Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria (2007) 8(2), 5-16

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Estudios preliminares para la producción de un biosurfactante bacteriano activo contra *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary

Erika Patricia Martínez[1] y
Jairo Antonio Osorio[2]

ABSTRACT

Preliminary studies for the production of an active biosurfactant against *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary

A main cause of losses in potato cultivation in Colombia is the attack of late blight (*Phytophthora infestans*). Frequent fungicide applications are required for its control which contaminates soil and water, increase production costs and favors the development of pathogen resistant biotypes. An alternative control method was evaluated using a bacterial metabolite which lyses the zoospores and delays plant colonization by *P. infestans*. For this purpose the production of bacterial biosurfactants and their biological effectiveness on zoospores of *P. infestans* was studied. Two *Pseudomonas fluorescens* strains (021V and 039T) were selected and identified according to their lytic ability and metabolite production by fermentation. Using colorimetry, it was found that the biosurfactant obtained was a rhamnolípid type glycolipid. For biosurfactant production, three culture media were evaluated, being the medium with minimum salt at 2% glycerol and incubated at 30 °C the most adequate for production. Bioassays assessment of the bacterial supernatants effect on pathogen colonization and its persistence in potato leaflets showed that the supernatant produced by the strain 021V decreased disease development by 60%. Finally, no inhibitory effect of the metabolite over other fungi and bacteria was found.

Key words: biosurfactant, late blight, lyses, zoospores, potato, *Pseudomonas fluorescens*.

RESUMEN

Una de las causas principales de pérdidas en el cultivo de la papa en Colombia es la Gota (*Phytophthora infestans*); para su control se requieren aplicaciones frecuentes de fungicidas que contaminan suelo y aguas, favorecen la aparición de biotipos tolerantes del patógeno e incrementan los costos de producción. El presente estudio evaluó una alternativa para combatir el patógeno con el uso de metabolitos bacterianos que causan lisis de las zoosporas y retrasan la colonización de la planta por *P. infestans*. A tal fin se estudió la producción de biosurfactantes bacterianos y su efectividad biológica sobre zoosporas de *P. infestans*; para ello se seleccionaron e identificaron dos cepas de *Pseudomonas fluorescens* (021V y 039T) según su capacidad lítica y la producción del metabolito por fermentación. Mediante colorimetría se encontró que el biosurfactante obtenido es un glicolípido tipo ramnolípido. Para estimar la producción del metabolito se evaluaron tres medios de cultivo y se determinó que el medio mínimo de sales con glicerol al 2% incubado a 30°C fue el que brindó las mejores condiciones para la producción del biosurfactante bacterial. Los bioensayos para la determinar el efecto de los sobrenadantes bacterianos sobre la colonización del patógeno y su persistencia en foliolos de papa, mostraron que el sobrenadante producido por la cepa 021V redujo en 60% la enfermedad. Finalmente, no se encontró un efecto inhibitorio del metabolito sobre otros hongos y bacterias.

Palabras clave: biosurfactante, Gota, lisis, zoosporas, papa, *Pseudomonas fluorescens*.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de la papa constituye una de las actividades agrícolas de mayor importancia para las economías empresarial, familiar y campesina de las zonas altas y frías de la región andina en Colombia. La especie *Solanum tuberosum* spp. *andigena* ocupa el primer lugar dentro de las explotaciones de clima frío, tanto por la superficie cultivada (152.936 ha en 2005), como por la cantidad de mano de obra que emplea, no sólo en los procesos de producción, sino también en la comercialización del tubérculo (Cevipapa, 2004; Agrocadenas, 2006).

La Gota o Tizón tardío es causada por el oomiceto *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary; constituye la principal enfermedad que afecta el cultivo de la papa en Colombia y la mayor causa del uso de agroquímicos (Agrocadenas, 2006). Su incidencia se acentúa en aquellas áreas con épocas de alta humedad relativa y temperaturas bajas, ocasionando la muerte de hojas, tallo y tubérculos de la planta (Agrios, 2002). En nuestras condiciones ambientales el ciclo de la enfermedad es muy corto (menos de 5 días); cada lesión de gota puede producir hasta 300.000 esporangios por día, los cuales emergen al exterior a través de los estomas (Vega, 2004).

El patógeno *P. infestans* pertenece al reino Chromista (grupo Stamenophyle) y a la clase Oomycete; los microorganismos pertenecientes a este grupo se caracterizan porque la pared celular tiene celulosa, son diploides, el micelio no tiene septas y son bisexuales; en efecto, su reproducción puede ser sexual (heterotálicos) y asexual (homotálicos) (Ristaino y Johnston, 1999; Torres, 2002).

La reproducción sexual de *P. infestans* requiere la unión de dos grupos de apareamiento -A1 y A2-; ésta es oogámica con un gameto femenino (oogonio) relativamente grande, con forma de huevo no flagelado, que es fecundado por el gameto masculino (anteridio) que es notablemente más pequeño y flagelado (Abad y Abad, 1997); este tipo de reproducción no se ha detectado en Colombia. El producto de la reproducción sexual es un zigoto con paredes gruesas (la oospora, que le da el nombre al Phyllum Oomycota), que puede entrar en estado de latencia a fin de tolerar condiciones de estrés que no son favorables para la germinación como la sequía, las bajas temperaturas y la ausencia de huéspedes (Agrios, 2002).

Recibido: noviembre 22 de 2007
Aceptado: diciembre 7 de 2007

1. Investigadora master asistente, Laboratorio de Fitopatología, Grupo de Manejo Integrado de Plagas, Centro de Investigación Tibaitatá, Mosquera (Cundinamarca), CORPOICA.
e-mail: emartinezl@corpoica.org.co
2. Investigador principal, Laboratorio de Fitopatología, Grupo de Manejo Integrado de Plagas, Centro de Investigación Tibaitatá, Mosquera (Cundinamarca), CORPOICA.
e-mail: josorio@corpoica.org.co

© 2007 Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria

La reproducción sexual de *P. infestans* ha dado origen a diferentes teorías sobre la migración mundial del patógeno y estuvo implicada en la gran devastación del cultivo y la hambruna de 1840 en Irlanda, que dejó más de un millón de muertes y generó la migración de más de 1,5 millones de personas a diferentes partes del mundo, particularmente a los Estados Unidos (Ristaino y Johnston, 1999; Alexopoulos *et al.*, 1996).

La reproducción asexual ocurre por medio de un zoosporangio que, bajo condiciones ambientales de temperatura entre 12 y 15ºC y humedad relativa de 95 al 100%, liberan zoosporas móviles cuyos flagelos son característicos y distintivos de la especie (Torres, 2002). A temperaturas superiores a 15°C el esporangio es capaz de germinar directamente produciendo un tubo germinativo que penetra la epidermis de las hojas y tallos (no requieren estomas) (Agrios, 2002; Deacon, 2004) (Figura 1).

Cuando los esporangios de *P. infestans* germinan a temperaturas entre 12 a 15°C producen de tres a ocho zoosporas móviles a causa del fraccionamiento del citoplasma multinucleado en células uninucleadas carentes de pared celular. Después de aproximadamente una hora de movilidad, las zoosporas se enquistan, pierden los flagelos, desarrollan una pared celular y germinan emitiendo el tubo germinativo (Deacon, 2004).

Para controlar la enfermedad en los cultivos de papa los agricultores colombianos realizan aplicaciones calendario con fungicidas protectantes (Mancozeb®) y/o sistémicos (Metalaxyl®) de manera intensiva, alcanzando en promedio 15 aplicaciones por ciclo de cultivo (Vega, 2004). No obstante, se han obtenido resultados poco satisfactorios en el control de la enfermedad y, por el contrario, ha aumentado el riesgo de contaminación del suelo y las aguas, los amenazas sobre la salud humana y otros seres vivos, los costos de producción y, posiblemente, la aparición de biotipos del patógeno tolerantes a estos fungicidas. El fenómeno de resistencia de *P. infestans* a los fungicidas fue detectado a principios de los años 80 en diferentes países de Europa y a comienzos de los años 90 en USA, Canadá, Ecuador y México (Riveros *et al.*, 2003; Nærstad *et al.*,2007).

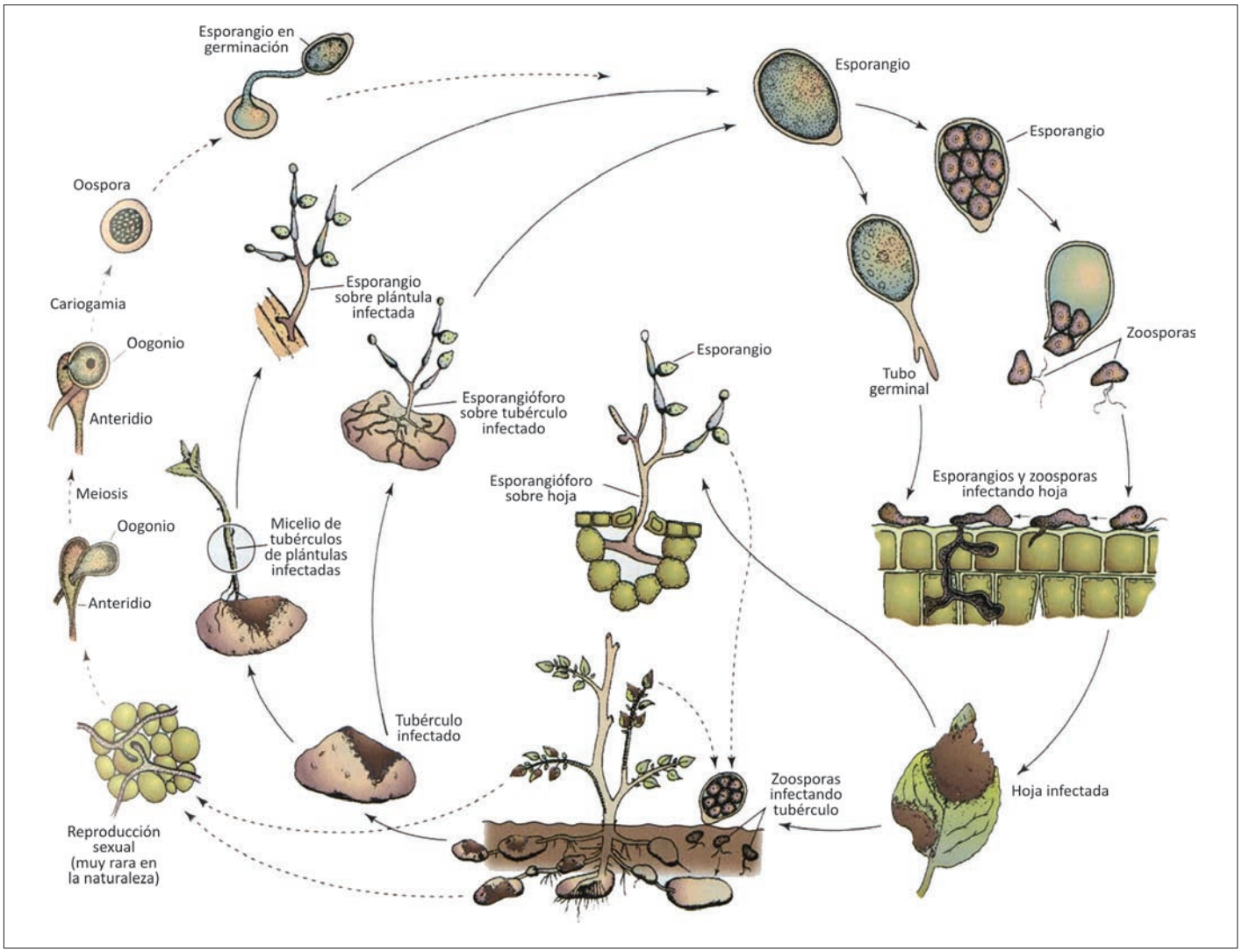

Figura 1. Ciclo de la Gota o Tizón tardío por *Phytophtora infestans* en la planta de papa. (Tomado y modificado de Agrios, 2005).

Al igual que en otros países, la investigación en Colombia busca estrategias para controlar la enfermedad mediante la aplicación de medidas culturales, obtención de variedades resistentes a la enfermedad e inducción de resistencia sistémica a través de métodos biológicos y químicos; sin embargo, los resultados son de carácter preliminar y aún no se ha logrado superar el uso del control químico (Barragán, 2004; Vega, 2004). Así, prevalece la necesidad de explorar nuevas opciones que permitan un control más eficaz de la enfermedad, a partir de un entendimiento claro del ciclo de vida del patógeno y sus estadios más vulnerables a la acción de ciertos productos, buscando interferir con el desarrollo de la enfermedad en sus orígenes sin afectar el medio ambiente.

Una de las alternativas de control se enfoca en el uso de compuestos tensoactivos biológicos conocidos como 'biosurfactantes' (Stanghellini y Miller, 1997; Nielsen *et al*., 2002 y Tran *et al.* 2007) que son productos del metabolismo secundario de algunos microorganismos (*Pseudomonas, Bacillus, Nocardia,* etc.); éstos tienen la capacidad de reducir la tensión superficial del agua, mejoran la emulsión de diferentes compuestos inmiscibles con ella y modifican la superficie de contacto entre líquidos o entre un líquido y una superficie.

Estructuralmente los biosurfactantes pueden ser de bajo peso molecular (glicolípidos y lipopéptidos) o de alto peso molecular (compuestos de polisacáridos, proteínas y una compleja mezcla de biopolímeros). Estos metabolitos también disminuyen la tensión superficial de la membrana celular de células eucarióticas y zoosporas de oomycetes, lo que ocasiona lisis de la célula; tal reacción se debe a la capacidad que tienen los surfactantes de intercalarse entre los componentes estructurales de la membrana plasmática de las zoosporas, característica que puede ser efectiva para el control de esta clase de patógenos (Lang y Wullbrandt, 1999; Kim, Lee y Hwang, 2000). Una ventaja para el uso de biosurfactantes como fungicidas, es que no exhiben impactos negativos en el medio ambiente, son de baja toxicidad para otros seres vivos y se pueden obtener por procesos de fermentación (EPA, 2003).

Investigaciones realizadas por Stanghellini y Miller (1997) informan sobre la eficacia de los biosurfactantes producidos por *P. aeruginosa* para el control biológico de patógenos zoospóricos de plantas; así mismo, Souza *et al.* (2003) describieron la propiedades bioquímicas, genéticas y zoosporicidas de algunos biosurfactantes lipopéptidos cíclicos producidos por *P. fluorescens*.

La presente investigación se enfocó en el estudio de la producción de biosurfactantes a nivel de laboratorio a partir de dos cepas de *Pseudomonas fluorescens*, así como en el reconocimiento del grupo químico al cual pertenecen dichos metabolitos y en la evaluación de su efecto sobre la infección de *P. infestans* en plantas de papa variedad Diacol Capiro; ello con el propósito de encontrar una alternativa eficaz para la prevención de la Gota de la papa que pueda convertirse en un producto disponible en el mercado para uso por parte de los productores de papa y otras solanáceas.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación tuvo lugar en los laboratorios de Fitopatología del Programa de Manejo Integrado de Plagas de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria –Corpoica–, en el Centro de Investigación Tibaitatá ubicado en el municipio de Mosquera (Cundinamarca) a N 4° 42', W 74° 12' y 2543 m.s.n.m. de altitud. Se llevó a cabo en cuatro fases, a saber: 1) Recuperación y evaluación de bacterias con potencial biosurfactante, 2) evaluación del comportamiento de la biomasa, el sustrato y el producto de la fermentación, 3) estimación del efecto inhibitorio de sobrenadantes de *P. fluorescens* sobre la infección por *P. infestans* en folíolos desprendidos de papa, y 4) evaluación del efecto de sobrenadantes de cepas bacterianas sobre otros micoorganismos.

Recuperación y evaluación de bacterias con potencial biosurfactante

En esta fase se llevaron a cabo las actividades de selección y reactivación de cepas bacterianas con actividad biosurfactante, evaluación de la capacidad emulsificante, estimación de la actividad zoosporicida contra *P. infestans*, identificación bioquímica de las cepas seleccionadas y, finalmente, identificación y cuantificación del biosurfactante obtenido.

Selección y reactivación de cepas bacterianas con actividad biosurfactante. Con el fin de confirmar los resultados obtenidos en estudios previos en los que se seleccionaron y evaluaron bacterias productoras de biosurfactantes, se reactivaron aislamientos bacterianos conservados en glicerol (20%) obtenidos a partir de muestras de suelo y material vegetal de cultivos de papa procedentes de varias zonas productoras de los departamentos de Cundinamarca y Boyacá.

Para realizar la selección inicial de bacterias productoras de biosurfactantes, los aislamientos se sembraron en tres medios de cultivo diferentes para su identificación presuntiva. El primer medio fue el agar con 5% de sangre de cordero en incubación por 48 h a 30°C el cual permite observar la formación de halos de hemólisis provocada por la disminución de la tensión superficial y el rompimiento de la membrana de los hematíes del medio a causa de los biosurfactantes secretados (Tuleva *et al*., 2002).

El segundo medio de selección de bacterias productoras de biosurfactantes fue el agar Siegmund y Wagner (SW, 1991) constituido por una base mínima de sales ($NaNO_3$, 1 g·L^{-1}; KH_2PO_4, 0,1 g·L^{-1}; $MgSO_4.7H_2O$, 0,1 g·L^{-1}; $CaCl_2$, 0,1 g·L^{-1}, extracto de levadura, 0,2 g·L^{-1}; pH 6,5) con glicerol al 2% (Deziel *et al*., 1996), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) 0,2 g·L^{-1} y azul de metileno 0,005 g·L^{-1} (Siegmund y Wagner, 1991); la presencia de biosurfactantes se constató por la presencia de un halo azul alrededor de las colonias después de 48 h de incubación a 30°C.

Finalmente se evaluó el agar Tween 80® para observar la producción de enzimas lipasas mediante la formación de un halo blanco de precipitación de cristales de calcio que indican la degradación de los lípidos del medio para la síntesis de ácidos grasos que conforman la molécula del biosurfactante (Slifkin, 2000).

Evaluación de la capacidad emulsificante. Debido a la propiedad que tienen los biosurfactantes de emulsificar líquidos inmiscibles en agua, se evaluó la capacidad emulsificante de los sobrenadantes de los cultivos bacterianos de acuerdo con la metodología descrita por Tuleva *et al*. (2002) mediante centrifugación durante

20 min a 8.000 *g*, después de remover la biomasa de fermentación a las 96 h de incubación a 30°C y 100 rpm en el caldo del medio mínimo de sales (MMS) con glicerol al 2%.

Para estas evaluaciones se escogió aceite mineral y kerosén como testigos por su propiedad de no ser solubles en el agua. En un tubo de ensayo se adicionaron 0,5 mL de sobrenadante del caldo obtenido en la centrifugación, 0,5 mL de aceite mineral o kerosén y 4 mL de agua destilada; cada tubo se agitó en vortex por 1 min y luego de un período de reposo (1 hora para el aceite mineral y 24 h para el kerosén) se realizó la lectura midiendo la altura del anillo de emulsificación presente en cada tubo; estas medidas se compararon con la altura del anillo formado por el control positivo (tensoactivo químico comercial Tween 20®, 200 $mg \cdot mL^{-1}$), para obtener los resultados como porcentaje de emulsificación. Adicionalmente se estimó la calidad de la emulsificación al observar si se desestabilizaba el anillo formado al agitar fuertemente los tubos.

Estimación de la actividad zoosporicida sobre P. infestans. Las bacterias que presentaron el mayor halo de emulsificación al usar el sobrenadante del caldo de cultivo obtenido en el ensayo anterior se seleccionaron para evaluar la habilidad de causar lisis en zoosporas de *P. infestans*. Éstas se obtuvieron a partir de una suspensión de 1 x 10^4 esporangios/mL^{-1} provenientes de un cultivo del oomiceto de 10 días de edad en agar V8, sometida a choque térmico (5°C) por una hora y media para inducir la formación y liberación de zoosporas (Souza, 2002).

En uno de los pozos cóncavos de una placa de vidrio se adicionaron volúmenes iguales de suspensión de zoosporas y sobrenadante (10 µL) y se observaron durante 5 minutos los cambios en la movilidad y en la morfología del total de las zoosporas en microscopio (40x), hasta su lisis en todos los campos observados.

Identificación bioquímica de las cepas seleccionadas. A fin de caracterizar el género y la especie de las bacterias que presentaron la mejor capacidad lítica (inferior a 5 minutos) sobre zoosporas de *P. infestans*, se utilizó una batería bioquímica convencional para bacterias Gram negativas no fermentadoras en la que se incluyeron análisis de óxido-fermentación de azúcares y utilización de aminoácidos y oxidasa, entre otras pruebas (Sánchez, 1994; Koneman, 1990).

Identificación y cuantificación del biosurfactante. Para identificar el grupo químico (glicolípido o lipopéptido) y para cuantificar la producción del biosurfactante presente en los sobrenadantes del caldo cultivo de las cepas seleccionadas se realizó separación mediante el uso de solventes orgánicos. A tal fin se probaron tres compuestos reportados en la literatura para biosurfactantes: 1) cloroformo - metanol (2:1 v/v) (Abbas, Fatemeh y Mazaheri, 2004); 2) 1 mL de éter dietílico para 0,333 mL de sobrenadante por duplicado (Tuleva *et al*. 2002); 3) 5 mL de acetato de etilo (con 1% de ácido fórmico) para 3 mL de sobrenadante (Nielsen *et al*., 2002).

A los productos obtenidos en la fase orgánica de la separación se les aplicaron diferentes técnicas colorimétricas para determinar la presencia de azúcares (ramnolípidos) o de péptidos en el caso de un biosurfactante de tipo lipopéptido.

Las técnicas colorimétricas escogidas para comprobar la presencia y cantidad de azúcares que conforman la molécula del glicolípido fueron la de orcinol (Tuleva *et al*. 2002; Deziel *et al.* 2000) y la de antrona - ácido sulfúrico (Laurentin y Edwars, 2003). Estas técnicas se calibraron con diferentes concentraciones de una solución de L-ramnosa, debido a que se ha reportado que este tipo de microorganismos producen biosurfactantes ramnolípidos (constituidos por una o dos moléculas de ramnosa unidas con uno o dos ácidos grasos).

Para determinar la presencia de los péptidos que conforman la molécula de los biosurfactantes del tipo lipopéptidos cíclicos, se utilizaron las técnicas Bradford y Biuret que permiten cuantificar, respectivamente, proteínas y enlaces peptídicos, las cuales se calibraron con albúmina sérica bovina (Sapan *et. al*., 1999).

Usando las curvas de calibración obtenidas con las mediciones de absorbancia de cada una de las concentraciones preparadas de la solución estándar de calibración (L- ramnosa y albúmina sérica bovina), se obtuvieron las ecuaciones de las rectas que permitieron determinar la concentración de los surfactantes (glicolípidos y/o lipopétidos) en los sobrenadantes parcialmente purificados producidos por las cepas bacterianas evaluadas.

Evaluación del comportamiento de la biomasa, el sustrato y el producto de la fermentación

Con el propósito de optimizar el proceso de producción del biosurfactante se evaluó el comportamiento del sustrato, el producto y el crecimiento celular en el proceso de la fermentación de las dos cepas de *Pseudomonas fluorescens* seleccionadas. Para ello se estableció un experimento con diseño completamente al azar (DCA), arreglo factorial 2*3*2 y tres repeticiones, por medio del cual se evaluaron dos temperaturas (25 y 30°C), tres medios de cultivo con glicerol (medio 1: MMS con glicerol al 2%, medio 2: MMS con glicerol al 1% y medio 3: medio de producción –MP– con glicerol al 1%) (Rosero *et al*., 2003) y las dos cepas bacterianas seleccionadas (*P. fluorescens* 021V y 039T).

Las concentraciones de glicerol, ramnosa y biomasa se midieron cada 24 h durante cinco días. La concentración de glicerol (sustrato expresado en $g \cdot L^{-1}$) consumido para el crecimiento de las bacterias se cuantificó mediante el método de peryodato - acetilacetona (Gorovits y Yarden, 2003).

La concentración de ramnosa (producto expresado en equivalentes de ramnosa [ER] o $mg \cdot mL^{-1}$) se midió después extraer el producto con éter dietílico a partir del sobrenadante del caldo de cultivo previamente acidificado a pH 2 con HCl. El extracto obtenido (biosurfactante parcialmente purificado, BPP) se dejó evaporar y se reconstituyó con 0,5 mL de agua destilada.

De la solución reconstituida se extrajo una alícuota de 0,2 mL a la que se le adicionaron 1,8 mL de una solución de orcinol al 19% en H_2SO_4 al 53% y se llevó a calentamiento por 20 min a 80 ºC; después de dejar enfriar por 15 min se leyó la absorbancia a λ= 421 nm. Para obtener

la concentración de ramnolípido presente se utilizó la ecuación de la recta obtenida previamente en la curva de calibración con L- ramnosa.

La concentración de biomasa ($g \cdot L^{-1}$) de las bacterias del ensayo se determinó midiendo la absorbancia del caldo de cultivo a λ= 600 nm y se transformó con la ecuación de absorbancia en función de la concentración realizada a partir de los caldos bacterianos crecidos con cada uno de los tres medios evaluados, después de 120 h de incubación bajo las mismas condiciones del ensayo.

Con los datos obtenidos de las concentraciones de glicerol, ramnosa y biomasa de las cepas bacterianas se realizó un análisis de varianza mediante el paquete estadístico SAS® versión 9.0 y las medias de los tratamientos se clasificaron mediante la prueba de Tukey (α= 0,05) con el objeto de identificar las mejores condiciones de producción de los biosurfactantes por las bacterias seleccionadas.

Por otra parte, paralelamente a las evaluaciones anteriores, se realizaron pruebas de emulsificación y lisis de zoosporas con las muestras de sobrenadantes obtenidas en las diferentes horas de muestreo, con el propósito de correlacionar estos resultados con los datos de producción obtenidos en la evaluación de la fermentación.

Estimación del efecto inhibitorio de sobrenadantes de *P. fluorescens* sobre la infección por *P. infestans* en folíolos desprendidos de papa

La habilidad de los sobrenadantes para prevenir la infección de Gota en la planta de papa se estimó *in vitro* sobre foliolos desprendidos de plantas de papa. Para ello se realizó un DCA con arreglo factorial 4*5 consistente en cuatro tratamientos (dos sobrenadantes, un protectante químico [Mancozeb 80%® y Manzate 200®] y uno con agua como testigo absoluto) diseñados para identificar cuál de ellos confiere mayor protección frente a *P. infestans* y cinco tiempos de aplicación de los tratamientos (2, 12, 24, 36 y 48 h) antes de la inoculación del patógeno a fin de evaluar su persistencia sobre los folíolos.

En cada caja de Petri se colocaron dos folíolos sobre papel filtro humedecido con 1 mL de agua estéril, para proporcionar una humedad relativa superior a 90%; además se asperjaron homogéneamente por las dos caras con los sobrenadantes, con el fungicida y con el agua destilada estéril. Después de 2, 12, 24, 36 y 48 h se procedió a la inoculación de los folíolos aplicando 0,03 mL de una suspensión de esporangios (1×10^4 esporangios$\cdot mL^{-1}$) de *P. infestans* sobre el haz de folíolos sanos desinfectados con NaOCl al 1%, provenientes del tercio medio de las plantas de papa cultivadas en casa de malla (*S. tuberosum* ssp. *andigena*) variedad Diacol-Capiro, de 6 a 8 semanas de edad. Los folíolos recién inoculados se incubaron a 12°C durante 12 h (Vega, 2004) y luego por cinco días a temperatura ambiente (18 ± 2°C); durante toda la incubación se mantuvo alta humedad relativa (100%).

En cada folíolo se midió el tiempo transcurrido entre la inoculación y la aparición de la sintomatología de Gota, además de la severidad (como porcentaje del área afectada). Para la evaluación de la severidad a los cinco días después de realizada la inoculación se midió el área de las lesiones (cm^2) y el área de cada folíolo (cm^2). Este ensayo se repitió dos veces utilizando los mismos parámetros de montaje para confrontar los resultados obtenidos al quinto día.

En un tercer ensayo adicional con las mismas condiciones se realizaron lecturas diarias para analizar los resultados día por día durante los cinco días de la evaluación. El análisis estadístico de los datos obtenidos en este ensayo se realizó por medio del paquete estadístico SAS® versión 9.0. Inicialmente los resultados de porcentaje de área foliar afectada se transformaron por arcoseno para normalizar los datos, y luego se les realizó el análisis de varianza; las medias de los tratamientos se clasificaron mediante la prueba de Tukey (α= 0,05) para identificar el mejor tratamiento utilizado y en cuáles horas previas a la inoculación presentaba mayor efectividad. Los datos obtenidos se analizaron por medio de una prueba de GLM y se realizó un análisis de varianza y una comparación de medias por la prueba de Tukey (α= 0,05) para evaluar los mismos parámetros de los dos ensayos anteriores y el comportamiento de la enfermedad en los folíolos inoculados con el patógeno que presentaban lesiones de Gota.

Evaluación del efecto de sobrenadantes de cepas bacterianas sobre otros microorganismos

Para determinar la actividad antibiótica y antifúngica de los biosurfactantes se realizaron evaluaciones de los sobrenadantes de los caldos de cultivo de las cepas seleccionadas sobre el crecimiento de otros microorganismos en medios de cultivo sólidos a fin de estimar su susceptibilidad.

Determinación de la actividad antibiótica de los sobrenadantes obtenidos de la fermentación sobre otras bacterias. Se realizó un ensayo con el fin de evaluar la capacidad inhibitoria de los biosurfactantes producidos por las dos cepas de *Pseudomonas* sobre el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas en medio Mueller-Hinton. La evaluación se realizó sobre las bacterias *Eschericia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 28923 y *Proteus mirabilis*, especies que se escogieron por presentar características químicas y físicas comúnmente encontradas en las bacterias aeróbicas.

Se desarrolló un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2*5*2 (dos sobrenadantes de las dos cepas seleccionadas, cinco cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas y dos métodos de difusión en agar) para conocer su sensibilidad frente a los biosurfactantes. En el primer método se utilizaron discos de papel filtro de 5 mm de diámetro impregnados con los sobrenadantes concentrados con $ZnCl_2$ 75 mM, según la metodología descrita por Tuleva *et al.* (2002); en el segundo método se difundieron los sobrenadantes filtrados con membrana Millipore de 0,22 μm (0,5 mL) en dos pozos de 1 cm de diámetro abiertos en el agar con sacabocados. Se realizó una siembra masiva sobre toda la placa de agar con un escobillón estéril impregnado con una solución de las bacterias en caldo nutritivo equivalente a la escala 0,5 de Mac Farland.

La lectura de la prueba se realizó a las 48 horas de incubación de los microorganismos a las temperaturas requeridas por cada especie bacteriana; se registró la presencia o ausencia de un halo de inhibición del crecimiento de las bacterias alrededor de los discos de papel filtro o de los pozos

de difusión de los sobrenadantes y se midió la zona de inhibición.

Determinación de la actividad antifúngica de los sobrenadantes obtenidos de la fermentación sobre hongos y oomicetos. Se realizó un ensayo de antagonismo con filtrados de los sobrenantes bacterianos de las cepas mencionadas de *Pseudomonas* sobre otras especies de hongos para conocer si presentaban actividad antifúngica. Los hongos utilizados fueron *Trichoderma harzianum* (Tricho-D®, Orius Biotecnología), dos cepas de *Colletotrichum* sp., además de micelios y esporangios del oomiceto causante de la gota de la papa *Phytophtora infestans.*

Los hongos se cultivaron en medio PDA a 25°C y el oomiceto en agar V8 a 20°C; la inoculación sobre el medio se realizó con discos de agar de 5 mm de diámetro con colonias de los microorganismos de 10 días de edad.

Como diseño experimental se utilizó un DCA con arreglo factorial aumentado 2*4*2 + 4 con un total de 20 tratamientos que incluyeron dos sobrenadantes, cuatro cepas de hongos y dos métodos de difusión de los sobrenadantes (directamente sobre el agar y desde pozos de 1 cm); los cuatro tratamientos restantes (+4) correspondieron a las cuatro cepas control (3 hongos y 1 oomiceto) que se desarrollaron en condiciones normales de crecimiento en cada medio y que sirvieron como referencia de tamaño para ser comparada con los otros tratamientos. La variable medida fue el crecimiento radial en centímetros de la colonia en agar. El análisis estadístico para estos ensayos se realizó por medio del paquete estadístico SAS® v. 9.0 mediante el uso de un análisis de varianza y una prueba de comparación múltiple de Tukey (α= 0,05).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Recuperación y evaluación de bacterias con potencial biosurfactante

Se reactivaron 128 aislamientos conservados en glicerol al 20% a los que se les realizaron pruebas de selección en búsqueda de bacterias productoras de biosurfactantes. Según las características morfológicas halladas, 45% correspondieron a bacilos Gram positivos, 23% a bacilos Gram positivos esporulados y 32% a bacilos Gram negativos.

En la selección primaria de bacterias productoras de biosurfactantes sobre el agar sangre de cordero al 5% se obtuvieron 104 (82%) bacterias que produjeron halo de hemólisis. El diámetro del halo constituyó un criterio de orientación hacia los posibles resultados en los siguientes ensayos de evaluación de actividad del biosurfactante: a mayor diámetro, mayor cantidad de surfactante producido. El porcentaje de bacterias restante (14%) no presentó halo de hemólisis y, por consiguiente, no se utilizaron para las siguientes evaluaciones.

En el medio Siegmund y Wagner (SW) se sembraron los aislamientos bacterianos que presentaron zona de hemólisis en el ensayo anterior; los resultados señalaron que el 88% no creció en este medio y el 11% creció pero no exhibió el halo azul alrededor de las colonias que indicara la presencia de biosurfactantes; sólo el 1% de aislamientos presentó halo azul, pero esto no fue un precepto significativo para seleccionar cepas con actividad surfactante y, por lo tanto, se continúo el estudio con otros procedimientos de selección.

Se constató actividad lipolítica de los aislamientos sembrados en agar Tween 80®, pues se observó la presencia de una zona blanca de cristales de calcio precipitados alrededor de las colonias que habían mostrado actividad hemolítica en agar sangre al 5%; la relación entre los datos obtenidos en esta evaluación y la de producción de hemólisis indicó que estas pruebas suministran orientación presuntiva para la selección primaria para bacterias productoras de biosurfactantes.

Evaluación de capacidad emulsificante y de la actividad zoosporicida sobre P. infestans. De un total de 104 bacterias inoculadas en el medio mínimo de sales con glicerol al 2%, el 45,7% mostró un óptimo crecimiento, mientras los aislamientos restantes no lograron adaptarse a la composición del medio.

Con los sobrenadantes de los caldos en dónde se obtuvo crecimiento de las bacterias se evaluó la capacidad emulsificante del aceite mineral y del kerosén en agua por acción de los biosurfactantes producidos. En la prueba de emulsificación con aceite mineral 45 de los sobrenadantes formaron el anillo de emulsificación y 27 lo formaron con el kerosén. Los anillos de emulsificación formados con los dos productos se mantuvieron estables y densos por 24 horas.

De los sobrenadantes positivos con la prueba de emulsificación (51 en total), los de las cepas 021V y 039T lograron el 100% de emulsificación del aceite mineral y del kerosén al ser comparadas con el halo de emulsificación del control positivo con Tween 20®. Como resultado, esta evaluación permitió seleccionar las dos cepas que produjeron la mayor actividad biosurfactante para las siguientes evaluaciones.

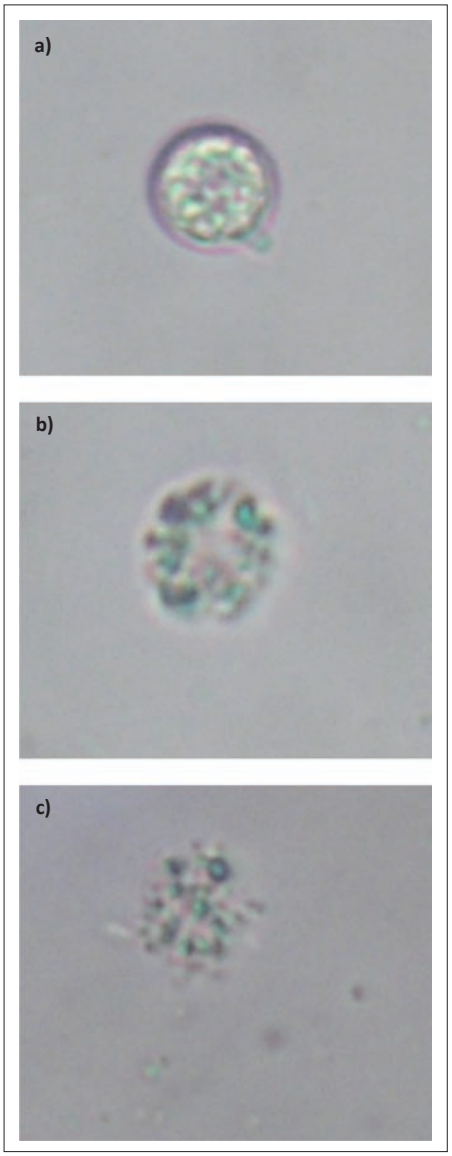

Figura 2. Proceso de lisis de zoosporas de *P. infestans* por efecto del biosurfactante de la cepa 039T de *P. fluorescens* : a) zoospora intacta; b) pérdida de turgencia y aspecto granular del citoplasma; c) rompimiento de la membrana y lisis total. (Microfotografías cedidas por Olga Pérez y Erika Martínez).

En la prueba de lisis de zoosporas observada con microscopio, los sobrenadantes de las cepas mencionadas mostraron un efecto a corto término sobre la integridad de las zoosporas del *P. infestans*, que se manifestó mediante inmovilización y cambios en la apariencia interna del citoplasma (fenómeno de granulación) que ocurrieron aproximadamente entre 1,5 y 2 minutos después de poner en contacto la suspesión de zoosporas y los sobrenadantes; en los siguientes 4 a 5 minutos se observó lisis y liberación del contenido citoplasmático del total de zoosporas presentes (Figura 2).

El efecto lítico del biosurfactante ocasionado por los sobrenadantes sobre las zoosporas del patógeno se debe al mecanismo físico-químico de tienen dichas sustancias para penetrar e intercalarse dentro de la membrana plasmática, la cual está compuesta por glicolípidos (en lugar de fosfolípidos como la membrana de las células eucarióticas) y proteínas, lo que establece una afinidad química con la porción hidrofílica del biosurfactante que favorece el desequilibrio de la integridad y la permeabilidad que conducen al rompimiento de la membrana de la zoospora y la liberación del contenido celular. Una vez enquistada la zoospora, los surfactantes no pueden alterarla debido a la presencia de la pared celular que le brinda protección (Kim, Lee y Hwang, 2000; EPA, 2003).

Identificación bioquímica de las cepas seleccionadas. Las pruebas bioquímicas realizadas y su correlación con las características microscópicas de las cepas 021V y 039T (bacilos Gram negativos pequeños) y con características macroscópicas como el buen crecimiento y la no fermentación de la lactosa en agar MacConkey, identificaron a los aislamientos mencionados dentro del género y especie *Pseudomonas fluorescens.*

Identificación y cuantificación del biosurfactante. Con los tres compuestos solventes utilizados se realizó una marcha analítica para determinar el grupo químico de los biosurfactantes presentes; así, fue posible obtener biosurfactantes parcialmente purificados (BPP) a partir de los sobrenadantes de los caldos de las cepas 021V y 039T de *P. fluorescens*.

Con las técnicas colorimétricas aplicadas a los BBP se obtuvieron resultados positivos acerca de la presencia de azúcar, tanto con el método del orcinol como con el de antrona-H_2SO_4, lográndose una mejor cuantificación con el primero. El solvente que permitió la mayor la recuperación del producto fue el éter dietílico (mayor concentración de azúcar obtenido: 0,036 $mg \cdot mL^{-1}$ para la cepa 021V y 0,037 $mg \cdot mL^{-1}$ para la cepa 039T).

La búsqueda de péptidos con las técnicas utilizadas no arrojó un resultado que indicara la presencia lipopéptidos; sin embargo, se advierte que estas pruebas no son suficientes para descartar la presencia de ese tipo de moléculas.

Por lo anterior, se asume que el biosurfactante presente en los sobrenadantes de las cepas 021V y 039T de *P. fluorescens* puede ser un glicolípido del tipo ramnolípido, debido a que no se han reportado otro tipos de carbohidratos producidos por *P. fluorescens* que produzcan resultados falsos positivos (Desai y Banat, 1997; Alemany, 2001). Por tanto, es necesario explorar un mayor reconocimiento de la molécula con técnicas de análisis instrumentales más sensibles como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la espectroscopia de infrarrojo (IRTF) y/o la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).

Comportamiento de la biomasa, el sustrato y el producto de la fermentación

El estudio del comportamiento de los diferentes componentes del proceso de fermentación del medio de cultivo fue un proceso que arrojó la información necesaria para mejorar las condiciones de producción del biosurfactante.

Para la cuantificación del producto (ramnolípido) durante la fermentación del medio mínimo de sales inoculado con las cepas 021V y 039T a escala de laboratorio, se realizó la extracción con éter dietílico y se usó como método de cuantificación el del orcinol por sus características de sensibilidad, reproducibilidad y rapidez. El análisis estadístico (resultados no mostrados) y el modelo de regresión usados para evaluar la producción indicaron que la mayor concentración de biosurfactante, expresada como equivalentes de ramnosa, fue producida por la cepa 039T en el medio 1 (MMS con glicerol al 2%) a 30°C (Figura 3), mientras que la cepa 021V obtuvo una menor concentración del producto en ese mismo medio y temperatura (Figura 4); los otros medios evaluados (medios 2 y 3) fueron menos efectivos en producción que el medio 1 (resultados no mostrados). Sin embargo, es necesario realizar estudios de producción de ramnolípido con mediciones más frecuentes para explicar de manera más específica el comportamiento de las variables evaluadas.

En general, el consumo de glicerol en los tres medios empezó en la fase exponencial del crecimiento de las cepas (biomasa); el compuesto fue consumido completamente a las 120 h en los medios 2 y 3 por tener menor concentración y casi por completo en el medio 1.

La fase exponencial del crecimiento de las cepas 021V y 039T se observó a las 72 horas, tanto a 25 como a 30°C, y junto con ella se incrementó la producción del biosurfactante, lo que confirmó que se trata de un metabolito secundario; este hallazgo confirma lo reportado por Santa Anna *et al.* en 2002, Tuleva *et al.* en 2002 y Barragán en 2004.

La emulsificación del aceite mineral se observó a partir de las 24 horas, tiempo que coincide con el inicio de la producción del ramnolípido; el fenómeno se incrementó a medida que aumentaba la concentración del biosurfactante. A las 72 horas se consiguió el 100% de emulsificación del aceite mineral. Simultáneamente se observó lisis casi total de las zoosporas de *P. infestans*; no obstante, el surfactante producido antes de las 72 horas solamente logró la inmovilizar a las zoosporas dentro de los primeros cinco minutos de exposición y la lisis se observó después de transcurridos varios minutos, lo que indica que bajas concentraciones de biosurfactante tienen un efecto de inmovilización, como lo observaron Kim, Lee y Hwang (2000) sobre *Phytophthora capsici* a bajas concentraciones de ramnolípido B. Este efecto del biosurfactante en un cultivo de papa podría inhibir el desplazamiento de las zoosporas suspendidas en aguas sobre el suelo para infectar otras plantas cercanas.

Efecto inhibitorio de sobrenadantes de *P. fluorescens* sobre la infección de *P. infestans* en folíolos desprendidos de papa

Este ensayo buscó establecer las bases para la utilización de biosurfactantes

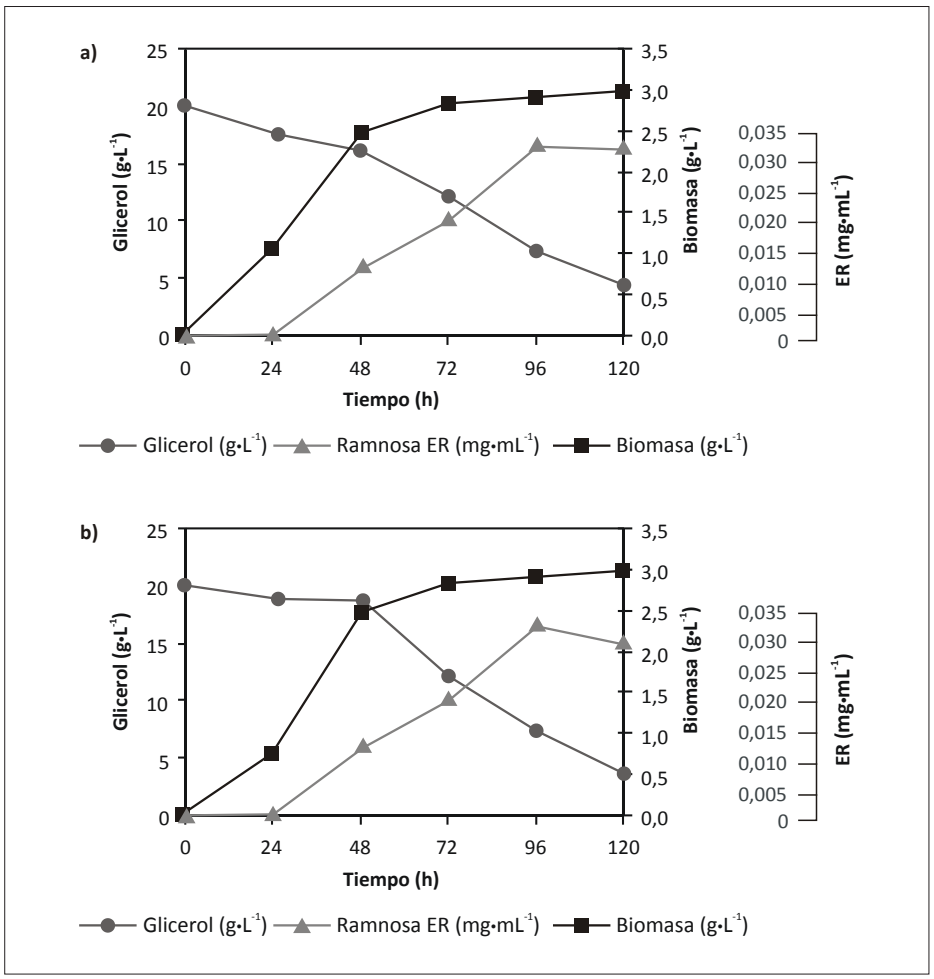

Figura 3. Evaluación de los componentes de la fermentación. Consumo de glicerol, incremento de la biomasa y producción de biosurfactante por cepas bacterianas cultivadas a 30°C en medio MMS con glicerol al 2%: a) cepa 039T de *P. fuorescens* ; b) cepa 021V de *P. fluorescens*. La concentración de glicerol se expresa en g•L^{-1}, la biomasa en g•L^{-1} y los niveles de biosurfactante se expresan en equivalentes de ramnosa [ER, mg•mL^{-1}].

como herramientas para el control no convencional de *P. infestans* con el fin de sustituir o reducir el uso de fungicidas químicos, compuestos de síntesis que deterioran las propiedades y ecología del suelo, son nocivos para la salud humana y de otros seres vivos, y pueden generan tolerancia por parte del patógeno.

A tal fin se evaluó el efecto inhibitorio *in vivo* de los biosurfactantes obtenidos de la fermentación sobre *P. infestans* inoculado en folíolos desprendidos de papa; este efecto protectante se comparó con la acción del fungicida químico Mancozeb® sobre el patógeno y con el desarrollo de la enfermedad en los folíolos no tratados.

Se encontró que Mancozeb® redujo en 99,4% las lesiones por Gota, mientras que los sobrenadantes de las cepas 021V y 039T de *P. fluorescens* las redujeron en 60% y 48,2% respectivamente, lo que indica que los biosurfactantes lograron una protección parcial frente a la aparición de la enfermedad; sin embargo, una vez el patógeno penetra los órganos de la planta los surfactantes no actúan como tratamiento curativo de la enfermedad, como lo que reportaron Jonghe *et al.* en 2005 y Kim, Lee y Hwang en 2000.

Los tiempos de aplicación que mostraron un efecto positivo estuvieron entre las 2 y las 24 horas previas a la inoculación (Tabla 1), lo que puede ser una limitante para la utilización de sobrenadantes bacterianos en campo ya que se requeriría de aplicaciones continuas. Este obstáculo podría superarse utilizando concentraciones de biosurfactante más altas que las usadas, lo cual se lograría mejorando los procesos de producción por parte de las cepas. La limitante también se puede vencer con la utilización de moléculas adyuvantes para que permitan mayor persistencia del biosurfactante sobre la planta o su aplicación conjunta con otros fungicidas a fin de reducir el empleo de éstos en el ciclo de cultivo.

En el tercer ensayo se pudo determinar el momento en que se desarrollaron las lesiones de la enfermedad sobre folíolos desprendidos de papa; las lesiones se hicieron evidentes a las 48 horas en aquellos folíolos no tratados coincidiendo con lo descrito por Smart *et al.* en 2000 (citado por Jaramillo, 2003). A las 72 horas las lesiones se observaron en los folíolos tratados con los biosurfactantes, lo que demuestra también que éstos disminuyen el crecimiento del patógeno en los folíolos.

La prueba de comparación de medias del crecimiento de las lesiones necróticas en los días 2 y 3 del ensayo mostró una gran variabilidad de tamaño de las lesiones (Tabla 2) que pudo deberse a diversas condiciones del tejido que lo hicieron susceptible a la enfermedad, como la edad y la densidad celular, así como por el desencadenamiento de reacciones de hipersensibilidad de la planta que le confieren resistencia natural al patógeno y, por lo tanto, limitaron en parte el desarrollo de la infección. Una vez el oomiceto supera esta barrera llega a colonizar completamente el tejido foliar formando lesiones de tamaño homogéneo entre sí según lo descrito por Vleeshouwers *et al.* en 2000.

El siguiente paso a seguir en este estudio sería la evaluación del efecto inhibitorio de los sobrenadantes baterianos sobre plantas de papa, sobre otros cultivos susceptibles a *P. infestans* como el tomate y el pimentón que también son atacados por otras especies de *Phytophthora*, y sobre otros oomicetos de importancia en fitopatología. Además, se deben complementar los estudios de persistencia en invernadero para lograr llevarlos a campo donde entran en contacto con las condiciones ambientales que favorecen el desarrollo de la enfermedad.

Tabla 1. Evaluación del efecto de los sobrenadantes de los caldos de fermentación sobre la gota en folíolos desprendidos de papa.

Tratamiento		Media[1]
Protectante	**Tiempo (h)**	**(% de área foliar afectada)**
Sobrenadante 021V	2	27,97 c
Sobrenadante 021V	12	36,05 c
Sobrenadante 021V	24	40,61 bc
Sobrenadante 021V	36	41,43 bc
Sobrenadante 021V	48	42,57 bc
Sobrenadante 039T	2	33,46 c
Sobrenadante 039T	12	44,21 bc
Sobrenadante 039T	24	30,25 c
Sobrenadante 039T	36	56,15 b
Sobrenadante 039T	48	80,53 a
Mancozeb ®	2	0 d
Mancozeb ®	12	0,5 d
Mancozeb ®	24	0 d
Mancozeb ®	36	1,21 d
Mancozeb ®	48	1,01 d
Agua	2	93,23 a
Agua	12	94,55 a
Agua	24	95,31 a
Agua	36	94,06 a
Agua	48	94,93 a

[1] Medias seguidas de la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de significancia de Tukey (α= 0.05; P< 0,005).

Tabla 2. Evaluación del efecto de los sobrenadantes de los caldos de fermentación sobre síntomas de Gota en folíolos desprendidos de papa durante cinco días.

Tratamiento		Media[1] (% de área foliar afectada)			
Protectante	**Tiempo**	**Día 2**	**Día 3**	**Día 4**	**Día 5**
S 21-V[2]	2	0 c	17,87 cdebf	29,07 fgde	30,10 c
S 021-V	12	0 c	5,85 def	27,47 fge	43,25 c
S 021-V	24	0 c	6,65 def	30,97 fcgde	43,67 c
S 021-V	36	0 c	10,75 cdef	30,27 fgde	48,67 c
S 021-V	48	0 c	15,52 cdebf	63,55 cab	88,95 a
S 39-T[3]	2	0 c	7,52 cdef	21,12 fg	34,90 c
S 39-T	12	0 c	1,30 ef	18,85 g	50,1 c
S 39-T	24	0 c	2,95 ef	12,80 gh	37,62 c
S 39-T	36	0 c	22,52 cdeb	36,97 fcgdb	57,07 cb
S 039-T	48	1,42 c	36,40 cab	69,80 ab	86,22 ab
Mancozeb ®	2	0 c	0 f	0 i	0 d
Mancozeb ®	12	0 c	0 f	0 i	0 d
Mancozeb ®	24	0 c	1 ef	1,17 ih	1,32 d
Mancozeb ®	36	0 c	0 f	1,15 ih	2,20 d
Mancozeb ®	48	0 c	0 f	0 i	0,9 d
Agua	2	5,22 bc	20,05 cdeb	50,67 fcadbe	97,30 a
Agua	12	3,87 bc	13,17 cdebf	61,75 cadb	92,57 a
Agua	24	0 c	26,45 cdb	55,50 cadbe	86,95 a
Agua	36	15,70 cb	44,02 ab	73,32 a	97,55 a
Agua	48	47,32 a	68,95 a	76,6 a	89,05 a

El día 1 se omitió por ausencia de las lesiones de Gota en lo folíolos.
[1] Medias seguidas de la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de significancia de Tukey (α= 0,05; P< 0,005).
[2] S 21-V: sobrenadante de la cepa 021V
[3] S 39 -T: sobrenadante de la cepa 039T.

Evaluación del efecto de los sobrenadantes de cepas bacterianas sobre otros microorganismos

La producción de moléculas con propiedades antibióticas es característica de muchos microorganismos que habitan en el suelo. *P. fluorescens* es uno de ellos y tiene la capacidad de producir antibióticos con diferentes grados de actividad contra patógenos específicos, por lo que es de gran interés como agente antagonista.

En estudios reportados por Haba *et al.* en 2003 se identificó la concentración mínima inhibitoria (CMI) del ramnolípido producido por una cepa de *P. aeruginosa* sobre bacterias Gram positivas como *S. aureus* (32 $\mu g \cdot mL^{-1}$), *B. subtilis* (16 $\mu g \cdot mL^{-1}$) y sobre bacterias Gram negativas como *E. coli* (64 $\mu g \cdot mL^{-1}$), *P. aeruginosa* (256 $\mu g \cdot mL^{-1}$) y *P. mirabilis* (>256 $\mu g \cdot mL^{-1}$). Estas concentraciones del biosurfactante son mayores que las concentraciones que se hallaron en los sobrenadantes de la fermentación (2,8 $\mu g \cdot mL^{-1}$ para la cepa 021V y 3,2 $\mu g \cdot mL^{-1}$ para la cepa 039T de *P. fluorescens*); por lo tanto, no se evidenció ningún efecto sobre las bacterias. Es conveniente continuar con este ensayo con bacterias del suelo y bacterias patógenas de la papa.

El efecto inhibitorio sobre los hongos *Trichoderma harzianum*, *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum gloeosporioides* y sobre otras estructuras de *P. infestans* diferentes de las zoosporas, se expresó claramente en la reducción del crecimiento (hasta del 84,32%) del oomiceto con el sobrenadante de la cepa 021V y por el sobrenadante de la cepa 039T (hasta el 55,56%) (Figura 4a).

Resultados semejantes fueron encontrados por Kim, Lee y Hwang (2000) sobre *P. capsici*, quienes concluyeron que los ramnolípidos también tienen efecto sobre otras estructuras con pared celular del patógeno, así como por Jonghe *et al.* (2005) sobre *P. cryptogea* en cultivos hidropónicos de achicoria en Bélgica. Lo anterior indica que las concentraciones presentes en los sobrenadantes lograron resultados positivos en la inhibición del patógeno de la Gota.

En el caso de *Trichoderma harzianum* se observó una ligera reducción del crecimiento cercana al 10% con los sobre-

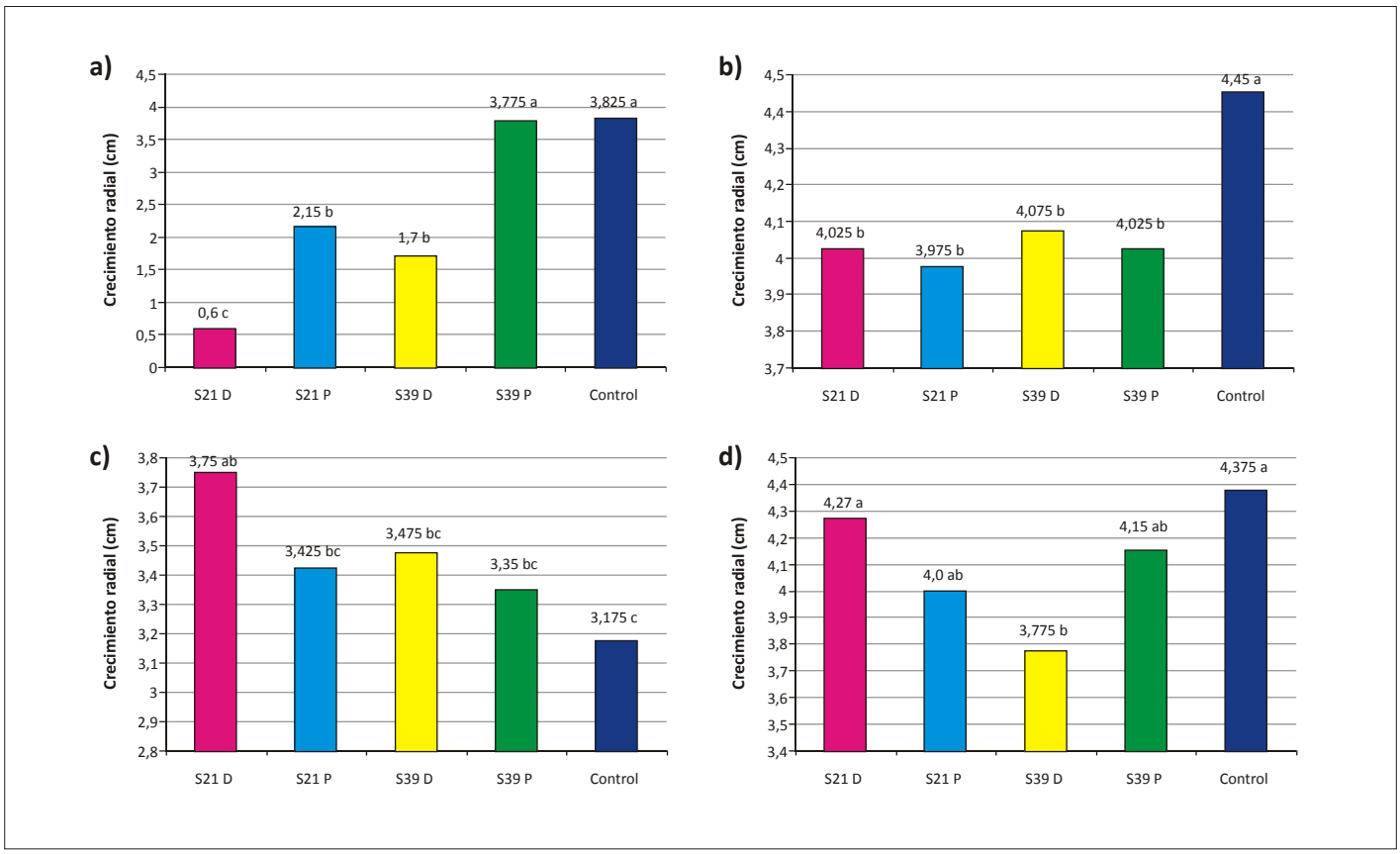

Figura 4. Efecto de los sobrenadantes de las cepas de *P. fluorescens* 021V y 039T sobre hongos y oomicetos: a) *P. infestans*, b) *T. harzianum*, c) *C. acutatum* y d) *C. gloeosporioides.* S21: sobrenadante 021V; S39: sobrenadante 039T; D: difusión directa; P: difusión a partir de pozos. Medias seguidas de la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey (α= 0,05; P< 0,005).

nadantes (Figura 4b), pero este efecto es muy bajo respecto al desarrollo del hongo sin que esto le impida realizar sus acciones biocontroladoras de fitopatógenos una vez esté en campo.

En las cepas de *Colletotrichum* se observó un incremento en el crecimiento radial de las colonias por encima del crecimiento que se observó en los controles del hongo, contrariamente a lo reportado por Kim, Lee y Hwang en 2000 y Haba *et al.* en 2003. Quizás el efecto estimulante ocurrió a causa de las concentraciones relativamente bajas de los biosurfactantes presentes en lo sobrenadantes probados en comparación con las utilizadas por dichos autores; así mismo, puede deberse a la presencia en el caldo de otros metabolitos con efecto sinérgico sobre estos hongos como lo hallado por Blakeman y Parbery en 1977 y por McCracken y Swinburne en 1979, quienes reportan que *C. acutatum* y *C. musae* aumentan la germinación de conidias y la formación de apresorios debido a la producción de sideróforos por *Pseudomonas* sp. al tomar el hierro presente en el medio (Figuras 4 c y d).

Los biosurfactantes representan una alternativa para el control biológico de la Gota de la papa debido al efecto sobre las estructuras más infecciosas de *P. infestans* (las zoosporas) y porque retrasan el crecimiento del patógeno cuando ya ha se formado la hifa. Es preciso realizar nuevos y más completos estudios en busca de la optimización de la producción, las aplicaciones y los efectos en las plantas, así como analizar los costos de producción con respecto a los fungicidas químicos, antes de abordar el desarrollo y comercialización del producto.

Se requiere realizar mayores esfuerzos en la investigación sobre las posibilidad de introducir los biosurfactantes en el manejo integrado de la Gota, no sólo en la papa sino también en cultivos de otras solanáceas como el tomate y el pimentón, con el fin de lograr un manejo exitoso y mantener la sostenibilidad de los cultivos.

CONCLUSIONES

De las bacterias seleccionadas en estudios previos como productoras de biosurfactantes, dos cepas identificadas como *Pseudomonas fluorescens*, mostraron la mejor actividad lítica sobre zoosporas de *Phytophthora infestans* produciendo la inmovilidad de éstas a los 2 minutos después de entrar en contacto con los sobrenadantes del caldo de cultivo y la lisis antes de los 5 minutos.

Los métodos de extracción con solventes utilizados permitieron la purificación parcial del biosurfactante presente en el caldo de fermentación de las dos cepas; mediante el método del orcinol se identificó y cuantificó a la ramnosa como el componente hidrofílico del biosurfactante producido (ramnolípido).

El ramnolípido obtenido de las dos cepas de *Pseudomonas* también tiene la capacidad de retrasar el crecimiento de *P. infestans* debido a que no sólo tiene acción

sobre las oosporas sino también sobre otras estructuras como las hifas.

De los tres medios de cultivo con glicerol como fuente de carbono evaluados, el medio mínimo de sales con una incubación a 30°C y 150 rpm por 120 horas proporcionó las mejores condiciones a las dos cepas para la producción del biosurfactante. Este biosurfactante, junto con otros subproductos de la fermentación de *P. fluorescens*, no mostraron efectos inhibitorios del crecimiento de otro tipo bacterias y de algunos hongos.

La utilización de los biosurfactantes para prevenir la Gota de la papa se constituye en una alternativa posible para controlar la enfermedad y para disminuir la aplicación de fungicidas de origen químico, no solamente en cultivos de papa, sino también en otras solanáceas susceptibles al patógeno.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

Abad, Z. y J. Abad. 1997. Another look at the origin of late blight of potatoes, tomatoes, and pear melon in the Andes of South America. Plant Dis 81(6): 682-688.

Abbas, T., K. Fatemeh y S. Mazaheri. 2004. Improved production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* mutant. Iran Biomed J 8(1): 25-39.

Agrios, G. 2002. Fitopatología. 2a ed., Editorial Limusa S.A. México D.F. pp. 310-320.

Agrios, G. 2005. Plant pathology. 5th ed., Elsevier Academic Press, Londres. pp. 425.

Agrocadenas. 2006. La cadena de la papa de la papa. Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Documento de trabajo No. 100. Bogotá, Colombia. 38 p.

Alemany, J. 2001. Caracterizació de metabólits produits per soques de *Pseudomonas fluorescens* efectives en el control biòlogic de fong fitopatòges. Tesis doctoral. Universitad de Girona. Instituto de Tecnología Agroalimentaria. Departamento de Ingeniería Química, Agraria y Tecnología Agroalimentaria. Girona. España. 271 p.

Alexopoulos, C.J., M. Blockwell y C.W. Mims. 1996. Introductory mycology. 4ª ed., Editorial John Wiley and Sons, New York. pp 717-723.

Barragán, N. 2004. Selección y evaluación de bacterias productoras de biosurfactantes para el control potencial de *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary. Tesis pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Industrial. Bogotá, Colombia. 103 p.

Blakeman, J. y D. Parbery. 1977. Stimulation of appressorium formation in the *Colletotrichum acutatum* by phylloplane bacteria. Physiol Plant Pathol 11: 313-325.

Cevipapa. 2004. El cultivo de la papa en Colombia. En: http://www.cevipapa.org.co/cultivo. Consulta: noviembre de 2004.

Deacon, J. 2004. The microbial world: fungal zoospore. En: University of Edinburgh, Institute of Cell and Molecular Biology. http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/zoospores.htm. Consulta: agosto 2005.

Desai, J. e I. Banat. 1997. Microbial production of surfactant and their commercial potential. Microbiol. Mol. Biol. R. 1(1): 47-64.

Deziel, E., F. Lepine, S. Milot y R. Villemur. 2000. Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. Biochim Biophys Acta 1485 (2-3): 145-152.

EPA. U.S. Environmental Protection Agency. 2003. Prevention Division Office of Pesticide. Rhamnolipid biosurfactant (PC Code 110029). Programs Biopesticides and Pollution. Federal Register: 68 (90).

Gorovits, R. y O. Yarden. 2003. Environmental suppression of neurospora crassa cot-1 hyperbranching: a link between COT1 kinase and stress sensing. Eukaryot Cell 2(4): 699-707.

Haba, E., A. Pinazo, A. Jáuregui, M. Espuny, M. Infante y A. Manresa. 2003. Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*. Biotech. Bioengin. 81(3): 316-322.

Jaramillo, S. 2003. *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. *Monografía*. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Medellín. Colombia. 137 p.

Jonghe, K., I. De Dobbelaere, R. Sarrazyn y M. Höfte. 2005. Control of *Phytophthora cryptogea* in the hydroponic forcing of witloof chicory with the rhamnolipid-based biosurfactant formulation PRO1. Plant Pathol. 54: 219-226.

Kim, B., J. Lee y B. Hwang. 2000. *In vivo* and *in vitro* antifungal activity of ramnolipid B, a glycolipid antibiotic against *Phytophthora capcisi* and *Colletotrichum orbiculare*. Pest Manag. Sci. 56: 1029-1035.

Koneman, E. 1990. Diagnóstico microbiológico. Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires, Argentina. 533 p.

Lang, S. y D. Wullbrandt. 1999. Rhamnose-lipids biosynthesis, microbial production and application potential. Minireview. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51: 22-32.

Laurentin, A. y C. Edwars. 2003. A microtiter modification of the antrone-sulfuric acid colorimetric assay for glucose-based carbohydrates. Anal. Biochem. 315: 143-145.

McCracken, A. y T.R. Swinburne. 1979. Siderophores produced by saprophytic bacteria as stimulants of germination of conidia of *Colletotrichum musae*. Physiol. Plant Pathol. 15: 331-340.

Nærstad, R., A. Hermansen y T. Bjor. 2007. Exploiting host resistance to reduce the use of fungicides to control potato late blight. Plant Pathol. 56: 156 -166.

Nielsen, T., D. Sorensen, C. Tobiasen, B. Andersen, C. Christophersen, M. Givskov y J. Sorensen. 2002. Antibiotic and biosurfactant proprieties of cyclic lipopeptides produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. from the sugar beet rhizosphere. Appl. Environ. Microbiol. 68(7): 3416-3423.

Ristaino, J.B. y S. Johnston. 1999. Ecologically based approaches to management of *Phytophthora* blight on bell pepper. Plant Dis 83(12): 1080-1089.

Riveros, F., R. Sotomayor, V. Rivera, S. Secor y B. Espinoza. 2003. Resistance of *Phytophthora infestans* (Montagne) de Bary to metalaxyl in potato crops in Northern Chile. Agric. Téc. 63(2) p.117-124.

Rosero, G., A. Pimienta, F. Dugarte y F. Carvajal. 2003. Parameters examination of biosurfactant production at laboratory scale. Cien. Tecnol. Futuro 2(4): 35-42.

Sánchez, M.P. 1994. Manual de procedimientos en bacteriología clínica. Biobacter Ltda. Santafé de Bogotá, Colombia. 256 p.

Santa Anna, L., G. Sebastián, E. Menezes, T. Alves, A. Santos, N. Pereira y D. Freire. 2002. Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil enviroments. Braz. J. Chem. Eng. 19(2): 159-166.

Sapan, C., R. Lundblad y N. Price. 1999. Colorimetric protein assay techniques. Biotechnol. Appl. Biochem. 29: 99-108.

Siegmund, I. y F. Wagner. 1991. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* Swinburne species during growth on mineral agar. Biotechnol. Tech. 5: 265 -268.

Slifkin, M. 2000. Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. J. Clin. Microbiol. 38(12): 4626-4628.

Souza, J. de, M. de Boer, P. de Waard, T. Beek y J. Raaijmakers. 2003. Biochemical, genetic, and zooporidal propierties of cyclic lipopéptido surfactant produced by *Pseudomonas fluorescens*. Applied and environmental microbiology. 69(12): 7161- 7172.

Souza, J. de. 2002. Distribution, diversity, and activity of antibiotic-production of *Pseudomas* spp. Tesis doctoral. Wageningen University. Netherlands. 161 p.

Stanghellini, M. y R. Miller. 1997. Biosurfactants: Their identity and potencial efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. Phytopathol. 81 (1): 1-12.

Torres, H. 2002. Tizón tardío. En manual de las enfermedades más importantes en el Perú. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú. pp. 5-12.

Tran, H., A. Ficke, T. Asiimwe, M. Höfte y J.M. Raaijmakers. 2007. Role of the cyclic lipopeptide massetolide A in biological control of *Phytophthora infestans* and in colonization of tomato plants by *Pseudomonas fluorescens*. New Phythol. 175: 731-742.

Tuleva, B.K., Ivanov, G.R. y N. Christova. 2002. Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. Z. Naturforsch. 57: 356-360.

Vega, S. 2004. Evaluación de compuestos inductores de resistencia contra Gota (*Phytophthora infestans*) en papa (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) en condiciones controladas. Tesis pregrado. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Escuela de Ingeniería Agronómica. Tunja, Colombia. 115p.

Vleeshouwers, V., W. van Dooijeweert, F. Govers, S. Kamoun y L. Colon. 2002. The hypersensitive response is associated with host and nohost resistance to *Phytophthora infestans*. Planta.210: 853-864.