



## Estabilidad de cepas nativas de *Trichoderma* conservadas mediante liofilización

### Stability of native *Trichoderma* strains preserved by lyophilization

Santos T. Leiva-Espinoza<sup>1,2\*</sup> , Elgar Hernández Díaz<sup>2</sup> , Luz Leonor Mattos Calderon<sup>3</sup> 

#### RESUMEN

En este estudio se evaluó la capacidad de especies del género *Trichoderma* para mantener sus capacidades reproductivas luego de un procedimiento de liofilización. Durante 90 días se evaluaron la capacidad de producir conidios y la capacidad de germinación de cuatro cepas conservadas a dos temperaturas diferentes y contrastantes entre sí, además de la adición de malto dextrina o agua como agente protector. Luego de 90 días de almacenamiento todas las cepas mostraron altos porcentajes de viabilidad y de producción de esporas. La mayoría de tratamientos redujo su capacidad de producir esporas, sin embargo, la cepa F20M4 produjo  $2,88 \times 10^7$  UFC/g luego de 90 días de almacenamiento, sin variar respecto de la evaluación hecha a los 30 días. Se evidencia que las esporas conservan mejor su viabilidad al ser conservadas a 28°C, aunque en todos los casos se observaron disminuciones en la viabilidad de las esporas. Solo siete tratamientos obtuvieron más del 80% de viabilidad de esporas luego de 90 días de almacenamiento.

**Palabras clave:** control biológico, conservación, *Trichoderma*, liofilización, viabilidad.

#### ABSTRACT

In this study, the ability of *Trichoderma* to maintain its reproductive capacities after a lyophilization procedure was studied. During 90 days, the capacity to produce conidia and the germination capacity of 4 strains conserved at two different and contrasting temperatures were evaluated, in addition to the addition of malt dextrin or water as a protective agent. After 90 days of storage, all the strains showed high percentages of viability and spore production. Most of the treatments reduced their capacity to produce spores, however, the F20M4 strain produced  $2.88 \times 10^7$  CFU/g after 90 days of storage, without varying with respect to the evaluation made at 30 days. It is evidenced that the spores better conserve their viability when stored at 28 °C, although in all cases decreases in the viability of the spores were observed. Only seven treatments obtained more than 80% spore viability after 90 days of storage.

**Keywords:** biological control, conservation, *Trichoderma*, lyophilization, viability.

<sup>1</sup>Universidad Nacional Agraria La Molina, Programa de Doctorado en Agricultura Sustentable, Lima, Perú.

<sup>2</sup>Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva, Amazonas, Perú.

<sup>3</sup>Universidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Agronomía, Departamento Académico de Fitopatología, Lima, Perú.

\*Autor de correspondencia: e-mail: santos.leiva@untrm.edu.pe

## I. INTRODUCCIÓN

Una alternativa sostenible para disminuir el impacto ambiental causado por el frecuente uso de agroquímicos en el control de plagas y enfermedades de los cultivos se basa en la utilización de agentes de control biológico. Dentro de estos agentes destacan los hongos del género *Trichoderma*, reconocidos por su actividad antagónica contra algunos hongos fitopatógenos y por su efecto como promotor de crecimiento en plantas (Benítez *et al.*, 2004; Druzhinina *et al.*, 2010).

Los hongos del género *Trichoderma* son los antagonistas más utilizados a nivel mundial debido a su ubicuidad, facilidad para ser aislados y cultivados, a su rápido crecimiento en un gran número de sustratos, a que no son patógenas de plantas y mediante aplicaciones foliares puede prevenir enfermedades en un amplio rango de cultivos. Estos hongos se encuentran en todas las zonas climáticas debido a su notable adaptación (Benítez *et al.*, 2004; Bateman *et al.*, 2005).

Para elaborar formulaciones con microorganismos, las células, las esporas o cualquier parte biológica, primeramente, deben someterse a un proceso de conservación para inducir la latencia y proporcionar estabilidad del producto por un tiempo prolongado. Existen métodos de conservación, tales como congelación, secado o liofilización. Este último ha resultado ser el más beneficioso para mantener la viabilidad de los microorganismos y su funcionalidad distintiva (Day y Stacey, 2007). Los microorganismos liofilizados están encerrados en una estructura vítrea, que es muy beneficiosa para el almacenamiento a largo plazo de microorganismos deshidratados, y también se pueden almacenar y ser transportados a temperatura ambiente (Day y Stacey 2007). La adición de crioprotectores es considerada benéfica durante el proceso de liofilización como la malto dextrina que protege contra la desnaturalización de proteínas (Tan *et al.*, 2007). Un producto de control biológico, para tener posibilidades de competir comercialmente con productos químicos, debe tener una vida útil mínima de uno a dos años a temperatura ambiente (Abadías *et al.*, 2000). Por lo tanto, formulaciones de hongos deshidratados son

atractivas debido a su larga vida útil, fácil manipulación y almacenamiento a temperatura ambiente (Pedreschi y Aguilera, 1997).

En este orden de ideas, en el presente estudio se evalúa la estabilidad de cinco cepas nativas de hongos del género *Trichoderma* basados en la conservación de la capacidad de producir conidios y de viabilidad de conidios liofilizados conservados a diferentes temperaturas.

## II. MATERIALES Y METODOS

### Adquisición de *Trichoderma* spp.

Se utilizaron cinco cepas de *Trichoderma* spp: IP3M2-C4, BIF7-C3, F20M4, BIPF5-C2D2 y AP1M5-C1. Estas cepas fueron aisladas de agroecosistemas de cacao de las provincias de Bagua y Utcubamba como parte de un estudio de diversidad.

Estas cepas se conservaron a 4°C en el laboratorio de Entomología y Fitopatología de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.

### Diseño experimental

Para esta investigación se utilizó un DCA (diseño completamente al azar) con un arreglo factorial 5A x 3B x 2C, donde A son las cepas de *Trichoderma* spp. (IP3M2-C4, BIF7-C3, F20M4, BIPF5-C2D2 y AP1M5-C1), B es la temperatura de almacenamiento (4 y 28°C) y C los protectores (agua, malta), para un total de 20 tratamientos con tres repeticiones cada uno. El detalle de tratamientos se describe en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Descripción de tratamientos

Cepa	Agente Protector	Temperatura	N° de tratamiento
IP3M2-C4	Malta	4°C	1
IP3M2-C4	Malta	28°C	2
IP3M2-C4	Agua	4°C	3
IP3M2-C4	Agua	28°C	4
BIPF5-C2D2	Malta	4°C	5
BIPF5-C2D2	Malta	28°C	6
BIPF5-C2D2	Agua	4°C	7
BIPF5-C2D2	Agua	28°C	8
BIF7-C3	Malta	4°C	9
BIF7-C3	Malta	28°C	10
BIF7-C3	Agua	4°C	11
BIF7-C3	Agua	28°C	12
F20M4	Malta	4°C	13
F20M4	Malta	28°C	14
F20M4	Agua	4°C	15
F20M4	Agua	28°C	16
AP1M5-C4	Malta	4°C	17
AP1M5-C4	Malta	28°C	18
AP1M5-C4	Agua	4°C	19
AP1M5-C4	Agua	28°C	20

### Producción de *Trichoderma* spp. en sustrato sólido

La producción de *Trichoderma* spp. se realizó en sustrato de arroz pre-cocido estéril. Se transfirieron 200 g de arroz en matraces de 500 ml, se añadió la suspensión de *Trichoderma* previamente estandarizada de conidios ( $3.68 \times 10^7$  UFC/ml). Luego se incubaron a 28°C durante 12 días. Los cultivos se agitaron diariamente a mano para mantener las condiciones aeróbicas de *Trichoderma* spp. y favorecer la conservación de la biomasa en el proceso de liofilización (Grzegorzcyk *et al.*, 2018).

### Proceso de liofilización

Pasados los 12 días de incubación y con el sustrato cubierto de micelio y conidios se procedió a liofilizar cada uno de los tratamientos. Para preparar el sustrato para la liofilización fueron transferidos 200 gramos de arroz de *Trichoderma* spp. matraz de 500 ml y se añadió 20 ml de una solución estéril de maltodextrina (Malta) al 20% o agua destilada estéril, según los tratamientos descritos en la tabla 1, como agentes protectores de conidios, se homogenizó adecuadamente la mezcla y se secó en frío con el liofilizador de triada Labconco, en un colector una presión de 0,2 mbar durante 24 h. Posteriormente, los liofilizados se trans-

firieron a tubos plásticos de 50 ml de capacidad y almacenados a una temperatura de 4°C y 28°C según los tratamientos descritos.

### Concentración de conidios

La concentración de conidios·mL<sup>-1</sup> se determinó mediante la fórmula siguiente de Reyes-Figueroa *et al.* (2016).

$$C = (Cc) (4 \times 10^6) (Fd / 80)$$

Donde:

C = Concentración (conidios·mL<sup>-1</sup>)

Cc = Promedio de conidios contados en la cámara de Neubauer

Fd = Factor de dilución.

### Estabilidad de *Trichoderma* spp. en almacenamiento

Para determinar la vida útil de las cepas de *Trichoderma* spp. se evaluó la viabilidad expresada como la capacidad de germinación de los conidios formulados durante tres meses de almacenamiento. Las evaluaciones se realizaron mensualmente, la dilución que realizó el conteo de esporas se sembró por triplicado en placas Petri con medio agar PDA y se incubaron a 28

°C durante 18 horas. Se cuantificaron 100 conidios entre germinados y no germinados mediante observación al microscopio de cinco campos ópticos por unidad experimental (Ekesi *et al.*, 1999).

#### Análisis estadístico

Todos los análisis se realizaron con el software estadístico Infostat V. 2020. Se realizaron análisis de varianza para determinar la existencia de diferencias entre las medias obtenidas para concentración de conidios y porcentaje de germinación. Cuando se identificaron diferencias estadísticas se procedió a realizar una prueba de comparación de medias, específicamente la prueba Scott Knott ( $\alpha=0,05$ ).

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las medias de concentración de conidios producidos por cada uno de los tratamientos mostraron diferencias estadísticas significativas ( $p<0,001$ ). Diversas tendencias se observan entre los tratamientos según la cepa evaluada y la temperatura de almacenamiento a 30, 60 y 90 días de evaluación (Tabla 2).

En la mayoría de tratamientos se aprecia una disminución de la capacidad de producir conidios, tanto para tratamientos con adición de Malta como de agua destilada. A los 90 días de evaluación las tres cepas que obtuvieron la mayor producción de conidios son las que fueron conservadas a 28 °C y usando extracto de

**Tabla 2.** Concentración de conidios durante los tres meses de almacenamiento (medias con letras diferentes son significativamente diferentes, Scott Knott,  $\alpha=0,05$ )

Cepa	Agente protector	Temperatura	Tratamiento	Concentración de esporas ( $\times 10^7$ UFC/g)		
				30 días	60 días	90 días
IP3M2-C4	Malta	4°C	1	1,23d	1,1d	0,68d
IP3M2-C4	Malta	28°C	2	2,7b	2,07c	3,32 <sup>a</sup>
IP3M2-C4	Agua	4°C	3	0,87d	0,73d	0,6d
IP3M2-C4	Agua	28°C	4	2,02c	1,78c	2,55b
BIPF5-C2D2	Malta	4°C	5	1,28d	1,28d	0,98d
BIPF5-C2D2	Malta	28°C	6	1,85c	1,92c	1,67c
BIPF5-C2D2	Agua	4°C	7	1,2d	1,2d	0,65d
BIPF5-C2D2	Agua	28°C	8	2,07c	1,45d	1,55c
BIF7-C3	Malta	4°C	9	2,63b	1,97c	2,03b
BIF7-C3	Malta	28°C	10	3,63 <sup>a</sup>	2,15b	3,42 <sup>a</sup>
BIF7-C3	Agua	4°C	11	1,63c	1,8c	0,93d
BIF7-C3	Agua	28°C	12	2,73b	2,27b	2,45b
F20M4	Malta	4°C	13	3,77 <sup>a</sup>	1,88c	1,77c
F20M4	Malta	28°C	14	3,68 <sup>a</sup>	2,87 <sup>a</sup>	3,17 <sup>a</sup>
F20M4	Agua	4°C	15	3,05b	1,72c	1,07d
F20M4	Agua	28°C	16	2,88b	2,22b	2,88 <sup>a</sup>
AP1M5-C4	Malta	4°C	17	1,87c	1,27d	1,03d
AP1M5-C4	Malta	28°C	18	2,87b	2,3b	1,52c
AP1M5-C4	Agua	4°C	19	1,22d	1,67c	1,02d
gAP1M5-C4	Agua	28°C	20	1,4d	1,63c	2,17b

Malta como agente protector. Estos resultados difieren a los obtenidos por Grzegorzcyk *et al.* (2018), quienes registran cepas con concentraciones superiores a  $7 \times 10^8$  UFC/g sobre paja de arroz como sustrato de

fermentación después del período de incubación de tres meses utilizando malto dextrina como agente protector. Tewari y Bhanu (2004), alcanzaron producciones de conidios de  $2,8 \times 10^8$  UFC/g utilizando paja

**Tabla 3.** Porcentajes de germinación de conidios durante los tres meses de almacenamiento (medias con letras diferentes son significativamente diferentes, Scott Knott,  $\alpha = 0,05$ ).

Cepa	Agente protector	Temperatura	Tratamiento	Germinación de esporas (%)		
				30 días	60 días	90 días
IP3M2-C4	Malta	4°C	1	60,73b	60,6c	58c
IP3M2-C4	Malta	28°C	2	90,87 <sup>a</sup>	87,27a	84,13 <sup>a</sup>
IP3M2-C4	Agua	4°C	3	58,27c	60,4c	55,8c
IP3M2-C4	Agua	28°C	4	89,6 <sup>a</sup>	87,2a	85 <sup>a</sup>
BIPF5-C2D2	Malta	4°C	5	58,47c	61,07c	60c
BIPF5-C2D2	Malta	28°C	6	89,6 <sup>a</sup>	84,73b	79,53b
BIPF5-C2D2	Agua	4°C	7	61,8b	57,6c	59c
BIPF5-C2D2	Agua	28°C	8	88,6 <sup>a</sup>	84b	78,2b
BIF7-C3	Malta	4°C	9	60,8b	58,93c	58,8c
BIF7-C3	Malta	28°C	10	93,53 <sup>a</sup>	91,13a	90,53a
BIF7-C3	Agua	4°C	11	57,2c	57,47c	55,8c
BIF7-C3	Agua	28°C	12	88,8 <sup>a</sup>	83,67b	80,93b
F20M4	Malta	4°C	13	62,33b	62,67c	61c
F20M4	Malta	28°C	14	91,6 <sup>a</sup>	90,33a	91 <sup>a</sup>
F20M4	Agua	4°C	15	56,53c	59,33c	56,8c
F20M4	Agua	28°C	16	87,4 <sup>a</sup>	82,8b	79,2b
AP1M5-C4	Malta	4°C	17	60,73b	61,2c	59,93c
AP1M5-C4	Malta	28°C	18	89,4 <sup>a</sup>	89,27a	88,4 <sup>a</sup>
AP1M5-C4	Agua	4°C	19	56,67c	58,93c	60,6c
AP1M5-C4	Agua	28°C	20	89,93 <sup>a</sup>	88,27a	87,67a

de trigo cepa como sustrato de fermentación. Por su parte, Witkowska *et al.* (2016) alcanzaron  $1,7 \times 10^8$  y  $5,3 \times 10^8$  UFC/g al evaluar el efecto de la liofilización sobre la supervivencia y la cinética del crecimiento de cepas de *Trichoderma*. En ambos estudios se alcanzaron concentraciones superiores a las más altas registradas en nuestro estudio. Esto podría deberse a diversas causas, entre las más probables podrían destacarse el diferente sustrato de concentración y la diferente capacidad de producción de conidios que tienen las cepas diferentes en hongos del género *Trichoderma*.

Las medias de viabilidad de conidios mostraron diferencias altamente significativas entre los tratamientos evaluados ( $p < 0,0001$ ).

Todos los tratamientos almacenados a 4 °C presentaron germinaciones menores al 80% luego de 90 días de evaluación (Tabla 3). Valores que están por debajo de los márgenes establecidos como estándares nacionales e internacionales de calidad, que sugieren en la viabilidad como límite mínimo de aceptación para productos biológicos (Jenkins y Grzywacz, 2000). Estos resulta-

dos contrastan con los obtenidos por Papavizas (1985), que demostró que los conidios de *T. viride* no lograron mantenerse viables por un tiempo superior a 20 semanas cuando son almacenados a 30°C.

Para los tratamientos almacenados a 28°C se alcanzaron medias por encima del 80% en la mayoría de los casos (Tabla 3). Esto podría estar relacionado con los excipientes empleados para la liofilización, ya que la Malta se considera una sustancia protectora de secado que tiene un efecto osmorregulador sobre el microorganismo (Teixido *et al.*, 2005; Grzegorzczak *et al.*, 2018).

El retraso en la germinación de los conidios posiblemente se debe a la deshidratación que sufre durante el tiempo de almacenamiento, lo cual aumenta la tensión superficial. Cuando la temperatura es mayor tiene consecuencias negativas en la viabilidad de los microorganismos durante el almacenamiento y es probable que a mayor temperatura exista una mayor reactividad de las moléculas, presentándose reacciones de degradación que pueden ser tóxicas para el microorganismo (Burges, 1998; Chen *et al.*, 2008). En

nuestro trabajo la incorporación de la Malta aumentó la capacidad de conservar la viabilidad y logró una mejor estabilidad tanto para producción de conidios como para el porcentaje de germinación en ambas temperaturas de conservación.

## V. CONCLUSIONES

La biomasa de *Trichoderma* spp. y la viabilidad de los conidios luego del proceso de liofilización está necesariamente relacionada con la temperatura. Basados en la capacidad de producir conidios y la conservación de viabilidad de conidios los tratamientos que mostraron mejores resultados son los que estuvieron almacenados a 28°C. Por otro lado, los aditivos influyeron en la concentración y viabilidad de conidios luego de la liofilización y almacenamiento. Además, el uso de Malta obtuvo mejores resultados comparados con el agua. Estos resultados confirman el efecto protector que ejercen los excipientes sobre el principio activo, manteniendo su viabilidad durante el tiempo de almacenamiento.

## V. AGRADECIMIENTO

Este estudio fue financiado por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica FONDECYT CONTRATO N° 10-2018-FONDECYT-BM-ADT-AV

## VI. CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

## VII. CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Conceptualización, Santos Leiva y Elgar Hernandez; metodología, Santos Leiva y Leonor Mattos; análisis formal, Elgar Hernandez; Investigación, Elgar Hernandez y Santos Leiva; preparación de manuscrito (borrador), Elgar Hernandez; Revisión y edición de Manuscrito, Santos Leiva y Leonor Mattos; adquisición de fondos, Santos Leiva. Todos los autores han leído y están de acuerdo con la publicación de esta versión del manuscrito.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadias, M., N. Teixido, J. Usall, I. Vinas, y N. Magan. 2000. "Solute Stresses Affect Growth Patterns, Endogenous Water Potentials and Accumulation of Sugars and Sugar Alcohols in Cells of the Biocontrol Yeast *Candida Sake*." *Journal of Applied Microbiology* 89 (6): 1009–17. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.01207.x.
- Bateman, R. P., E. Hidalgo, J. García, C. Arroyo, G. M. Ten Hoopen, V. Adonijah, y U. Krauss. 2005. "Application of Chemical and Biological Agents for the Management of Frosty Pod Rot (*Moniliophthora Roreri*) in Costa Rican Cocoa (*Theobroma Cacao*)." *Annals of Applied Biology* 147 (2): 129–38. DOI: 10.1111/j.1744-7348.2005.00012.x.
- Benítez, T., A. M. Rincón, M. Carmen Limón, y A. C. Codón. 2004. "Biocontrol Mechanisms of *Trichoderma* Strains." *International Microbiology : The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology* 7 (4): 249–60.
- Burges, H. D. 1998. *Formulation of Microbial Pesticides, Beneficial Microorganisms, Nematodes and Seed Treatments*. Dordrecht (Países Bajos): Springer.
- Chen, H., X. Xiao, J. Wang, L. Wu, Z. Zheng, y Z. Yu. 2008. "Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*." *Biotechnology Letters* 30 (5): 919–23. DOI: 10.1007/s10529-007-9626-9.
- Day, J. G., y G. N. Stacey. 2007. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Totowa (EEUU): Humana Press. DOI: 10.1007/978-1-59745-362-2.
- Druzhinina, I. S., M. Komoń-Zelazowska, L. Atanasova, V. Seidl, y C. P. Kubicek. 2010. "Evolution and ecophysiology of the industrial producer *Hypocrea jecorina* (Anamorph *Trichoderma reesei*) and a new sympatric

- Agamospecies related to it.” *PLoS ONE* 5 (2): e9191. DOI: 10.1371/journal.pone.0009191.
- Ekesi, S., N. K. Maniania, y K. Ampong-Nyarko. 1999. “Effect of temperature on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium Anisopliae* and *Beauveria Bassiana* on *Megalurothrips Sjostedti*.” *Biocontrol Science and Technology* 9 (2): 177–85. DOI: 10.1080/09583159929767.
- Grzegorzcyk, M., A. Kancelista, W. Łaba, M. Piegza, y D. Witkowska. 2018. “The effect of lyophilization and storage time on the survival rate and hydrolytic activity of *Trichoderma* strains.” *Folia Microbiologica* 63 (4): 433–41. DOI: 10.1007/s12223-017-0581-0.
- Jenkins, N. E., y D. Grzywacz. 2000. “Quality control of fungal and viral biocontrol agents - assurance of product performance.” *Biocontrol Science and Technology* 10 (6): 753–77. DOI: 10.1080/09583150020011717.
- Papavizas, G. C. 1985. “Trichoderma and Gliocladium: Biology, Ecology, and Potential for Biocontrol.” *Annual Review of Phytopathology* 23 (1): 23–54. DOI: 10.1146/annurev.py.23.090185.000323.
- Pedreschi, F., y J. M. Aguilera. 1997. “Viability of Dry *Trichoderma harzianum* Spores under Storage.” *Bioprocess Engineering* 17 (3): 177–83. DOI: 10.1007/PL00008963.
- Reyes-Figueroa, O, C. F. Ortiz-García, M. T. De La Cruz, L. C. Lagunes-Espinoza, y G. Valdovinos-Ponce. 2016. “Especies de *Trichoderma* Del Agroecosistema Cacao Con Potencial de Biocontrol Sobre *Moniliophthora roreri*.” *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente* 22 (2): 149–63. DOI: 10.5154/r.rchscfa.2015.08.036.
- Tan, C. S, C. W. Ingen, y J. A. Stalpers. 2007. “Freeze-Drying Fungi Using a Shelf-Freezer Drier.” *Methods Mol Biol* 368: 119–25. DOI: 10.1007/978-1-59745-362-2\_8.
- Teixido, N., T.P. Canamas, J. Usall, R. Torres, N. Magan, y I. Vinas. 2005. “Accumulation of the Compatible Solutes, Glycine-Betaine and Ectoine, in Osmotic Stress Adaptation and Heat Shock Cross-Protection in the Biocontrol Agent *Pantoea agglomerans* CPA-2.” *Letters in Applied Microbiology* 41 (3): 248–52. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2005.01757.x.
- Tewari, L., y C. Bhanu. 2004. “Evaluation of Agro-Industrial Wastes for *Conidia* Based Inoculum Production of Bio-Control Agent: *Trichoderma harzianum*.” *Journal of Scientific and Industrial Research* 63 (10): 807–12.
- Witkowska, D., A. Kancelista, A. Wilczak, R. Stempniewicz, M. Pasławska, M. Piegza, W. Łaba, y M. Szczech. 2016. “Survivability and Storage Stability of *Trichoderma Atroviride* TRS40 Preserved by Fluidised Bed Drying on Various Agriculture By-Products.” *Biocontrol Science and Technology* 26 (12): 1591–1604. DOI: 10.1080/09583157.2016.1201457.