

Evaluación de factores ambientales simulados sobre el desempeño de  
formulados de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y su potencial como controlador  
biológico de la Sigatoka negra.

Trabajo de grado para optar por el título de Ingeniero de Procesos

JAIME ANDRÉS GUTIÉRREZ MONSALVE

Cód. 2001100180014

Asesora:

SANDRA MOSQUERA LÓPEZ

Ingeniera de Procesos

Coasesora:

VALESKA VILLEGAS E.

Ingeniera Química, MRes.

UNIVERSIDAD EAFIT

ESCUELA DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE PROCESOS

MEDELLÍN

2011

Evaluación de factores ambientales simulados sobre el desempeño de  
formulados de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y su potencial como controlador  
biológico de la Sigatoka negra.

Trabajo de grado para optar por el título de Ingeniero de Procesos

JAIME ANDRÉS GUTIÉRREZ MONSALVE

Cód. 2001100180014

Asesora:

SANDRA MOSQUERA LÓPEZ

Ingeniera de Procesos

Coasesora:

VALESKA VILLEGAS E.

Ingeniera Química, MRes.

UNIVERSIDAD EAFIT

ESCUELA DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE PROCESOS

MEDELLÍN

2011



## **AGRADECIMIENTOS**

Por la colaboración brindada durante el desarrollo del Proyecto de Grado se agradece:

A Sandra Mosquera, asesora del proyecto, por su continuo apoyo, paciencia y total disponibilidad durante el desarrollo de este proyecto de investigación.

Al laboratorio de Biotecnología en cabeza de Sigifredo Cárdenas por la disponibilidad de los recursos para la realización de este proyecto de grado.

A Augura y a la Universidad EAFIT por la financiación del proyecto.

A la profesora Valeska Villegas por todo su apoyo y asesoría.

Al Ing. Mario Martínez, director de Sanidad Vegetal de C.I. Uniban por la ayuda prestada y los recursos ofrecidos para este proyecto de investigación.

A mi papá, el Ing. Jaime Gutiérrez por el apoyo técnico, logístico, profesional y bibliográfico.

A mi familia por el apoyo y acompañamiento desinteresado.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma nos brindaron los conocimientos para la elaboración del Proyecto de Grado.

## TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN.....	10
2. INTRODUCCIÓN.....	12
3. OBJETIVOS.....	15
3.1. OBJETIVO GENERAL .....	15
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
4. MARCO TEÓRICO .....	16
4.1. Factores climáticos del cultivo del banano .....	16
4.2. La Sigatoka negra .....	16
4.2.1. Biología del hongo causante de la Sigatoka negra en el banano. ....	17
4.3. Control de la Sigatoka negra.....	19
4.3.1. Control químico de la Sigatoka negra.....	20
4.3.2. Resistencia de <i>M. fijiensis</i> a fungicidas químicos .....	21
4.3.3. Control cultural de la Sigatoka negra.....	22
4.3.4. Control biológico de la Sigatoka negra: Antecedentes .....	22
4.4. Formulaciones de pesticidas biológicos: .....	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
5.1. Microorganismos de estudio .....	27
5.2. Preparación de las formulaciones del <i>B. subtilis</i> EA-CB0015 .....	27
5.2.1. Fermentación del <i>B. subtilis</i> EA-CB0015.....	27
5.3. Metodologías para el cumplimiento del objetivo 1: Evaluación de la actividad antagónica de los formulados .....	28
5.4. Metodologías para el cumplimiento del objetivo 2: Evaluación de la viabilidad de los formulados .....	30
5.5. Metodologías para el cumplimiento del objetivo 3: Evaluación de los formulados sometidos a presiones ambientales simuladas .....	31
• Evaluación de la tolerancia de los formulados a la radiación U.V. ....	31

• Evaluación de la tolerancia de los formulados a las mezclas con fungicidas químicos. ....	32
• Resistencia de los formulados al lavado por la lluvia. ....	35
5.6. Metodología para el cumplimiento del objetivo 4: Evaluación del efecto sobre la severidad de la Sigatoka negra de las formulaciones en invernadero.	36
5.7. Análisis Estadístico: .....	38
6. RESULTADOS .....	39
6.3. Resultado del objetivo 3: Evaluación de las formulaciones al ser sometidas a presiones ambientales simuladas .....	44
• Evaluación de la tolerancia de los formulados a la radiación U.V. ....	44
6.4. Resultados del objetivo 4: Evaluación del efecto sobre la severidad de la Sigatoka negra de las formulaciones en invernadero.....	52
7. DISCUSIÓN.....	56
8. CONCLUSIONES .....	63
9. RECOMENDACIONES.....	65
10. BIBLIOGRAFÍA.....	66
11. ANEXOS.....	78

## LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. % de inhibición del tubo germinativo de las formulaciones de <i>B. subtilis</i> EA-CB0015 .....	40
Gráfica 2. % de muerte celular luego de 180 días de almacenamiento .....	42
Gráfica 3. Cinética de viabilidad celular para cada una de las formulaciones ...	43
Gráfica 4. % de adherencia a la superficie para cada una de las formulaciones evaluadas .....	45
Gráfica 5. Cinética de viabilidad de las formulaciones expuestas a mezclas con fungicidas químicos .....	48
Gráfica 6. Porcentaje de adherencia a la superficie de las formulaciones del <i>B. subtilis</i> EA-CB0015 luego de ser sometidos al lavado simulado por lluvia.....	51
Gráfica 7: Porcentaje de área necrosada de la hoja número uno de plantas de banano cv. <i>Williams</i> infectadas con <i>M. fijiensis</i> y tratadas con las formulaciones de <i>B. subtilis</i> EA-CB0015. ....	53

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema del ciclo reproductivo sexual y asexual del hongo <i>M. fijiensis</i> .....	18
Figura 2: Fotografía de una porción de la hoja número uno de plantas de banano cv. Williams infectadas con <i>M. fijiensis</i> y tratadas con las formulaciones de <i>B. subtilis</i> EA-CB0015 .....	54

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Condiciones climáticas del cultivo de banano .....	15
Tabla 2 Diferencias entre las conidias y las ascosporas de <i>M. fijiensis</i> .....	17
Tabla 3 Composición de las mezclas de tanque de fungicidas químicos empleados en los cultivos de banano para el control de la Sigatoka negra ....	34
Tabla 4 Tiempo en que el 50% de las esporas de <i>B. subtilis</i> EA-CB0015 pierden su viabilidad al ser sometidas a una radiación U.V-C ( 254 nm). .....	46
Tabla 5 Tiempo en que el 50% de las esporas de <i>B. subtilis</i> EA-CB0015 pierden su viabilidad y porcentaje de muerte celular a las 3 y 25 horas para las formulaciones de <i>B. subtilis</i> EA-CB0015 al ser expuestas a las mezclas de tanques de los fungicidas empleados para el control de la Sigatoka negra. ....	48

## 1. RESUMEN

La Sigatoka negra causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* es la enfermedad más devastadora del cultivo de banano y plátano alrededor del mundo. Hasta el momento el control químico ha demostrado ser la técnica más eficaz, sin embargo esto ha generado problemas ambientales y económicos que han llevado al desarrollo de otras técnicas como el empleo de formulaciones biológicas. En este trabajo se evaluó el desempeño de dos formulaciones de *Bacillus subtilis* EA-CB0015, una mezcla base agua, una emulsión y la suspensión bacteriana. En relación al control de la enfermedad, el bioformulado que presentó los mejores resultados fue la mezcla base agua: a nivel *in-vitro* la formulación mezcla base agua inhibió el tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis* un 66,1% sin presentar diferencias significativas con los controles químico y biológico; a nivel de invernadero la mezcla agua fue la única formulación que presentó control sobre la enfermedad con un porcentaje de área necrosada de 2,29%, sin presentar diferencias significativas con el 1,0 % mostrado por el control químico Dithane®.

Se evaluó la viabilidad de los bioformulados al ser sometidos a diversas condiciones ambientales: En relación a la viabilidad de las esporas de *B. subtilis* EA-CB0015 tras almacenar las formulaciones por 6 meses a 4°C y 25°C se encontró que a 25°C todas perdían entre un 47 a un 49% de la viabilidad sin presentar diferencias significativas entre ellas; mientras que a 4°C prácticamente no se presentó pérdida significativa de la viabilidad.

Para la tolerancia de las bioformulaciones a la radiación U.V., la emulsión fue el que más protegió a las esporas de *B. subtilis* EA-CB0015 con un  $t_{d50}$  de 37,39 minutos, esto comparado a la mezcla base agua con un  $t_{d50}$  de 7,77 minutos y a la suspensión bacteriana con un  $t_{d50}$  de 6,67 minutos. Ninguna de las formulaciones evaluadas igualó al control biológico Rhapsody®, el cual mostró un  $t_{d50}$  mayor que 180 minutos y una reducción total de 24,1% en 180 min.

Con relación a la tolerancia a las mezclas de fungicidas se encontró que los bioformulados eran altamente tolerantes, la formulación mezcla base agua

mostró un  $t_{d50}$  mayor a 25 horas para todas las mezclas evaluadas y la suspensión bacteriana un  $t_{d50} > 25$  horas para 5 de las 8 mezclas evaluadas.

Por último se evaluó el lavado con lluvia, allí la emulsión presentó el mejor comportamiento con un porcentaje de adherencia a la superficie de 17,0% sin diferencias significativas con el control positivo Rhapsody® (20,4%); la suspensión bacteriana y la mezcla agua presentaron % de adherencia de 5,3% y 4,5% respectivamente. Esto comparado a los controles químicos Bravonil® y Dithane® que presentaron porcentajes de adherencia de 83,7% y 80,4%.

**Palabras claves:** Formulaciones biológicas, *Mycosphaerella fijiensis*, *Musa spp.*, Control biológico.

## 2. INTRODUCCIÓN

El banano es uno de los productos de exportación agrícola más importantes a nivel mundial. Es cultivado en los cinco continentes y se convierte en alimento básico para millones de personas en el planeta (Frison y Sharrock 1999). En términos de volumen, representa una de las primeras frutas de exportación y en términos económicos ocupa el segundo lugar después de los cítricos según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2008). Anualmente en el mundo se comercializan cerca de 15 millones de toneladas de banano, equivalentes a US \$12.972'756.000, Colombia participa con el 12,32% de las exportaciones con cerca de 1,8 millones de toneladas, equivalentes a US \$1.660'924.230 (FAO, 2008). Actualmente el país cuenta con 44.600 hectáreas de banano de las cuáles 35.000 hectáreas se encuentran en el Urabá antioqueño y las restantes en el Magdalena (Gutiérrez, 2010). Según estas estadísticas, el banano no solo representa un producto de consumo masivo para la alimentación mundial, sino también una importante fuente de ingreso y generación de empleo para muchos países productores como es el caso de Colombia.

La Sigatoka negra, causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, es la enfermedad más devastadora de los cultivos de banano y plátano en el mundo y que requiere de gran atención en las regiones de América Central, Panamá, Colombia y Ecuador, así como en muchas regiones de África y Asia, esto debido a su impacto en la producción y a los altos costos económicos y ambientales que genera su control (Marín y Romero 1992). Dicha enfermedad causa un deterioro significativo en el área foliar, una disminución en la productividad y en la calidad de la fruta cuando no se le combate (Marín y Romero, 1992; Arias *et al.*, 2003; Marín *et al.*, 2003). En Colombia, se han reportado reducciones de hasta un 60% en el peso del racimo en plantaciones donde no se le controla (Belalcázar, 1991).

El control químico es el método más utilizado para el combate de la Sigatoka negra lo que ha llevado a un deterioro paulatino de la fauna, flora, suelos y fuentes acuíferas en las regiones de cultivo (Astorga, 1999; Vindas *et al.*, 2004). Por otro lado, el uso continuo e irracional de fungicidas ha originado cepas de *M. fijiensis* resistentes a los ingredientes activos de algunos productos, trayendo como consecuencia una disminución en los agentes disponibles para su control y un aumento en el número de ciclos de aspersión y en el costo de producción de la fruta (Marín *et al.*, 2003). En la zona del Urabá antioqueño se ha estimado para el 2010 un costo de fungicidas de US \$18'700.000 para el control de la Sigatoka negra, esto sin tener en cuenta los costos de la aerofumigación (ver anexo 1) (Gutiérrez, 2010). Todo esto más la exigencia de medidas de control ambientalmente seguras, hacen evidente la necesidad de investigar e implementar estrategias de manejo sostenible como el control biológico. Éste ha tenido poca acogida en el ámbito comercial debido a que los fungicidas sintéticos ejercen un control altamente efectivo, la normativa ambiental es muy laxa y las bioformulaciones son costosas en relación a los agroquímicos (Marín *et al.*, 2003). Sin embargo, en las últimas dos décadas, estudios han reportado problemas ambientales relacionados con el empleo de estos agentes químicos, lo que ha traído un creciente interés en los estudios que desarrollen esta tecnología biológica.

Actualmente se han reportado microorganismos que ejercen un control sobre el crecimiento de *M. fijiensis* y el desarrollo de la Sigatoka negra a escala de laboratorio, en invernadero y campo (Gonzales, 1995; Miranda, 1996; Talavera, 1996; Salazar, 2005; Osorio, 2006; Ceballos, 2009), sin embargo en Colombia no se encuentra registrado ningún fungicida biológico producido en el país para el control de la Sigatoka negra (Navarro *et al.*, 2004)

En trabajos previos realizados en el laboratorio de biotecnología de la Universidad EAFIT, Ceballos (2009) hizo un estudio de la población bacteriana

presente en la filósfera de diferentes cultivares de *Musa* spp. en el Urabá Antioqueño. En este estudio se aislaron 648 BAFE's (Bacterias aerobias formadoras de esporas) y se evaluó la capacidad antagonista de sus metabolitos contra *M. fijiensis in vitro*. A partir de este estudio se seleccionó la cepa *B. subtilis* EA-CB0015 como agente de control biológico por ser capaz de inhibir el crecimiento del hongo en un 92% *in vitro*. En un estudio posterior, Proyecto Colciencias – EAFIT – Augura, código 12164030656 se desarrollaron dos formulaciones, una base agua y una emulsión de *B. subtilis* EA-CB0015 que son objeto de estudio en este trabajo.

Para la producción y comercialización de las bioformulaciones se deben cumplir unos requerimientos mínimos: garantizar la viabilidad del agente biocontrolador antes del período de vencimiento del producto, que el agente activo no presente fitotoxicidad al contacto con la planta u otros seres vivos fuera del microorganismo de control, que tolere las condiciones medioambientales adversas y sea compatible con otros microorganismos presentes en el ambiente de aplicación (Brar *et al.*, 2007).

En este trabajo se evaluó la capacidad de *B. subtilis* EA-CB0015 de permanecer viable luego de someter las formulaciones a un periodo de almacenamiento, la efectividad de las bioformulaciones en el control del hongo y la enfermedad a nivel *in vitro* y en invernadero. También se determinó si las formulaciones eran capaces de proteger el agente de control biológico ante las condiciones medioambientales adversas a las que serían sometidos al aplicarse en la planta. Por último, se evaluó la viabilidad de *B. subtilis* EA-CB0015 tras la exposición a la radiación U.V. y la presencia de fungicidas químicos, además de la adherencia del bioformulado tras ser sometido al lavado por lluvia.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar diferentes factores ambientales simulados sobre el desempeño de dos formulados (base agua y emulsión) de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y su potencial como controlador biológico del hongo *Mycosphaerella fijiensis*.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la actividad antagónica de dos formulados de *B. subtilis* EA-CB0015 contra el hongo *M. fijiensis* *in vitro* bajo diferentes condiciones de almacenamiento en el mes 3.
- Evaluar la viabilidad de la cepa de los formulados de *B. subtilis* EA-CB0015 contra el hongo *M. fijiensis* *in vitro* bajo diferentes condiciones de almacenamiento en el tiempo.
- Determinar la viabilidad del *B. subtilis* EA-CB0015 en formulación al ser sometido a presiones ambientales simuladas tales como: tiempo de exposición a radiación U.V., resistencia al lavado por lluvia y tiempo de exposición a mezclas con fungicidas químicos.
- Determinar el efecto de los formulados del *B. subtilis* EA-CB0015 sobre la Sigatoka negra en condiciones de invernadero.

## 4. MARCO TEÓRICO

Esta revisión bibliográfica comienza describiendo las condiciones medio-ambientales del cultivo del banano y del desarrollo de la Sigatoka negra. Luego se describe la Sigatoka negra, la biología del agente causal de la enfermedad y los diferentes mecanismos de control de la misma. Por último se habla específicamente del control biológico y de algunos antecedentes.

### 4.1. Factores climáticos del cultivo del banano

Los factores climáticos óptimos para el cultivo del banano tipo exportación de las variedades Cavendish Valery y Gran Enano ampliamente distribuidas la zona bananera de Urabá y Santa Marta en Colombia son (MINISTERIO DE AGRICULTURA, 2005):

**Tabla 1.** Condiciones climáticas del cultivo del banano en el Urabá antioqueño (UNIBAN, 2005)

Variable	Unidades	Valor
Precipitación anual	mm de agua	2000-3000
Humedad relativa	%	85 – 90
Temperatura	°C	24-28
Luminosidad solar	Horas al año	1659

### 4.2. La Sigatoka negra

La Sigatoka negra, causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, es la enfermedad más importante del cultivo del banano (Lawrence, 1969; Stover,

1980). Esta enfermedad ataca las hojas de las plantas produciendo un rápido deterioro del área foliar cuando no se le combate. Esto afecta el crecimiento y productividad de la planta al reducir la capacidad de fotosíntesis y disminuye la calidad de la fruta favoreciendo la maduración prematura de los racimos por la alta producción de etileno (Marín y Romero 1992; Burt *et al.*, 1997).

Esta enfermedad fue observada por primera vez en 1963 en las Islas Fiji, suroeste asiático; en Centro América se detectó en Honduras hacia 1972, y a Costa Rica llegó a mediados de 1979. La enfermedad se diseminó rápidamente, y en 1981 se detectaron los primeros brotes en la zona bananera de Urabá (Gonzales, 1997; Burt *et al.*, 1997; Marín *et al.*, 2003).

#### **4.2.1. Biología del hongo causante de la Sigatoka negra en el banano.**

El agente causante de la Sigatoka negra es el hongo ascomicete *Mycosphaerella fijiensis*. Dicho fillum de hongos se caracteriza por producir ascosporas endógenas, poseer micelio tabicado y sus paredes celulares contienen quitina. Crecen en ambientes terrestres y acuáticos, en sustratos como la madera, hojas vegetales, materiales de quitina, estiércol, suelo, alimento, entre otros. En el mundo se han reportado cerca de 30.000 especies distintas de Ascomicetos. Pueden ser uni o pluricelulares, formar estructuras reproductivas en forma de taza o cuerpos de esporas corrugadas o en forma de champiñón. Dichos hongos secretan enzimas que comprenden celulasas, proteasas y otras toxinas, que en climas calientes y húmedos causan daños importantes a cultivos como el algodón, la lana, el banano, entre otros (Audersik, 1996). *M. fijiensis* es un hongo haploide-ascomicete, se caracteriza porque se reproduce en forma sexual y asexual durante su ciclo de vida. (Grupp *et al.*, 2007).

La reproducción sexual de *M. fijiensis* ocurre mediante el desarrollo de las ascosporas, esta fase es considerada como la más importante y de mayor influencia en el desarrollo de la enfermedad debido a que éstas pueden ser diseminadas por el viento a largas distancias (Cadavid, 1984). Las ascosporas

son expelidas de los sacos o ascas de los peritecios y son llevadas por el viento, la mayoría de las ascosporas caen a pocos centenares de metros del punto de expulsión (a menudo a orillas de los cultivos); sin embargo otras son llevadas a varios kilómetros de distancia (Marín *et al.*, 2003). Durante la reproducción asexual se producen las conidias, estos están asociados con la infección local en la planta ya que son diseminados a corta distancia en la superficie foliar por el escurrimiento del agua (Grupp *et al.*, 2007). Las conidias dependen del desplazamiento local del agua para trasladarse a las plantas jóvenes debajo de la capa superior del follaje y a plantas adyacentes (United Brands Company, 1984). En la tabla 2 se resumen las diferencias entre conidios y ascosporas responsables de la transmisión de *M. fijiensis*.

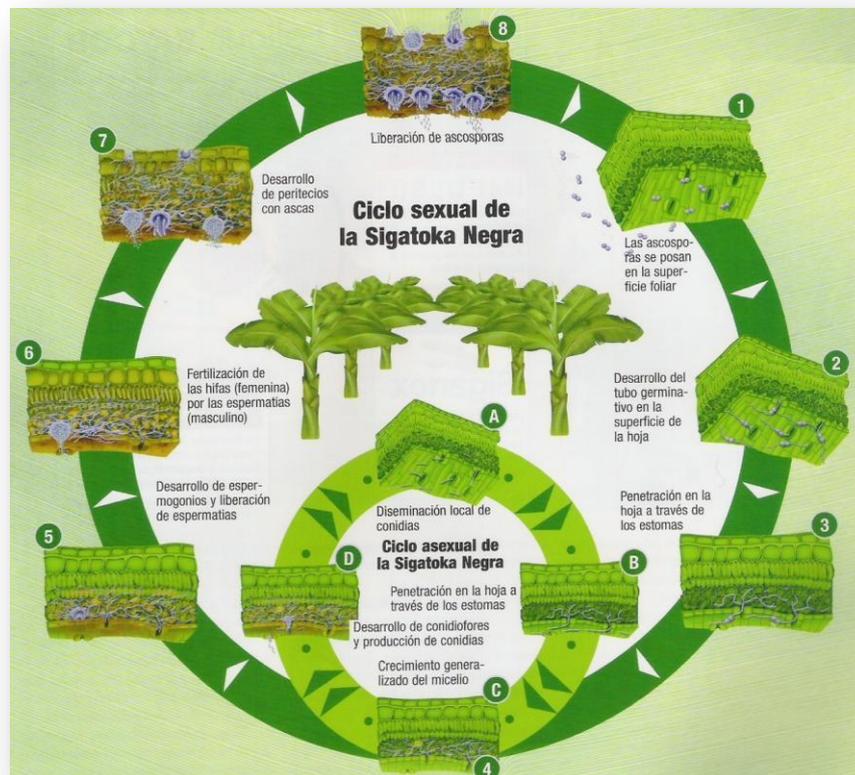
**Tabla 2.** Diferencias entre las conidias y las ascosporas de *M. fijiensis* (United Brands Company, 1984).

<b>Conidias</b>	<b>Ascosporas</b>
Producidas periódicamente con rocío presente	Producidas periódicamente con presencia de lluvia.
Humedad relativa necesaria para la germinación: 92 – 100% (Marin <i>et al.</i> , 2003)	Humedad relativa necesaria para la germinación: 98 – 100% (Marin <i>et al.</i> , 2003)
Producidas en ausencia de lluvia (con rocío)	Producidas dependiendo de la lluvia.
Liberadas por rocío y lluvia.	Liberadas principalmente por lluvia.
Diseminadas por agua.	Diseminadas por viento.
Infección sobre toda la hoja con tendencia hacia la base.	Infección mayormente hacia el ápice de la hoja.
Sobrevive de 3 a 4 semanas sobre la superficie de la hoja.	Sobrevive ocho semanas en los peritecios.

Puede sostener o incrementar la enfermedad durante la época seca.

Poca o ninguna infección durante la época seca.

Tras la germinación de las ascosporas o las conidias, el patógeno puede desarrollarse en la superficie foliar durante algún tiempo, aún antes de penetrar en la hoja a través de los estomas. En condiciones óptimas *M. fijiensis* puede completar su ciclo de vida, desde la germinación hasta la producción de esporas secundarias, en 21 días (Grupp *et al.*, 2007). En la figura 1 se muestra el ciclo de vida del patógeno.



**Figura 1.** Esquema del ciclo reproductivo sexual y asexual del hongo *M. fijiensis* (Grupp *et al.*, 2007).

#### 4.3. Control de la Sigatoka negra

La Sigatoka negra se ve favorecida por la alta susceptibilidad de las especies de banano que se utilizan en cultivos extensivos para la exportación. Hasta el momento no existen variedades resistentes que satisfagan los requerimientos

del mercado internacional, por lo que el control químico o bioquímico se convierte en la mejor técnica de combate contra la enfermedad (Guzmán *et al.*, 2002). Debido a la alta presión del inoculo, la naturaleza policíclica del hongo y las condiciones climáticas de las zonas bananeras tropicales aptas para el desarrollo y reproducción del *M. fijiensis*, se requiere un control estricto y frecuente con fungicidas a lo largo de todo el año.

#### **4.3.1. Control químico de la Sigatoka negra**

El uso de fungicidas químicos es la principal herramienta de control de la Sigatoka negra en cultivos comerciales (Marín y Romero, 1992; Marín *et al.*, 2003). Estos fungicidas pueden agruparse básicamente en tres categorías: protectante, de acción sistémica local y sistémicos con modos de acción distintos dependiendo de la familia química a la que pertenezcan (Gutiérrez, 1998; Marín y Romero, 1992).

Los fungicidas protectantes se caracterizan porque no penetran en las hojas, su eficacia depende de que haya una distribución uniforme en toda el área foliar de la hoja (especialmente la hoja candela) con el fin de formar una capa protectora. Su modo de acción es multisitio, por lo que la probabilidad de formar resistencia es nula (Marín *et al.*, 2003). Los fungicidas de acción sistémica local actúan en dos etapas diferentes en la biosíntesis de los ergosteroles, penetran en las hojas pero no se traslocan al resto de la planta, por lo que la generación de resistencia a este compuesto es menos probable, posee la ventaja de que no se ha encontrado resistencia cruzada con triazoles, lo que permite que pueda ser utilizado en la rotación de fungicidas de modo de acción distinto (Marín y Romero, 1992). Los fungicidas sistémicos penetran en la cutícula de la hoja e inhiben el crecimiento del hongo en los primeros estadíos de la enfermedad; estos fungicidas al ser tan específicos actúan en un solo paso de la fisiología del hongo, lo que incrementa la posibilidad de generar resistencia (Shillingford, 1989; Marín y Romero, 1992; Pérez *et al.*, 2002).

Como complemento a los fungicidas se utiliza aceite agrícola, el cual posee propiedades importantes para el control del patógeno. Este potencializa la acción del fungicida químico cuando se aplica en compañía, genera una mejor penetración, ayuda en la distribución en la hoja y favorece la permanencia del fungicida aplicado. Adicionalmente el aceite tiene efecto fungistático (Gutiérrez, 1998; Marín *et al.*, 2003).

#### **4.3.2. Resistencia de *M. fijiensis* a fungicidas químicos**

Un organismo adquiere resistencia a un producto químico determinado cuando su aplicación no causa el mismo efecto sobre las poblaciones del patógeno en las mismas concentraciones. Los mecanismos de resistencia más comúnmente presentados por los patógenos son: la menor permeabilidad de las membranas, detoxificación del fungicida, rutas metabólicas alternas y alteración del sitio de acción del fungicida cuando este es de acción específica en un solo sitio (Sierra, 1980; Peláez, 1999; Arango, 2010)

Los fungicidas que normalmente presentan resistencia al control de la Sigatoka negra son los sistémicos ya que son sustancias químicas muy específicas que poseen un solo sitio de acción en el metabolismo del hongo. Esto contrasta con los fungicidas protectantes que poseen acción multisitio razón por la cual el patógeno no genera resistencia (Marín y Romero, 1992; Peláez, 1999; Arango, 2010).

Los benzimidazoles son los fungicidas que presentan mayor riesgo, induciendo a la generación de razas resistentes de *M. fijiensis* (Stover 1979, Marín *et al.*, 2003). También se ha detectado la pérdida de sensibilidad al grupo de los triazoles como es el caso del propiconazol en Centro América (Romero y Sutton, 1997, Marín *et al.*, 2003); al thiabendazole (Dubois, 1997); al azoxystrobina (Amil *et al.*, 2007), trifloxystrobina (Chin *et al.*, 2001; Pérez *et al.*, 2002) y propiconazole (Romero y Sutton, 1997).

Las principales técnicas para evitar la resistencia son la rotación de productos de modos de acción diferentes, programas de sanidad regionales, monitoreo periódico de la susceptibilidad del patógeno en el laboratorio y la utilización de mezclas de fungicidas protectantes y sistémicos (Marín y Romero, 1992; Brent, 1995, Arango, 2010).

#### **4.3.3. Control cultural de la Sigatoka negra**

Aunque el control químico es la herramienta más eficaz contra la Sigatoka negra, para que éste sea exitoso debe estar complementado con controles culturales (Guzmán *et al.*, 2002; Marín *et al.*, 2003; Chillet *et al.*, 2009). Esta estrategia consiste en la eliminación de las partes de la planta contaminadas con la enfermedad para reducir las fuentes de inóculo y las condiciones microclimáticas favorables a la misma. Las principales estrategias de control cultural son: Drenaje, control de malezas, deshoje, deshije o desmache y la fertilización (United Fruit Company, 1982; Marín y Romero, 1992).

#### **4.3.4. Control biológico de la Sigatoka negra: Antecedentes**

El control biológico se define como la disminución en la severidad o incidencia de una enfermedad en respuesta al tratamiento con un microorganismo antagonista al patógeno (Adams, 1990). Este fenómeno es común en la naturaleza: de hecho se cree que muchos de los patógenos de plantas son mantenidos bajo control por diferentes antagonistas de manera permanente en el ambiente, y precisamente cuando se rompe este equilibrio, se origina la enfermedad (Jeffries, 1995; Young, 1999; López, 2002).

El control biológico en la filósfera ofrece una alternativa complementaria para el control de enfermedades foliares de las plantas, sin embargo, hasta que no se tenga un buen entendimiento de la ecología microbiana en la filósfera las

manipulaciones en el control biológico serán de tipo empírico y su éxito será solo fortuito. Para el éxito del control biológico se debe asegurar que el microorganismo controlador se establezca en la superficie foliar y esto se ve influenciado por diferentes factores ambientales como la radiación U.V. que puede afectar la viabilidad del microorganismo de control, las lluvias que pueden lavar el producto de las hojas y la presencia de otros agroquímicos que pueden ser tóxicos para el microorganismo de control (Andrews, 1990).

El control biológico de la Sigatoka negra ha recibido poca atención debido a la presencia en el mercado de fungicidas químicos y programas de sanidad que permiten un control eficaz de la enfermedad en las plantaciones de banano, por lo que la inversión y el interés en este tipo de tecnología se ven restringidas. Sin embargo, la resistencia creciente del patógeno a los pocos fungicidas sistémicos que se encuentran en el mercado, el incremento de la demanda de productos de consumo medio-ambientalmente amigables, los altos precios del petróleo, entre otros, han hecho que la atención se centre a estas alternativas de control biológico (Marín *et al.*, 2003)

Se han desarrollado diversos trabajos que se centran en la obtención de agentes biocontroladores capaces de reducir el crecimiento de *M. fijiensis in vitro* y de controlar la enfermedad en invernadero y campo.

En Costa Rica, Jimenez y colaboradores en 1987 aislaron 225 bacterias epifíticas de la superficie foliar de las hojas del banano y evaluaron su actividad antagónica contra *M. fijiensis*. Doce de estas bacterias mostraron un control efectivo en condiciones *in vitro*, y solamente una de las aisladas (*Pseudomonas sp.*) produjo un control superior al presentado por el fungicida protectante clorotalonil en condiciones de invernadero. Gonzales y colaboradores (1996) aislaron microorganismos que secretan enzimas capaces de dañar la pared celular de *M. fijiensis*. En su proyecto lograron aislar 120 bacterias quitinolíticas de hojas de banano en áreas de alta y baja presión de la enfermedad reportando que únicamente dos cepas de *Serratia marcescens* redujeron el crecimiento de *M. fijiensis* por encima del control

realizado por el fungicida sistémico propiconazole en invernadero. Por otro lado Guzmán y Villalta (2003) (resultados no publicados) encontraron que las especies del género *Bacillus* poseen un gran potencial para colonizar la superficie foliar de la hoja y una gran resistencia a las condiciones adversas del ambiente natural de cultivo, razón por la cual los estudios de control biológico han dirigido la atención a especies de este género. (Marín *et al.*, 2003)

En Colombia Zuluaga y Patiño, 2006; realizaron un estudio sobre el efecto de inductores de resistencia (Acibenzolar-S-metil (ASM) y ácido salicílico (AS)) y bacterias quitinolíticas como *Bacillus sp.* sobre el desarrollo de la Sigatoka negra en plantas de banano Gran Enano, en este estudio se encontró que formulaciones que contenían adición de bacterias quitinolíticas e inductores de resistencia podrían disminuir de un 46% a un 100% la cantidad de fungicidas convencionales usados en el control de la Sigatoka negra.

Ceballos en el 2009, aisló 648 bacterias aeróbicas formadoras de endospora (BAFEs) de diferentes cultivares de *Musa spp.* en el Urabá antioqueño y evaluó en condiciones *in vitro* la capacidad antagonista de sus metabolitos contra *M. fijiensis*. El 5 % de la colección de BAFEs -la mayoría del género *Bacillus*- generaron porcentajes de inhibición en el crecimiento del micelio mayores al 85% durante la prueba inicial de selección de aislados antagonistas. Del grupo de antagonistas se seleccionaron cuatro cepas de la especie *B. subtilis* como promisorias para el control de *M. fijiensis*, entre estas se encuentra *B. subtilis* EA-CB0015 que es la cepa empleada como ingrediente activo de los formulados evaluados en este trabajo. En China, en una plantación ubicada en la ciudad de Nanning, Guanxi, Fu y colaboradores (2010), aislaron de la filósfera de banano la cepa *B. subtilis* B106 que mostró capacidad antagónica *in vitro* contra diferentes patógenos de *Musa spp.*: *M. fijiensis*, *Mycosphaerella misicola* el hongo causante de la Sigatoka amarilla y *Colleotrichum musa* responsable de la antracnosis post-cosecha del banano. Aunque la mayoría de las investigaciones para el control biológico de la Sigatoka negra se ha centrado en bacterias, los hongos también han sido objeto importante de estudio. En Colombia y otros países latinoamericanos se han realizado numerosos trabajos con *Trichoderma harzianum* (Alvindhia y

Natsuaki, 2009), *Trichoderma spp* y *Gliocladium spp.*, (López, 2002; Gaviria, 2004). Se ha encontrado que *Trichoderma spp.* y *Gliocladium spp.* presentan poca tolerancia a bajas concentraciones de fungicidas utilizados en el control convencional de la enfermedad (Mancozeb) y a la luz ultravioleta propia de la zona de cultivo del banano, lo que dificulta el empleo de estos microorganismos en campo (Gaviria, 2004).

Actualmente existe en el mercado el biofungicida Serenade®, efectivo contra la Sigatoka negra en programas integrados con fungicidas convencionales. El ingrediente activo es la cepa *B. subtilis* QST 173 y los lipopéptidos que esta bacteria produce (Navarro, Manker & Edgecomb 2004). Este producto fue desarrollado por AgraQuest Inc., con los números de patentes para Estados Unidos 6.060.051; 6.103.228; 6.291.426 y 6.417.163 y con el número de Registro de la EPA 69592-7 (AgraQuest 2009). Actualmente este producto se encuentra registrado ante el ICA como un fungicida para el control de la Sigatoka negra, aunque no fue desarrollado específicamente para el control de esta enfermedad.

#### **4.4. Formulaciones de pesticidas biológicos:**

Para poder emplear un agente biológico para el control de una enfermedad en un cultivo es necesario el desarrollo de una formulación que permita llevar el microorganismo vivo desde la fábrica a la planta o sitio en que va a actuar, asegurando su viabilidad y potencializando su actividad (Bashan, 1998). Una formulación puede definirse como un producto estable, efectivo y de fácil aplicación obtenido a partir de una correcta combinación de auxiliares inertes e ingrediente activo (Cerón, 2004). Para el caso de las bioformulaciones el ingrediente activo consiste en uno o más microorganismos que ejercen algún efecto sobre la enfermedad o blanco. Por tratarse de organismos vivos la formulación debe asegurar su viabilidad y protección frente a las condiciones adversas del ambiente al cual están expuestos (Schisier *et al.*, 2004).

Dada su naturaleza, estas bioformulaciones pueden sufrir cambios en sus propiedades físicas y químicas que las hagan susceptibles a ciertas condiciones de pH, a contaminación con otros microorganismos, a la radiación U.V. y a condiciones térmicas, que pueden incidir negativamente en la función controladora (Brar *et al.*, 2007).

Para que un pesticida biológico foliar pueda ser comercializado y empleado en campo debe cumplir con los siguientes requisitos mínimos (Brar *et al.*, 2007):

- No presentar contaminación de otros microorganismos que puedan afectar la naturaleza del producto.
- Que el producto sea estable en el tipo de mezcla en el que se aplique (emulsión, suspensión, solución o coctel).
- Que sea resistente y no pierda sus propiedades controladoras con la radiación U.V.
- Que su acción controladora sea viable por un periodo razonable de tiempo.
- Que se garantice una distribución uniforme en la hoja luego de que sea aplicado en campo.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Microorganismo de estudio

En este estudio se empleo como ingrediente activo de las formulaciones la cepa de *B. subtilis* EA-CB0015 aislada de la filósfera por Ceballos en el 2009 de hojas de banano en el Urabá Antioqueño. Las cepas de *M. fijiensis* destinadas para las pruebas de antagonismo se aislaron de hojas de banano c.v. Gran Enano provenientes de la zona de Urabá - Antioquia en estadio seis de la enfermedad según la escala de Fouré (1982) y siguiendo la metodología empleada por Cenibanano (Dupont, 1982).

### 5.2. Preparación de las formulaciones del *B. subtilis* EA-CB0015

Se evaluaron dos formulaciones de *B. subtilis* EA-CB0015, una emulsión aceite en agua y una mezcla base agua. La emulsión estaba compuesta por: aceite de girasol (16,7 % V/V), goma Xanthan (0,6 % P/V), ácido propiónico (0,5 % V/V), buffer fosfato pH 5 3 M (3 % V/V), tween 80 (2,3 % V/V) y el resto caldo de cultivo de la fermentación de *B. subtilis* EA-CB0015. La mezcla en base agua estaba compuesta por: carboximetilcelulosa (3,5 % p/V), ácido propiónico (0,5 % V/V), glicerol (2 % V/V), goma Xanthan (0,1 % P/V) y el resto caldo de cultivo de la fermentación de *B. subtilis* EA-CB0015.

#### 5.2.1. Fermentación del *B. subtilis* EA-CB0015 en el biorreactor New Brunswick Bioflo 110 de 14 litros.

La fermentación del *B. subtilis* EA-CB0015 se realizó en el Biorreactor New Brunswick BIOFLO 110 de 14 L de capacidad en 9 L del medio Finley (3 g/L de extracto de carne; 1,9 g/L de peptona bacteriológica; 0,0043 g/L de sulfato de

manganeso tetrahidratado) medio desarrollado para la producción de esporas (Foldes *et al.*, 2000).

Para realizar la fermentación en el bioreactor, la bacteria conservada a -80°C se repicó en agar tripticasa de soya (TSA) al 50% y fue incubada durante 48 h a 30°C. Al cabo del tiempo de incubación, se inoculó una colonia en 50 mL de medio Finley a 30°C por 24 h en un erlenmeyer de 500 mL a 140 rpm. Dicho pre-inoculo se inoculó en un segundo cultivo de 500 mL del medio Finley en un erlenmeyer de 2000 mL. Finalmente, este último cultivo se inoculó en el biorreactor el cual se operó a 30°C, 140 rpm, 0.5 vvm, 4 baffles, con adición de 400 mL de antiespumante aniónico, y KOH y HCl para mantener el pH en condiciones neutras.

### **5.3. Metodologías para el cumplimiento del objetivo 1: Evaluación de la actividad antagónica de los formulados**

Para la evaluación del antagonismo de los formulados de *B. subtilis* EA-CB0015 a través del tiempo se empleo la técnica de inhibición de ascosporas descrita por Talavera y colaboradores (1996) y empleada por Ceballos (2009). Se determinó el efecto de las formulaciones de *B. subtilis* EA-CB0015 sobre el desarrollo del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis* en una hoja de banano sana. Para esto se recortaron discos de 9 cm de diámetro de una hoja número 1 sana de la variedad Gran Enano, se desinfectaron sumergiéndolas por un minuto en etanol al 70% y se hicieron tres lavados con agua estéril cada uno de un minuto, luego estos discos fueron sumergidos en muestras de cada formulado que se encontraban almacenados por tres meses a 25°C o a 4°C y se dejaron secar.

Las descargas de las ascosporas se realizaron siguiendo la metodología de Dupont (1982): para ello, se tomaron piezas de tejido infectado obtenido de plantas enfermas en estadio seis de la escala de Fouré (1982) de la zona del

Urabá antioqueño sin influencia de fumigación aérea y se graparon a discos de papel kraft con el envés de la hoja hacia el exterior. Estos discos se humedecieron y guardaron en bolsas selladas durante 48 horas. Luego se realizaron las descargas de ascosporas por una hora sobre el envés de los discos de las hojas con los tratamientos y se incubaron en cajas Petri con un pedazo de papel humedecido a 21°C por 48 horas. Pasado el periodo de incubación, el envés de las hojas se pintó con barniz transparente y se dejó secar por 24 horas. El barniz fue retirado de la hoja y teñido con safranina para observar con la ayuda de un microscopio las ascosporas adheridas a este.

Para determinar la germinación de las ascosporas se promedió la longitud ( $L$ ) de los tubos germinativos de 30 ascosporas por disco. La medición se realizó con el programa de procesamiento de imágenes Axio Vision® 4.2 de Zeiss® analizándose dos discos por tratamiento. Se empleó un diseño unifactorial con dos réplicas por tratamiento en donde se evaluó el factor formulación con tres niveles (emulsión, mezcla base agua y caldo de cultivo), como control positivo se utilizó el fungicida protectante Dithane FMB® (Mancozeb), como control biológico el Rhapsody® y como control absoluto se empleó agua destilada. La variable de respuesta evaluada fue el porcentaje de inhibición en la germinación de las ascosporas y se calculó considerando la germinación de las esporas del control absoluto ( $C\ Abs$ ) como 100% y utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inh} = \frac{L.Cabs - L.trat}{L.Cabs} * 100 \text{ (ecuación 1)}$$

Donde:

$L.Cabs$ : Longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis* para cada tratamiento evaluado.

$L.trat$ : Longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis* del control absoluto.

$\% \text{ de inh}$ : % de inhibición del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis*.

#### 5.4. Metodologías para el cumplimiento del objetivo 2: Evaluación de la viabilidad de los formulados

Para la evaluación de la viabilidad de *B. subtilis* EA CB-0015 en los formulados a través del tiempo se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC)/mL empleando la técnica de diluciones seriadas y sembrado por superficie en medio agar tripticasa de soya (TSA) al 50%. Para esto se tomaron muestras de un mililitro de cada formulación, se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-6}$  y se sembraron 100  $\mu$ L de las tres últimas diluciones. Las cajas se incubaron por 48 horas a 30°C y se realizó el conteo en aquellas diluciones que arrojaron entre 30 y 300 UFC por caja.

Para esta evaluación se empleó un diseño factorial 3 x 2 x 7 con tres factores: formulación, temperatura de almacenamiento y tiempo, el primero se evaluó en tres niveles (emulsión, mezcla base agua y caldo de cultivo), el segundo en dos niveles (4°C y 25°C) y el tercero en 6 niveles (30, 60, 90, 120, 159 y 180 días). Para este ensayo se empleó dos réplicas por tratamiento la variable de respuesta fue el número de UFC/mL en los tiempos evaluados. Adicionalmente se determinó el % de muerte celular entre el tiempo 0 y el tiempo 180 días como sigue:

$$\% \text{ de muerte celular} = \frac{N_0 - N}{N_0} * 100 \text{ (ecuación 2)}$$

Donde:

*N*: Número de UFC/mL viables a los 180 días de almacenamiento.

*N*<sub>0</sub>: Número de UFC/mL viables en el tiempo 0.

### **5.5. Metodologías para el cumplimiento del objetivo 3:** Evaluación de los formulados sometidos a presiones ambientales simuladas

Para la evaluación de la tolerancia de los formulados de *B. subtilis* EA CB-0015 a las presiones ambientales propias del cultivo del banano se simuló en el laboratorio condiciones de radiación U.V., presencia de fungicidas y lavado por lluvia. Se determinó la viabilidad de *B. subtilis* EA-CB0015 al someter las formulaciones a la radiación U.V.-C (254nm), a la mezcla con fungicidas convencionales empleados para el control de la Sigatoka negra y se evaluó la adherencia del formulado al ser sometido a un lavado por lluvia.

- **Evaluación de la tolerancia de los formulados a la radiación U.V.**

Para evaluar la tolerancia de los formulados de *B. subtilis* EA-CB0015 a la radiación U.V., se determinó la viabilidad de *B. subtilis* EA-CB0015 antes y después de someter las formulaciones a radiación U.V., esto se realizó empleando la metodología planteada por Boyd–Wilson (2002).

De cada formulación se tomó una muestra de 20 mL que fue sometida a una fuente de radiación Phillips U.V.-C (254 nm) de 30 Watts de potencia durante 180 minutos. La muestra se depositó en un recipiente de vidrio con agitación magnética a 22 cm de la fuente de radiación y se evaluó la viabilidad en diferentes tiempos empleando las técnicas de diluciones seriadas y sembrado por superficie descrita en el numeral 5.4.

En este experimento se empleó un diseño multifactorial 3 x 8 con dos factores en donde el primer factor fue tipo de formulado con tres niveles (mezcla agua, emulsión y caldo de cultivo) y el segundo factor con ocho niveles fue tiempo de exposición a la luz U.V.-C (254 nm) (0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 y 180 min). Los resultados se compararon con el control biológico Rapsody® y se emplearon dos réplicas por tratamiento. La variable de respuesta de este experimento fue el número de UFC/mL en cada uno de los tiempos de evaluación.

Adicionalmente se determinó el  $t_{d50}$  tiempo en que el 50% de las esporas de *B. subtilis* EA-CB0015 pierden su viabilidad a causa de la exposición a la radiación U.V. utilizando para el análisis de los datos un diseño unifactorial, en donde el factor sería el % de muerte celular.

- **Evaluación de la tolerancia de los formulados a las mezclas con fungicidas químicos.**

Para determinar si las formulaciones de *B. subtilis* EA-CB0015 pueden actuar en combinación con las mezclas de fungicidas químicos se determinó la viabilidad de *B. subtilis* EA-CB0015 antes y después de someter las formulaciones a las mezclas de tanque empleadas para el control de la Sigatoka negra en plantaciones comerciales. Para esto se tomaron muestras de 10 mL de cada formulación las cuales fueron sometidas a las diferentes mezclas de tanque descritas en la tabla 3. Las mezclas de fungicidas químicos se realizaron de acuerdo a lo descrito por Becerra (2007). Para cada una de las mezclas se evaluó la viabilidad de *B. subtilis* EA-CB0015 utilizando la técnica de diluciones seriadas y sembrado por superficie descrita anteriormente (numeral 5.4.) en diferentes tiempos.

Para esto se empleo un diseño multifactorial 8 x 8 x 2 en donde el primer factor evaluado fue tipo de mezclas de tanque con 8 niveles (ver tabla 3), el segundo fue el tiempo de exposición a las mezclas o tiempo de evaluación de la viabilidad con ocho niveles (0, 0.5; 1.5; 3; 6; 12 y 25 horas) y el tercero fue tipo de formulación con dos niveles (mezcla base agua y suspensión bacteriana). En este experimento no se evaluó la formulación en emulsión debido a que esta fue la formulación con menor capacidad de inhibir a *M. fijiensis in vitro* y, adicionalmente, esta no fue muy promisoría en las evaluaciones en invernadero presentadas más adelante. Los resultados se compararon con el control biológico Rapsody® y se emplearon dos réplicas por tratamiento. La variable de respuesta evaluada fue el número de UFC/mL en cada uno de los tiempos

de evaluación. Adicionalmente se determinó el  $t_{d50}$  tiempo en que el 50% de las esporas de *B. subtilis* EA-CB0015 pierden su viabilidad a causa de la exposición a cada una de las mezclas utilizando para el análisis de los datos un diseño unifactorial, en donde el factor sería el % de muerte celular. También se determinó el porcentaje de muerte celular luego de 3 y 25 horas (3 horas corresponde al tiempo promedio que se demora una formulación en ser aplicada luego de su preparación y 25 horas es el tiempo máximo que una formulación permanece en los tanques de mezcla antes de ser aplicada) (Fuente propia: visita técnica a la planta de fumigación de C.I. Unibán- Calima Noviembre de 2010).

En la tabla 3 se muestra las concentraciones de los insumos utilizados para prepara las mezclas de fungicidas químicos comerciales utilizados por C.I. Uniban en su programa de control de la Sigatoka en Urabá a 2010. En esta tabla se encuentra adicionada los bioformulados a evaluar.

**Tabla 3.** Composición de las mezclas de tanque de fungicidas químicos empleadas para evaluar la viabilidad del *B. subtilis* EA-CB0015 en base a la mezclas de tanques utilizados en los cultivos de banano para el control de la Sigatoka negra.

<b>Compuesto/ Tratamiento</b>	<b>Agua (%V/V)</b>	<b>Aceite agrícola (%V/V)</b>	<b>Dithane® (%V/V)</b>	<b>Pegal® (%V/V)</b>	<b>Clorotalonil® (%V/V)</b>	<b>Formulado (%V/V)</b>	<b>SICO® (%V/V)</b>	<b>SIGANEX® (%V/V)</b>	<b>Baycor ® (%V/V)</b>	<b>Impulse® (%V/V)</b>	<b>OPUS ® (%V/V)</b>	<b>Atlas® (%V/V)</b>	<b>Calixin ® (%V/V)</b>
<b>Mezcla 1</b>	72,53	0	0	0	7,47	20	0	0	0	0	0	0	0
<b>Mezcla 2</b>	38,86	40,88	8,79	0,41	0	9,31	1,76	0	0	0	0	0	0
<b>Mezcla 3</b>	38,51	40,88	8,79	0,41	0	9,22	0	2,2	0	0	0	0	0
<b>Mezcla 4</b>	38,51	40,88	8,79	0,41	0	9,22	0	0	2,2	0	0	0	0
<b>Mezcla 5</b>	38,86	40,88	8,79	0,41	0	9,31	0	0	0	1,76	0	0	0
<b>Mezcla 6</b>	36,75	40,88	8,79	0,41	0	8,78	0	0	0	0	4,4	0	0
<b>Mezcla 7</b>	38,86	40,88	8,79	0,41	0	9,31	0	0	0	0	0	1,76	0
<b>Mezcla 8</b>	38,51	40,88	8,79	0,41	0	9,21	0	0	0	0	0	0	2,2

- **Resistencia de los formulados al lavado por la lluvia.**

Para evaluar la susceptibilidad de los formulados de *B. subtilis* EA-CB0015 al lavado por la lluvia se empleo la metodología descrita por Brar y colaboradores (2007), se tomaron muestras de 1 mL de cada formulado y se esparcieron uniformemente en una superficie plana de vidrio pyrex previamente secada y pesada. La formulación se dejó secar a 30°C por 2 horas, que corresponde al tiempo mínimo necesario recomendado por las casas productoras de agroquímicos para garantizar adherencia de la mezcla en la hoja antes de que comience a llover (Gutiérrez, 2010)

Cada placa se colocó a 2 cm por debajo de una bureta de 100 mL con 40 mL de agua destilada que se dejó caer sobre la superficie a una velocidad de 20 mL/min. Durante el proceso la placa se movió continuamente de abajo a arriba y de un lado a otro para lograr un lavado uniforme.

Terminado este proceso, se dejaron secar las placas a 30°C hasta peso constante y se pesaron.

Para esta evaluación se empleo un diseño unifactorial en donde el factor evaluado fue tipo de formulado con tres niveles (emulsión, mezcla base agua y caldo de cultivo), como variable de respuesta se determinó el porcentaje de adherencia a la superficie de vidrio empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de adh} = \left( 1 - \frac{W_{formu} - W_{final}}{W_{formu} - W_{pyrex}} \right) * 100 \text{ (ecuación 3)}$$

Para:

*W<sub>formu</sub>*: Peso seco de la superficie de vidrio más la formulación luego de transcurrido 2 horas.

*W<sub>pyrex</sub>*: Peso seco de la superficie de vidrio

*W<sub>final</sub>*: Peso de la superficie de vidrio más la formulación luego del lavado con 40 mL de agua luego de alcanzado peso constante.

*% de adh*: Porcentaje de adherencia del formulado a la superficie luego del proceso de lavado.

Como control positivo se evaluaron los fungicidas Dithane F-MB®, Bravonil® y como control biológico el fungicida Rhapsody®. Para cada ensayo se realizaron 3 réplicas por tratamiento.

#### **5.6. Metodología para el cumplimiento del objetivo 4:** Evaluación del efecto de las bioformulaciones sobre la Sigatoka negra en invernadero.

La evaluación del efecto de los formulados de *B. subtilis* EA-CB0015 sobre la Sigatoka negra en condiciones de invernadero se llevó a cabo en el invernadero de la Universidad EAFIT en Medellín. Para esto se emplearon plantas de banano c.v. Williams de 4 meses de edad y la inoculación del patógeno se hizo de manera artificial aplicando una suspensión micelial del hongo *M. fijiensis* a la hoja número uno de la planta, se aseguró la no caída de rocío o lluvia durante la primera hora de inoculación y se garantizó una humedad relativa aproximada de 90% a 28°C durante todo el experimento empleando un control electrónico de humedad.

La obtención de micelio de *M. fijiensis* para la inoculación de las plantas se hizo siguiendo la metodología de descarga de ascosporas utilizada por Cenibanano (Dupont, 1982). Para esto se repitió el procedimiento descrito en el numeral 5.3., con la diferencia de que en esta parte la descarga se hizo sobre agar simple al 2% y no sobre tejido vegetal sano. Las cajas con las esporas se incubaron a 21°C por 24 horas y con ayuda de un estéreo microscopio y la punta de una aguja estéril se recolectaron las ascosporas germinadas. Estas esporas se incubaron en agar papa dextrosa (PDA, Merck) a 23°C en oscuridad por ocho días hasta obtener los cultivos monospóricos. Éstos se fragmentaron con un vortex durante 2 minutos en un falcon de 15 mL con 20

bolas de vidrio de 7 mm de diámetro y 6 mL de agua estéril. La suspensión obtenida se inoculó en 100 mL de caldo Sabouraud (Merck) por 8 días a 30°C. El micelio obtenido fue fragmentado de nuevo con la metodología anteriormente descrita. A la suspensión de micelio se le adicionó: Tween 20 (0,05% V/V), carboximetilcelulosa de sodio (0,05% P/V), caldo Saboroud (2% V/V) y esta nueva suspensión fue empleada para la inoculación de las plantas. En la inoculación del hongo se empleó una brocha para distribuir uniformemente la suspensión de micelio en el haz y el envés de la hoja número 1.

La aplicación de las formulaciones se realizó un día después de la inoculación de las plantas con el patógeno. Éstas fueron diluídas hasta una concentración de  $1 \times 10^8 \pm 0,1$  UFC/mL y se aplicaron utilizando un aerógrafo de la referencia Mini Spray gun with cup K-3® con aspersor en abanico conectado a un compresor de 30 psi y calibrado para asperjar 50 gotas/cm<sup>2</sup> a una altura de 30 cm. Para la fumigación se hizo un solo paso por el haz y el envés de las hojas infectadas a una altura de 30 cm; garantizando una concentración mínima de 50 gotas/cm<sup>2</sup> (simulando las condiciones de aspersión aérea del Urabá Antioqueño) (Gutiérrez, 2010). Las aplicaciones se realizaron afuera del invernadero para evitar interferencia entre los tratamientos y las plantas se aleatorizaron dentro del invernadero empleando un diseño estadístico unifactorial en el cuál se evaluó el factor formulación con tres niveles (emulsión, mezcla base agua y suspensión bacteriana). Como controles se emplearon un control químico Dithane F-MB® (Mancozeb) en agua (20%V/V), un control biológico Rhapsody® ( $1 \times 10^8 \pm 0,1$  UFC/ml) y agua estéril como control negativo.

El desarrollo de la enfermedad se midió al mes de haber infectado las plantas. Se determinó el grado de infección utilizando la escala de Fouré (1982) y el área necrosada con la ayuda de una cámara Samsung de 8 Mega-pixels y el software de procesamiento de imágenes Axio Visio® 4.2 de Zeiss®.

### **5.7. Análisis estadístico:**

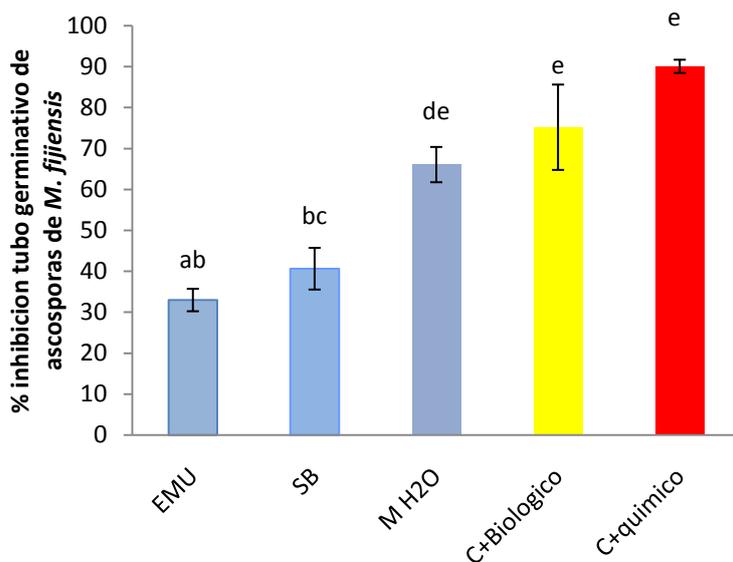
Todos los resultados obtenidos se procesaron en el software Statgraphics® versión 5.1. , se realizaron análisis de varianza simples ANOVA con un nivel de confianza del 95%. Los análisis de rangos múltiples se realizaron utilizando los parámetros de la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95%. Los supuestos de normalidad e igualdad de varianza se comprobaron a partir del análisis de residuales que en todos los experimentos su distribución fue normal.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Resultados del objetivo 1: Evaluación de la actividad antagónica de los formulados

Para la evaluación de la actividad antagónica de las formulaciones de *B. subtilis* EA-CB0015 *in vitro* se determinó el porcentaje de inhibición del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis* sobre material vegetal sano luego de tres meses de almacenamiento. Para esto se empleó un diseño factorial 2 x 3 en donde los factores considerados fueron temperatura de almacenamiento y tipo de formulación y la variable de respuesta fue porcentaje de inhibición del tubo germinativo.

A partir de los resultados del análisis ANOVA se encontró que la interacción entre temperatura de almacenamiento y tipo de formulación no ejercía un efecto significativo sobre el porcentaje de inhibición de las ascosporas del hongo (valor  $p = 0,433$ ), por lo que se procedió a evaluar los factores individuales. El factor temperatura de almacenamiento no afectó significativamente la variable de respuesta (valor  $p = 0,6766$ ), mientras que el factor tipo de formulación sí presentó un efecto significativo (valor  $p = 0,01$ ) (Ver anexo 2). En la grafica 1 se muestran los porcentajes de inhibición de las ascosporas para cada uno de los formulados de *B. subtilis* EA-CB0015 evaluados luego de tres meses de almacenamiento.



**Gráfica 1.** Porcentaje de inhibición del tubo germinativo de las formulaciones de *B. subtilis* EA-CB0015 luego de tres meses de almacenamiento. En donde C+químico denota control positivo químico Dithane®; C+biológico control positivo biológico Rhapsody®; M H2O formulación mezcla base agua; SB suspensión bacteriana; EMU formulación emulsión agua en aceite. Los grupos homogéneos que tienen la misma letra no difieren estadísticamente. Los intervalos representan los errores estándar de la media. Las medias de las barras con letras iguales denotan diferencias estadísticamente no significativas ( $p < 0,05$ ) por las pruebas de rangos múltiples de Tukey.

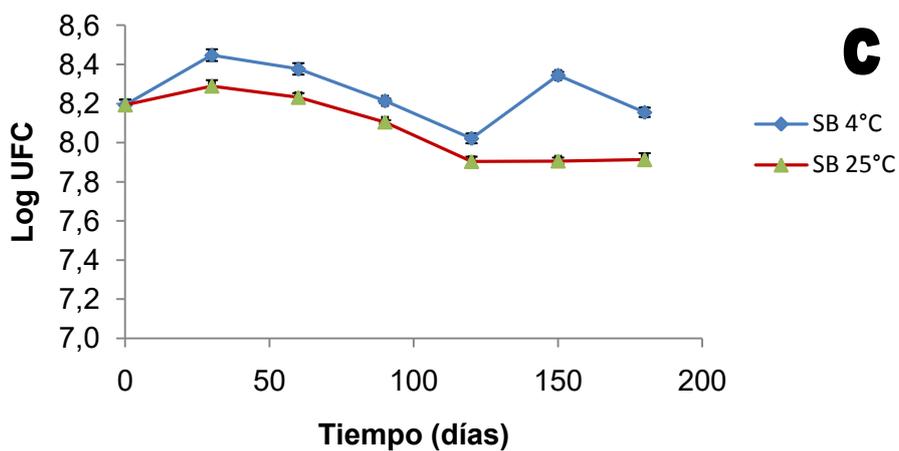
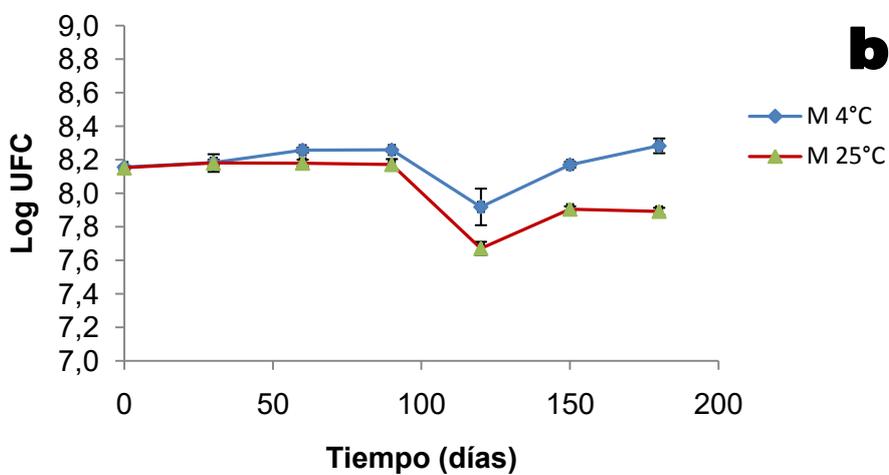
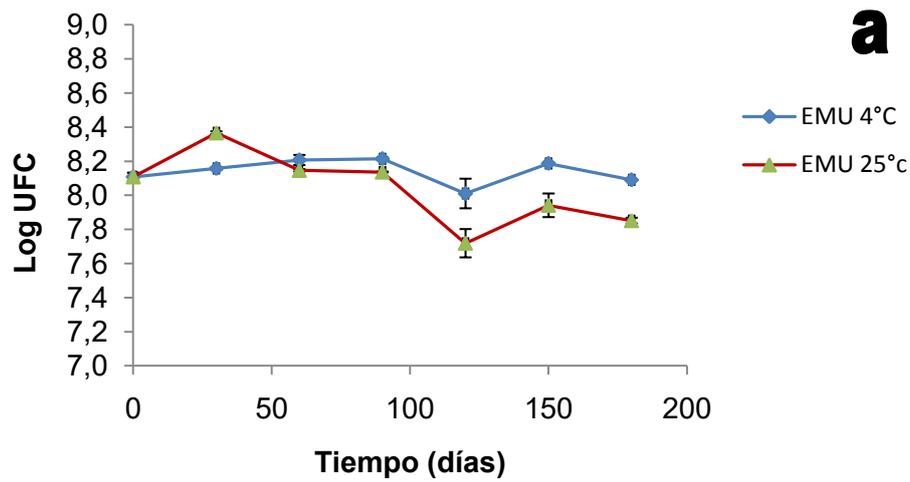
En la gráfica 1 se observa que la formulación mezcla base agua (M H2O) fue la formulación que mostró una mayor capacidad de inhibir al patógeno, con un porcentaje de inhibición del tubo germinativo de  $66,1 \pm 4,3\%$ , ésta no presentó diferencias significativas con los controles positivo químico y biológico (C+químico, C+biológico) con porcentajes de inhibición de  $90,1 \pm 1,61\%$  y  $75,2 \pm 10,43\%$  respectivamente. La emulsión y la suspensión bacteriana fueron los tratamientos que mostraron la menor capacidad de inhibir el patógeno, con porcentajes de inhibición de  $33,0 \pm 2,7\%$  y  $40,6 \pm 5,1\%$ , respectivamente; valores significativamente inferiores a los presentados por los controles positivos pero sin diferencias estadísticas entre ellos.

Estos resultados indican que la formulación de *B. subtilis* EA-CB0015 que presenta mayor capacidad de inhibir el patógeno a nivel *in vitro* es la mezcla base agua.

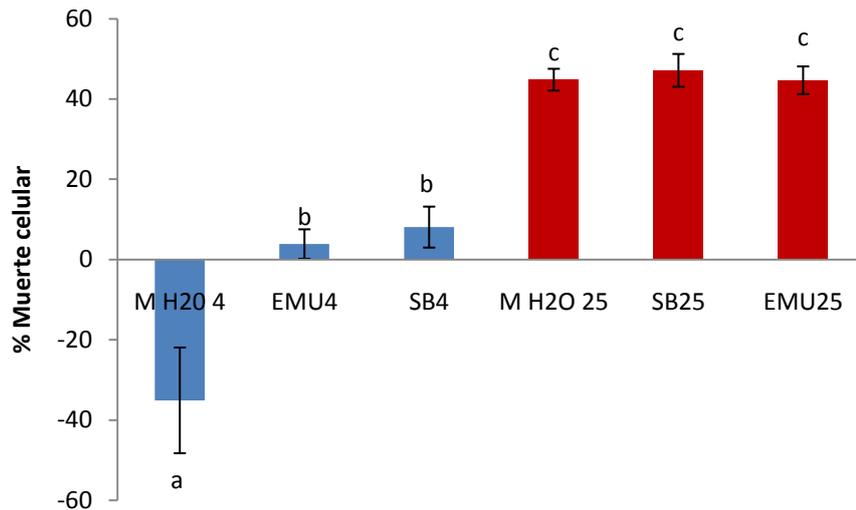
## **6.2. Resultados del objetivo 2:** Evaluación de la viabilidad de los formulados

Para la evaluación de la viabilidad de las formulaciones de *B. subtilis* EA-CB0015 *in vitro* se realizaron recuperaciones de UFC de *B. subtilis* EA-CB0015 mensuales por un periodo de 6 meses en los cuales las formulaciones fueron almacenadas a dos temperaturas diferentes, 4°C y 25°C. Para esto se empleó un diseño factorial 7 x 2 x 3 en donde los factores considerados fueron el tiempo de muestreo, la temperatura de almacenamiento y el tipo de formulación. La variable de respuesta evaluada fue el Log(UFC/mL) en el tiempo y adicionalmente se evaluó el porcentaje de muerte celular a los 180 días de almacenamiento.

A partir del análisis de varianza ANOVA se encontró que todos los factores y sus interacciones afectaron significativamente la variable de respuesta UFC/mL con un valor  $p=0$  (anexo 3). En la gráfica 2 se presentan las cinéticas de viabilidad para la formulación en base agua, la emulsión y la suspensión bacteriana de *B. subtilis* EA-CB0015 y en la gráfica 3 se presenta el porcentaje de muerte celular para cada uno de los tratamientos luego de 180 días.



**Gráfica 2:** Cinética de viabilidad de las formulaciones de *B. subtilis* EA-CB0015 para dos temperaturas de almacenamiento (4°C y 25°C). a) Formulación en emulsión (EMU); b) formulación mezcla base agua (M); c) Suspensión bacteriana (SB). Los intervalos representan los errores estándar de la media.



**Gráfica 3:** Porcentaje de muerte de las formulaciones de *B. subtilis* EA-CB0015 después de 180 días de almacenamiento a dos temperaturas (4°C y 25°C). En donde: M H2O 4 y M H2O 25 denotan formulación mezcla en base agua almacenada a 4°C y 25°C respectivamente; EMU4 y EMU25 formulación emulsión aceite en agua almacenada a 4°C y 25°C respectivamente; SB4 y SB25 suspensión bacteriana almacenada a 4°C y 25°C respectivamente. Los grupos homogéneos que tienen la misma letra no difieren estadísticamente. Los intervalos representan los errores estándar de la media. Las medias de las barras con la misma letra denotan diferencias estadísticamente no significativas ( $p < 0,05$ ) por las pruebas de rangos múltiples de Tukey.

En la grafica 2 se puede apreciar, para todas las temperaturas y tipos de formulación, un aumento significativo del número de UFC/mL en los primeros meses de evaluación; ésto seguido con una disminución de la viabilidad de la cepa a partir del primer mes para la suspensión bacteriana y del tercer mes para la emulsión y la mezcla base agua. Para el caso de la formulación en emulsión (gráfica 2 a y grafica 3) la viabilidad celular se vio disminuida en un 44,7% al cabo de 180 días cuando fue almacenada a 25°C en comparación a 3% cuando fue almacenada a 4°C durante el mismo periodo de tiempo. Para la mezcla en base agua (gráfica 2 b y grafica 3) se presentó una disminución de la viabilidad celular del 43,4% en 180 días cuando fue almacenada a 25°C,

pero no se observó disminución al ser almacenada a 4°C. Finalmente, la suspensión bacteriana (gráfica 2 c y grafica 3) presentó una disminución de la viabilidad celular del 47,4% cuando fue almacenada a 25°C en 180 días y una disminución del 8,3% cuando fue almacenada a 4°C durante el mismo lapso de tiempo.

Para todas las formulaciones, la temperatura de almacenamiento de 25°C generó una mayor disminución en la viabilidad de *B. subtilis* EA-CB0015 con porcentajes entre 44,7 % y 47,1 %, sin diferencias significativas para los diferentes formulados, ésto comparado con la temperatura de 4°C en donde se obtuvieron disminuciones entre -35,0 % y 8,1 %. En esta temperatura, la mezcla base agua (M4) presentó un crecimiento en las UFC/mL del 35,0 % luego de los 180 días de almacenamiento mientras que la suspensión bacteriana y la emulsión presentaron reducciones inferiores al 10,0 % sin diferencias entre ellas. Estos resultados sugieren que al inicio del almacenamiento hay un aumento celular debido posiblemente a una germinación de las esporas de *B. subtilis* EA-CB0015 y posteriormente una división celular por consumo de algunos nutrientes presentes en la formulación y que la mayor muerte celular a temperatura de 25°C podría sugerir que a estas condiciones de temperatura las células se dividen pero igualmente ocurre lisis celular con el paso del tiempo.

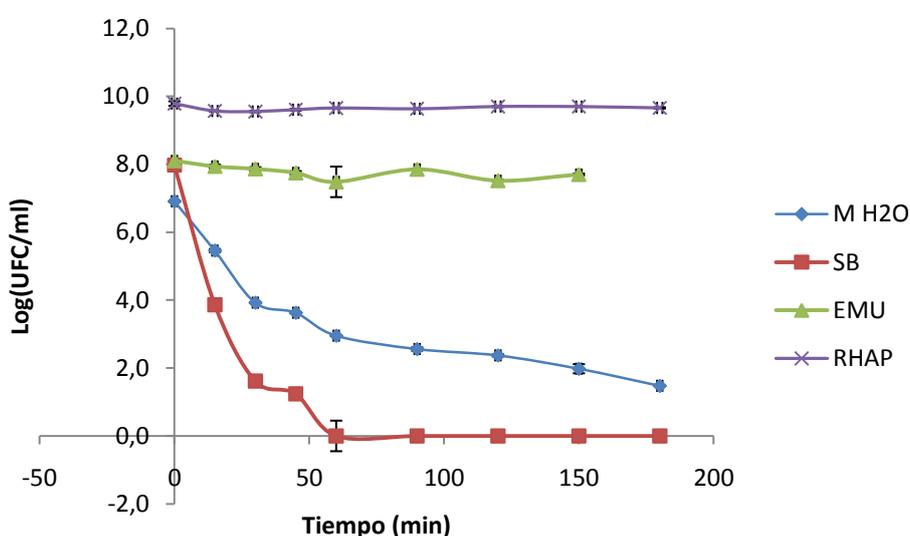
### **6.3. Resultado del objetivo 3:** Evaluación de las formulaciones al ser sometidas a presiones ambientales simuladas

- **Evaluación de la tolerancia de los formulados a la radiación U.V.**

Para la evaluación de la tolerancia de los formulados a la radiación U.V. se evaluó la viabilidad de *B. subtilis* EA-CB0015 cuando se sometieron a una radiación U.V.-C (254 nm) durante 180 minutos en el laboratorio. Para esto se empleo un diseño factorial 8 X 3 en donde los factores evaluados fueron tiempo de exposición a la radiación U.V. y tipo de formulación (mezcla base agua,

emulsión y suspensión bacteriana). La variable de respuesta fue el número de UFC/mL y el  $t_{d50}$  tiempo en que el 50% de las esporas del *B. subtilis* EA-CB0015 pierden la viabilidad a causa de la exposición a la radiación U.V.

A partir del análisis de varianza ANOVA se encontró que los factores y sus interacciones afectan significativamente la variable de respuesta con un valor  $p = 0$  (Ver Anexo 4). En la gráfica 4 se muestran las cinéticas de viabilidad del *B. subtilis* EA-CB0015 para cada una de las formulaciones evaluadas, cuando son sometidas a la radiación U.V.



**Gráfica 4.** Cinética de viabilidad de las formulaciones de *B. subtilis* EA-CB0015 expuestas a la radiación U.V. (254 nm). En donde M H2O denota formulación mezcla base agua, SB suspensión bacteriana, EMU formulación en emulsión y RHAP Rhapsody® que actúa como control biológico. Los intervalos representan los errores estándar de la media.

En la gráfica 4 se observa que las formulaciones en base agua (M H2O) y suspensión bacteriana (SB) muestran un descenso significativo en el número de UFC/mL, la suspensión bacteriana pierde el 100% de su viabilidad a los 60 minutos, mientras que la formulación en base agua pierde el 99 % a los 180

minutos, esto a diferencia del control biológico Rhapsody® el cual mantiene su viabilidad constante durante todo el tiempo de evaluación.

Con el fin de comparar la susceptibilidad a la radiación U.V. de los formulados de *B. subtilis* EA-CB0015 se determinó el  $t_{d50}$ . En la tabla 4 se muestra los resultados.

**Tabla 4.** Tiempo en que el 50% de las esporas de *B. subtilis* EA-CB0015 pierden su viabilidad al ser sometidas a una radiación U.V-C ( 254 nm).

Formulación	$t_{d50}$ (min)
Formulación base Agua (M H2O)	7,77
Suspensión bacteriana (SB)	6,67
Emulsión (EMU)	37,39
Rhapsody®	Mayor de 180

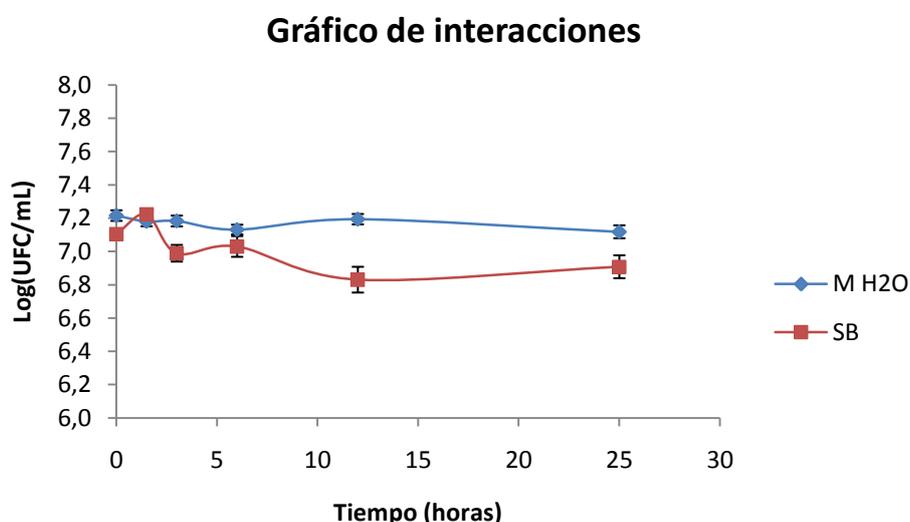
En la tabla 4 se observa que la suspensión bacteriana y la formulación base agua con un  $t_{d50}$  de 6,67 minutos y 7,77 minutos respectivamente presentaron una pérdida más acelerada de la viabilidad del *B. subtilis* EA-CB0015 al compararlas con la formulación en emulsión con un  $t_{d50}$  de 37,39 minutos. Ninguno de los tratamientos igualó el control positivo biológico Rhapsody® el cual mostró un  $t_{d50}$  mayor de 180 minutos. Este en el tiempo de evaluación alcanzó una pérdida en la viabilidad de las esporas de 24,1%.

Estos resultados sugieren que la radiación U.V. generó mutaciones a nivel de DNA en las esporas de *B. subtilis* EA-CB0015 contenidas en las formulaciones y por ende una disminución de la viabilidad de las mismas, además el ambiente de la formulación mejoró en algún grado el  $t_{d50}$  como lo muestra la tabla 4, sin embargo sería recomendable añadir un protector U.V. a las formulaciones.

- **Evaluación de la tolerancia de los formulados a las mezclas con fungicidas químicos.**

Para determinar si las formulaciones de *B. subtilis* EA-CB0015 pueden actuar en combinación con las mezclas de fungicidas químicos se determinó la viabilidad de *B. subtilis* EA-CB0015 antes y después de someter las formulaciones a las mezclas de fungicidas empleadas para el control de la Sigatoka negra. Para eso se empleó un diseño estadístico factorial 8 x 8 x 2 en donde se evaluaron los factores tipo de mezclas fungicidas, el tiempo de exposición y el tipo de formulación. La variable de respuesta fue el Log(UFC/mL) en el tiempo, el  $t_{d50}$  tiempo en que el 50% de las esporas de *B. subtilis* EA-CB0015 pierden la viabilidad a causa de la exposición a cada una de las mezclas fungicidas y el porcentaje de muerte celular luego de 3 y 25 horas. A partir del análisis de varianza ANOVA se encontró que tanto los factores como sus interacciones afectaron significativamente la variable de respuesta (Ver anexo 5).

En la gráfica 5 se muestra la interacción entre los factores tiempo y tipo de formulación, independiente del factor mezcla de fungicidas.



**Gráfica 5.** Cinética de viabilidad de las formulaciones expuestas a mezclas con fungicidas químicos. En donde MH2O denota formulación mezcla base agua y SB suspensión bacteriana

En la gráfica 5 se muestra que la formulación mezcla base agua (M H2O) presentó una menor muerte celular en el tiempo que la suspensión bacteriana (SB), esto independiente de las mezclas de fungicidas evaluadas. La suspensión bacteriana comenzó a presentar una pérdida en la viabilidad a partir de la tercera hora hasta alcanzar una pérdida máxima de 36,3 % a la hora 25, comparado a la mezcla de base agua que en la hora 25 presentó una reducción en la viabilidad del 20,1 %.

En la tabla 5 se muestra el  $t_{d50}$ , y porcentaje de muerte celular a las 3 y 25 horas para cada formulado de *B. subtilis* EA-CB0015 y en cada mezcla de fungicida.

**Tabla 5.** Tiempo en que el 50% de las esporas de *B. subtilis* EA-CB0015 pierden su viabilidad y porcentaje de muerte celular a las 3 y 25 horas para las formulaciones de *B. subtilis* EA-CB0015 al ser expuestas a las mezclas de tanques de los fungicidas empleados para el control de la Sigatoka negra.

Mezcla	$t_{d50} \text{ M H2O}$ (h)	$t_{d50} \text{ SB}$ (h)	% muerte celular a las 3 h		% muerte celular a las 25 h	
			M H2O	SB	M H2O	SB
M1	< 25	< 25	3,71%	9,16%	24,62%	18,02%
M2	< 25	< 25	18,61%	20,98%	10,55%	5,35%
M3	< 25	< 25	32,07%	-19,83%	25,35%	-13,75%
M4	< 25	< 25	25,91%	28,80%	21,97%	0,51%
M5	< 25	< 25	16,30%	40,85%	36,41%	73,10%

M6	< 25	5,5 h	7,20%	27,10%	28,12%	68,89%
M7	< 25	3,6 h	17,00%	41,05%	17,38%	59 %
M8	< 25	6,2h	6,00%	1,66%	6,47%	75,21%

M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7 y M8 denotan las diferentes mezclas fungicidas a las cuáles fueron sometidos los formulados. La composición de dichas mezclas se muestran en la tabla 3.

En la tabla 5 se observa que la formulación mezcla base agua para todas las mezclas fungicidas presentó un  $t_{d50}$  mayor a veinticinco horas y que la suspensión bacteriana presentó un  $t_{d50}$  mayor a 25 horas en cinco de las ocho mezclas de fungicidas. Las tres mezclas en las que la suspensión bacteriana alcanzó reducciones en la viabilidad superiores al 50% en 25 horas poseían los fungicidas Opus®, Atlas® y Calixin®. Éstos resultados pueden sugerir que el *B. subtilis* EA-CB0015 puede ser más susceptible a estos productos. Además, dado que en la formulación mezcla base agua las reducciones de la viabilidad fueron inferiores al 50%, la formulación puede estarle otorgando protección extra al *B. subtilis* EA-CB0015, lo que le permite conservar la viabilidad durante periodos prolongados de exposición a mezclas fungicidas.

En relación a los porcentaje de pérdida de la viabilidad, en condiciones ordinarias (3 horas) las mezclas M2 (SICO®), M3 (Siganex®) y M4 (Baycor®) con porcentajes de reducción de 18,6%, 32,1% y 25,9% respectivamente presentaron los mayores índices de reducciones de la viabilidad para la formulación mezcla base agua y en condiciones extraordinarias (25 horas) los mayores índices se registraron en las mezclas M1 (Bravonil®), M3(Siganex®), M5(Bumper®) y M6(Opus®) con porcentajes de 24,6%, 25,4%, 36,7% y 28,1% respectivamente. Ésto comparado con los de la suspensión bacteriana que a condiciones ordinarias (3 horas) las mezclas M2 (SICO®), M3 (Siganex®) y

M4 (Baycor®) presentaron 20,98%, -19,83%<sup>1</sup> y 28,80% y a condiciones extraordinarias las mezclas M1 (Bravonil®), M3 (Siganex®), M5 (Bumper®) y M6 (Opus®) presentaron porcentajes de 18,02 %, -13,75 %, 73,10 % y 68,89% respectivamente.

En este experimento no se evaluó la formulación en emulsión debido a que esta fue la formulación con menor capacidad de inhibir a *M. fijiensis in vitro* y adicionalmente, no fue muy promisorio en las evaluaciones en invernadero presentadas más adelante.

- **Resistencia de los formulados al lavado por la lluvia.**

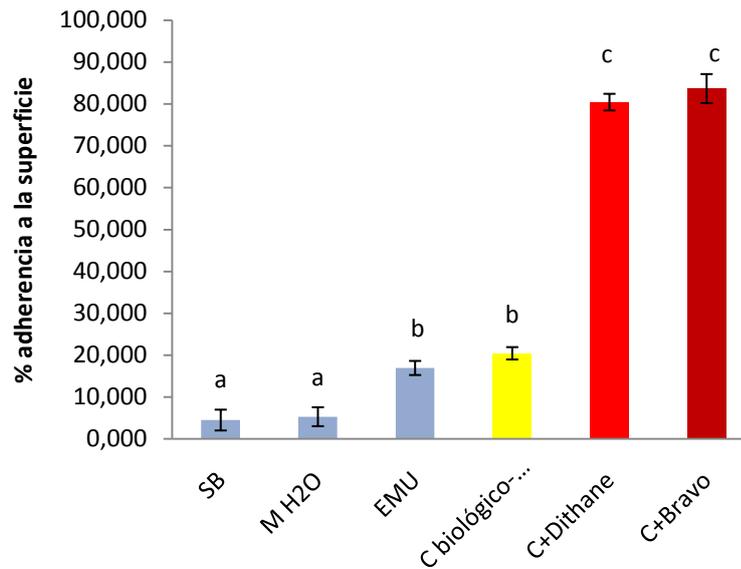
Para evaluar la resistencia de los formulados al lavado por la lluvia las formulaciones se sometieron a una simulación de lluvia en el laboratorio. Para esto se empleo un diseño unifactorial en donde el factor evaluado fue tipo de formulación y la variable de respuesta porcentaje de adherencia de los formulados.

El análisis de varianza ANOVA arrojó que el factor formulación afectaba significativamente la variable de respuesta con un valor  $p=0$  (Ver anexo 6).

A partir de la prueba de rangos múltiples y grupos homogéneos de Tukey se determinó cuáles tratamientos diferían significativamente entre sí (Ver anexo 6), en la gráfica 6 se muestra los resultados.

---

<sup>1</sup> El signo negativo indica que hubo un aumento en el número de UFC/mL en el tiempo de evaluación



**Gráfica 6.** Porcentaje de adherencia a la superficie de las formulaciones del *B. subtilis* EA-CB0015 luego de ser sometidos al lavado simulado por lluvia. En donde SB denota suspensión bacteriana, M H2O formulación en mezcla base agua, EMU formulación en emulsión, C biológico-RHA control biológico Rhapsody®, C+Dithane® control positivo Dithane® y C+Bravonil® control positivo Bravonil®. Los grupos homogéneos que tienen la misma letra no difieren estadísticamente ( $p=0,05$ ). Los intervalos representan los errores estándar de la media.

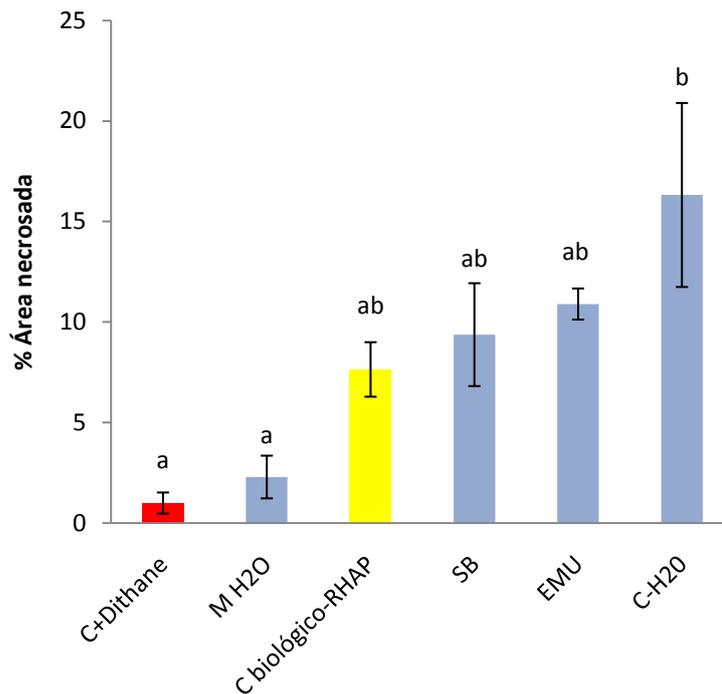
En la gráfica 6 se aprecia que la emulsión fue la formulación de *B. subtilis* EA-CB0015 que presentó mayor adherencia con un porcentaje de adherencia de 16,9%. La suspensión bacteriana y la mezcla agua mostraron menor capacidad con porcentajes de adherencia estadísticamente similares de 4,5% y 5,3%, respectivamente. Todos los formulados de *B. subtilis* EA-CB0015 presentaron una adherencia inferior a la presentada por los controles químicos Dithane® y Bravonil® con porcentajes de adherencia de 80,4% y 83,7% respectivamente. Con relación al control biológico Rhapsody®, el cuál presentó un porcentaje de adherencia de 20,4%, sólo la emulsión mostró una capacidad de adherencia similar. Estos resultados sugieren que las formulaciones en base a *B. subtilis* EA-CB0015 poseen mayor afinidad por el agua que por la superficie de la placa de vidrio utilizado en este experimento, lo que conlleva a replantear la

composición de los formulados en orden a mejorar su resistencia al lavado por la lluvia.

**6.4. Resultados del objetivo 4:** Evaluación del efecto sobre la severidad de la Sigatoka negra de las formulaciones en invernadero.

Para la evaluación del efecto sobre la severidad de la Sigatoka negra de las formulaciones en invernadero se inocularon artificialmente plantas de banano c.v. Williams de 4 meses de edad en el invernadero de la Universidad EAFIT y se evaluó el efecto de las formulaciones sobre el porcentaje de área necrosada en las hojas infectadas con el hongo *M. fijiensis*.

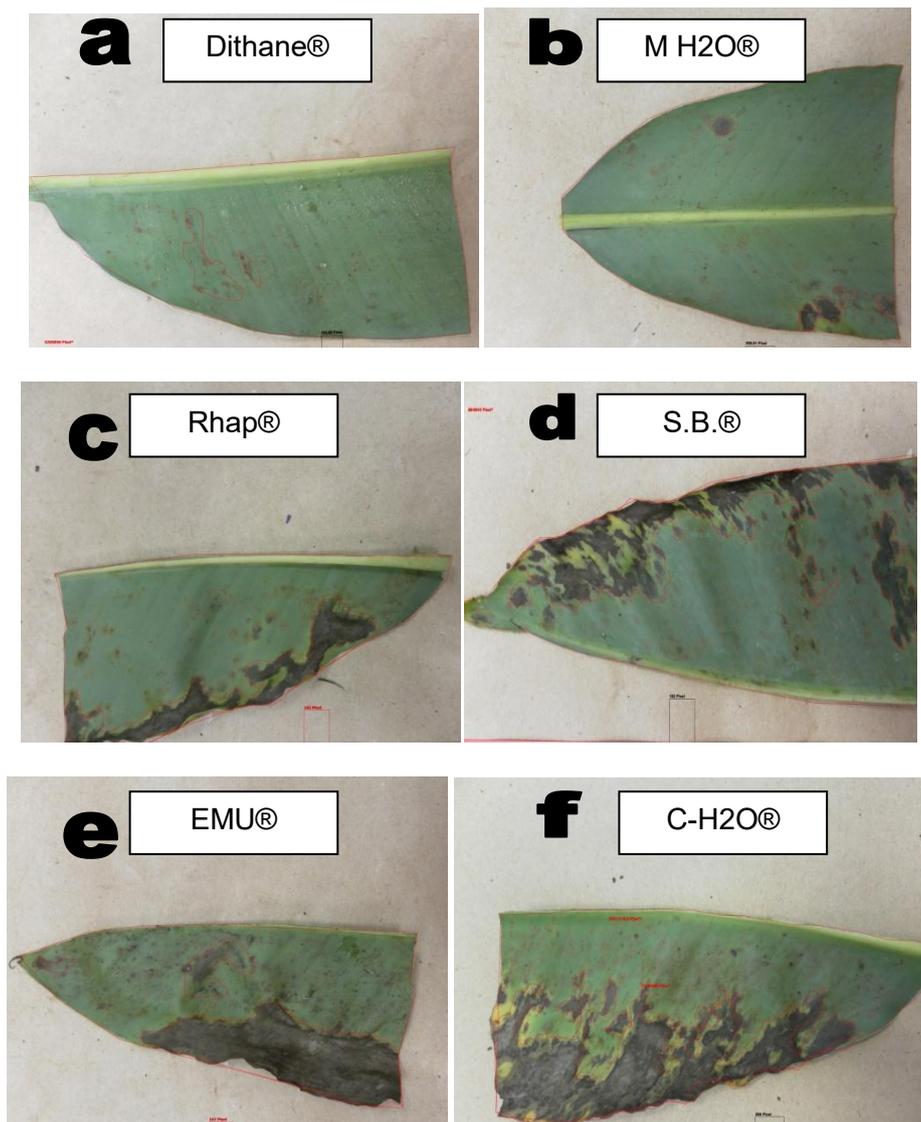
A partir del análisis de varianza ANOVA se encontró que habían diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados (Ver anexo 7). Para determinar la diferencia entre éstos se hizo uso de la prueba de rangos múltiples por el método de Tukey. Los porcentajes de área necrosada para los diferentes tratamientos se muestran en la gráfica 7.



**Gráfica 7.** Porcentaje de área necrosada de la hoja número uno de plantas de banano cv. *Williams* infectadas con *M. fijiensis* y tratadas con las formulaciones de *B. subtilis* EA-CB0015. En donde SB denota suspensión bacteriana, M H2O denota formulación en mezcla base agua, EMU denota formulación en emulsión, C biológico-RHAP denota control biológico Rhapsody®, C+Dithane® denota control positivo Dithane®. Los grupos homogéneos que tienen la misma letra no difieren estadísticamente ( $p=0,05$ ). Los intervalos representan los errores estándar de la media.

Como se observa en la gráfica 7, la formulación base agua con un porcentaje de área necrosada de  $2,3 \pm 1,1\%$  y el control positivo Dithane® con  $1 \pm 0,53\%$  de área necrosada fueron los únicos tratamientos que mostraron algún tipo de control sobre la enfermedad, mostrando diferencias estadísticas con el  $16,3 \pm 4,6\%$  de área necrosada de las plantas no tratadas. La suspensión bacteriana con un porcentaje de área necrosada de  $9,4 \pm 2,6\%$ , la emulsión con  $10,9 \pm 0,8\%$  y el control biológico Rhapsody® con  $7,6 \pm 1,4\%$  no presentaron diferencias significativas con las plantas no tratadas.

Como complemento a este análisis, en la figura 2 se muestran fotografías de hojas tratadas con cada uno de los tratamientos evaluados en el invernadero:



**Figura 2.** Fotografía de una porción de la hoja número uno de plantas de banano cv. *Williams* infectadas con *M. fijiensis* y tratadas con las formulaciones de *B. subtilis* EA-CB0015. Control positivo Dithane® (a), formulación mezcla base agua (M H2O) (b); Control biológico Rhapsody (c), suspensión bacteriana (SB) (d); Formulación en Emulsión (EMU) (e) y Control negativo (f).

En la figura 3 se puede apreciar visualmente la diferencia entre los tratamientos evaluados. Estas fotografías fueron seleccionadas de porciones de hoja promedio. La formulación mezcla base agua presentó un mejor control que el control biológico Rhapsody® y no mostró diferencias significativas con el control químico Dithane®.

Según estos resultados se puede concluir que la formulación de *B. subtilis* EA-CB0015 que mostró mayor capacidad de controlar la Sigatoka negra en invernadero es la formulación mezcla base agua.

## 7. DISCUSIÓN

En el proceso de desarrollo, producción y comercialización de una formulación biológica eficaz para el control biológico es esencial la evaluación de los factores ambientales que afectan el desempeño del producto. El objetivo de este trabajo de investigación fue evaluar algunos de estos factores con el fin de caracterizar el desempeño e identificar los puntos débiles de los formulados de *B. subtilis* EA-CB0015 desarrollados en la Universidad EAFIT en el proyecto "Diseño del proceso productivo y desarrollo de un producto con base en bacterias del filoplan del género *Bacillus* para el control de la Sigatoka negra en banano *Musa AAA*" bajo el código COLCIENCIAS: 121640320656.

Una formulación biológica para el control de la Sigatoka negra debe cumplir con una serie de características que le permitan ejercer un control eficaz sobre el patógeno, ésta debe estabilizar el agente microbiano durante su almacenamiento y distribución; contener coadyuvantes que ayuden a su manipulación y aplicación y que protejan el agente biológico contra los factores ambientales adversos cuando es aplicada en campo (Brar *et al.*, 2006). Con este estudio se evaluaron algunos de estos aspectos. El primero de ellos fue la eficacia de los formulados sobre el control del patógeno *in vitro*.

Se encontró que la formulación mezcla base agua de *B. subtilis* EA-CB0015 fue capaz de inhibir el crecimiento del patógeno en un 66,1%. Ésta presentó un control similar al alcanzado con dos productos, uno químico y uno biológico (Dithane® y Rapsody®) registrados para el control de la Sigatoka negra en banano. Esto es compatible con los resultados reportados por otros autores: Ceballos, 2009 encontró que el sobrenadante libre de células de la cepa *B. subtilis* EA-CB0015 sin formular presentó un porcentaje de inhibición del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis* a nivel *in vitro* de 84 % en una prueba de inhibición del tubo germinativo similar a la descrita en el numeral 5.3., ese porcentaje de inhibición que fue superior al hallado en este trabajo, puede deberse a que al adicionar los aditivos para la formulación los productos

de la fermentación de *B. subtilis* EA-CB0015 fueron diluidos. Por su parte Chica y colaboradores (2009) reportaron porcentajes de inhibición del tubo germinativo de *M. fijiensis* de 75,3 % cuando se utilizó el bitertanol y de 79,4 % cuando se utilizó el fenbuconazol, ambos fungicidas sistémicos de la familia de los triazoles a una concentración de 5 mg/L bajo la misma técnica *in vitro* utilizada en este proyecto, ambos resultados fueron muy similares a los reportados en este estudio, esto sugiere que la formulación mezcla agua de *B. subtilis* EA-CB0015 podría generar un control de la enfermedad en la planta similar a los productos evaluados por Chica y colaboradores (2009).

Otra de las características que debe cumplir un formulado biológico para que se considere aceptable es conservar la viabilidad del agente biológico. Brar y colaboradores (2006) utilizaron el ácido propionico como un agente antimicrobiano para una formulación en base a *Bacillus thurigiensis*. De este estudio se seleccionó este adjuvante para las formulaciones en base a *B. subtilis* EA-CB0015 como un agente que evitaría la contaminación con otros microorganismos, sin embargo no se evaluó si el ácido propiónico también tiene un efecto tóxico contra las esporas y por tanto no se observó si es el responsable de la muerte de la cepa. Andrews (1992) afirmó que es permisible una reducción máxima de la viabilidad de la cepa del 30% en un periodo de 6 meses, de hecho el control biológico utilizado para esta investigación y comercializado en Colombia bajo los nombres de Serenade® registro ICA No. 5973 y Rhapsody® registro ICA No. 5770 garantizan un control efectivo y viabilidad de la cepa durante dos años luego de la fabricación del producto (Información sobre el producto, <http://www.agrocorp.com.co/file/ftecnica/ftRHAPSODY.pdf>, consultada Junio 20 de 2011). En ese lapso de tiempo se asegura una concentración mínima de bacterias de  $1 \times 10^9$  UFC/mL y la no pérdida de efectividad de los coadyuvantes, metabolitos o agentes auxiliares para el control de la enfermedad cuando se almacena a temperatura ambiente (Specimen Labels-Serenade ®. [www.agraquest.com/docs/labels.msds/sersoil-label-US0034-B-001.pdf](http://www.agraquest.com/docs/labels.msds/sersoil-label-US0034-B-001.pdf). Mayo 27 de 2011). En este trabajo de investigación se encontró que la formulación en emulsión fue la que presentó el menor porcentaje de muerte celular durante 6

meses al ser almacenada a 25°C con una reducción en la viabilidad del 44,7%, seguida por la formulación mezcla base agua con una reducción de 47,2%; sin embargo, al ser almacenadas a 4°C se encontraron que las pérdidas en la viabilidad eran inferiores al 10%. Estos datos evidencian que para que las formulaciones cumplan con los requerimientos mínimos de viabilidad para su comercialización deben ser refrigeradas y para lograr que puedan conservar la viabilidad al ser almacenadas a temperatura ambiente es necesario modificar su composición o agregar algún tipo de coadyuvante que garantice la viabilidad de la cepa en el tiempo. En la literatura se han publicado agentes humectantes que han sido efectivos en la preservación de la viabilidad de la cepa para formulaciones biológicas, entre ellos la glicerina, el propilenglicol y el sorbitol (Miranda, 1996; Burges, 1998; Murillo *et al.*, 2003; Maniscalco, 2003 y Ceron, 2004). Adicional a los factores ya mencionados, en este proyecto se evaluaron factores ambientales que podrían incidir negativamente en la eficacia de la formulación al ser aplicada en la planta. Se evaluó la exposición a la radiación U.V., la tolerancia a mezclas fungicidas y la resistencia al lavado por lluvia; todos factores fueron reportados como críticos para el desempeño de formulados biológicos cuando son aplicados en campo (Brar *et al.*, 2006, 2007). Con relación a la exposición a la radiación U.V. Las formulaciones evaluadas presentaron  $t_{d50}$  entre 6,67 y 37,39 minutos, es decir que en un tiempo de exposición a la radiación U.V. inferior a 40 minutos las formulaciones ya habían perdido la viabilidad de más del 50% de sus esporas, lo que sugiere que la radiación U.V. está generando mutaciones a nivel de DNA. Estos contrasta con lo encontrado para el producto biológico Rhapsody® que presentó una reducción del 24,1% de la viabilidad celular y un  $t_{d50}$  mayor de 180 minutos.

La emulsión fue la formulación de *B. subtilis* EA-CB0015 que presentó el mejor desempeño en la prueba de resistencia a la radiación U.V., este comportamiento puede deberse al color blanco del formulado capaz de reflejar la radiación (Boyd-Wilson, *et al.*, 1998; Sudin & Jacobs 1999; Jacobs, Carroll & Sudin 2005), sin embargo, se recomienda la adición de un protector U.V. como lignina en emulsión, lignosulfonato de sodio, rojo congo, ácido fólico y ácido *p*-aminobenzoico que proteja a las bacterias del potencial daño causado por la

radiación (Brar *et al.*,2006; Sheyler *et al.*, 2009). En estudios similares Scheiler y colaboradores (2009) evaluaron la viabilidad de una cepa de *Bacillus spp.* en emulsión al ser expuesta este tipo de radiación: La formulación que no contenía lignina como protector U.V. presentó una reducción de la viabilidad celular del 51% después de 31 horas de exposición a la radiación U.V.-A y U.V.-B solares. La formulación que contenía lignina, en esas mismas condiciones, presentó una reducción de la viabilidad del 16%.

Otro factor a considerar a la hora de desarrollar un fungicida biológico para el control de la Sigatoka negra en banano son los fungicidas químicos empleados para el control de dicha enfermedad. En Colombia y en todos los países exportadores de banano se cuenta con programas de fumigación basados en la aplicación de mezclas fungicidas con modos de acción diferentes (Marin *et al.*, 2003). Por esto es importante que los formulados desarrollados puedan ser aplicados en combinación con fungicidas químicos. En este trabajo se encontró que la formulación en base agua de *B. subtilis* EA-CB0015 permaneció 25 horas en contacto con las mezclas de tanque actualmente empleadas en los cultivos comerciales de banano sin perder la viabilidad del 50 % de las esporas de *B. subtilis* EA-CB0015, alcanzando reducciones promedio de solo el 20,1 % en la viabilidad; inclusive para el caso de la suspensión bacteriana se encontró que en cinco de las ocho mezclas fungicidas evaluadas la cepa no perdió más del 50% de la viabilidad a las 25 horas.

Estos resultados sugieren que estas formulaciones tienen una alta tolerancia a las mezclas de fungicidas químicos empleados para el control de la Sigatoka negra. Esto representa una ventaja de la formulación desarrollada ya que puede emplearse en programas de manejo integrado en donde se implemente el control biológico en combinación con el producto químico; en efecto, Conway y colaboradores (1997) evaluaron el efecto de un formulado en base a *Laetisaria arvalis* contra el patógeno *Rhizoctonia solani* AG-4 en flores, encontrando que el control integrado del biofungicida en base a *Laetisaria*

*arvalis* combinado con un fungicida químico foliar controla mejor la enfermedad que el biofungicida aplicado solo.

El lavado por lluvia es otro factor ambiental al que están sometidos los formulados al ser aplicados en la planta. La permanencia de los formulados en la superficie biótica luego de la caída de lluvia es fundamental a la hora de evaluar una formulación. Según recomendaciones de las productoras y comercializadoras de fungicidas, para una óptima adherencia de los formulados a las hojas se debe garantizar como mínimo dos horas de no caída de lluvia o rocío luego de la aplicación (Gutierrez, 2010). Los resultados obtenidos en este estudio con relación a esta presión ambiental muestran una pobre adhesión de los formulados a la superficie evaluada. La formulación en emulsión fue la que presentó el mejor comportamiento con un porcentaje de adherencia de 16,9%, resultado muy inferior a lo reportado en la literatura. Jaronski (2010) realizó un estudio en donde evaluó algunos factores ambientales de formulaciones en suspensión acuosa basadas en hongos ascomycetes, entre ellos el lavado por lluvia y obtuvo porcentajes de adherencia entre 51- 56% cuando se expusieron a una llovizna controlada en el laboratorio durante 30 minutos correspondiente a 27 mm de lluvia en superficie biótica. El autor concluye que estos resultados no son apropiados y por tanto propone emplear la presentación de formulado en emulsión base aceite logrando una mejor adherencia del agente biocontrolador. Inyang y colaboradores (2000) observaron que las conidias de *Metarhizium anisopliae* aplicadas en formulaciones base aceite presentaron mayor porcentaje de adherencia a la superficie que aquellas que fueron formuladas en mezcla acuosa. Como complemento al análisis, en este trabajo de investigación se utilizó la metodología planteada por Brar y colaboradores (2007) quienes evaluaron el porcentaje de adherencia de formulaciones en base a *Bacillus thuringiensis* en una superficie de vidrio. Es importante anotar que las características de la superficie de vidrio son diferentes a las de las hojas en las cuales se aplicará las formulaciones, en primer lugar la superficie de una hoja de banano posee características de hidrofobicidad, está compuesta por células individuales y estomas lo que le otorga cierta rugosidad, además posee vello y generalmente se encuentra inclinada (Correa,

1999), ésto a diferencia de la superficie de vidrio que es lisa, hidrofílica y por tanto con menos posibilidades de que la formulación se adhiera a la superficie en comparación a la superficie biótica de la hoja banano (Smith, 2003); según esto se sugiere modificar la metodología y realizar la prueba utilizando materiales que tengan características similares a las de la hoja de banano. Por otro lado, los resultados obtenidos en este estudio indican que es necesario la adición de algún coadyuvante, entre ellos se deben considerar polímeros acrílicos (ACRYLOCOAT®, ACTIPRON®) los cuáles generan microcápsulas permitiendo que el formulado se adhiera a la superficie de la hoja (Quong y Nielsen, 2003) o surfactantes siliconados de la familia de los alquil alcoxilatos que al reducir la tensión superficial en la hoja le confieren al formulación una mayor resistencia al lavado por lluvia (Humble *et al.*, 2003). Por último se evaluó el efecto de los formulados sobre la enfermedad a nivel de invernadero. La formulación mezcla base agua fue la única formulación de *B. subtilis* EA-CB0015 que generó un control de la enfermedad en invernadero con un porcentaje de área necrosada de 2,3%, resultado muy similar al obtenido con el control positivo Dithane® en donde la enfermedad alcanzó un porcentaje de área necrosada del 1,0 %.

Estos resultados indican que la formulación mezcla base agua de *B. subtilis* EA-CB0015 fue capaz de ejercer un control efectivo de la enfermedad Sigatoka negra en invernadero, un control similar a uno de los productos actualmente empleados para el control de esta enfermedad en campo e incluso superior al ejercido por el producto biológico Rhapsody® el cual se encuentra actualmente registrado para el control de la misma. Esto sugiere que este formulado puede tener un efecto sobre la enfermedad en campo bajo un modo de acción protectante. Los resultados de este trabajo y de Ceballos (2009) concluyen que las esporas y los metabolitos están inhibiendo la germinación del micelio y de las esporas de *M. fijiensis*, sin embargo debe evaluarse con mayor profundidad si algunos de los metabolitos ingresan por los estomas de la hoja y ejercen un control sistémico de la enfermedad.

A pesar de los resultados promisorios encontrados en este estudio para los formulados de *B. subtilis* EA-CB0015 en el control de *M. fijiensis* y de la Sigatoka negra a nivel *in vitro* e invernadero, especialmente para la formulación mezcla base agua, los resultados relacionados con la tolerancia a los factores ambientales indican que es necesario trabajar en el mejoramiento de las formulaciones, especialmente enfocadas en estrategias que permitan mejorar la tolerancia a la radiación U.V., y la resistencia al lavado por lluvia, además que la formulación aumenta la viabilidad del microorganismo comparado con la cepa sin formular en suspensión bacteriana.

## 8. CONCLUSIONES

Los formulados con base en *B. subtilis* EA-CB0015 almacenados a 25°C presentaron una mayor pérdida en la viabilidad, con pérdidas de 44,7% para la emulsión, 44,8% para la mezcla base agua y 47,1% para la suspensión bacteriana, en comparación con aquellas almacenadas a 4°C que mostraron pérdidas de -35% para la mezcla base agua, 3,9% para la emulsión y 8,1% para la suspensión bacteriana después de 180 días de almacenamiento.

La formulación mezcla base agua de *B. subtilis* EA-CB0015 fue la formulación que presentó el mayor porcentaje de inhibición del tubo germinativo de *M. fijiensis* con un porcentaje inhibición de 66,1% sin diferencias significativas con el control químico (Dithane®) y biológico (Rhapsody®), mientras que la formulación en emulsión de *B. subtilis* EA-CB0015 y la suspensión bacteriana presentaron reducciones del tubo germinativo de 33% y 40,6% respectivamente.

El efecto de los formulados con base en *B. subtilis* EA-CB0015 sobre la longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis* a nivel *in vitro* luego de tres meses de almacenamiento no se vió afectado por la temperatura en la que fueron almacenados los formulados.

La formulación en emulsión fue la que presentó menor pérdida en la viabilidad de las esporas de *B. subtilis* EA-CB0015 al ser expuesta a la radiación U.V. (254 nm) con un  $t_{d50}$  de 37,4 minutos. La mezcla base agua y la suspensión bacteriana fueron los formulados más susceptibles a la radiación U.V. con un  $t_{d50}$  de 7,8 y de 6,7 minutos respectivamente. Esto comparado al control positivo Rhapsody® que mostró una reducción del 24,1% de la viabilidad celular durante los 180 minutos y un  $t_{d50}$  mayor que 180 minutos.

La formulación mezcla base agua de *B. subtilis* EA-CB0015 presentó la menor pérdida en la viabilidad al estar en contacto con las mezclas de tanque de fungicidas empleados en el control de la Sigatoka negra en comparación con la suspensión bacteriana. Esta formulación presentó un  $t_{d50}$  inferior a 25 horas y reducciones en la viabilidad de las esporas inferiores a 36,7% luego de 25 a horas a diferencia de la suspensión bacteriana que presentó un pico máximo de 75,21% de reducción en la viabilidad para todas las mezclas de fungicidas químicos evaluados. Sin tener en cuenta el efecto de los tipos de mezcla fungicida, la formulación mezcla base agua presentó una reducción de la viabilidad de 20,1 %, mientras que la suspensión bacteriana presentó una reducción del 36,4%.

La emulsión con base en *B. subtilis* EA-CB0015 fue la formulación que presentó la mejor adherencia a la superficie luego de realizada la prueba de lavado simulado con un porcentaje de adherencia de 16,9%; seguido de la suspensión bacteriana con 5,3% y por último la formulación mezcla base agua con 4,5%. Los controles químicos Bravonil® y Dithane®, ambos fungicidas protectantes, presentaron un porcentaje de adherencia de 83,7% y 80,4% respectivamente, mientras que el control biológico Rhapsody® presentó una adherencia del 20,4% similar a la presentada por la emulsión de *B. subtilis* EA-CB0015.

La formulación mezcla base agua fue la formulación de *B. subtilis* EA-CB0015 que ejerció el mejor control de la enfermedad a escala de invernadero con un porcentaje de área necrosada de 2,29% sin diferencias significativas con el control químico Dithane® (1,0 %) y estadísticamente inferior al porcentaje de área necrosada presentado por el Rhapsody® (7,63%). La formulación emulsión fue la que presentó el menor control de las formulaciones de *B. subtilis* EA-CB0015 con un porcentaje de área necrosada de 10,9% el cuál no difirió estadísticamente del control negativo (16,3%).

## 9. RECOMENDACIONES

- Se recomienda aumentar el número de UFC/mL de *B. subtilis* EA-CB0015 viables en los formulados a partir de la optimización del medio de cultivo.
- Mejorar la resistencia del formulado al lavado por lluvia a partir de la adición de polímeros acrílicos como ACRYLOCOAT® y ACTIPRON® o surfactantes siliconados de la familia de los alkyl alkoxyatos; garantizar la viabilidad de la cepa frente a la exposición con radiaciones U.V. agregándole adjuvantes como lignosulfonato de sodio, rojo congo, ácido fólico y ácido *p*-aminobenzoico; y mejorar la viabilidad del *B. subtilis* EA-CB0015 cuando se somete a condiciones normales y extremas de almacenamiento a partir de la adición de agentes humectantes como la glicerina, el propilenglicol y el sorbitol.
- Realizar otros ensayos en el invernadero para garantizar reproducibilidad en el tiempo de los resultados obtenidos.
- Se recomienda evaluar *in vitro*, en invernadero y campo la eficacia contra la Sigatoka negra de mezclas integradas (químico y biológico) y determinar si efectivamente la mayor parte del control de la enfermedad se lleva a cabo por la presencia de los microorganismos o por la liberación de metabolitos como polipéptidos.
- Se recomienda evaluar la viabilidad de la cepa de los formulados reformulados de *B. subtilis* EA-CB0015 por un periodo más prolongado de tiempo (por lo menos un año) para comprender mejor el comportamiento de la pérdida de la viabilidad de las formulaciones.

## BIBLIOGRAFÍA

1. ADAM, P.B. (1990). The potential of mycoparasites for biological control in plant disease. *Ann. Rev. Phytopatology* 29:59-72
2. AMIL, A.F.; HEANEY, S.P.; STRANGER,C; SHAW, M.W. (2007). Dynamics of Qol sensitivity in *Mycosphaerella fijiensis* in Costa Rica during 2002-2003. *Phytopatology* 97:1451-1557.
3. ANDREWS, J. H., y R. Harris. (2005). "The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces." (2000). (Cit. en: SALAZAR, L. "Estudio de la filosfera de musáceas alimenticias en el Urabá antioqueño". Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia. Medellin.
4. ARANGO, R.; CAÑAS GUTIÉRREZ, G. P.; CHONK, P.; STERGIOPOULOS, I.; KEMA, K.H.J.; RODRIGUEZ, E.; ANGARITA, M. (2010). Resistance to Chemical Fungicides in *Mycosphaerella fijiensis*: A molecular view. XIX Reunión internacional Accorbat. 8-12 Noviembre de 2010.
5. ARIAS, Pedro; DANKERS, Cora; LIU, Pascal; PILKAUSKAS, Paul. (2003) The World Banana Economy. Food and Agriculture organization of the United Nations. Roma(FAO).. Consultado en <http://www.fao.org/docrep/007/y5102e/y5102e00.htm#Contents>. Junio 28 de 2010.
6. ANGEL, Luz Edith. (2010). Bióloga: Investigadora de CENIBANANO. AUGURA. Información personal.

7. ASTORGA, Y. (2010). The Environmental Impact of the Banana Industry: A Case Study of Costa Rica. <http://www.abc2.org/text/PAPER2E.pdf>. Visitada Junio 10 de 2010.
8. AUDERSIK, T. AUDERSIK, G. (1996). Biología: La Vida en la Tierra. Universidad de Colorado - Denver. Editorial PEARSON. (Traducido por Ma. Marcela Ramirez E. Profesora de la UNAM).
9. BASHAN, Y. (1998). Inoculants of plant Growth-Promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, 16 No 4:729-770.
10. BECERRA, E. (2003). Manejo de Formulaciones de Dithane ® para el control de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*). Dow Agrosiences – boletín informativo.
11. BELALCAZAR, A. (1991). Estadísticas bananeras en Colombia. (Cit. en: Chica, R., Herrera, M., Jimenez, I., Lizcano, S., Montoya, J., Patino, L., Rodriguez, P. y Ruiz, L. (2004). "Impacto y manejo de la Sigatoka Negra en el cultivo del banano de exportacion en Colombia. Mexico, XVI Reunion Internacional ACORBAT).
12. BOYD-WILSON, K.S.H., PERRY, J.H., WALTER, M. (1998) Persistence and survival of saprophytic fungi antagonistic to *Botrytis cinerea* on kiwifruit leaves. *Microbial Control of Plant Pathogens*. Proc. 51st N.Z. Plant Protection Conf. 1998:96-101.
13. BRAR, S. K; VERMA, M; TYAGY, R.D.; VALÉRO, J.R.; SURAMPALLI, R.Y. (2006). Screening of different Adjuvants for

Waste/water sludge-based *Bacillus thuringiensis* formulation. Biological and Microbial Control 99 (4):1065-1079.

14. BRAR, S. K.; VERMA, M; TYAGY, R.D.; VALÉRO, J.R.; SURAMPALLI, R.Y. (2007). *Bacillus thuringiensis* fermentation of hydrolyzed sludge-Rheology and formulation studies. Chemosphere 67:674-679.
15. BRENT, K.J. (1995). Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed?. GIPAF.FRAC Monograph No 1. Brussels, Belgium. P 48.
16. BURGESS, H. (1998). Formulation of microbial biopesticides, beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. Kluwer Academic Publishers. USA.
17. BURT, P. J. A.; RUTTER, J; GONZALES, H. (1997). Short-distance wind dispersal of the fungal pathogen causing Sigatoka diseases in banana and plantain. Plant pathology 46: 451-458.
18. CADAVID, A. (1984). Capacitación Ingenieros Agrónomos en el manejo y control de la Sigatoka Amarilla y Negra. Unibán – Apartadó.
19. CERÓN, J. y BRAVO A. (2004). *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Bravo, A. y Cerón, J. eds. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
20. CHICA, *et al.*, (2009). Efecto del Butóxido de Piperonilo y sus mezclas con fungicidas triazoles sobre el crecimiento *in vitro* de *M.*

*fijiensis* Morelet. Revista Tecnológica ESPOL. Escuela Superior politécnica del Litoral. Guayaquil Ecuador.

21. CHIN, K.M., WIRZ, M. LARD, D. (2001). Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* from banana to trifloxystrobin. Plant disease 85:1264-1270
22. COLOMA R., B. y BARZOLA RUIZ, O. (2010). Desarrollo de un modelo porcentual para la evaluación de Sigatoka negra en condiciones de Invernadero. Centro de investigaciones Biotecnológicas del Ecuador. [http://biblioteca.universia.net/html\\_bura/ficha/params/title/desarrollomodelo-porcentual-evaluacion-sigatoka-negra-condiciones-invernadero/id/52145474.html](http://biblioteca.universia.net/html_bura/ficha/params/title/desarrollomodelo-porcentual-evaluacion-sigatoka-negra-condiciones-invernadero/id/52145474.html). Junio 21 de 2010.
23. CONWAY, K. E., MANESS, N. E., MOTES, N. E. (1997). Integration of biological and chemical controls for *Rhizoctonia aerial* blight an root rot of rosemary. Plant disease, 81. No 7.
24. CORREA PÉREZ, J. (1999). Guía Práctica para el cultivo del Banano. Material publicado por UNIBAN. Apartadó – Antioquía.
25. DRIKS, A., (2004). The *Bacillus* spore coat. Phytopathology 94:1249-1251.
26. DONZELLI, B.G., CHURCHILL, A. C. (1997). A quantitative assay using mycelia fragments to assess virulence of *Mycosphaerella fijiensis*. Phytopathology 97:916-929.
27. DUPONT. Sigatoka Negra y Amarilla. (1982). Informe, pág. 17.

28. FOLDES, T., I. B´anhegyi, Z. Herpai, L. Varga, and J. Szigeti. (2000). "Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and in vitro screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage micro-organisms." (Cit.en: Macagnan D, Romeiro R, Souza J and Pomela, A. "Isolation of Actinomycetes and Endospore-forming Bacteria from the Cacao Pod Surface and Their Antagonistic Activity against the Witches'Brom Black Pod Pathogens." *Phytoparasitica* 34,no.2 (2006):122-132).
29. FOURÉ, E. (1982). Les cercosporioses du bananier et leurs traitements. Comportement des variétés. Etude de la sensibilité variétale des bananiers et plantains e *Mycosphaerella fijiensis* Morelet au Gabon (maladie desreies noires). I-Incubation et evolution de la maladie. *Fruits*, 37:749-771.
30. FRAVEL, D.R. (1988). Role of Antibiosis in the Biocontrol of Plant Diseases. *Annual Reviews of Phytopathology* 26 :75-91
31. FU, G.; HUANG, S.; YE, Y.; WU, Y.; CEN, Z.; LIN, S. (2010). Characterization of a bacterial biocontrol strain B 106 and its efficacies on controlling banana leaf spot and post-harvest anthracnose disease. *Biological Control*. S1049-9644(10)00094-0
32. GAUHL, F. (1989). Untersuchunge zur epidemiologie un okoloigie de shwarzen Sigatoka Krankheit (*Mycosphaerella fijiensis* MORELET) an Kockbonanen (*Musa* sp) in Costa Rica. Thesis Univ. Gottingen (West Germany), 128 pág.
33. GAUHL, Friedhelm.(1992). Epidemiología y Ecología de la Sigatoka Negra en Plátano en Costa Rica traducido del Alemán. UPEB (Unión de países exportadores de Banano). Panamá.

34. GAVIRIA PAMPLONA, R. A. (2004). Evaluación de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt y Nirenberg sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, bajo condiciones de invernadero. Trabajo de grado para optar por el título de Ing. Agrónomo. Universidad Nacional de Colombia – sede Medellín.
35. GONZALES, M. (1987). Enfermedades del cultivo del banano. Oficina de publicaciones de la Universidad de Costa Rica. San José.
36. GONZALES, R; BUSTAMANTE, E; SHANNON, P; OKUMOTO, S; LEANDRO, G. (1996). Selección de microorganismos quitinolíticos en el control de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano. Manejo integrado de Plagas 40:6-11.
37. GRUPP, Bernhard; DOLLACKER, A; DOUGTHY, K; HAAS, M; HOLL, A. (2007). Protección de un Tesoro tropical: el banano. Revista Correo de Bayer CropScience. Enero de 2007.
38. GUTIÉRREZ GRISALES, Jaime. (1998). Control de Sigatoka Negra. Compilado. Boletín informativo. Dow Agrosciences de Colombia. 1998
39. ENTREVISTA con Jaime Gutiérrez Grisales. Asistente técnico y comercial de los productos de Dow® para banano en Urabá. Apartadó, Noviembre 1 de 2010.
40. GUZMAN, Mauricio. (2009). Investigación en control biológico de la Sigatoka negra del banano: Una prioridad Corbana. Boletín CORBANA No 79.

41. GUZMAN, Mauricio; WANG, Amy; ROMERO, Ronald A. (2001). Estrategias de aplicación de fungicidas Triazoles para el combate de la Sigatoka Negra en Banano (*Musa AAA*) y su efecto sobre el desarrollo de resistencia en *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Revista Corbana 27(54):79-104.2001.
42. HUMBLE, G.D., KENNEDY, M.W., SIMPELKAMP, J.R., 2003. Use of nonspreading silicone surfactants in agrochemical compositions. US Patent Application 0,104,944.
43. INESTROZA *et al.* (2007). Proyecto Especial de Sigatoka Negra. Cartilla informativa de AUGURA y CENIBANANO. Urabá.
44. INYANG *et al.*, (2000). Effect of formulation, application and rain on the persistence of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* on oilseed rape. Mycol Res 104(6):653–661
45. JACOBSEN, B.J., ZIDACK, N.K., LARSON, B. J. (2004). The role of *Bacillus* based biological agents in integrated pest management systems. Plant diseases. Phytopathology 94, 1272-1275.
46. JAROSKI, S. T. (2010) Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. Biocontrol 55:159-185.
47. JEFFRIES, D. (1995), Biology and ecology of microparasitism. Can. J Botanical Supply 1. 51284-51290.
48. JIMENEZ, J. M., GALINDO J. J., RAMIREZ, C. (1987). "Estudios sobre combate biológico de *M.fijiensis* var. *difformis* mediante

bacterias epifitas". (Cit. en: Marin, D., R. Romero, M. Guzman, and T. Sutton. (2003). Black Sigatoka: An increasing Threat to Banana Cultivation. *Plant disease* 87, no. 3:208-223).

49. LIMA, G.; De CURTIS, F.; PIEDIMONTE, D. (2006). Integration of biocontrol yeast and thiabendazole protects stored apples from fungicide sensitive and resistant isolates of *Botrytis cinerea*. *Postharvest biology and technology* 49 301-3017.
50. LOPEZ ARISMENDY, Elkin Darío. (2002). Evaluación en laboratorio de cepas de *Trichoderma* spp. Y *Gliocladium* spp. Para el control de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra en banano y plátano. Trabajo de grado, requisito para obtener el título de maestría en biotecnología. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Posgrado en Biotecnología.
51. MARÍN D.H, ROMERO R.A., GUZMAN M, Sutton TB. (2003). Black Sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. *Plant Dis* 87:208–222
52. MARÍN, D., ROMERO, R. (1992). Control de la Sigatoka Negra. Corporación Bananera Nacional (Corbana). Boletín # 4.
53. MELNICK, Rachel; ZIDACK, Nina K.; BAILEY, Brian A.; MAXIMOVA, Siela N.; GUILTINAN, Mark; BACKMAN, Paul A. (2008) Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. From annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. *Biological control* 46:46-56.

54. MEREDITH, D.S., LAWRENCE, J. S. (1970). Black leaf streak of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): Susceptibility of cultivars. Trop. Agric. 47:275-287.
55. MEREDITH, D.S.; LAWRENCE, J.S. (1969). Black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the causal fungus. Trans. Br. Mycol. Soc. 52(3):459-476.
56. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. (2005). La Cadena de Banano en Colombia, una mirada global de su estructura y dinámica: 1991-2005. [http://www.agronet.gov.co/www/docs\\_agronet/2005112143835\\_caracterizacion\\_banano.pdf](http://www.agronet.gov.co/www/docs_agronet/2005112143835_caracterizacion_banano.pdf). Consultada en Junio 28 de 2010.
57. MIRANDA J. E. (1996). Evaluación de microorganismos antagonistas al hongo *Mycosphaerella fijiensis* (Morelet), colocados en el interior y en el exterior de la planta de banano. Tesis de posgrado. Centro Agronómico tropical de investigación y enseñanza para el desarrollo y la conservación. Turrialba, Costa Rica.
58. MURILLO R., LASA R., GOULSO D., WILLIAMS T., MUÑOZ D., CABALLERO P. (2003). Effect of tinopal LPW on the insecticidal properties and genetic stability of the nucleopolyhedrovirus of *Spodoptera exigua*. Journal of Economic Entomology. 96: 1668-1674.
59. ONGENA, M., and P. J. "Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol." *Trends in Microbiology* 16, no. 3 (2008): 115-125.

60. PARNELL, M.; BURT, P.; WILSON, K. (1998). The influence of exposure to ultraviolet radiation in simulated sunlight on ascospores causing Black Sigatoka disease of banana and plantain. *International J. Biometeorology* (1998) 42:22-27.
61. PELAEZ MONTOYA, J. E. (1999). Evaluación de la sensibilidad de *Mycosphaerella fijiensis* a cuatro fungicidas empleados para el control de la Sigatoka negra. Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia – sede Medellín.
62. PÉREZ, L.; HERNÁNDEZ, A.; HERNÁNDEZ, L.; PÉREZ, M.. (2002). Effect of trifloxystrobin and azoxystrobin on the control of black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) on banana and plantain. *Crop. Protection* 21:17-23
63. QUONG, D., NIELSEN, K.E. (2003). Adherent microcapsules. US Patent Application 0,040,552.
64. RAMIREZ, C. (2005). Aislamiento y evaluación de rizobacterias con potencial biocontrolador y promotor de crecimiento en plantas en banano. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia, Medellín.
65. RODRIGUEZ GAVIRIA, P. A. CAYÓN, G. (1996) Efecto de *Mycosphaerella fijiensis* sobre la fisiología de la hoja de banano. *Revista Agronomía Colombiana*. 26:2.
66. ROMERO, R.A. y SUTTON, T.B. (1997). Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black Sigatoka of banana, to propiconazole. *Phytopathology* 87:96-100

67. SCHISLER, D.A.; SLININGER, P.J.; BEHLE, R.W. y JACSON, M. A. (2004). Formulation of *Bacillus* spp. For biological control of plant Diseases. *Phytopatology*. 94:1267-1271.
68. SHILLINGFORD, C.A. (1989). Use of fungicides to control leaf spot disease in *Musa* en Fullerton, RA; STOVER, R H. (1989) Sigatoka leaf spot disease of bananas. Proceedings of an international workshop. Sn José de C.R. Montpellier-Francia, INIBAP. 75-83
69. SIERRA, J. (1980). Naturaleza de la resistencia de razas de hongos a fungicidas de acción específica y sistemas de prevención. EN: *Ascolfi informa* vol 6, No 5:61, 69
70. SMITH, William F. (1993). *Fundamento de la ciencia e ingeniería de materiales*. McGraw-Hill. Segunda Edición. Bogotá-Colombia.
71. STOVER, R.H. (1971). A proposed international scale for estimating intensity of banana leaf spot (*Mycosphaerella musicola* LEACH). *Trop. Agriculture*. (Trinidad), 48:185-196.
72. STOVER, R.H. (1979) Field observations on benomyl tolerance in ascospores of *Mycosphaerella fijinsis* var. *difformis*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 69:500-502.
73. STOVER, R.H. (1980). Sigatoka leaf spot of bananas and Platains. *Plant Disease*. 64 (8): 750-755
74. SUNDIN, G. W. (2002). "Ultraviolet radiation on leaves its influence on microbial communities and their adaptation.". (Cit. en: WHIPPS, J.

M., P. HAND, D. PINK, y G. D. Bending. "Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype." *Journal of Applied Microbiology*, 2007: 1744-1755).

75. SUDIN., G. W., y J. L. Jacobs. (1999). Ultraviolet radiation (UVR) sensitivity analysis and UVR survival strategies of a bacterial community from the phyllosphere of field grown peanut (*Arachis hypogaea* L). (Cit. en: Whipps, J. M., P. Hand, D. Pink, and G. D. Bending. "Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype." *Journal of Applied Microbiology*, 2007: 1744-1755)

76. TALAVERA, S.; BUSTAMANTE, R.; GONZALEZ, E y V. SANCHEZ, V. (1998). "Selección y evaluación en laboratorio y campo de microorganismos glucanólíticos antagonistas a *Mycosphaerella fijiensis*." *Manejo Integrado de Plagas* 47 (1998): 24-30.

77. UNITED BRANDS COMPANY. (1984) Bananos: Manual para controlar la Sigatoka. N.A. ; N.E.

78. VINDAS, R.; ORTIZ, F.; RAMIREZ, V. (2004). Genotoxicidad de tres plaguicidas utilizados en la actividad bananera de Costa Rica. *Rev. biol. trop*, sep. 2004, vol.52, no.3, p.601-609. ISSN 0034-7744.

79. ZULOAGA, Catalina M; PATIÑO, Luis Fernando, COLLAZOS, Juan C. (2004). INTEGRACIÓN DE INDUCCIÓN DE RESISTENCIA CON BACTERIAS QUITINOLÍTICAS EN EL CONTROL DE LA SIGATOKA NEGRA (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) EN BANANO. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín* v.60. n.2. Julio/Dic. 2007.

## 10. ANEXOS

**ANEXO 1:** Mercado de agroquímicos para el control de la Sigatoka negra en la zona bananera de Urabá a 2010. (Gutiérrez, 2010).

Casa Comercial	Producto	Función	Ingrediente activo	No de ciclos año	Dosis (L)/ha	Precio/L US\$	Cantidad del producto (L)	Costo total \$ US
<b>SYNGENTA</b>	Bravonil 720	Protectante	Clorotalonil	10	1,5	\$ 8,21	502.500	\$ 4.125.789,47
	SICO	Sistémico	Difenoconazole	2	0,4	\$27,89	26.800	\$ 747.578,95
	<b>TOTAL</b>							
<b>BAYER</b>	SIGANEX	Sistémico	Anilinopirimidina	1	0,5	\$18,95	16.750	\$ 317.368,42
	BAYCOR	Sistémico	Bytartenol	2	0,5	\$35,42	33.500	\$ 1.186.605,26
	IMPULSE	Sistemico	Estoroles	1	0,4	\$22,11	13.400	\$ 296.210,53
	<b>TOTAL</b>							
<b>BASF</b>	CALIXIN	Accion sistematica local	Tridemorph	12	0,5	\$18,42	201.000	\$ 3.702.631,58

	OPUS	Sistemico	Epoxiconazole	1	1	\$11,47	33.500	\$ 384.368,42
	<b>TOTAL</b>							<b>\$ 4.087.000,00</b>
<b>DOW</b>	DITHANE F-MB	Protectante	Mancozeb	17	2	\$3,27	1.139.000	<b>\$ 3.719.734,21</b>
<b>BANOLE</b>	ACEITE AGRICOLA			17	7,58	\$0,94	4.316.810	<b>\$ 4.076.421,05</b>
<b>PROFICOL</b>	ATLAS 25 E.W.	Sistemico	Tebuconazole	2	0,4	\$ 11,05	26.800	<b>\$ 296.210,53</b>
							<b>TOTAL</b>	<b>\$ 18.852.918,42</b>

**ANEXO 2:** Promedio longitud del tubo germinativo de *M. fijiensis* respecto a los tratamientos evaluados

Tratamiento <sup>2</sup>	% de inhibición del tubo germinativo	Grupos homogéneos
EMU	33+/-2,7	ab
SB	40,6+/-5,1	bc
M H2O	60,1+/-4,3	de
C+Biologico	75,2+/-10,43	e
C+químico	90,1+/-1,62	e

**ANEXO 3:** Valor p para cada uno de los factores e interacciones evaluadas para el ensayo de % de muerte celular en el tiempo.

Factor	Valor p
Tiempo (días)	0
Temperatura (°C)	0
Tipo de Formulación	0
Tiempo-Temperatura	0
Tiempo-tipo de formulación	0,0010

<sup>2</sup> Los tratamientos evaluados fueron C+químico Dithane® ; C+Biológico Rhapsody; M25 y M4 corresponde a la formulación en base agua almacenada a 25°C y 4°C respectivamente; C25 y C4 corresponde al caldo de cultivo bacteriano almacenado a 25°C y 4°C; EM 25 y EM 4 corresponden a la formulación en emulsión almacenada a 25° y 4°C y CH2O corresponde al control negativo.

Temperatura-formulación	0,00509
-------------------------	---------

**ANEXO 4:** Valor p para cada uno de los factores e interacciones evaluadas, ensayo de exposición a la radiación U.V.-C (254nm).

<b>Factor</b>	<b>Valor p</b>
Tiempo de exposición	0
Tipo de formulación	0
Interacción Tiempo-tipo de formulación	0

**ANEXO 5:** Valor p para cada uno de los factores e interacciones evaluadas experimentalmente para el ensayo de viabilidad en mezclas de tanque.

<b>Factor</b>	<b>Valor p</b>
Tiempo (horas)	0
Mezclas de fungicidas	0
Formulación	0
Interacción Tiempo-Mezclas	0
Interacción Tiempo-Mezclas	0
Interacción Mezclas-Formulación	0

**ANEXO 6:** Promedio de % de permanencia en la superficie, grupos homogéneos y error standart para cada uno de los tratamientos evaluados para: SB suspensión bacteriana, M formulación en mezcla base agua, EMU formulación en emulsión, C biológico RHA control biológico Rhapsody®, C+Dithane® control positivo Dithane® y C+Bravonil® control positivo Bravonil®

<b>Formulación</b>	<b>% permanencia en la superficie</b>	<b>Grupos homogéneos</b>
SB	4,498+/- 2,49	a
M	5,300+/-2,26	a
EMU	16,935+/-1,68	b
C biológico-RHA	20,443+/-1,47	b
C+Dithane®	80,424+/-1,98	c
C+Bravonil®	83,658+/-3,47	c

**ANEXO 7:** Promedio de % de área necrosada, grupos homogéneos y error standart para cada uno de las formulaciones evaluadas: SB suspensión bacteriana, M formulación en mezcla base agua, EMU formulación en emulsión, C biológico RHAP control biológico Rhapsody®, C+Dithane® control positivo Dithane® y C+Bravonil® control positivo Bravonil®

<b>Formulación</b>	<b>% Area necrosada con (Promedio)</b>	<b>Grupos homogéneos</b>
C+Químico	0,989+/-2,4895	a
M	2,285+/-2,2573	a
C biológico-RHA	7,637+/-1,6822	ab
SB	9,368+/-1,4730	ab
EMU	10,891+/-1,9842	ab
C-H2O	16,317+/-3,4663	b