

# Desarrollo de una metodología *in vitro* para la determinación rápida de actividad biocida-biostática sobre agentes fitopatógenos

J.M. Lara, I. Troytifo, E. García y C. Fernández (Departamento de Investigación y Desarrollo, FUTU-RECO BIOSCENCE, SL).

## INTRODUCCIÓN

La aplicación de sustancias externas al cultivo para el control de plagas y enfermedades ha sido una de las prácticas más comunes desde el inicio de la agricultura. Algunos escritos del siglo XVIII reportan ya la aplicación de extractos de piretrum, sulfatos, arsénico e incluso plomo para controlar enfermedades de los cultivos (MONTESINOS, 2006). Hoy en día, un gran número de formulaciones se evalúan cada año como posibles agentes de control de enfermedades causadas por hongos o bacterias.

Una alternativa al uso de agroquímicos sintéticos para el control de plagas y enfermedades en los cultivos agrícolas es la aplicación de extractos vegetales procedentes de flores, hojas, raíces, tallos e incluso semillas (PÉREZ *et al.*, 2003). Los plaguicidas naturales más conocidos son aquellos que se utilizan para controlar insectos (CUBILLO, *et al.*, 1999; IANACONE & LAMAS, 2003; IANACONE & REYES, 2001) y nematodos (INSUNZA & VALENZUELA, 1995; OKA *et al.*, 2000; PÉREZ *et al.*, 2003; RODRIGUEZ-KABANA *et al.*, 1992, 1995). Menos frecuente es la información que hace referencia al control de enfermedades causadas por hongos y bacterias fitopatógenas mediante la aplicación de extractos vegetales (ELKAFFASH W. M. & AL-MENOUFI O. A., 1998; RANASINGHE *et al.*, 2002, 2003; STAUFFER, *et al.*, 2000).

A pesar de que se ha aislado muchos compuestos con actividad fungicida-bactericida procedentes de vegetales tales como glucosinolatos, fenoles, poliacetilenos, diterpenos, sesquiterpenos, entre otros (PÉREZ, *et al.* 2003), resulta complicado aislar los efectos de sus compuestos de manera individual (por cromatografía líquida la mayoría de las veces) además de ser económicamente costosos. Debe resaltarse que solamente evaluando el extracto completo se puede valorar su verdadero efecto biocida, ya que de este modo se considera el efecto de los ingredientes individuales y la posible sinergia entre ellos.

Se han probado numerosas técnicas para determinar la acción biocida o biostática de productos con múltiples compuestos sobre agentes fitopatógenos. Entre las más utilizadas está la expansión radial, la inhibición por sustrato, la inhibición de la capacidad germinativa (RANASINGHE *et al.*, 2002; SEMPERE & SANTAMARIA, 2006; STAUFFER *et al.*, 2000), entre otras.

En este trabajo se ha puesto a punto una metodología *in vitro* que permite evaluar las propiedades biocidas y/o biostáticas de compuestos complejos (tipo extractos). El objetivo de este estudio era desarrollar un procedimiento que permitiera discernir si una concentración particular de un producto ejercía una acción biocida (elimina las unidades reproductivas) o bioestática (inhibe el crecimiento pero no elimina las unidades reproductivas) sobre un determinado microorganismo fitopatógeno (hongo o bacteria).

## Materiales y métodos

Para la puesta a punto de esta metodología, se utilizaron 3 dosis de un producto basado en extracto de cítricos que en experiencias preliminares había evidenciado una posible acción fungicida y bactericida. De esta manera se incorporó el extracto al medio de cultivo de un hongo fitopatógeno (Ensayo 1) y de una bacteria fitopatógena (Ensayo 2) ampliamente conocidos, y se compararon frente a un testigo sin tratar y un tratamiento con un fungicida y un bactericida comercial.

### Microorganismos patógenos:

En el primer ensayo se evaluó el efecto del extracto sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder & H.N. Hans., (aislamiento FEAD 0512). *Fo* es un hongo patógeno del suelo de la clase Hifomicetes, que causa marchitez especialmente en plantas de tomate en todo el mundo, especialmente en climas cálidos. En un segundo ensayo, se seleccionó la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi (= *Pseudomonas solanacearum*) (cepa FEAD 0511) pro-

teobacteria responsable de la podredumbre parca de numerosos cultivos. Ambas cepas pertenecen a la colección de cultivos mantenida en el laboratorio de Investigación y Desarrollo de FuturEco BioScience S.L.

### Formulaciones con actividad biocida:

- **Standard (productos químicos).**

**Ensayo 1.** Control positivo para la evaluación de *Fo*: Cuproxat® (de Kenogard). Fungicida comercial a base de oxiclóruro de cobre (al 19%)

en forma de suspensión concentrada para aplicación foliar.

**Ensayo 2.** Control positivo para la evaluación de *Rs*: Kasumin® (de Lainco). Bactericida comercial (polvo mojable) cuya formulación se compone de un 45% de oxiclورو de cobre y un 5% de kasugamicina.

**- Extracto Vegetal.**

En ambos ensayos se evaluó la actividad biocida de un extracto procedente de semillas de cítricos: Bestcure®, (de FuturEco BioScience). Fertilizante con 6% de L-aminoácidos, en el que se ha observado cierta acción fungicida-bactericida en ensayos anteriores (MANSILLA *et al.*, 2004).

**Validación:**

A partir de un cultivo de 7 días de *Fusarium oxysporum* FEAD 0512 (*Fo*) sobre medio PDA estéril se obtuvo una suspensión de  $1,7 \times 10^7$  esporas/mL. Se inoculó 1 mL de la suspensión en 4 matraces de 150 mL y a dos de ellos se les adicionó oxiclورو de cobre (19%) ajustando a una concentración de 1% (máxima recomendada). Los matraces inoculados se incubaron en agitador orbital a 25°C, 100 rpm durante 96 horas. Al cabo de este tiempo se determinó la concentración total de biomasa (filtración + desecación hasta peso constante), la concentración final de esporas de *Fo* y las UFCs. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 1.

**Evaluación de extracto de semillas:**

Se realizaron dos ensayos independientes. En el primero se evaluó la capacidad fungicida-fungistática de un extracto de cítricos sobre *Fo* mientras que en el segundo se determinó la capacidad bactericida-bacteriostática de ese mismo extracto sobre *Rs*. Cada uno de los ensayos se realizó por duplicado.

**Ensayo 1:** Se incubaron 10 placas de un cultivo de *Fo* para obtener el inóculo patrón. Se raspó la superficie de las placas y se recogió el material en una solución de polisorbato 80 al 0,1% estéril. La suspensión resultante se filtró a través de una doble capa de gasa estéril para separar los fragmentos de micelio y esporas germinativas, intentando obtener un inóculo basado exclusivamente en unidades reproductivas no germinadas (esporas y células bacterianas). Usando la cámara de Neubauer, se realizó un recuento de las esporas y paralelamente se determinó el número de Unidades Formadoras de Colonia (UFCs) para conocer la concentración inicial. El inóculo resultante se ajustó a  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL. Se se-

tratamiento	[ ] FO (ESPORAS / ML) T <sub>0h</sub>	[ ] FO (ESPORAS / ML) T <sub>96h</sub>	Biomasa (G)	UFC / ML
Control 1	$1,13 \times 10^5$	$7,0 \times 10^6$	0,271	$1,0 \times 10^7$
Control 2	$1,13 \times 10^5$	$7,8 \times 10^6$	0,260	$2,0 \times 10^7$
Fungicida 1	$1,13 \times 10^5$	$2,5 \times 10^4$	0,02	0
Fungicida 2	$1,13 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$	0,04	0

Tabla 1. Resultados de la validación del método sobre *Fusarium oxysporum*

Producto / Muestra	dosis (%V)	Biomasa (G/L)	% ic <sup>1</sup>	UI <sup>2</sup> totales (E/MI)	UI <sup>2</sup> Viables (UFC/ML)	Actividad
Bestcure®	0,075	0,035	99,2	$5,0 \times 10^5$	35	Fungicida
	0,15	0,085	98,09	$6,5 \times 10^5$	0,0	Fungicida
	0,30	0,125	97,20	$2,3 \times 10^5$	0,0	Fungicida
Cuproxat®	1,0	0,045	98,99	$6,4 \times 10^5$	10	Fungicida

IC<sup>1</sup>: Inhibición del crecimiento; UI<sup>2</sup>: unidades infectivas;  
Concentración final en el control:  $5,5 \times 10^7$  e/mL

Tabla 2. Efecto de un producto formulado a base de extracto de cítricos (Bestcure®) sobre *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*.

Producto / Muestra	dosis (% V/V)	UI viables (UFC/ML)	mortalidad <sup>1</sup>	Actividad
Bestcure®	0,075	0	100%	Bactericida
	0,15	0	100%	Bactericida
	0,30	0	100%	Bactericida
Kasumin®	1,5	0	100%	Bactericida

Concentración final en el control:  $1,22 \times 10^{11}$  e/mL

Tabla 3. Efecto de un producto formulado a base de extracto de cítricos (Bestcure®) sobre *Ralstonia solanacearum*.

leccionaron tres dosis comercialmente aceptables del extracto de cítricos (Bestcure®) 0,075%, 0,15% y 0,3% v/v, y se preparan soluciones del producto sintético *standard* aplicando una dosis doble de la máxima recomendada (Cuproxat® al 2%). En cada matraz se incorporaron 100 mL de caldo de cultivo (Caldo Saboreaud, Liofilchem, Italia), 1 mL de la suspensión del inóculo y las cantidades necesarias de Bestcure® y Cuproxat® para ajustar las dosis seleccionadas. Los matraces se incubaron durante 96 h a 25°C a 100 rpm en un agitador orbital (Gallenkamp).

**Ensayo 2:** De manera similar al Bioensayo 1, se incubaron 10 placas de un cultivo de *Rs* para obtener el inóculo patrón. La suspensión resultante del ras-

pado, se filtró y se determinaron UFCs. El inóculo resultante se ajustó a  $8,0 \times 10^{10}$  UFC/mL. Se utilizó Kasumin® al 1,5% como producto sintético *standard*. En cada matraz se incorporaron 100 mL de caldo de cultivo (Medio King: 15 g/l agar; caseína peptona 20 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,5 g/L; MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O 1,5 g/L; glicerol 15 mL/L; pH 6,8), 1 mL de la suspensión del inóculo (*Rs*) y las cantidades necesarias de Bestcure® y Kasumin® para ajustar las dosis seleccionadas. Los matraces se incubaron durante 48 h a 30°C a 100 rpm en un agitador orbital.

**Determinaciones:**

Al finalizar el periodo de incubación en ambos ensayos, se filtró al vacío en un kitasato el conteni-

do de los matracas, empleando papel Whatman Nº1, y los filtros se secaron hasta peso constante en estufa (Selecta). En cada ensayo se incorporaron dos controles sin incubar, que se filtraron inmediatamente después de la inoculación para determinar el contenido de biomasa inicial.

Con el contenido de biomasa encontrado se calculó el % de inhibición (I) aplicando la fórmula (RANASINGHE *et al.*, 2002):

$$\% I = ((PM_c - PM_0) - (PM_t - PM_0)) / (PM_c - PM_0) \cdot 100$$

**PM<sub>c</sub>** = Biomasa obtenida en el control

**PM<sub>0</sub>** = Biomasa inicial (control sin incubar)

**PM<sub>t</sub>** = Biomasa obtenida en los tratamientos

De acuerdo con las concentraciones utilizadas se calculó la concentración capaz de producir al menos un 90% de inhibición en la capacidad de crecimiento de cada microorganismo (CMI).

Previo a la filtración de cada uno de los matracas, al final del periodo de incubación, se separó 1 mL de cultivo en condiciones estériles. A partir de éste se hicieron soluciones seriadas y se determinó el Número de Unidades Formadoras de Colonias / mL (recuento de viables) de cada uno de los patógenos.

## Resultados y discusión

Bestcure®, el extracto de cítricos evaluado, presentó actividad fungicida a las dosis ensayadas sobre *Fo* (Tabla 2) y bactericida a las mismas dosis sobre *Rs* (Tabla 3).

Los resultados de esta técnica sirven para dilucidar de forma global si un producto determinado posee una acción biocida o bioestática sobre un microorganismo patógeno en un tiempo promedio de una semana. Incluyendo un número suficiente de concentraciones es posible conocer la concen-

tración mínima inhibitoria y la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>), que son datos de partida para el diseño de ensayos posteriores de semi-campo y campo.

Este método resulta suficientemente viable, cuando se aplica a patógenos bacterianos o fúngicos, con una respuesta de efecto suficientemente diferente a la del control que permite observar efectos concluyentes del tipo SI o NO. Aunque la eficacia de un determinado producto debe validarse en condiciones *in vivo*, al menos este método proporciona una base para descartar productos no eficaces.

Es una metodología sencilla, que permite ser adaptada en un laboratorio de microbiología básico. Esta herramienta de análisis, gracias a su flexibilidad, se ha convertido en un método de análisis interno estandarizado en el laboratorio de Investigación y Desarrollo de FuturEco Bioscience, SL.

## BIBLIOGRAFÍA

- CUBILLO, D.; SANABRIA, G.; HILJE L. (1999). *Evaluación de la repelencia y mortalidad causada por insecticidas comerciales y extractos vegetales sobre Bemisia tabaci*. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 53: 309-315.
- ELKAFASH W. M.; AL-MENOUFI. (1998). *Evaluation of plant aqueous extracts for their antifungal activity against certain phytopathogenic fungi*. Phytopathology 88, 25.
- IANNACONE, J.; LAMAS, G. (2003). *Efecto insecticida de cuatro extractos botánicos y del cartap sobre la polilla de la papa Phthorimaea operculella (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae), en el Perú*. Entomotrópica, 18 (2): 95-105.
- IANNACONE, J.; REYES, M. (2001). *Efecto de las poblaciones de Bemisia tabaci (Homóptera: Aleyrodidae) y Liriomyza huidobrensis (Diptera: Agromyzidae) por los insecticidas botánicos neem y rotenona en el cultivo de tomate en el Perú*. Rev. Col. Entomol 27: 147-152.
- INSUZA, V.B.; VALENZUELA, A.A. (1995). *Control of Ditylenchus dipsaci on garlic (Allium sativum) with extracts of medicinal plants from Chile*. Nematropica, 25 (1): 35-41.
- MANSILLA, P.; PÉREZ, R; FERNANDEZ, C. (2004). *Ensayo preliminar de control de mildiu de la vid con Bestcure*. Vida Rural, 15 abril: 67.
- MONTESINOS, E. (2006). *Una mirada al fenómeno de la resistencia a funguicidas y bactericidas*. Comunicación Técnica, Boletín Empresarial LA HOJA, FuturEco, SL. Febrero de 2006. (www.futureco.net)
- OKA, Y.; NACAR, S; PUTIEVSKY, E.; RAVID, UZI, YANIV, Z.; SPIEGEL, Y. (2000). *Nematicidal Activity of essential oils and their components against the root-knot nematode*. Phytopathology, 90:710-715.
- PÉREZ, M.P.; NAVAS-CORTÉS, J.A.; PASCUAL-VILLALOBOS, M.J.; CASTILLO, P. (2003). *Nematicidal activity of essential oils and organic amendments from Astereaceae against root-knot nematodes*. Plant Pathology, 52: 395-401.
- RANASINGHE, L.; JAYAWARDENA, B; ABEYWICKRAMA K. (2002). *Fungicidal activity of essential oils of Cinnamomum zeylanicum (L.) and Syzygium aromaticum (L.) Merr et L.M. Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana*. Letters in Applied Microbiology, 35: 208-211.
- RODRÍGUEZ-KABANA, R.; PINOCHET, J.; CALVET, C. (1992). *El orujo de aceituna para el control de nematodos fitoparásitos*. Nematotrópica, 22 (2) 149- 158.
- RODRÍGUEZ-KABANA, ESTAUN, V.; PINOCHET, J.; MARFA, O. (1995). *Mixtures of Olive Pomace with different nitrogen sources for the control of Meloidogyne spp. on tomato*. Journal of Nematology 27 (4S): 575-584.
- SEMPERE, F., SANTAMARINA, M.P. (2006) *Estudio de la respuesta a distintas condiciones medioambientales del agente responsable de la fusariosis del arroz: Fusarium verticilloides (Sacc.) Nirenberg*. PHYTOMA, 182: 122-125
- STAUFFER, A., ORREGO A. F., AQUINO A.J. (2000). *Selección de extractos vegetales con efecto fungicida y/o bactericida*. Revista de Ciencia y Tecnología, Dirección de Investigaciones – UNA. Vol 1 (2): 29-33.