

Notas del Director

En el cultivo de la palma, las plagas han sido y son una amenaza permanente para la productividad del cultivo, efecto que en muchos casos se intensifica por la carencia de un manejo uniforme entre plantaciones vecinas.

El enfoque que ha dado CENIPALMA para el Manejo Integrado de las Plagas (MIP) tiene básicamente tres componentes: El primero es un manejo agronómico apropiado del cultivo, relacionado con mantenimiento y nutrición del mismo. En la medida en que el cultivo esté bien nutrido y con un mantenimiento apropiado, va a estar la planta en mejores condiciones para soportar los ataques de los diferentes plagas. Otro componente del MIP el cual se va difundiendo en muchas plantaciones de las diferentes zonas palmeras, está basado en propiciar condiciones favorables para la multiplicación de parasitoides y depredadores o enemigos naturales de las principales plagas. Esto se ha venido haciendo con el incremento de siembras de plantas arvenses alrededor de los lotes y en muchas ocasiones dentro de ellos, con resultados muy positivos. Un tercer componente complementario a las anteriores, es la utilización de entomopatógenos que pueden ser un poco más difíciles de manejar que los parasitoides y depredadores, pero que en determinados momentos son claves para el control de una plaga.

En la colección, identificación, evaluación y formulación de estos entomopatógenos CENIPALMA ha venido trabajando durante varios años y en este proceso se cuenta ya con una colección importante de ellos. En este CENIAVANCE se describen las etapas de colección, evaluación y formulación de los biopesticidas como un ejemplo del tipo de trabajo que estamos haciendo.

PEDRO LEÓN GÓMEZ CUERVO
Director Ejecutivo

Desarrollo de un bioplaguicida con base en *Beauveria sp.* para el control de plagas de la palma de aceite¹



Los altos costos de control de plagas generados por la utilización de productos químicos de manera indiscriminada en los cultivos de palma, han generado la búsqueda de nuevas alternativas de control que vayan de acuerdo con las tendencias de manejo integrado de plagas en el ámbito mundial, favoreciendo el ecosistema y disminuyendo los costos de producción del cultivo. Entre las alternativas más importantes en el control de plagas en el cultivo de palma de aceite se encuentra el uso de microorganismos entomopatógenos como hongos, virus y bacterias.

Aunque el uso de agentes biológicos para el control de plagas es una alternativa viable, no se debe olvidar que al ser estos agentes vivos, presentan ciertas desventajas con respecto al uso de agentes químicos. La principal desventaja del uso de agentes biológicos para el control de plagas es su susceptibilidad a los factores ambientales adversos como las altas temperaturas y las bajas humedades relativas, condiciones que se presentan en algunas zonas palmeras del país. Para disminuir el efecto negativo que estos factores producen, se puede conferir al microorganismo, por medio de un proceso de formulación, características físicas que favorezcan el establecimiento del agente microbiano en el campo.

En el laboratorio de entomopatógenos de Cenipalma se ha venido adelantando un proceso de colección de

hongos entomopatógenos de diferentes zonas del país, con el fin de evaluar la efectividad de los aislamientos obtenidos en el control de insectos plaga de importancia económica y así presentar alternativas de control diferentes al uso de productos químicos.

El desarrollo de un bioplaguicida es un proceso tecnológico que incluye varias etapas. La primera de ellas es la selección del microorganismo, la cual se debe hacer teniendo en cuenta su alta actividad biocontroladora. Una segunda etapa en el desarrollo de un bioplaguicida es la preformulación; en esta se evalúan todos los excipientes o auxiliares de formulación, que de acuerdo con el tipo de formulación que se requiera, puedan conferir al microorganismo las características físicas adecuadas para facilitar su manipulación. Como característica importante, los excipientes seleccionados deben ser inocuos frente al insecto y al microorganismo y deben conferir estabilidad a este en condiciones de almacenamiento. Para determinar el tipo de formulación que se desea desarrollar se deben tener en cuenta los hábitos del insecto que se quiere atacar, ya que una formulación de aplicación foliar tiene características físicas diferentes a las de un producto diseñado para ser aplicado en el suelo. Por lo tanto, la selección de los excipientes debe hacerse de acuerdo con las características físicas que se deseen conferir al microorganismo (Valencia, 2000). Otra etapa dentro del desarrollo de un producto es la formulación. En ella se determinan las cantidades exactas de cada uno de los excipientes seleccionados; además en esta se evalúa la efectividad de la formulación en el control de la plaga frente a los seres vivos y la estabilidad física y microbiológica del producto en condiciones de almacenamiento. El desarrollo de todas estas etapas asegurará que el producto obtenido sea altamente eficaz en el control de los insectos plaga cuando sea aplicado en el campo.

Con este Ceniavances se pretende dar a conocer la forma como se está procediendo para llegar a formular un bioplaguicida a base del hongo *Beauveria bassiana* para el control de defoliadores.

1. Carolina Valencia C. Microbióloga Agrícola - Veterinaria, Cenipalma

Materiales métodos

Establecimiento de la colección de controladores

Para la colección de nuevos aislamientos de hongos entomopatógenos se realizaron recorridos por diferentes plantaciones de la zona, buscando en campo insectos que presentaran crecimiento micelial en la cutícula. Posteriormente los insectos se llevaron al laboratorio y se colocaron en cámaras húmedas. El insecto previamente fue sometido a un proceso de desinfección, sumergiéndolo en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5%, durante un minuto y realizando tres lavados con agua destilada estéril (A.D.E); una vez se observó la esporulación del hongo sobre el insecto, se realizó la siembra en agar papa dextrosa (P. D. A.) y se llevó a incubar a 28°C durante cinco días aproximadamente. Este procedimiento se realizó con todos los insectos colectados en campo.

Una vez se tiene el microorganismo aislado, éste se debe conservar en tubos de ensayo con agar inclinado y mantenido a temperatura de refrigeración, con el fin de conformar el banco de hongos entomopatógenos. Para la realización del presente estudio se tomó una cepa de *Beauveria bassiana* aislada de *Stenoma cecropia* Meyrick.

Proceso de preformulación

Para definir el tipo de presentación de la formulación a desarrollar, se tuvo en cuenta el comportamiento de los estados larvales de los insectos defoliadores. Con base en estas características de comportamiento se determinó que la formulación podría ser un polvo mojable o gránulos dispersables en agua. Para ello se eligieron los auxiliares de formulación que se presentan en la tabla No 1.

Tabla No. 1. Excipientes seleccionados en el proceso de preformulación de *B. Bassiana*.

Excipiente	Código	Tipo de Acción
Caolín	D001	Diluyente
Bentonita	D002	Diluyente
Carbonato de Calcio	D003	Diluyente
Gelatina	A001	Adherente
Dióxido de titanio	P001	Fotoprotector
Oxido de Zinc	P002	Fotoprotector

Se realizó la caracterización física de los excipientes seleccionados con el fin de conocer las posibles propiedades físicas de los productos a desarrollar y así prever posibles problemas de manipulación en la manufactura del producto. Las características físicas evaluadas fueron pH, el cual se fundamenta en la actividad del ion hidronio en solución. La acidez o alcalinidad del producto final está determinada por los auxiliares de formulación empleados. En los productos biológicos, el pH es importante para garantizar la viabilidad del hongo, ya que ésta se ve afectada por pH superiores a 10 e inferiores a 5 (CENICAFE, 1997). La humectabilidad la cual es una propiedad que se define como el tiempo que tarda una sustancia en humedecerse por completo. Esta medida, se relaciona con el tipo de materiales de los cuales esté constituido el producto y con la solubilidad

de cada uno de estos en el agua (CENICAFE, 1997). Otra característica importante es la Voluminosidad que se define como el volumen que ocupa un peso dado de un material. Esta característica está determinada por el tamaño y forma de las partículas, e incide directamente en el llenado de los recipientes (Voight y Borns, 1979).

Las características físicas del producto final están relacionadas con las características individuales de cada uno de los excipientes utilizados en el proceso de formulación.

Estabilidad en condiciones de almacenamiento

Otra característica importante que se debe evaluar en un proceso de formulación es la compatibilidad de los auxiliares de formulación con el agente biológico y los posibles efectos adversos que estos puedan ocasionarle, tales como la pérdida de la viabilidad, la disminución de la concentración y el porcentaje de germinación. Para evaluar este efecto se realizó la prueba de almacenamiento, colocando 1 g de la muestra con 1 g de cada uno de los excipientes en viales de vidrio con tapón de caucho. Estos se llevaron a temperatura de refrigeración 6-8°C aproximadamente; mensualmente durante 6 meses se evaluó la disminución en la concentración y el porcentaje de germinación en todos los tratamientos incluido el testigo, al cual no se le agregó ningún tipo de excipiente.

Control de calidad

Como parámetros para evaluar el comportamiento del hongo *B. bassiana* en condiciones de almacenamiento, se tuvo en cuenta la concentración y el porcentaje de germinación. La determinación de la concentración se realizó por el método de conteo en placa y conteo en cámara de Neubauer (CENICAFE, 1997). Esta prueba se realiza sembrando diluciones en serie por triplicado. Para garantizar la uniformidad del producto en la suspensión, es necesario realizar la primera dilución licuando 1 gramo del producto en 99 ml de Tween 80 al 0.1% durante treinta segundos. A partir de la dilución obtenida (10^{-1}), se realizan diluciones sucesivas en tubos que contengan 9 ml de Tween 80 al 0.1%. Posteriormente se siembra 1 ml de las diluciones en cajas de petri que contengan Agar Sabureaud Rosa de Bengala (S.R.B). Para la determinación del porcentaje de germinación se utilizó la técnica descrita por CENICAFE en 1997, tomando 1 gramo de cada producto y realizando diluciones seriadas en tubos de 9 ml de agua peptonada, posteriormente se incubó a 28°C durante veinticuatro horas. Transcurrido ese tiempo, las láminas son observadas al microscopio para realizar el conteo de diez campos ópticos y contabilizar el número de conidios germinados y no germinados para obtener el porcentaje de germinación.

Resultados y discusión

Colección de entomopatógenos

El banco de microorganismos cuenta con 10 nuevos aislamientos de *Beauveria* sp., un aislamiento de *Metarhizium* sp. y uno de *Paecilomyces lilacinus*. El banco inició actividades en 1998 y en el año 2000 reportó una colección de 118 aislamientos de hongos entomopatógenos (Cenitavances No. 73).

Actualmente todos estos aislamientos se encuentran conservados en tubos de ensayo con agar P.D.A en el laboratorio de entomopatógenos de Cenipalma a temperatura de refrigeración.

Proceso de preformulación

A excepción del D001 (Caolín) y A001 (Gelatina) los cuales presentaron valores de pH de 5.0 y 6.0 respectivamente, todos los excipientes tienen valores de pH que pudieron no afectar al hongo en condiciones de almacenamiento, ya que fueron valores cercanos a siete o ligeramente básicos. Sin embargo todos presentan valores de pH que se encuentran en los límites reportados por la literatura como permitidos para productos biológicos.

En cuanto a la humectación, todos los excipientes evaluados presentaron tiempos de humectación menores a veinte segundos, lo que indica que fueron solubles en agua por lo que no presentarán problemas en el momento de la preparación de los productos para ser aplicados en el campo.

Los valores de Voluminosidad de todos los excipientes medidos en ml/g fueron menores a 5 por lo que no se presentarán problemas de manipulación del producto en el proceso de llenado de recipientes.

Los valores de cada una de las pruebas físicas realizadas a los excipientes se muestran en la tabla No 2.

Tabla No. 2. Resultados de pruebas físicas a excipientes

Excipientes	pH	Humectabilidad	Voluminosidad ml/g
D001	5.0	< 20 segundos	1.39
D002	9.0	< 20 segundos	1.39
D003	9.0	< 20 segundos	1.19
A001	6.0	< 20 segundos	1.7
P001	8.5	< 20 segundos	1.39
P002	7.5	20 segundos	2.01

Los resultados de las pruebas físicas evaluadas para cada uno de los excipientes permiten concluir que los valores de pH, humectabilidad y Voluminosidad de cada uno de ellos se encuentran en los límites reportados para auxiliares de formulación para productos biológicos, por lo que podrían ser utilizados en el proceso. Sin embargo, se debe tener en cuenta el comportamiento del hongo frente a cada uno de estos en condiciones de almacenamiento, para realizar la selección definitiva de los excipientes a utilizar en el proceso.

Estabilidad en condiciones de almacenamiento

Después de 6 meses de almacenamiento del hongo con cada uno de los auxiliares de formulación a una temperatura de 6°C aproximadamente,

se observó una disminución drástica en el porcentaje de germinación y en la concentración en todos los tratamientos.

Concentración

Con relación a las pérdidas en la concentración de *B. bassiana* en todos los tratamientos presentan pérdidas significativas después del cuarto mes de almacenamiento.

La disminución de la concentración después de cinco meses de almacenamiento es similar en todos los tratamientos a excepción del testigo el cual tuvo una disminución en la concentración de 1.9×10^8 esp/g a 1×10^4 esp/g, mostrando el efecto negativo que sobre el microorganismo tiene el almacenamiento de los hongos sin ningún tipo de formulación, por periodos de tiempo prolongados.

En los tratamientos D001 se observa una disminución en la concentración de *B. bassiana* de 1.9×10^8 esp/g a 1×10^5 esp/g (Tabla 3), hecho que se podría relacionar con el pH del diluyente, el cual es de 5. Esta pérdida en la concentración se relaciona directamente con el bajo porcentaje de germinación del hongo después de cinco meses de almacenamiento, al sexto mes de almacenamiento no se encuentran diferencias significativas con respecto al mes quinto, sin embargo se espera que la tendencia a la disminución en la concentración continúe.

La disminución de la concentración presentada en el ensayo con A001 fue de 1.9×10^8 esp/g a 1.4×10^5 esp/g después de cinco meses de almacenado. Este resultado no presenta diferencias significativas respecto al sexto mes y permite pensar en la eliminación de este adherente como auxiliar de formulación, pudiendo ser reemplazado por un vehículo aceitoso que permita una mejor adhesión del producto a la superficie foliar en el momento de la aplicación.

Con respecto a la disminución de la concentración de *B. bassiana* en el tratamiento que contiene el D003, el comportamiento es similar al de los otros tratamientos. Después de seis meses de almacenamiento presenta el menor porcentaje de germinación entre los tratamientos comparado con los demás diluyentes, ya que el tratamiento con el D002 aunque presenta una pérdida menor en la concentración, ésta no es significativamente diferente respecto a los demás diluyentes. Sin embargo, respecto a la disminución en el porcentaje de germinación esta presenta las menores pérdidas. El objetivo de la incorporación de un diluyente dentro del proceso de formulación es dar forma física a los gránulos dispersables en agua en el caso de la formulación granular y el D002 puede conferir esta característica a la formulación.

Los tratamientos de *B. bassiana* con los fotoprotectores P001 y P002 presentaron pérdidas similares a las de los demás tratamientos. Sin embargo las pérdidas en el porcentaje de germinación fueron menores en estos tratamientos. Además la función de éstos, como protectores de radiación ultravioleta, conferirán tolerancia a la radiación solar al microorganismo una vez este sea aplicado en el campo.

El testigo presentó una pérdida drástica en la concentración después del tercer mes de almacenamiento, hecho que ocurrió después del quinto mes en los tratamientos que tenían algún tipo de formulación, lo que significa la disminución del impacto negativo que el proceso de formulación tiene cuando el microorganismo va a ser almacenado.

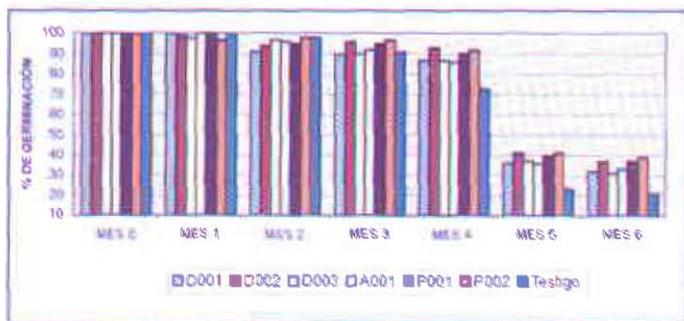
Tabla No. 3. Porcentaje de concentración de *B. bassiana* en pruebas de almacenamiento a través del tiempo

Código	MES 0	MES 1	MES 2	MES 3	MES 4	MES 5	MES 6
D001	1.9x 10 ⁸ esp/g	1.8x 10 ⁸ esp/g	2 x 10 ⁸ esp/g	1.7x 10 ⁸ esp/g	2 x 10 ⁷ esp/g	1.4 x 10 ⁵ esp/g	1.7 x 10 ⁵ esp/g
D002	1.9x 10 ⁸ esp/g	1.9x 10 ⁸ esp/g	1.8x 10 ⁸ esp/g	1.8x 10 ⁸ esp/g	1.6x 10 ⁸ esp/g	1.9 x 10 ⁸ esp/g	1.4 x 10 ⁶ esp/g
D003	1.9x 10 ⁸ esp/g	1.9x 10 ⁸ esp/g	1.7x 10 ⁸ esp/g	1.7x 10 ⁸ esp/g	1 x 10 ⁷ esp/g	1.4 x 10 ⁵ esp/g	1.2 x 10 ⁵ esp/g
A001	1.9x 10 ⁸ esp/g	1.9x 10 ⁸ esp/g	1.8x 10 ⁸ esp/g	1.8x 10 ⁸ esp/g	1.8x 10 ⁷ esp/g	1.2 x 10 ⁵ esp/g	1.4 x 10 ⁵ esp/g
P001	1.9x 10 ⁸ esp/g	2.0x 10 ⁸ esp/g	1.9x 10 ⁸ esp/g	1.9x 10 ⁸ esp/g	1.8x 10 ⁸ esp/g	1 x 10 ⁸ esp/g	1.8 x 10 ⁵ esp/g
P002	1.9x 10 ⁸ esp/g	1.8x 10 ⁸ esp/g	1.8x 10 ⁸ esp/g	1.8x 10 ⁸ esp/g	1 x 10 ⁸ esp/g	1.9 x 10 ⁸ esp/g	1.7 x 10 ⁶ esp/g
CONTROL	1.9x 10 ⁸ esp/g	1.9x 10 ⁸ esp/g	2.0x 10 ⁸ esp/g	2.0x 10 ⁸ esp/g	6 x 10 ⁸ esp/g	1.5 x 10 ⁴ esp/g	1 x 10 ⁴ esp/g

Porcentaje de germinación de *B. bassiana*

En la lectura del porcentaje de germinación a las 24 horas de incubadas las muestras, a partir del quinto mes se observa una disminución drástica en todos los tratamientos, presentándose porcentajes de germinación con resultados inferiores a 40% en los tratamientos D001 (36%), D003 (37%), A001 (36%) y el tratamiento testigo (23%), los tratamientos D002, P001 y P002 muestran porcentajes de germinación de 41, 40 y 41% respectivamente (Figura 1). Estos resultados no son significativamente diferentes respecto a los porcentajes de germinación de los otros tratamientos, ya que en todos los casos los porcentajes de germinación a las 24 horas de incubada la muestra fueron inferiores a 50%. Esto indica que el hongo ha perdido más de un 50% de su capacidad de generar un tubo germinal y por ende de causar enfermedad cuando entre en contacto con el insecto al ser aplicado en el campo. La variación de estos resultados respecto al sexto mes de almacenamiento no fue significativa si se tiene en cuenta que en todos los tratamientos ya se había presentado una disminución drástica del porcentaje de germinación, hecho que se podría relacionar con la pérdida de la concentración y con el efecto que el largo periodo de almacenamiento a bajas temperaturas tiene sobre el hongo, lo que induciría un periodo de latencia en el microorganismo retardando el proceso de germinación.

El testigo presentó la mayor pérdida en el porcentaje de germinación, lo que sugiere que al almacenar el hongo con un auxiliar de formulación, este disminuye el efecto negativo que las bajas temperaturas tienen sobre él.

Figura 1. Porcentaje de germinación de *B. bassiana* en el tiempo.

En el caso de los fotoprotectores P001 y P002, no se observan pérdidas drásticas en la concentración y debido a que se desea desarrollar un producto diseñado para aplicación foliar, estos auxiliares fueron preseleccionados para el proceso de preformulación.

En conclusión los excipientes D002, P001 y P002 ocasionaron el menor impacto al hongo en condiciones de almacenamiento por lo cual fueron seleccionados para el desarrollo de los prototipos de las formulaciones. Una vez seleccionados los productos se deben realizar ensayos para determinar los porcentajes de cada uno de ellos que se deben utilizar en las formulaciones para poder realizar ensayos evaluando la efectividad de estas en laboratorio y en campo.

El almacenamiento de productos biológicos por periodos de tiempo prolongados tiene un efecto negativo sobre el agente biológico por lo que se recomienda no aplicar en campo productos cuya fecha de fabricación sea superior a los cuatro meses más aún si estos no han sido almacenados bajo condiciones de temperatura adecuadas.

Se debe verificar la calidad de los productos comerciales antes de realizar la aplicación de estos en el campo.

Referencias bibliográficas

- CASTAÑEDA, D.M. 2000. Banco de microorganismos benéficos para el cultivo de la palma de aceite. Ceniavances No. 73. Centro de Investigación en Palma de Aceite, Cenipalma. 4 p.
- CENICAFE 1997. Técnicas para el control de calidad para formulaciones de hongos entomopatógenos. Boletín Técnico No. 17. Chinchiná (Caldas).
- GÓMEZ, M.; VILLAMIZAR, L. 1996. Estudio Tecnológico para Producción Masiva Y Preformulación del hongo entomopatógeno *Metarhizium* spp. para el control biológico de la langosta de los Llanos Orientales. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia. Santafé de Bogotá. Trabajo de grado de Químico Farmacéutico. P. 40-44.
- VOIGHT, R.; BORNES, CH. 1979. Tratado de tecnología farmacéutica. Editorial Acribia. Zaragoza.
- VALENCIA, C. 2000. Control de calidad físico y microbiológico de preformulados con base en el hongo *B. bassiana* (Bálsamo) utilizados en forma experimental para el control biológico del gusano blanco de la papa *Pemnotrypes varax* (Hustache) (Coleoptera: Curculionidae). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Santafé de Bogotá. Trabajo de grado Microbiología Agrícola y Veterinaria.

Director: Pedro León Gómez Cuervo
 Coordinación Editorial: Oficina de Prensa de Fedepalma
 Diseño y Diagramación: Bricio Gráfico
 Impresión: Molter Ltda. Impresoras
 Esta publicación contó con el apoyo del
 Fondo de Fomento Palmero.