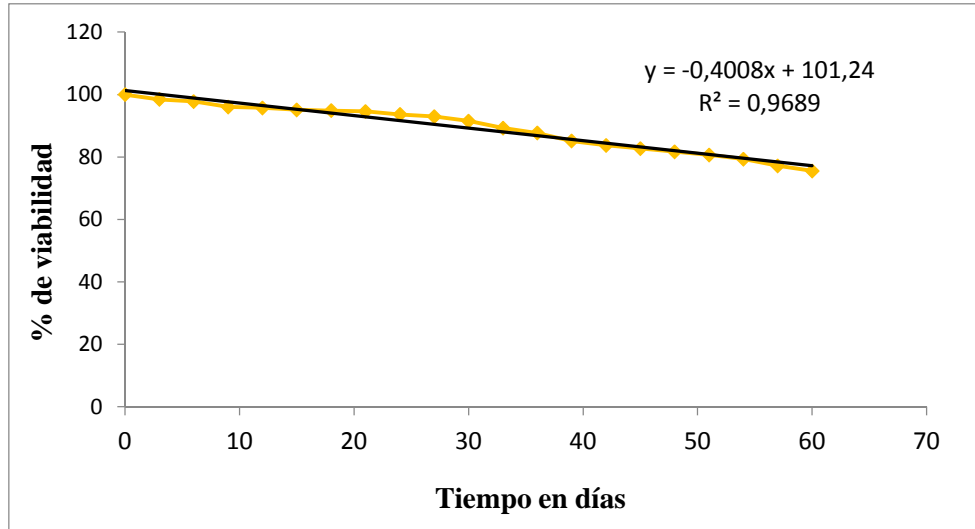


Figura 22-3. Curva de regresión en función del tiempo mediante el micro cultivo a. 4°C
Fuente: Realizado por Lupe Aguirre

Para el bioformulado almacenado a 4°C es de 102 días con la ecuación de la curva de regresión $y = -0,40086x + 101,24$. Transcurridos los 102 días de tiempo de vida útil el porcentaje de viabilidad es de 60.35%. Como se evidencia en la figura 22-3.

Los resultados obtenidos por Fernández (2006), el tiempo máximo de consumo del bioformulado Baukill a 4°C es de 37 días, de acuerdo a la ecuación de la curva $y = -0,0859x + 9,2151$, manifestando así que el bioformulado presenta un tiempo de vida útil de 102 días (3 meses) debido a la adición de nutrientes emulsificantes y aditivos a la nueva formulación que hace que el formulado sea más apto para la crecimiento, estabilidad y desarrollo del microorganismo en tiempos más prolongados y que su almacenamiento no afecta la viabilidad del producto. Kononova (1981) y Barajas (2009), menciona que estos requerimientos también pueden ser suplementados en cantidades adecuadas en un medio de cultivo para lograr un máximo de crecimiento y esporulación, aun cuando debe tenerse en cuenta que estos requerimientos pueden ser diferentes para la obtención de biomasa micelar, por lo tanto las técnicas y procesos de producción más adecuados pueden variar para diferentes especies de hongos.

3.6.2 Determinación del porcentaje de viabilidad del bioformulado Baukill a 18 °C

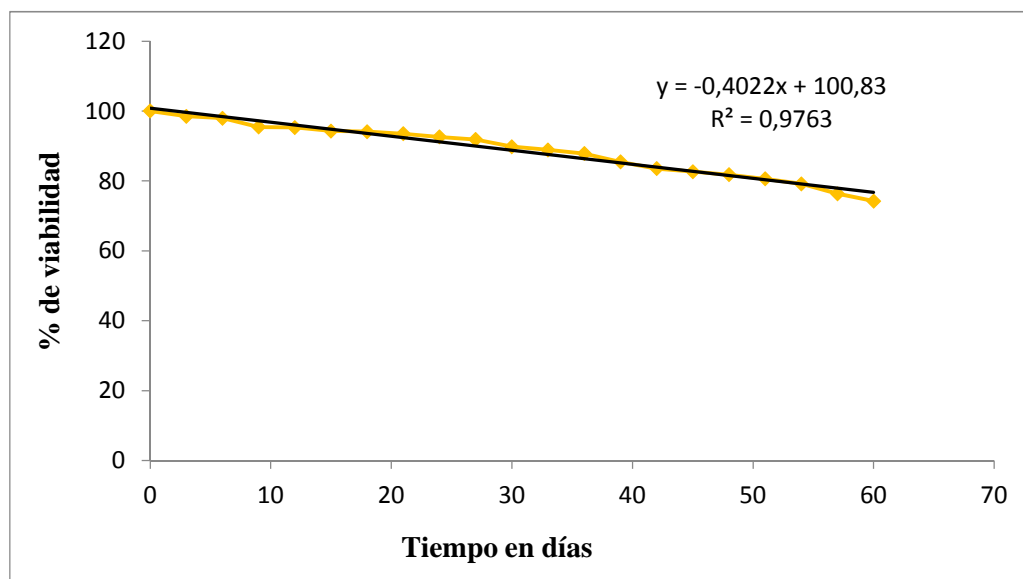


Figura 23-3. Curva de regresión en función del tiempo mediante el micro cultivo a 18°C
Fuente: Realizado por Lupe Aguirre

Para el bioformulado Baukill almacenado a 18°C es de 102 días con una Ecuación de la curva de regresión $y = -0,4022x + 100,83$. Transcurridos los 102 días de tiempo de vida útil con un porcentaje de viabilidad de 59.80%. Como se observa en la figura 23-3.

Los resultados obtenidos por Fernández (2006), el tiempo máximo de consumo del bioformulado Baukill a 18 °C es de 30 días, de acuerdo a la ecuación de la curva $y = -0,0989x + 8,9998$, manifestando así que el bioformulado presenta un tiempo de vida útil de 102 días (3 meses) debido a la adición de nutrientes emulsificantes y aditivos a la nueva formulación que hace que el formulado sea más apto para la crecimiento, estabilidad y desarrollo del microorganismo en tiempos más prolongados y que su almacenamiento no afecta la viabilidad del producto. Kononova (1981) y Barajas (2009), menciona que estos requerimientos también pueden ser suplementados en cantidades adecuadas en un medio de cultivo para lograr un máximo de crecimiento y esporulación, aun cuando debe tenerse en cuenta que estos requerimientos pueden ser diferentes para la obtención de biomasa micelar, por lo tanto las técnicas y procesos de producción más adecuados pueden variar para diferentes especies de hongos.

3.6.3 Determinación del porcentaje de viabilidad del bioformulado Baukill a 22°C

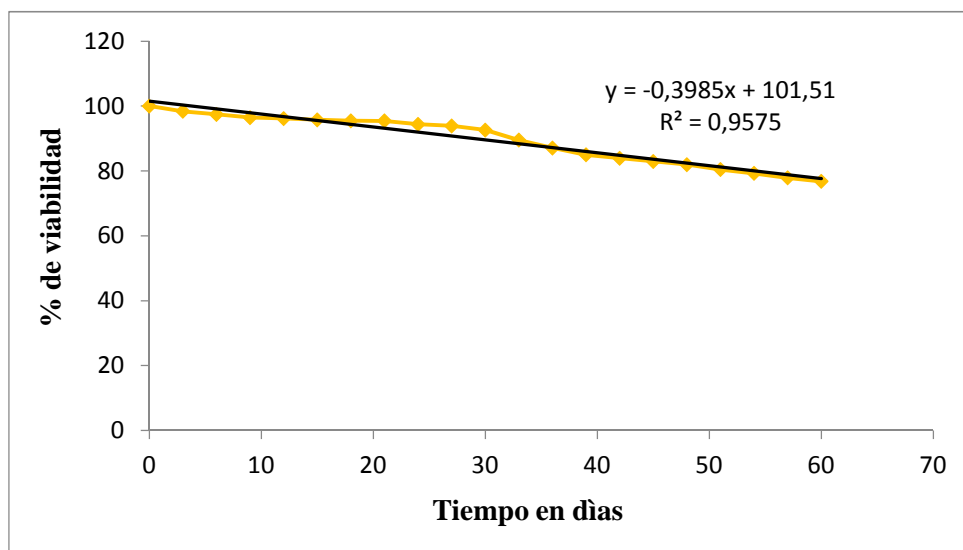


Figura 24-3. Curva de regresión en función del tiempo mediante el micro cultivo a 22°C
Fuente: Realizado por Lupe Aguirre

La curva de regresión para el bioformulado Baukill conservado a 22°C es de 104 días con la Ecuación de la Curva de regresión $y = -0,3985x + 101,51$. Como se evidencia en la figura 24-3 transcurridos los 104 días de tiempo de vida útil la población es de 60.01%

Los resultados obtenidos por Fernández (2006), el tiempo máximo de consumo del bioformulado Baukill a 22 °C es de 27 días, de acuerdo a la ecuación de la curva $y = -0,1097x + 8,9889$, manifestando así que el bioformulado presenta un tiempo de vida útil de 104 días (3 meses) debido a la adición de nutrientes emulsificantes y aditivos a la nueva formulación que hace que el formulado sea más apto para la crecimiento, estabilidad y desarrollo del microorganismo en tiempos más prolongados y que su almacenamiento no afecta la viabilidad del producto. Kononova (1981) y Barajas (2009), menciona que estos requerimientos también pueden ser suplementados en cantidades adecuadas en un medio de cultivo para lograr un máximo de crecimiento y esporulación, aun cuando debe tenerse en cuenta que estos requerimientos pueden ser diferentes para la obtención de biomasa micelial, por lo tanto las técnicas y procesos de producción más adecuados pueden variar para diferentes especies de hongos.

CONCLUSIONES

- Luego de analizar las curvas de crecimiento se determinó: los bioformulados Trikofun y NemaKill almacenados a 4°C presentan mayor efectividad hasta los 45 días; y para BauKill hasta 48 días. A la temperatura de 18°C los tres bioformulados presentaron mayor velocidad de crecimiento a los 60, 48 y 54 días respectivamente. Trikofun y BauKill almacenados a 22°C muestran mejores resultados a 48 días, mientras que en NemaKill es de 45 días.
- El tiempo máximo de vida útil para Trikofun almacenado a 4°C, 18°C y 22°C es de 89, 122 y 166 días respectivamente; para NemaKill es de 189, 133 y 159 días; en el caso de BauKill conservado a 4°C y 18°C es de 102 días y a una temperatura de 22°C es útil hasta los 104 días.
- Los porcentajes de viabilidad de Trikofun almacenado a 4°C, 18°C y 22°C son 60.13%, 60.30% y 60.12% para NemaKill son 60.01%, 60.05% y 59.9%; y para BauKill son 60.35%, 59.80% y 60.01% respectivamente.

RECOMENDACIONES:

- Se recomienda almacenar los bioformulados Trikofun, NemaKill y BauKill a una temperatura de 18°C.
- Extender el tiempo de crecimiento microbiano (mayor a 96 días) para comprobar si existe incremento o disminución en la concentración de esporas viables para cada microorganismo.
- Buscar nuevas alternativas como: sustratos, caldos o procedimientos que ayuden a prolongar la vida útil de los microorganismos en los bioformulados. Y utilizar Trikofun, NemaKill y BauKill como una herramienta de control de plagas y enfermedades en los cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

A. C. Michel et al. “Producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en diferentes sustratos orgánicos”. *Revista Chapingo. Serie horticultura* [en línea], vol.14 no.2 (2008) (México) [Consulta: 2015-10-14]. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1027-152X2008000200012&script=sci_arttext

AGRIOS George, *Fitopatología* quinta edición, México DF. México: Limuso, 2005, pp9-36.

AVILAC, C., UMAÑA, M. “Aspectos de Biología y Fitopatogenicidad del hongo *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces lilacinus*, *Beauveria Bassiana*, *Metarhizium Anisopliae*. Sorokin, Sobre Aenolania” *Revista ICA*, (2010), pp. 151, 156.

ALTIERI, Miguel, “*Agroecología: principios y estrategias para diseñar una agricultura que conserva recursos naturales y asegura la soberanía alimentaria*”, [en línea] Universidad de California, Berkeley. [Consulta: 2015-10-14]. Disponible en: http://www.mda.gov.br/sitemda/sites/sitemda/files/user_arquivos_64/Agroecologia_-_principios_y_estrategias.pdf

BARAJAS, Gerardo C; et al Morales: “Condiciones para el desarrollo de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control biológico de chapulín frijolero”. *Tecno ciencia* [en línea], vol. 3, n°1(2009) (Chihuahua), pp. 3-6. [Consulta: 2015-12-14]. Disponible en: <http://tecnociencia.uach.mx/numeros/numeros/v3n1/data/ControlBiologicodeChapulinFrijolero.pdf>

BIKANDI Joseba “Cinética de la fase exponencial de la curva de crecimiento microbiano”, *Departamento de inmunología, microbiología y parasitología facultad de farmacia* [en línea] (2015) (Vasco), pp1-3. [Consulta: 2015-10-23]. Disponible en: <http://testak.org/microbiologia/crecimiento/cinetica.pdf>

BRADLEY, Robert, “Recuento Total de Esporas Viabiles”, *Spore News* [en línea], vol.10 n°2, (2013) (USA), pp. 1-4. [Consulta: 2015-10-23]. Disponible en: <http://www.tiselab.com/spore%20news/spore%20news%2010.2.pdf>

CRISSMAN, C. “Uso de pesticidas y salud de los trabajadores agrícolas en la producción de papa en el Ecuador”. *Proyecto SICA*, (2009) (Ecuador) pp.1-8. [Consulta: 2015-10-22]. Disponible en: <http://www.sica.gov.ec/cadenas/papa/fungicidas.html>

CARRILLO, Luis. “Producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en diferentes sustratos orgánicos”. (2011) (Argentina) pp.12-20 [Consulta: 2015-10-14]. Disponible en:

<http://documents.mx/education/observacion-y-conteo-de-esporas-de-hongos-aislados-del-ambiente-aire-suelo-agua.html>

CARRANZA, Gustavo. “Evaluación en campo de la capacidad nematocida de la cepa de *Paecilomyces l* contra estadios juveniles en tierra de *Meloidoyne sp*”. (2011) (Honduras), pp.10-25. [Consulta: 2015-10-14]. Disponible en:

<http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/2125/1/T1967.pdf>

CAVALCANTE et al. “Efecto de la humedad en la producción de conidios de *Trichoderma* en maíz y salvado de trigo por fermentación en estado sólido” *Bioproceso y tecnología de alimentos* [en línea] vol.1 n° 1 (2010), (Brasil), pp. 946- 951

CAYRÉ, M.; Garo Vignolo, G. “Effect of storage temperature and gas permeability of packaging film on the growth of lactic acid bacteria and brochotrix thermosphacta in cooked meat emulsions”. *Food Microbial* [en línea], vol. 22, (2011) (USA) pp. 505- 512. [Consulta: 2015-10-14]. Disponible en:

<https://books.google.com.ec/books?id=FfnMwn5irp8C&pg=PA267&lpg=PA267&dq=Cayr%C3%A9,+M.2005&source=bl&ots=Aa3C2NidDO&sig=rPhC8RD3fBaRILM1dR9kLFkYv8&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwit5sa9mfjKAhXCdx4KHeKCBvMQ6AEIKzAC#v=onepage&q=Cayr%C3%A9%2C%20M.2005&f=false>

CASTRO Rosa. “Biotecnología en el Ecuador”. *Revista Mundo Verde*, vol.2,(2005)(Ecuador) pp. 30 -3.

CASTRO et al. “Efecto de la cepa ecuatoriana de *Trichoderma harzianum* Rifai como antagonista de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en condiciones de casa de cultivo” *Revista de protección vegetal*, vol.30, n°2 (2015), (Cuba) pp. 130- 139.

DEAQ. “Productos biológicos a base de hongos entomopatógenos”. *Diccionario de especialidades agroquímicas* [en línea], n°8 (2016) (México) [Consulta: 2016-01-14]. Disponible en: www.agroquimicos-organicosplm.com

FALCONI, Carlos. “Manual de Taxonomía de *Trichoderma* y *Paecilomyces spp*”. (2011), (Ecuador) pp. 3-40

FAO. “Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y agricultura”. *Agricultura mundial hacia los años 2015/2030* [en línea] (2015) (Italia) [Consulta: 2015-10-14]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/004/y3557s/y3557s00.htm>

FERNÁNDEZ, Rosa, “Determinación De Esporas Viabiles En Función Del Tiempo Y Temperatura De Trikofun, NemaKill, Baulkill, Methakill Y Vetik En Formulados Líquidos”. (Tesis), Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba- Ecuador, 2006. Pp. 65-83.

FERNÁNDEZ, Orietta.; Larrea Vega. *Tecnologías para la Producción de Biopesticidas a base de hongos entomopatógenos y su control de la Calidad* [en línea]. Habana Cuba. Laboratorio de Hongos Entomopatógenos INISAV, [Consulta: 2015-10-14]. Disponible en: <http://www.aguascalientes.gob.mx/codagea/produce/HONG-ENT.htm>

FERNANDEZ, C.; LARREA, A. *Los plaguicidas adsorción y evolución en el suelo* [en línea]. Edición electrónica promovida por CeresNet. [Consulta: 2015-10-14]. Disponible en: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/12919/1/plaguicidas.pdf>

FERNÁNDEZ, C.; JUNCOSA, R. “Biopesticidas: La Agricultura Del Futuro”. *FuturEco* [en línea] (2012) (Barcelona) pp. 2-6. [Consulta: 2015-10-14]. Disponible en: <https://infixica2.files.wordpress.com/2010/01/1-12-biopesticidas-c2bf-la-agricultura-del-futuro.pdf>

FRANCE, Andrés. “Formulaciones de hongos entomopatógenos para control de plagas en agricultura”. *Tierra adentro* [en línea], vol.2, (2010), p. 46. [Consulta: 2016-01-14]. Disponible en: <http://www2.inia.cl/medios/quilamapu/pdf/tadentro/TA77ND0207.pdf>

GATO, Yohana. “Métodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum rifai* “. *Fitosanidad* [en línea], 2010, (Cuba) vol. 14 (nº3), pp. 1997-2015 [Consulta: 2015-12-14]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1562-30092010000300008&script=sci_arttext

GONZÁLES, Pau, *Riesgos químicos por uso de plaguicidas en el medio ambiente* [en línea]. [Consulta: 2016-01-14]. Disponible en: http://www.ccoo.cat/fsap/s_gene/ccoogene/salut/riesgosma.pdf

GÓNGORA, B.; MARÍN, Patricia. *Claves para el éxito del hongo Beauveria bassiana como controlador biológico de la broca del café.* (2013)(Colombia) [Consulta: 2015-12-14]. Disponible en: <http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/346/1/avt0384.pdf>

GUÉDEZ, Clemencia. “Control Biológico: Una Herramienta para el Desarrollo Sustentable y Sostenible”. *ACADEMIA – Trujillo* ISSN 1690-3226- Enero – Junio [en línea] Vol. 7. (2008) (Venezuela). [Consulta: 2015-10-12]. Disponible en: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/29752/1/articulo5.pdf>

HARMAN, Gary. "Descripción general de los mecanismos y usos de *Trichoderma sp*" *Fitopatología*, vol. 96, n° 2 (2010) (EEUU) pp. 190-195

INFANTE, Danay; et al. Reyes. "Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos". *Revista de Protección Vegeta Scielo*. [en línea], 2010 (Cuba) vol. 24 (n°1), pp.18-19 [Consulta: 2015-01-14]. Disponible en:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522009000100002&script=sci_arttext

SALTERAIN, Pedro, *Agrotóxicos hasta en la sopa* [en línea]. Montevideo: n°12, 2013 [Consulta: 2015-01-14]. Disponible en: <http://www.ecocomunidad.org.uy/ecosur/txt/agrotoxicos.htm>

SIVILA, NANCY.; Álvarez Susana. "Producción artesanal de *Trichoderma harzianum* Jujuy". *Tecnologías agroecológicas para la agricultura familiar*, [en línea] 201, pp. 25-45 [Consulta: 2015-10-14]. Disponible en:
http://www.minagri.gob.ar/site/desarrollo_rural/forobioinsumos/publicaciones/Manual_de_Trichoderma_2013_CEDAF_Jujuy.pdf

KONONOVA, E. "Selection of comercial strains of the fungus *Beauveria bassiana*". *Proceeding First Join US/URSS Conference Kiju*:173-191.pp.13-14.[Consulta: 2015-10-14]. Disponible en:
<http://eprints.uanl.mx/2799/1/1080227487.pdf>

KREDICS, Antal. "Influence of Environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. Food Technology and Biotechnology". *Manczinger, Szekeres, Kevei and Nagy*. vol 41 n° 1 p. 37 – 42.

MARTÍNEZ, Carlos. "Desarrollo de un prototipo de formulación con hongos entomopatógenos para el manejo de demotispa neivai Bondar Coleoptera: Chrysomelidae. [en línea](maestria) Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía, Escuela de Posgrado. Bogota (2010),pp. 34-42 [Consulta: 2015-10-14]. Disponible en:
<http://www.bdigital.unal.edu.co/2722/1/luiscarlosmartinezcastrillon.2010.pdf>

MOORE LANDECKER, E. *Fundamentals of the fungi*. Ed. Prentice Hall. New Jersey.1996 pp 574.

MONTE, Vázquez,; &GARCÍA, Enrique. *Formulación líquida a base de cepas de los hongos filamentosos *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride**, [blog]. España. [Consulta: 2015-12-14]. Disponible en: http://www.espatentes.com/pdf/2109182_a1.pdf

MONZÓN Arnulfo. “Producción y uso de hongos entomopatógenos”. *Funica CATIE*, volumen 1, (2010), (Nicaragua), p, 28. [Consulta: 2015-12-14]. Disponible en: <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A0949e/A0949e.pdf>

OTERO SÁNCHEZ, “producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en diferentes sustratos orgánicos” Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero, México. 2005. [Consulta: 2015-12-14]. Disponible en: <file:///C:/Users/Server/Downloads/rchshXIV23.pdf>

PESÁNTEZ, M. Fichas Técnicas. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Laboratorio de Fitopatología. MIKROBEN 2015

PÉREZ, Víctor, *Control biológico de plagas y enfermedades vegetales*. [blog]. España. [Consulta: 2015-12-14]. Disponible en: <http://sgitt-otri.ua.es/es/empresa/documentos/ot-0811-control-biologico-de-plagas.pdf>

RAKHOLIYA, K. “La eficacia de los fungicidas contra *Trichoderma harzianum* y *Sclerotium rolfsii*”. *Revista de Protección Fitosanitaria*, vol. n°2 (2010), (India) pp. 406- 407.

RIECHMANN, Jorge. *Desarrollo sostenible: la lucha por la interpretación*. [blog]. Madrid 2010 [Consulta: 2015-12-14]. Disponible en: <http://www.ambiente.gov.ar/infotecaea/descargas/riechman01.pdf>

SANTOS, Adriana.; GARCÍA, Magda.; COTES, Alba.; VILLAMIZAR, Laura. “Efecto de la formulación sobre la vida útil de bioplaguicidas a base de dos aislamientos colombianos de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y *Trichoderma asperellum* Th034”. *Revista Iberoamericana de Micología, Rev Iberoam Micol.* [en línea]. 2012; 29(3) pp.1-7, [Consulta: 2015-10-24]. Disponible en: <http://www.reviberoammicol.com/2012-29/150156.pdf>

TRABANINO, Rogelio. Efectos de la aplicación de *Paecilomyces lilacinus* en el control de *Meloidogyne spp* en peino. [en línea] (Tesis) (Doctoral) corporación Suiza para el desarrollo COSUDE, Honduras. 2010. pp. 13-14 Consulta: 2015-10-24]. Disponible en: <http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/2125/1/T1967.pdf>

TIJERINO, Anamariela. Aislamiento, caracterización y análisis funcional del gen Tbt15 de *Trichoderma brevicompactum* [en línea] (Tesis) (Doctoral) Universidad de Salamanca, Ciencias Biosanitarias Departamento de Microbiología y Genética Salamanca, España. 2010. Pp. 4-23 [Consulta: 2015-10-24]. Disponible en: <http://gedos.usal.es/jspui/handle/10366/83191.pdf>

THOM, SAMSON. Selection of isolates of *Paecilomyces lilacinus* Samson to control *Meloidogyne paranaensis* in tomato. [blog], [Consulta: 2015-10-24]. Disponible en: www.mycobank.org/name/Paecilomyces%20lilacinus

VÁSQUEZ M., JANET ALFONSO. Guía Ilustrada sobre Manejo Agroecológicos de Organismos Nocivos. Primera edición, la habana 2013. pp. 7-15

VÁZQUEZ ROMERO, Gloria. Biotecnología generalidades, riesgos y beneficios. [blog] [Consulta: 2015-10-24]. Disponible en: <http://www2.uned.es/experto-biotecnologia-alimentos/TrabajosSelecc/GloriaRomero.pdf>

VARGAS BLANCO, DIEGO ALONSO, Evaluación de la viabilidad en el tiempo para muestras de esporas puras y en formulación líquida de *Paecilomyces lilacinus*. (Tesis) Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Carrera de Microbiología Industrial. BOGOTÁ, D.C. 2011. pp. 53-54. [Consulta: 2015-10-14]. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis226.pdf>

VERMA et al. “Hongos antagonistas, *Trichoderma sp*, *Paecilomyces sp* y *Baeuveria sp* en el control biológico de *Panoplia*” *Biochemical engineering Journal* [en línea], (2007) pp 1-34. [Consulta: 2015-10-14]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X07001994>

ANEXOS

Anexos A. Conteo de esporas viables del bioformulado TRIKOFUN A 4⁰C

| Tiempo (Días) | R1 | R2 | R3 | Media | log UFC/mL |
|---------------|----------|----------|----------|----------|------------|
| 0 | 1,00E+09 | 1,10E+09 | 1,20E+09 | 1,10E+09 | 9,04 |
| 3 | 1,05E+09 | 1,2E+09 | 1,1E+09 | 1,12E+09 | 9,05 |
| 6 | 1E+09 | 1,2E+09 | 1,15E+09 | 1,12E+09 | 9,05 |
| 9 | 1,1E+09 | 1,25E+09 | 1,65E+09 | 1,33E+09 | 9,12 |
| 12 | 1,7E+09 | 1,45E+09 | 1,4E+09 | 1,52E+09 | 9,18 |
| 15 | 1,65E+09 | 1,7E+09 | 1,45E+09 | 1,60E+09 | 9,20 |
| 18 | 1,55E+09 | 2,1E+09 | 1,5E+09 | 1,72E+09 | 9,23 |
| 21 | 1,9E+09 | 1,95E+09 | 1,75E+09 | 1,87E+09 | 9,27 |
| 24 | 1,85E+09 | 1,95E+09 | 1,9E+09 | 1,90E+09 | 9,28 |
| 27 | 1,85E+09 | 2,3E+09 | 1,95E+09 | 2,03E+09 | 9,31 |
| 30 | 1,95E+09 | 2E+09 | 2,4E+09 | 2,12E+09 | 9,33 |
| 33 | 2,1E+09 | 2,45E+09 | 2,05E+09 | 2,20E+09 | 9,34 |
| 36 | 2,3E+09 | 2,1E+09 | 2,4E+09 | 2,27E+09 | 9,36 |
| 39 | 2,25E+09 | 2,35E+09 | 2,5E+09 | 2,37E+09 | 9,37 |
| 42 | 2,3E+09 | 2,5E+09 | 2,35E+09 | 2,38E+09 | 9,38 |
| 45 | 2,45E+09 | 2,3E+09 | 2,55E+09 | 2,43E+09 | 9,39 |
| 48 | 2,6E+09 | 2,3E+09 | 2,55E+09 | 2,48E+09 | 9,40 |
| 51 | 2,45E+09 | 2,45E+09 | 2,6E+09 | 2,50E+09 | 9,40 |
| 54 | 2,55E+09 | 2,75E+09 | 2,25E+09 | 2,52E+09 | 9,40 |
| 57 | 2,55E+09 | 2,6E+09 | 2,4E+09 | 2,52E+09 | 9,40 |
| 60 | 2,5E+09 | 2,65E+09 | 2,3E+09 | 2,48E+09 | 9,40 |
| 63 | 2,25E+09 | 2,6E+09 | 2,6E+09 | 2,48E+09 | 9,40 |
| 66 | 2,45E+09 | 2,4E+09 | 2,6E+09 | 2,48E+09 | 9,40 |
| 69 | 2,4E+09 | 2,35E+09 | 2,7E+09 | 2,48E+09 | 9,40 |
| 72 | 2,2E+09 | 2,65E+09 | 2,6E+09 | 2,48E+09 | 9,40 |
| 75 | 2,25E+09 | 2,5E+09 | 2,8E+09 | 2,52E+09 | 9,40 |
| 78 | 2,35E+09 | 2,4E+09 | 2,7E+09 | 2,48E+09 | 9,40 |
| 81 | 2,5E+09 | 2,4E+09 | 2,65E+09 | 2,52E+09 | 9,40 |
| 84 | 2,5E+09 | 2,5E+09 | 2,4E+09 | 2,47E+09 | 9,39 |
| 87 | 2,45E+09 | 2,4E+09 | 2,4E+09 | 2,42E+09 | 9,38 |
| 90 | 2,65E+09 | 2E+09 | 2,4E+09 | 2,35E+09 | 9,37 |
| 93 | 2,15E+09 | 2E+09 | 2,4E+09 | 2,18E+09 | 9,34 |
| 96 | 1,35E+09 | 2E+09 | 1,65E+09 | 1,67E+09 | 9,22 |

R1: Conteo de esporas viables repetición uno

R2: Conteo de esporas viables repetición dos

R3: Conteo de esporas viables repetición tres

Anexos B. Conteo de esporas viables del bioformulado TRIKOFUN A 18⁰C

| Tiempo (Días) | R1 | R2 | R3 | Media | Log (UFC/ml) |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|--------------|---------------------|
| 0 | 1,7E+09 | 1,21E+09 | 1,60E+09 | 1,50E+09 | 9,18 |
| 3 | 1,6E+09 | 1,5E+09 | 1,7E+09 | 1,57E+09 | 9,19 |
| 6 | 1,7E+09 | 1,9E+09 | 1,7E+09 | 1,67E+09 | 9,22 |
| 9 | 1,7E+09 | 1,7E+09 | 1,7E+09 | 1,67E+09 | 9,22 |
| 12 | 1,95E+09 | 1,75E+09 | 1,9E+09 | 1,87E+09 | 9,27 |
| 15 | 1,85E+09 | 2,1E+09 | 1,95E+09 | 1,97E+09 | 9,29 |
| 18 | 1,95E+09 | 2,1E+09 | 2E+09 | 2,02E+09 | 9,30 |
| 21 | 2,2E+09 | 1,95E+09 | 2,05E+09 | 2,07E+09 | 9,32 |
| 24 | 2,2E+09 | 2,35E+09 | 1,95E+09 | 2,17E+09 | 9,34 |
| 27 | 2,35E+09 | 2,15E+09 | 2,2E+09 | 2,23E+09 | 9,35 |
| 30 | 2,35E+09 | 2,4E+09 | 2,2E+09 | 2,32E+09 | 9,36 |
| 33 | 2,35E+09 | 2,55E+09 | 2,45E+09 | 2,45E+09 | 9,39 |
| 36 | 2,65E+09 | 2,45E+09 | 2,55E+09 | 2,55E+09 | 9,41 |
| 39 | 2,7E+09 | 2,6E+09 | 2,65E+09 | 2,65E+09 | 9,42 |
| 42 | 2,75E+09 | 2,7E+09 | 2,8E+09 | 2,75E+09 | 9,44 |
| 45 | 2,95E+09 | 2,65E+09 | 3E+09 | 2,87E+09 | 9,46 |
| 48 | 3,1E+09 | 3,15E+09 | 2,65E+09 | 2,97E+09 | 9,47 |
| 51 | 3,15E+09 | 3,15E+09 | 2,95E+09 | 3,08E+09 | 9,49 |
| 54 | 3,1E+09 | 3,25E+09 | 3,3E+09 | 3,22E+09 | 9,51 |
| 57 | 3,4E+09 | 3,1E+09 | 3,2E+09 | 3,23E+09 | 9,51 |
| 60 | 3,25E+09 | 3,4E+09 | 3,45E+09 | 3,37E+09 | 9,53 |
| 63 | 3,65E+09 | 3,4E+09 | 3,3E+09 | 3,45E+09 | 9,54 |
| 66 | 3,55E+09 | 3,4E+09 | 3,65E+09 | 3,53E+09 | 9,55 |
| 69 | 3,45E+09 | 3,55E+09 | 3,6E+09 | 3,53E+09 | 9,55 |
| 72 | 3,9E+09 | 3,1E+09 | 3,7E+09 | 3,57E+09 | 9,55 |
| 75 | 3,6E+09 | 3,65E+09 | 3,35E+09 | 3,53E+09 | 9,55 |
| 78 | 3,6E+09 | 3,45E+09 | 3,75E+09 | 3,6E+09 | 9,56 |
| 81 | 3,35E+09 | 3,7E+09 | 3,75E+09 | 3,6E+09 | 9,56 |
| 84 | 3,55E+09 | 3,6E+09 | 3,65E+09 | 3,6E+09 | 9,56 |
| 87 | 3,5E+09 | 3,6E+09 | 3,8E+09 | 3,63E+09 | 9,56 |
| 90 | 3,5E+09 | 3,7E+09 | 3,6E+09 | 3,6E+09 | 9,56 |
| 93 | 2,4E+09 | 2,4E+09 | 1,65E+09 | 2,15E+09 | 9,33 |
| 96 | 1,45E+09 | 1,65E+09 | 1,55E+09 | 1,55E+09 | 9,19 |

R1: Conteo de esporas viables repetición uno

R2: Conteo de esporas viables repetición dos

R3: Conteo de esporas viables repetición tres

Anexos C. Conteo de esporas viables del bioformulado TRIKOFUN A 22⁰C

| Tiempo (Días) | R1 | R2 | R3 | Media | Log (UFC/ml) |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|--------------|---------------------|
| 0 | 1,80E+09 | 1,50E+09 | 1,50E+09 | 1,60E+09 | 9,20 |
| 3 | 1,55E+09 | 1,6E+09 | 1,55E+09 | 1,57E+09 | 9,19 |
| 6 | 1,55E+09 | 1,65E+09 | 1,6E+09 | 1,60E+09 | 9,20 |
| 9 | 1,7E+09 | 1,8E+09 | 2E+09 | 1,83E+09 | 9,26 |
| 12 | 2,05E+09 | 2,2E+09 | 1,65E+09 | 1,97E+09 | 9,29 |
| 15 | 2,05E+09 | 2E+09 | 2E+09 | 2,02E+09 | 9,30 |
| 18 | 2,05E+09 | 2,1E+09 | 2,3E+09 | 2,15E+09 | 9,33 |
| 21 | 2,25E+09 | 2,35E+09 | 2,35E+09 | 2,32E+09 | 9,36 |
| 24 | 2,35E+09 | 2,4E+09 | 2,4E+09 | 2,38E+09 | 9,38 |
| 27 | 2,7E+09 | 2,65E+09 | 2,2E+09 | 2,52E+09 | 9,40 |
| 30 | 2,95E+09 | 2,75E+09 | 2,4E+09 | 2,70E+09 | 9,43 |
| 33 | 3E+09 | 3,05E+09 | 2,5E+09 | 2,85E+09 | 9,45 |
| 36 | 3,25E+09 | 3,15E+09 | 2,6E+09 | 3,00E+09 | 9,48 |
| 39 | 3,25E+09 | 3,15E+09 | 2,6E+09 | 3,00E+09 | 9,48 |
| 42 | 3,25E+09 | 3,15E+09 | 2,6E+09 | 3,00E+09 | 9,48 |
| 45 | 3,25E+09 | 3,15E+09 | 2,6E+09 | 3,00E+09 | 9,48 |
| 48 | 3,4E+09 | 3,3E+09 | 2,75E+09 | 3,15E+09 | 9,50 |
| 51 | 3,35E+09 | 3,3E+09 | 2,8E+09 | 3,15E+09 | 9,50 |
| 54 | 3,55E+09 | 3,15E+09 | 2,8E+09 | 3,17E+09 | 9,50 |
| 57 | 3,25E+09 | 3,65E+09 | 2,6E+09 | 3,17E+09 | 9,50 |
| 60 | 3,2E+09 | 3,1E+09 | 3,1E+09 | 3,13E+09 | 9,50 |
| 63 | 3,4E+09 | 3,15E+09 | 2,9E+09 | 3,15E+09 | 9,50 |
| 66 | 3,35E+09 | 3E+09 | 3,1E+09 | 3,15E+09 | 9,50 |
| 69 | 3,2E+09 | 3,2E+09 | 3,05E+09 | 3,15E+09 | 9,50 |
| 72 | 3,25E+09 | 3,2E+09 | 2,95E+09 | 3,13E+09 | 9,50 |
| 75 | 3,15E+09 | 3,15E+09 | 2,8E+09 | 3,03E+09 | 9,48 |
| 78 | 3,1E+09 | 3E+09 | 2,8E+09 | 2,97E+09 | 9,47 |
| 81 | 3E+09 | 2,9E+09 | 2,75E+09 | 2,88E+09 | 9,46 |
| 84 | 2,9E+09 | 2,9E+09 | 2,55E+09 | 2,78E+09 | 9,44 |
| 87 | 2,55E+09 | 2,65E+09 | 2,95E+09 | 2,72E+09 | 9,43 |
| 90 | 2,8E+09 | 2,65E+09 | 2,55E+09 | 2,67E+09 | 9,43 |
| 93 | 2,3E+09 | 2,45E+09 | 2,1E+09 | 2,28E+09 | 9,36 |
| 96 | 2,2E+09 | 1,85E+09 | 2,05E+09 | 2,03E+09 | 9,31 |

R1: Conteo de esporas viables repetición uno

R2: Conteo de esporas viables repetición dos

R3: Conteo de esporas viables repetición tres

Anexos D. Porcentaje de viabilidad del bioformulado TRIKOFUN A 4⁰C

| Tiempo (Días) | R1 | | | R2 | | | R3 | | | %Total |
|------------------|-----|-----|-------|-----|-----|-------|-----|-----|-------|--------|
| | EG | NoG | %T1 | EG | NoG | %T2 | EG | NoG | %T3 | |
| 0 | 100 | 0 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 |
| 3 | 946 | 24 | 97,46 | 926 | 22 | 97,62 | 986 | 26 | 97,36 | 97,48 |
| 6 | 756 | 31 | 95,90 | 736 | 29 | 96,06 | 776 | 33 | 95,75 | 95,90 |
| 9 | 470 | 26 | 94,47 | 450 | 24 | 94,67 | 490 | 28 | 94,29 | 94,47 |
| 12 | 256 | 15 | 94,14 | 236 | 13 | 94,49 | 276 | 17 | 93,84 | 94,16 |
| 15 | 309 | 21 | 93,20 | 289 | 19 | 93,43 | 239 | 23 | 90,38 | 92,34 |
| 18 | 485 | 37 | 92,37 | 465 | 35 | 92,47 | 505 | 39 | 92,28 | 92,37 |
| 21 | 451 | 39 | 91,35 | 431 | 37 | 91,42 | 471 | 41 | 91,30 | 91,35 |
| 24 | 213 | 23 | 89,20 | 293 | 21 | 92,83 | 233 | 25 | 89,27 | 90,44 |
| 27 | 309 | 35 | 88,67 | 289 | 33 | 88,58 | 329 | 37 | 88,75 | 88,67 |
| 30 | 401 | 52 | 87,03 | 381 | 50 | 86,88 | 421 | 54 | 87,17 | 87,03 |
| 33 | 347 | 52 | 85,01 | 327 | 50 | 84,71 | 367 | 54 | 85,29 | 85,00 |
| 36 | 279 | 48 | 82,80 | 259 | 46 | 82,24 | 299 | 50 | 83,28 | 82,77 |
| 39 | 200 | 40 | 80,00 | 180 | 38 | 78,89 | 220 | 42 | 80,91 | 79,93 |
| 42 | 156 | 34 | 78,21 | 136 | 32 | 76,47 | 176 | 36 | 79,55 | 78,07 |
| 45 | 138 | 29 | 78,99 | 118 | 27 | 77,12 | 158 | 31 | 80,38 | 78,83 |
| 48 | 210 | 46 | 78,10 | 190 | 44 | 76,84 | 230 | 48 | 79,13 | 78,02 |
| 51 | 271 | 61 | 77,49 | 251 | 59 | 76,49 | 291 | 63 | 78,35 | 77,45 |
| 54 | 271 | 64 | 76,38 | 251 | 62 | 75,30 | 291 | 66 | 77,32 | 76,33 |
| 57 | 185 | 45 | 75,68 | 165 | 43 | 73,94 | 205 | 47 | 77,07 | 75,56 |
| 60 | 132 | 39 | 70,45 | 162 | 45 | 72,22 | 142 | 34 | 76,06 | 72,91 |

EG: Esporas Germinates

NoG: Esporas no Germinadas

%T: Porcentaje de esporas germinadas y no germinadas por 100

Anexos F. Porcentaje de viabilidad del bioformulado TRIKOFUN A 18°C

| Tiempo (Días) | R1 | | | R2 | | | R3 | | | %Total |
|------------------|-----|-----|-------|-----|-----|-------|-----|-----|-------|--------|
| | EG | NoG | %T1 | EG | NoG | %T2 | EG | NoG | %T3 | |
| 0 | 100 | 0 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 |
| 3 | 736 | 6 | 99,18 | 722 | 8 | 98,89 | 740 | 7 | 99,05 | 99,04 |
| 6 | 629 | 5 | 99,21 | 614 | 6 | 99,02 | 630 | 9 | 98,57 | 98,93 |
| 9 | 742 | 10 | 98,65 | 798 | 9 | 98,87 | 821 | 10 | 98,78 | 98,77 |
| 12 | 478 | 7 | 98,54 | 486 | 6 | 98,77 | 508 | 9 | 98,23 | 98,51 |
| 15 | 534 | 9 | 98,31 | 514 | 7 | 98,64 | 554 | 11 | 98,01 | 98,32 |
| 18 | 620 | 11 | 98,23 | 600 | 9 | 98,50 | 640 | 13 | 97,97 | 98,23 |
| 21 | 588 | 14 | 97,62 | 568 | 12 | 97,89 | 608 | 16 | 97,37 | 97,62 |
| 24 | 647 | 22 | 96,60 | 627 | 20 | 96,81 | 667 | 24 | 96,40 | 96,60 |
| 27 | 110 | 8 | 92,73 | 90 | 6 | 93,33 | 130 | 10 | 92,31 | 92,79 |
| 30 | 119 | 9 | 92,44 | 99 | 7 | 92,93 | 149 | 11 | 92,62 | 92,66 |
| 33 | 460 | 36 | 92,17 | 440 | 34 | 92,27 | 480 | 38 | 92,08 | 92,18 |
| 36 | 386 | 32 | 91,71 | 366 | 30 | 91,80 | 406 | 34 | 91,63 | 91,71 |
| 39 | 428 | 40 | 90,65 | 408 | 38 | 90,69 | 448 | 42 | 90,63 | 90,66 |
| 42 | 288 | 32 | 88,89 | 268 | 30 | 88,81 | 308 | 34 | 88,96 | 88,89 |
| 45 | 564 | 70 | 87,59 | 544 | 68 | 87,50 | 584 | 72 | 87,67 | 87,59 |
| 48 | 430 | 60 | 86,05 | 410 | 58 | 85,85 | 450 | 62 | 86,22 | 86,04 |
| 51 | 286 | 40 | 86,01 | 266 | 42 | 84,21 | 306 | 42 | 86,27 | 85,50 |
| 54 | 158 | 26 | 83,54 | 138 | 24 | 82,61 | 178 | 28 | 84,27 | 83,47 |
| 57 | 147 | 27 | 81,63 | 127 | 25 | 80,31 | 167 | 29 | 82,63 | 81,53 |
| 60 | 127 | 32 | 74,80 | 147 | 32 | 78,23 | 156 | 34 | 78,21 | 77,08 |

EG: Esporas Germinates

NoG: Esporas no Germinadas

%T: Porcentaje de esporas germinadas y no germinadas por 100

Anexos G. Porcentaje de viabilidad del bioformulado TRIKOFUN A 22⁰C

| Tiempo (Dias) | R1 | | | R2 | | | R3 | | | %Total |
|------------------|-----|-----|-------|-----|-----|-------|-----|-----|-------|--------|
| | EG | NoG | %T1 | EG | NoG | %T2 | EG | NoG | %T3 | |
| 0 | 100 | 0 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 |
| 3 | 698 | 11 | 98,42 | 678 | 9 | 98,67 | 718 | 13 | 98,19 | 98,43 |
| 6 | 457 | 12 | 97,37 | 437 | 10 | 97,71 | 477 | 14 | 97,06 | 97,38 |
| 9 | 501 | 18 | 96,41 | 481 | 16 | 96,67 | 521 | 20 | 96,16 | 96,41 |
| 12 | 436 | 18 | 95,87 | 416 | 16 | 96,15 | 456 | 20 | 95,61 | 95,88 |
| 15 | 362 | 17 | 95,30 | 342 | 15 | 95,61 | 382 | 19 | 95,03 | 95,31 |
| 18 | 274 | 13 | 95,26 | 254 | 11 | 95,67 | 294 | 15 | 94,90 | 95,27 |
| 21 | 212 | 13 | 93,87 | 192 | 11 | 94,27 | 231 | 15 | 93,51 | 93,88 |
| 24 | 422 | 29 | 93,13 | 402 | 27 | 93,28 | 442 | 31 | 92,99 | 93,13 |
| 27 | 532 | 37 | 93,05 | 512 | 35 | 93,16 | 552 | 39 | 92,93 | 93,05 |
| 30 | 332 | 24 | 92,77 | 312 | 22 | 92,95 | 352 | 26 | 92,61 | 92,78 |
| 33 | 159 | 14 | 91,19 | 139 | 12 | 91,37 | 179 | 16 | 91,06 | 91,21 |
| 36 | 376 | 34 | 90,96 | 356 | 32 | 91,01 | 396 | 36 | 90,91 | 90,96 |
| 39 | 180 | 18 | 90,00 | 160 | 16 | 90,00 | 200 | 20 | 90,00 | 90,00 |
| 42 | 214 | 23 | 89,25 | 194 | 21 | 89,18 | 234 | 25 | 89,32 | 89,25 |
| 45 | 302 | 34 | 88,74 | 282 | 32 | 88,65 | 322 | 36 | 88,82 | 88,74 |
| 48 | 218 | 24 | 88,99 | 198 | 22 | 88,89 | 238 | 26 | 89,08 | 88,99 |
| 51 | 189 | 23 | 87,83 | 169 | 21 | 87,57 | 209 | 25 | 88,04 | 87,81 |
| 54 | 163 | 23 | 85,89 | 143 | 21 | 85,31 | 183 | 25 | 86,34 | 85,85 |
| 57 | 254 | 37 | 85,43 | 234 | 35 | 85,04 | 274 | 39 | 85,77 | 85,41 |
| 60 | 201 | 35 | 82,59 | 217 | 38 | 82,49 | 286 | 35 | 87,76 | 84,28 |

EG: Esporas Germinates

NoG: Esporas no Germinadas

%T: Porcentaje de esporas germinadas y no germinadas por 100

Anexos H. Conteo de esporas viables del bioformulado NEMAKILL A 4⁰C

| Tiempo (Días) | R1 | R2 | R3 | Media | Log (UFC/mL) |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|--------------|---------------------|
| 0 | 1,30E+09 | 1,20E+08 | 1,50E+09 | 9,73E+08 | 8,99 |
| 3 | 1E+09 | 9,5E+08 | 1,05E+09 | 1E+09 | 9,00 |
| 6 | 9E+08 | 9,5E+08 | 1,1E+09 | 9,83E+09 | 8,99 |
| 9 | 1,1E+09 | 1,05E+09 | 1,15E+09 | 1,08E+09 | 9,03 |
| 12 | 1E+09 | 1,15E+09 | 1,15E+09 | 1,10E+09 | 9,04 |
| 15 | 1,25E+09 | 1,3E+09 | 1,35E+09 | 1,30E+09 | 9,11 |
| 18 | 1,6E+09 | 1,6E+09 | 1,55E+09 | 1,58E+09 | 9,20 |
| 21 | 1,55E+09 | 1,85E+09 | 1,7E+09 | 1,7E+09 | 9,23 |
| 24 | 1,95E+09 | 1,75E+09 | 1,5E+09 | 1,73E+09 | 9,24 |
| 27 | 1,9E+09 | 1,8E+09 | 2,05E+09 | 1,92E+09 | 9,28 |
| 30 | 2,05E+09 | 1,95E+09 | 2,05E+09 | 2,02E+09 | 9,30 |
| 33 | 2,05E+09 | 2E+09 | 2,05E+09 | 2,03E+09 | 9,31 |
| 36 | 2,3E+09 | 1,9E+09 | 2,1E+09 | 2,1E+09 | 9,32 |
| 39 | 2,3E+09 | 2E+09 | 2,1E+09 | 2,13E+09 | 9,33 |
| 42 | 2,15E+09 | 2,1E+09 | 2,35E+09 | 2,2E+09 | 9,34 |
| 45 | 2,25E+09 | 2,2E+09 | 2,3E+09 | 2,25E+09 | 9,35 |
| 48 | 2,35E+09 | 2,25E+09 | 2,25E+09 | 2,28E+09 | 9,36 |
| 51 | 2,25E+09 | 2,3E+09 | 2,3E+09 | 2,28E+09 | 9,36 |
| 54 | 2,1E+09 | 2,35E+09 | 2,4E+09 | 2,28E+09 | 9,36 |
| 57 | 2,45E+09 | 2,3E+09 | 2,15E+09 | 2,3E+09 | 9,36 |
| 60 | 2,2E+09 | 2,15E+09 | 2,5E+09 | 2,28E+09 | 9,36 |
| 63 | 2,3E+09 | 2,15E+09 | 2,45E+09 | 2,3E+09 | 9,36 |
| 66 | 2,4E+09 | 2,05E+09 | 2,4E+09 | 2,28E+09 | 9,36 |
| 69 | 2,1E+09 | 2,35E+09 | 2,4E+09 | 2,28E+09 | 9,36 |
| 72 | 2,35E+09 | 2,15E+09 | 2,35E+09 | 2,28E+09 | 9,36 |
| 75 | 2,25E+09 | 2,3E+09 | 2,35E+09 | 2,3E+09 | 9,36 |
| 78 | 2,2E+09 | 2,2E+09 | 2,45E+09 | 2,28E+09 | 9,36 |
| 81 | 2,25E+09 | 2,15E+09 | 2,45E+09 | 2,28E+09 | 9,36 |
| 84 | 2,15E+09 | 2,2E+09 | 2,05E+09 | 2,13E+09 | 9,33 |
| 87 | 2,05E+09 | 2,2E+09 | 2E+09 | 2,08E+09 | 9,32 |
| 90 | 1,95E+09 | 2,15E+09 | 2E+09 | 2,03E+09 | 9,31 |
| 93 | 1,9E+09 | 1,8E+09 | 1,95E+09 | 1,88E+09 | 9,27 |
| 96 | 1,45E+09 | 1,6E+09 | 1E+09 | 1,35E+09 | 9,13 |

R1: Conteo de esporas viables repetición uno

R2: Conteo de esporas viables repetición dos

R3: Conteo de esporas viables repetición tres

Anexos I. Conteo de esporas viables del bioformulado NEMAKILL A 18⁰C

| Tiempo (Días) | R1 | R2 | R3 | Media | Log UFC/mL |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|--------------|-------------------|
| 0 | 1,20E+09 | 1,30E+09 | 1,10E+09 | 1,20E+09 | 9,08 |
| 3 | 1,2E+09 | 1,35E+09 | 1,25E+09 | 1,27E+09 | 9,10 |
| 6 | 1,4E+09 | 1,05E+09 | 1,35E+09 | 1,27E+09 | 9,10 |
| 9 | 1,25E+09 | 1,2E+09 | 1,2E+09 | 1,22E+09 | 9,09 |
| 12 | 1,6E+09 | 1,85E+09 | 1,45E+09 | 1,63E+09 | 9,21 |
| 15 | 1,5E+09 | 1,95E+09 | 1,65E+09 | 1,70E+09 | 9,23 |
| 18 | 1,7E+09 | 1,95E+09 | 1,75E+09 | 1,80E+09 | 9,26 |
| 21 | 1,7E+09 | 2,05E+09 | 1,75E+09 | 1,83E+09 | 9,26 |
| 24 | 1,95E+09 | 2,2E+09 | 1,85E+09 | 2,00E+09 | 9,30 |
| 27 | 1,8E+09 | 2,2E+09 | 2,15E+09 | 2,05E+09 | 9,31 |
| 30 | 2,1E+09 | 1,75E+09 | 2,45E+09 | 2,10E+09 | 9,32 |
| 33 | 2,45E+09 | 2,05E+09 | 2,15E+09 | 2,22E+09 | 9,35 |
| 36 | 2,3E+09 | 2,15E+09 | 2,3E+09 | 2,25E+09 | 9,35 |
| 39 | 2,3E+09 | 2,5E+09 | 2,15E+09 | 2,32E+09 | 9,36 |
| 42 | 2,35E+09 | 2,25E+09 | 2,4E+09 | 2,33E+09 | 9,37 |
| 45 | 2,3E+09 | 2,4E+09 | 2,35E+09 | 2,35E+09 | 9,37 |
| 48 | 2,4E+09 | 2,4E+09 | 2,25E+09 | 2,35E+09 | 9,37 |
| 51 | 2,35E+09 | 2,45E+09 | 2,3E+09 | 2,37E+09 | 9,37 |
| 54 | 2,3E+09 | 2,55E+09 | 2,25E+09 | 2,37E+09 | 9,37 |
| 57 | 2,4E+09 | 2,4E+09 | 2,3E+09 | 2,37E+09 | 9,37 |
| 60 | 2,25E+09 | 2,4E+09 | 2,45E+09 | 2,37E+09 | 9,37 |
| 63 | 2,5E+09 | 2,4E+09 | 2,25E+09 | 2,38E+09 | 9,38 |
| 66 | 2,5E+09 | 2,3E+09 | 2,35E+09 | 2,38E+09 | 9,38 |
| 69 | 2,3E+09 | 2,45E+09 | 2,5E+09 | 2,42E+09 | 9,38 |
| 72 | 2,3E+09 | 2,5E+09 | 2,4E+09 | 2,40E+09 | 9,38 |
| 75 | 2,3E+09 | 2,4E+09 | 2,45E+09 | 2,38E+09 | 9,38 |
| 78 | 2,55E+09 | 2,3E+09 | 2,45E+09 | 2,43E+09 | 9,39 |
| 81 | 2,35E+09 | 2,3E+09 | 2,2E+09 | 2,28E+09 | 9,36 |
| 84 | 2,15E+09 | 2,1E+09 | 2,45E+09 | 2,23E+09 | 9,35 |
| 87 | 1,85E+09 | 1,35E+09 | 2,55E+09 | 1,92E+09 | 9,28 |
| 90 | 1,95E+09 | 1,6E+09 | 1,8E+09 | 1,78E+09 | 9,25 |
| 93 | 1,55E+09 | 1,65E+09 | 1,6E+09 | 1,60E+09 | 9,20 |
| 96 | 1,1E+09 | 1,15E+09 | 1,25E+09 | 1,17E+09 | 9,07 |

R1: Conteo de esporas viables repetición uno

R2: Conteo de esporas viables repetición dos

R3: Conteo de esporas viables repetición tres

Anexos J. Conteo de esporas viables del bioformulado NEMAKILL A 22⁰C

| Tiempo (Días) | R1 | R2 | R3 | Media | Log UFC/mL |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|--------------|-------------------|
| 0 | 1,90E+09 | 1,80E+09 | 2,00E+09 | 1,9E+09 | 9,28 |
| 3 | 1,85E+09 | 1,7E+09 | 1,9E+09 | 1,82E+09 | 9,26 |
| 6 | 1,75E+09 | 1,9E+09 | 2E+09 | 1,88E+09 | 9,27 |
| 9 | 1,9E+09 | 1,75E+09 | 1,9E+09 | 1,85E+09 | 9,27 |
| 12 | 2,1E+09 | 2,1E+09 | 1,95E+09 | 2,05E+09 | 9,31 |
| 15 | 2,3E+09 | 1,95E+09 | 2,1E+09 | 2,12E+09 | 9,33 |
| 18 | 2,15E+09 | 2,2E+09 | 2,05E+09 | 2,13E+09 | 9,33 |
| 21 | 2,15E+09 | 2,35E+09 | 2,35E+09 | 2,28E+09 | 9,36 |
| 24 | 2,45E+09 | 2,45E+09 | 2,4E+09 | 2,43E+09 | 9,39 |
| 27 | 2,65E+09 | 2,75E+09 | 2,6E+09 | 2,67E+09 | 9,43 |
| 30 | 3E+09 | 2,65E+09 | 2,5E+09 | 2,72E+09 | 9,43 |
| 33 | 2,8E+09 | 2,95E+09 | 2,85E+09 | 2,87E+09 | 9,46 |
| 36 | 2,95E+09 | 2,7E+09 | 2,9E+09 | 2,85E+09 | 9,45 |
| 39 | 2,85E+09 | 2,9E+09 | 2,95E+09 | 2,9E+09 | 9,46 |
| 42 | 3,15E+09 | 3E+09 | 3,05E+09 | 3,07E+09 | 9,49 |
| 45 | 2,95E+09 | 3,1E+09 | 3,4E+09 | 3,15E+09 | 9,50 |
| 48 | 3,2E+09 | 3E+09 | 3,25E+09 | 3,15E+09 | 9,50 |
| 51 | 3,15E+09 | 3,35E+09 | 3,05E+09 | 3,18E+09 | 9,50 |
| 54 | 3,25E+09 | 3,05E+09 | 3,25E+09 | 3,18E+09 | 9,50 |
| 57 | 3,3E+09 | 3,3E+09 | 2,95E+09 | 3,18E+09 | 9,50 |
| 60 | 3,5E+09 | 3,1E+09 | 2,95E+09 | 3,18E+09 | 9,50 |
| 63 | 3,15E+09 | 3,35E+09 | 3,05E+09 | 3,18E+09 | 9,50 |
| 66 | 3,25E+09 | 2,95E+09 | 3,15E+09 | 3,12E+09 | 9,49 |
| 69 | 3,05E+09 | 2,8E+09 | 3,3E+09 | 3,05E+09 | 9,48 |
| 72 | 2,75E+09 | 2,85E+09 | 3,25E+09 | 3,0E+09 | 9,47 |
| 75 | 2,7E+09 | 2,8E+09 | 3,25E+09 | 2,92E+09 | 9,46 |
| 78 | 3,15E+09 | 2,7E+09 | 2,75E+09 | 2,87E+09 | 9,46 |
| 81 | 2,95E+09 | 2,75E+09 | 2,6E+09 | 2,77E+09 | 9,44 |
| 84 | 2,5E+09 | 2,65E+09 | 2,6E+09 | 2,58E+09 | 9,41 |
| 87 | 2,2E+09 | 2E+09 | 2,6E+09 | 2,27E+09 | 9,36 |
| 90 | 2,2E+09 | 2,05E+09 | 2,1E+09 | 2,12E+09 | 9,33 |
| 93 | 2,05E+09 | 1,85E+09 | 2,05E+09 | 2,0E+09 | 9,30 |
| 96 | 1,55E+09 | 1,7E+09 | 1,4E+09 | 1,55E+09 | 9,19 |

R1: Conteo de esporas viables repetición uno

R2: Conteo de esporas viables repetición dos

R3: Conteo de esporas viables repetición tres

Anexos K. Porcentaje de viabilidad del bioformulado NEMAKILL A 4°C

| Tiempo (Días) | R1 | | | R2 | | | R3 | | | %Total |
|------------------|-----|-----|-------|-----|-----|-------|-----|-----|-------|--------|
| | EG | NoG | %T1 | EG | NoG | %T2 | EG | NoG | %T3 | |
| 0 | 100 | 0 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 |
| 3 | 856 | 21 | 97,55 | 836 | 14 | 98,33 | 876 | 22 | 97,49 | 97,79 |
| 6 | 873 | 24 | 97,25 | 863 | 21 | 97,57 | 753 | 19 | 97,48 | 97,43 |
| 9 | 698 | 21 | 96,99 | 798 | 20 | 97,49 | 898 | 31 | 96,55 | 97,01 |
| 12 | 770 | 24 | 96,88 | 820 | 34 | 95,85 | 678 | 28 | 95,87 | 96,20 |
| 15 | 870 | 31 | 96,44 | 855 | 41 | 95,20 | 798 | 38 | 95,24 | 95,63 |
| 18 | 485 | 21 | 95,67 | 535 | 31 | 94,21 | 643 | 28 | 95,65 | 95,17 |
| 21 | 356 | 19 | 94,66 | 367 | 29 | 92,10 | 476 | 25 | 94,75 | 93,84 |
| 24 | 315 | 17 | 94,60 | 356 | 27 | 92,42 | 456 | 25 | 94,52 | 93,85 |
| 27 | 542 | 32 | 94,10 | 654 | 42 | 93,58 | 576 | 38 | 93,40 | 93,69 |
| 30 | 799 | 38 | 95,24 | 802 | 48 | 94,01 | 820 | 45 | 94,51 | 94,59 |
| 33 | 604 | 32 | 94,70 | 634 | 42 | 93,38 | 598 | 38 | 93,65 | 93,91 |
| 36 | 586 | 34 | 94,20 | 596 | 44 | 92,62 | 602 | 40 | 93,36 | 93,39 |
| 39 | 698 | 44 | 93,70 | 778 | 54 | 93,06 | 721 | 48 | 93,34 | 93,37 |
| 42 | 345 | 23 | 93,33 | 445 | 32 | 92,81 | 486 | 35 | 92,80 | 92,98 |
| 45 | 657 | 46 | 93,00 | 678 | 45 | 93,36 | 623 | 45 | 92,78 | 93,05 |
| 48 | 234 | 26 | 88,89 | 334 | 36 | 89,22 | 265 | 25 | 90,57 | 89,56 |
| 51 | 342 | 40 | 88,30 | 443 | 50 | 88,71 | 435 | 46 | 89,43 | 88,81 |
| 54 | 243 | 34 | 86,01 | 356 | 24 | 93,26 | 384 | 42 | 89,06 | 89,44 |
| 57 | 166 | 39 | 76,51 | 233 | 28 | 87,98 | 212 | 24 | 88,68 | 84,39 |
| 60 | 171 | 43 | 74,85 | 255 | 34 | 86,67 | 198 | 28 | 85,86 | 82,46 |

EG: Esporas Germinates

NoG: Esporas no Germinadas

%T: Porcentaje de esporas germinadas y no germinadas por 100

Anexos L. Porcentaje de viabilidad del bioformulado NEMAKILL A 18°C

| Tiempo (Días) | R1 | | | R2 | | | R3 | | | %Total |
|------------------|-----|-----|-------|-----|-----|-------|-----|-----|-------|--------|
| | EG | NoG | %T1 | EG | NoG | %T2 | EG | NoG | %T3 | |
| 0 | 100 | 0 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 |
| 3 | 718 | 6 | 99,16 | 913 | 8 | 99,12 | 823 | 7 | 99,15 | 99,15 |
| 6 | 646 | 10 | 98,45 | 940 | 11 | 98,83 | 952 | 15 | 98,42 | 98,57 |
| 9 | 526 | 15 | 97,15 | 520 | 12 | 97,69 | 532 | 15 | 97,18 | 97,34 |
| 12 | 848 | 28 | 96,70 | 840 | 20 | 97,62 | 756 | 20 | 97,35 | 97,22 |
| 15 | 921 | 31 | 96,63 | 601 | 18 | 97,00 | 641 | 19 | 97,04 | 96,89 |
| 18 | 839 | 32 | 96,19 | 693 | 23 | 96,68 | 983 | 32 | 96,74 | 96,54 |
| 21 | 650 | 25 | 96,15 | 545 | 22 | 95,96 | 454 | 18 | 96,04 | 96,05 |
| 24 | 660 | 28 | 95,76 | 550 | 25 | 95,45 | 659 | 32 | 95,14 | 95,45 |
| 27 | 588 | 33 | 94,39 | 780 | 39 | 95,00 | 458 | 24 | 94,76 | 94,72 |
| 30 | 347 | 22 | 93,66 | 437 | 22 | 94,97 | 385 | 22 | 94,29 | 94,30 |
| 33 | 323 | 27 | 91,64 | 425 | 25 | 94,12 | 374 | 26 | 93,05 | 92,94 |
| 36 | 615 | 56 | 90,89 | 520 | 48 | 90,77 | 568 | 52 | 90,85 | 90,84 |
| 39 | 483 | 48 | 90,06 | 395 | 38 | 90,38 | 439 | 43 | 90,21 | 90,22 |
| 42 | 295 | 28 | 90,51 | 325 | 32 | 90,15 | 310 | 30 | 90,32 | 90,33 |
| 45 | 458 | 46 | 89,96 | 425 | 42 | 90,12 | 442 | 44 | 90,05 | 90,04 |
| 48 | 126 | 18 | 85,71 | 156 | 20 | 87,18 | 141 | 19 | 86,52 | 86,47 |
| 51 | 109 | 17 | 84,40 | 125 | 15 | 88,00 | 117 | 16 | 86,32 | 86,24 |
| 54 | 99 | 16 | 83,84 | 105 | 18 | 82,86 | 102 | 17 | 83,33 | 83,34 |
| 57 | 93 | 18 | 80,65 | 83 | 15 | 81,93 | 88 | 16 | 81,82 | 81,46 |
| 60 | 85 | 18 | 78,82 | 95 | 20 | 78,95 | 90 | 19 | 78,89 | 78,89 |

EG: Esporas Germinates

NoG: Esporas no Germinadas

%T: Porcentaje de esporas germinadas y no germinadas por 100

Anexos LI. Porcentaje de viabilidad del bioformulado NEMAKILL A 22⁰C

| Tiempo (Dias) | R1 | | | R2 | | | R3 | | | % Total |
|------------------|-----|-----|-------|-----|-----|-------|-----|-----|-------|------------|
| | EG | NoG | %T1 | EG | NoG | %T2 | EG | NoG | %T3 | |
| 0 | 100 | 0 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 |
| 3 | 787 | 14 | 98,22 | 875 | 11 | 98,74 | 850 | 15 | 98,29 | 98,42 |
| 6 | 760 | 17 | 97,76 | 902 | 16 | 98,23 | 853 | 17 | 98,01 | 98,00 |
| 9 | 612 | 18 | 97,06 | 659 | 16 | 97,57 | 715 | 23 | 96,78 | 97,14 |
| 12 | 809 | 26 | 96,79 | 830 | 27 | 96,75 | 717 | 24 | 96,65 | 96,73 |
| 15 | 901 | 31 | 96,56 | 728 | 30 | 95,95 | 720 | 29 | 96,04 | 96,18 |
| 18 | 711 | 30 | 95,78 | 614 | 27 | 95,60 | 813 | 30 | 96,31 | 95,90 |
| 21 | 766 | 38 | 95,04 | 456 | 26 | 94,41 | 465 | 22 | 95,38 | 94,94 |
| 24 | 666 | 36 | 94,59 | 453 | 26 | 94,26 | 558 | 29 | 94,89 | 94,58 |
| 27 | 631 | 36 | 94,29 | 717 | 41 | 94,35 | 517 | 31 | 94,00 | 94,22 |
| 30 | 537 | 35 | 93,48 | 620 | 35 | 94,35 | 603 | 34 | 94,44 | 94,09 |
| 33 | 337 | 26 | 92,28 | 530 | 34 | 93,67 | 486 | 32 | 93,42 | 93,12 |
| 36 | 305 | 26 | 91,48 | 558 | 46 | 91,76 | 585 | 46 | 92,14 | 91,79 |
| 39 | 248 | 28 | 88,71 | 587 | 46 | 92,16 | 580 | 46 | 92,16 | 91,01 |
| 42 | 238 | 32 | 86,55 | 385 | 32 | 91,69 | 398 | 33 | 91,83 | 90,03 |
| 45 | 305 | 43 | 85,90 | 552 | 44 | 92,11 | 533 | 45 | 91,64 | 89,89 |
| 48 | 271 | 39 | 85,61 | 245 | 28 | 88,57 | 203 | 22 | 89,16 | 87,78 |
| 51 | 148 | 23 | 84,46 | 284 | 33 | 88,56 | 276 | 31 | 88,77 | 87,26 |
| 54 | 238 | 42 | 82,35 | 231 | 21 | 90,89 | 243 | 30 | 87,86 | 87,03 |
| 57 | 145 | 26 | 82,07 | 158 | 22 | 86,39 | 150 | 20 | 86,67 | 85,04 |
| 60 | 71 | 16 | 77,46 | 175 | 27 | 84,57 | 144 | 24 | 83,68 | 81,91 |

EG: Esporas Germinates

NoG: Esporas no Germinadas

%T: Porcentaje de esporas germinadas y no germinadas por 100

Anexos M. Conteo de esporas viables del bioformulado BAUKILL 4°C

| Tiempo Días | R1 | R2 | R3 | Media | Log UFC/ml |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|--------------|-----------------------|
| 0 | 1,00E+09 | 1,00E+09 | 1,00E+09 | 1,00E+09 | 9 |
| 3 | 1,03E+09 | 1,08E+09 | 1,08E+09 | 1,00E+09 | 9,00 |
| 6 | 1,25E+09 | 1,08E+09 | 1,33E+09 | 1,05E+09 | 9,02 |
| 9 | 1,33E+09 | 1,25E+09 | 1,45E+09 | 1,05E+09 | 9,02 |
| 12 | 1,48E+09 | 1,45E+09 | 1,48E+09 | 1,20E+09 | 9,08 |
| 15 | 1,55E+09 | 1,50E+09 | 1,60E+09 | 1,55E+09 | 9,19 |
| 18 | 1,58E+09 | 1,85E+09 | 1,53E+09 | 1,65E+09 | 9,22 |
| 21 | 1,73E+09 | 1,90E+09 | 1,73E+09 | 1,78E+09 | 9,25 |
| 24 | 1,90E+09 | 1,85E+09 | 1,70E+09 | 1,90E+09 | 9,28 |
| 27 | 1,88E+09 | 2,05E+09 | 2,00E+09 | 1,98E+09 | 9,30 |
| 30 | 2,00E+09 | 1,98E+09 | 2,23E+09 | 2,07E+09 | 9,32 |
| 33 | 2,08E+09 | 2,23E+09 | 2,05E+09 | 2,12E+09 | 9,33 |
| 36 | 2,30E+09 | 2,00E+09 | 2,25E+09 | 2,18E+09 | 9,34 |
| 39 | 2,28E+09 | 2,18E+09 | 2,30E+09 | 2,25E+09 | 9,35 |
| 42 | 2,23E+09 | 2,30E+09 | 2,35E+09 | 2,29E+09 | 9,36 |
| 45 | 2,35E+09 | 2,25E+09 | 2,43E+09 | 2,34E+09 | 9,37 |
| 48 | 2,48E+09 | 2,28E+09 | 2,40E+09 | 2,38E+09 | 9,38 |
| 51 | 2,35E+09 | 2,38E+09 | 2,45E+09 | 2,39E+09 | 9,38 |
| 54 | 2,33E+09 | 2,55E+09 | 2,33E+09 | 2,40E+09 | 9,38 |
| 57 | 2,50E+09 | 2,45E+09 | 2,28E+09 | 2,41E+09 | 9,38 |
| 60 | 2,35E+09 | 2,40E+09 | 2,40E+09 | 2,38E+09 | 9,38 |
| 63 | 2,28E+09 | 2,38E+09 | 2,53E+09 | 2,39E+09 | 9,38 |
| 66 | 2,43E+09 | 2,23E+09 | 2,50E+09 | 2,38E+09 | 9,38 |
| 69 | 2,25E+09 | 2,35E+09 | 2,55E+09 | 2,38E+09 | 9,38 |
| 72 | 2,28E+09 | 2,40E+09 | 2,48E+09 | 2,38E+09 | 9,38 |
| 75 | 2,25E+09 | 2,40E+09 | 2,58E+09 | 2,41E+09 | 9,38 |
| 78 | 2,28E+09 | 2,30E+09 | 2,58E+09 | 2,38E+09 | 9,38 |
| 81 | 2,38E+09 | 2,28E+09 | 2,55E+09 | 2,40E+09 | 9,38 |
| 84 | 2,33E+09 | 2,35E+09 | 2,23E+09 | 2,30E+09 | 9,36 |
| 87 | 2,25E+09 | 2,30E+09 | 2,20E+09 | 2,25E+09 | 9,35 |
| 90 | 2,30E+09 | 2,08E+09 | 2,20E+09 | 2,19E+09 | 9,34 |
| 93 | 2,03E+09 | 1,90E+09 | 2,18E+09 | 2,03E+09 | 9,31 |
| 96 | 1,40E+09 | 1,80E+09 | 1,33E+09 | 1,51E+09 | 9,18 |

R1: Conteo de esporas viables repetición uno

R2: Conteo de esporas viables repetición dos

R3: Conteo de esporas viables repetición tres

Anexos N. Conteo de esporas viables del bioformulado BAUKILL 18⁰C

| Tiempo (Días) | R1 | R2 | R3 | Media | Log UFC/mL |
|---------------|----------|----------|----------|----------|------------|
| 0 | 1,20E+09 | 1,20E+09 | 1,20E+09 | 1,20E+09 | 9,08 |
| 3 | 1,58E+09 | 1,55E+09 | 1,58E+09 | 1,30E+09 | 9,11 |
| 6 | 1,68E+09 | 1,63E+09 | 1,58E+09 | 1,30E+09 | 9,11 |
| 9 | 1,58E+09 | 1,73E+09 | 1,65E+09 | 1,30E+09 | 9,11 |
| 12 | 1,78E+09 | 1,80E+09 | 1,68E+09 | 1,35E+09 | 9,13 |
| 15 | 1,63E+09 | 2,03E+09 | 1,80E+09 | 1,55E+09 | 9,19 |
| 18 | 1,83E+09 | 2,03E+09 | 1,88E+09 | 1,91E+09 | 9,28 |
| 21 | 1,95E+09 | 2,00E+09 | 1,90E+09 | 1,95E+09 | 9,29 |
| 24 | 2,08E+09 | 2,28E+09 | 1,90E+09 | 2,08E+09 | 9,32 |
| 27 | 2,08E+09 | 2,18E+09 | 2,18E+09 | 2,14E+09 | 9,33 |
| 30 | 2,23E+09 | 2,08E+09 | 2,33E+09 | 2,21E+09 | 9,34 |
| 33 | 2,40E+09 | 2,30E+09 | 2,30E+09 | 2,33E+09 | 9,37 |
| 36 | 2,48E+09 | 2,30E+09 | 2,43E+09 | 2,40E+09 | 9,38 |
| 39 | 2,50E+09 | 2,55E+09 | 2,40E+09 | 2,48E+09 | 9,40 |
| 42 | 2,55E+09 | 2,48E+09 | 2,60E+09 | 2,54E+09 | 9,41 |
| 45 | 2,63E+09 | 2,53E+09 | 2,68E+09 | 2,61E+09 | 9,42 |
| 48 | 2,75E+09 | 2,78E+09 | 2,45E+09 | 2,66E+09 | 9,42 |
| 51 | 2,75E+09 | 2,80E+09 | 2,58E+09 | 2,71E+09 | 9,43 |
| 54 | 2,85E+09 | 2,90E+09 | 2,78E+09 | 2,84E+09 | 9,45 |
| 57 | 2,90E+09 | 2,75E+09 | 2,85E+09 | 2,83E+09 | 9,45 |
| 60 | 2,75E+09 | 2,90E+09 | 2,95E+09 | 2,87E+09 | 9,46 |
| 63 | 3,08E+09 | 2,90E+09 | 2,78E+09 | 2,92E+09 | 9,46 |
| 66 | 3,03E+09 | 2,85E+09 | 3,00E+09 | 2,96E+09 | 9,47 |
| 69 | 2,88E+09 | 3,00E+09 | 3,05E+09 | 2,98E+09 | 9,47 |
| 72 | 3,10E+09 | 2,80E+09 | 3,05E+09 | 2,98E+09 | 9,47 |
| 75 | 2,95E+09 | 3,03E+09 | 2,90E+09 | 2,96E+09 | 9,47 |
| 78 | 2,95E+09 | 2,88E+09 | 3,10E+09 | 2,98E+09 | 9,47 |
| 81 | 2,85E+09 | 3,00E+09 | 2,98E+09 | 2,94E+09 | 9,47 |
| 84 | 2,85E+09 | 2,85E+09 | 3,05E+09 | 2,92E+09 | 9,46 |
| 87 | 2,68E+09 | 2,98E+09 | 3,18E+09 | 2,94E+09 | 9,47 |
| 90 | 2,73E+09 | 2,90E+09 | 2,90E+09 | 2,84E+09 | 9,45 |
| 93 | 1,98E+09 | 1,78E+09 | 1,63E+09 | 1,79E+09 | 9,25 |
| 96 | 1,28E+09 | 1,40E+09 | 1,40E+09 | 1,36E+09 | 9,13 |

R1: Conteo de esporas viables repetición uno

R2: Conteo de esporas viables repetición dos

R3: Conteo de esporas viables repetición tres

Anexos O. Conteo de esporas viables del bioformulado BAUKILL 22⁰C

| Tiempo (Días) | R1 | R2 | R3 | Media | Log UFC/ml |
|---------------|----------|----------|----------|----------|------------|
| 0 | 1,90E+09 | 1,70E+09 | 1,50E+09 | 1,70E+09 | 9,23 |
| 3 | 2,03E+09 | 1,80E+09 | 1,88E+09 | 1,75E+09 | 9,24 |
| 6 | 1,90E+09 | 2,08E+09 | 2,08E+09 | 1,75E+09 | 9,24 |
| 9 | 1,98E+09 | 2,00E+09 | 2,13E+09 | 1,75E+09 | 9,24 |
| 12 | 2,08E+09 | 2,50E+09 | 1,80E+09 | 1,80E+09 | 9,26 |
| 15 | 2,23E+09 | 2,13E+09 | 2,18E+09 | 2,18E+09 | 9,34 |
| 18 | 2,18E+09 | 2,23E+09 | 2,23E+09 | 2,21E+09 | 9,34 |
| 21 | 2,20E+09 | 2,35E+09 | 2,35E+09 | 2,30E+09 | 9,36 |
| 24 | 2,40E+09 | 2,43E+09 | 2,40E+09 | 2,41E+09 | 9,38 |
| 27 | 2,68E+09 | 2,70E+09 | 2,40E+09 | 2,59E+09 | 9,41 |
| 30 | 2,98E+09 | 2,70E+09 | 2,45E+09 | 2,71E+09 | 9,43 |
| 33 | 2,90E+09 | 3,00E+09 | 2,68E+09 | 2,86E+09 | 9,46 |
| 36 | 3,10E+09 | 2,93E+09 | 2,75E+09 | 2,90E+09 | 9,46 |
| 39 | 3,05E+09 | 2,93E+09 | 2,78E+09 | 2,92E+09 | 9,46 |
| 42 | 3,08E+09 | 3,08E+09 | 2,78E+09 | 2,98E+09 | 9,47 |
| 45 | 3,10E+09 | 3,13E+09 | 3,00E+09 | 3,08E+09 | 9,49 |
| 48 | 3,30E+09 | 3,15E+09 | 3,00E+09 | 3,15E+09 | 9,50 |
| 51 | 3,25E+09 | 3,33E+09 | 2,93E+09 | 3,17E+09 | 9,50 |
| 54 | 3,40E+09 | 3,10E+09 | 3,03E+09 | 3,18E+09 | 9,50 |
| 57 | 3,28E+09 | 3,48E+09 | 2,78E+09 | 3,18E+09 | 9,50 |
| 60 | 3,35E+09 | 3,10E+09 | 3,03E+09 | 3,16E+09 | 9,50 |
| 63 | 3,28E+09 | 3,25E+09 | 2,98E+09 | 3,17E+09 | 9,50 |
| 66 | 3,30E+09 | 3,15E+09 | 3,05E+09 | 3,17E+09 | 9,50 |
| 69 | 3,13E+09 | 3,00E+09 | 3,18E+09 | 3,10E+09 | 9,49 |
| 72 | 3,00E+09 | 3,03E+09 | 3,10E+09 | 3,04E+09 | 9,48 |
| 75 | 3,10E+09 | 2,98E+09 | 3,03E+09 | 3,03E+09 | 9,48 |
| 78 | 3,13E+09 | 2,85E+09 | 2,78E+09 | 2,92E+09 | 9,46 |
| 81 | 2,98E+09 | 2,83E+09 | 2,68E+09 | 2,83E+09 | 9,45 |
| 84 | 2,70E+09 | 2,90E+09 | 2,58E+09 | 2,73E+09 | 9,44 |
| 87 | 2,38E+09 | 2,33E+09 | 2,78E+09 | 2,49E+09 | 9,40 |
| 90 | 2,50E+09 | 2,35E+09 | 2,33E+09 | 2,39E+09 | 9,38 |
| 93 | 2,18E+09 | 2,15E+09 | 2,08E+09 | 2,13E+09 | 9,33 |
| 96 | 1,88E+09 | 1,78E+09 | 1,73E+09 | 1,79E+09 | 9,25 |

R1: Conteo de esporas viables repetición uno

R2: Conteo de esporas viables repetición dos

R3: Conteo de esporas viables repetición tres

Anexos P. Porcentaje de viabilidad del bioformulado BAUKIL A 4⁰C

| Tiempo (Días) | R1 | | | R2 | | | R3 | | | % Total |
|------------------|-----|-----|------|-----|-----|-------|-----|-----|-------|------------|
| | EG | NoG | %T1 | EG | NoG | %T2 | EG | NoG | %T3 | |
| 0 | 100 | 0 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 |
| 3 | 615 | 10 | 98,4 | 632 | 9 | 98,65 | 623 | 11 | 98,31 | 98,45 |
| 6 | 581 | 15 | 97,4 | 720 | 15 | 97,92 | 731 | 15 | 97,95 | 97,76 |
| 9 | 513 | 22 | 95,8 | 748 | 28 | 96,32 | 605 | 25 | 95,95 | 96,03 |
| 12 | 801 | 36 | 95,5 | 895 | 37 | 95,92 | 854 | 37 | 95,73 | 95,72 |
| 15 | 710 | 38 | 94,6 | 846 | 40 | 95,27 | 823 | 38 | 95,38 | 95,10 |
| 18 | 639 | 36 | 94,4 | 789 | 40 | 94,93 | 799 | 38 | 95,24 | 94,85 |
| 21 | 562 | 34 | 94,0 | 710 | 38 | 94,72 | 808 | 40 | 95,05 | 94,60 |
| 24 | 570 | 43 | 92,5 | 535 | 32 | 94,02 | 627 | 36 | 94,34 | 93,60 |
| 27 | 555 | 45 | 92,0 | 571 | 36 | 93,69 | 600 | 41 | 93,24 | 92,97 |
| 30 | 442 | 41 | 90,8 | 417 | 35 | 91,61 | 452 | 36 | 92,15 | 91,53 |
| 33 | 288 | 31 | 89,4 | 313 | 37 | 88,32 | 345 | 34 | 90,14 | 89,29 |
| 36 | 257 | 29 | 88,7 | 302 | 40 | 86,90 | 275 | 35 | 87,43 | 87,68 |
| 39 | 132 | 17 | 87,5 | 178 | 30 | 83,43 | 163 | 26 | 84,36 | 85,09 |
| 42 | 110 | 16 | 85,4 | 155 | 27 | 82,52 | 129 | 22 | 83,33 | 83,75 |
| 45 | 142 | 22 | 84,5 | 133 | 25 | 81,13 | 143 | 25 | 82,52 | 82,72 |
| 48 | 149 | 25 | 83,6 | 144 | 30 | 79,44 | 114 | 21 | 82,02 | 81,67 |
| 51 | 112 | 20 | 82,5 | 117 | 26 | 78,21 | 133 | 25 | 81,20 | 80,64 |
| 54 | 106 | 20 | 81,6 | 97 | 23 | 76,80 | 113 | 23 | 79,56 | 79,32 |
| 57 | 110 | 24 | 78,6 | 125 | 30 | 76,00 | 137 | 32 | 76,92 | 77,19 |
| 60 | 94 | 21 | 77,5 | 82 | 21 | 74,85 | 95 | 25 | 74,21 | 75,53 |

EG: Esporas Germinadas

NoG: Esporas no Germinadas

%T: Porcentaje de esporas germinadas y no germinadas por 100

Anexos Q. Porcentaje de viabilidad del bioformulado BAUKIL A 18⁰C

| Tiempo (Días) | R1 | | | R2 | | | R3 | | | %Total |
|------------------|-----|-----|-------|-----|-----|-------|-----|-----|-------|--------|
| | EG | NoG | %T1 | EG | NoG | %T2 | EG | NoG | %T3 | |
| 0 | 100 | 0 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 |
| 3 | 518 | 8 | 98,46 | 513 | 6 | 98,83 | 523 | 9 | 98,28 | 98,52 |
| 6 | 646 | 16 | 97,52 | 940 | 18 | 98,09 | 952 | 17 | 98,21 | 97,94 |
| 9 | 526 | 25 | 95,25 | 520 | 23 | 95,58 | 532 | 24 | 95,49 | 95,44 |
| 12 | 848 | 42 | 95,05 | 840 | 38 | 95,48 | 856 | 40 | 95,33 | 95,28 |
| 15 | 721 | 44 | 93,90 | 702 | 40 | 94,30 | 751 | 40 | 94,67 | 94,29 |
| 18 | 622 | 38 | 93,89 | 730 | 44 | 93,97 | 748 | 41 | 94,52 | 94,13 |
| 21 | 456 | 32 | 92,98 | 560 | 38 | 93,21 | 774 | 44 | 94,32 | 93,50 |
| 24 | 460 | 42 | 90,87 | 500 | 36 | 92,80 | 670 | 39 | 94,18 | 92,62 |
| 27 | 488 | 48 | 90,16 | 520 | 38 | 92,69 | 598 | 43 | 92,81 | 91,89 |
| 30 | 347 | 38 | 89,05 | 307 | 35 | 88,60 | 387 | 32 | 91,73 | 89,79 |
| 33 | 238 | 28 | 88,24 | 300 | 37 | 87,67 | 360 | 33 | 90,83 | 88,91 |
| 36 | 300 | 36 | 88,00 | 289 | 40 | 86,16 | 355 | 38 | 89,30 | 87,82 |
| 39 | 158 | 22 | 86,08 | 150 | 24 | 84,00 | 168 | 23 | 86,31 | 85,46 |
| 42 | 110 | 18 | 83,64 | 100 | 18 | 82,00 | 120 | 18 | 85,00 | 83,55 |
| 45 | 164 | 28 | 82,93 | 160 | 31 | 80,63 | 154 | 24 | 84,42 | 82,66 |
| 48 | 191 | 34 | 82,20 | 180 | 38 | 78,89 | 121 | 19 | 84,30 | 81,80 |
| 51 | 123 | 23 | 81,30 | 140 | 32 | 77,14 | 168 | 28 | 83,33 | 80,59 |
| 54 | 110 | 22 | 80,00 | 98 | 24 | 75,51 | 128 | 23 | 82,03 | 79,18 |
| 57 | 108 | 25 | 76,85 | 130 | 33 | 74,62 | 174 | 39 | 77,59 | 76,35 |
| 60 | 91 | 22 | 75,82 | 75 | 20 | 73,33 | 106 | 28 | 73,58 | 74,25 |

EG: Esporas Germinates

NoG: Esporas no Germinadas

%T: Porcentaje de esporas germinadas y no germinadas por 100

Anexos R. Porcentaje de viabilidad del bioformulado BAUKIL A 22⁰C

| Tiempo (Días) | R1 | | | R2 | | | R3 | | | %Total |
|---------------|-----|-----|-------|-----|-----|-------|-----|-----|-------|--------|
| | EG | NoG | %T1 | EG | NoG | %T2 | EG | NoG | %T3 | |
| 0 | 100 | 0 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 |
| 3 | 711 | 12 | 98,31 | 750 | 11 | 98,53 | 722 | 12 | 98,34 | 98,39 |
| 6 | 515 | 14 | 97,28 | 500 | 12 | 97,60 | 510 | 13 | 97,45 | 97,44 |
| 9 | 500 | 18 | 96,40 | 975 | 32 | 96,72 | 678 | 25 | 96,31 | 96,48 |
| 12 | 754 | 30 | 96,02 | 950 | 35 | 96,32 | 852 | 33 | 96,13 | 96,15 |
| 15 | 698 | 32 | 95,42 | 990 | 40 | 95,96 | 894 | 36 | 95,97 | 95,78 |
| 18 | 656 | 34 | 94,82 | 848 | 36 | 95,75 | 850 | 35 | 95,88 | 95,48 |
| 21 | 668 | 35 | 94,76 | 860 | 37 | 95,70 | 842 | 36 | 95,72 | 95,39 |
| 24 | 680 | 44 | 93,53 | 570 | 28 | 95,09 | 584 | 32 | 94,52 | 94,38 |
| 27 | 621 | 41 | 93,40 | 621 | 34 | 94,52 | 601 | 38 | 93,68 | 93,87 |
| 30 | 537 | 43 | 91,99 | 527 | 35 | 93,36 | 517 | 39 | 92,46 | 92,60 |
| 33 | 337 | 33 | 90,21 | 325 | 36 | 88,92 | 330 | 35 | 89,39 | 89,51 |
| 36 | 214 | 22 | 89,72 | 314 | 39 | 87,58 | 194 | 31 | 84,02 | 87,11 |
| 39 | 106 | 11 | 89,62 | 206 | 35 | 83,01 | 158 | 28 | 82,28 | 84,97 |
| 42 | 109 | 14 | 87,16 | 209 | 36 | 82,78 | 138 | 25 | 81,88 | 83,94 |
| 45 | 120 | 16 | 86,67 | 105 | 19 | 81,90 | 132 | 26 | 80,30 | 82,96 |
| 48 | 107 | 15 | 85,98 | 107 | 21 | 80,37 | 107 | 22 | 79,44 | 81,93 |
| 51 | 100 | 16 | 84,00 | 94 | 19 | 79,79 | 98 | 22 | 77,55 | 80,45 |
| 54 | 102 | 17 | 83,33 | 96 | 21 | 78,13 | 97 | 23 | 76,29 | 79,25 |
| 57 | 112 | 22 | 80,36 | 120 | 27 | 77,50 | 99 | 24 | 75,76 | 77,87 |
| 60 | 96 | 20 | 79,17 | 88 | 21 | 76,14 | 84 | 21 | 75,00 | 76,77 |

EG: Esporas Germinates

NoG: Esporas no Germinadas

%T: Porcentaje de esporas germinadas y no germinadas por 100

Anexos S. Registro fotográfico

