



# Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario

Orietta Fernández-Larrea Vega<sup>1</sup>

## Introducción

Existe un grupo importante de hongos y bacterias que presentan efectos antagónicos con otros microorganismos y esta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos vegetales.

Entre los microorganismos más importantes se encuentran las bacterias de los géneros *Fusarium*, *Pseudomonas* y *Bacillus* y hongos de los géneros *Gliocladium* y *Trichoderma*. Este último es el más utilizado para el control de un grupo importante de patógenos del suelo. El efecto principal de *Trichoderma* es por hiperparasitismo, aunque algunas especies y cepas pueden producir metabolitos bioactivos que incrementan su acción. Además algunos aislamientos controlan nematodos.

En el mundo biológico existe una interacción continua entre los patógenos potenciales y sus antagonistas, de forma tal que estos últimos contribuyen a que en la mayoría de los casos no se desarrolle la enfermedad. En condiciones naturales los microorganismos están en un equilibrio dinámico en la superficie de las plantas.

## Mecanismos de acción

Se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos. Algunos de estos son antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo y lisis enzimática) e inducción de resistencia.

No es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los an-

tagonistas y los patógenos en la planta. En general, los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de éstos es una característica importante para su selección como agentes de control biológico. Si el antagonista posee varios modos de acción reduce los riesgos de desarrollo de resistencia en el patógeno. Este riesgo de resistencia también se reduce mediante el uso de combinaciones de antagonistas con diferente modo de acción.

## Competencia

Esta constituye un mecanismo de acción antagónica muy importante. Puede definirse como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. Un factor esencial para que exista competencia es la escasez o limitación de un elemento porque si hay exceso no hay competencia.

**Competencia por nutrientes.** La competencia más común es por nutrientes, oxígeno o espacio. *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* son dos hongos de poscosecha típicamente dependientes de los nutrientes, como hongos necrotróficos sus esporas requieren de estas sustancias para germinar y comenzar el crecimiento de las hifas antes de penetrar al sustrato. Esos nutrientes se encuentran en las heridas de las frutas y es allí donde la competencia microbiana actúa inhibiendo el desarrollo de estos patógenos.

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal La Habana. Cuba oflarrea@inisav.cu

**Competencia por espacio.** Este tipo de competencia también ha sido evaluado. Las levaduras son eficaces colonizadoras de la superficie de plantas y se destaca la producción de materiales extracelulares (especialmente polisacáridos) que restringen el espacio para la colonización por otros microorganismos.

### Interacción directa con el patógeno

Un tipo de interacción directa entre los antagonistas y los patógenos es el parasitismo (Lecuona 1996).

El parasitismo es la acción de un microorganismo parasitando a otro y puede ser definido como una simbiosis antagónica entre organismos. Este consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. Generalmente, están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasa, celulasa, 1,3-glucanasa y proteasa, que rompen las estructuras de los hongos parasitados. Los ejemplos más conocidos de hongos hiperparásitos son *Trichoderma* y *Gliocladium*. Ambos ejercen su acción mediante varios mecanismos, entre los cuales tiene un rol importante el parasitismo. Los hongos del género *Trichoderma* han sido muy estudiados como antagonistas de patógenos de suelos como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotium cepivorum* y existen varias formulaciones comerciales desarrolladas a partir de ellos.

### Microorganismos antagonistas

#### Bacterias antagonistas

Las bacterias del grupo de *Pseudomonas fluorescens* y las del género *Bacillus* son consideradas las más eficaces para controlar enfermedades foliares y de las raíces.

Dada la diversidad genética en el género *Bacillus*, tanto en el suelo como en la rizosfera, se considera a estos microorganismos como colonizadores eficaces. Las potencialidades del género *Bacillus* sobre *P. fluorescens* han sido señaladas por Kin *et al.* (1997), quienes encontraron mayor emergencia y control de patógenos del trigo cuando utilizaron este género.

Estas bacterias se han evaluado para el control de enfermedades fungosas, determinándose que las aplicaciones de *Bacillus subtilis* pre y poscosecha en aguacate tienen un efecto similar al de los fungicidas comerciales (Korsten *et al.* 1997). Los mejores resultados fueron logrados con un tratamiento integrado que incluía aplicaciones de benomil y oxiclورو de cobre y control biológico, siendo este el primer informe de control biológico pre-cosecha en aguacate. En investigaciones futuras deberán evaluarse el modo de acción

de *B. subtilis*, habitante natural del filoplano del árbol de aguacate.

Recientemente, se desarrolló una formulación de *B. subtilis* para controlar la pudrición radicular del frijol, la cual se evaluó comparando diferentes sustratos y se determinó que en condiciones de laboratorio el tratamiento con turba fue el más eficaz. No obstante, en condiciones de campo la formulación a base de pectina fue la que logró mejor control (Lazarete *et al.* 1994).

Se determinó el efecto de *Bacillus* sp. sobre la germinación y el desarrollo de semillas de tomate infectadas con *Fusarium oxysporium* var *cubensis* (Brada *et al.* 1995); también se realizaron pruebas *in vitro* con *Pseudomonas* sp. y *B. subtilis* aislados de plátano y arroz, respectivamente (Torres *et al.* 2001). Estos microorganismos mostraron la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos del suelo, tales como *Fusarium oxysporium*, f. s. *lycopersici*, *Pythium ultimum*, *R. solani*, *S. rolfsii*, *Phytophthora nicotianae*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium solani*.

Castellanos *et al.* (1995) evaluaron *B. subtilis* para el control de *Alternaria porri* en plantas de cebolla, alternando aplicaciones del producto biológico con las de los fungicidas zineb y oxiclورو de cobre, determinándose que los tratamientos que consistían en la combinación de fungicidas sintéticos y biológicos mostraron mejor control que el resto de los tratamientos.

Uno de los usos de *B. subtilis* como agente de control biológico es mediante el tratamiento de semillas. Su efecto benéfico cuando se aplica junto a las semillas o en forma individual no se debe exclusivamente al antagonismo con los patógenos sino que influye positivamente en la germinación, desarrollo y rendimiento del cultivo debido a la producción de sustancias promotoras del crecimiento y al mejoramiento de la nutrición de las plantas.

Con respecto a *B. subtilis*, se ha estudiado la liberación de compuestos con propiedades antifúngicas como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las Iturinas. Estas últimas son polipéptidos que actúan sobre la pared celular de los hongos. Friddaman y Rossal (1993) observaron vacuolización y deformación de las hifas de *R. solani* y *P. ultimum* provocadas por la formación de un compuesto volátil con propiedades fungicidas.

El efecto antagónico de las bacterias aisladas puede evaluarse usando varios métodos, como los descritos a continuación:

- a) Goteo de los aislamientos. Se colocan 5 o 6 gotas alrededor del borde de una caja de Petri, la cual se deja en incubación durante dos días a 15 °C. Un disco del hongo evaluado, de una semana de crecimiento, se coloca en el centro de la caja y se mide el halo de inhibición.
- b) Depositar una gota del cultivo bacteriano en una caja de Petri a una distancia de 10 cm del micelio del hongo creciendo activamente en PDA. Se incubaba por siete días y después se examina la zona de inhibición.
- c) Las cepas de *Bacillus* se cultivan en un frasco de 500 ml durante siete días en 100-200 ml de caldo de papa, el cual se agita constante; la solución debe mantenerse en la oscuridad. Después se agregan 6 g de agar, se lleva al autoclave a 121°C por 20 min y se procede a verter en cajas de Petri. Una vez que el medio se ha solidificado se colocan en las cajas de Petri discos de 0,7 cm de diámetro conteniendo el hongo a evaluar. La evaluación se basa en el porcentaje de inhibición del hongo.
- d) Las colonias de bacterias antagonistas se siembran utilizando una aguja para este propósito, dejando cuatro colonias por caja de Petri. Se incuban a 28°C durante dos días. Estas se matan con vapores de cloroformo y se retira el crecimiento. Después se hace la siembra del hongo evaluado, preferiblemente ya esporulado, utilizando una aguja para este propósito.

### **Producción de bacterias antagonistas**

El aspecto más importante es decidir la fracción a producir, para lo cual es necesario determinar los modos de acción de la especie. Esto permite definir la estrategia de producción y aplicación. En el caso de las bacterias, su acción principal está dada por la producción de metabolitos bioactivos con efecto antibiótico o lítico, por lo cual deben obtenerse concentraciones altas en los caldos de cultivo de estos organismos y posteriormente lograr su concentración y purificación.

También la producción de biomasa puede resultar importante porque al aplicarse como inóculo al suelo, incrementan su cantidad y logran mejor competencia e interacción con el patógeno. En ambos casos, el método de producción más utilizado es la fermentación sumergida, proceso que tiene posibilidades de ser escalado con gran eficacia. También pueden utilizarse métodos más artesanales como el cultivo líquido está-

tico, que mediante un cuidadoso proceso con el medio de cultivo y los parámetros de incubación adecuados se logra una producción eficiente.

En Estados Unidos hay registrados comercialmente varias especies de microorganismos para el control de patógenos del suelo. Estos incluyen dos hongos (*Gliocladium virens* y *Trichoderma harzianum*), tres bacterias gramnegativas (*Agrobacterium agrobacter* K84, *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia* tipo *Wisconsin*) y dos bacterias del género *Bacillus* (*Bacillus subtilis* GB03 y *B. subtilis* MBI600).

Actualmente, se comercializan a gran escala productos a base de *B. subtilis* siendo los Estados Unidos los líderes en este campo. En 1994, estos productos se aplicaron en 2 millones de ha en ese país. En 1997 Alemania aprobó la comercialización de productos con *B. subtilis* como ingrediente activo. Se han realizado muchas investigaciones sobre el uso de los componentes activos presentes en el caldo de cultivo.

### ***Trichoderma*, hongos antagonista**

La versatilidad, adaptabilidad y fácil manipulación de los hongos del género *Trichoderma* ha permitido su uso en el control biológico. Sin embargo, las deficiencias en las tecnologías de formulación son una limitación para el avance en las investigaciones tecnológicas. *Trichoderma* spp. produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y conidios, éstas son activas contra fitopatógenos en diferentes fases del ciclo de vida, desde la germinación de las esporas hasta la esporulación. El parasitismo puede ocurrir mediante la penetración, engrosamiento de las hifas, producción de haustorios y desorganización del contenido celular. La competencia por el espacio y los nutrientes es más favorable, principalmente para los hongos que se desarrollan en la superficie de las hojas antes de efectuar la penetración, no actuando sobre aquellos que penetran rápidamente. En algunos casos *Trichoderma* actúa sobre algunos patógenos debido a su capacidad de colonizar rápidamente el follaje; también puede colonizar extensivamente una superficie foliar intacta.

Existen diferentes formulaciones de hongos antagonistas y su uso depende del modo de acción. Para uso comercial, el material seco es el preferido por la importancia del peso y la manipulación de los productos durante la comercialización. Las hifas son poco resistentes al secado, por lo cual se trabaja en las formulaciones de las formas reproductoras (conidios y clamidosporas) como polvos humedecibles, polvo seco,

formulaciones en aceite y encapsulados que contienen el hongo. Los conidios son más resistentes que las clamidosporas y se producen en mayor cantidad por diferentes medios (Normas de especificaciones ...1993, Fernández-Larrea 1997, Fernández-Larrea y Ceja 1997)

En Cuba, la elaboración de productos biológicos a partir de diferentes cepas de *Trichoderma* spp. se realiza mediante métodos artesanales y más recientemente mediante producción industrial, para lo cual se utiliza la fermentación sumergida y la fermentación en sólido. La producción artesanal está limitada por el volumen productivo y la imposibilidad de almacenar estos productos a temperatura ambiente por largo tiempo, mientras la producción industrial es una alternativa tecnológica muy eficiente desde el punto de vista productivo y económico para la obtención de fungicidas biológicos de alta calidad, los cuales se han evaluado ya en condiciones de laboratorio. Además éstos productos tienen un mercado potencial, sobre todo en países donde la agricultura sostenible está tomando mayor importancia.

En la actualidad, y mediante la capacidad instalada en Cuba se elabora un promedio de 250 toneladas por año, que permiten proteger más de 100 000 ha de cultivos de importancia económica, tales como tabaco, tomate y chile, tanto en condiciones de campo como en invernadero. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevos métodos de fabricación de productos finales como polvos secos que cumplan con los requisitos para el registro como producto comercial.

En Cuba se produce artesanalmente *Trichoderma* en presentación sólida, líquida estática y bifásico (líquido-sólido). La concentración de conidios en la presentación líquida es de  $2-3 \times 10^8$  conidios/ml y en la presentación sólida del hongo de  $2-3 \times 10^9$  conidios/g. La presentación sólida se incuba durante 7-15 días, el líquido estático durante 10-15 días y el bifásico se mantiene en agitación por 24-72 h, luego por 5-7 días estático y en sólido durante otros 5-7 días. La presentación líquida se usa en dosis de 40 L de solución final en 400 L/ha, mientras la presentación sólida es usada en dosis de 20 g/m<sup>2</sup> o 40 L/ha. Cuando *Trichoderma* es utilizado para el control de hongos del suelo, pueden

mezclarse con materia orgánica u otras enmiendas utilizadas como fertilizantes, tal como se hace con inoculantes bacterianos usados como fertilizantes biológicos.

#### **Control de calidad y bioensayo**

El control de calidad de los productos de *Trichoderma* obtenidos por métodos artesanales se refieren principalmente al control de la pureza del producto, la concentración de esporas por mililitro, lo cual se realiza mediante el conteo usando un microscopio en cámara de Neubauer y la verificación de la viabilidad de los conidios, mediante microcultivo en portaobjetos.

En el caso de los productos sólidos molidos se determina el tamaño de partícula .

El bioensayo constituye el proceso más importante del control de calidad. Para esto se sigue el procedimiento descrito a continuación:

Se prepara una suspensión con 1 g del preparado biológico en 10 ml de agua destilada estéril, la cual se deja 1 h. Transcurrido este tiempo se realizan diluciones hasta  $10^{-4}$  conidios/ml.

En cajas de Petri con Agar-Papa-Dextrosa con los antibióticos Rosa de Bengala 17 ppm y sulfato de estreptomicina 30 ppm, se siembra 1 ml de la suspensión usando una espátula. Se preparan tres cajas por muestra. Estas se incuban por 72 h a  $25 \pm 2$  °C. Transcurrido este tiempo se examina el crecimiento de *Trichoderma*, contando el total de colonias por caja de Petri.

Se siembra una porción del micelio y conidios en una caja con agar agua. Se deja crecer durante 58 h y posteriormente se obtienen discos de 0,5 cm.

En cajas de Petri conteniendo Agar-Papa-Dextrosa se siembra un disco de *Trichoderma* sp. en un extremo y en el otro extremo de la otra caja un disco similar con el crecimiento del patógeno. Se hacen 3 repeticiones. Posteriormente, se mide el crecimiento lineal de cada colonia al enfrentarse una con otra (entre 4-6 días), valorando la actividad competitiva por el sustrato.

El valor promedio del crecimiento lineal de *Trichoderma* sp. estará entre 5-6 cm en comparación con la cepa probada. Podrá observarse hiperparasitismo y en muchos casos incremento de la esporulación cuando crece sobre la colonia del patógeno.

## Control de calidad de producciones de *Trichoderma*

### Control del Proceso

#### Medios de cultivo

- Esterilidad
- pH
- Materias primas

#### Inóculo

- Pureza
- Viabilidad
- Concentración

#### Incubación

- Temperatura del cuarto de crecimiento

### Control de producto

- Pureza
- pH
- Concentración conidios/ml
- Características del cultivo
- Efectividad biológica por bioensayo (cultivo dual)

#### Almacenamiento

- Control de temperatura
- Tiempo de estabilidad

## Bibliografía

- Brada, IE; Quintana, E; Pelaya, E; Araujo, T. 1995 Efecto de *Bacillus* sp. sobre la germinación y desarrollo de semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* M.) infestadas con *Fusarium oxysporum* Schl. var. *cubensis* Smith. Resúmenes Bioplág 95. (1995, Ciudad Habana, Cuba). INIFAT p. 11.
- Castellanos, JJ; Oliva, P; Izquierdo, E; Morales, N. 1995. Evaluación de *Bacillus subtilis* como biocontrol del patógeno *Alternaria porri* (Ell). Cif en cebolla. In Bioplág 95. (1995, Ciudad Habana, Cuba). INIFAT. p. 21.
- Chet, J. 1987. *Trichoderma*. Application, mode of action and potential as biocontrol agents of soilborne plant pathogen fungi. Wiley 46 p.
- Dunn, RT; Lewis, SA; Papavizas, GO. 1983. Production and fermentation of two biological control agents from liquid fermentation. *Phytopathology* 73:165.
- Elad, Y. 1993. Isolate of *Trichoderma harzianum* I-952 fungicidal compositions containing said isolate and use against *B. cinerea* and *S. sclerotiorum*. PN 5666316.E.U.
- Fernández-Larrea, O. 1985. Microorganismos entomopatógenos y antagonistas: posibilidades de producción. CID-INISAV. Boletín Técnico no. 1.
- Fernández-Larrea, O. 1997. Procedimiento para la obtención de productos líquidos concentrados estables por cuatro meses de *Trichoderma harzianum*. Cuba, OCPI. 8 p.
- Fernández-Larrea, O; Cenjas, A. 1997. Producción y conservación de productos de *Trichoderma* por vía fermentativa. 1977. 26 p.
- Harman, G; Lumrden; 1990. The Rhizosphere. New York, Wiley & Sons. p. 259 - 280
- Kim, DS; Cook, RJ; Weller, DM. 1997. *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root disease of wheat grown with reduced tillage. *Phytopathology* 87:551-558.
- Kononova, E. 1986. Conferencias sobre hongos entomopatógenos y antagonistas. Cuba, INISAV. 8 p.
- Korsten, L; De Villiers, EE; Wehner, RC; Kotzet, JM. 1997. Field spray of *Bacillus subtilis* and fungicides for control of preharvest fruit disease of avocado in South Africa. *Plant Disease* 81:455-459.
- Lazzarete, E; Menten, JOM; Bettiol, W. 1994. *Bacillus subtilis* antagonistas aos principais patógenos asociados a sementes de feijão e trigo. *Fitopatología Venezolana* 7:42-46.
- Lecuona, RE. Ed. 1996. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Argentina. 338 p.
- Normas de especificaciones para el control de calidad de *Trichoderma*. CEN. Normas Cubanas. Fernández-Larrea, O; Sandoval, I. Ed. Cuba, INISAV-MINAGRI. 12 p.
- Papavizas, G; Dunm, M; Jack, L. 1984. Liquid fermentation technology for experimental production of biocontrol fungi. *Phytopathology* 1171-1175.
- Rousos, S. 1989. Obtención de biopreparados a partir de *Trichoderma harzianum*. Tesis. Francia. 160 p.
- Stefanova, M. 1995. Producción de metabolitos por cepas de *Trichoderma* spp. Informe de investigación. Cuba, INISAV. p. 6.
- Torres, LA; Wong, W; Miguel, A; Fernández, A; Amat, Z. 2001. Actividad antagónica de especies de *Bacillus* spp contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*. Revista Fitosanidad Aceptado para publicación.