

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Evaluation of Biosurfactants Produced by *Pseudomonas fluorescens* for Potato Late Blight Control (*Phytophthora infestans* (Mont) de Bary) Under Controlled Conditions

Respuesta de biosurfactantes producidos por *Pseudomonas fluorescens* para el control de la gota de la papa *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary, bajo condiciones controladas

Hugo F. Rivera¹, Erika P. Martínez², Jairo A. Osorio⁴ y Edgar Martínez³

ABSTRACT

Phytophthora infestans (Mont.) de Bary, causal agent of potato late blight is considered the main limiting pathogen for the production of this crop in Colombia. The usual control of the disease has been performed with systemic fungicides which increase production costs, can induce pathogen resistance and have a negative impact on the environment.

Therefore, this study was carried out in order to find effective and environmentally friendly control alternatives for potato late blight. Two *Pseudomonas fluorescens* native strains (039T and 021V) isolated from potato crops were evaluated against *P. infestans*.

Bacterial suspensions (obtained from minimal salts medium added with kerosene) and partially purified biosurfactants (BPP) were applied on detached leaflets for *in vitro* assays and on potato plants in greenhouse, for *in vivo* assays and the measure of inhibitory effect of the disease was assessed. The results showed the ability of *P. fluorescens* biosurfactants and bacterial suspensions to control the pathogen. BPP 039T was able to reduce the level of severity disease by 79.9% *in vitro* and 38.5% *in vivo*, whereas BPP 021V decreased 78.7% *in vitro* and 30.2% *in vivo*. Bacterial suspensions reduced the severity level in 72.4% (039T) and 66.1% (021V) *in vitro* assessments and 35% in the *in vivo* experiment. These results show the potential of *P. fluorescens* biosurfactants to control the potato late blight in Colombia.

Keywords: Biosurfactants Partially Purified, Controlled Condition, Late Blight, *Pseudomonas fluorescens*, Potato.

RESUMEN

Phytophthora infestans (Mont.) de Bary, agente causal de la gota de la papa, es considerado la principal limitante de la producción de este cultivo en Colombia. El control habitual del patógeno se realiza con fungicidas de tipo sistémico, que incrementan los costos de producción, pueden inducir la resistencia del patógeno y tiene un impacto negativo en el ambiente. Por tanto, se llevó a cabo este estudio con el propósito de buscar alternativas amigables con el ambiente, que hagan parte de un paquete tecnológico eficaz de control. Dos cepas nativas de *Pseudomonas fluorescens* (039T y 021V), provenientes de cultivos de papa, fueron evaluadas contra *P. infestans*. Las suspensiones bacterianas y los biosurfactantes parcialmente purificados (BPP), producidos por éstas (obtenidos en medio mínimo de sales con querosén), fueron aplicados sobre folíolos desprendidos en ensayos *in vitro* y experimentos *in vivo* en plantas de papa, en condiciones controladas en casa de malla. Los resultados demostraron la capacidad que tienen los biosurfactantes y las suspensiones bacterianas para controlar al patógeno, ya que el BPP 039T logró reducir el nivel de severidad de la enfermedad en 79,9% *in vitro* y 38,5% *in vivo*, mientras que el BPP 021V redujo en 78,7% *in vitro* y 30,2% *in vivo*. Las suspensiones bacterianas redujeron el nivel de severidad en 72,4% (039T) y 66,1% (021V) en las evaluaciones *in vitro* y 35% en los experimentos *in vivo*. Los resultados de esta investigación muestran el potencial que tienen los biosurfactantes para el control de la gota en Colombia.

Palabras clave: biosurfactantes parcialmente purificados, condiciones controladas, gota, papa, *Pseudomonas fluorescens*.

INTRODUCCIÓN

En Colombia se cultivan alrededor de 128.701 ha de papa que producen aproximadamente 2.272.772 t/año, siendo este cultivo el más importante de las zonas altas de nuestro país. Alrededor de 90.000 familias se encuentran vinculadas con la explotación directa de este cultivo, que genera cerca de 20 millones de jornales al año. Se estima que en todo el país el cultivo de la papa genera unos 104.456 empleos directos, además de otros empleos que

¹ Ingeniero Agrónomo. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (Udca). hrivera@corpoica.org.co

² Investigadora Máster. Laboratorio de Fitopatología, Corpoica, C.I. Tibaitatá. Mosquera (Cundinamarca). emartinez@corpoica.org.co

³ Investigador Ph.D. Laboratorio de Fitopatología, Corpoica, C.I. Tibaitatá. Mosquera (Cundinamarca). josorio@corpoica.org.co

⁴ Docente, Ph.D. de Fitopatología, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (Udca). edgar.martinezgranja@gmail.com

crea la cadena en torno a los procesos de distribución de insumos, empaques, maquinaria, semilla, procesamiento y comercialización.

El principal problema fitosanitario del cultivo de la papa es la gota o *Tizón tardío*, causado por el Oomycete *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary; esta enfermedad es muy destructiva en épocas de alta humedad (superior al 90%) y en temperaturas entre los 12° C y 15° C, condiciones que permiten que el patógeno ocasione la muerte de hojas y tallos de la planta, y las infecciones de los tubérculos, logrando deteriorar la calidad y reducir su valor como producto final (Robayo, 2000; Agrios, 2005).

Las medidas de prevención de la enfermedad que se realizan habitualmente, se han orientado a la destrucción de fuentes iniciales de inóculo, la siembra de semilla certificada y la aplicación de fungicidas foliares. En Colombia, para controlar la enfermedad se invierte aproximadamente el 10% de los costos de producción en aplicaciones tipo calendario de fungicidas como Manzate® y Metalaxil® entre otros.

El excesivo uso de fungicidas químicos genera problemas medioambientales, afecta gravemente la salud humana y conjuntamente provoca el desarrollo de nuevos genotipos del patógeno con sensibilidad reducida a estos fungicidas. La alta capacidad reproductiva de estos organismos y el uso continuado de los químicos contribuyen a que la frecuencia de aparición de resistencia se incremente rápidamente en las poblaciones del patógeno, haciendo su control más difícil (Maldonado *et al.*, 2002).

La investigación en manejo de la gota se ha orientado hacia diferentes métodos de control, como la obtención de variedades resistentes mediante el cruzamiento varietal, control cultural, la inducción de resistencia sistémica, ingeniería genética o a través de microorganismos y el uso de metabolitos de origen microbiano como los biosurfactantes producidos por bacterias del género *Pseudomonas* spp. (Tran *et al.*, 2007).

Los biosurfactantes son moléculas extracelulares producidas por microorganismos pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, principalmente. Estos microorganismos tienen la capacidad de crecer en presencia de hidrocarburos, lo cual estimula la producción de biosurfactante y otros metabolitos secundarios de las bacterias (Turkovskaya *et al.*, 1999). Investigaciones realizadas por Stangellini y Miller (1997), De Souza (2003) y Tran *et al.* (2007), demostraron que los biosurfactantes producidos por especies de *Pseudomonas* tienen actividad lítica sobre zoosporas de los géneros *Phytophthora* y *Phytophthora*.

Los biosurfactantes (bioemulsificantes) poseen una porción hidrofílica que puede estar constituida por monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, aminoácidos, péptidos, grupos fosfatos o carboxilados y una porción hidrofóbica compuesta por un ácido graso saturado o insaturado; los biosurfactantes tienen la capacidad de modificar las propiedades de un medio líquido o su interfase, reduciendo la tensión superficial (Desai y Banat, 1997; De Jonghe *et al.*, 2005).

Esta condición le confiere a los biosurfactantes la capacidad de penetrar e intercalarse dentro de la membrana plasmática de las zoosporas, compuesta por glicolípidos (en lugar de fosfolípidos) y proteínas, y conseguir una afinidad química de la porción hidrofílica del biosurfactante para la entrada y el desequilibrio en la integridad y la permeabilidad de la membrana, conduciendo al rompimiento de la zoospora y la liberación del contenido citoplasmático (Kim *et al.*, 2000; EPA, 2009).

En Colombia, los estudios exploratorios realizados por Barragán (2004) y Martínez y Osorio (2007) demostraron que los biosurfactantes producidos por cepas nativas de *Pseudomonas fluorescens* de papa (021V y 039T) son potenciales controladores de *P. infestans*, ya que presentaron actividad lítica en zoosporas y redujeron el crecimiento del oomiceto. Por consiguiente, los biosurfactantes pueden ser una alternativa rentable para reducir la gota de la papa sin generar un alto impacto en el medio ambiente.

Encontrar y desarrollar opciones de control de la gota de papa con fungicidas es una prioridad en muchas regiones productoras de papa en el mundo. Por tanto, los avances promisorios que surgen para el control biológico de *P. infestans* deben ser evaluados en condiciones del cultivo; por consiguiente, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de los biosurfactantes producidos por las cepas de *Pseudomonas fluorescens* 021V y 039T sobre la infección de *P. infestans* en plantas de papa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se desarrolló en el laboratorio de Fitopatología de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica, Centro de Investigación Tibaitatá, localizado en el municipio de Mosquera (Cundinamarca) a 2.544 de altitud. Esta investigación incluyó experimentos de laboratorio y casa de malla, realizados entre abril de 2007 y mayo de 2008.

La metodología planteada se realizó para evaluar el efecto inhibitorio sobre la infección de *P. infestans*, de biosurfac-

tantes parcialmente purificados y de suspensiones bacterianas de *P. fluorescens* productoras de biosurfactantes (021V y 039T), mediante evaluaciones *in vitro* en foliolos desprendidos de papa y en ensayos *in vivo* sobre el follaje de plantas de papa en condiciones de casa de malla.

MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron plantas de papa (*Solanum tuberosum*), variedad Diacol capiro (susceptible a la gota), de ocho semanas de edad. Las plantas fueron propagadas en casa de malla, en condiciones controladas de temperatura entre los 9°C en horas de la mañana y 28°C en horas de la tarde, humedad relativa >90% y riego constante por aspersión; estas condiciones fueron monitoreadas con una estación meteorológica digital. Adicionalmente, se aplicaron prácticas agronómicas para evitar plagas y enfermedades en las plantas.

Microorganismos y condiciones de cultivo

Pseudomonas fluorescens

Se utilizaron dos cepas de *Pseudomonas fluorescens*, 021V y 039T, pertenecientes a la colección de microorganismos del laboratorio de Fitopatología de Corpoica C.I. Tibaitatá, aisladas de suelo y de material vegetal, de cultivos de papa de los municipios de Ventaquemada y Toca, respectivamente (Boyacá, Colombia). Dichas cepas fueron seleccionadas en los estudios realizados por Barragán (2004) y Martínez y Osorio (2007), por su actividad lítica sobre zoosporas de *P. infestans* y por su capacidad de emulsificar el aceite mineral y el querosén, pruebas que indicaron indirectamente la producción de biosurfactante.

Las cepas, conservadas a -10°C en glicerol al 20%, fueron reactivadas en agar nutritivo (pH 6,5-7,0) a 30°C durante 24 h. Una vez reactivadas, se determinaron las características bioquímicas de las bacterias para confirmar el género y las especies de las cepas, mediante pruebas de fermentación de la lactosa en agar Mac Conkey, la presencia de oxidasa, el crecimiento y producción de pigmentos y fluorescencia en agar King B y la ausencia de crecimiento en agar nutritivo a 42°C (Schaad *et al.*, 2001).

Phytophthora infestans

La cepa de *P. infestans* que fue utilizada como inóculo en el laboratorio y en la casa de malla para llevar a cabo los procesos de infección, hace parte de la colección de microorganismos del laboratorio de fitopatología y permanece conservada en medio sólido V8® a 18°C. Con el objeto de estimular la virulencia del patógeno, esta cepa se reactivó en tubérculos y foliolos de papa desinfectados

con hipoclorito de sodio al 1% y alcohol etílico al 70%, que fueron inoculados con 1×10^4 zoosporas ml^{-1} .

Luego de ser reaislada del material vegetal infectado, la cepa se purificó en agar jugo V8® a partir de un solo esporangio germinado mediante la técnica de de cultivos monospóricos, pH 7,0 (Ho y Ko, 1996): en placas de Petri con agar - agua se inoculó una suspensión de esporangios (1 esporangio $2 \mu\text{l}^{-1}$) y se incubaron a temperatura ambiente ($18 \pm 2^\circ\text{C}$) durante 24 h. Transcurrido este período, los esporangios germinados fueron transferidos a placas de agar V8® y se incubaron a temperatura ambiente hasta obtener colonias del patógeno provenientes de un único esporangio.

Obtención del Biosurfactante Parcialmente Purificado (BPP)

Para la producción de los biosurfactantes, las cepas de *P. fluorescens* 021V y 039T fueron inoculadas en medio mínimo de sales (MMS) compuesto por glicerol al 2%, NaNO_3 (1,0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), KH_2PO_4 (0,1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), CaCl_2 (0,1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y extracto de levadura (0,2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) (Déziel *et al.*, 1996; Barragán, 2004, y Martínez, 2006) pH 6,0. El medio MMS fue modificado con querosén (0,05 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), con el propósito de estimular la producción del biosurfactante por parte de las bacterias (Turkovskaya *et al.*, 1999) y se incubaron a 30°C durante 120 h a 150 rpm en un agitador orbital.

Transcurrido el tiempo de incubación, al caldo microbiano se le separó la biomasa por centrifugación a 8000 G durante 20 min. El sobrenadante obtenido fue acidificado con H_2SO_4 2N hasta pH 2,0 y luego se le realizó la extracción de los BPP con éter dietílico. La fase etérea formada en el proceso de extracción fue puesta a evaporación durante 12 h y luego el BPP se reconstituyó con agua destilada estéril (Torres y Sánchez, 2001; Martínez y Osorio, 2007; Rivera, 2008). Cada BPP reconstituido fue conservado a 4°C hasta su utilización. Este procedimiento se realizó previamente a cada una de las evaluaciones de los BPP en condiciones *in vitro* e *in vivo*.

Preparación de las suspensiones de *P. fluorescens*

Las suspensiones bacterianas de las cepas de *P. fluorescens* 021V y 039T se obtuvieron de colonias crecidas durante 24 horas en AN y suspendidas en el medio mínimo de sales (MMS), con glicerol al 2%, en una concentración de 1×10^8 bacterias ml^{-1} .

Cuantificación y evaluación de los Biosurfactantes Parcialmente Purificados (BPP)

Los BPP de las cepas 021V y 039T fueron cuantificados indirectamente mediante las pruebas de Orcinol,

emulsificación y actividad zoosporicida, para evaluar y comparar las propiedades de los BPP producidos por las cepas bacterianas (Tuelva *et al.*, 2002; Martínez y Osorio, 2007).

Prueba de Orcinol

Esta prueba de cuantificación de azúcares con Orcinol se realizó con el objetivo de confirmar la presencia del ramnolípido y cuantificar la concentración de ramnosa presente en la molécula hidrofílica de los BPP producidos por las cepas 021V y 039T. Para ello, se tomaron 0,2 ml de los extractos obtenidos de los caldos de cultivo de las cepas bacterianas y se le adicionaron 1,8 ml de la solución de Orcinol al 19% en H₂SO₄ (53%); la reacción se llevó a cabo a 80°C durante 30 min, después se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 15 minutos, se leyó la absorbancia a $\lambda = 421$ nm frente a un blanco de reactivo con agua destilada. Para obtener la concentración (mg ml⁻¹) de ramnolípido presente se utilizó la ecuación 1 de la recta obtenida previamente en la curva de calibración con L- ramnosa (Martínez y Osorio, 2007):

$$Y_{ij} = u + ip + ij + (p * t)_{ij} + \sum ij$$

Donde:

- Y_{ij} : variable aleatoria observada
 u : media general
 ip : efecto del i –ésimo protectante
 t : efecto del j –ésimo tiempo de inoculación
 $(p * t)_{ij}$: efecto de la interacción protectante * tiempo de inoculación
 $\sum ij$: error experimental

Prueba de emulsificación

El porcentaje de emulsificación (PE) se definió como el porcentaje de aceite mineral o querosén emulsionado en agua, luego de ser expuesto a los BPP y agitado durante 1 min en un Vortex a temperatura ambiente; la lectura se hizo 1 h después para el aceite mineral y 24 h para el querosén. La prueba se realizó en tubos de ensayo a los que se adicionaron 0,5 mL de los BPP, 0,5 mL de aceite mineral o querosén y 4 mL de agua destilada.

El PE de los BPP se obtuvo comparando la medida de la altura del anillo de emulsificación formado, con la medida de la altura del anillo producido por el control positivo (Tween 20®, 200 mg·mL⁻¹), el cual se tomó como el 100% (Martínez, 2006; Martínez y Osorio, 2007).

Actividad zoosporicida de los BPP

Para confirmar la actividad lítica de los BPP sobre las zoosporas de *P. infestans*, se colocaron 20 μ l de una suspensión de 1×10^4 zoosporas·mL⁻¹ con igual volumen de la suspensión del biosurfactante en una lámina cóncava. Mediante observación microscópica (40X) se tomo el tiempo que transcurrió entre la adición del BPP y la inmovilización y lisis de las zoosporas.

Actividad biocontroladora de los BPP y de las cepas de *P. fluorescens* contra *Phytophthora infestans* en folíolos desprendidos de papa

La evaluación del efecto inhibitorio sobre la infección por *P. infestans* de los BPP y de las suspensiones bacterianas, se realizó mediante ensayos *in vitro* con folíolos desprendidos de papa variedad Diacol Capiro, libres del patógeno. Para este estudio se planteó un diseño experimental completamente al azar (DCA), con arreglo factorial 6*5, donde el factor A (protectantes) incluyó: un testigo sin protectante, un testigo químico comercial Manzate® (Mancozeb 80%), el BPP de la cepa 021V, el BPP de la cepa 039T, la suspensión bacteriana de la cepa 021V en MMS y la suspensión bacteriana de la cepa 039T en MMS; y el factor B (tiempos de inoculación del patógeno): 2, 12, 24, 36 y 48 h después de la inoculación de los protectantes, a fin de evaluar su persistencia sobre los folíolos.

Cada unidad experimental constó de una cámara húmeda compuesta por una caja Petri de 10 cm de diámetro, con un disco de papel filtro humedecido para mantener la humedad relativa por encima del 90%. Sobre una lámina portaobjetos se colocaron dos folíolos de igual tamaño, que se asperjaron por el haz y el envés con los protectantes y fueron inoculados con 40 μ l de una suspensión de 1×10^4 esporangios·mL⁻¹. Las cámaras fueron incubadas durante 12 h a 5°C, para estimular la liberación de zoosporas y facilitar la infección por parte del patógeno; luego las cámaras húmedas fueron incubadas a temperatura ambiente por 120 h.

Cada 12 h, desde el momento en que se inoculó el patógeno, se tomaron lecturas del porcentaje de severidad de la gota, medida como área foliar afectada (cm²) con respecto al área total del folíolo. Las evaluaciones se hicieron durante 120 h, tiempo en el que el testigo infección mostró el 100% de área total afectada por la enfermedad. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza (Anava) y una prueba de comparación múltiple de Tukey, por medio del paquete estadístico SAS® versión 9.1.3.

Actividad biocontroladora de los BPP y de las cepas de *P. fluorescens* contra *P. infestans* en plantas de papa en condiciones de casa de malla

El efecto inhibitorio de los BPP y de las suspensiones de las cepas bacterianas 021V y 039T sobre la infección de *P. infestans*, se evaluó en el follaje de plantas de papa mediante un ensayo *in vivo* en casa de malla. Para este ensayo se utilizó un diseño experimental completamente al azar (DCA), con arreglo factorial 6*3, en donde el factor A (protectantes) incluyó: un testigo sin tratar, un testigo comercial Manzate® (Mancozeb 80%), un BPP de la cepa 021V, un BPP de la cepa 039T, una suspensión bacteriana de la cepa 021V en MMS y una suspensión bacteriana de la cepa 039T en MMS; y el factor B (tiempos de inoculación del patógeno): cuarto, quinto y sexto días después de la aplicación de los protectantes sobre el follaje de las plantas.

Cada unidad experimental consistió en una materia con un planta de papa variedad Diacol Capiro de ocho (8) semanas de edad; en cada planta se escogieron tres hojas apicales, y de cada hoja se escogió el foliolo apical como unidad de muestreo, al cual se le midió el área total en cm², como medida de referencia para determinar el porcentaje de severidad ocasionado por la enfermedad a partir del área de cada lesión en cm².

Las plantas fueron asperjadas con cada uno de los protectantes, y al cuarto, quinto y sexto días fueron inoculadas con una suspensión de *P. infestans* de 1x10⁴ zoosporas ·ml⁻¹. Después de la inoculación con el patógeno, cada planta fue cubierta con una bolsa de plástico para propiciar una humedad relativa superior al 90%, y de esta forma ofrecerle al patógeno las condiciones adecuadas para la infección. Adicionalmente, se realizaron periódicamente aspersiones con agua, usando una bomba de espalda nebulizadora para mantener una lámina de agua sobre los foliolos y optimizar la infección por parte del patógeno.

Las lecturas se realizaron cada 24 h, durante ocho (8) días después de inocular la primera planta con el patógeno, hasta cuando el testigo infección mostró un porcentaje de severidad del 100%. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza Anava para un diseño factorial y una prueba de comparación múltiple Tukey, para identificar los mejores tratamientos mediante el paquete estadístico SAS® versión 9.1.3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Microorganismos y condiciones de cultivo

Las características de las cepas nativas de *Pseudomonas fluorescens* de 021V y 039T reactivadas en esta investigación,

se confirmaron mediante la caracterización morfológica y bioquímica de las bacterias. Así mismo, se determinó que estas cepas producen biosurfactantes en MMS con glicerol al 2%, de acuerdo con las características obtenidas en las pruebas de cuantificación y evaluación de los BPP, corroborando los resultados obtenidos en los estudios anteriores (Martínez y Osorio, 2007).

Cuantificación y evaluación de los Biosurfactantes Parcialmente Purificados (BPP)

Las técnicas utilizadas para la cuantificación de los biosurfactantes producidos por las cepas de *P. fluorescens* 021V y 039T, mostraron las propiedades que tienen éstos, tales como: la capacidad de reducir la tensión superficial entre dos líquidos inmiscibles y la característica de intercalarse entre la membrana citoplasmática de las zoosporas de *P. infestans*, ocasionando desequilibrio a nivel celular.

Resultados de la Prueba de Orcinol

La técnica colorimétrica de Orcinol permitió cuantificar el azúcar que compone los BPP, indicando que el biosurfactante producido por las cepas bacterianas de *Pseudomonas fluorescens* 021V y 039T es un glicolípido de tipo ramnolípido, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Martínez y Osorio (2007). Sin embargo, en este estudio se logró obtener concentraciones más altas de los biosurfactantes, debido a la adición de querosén al MMS (021V= 0,013 mg·mL⁻¹ y 039T= 0,056 mg·mL⁻¹). Lo anterior se debe a que compuestos derivados del petróleo incrementan la producción de biosurfactantes, ya que son fuente de carbono fácilmente degradable por bacterias del género *Pseudomonas* (Desai y Banat, 1997).

Resultados de la Prueba de Emulsificación

En la prueba de emulsificación se determinó indirectamente la presencia del compuesto en los caldos de cultivo de las cepas de *P. fluorescens* 021V y 039T, por medio de la formación de la interfase causada por los BPP, entre líquidos inmiscibles como lo son el aceite mineral o el querosén en agua.

Al comparar los anillos de emulsificación formados, el biosurfactante producido por la cepa 039T mostró un anillo de emulsificación con una altura de 1cm, igual al halo formado por el control positivo (Tween 20®, 200 mg·mL) o porcentaje de emulsificación (PE)=100% (Figura 1). La cepa 021V formó un halo de emulsificación con altura de 0,7 cm, indicando un 70% de emulsificación respecto al control positivo. El resultado anterior muestra que la cepa 039T produjo el metabolito en mayor concentración en el

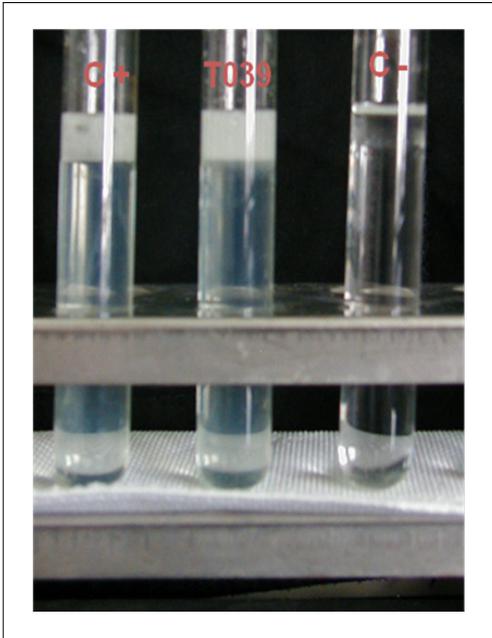


Figura 1. Prueba de emulsificación positiva de aceite mineral en agua, producida por el biosurfactante de la cepa de *P. fluorescens* 039T. C-: control negativo (agua), C+: control positivo (Tween 20®, 200 mg•mL⁻¹) (Fotografía: Fernando Rivera, 2008).

MMS con glicerol al 2% y querosén, que la cepa 021V, lo que concuerda con el resultado obtenido en la prueba de Orcinol.

Actividad zoosporicida de los BPP

En las observaciones al microscopio (40X) se evidenció que las dos suspensiones de biosurfactantes redujeron la motilidad y causaron lisis en el total de zoosporas evaluadas del patógeno, en un lapso de tiempo inferior a 5 minutos (039T: 1,5 y 2,8 min; 021V: 2,5 a 5 min); de esta forma se comprobó que el mecanismo de acción de los biosurfactantes sería posiblemente de contacto, que actuaría como un control preventivo de la infección.

La actividad lítica de los BPP producidos por las cepas de *P. fluorescens* 021V y 039T sobre las zoosporas de *P. infestans*, se debe a su composición química que permite una afinidad con la membrana de la zoospora. Por lo cual el biosurfactante se puede intercalar entre la membrana plasmática y generar un desequilibrio en su integridad y permeabilidad, provocando ruptura de la membrana y liberación del contenido citoplasmático (Stanghellini y Miller, 1997; Kim *et al.*, 2000; Martínez y Osorio, 2007).

Sin embargo, aunque es posible que el efecto de los biosurfactantes sobre las zoosporas pueda reducirse por el enquistamiento natural que ocurre en las zoosporas

después de 2 h para la formación de la pared celular, estos productos pueden continuar reduciendo la infección de *P. infestans*, ya que estudios de Kim *et al.* (2000) en *P. capsici*, De Jonghe *et al.* (2005) en *P. cryptogea*, y Martínez y Osorio (2007) en *P. infestans*, han demostrado que los ramnolípidos también tienen efecto inhibitorio sobre otras estructuras con pared celular del patógeno.

Actividad biocontroladora de los BPP y de las cepas de *P. fluorescens* contra *Phytophthora infestans* en foliolo desprendidos de papa

Los resultados encontrados en la evaluación de la severidad de la goma, medida como el porcentaje de área foliar afectada por la enfermedad, mostraron que el testigo químico Manzate® redujo en 95,5% el porcentaje de severidad con respecto al testigo sin protectantes, seguido por el BPP 039T y 021V que controlaron la enfermedad en 79,9% y 78,7%, respectivamente. Las suspensiones bacterianas 039T controló la enfermedad en 72,4% y la suspensión 021V en 66,1% a las 120 horas de evaluación después de que se inoculó *P. infestans*.

Los análisis estadísticos obtenidos mediante Anava mostraron diferencias significativas ($\alpha=0,05$) entre el efecto de cada uno de los tratamientos (protectantes y horas de inoculación del patógeno) sobre la infección *P. infestans*. En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos mediante la diferenciación de medias de Tukey en las diferentes horas de evaluación.

De acuerdo con las observaciones realizadas durante las 120 h de evaluación de los protectantes en condiciones *in vitro*, se determinó que el porcentaje de severidad de la goma en el testigo sin protectantes presentó un crecimiento exponencial, esto debido a que una vez el patógeno penetra el tejido foliar, el proceso de colonización por parte del patógeno avanza en el tiempo. Lo anterior orienta a que los biosurfactantes y/o las suspensiones bacterianas de *P. fluorescens* productoras de biosurfactantes deben estar presentes antes de la llegada del patógeno, para que ejerzan un mecanismo de acción preventivo mediante la reducción de la concentración de inóculo (Jonghe *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2000).

Adicionalmente, se observó que el porcentaje de área afectada de los foliolo tratados con los biosurfactantes y las suspensiones bacterianas durante el periodo, fue menor que el presentado en el testigo sin protectantes (Figura 2); de esta forma se demostró la presencia y la persistencia de los protectantes y su efecto controlador sobre la enfermedad en condiciones *in vitro*, siendo más efectivos dentro de las primeras 24 h de ser inoculado el patógeno. De esta forma se evidenció que es necesario

Tabla 1. Resultados obtenidos en el ensayo de control *in vitro* sobre la infección de *Phytophthora infestans* en foliolos desprendidos de papa.

Tratamiento		Media en % de área foliar afectada			
Protec-tantes	Hora de inocu-lación	Horas de evaluación			
		48	72	96	120
BPP 021V	2	0,0 a	0,0 d	2,3e	5,6 h
BPP 021V	12	0,0 a	0,8 d	3,4 e	8,1 h
BPP 021V	24	0,0 a	2,9 d	8,6 d	19,0 g
BPP 021V	36	0,6 a	4,5 c	31,9 a	44,1 d
BPP 021V	48	0,0 a	2,1 d	13,0 d	28,7 f
BPP 039T	2	0,0 a	0,0 d	1,0 e	4,0 h
BPP 039T	12	0,0 a	1,0 d	2,3 e	7,2 h
BPP 039T	24	0,0 a	1,3 d	11,2 d	16,5 g
BPP 039T	36	0,2 a	2,5 d	11,1 d	26,3 c
BPP 039T	48	0,0 a	1,7 d	5,6 e	18,8 g
SUB 021V	2	0,0 a	1,3 d	12,2 d	53,5 d
SUB 021V	12	0,0 a	1,5 d	9,1 d	17,9 g
SUB 021V	24	0,0 a	1,1 d	8,7 d	16,0 g
SUB 021V	36	2,3 a	7,7 c	33,9 a	44,8 e
SUB 021V	48	2,8 a	8,1 b	24,8 b	56,6 d
SUB 039T	2	0,0 a	0,0 d	5,7 e	22,5 g
SUB 039T	12	0,0 a	1,9 d	8,1 d	18,9 g
SUB 039T	24	0,0 a	1,9 d	7,0 d	15,8 g
SUB 039T	36	2,4 a	5,9 c	37,0 a	51,8 d
SUB 039T	48	2,3 a	6,3 c	11,5 d	27,8 f
Manzate®	2	0,0 a	0,0 d	0,0 e	1,8 h
Manzate®	12	0,0 a	0,3 d	1,6 e	3,8 h
Manzate®	24	0,0 a	0,0 d	0,4 e	1,7 h
Manzate®	36	0,0 a	0,0 d	1,2 e	5,5 h
Manzate®	48	0,0 a	1,9 d	5,3 d	9,9 h
Testigo	2	0,0 a	4,7 d	30,7 a	99,1 a
Testigo	12	0,0 a	16,7 a	15,2 c	81,1 b
Testigo	24	0,0 a	4,7 d	26,8 b	92,4 a
Testigo	36	2,5 a	17,6 a	42,2 a	96,8 a
Testigo	48	1,9 a	3,1 d	24,3 b	95,9 a

Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba significativa de Tukey; ($\alpha = 0,005$; $P < 0,001$).

BPP 021V: Biosurfactante Parcialmente Purificado cepa 021V.

BPP 039T: Biosurfactante Parcialmente Purificado cepa 039T.

SUB 021V: Suspensión bacteriana cepa 021V.

SUB 039T: Suspensión bacteriana cepa 039T.

realizar estudios posteriores en los que se evalúen sustratos para estos productos, para que aumenten su persistencia en el follaje de las plantas.

Durante el periodo de evaluación se observó en los foliolos que presentaron las lesiones, una baja presencia de signos del patógeno, que fueron tratados con los BPP, y de las suspensiones bacterianas, en comparación con el testigo infección. Esto puede ser atribuido a que microorganismos

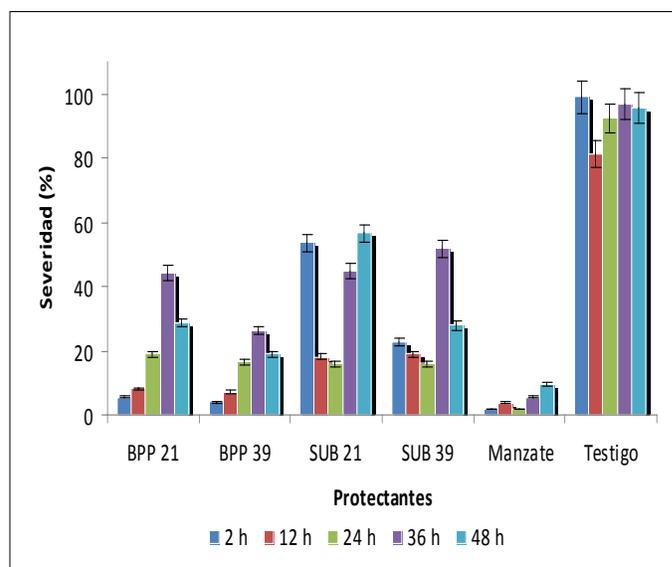


Figura 2. Porcentaje de severidad de la enfermedad a las 120 h de evaluación de los protectantes sobre foliolos desprendidos de papa inoculados con *P. infestans* a las 2, 12, 24, 36 y 48 h después de aplicados.

como las *P. fluorescens* tiene la facultad de reducir otras estructuras reproductivas de *P. infestans*, disminuyendo el porcentaje de área foliar afectada (Kim *et al.*, 2000; De Jonghe *et al.*, 2005; Martínez y Osorio, 2007).

Actividad biocontroladora de los BPP y de las cepas de *P. fluorescens* contra *P. infestans* en plantas de papa en condiciones de casa de malla

El bioensayo en casa de malla se hizo con el objetivo de simular un patosistema similar al natural que existe entre plantas de papa y *P. infestans*; de esta forma se consiguió evaluar el potencial de los BPP y de las suspensiones bacterianas de *P. fluorescens* 021V y 039T, para el control de la gota de la papa en condiciones similares a campo.

Los datos obtenidos mostraron que al igual que los ensayos *in vitro*, el mejor control para la gota de la papa continuó siendo el producto comercial Manzate®, el cual redujo el porcentaje de severidad en las plantas en 90,6%, al octavo día de evaluación. Los BPP 039T y 021V redujeron el porcentaje de área foliar afectada en 64,3% y 59,7%, y las suspensiones bacterianas de *P. fluorescens* 021V y 039T, lo redujeron en 44,7% y 37,5%, respectivamente.

Mediante Anava, los análisis estadísticos de los datos obtenidos en los diferentes tratamientos presentaron diferencias significativas ($\alpha=0,05$) entre los porcentajes de severidad de la gota de cada planta inoculada con el patógeno. Los resultados obtenidos mediante la diferenciación de medias de Tukey, en las diferentes horas de evaluación, se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados obtenidos en el ensayo de control *in vivo* sobre la infección de *Phytophthora infestans* en plantas de papa en condiciones de casa de malla.

Protec- tantes	Días de inocula- ción	Media en % de área foliar afectada			
		Horas de evaluación			
		72	120	168	192
BPP 021V	4	0,3 e	11,6 e	30,2 d	40,2 d
BPP 021V	5	0,3 e	9,1 e	37,6 c	54,6 c
BPP 021V	6	7,5 b	30,7 b	60,4 b	70,6 b
BPP 039T	4	0,3 e	10,6 e	29,4 d	35,6 d
BPP 039T	5	0,5 e	7,8 e	27,9 d	39,3 d
BPP 039T	6	1,8 e	31,4 b	55,9 b	68,8 b
SUB 021V	4	6,7 b	13,4 d	38,5 c	55,2 c
SUB 021V	5	1,8 e	8,4 e	32,8 d	45,9 d
SUB 021V	6	2,3 d	35,8 a	61,8 b	77,9 b
SUB 039T	4	3,1 d	23,9 c	49,4 c	62,5 c
SUB 039T	5	1,3 e	18,2 d	49,1 c	60,2 c
SUB 039T	6	6,4 c	31,5 b	60,7 b	76,7 b
Manzate®	4	0,0 e	0,0 f	6,1 e	9,3 f
Manzate®	5	0,0 e	0,0 f	0,0 e	0,0 f
Manzate®	6	0,0 e	0,40 f	1,2 e	1,5 f
Testigo	4	6,2 b	29,2 b	64,3 b	84,2 a
Testigo	5	12,0 a	40,1 a	75,9 a	96,7 a
Testigo	6	10,8 a	39,6 a	75,2 a	100 a

Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas, de acuerdo con la prueba significativa de Tukey: ($\alpha = 0,005$; $P < 0,001$).
 BPP 021V: Biosurfactante Parcialmente Purificado cepa 021V.
 BPP 039T: Biosurfactante Parcialmente Purificado cepa 039T.
 SUB 021V: Suspensión bacteriana cepa 021V.
 SUB 039T: Suspensión bacteriana cepa 039T.

Los primeros síntomas de la enfermedad se evidenciaron a partir de 72 h después que el patógeno fue inoculado sobre el follaje de las plantas, indicando de esta forma que tanto en laboratorio como en casa de malla el período de incubación del patógeno es aproximadamente de 72 hrs. A partir de las 72 h la enfermedad fue incrementándose hasta cubrir el 100% del área foliar en el testigo sin protectantes. De esta forma se corroboraron los datos obtenidos en el ensayo *in vitro*, en el que se confirma el mecanismo de acción preventiva de los BPP y de las cepas en estudio, al reducir el número de zoosporas y el porcentaje de área foliar afectada.

Tran *et al.* en 2008 demostraron que cepas de *Pseudomonas fluorescens* aisladas de la rizosfera del cultivo de pimentón negro en Vietnam, tienen la capacidad de producir biosurfactante. Este compuesto producido por estas cepas bacterianas tienen actividad zoosporicida sobre *Phytophthora capsici* y disminuyen en condiciones de campo el porcentaje de área radicular afectada. Por otra parte, las cepas de *P. fluorescens*, en ausencia de la enfermedad, tienen la capacidad de promover el crecimiento de tallos por parte de la planta.

De esta forma se confirmó que bacterias pertenecientes a la especie de *Pseudomonas fluorescens* tienen actividad zoosporicida sobre las estructuras reproductivas de microorganismos pertenecientes al género *Phytophthora*, y que además las cepas de *P. fluorescens* 021V y 039T posiblemente tengan la capacidad de inducir el crecimiento vegetativo en algunas especies de plantas.

Al comparar los hallazgos obtenidos en las evaluaciones *in vivo* e *in vitro*, se evidenció que en condiciones naturales del cultivo, los biosurfactantes y/o las cepas no reducen la enfermedad en los mismos porcentajes, posiblemente por estar expuestos a condiciones que no son favorables para su permanencia y que pueden interferir con su mecanismo de acción sobre las zoosporas. Por tanto, es posible que estos factores o que los microorganismos presentes en la superficie de los folíolos puedan desestabilizar la molécula, acelerando la degradación de este compuesto de síntesis orgánica y facilitando el proceso de infección por parte del patógeno.

En la Figura 3 se muestra la severidad (%) de la gota a los ocho (8) días (192 h) de evaluación de los BPP y de las suspensiones bacterianas. El porcentaje de severidad de la gota en las plantas de papa tratadas fue menor que el del testigo, de esta forma se evidenció la presencia y persistencia de los protectantes y su efecto controlador sobre la enfermedad durante este tiempo, aunque no se les haya aplicado algún tipo de coadyuvante que favoreciera la persistencia.

De acuerdo con lo anterior, y luego de realizar improntas de los folíolos de las plantas tratadas con las suspensiones bacterianas de *P. fluorescens* 021V y 039T, se recuperaron las bacterias inoculadas, mostrando así que éstas lograron permanecer y reproducirse sobre el follaje; resultados similares fueron reportados por Stanghellini y Miller (1997) en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, que demuestran que a los siete días de haber sido inoculadas sobre el follaje de plantas de papa, tienen actividad zoosporicida sobre *P. infestans*.

Las suspensiones bacterianas son un método de control promisorio, sin embargo, los estudios realizados aún son exploratorios y, por tanto, es necesario realizar más evaluaciones para identificar su verdadero potencial, tal como lo indicó Tran *et al.*, (2007) con cepas de *P. fluorescens* con capacidad para producir biosurfactantes del tipo lipopéptidos cíclicos (massetolide A), compuestos que son un componente importante en la actividad de estas bacterias.

De acuerdo con la Figura 3, se identificó el BPP 039T como el mejor tratamiento biológico luego de la inoculación del

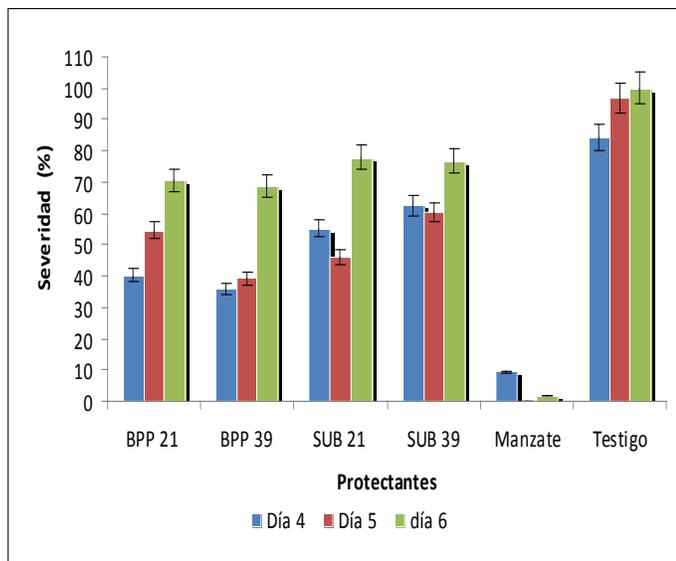


Figura 3. Severidad de la enfermedad a los ocho (8) d (192 h) de evaluación de los protectantes sobre los folíolos desprendidos de papa inoculados con *P. infestans* al 4, 5 y 6 días después de aplicados.

patógeno en el cuarto día después de que el protectante fue asperjado sobre el follaje de la planta, lo que indica que a menor tiempo pase entre la aplicación del biosurfactante y la inoculación del patógeno, mayor será la actividad zoosporicida sobre las estructuras del patógeno.

De esta forma se podría disminuir directamente el porcentaje de germinación de las zoosporas, afectando la dinámica de la población y disminuyendo el número de ciclos que se podrían presentar durante el ciclo de cultivo. Lo que con-

lleva a disminuir el número de aplicaciones de fungicidas para el control de la enfermedad durante el ciclo de cosecha, traducido en costos de cosecha y disminución en el impacto medioambiental generado por el exceso de aplicación de fungicidas para el control de la enfermedad.

La supresión de enfermedades con agentes de biocontrol, como los biosurfactantes y las bacterias productoras de biosurfactantes, se sustenta en las interacciones entre la planta, el patógeno, los biocontroladores y el ambiente (Lozola – Saldaña *et. al.*, 2006). En el anterior estudio se identificó que los BPP y las suspensiones bacterianas de *P. fluorescens* 039T y 021V son una alternativa para reducir el uso de fungicidas químicos para el control de la gota de la papa, en combinación con otras medidas de manejo, como el uso de variedades resistentes y el manejo cultural. Por tal razón, es necesario realizar nuevos estudios en los que se evalúen estos productos en condiciones de campo y acompañados de otros productos que aumenten su persistencia en el ambiente del cultivo, sin alterar su potencial biocontrolador.

CONCLUSIONES

En este estudio se demostró que los biosurfactantes parcialmente purificados y las cepas de *Pseudomonas fluorescens* 021V y 039T tienen la capacidad de disminuir el porcentaje de la infección de *P. infestans* en condiciones controladas. Adicionalmente, estos productos, en combinación con otras estrategias de manejo, pueden ser potenciales biocontroladores de la gota de la papa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology*. Department of Plant Pathology. University of Florida. Fifty Edition. Elsevier: 66–75.
- Arcos, M.; Ossa, F.; Díaz, T. (2004). *Criopreservación de aislados nativos de la bacteria ruminal Fibrobacter succinogenes*. Revista Corpoica. 5(1): 60–63.
- Barragán, N. (2004). *Selección y evaluación de cepas productoras de biosurfactantes para el control potencial de Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary. Tesis de pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Industrial. Bogotá, Colombia. 103 p.
- De Jonghe, K.; De Dobbelaere, I.; Sarrazyn, R.; Höfte, M. (2005). *Control of Phytophthora cryptogea in the Hydroponic Forcing of Witloof Chicory with the Rhamnolipid-based Biosurfactant Formulation PRO1*. Plant Pathology. 54: 219–226.
- Desai, J.; Banat, I. (1997). *Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential*. Microbiol Mol Biol Rev. 61(1): 47–64.
- De Souza, J.; De Boer, M.; Waard, P.; Beek, T.; Raaijmakers, J. (2003). *Biochemical, Genetic, and Zooporal Properties of Cyclic Lipopéptido Surfactant Produced by Pseudomonas fluorescens*. Applied and Environmental Microbiology. 69(12): 7161- 7172.
- De Souza, J. (2002). *Distribution, Diversity, and Activity of Antibiotic – Production of Pseudomas spp. Tesis doctoral*. Wageningen University. Netherlands. 161 p.
- Déziel, E.; Villemur, R.; Llépine, F.; Bisaillon, J. (1996). *Biosurfactante Production a soil Pseudomonas Strain Growing on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. Centre de Recherche en Microbiologie Appliquée, Université du Québec, Canada. Applied and Environmental Microbiology: 1908-1912.
- EPA US. Environmental Protection Agency. 2009. *Prevention Division Office of Pesticide*. Rhamnolipid Biosurfactant (PC Code 110029). Programs Biopesticides and Pollution. Federal Register: 68 (90).
- Ho, W.; Ko, H. (1996). *A Simple Method for Obtaining Single-spore Isolates of Fungi*. Bot. Bull. Acad. Sin. 38: 41- 44.
- Kim, B.; Lee, J.; Hwang, B. (2000). *In Vivo and In Vitro Antifungal Activity of Rhamnolipid B, a Glycolipid Antibiotic Against Phytophthora capsici and Colletotrichum orbiculare*. Pest Management Science. 56: 1029-1035.
- Lozoya Saldaña, H.; Coyote, M.; Ferrera, R.; Lara, E. (2006). *Antagonismo microbiano contra Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. Agrociencia. 40 (4): 491- 499.
- Maldonado, L.; Delgado, M.; García, C. (2002). *Estudio de la estructura genética de las poblaciones de Phytophthora infestans en las regiones productoras de papa en Colombia*. Universidad de Nacional de Colombia. 16 p.
- Martínez, E. (2006). *Estudios preliminares para la producción de un biosurfactante para el control de la gota (Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary) de la papa. Tesis de postgrado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Maestría en Microbiología. Bogotá, Colombia. 103 p.
- Martínez, E.; Osorio, J. (2007). *Estudios preliminares para la producción de un biosurfactante bacteriano activo contra Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary. Revista Corpoica. 8 (2): 5-16.
- Rivera, F. (2008). *Respuesta de la gota de la papa (Phytophthora infestans* (Mont) de Bary), a la aplicación de biosurfactantes producidos por *Pseudomonas fluorescens*. Tesis de pregrado. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales. Facultad de Agronomía. Bogotá, Colombia. 79 p.
- Robayo, G. (2000). *Papas colombianas*. Ventana al campo andino. Fedepapa. 3 (1 y 2) 56: 119-126.
- Schaad, N.; Jones, J.; Chun, W. (2001). *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Th. Edition. APS Press. St. Paul, Minnesota. USA.
- Stanghellini, M.; Miller, R. (1997). *Biosurfactants: Their Identity and Potential Efficacy in the Biological Control of Zoosporic Plant Pathogens*. Phytopathology 81 (1): 1-12.
- Torres, J.; Sánchez, J. (2001). *Producción de un biosurfactante microbiano por Torulopsis magnoliae en cultivos sumergidos por carga*. Ciencia. 9(3): 305 -312.
- Tuelva, B.; Ivanov, G.; Christova, N. (2002). *Biosurfactant Production by a New Pseudomonas putida Strain*. Z. Naturforsch. 57: 356–360.
- Tran, H.; Ficke, A.; Asiimwe, T.; Hofte, M.; Raaijmakers, J. (2007). *Role of the Cyclic Lipopeptide Massetolide a in Biological Control of Phytophthora infestans and in Colonization of Tomato Plants by Pseudomonas fluorescens*. Laboratory of Phytopathology. Ghent University. New Phytologist: 731–742.
- Tran, H.; Kruijt, M.; Raaijmakers, J. (2008). *Diversity and Activity of Biosurfactant-Producing Pseudomonas in the Rhizosphere of Black Pepper in Vietnam*. Journal of Applied Microbiology. 104 (3): 839–851.
- Turkovskaya, O.; Dmitrieva, T.; Muratova, A. (1999). *A Biosurfactant – Producing Pseudomonas aeruginosa Strain*. Institute of Biochemistry and Physiology of Plant and Microorganisms. Russia Academy of Sciences. Vol. 37: 71-75.