

PRODUCCION MASIVA Y FORMULACION DE MICROORGANISMOS BIOCONTROLADORES DE FITOPATOGENOS

Alba Marina Cotes P.*

* Investigador Principal. Programa Nacional de Manejo Integrado de Plagas -MIP- Centro de Investigación "Tibaitatá",
km. 14 vía a Mosquera, Cund.
Tel. 2861619 - FAX: (571) 282 8947 Apartado Aéreo 240142 Las Palmas, Santafé de Bogotá D.C. Colombia
E-mail: corpoic2@mutis.colciencias.gov.co

1.3

Uno de los obstáculos en la implementación del control biológico de microorganismos fitopatógenos como método efectivo de control es la producción masiva del microorganismo biocontrolador, dadas las cantidades que deben ser utilizadas para su aplicación en condiciones de campo y los problemas referentes a su formulación y conservación. En muchos casos, el agente de control biológico deberá tener propiedades que permitan su fácil manipulación, dado que muchos de ellos tienen tiempos de vida cortos y son muy sensibles a las manipulaciones en procesos industriales. Factores limitantes como su producción, formulación, los ensayos de toxicidad requeridos, así como el mercadeo y venta de los mismos, hacen difícil el uso de microorganismos como alternativas de control.

Buena parte de los esfuerzos actuales en investigación se dirigen a obtener por aislamiento o por manipulación genética nuevas cepas de microorganismos con alto grado de virulencia, amplio espectro de actividad y mayor permanencia en el medio ambiente; pero si la producción masiva o fermentación industrial del microorganismo no se puede lograr o no se puede controlar suficientemente para aprovechar eficientemente todas las ventajas que ellos puedan tener, o si sus costos de producción son muy elevados o su producción restringida, se pierden o se disminuyen las posibles ventajas tecnológicas, económicas y comerciales resultantes de una investigación científica exitosa.

Por todas estas razones se requiere un esfuerzo de investigación que intente la integración de ese modelo teórico del antagonismo de los microorganismos con sus condiciones de fermentación y con criterios de asignación de aportes al costo total del proyecto.

Una limitante en el conocimiento de métodos de producción industrial de microorganismos biocontroladores es que las compañías transnacionales que elaboran dichos productos actualmente, lo hacen empleando tecnologías patentadas o que se rigen bajo secreto industrial, lo cual dificulta el acceso al conocimiento sobre los métodos empleados para tal fin.

El campo de la tecnología para la producción de bioplaguicidas es amplio y nuevo en Colombia. Para el caso de los biocontroladores de fitopatógenos, hasta el momento, en el país no existe ningún producto registrado ante el ICA. Sin embargo, en el mercado empieza a ser creciente la oferta de productos no registrados, que en la mayoría de los casos no llenan los requisitos de control de calidad exigidos y cuya supuesta actividad biológica no está respaldada por resultados experimentales serios y representativos.

El logro de un bioplaguicida implica el cumplimiento de diversas etapas técnicas que aseguren la obtención de un producto seguro, eficaz y confiable. Dichas etapas comprenden el aislamiento del microorganismo, su conservación, la evaluación de su actividad biológica, el estudio de los mecanismos de acción implicados en dicha actividad, su producción masiva, estudios de preformulación, formulación, determinación de dosis y formas de aplicación, ensayos de campo, estudios de toxicidad, estudios de impacto ambiental, caracterización molecular, estudios de mercado y patentamiento.

Además, de las consideraciones ecológicas que hacen del control biológico una tecnología deseable, para la producción de un bioplaguicida, desde el punto de vista práctico, deben considerarse aspectos tales como la importancia económica del o de los cultivos y del o de los fitopatógenos para los cuales el producto sería utilizado y la disponibilidad local de materias primas para su producción.

Antes de proponer un microorganismo como agente de control biológico, éste debe ser identificado plenamente para garantizar que su utilización no represente riesgo para la sanidad vegetal ni para la salud humana o animal. Dicho microorganismo debe ser conservado bajo condiciones que garanticen la preservación de sus características genéticas y fisiológicas. Los métodos de conservación más frecuentemente utilizados son la criopreservación en nitrógeno líquido, conservación en suelo y liofilización.

Seguidamente, con el propósito de medir la real actividad biocontroladora de dicho microorganismo, se deben realizar bioensayos bajo condiciones controladas de laboratorio y/o invernadero. Posteriormente, se deben realizar estudios tendientes al entendimiento de los mecanismos de acción involucrados en el control biológico, de tal manera que al definir los requerimientos que tiene el microorganismo para ejercer su actividad antagonista, se potencie dicha actividad cuando éste sea aplicado bajo condiciones naturales de campo.

Respecto a los mecanismos implicados en el control biológico de fitopatógenos, los más estudiados son aquellos que implican una interacción directa entre el biocontrolador y el fitopatógeno, tal es el caso de la competencia, parasitismo y antibiosis. Sin embargo, en los últimos años, han cobrado especial interés los

mecanismos que involucran al hospedero tales como la inducción de respuestas de defensa y la estimulación del crecimiento.

Con el fin de producir las cantidades necesarias para la aplicación de este microorganismo en condiciones de campo y con miras a un posible escalamiento industrial del mismo, se deben definir los requerimientos químicos y físicos para producir en forma óptima los propágulos que se consideren activos en el biocontrol sin afectar la actividad biocontroladora de los mismos.

Para su aplicación bajo condiciones de campo, los microorganismos biocontroladores deben ser producidos y formulados en grandes cantidades como inóculos competentes que sean compatibles con las tecnologías existentes de almacenamiento y aplicación. El agente de control biológico debe tener una vida mínima de almacenamiento de seis meses, aunque lo óptimo es que ésta sea de dos años.

La producción masiva de los microorganismos biocontroladores de fitopatógenos, puede llevarse a cabo mediante fermentación líquida o sólida. La primera se utiliza principalmente para la producción de bacterias y de levaduras, mientras que la segunda se utiliza más frecuentemente para la producción de mohos, dado que éstos tienen dificultades para esporular bajo condiciones normales de fermentación sumergida. Sin embargo, en varios casos, se ha demostrado la producción masiva de conidias, al modificar las condiciones de fermentación líquida.

La presión selectiva a la que se somete el microorganismo para su producción bajo condiciones de laboratorio o industriales, puede reducir su actividad biocontroladora. Es importante destacar, que en muchos casos, la actividad biocontroladora de un microorganismo está directamente relacionada con el sustrato en el cual éste se produce. Esta actividad también está relacionada con el manejo que se haga de la biomasa producida, pues factores tales como el método de separación de la biomasa empleado, los procedimientos utilizados para su formulación, y secado, así como las condiciones que se utilicen para su almacenamiento y transporte no sólo pueden afectar la viabilidad del microorganismo sino también pueden afectar su actividad biológica.

Una etapa importante en el desarrollo de un bioplaguicida es la preformulación, la cual se define como el conjunto de actividades organizadas, conducentes a la determinación de las características del principio activo (el microorganismo) y de los cambios químicos, físicos y microbiológicos que éste pueda sufrir solo o en combinación con los auxiliares de formulación (excipientes) necesarios para la elaboración de un producto final.

Basados en los resultados de preformulación, se desarrolla la formulación del bioplaguicida en la cual, el ingrediente activo junto con otros materiales debe formar un producto activo contra la plaga, seguro y fácil de aplicar. Este

producto, debe tener propiedades de cobertura y adherencia al sustrato al cual es aplicado. Sin embargo, el tipo de formulación que se haga de un microorganismo biocontrolador, debe estar de acuerdo con el hábitat en el que éste será aplicado. Si el bioplaguicida ha de ser aplicado en partes aéreas de la planta, la formulación deberá contener principalmente excipientes que le confieran propiedades de adherencia, tolerancia a la desecación, tolerancia a altas temperaturas y tolerancia a la luz ultravioleta del sol; mientras que si el bioplaguicida ha de ser aplicado en el suelo, la formulación deberá contener principalmente una base nutricional que permita el establecimiento del microorganismo y excipientes que lo protejan de la antimicrobiosis y que le ofrezcan estabilidad ante condiciones de pH adversas.

Los bioplaguicidas pueden ser de diferentes tipos: polvos para espolvoreo, polvos humectables, granulados y líquidos emulsionables. Los excipientes que con mayor frecuencia constituyen las formulaciones de bioplaguicidas son diluyentes o diluentes que son inertes frente al biocontrolador y a los patógenos. Estos actúan como vehículos en las formulaciones líquidas y sólidas respectivamente.

Los vehículos sólidos, tienen la función de diluir el principio activo, para la elaboración de polvos solubles, para este propósito se utilizan principalmente sales solubles en agua como cloruros, sulfatos, carbonatos, fosfatos, etc., mientras que para la elaboración de polvos para espolvoreo se utilizan tierras inertes tales como silicatos (talcos), arcillas, caolines, bentonitas, tierra de diatomeas, harinas etc.

Para las formulaciones tanto solubles como emulsionables, se utilizan vehículos líquidos (disolventes), dentro de los que se encuentran el xileno, algunos derivados del petróleo, ciclohexanona, dimetilformamida, alcoholes como el etílico, isopropílico, butílico etc. Cabe destacar, que en muchos casos, el uso frecuente de estos compuestos puede producir fitotoxicidad.

Los coadyuvantes son otro tipo de excipientes que ayudan a mejorar las propiedades del principio activo. Estos pueden contribuir por ejemplo a conservar la estabilidad biológica y física del producto bajo condiciones razonables de almacenamiento, pueden incrementar su cobertura y adherencia, pueden mejorar la dispersión y suspensibilidad del microorganismo en los tanques de aplicación, incrementar la resistencia del microorganismo a la intemperie (lluvia, degradación por luz ultravioleta y antimicrobiosis) y bajo condiciones de campo, ayudar al establecimiento del microorganismo y estimular la actividad biocontroladora de éste.

Los tensioactivos que pueden ser de naturaleza catiónica, aniónica o no iónica, están dentro de los coadyuvantes más utilizados, pues éstos mejoran la mojabilidad del producto, permiten la preparación de suspensiones estables,

mejoran las propiedades de extensibilidad de las formulaciones permitiendo una aplicación más homogénea y son indispensables para la formación de emulsiones. Los tensioactivos más utilizados son el tween (polisorbatos 20, 40, 60, y 80), el Span (ésteres de sorbitán 20, 40, 60, 80), algunos ésteres de ácidos grasos como el Myrj (estearatos de polyoxyetileno 45, 49, 51, 52 y 53). Dado que en su mayoría, estos tensioactivos son lipofílicos, permiten la incorporación del producto dentro de vehículos líquidos lipofílicos.

Los agentes de fluidez se utilizan en las formulaciones sólidas para mejorar el flujo de los polvos y evitar la aglutinación de los propágulos microbianos bajo condiciones prolongadas de almacenamiento. Los compuestos más utilizados para este fin son los silicatos de aluminio y sodio (talcos).

Para favorecer la suspensibilidad de los polvos humectables, se utilizan compuestos que aumentan la viscosidad del agua, los cuales retardan la caída de las partículas. Dentro de éstos, los más utilizados son gomas, caseinatos, albúmina, carragenan, almidón, celulosa, alcohol polivinílico, sulfonatos de lignina, naftaleno etc.

Los adherentes tales como las celulosas, la albúmina, la caseína, la gelatina, las gomas, el carragenan, etc., son utilizados principalmente para evitar el arrastre del microorganismo por las lluvias, rocío y viento. Estos compuestos, también pueden usarse para adherir otros excipientes sobre la superficie del principio activo.

Dado que la luz ultravioleta del sol es una de las principales causas de pérdida tanto de viabilidad como de actividad biológica de los microorganismos biocontroladores, la utilización de filtros solares tales como benzofenonas, salicilatos, y algunos derivados del ácido p-amino benzoico han demostrado buenos resultados bajo condiciones de campo. También han sido reportados aceites vegetales y minerales por su cualidades de protección ante la luz ultravioleta.

Aunque son muchas las etapas que se deben cumplir para producir un bioplaguicida efectivo y estable, es importante que quienes consideren la práctica del control biológico como una alternativa sostenible para el manejo de plagas agrícolas, realicen un esfuerzo de investigación que intente la integración del modelo teórico del control biológico, con las condiciones de producción masiva y formulación del microorganismo que garanticen su efectividad bajo condiciones de campo.

BIBLIOGRAFIA

Atlas surface active agents: Their characteristics, the HLB system of selection. 1950. Atlas Powder company, Wilmington, Delaware. New York.

Cotes, A. M., Lepoivre, P., Semal, J. 1994. Correlation between carboxymethylcellulase activity, precolonisation of bean seeds coat by *Trichoderma*, and protection against *Pythium*. In Diseases and Insects in Forest Nurseries. Ed. INRA, Paris (Les Colloques, N° 68). pp.179-188.

Cotes, A. M., Lepoivre, P., Thonart, P. 1994. Relationship between the protective activities of several strains of *Trichoderma* against damping-off agents and their ability to produce hydrolytic enzymes activities in soil or in synthetic media. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent, 59/3a pp.931-941.

Galán, L. 1993. Biotecnología de la producción de bioinsecticidas microbianos centrada en *Bacillus thuringiensis*. Universidad autónoma de México, Primera edición.

Gareth, J. 1993. Exploitation of microorganisms. Chapman & Hall, London.

Handbook of farmaceutical excipients. 1986. American Pharmaceutical Association.

Lewis, J. A. 1991. Formulation and delivery systems of biological control agents with emphasis of fungi. In the rhizosphere and Plant growth, (eds D. L Kiester and P. B. Cregan), Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

Holfstein, R., Fridlender, B. Chalutz, E. 1994. Large scale production of pilot testing of biological control agents for postharvest diseases. In Biological control of postharvest diseases theory and practice, (Eds C. Wilson and M. Wisniewski), CRC Press, London.