

FORMULACIÓN DE ASOCIACIONES MICROBIANAS PARA ESTABLECER SU COMPATIBILIDAD (Evaluar fitopatógeno).

ANGARITA, Guzmán Karen, CAMPUZANO, Soto Katrín Valeria, FUENTES, Corzo Laura Milena, MARIN, Zulaga Sara Victoria, ACEVEDO, Carlos

Resumen

Rhizopus sp. es considerado uno de los principales hongos fitopatógeno que provocan enfermedades postcosecha, su rápida velocidad de crecimiento le permite colonizar la superficie de los productos agrícolas y causar la enfermedad conocida como pudrición blanda de frutas y hortalizas ocasionando importantes pérdidas económicas. Este proceso se desarrolla mediante la excreción de enzimas pépticas del hongo que degradan y disuelven las pectinas de la lámina media de las células vegetales. Durante varios años se han empleado fungicidas sintéticos para controlar a este microorganismo; sin embargo, en diversos estudios se ha demostrado que estos compuestos han causado resistencia en las cepas. En la búsqueda de alternativas naturales para el control de las pudriciones postcosecha, se han valorado opciones como el empleo de antagonismo microbiano. En este estudio se quiso evaluar si el pool microbiano "fungicida biológico" protege la planta de guayaba (*Psidium guajava*) de *Rhizopus sp.* La metodología se basó en elaboración de pool microbiano con bacterias fijadoras de nitrógeno y hongos biocontroladores. Como resultados obtenidos se determinó que el fungicida biológico más adecuado para el control de fitopatógenos es (Bacteria 1, Bacteria 2, Bacteria 3, Hongo 1, Hongo 2).

Palabras clave: *Rhizopus sp.*, *Azotobacter sp.*, *Rhizobium sp.*, *Azospirillum sp.*, *Trichoderma sp.*, pool microbiano, biocontrolador.

Introducción

Los productos agrícolas son susceptibles al ataque de microorganismos, destacándose los hongos como agentes etiológicos de diversas enfermedades. Aunque los tratamientos fungicidas han sido el método principal para el control de enfermedades, la preocupación pública sobre residuos de fungicidas en los alimentos y el desarrollo de resistencia a los fungicidas por patógenos ha aumentado la búsqueda de medios alternativos de control de la enfermedad. El control biológico de las degradaciones de frutas y verduras ha surgido recientemente como una alternativa prometedora para el uso de fungicidas.⁽¹⁾

Rhizopus sp. es considerado uno de los principales hongos fitopatógenos que provocan enfermedades postcosecha, es el agente causal de la pudrición blanda de frutas y hortalizas ocasionando importantes pérdidas económicas. Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza sobreviviendo de manera saprófita en el suelo y en residuos orgánicos con el potencial de invadir tejidos vegetales. Entre sus características particulares, se encuentran la

formación de micelio aéreo carente de septos y la producción de esporangióforos que presentan en sus puntas esporangios esféricos donde se alojan las esporangiosporas, las cuales muestran diferentes formas: globosas, elipsoidales y angulares con superficies lisas o estrías distintivas.⁽²⁾

Las esporas de *Rhizopus sp.* pueden sobrevivir largos períodos sin agua y soportar temperaturas elevadas, germinando sobre tejidos vegetales dañados y generando rápidamente la maceración de los tejidos y la pudrición de los frutos.⁽²⁾

Los microorganismos antagonistas (bacterias, levaduras y hongos) tienen la capacidad de ejercer un efecto de control biológico sobre diferentes patógenos de interés y se han empleado para controlar diversas enfermedades en frutos y vegetales.⁽³⁾

El control de las pudriciones postcosecha ocasionadas por *Rhizopus sp.* ha sido objeto de numerosos estudios y ensayos, desde compuestos químicos hasta métodos alternativos naturales que incluyen el uso de compuestos inocuos.⁽⁴⁾

Las tendencias actuales involucran el empleo de productos vegetales, antagonistas microbianos y quitosano, solas o combinadas entre sí para potenciar su efecto ⁽⁵⁾

La formulación de un pool microbiano “fungicida biológico” permite combinar microorganismos para que complementen sus funciones metabólicas y ejerzan un efecto de control biológico sobre el patógeno y proteger el árbol de guayaba (*Psidium guajava*).

Control biológico es el uso de un organismo para controlar a otro. Se basa en la utilización, principalmente, de un grupo de hongos y bacterias que presentan efectos antagónicos frente a otros microorganismos patógenos vegetales. De este modo, cepas especialmente seleccionadas pueden ser aplicadas y formuladas artesanal o industrialmente, para el control biológico de enfermedades de cultivos de importancia agrícola.⁽⁶⁾

Azotobacter sp., y *Azospirillum sp.*, son bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico, aumentan la capacidad de solubilización del fósforo orgánico e inorgánico del suelo, colonizan las raíces de las plantas produciendo fitohormonas como giberelinas (inducen a la germinación de las semillas y controlan el crecimiento vegetal), citocininas (fomentan y favorecen el crecimiento de las yemas laterales), auxinas (sustancias promotoras del crecimiento vegetal), esto trae como consecuencia un aumento en la captación de nutrientes.⁽⁷⁾ Mientras que *Rhizobium sp.* Hace parte de los rizobios, que son bacterias del suelo capaces de vivir como saprofitos libres, pero que también tienen capacidad para inducir en las raíces de las leguminosas la formación de nódulos radicales, dentro de los cuales son capaces de realizar la fijación del nitrógeno.⁽⁸⁾

Trichoderma sp. es un hongo que se utiliza como agente de control biológico contra las enfermedades fúngicas de la planta; el agente de biocontrol crece generalmente en su hábitat natural en la superficie de la raíz, y así afecta enfermedad de la raíz en particular, pero también puede ser eficaz contra las enfermedades foliares. Los diversos mecanismos incluyen antibiosis, el parasitismo, la inducción de la resistencia de la planta hospedante, y la competencia.⁽⁹⁾

Metodología

Asociaciones microbianas

Azotobacter sp., *Rhizobium sp.*, *Azospirillum sp.*, y dos controladores biológicos (*Trichoderma sp.*) se obtuvieron del cepario de Microbiología Industria de la UDES los cuales se sembraron en un mismo medio de cultivo, agar avena de la siguiente manera: B: bacteria H: hongo(B1- b2);(B1-B3);(B2-B3);(H1-H2);(B1-B2-B3);(H1- H2-B1);(H1-H2-B2);(H1-H2-B3);(H1-H2-B1-B2 -B3).Luego del crecimiento se realizó descripciones microscópicas y macroscópicas inoculando microorganismo asociados para formar el “pool microbiano” .

Aislamiento de Fitopatógeno.

Se aisló de *Rhizopus stolonifer* a partir de fresas infectadas en medio de cultivo PDA (Agar papa dextrosa).

Realización del Pool Microbiano modificado.

Se preparó un agar líquido (NaCl 5gr, avena molida 15gr, agua destilada estéril 450 ml) y se le adicionaron las diferentes mezclas obtenidas anteriormente.

Evaluación del Pool microbiano frente al Fitopatógeno. Primera parte: Se escogieron 9 plantas de guayabo con crecimiento medio. Se les aplico 8 ml de splash para cubrir la totalidad de las plantas con cada una de las mezclas. Luego de 12 horas se le aplico la misma cantidad de splash aplicando el Fitopatógeno. (Nota: cada una de las plantas se le adiciono una mezcla diferente, por ejemplo si se le adiciono la primera mezcla solo puede aplicársele a esa planta, luego de las 12 se le aplicaba el fitopatógeno. El procedimiento descrito, supervisado durante 8 días.

Segunda parte:

Se efectuó igual que el procedimiento anteriormente descrito pero primero se le aplico el fitopatógeno y luego de las 12 horas las mezclas propuestas como Pool Microbiano.

Descripción de características

Luego de las observaciones durante el tiempo determinado, se les realizó descripción de características teniendo en cuenta los siguientes parámetros: Área folicular; número de hojas, longitud del tallo; grosor del tallo; longitud de la raíz; color del tallo y raíz.⁽¹⁰⁾

Resultados

Asociaciones microbianas

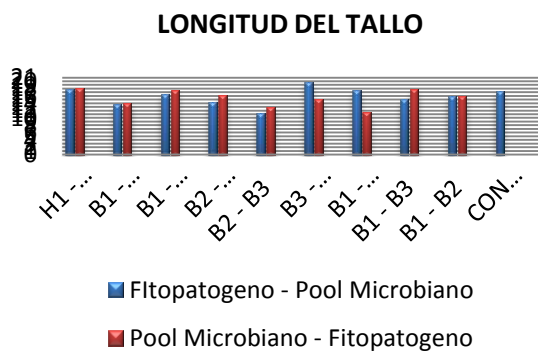
Asociaciones microbianas de bacterias promotoras de crecimiento vegetal y biocontroladores. Bacteria 1 (*Rhizobium sp*); Bacteria 2 (*Azospirillum sp*); Bacteria 3 (*Azotobacter sp*); Hongo 1 (*Trichoderma sp* aislada de orquídea); Hongo 2 (*Trichoderma sp* aislada de higuera). El conjunto de imágenes observadas muestran las diferentes interacciones de los microorganismos las cuales presentaron la capacidad de crecimiento en el agar avena. Tomando la avena como fuente de carbono y el cloruro de sodio mantiene el equilibrio⁽¹⁾ osmótico debido a que los hongos necesitan un nivel de humedad relativamente alto; todos estos componentes ayudan al desarrollo del microorganismo. (ver figura 1)

Figura N°1:



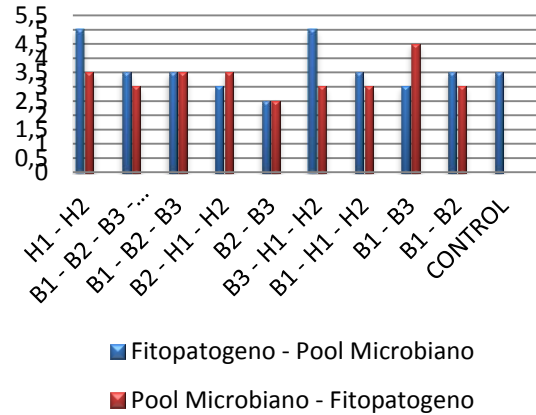
Evaluación del Pool microbiano frente al Fitopatógeno Descripción de características

Grafica N°1



Grafica N°2

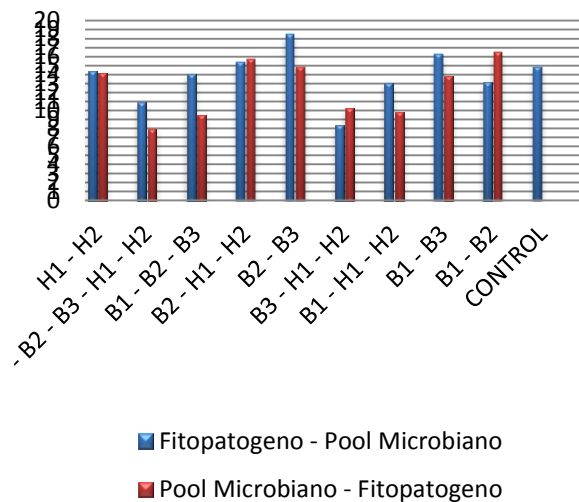
GROSOR DEL TALLO



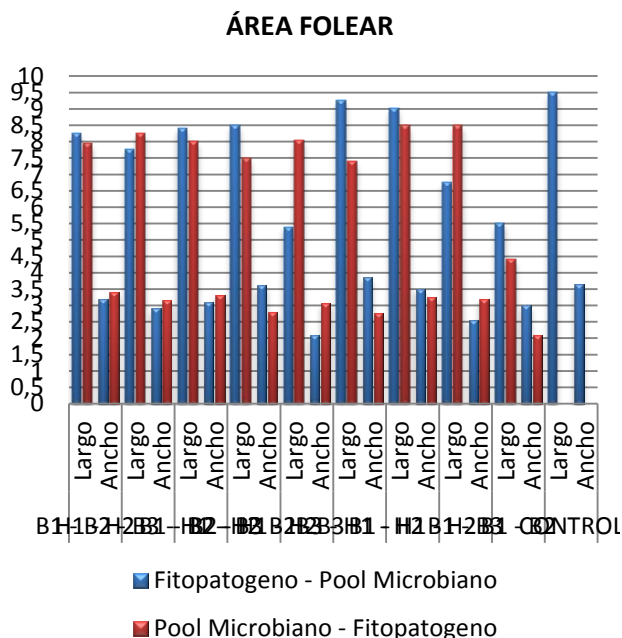
En las gráficas se observan los promedios de las características de las plantas frente a las diferentes mezclas de pool microbianos, evaluando la forma de crecimiento de los microorganismos sobre *Psidium guajava*. La primera grafica se evidencia la longitud de tallo y la segunda el grosor de este mismo. Se puede determinar que las plantas que primero se les aplico las mezclas de los pool microbiano presentaron capacidades de inhibir el crecimiento de *Rhizopus sp*. A diferencia de las plantas que se les aplico primero el fitopatógeno que presentaron lecciones en las hojas o la falta de abundancia de las raíces las cuales no se logró calcular el área foliar por presentar efectos negativos.

Grafica N°3

LONGITUD DE LA RAZA



Grafica N° 4



La grafica 3 y 4 evalúan el área foliar y longitud de la raíz, como se mencionó anteriormente las plantas que se les aplico primero el pool microbiano proporciono resultados positivos a diferencia de la otros forma de evaluación de las mezclas. Con respecto al área foliar las hojas que se les aplicaba en primera instancia el fitopatógeno presentaban lecciones como manchas, marchitez y debilitamiento completo de esta. Cabe resaltar que algunas mezclas de la propuesta para el mejor pool microbiano tuvieron aumento de actividad antagonica que otras como es el caso de la mezcla completa de todos los microorganismos y las que presentaban hongos debido a que ellos son considerados biocontroladores de fitopatógenos. Con referencia a la gráfica N°3 las plantas que tenían mayor abundancia en sus raíces presentaron una disminución en la formación de lecciones.(ver tabla 3).

Conclusiones

Los microorganismos tiene la capacidad de crecimiento dependiendo diferentes variables como nutrientes, pH, temperatura entre otros. Los microorganismos que conforman el pool microbiano evaluado tiene la capacidad de crecer con al menos un nutriente básico para su desarrollo en este caso la harina de avena.

Se pudo establecer que los mezclas del pool microbiano tenían un mayor aumento con respecto a la actividad antagonicas las que presentaban en sus componentes los microorganismos fúngicos (*Trichoderma sp.*).

Se aprendió la importancia industrial que tienen los microorganismos fijadores de nitrógeno y biocontroladores para la inhibición del fitopatógeno *Rhizopus sp.*

Se evaluó la actividad del pool microbiano frente a al fitopatógeno *Rhizopus sp.* Debido a que inhibió su crecimiento.

Se determinó que el fungicida biológico más adecuado para el control de fitopatógenos es (Bacteria 1, Bacteria 2, Bacteria 3, Hongo 1, Hongo 2)

Bibliografía

1. S. P. Tian*†, Q. Fan, Y. Xu and A. L. Jiang, Blackwell Science, Ltd Effects of calcium on biocontrol activity of yeast antagonists against the postharvest fungal pathogen *Rhizopus stolonifer*, *Plant Pathology* (2002) 51, 352–358.
2. Pérez, Josam Vega. Efecto del quitosano en la funcionalidad de la membrana plasmática de *Rhizophus stolonifer*, México, D.F. 2009
3. Lauzardo, Ana Niurka Hernández, Baños, Silvia Bautista, Velázquez-del Valle, Miguel Gerardo, Rodríguez, Annia Hernández. Uso de Microorganismos Antagonistas en el Control de Enfermedades Postcosecha en Frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, vol. 25, núm. 1, pp. 66-74, enero-junio, 2007.
4. Guerra, Beatriz Elena. evaluación de la actividad fungicida del aceite esencial de *Lippia organoides* (Verbenácea) en *Rhizopus stolonifer* y *Fusarium oxysporum*.
5. Miguel Gerardo Velázquez-del Valle, Silvia Bautista-Baños, Ana Niurka Hernández-Lauzardo, María Guadalupe Guerra-Sánchez y Enriqueta Amora-Lazcano Estrategias de Control de *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. (Ex Fr.) Lind, Agente Causal de Pudriciones Postcosecha en Productos Agrícolas. *Rev. mex. fitopatol* vol.26 no.1 Ciudad Obregón ene. 2008.

6. Karina Mendoza Rodriguez. Biocontroladores. Universidad de Talca.
7. Bacteria *Azospirillum brasilense* y *Azotobacter chroococcum* promotoras del crecimiento vegetal.
8. Miguel Redondo-Nieto, Ildelfonso Bonilla, Luis Bolaños. Fijación biológica del nitrógeno.
9. Trichoderma, Especies, Características, Teleomorfo, Habitat, Agente de biocontrol, Agente causal de la enfermedad, Usos médicos, Uso industrial. E-CENTRO
10. Acevedo, Carlos. Formulación de asociaciones microbianas para establecer su compatibilidad. 2014.
11. Medios de cultivo y pruebas bioquímicas.