

# Colección y selección de microorganismos benéficos

## Collection and selection of beneficial microorganisms

Diana Marcela Castañeda Peña

### RESUMEN

Los microorganismos benéficos son aquellos que cumplen un papel en el ambiente como herramientas del control biológico; éste es un fenómeno que ocurre en el campo y que se aplica como una tecnología para el manejo de enemigos naturales de plantas, insectos, animales, etc. Los microorganismos benéficos pueden ser entomopatógenos, antagonistas de fitopatógenos o participar en eventos de absorción de nutrientes, entre otras actividades. El uso de microorganismos benéficos trae grandes ventajas comparado con el uso de productos químicos, pero su éxito depende de una buena selección entre varios candidatos. Dentro del cultivo de la palma de aceite se han usado microorganismos que se manifiestan en forma natural para el manejo de plagas, y desde hace unos años se planteó e inició el establecimiento de la colección de microorganismos benéficos de Cenipalma, cuyo principal objetivo es proveer a los palmicultores de cepas de microorganismos aptos para ser aplicados en el campo como herramientas en el manejo integrado de plagas, y se logra mediante la colección de las muestras, el aislamiento y purificación de los microorganismos, pruebas de eficiencia y eficacia, conservación y, finalmente, pruebas de control de calidad periódicas. En la actualidad, la colección de microorganismos benéficos de Cenipalma cuenta con 18 aislamientos de entomopatógenos y 15 de antagonistas de fitopatógenos, provenientes de las diferentes zonas palmeras del país.

### SUMMARY

The beneficial microorganisms are those which have a role in the environment, as biological control tool. This is a phenomenon that occurs in the country side and its applied as a technology for the management of natural enemies of the plants, insects, animals, etc. Beneficial microorganisms may be entomo-pathogenous, phyto-pathogenous antagonistic, or participate in absorption of nutrients, among other events. The use of the beneficial microorganisms brings great advantages in comparison with the use of chemical products. Its success depends on a good selection between different candidates. In the oil palm crop microorganism that show in natural form have been used for plague treatment. Some years ago, it was noted and began the collection of beneficial microorganisms of Cenipalma. Its main objective is to supply the palm growers with stock of beneficial microorganisms ready to be applied in the field, as a tool for integrate plague management, giving guarantee of its viability and effectivity. The objective is achieved through collecting samples, insulation and purification of the microorganisms, efficiency and efficacy tests, conservation, and finally periodic control tests. Nowadays, the beneficial microorganisms collection of Cenipalma has 18 insulations of entomo-pathogenous and 15 of antagonistic of phyto-pathogenous, which come from different oil palm regions of the country.

Palabras claves: Control biológico, Antagonismo, Entomopatógeno, Colección de microorganismos.

1 Microbióloga. Invest. Auxiliar. Área Sanidad Vegetal. Cenipalma. Apartado Aéreo 252171. Bogotá, D.C., Colombia.

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de la palma de aceite, por ser un monocultivo, brinda las condiciones necesarias para que organismos patógenos, insectos y medio ambiente interactúen en forma especial, manifestándose con efectos nocivos en las palmas; lo anterior, unido a prácticas de manejo inadecuadas ha generado problemas sanitarios graves, y con ellos grandes pérdidas económicas. A pesar de esto, el ecosistema mismo ha mostrado que las plagas pueden ser manejadas, y el control biológico es la herramienta que permite lograr ese efecto, manifestándose naturalmente, o después de la intervención del hombre, quien lo puede introducir, para reponer el equilibrio natural del ecosistema, que es su principal objetivo (Calvache 1993). La posibilidad de manejar las plagas propias del cultivo con un agente o con una mezcla de agentes biológicos (hongos y bacterias principalmente), es una alternativa que por ser exitosa en otros cultivos, se propone como parte de un paquete tecnológico, dentro del cual sería una estrategia para su manejo.

Antes de llevar al campo un microorganismo con potencial como agente de control biológico, se deben tener en cuenta algunos criterios que permiten seleccionar al biocontrolador ideal, por ejemplo, debe ser genéticamente estable, ser efectivo a bajas concentraciones y volúmenes, debe poder ser fácilmente conservado y a esto lo favorece tener requerimientos nutricionales simples, ser fácil de propagar en fermentadores con sistemas económicos, tener la habilidad de sobrevivir en el campo, tener amplio espectro de acción, no producir metabolitos secundarios que puedan afectar al hombre u otros vertebrados, debe tolerar productos químicos habitualmente usados como parte del manejo agronómico y, si es posible, ser compatible con ellos (Cook y Baber 1996). Además, algunas características son deseables en el metabolismo del biocontrolador; de los antagonistas de organismos fitopatógenos se espera la producción de sustancias inhibitoras o antimicrobianas (Faull 1988; Hawksworth et al. 1996), y de los organismos entomopatógenos se espera la producción de enzimas para degradar la quitina, las toxinas, etc. (Fuxa y Kumini 1997;

Ainswortetal. 1983, Whipps et al. 1988). Por otro lado, los biocontroladores pueden seleccionarse teniendo en cuenta mecanismos físicos como su habilidad de competir por nutrientes y por el sustrato de colonización, que son más comunes en antagonistas de fitopatógenos (Cenipalma 1997). Pero aún conociendo los criterios básicos que permiten seleccionar biocontroladores ideales, este proceso no se puede iniciar si no se cuenta con un número adecuado de individuos promisorios, preferiblemente provenientes de entornos con diferentes condiciones ambientales, almacenados en las mejores condiciones que permitan usarlos mucho tiempo después, sin correr el riesgo de que se pierda su efectividad (Castañeda 2000). Por eso que ha sido interés de Cenipalma contar con un banco de microorganismos benéficos con esas características, que pueda brindar el material biológico necesario para desarrollar trabajos de investigación y para que el sector palmicultor cuente con nuevas herramientas para el manejo de plagas.

En este artículo se presentan resultados de algunas de las actividades que se vienen desarrollando dentro del proyecto "Microorganismos biocontroladores en el cultivo de la palma de aceite: reconocimiento, selección y producción", específicamente en cuanto a dos de sus objetivos que son: la creación del banco de microorganismos benéficos de Cenipalma, y a selección de los microorganismos ideales para implementar prácticas de manejo de plagas. Los microorganismos objeto de estudio son todos los géneros de hongos y bacterias entomopatógenos que permiten ser manejados bajo condiciones de laboratorio, y aquellos hongos y bacterias de los géneros *Trichoderma*, *Pseudomonas* y *Bacillus*, promisorios para el manejo de los agentes causales de la Pudrición de Cogollo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las actividades necesarias para obtener la colección de microorganismos y la selección de los más promisorios se desarrollan en el

Laboratorio de Control Biológico de Cenipalma, ubicado en la Plantación Unipalma de los Llanos S.A., en Cumaral (Meta), ubicada en una altitud de 370 msnm.

Colección de microorganismos: se obtiene realizando muestreos, ya sea de insectos con signos o síntomas de afección por algún microorganismo, para el caso de entomopatógenos de interés. Las muestras se toman y se mantienen en recipientes limpios, secos, cerrados y debidamente marcados hasta el momento de su procesamiento, y en caso de requerirse su envío por tiempos prolongados se procura refrigerar, especialmente cuando se sospecha de infección por bacterias. Para el caso de antagonistas de fitopatógenos son útiles muestras de suelo, agua, ambiente o material vegetal; para el muestreo de suelo se elimina la capa más superficial y se toman aproximadamente 500 g, cuidando que se tome desde la superficie hasta 20 cm de profundidad; en algunos casos, dependiendo del tipo de muestra a evaluar, son necesarias submuestras para garantizar representatividad; las muestras de ambiente se colectan luego de exponer cajas de Petri con medio de cultivo por algunos minutos en el área a evaluar, y las muestras de agua y material vegetal se toman en el área deseada, empleando recipientes adecuados, pero asépticos, para ese fin, cuidando de rotular adecuadamente las muestra.

En el laboratorio se realizan aislamientos a partir de las muestras colectadas, usando medios generales como PDA y AN para el aislamiento de hongos y bacterias, y en otros casos se usan medios selectivos como TSM y KB para el crecimiento de *Trichoderma* spp. y de *Pseudomonas* spp., respectivamente, como parte del aislamiento y purificación de géneros específicos. Una vez purificados se realiza la conservación mediante la técnica de papel de filtro esterilizado y, finalmente, con una frecuencia semestral, se realizan pruebas de control de calidad que se basan en la calificación de la viabilidad y pureza de los microorganismos en colección, y de los procesos necesarios para lograrla. Para el caso de los hongos se realizan cultivos monospóricos con el fin de garantizar la uniformidad del individuo, y se conservan en esa condición.

**Selección in vitro:** Se trabajaron métodos diferentes para evaluar la habilidad metabólica de hongos y bacterias como antagonistas de un aislamiento catalogado como el más patogénico de *Thielaviopsis paradoxa* (De Seynes) van Hohn. Se montaron antibiogramas en los que se midió el tamaño del halo de inhibición del crecimiento del hongo causado por las bacterias, y se prepararon extractos en medio líquido, a partir del crecimiento por separado, de 10 de los aislamientos de *Trichoderma* spp. colectados; los extractos se adicionaron al PDA convencional y sobre los 10 medios así obtenidos, se sembró el aislamiento del patógeno mencionado, con el fin de evaluar el efecto de los metabolitos producidos por los hongos y ahora contenidos en los medios, en el desarrollo del patógeno. En vista de la agresividad en cuanto al crecimiento *in vitro* de los géneros *Trichoderma* y *Thielaviopsis*, también se realizaron pruebas de competencia por sustrato entre ellos, con el fin de determinar las cepas de *Trichoderma* más agresivas en cuanto a la habilidad de competir por sustratos o nutrientes. En el momento se están estandarizando las pruebas de selección *in vitro* para hongos y bacterias entomopatógenas, con las que se podrán determinar los mejores aislamientos y las dosis letales sugeridas para aplicarlos en el campo.

**Selección en invernadero:** Los aislamientos de *Trichoderma* spp. seleccionados como efectivos en las pruebas *in vitro*, se llevaron al invernadero para ser evaluados por su habilidad de colonizar sustratos y garantizar su agresividad en el momento de ser aplicados en el campo. Como sustratos se evaluaron las tusas y porciones de paleras, y sobre ellas se asperjaron suspensiones en agua y en aceite de los aislamientos del hongo, usando diferentes volúmenes con concentraciones alrededor de  $5 \times 10^8$  u.f.c/ml de suspensión.

## RESULTADOS

**Colección de microorganismos:** A partir de muestreos realizados desde el mes de abril de 1997 en diferentes plantaciones palmeras en los Llanos Orientales, se han recuperado varios aislamientos fúngicos y bacterianos, de los cuales

se han seleccionado aquellos pertenecientes a los géneros *Trichoderma*, *Bacillus*, y *Pseudomonas*, que son catalogados como promisorios como antagonistas de fitopatógenos, y gracias al apoyo del Área de Entomología de Cenipalma, y de algunos encargados de la sanidad vegetal de diferentes plantaciones se han obtenido varios aislamientos de hongos y bacterias entropatógenos. Las Tablas 1 y 2 presentan un resumen de los microorganismos en colección.

**Selección in vitro:** Se logró estandarizar la técnica del medio filtrado para hacer la selección *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma* spp.; inicialmente se probaron diez aislamientos de la colección contra cuatro aislamientos patógenos de *Thielaviopsis* spp., sobre PDA que contenía el filtrado obtenido del crecimiento de los aislamientos de *Trichoderma* spp., y se midió diariamente el aumento en mm del diámetro de las colonias del patógeno (Fig. 1). Los resultados permitieron observar que hay aislamientos de *Trichoderma* sp. efectivos contra los cuatro

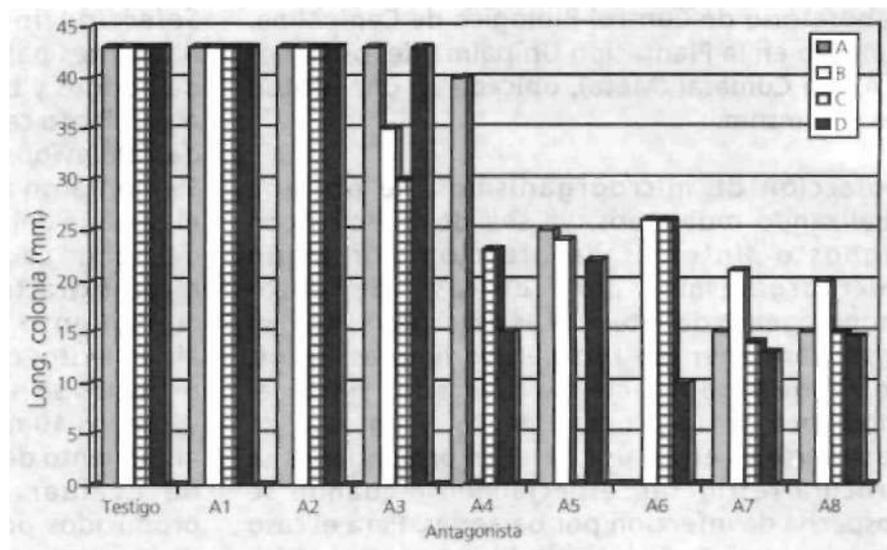


Figura 1 Inhibición del crecimiento de cuatro aislamientos de *Thielaviopsis* spp. en medio con filtrado de ocho aislamientos de *Trichoderma* spp.

aislamientos de *Thielaviopsis* spp. en estudio, y que otros actúan específicamente contra algunos de los aislamientos.

Tabla 2. Colección de microorganismos antagonistas de *Thielaviopsis paradoxa* (aislamiento CPT 007).

# / Microorg	Procedencia	Efectivas
<i>Trichoderma</i> spp.		
9	Palmas de Casanare	1
5	El Borrego	1
5	Unipalma	1
2	Cuernavaca	0
<i>Pseudomonas</i> spp.		
4	Palmas de Casanare	0
8	El Borrego	0
5	Unipalma	1
1	Tumaco	0
1	Santa Helena	0
2	Bucarelia	0
2	Auburn	0
<i>Bacillus</i> spp.		
1	Palmas de Casanare	1
4	El Borrego	4
3	Unipalma	2
1	Santa Helena	0
1	Tumaco	1
1	Ecuador	1
3	Auburn	2

Microorganismo	Huésped	Procedencia
<i>Metarhizium</i> sp.	<i>Rhinostomus</i> sp.	Mejorana
<i>Metarhizium</i> sp.	<i>Metamasius</i> sp.	Unipalma
<i>Metarhizium</i> sp.	<i>Rhynchophorus</i> sp.	Unipalma
<i>Paecilomyces</i> sp.	<i>Pleseobyrsa bicincta</i>	El Borrego
<i>Paecilomyces</i> sp.	<i>Durrantia</i> sp.	Tequendama
<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Rhynchophorus</i> sp.	Unipalma
<i>Beauveria</i> sp.	<i>Loxotoma</i> sp.	Barbasal
<i>Beauveria</i> sp.	<i>Opsiphanes</i> sp.	Zona Central
<i>Beauveria</i> sp.	<i>Stenoma</i> sp.	Palmeiras
<i>Beauveria</i> sp.	<i>Hyphotenemus hampeii</i>	Cenicafé
<i>Beauveria</i> sp.	<i>Metamasius</i> sp.	Unipalma
<i>Beauveria</i> sp.	Suelo	Unipalma
<i>Beauveria</i> sp.	<i>Loxotoma</i> sp.	Zona Oriental
<i>Beauveria</i> sp.	<i>Episibine</i> sp.	Manuelita
<i>Beauveria</i> sp.	<i>Episibine</i> sp.	Manuelita
<i>Beauveria</i> sp.Com	<i>Loxotoma</i> sp.	Unipalma
<i>B. thuringiensis</i> . Com		Comercial
Bact No Ident.	<i>Rhadinaphelenchus</i> sp.	Unipalma

*Selección en invernadero y campo:* Se prepararon suspensiones en agua y aceite de *Trichoderma* spp., hasta lograr volúmenes de 500 ml con aproximadamente  $5 \times 10^8$  ufc/ml, después de hacer recuento de esporas en la cámara de Neubauer; sin embargo, las concentraciones de las suspensiones en aceite no fueron posibles de medir debido a que el hongo, por tener pared hidrofílica, no se suspende homogéneamente en esa sustancia (aceite de cocina común), formando conglomerados que no permitían su recuento; sin embargo, se usó la misma cantidad de hongo empleado para la preparación de las suspensiones en agua. Con las suspensiones preparadas se hicieron aspersiones de 10 ml/ tusa bajo condiciones de invernadero. Previamente se había determinado que 10 ml eran suficientes para humedecer totalmente una tusa de 5 kilogramos. Cinco días después de la inoculación se observó colonización completa del aislamiento seleccionado en las pruebas *in vitro* sobre las tusas.

## DISCUSIÓN

El trabajo realizado hasta el momento ha permitido establecer una organización de los microorganismos con potencial biocontrolador propios del cultivo de la palma de aceite, en una colección que permite disponer de esos individuos en cualquier momento, bien sea para fines de investigación que permitan seleccionar entre ellos los mejores, o para ser usados en el campo como herramientas del manejo integrado de plagas. El proceso de formación de la colección es continuo, ya que el medio ambiente es dinámico, y las condiciones permiten que en diferentes épocas se manifiesten diferentes plagas y simultáneamente diferentes alternativas para su control; en esos momentos es de gran importancia la colaboración de técnicos y agrónomos respecto a la observación de esos fenómenos y a la recolección de esos especímenes que son recibidos en el laboratorio de control biológico de Cenipalma, para su adecuado manejo, garantizando así la conservación de una de las herramientas más valiosas para el MIP.

A pesar de que a un microorganismo se le brindan en el laboratorio las mejores condiciones para su desarrollo y funcionamiento, y de hecho

muestran ser efectivos, en el momento de ser llevado al campo no ocurre lo mismo; sin embargo, las técnicas de selección *in vitro* se realizan como una práctica que permite discriminar entre una gran cantidad de individuos algunos que tienen más posibilidades de actuar efectivamente en el campo. Respecto al trabajo realizado se lograron seleccionar algunos microorganismos antagonistas de fitopatógenos que pasaron a la etapa de selección en invernadero; de ellos un aislamiento de *Trichoderma* sp. se catalogó como eficiente en las pruebas donde se calificó la agresividad para colonizar sustratos, que es una ventaja a la hora de confirmar que bajo condiciones de campo pueden competir hábilmente contra aislamientos del patógeno; las aplicaciones hechas a las paleras fueron difíciles de calificar por lo que esos datos no han sido tenidos en cuenta para la calificación del aislamiento de *Trichoderma* sp. probado. La utilización de aceites como vehículo de aplicación de los microorganismos es una alternativa interesante ya que de demostrar ser factible, traería ventajas respecto a la viabilidad del producto en el campo, y reducción en los volúmenes de aplicación por vía aérea.

## CONCLUSIONES

La colección de microorganismos benéficos de Cenipalma cuenta con 18 aislamientos de entomopatógenos y 15 de antagonistas de fitopatógenos, provenientes de diferentes zonas palmeras del país. De los 15 antagonistas de fitopatógenos se han seleccionado un aislamiento de *Trichoderma* sp. (por su efectividad y agresividad como colonizador) y uno de *Pseudomonas* sp. (por su efectividad), como efectivos mediante pruebas *in vitro* contra un aislamiento patogénico de *Thielaviopsis paradoxa*, uno de los principales agentes causales de la Pudrición de Cogollo.

## PERSPECTIVAS

Teniendo en cuenta la importancia de contar con una colección de microorganismos y las posibilidades que la naturaleza brinda, se planea aumentar el número de aislamientos promisorios

en ella. Otro punto a desarrollar es fomentar el interés respecto a estos temas en las zonas palmeras del país, con el fin de estimular la creación de grupos de laboratorios por plantaciones para la multiplicación comercial de los microorganismos, que permitan llevarlos al campo dentro de las prácticas agronómicas normales y así reducir costos en el manejo de plagas. Por otra parte, se planea continuar ofreciendo servicios de capacitación en cuanto al manejo de estos microorganismos, así como continuar el proceso de selección de antagonistas de fitopatógenos probando los aislamientos que vayan ingresando en la colección.

## BIBLIOGRAFÍA

- AINSWORTH, G. C.; SPARROW, F. K.; SUSSMAN, A.S. (Eds.). 1983. *The Fungi: An advance treatise*. Vol. 4: A taxonomic review with keys. Academic Press, New York.
- CALVACHE, H. 1993. El control microbiano en el manejo de las plagas de la palma de aceite en Colombia. *Palmas* (Colombia). v. 14 no.2, p. 13-21.
- CENIPALMA. 1997. Control biológico de los agentes causales de la Pudrición de cogollo en palma de aceite. *Ceniavances*. No. 40. Cenipalma. Santafé de Bogotá, 2p.
- CASTAÑEDA, D. 2000. Banco de microorganismos benéficos para el cultivo de la palma de aceite. *Boletín divulgativo Ceniavances*. No. 73. Cenipalma. Bogotá. 4p.
- COOK, R. J.; BAKER, K.F. 1996. *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. APS Press, Minneapolis.
- FAULL, J. L. 1988. Competitive antagonism of soil-borne plant pathogens. *In: M.N. BURGE (Ed.)*. *Fungi in biological control systems*. University Press. Manchester. p. 125-138.
- FUXA, J.R.; KUNIMI Y. 1997. Microorganisms interacting with insects. *In: C.J. HURST; G.R. KNUDSEN; M.J. McINERNEY; L.D. STETZENBACH; M.V. WALTER (Eds.)*. *Manual of environmental microbiology*. ASM Press, Washington.
- HAWKSWORTH, D. L; KIRK, P.M.; SUTTON, B.C.; PEGLER, D. 1996. *Dictionary of the fungi*. 8<sup>a</sup> ed., International Mycological Institute, CAB International, England.
- WHIPPS, J.M.; LEWIS, K.; COOKE, R.C. 1988. Mycoparasitism and plant disease control. *In: M.N. BURGE (Ed.)*. *Fungi in biological control systems*. University Press. Manchester. p.161-182.