



**LAS LEVADURAS
COMO ALTERNATIVA
DE CONTROL
BIOLÓGICO DE
FITOPATÓGENOS
EN POSTCOSECHA
DE FRUTAS
Y HORTALIZAS**



COLCIENCIAS



**LAS LEVADURAS COMO
ALTERNATIVA DE CONTROL
BIOLÓGICO DE
FITOPATÓGENOS EN
POSTCOSECHA DE FRUTAS
Y HORTALIZAS**



LAS LEVADURAS COMO ALTERNATIVA DE CONTROL BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS EN POSTCOSECHA DE FRUTAS Y HORTALIZAS

AUTORES

Investigadores

Alba Marina Cotes, Ph. D.¹
Laura Fernanda Villamizar, Q. F., M. Sc.¹
Paulo German García, Biólogo, M. Sc.
Martha Isabel Gómez, Q. F.
Oscar Fuentes, I. A.
Andrés Díaz, I. Q.¹
Javier Flórez, I. Q.¹
Erika Grijalba, Q. F.¹
Jacqueline López, Q. F.

Estudiantes de pregrado

Yanira Jiménez
Alejandro Neiza
Fliana Pava, Microbiólogo Agrícola
Jimmy Alexander Zapata N, Microbiólogo Agrícola
Linda Rincón, I. A.
Nubia Carolina Higuera, Microbióloga Industrial
Carolina Contreras Proaño, Microbióloga Industrial
Carol Gutierrez, Microbióloga Industrial
Lina Benito, Microbióloga Industrial
Catalina Poveda, Microbióloga Industrial
Luisa Fernanda Ramón, Microbióloga Industrial

Auxiliares de Técnico

Juan Alberto Arias
Gabriela Perdomo
Rubén Molina

Compilador

Jimmy Alexander Zapata N.

Editores

Jimmy Alexander Zapata N.
Alba Marina Cotes
Andrés Díaz

ISBN 958-8210-68-2

¹ Laboratorio de Control Biológico, Programa de Manejo Integrado de Plagas, C. I. Tibaitatá, K. 14 vía Mosquera (Cundinamarca), A. A. 240142, Las Palmas, Parque Central Bavaria, Bogotá.

CONTENIDO

Introducción	7
1. Selección de levaduras para el control de <i>Botrytis allii</i> en cebolla de bulbo ..	9
2. Búsqueda de alternativas de control biológico de <i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehr.: Fr) Vuill., en la postcosecha de tomate, mediante la utilización de levaduras	10
3. Contribución al estudio del modo de acción de la levadura <i>Pichia onychis</i> cepa Lv027 contra <i>Rhizopus stolonifer</i> , causante de la pudrición blanda del tomate en postcosecha	11
4. Diseño y puesta en marcha de un reactor airlift para la producción masiva de levaduras biocontroladoras	12
5. Estandarización de la producción masiva de la levadura <i>Pichia onychis</i> (Lv 027), para el control de <i>Rhizopus stolonifer</i> de postcosecha en tomate	13
6. Control de calidad de un preformulado ocoso a base de la levadura <i>Pichia onychis</i> para el control de <i>Rhizopus stolonifer</i> en postcosecha del tomate	14
7. Desarrollo, caracterización y determinación de la estabilidad de un bio plaguicida granular a base de la levadura <i>Pichia onychis</i> para el control de <i>Rhizopus stolonifer</i> en postcosecha del tomate	15
8. Optimización de un bioplaguicida a base de la levadura <i>Pichia onychis</i> (Lv 027), para el control de <i>Rhizopus stolonifer</i> de postcosecha en tomate	16
9. Efecto de sustancias bioactivas sobre la actividad biocontroladora de <i>Pichia onychis</i> (Lv027) contra <i>Rhizopus stolonifer</i> en la postcosecha del tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill)	18
10. Evaluación de la estabilidad de preformulados a base de la levadura <i>Pichia onychis</i> para el control de <i>Rhizopus stolonifer</i> en la postcosecha de tomate	19

11. Selección de levaduras potencialmente biocontroladoras de <i>Alternaria alternata</i> en postcosecha de tomate	20
12. Búsqueda de alternativas para el control biológico de <i>Botrytis cinerea</i> en la postcosecha de tomate mediante el uso de levaduras	21
13. Selección de levaduras aisladas de estructuras reproductivas de la mora de castilla (<i>Rubus glaucus Benth</i>), para el control del moho gris producido por <i>Botrytis cinerea</i>	23
14. Referencias Bibliográficas	25

LISTA DE FIGURAS

Fig 1. Bioplaguicida granular y oleoso a base de la levadura <i>Pichia onychis</i> Lv 027	17
Fig 2. Efecto de la actividad biocontroladora de la levadura <i>Pichia onychis</i> Lv 027 sobre <i>Rhizopus stolonifer</i> , durante la postcosecha del tomate	22
Fig 3. Inhibición del desarrollo del moho gris en frutos de mora de Castilla, mediante el uso de levaduras aisladas de estructuras reproductivas de la misma planta	24

INTRODUCCIÓN

ALBA MARINA COJES

Las pérdidas de frutas y hortalizas después de la cosecha pueden alcanzar valores muy altos, dependiendo de las especies, métodos de cosecha, tiempo de almacenamiento, condiciones de comercialización, etc. En países en desarrollo, las pérdidas provocadas por microorganismos fitopatógenos pueden alcanzar un 50% (Wilson y Wisniewski, 1989).

Tradicionalmente, el uso de fungicidas sintéticos es la primera medida para el control de enfermedades en la postcosecha. Sin embargo, esta medida actualmente está siendo revaluada debido a los problemas de toxicidad provocados en los productos alimenticios (Wilson y Wisniewski, 1989). Según la U.S. National Academy of Sciences, 1987, citado Wilson y Wisniewski, 1994; un 60% de los fungicidas usados habitualmente presentan riesgos oncogénicos hacia los consumidores, generados a partir de residuos de fungicidas en los alimentos. Es así que estas razones motivan la reducción del uso de estos productos particularmente después de la cosecha (Ippolito y Nigro, 2000).

Por lo mencionado anteriormente, el control biológico de agentes patógenos mediante el uso de bioplaguicidas, aparece como una de las alternativas de control más promisorias, dadas sus ventajas de sostenibilidad ambiental. Es así como muchos laboratorios dirigen sus esfuerzos de investigación a la búsqueda de microorganismos epífitos, capaces de controlar a los patógenos, permitiendo la reducción del inóculo o bloqueando una o varias etapas de su ciclo infeccioso (Iijakli y Lepoivre, 1995).

En este sentido, las levaduras se ubican como organismos ideales para el control biológico de patógenos en postcosecha, debido a que éstas pueden ser aisladas de la superficie de los frutos y hortalizas; además, dentro de este grupo de microorganismos existen cepas con una alta actividad antagónica, que pueden establecerse en los sitios de herida, protegiendo los frutos (Potjewijd *et al.*, 1995).

Algunas especies de levaduras son antagonistas ideales de fitopatógenos de frutas y hortalizas en la postcosecha, debido a que son genéticamente estables, efectivas a bajas concentraciones, tienen requerimientos nutricionales comunes, tienen capacidad de sobrevivir en condiciones ambientales adversas, son efectivas contra un amplio rango de patógenos en una variedad de frutas y hortalizas, no producen metabolitos que puedan comprometer la salud humana y no son patógenos de vegetales, de animales o del hombre. Las levaduras utilizadas para el control de fitopatógenos en la postcosecha tienen como principal modo de acción la competencia por nutrientes y espacio, siendo poco común la producción de antibióticos (Wilson y Wisniewski, 1989).

A partir de la década de los 80, son numerosos los reportes exitosos en el manejo de patógenos en postcosecha, tal es el caso del control de los patógenos *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* en manzanas mediante el uso de las levaduras *Kloeckera apiculata* y *Candida guilliermondii* (McLaughlin et al., 1992) y *Pichia anomala* y *Candida sake* (Jijakli, 1996) en el manejo de *B. cinerea* y *P. expansum* en pera (Chand-Goyal y Spotts, 1997), así como *Candida oleophila* contra los patógenos *Geotrichum candidum*, *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum* en cítricos. (Droby et al., 1999)

Actualmente, en el mundo se encuentran registrados tres productos para el control biológico de enfermedades en postcosecha: BIO-SAVE® (*Pseudomonas syringae*), ASPIRE® (*C. oleophila*) y YIELDPLUS® (*Cryptococcus albidus*), para el control de *B. cinerea* y *P. digitatum* en manzanas (Cotes, 2001, García, 2001).

En Colombia, en investigaciones realizadas en el Laboratorio de Control Biológico de Corpoica se han seleccionado cepas nativas de levadura tales como *Pichia onychis* (cepas Lv 027 y Lv 031) para el control de *Botrytis alli* en postcosecha de cebolla de bulbo; estas mismas cepas y *Pichia anomala* (cepa Lv 050) mostraron alta actividad biocontroladora contra *Rhizopus stolonifer* en postcosecha de tomate. Los resultados de las investigaciones desarrolladas en Corpoica se mencionan a continuación.

1. Selección de levaduras para el control de *Botrytis alli* en cebolla de bulbo

YANIRA JIMÉNEZ, ALEJANDRO NEISA, ALBA MARINA COTES

Botrytis alli produce la podredumbre gris del cuello, que es la enfermedad más limitante de la cebolla de bulbo en postcosecha. Para contribuir al control de este patógeno se aislaron levaduras potencialmente antagonistas a partir de muestras vegetales y de suelo de regiones cebolleras con diversas condiciones medioambientales, también se expusieron al ambiente cebos líquidos, obteniéndose 50 aislamientos de levaduras. Se seleccionaron 10 aislamientos de levaduras de acuerdo con sus características macro y microscópicas, su procedencia y su capacidad psicrófila, para realizar pruebas de protección. Para la prueba de patogenicidad con *B. alli* se realizó una inoculación directa aplicando 25µl de la suspensión del patógeno a una concentración de 1×10^8 conidios.ml⁻¹ sobre heridas artificiales (6 mm diámetro x 3 mm profundidad) en cebolla de bulbo.

El efecto biocontrolador de las 10 levaduras seleccionadas contra *B. alli* en cebolla de bulbo, se determinó bajo condiciones controladas de almacenamiento a temperaturas de 5°C y 20°C y humedad relativa de 90 %. Los bulbos de cebolla

fueron inoculados con 25µl de una suspensión de cada una de las levaduras a una concentración de 1×10^7 células.ml⁻¹, y fueron incubados a 5º C y a 20º C en cámaras húmedas durante 24 h, pasado este tiempo, se inocularon 25µl de la suspensión del patógeno en el sitio de la herida y se dejaron en cámaras húmedas a las dos temperaturas de incubación; las lecturas de crecimiento del hongo se expresaron como el diámetro de la lesión provocada por éste. Estas se realizaron cada dos días y finalizaron en el momento en el cual el hongo colonizó el bulbo en el testigo patógeno, siendo este tiempo de 18 días para 20º C y 20 días para 5º C. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar y se realizaron análisis de varianza y pruebas de comparación de medias de Tukey con un nivel de significancia 0.05 %.

Los resultados obtenidos mostraron que las 10 levaduras seleccionadas presentaron actividad biocontroladora contra *B. alli*, lo cual se evidenció por una menor severidad de la enfermedad con respecto al testigo patógeno. Las levaduras Lv 006, Lv 027 y Lv 031, todas identificadas como *Pichia onychis*, presentaron porcentajes de protección superiores al 85% en las dos temperaturas de almacenamiento.

2. Búsqueda de alternativas de control biológico de *Rhizopus stolonifer* (Ehr.:Fr) Vuill., en la postcosecha de tomate, mediante la utilización de levaduras

PAULO GERMAN GARCÍA, ALIJA MARINA COTES

Con el propósito de crear una alternativa de control biológico de la pudrición blanda producida por *Rhizopus stolonifer* en frutos de tomate en condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente y de refrigeración, se evaluaron algunas levaduras provenientes de la colección de Corpoica y del Instituto Nacional de Salud; mientras que otras fueron aisladas a partir de frutos de tomate, procedentes de diferentes zonas productoras del país.

Se seleccionó una concentración de 1×10^4 esporangiosporas.ml⁻¹ de *R. stolonifer*, con la cual se obtuvo una severidad aproximada del 80% y una incidencia del 100%, tanto a temperatura ambiente como de refrigeración.

Se evaluó el efecto biocontrolador de 4 levaduras aisladas de tomate (Lv056, Lv053, Lv050 y Lv039), seleccionadas por su capacidad de desarrollarse tanto a 25º C como a 6º C y por presentar diferencias en sus características macro y microscópicas. Adicionalmente, se evaluaron las levaduras Lv 006, Lv 027 y Lv 031, identificadas como *Pichia onychis*; seleccionadas por su alta actividad biocontroladora contra *Botrytis alli* en cebolla de bulbo (García et al., 2001). En esta prueba, se utilizaron

los procedimientos de evaluación descritos anteriormente para cebolla.

Se realizaron mediciones de los diámetros de las lesiones provocadas por el patógeno sobre frutos de tomate, encontrándose que la levadura Lv050, aislada de tomate e identificada como *Pichia anomala* y las levaduras Lv031 y Lv027, presentaron porcentajes de protección contra *R. stolonifer* de 88,50%, 93,33% y 100% respectivamente a temperatura ambiente y de 89,53%, 97,37% y 92,40% respectivamente a temperatura de refrigeración.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permitieron concluir que la utilización de levaduras para el control biológico de fitopatógenos en la postcosecha de tomate, representa una alternativa promisoría.

3. Contribución al estudio del modo de acción de la levadura *Pichia onychis* cepa Lv027 contra *Rhizopus stolonifer*, causante de la pudrición blanda del tomate en postcosecha

PAULO GERMAN GARCÍA, ALBA MARINA COTIS

Con el objetivo de contribuir al estudio de los modos de acción presentes en la interacción levadura-*R. stolonifer*-tomate, se realizaron diferentes experimentos, uno de ellos tuvo el propósito de encontrar la concentración mínima efectiva de la levadura *Pichia onychis* cepa Lv 027, para lo cual ésta se aplicó a tomates en concentraciones desde 1×10^4 células.ml.⁻¹ hasta 1×10^8 células.ml.⁻¹, encontrándose una protección entre 91,11% y 86,24% respectivamente a temperatura de refrigeración y entre 94,96% y 85,14% respectivamente a temperatura ambiente. De otra parte, para determinar el tiempo en que la levadura debía ser inoculada con relación al patógeno, la levadura se aplicó a 24, 18, 12 y 6 horas antes y después de la aplicación del patógeno, así como simultáneamente con éste; encontrándose que al inocular la levadura 24 y 18 horas antes se obtuvieron porcentajes de protección del 94,42% y 87,95% respectivamente a temperatura de refrigeración y del 100% en los mismos tiempos de inoculación de la levadura a temperatura ambiente.

Se determinó el efecto de la levadura sobre el crecimiento micelial del patógeno expresado como peso seco, al cultivarse simultáneamente los dos microorganismos en un medio sintético suplementado con fructosa, glucosa y sacarosa, encontrándose en estos medios una reducción en el peso seco del micelio del 82,85%, 28,00% y 62,15% respectivamente. Cuando se observó el efecto de la levadura sobre la emergencia del tubo germinativo y la germinación total de las esporangiosporas de *R. stolonifer* en los sitios de herida; se obtuvo a las 6 y a las 12 horas un porcentaje de emergencia del tubo germinativo de sólo un 19,03% y 14,58% res-

pectivamente, el cual fue significativamente superior en ausencia de la levadura, ya que fue de 85% y 95.83%, respectivamente.

Cuando se evaluó el efecto de los metabolitos extracelulares producidos por la interacción levadura-tomate, sobre el desarrollo de las esporangiosporas del patógeno, se observó una reducción significativa en el porcentaje de emergencia del tubo germinativo (43.87%) a las 12 horas, con respecto al obtenido por el patógeno sin la levadura (97.22%). De acuerdo con los resultados presentados anteriormente, el principal modo de acción de la levadura contra el patógeno, podría atribuirse a la competencia por nutrientes, en la cual la levadura puede aprovechar más rápidamente que el patógeno las fuentes nutricionales en los sitios de herida.

4. Diseño y puesta en marcha de un reactor airlift para la producción masiva de levaduras biocontroladoras

JAVIER FLÓREZ, ANDRÉS DÍAZ, ALBA MARINA COTES

Los procesos de fermentación tienen como objetivo principal el de lograr que el microorganismo desarrolle adecuadamente su metabolismo celular, esto implica la adecuada satisfacción de necesidades nutricionales del organismo y el mantenimiento permanente de condiciones ambientales óptimas (temperatura, pH, oxígeno disuelto, homogeneidad de la mezcla, etc.). Una alternativa para satisfacer estos requerimientos de una manera eficiente es el uso de reactores tipo airlift, por sus elevadas velocidades de transferencia de oxígeno, bajo consumo de energía, buena remoción de calor y bajos costos de construcción y de operación (al prescindir de agitación mecánica). Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, el objetivo principal del proyecto fue el diseño y puesta en marcha de un reactor airlift a nivel de banco (20L), y posteriormente la determinación de la eficiencia del sistema de fermentación usando la levadura *Pichia onychis* Lv027 como modelo.

Para el desarrollo del trabajo se aplicó la siguiente metodología: se realizó la selección y diseño del equipo con sus respectivos planos; se construyó el equipo y se determinó su eficiencia por medio de corridas experimentales, se evaluó el consumo de sustrato determinando azúcares reductores por el método de Somogyi-Nelson y se evaluó la concentración de células por conteo en cámara de Neubauer usando la levadura *Pichia onychis* Lv027 proveniente de un medio de cultivo (MLXOM) estandarizado previamente en el Laboratorio de Control Biológico; el resultado obtenido fue un reactor airlift de lazo interno, construido en vidrio y acero inoxidable, con volúmenes de trabajo de 10, 15 y 20 litros. Se realizaron corridas experimentales a una temperatura de 30° C y una aireación de 0.5 v.v.m

durante 24 horas. De los resultados obtenidos, se observó una curva de crecimiento típica para la levadura con una concentración final de 8.83×10^9 células.mL⁻¹ a las 24 horas y un rendimiento en biomasa seca de 2.35g.L⁻¹, en la determinación de azúcares fue posible observar una tendencia típica de consumo de sustrato con el tiempo, representado por un consumo a las 24 horas de fermentación de aproximadamente un 92.55% del sustrato carbonado.

5. Estandarización de la producción masiva de la levadura *Pichia onychis* (Lv 027), para el control de *Rhizopus stolonifer* de postcosecha en tomate

JAVIER FLÓREZ, ANDRÉS DÍAZ, ALBA MARINA COTES

Con el objeto de estandarizar las condiciones de producción de la levadura *Pichia onychis* (Lv 027) en un biorreactor airlift de 20 litros, para obtener la biomasa suficiente para desarrollar prototipos de formulación de bioplaguicida (líquida o granular), se llevaron a cabo fermentaciones en erlenmeyers de 125ml, 500ml y 1000ml con volúmenes de medio de 25ml, 100ml y 200ml respectivamente. Se utilizó el medio líquido base (MLXOM) con un pH de 4.5, el cual fue previamente estandarizado y optimizado para la producción de la levadura *Pichia onychis* (Lv 031).

Inicialmente se inocularon los erlenmeyers de 125ml con 5 ml de una suspensión de la levadura a una concentración de 1×10^7 células.mL⁻¹, y se incubó a 25° C con agitación constante de 150 rpm durante 48 horas, en el transcurso de la fermentación se llevó a cabo la evaluación del crecimiento de la levadura cada hora mediante conteo en cámara de Neubauer. El cambio de volumen fue progresivo: una vez finalizada la cinética de crecimiento y seleccionado el tiempo de fermentación óptimo en erlenmeyers de 125 ml, el contenido de los erlenmeyers sirvió de inóculo para los erlenmeyers de 500ml a los cuales se le aplicó el procedimiento anteriormente mencionado, y el contenido de los erlenmeyers de 500ml sirvió a su vez como inóculo de los erlenmeyers de 1000ml. En todos los casos (erlenmeyers de 125 mL, 500 mL, 1000 mL), el tiempo óptimo de fermentación fue determinado por los resultados obtenidos de las cinéticas de crecimiento de la levadura.

El contenido de los erlenmeyers de 1000 ml sirvió de inóculo para el biorreactor airlift de lazo interno, el cual contenía 15 L del medio MLXOM, las condiciones de fermentación fueron: temperatura de 26° C y aireación de 1 v.v.m durante 48 horas, la evaluación del crecimiento de la levadura se llevó a cabo cada hora. Una vez

finalizada la fermentación, al producto de la fermentación se le realizó un control de calidad microbiológico, es decir, se le determinó su concentración y viabilidad.

Los resultados obtenidos en el biorreactor airlift operado bajo las condiciones anteriormente mencionadas fueron: tiempo óptimo de fermentación 24 horas, concentración de 1.05×10^9 células.mL⁻¹, una viabilidad de 5.7×10^{10} u.f.c.mL⁻¹ y rendimiento de la fermentación expresada como biomasa seca de 3.54 g.L⁻¹.

6. Control de calidad de un preformulado oleoso a base de la levadura *Pichia onychis* para el control de *Rhizopus stolonifer* en postcosecha del tomate

CAROL GUTIERREZ, MARITHA GÓMEZ, PAULO GERMÁN GARCÍA, ALBA MARINA COTES

El control de calidad de los bioplaguicidas microbianos utilizados para el control de fitopatógenos es de gran importancia ya que éste garantiza su efectividad y su vida útil (García et al., 2002). Por lo tanto, en el presente trabajo se estandarizaron técnicas de control de calidad físicas, microbiológicas y biológicas para una preformulación oleosa de la levadura *Pichia onychis* Lv 027 almacenada a 8º C, 18º C y 28º C durante 5 meses. Se realizaron pruebas físicas a la suspensión y al producto reconstituido (emulsión) tales como: separación de fases y zonas, densidad y homogeneidad de la concentración se determinó la estabilidad del producto a través del tiempo, además la viabilidad y la actividad biocontroladora.

Los resultados obtenidos mostraron que la suspensión oleosa tiene unas características físicas y microbiológicas adecuadas y estables durante los cinco meses de almacenamiento, siendo la temperatura de refrigeración (8º C) la más adecuada para el almacenamiento del producto. La preformulación presentó un efecto biocontrolador moderado hasta los 2.5 meses de almacenamiento, y a partir de este momento se evidenció una disminución considerable de la misma, probablemente debida a un efecto negativo del proceso de secado sobre el principio activo.

7. Desarrollo, caracterización y determinación de la estabilidad de un bioplaguicida granular a base de la levadura *Pichia onychis* para el control de *Rhizopus stolonifer* en postcosecha del tomate

NUBIA CAROLINA HIGUERA, LAURA VILLAMIZAR, PAULO GERMÁN GARCÍA, ALBA MARINA COTES

Las técnicas utilizadas para realizar el control de calidad de los bioplaguicidas han sido frecuentemente tomadas de las utilizadas para agroquímicos, por lo que

no siempre se adaptan a organismos vivos. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue el de establecer parámetros de calidad adecuados para una formulación granular a base de la levadura *P. onychis* (Lv 027). Con la biomasa obtenida en un fermentador Airlif de 20 litros, se elaboraron 16 prototipos de bioplaguicida que fueron caracterizados física y microbiológicamente, se seleccionó el más adecuado y se almacenó por 6 meses junto con la biomasa seca, evaluando su viabilidad mensualmente y la estabilidad de su actividad biocontroladora a los 0, 3 y 6 meses de almacenamiento mediante bioensayos en tomate.

El granulado seleccionado identificado como G16 presentó características físicas y microbiológicas adecuadas y pérdidas en la viabilidad del 21%, 37,20% y 62,42% al almacenarlo a 8° C, 18° C y 28° C, respectivamente, mientras que en la biomasa no formulada fueron del 11%, 12% y 59%, respectivamente. El granulado y la biomasa seca presentaron porcentajes de protección del 76% y 83,08%, que no fueron significativamente diferentes a los obtenidos por la biomasa sin formular ni de la obtenida con la levadura cultivada en caja de Petri en medio YM (81,4% y 87,33% respectivamente). Estos resultados sugieren que el producto debe ser almacenado a temperatura de refrigeración para que las pérdidas de viabilidad de la levadura sean mínimas, manteniendo su eficiencia biocontroladora en el tiempo.

8. Optimización de un bioplaguicida a base de la levadura *Pichia onychis* (Lv 027), para el control de *Rhizopus stolonifer* de postcosecha en tomate

ALBA MARINA COTES, ERIKA GRIJALBA, JAVIER FLÓREZ, ANDRÉS DÍAZ, LAURA VILLAMIZAR, JACQUELINE LÓPEZ, PAULO GERMÁN GARCÍA, OSCAR FUENTES, LINA BENTO¹, CATALINA POVEDA¹, LUISA FERNANDA RAMÓN¹

El desarrollo del proceso tecnológico para la obtención de un formulado para el control de fitopatógenos en postcosecha de tomate, usando la levadura *Pichia onychis* (Lv 027) se dividió en dos etapas: estandarización de la producción masiva y del proceso de secado y optimización de los prototipos de formulación diseñados previamente.

La producción masiva de la levadura Lv 027 se llevó a cabo bajo condiciones de fermentación líquida en un fermentador Airlif de 20 litros de capacidad, utilizando un inóculo previamente estandarizado en medios de cultivo con actividad de agua modificada ($A_w=0,98$). Ya que ninguno de los solutos represores de acti-

¹ Estudiantes de Microbiología Industrial de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá

vidad de agua evaluados confirieron estabilidad de la actividad biocontroladora de la levadura Lv027 durante almacenamiento a 4 meses, el estudio se enfocó hacia la implementación de otras estrategias para alcanzar dicho objetivo. Se evaluó la aplicación de sustancias protectantes durante el proceso de secado y el uso de soluciones de rehidratación para mantener la viabilidad de la levadura en el momento de resuspender la biomasa para ser formulada; de los resultados obtenidos se implementó el uso de una solución proteica al 10% más un poliol al 5% como protectante de secado y una solución de Tween 80 al 10% ya que estos en conjunto, mantuvieron la viabilidad de *P. onychis* por encima del 90% con una actividad biocontroladora superior al 80% contra *R. stolonifer*, al ser ésta almacenada por periodos de hasta 6 meses.

En la etapa de formulación se desarrolló un prototipo granulado (codificado como G16) y un prototipo oleoso (codificado como 7) que cumplieron con todos los requerimientos físicos y microbiológicos establecidos en el Laboratorio de Control Biológico de Corpoica y que además, presentaron alta eficiencia biocontroladora (cercana al 80%) con pérdidas de viabilidad menores al 10% en condiciones de refrigeración durante 6 meses.

Se estandarizaron metodologías de evaluación mediante bioensayos que simulaban las condiciones naturales de herida de los frutos y se evaluaron las formulaciones seleccionadas; realizando una prueba de patogenicidad de *R. stolonifer* a dos concentraciones y en 4 tipos de herida (abrasión, punción, eliminación de tejido y herida natural); se seleccionó una concentración del patógeno de 1×10^5 esporangiosporas.mL⁻¹ y el tipo de herida por abrasión, ya que bajo estas condiciones, se presentó una adecuada manifestación de síntomas y signos de la enfermedad. Se demostró que la técnica de aplicación de la levadura, ya sea por inmersión o por impregnación, no influye sobre su actividad biocontroladora, independiente del tipo de formulación evaluado. Por último, se realizó la evaluación de los prototipos de formulación más promisorios mencionados anteriormente, sobre frutos de tomate y se determinó que el prototipo granular se comportó significativamente mejor que el prototipo oleoso con porcentajes de protección entre el 88% y el 90%.

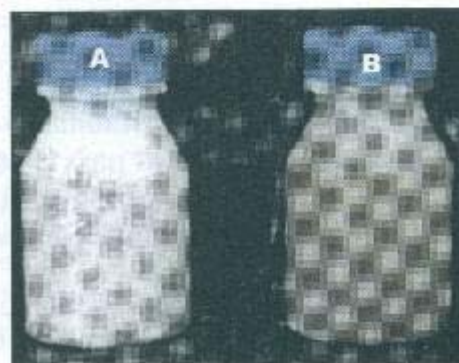


Figura 1. Bioplaguicidas granular (A) y oleoso (B) a base de la levadura *Pichia onychis* Lv 027.

9. Efecto de sustancias bioactivas sobre la actividad biocontroladora de *Pichia onychis* (Lv027) contra *Rhizopus stolonifer* en la postcosecha del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill)

LINDA RINCÓN, ALBA MARINA COTES, OSCAR FUENTES

Las sustancias bioactivas (productos de origen microbiano) representan una alternativa al uso de los agroquímicos utilizados para el control de enfermedades, ya que éstas han demostrado tener propiedades antifúngicas o de inducción de resistencia. Mediante el uso combinado de levaduras con estas sustancias se han obtenido resultados exitosos de control de diferentes patógenos. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue el de evaluar la actividad biocontroladora de la levadura *Pichia onychis* Lv 027 en su concentración efectiva $50 (1 \times 10^5 \text{ células.mL}^{-1})$ sola y combinada con sustancias bioactivas (SB) contra *R. stolonifer* en postcosecha de tomate. Las sustancias evaluadas fueron obtenidas a partir del micelio de *Botrytis cinerea*, de *Trichoderma koningii* y de *R. stolonifer* (0.2%) y de su digestión enzimática (0.2%), así mismo se evaluó lizosima (0.02%), quitosán (0.1%) y CaCl_2 (1%, 2%, 3%), todas éstas fueron adicionadas al medio de cultivo o a la suspensión de inoculación de la levadura, seleccionando aquellas que combinadas con la levadura registraron una incidencia menor comparada con la levadura sola y aquellas que en su ausencia redujeron la incidencia entre 30% y 50% comparadas con el testigo patógeno.

Cuando las SB se aplicaron combinadas con la levadura se seleccionó el digerido de *B. cinerea*, el producto proveniente del micelio de *R. stolonifer* y CaCl_2 (1%) por presentar una reducción en la incidencia del patógeno mayor a la presentada por la levadura sola (73%); también fueron seleccionadas la lizosima y el quitosán adicionadas al medio de cultivo por reducir la incidencia de la enfermedad en 74% y 83% respectivamente. Cuando las SB fueron aplicadas solas se seleccionaron las provenientes del micelio de *T. koningii*, *R. stolonifer*, el quitosán y CaCl_2 (1%), por reducir la incidencia entre 50% y 66% en comparación con el testigo patógeno.

10. Evaluación de la estabilidad de preformulados a base de la levadura *Pichia onychis* para el control de *Rhizopus stolonifer* en la postcosecha de tomate

CAROLINA CONTRERAS PROAÑO I, LAURA VILLAMIZAR, ALBA MARINA COTES

La estabilidad de los bioplaguicidas durante el almacenamiento constituye uno de los principales problemas para lograr la comercialización de estos productos.

Teniendo en cuenta que en trabajos realizados anteriormente se desarrollaron dos prototipos de formulación a base de la levadura *Pichia onychis* Lv 027 se evaluó la estabilidad durante seis meses de almacenamiento a tres temperaturas de los dos prototipos de formulación optimizados. Se evaluaron las características físico químicas de las formulaciones inmediatamente después de la formulación y después de seis meses de almacenamiento; para el concentrado emulsionable se determinó el pH, la gravedad específica, la viscosidad y la estabilidad física de la suspensión y del producto reconstituido y para el granulado se evaluó el pH, la humedad, la humectabilidad, la desintegración, la sedimentación, la voluminosidad, la porosidad, la fluidez y el tamaño de partícula.

La viabilidad de los prototipos de formulación y de la levadura liofilizada sin formular se evaluó mensualmente durante seis meses de almacenamiento mediante la técnica de recuento en placa y la actividad biocontroladora se evaluó determinando la protección ejercida por la levadura sobre el patógeno en frutos de tomate, mediante bioensayos realizados bimestralmente durante los seis meses de almacenamiento. Todas las características fisicoquímicas de los dos prototipos fueron adecuadas para este tipo de productos, permaneciendo estables durante el almacenamiento. La estabilidad de la viabilidad fue mayor cuando los preformulados fueron almacenados a 8° C, seguido por el almacenamiento a 18° C y por último a 28° C, esto sugiere que los productos deben ser almacenados a temperaturas de refrigeración para aumentar su vida útil.

Después de seis meses de almacenamiento la levadura liofilizada sin formular presentó una pérdida de viabilidad del 8.71%, 15.91% y del 19.81% a 8° C, 18° C y 28° C respectivamente. El concentrado emulsionable presentó una pérdida de viabilidad del 18.04%, 18.71% y del 37.13% a las tres temperaturas respectivamente. El granulado presentó pérdidas en la viabilidad del 20.29%, 35.37% y del 46.3% a 8° C, 18° C y 28° C respectivamente; las pérdidas obtenidas con la levadura liofilizada sin formular fueron significativamente menores en todas las temperaturas de almacenamiento que las obtenidas con las formulaciones, sugiriendo un efecto negativo del proceso o de los auxiliares de formulación sobre la levadura. La actividad biocontroladora tanto de la levadura liofilizada sin formular como de los dos prototipos de formulación se mantuvo estable durante seis meses de almacenamiento a 8° C, 18° C y 28° C. Adicionalmente se determinó que la pérdida de viabilidad de la levadura no afectó su actividad biocontroladora. En el sexto mes de almacenamiento se obtuvieron porcentajes de protección significativamente superiores con la levadura almacenada a 8° C con respecto a la levadura almacenada a 28° C, lo que demuestra que la temperatura de almacenamiento tiene un efecto importante sobre la actividad biocontroladora de la levadura.

11. Selección de levaduras potencialmente biocontroladoras de *Alternaria alternata* en postcosecha de tomate

OSCAR FUENTES, ALBA MARINA COTES, PABLO GERMÁN GARCÍA

El moho negro, causado por *Alternaria alternata* es una de las enfermedades más limitantes en la etapa de postcosecha de frutos de tomate en el mundo. Su manejo se realiza principalmente mediante aplicaciones de fungicidas en la etapa de precosecha, lo que ha generado la aparición de cepas resistentes del patógeno, ante lo cual, el control biológico mediante la utilización de levaduras emerge como una alternativa muy deseable.

En el presente trabajo se evaluó la actividad biocontroladora de 10 cepas de levaduras contra *A. alternata* en dos estados de madurez de los frutos de tomate: verde hecho y pintón y dos temperaturas de incubación: 6^o C y 17±2^o C. Se determinó la severidad medida como el diámetro de lesión producido por cinco diferentes concentraciones del patógeno (desde 1 x 10³ hasta 1 x 10⁷ conidios.mL⁻¹) inoculadas en heridas artificiales de frutos de tomate, seleccionándose los frutos pintones y una concentración de 1x10⁶ conidios.mL⁻¹ del patógeno, ya que desarrolló una lesión de 47.9 mm y 23.6 mm a 17±2^o C y 6^o C respectivamente.

Para evaluar la actividad biocontroladora de las levaduras, se utilizaron las metodologías descritas para cebolla de bulbo aplicando la levadura en una suspensión de 1 x 10⁷ células.mL⁻¹ en heridas artificiales de tomate 24 horas antes de la inoculación del patógeno.

Las diez levaduras evaluadas produjeron algún nivel de control, sin embargo, se seleccionó la cepa Lv 027 correspondiente a un aislamiento de *Pichia onychis* ya que produjo significativamente la mayor protección reduciendo la severidad en 90% y 76% a 17±2^o C y 6^o C respectivamente comparado con el testigo patógeno. Cabe destacar que en posteriores evaluaciones, se obtuvieron menores niveles de protección, debido probablemente a un aumento en la virulencia del patógeno. La protección conferida por esta levadura indica su potencial uso en el desarrollo de un biofungicida contra *A. alternata* en postcosecha de frutos de tomate, e inclusive, en otros productos en donde este patógeno es limitante.

12. Búsqueda de alternativas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en la postcosecha de tomate mediante el uso de levaduras

ELIANA PAVA, ALBA MARINA COTES, PAULO GERMÁN GARCÍA

El moho gris es una enfermedad quiescente causada por *Botrytis cinerea*, esta es la enfermedad más común del cultivo de tomate en invernadero, afectando principalmente flores y frutos. Además, la enfermedad también puede manifestarse en postcosecha.

Por lo tanto, en el presente trabajo se evaluó la actividad biocontroladora en postcosecha de cepas de levaduras codificadas como Lv006, Lv027, Lv031 identificadas como *Pichia onychis* y de la cepa Lv050 identificada como *P. anomala* seleccionadas en estudios previos por su alta actividad biocontroladora contra otros patógenos en postcosecha. Dicha evaluación se realizó utilizando los procedimientos y las concentraciones de levaduras, (1×10^7 células.ml⁻¹) y del patógeno (1×10^6 conidios.ml⁻¹), citados para el caso de *A. alternata*.

La levadura *Pichia onychis* (Lv031) produjo el mayor porcentaje de protección a temperatura ambiente, el cual fue de 45.57%, seguido por las levaduras Lv006,

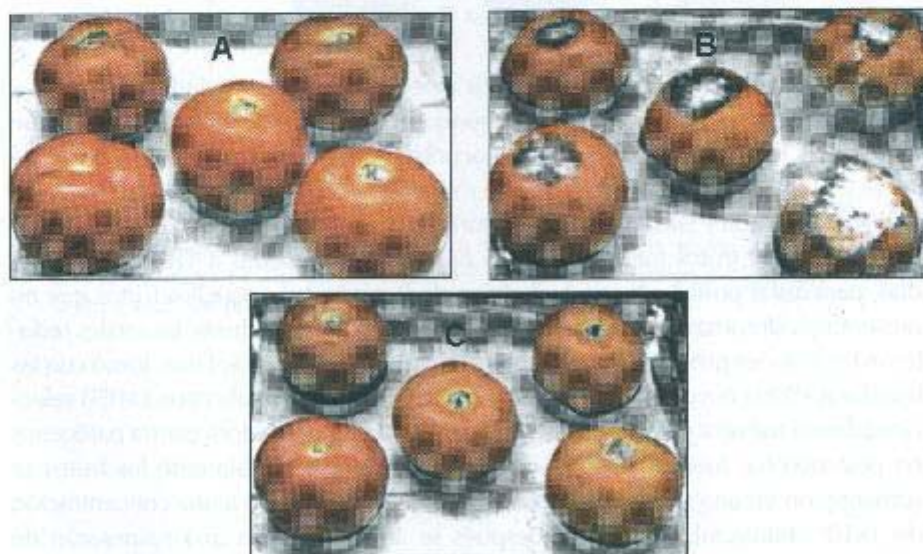


Figura 2. Efecto de la actividad biocontroladora de la levadura *Pichia onychis* Lv 027 sobre *Rhizopus stolonifer*, durante la postcosecha del tomate. (A) Testigo absoluto, (B) Testigo patógeno (sin la levadura), (C) Tratamiento con la levadura en presencia del patógeno.

Lv050 y Lv027, las cuales produjeron porcentajes de protección de 41.44%, 31.8% y 25.68% respectivamente. A temperatura de refrigeración la levadura *P. anomala* (Lv050) produjo un porcentaje de protección de 28.43%, seguida por las levaduras Lv031, Lv027 y Lv006, con 25.37%, 18.98% y 16.94% respectivamente.

Dados los bajos porcentajes de protección obtenidos, se evaluó el efecto de una menor concentración *B. cinerea* (1×10^5 conidios. mL^{-1}), sobre la actividad biocontroladora de las levaduras; encontrándose un aumento de la actividad biocontroladora de la levadura Lv031 tanto a 18° C como a 8° C, con porcentajes de protección de 89.63% y 63.58% respectivamente. Las levaduras Lv027, Lv050 y Lv006 frente a esta concentración del patógeno presentaron porcentajes de protección inferiores al 40% a las mismas temperaturas. Los resultados obtenidos permiten concluir que todas las levaduras evaluadas presentaron reducción de las lesiones producidas por *B. cinerea* en frutos de tomate a 18° C y 8° C. Sin embargo, fue la levadura Lv031 la que presentó los mayores porcentajes de protección.

13. Selección de levaduras aisladas de estructuras reproductivas de la mora de castilla (*Rubus glaucus Benth*), para el control del moho gris producido por *Botrytis cinerea*

JIMMY ALEXANDER ZAPATA N, MA. CLEMENCIA FORERO DE LA ROTA², ALBA MARINA COTES

El moho gris, producido por *Botrytis cinerea* es la enfermedad mas común y limitante del género *Rubus* en todo el mundo. El propósito del presente trabajo fue el de aislar levaduras con potencial biocontrolador sobre *B. cinerea*, a partir de flores y frutos colectados en cultivos de mora de Castilla, localizados en los municipios de Granada y Sylvania (Cundinamarca).

Las flores y frutos fueron ubicados en cámaras húmedas a 18° C durante 5 días, para aislar posibles biocontroladores de *B. cinerea* de aquellos frutos que no presentaran síntomas del moho gris. Se seleccionaron 7 levaduras, las cuales redujeron las lesiones producidas por el patógeno entre 65% y 76%. Éstas, junto con las levaduras *Pichia onychis* cepas Lv027 y Lv031 y *Pichia anomala* cepa Lv050 seleccionadas en trabajos previos por su alta actividad biocontroladora contra patógenos en postcosecha, fueron evaluadas en frutos de mora. Inicialmente los frutos se sumergieron en una suspensión de cada una de las levaduras a una concentración de 1×10^7 células. mL^{-1} , 24 horas después se asperjaron con una suspensión de conidios de *B. cinerea* a una concentración de 1×10^4 conidios. mL^{-1} . Los frutos inoculados se ubicaron en cámaras húmedas a 18° C durante 5 días.

² Docente del área de fitopatología de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.

Las levaduras aisladas de frutos de mora, codificadas como Lv 297, Lv 298 y Lv 299 (conservadas en la colección de levaduras del Banco de Germoplasma de Microorganismos con Interés en Control Biológico) redujeron la incidencia de la enfermedad entre 67,4% y 78,7%, siendo éstas las más promisorias para el control del moho gris.

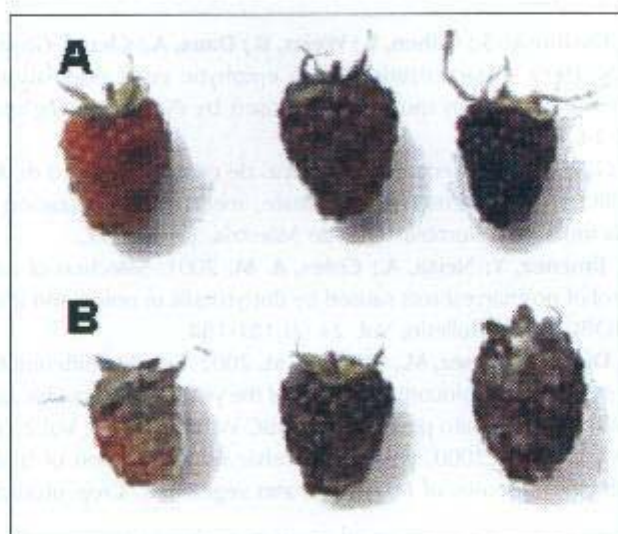


Figura 3. Inhibición del desarrollo del moho gris en frutos de mora de Castilla, mediante el uso de levaduras aisladas de estructuras reproductivas de la misma planta. (A) Tratamiento con la levaduras Lv 297 en presencia del patógeno, (B) Testigo patógeno (en ausencia de la levadura), después de 2 días de inoculación

14. Referencias bibliográficas

Chang-Goyan, T.; Spotts, R. A. 1997. Biological control of postharvest diseases of apple and pear under semi-commercial and commercial conditions using three saprophytic yeast. *Biological Control* 10:199-206.

Cotes, A. M. 2001. Biocontrol of fungal pathogens - from discovery of potential biocontrol agents to implementation of formulated products. *IOBC WPRS Bulletin* Vol 24 (3) 43-47.

Droby, S.; Lischinski, S.; Cohen, L.; Weiss, B.; Daus, A.; Chand-Goyal, T.; Eckert, J. W.; Manulis, S. 1999. Characterization of an epiphytic yeast population of grapefruit capable of supression of green mold decay caused by *Penicillium digitatum*. *Biological Control* 16:27-34.

García P. G. 2001. Búsqueda de alternativas de control biológico de *Rhizopus stolonifer* (Ehr-Fr)Vuill., en la postcosecha de tomate, mediante la utilización de levaduras. Universidad Nacional de Colombia. Tesis de Maestría. Bogotá D.C.

García, P.; Jimenez, Y; Neisa, A.; Cotes, A. M. 2001. Selection of native yeasts for biological control of postharvest rots caused by *Botrytis allii* in onion and *Rhizopus stolonifer* in tomato. *IOBC WPRS Bulletin*, Vol. 24 (3) 181-184.

García, P., Díaz, A., Gómez, M., Cotes, A. M. 2002. Effect of different factors on mass production, formulation and biocontrol activity of the yeast *Pichia onychis* against *Rhizopus stolonifer*, a pathogen of tomato postharvest. *IOBC WPRS Bulletin*. Vol 25 (10) 7-40.

Ippolito, A.; Nigro, F. 2000. Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Crop protection*. 19, 715-723.

Jijakli, M. H.; Lepoivre, P. 1995. Utilisation des biopesticides pour la protection des pommes en conservation. *Le Fruit Belge* 45: 83-88.

Jijakli, M. H. 1996. Étude des propriétés antagonistes de deux souches de levures vis-à-vis de *Botrytis cinerea* Pers. sur pommes en conservation. Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux. Tesis de docteur en Sciences Agronomiques et Ingénierie Biologique. Gembloux. Belgique p.p. 35-40.

McLaughlin, R. J.; Wisniewski, M. E.; Wilson, C. L.; Chalutz, E. 1992. Effect of inoculum concentration and salt solution on biological control of postharvest diseases of apple with *Candida* sp. *Phytopathology* 80:456-461.

Potjewijd, R.; Nisperos, M. O.; Baldwin, E. A. 1995. Cellulose-based coatings as carriers for *Candida guilliermondii* and *Debaryomyces* sp. in reducing decay of oranges. *HortScience*. 30: 1417-1421.

Wilson, C. L.; Wisniewski, M. E. 1989. Biological control of postharvest disease of fruits and vegetables: an emerging technology. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27: 425-441.

Wilson, C. L.; Wisniewski, M. E. 1994. Preface. In. *Biological Control of post harvest disease theory and practice*. Wilson, C. L. & Wisniewski, M. E., eds, CRC Press, USA.