



Ministerio de Agricultura
y Desarrollo Rural

Asohfrucol
Asociación Hortifructícola de Colombia
Administradora del Fondo Nacional
de Fomento Hortifructícola



**ESTRATEGIAS DE CONTROL
BIOLÓGICO DE *Fusarium*
oxysporum EN EL CULTIVO DE
UCHUVA (*Physalis peruviana*)**

Cotes, A.M., Jiménez, P., Rodríguez, M.X., Díaz, A., Zapata, J., Gómez, M., Grijalba, E., Villamizar, L., González, C., Smith, A., Mejía, C., Mesa, P., Cruz, L.C. / Estrategias de control biológico de *Fusarium Oxysporum* en el cultivo de la Uchuva (*Physalis peruviana*). Bogotá: Corpoica, 2012. 82 p.

Palabras clave: UCHUVA, *PHYSALIS PERUVIANA*, CONTROL BIOLÓGICO, *FUSARIUM OXYSPORUM*, ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS, ENFERMEDADES FUNGOSAS.



EQUIPO TÉCNICO:

Investigadores

Alba Marina Cotes, Ph. D., Pedro Jiménez, Ph. D. (UMNG)
María Ximena Rodríguez, Ph. D. (PUJ), Andrés Díaz, M. Sc., Jimmy Zapata, PU,
Martha Gómez, Ph. D., Erika Grijalba, M. Sc., Laura Villamizar, Ph. D.
Carolina González, Ph. D., Alex Smith, PU, Cindy Mejía, PU
Paula Mesa, PU, Lina Carolina Cruz, M. Sc.

Estudiantes

Diana Caviedes, Andrés Guacaneme, Johan Sáenz, Martha Arias

Auxiliares de laboratorio

Hugo Cárdenas, Auxiliar, Gabriela Perdomo, Auxiliar
Darwin Vásquez, Auxiliar

Editor

Andrés Díaz G.

La presente publicación ha sido elaborada con la cofinanciación del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural -MADR- y la Asociación Hortifrutícola de Colombia -Asohofrucol-. El contenido de la misma es responsabilidad exclusiva de los investigadores y en ningún caso debe considerarse que refleja los puntos de vista del MADR o Asohofrucol.

© Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica

ISBN: 978-958-740-093-9

CA: 1675

CUI: 1347

Primera edición: Mayo de 2012

Tiraje: 350 ejemplares

Línea de atención al cliente: 018000121515

atencionalcliente@corpoica.org.co

www.corpoica.org.co

Producción editorial:

Diagramación, impresión y encuadernación



www.produmeditos.org

Diseño gráfico:

Impreso en Colombia

Printed in Colombia

Agradecimientos

Los autores expresan su gratitud:

A el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y Asofrucol por su apoyo financiero para la realización del presente trabajo.

A Hernando Parra, propietario de la finca La Ucrania en la vereda de Santa Helena, por facilitar la logística requerida para llevar a cabo las evaluaciones en campo en uchuva en el municipio de Granada, Cundinamarca.

A Pedro León Gómez, por suministrar semillas de uchuva de alta calidad para utilizar en todos los experimentos en laboratorio, invernadero y campo.





Contenido

		Página
1	Importancia agronómica de la uchuva - Limitantes <i>Jimmy Zapata</i>	7
2	Etiología de la enfermedad causada por <i>F. oxysporum</i> en el cultivo de uchuva <i>Pedro Jiménez, Tatiana Sánchez, Paula Forero</i>	13
3	Métodos de control de <i>Fusarium</i> <i>Alex Smith, Paula Mesa</i>	23
4	Aislamiento y caracterización de rizobacterias <i>Jimmy Zapata, Andrés Díaz, Diana Caviedes</i>	27
5	Producción masiva de rizobacterias <i>Andrés Díaz, Cindy Mejía, Lina Carolina Cruz, Johan Sáenz</i>	32
6	Formulación de bioproductos <i>Martha Gómez, Erika Grijalba, Laura Villamizar, Martha Arias</i>	45
7	Evaluaciones en invernadero y selección de prototipos a base de rizobacterias <i>Jimmy Zapata, Andrés Díaz</i>	62
8	Avances en el control biológico de <i>F. oxysporum</i> <i>Andrés Díaz, Alex Smith, Paula Mesa, Jimmy Zapata</i>	71
9	Perspectivas para el control biológico de <i>Fusarium</i> <i>Andrés Díaz</i>	82





1 Importancia agronómica de la uchuva - limitantes

Jimmy Alexander Zapata

Investigador Laboratorio de Control Biológico
Centro de Biotecnología y Bioindustria - CBB

Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - Corpoica.

E-mail: jzapatan@corpoica.org.co

INTRODUCCIÓN

La uchuva (*Physalis peruviana*) es originaria de los Andes peruanos, pues los incas la cultivaban y producían en sus “jardines reales”; sin embargo, luego de la conquista española, al igual que otros cultivos desapareció.

Es una planta perenne, herbácea, que crece silvestre o semisilvestre en zonas entre los 1500 y 3000 msnm, presenta porte arbustivo y se propaga por semilla, creciendo normalmente sin tutorado hasta una altura de 1 a 1,5 m. Las plantas que se desarrollan con un tallo principal presentan de 4 a 5 ramas productivas dominantes, y las flores son solitarias y hermafroditas, son fácilmente polinizadas por insectos, el viento o autopolinización (Figura 1).

El fruto es una baya globosa u ovoide y jugosa, con un diámetro entre 1,25 y 2,15 cm con un peso entre 4 a 10 gramos, una estructura interna similar a la de un tomate. El fruto varía de color amarillo al ocre o amarillo naranja cuando madura, su piel es delgada y lustrosa y está recubierta con un cáliz o capacho (Figura 1). Su sabor va desde ácido hasta muy agrio y se consume al natural, en ensaladas, helados y tortas. La uchuva es excelente fuente de provitamina A (3000 I.U. de caroteno por 100 g) vitamina B y C, proteína (0,3%) y fósforo (55%), valores altos para una fruta.



Figura 1. Planta, flor y fruto de uchuva.



El cultivo de la uchuva presenta buen comportamiento en las regiones que se ubican entre 1800 y 2800 metros sobre el nivel del mar, con alta luminosidad, temperaturas promedio entre 13 y 18 grados centígrados, precipitación anual de entre 1000 y 2000 milímetros y humedad relativa de 70 a 80%, preferiblemente en suelos con estructura granular y textura areno - arcillosa, que contengan altos contenidos de materia orgánica y un pH entre 5,5 y 6,8. Los suelos que registran alta fertilidad favorecen el crecimiento de las plantas, mientras que en los de fertilidad baja se registra fructificación temprana y baja calidad de los frutos.

Aunque no se conocen variedades definidas de la especie *P. peruviana*, sí se conocen varios ecotipos, cultivándose básicamente tres: Kenia, Sudáfrica y Colombia, de donde han tomado sus nombres; estos se diferencian por el color y el tamaño del fruto, por la forma del cáliz y por el peso de los frutos cuando maduran. Los ecotipos Sudáfrica y Kenia tienen un peso promedio de 6 a 10 g, mientras que el de origen colombiano es más pequeño y puede pesar entre 4 y 5 g; así mismo, muestra coloraciones vivas y mayor contenido de azúcar, cualidad que le brinda una ventaja en los mercados internacionales.

IMPORTANCIA AGRONÓMICA DE LA UCHUVA

En Colombia, primer productor mundial, es uno de los frutales de mayor importancia debido en parte a los ingresos generados por concepto de las exportaciones especialmente al mercado europeo, donde en el año 2007 se destinó el 95% de las exportaciones colombianas de uchuva principalmente a países como Holanda, Alemania, Bélgica, Suecia, Francia y Reino Unido, en tanto que el 5% restante se dirigió esencialmente a los mercados norteamericanos (Canadá y Estados Unidos), con cuantías mínimas a otros mercados entre los que se cuentan Aruba, Brasil y Honk Kong (China) (Figura 2), terminando el año con un registro récord de declaración de exportaciones colombianas de uchuva fresca por US\$ 24,2 millones y 14.900 toneladas (t) de

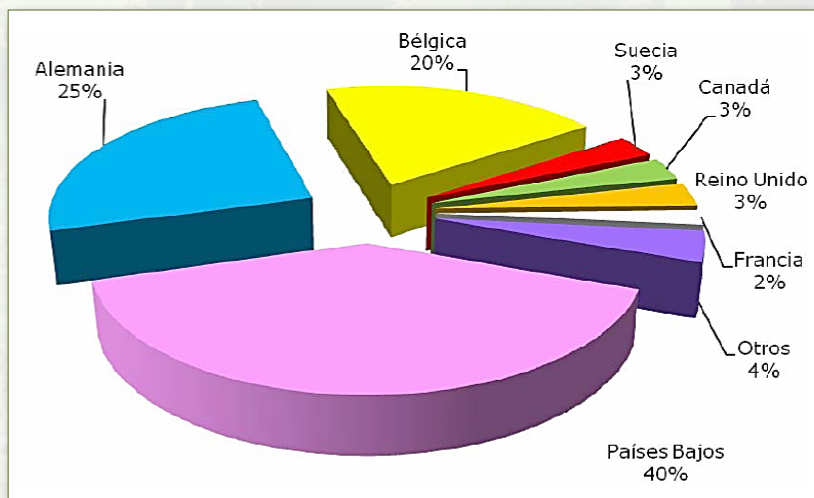


Figura 2. Principales países destino de las exportaciones colombianas de uchuva para el año 2007. Fuente: Inteligencia de mercados - Frutas exóticas en Colombia, Exportaciones, Legiscomex.com 2008.

producto. Esta dinámica y el monto de exportación que ha alcanzado la uchuva, la convierte de lejos en la principal fruta de exportación de Colombia en la categoría de promisorios, diferentes de las tradicionales como banano y plátano (Legiscomex. com, 2008; MADR, 2009).

El área sembrada en Colombia con esta fruta es de 841 hectáreas (ha) (2008), con una producción de 15.463 t y un rendimiento promedio de 18 t/año, siendo en su orden Boyacá, Antioquia y Cundinamarca los principales departamentos productores de esta fruta (Figura 3) (MADR, 2008). La uchuva es cultivada en lotes promedio entre 0,63 ha y 0,86 ha, indicando que su producción es esencialmente de economía campesina, donde parte de la mano de obra proviene del núcleo familiar empleando en promedio 443 jornales/ha/año (Torrado *et al.*, 2005).

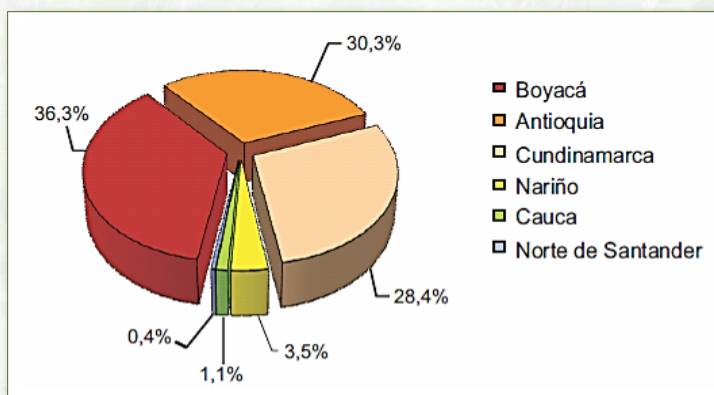


Figura 3. Porcentaje de participación departamental para el cultivo de la uchuva en Colombia para el año 2008. Fuente: Anuario estadístico de frutas y hortalizas 2004 - 2008 (MADR 2008).

Limitantes del cultivo de uchuva

A pesar del crecimiento que ha presentado el cultivo de uchuva en los últimos años, su producción se ha visto limitada por diferentes problemas fitosanitarios, entre los que se cuentan plagas y enfermedades que en muchos casos provocan pérdidas de hasta el 40% de la producción total.

Dentro de las plagas más importantes para este cultivo se encuentra el perforador del fruto, *Heliothis subflexa*, polilla de la familia Noctuidae que se encuentra en todas las zonas donde se cultiva la uchuva. Los daños son causados por la larva desde sus primeros instares, ya que una vez eclosiona esta perfora el capacho en estado verde, se alimenta del fruto y eventualmente la larva pasa a otros frutos para continuar su alimentación. La presencia de la plaga se nota únicamente cuando hace el orificio de salida para alimentarse en otro fruto o para empupar, o por la presencia de excrementos en el ápice del capacho (Zapata, 2002) (Figura 4).

Otra plaga que se considera en este cultivo son los áfidos, estos atacan el interior del capacho, depositan excrementos y dejan exuvias que deterioran su apariencia. Los ataques se presentan en algunas plantas y no en forma generalizada en el cultivo. A diferencia de otros cultivos, no se han detectado ocasionando daños en las hojas (Zapata, 2002).





Figura 4. A y B. Perforador del fruto *Heliopsis subflexa*. C. Daño ocasionado por áfidos. A y B. Fuente: Zapata, J. L.; Saldarriaga, A.; Londoño, M.; Díaz, C. (2002).

De otra parte, dentro de las enfermedades más importantes de este cultivo se encuentra la mancha gris de las hojas y el cáliz, producida por el hongo *Cercospora physalidis* Ellis (Zapata, 2002), considerada como la principal enfermedad foliar de la uchuva, la cual se presenta con mayor intensidad en épocas de alta humedad, representada por lesiones de forma angular o redonda de color verde claro (Figura 5). En el cáliz la mancha se hace rápidamente difusa alcanzando en corto tiempo toda la superficie. La infección ocurre primero en las hojas más viejas y avanza hacia el follaje nuevo. En estados avanzados ocasiona defoliación y fructificación prematura (Zapata, 2002).

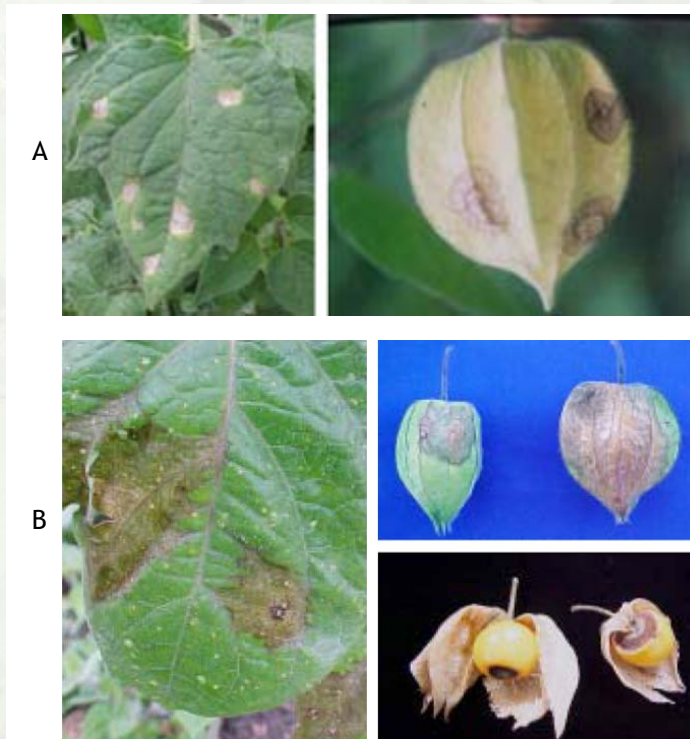


Figura 5. A. Mancha gris producida por *Cercospora* sp. en hojas y capachos. B. Manchas producidas por *Phoma* sp. Fuente: Zapata, J. L.; Saldarriaga, A.; Londoño, M.; Díaz, C. (2002).

La muerte descendente causada por el hongo *Phoma* sp. limita la producción del cultivo, ya que puede afectar en cualquier estado de desarrollo los tallos, hojas, capachos y frutos (Zapata, 2002).

Sin embargo, la enfermedad más limitante y la que mayor impacto económico y productivo en el cultivo de la uchuva ha producido es el marchitamiento vascular, causado por el hongo *Fusarium oxysporum*. Este patógeno penetra por la raíz, obstruye y degrada los haces vasculares generando una coloración marrón tanto en raíz como tallo; como resultado de la infección se presentan síntomas como clorosis, pérdida de turgencia (encopamiento de hojas), poco desarrollo de los frutos, y por último se produce la muerte de la planta (Figura 6).

Ha sido tal el impacto que esta enfermedad ha tenido sobre este cultivo, que provocó en el departamento de Cundinamarca, primer productor nacional de esta fruta hasta el año 2007, una disminución de 689 ha sembradas en 2004 a solo 247 ha en 2008; esto causó que muchos de los cultivos en los municipios más productores como Fusagasugá, Granada y Silvania, se movieran hacia zonas potencialmente libres del patógeno en los departamentos de Boyacá y Antioquia; sin embargo, en estas zonas la incidencia de la enfermedad ha venido aumentando (MADR, 2009).



Figura 6. Signos y síntomas del marchitamiento vascular en plantas de uchuva: A. Planta marchita; B. Necrosis en el cuello de la raíz; C y D. Taponamiento vascular evidenciado por la colonización del xilema por estructuras de *Fusarium oxysporum*.



F. oxysporum es un hongo de difícil control, puesto que ha desarrollado resistencia a muchos de los fungicidas utilizados para su control. Adicionalmente es persistente en el suelo, debido a su versatilidad fisiológica y su capacidad de producir clamidosporas (estructuras de resistencia) (Gordon y Martyn, 1997).

CONCLUSIÓN

De todos los limitantes causados por plagas de insectos y enfermedades por bacterias u hongos patógenos, en la última década se ha reconocido el marchitamiento vascular como la enfermedad más limitante debido a su agresividad en campo, su persistencia y las elevadas pérdidas económicas que causa a los agricultores en este cultivo.

LITERATURA CITADA

- Gordon, T.R.; Martyn, R.D. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual Review of Phytopathology*. 35:111-28. 1997.
- Legiscomex.com. Inteligencia de mercados- Frutas exóticas en Colombia. 2008.
En: www.legiscomex.com/BancoMedios/.../est_col_frutas_exot_6.pdf Consulta: 10/08/11.
- MADR. Anuario estadístico de frutas y hortalizas 2004 – 2008 y sus calendarios de siembras y cosechas. *Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. República de Colombia*. 2008.
- MADR. Boletín informativo. Agenda de investigación de cadenas productivas. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. República de Colombia. 2009.
En: www.minagricultura.gov.co/archivos/boletin-_agenda_004.pdf Consulta: 10/08/11.
- Toro, J. C. Situación actual de la investigación y desarrollo de frutas tropicales en Colombia. *En: CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Propuesta para un programa de frutas tropicales. Bogotá, CIAT*. pp. 1-42. 2001.
- Torrado, A.; Sánchez, G.; Pedraza, J. M.; Saavedra, M. Implementación de Buenas Prácticas Agrícolas en el cultivo de la Uchuva en Colombia. *FAO-Corpoica-Sena-Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural*. 2005.
- Zapata, J. L.; Saldarriaga, A.; Londoño, M.; Díaz, C. Manejo del cultivo de la uchuva en Colombia. *Boletín Técnico. Corpoica C.I. La Selva - Rionegro, Antioquia – Colombia*. 2002.

2 Etiología de la enfermedad causada por *F. Oxysporum* en el cultivo de uchuva

Pedro Jiménez, Tatiana Sánchez, Paula Forero

Investigador Docente. Facultad de Ciencias Básicas,
Universidad Militar Nueva Granada. Bogotá, Colombia.

E-mail: pedro.jimenez@unimilitar.edu.co

RESUMEN

Para proponer una escala de severidad para la fusariosis en uchuva, aislamientos del género *Fusarium* fueron extraídos de plantas de uchuva que mostrasen síntomas. Una vez establecida la colección de hongos, se clasificaron y se inocularon en plantas sanas para observar el proceso de colonización y el progreso de la enfermedad. Se agruparon los síntomas de manera tal que permitieran establecer una escala gráfica de uso simple para la estandarización del tema. Un resultado no esperado fue la identificación de dos especies: *F. solani* y *F. pseudocircinatum*, las cuales no habían sido reportadas como inductoras de la enfermedad. Por último, es oportuno destacar que el presente trabajo es la primera propuesta para establecer en una escala los distintos grados de enfermedad por los que atraviesa la uchuva al experimentar fusariosis.

INTRODUCCIÓN

Uno de los géneros de hongos más importantes cuando se estudian enfermedades de plantas es *Fusarium*, debido a que ocasiona grandes pérdidas económicas a nivel mundial al inducir enfermedades sobre muchas especies (Nelson *et al.*, 1994; Olivain y Alabouvette, 1999; Fravel *et al.*, 2003). Quizás la más conocida de estas enfermedades es la marchitez vascular de las plantas, en la cual el hongo impide la traslocación de agua y nutrientes a lo largo de la planta conduciendo finalmente a la muerte del individuo (Schumann y D’Arcy, 2006). En Colombia, especies de este género afectan de manera importante flores y frutales de alta importancia comercial, como clavel, tomate, uchuva, etc. De esto se desprende que es necesario encontrar maneras de controlar al hongo, y debe comenzarse por conocerse la enfermedad y su desarrollo, no solo los síntomas finales de la misma. Dado que la uchuva fue un cultivo con gran crecimiento en los últimos años (Legiscomex, 2008), el cual se ha visto seriamente afectado por este hongo, se escogió para buscar una manera alternativa y efectiva de controlar la enfermedad.

Diferentes especies del género *Fusarium* ocasionan enfermedades, las cuales afectan diversos cultivos como plantas hortícolas y en especial granos y cereales de importancia mundial como el arroz y maíz, entre otros (Nelson *et al.*, 1994). Sin



embargo, aunque se conocen muchos cultivos que han sido atacados por *Fusarium* sp, en especial por la especie *Fusarium oxysporum*, puede ser que aún no hayan sido reportados todos los potenciales hospederos de importancia agrícola (Gordon y Martyn, 1997), de ahí la importancia de estudiar cómo se desarrollan las enfermedades causadas por *Fusarium* en este tipo de cultivos.

Dentro de las enfermedades causadas por este género, las más representativas son las del tipo vascular; estas al afectar el transporte de agua y minerales a través del cuerpo del hospedero producen síntomas como marchitamiento, decaimiento y amarillamiento (Schumann y D’Arcy, 2006). La marchitez causada por la especie *Fusarium oxysporum* es muy importante, debido a su amplio rango geográfico, la persistencia del inóculo en el suelo y al alto número de hospederos susceptibles (Beckman, 1987). Esta probablemente es la especie de *Fusarium* más importante en términos económicos, puesto que puede afectar hasta el 90% de las plantas, como ha ocurrido en cultivos como el tomate. Al estar presente en el cultivo, esta especie induce la aparición de síntomas como la deshidratación de la parte apical hacia la parte basal (conocido como marchitez descendente), provocando la muerte de las plantas y por lo tanto pérdidas de gran importancia en la producción (Schumann y D’Arcy, 2006). Lo anterior afecta directamente a los productores, quienes no solo tienen una pérdida económica sino de tiempo y desgaste del suelo. Incluso si la enfermedad no perjudica a la producción total del cultivo, la calidad del producto puede estar comprometida, lo cual limita las posibilidades de mercadeo y restringe, en muchos casos, la oportunidad de exportación (CCI, 2005). Además, el control de *Fusarium* es difícil, en parte porque se encuentra en casi todo tipo de suelo y es un componente habitual de la microflora (Fravel *et al.*, 2003).

En el año 2003, la especie *Fusarium oxysporum* fue reportada como el patógeno causal de la marchitez vascular en el cultivo de la uchuva (Carreño, 2007). Es importante evaluar la enfermedad que *Fusarium* produce al cultivo de la uchuva, debido a la amplia aceptación en mercados internacionales y un potencial cada vez mayor (CCI, 2005), así como aportar información que eventualmente puede ayudar en la evaluación de biocontroladores. Dado que se desconocen detalles de la etiología de la enfermedad en este cultivo, el objeto de este trabajo fue aislar y reconocer los *Fusarium* asociados a plantas sintomáticas, determinar la patogenicidad de los aislamientos y describir el progreso de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron plantas de uchuva que mostraran signos avanzados de la enfermedad que pudieran explicarse por el ataque de *Fusarium* sp. (fusariosis). Las muestras provinieron de diferentes localidades del departamento de Cundinamarca: Granada, Sylvania y Pasca.

Aislamiento de los hongos

Se procedió a realizar una esterilización de la superficie de las muestras. Para ello se tomaron submuestras que incluyen 3 cm por encima y por debajo de la corona. Esos segmentos fueron sumergidos en una solución 5% de hipoclorito de sodio durante 3 mi-

nutos, después fueron enjuagados 5 veces con agua destilada estéril. Posteriormente se procedió a obtener secciones de 1 cm de longitud, las cuales se cultivaron en cajas de Petri sobre agar papa dextrosa a un cuarto de su concentración (APD 1/4).

Determinación taxonómica

Los diferentes aislamientos se inocularon sobre medio APD a concentración completa y agar Agua-Hoja de clavel (AHC) (Figura 7B) (Nelson *et al*, 1983; Leslie y Summerell, 2006); una vez desarrollados fueron identificados mediante el uso de manuales de identificación de *Fusarium* utilizando la observación de sus estructuras, como recomiendan Leslie y Summerell (2006).

Pruebas de patogenicidad

Preparación de inóculos

Los aislamientos fueron reactivados, cultivándolos en cajas de Petri con APD a $\frac{1}{4}$, y se les dejó crecer durante 8 días, cuando se cosechó para preparar una suspensión conidial, que serviría para las pruebas de patogenicidad.

Las suspensiones se elaboraron añadiendo 2 ml de agua destilada estéril (ADE) a la caja de Petri; sobre el micelio de cada hongo y con ayuda de un asa bacteriológica, se rasparon las superficies del medio separando así las macro y microconidias, suspendiéndolas en el agua. Este volumen era retirado de la caja y se realizaron dos lavados adicionales, cada uno con 3 ml de ADE para recolectar las conidias restantes.

A cada suspensión obtenida se le determinó el título, contando las esporas presentes en tres submuestras, utilizando una cámara de Neubauer Improved (Optik Labor). Conocido el título se corrigieron las concentraciones conidiales a 10^4 , 10^5 y 10^6 UFC/ml para las pruebas de patogenicidad, las cuales eran aplicadas en el suelo experimental a saturación, y como solución donde se sumergieron las raíces de las plántulas en las pruebas de patogenicidad.

Después de no encontrar diferencias significativas en las velocidades de infección utilizando las concentraciones mencionadas, y habiendo determinado que los títulos de inóculo en suelo alcanzaban concentraciones alrededor de 10^2 UFC/g de suelo, se prefirió utilizar el método de inoculación denominado salvado-grano (“Chaff-grain”). Este método consiste en la mezcla de granos de cereales, los cuales han sido pre-inoculados con el hongo, con el suelo en donde se establece la planta que se va a evaluar. En este estudio, el grano inoculado fue trigo y el protocolo de infección se encuentra reportado por Leslie y Summerell (2006), siendo ampliamente aceptado en este tipo de estudios.

Inoculación de suspensiones en plántulas de uchuva

El paquete radicular de 6 plántulas, presentando dos pares de hojas verdaderas expandidas, que iban a ser inoculadas con las suspensiones, fue previamente recortado (1/3 de la longitud). Posteriormente, las raíces fueron sumergidas en la suspensión correspondiente a cada tratamiento (10^4 , 10^5 y 10^6 UFC/ml), durante 5 minutos.

Así, fueron plantadas en sustrato no inoculado, se regaron cada tercer día con 30 ml de agua estéril por plántula y no se realizaron fertilizaciones. El sustrato en



cual se mantuvieron las plantas, correspondió al suelo utilizado para la germinación de las semillas (turba) y no se añadió suelo adicional o cascarilla de arroz durante el tiempo de evaluación. Este experimento se repitió 3 veces.

Evaluación de la presencia del hongo en el sistema vascular de las plántulas

Para evaluar la colonización interna de los aislados, 66 plántulas fueron plantadas en una bandeja de propagación de 144 alvéolos, manteniendo los grupos de 6 plántulas separados. En total se establecieron doce tratamientos para este ensayo, incluido el control. Los tratamientos consistieron en enfrentar cada grupo a un aislamiento del hongo.

A partir del décimo día, luego de la inoculación, se realizaron muestreos destructivos para determinar si los hongos inoculados lograban penetrar al sistema vascular de las raíces de las plántulas. Para determinar la presencia de los hongos en las plántulas, estas fueron extraídas de la bandeja de propagación y sus raíces se lavaron cuidadosamente con agua corriente. Se seccionó una porción de 3 cm a partir de la punta de la raíz hacia la corona, porción que fue esterilizada sumergiéndola durante tres minutos en hipoclorito de sodio al 0,2% y dos lavados posteriores con ADE de dos minutos cada uno.

Las muestras estériles fueron cortadas en porciones de 3 mm. Para cada tratamiento, una caja de Petri se dividió en dos y sobre medio APD $\frac{1}{4}$ se sembraron los trozos de dos plantas correspondientes al mismo tratamiento.

Una vez sembradas las porciones de raíz en el medio, las cajas se observaron al microscopio cada tercer día, durante nueve días, para establecer la presencia o la ausencia de los respectivos hongos inoculados y su crecimiento. Todo este procedimiento se llevó a cabo tres veces.

Seguimiento del proceso infectivo de *Fusarium* sp. en uchuva

Como en las pruebas anteriores, la inoculación se realizó sumergiendo las raíces en suspensiones de esporas. En este ensayo, nueve plantas de 20 ± 1 cm de longitud por tratamiento fueron evaluadas durante nueve semanas. Una vez inoculadas 5 min en la suspensión de esporas, se mantuvieron en bandeja de propagación durante ocho días y entonces fueron trasplantadas a materas de 1 kg. El sustrato empleado fue suelo y cascarilla de arroz (2:1) previamente humedecido y esterilizado a 121°C , 15 atm durante 25 minutos. Las plantas fueron ubicadas al aire libre, irrigadas una vez al día a saturación. Se aplicó fertilización cada tres semanas por irrigación con N-P-K a 1000 ppm. Las plantas fueron distribuidas al azar en el sitio de experimentación. Este experimento se repitió tres veces.

El experimento se modificó y se realizó utilizando el método de inoculación con salvado y grano. La modificación consistió en que el suelo fue inoculado con el hongo producido sobre una mezcla de salvado y granos de trigo, la cual se mezcló con el suelo a una proporción mezcla:suelo de 1:100; así se garantizó una carga de inóculo muy alta (10^5 UFC/g de suelo). En el control se mezclaron 10 g de trigo estéril. Este experimento se repitió tres veces.

Para determinar el avance de los diferentes hongos por el sistema vascular de las plantas, semanalmente se indexó una planta por tratamiento durante un período de

nueve semanas. La zona evaluada comprendía 2 cm por debajo del cuello radicular y 2 cm por encima.

Cada semana, una planta de cada tratamiento fue escogida al azar y removida del sustrato cuidadosamente para evitar daños al material. Las raíces de cada planta fueron lavadas con agua corriente para eliminar los restos de sustrato. Una vez realizado este lavado, se podó el paquete radicular para dejar expuesta la raíz principal. Esta se seccionó para obtener la porción de 4 cm, 2 cm por encima y debajo de la corona, la cual fue esterilizada al sumergirla en hipoclorito al 0,2% durante 3 minutos, seguido por dos lavados con ADE durante 2 minutos cada uno. Una vez esterilizados, cada fragmento de 4 cm fue dividido en 8 fragmentos de 2,5 mm de longitud, los cuales fueron inoculados en APD 1/4 (Figura 7A).

En estos montajes se realizaron observaciones macroscópicas (estereomicroscopio) y microscópicas (microscopio de luz) durante los primeros ocho días para establecer la presencia del hongo, su crecimiento a partir del sistema vascular, el avance desde la zona radicular hacia la parte aérea de la planta y para corroborar que el hongo que emergiera de las muestras fuera el correspondiente al inoculado previamente en cada tratamiento.

Elaboración de la escala de severidad

Se realizó utilizando el método de inoculación con salvado y grano, con el mismo diseño experimental que se muestra arriba. En este caso se modificó utilizando grupos de 10 plantas, con 2 pares de hojas expandidas, el cual es un tamaño comercial, útil para trasplantes. Este experimento fue realizado tres veces.

Debido a la falta de descripciones detalladas de los síntomas esperados, se realizaron observaciones conducentes a la determinación de los síntomas diferentes al marchitamiento descendente, ya que este último es un síntoma terminal. El monitoreo de las plántulas se realizó diariamente, pero se escogió la observación de cada séptimo día como descriptor, debido a que no era evidente la diferencia entre dos observaciones diarias. A partir de estas observaciones, se elaboró una escala diagramática de cinco grados, la cual fue evaluada en una repetición del experimento realizada posteriormente y en el campo, con observaciones propias y del Ing. Carlos Ramírez de CIDELA.



Figura 7. Aislamiento de *Fusarium* sp. a partir de muestras de raíz. A. Muestras de raíz con tres días de incubación; 1 y 2 posibles *Fusarium* para aislar. B. Hongo aislado (Sánchez y Forero, 2009).



RESULTADOS

Aislamiento de hongos de la raíz de uchuva en laboratorio

De las muestras obtenidas en las diferentes localidades se aislaron en total 50 hongos correspondientes al género *Fusarium* (Figura 7).

Clasificación de aislados

Los aislamientos resultaron pertenecer mayoritariamente a la especie *F. oxysporum* con un 92% (46 aislamientos) y le siguieron 4 aislamientos pertenecientes a la especie *F. solani* (8%). Las características observadas se ilustran en las Figuras 8, 9, y 10, respectivamente.

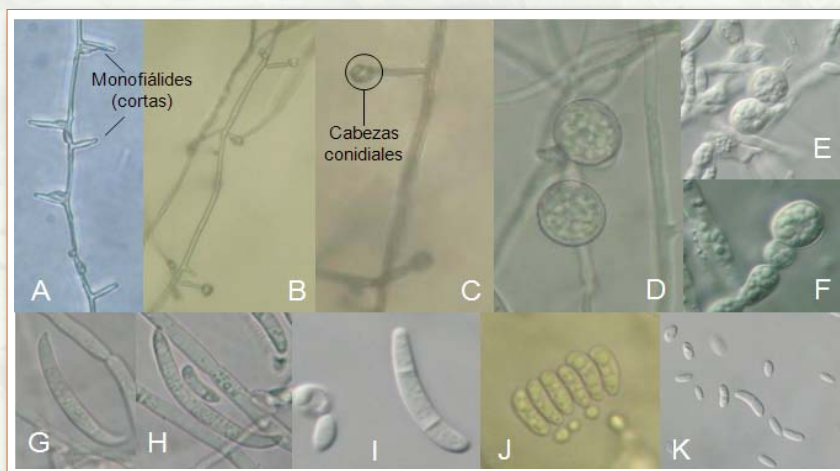


Figura 8. Características morfológicas para aislados de *F. oxysporum*. A-C. Monofialides (400x) D-F. Clamidosporas (1000x) G-H. Macroconidias (1000x) I. Mesoconidias (1000x) J-K. Microconidias (1000x) (Sánchez y Forero, 2009).

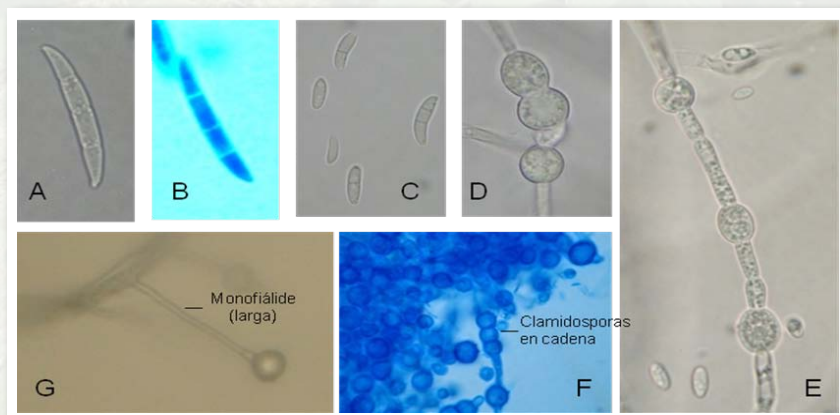


Figura 9. Características morfológicas para aislados de *F. solani*. A-B Macroconidias (1000x) C. Microconidias (1000x) D-E y F. Clamidosporas (1000x) E. Clamidosporas (1000x) G. Monofialide (400x) (Sánchez y Forero, 2009).

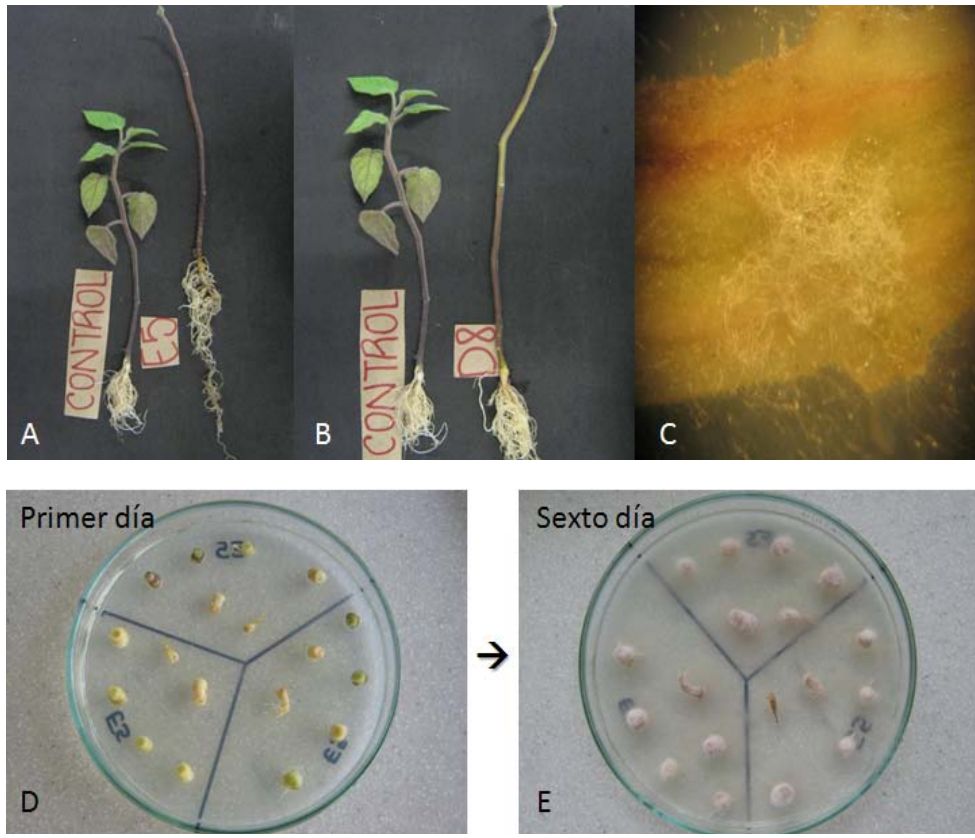


Figura 10. Pasos de las pruebas de patogenicidad. A-B Vista de plantas inoculadas. C. Observación en estereoscopio del crecimiento de micelio en corte longitudinal. D-E. Montaje de siembra de segmentos del tejido cercano al cuello radicular de una planta inoculada (Sánchez y Forero, 2009).

Elaboración de la escala de severidad

Luego de recabar la información necesaria, se determinó una escala que permite medir la severidad de la enfermedad inducida por *F. oxysporum* y otras especies de *Fusarium* sobre uchuva. Esta escala es mostrada a continuación (Figuras 11 y 12) y es ilustrada con las plantas del primer ensayo, por razones pedagógicas.

CONCLUSIONES

Se encontraron aislamientos que morfológicamente fueron clasificados como *Fusarium solani*; estos produjeron el síndrome de marchitez vascular en uchuva, lo que hasta el momento no había sido reportado para este cultivo.

La elaboración de una escala diagramática y gráfica permitió identificar y describir los síntomas causados por los aislamientos de *Fusarium* y detallar el progreso de la enfermedad en uchuva. Su utilización por parte de agrónomos e investigadores ha mostrado ser de utilidad en la detección temprana y la descripción precisa.



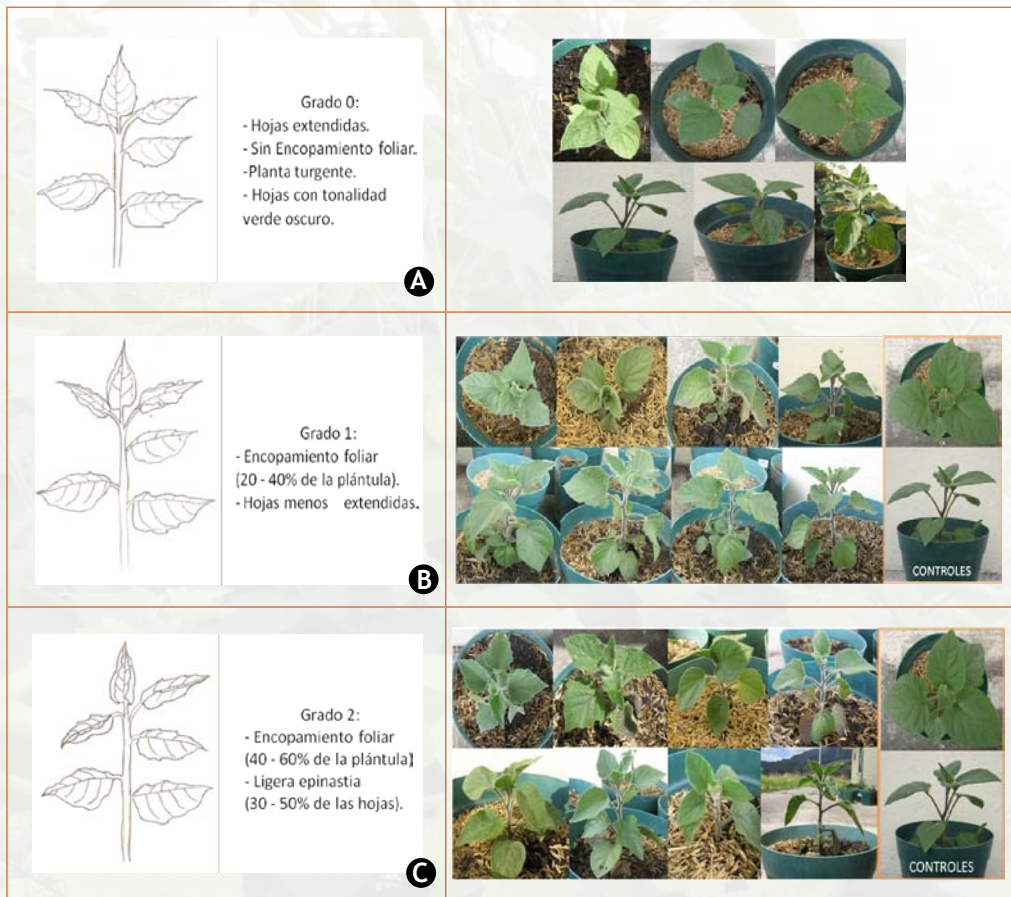


Figura 11. A. Grado cero en escala diagramática para fusariosis en uchuva. Nótese el color de las hojas, así como la posición de la lámina foliar respecto al eje central de la planta. B. Grado uno en escala diagramática para fusariosis en uchuva. Nótese la posición de la lámina respecto al eje central de la planta y los bordes levantados en forma de copa de las hojas más jóvenes. C. Grado dos en escala diagramática para fusariosis en uchuva. Nótese la posición de la lámina respecto al eje central de la planta (epinastia leve a moderada) (Sánchez y Forero, 2009).

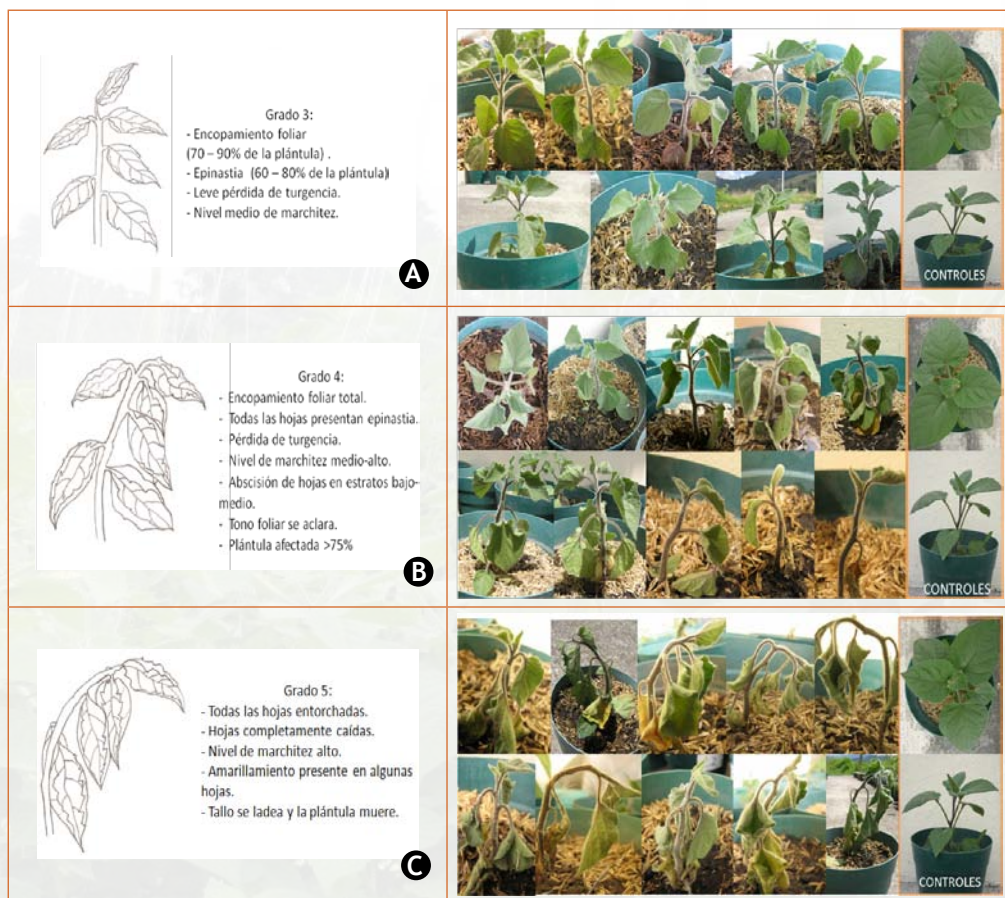


Figura 12. A. Grado tres en escala diagramática para fusariosis en uchuva. Nótese la posición de la lámina respecto al eje central de la planta (epinastia marcada) y los bordes levantados en forma de copa de las hojas más jóvenes (pérdida de turgencia notoria). B. Grado cuatro en escala diagramática para fusariosis en uchuva. C. Grado cinco en escala diagramática para fusariosis en uchuva. Nótese que solo permanecen las hojas apicales de la planta, debido a la defoliación que se presenta (Sánchez y Forero, 2009).



LITERATURA CITADA

- Beckman, C. H. The Nature of Wilt Diseases of Plants. APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. 175 pp. 1987.
- Corporación Colombia Internacional. Sistema de Inteligencia de Mercados. Perfil producto No.34, Bogotá, Colombia. Noviembre de 2005.
- Fravel, D.; Olivain, C. Y.; Alabouvette, C. *Fusarium oxysporum* and Its Biocontrol. New Phytologist. 157 (3) : 493-502. 2003.
- Gordon, T. R.; Martyn, R. D. The Evolutionary Biology of *Fusarium oxysporum*. Annual Reviews of Phytopathology. 35 : 111-28. 1997.
- Legiscomex. Inteligencia de Mercados. Frutas Exóticas de Colombia.
http://www.legiscomex.com/BancoMedios/Documentos%20PDF/est_col_frutas_exot_7.pdf accedida el 16 de Marzo de 2008.
- Leslie, J. F.; Summerell, B. A. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing. 2006.
- Nelson, P. E.; Dignani, M. C.; Anaissie, E. J. Taxonomy, Biology and Clinical Aspects of *Fusarium* Species. Clinical Microbiology Reviews. 7 (4) : 479-504. 1994.
- Nelson, P. E.; Tousson, T. A.; Marasas, W. F. O. *Fusarium* species. A Illustrated Manual for Identification. University Park. Pennsylvania State University Press. 1983.
- Olivain, C. y Alabouvette, C. Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in comparison with non-pathogenic strain. New Phytologist. 141 (3): 497-510. 1999.
- Sánchez, M. T. y Forero, P. A. Reporte de especies del género *Fusarium* asociadas a la uchuva (*Physalis peruviana*) y descripción de la etiología relacionada con la fusariosis. Trabajo de grado de biología. Universidad Militar Nueva Granada. Bogotá, D.C. 97 pp. 2009.
- Schumann, G. L. Y.; D'Arcy, C. J. Essential Plant Pathology. APS Press. 2006.

3

Métodos de control de *Fusarium*

Alexander Smith, Paula Mesa

Investigadores Laboratorio de Control Biológico

Centro de Biotecnología y Bioindustria - CBB

Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - Corpoica.

E-mail: asmith@corpoica.org.co

INTRODUCCIÓN

Son varias las prácticas que se pueden integrar para controlar las diferentes enfermedades causadas por hongos, desde labores culturales hasta la aplicación de productos químicos y biológicos. No obstante, dentro de las enfermedades causadas por hongos, una de las más importantes por su difícil control es el marchitamiento vascular causado por *F. oxysporum*. Esta enfermedad ha ocasionado un gran impacto económico para el cultivo de uchuva en los últimos años, particularmente en regiones productoras, disminuyendo considerablemente la producción y causando la disminución de las áreas de cultivo. Colombia es el primer productor mundial de uchuva, liderada por el departamento de Cundinamarca con cerca de 36 toneladas/ha de producción durante el año 2004 con cerca de 267 ha sembradas, pero entre los años 2004 y 2005 se reportó una caída cercana a las 100 ha atribuida por los productores de la zona de Granada al marchitamiento vascular (MADR, 2009).

Este fenómeno se dio en gran medida por la ausencia de semillas certificadas libres de enfermedades, el excesivo uso del suelo sin prácticas agronómicas que permitan la rotación y que hace que los rendimientos bajen considerablemente, el uso excesivo de agroinsumos que ha incrementado los costos de producción (por cuanto el cultivo ha sido manejado de forma similar a los cultivos tradicionales en la zona) y finalmente por el área de producción, que también tiende a disminuir por situaciones propias en la comercialización, que incluye muy bajos precios al productor e inconformidad en las formas de pago y cambio de reglas para la recepción del producto por parte de las comercializadoras. Todo lo anterior ha generado un desplazamiento del cultivo hacia otros departamentos como Boyacá, sin tomar las respectivas prevenciones de manejo fitosanitario.

Si bien existen diferentes fungicidas en el mercado para el control de las diferentes enfermedades en el cultivo de uchuva, en la actualidad no se encuentra registrado ningún producto químico para controlar la marchitez vascular, dado que el patógeno ha adquirido un alto nivel de resistencia y persistencia. Por estas razones, surge la necesidad de implementar tecnologías agrícolas efectivas para el control de enfermedades y con un bajo impacto ambiental sobre el ecosistema para cumplir



con las exigencias del mercado internacional de exportación de la uchuva; una de ellas es el control biológico mediante la aplicación de bioplaguicidas, que presentan efectos benéficos para la planta y que además generan antagonismo frente al marchitamiento vascular causado por *F. oxysporum*.

De esta manera, el aislamiento, la preselección y la identificación de rizobacterias de cultivos de uchuva pertenecientes al género *Bacillus* y *Pseudomonas* representa una alternativa de control eficiente frente a enfermedades tan agresivas como la marchitez vascular, que ayudaría a disminuir las pérdidas económicas de los productores de uchuva, a aumentar la producción de los cultivos y a abrir cada vez más mercados internacionales, que son mucho más exigentes en cuanto a la calidad fitosanitaria del producto.

Avances en la investigación de métodos de control de *F. oxysporum* en el cultivo de la uchuva en Colombia

El diagnóstico del agente causal ha sido muy limitado, en tanto que se dificulta la reproducción de síntomas en laboratorio, por lo que a la fecha se ha considerado como un complejo de patógenos, principalmente del género *Fusarium*. Por otro lado, nuevas zonas productoras han reportado pérdidas por *Ralstonia* spp. sin que su diagnóstico sea definitivo. Por lo anterior, se ha considerado como tema principal de vigilancia los complejos de enfermedades en plantas relacionadas con *Fusarium*. Los resultados obtenidos en la vigilancia tecnológica indican, como primer aspecto, que no hay información específica relacionada con el complejo *Fusarium* - uchuva. Esto lleva a pensar que es necesario adoptar tecnologías que hayan tenido éxito en el control de *Fusarium* en otros cultivos y validar las metodologías a las condiciones particulares del cultivo en Colombia, además de dirigir las investigaciones de manera más específica al complejo *Fusarium* - uchuva (MADR, 2009).

Estrategias y prácticas de campo para el manejo de *F. oxysporum*

Una problemática que se ha presentado en la mayoría de los sistemas productivos es la resistencia que adquieren los patógenos a los fungicidas, obligando al productor a usar dosis más altas o productos con categoría toxicológica alta, ocasionando aumento en los costos de producción y mayor contaminación ambiental. Es necesario entonces tener alternativas de control, libres de químicos y que tengan en cuenta nuestro medio ambiente. A continuación se describen algunas estrategias de control para disminuir la incidencia de la marchitez vascular, empezando por labores culturales, pasando por el control biológico y finalizando por el control químico, el cual debe ser el último recurso para controlar esta enfermedad.

1. Control por exclusión

Es el primer paso y más importante, en donde se recomienda:

- No sembrar en suelo donde la enfermedad haya presentado alta incidencia.
- Sembrar material vegetal libre de la enfermedad.

La importancia de utilizar material vegetal sano para iniciar las siembras no puede enfatizarse lo suficiente, ya que la mejor manera de diseminar muchas plagas y enfermedades es a través de este. Si bien en la actualidad no se ha registrado material resistente o tolerante a *F. oxysporum*, se puede obtener material libre de este patógeno en laboratorios de micropropagación vegetal especializados.

2. Monitoreo

Si se detecta a tiempo la enfermedad, es más fácil controlar su diseminación; así, un buen programa de monitoreo requiere:

- Recursos humanos - Personal entrenado que pueda detectar e identificar el problema en el campo.
- Mapeo - Identificación de áreas afectadas (focos) por la marchitez vascular.
- Recolección de información - determinación de la incidencia y severidad.
- Evaluación y toma de decisiones - cuándo y dónde aplicar medidas de control, desde “ninguna acción” hasta la aspersión de control químico.

3. Control cultural

Son varias las prácticas que pueden restringir o retardar la diseminación de la enfermedad, de acuerdo con Zapata y colaboradores (2002) entre ellas se encuentran:

- Distancias de siembras amplias (3 x 3 m o 3 x 2,5m).
- Rotación de cultivos sin solanáceas u otras especies que sean afectadas por este patógeno.
- Amarre en “V” con el fin de que la planta tenga suficiente aireación.
- Mantener la zona del cultivo limpio.
- Restringir el paso de operarios y vehículos entre zonas enfermas y sanas.
- Cuando una planta se encuentre severamente afectada por la marchitez vascular se debe retirar y eliminar cuidadosamente sin disturbar el suelo o contaminar otras plantas. Tratar el suelo con cal, vapor o formaldehído (Pizano, 2001).
- Manejar la fertilización, control de pH (el pH alcalino detiene la colonización del hongo).

4. Control físico

Los controles físicos incluyen todas aquellas barreras o tratamientos no químicos que reducen, previenen o eliminan la enfermedad:

- Tratamiento con vapor, es una excelente opción y es económicamente viable si la incidencia de enfermedad es baja. Los focos de infección deben tratarse durante más tiempo (Pizano, 2001).
- Desinfestación de calzado, herramientas y otros con hipoclorito de sodio.
- Solarización del suelo.

5. Control químico

En la actualidad no existen productos químicos registrados para el control de la marchitez vascular, no obstante, la mayoría de los productores utilizan varios ingre-



dientes activos en rotación o en mezcla para controlar la enfermedad como: Car-bendazim, Polietoxi Etanol, Carboxin y Thiram. El uso de estos productos químicos aumenta los costos de producción, más aún cuando no se tiene la seguridad de un control eficiente del fitopatógeno; además ocasionan daño al medio ambiente, afectando negativamente la fauna benéfica.

Al utilizar estos productos, siempre se deben observar precauciones y estándares de protección a la salud, incluyendo un período adecuado de reentrada. La aplicación de estos productos - como la de cualquier otro plaguicida - debe llevarse a cabo utilizando máscaras de gases, guantes, overol y otros elementos de protección. Es preciso leer siempre cuidadosamente la etiqueta que acompaña a los productos, ya que esta contiene recomendaciones, dosis sugeridas, procedimientos de emergencia y otra información importante.

6. Control biológico

La actividad biocontroladora de hongos y bacterias frente a varios fitopatógenos cada vez es más reconocida a nivel mundial, puesto que existen microorganismos en la filosfera, espermosfera, frutos y suelos con actividad antagónica frente a fitopatógenos. Estos organismos disminuyen la incidencia de la enfermedad por varios mecanismos; algunos de estos son antibiosis, competencia por espacio o nutrientes, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo y lisis enzimática) e inducción de resistencia.

En general, los antagonistas no tienen un único modo de acción, y la multiplicidad de estos 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 fitopatógeno. Este riesgo de resistencia también se reduce mediante el uso de combinaciones de antagonistas con diferente modo de acción (Fernández-Larrea, 2001). Dentro de los microorganismos estudiados para el control biológico de la marchitez vascular en uchuva con buenas perspectivas se encuentran:

- Bacterias del género *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp.
- Hongos, como *Trichoderma* spp.
- Además, se puede incorporar compost y/o organismos benéficos al suelo.

LITERATURA CITADA

- Fernández-Larrea, O. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica). CATIE. No. 62 p. 96 - 100. 2001.
- MADR. Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de la uchuva en fresco para exportación en Colombia. Giro Editores Ltda. 2009.
- Pizano, M. X Floricultura y medio ambiente. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA). 47 pp. 2009.
- Zapata, J.; Saldarriaga, A.; Londoño, M.; Díaz, C. Manejo del cultivo de la uchuva. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Corpoica, Centro de Investigación La Selva. Boletín Técnico. Produmedios. Rionegro, Antioquia. 42 pp. 2002.

4 Aislamiento y caracterización de rizobacterias

Jimmy Zapata¹, Andrés Díaz¹, Diana Caviedes²

¹ Investigadores Laboratorio de Control Biológico
Centro de Biotecnología y Bioindustria - CBB
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - Corpoica.
E-mail: jzapatan@corpoica.org.co

² Estudiante Microbiología Industrial, Pontificia Universidad Javeriana.
Bogotá, Colombia.

METODOLOGÍA

Aislamiento de rizobacterias de la rizosfera de uchuva

En cultivos comerciales, dos ubicados en el municipio de Cóbbita (Boyacá) y cuatro en el municipio de Granada (Cundinamarca), se colectaron a partir de plantas asintomáticas a marchitamiento vascular (las cuales se encontraban en un foco de plantas que presentaban signos avanzados de la enfermedad) muestras de raíces secundarias a una profundidad no mayor a 15 cm (Figura 13), que se transfirieron cuidadosamente a bolsas de papel debidamente rotuladas y se trasladaron en nevera al Laboratorio de Control Biológico del CBB - Corpoica para su almacenamiento a 4 °C y posterior procesamiento.



Figura 13. Toma de muestras de raíces en cultivos de uchuva. A. Planta seleccionada en un foco de plantas con síntomas de marchitamiento vascular. B. Colecta de raíces.



Para cada cultivo se formó una muestra compuesta y las raíces se lavaron con agua estéril para remover el suelo adherido; posteriormente se cortaron en secciones de 5 cm y se tomaron 10 gramos transfiriéndolos a elenmeyers con 90 ml de solución salina a 0,85%, los cuales se dejaron en agitación constante a 250 rpm durante 1 hora.

A partir de esta suspensión de lavado se realizaron diluciones seriadas de hasta 10^{-7} sembrando por triplicado 100 μ L de cada dilución en agar King B (KB) para el aislamiento de bacterias del género *Pseudomonas* spp., y en agar Luria Bertoni (LB) para bacterias del género *Bacillus* spp. Las cajas Petri se incubaron durante 24 horas a 28 °C. A partir de las colonias que se obtuvieron después del período de incubación se realizó el aislamiento en los medios de cultivo respectivos con el fin de obtener los aislamientos puros.

Para los aislamientos que se presumieron *Pseudomonas* spp., nuevamente se cultivaron en agar KB con el propósito de evidenciar la producción de pioverdina y/o piocianina, pigmentos (producidos por bacterias de este género) difusibles al medio y fluorescentes a la luz ultravioleta a una longitud de onda de 280 nm.

De otra parte, para los dos géneros de bacterias se realizó coloración de Gram para observar su morfología y las pruebas bioquímicas de oxidasa y catalasa, de acuerdo con los métodos de diagnóstico estándar (Braun-Kiewink y Sanda, 2001).

Caracterización biológica

Promoción del crecimiento vegetal

Se evaluó el efecto de las rizobacterias sobre la germinación de semillas de uchuva. Para este fin se utilizaron semillas obtenidas de plantas de uno de los cultivos de Cómbita seleccionadas por su alta producción y manejo fitosanitario.

Las semillas se sometieron a tratamiento térmico en un baño termostataado a 48 °C por 2 horas con el fin de romper la latencia de las mismas; luego se desinfectaron sumergiéndolas en etanol al 70% por 5 minutos seguidas por hipoclorito de sodio al 1% por 1 minuto y finalmente se lavaron tres veces con agua destilada estéril.

Paralelamente se realizó un cultivo líquido para cada uno de los 20 aislamientos de rizobacterias en caldo LB con agitación de 150 rpm a 28 °C por 48 horas; transcurrido este tiempo se centrifugó el caldo de fermentación a 5000 rpm por 15 minutos, se resuspendió en una solución estéril al 2% de carboximetilcelulosa y se ajustó su concentración a 1×10^9 cél/ml. Posteriormente se sumergieron 60 semillas en cada una de las suspensiones bacterianas por 1 minuto (Yao *et al.*, 2010) y se dejaron secar en cabina de flujo laminar para colocarlas en cámara húmeda, teniendo 20 semillas cada tratamiento por triplicado. Como control se sumergieron las semillas en agua destilada estéril. Todos los tratamientos se incubaron a 26 °C en oscuridad por 20 días y se realizaron observaciones diarias del número de semillas germinadas y la longitud de la raíz.

Los resultados obtenidos en cada tratamiento se expresaron como un índice de vigor (Harish *et al.*, 2008), definido como:

$$\text{Índice de vigor} = \text{porcentaje de germinación} * (\text{longitud de germinación total})$$
$$\text{Longitud de germinación total} = \text{longitud del tallo} + \text{longitud de la raíz}$$

Después de ello se realizó un análisis de comparación de medias para seleccionar las rizobacterias más promisorias a ser evaluadas en los bioensayos en condiciones de invernadero.

Actividad biocontroladora in vitro contra *F. oxysporum*

La actividad antagonica de cada una de las rizobacterias aisladas contra *F. oxysporum* se determinó mediante la inhibición por antibiosis en agar papa dextrosa (PDA). Se colocaron discos de agar de 5 mm de cada aislamiento en cuatro puntos equidistantes con una distancia de 1,5 cm tomados a partir del borde de una caja Petri (dos en la parte superior y dos en la parte inferior) por triplicado y se incubaron a 28 °C por 48 h. Discos de agar PDA de 5 mm con *F. oxysporum* se cortaron de aislamientos de 15 días de edad y se colocaron en el centro de las cajas con las rizobacterias previamente sembradas, incubándose a 25 °C por 7 días. Se utilizó como control el crecimiento solo de *F. oxysporum* en agar PDA. El radio de la colonia fúngica se midió con un calibrador y se calculó el porcentaje de inhibición micelial del patógeno con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición: } [(R - r) / R] * 100$$

Donde: **R** es el radio máximo de la colonia fúngica en el control, **r** es el radio de la colonia fúngica enfrentada al aislamiento. De esta forma, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y se compararon las medias de los tratamientos con un test LSD con un 95% de confianza.

RESULTADOS

De las muestras colectadas en los cultivos de Granada se aislaron y seleccionaron 14 aislamientos de *Pseudomonas* sp., siendo de las únicas muestras que se obtuvieron bacterias de este género, las cuales correspondieron a bacilos Gram negativos móviles por flagelos polares (Figura 14A), cuyo test bioquímico fue catalasa y citocromo oxidasa positivo.

De otra parte, se obtuvieron 6 aislamientos de *Bacillus* sp., cuatro de los cultivos de Cómbita y dos de Granada, correspondientes a bacilos Gram positivos esporulados (Figura 14B), cuyo test bioquímico fue catalasa positiva y citocromo oxidasa negativo.

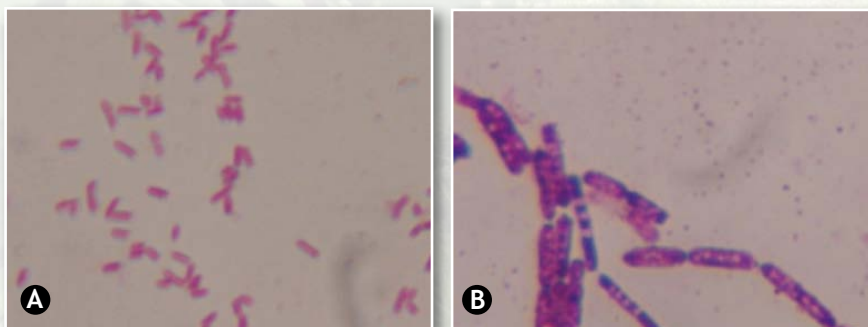


Figura 14. A. Bacteria Gram negativa correspondiente a *Pseudomonas* sp. B. Bacteria Gram positiva correspondiente a *Bacillus* sp.



Promoción del crecimiento vegetal

El aislamiento de *Bacillus* sp., codificado como Bs03, y el aislamiento de *Pseudomonas* sp., codificado como Pf14, presentaron índices de vigor de 52,42 y 50,63 respectivamente; estos valores son significativamente diferentes con respecto a los demás tratamientos y representan una magnitud superior al 500% con respecto al control sin inmersión de rizobacterias. Adicionalmente al efecto inductor de crecimiento tanto de tallo como de raíz, se observó que los aislamientos Bs03 y Pf14 también estimularon la velocidad de germinación de las semillas de uchuva, factor clave más si se tiene en cuenta la falta de homogeneidad natural que exhiben las semillas de esta especie vegetal en particular (Figura 15).

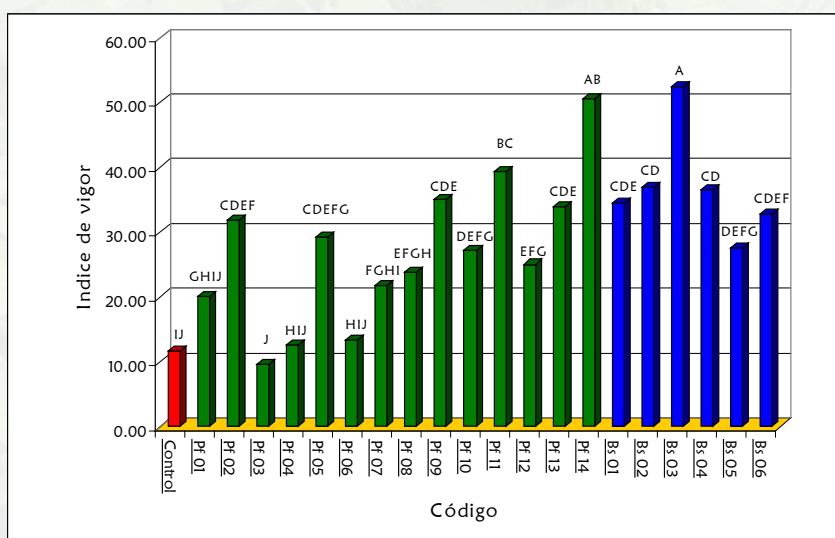


Figura 15. Índice de vigor de 20 aislamientos de rizobacterias aisladas a partir de cultivos de uchuva. Las letras representan los grupos homogéneos obtenidos al realizar un análisis de comparación de medias aplicando la técnica LSD con un nivel de confianza del 95%. Pf: género *Pseudomonas* sp., Bs: género *Bacillus* sp.

Actividad biocontroladora *in vitro* contra *F. oxysporum*

Para la inhibición del crecimiento micelial del hongo *F. oxysporum*, nuevamente el aislamiento de *Bacillus* sp., codificado como Bs03, presentó diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos con un valor de 63,59% después de 7 días de incubación (Figura 16). También se observó una tendencia general muy clara de un mejor desempeño por parte de los aislamientos de *Bacillus* sp., en comparación con los aislamientos de *Pseudomonas* sp., comportamiento que era de esperarse, ya que se ha demostrado por numerosos autores la producción de antibióticos por parte de este género, incluso en condiciones del suelo.

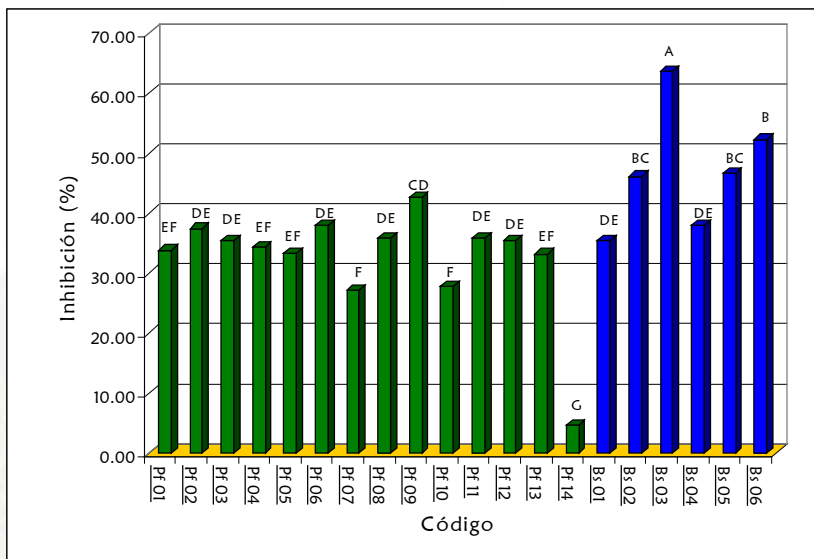


Figura 16. Porcentaje de inhibición de crecimiento *in vitro* del hongo *F. oxysporum* en presencia de 20 aislamientos de rizobacterias aisladas a partir de cultivos de uchuva. Las letras representan los grupos homogéneos obtenidos al realizar un análisis de comparación de medias aplicando la técnica LSD con un nivel de confianza del 95%. Pf: género *Pseudomonas* sp., Bs: género *Bacillus* sp.

CONCLUSIÓN

A partir de plantas asintomáticas se aislaron rizobacterias de los géneros *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp., de las cuales los aislamientos Pf14, Bs006 y Bs03 fueron seleccionados como los más promisorios para el desarrollo de un prototipo de bioproducto, ya que presentaron los mejores efectos de promoción de crecimiento vegetal en semillas e inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* en laboratorio.

LITERATURA CITADA

- Braun-Kiewnick, A.; Sands, D. 2001. Gram-Negative Bacteria: *Pseudomonas*. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Third edition., The American Phytopathological Society. St. Paul. Minnesota. USA. Pp 84-120.
- Harish, S.; Kavino, M.; Kumar, N.; Saravanakumar, D.; Soorianathasundaramb, K.; Samiyappan, R. Biohardening with plant growth promoting rhizosphere and endophytic bacteria induces systemic resistance against banana bunchy top virus. *Applied Soil Ecology*. 2008; 39: 187 – 200.
- Yao, L.; Wu, Z.; Zheng, Y.; Kaleem, I.; Li, C. Growth promotion and protection against salt stress by *Pseudomonas putida* Rs-198 on cotton. *European Journal of Soil Biology*. 2010; 46 (1): 49-54.



5

Producción masiva de rizobacterias

Andrés Díaz¹, Cindy Mejía¹, Lina Carolina Cruz¹, Johan Sáenz²

¹ Investigadores Laboratorio de Control Biológico

Centro de Biotecnología y Bioindustria - CBB

Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - Corpoica.

E-mail: adiaz@corpoica.org.co

² Estudiante Microbiología Industrial, Pontificia Universidad Javeriana.
Bogotá, Colombia.

RESUMEN

En etapas anteriores se seleccionaron dos rizobacterias, una del género *Pseudomonas* sp. y otra del género *Bacillus* sp., que presentaron una eficacia en el control de *F. oxysporum* en invernadero entre el 40% y 50% sin formular. En la etapa de producción masiva se llevó a cabo el diseño, estandarización y optimización de un medio de cultivo eficiente, económico, escalable y compatible con las operaciones unitarias de formulación para cada uno de estos aislamientos. El esquema general aplicado se presenta en la Figura 17.

En la Figura 17 se presentan a la izquierda las etapas que se surtieron aplicando herramientas de diseño de experimentos y a la derecha las variables de respuesta

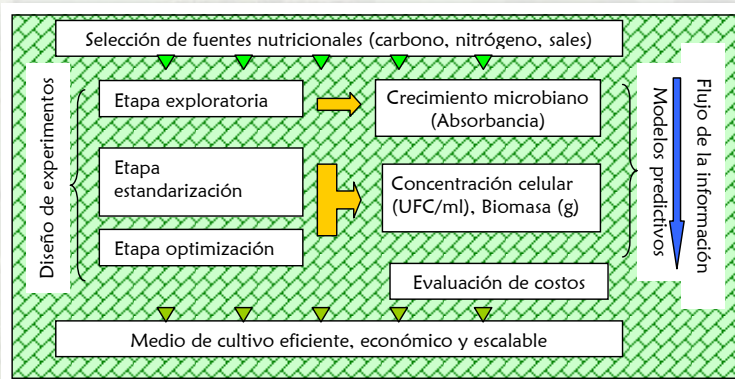


Figura 17. Representación general de la estrategia aplicada para el diseño de medios de cultivo para fermentación líquida con dos aislamientos de rizobacterias del género *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp.

evaluadas experimentalmente en los procesos de fermentación que permitieron la generación de modelos predictivos de desempeño del proceso. La información que se generó en cada etapa sirvió como insumo o línea base de la etapa siguiente.

INTRODUCCIÓN

Para el desarrollo de un bioproducto con potencial para el control del hongo patógeno *Fusarium oxysporum* se debe tener en cuenta no solo la selección cuidadosa del ingrediente activo con elevada actividad antagónica contra el patógeno y un mecanismo de acción bien definido, sino también las características del patógeno y su comportamiento en el microambiente en el que se va a aplicar.

Como se ha mencionado en capítulos anteriores, *F. oxysporum* es un hongo fitopatógeno que reside en el suelo, que presenta una versatilidad fisiológica que le permite su adaptación a diversas condiciones medioambientales y generar resistencia a corto plazo a la mayoría de los plaguicidas químicos; además tiene la capacidad de sobrevivir hasta 30 años en el suelo, ya que produce estructuras de resistencia. Por tanto, el bioproducto a desarrollar idealmente debe tener las siguientes características:

- Concentración óptima del ingrediente activo para asegurar su eficacia.
- Compatibilidad con algunos de los principales fungicidas y plaguicidas comúnmente usados en el cultivo de uchuva.
- No presentar fitotoxicidad o algún otro tipo de efecto negativo sobre uchuva u otro cultivo.
- Elevada permanencia en el suelo manteniendo la viabilidad del ingrediente activo.
- Facilidad de aplicación en el suelo usando equipos convencionales.
- Facilidad de dosificación, dispersión o disolución.
- Mediante la selección adecuada del microorganismo biocontrolador y con el desarrollo de procesos eficientes de producción del ingrediente activo se pueden solventar los retos asociados a las tres características iniciales, mientras las tres últimas se abordan en la etapa de formulación del bioproducto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Producción masiva por fermentación líquida de *Pseudomonas* sp. (Pf14)

Evaluación exploratoria en microplacas de 400 µl

Inicialmente se llevó a cabo una evaluación experimental en microplacas de 400 µl con el fin de determinar el efecto de la fuente de carbono, nitrógeno y sales sobre el crecimiento de la rizobacteria *Pseudomonas* sp. Pf14 expresado como absorbancia, asumiendo que este parámetro es directamente proporcional al crecimiento bacteriano en un medio líquido. Se aplicó un diseño factorial completo con tres niveles por factor, todos los tratamientos se evaluaron por triplicado en microplacas incubadas



a 25 °C con agitación de 200 rpm.

A partir del análisis estadístico de la información experimental (datos no mostrados) se determinaron los niveles base (nivel 0) para dar inicio al trabajo del diseño del medio de cultivo líquido.

Evaluación exploratoria de la producción de biomasa de la rizobacteria *Pseudomonas sp. Pf14* en erlenmeyer de 125 ml

En esta etapa se aplicó un diseño experimental factorial completo con dos factores y dos niveles con punto central. La fermentación se realizó en erlenmeyers de 125 ml con un volumen de trabajo de 25 ml (Tabla 1), el nivel cero correspondió a las concentraciones de los factores nutricionales obtenidos en la evaluación en microplaca. Se conservó una relación volumétrica existente entre el volumen total y el volumen de trabajo de 1/5, con el fin de favorecer la disponibilidad de oxígeno para el crecimiento y metabolismo de *Pseudomonas sp.*

Tabla 1. Matriz de niveles usada para la fermentación de la cepa de *Pseudomonas sp. Pf14* en erlenmeyer de 125 ml.

Nivel	Factor A (FC) (g/L)	Factor B	
		(FNO) (g/L)	(FNI)(g/L)
-1	5,16	2,54	0,9
0	10,32	5,08	1,8
1	15,48	7,62	2,7

FC: Fuente de carbono, FNO: Fuente de nitrógeno orgánica, FNI: fuente de nitrógeno inorgánica.

La codificación de los niveles se realizó aplicando la siguiente fórmula:

$$X_c = [X_i - X_i^{\oplus}] / (\Delta X_i)$$

Donde: X_c es la variable codificada, X_i es el valor de la variable sin codificar, X_i^{\oplus} es el valor de la variable sin codificar en el punto cero y ΔX_i es el valor del paso entre niveles de la variable sin codificar.

Se prepararon 20 ml de una solución 10X de cada una de las concentraciones de la fuente de carbono y nitrógeno orgánico e inorgánico listadas en la Tabla 1 con agua destilada; adicionalmente se preparó una solución de sales, las soluciones fueron esterilizadas bajo condiciones estándar. Igualmente se realizó un inóculo de 1×10^7 UFC/ml en Tween 80 al 0,5% a partir de una caja previamente colonizada con la bacteria durante 48 h.

Cada erlenmeyer contenía 25 ml como resultado de la adición de 2,5 ml de fuente de carbono, 2,5 ml de fuente de nitrógeno orgánico, 2,5 ml de fuente de nitrógeno inorgánico, 2,5 ml de solución de sales, 12,5 ml de agua destilada y 2,5 ml de inóculo. Las diferentes combinaciones de los niveles dieron como resultado cinco tratamientos, los cuales se evaluaron por triplicado (Tabla 2). La variable de respuesta fue la biomasa bacteriana, que se determinó mediante la técnica de peso seco. Los resultados se

analizaron usando el software estadístico Statgraphics® v. 4.0.

Tabla 2. Tratamientos evaluados para el ensayo exploratorio en erlenmeyer de 125 ml con la cepa de *Pseudomonas* sp. Pf14.

Tratamiento	Factor A	Factor B
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	0	0

Etapa de optimización de la producción de biomasa de la rizobacteria *Pseudomonas* sp. Pf14 en erlenmeyer de 125 ml

En concordancia con los resultados obtenidos en la evaluación exploratoria, se planteó un experimento de optimización en el que se aplicó un diseño factorial completo a tres niveles con dos variables: fuente de carbono y fuente de nitrógeno. Como variables de respuesta se evaluaron la producción de biomasa por la técnica de peso seco y la concentración celular viable por la técnica de siembra en caja.

Como se observa en la Tabla 3, se aumentó la concentración de la fuente de nitrógeno usando el nivel 1 del ensayo anterior como nivel -0,5 del presente ensayo para explorar nuevas regiones, donde se espera obtener un aumento en la concentración y en la biomasa bacteriana; de otro lado, para la fuente de carbono se evaluaron concentraciones similares a las del ensayo anterior, dado que este factor no mostró un efecto significativo y de esta manera se está disminuyendo el costo del medio de cultivo global.

Tabla 3. Matriz de niveles usada para la fermentación de la cepa de *Pseudomonas* sp. Pf14 en el ensayo de optimización en erlenmeyer de 125 ml.

Nivel	Factor A (FC) (g/L)	Factor B	
		(FNO)(g/L)	(FNI)(g/L)
-1	4,64	5,71	1,35
0	9,28	11,43	2,70
1	13,92	17,14	4,05

FC: Fuente de carbono, FNO: Fuente de nitrógeno orgánica, FNI: fuente de nitrógeno inorgánica.

La matriz experimental generada se presenta en la Tabla 4.

Producción masiva por fermentación líquida de *Bacillus* sp. (Bs006)

Generación de las cinéticas de crecimiento de *Bacillus* sp. Bs006

Las cinéticas de crecimiento de *Bacillus* sp. Bs006 fueron realizadas utilizando er-



Tabla 4. Tratamientos evaluados para la fermentación de la cepa de *Pseudomonas* sp. Pf14 en el ensayo de optimización en erlenmeyer de 125 ml.

Tratamiento	Factor A	Factor B
1	1	0
2	-1	-1
3	-1	1
4	0	1
5	0	-1
6	0	0
7	1	-1
8	-1	0
9	1	1

lenmeyer de 500 ml por triplicado. Se conservó una relación volumétrica existente entre volumen total y volumen de trabajo de 1/5, con el fin de favorecer la disponibilidad de oxígeno para el crecimiento y metabolismo de *Bacillus* sp.

En cada erlenmeyer se utilizaron 100 ml del medio J, reportado en la literatura y comúnmente empleado para el crecimiento de microorganismos pertenecientes al género *Bacillus* (Claus y Berkeley, 1986).

Para evaluar la viabilidad de este medio como medio de producción para bacilos esporulados y procurando reducir los costos de producción, las fuentes de carbono y nitrógeno originales fueron sustituidas por otras de menor costo y composición similar.

Las condiciones de incubación fueron: agitación de 125 rpm y temperatura de 30 °C en un shaker New Brunswick® modelo Innova. Para evaluar el crecimiento a través del tiempo de cultivo se empleó la técnica de recuento en placa en medio LB y los resultados fueron expresados en UFC/ml. Las suspensiones bacterianas se sometieron a un choque térmico a 80 °C durante 30 minutos para dejar activas únicamente las esporas.

RESULTADOS

Evaluación exploratoria de la producción de biomasa de la rizobacteria *Pseudomonas* sp. Pf14 en erlenmeyer de 125 ml

El análisis de varianza (Tabla 5) reveló que se presentó un efecto significativo de la fuente de nitrógeno (factor B) sobre la producción de biomasa de *Pseudomonas* sp Pf14. El factor fuente de carbono no presentó efecto significativo dentro del espacio experimental evaluado. Para determinar la magnitud y la dirección de estos efectos

se analizó el diagrama de Pareto correspondiente (Figura 18).

Tabla 5. Análisis de varianza para la biomasa en el ensayo exploratorio en erlenmeyer de 125 ml con la cepa de *Pseudomonas* sp. Pf14.

Fuente de variación	Cociente F	Valor P
A: Carbono	1,27	0,2843
B: Nitrógeno	15,32	0,0024*
AB	0,42	0,5306

*Indica diferencia significativa

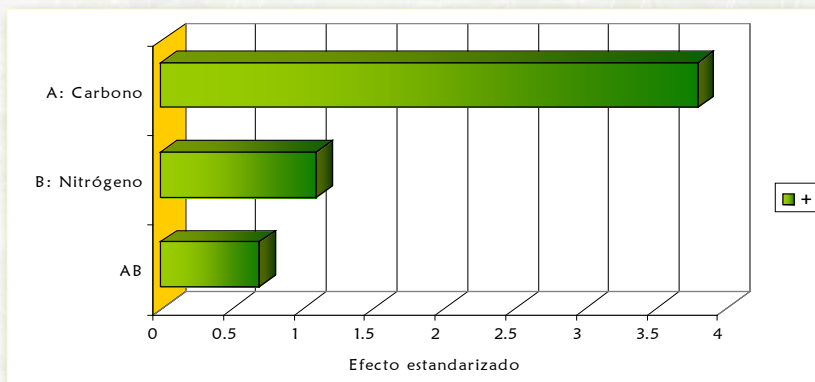


Figura 18. Influencia de factores nutricionales sobre el crecimiento de la cepa de *Pseudomonas* sp. Pf14 crecida en medio líquido en erlenmeyer de 125 ml.

En el diagrama de Pareto se observó que el factor B (fuente de nitrógeno) fue el único que presentó un efecto significativo sobre la variable de respuesta, mientras que el factor A (fuente de carbono) y la interacción de las dos fuentes no presentaron efecto significativo. Adicionalmente, todos los efectos e interacciones presentaron un efecto positivo o directamente proporcional con la respuesta, lo que indica que los niveles usados de las fuentes nutricionales fueron estimados de forma conservadora y se requiere un aumento en su concentración para alcanzar magnitudes de biomasa finales de *Pseudomonas* sp. más elevadas.

En la Figura 19 se observa la superficie plana generada a partir del modelo matemático que describe el fenómeno experimental observado en erlenmeyer de 125 ml.

En la superficie de respuesta se puede observar el espacio experimental del ensayo, en donde la mejor respuesta en biomasa (expresada como g/25 ml) se obtuvo con el nivel alto de la fuente de nitrógeno y el nivel alto de la fuente de carbono. Esto concuerda con los resultados del diagrama de Pareto.

De otro lado, con el fin de determinar el grado de ajuste del modelo simplificado generado, se llevó a cabo un análisis gráfico de comparación de respuestas teóricas contra respuestas experimentales (Figura 20).

En la Figura 20 se observa que hay un ajuste modesto del modelo contra los datos experimentales. En la ecuación se presenta el modelo matemático obtenido; el ajuste presentado fue de 60,73% de la variabilidad total presentada en el



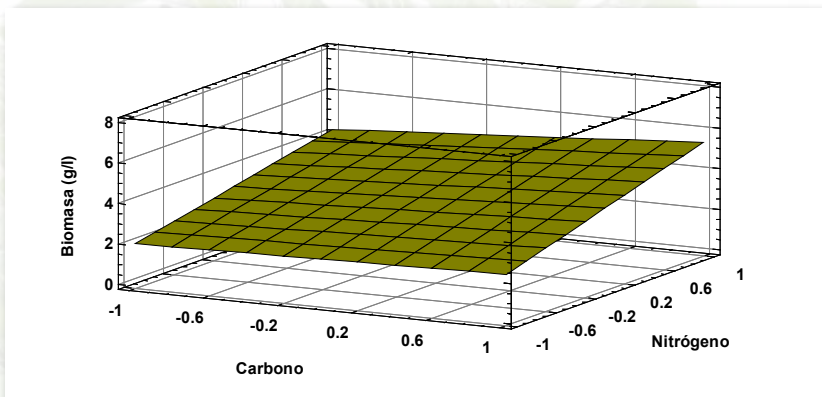


Figura 19. Superficie de respuesta del efecto de dos factores nutricionales sobre la producción de biomasa de la cepa de *Pseudomonas* sp. Pf14 crecida en medio líquido en erlenmeyer de 125 ml.

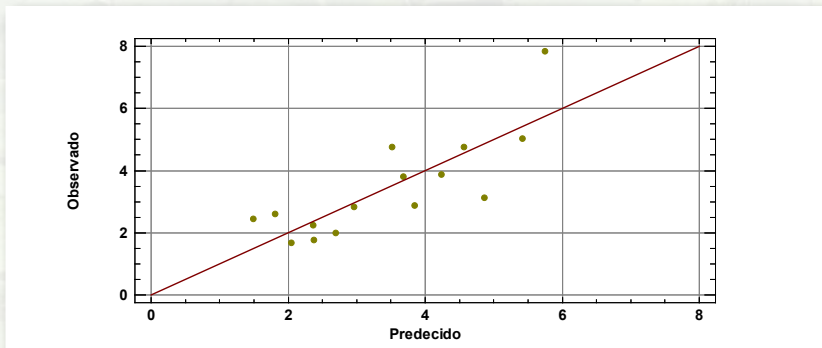


Figura 20. Representación del ajuste del modelo matemático generado para evaluar la producción de biomasa de la cepa de *Pseudomonas* sp. Pf14 crecida en medio líquido en erlenmeyer de 125 ml.

experimento. Dado que este grado de ajuste no es bueno, no se utilizó el modelo para realizar predicciones dentro del espacio experimental ni para extrapolaciones; todos los resultados se basaron en el análisis de varianza, el diagrama de Pareto y el análisis de comparación de medias.

$$Biomasa (g/25 ml) = 0,0860667+0,00941667*A+0,03275B+0,00541667*A*B$$

$$R^2 = 60,73\%$$

Por último, se llevó a cabo un análisis de comparación de medias usando la técnica LSD con un nivel de confianza del 95% (los resultados se presentan en la Tabla 6).

Al analizar los resultados de la comparación de medias se observó que el mejor tratamiento fue el 4, que presentó diferencias significativas con respecto a los tratamientos 1 y 2, y presentó diferencias en magnitud del 52% y 29% por encima con respecto a los tratamientos 5 y 3. El tratamiento 4 correspondió a la combinación de los niveles altos de las fuentes de carbono y nitrógeno, esto es concordante con el análisis del diagrama de Pareto y la superficie de respuesta.

Tabla 6. Análisis de comparación de medias de los tratamientos evaluados en el ensayo exploratorio en erlenmeyer de 125 ml con la cepa de *Pseudomonas* sp. Pf14.

Tratamiento	Conteo	Media	Grupos Homogéneos
1	3	0,0490000	B
2	3	0,0570000	B
5	3	0,0873333	AB
3	3	0,1036670	AB
4	3	0,1333330	A

Etapa de optimización de la producción de biomasa de la rizobacteria *Pseudomonas* sp. Pf14 en erlenmeyer de 125 ml

En la Tabla 7 se observan los resultados obtenidos en concentración expresada como UFC/ml para la cepa de *Pseudomonas* sp. Pf14. Todos los resultados estuvieron por encima de 1×10^{10} UFC/ml, lo que indica que son aceptables para las posteriores operaciones unitarias “aguas abajo” del proceso de fermentación (Prabakaran *et al.*, 2009). El valor más alto se obtuvo con el tratamiento 1 con un promedio de $2,63 \times 10^{10}$ UFC/ml y el valor más bajo se obtuvo con el tratamiento 2 con un promedio de $1,44 \times 10^{10}$ UFC/ml.

Tabla 7. Viabilidad (en UFC/ml) para el ensayo de optimización en erlenmeyer de 125 ml con la cepa de *Pseudomonas* sp. Pf14. R1, R2, R3: repeticiones, X: promedio, S: desviación estándar, CV: coeficiente de variación.

	Log(UFC/ml)					
	R1	R2	R3	X	S	CV (%)
T1	10,48	10,28	10,49	10,42	0,119	1,14
T2	10,36	9,98	10,15	10,16	0,190	1,87
T3	10,24	10,29	10,26	10,26	0,024	0,23
T4	10,26	10,33	10,32	10,30	0,043	0,41
T5	10,33	10,32	10,33	10,33	0,004	0,03
T6	10,20	10,33	10,13	10,22	0,103	1,67
T7	10,21	10,32	10,30	10,28	0,058	0,56
T8	10,32	10,30	10,32	10,32	0,012	0,12
T9	10,06	10,16	10,28	10,17	0,111	1,09

En la Tabla 8 se observan los resultados obtenidos en biomasa para la cepa de *Pseudomonas* sp. Pf14. El valor más alto se obtuvo con el tratamiento 1, con un promedio de 5,61 g/L y el valor más bajo se obtuvo con el tratamiento 2, con un promedio de 3,76 g/L; estos resultados son directamente proporcionales a los presentados con la variable de respuesta viabilidad, lo que indica que la interferencia debida a residuos del medio de cultivo no es apreciable.



Tabla 8. Biomasa obtenida para el ensayo de optimización en erlenmeyer de 125 ml con la cepa de *Pseudomonas* sp. Pf14.

	Biomasa (g/25 ml)					
	R1	R2	R3	X	S	CV (%)
T1	0,1360	0,1450	0,1400	0,1403	0,0045	3,21
T2	0,0934	0,0858	0,1027	0,0940	0,0085	9,01
T3	0,1027	0,1025	0,1005	0,1019	0,0012	1,19
T4	0,1201	0,1222	0,1238	0,1220	0,0019	1,52
T5	0,1240	0,1290	0,1315	0,1282	0,0038	2,98
T6	0,1119	0,1125	0,1065	0,1103	0,0033	3,00
T7	0,1177	0,1179	0,1193	0,1183	0,0009	0,7369
T8	0,1265	0,1293	0,1247	0,1268	0,0023	1,8387
T9	0,0986	0,1043	0,1000	0,1010	0,0030	2,9420

R1, R2, R3: repeticiones, X: promedio, S: desviación estándar, CV: coeficiente de variación.

Del análisis de varianza (Tabla 9) se concluyó que ninguno de los factores evaluados o sus interacciones presentaron un efecto significativo sobre la variable de respuesta concentración bacteriana.

Tabla 9. Análisis de varianza para la viabilidad en el ensayo de optimización en erlenmeyer de 125 ml con la cepa de *Pseudomonas* sp. Pf14.

Fuente	Cociente F	Valor P
A: Carbono	0,00	0,9626
B: Nitrógeno	0,00	0,9886
AA	1,84	0,1912
AB	0,01	0,9190
BB	1,65	0,2139
bloques	0,99	0,3886

Del diagrama de Pareto (Figura 21), se corrobora que ninguno de los efectos principales de los factores tiene efecto significativo sobre la respuesta, pero además, se observa que el efecto de la interacción entre fuente de carbono y nitrógeno fue el que tuvo la mayor magnitud, ya que las interacciones AA y BB no tienen significado biológico y solo sirven para ajustar a la forma del modelo de segundo orden.

Como se aplicó un modelo factorial de tres niveles, la superficie de respuesta generada presenta curvatura y permite visualizar más fácilmente la región donde se obtiene la respuesta óptima; para este caso (Figura 22) se observa un “valle” o mínimo hacia el centro del espacio experimental (combinación de niveles 0, 0), mientras que los valores máximos se obtienen en los vértices (combinación de niveles -1, -1; -1, 1; -1, -1; 1, 1 respectivamente). Por tanto, para la selección del mejor tratamiento se deben tener en cuenta criterios estadísticos y técnico-económicos.

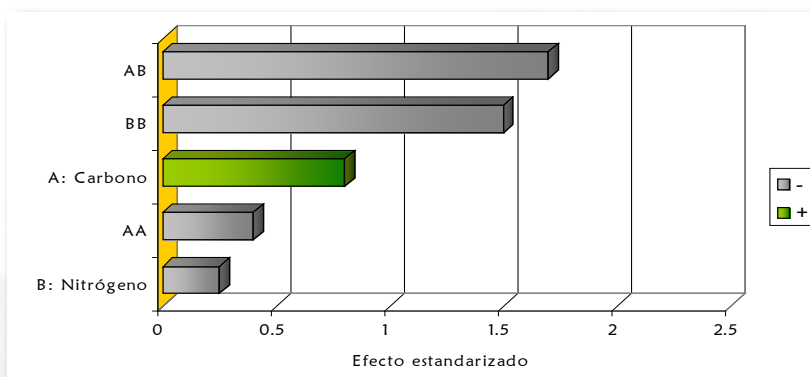


Figura 21. Influencia de factores nutricionales sobre el crecimiento de la cepa de *Pseudomonas* sp. Pf14 crecida en medio líquido en erlenmeyer de 125 ml.

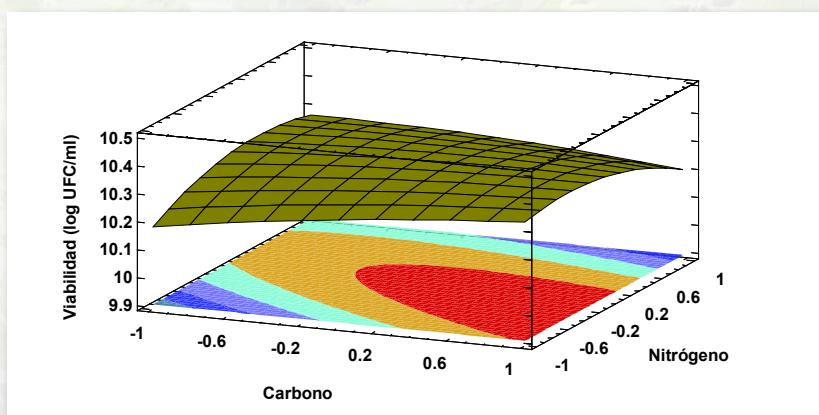


Figura 22. Superficie de respuesta del efecto de las fuentes nutricionales sobre la viabilidad de la cepa de *Pseudomonas* sp. Pf14.

Concentración

$$[\text{Log (UFC/ml)}] = 8,66195 + 0,0199 \cdot A - 0,00607222 \cdot B + 0,982989 \cdot A^2 - 0,0528583 \cdot A \cdot B + 0,932706 \cdot B^2$$

$$R^2 = 22,42\%$$

Cuando se analizó el modelo de segundo orden generado se observó un bajo poder de predicción, puesto que se obtuvo un coeficiente de correlación inferior al 25%; por tanto, no se utilizó el modelo para realizar predicciones dentro del espacio experimental ni para extrapolaciones; todos los resultados se basaron en el análisis de varianza y el diagrama de Pareto.

Posteriormente se realizó un análisis de optimización basado en la técnica de ascenso por pasos (stepascend path), ya que esta no se ve influenciada por el modelo matemático generado sino que usa las mejores respuestas experimentales para, en función de estas, determinar teóricamente la variable de respuesta en regiones aledañas a las evaluadas previamente.



Tabla 10. Niveles para optimizar la variable respuesta concentración

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Factor A	-1,0	1,0	1,0
Factor B	-1,0	1,0	-1,0

Meta: maximizar Log(UFC/ml)
 Valor óptimo = 10,65

De los resultados de la Tabla 10 y de los análisis anteriores se puede colegir que la combinación del nivel alto (+1) de la fuente de carbono y el nivel bajo (-1) de la fuente de nitrógeno podría alcanzar una concentración final de $4,53 \times 10^{10}$ UFC/ml. Además, al usar un nivel bajo para la fuente de nitrógeno se está ahorrando en el aspecto del costo del medio de cultivo (que generalmente puede alcanzar un 40% del costo total del proceso), y se mantiene un nivel adecuado de la fuente de carbono que se había demostrado por el ensayo exploratorio.

Producción masiva por fermentación líquida de *Bacillus* sp. (Bs006)

Generación de las cinéticas de crecimiento de *Bacillus* sp. Bs006

Inicialmente, se realizó un montaje experimental para dilucidar el comportamiento del crecimiento del microorganismo y se encontró que después de 28 horas de fermentación se dio inicio a un proceso de muerte celular con una disminución drástica de la concentración celular (Figura 23).

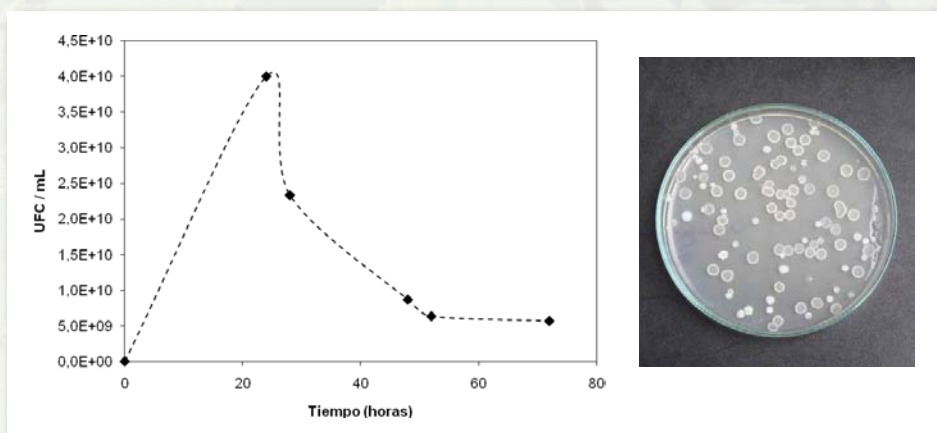


Figura 23. A. Cinética de crecimiento de *Bacillus* sp. Bs006 en el medio J modificado. B. Aspecto macroscópico cepa Bs006 en medio sólido LB.

Los resultados de la cinética de crecimiento obtenida son similares a los obtenidos en trabajos previos realizados en el Laboratorio de Control Biológico con un aislamiento del género *Bacillus* sp., en la que se obtuvieron concentraciones finales del orden de 1×10^{10} UFC/ml. En este caso se alcanzó una concentración

de 4×10^{10} UFC/ml en 28 horas, equivalentes a una biomasa seca de 6,4 g/L; este resultado es aceptable si se tiene en cuenta que en la literatura las concentraciones de biomasa están en el orden de 1,0-10,0 g/L.

Sumado a esto, se observó una etapa de muerte celular que dio inicio a partir de la hora 28 y en la que se obtuvo una concentración final de 5×10^9 UFC/ml después de 72 horas de fermentación.

Con estos resultados, se realizó otra evaluación para determinar el comportamiento de *Bacillus* sp. en la fase exponencial de crecimiento (0 a 28 horas), resultados con los que fue posible ajustar inicialmente un modelo de tipo lineal (Figura 24).

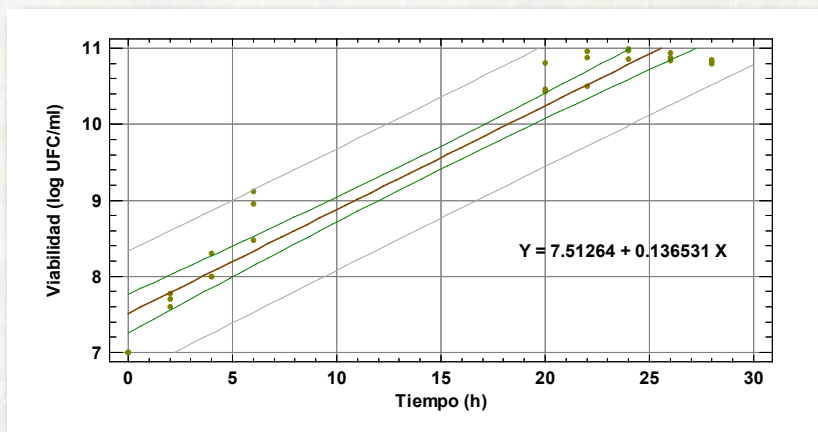


Figura 24. Cinética de crecimiento de la cepa de *Bacillus* Bs006 en medio líquido J.

El resultado final obtenido es muy promisorio, ya que, al igual que con la rizobacteria *Pseudomonas* sp., el objetivo en el proceso de fermentación es asegurar un nivel de concentración superior a 1×10^{10} esporas/ml, ya que la mayoría de los productos comerciales a base de *Bacillus* sp. son formulados y ajustados a una concentración de este orden de magnitud (Harrold *et al.*, 2011). Este medio de cultivo se usó para la producción de biomasa de *Bacillus* sp. para los prototipos de formulación.

CONCLUSIONES

Se diseñó un medio de cultivo a nivel laboratorio en erlenmeyer de 125 ml para la producción de biomasa de la cepa de *Pseudomonas* sp. Pf14 que cumplió con los requerimientos mínimos de concentración bacteriana viable para el proceso de formulación de un bioproducto (1×10^9 UFC/ml), de acuerdo con los requerimientos técnicos del Laboratorio de Control Biológico.

Se diseñó un medio de cultivo a nivel laboratorio en erlenmeyer de 500 ml para la producción de biomasa de la cepa de *Bacillus* sp. Bs006 que cumplió con los requerimientos mínimos de concentración bacteriana viable para el proceso de formulación (1×10^{10} UFC/ml), según los requerimientos técnicos de otros bioproductos que existen en el mercado.



LITERATURA CITADA

- Claus, D.; R. C. W. Berkeley. "Genus *Bacillus*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", 9th ed., vol. 2, Williams & Wilkins, pp. 1105-1139. 1986.
- Harrold, Z. R.; Hertel, M. R.; Gorman-Lewis, D. "Optimizing *Bacillus subtilis* spore isolation and quantifying spore harvest purity". *Journal of Microbiological Methods*. 87(3): 325-329. 2011.
- Prabakaran, G.; Hoti, S. L.; Paily, K. P. "Development of cost-effective medium for the large-scale production of a mosquito pupicidal metabolite from *Pseudomonas fluorescens* Migula". *Biological Control*. 48(3): 264-266. 2009.

6

Formulación de bioproductos a base de rizobacterias

Martha Gómez¹, Erika Grijalba¹, Laura Villamizar¹, Martha Arias²

¹ Investigadoras Laboratorio de Control Biológico
Centro de Biotecnología y Bioindustria - CBB
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - Corpoica.
E-mail: mgomeza@corpoica.org.co

² Estudiante Microbiología Industrial, Pontificia Universidad Javeriana.
Bogotá, Colombia.

RESUMEN

En este capítulo se mencionan algunos de los aspectos más relevantes que se tuvieron en cuenta en el diseño de sistemas de entrega al agricultor de fácil aplicación y que conserven la viabilidad y la actividad biológica de los microorganismos seleccionados (*Pseudomonas* sp. Pf014 y *Bacillus* sp. Bs006), para lo cual se llevó a cabo el diseño de prototipos de formulación que fueron caracterizados microbiológica y fisicoquímicamente y sometidos posteriormente a un estudio de estabilidad acelerado.

INTRODUCCIÓN

En la generación de estrategias de control biológico contra los agentes patógenos una vez se tiene seleccionado el microorganismo que puede ejercer la actividad biocontroladora, una de las etapas más importantes consiste en el desarrollo de una formulación que sirva como sistema de entrega al agricultor y que proteja al microorganismo de las condiciones ambientales desfavorables que pueden ir en detrimento de su viabilidad y de su actividad biológica. Adicionalmente, con el fin de masificar el uso de un microorganismo biocontrolador, su producción y formulación son factores críticos para su comercialización, más en la actualidad dado que los bioproductos surgen como iniciativa a la reducción o prohibición de algunos insumos químicos, cuyos residuos en los alimentos pueden afectar la salud y el medio ambiente (Whipps y Lumsden, 2001).

Una formulación microbiana está compuesta de un ingrediente activo (microorganismo) que ejerce la actividad biológica y auxiliares de formulación que son sustancias inertes que protegen y liberan el ingrediente activo; estos auxiliares deben asegurar la estabilidad durante la producción, procesamiento y almacenamiento, además de facilitar la aplicación, proteger de la radiación ultravioleta, asegurar la



permanencia sobre el blanco, retener la humedad o proteger contra la desecación y promover la dispersión del bioproducto, entre otras (Burgues, 1998; Boyetchko *et al.*, 2002). Generalmente las formulaciones tienen dos formas de presentación, sólida o líquida, y su elección depende de las características del patógeno que se quiere controlar. La primera incluye a los granulados, polvos mojables y polvos secos, entre otros, y la segunda a las suspensiones en agua, en aceite y emulsiones, entre otras (Schisler *et al.*, 2004).

Actualmente, se encuentran en el mercado diversas formulaciones a base de *Bacillus* sp. y de *Pseudomonas* sp., cuyas formas de presentación comprenden principalmente suspensiones acuosas y polvos mojables. En Colombia se encuentran registrados ante el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) cuatro productos a base de *Bacillus* sp., tres corresponden a una suspensión concentrada y uno a un polvo mojable y ninguno a base de *Pseudomonas* sp. (ICA, 2011).

METODOLOGÍA

Obtención del ingrediente activo de *Bacillus* sp. Bs006

Teniendo en cuenta que el aislamiento de *Bacillus* sp. seleccionado produce estructuras de resistencia denominadas esporas, que pueden tener una mayor resistencia ante condiciones físicas, químicas y ambientales adversas (Schisler *et al.*, 2004), se seleccionó este tipo de estructuras como ingrediente activo de los prototipos de formulación a desarrollar.

Para la obtención del ingrediente activo, a partir de un cultivo de 24 horas en agar nutritivo se preparó una suspensión inicial y se determinó su absorbancia usando un espectrofotómetro Nanodrop 1000 Thermo Scientific®, la cual se correlacionó con la concentración celular usando una curva de calibración obtenida previamente. De esta suspensión se tomó el volumen necesario para ajustar la concentración inicial de tres lotes de 500 ml de caldo nutritivo en 1×10^6 células/ml. El caldo de fermentación se dejó en incubación por 48 horas a $28 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ y 150 rpm. Después del tiempo de incubación se confirmó la producción de esporas al realizar una tinción verde de malaquita- safranina y observar la presencia de mínimo 10 esporas por campo óptico.

Obtención del ingrediente activo de *Pseudomonas* sp. Pf014

La producción de principio activo se realizó mediante un proceso de fermentación en medio líquido, para lo cual inicialmente se tomó un criovial de la cepa, se reactivó en cajas de Petri con medio agar nutritivo y se incubó durante 24 h a $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Después de este tiempo, se preparó el inóculo de la fermentación, cuya concentración se estimó en un espectrofotómetro mediante la lectura de su absorbancia a 300 nm, y posterior extrapolación en una curva de calibración previamente estandarizada (Cely, 2010).

Se realizaron dos lotes de fermentación, cada uno consistente en tres erlenmeyers de 1000 ml de capacidad con 500 ml de caldo Luria Bertani (LB), los cuales fueron inoculados a razón de 1×10^5 unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml).

Las condiciones de fermentación fueron 28 ± 2 °C durante 48 h a 180 rpm. Al finalizar el tiempo de fermentación a cada medio de cultivo se le verificó la pureza mediante coloración de Gram y observación en microscopio. Posteriormente se realizó su caracterización determinando los parámetros pH, peso seco (%) y viabilidad (UFC/ml) por triplicado.

Diseño y preparación de los prototipos de formulación a base de *Bacillus* sp. Bs006

Se diseñaron dos prototipos de formulación: uno sólido, correspondiente a un polvo mojable (WP) y uno líquido, correspondiente a una suspensión acuosa (SC), cuya composición se presenta en la Tabla 11. En cada prototipo los auxiliares de formulación cumplieron una función particular, teniendo en cuenta que la formulación se aplica en suelo desde semillero y el ingrediente activo son las esporas de *Bacillus* sp., estructuras de mayor resistencia en comparación con las células bacterianas.

Tabla 11. Prototipos de formulación a base de *Bacillus subtilis* (Bs06)

Prototipo	Composición (%)								
	Activo (b. h.)	Ps01	Di03	Cm04	Ps05	Su01	Su04	Sp03	Agua (ml)
PL3 (SC)	5	---	---	0,1	2	0,2	0,1	1	c.s.p 100
PS01 (WP)	40	10	50	---	---	---	---	---	40

*c.s.p cantidad suficiente para, b. h. base húmeda

El proceso de formulación se presenta en la Figura 25. En la Figura 25a se observa la preparación del polvo mojable, en el cual se mezcla la biomasa con el agua en proporción 1:1 y se adiciona el protector de secado Ps01. Se mezcla nuevamente y finalmente se adiciona el diluyente Di03.

En la Figura 25b se observa la preparación de la suspensión acuosa, en la cual los auxiliares de formulación son adicionados previamente al agua; esta suspensión se mezcla con la biomasa, se agita y finalmente se adiciona el viscosante Sp03.

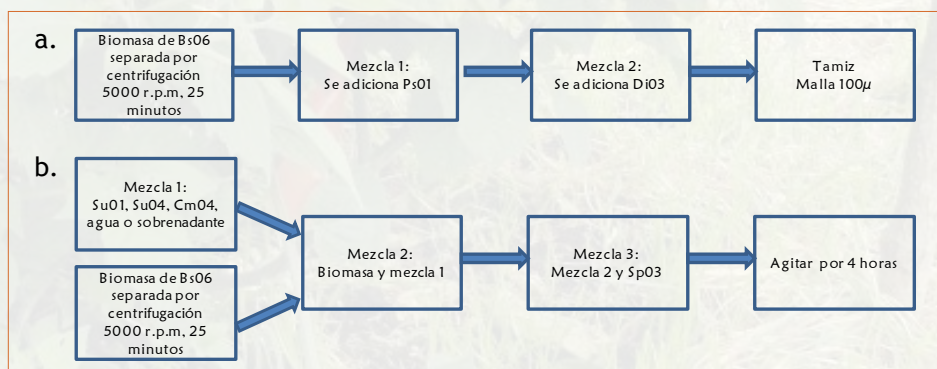
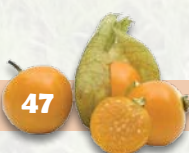


Figura 25. Proceso de formulación de los prototipos a base de *Bacillus* sp. (Bs06). a: Prototipo WP, b: Prototipo SC.



Diseño y preparación de los prototipos de formulación a base de *Pseudomonas sp.* Pf014

Para el desarrollo de los sistemas de preformulación se evaluaron dos principios activos: el primero correspondiente al caldo de fermentación de *Pseudomonas sp.* Pf14 y el segundo a la biomasa separada del caldo de fermentación por un proceso previo de centrifugación en una centrífuga Sorval a 15.000 rpm durante 15 minutos y dos lavados con tampón fosfato a pH 7,5.

Para los dos principios activos se evaluaron tres polioles a dos concentraciones distintas (5% y 10%); como control se utilizó para el caldo de fermentación el medio líquido sin adición de polioles, y para la biomasa separada del caldo de fermentación, la biomasa resuspendida en un tampón de fosfatos pH 7,5. Las preformulaciones fueron preparadas utilizando un dispersor Ultra Turrax marca IKA a 6000 rpm y se mantuvieron durante 48 horas a temperatura ambiente. Tres muestras de 3 ml de cada una de las preformulaciones recién preparadas y después de 48 horas de reposo fueron tomadas para la determinación del pH, la actividad de agua (A_w) y la viabilidad (UFC/ml) siguiendo los procedimientos previamente establecidos en el Laboratorio de Control Biológico.

Con los resultados obtenidos se elaboró una matriz de decisión binaria que incluyó las siguientes variables de respuesta: viabilidad (UFC/ml), actividad de agua en el sistema, estabilidad de la actividad de agua con el tiempo, pH, costos de producción y concentración final del prototipo. Por cada variable de respuesta por tratamiento se asignó un valor de uno (1) para el comportamiento deseado y cero (0) para el comportamiento no deseado. Una vez calificados todos los prototipos, se realizó la sumatoria y se seleccionaron los que presentaron el mayor puntaje para ser utilizados en el ensayo de estabilidad en almacenamiento.

Caracterización fisicoquímica y microbiológica de los prototipos seleccionados

Se prepararon tres lotes de cada prototipo, cada uno a partir de 1 litro de caldo nutritivo de 48 horas de incubación a una temperatura de 28 °C y 150 rpm. Cada lote se centrifugó a 5000 rpm por 25 minutos en una centrífuga Sorvall Biofuge® y la biomasa obtenida se lavó tres veces con agua destilada estéril.

Se tomó una muestra de cada lote y se determinó la concentración, la pureza, el pH, la actividad de agua (A_w) y la viscosidad para los prototipos líquidos; y la concentración, la pureza, el pH, la fluidez, la voluminosidad, el tamaño de partícula y la humedad para el prototipo sólido.

Las pruebas fisicoquímicas que se presentan a continuación se basan en las pruebas reportadas por Remington (2000) y en los procedimientos operativos estándar del Laboratorio de Control Biológico de Corpoica.

Concentración: se tomaron las diluciones correspondientes a 1×10^{-8} , 1×10^{-9} y 1×10^{-10} y se sometieron a un choque térmico. Posteriormente, se tomó 0,1 ml y se inocularon por triplicado cajas de Petri con agar nutritivo (AN). Las cajas se dejaron en incubación a $28 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ por 48 horas, tiempo después del cual se realizó el conteo de unidades formadoras de colonia y el resultado se expresó como UFC/g o UFC/ml.

Pureza: se evaluó el contenido de levaduras y mohos filamentosos contaminantes. Para esto, se inocularon 0,1 ml de las diluciones 1×10^{-1} , 1×10^{-2} y 1×10^{-3} en agar extracto de malta y levadura (YM) para determinar levaduras contaminantes, estas cajas se dejaron en incubación por 48 horas a una temperatura de 2 °C; y en agar papa dextrosa (PDA) con tritón X-100 al 1% para determinar hongos filamentosos, estas cajas se dejaron en incubación a una temperatura de 25 °C durante 7 días. Posteriormente en cada caso se realizó la lectura de unidades formadoras de colonia y el resultado se expresó como UFC/g o UFC/ml.

$$\text{Nivel de contaminación (\%)} = a \times 100/b$$

Donde a representa la concentración de contaminantes (UFC/g) y b indica la concentración del ingrediente activo (UFC/g).

Determinación del pH: para esto se utilizó un analizador electroquímico Consort C931®, previamente calibrado con soluciones tampón pH 4,0 y pH 7,0. El electrodo se introdujo en el tubo con la muestra de 10 ml, se esperó hasta estabilización de la lectura y se registró el valor de pH.

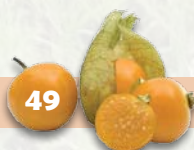
Actividad de agua (Aw): la determinación de este parámetro se llevó a cabo mediante un termoconstanter Novasina® modelo mS1, en el cual la muestra se colocó en el portamuestras a temperatura ambiente (aproximadamente 18 °C ± 2 °C) y se esperó que alcanzara el equilibrio para tomar la medida.

Viscosidad: corresponde a la capacidad que tiene un fluido de oponerse a su desplazamiento cuando se le aplica una fuerza. Esta característica se determinó mediante un viscosímetro de disco Brookfield RV®. Los datos obtenidos fueron procesados de acuerdo con el método Mitschka empleado por Briggs y Steffe (1997), en donde se determinó la viscosidad aparente y se realizó el reograma correspondiente, y siguiendo la ley de potencias se caracterizó la suspensión líquida mediante la determinación de los coeficientes K (índice de consistencia) y n (índice de comportamiento de flujo), empleados para fluidos no Newtonianos.

Fluidez: esta característica corresponde a la capacidad que tiene un material para moverse a través de un sistema mecánico de alimentación y depende de las fuerzas de rozamiento entre las partículas. Permite inferir el comportamiento que tendría el producto cuando es envasado. Se pesó una cantidad conocida de cada muestra y se colocó en un embudo con un orificio de salida de 2 cm de diámetro y a una altura de 10 cm de una superficie horizontal. Se destapó el orificio de salida y se midió la altura y el diámetro del cono formado por el material sobre la superficie horizontal. Con estas medidas se calculó la fluidez utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Fluidez} = \text{Ángulo de reposo (}^\circ\text{)} = \text{Arcotangente (Altura / (Diámetro/2))}$$

El valor obtenido se comparó con los parámetros de fluidez reportados en la literatura para clasificar materiales.



Voluminosidad: se refiere al volumen ocupado por un material. Para su determinación se pesó una cantidad conocida de producto y se dejó caer libremente en una probeta de 100 ml. Posteriormente, se leyó el volumen ocupado por el material en la probeta y se calculó la voluminosidad mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Voluminosidad} = \text{Volumen} / \text{Peso del material (g)}$$

Tamaño de partícula: esta prueba se llevó a cabo mediante la determinación del tamaño de las partículas del polvo mojable por microscopía óptica, ajustando al objetivo de 40X un micrómetro que permite cuantificar el tamaño de cada partícula. Para esto se tomaron tres muestras por lote y se realizó el conteo de 100 partículas por muestra.

Humedad: la humedad se determinó por pérdida de peso mediante el empleo de una balanza de humedad Ohaus® MB45, en la que la muestra se sometió a una temperatura de 110 °C hasta que el peso fue constante y la humedad se expresó como el porcentaje correspondiente a la diferencia en pérdida de peso.

Estabilidad en almacenamiento de prototipos a base de *Bacillus sp. Bs006*

Se pesaron 0,1 g del prototipo en polvo y se empacaron en bolsas metalizadas que se sellaron al vacío, mediante una selladora Van Der Stähl V-300. Para los prototipos líquidos se colocaron 5 ml de cada prototipo en un vial de vidrio tapado con un tapón de caucho y agrafe. Las muestras se dejaron en almacenamiento a una temperatura de 35 °C ± 2 °C. Se aplicó un diseño experimental completamente al azar y se tomaron tres muestras por tratamiento cada mes durante tres meses.

A partir de cada muestra se realizaron diluciones seriadas, y las diluciones correspondientes a 1x10⁻⁸, 1x10⁻⁹ y 1x10⁻¹⁰ se sometieron a un choque térmico a una temperatura de 80 °C por 15 minutos con el fin de dejar activas solo las esporas. Posteriormente, se tomaron 0,1 ml y de cada una se inocularon por triplicado cajas de Petri con agar nutritivo. Las cajas se dejaron en incubación a 28 °C ± 2 °C por 48 horas, tiempo después del cual se realizó el conteo de unidades formadoras de colonia y el resultado se expresó como UFC/g o UFC/ml.

Estabilidad en almacenamiento de prototipos a base de *Pseudomonas sp. Pf014*

Se prepararon 30 tubos Falcon con 15 ml de cada preformulación, los cuales fueron almacenados durante dos meses, 15 tubos a 18 ± 2 °C y los restantes a 28 ± 2 °C. Antes de iniciar el almacenamiento (tiempo cero) y cada 15 días durante dos meses, se tomaron tres tubos de cada temperatura y a cada uno se les evaluó el pH, la actividad del agua (A_w) y la viabilidad (UFC/ml) siguiendo las metodologías previamente descritas. El diseño experimental fue completamente al azar con medidas repetidas en el tiempo y arreglo factorial, con tres repeticiones para cada tiempo y tratamiento.

RESULTADOS

Obtención y caracterización del ingrediente activo de *Bacillus* sp. Bs006

Después de 48 horas de fermentación se pudo observar la formación de esporas en el medio de cultivo mediante la tinción verde de malaquita-rojo safranina, en la cual los bacilos se tiñen de color rojo y las esporas se tiñen de color verde (Figura 26).

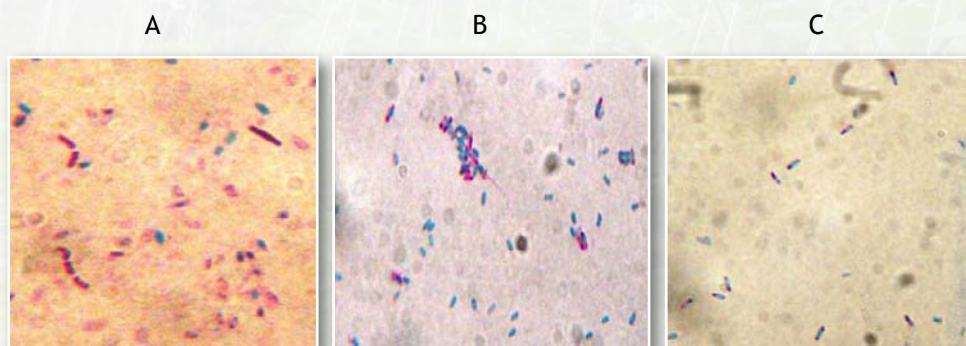


Figura 26. Tinción verde de malaquita - rojo safranina del medio de cultivo de *Bacillus* sp. Bs06. A) Lote 1. B) Lote 2. C) Lote 3

Prototipo sólido (WP)

Para la caracterización del polvo mojable (PS01) se produjeron tres lotes, cada uno a partir de 1 litro de fermentación en caldo nutritivo. La biomasa húmeda obtenida a partir del proceso de centrifugación de cada lote fue de 10 g para el lote 1, de 7,3 g para el lote 2 y finalmente de 11,5 g para el lote 3. Cada lote se formuló de acuerdo con las indicaciones dadas anteriormente.

A partir de la determinación del tamaño de partícula para cada lote de formulación se pudo observar que el mayor porcentaje de partículas del polvo mojable PS01 se encuentran en un rango entre 2,6 a 5,0 μm con valores entre 40% y 49% entre lotes. Para partículas con tamaño inferior o igual a 2,5 μm se obtuvieron valores entre 39% y 45% entre lotes. Para los mayores tamaños de partícula del producto se encontraron porcentajes bajos (5% a 10% para 5,1 a 7,5 μm y 5% o menos para 7,6 a 10 μm). Estos resultados permiten deducir que al encontrarse el mayor porcentaje de partículas con un tamaño igual o inferior a 5 μm el área superficial del polvo será mayor y, por ende, al suspenderse en el agua la liberación del activo será más rápida y homogénea, y el cubrimiento de las semillas será más eficiente (Helman, 1982). Sin embargo, a pesar de estas ventajas el tamaño de partícula obtenido es demasiado fino y puede afectar la salud, ya que tamaños entre 0,5 a 4 μm aseguran una máxima penetración bronco alveolar (Helman, 1982) que puede ser perjudicial para quienes procesan y aplican este tipo de productos. Por esta razón, en el proceso de elaboración de este producto y en las recomendaciones de uso del mismo se debe indicar el uso de los elementos de protección adecuados.



En la Tabla 12 se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de otras variables empleadas para la caracterización del polvo mojable.

Tabla 12. Caracterización del polvo mojable PS01 a base de *Bacillus* sp. Bs06

Variable	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Promedio	Coefficiente de variación (%)
Concentración (UFC/g)	2,48x10 ¹²	1,84x10 ¹²	1,01x10 ¹²	1,78x10 ¹²	1,62
pH	6,56	6,58	6,52	6,55	0,45
Humedad (%)	2,72	2,73	2,45	2,63	5,70
Fluidez (°)	19,79	20,46	20,76	20,33	2,41
Voluminosidad (ml/g)	2,05	2,12	2,05	2,07	1,93

La concentración obtenida para el producto se encontró entre 1,01x10¹² y 2,48x10¹² UFC/g, siendo superior a la concentración que presentan la mayoría de las formulaciones que se encuentran en el mercado, como Subtilex® que tiene una concentración de 5,50x10¹⁰ esporas/g, Raphsody® que presenta una concentración de 1x10⁹ esporas/g y FBZ24® que tiene una concentración de 5x10¹⁰ UFC/g, lo que indica que con el producto desarrollado se reduciría la dosis de aplicación.

La humedad obtenida para los tres lotes fue inferior al 5%, lo que posiblemente reduce la contaminación y permite una mayor estabilidad en el almacenamiento del activo. La fluidez fue menor a 25°, lo que indica que el polvo posee propiedades de flujo libre y no presentaría inconvenientes en su envasado (Aulton, 2004).

Prototipo líquido (SC)

Se prepararon tres lotes de producto (los resultados obtenidos en la caracterización se presentan en la Tabla 13). A partir de los mismos se pudo evidenciar que el pH obtenido se encuentra en el rango adecuado para la bacteria (6,5 a 7,5), de acuerdo con lo reportado por Junge y colaboradores (2000).

Tabla 13. Caracterización de la suspensión acuosa PL3 a base de Bs06

Variable	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Promedio	Coefficiente de variación (%)
Concentración (UFC/ml)	2,25x10 ¹²	4,00x10 ¹²	2,67x10 ¹²	2,97x10 ¹²	1,03
pH	6,89	6,89	6,97	6,91	0,43
Viscosidad aparente (Centipoises, Cp)	380 - 770	380 - 770	390 - 770	383 - 770	
n = índice de flujo	0,157	0,155	0,156	0,156	0,641
k = índice de consistencia	3,42	3,56	3,53	3,50	2,08

En cuanto a la viscosidad, todos los lotes presentaron un comportamiento similar que permitió establecer que la suspensión líquida a base de *Bacillus* sp. Bs06 se comporta como un fluido no Newtoniano en el que la relación entre el esfuerzo y la velocidad de corte no son una constante, es decir, la viscosidad del fluido varía cuando cambia la velocidad de corte. Teniendo esto en cuenta, se pudo observar que

para la temperatura de trabajo (aproximadamente 20 °C) la viscosidad de los tres lotes se encontró en un rango similar entre 380 y 770 cP (Tabla 13).

Se aplicó el método de Mitschka (Briggs y Sttefe, 1997) para, mediante un análisis de regresión lineal, previa transformación logarítmica de los datos de corte vs la velocidad de corte, determinar los índices de flujo n y de consistencia K . El índice de flujo n en los tres lotes fue inferior a 1 (Tabla 13), lo que indica que el fluido sigue un comportamiento pseudoplástico (Ibarrola, 2011) que se aleja con respecto a un fluido de flujo Newtoniano cuyo valor para n es igual a 1. En cuanto al índice de consistencia K , el promedio obtenido fue de 3,50, valor que se encuentra por encima del valor del agua que es de 1 (Bandala-Rocha *et al.*, 2005). Estos coeficientes se convierten en parámetros de calidad que permiten controlar y garantizar que cada lote de producción tendrá las mismas características de flujo, lo que podría ser relacionado con la posterior adherencia del producto al ser aplicado a las semillas.

Obtención y caracterización del ingrediente activo de *Pseudomonas* sp. Pf014

Para la producción del principio activo se elaboraron dos lotes y se realizó su caracterización determinando los parámetros de pH, peso seco (%) y concentración (UFC/ml). Los resultados promedio de cada característica para cada lote de producción se presentan en la Tabla 14.

Tabla 14. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de dos lotes de fermentación de *Pseudomonas* sp. Pf14.

Características	Lote 1	Lote 2	Promedio	DE
pH	7,96	7,59	7,77	0,26
Peso seco (%)	1,24	1,52	1,38	0,19
Concentración (UFC/mL)	6,73x10 ⁹	8,03x10 ⁹	7,38x10 ⁹	9,19x10 ⁸

El análisis de varianza no detectó diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los dos lotes de producción para las características de pH, peso seco (%) y concentración (UFC/ml), lo que sugiere que hay repetibilidad entre estos.

El valor de pH obtenido estuvo de acuerdo con lo reportado por Kamal y colaboradores (2008), quienes describieron un pH de 7,85 al final de la fermentación de *P. fluorescens* generado por una acidificación del medio de cultivo.

En lo que se refiere a la concentración (en UFC/ml), cada lote presentó valores superiores a una concentración de 1×10^9 UFC/ml, resultados similares a los obtenidos cuando se cultivó otro aislamiento de *Pseudomonas fluorescens* en caldo King B a 28 ± 2 °C durante 48 h a 150 rpm, con un resultado final de 1×10^9 UFC/ml (Agrios, 2005).

Selección de prototipos a base de *Pseudomonas* sp. Pf014

Cuando se utilizó como principio activo la biomasa separada del caldo de fermentación, todas las preformulaciones presentaron concentraciones altas del orden de 10^{12} UFC/ml; mientras que cuando se usó el caldo de fermentación, la concentración fue inferior a 10^{10} UFC/ml. Teniendo en cuenta que la dosis de aplicación recomendada



para esta bacteria es del orden de 10^9 UFC/ml, sería más conveniente contar con un producto concentrado que permita la manipulación de volúmenes bajos.

Por el contrario, cuando se utilizó como principio activo el caldo de fermentación, en el producto pueden quedar residuos de sales, fuentes de carbono y nitrógeno que no fueron consumidas totalmente en el proceso de fermentación. Durante el almacenamiento, este tipo de sustancias podrían afectar la viabilidad de las células y su actividad, ya que podrían precipitar causando inestabilidad química con los excipientes adicionados a la formulación y favorecer la acumulación de productos tóxicos del metabolismo microbiano (Costa *et al.*, 2002).

En lo relacionado con la actividad de agua (A_w), para las preformulaciones a base de biomasa separada del caldo de fermentación se obtuvieron bajas actividades de agua entre 0,907 y 0,938; mientras que el tratamiento control al cual no se le adicionó ningún poliol presentó una A_w de 1,0. Estos resultados confirmaron el efecto del poliol sobre el parámetro evaluado. Los valores de A_w obtenidos para todos los tratamientos podrían favorecer que el microorganismo entre en una fase de latencia, disminuyendo su actividad metabólica y mejorando su estabilidad.

La actividad de agua de las preformulaciones a base del caldo de fermentación con el poliol 1 al 5% y al 10% osciló entre 0,968 y 0,983, mientras que para los otros cuatro tratamientos la actividad de agua fue menor (0,911 y 0,938). En cuanto al tratamiento control, la actividad de agua fue de 0,957.

En general, para la mayoría de los tratamientos no se detectó un cambio significativo de la actividad de agua al tiempo cero y después de 48 horas de reposo, siendo estos aptos para realizar el estudio de estabilidad, a excepción de los tratamientos correspondientes a la biomasa con el poliol 2 al 10% y el caldo de fermentación con el poliol 1 al 5%.

En cuanto al pH, se observó que todas las preformulaciones a base de biomasa separada del caldo de fermentación presentaron valores entre 7,32 y 7,44.

El pH de las preformulaciones a base del caldo de fermentación osciló entre 7,53 y 7,89, valores superiores a los obtenidos en las preformulaciones a base de la biomasa separada del caldo de fermentación, los cuales estuvieron muy cercanos a la neutralidad, siendo adecuados para asegurar la estabilidad de la bacteria, ya que *Pseudomonas sp.* tiene un mejor crecimiento a pH neutro (Gould y Measures, 1997).

Teniendo en cuenta los resultados mencionados anteriormente, y además los costos de producción y la concentración final del producto, se elaboró la matriz de decisión binaria y una vez calificados todos los prototipos con todas las variables se realizó la sumatoria. Los preformulados a base de la biomasa separada del caldo de fermentación al 5% fueron los que presentaron el mayor puntaje (Tablas 15 y 16), por lo que se seleccionaron para el estudio de estabilidad en almacenamiento.

Estabilidad en almacenamiento de los prototipos seleccionados de *Bacillus sp.* Bs006

Prototipo sólido (WP)

Los resultados de la estabilidad en almacenamiento para el prototipo sólido se presentan en la Tabla 17. Se observó que después de dos meses de almacenamiento la viabilidad no se redujo significativamente (Tukey, $\alpha=0,95$), y al tercer mes la reduc-

Tabla 15. Matriz binaria de calificación de preformulados a base de la biomasa de *Pseudomonas* sp. Pf14.

Variable	Comportamiento deseado	Principio					
		Biomasa separada del caldo de fermentación					
		P1(5%)	P2(5%)	P3(5%)	P1(10%)	P2(10%)	P3(10%)
Viabilidad (UFC/ml)	Estable	1	1	1	1	1	1
Aw	< 0,94	1	1	1	1	0	1
Estabilidad Aw	Estable	1	1	1	1	0	1
pH	Cercano a la neutralidad	1	1	1	1	1	1
Costos	< costos	1	1	1	0	0	0
Concentración de la formulación	> concentración	1	1	1	1	1	1
Total		6	6	6	5	3	5

Tabla 16. Matriz binaria de calificación de preformulados a base del caldo de fermentación de *Pseudomonas* sp. Pf14.

Variable	Comportamiento deseado	Principio					
		Caldo de fermentación					
		P1(5%)	P2(5%)	P3(5%)	P1(10%)	P2(10%)	P3(10%)
Viabilidad (UFC/ml)	Estable	0	1	1	1	1	1
Aw en el sistema	< 0,94	0	1	1	0	1	1
Estabilidad Aw	Estable	0	1	1	0	1	1
pH en el sistema	Cercano a la neutralidad	0	0	0	0	0	0
Costos	< costos	1	1	1	0	0	0
Concentración de la formulación	> concentración	0	0	0	0	0	0
Total		1	5	5	2	3	4

Tabla 17. Estabilidad en almacenamiento del polvo mojable a base de *Bacillus* sp. Bs06 a una temperatura de 35 °C durante tres meses.

Tiempo almacenamiento	Concentración (UFC/g)	Lote			Coeficiente de variación (%)
		1	2	3	
0	Ingrediente activo	2,48x10 ¹² (a)*	1,84x10 ¹² (a)*	1,01x10 ¹² (a)*	1,62
	Mohos	<100	<100	<100	
	Levaduras	<100	<100	<100	
1 mes	Ingrediente activo	2,24x10 ¹² (a)	1,15x10 ¹² (ab)	1,20x10 ¹² (a)	1,35
	Mohos	<100	<100	<100	
	Levaduras	<100	<100	<100	
2 meses	Ingrediente activo	1,23x10 ¹² (ab)	1,10x10 ¹² (ab)	1,60x10 ¹² (a)	0,69
	Mohos	<100	<100	<100	
	Levaduras	<100	<100	<100	
3 meses	Ingrediente activo	5,60x10 ¹¹ (b)	7,14x10 ¹¹ (b)	1,76x10 ¹¹ (b)	2,82
	Mohos	2666	1666	2666	
	Levaduras	<100	<100	<100	

Pureza: Mohos u hongos filamentosos y levaduras

* Las columnas con la misma letra no presentaron diferencias significativas según Tukey ($\alpha = 0,05$)



ción alcanzó una magnitud de solo 5% en promedio. Adicionalmente, es importante recordar que el producto estará expuesto a temperaturas inferiores a la evaluada, ya que la uchuva se cultiva en zonas de clima frío moderado (Censo Hortofrutícola, 2004), lo que indicaría que posiblemente el polvo mojable desarrollado puede mantener su viabilidad a temperatura ambiente o a 4 °C durante un tiempo de almacenamiento mayor a tres meses.

Con respecto a la pureza del producto, se puede observar que después de tres meses de almacenamiento el contenido de levaduras es igual al presentado en el producto fresco (<100 UFC/g) y el contenido de mohos se incrementó en un promedio de 2332 UFC/g, lo que indica que el nivel de contaminación fue inferior a 0,0001%.

En la actualidad no existe una reglamentación que defina los límites de aceptación de contaminantes. Generalmente, los niveles de contaminación aceptables para un producto determinado deben ser establecidos por el productor a partir del historial de los resultados obtenidos para cada lote, ya que dependen del proceso de producción y del tipo agente que es empleado como ingrediente activo (Jenkins y Grzywacs, 2000). Sin embargo, es claro que un menor nivel de contaminación permite obtener un producto que mantiene durante su almacenamiento sus características microbiológicas y biológicas, además de evitar la dilución del ingrediente activo.

Prototipo líquido (SC)

Los resultados obtenidos a partir de la evaluación de la estabilidad en almacenamiento se presentan en la Tabla 18. Se observó que después de tres meses de almacenamiento a una temperatura de 35 °C no hay reducción significativa en la viabilidad (Tukey, $\alpha=0,05\%$), lo que indica que posiblemente la suspensión acuosa a una temperatura de almacenamiento de 4 °C o a temperatura ambiente se mantendrá estable por un tiempo superior a tres meses. Por otra parte, en el tiempo cero no se evidenció contaminación por mohos o levaduras, y después de tres meses de almacenamiento el crecimiento de levaduras y de mohos es inferior a 300 UFC/ml, valor que es adecuado para este tipo de bioproductos.

Tabla 18. Estabilidad en almacenamiento de la suspensión acuosa a base de *Bacillus* sp.Bs06 por tres meses a una temperatura de 35 °C.

Tiempo almacenamiento	Concentración (UFC/ml)	Lote			Coeficiente de variación (%)
		1	2	3	
0	Ingrediente activo	2,25x10 ¹²	4,00x10 ¹²	2,67x10 ¹²	1,02
	Mohos	<10	<10	<10	
	Levaduras	<10	<10	<10	
1 mes	Ingrediente activo	2,40x10 ¹²	4,20x10 ¹²	1,79x10 ¹²	1,50
	Mohos	<10	<10	<10	
	Levaduras	<10	<10	<10	
2 meses	Ingrediente activo	2,40x10 ¹²	4,70x10 ¹²	2,30x10 ¹²	1,36
	Mohos	<10	<10	<10	
	Levaduras	<10	<10	<10	
3 meses	Ingrediente activo	2,60x10 ¹²	4,80x10 ¹²	3,26x10 ¹²	1,08
	Mohos	266	67	166	
	Levaduras	<10	<10	<10	

M: Mohos u hongos filamentosos, L: Levaduras

Estabilidad en almacenamiento de los prototipos seleccionados de *Pseudomonas* sp. Pf014

Los valores de pH iniciales y finales de los preformulados a base de los polioles 2 y 3 no fueron significativamente diferentes entre sí ($p > 0,05$) tanto a 28 ± 2 °C como a 18 ± 2 °C, mientras que para el preformulado a base del poliol 1 se detectaron diferencias significativas a las dos temperaturas entre los valores obtenidos antes y después de los dos meses de almacenamiento (Figura 27).

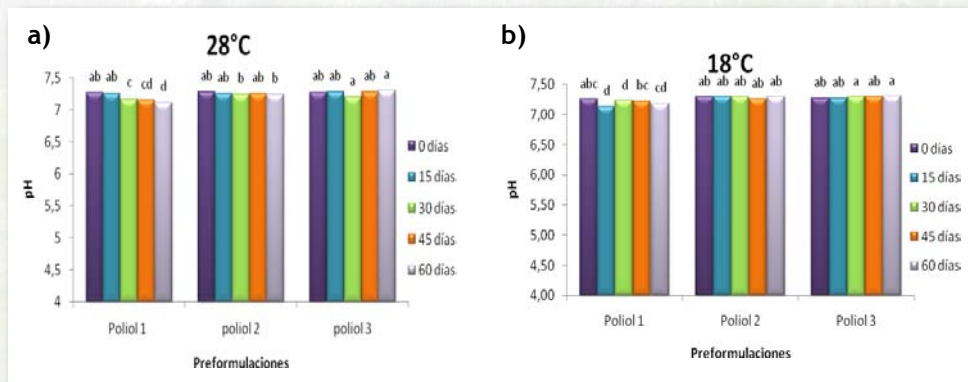
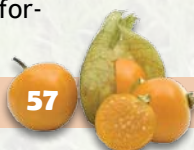


Figura 27. pH de las preformulaciones a base de la biomasa de *Pseudomonas* sp. Pf14 separada del medio de fermentación con polioles al 5% y almacenadas durante dos meses a a) 28 ± 2 °C. b) 18 ± 2 °C. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).

El pH es un parámetro de vital importancia, debido a que los cambios fuertes pueden afectar la estabilidad del principio activo y modificar sus propiedades (Ertola *et al.*, 2011). En el presente trabajo se presentaron valores cercanos a la neutralidad, que aseguran la estabilidad de la bacteria durante el almacenamiento, ya que la literatura reporta que el género *Pseudomonas* sp. presenta una mejor estabilidad a pH neutro (Padan *et al.*, 2005). Además, es necesario tener en cuenta que valores de pH extremos afectan la membrana de las bacterias, el transporte de solutos y ocasionan cambios en el metabolismo, limitando su desarrollo e incluso generando su inhibición, debido a que influye sobre la expresión de genes y la degradación de aminoácidos (Scragg, 1996).

En lo relacionado con la actividad de agua, el análisis de varianza no detectó diferencias significativas ($p > 0,05$) en el A_w de las preformulaciones cuando fueron almacenadas dos meses a 28 ± 2 °C y a 18 ± 2 °C (Figura 28). Sin embargo, en las preformulaciones a base de los polioles 1 y 3 se evidenciaron valores más bajos de A_w (0,902 y 0,908), mientras que en las preformulaciones a base del poliol 2 se encontraron valores superiores (0,922 y 0,926) tanto a 28 ± 2 °C como a 18 ± 2 °C. El menor A_w de las preformulaciones a base de los polioles 1 y 3 posiblemente podría estabilizar más eficientemente al microorganismo con respecto al prototipo con el poliol 2, ya que el A_w es un factor que influye en el crecimiento y la viabilidad de los microorganismos. A valores de A_w bajos, los microorganismos entran en una fase de latencia disminuyendo la velocidad de crecimiento y extendiendo su tiempo de supervivencia (Galván y Beneyto, 2009), lo cual está relacionado con el efecto de los polioles al acumularse intracelularmente. Por ejemplo, Abadías y colaboradores (2001) diseñaron una for-



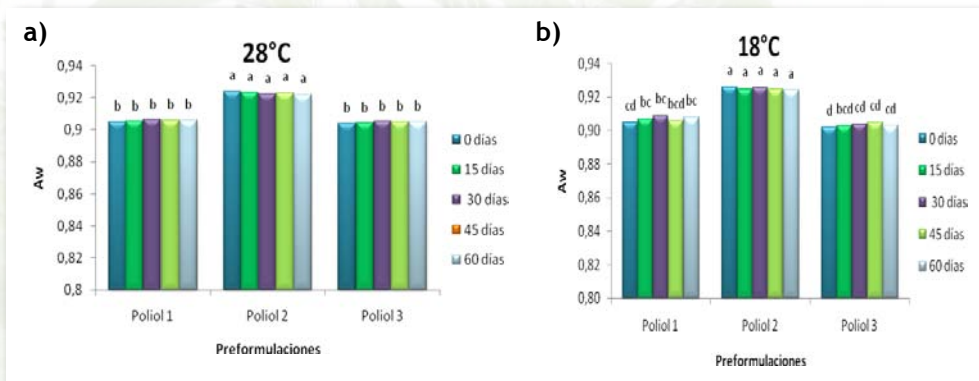


Figura 28. Actividad de agua de las preformulaciones a base de la biomasa de *Pseudomonas* sp. Pf14 separada del medio de fermentación, con polioles al 5% y almacenadas durante dos meses a: a) 28±2 °C. b) 18±2 °C. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).

mulación líquida a base de *Candida sake* y demostraron que al cultivar las células utilizando diferentes polioles, se evidencia una reducción de la actividad de agua de 0,996 hasta 0,960, la cual favoreció el mantenimiento de la viabilidad y la actividad biológica, teniendo mayor resistencia al estrés hídrico. Además, en otros estudios en los cuales se utilizaron polioles en una formulación líquida a base de *Pseudomonas fluorescens* Pf1, se demostró que el glicerol protegió a las células de los efectos de desecación, producidos al disminuir el A_w y permitió mantener la viabilidad durante seis meses (Manikandan *et al.*, 2010).

En cuanto al contenido de contaminantes en las preformulaciones, se observó que a 28±2 °C y a 18±2 °C las bacterias contaminantes fueron inferiores a 10 UFC/ml, mientras que para levaduras se evidenció una disminución durante el almacenamiento hasta alcanzar concentraciones de 10³ UFC/ml. Todos estos valores están dentro de los límites de aceptación establecidos.

En cuanto al contenido inicial de mohos para los preformulados a base del poliol 1 y 2, este fue de 10² UFC/ml y después de dos meses se evidenció un aumento significativo hasta 10⁴ UFC/ml, mientras que para el preformulado a base del poliol 3 la concentración de mohos se mantuvo en el mismo exponente (10² UFC/ml) a 28±2 °C y a 18±2 °C y se observó un leve aumento durante los dos meses de almacenamiento. El contenido de contaminantes de las tres preformulaciones no se redujo significativamente ($p > 0,05$) durante los dos meses para los preformulados a base del poliol 2 tanto a 28±2 °C como a 18±2 °C (Figura 29). La prueba de comparación de medias de Tukey detectó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores obtenidos antes y después de los dos meses de almacenamiento para los preformulados a base del poliol 1 y 3 a las dos temperaturas evaluadas.

En cuanto a la viabilidad se observaron pérdidas tanto a los 18±2 °C como a los 28±2 °C después de 60 días de almacenamiento. A 18±2 °C, la pérdida para los preformulados a base del poliol 1, 2 y 3 fue de 9,84%, 9,26%, 9,49% respectivamente, y no se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los tres tratamientos (Figura 30). Por otra parte, los preformulados almacenados a 28±2 °C presentaron pérdidas del 3,59%, 9,47%, y del 3,98%, en las cuales los prototipos a base del poliol 2 presentaron pérdidas significativamente mayores que los demás, lo cual podría

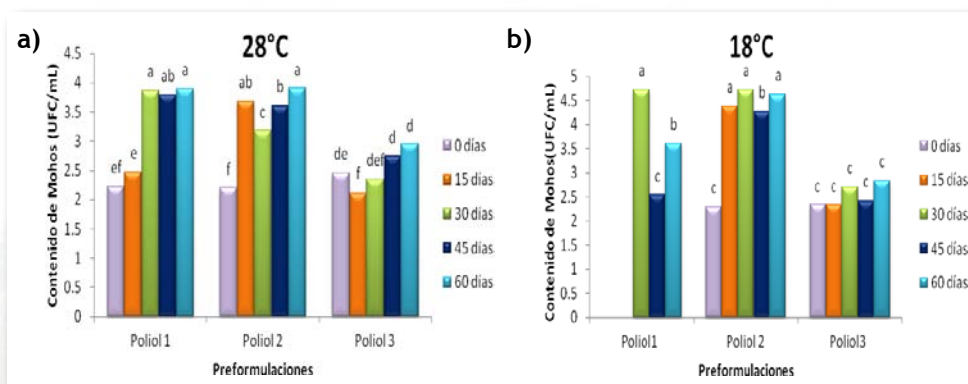


Figura 29. Contenido de mohos (Log UFC/ml) en las preformulaciones a base de la biomasa de *Pseudomonas* sp. Pf14 con polioles al 5% almacenadas durante dos meses a: a) 28±2 °C b) 18±2 °C. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).

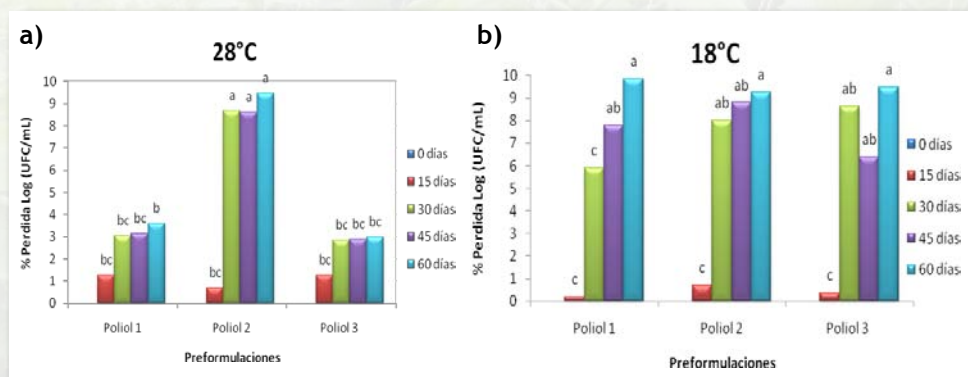


Figura 30. Pérdida de viabilidad de *Pseudomonas* sp. Pf14 en formulaciones líquidas con polioles al 5% durante dos meses de almacenamiento. a) 28±2 °C b) 18±2 °C. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).

estar relacionado con su mayor A_w , que posiblemente permitió que el metabolismo siguiera activo, repercutiendo negativamente en la viabilidad a través del tiempo, mientras que para los otros dos sistemas el bajo A_w posiblemente favoreció que el microorganismo entrara en un estado de latencia.

En términos generales, la A_w , el pH y el contenido de contaminantes de todos los sistemas se encontraron dentro de los rangos aceptables para este tipo de formulación, razón por la cual la selección se realizó con base en la pérdida de viabilidad. A partir de los resultados obtenidos el único sistema inestable fue el poliol 2, por esta razón se seleccionaron las preformulaciones a base del poliol 1 y 3 para continuar con la fase de formulación.

CONCLUSIONES

Se seleccionaron dos prototipos de formulación a base de *Bacillus* sp. Bs06, uno líquido y uno sólido, y dos prototipos de formulación líquida a base de *Pseudomonas* sp. Pf014, los cuales fueron caracterizados microbiológica y fisicoquímicamente. Todos



los prototipos líquidos mantuvieron su viabilidad después de tres meses de almacenamiento, en tanto que el prototipo sólido presentó una reducción de solo 5%.

Se seleccionó la biomasa separada del caldo de fermentación como el principio activo más adecuado para el desarrollo de las preformulaciones de *Pseudomonas* sp. Pf014 por permitir la obtención de productos más concentrados y más estables.

A partir de los resultados de estabilidad obtenidos se pudo evidenciar que los prototipos PS01 y PL3 a base de *Bacillus* sp. Bs006 pueden tener potencial para continuar con su desarrollo, pero es necesario tener en cuenta en estudios posteriores la evaluación de la actividad biológica.

Se seleccionaron las preformulaciones consistentes en biomasa separada del caldo de fermentación con adición de los polioles 1 y 3 al 5% para iniciar la fase de optimización con *Pseudomonas* sp. Pf014, por presentar características adecuadas y ser las más estables durante dos meses de almacenamiento.

LITERATURA CITADA

- Abadias, M.; Teixidó, N.; Usual, J.; Viñas, I.; Magan, N. Improving water stress tolerance of the biocontrol yeast canadian sake grown in molasses based media by physiological manipulation. *Canadian Journal of Microbiology*, 47: 123-128. 2001.
- Agrios, G. *Plant Pathology*. Quinta edición. Editorial Elsevier Academic Press. San Diego, California. 638p. 2005.
- Aulton, M. E. La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas. Segunda edición. Elsevier. Madrid, España. Pp. 208-210. 2004.
- Bandala-Rocha, M. R.; Ramírez, R. C.; Vélez-Ruiz, J. F. Evaluación de coeficientes de fricción en el transporte de fluidos no Newtonianos. *Información tecnológica*. 16: 73-80. 2005.
- Boyetchko, S. M.; Rosskopf, E. N.; Caesar, A. J.; Charudattan, R. Biological weed control with pathogens: search for candidates to applications. In: Khachatourians, G.G., Arora, D.K. (Eds.), *Applied Mycology and Biotechnology Agriculture and Food Production*, vol. 2. Elsevier Sciences, Amsterdam, pp. 239-274. 2002.
- Burges, H. D. In: Burges, H. D. (Ed.), *Formulation of Microbial Biopesticides: Beneficial Microorganisms, Nematodes and Seed Treatments*. Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 1-6. 1998.
- Briggs, J.; Steffe, J. Using Brookfield data and the Mitschka method to evaluate power law foods. *Journal of texture studies*. 28: 517-522. 1997.
- Cely, M. Caracterización de *Pseudomonas fluorescens* Ps013 y estudio de la estabilidad en medios acuosos isotónicos. Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Colombia. 21 p. 2010.
- Costa, E.; Usall, S.; Teixido, N.; Torres, R.; Viñas, I. Effect of package and storage conditions on viability and efficacy of the freeze-dried biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain Cpa-2. *Journal of Applied Microbiology*. 92: 873 - 878. 2002.
- Ertola, R.; Yantorno, O.; Mignone, C. Crecimiento microbiano. Programa Regional de desarrollo científico y tecnológico de la OEA. <http://biología.edu.ar/microind/crecimiento%2520bacteriano.htm>. Consultado el 4 de julio del 2011.

- Galvañ, P.; Beneyto, M. *Curso de manipulador de agua de consumo humano*. Universidad de Alicante. Alicante, España. 96p. 2009.
- Gerhardson, B. Biological substitutes for pesticides. *TRENDS in Biotechnology*. 20 (8): 338–343. 2002.
- Gould, G.; Measures, J. Water relations in single cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 278: 151-166. 1997.
- Hanson, G.; White, H.; Gennaro, A. R. Remington Farmacia. 20ª edición. Lippincott Williams & Wilkins. Traducción de Editorial Médica Panamericana S.A. 2447 p. 2000.
- Helman, J. Farmacotecnia teórica y práctica. Editorial Continental. pp. 1706-1718, 1621-1625. 1982.
- Ibarrola, E. Introducción a los fluidos no newtonianos. Cátedra de mecánica de fluidos. www.itescam.edu.mx. 2011.
- ICA. Productos de bioinsumos registrados. Área agrícola, insumos agrícolas. <http://www.ica.gov.co>. 2011.
- Jenkins, N.; Grzywacz, D. Quality control of fungal and viral biocontrol agents -assurance of product performance. *Biocontrol science and technology*. 10(6): 753-777. 2000.
- Junge, H.; Krebs, B.; Kilian, M. Strain selection, production, and formulation of the biological plant vitality enhancing agent FZB24® *Bacillus subtilis*. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*. 1/00, 1: 94-104. 2000.
- Kamal, M.; Elyousr, A.; Hendawy, E. Integration of *Pseudomonas fluorescens* and acibenzolar-S-methyl to control bacterial spot disease of tomato. *Crop protection*. 27, 1118-1124. 2008.
- Manikandan, R.; Saravanakumar, D.; Rajendra, L.; Raguchander, T.; Samiyappan, R. Standarization of liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* PF1 for its efficacy against *Fusarium* wilt of tomato. *Biological Control*. 54: 83-89. 2010.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Anuario Estadístico de frutas y hortalizas 2004-2008 y sus calendarios de siembras y cosechas. [http://www.agront.gov.co/www/docs_agronet/20101715620_AnuarioEstadicofrutasyhortalizas 2004 - 2008. pdf](http://www.agront.gov.co/www/docs_agronet/20101715620_AnuarioEstadicofrutasyhortalizas%202004%20-%202008.pdf). Consultado el 24 de abril de 2011.
- Nakkeeran, S.; Fernando, D.; Siddiqui, A. Plant growth promoting rhizobacteria formulations and its scope in commercialization and the management of pests and diseases. *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Editado por Zaqui Siddiqui. Springer. 257-258. 2006.
- Schisler, D. A.; Slininger, P. J.; Behle, R. W.; Jackson, M. A. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. Symposium: The Nature and Application of Biocontrol Microbes: *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94 (11): 1267 – 1271. 2004.
- Stark, J.; Banks, J. Estimating susceptibility of biological control agents to pesticides: influence of life history strategies and population structure. *Biological Control*. 29: 392-398. 2004.
- Scragg, A. *Biotecnología para Ingenieros: Sistemas Biológicos en procesos tecnológicos*. Editorial Limusa. México, Ciudad de México. 415p. 1996.
- Padan, E.; Bibi, E.; Lto, M.; Krulwich, T. Alkaline pH homeostasis in bacteria: New insights. *Biochimica et Biophysica Acta*. 17 (17): 67 -68. 2005.
- Whipps, J. M.; Lumsden, R. D. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. In: Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (Eds.), *Fungi as Biocontrol agents. Progress, Problems and Potential*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 9–22. 2001.



7 Evaluaciones en invernadero y selección de prototipos a base de rizobacterias

Jimmy Zapata, Andrés Díaz

Investigadores Laboratorio de Control Biológico

Centro de Biotecnología y Bioindustria - CBB

Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - Corpoica.

E-mail: adiaz@corpoica.org.co

RESUMEN

En este caso se evaluó el efecto de promoción de crecimiento y de control biológico de *F. oxysporum* de tres prototipos de formulación a base de dos rizobacterias (*Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp.) que demostraron ser promisorias para la promoción de crecimiento y control de *F. oxysporum* en uchuva. Adicionalmente, estos prototipos se evaluaron frente a un producto biológico comercial existente, denominado Rhap-sody® a base de *Bacillus subtilis*, que ha sido recomendado para el control biológico de diversos hongos patógenos.

INTRODUCCIÓN

Es bien sabido que *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* sp. son los géneros de bacterias más abundantes en la rizosfera y que presentan actividad de promoción del crecimiento vegetal, ya que pueden proporcionar a la planta formas solubles de fósforo y hierro y estimular el crecimiento mediante la producción de fitohormonas como las auxinas, las giberelinas y citoquininas, que estimulan la germinación de las semillas, la proliferación del sistema radical y el crecimiento de la parte aérea de la planta (Lugtenberg y Kamilova, 2009; Saharan y Nehra, 2011). Teniendo esto en cuenta y aunque para las rizobacterias evaluadas en este proyecto no se ha demostrado la producción de fitohormonas, se evaluó el efecto de los prototipos a base de dichas rizobacterias sobre la emergencia de plántulas, el crecimiento del sistema radical y de la parte aérea de plántulas, y la eficiencia en el control de *F. oxysporum*.

Sin embargo, antes de llevar un prototipo de bioplaguicida a campo se requiere demostrar en condiciones semi-controladas la eficacia del mismo. Para esto es necesario desarrollar y estandarizar técnicas o bioensayos que permitan, en un

período de tiempo relativamente corto, observar los síntomas y signos que causa un hongo patógeno bajo condiciones semi-controladas, generalmente en invernadero. Este tipo de metodologías permiten de esta manera tener un criterio biológico y agronómico sólido para seleccionar potenciales prototipos de formulación que no afecten la actividad de promoción de crecimiento o biocontroladora del microorganismo de interés.

MATERIALES Y MÉTODOS

Efecto de los prototipos de formulación a base de rizobacterias sobre el crecimiento de plántulas de uchuva en invernadero

Esta prueba se desarrolló en semilleros con sustrato constituido por suelo agrícola y cascarilla de arroz en proporción 2:1 (v/v). Las semillas de uchuva fueron sumergidas durante 10 minutos en suspensiones ajustadas a 1×10^9 células/ml de los prototipos de formulación seleccionados, es decir, el prototipo en polvo a base de *Bacillus* sp. Bs006 (código P1) que se recodificó como PWPBs006, el prototipo líquido concentrado a base de *Bacillus* sp. Bs006 (código P2A) que se recodificó como PCABs006 y el prototipo líquido a base de *Pseudomonas* sp. Pf14 (código P2) que se recodificó como PIPf014.

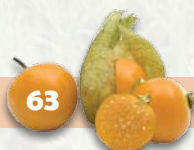
Adicionalmente, se incluyeron en el ensayo los tratamientos con las dos rizobacterias individuales sin formular a una concentración de 1×10^9 células/ml, un testigo bioplaguicida comercial a base de *Bacillus subtilis* (Rhapsody®) que fue utilizado en la misma concentración que los prototipos de formulación y un testigo absoluto en el que no se realizó ninguna aplicación. El bioensayo se estableció bajo un diseño de bloques completos al azar en bandejas de siembra de 50 alvéolos donde la unidad experimental constó de una planta; el montaje se realizó por triplicado.

El riego a los semilleros se realizó diariamente y cada 15 días se aplicó al sustrato un refuerzo de cada uno de los prototipos, rizobacterias y el bioplaguicida comercial a una concentración de 1×10^9 células/ml.

Las variables evaluadas fueron la emergencia de las plántulas, el peso fresco y seco de la raíz y de la parte foliar de las plantas y el área foliar de las mismas. Los resultados obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza y comparación de medias usando el test Tukey con $\alpha=0,95$.

Efecto de los prototipos de formulación a base de rizobacterias sobre la protección de plántulas de uchuva contra *F. oxysporum*

La producción del inóculo de *F. oxysporum* se realizó en erlenmeyers de 250 ml con 100 ml de caldo caseína hidrolizada que se inocularon con cuadros de 1 cm^2 del hongo crecido en agar PDA durante 15 días. Los erlenmeyers se incubaron a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y 120 rpm durante 6 días; pasado este tiempo el medio se centrifugó a 5000 rpm durante 20 minutos. Posteriormente se descartó el sobrenadante, mientras que la biomasa se lavó y filtró con velo suizo para obtener así las microconidias purificadas.



Una vez se contó con plántulas de un tamaño entre 5 cm y 10 cm para cada tratamiento se realizó el trasplante a vasos plásticos de 6 onzas con el sustrato de siembra (mezcla de suelo, turba y cascarilla en proporción 2:1:1) inoculado mediante aspersión con una suspensión de microconidios de *F. oxysporum*, hasta alcanzar una concentración final teórica del sustrato de 1×10^4 microconidios/g. Se contó con un testigo absoluto y un testigo patógeno en el que no se aplicó ningún agente biocontrolador. El bioensayo se realizó bajo un diseño de bloques completos al azar donde la unidad experimental constó de 15 plantas con tres repeticiones.

El riego a los semilleros se realizó diariamente y cada 15 días se aplicó al sustrato un refuerzo de cada uno de los prototipos, rizobacterias y el bioplaguicida a una concentración de 1×10^9 células/ml.

La variable de respuesta evaluada fue la incidencia de la enfermedad, expresada como el número de individuos afectados por *F. oxysporum* por tratamiento sobre el número total de individuos por tratamiento. Los resultados obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza y comparación de medias usando la prueba de Tukey con $\alpha=0,95$.

RESULTADOS

A diferencia del testigo absoluto, todos los tratamientos presentaron una emergencia de plántulas superior al 90%, siendo los tratamientos correspondientes a la rizobacteria Bs006 sin formular y el bioplaguicida Rhapsody® los que mayor porcentaje de emergencia presentaron con un 94%, en tanto que los demás tratamientos presentaron un 92% después de 22 días de la siembra (Figura 31).

Con respecto a la velocidad de emergencia, se encontró que las semillas germinaron entre los días 12 y 22 después de la siembra, siendo los días 15, 16 y 17 en los que se observó el mayor número de semillas germinadas.

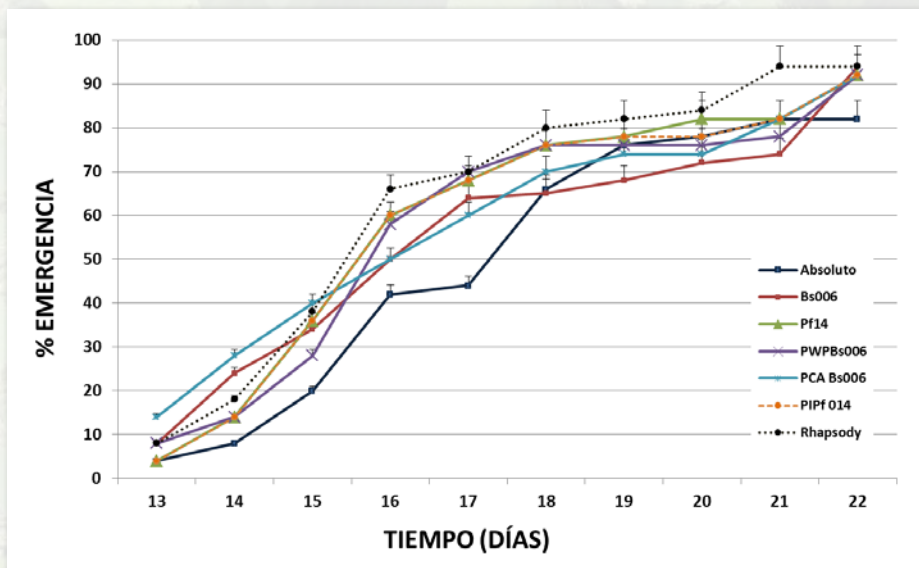


Figura 31. Emergencia de plántulas de uchuva después de 22 días de la siembra de las semillas.

Con respecto al crecimiento de las plantas, particularmente el efecto sobre el sistema radical, las plantas correspondientes al semillero tratado con la rizobacteria Bs006 sin formular presentaron el mayor crecimiento radical, ya que al realizar las mediciones y el análisis de la variable peso fresco y seco de la raíz, estas presentaron en promedio un peso fresco de 0,38 g y un peso seco de 0,07 g presentando diferencias significativas con respecto a los prototipos de formulación (Figura 32). A este tratamiento le siguió el semillero tratado con el bioplaguicida comercial y la rizobacteria Pf014, cuyas plantas presentaron en promedio un peso fresco del sistema radical entre 0,25 g y 0,30 g y un peso seco entre 0,05 g y 0,06 g (Figura 32).

De otra parte, entre los tres prototipos de formulación no se encontraron diferencias significativas pero sí diferencias numéricas, al igual que con el testigo absoluto cuyo peso promedio del sistema radical fue mayor con respecto a estos (Figuras 32 y 33).

En la Figura 33 se observan las diferencias cualitativas visuales existentes en el sistema radical entre los tratamientos con rizobacterias sin formular y formuladas como prototipos de bioplaguicida.

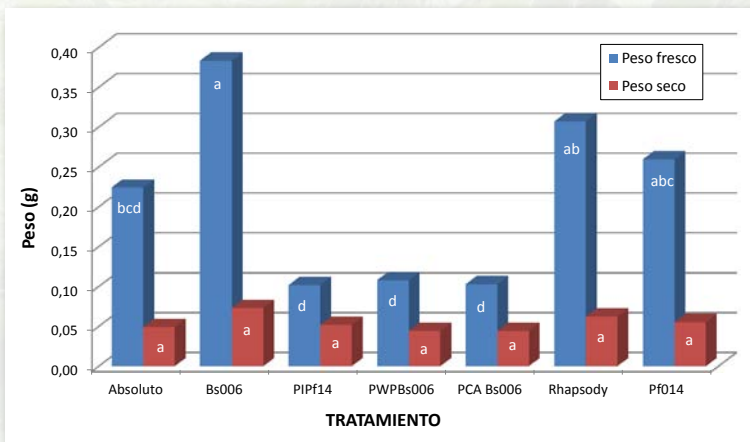


Figura 32. Peso fresco y peso seco para el sistema radical de las plántulas de uchuva tratadas con las rizobacterias *Bacillus* sp. Bs006, *Pseudomonas* sp. Pf014 y sus prototipos de formulación. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha=0,95\%$).

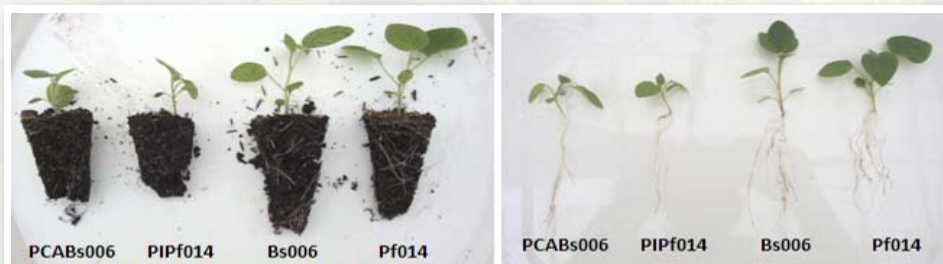


Figura 33. Sistema radical de las plántulas de uchuva tratadas con las rizobacterias *Bacillus* sp. Bs006, *Pseudomonas* sp. Pf014 y sus prototipos de formulación después de 30 días de la siembra. PCABs006 es el prototipo de formulación de *Bacillus* sp. Bs006, P1Pf014 es el prototipo de formulación de *Pseudomonas* sp. Pf014, Bs006 es la rizobacteria *Bacillus* sp. Bs006 sin formular, Pf014 es la rizobacteria *Pseudomonas* sp. Pf014 sin formular.

En cuanto al efecto sobre el crecimiento foliar, nuevamente el tratamiento correspondiente a la rizobacteria Bs006 sin formular presentó las plantas con el mayor crecimiento, con un peso fresco promedio de 1,07 g y un peso seco de 0,17 g, presentando diferencias significativas para el peso fresco con respecto a los prototipos de formulación a base de esta bacteria (Figura 34). Al igual que para el sistema radical, el semillero tratado con el bioplaguicida comercial presentó las plantas con el segundo mejor crecimiento con un peso fresco promedio de 0,85 g y un peso seco de 0,17 g (Figura 37).

De otra parte, el prototipo de formulación a base de la bacteria Pf014 y esta bacteria aplicada sin formular mostraron el mismo comportamiento, encontrando diferencias numéricas con los prototipos de formulación a base de *Bacillus* sp. Bs006; sin embargo, las plantas del testigo absoluto presentaron un crecimiento mayor al obtenido en los semilleros tratados con los prototipos (Figuras 34 y 35).

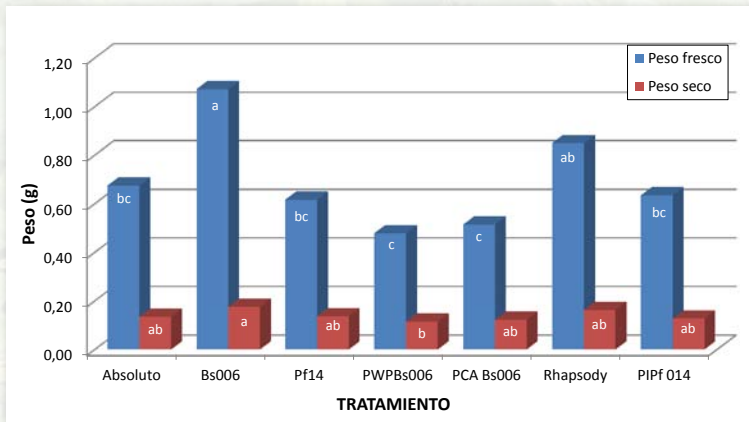


Figura 34. Peso fresco y peso seco foliar de las plántulas de uchuva tratadas con las rizobacterias *Bacillus* sp. Bs006, *Pseudomonas* sp. Pf014 y sus prototipos de formulación. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha=0,95\%$).

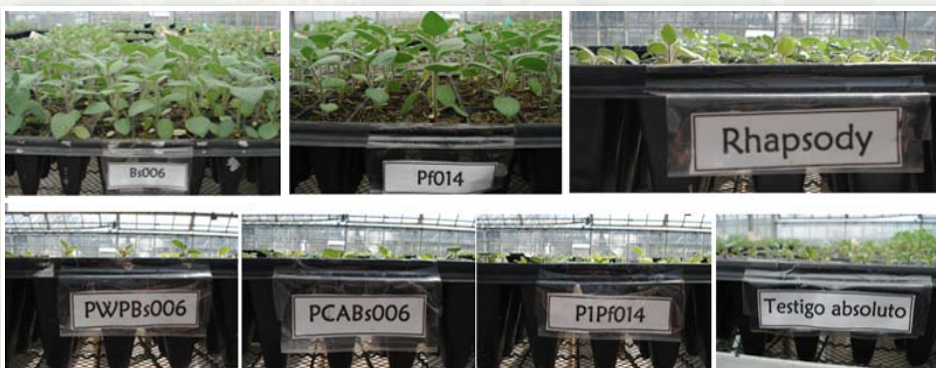


Figura 35. Plántulas de uchuva tratadas con las rizobacterias *Bacillus* sp., Bs006, *Pseudomonas* sp., Pf014 y sus prototipos de formulación después de 45 días de la siembra. PCABs006 es el prototipo de formulación de *Bacillus* sp. Bs006, PIPf014 es el prototipo de formulación de *Pseudomonas* sp. Pf014, Bs006 es la rizobacteria *Bacillus* sp. Bs006 sin formular, Pf014 es la rizobacteria *Pseudomonas* sp. Pf014 sin formular, Bs006PW: prototipo sólido de *Bacillus* sp., Rhapsody®: bioproducto comercial.

En la Figura 35 se evidencia la promoción cualitativa del crecimiento medida como área foliar en plántulas de uchuva debida a la aplicación de las rizobacterias sin formular y la aplicación del bioplaguicida comercial. En contraste, los tratamientos con los prototipos de formulación y el testigo presentan menor altura y densidad de área de las hojas.

Al realizar el análisis del área foliar de las plántulas antes del trasplante se observó que los tratamientos con las rizobacterias sin formular y el bioplaguicida comercial, presentaron mejor comportamiento que el testigo absoluto (Figura 36). Para el caso de *Bacillus* sp. Bs006, el área foliar fue un 55% superior al testigo absoluto, con Rhapsody® este valor fue de 38% y con la rizobacteria *Pseudomonas* sp. Pf14 fue de 10%. En contraste, los prototipos de formulación de *Bacillus* sp. presentaron un efecto negativo con respecto al testigo entre el 11% y 16%, mientras que el prototipo a base de *Pseudomonas* sp. no mostró ningún efecto. Cuando se llevó a cabo un análisis estadístico de comparación de medias aplicando la técnica de Tukey ($\alpha=0,95$), se determinó que el tratamiento con *Bacillus* sp. sin formular fue significativamente diferente al testigo absoluto y a los prototipos de formulación de la rizobacteria en mención. De otro lado, todos los tratamientos que involucraban la bacteria *Pseudomonas* sp. no presentaron diferencias significativas con el testigo absoluto o con el producto Rhapsody®. Como era de esperarse, estos resultados fueron directamente proporcionales a los obtenidos en las evaluaciones de peso seco y fresco del sistema aéreo.

A la luz de estos resultados se recomendaría el uso de las rizobacterias sin formular; sin embargo, esta opción es tecnológicamente poco viable, ya que implicaría tener siempre un stock fresco de la rizobacteria que no presentaría buena capacidad de supervivencia en almacenamiento. Además, en ausencia de un sistema de formulación la biomasa bacteriana estaría sometida a muchos factores de inestabilidad fisicoquímicos y ambientales, que disminuirían su eficacia en condiciones de campo.

Los síntomas de marchitamiento vascular (aclaramiento de las nervaduras de los folíolos, epinastia y marchitamiento de las hojas inferiores y un ligero color pardo a lo largo del tallo) se presentaron una semana después del trasplante. Después de 20 días de evaluación, el testigo patógeno presentó una incidencia del marchitamiento vascular del 100% (Figura 37).

Las plantas correspondientes a los tratamientos con las bacterias sin formular presentaron la menor incidencia del marchitamiento vascular, *Bacillus* sp. Bs006 con 46% y *Pseudomonas* sp. Pf014 con 53%. De otra parte, con el bioplaguicida comercial la enfermedad presentó una incidencia de 60%, presentando diferencias numéricas con respecto a las bacterias sin formular (Figura 38).

Con respecto a los prototipos de formulación, estos presentaron una incidencia entre 80% y 93%, siendo la menor para el prototipo PWPBs006. Estos tratamientos presentaron el menor control del patógeno y se encontraron diferencias significativas con las bacterias sin formular (Figura 38).

Al igual que con la actividad sobre el crecimiento vegetal, nuevamente las bacterias sin formular presentaron el mejor comportamiento. En estudios realizados por Caviedes (2010) se observó que estas bacterias inhibieron el crecimiento *in vitro* de *F. oxysporum* en un 63%, observando rompimiento y vacuolización del micelio, así como reducción en la producción de macro y microconidias.



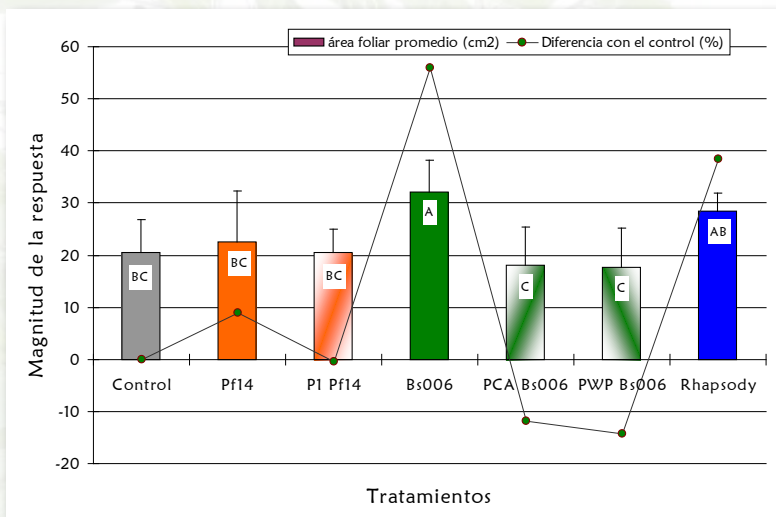


Figura 36. Área foliar de plántulas de uchuva evaluadas en invernadero usando prototipos de formulación de rizobacterias. Bs006PW: prototipo sólido de *Bacillus* sp., Bs006SC prototipo líquido de *Bacillus* sp., Rhapsody®: bioproducto comercial, Pf014SC: prototipo líquido de *Pseudomonas* sp. Las barras representan la desviación estándar por tratamiento. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha=0,95\%$).

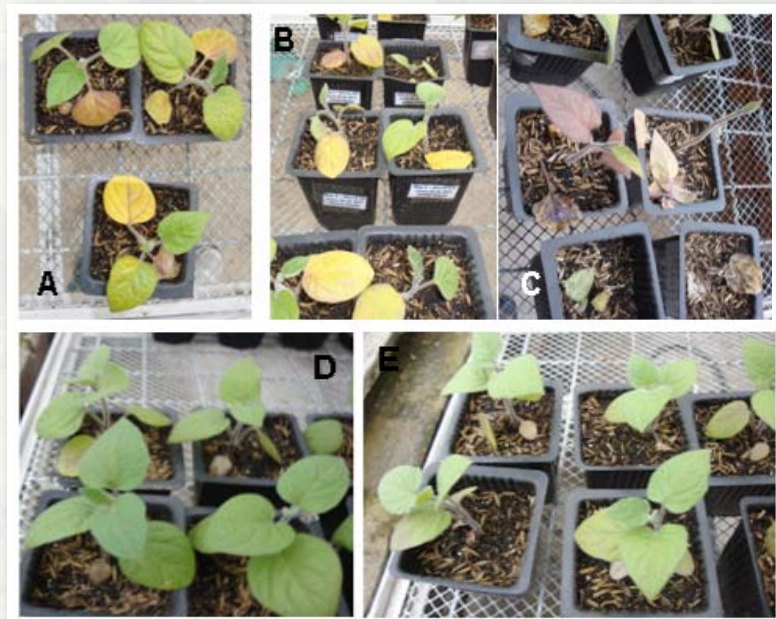


Figura 37. Desarrollo de la enfermedad de marchitamiento vascular en plantas de uchuva en invernadero. A. Plantas del testigo patógeno. B. Plantas correspondientes al prototipo P1Pf014 15 días después del trasplante. C. Plantas muertas después de 20 días para el tratamiento P1Pf014. D. Plantas del testigo absoluto. E. Plantas del tratamiento Bs006 20 días después del trasplante.

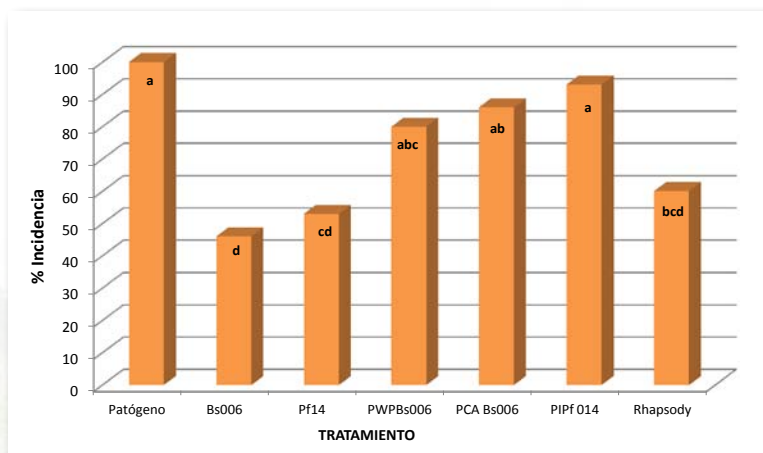


Figura 38. Incidencia del marchitamiento vascular en plantas de uchuva 30 días después del trasplante en invernadero. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha=0,95\%$).

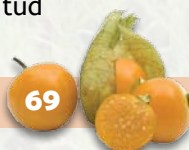
La inhibición de *F. oxysporum* por estas rizobacterias podría relacionarse con la producción de metabolitos secundarios, ya que durante el desarrollo de estos bioensayos tanto el hongo como las bacterias nunca estuvieron en contacto. Estos metabolitos pueden estar asociados a la producción de enzimas líticas como la β -1,3-glucanasa o antibióticos con actividad antifúngica como la cianida de hidrógeno, oomycina, fenazina, pirrolnitrina, pioluteorina, tensin, tropolona, iturin A, surfactin y 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), o por la producción de enzimas líticas como la β -1,3-glucanasa, que destruye la pared celular de hongos como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotim rolfsii* y *Pythium ultimum* (Fridlender *et al.*, 1993; Compant *et al.*, 2005).

CONCLUSIONES

Desde el punto de vista de promoción de crecimiento, sin duda las rizobacterias presentaron un efecto positivo que fue afectado significativamente por la adición de los excipientes de formulación. Independientemente del resultado obtenido en esta evaluación, se requiere de experimentación posterior para alcanzar un prototipo de formulación óptimo que sea inerte y no afecte las características de promoción de crecimiento de las rizobacterias.

En condiciones de invernadero los prototipos de rizobacterias presentaron características promisorias, ya que aumentaron la germinación de semillas de uchuva hasta alcanzar porcentajes superiores al 90% en 5 días menos que el tratamiento convencional, promovieron el crecimiento vegetal aumentando en 50% el peso seco de la raíz de las plántulas y en 100% el peso seco foliar con respecto al control, lo cual contribuyó a obtener plántulas con más vigor para ser trasplantadas a campo.

Con respecto a su actividad biocontroladora, los prototipos redujeron la incidencia de la enfermedad causada por *F. oxysporum*, aunque la magnitud



de la reducción no superó el 25%. Estos resultados son interesantes, ya que las condiciones del bioensayo fueron extremas y se debe tener en cuenta la magnitud del problema que representa el patógeno evaluado; por esta razón los resultados fueron validados en campo.

LITERATURA CITADA

- Caviedes, D. Aislamiento y selección de *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp., promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de uchuva (*Physalis peruviana* L.) con actividad antagónica frente a *Fusarium oxysporum*. Trabajo de grado. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. 38p. 2010.
- Compant, S.; Duffy, B.; Nowak, J.; Clément, C.; Barka, E. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 9: 4951–4959. 2005.
- Fridlender, M.; Inbar, J.; Chet, I. Biological control of soilborne plant pathogens by a β -1,3-glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biology and Biochemistry*. 25:1211–1221. 1993.
- Lugtenberg, B.; Kamilova, F. Plant growth promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*. 63: 541-56. 2009.
- Saharan, B. S.; Nehra, V. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research*. Volume 2011. 2011.

8

Avances en el control biológico de *F. oxysporum*

Andrés Díaz¹, Alex Smith¹, Paula Mesa¹, Jimmy Zapata¹

¹ Investigadores Laboratorio de Control Biológico
Centro de Biotecnología y Bioindustria - CBB

Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - Corpoica.
E-mail: adiaz@corpoica.org.co

RESUMEN

A partir de los trabajos desarrollados en el marco de este proyecto, que incluyeron dos trabajos de pregrado (Caviedes, 2010; Guacaneme, 2010), se seleccionaron aislamientos de rizobacterias con efectos positivos tanto sobre la promoción del crecimiento vegetal como para el control del marchitamiento vascular en uchuva en laboratorio e invernadero. Estas fueron aplicadas posteriormente en campo y se demostró que aumentaron la productividad del cultivo.

INTRODUCCIÓN

Como un primer avance hacia el control biológico de *F. oxysporum* se evaluaron en condiciones de campo los prototipos de formulación a base de rizobacterias que demostraron, a través de todos los bioensayos *in vitro* y en invernadero, un efecto significativo sobre parámetros de crecimiento vegetal y capacidad biocontroladora de *F. oxysporum* en uchuva. Adicionalmente, otro criterio de selección aplicado fue el potencial tecnológico de cada uno de los prototipos, expresado como la viabilidad técnica y económica para llevar a cabo los procesos de producción por fermentación y formulación; este criterio fue evaluado por expertos en cada tema específico. Una vez analizados todos estos aspectos, se evaluaron en campo un prototipo líquido para *Pseudomonas* sp. Pf14 y un prototipo líquido concentrado para *Bacillus* sp. Bs006 de forma individual, en conjunto con dos testigos biológicos (Tricotec® y Rhapsody®), un testigo agricultor con el manejo convencional y un testigo absoluto en el que no se aplicó ningún producto específico para el control de *F. oxysporum*.

Dado que no se contaba con información previa acerca de las condiciones de manejo agronómico, formas y frecuencias de aplicación de bioproductos en uchuva, fue necesario tomar como línea base la información provista por el agricultor y aquella generada previamente en otro modelo como tomate.



MATERIALES Y MÉTODOS

Producción de plántulas para siembra en campo

Con el fin de contar con plántulas con características adecuadas para la siembra en el municipio de Granada, Cundinamarca, se llevó a cabo el montaje en invernadero de seis tratamientos que consistieron en: prototipo líquido de rizobacteria *Pseudomonas* sp. Pf14 codificado como PIPf14, prototipo líquido concentrado de rizobacteria *Bacillus* sp. Bs006 codificado como PCABs006, producto biológico Tricotec® a base de *Trichoderma koningiopsis*, producto biológico Rhapsody® a base de *Bacillus subtilis*, tratamiento químico aplicando productos convencionales usados por plantuladores de uchuva y un tratamiento control absoluto.

Las plántulas se ubicaron en un invernadero previamente adecuado que se encuentra anexo al Laboratorio de Control Biológico de Corpoica, CBB, y fueron trasplantadas a bolsas plásticas de 700 gramos para, un mes después, transportarlas al sitios de siembra.

Eficacia biocontroladora de los prototipos basados en las rizobacterias seleccionadas y de *Trichoderma koningiopsis* Th003 contra el marchitamiento vascular, causado por *F. oxysporum* en condiciones comerciales de cultivo

Se escogió una finca de producción comercial en el municipio de Granada, Cundinamarca, con antecedentes de presencia de marchitamiento vascular. El área experimental fue de 900 m² y la producción de plántulas se hizo en semilleros siguiendo los procedimientos mencionados anteriormente y utilizando los prototipos de producto seleccionados en etapas previas.

En la Tabla 19 se describen los tratamientos evaluados. La frecuencia de aplicación de los productos a base de las cepas *Bacillus* sp. Bs006, *Pseudomonas* spp. Pf014 y *Trichoderma koningiopsis* Th003 consistió en aplicaciones desde semillero al momento de la siembra, y posteriormente cada 15 días hasta los 45 días después de la siembra. En campo las aplicaciones de las cepas en mención fueron realizadas en drench: al trasplante, cada 15 días después del trasplante (ddt) hasta los 60 ddt; posteriormente se hicieron seis aplicaciones mensuales (Tabla 20).

Tabla 19. Descripción de tratamientos evaluados en campo para el control de *F. oxysporum*.

No.	Producto	Dosis
1	<i>Bacillus</i> sp. Bs006 (PCABs006)	1x10 ⁹ células/ml
2	<i>Pseudomonas</i> sp. Pf014 (PIPf14)	1x10 ⁹ células/ml
3	<i>Trichoderma koningiopsis</i> Th003 WP	1x10 ⁶ conidios/ml
4	Testigo comercial biológico: Rhapsody® 1,34 SC (<i>B. subtilis</i>)	1x10 ⁹ células/ml
5	Testigo agricultor: Productos aplicados por el agricultor*.	2,5 cm ³ /L
6	Testigo absoluto	No se aplica producto

* Los productos aplicados fueron: i.a. Polietoxi etanol aplicado inmediatamente después del trasplante, posteriormente se aplicó el i.a. Folpet (2,5 g.l⁻¹) cada 20 días y después de seis meses (iniciada la cosecha) aplicación en drench del i.a. Carbendazim + Carboxim-Thiram desde el inicio de cosecha en frecuencias quincenales.

Las aplicaciones del tratamiento testigo comercial biológico Rhapsody® se hicieron en frecuencias de aplicación similares a lo descrito. Las aplicaciones del testigo agricultor se realizaron según criterio del productor. En el testigo absoluto no se aplicó ningún producto para el control del marchitamiento vascular de la uchuva.

Tabla 20. Cronograma de aplicaciones de bioproductos en semillero y campo para el control de *F. oxysporum*.

No.	Actividad	Etapa	Días ¹
1	Siembra de semillero y aplicación 1	Semillero	0
2	Aplicación 2	Semillero	15
3	Aplicación 3	Semillero	30
4	Aplicación 4	Semillero	45
5	Trasplante y aplicación 5	Campo	75
6	Aplicación 6	Campo	89
7	Aplicación 7	Campo	103
8	Aplicación 8	Campo	117
9	Aplicación 9	Campo	131
10	Aplicación 10	Campo	159
11	Aplicación 11	Campo	194
12	Aplicación 12	Campo	222
13	Aplicación 13	Campo	250
14	Aplicación 14	Campo	285

¹Días después de la siembra en semillero y días después del trasplante en campo.

Manejo agronómico del cultivo

Antes del establecimiento del cultivo y después del arado de rastrillo con tractor se tomaron muestras de suelo para análisis físico-químico de macro y microelementos.

Para el control de plagas se aplicaron insecticidas principalmente para el control de *Epitrix* sp. o pulgulla.

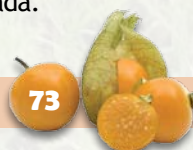
El riego se instaló por aspersión durante los períodos cálidos y el control de arvenses se efectuó manualmente.

Diseño experimental

El experimento se estableció en un área de 900 m², en la cual se evaluaron los tratamientos presentados en la Tabla 34. El diseño experimental correspondió a un diseño de bloques completamente aleatorizados, con cuatro repeticiones. La unidad experimental fueron dos surcos compuestos de cinco plantas cada uno.

Promoción del crecimiento vegetal

Cada 15 días se evaluaron las siguientes variables fisiológicas de las plantas: altura, grosor del tallo, número de ramas y número de botones florales cerrados en una rama marcada.



Control del marchitamiento vascular

A partir de la aparición de los síntomas característicos del marchitamiento vascular en plantas de uchuva, se registró quincenalmente la incidencia de la enfermedad, la cual se midió como el número de plantas con la sintomatología de la enfermedad por tratamiento sobre el total de plantas por tratamiento y se expresó como porcentaje. La severidad se evaluó según la escala de severidad (Figura 42) desarrollada por Sánchez & Forero (2009) y se registró para todas las plantas por tratamiento. Al final se expresó como:

$$\text{Severidad (\%)} = 100 \times [(0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4 + 5n_5) / 5N]$$

Donde: n_i representa el número de plantas enfermas por nivel de severidad y N el número total de plantas (Zhang *et al.*, 1996).

Rendimiento del cultivo

En cada unidad experimental se cosecharon los frutos óptimos, contabilizando el número de frutos producidos en cada planta y registrando el peso de los mismos.

Análisis estadístico

Con los valores promedio de incidencia, severidad y rendimiento del cultivo se hizo un análisis de varianza y comparación de medias LSD ($\alpha=0,95$). Todos los análisis se realizaron usando el programa estadístico SAS versión 9.0.

RESULTADOS

Producción de plántulas para siembra en campo

Como se observa en la Figura 39, desde etapas tempranas de siembra en semilleros tipo alvéolo se presentaron diferencias en características fenotípicas de las plántulas de uchuva. Con los tratamientos usando rizobacterias se observó un incremento en altura, área foliar y número de hojas en comparación con el testigo, tal como se había demostrado en evaluaciones anteriores. Adicionalmente, la velocidad de emergencia fue mayor y el tiempo de emergencia fue menor en los tratamientos con rizobacterias.

En las plántulas trasplantadas a bolsas de 700 gramos con suelo con el fin de permitir una mejor expansión y crecimiento del sistema radical de las plantas, también se observó el fenómeno descrito anteriormente reflejado en plántulas de mayor tamaño, área foliar y número de hojas en los tratamientos con rizobacterias en comparación con los tratamientos con *Trichoderma koningiopsis* y el testigo después de 9 semanas de la siembra (Figura 40).

Al final las plántulas se trasladaron a la finca del agricultor con una semana de antelación para dar inicio a un período de adaptación bajo las condiciones medioambientales del sitio antes de ser sembradas.



Tratamiento *Pseudomonas* sp. Pf014



Tratamiento *Bacillus* sp. Bs006



Tratamiento Tricotec



Tratamiento testigo

Figura 39. Vista general de los tratamientos a evaluar en campo en fase de semillero tipo alvéolo. Tiempo desde la siembra: 5 semanas.



Tratamiento *Pseudomonas* sp. Pf014



Tratamiento *Bacillus* sp. Bs006



Tratamiento *Trichoderma koningiopsis* Th 003



Tratamiento testigo

Figura 40. Vista general de los tratamientos a evaluar en campo en fase de semillero en bolsa plástica. Tiempo desde la siembra: 9 semanas.



Efecto promotor de crecimiento vegetal en plantas de uchuva

Con la aplicación de las rizobacterias la altura de las plantas fue mayor frente a los restantes tratamientos, presentando diferencias estadísticamente significativas en el transcurso del ensayo (Figura 41). Lo anterior sugiere que probablemente se alcanzó un establecimiento de la población de rizobacterias en la rizosfera por las aplicaciones realizadas en el tiempo.

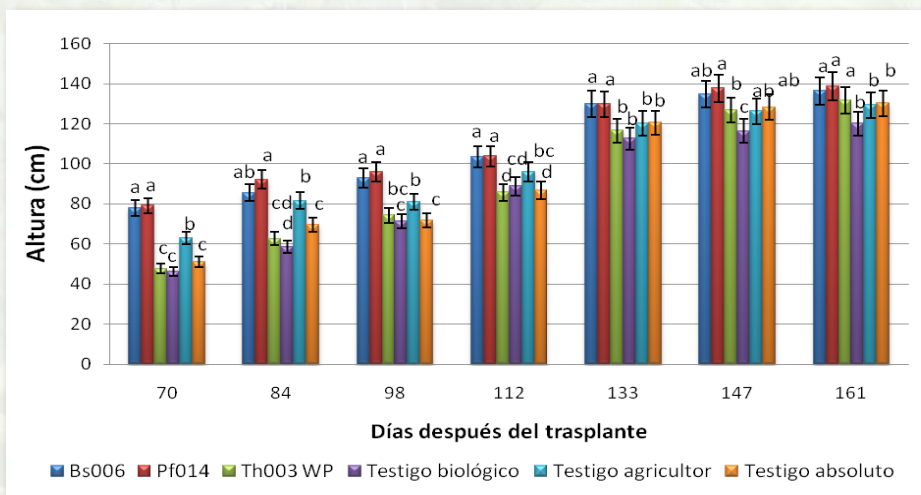


Figura 41. Altura de plantas de uchuva durante el experimento en campo de evaluación de prototipos de rizobacterias para el control de la enfermedad causada por *F. oxysporum*. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes. Las barras verticales indican desviación estándar.

De otro lado, se apreció que el testigo biológico Rhapsody® y Th003 no tuvieron un efecto promotor de crecimiento en las plantas de uchuva, encontrándose plantas con mayor altura en el testigo absoluto. En cuanto al testigo agricultor, se encuentra como el tercer mejor tratamiento, lo que indicó un buen plan de fertilización química por parte del agricultor, mas no necesariamente un mejor efecto en comparación con las rizobacterias.

Rendimiento del cultivo

La aplicación del prototipo de *Bacillus* sp. Bs006 incrementó significativamente el rendimiento y el número de frutos de uchuva frente a los restantes tratamientos. No obstante, la aplicación del prototipo de *Pseudomonas* sp. Pf014 y los productos aplicados en el testigo agricultor presentaron valores de producción muy superiores frente a los tratamientos Rhapsody®, Tricotec® y absoluto, sin alcanzar diferencias estadísticas significativas (Figuras 42 y 43). De otro lado, se observó que la mayoría de los frutos presentaron una alta calidad sanitaria (datos no mostrados), con presencia de manchas superficiales en la cáscara o capuchón menores al 5% del área, lo que los clasifica en la categoría extra, que es factible de exportación (Icontec, 1999).

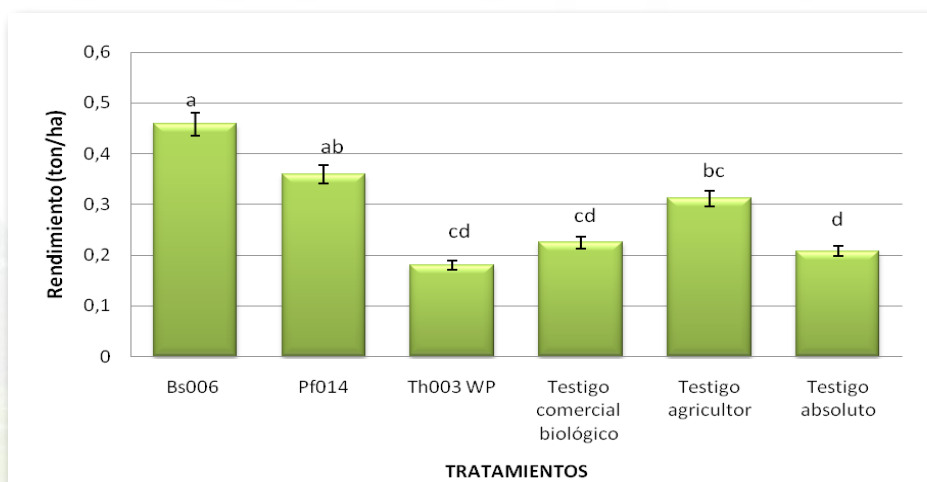


Figura 42. Rendimiento de una cosecha del cultivo de uchuva en el experimento en campo de evaluación de prototipos de rizobacterias para el control de la enfermedad causada por *F. oxysporum*. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes. Las barras verticales indican desviación estándar.

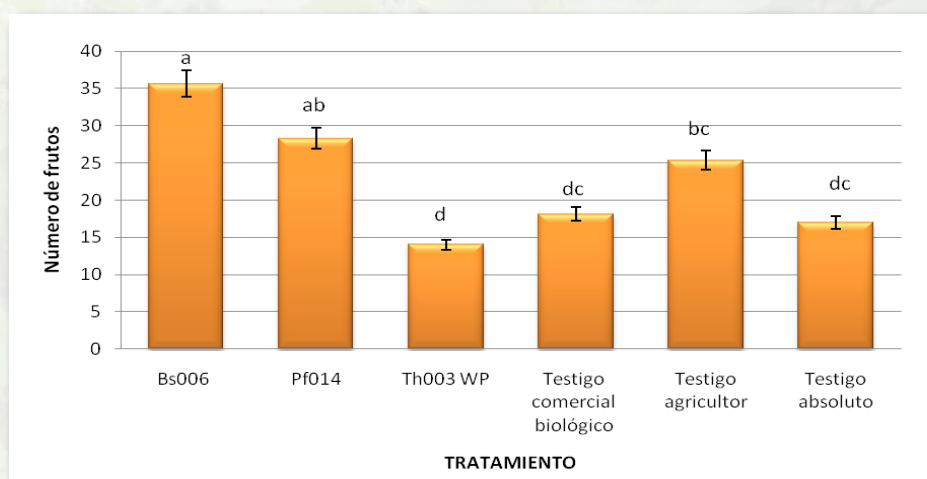


Figura 43. Número de frutos por planta de uchuva en el experimento en campo de evaluación de prototipos de rizobacterias para el control de la enfermedad causada por *F. oxysporum*. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes. Las barras verticales indican desviación estándar.

Es reconocido en muchas publicaciones (Adesemoye & Kloepper, 2009 y Adesemoye *et al.*, 2009) la ventaja de las rizobacterias en el incremento de la productividad de las plantas, al estar íntimamente relacionadas con las raíces de las plantas.

El mayor rendimiento entre tratamientos fue de 0,489 t/ha (obtenido con la aplicación del prototipo de *Bacillus* sp. Bs006), el cual es equivalente a aproximadamente 25,43 t/ha·año, valor superior al rendimiento promedio reportado en Cundinamarca (19 t/ha·año) y a nivel nacional (20 t/ha·año) (CCI, 2000). No obstante, se debe tener en cuenta que los rendimientos obtenidos corresponden a una sola cosecha del cultivo, el cual se cosecha semanalmente y en el que existen



variaciones (picos de producción) en el tiempo. Por lo tanto, se continuará con evaluaciones posteriores para obtener datos más confiables.

Control del marchitamiento vascular de la uchuva

Los síntomas del marchitamiento vascular se presentaron a partir de 112 días después del trasplante. A partir de plantas de uchuva enfermas se tomaron muestras de tallo, con síntomas de marchitamiento ascendente en el sistema vascular, y de estas muestras se aisló un hongo con crecimiento micelial con características de *Fusarium* (Barnett & Hunter, 1972 y Nelson *et al.*, 1983) (Figura 44).



Figura 44. Síntomas de marchitamiento vascular en plantas de uchuva y aislamiento de *Fusarium*. A, B, C y D: Marchitamiento de plantas de uchuva; E y F: Necrosis en sistema vascular de plantas de uchuva; G: Colonia de *Fusarium* spp. aislada a partir de tejido vegetal enfermo de uchuva.

Se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los productos aplicados para el control del marchitamiento vascular de la uchuva a los 193 días después del trasplante. Los menores valores de incidencia y severidad se registraron con la aplicación del bioplaguicida Tricotec® a base de *T. koningiopsis* Th003 con valores de 5% y 2% respectivamente. Entre tanto, los tratamientos a base de los prototipos de las rizobacterias *Bacillus* sp. Bs006 y *Pseudomonas* sp. Pf014 registraron los mayores

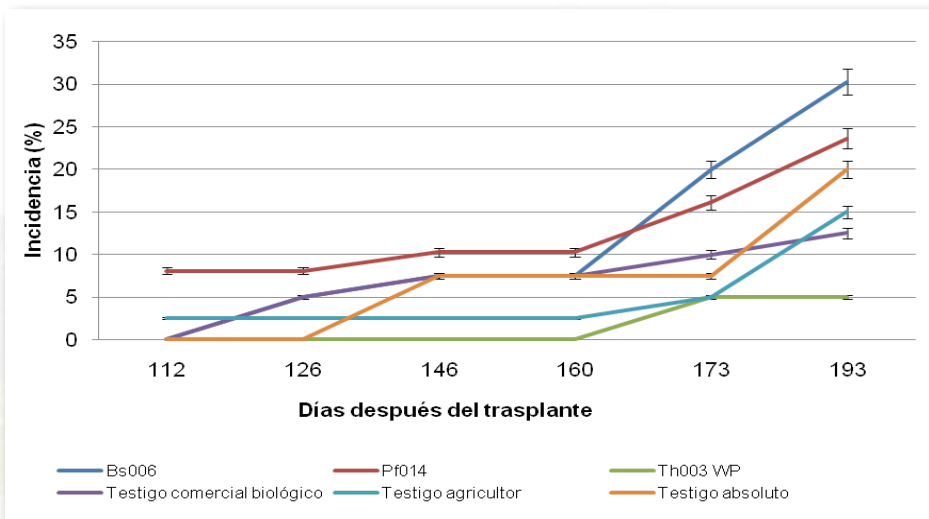


Figura 45. Curvas de progreso del marchitamiento vascular de la uchuva durante el experimento en campo de evaluación de prototipos de rizobacterias para el control de *F. oxysporum*.

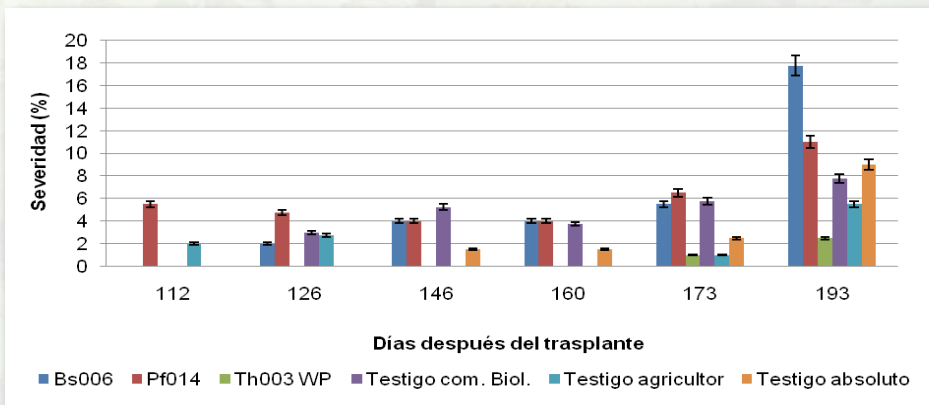


Figura 46. Severidad del marchitamiento vascular de la uchuva durante el experimento en campo de evaluación de prototipos de rizobacterias para el control de *F. oxysporum*.

valores de incidencia de la enfermedad con 30% y 23%, respectivamente (Figuras 45 y 46). Es decir, aunque las rizobacterias promovieron el crecimiento vegetal de las plantas de uchuva, presentaron baja actividad biocontroladora frente a *Fusarium* spp. en condiciones de campo.

Sin embargo, es necesario aclarar que estos resultados son preliminares, ya que corresponden a la evaluación de la incidencia de la enfermedad al inicio del ciclo del cultivo (6-7 meses).

Además, se debe tener en cuenta que el mecanismo de acción de las rizobacterias no está del todo dilucidado, por lo cual los métodos de evaluación *in vitro* son insuficientes para determinar el potencial de las rizobacterias (Smyth *et al.*, 2011). Otro punto a considerar es la acción biótica y abiótica sobre los microorganismos aplicados en el patosistema. En este sentido, las preformulaciones desarrolladas



para las rizobacterias *Bacillus* sp. Bs006 y *Pseudomonas* sp. Pf014 permiten la protección de la célula frente a factores adversos del medio.

Sumado a esto, aunque no se evaluó la capacidad de colonización de las rizobacterias en el microambiente, su capacidad pudo haber sido baja. En este sentido, Landa y colaboradores (2001) señalan que la capacidad de control de cepas de *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. sobre *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* es dependiente de la temperatura e inóculo inicial del fitopatógeno en el suelo, encontrándose que a concentraciones altas del fitopatógeno, el efecto antagónico de las rizobacterias disminuye significativamente. Por lo tanto, en estudios posteriores con las cepas se debe determinar la dinámica poblacional en suelos.

Puesto que en este estudio se ha visto la acción promotora de crecimiento vegetal de las rizobacterias en plantas de uchuva y la acción antagónica de *T. koningiopsis* Th003 contra *Fusarium* sp., en posteriores trabajos se evaluará el uso combinado de los microorganismos con el fin de permitir mayores ventajas hacia la estructuración de un esquema de control del marchitamiento vascular de la uchuva.

CONCLUSIONES

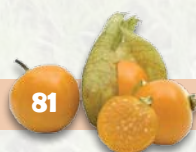
Se demostró que las rizobacterias seleccionadas, aplicadas desde la etapa de semillero y a través de toda la etapa de plantulaje en invernadero, permitieron la obtención de plántulas de uchuva con mejores características agronómicas de peso, altura y área foliar en comparación con el manejo convencional, lo que puede favorecer el establecimiento rápido del cultivo y, de esta manera, generar mejores respuestas de las plantas a la enfermedad causada por *F. oxysporum*.

Los dos prototipos a base de rizobacterias evaluados en campo demostraron un efecto positivo sobre el rendimiento del cultivo de uchuva, ya que se obtuvieron entre 2 kg/ha y 6 kg/ha más con relación al testigo del agricultor, con una reducción importante en la aplicación de fertilizantes, especialmente en semillero e invernadero.

El bioproducto Tricotec® demostró tener actividad biocontroladora contra *F. oxysporum* en comparación con los otros cinco tratamientos, indicando su potencial uso para el control de este patógeno, reemplazando así el uso de fungicidas en el cultivo de uchuva y reduciendo los niveles de químicos residuales en los frutos que son requeridos para su exportación.

LITERATURA CITADA

- Caviedes, D. Aislamiento y selección de *Pseudomonas* sp., y *Bacillus* sp., promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de uchuva (*Physalis peruviana* L.) con actividad antagonica frente a *Fusarium oxysporum*. Trabajo de grado. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. 38p. 2010.
- Guacaneme, A. Biocontrol de *Fusarium oxysporum* y promoción de crecimiento por rizobacterias en plantas de uchuva (*Physalis peruviana*). Trabajo de Grado. Biología. Universidad de los Andes. pp. 15. 2010.
- Landa, B. B.; Cortés, J. A.; Hervás, A.; Díaz, R. M. Influence of temperature and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on suppression of fusarium wilt of chickpea by rhizosphere bacteria. *Phytopathology*. 91: 807 - 816. 2001.
- Smyth, E. M.; McCarthy, J.; Nevin, R.; Khan, M. R.; Dow, J. M.; O'Gara, F. y Doohan, F. M. *In vitro* analyses are not reliable predictors of the plant growth promotion capability of bacteria; a *Pseudomonas fluorescens* strain that promotes the growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology* 111: 683 - 692. 2011.



9 Perspectivas para el control biológico de *Fusarium*

Andrés Díaz¹

¹ Investigador Laboratorio de Control Biológico
Centro de Biotecnología y Bioindustria - CBB
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - Corpoica.
E-mail: adiaz@corpoica.org.co

A la luz de los resultados obtenidos es indispensable consolidar una plataforma robusta para dar soporte al uso de bioproductos dentro de un marco de manejo integrado del cultivo de uchuva; esta debe involucrar los componentes de promoción de crecimiento y control biológico del marchitamiento vascular causado por *F. oxysporum*, teniendo como línea base todos los resultados presentados en este boletín técnico.

En concordancia con lo mencionado, es necesario llevar a cabo evaluaciones de formas y frecuencias de aplicación de los prototipos de los bioproductos desarrollados para determinar el número de aplicaciones óptimas y evaluar la integración de estos con otras soluciones tecnológicas que desarrolla actualmente el Centro de Biotecnología y Bioindustria, tales como el uso del bioplaguicida Tricotec® a base de *Trichoderma koningiopsis* y la micropropagación de variedades de uchuva resistentes a *F. oxysporum*.

La implementación futura de estas herramientas de manejo del cultivo permitirá mejorar la competitividad del sector, aumentar los ingresos de los pequeños y medianos agricultores y hacer ambientalmente más sostenible la producción frutícola en las regiones productoras de uchuva de Cundinamarca y Boyacá.





Terminó de imprimirse
en mayo de 2012 en



Tel: 893 7710 - Bogotá, DC