



**Actividad de *Raoultella* sp. como entomopat6gena de *T. solanivora* frente a:  
AHLs (N-acil homoserina lactonas), co-inoculaciones, una formulaci6n  
preliminar y compatibilidad con insumos agr6colas.**

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca  
Facultad de Ciencias de la Salud  
Programa Bacteriolog6a y Laboratorio Cl6nico  
Trabajo de grado  
Bogot6 D.C, 2018**



**Actividad de *Raoultella* sp. como entomopat6gena de *T. solanivora* frente a:  
AHLs (N-acil homoserina lactonas), co-inoculaciones, una formulaci6n  
preliminar y compatibilidad con insumos agr6colas.**

**Diana Katherine Moreno Quintana  
María Camila Obando León**

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca  
Facultad de Ciencias de la Salud  
Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico  
Trabajo de grado  
Bogotá D.C, 2018**

**Actividad de *Raoultella* sp. como entomopat6gena de *T. solanivora* frente a:  
AHLs (N-acil homoserina lactonas), co-inoculaciones, una formulaci6n  
preliminar y compatibilidad con insumos agr6colas.**

**Estudiantes:**

**Diana Katherine Moreno Quintana  
María Camila Obando León**

**Asesor externo**

**Dr. Javier Vanegas Guerrero-Universidad Antonio Nariño**

**Asesor interno**

**Carolina Jaime Rodríguez  
Especialista y Magíster en Gestión Ambiental Universidad Colegio Mayor de  
Cundinamarca**

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca  
Facultad de Ciencias de la Salud  
Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico  
Trabajo de grado  
Bogotá D.C, 2018**

Camila Obando

A mi hija, por ser la persona que me hace pensar en un mejor futuro, a quien dedicaré cada uno de mis logros, a mi familia, el lugar donde aprendí a ser una persona de bien y a luchar por las cosas que quiero y, por último, pero no menos importante a Dios, por cada uno de sus hermosos regalos para mi vida.

Diana Moreno

Dedico este logro primeramente a Dios, quien me ha permitido llegar hasta este punto de mi vida, por sostenerme y guiarme en cada paso que doy. A mi familia que me ha apoyado en cada una de mis metas, con cada de sus esfuerzos que hacen por ayudarme, en especial a mis padres que me han guiado para ser una persona que lucha por lo que quiere sin desfallecer.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos primeramente a Dios quien nos permitió alcanzar este logro, a nuestras familias, por ser el apoyo en cada paso de nuestra carrera, y enseñarnos que todo se logra con esfuerzo y dedicación.

Al Dr Javier Vanegas, nuestro asesor externo, por brindarnos la oportunidad de pertenecer a este proyecto, depositar su confianza en nosotras y guiarnos para poder culminar esta parte importante de nuestras vidas.

A la MSc Carolina Jaime, nuestra asesora interna, por la disposición y paciencia a lo largo de este proyecto.

Las actividades de este trabajo están enmarcadas dentro del proyecto “¿Bacterias productoras de moléculas señal tipo *N*-acil homoserina lactonas (AHLs) pueden potenciar la actividad de cepas PGPR para promover el crecimiento en plantas de papa (*Solanum tuberosum*)?” Financiado por la UNIVERSIDAD ANTONIO NARIÑO con código 2016224.

**Actividad de *Raoultella* sp. como entomopatógena de *T. solanivora* frente a: AHLs (N-acil homoserina lactonas), co-inoculaciones, una formulación preliminar y compatibilidad con insumos agrícolas.**

**RESUMEN**

En Colombia el cultivo de papa se ve afectado por varias plagas, entre estas *Tecia solanivora*, causante de pérdidas económicas durante su producción, para combatir dicha plaga los agricultores utilizan insecticidas químicos, estos ocasionan daño al medio ambiente, toxicidad al agricultor, entre otros; es por ello, que surge la necesidad de buscar otras alternativas para el control de *T. solanivora*, entre ellas encontramos el control biológico mediante rizobacterias entomopatógenas productoras de AHLs. El objetivo de este trabajo es potenciar la actividad de *Raoultella* sp. como entomopatógena de *T. solanivora* mediante el uso de AHLs, co-inoculaciones, una formulación preliminar y compatibilidad con insumos agrícolas. Para esto, se determinó la producción de proteasas, ácido cianhídrico, sideróforos y movilidad tipo *swarming* de *Raoultella* sp, a través de, la adición de AHLs exógenas; de igual modo, se evaluó la viabilidad de *Raoultella* sp. en tres transportadores (turba, aserrín y líquido) mediante formulación, y se co-inoculó con una rizobacteria promotora de crecimiento vegetal y de AHLs. Además, se observó su resistencia frente a los insecticidas comerciales más utilizados en el control de *T. solanivora*. Los resultados obtenidos muestran que la producción de ácido cianhídrico, sideróforos y motilidad tipo *swarming* de *Raoultella* sp. aumentan al agregar las AHLs exógenas. El transportador que mejor mantuvo la viabilidad de *Raoultella* sp. fue turba a 4°C, de igual modo, ésta puede crecer en medios suplementados con insecticidas comerciales. De esta manera, se puede concluir *Raoultella* sp. es una gran alternativa de control biológico contra *T. solanivora*.

**TABLA DE CONTENIDO**

## Contenido

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN .....   | 14 |
| 2. ANTECEDENTES .....   | 16 |
| 3. MARCO TEÓRICO .....  | 20 |
| 3.1 Cultivo de papa .....   | 20 |
| 3.2 <i>Tecia solanivora</i> .....   | 20 |
| 3.3 Plaguicidas de síntesis química .....   | 21 |
| 3.4 Actividad Entomopatógena .....  | 23 |
| 3.5 <i>Raoultella</i> sp. ....  | 24 |
| 3.6 Mecanismos de acción de <i>Raoultella</i> sp.....                                 | 24 |
| 3.6.1 Quorum sensing (QS).....  | 24 |
| 3.6.2 N - acil homoserina lactona .....   | 25 |
| 3.6.3 Proteasas .....   | 26 |
| 3.6.4 Sideróforos .....   | 27 |
| 3.6.5 Movilidad tipo <i>swarming</i> .....  | 27 |
| 3.6.6 Ácido Cianhídrico .....   | 28 |
| 3.7 Formulación .....   | 28 |
| 4. OBJETIVOS.....   | 30 |
| 4.1 Objetivo general .....  | 30 |
| 4.2 Objetivos específicos .....   | 30 |
| 5. DISEÑO METODOLÓGICO .....  | 31 |
| 5.1 Obtención de <i>Raoultella</i> sp.....  | 32 |
| 5.2 Curva de crecimiento.....   | 32 |
| 5.3 Proteasas.....  | 33 |
| 5.4 Motilidad tipo <i>swarming</i> .....  | 33 |
| 5.5 Producción de ácido cianhídrico (HCN) .....                                       | 34 |
| 5.6 Capacidad de retención de agua y pH del transportador.....                        | 34 |
| 5.7 Método para el recuento de colonias en placa. ....                                | 34 |
| 5.8 Preparación de la formulación .....   | 35 |
| 5.9 Compatibilidad de bacterias PGPR y <i>Raoultella</i> sp.....                      | 35 |
| 5.10 Bioensayo.....   | 36 |
| 5.11Compatibilidad de <i>Raoultella</i> sp. con plaguicidas de síntesis química. .... | 36 |
| 5.12 Análisis estadístico.....  | 37 |
| 6. RESULTADOS.....  | 38 |

|   |    |
|---|----|
| 6.1 Efecto de las AHLs en el crecimiento de <i>Raoultella sp.</i> .....                                 | 38 |
| 6.2 Proteasas: .....  | 39 |
| 6.3 Sideróforos: .....  | 39 |
| 6.4 Motilidad tipo <i>swarming</i> : .....  | 40 |
| 6.5 Producción de Ácido Cianhídrico (HCN):.....   | 40 |
| 6.6 Formulación. ....   | 41 |
| 6.7 Enfrentamiento de <i>Raoultella sp.</i> con bacterias promotoras de crecimiento .....               | 42 |
| 6.8 Bioensayo: .....  | 43 |
| 6.9 Crecimiento de <i>Raoultella sp.</i> en medio suplementado con plaguicidas de síntesis química..... | 43 |
| 8. CONCLUSIONES.....  | 49 |
| 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 51 |
| 11. ANEXOS .....  | 60 |



## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1:</b> Daño típico de los tubérculos de papa ocasionado por <i>T. solanivora</i> .....   | 18 |
| <b>Figura 2.</b> Comparación entre intervalos de concentración de DL50 para toxicidad aguda. (Pitre L, 2008).....  | 19 |
| <b>Figura 3.</b> Estructura química de las moléculas involucradas en la comunicación celular bacteriana mediante el sistema de Quorum sensing. A. Péptidos autoinductores (AIP), B. N–acil homoserina lactonas (AHLs) C. Moléculas autoinducer-2 (AI-2). Fuente: (Schikora, 2016 <sup>[35]</sup> ).....                                      | 22 |
| <b>Figura 4.</b> Mecanismos generales de quorum sensing microbiano mediado por AHLs. Fuente: (Acosta, J. 2011. <sup>[36]</sup> ).....  | 22 |
| <b>Figura 5.</b> Estructura química de las Moléculas N-acil-homoserina lactonas. N corresponde al enlace amida entre el anillo de lactona y la cadena acilo. R1 es un hidrógeno, oxígeno o hidroxilo y R2 corresponde a la cadena acilo que puede ser de 4 a 14 carbonos y presentar diferentes saturaciones. Fuente: (Acosta, J. 2011)..... | 23 |
| <b>Figura 6.</b> Método de siembra para determinar la compatibilidad de dos o más bacterias.....   | 33 |
| <b>Figura 7.</b> Patrón de distribución de los discos en un medio de cultivo.....  | 35 |
| <b>Figura 8.</b> Curva de crecimiento de <i>Raoultella</i> sp. comparada con <i>Raoultella</i> sp. suplementada con AHLs exógenas (AHL-C4 y AHL-C6) a concentraciones de [25], [50] y [100] nM. La fase exponencial termina a los 500 minutos en todas las concentraciones, donde se estabiliza hasta completar los 2000 minutos.....        | 36 |
| <b>Figura 9.</b> Producción de ácido cianhídrico con suplementación de AHLs exógenas (AHL-C4 y AHL-C6) a tres concentraciones [25], [50] y [100] nM.....   | 38 |
| <b>Figura 10. Viabilidad de <i>Raoultella</i> sp. almacenada a 4 y 18°C:</b> Se representa la dilución 10 <sup>9</sup> de los tres transportadores (turba, líquido y aserrín) almacenados a 4°C y 18°C.....  | 39 |
| <b>Figura 11.</b> Enfrentamiento de bacterias promotoras de crecimiento y productoras de AHLs (A).TN26, TN503 Y TN106, (B) TN26, TN503 Y TN33 contra <i>Raoultella</i> sp..  | 40 |
| <b>Figura 12.</b> Disminución del porcentaje de daño respecto al control de papas, causado por <i>T. solanivora</i> utilizando como transportador turba inoculada a una absorbancia de 0,2 nm.....   | 41 |

**Figura 13.** Sensidiscos impregnados con tres plaguicidas de síntesis química (L: Lorsban, K: Karate 2, F: Fulminator) a 5 concentraciones (diluciones en base 10), en agar nutritivo sembrado de forma masiva con *Raoultella* sp.....41

**Figura 14.** Agar nutritivo suplementado con tres plaguicidas de síntesis química (L: Lorsban, K: Karate 2, F: Fulminator) a una concentración del 100% (uso en campo), sembrado de forma masiva con *Raoultella* sp. por 24 horas incubados a 30°C.....42

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> Medida de la longitud y el área de proteasas, sideróforos y motilidad tipo <i>swarming</i> ..... | 38 |
|--|----|

## LISTA DE ANEXOS

|  |    |
|--|----|
| <b>Anexo 1.</b> Resultados proteasas.....                                      | 58 |
| <b>Anexo 2.</b> Resultados sideróforos.....                                    | 58 |
| <b>Anexo 3.</b> Escala colorimétrica de Guignard para la expresión de HCN..... | 59 |
| <b>Anexo 4.</b> Resultados Motilidad tipo <i>swarming</i> .....                | 59 |

## 1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de papa en Colombia es muy importante para la economía y seguridad alimentaria del país, ya que, este alimento hace parte de la dieta diaria de la mayoría de hogares colombianos. Anualmente se cultivan unas 60 variedades de papa en 130.000 hectáreas con una producción de 2,7 millones de toneladas que abastecen el mercado nacional <sup>1</sup>, generando cerca de 264 mil empleos totales, de los cuales aproximadamente 75 mil son empleos directos y alrededor de 189 mil son indirectos, existen unas 100 mil familias que se dedican al cultivo de papa en 10 departamentos y 283 municipios. El cultivo de papa se ve afectado por una gran variedad de plagas, en donde se destaca *Tecia solanivora* conocida como polilla guatemalteca, siendo una de las plagas más invasivas e importante <sup>2</sup>. En su estado larval causa daños directos a los tubérculos tanto en campo como en almacén afectando la calidad de los mismos y ocasionando pérdidas económicas entre el 30-50% de los costos de producción. Para el control de *T. solanivora* los agricultores utilizan plaguicidas químicos que no controlan de forma efectiva esta plaga. Sin embargo, sí ocasionan problemas secundarios como resistencia de la plaga a los insecticidas, destrucción de los enemigos naturales y presencia de residuos químicos en los tubérculos. Además, existe un alarmante nivel de intoxicación por plaguicidas en las comunidades campesinas, contaminación de los suministros de aguas y daños irreversibles en los suelos <sup>3</sup>.

Para aumentar la producción de papa, proteger al productor, a los consumidores y medio ambiente, se requiere un enfoque integral de protección de los cultivos que comprende diversas estrategias <sup>3</sup>: (1) promover la presencia de depredadores naturales de las plagas, (2) producir variedades mejoradas con mayor resistencia a las plagas y las enfermedades, (3) sembrar papas de semillas certificadas, (4) producir los tubérculos en rotación con otros cultivos, y (5) utilizar composta orgánica para mejorar la calidad del suelo <sup>3</sup>. De igual modo, se han investigado nuevas alternativas para el control de plagas, entre éstas se encuentra el control biológico mediante el uso de microorganismos entomopatógenos, los cuales tienen menor impacto sobre el ambiente y la salud humana <sup>4</sup>. Entre los microorganismos más evaluados ésta *Bacillus thuringiensis* y *Pseudomonas*.

En la presente investigación se analizó la actividad entomopatógena de *Raoultella* sp. contra *T. solanivora* mediante el uso de AHLs exógenas (C4 - AHL Y C6 - AHL) a concentraciones de [25], [50] y [100] nM respectivamente, además, se realizará una co-inoculación mediante una formulación preliminar y se determinará su compatibilidad con insumos agrícolas; así, evaluar una rizobacteria (*Raoultella* sp.) como alternativa de control biológico contra *T. solanivora* con el fin, de reducir el uso de plaguicidas químicos y sus efectos negativos, de igual modo, se estimó una manera de promover el crecimiento del cultivo de papa a través de una bacteria promotora de crecimiento.

## 2. ANTECEDENTES

El control biológico fue concebido a inicios del siglo XIX para restablecer el equilibrio ecológico mediante la utilización de organismos vivos o sus metabolitos al eliminar o reducir los daños causados por organismos perjudiciales <sup>5</sup>.

Desde entonces, muchos se han dedicado a buscar el mejor biocontrolador de las plagas que más afectan la agricultura; un estudio en el 2004 demostró que el salvado de trigo y homogeneizado de larvas de *Tecia solanivora* potenciaban la actividad biocontroladora y enzimática (N-acetilglucosaminidasa, quimoelastasa proteasa y  $\beta$ -esterasa) de *Serratia mercencens*. Se determinó que las suplementaciones de salvado de trigo generaban una mortalidad de un 65%, mientras los controles negativos el 48,5%; y un 59% cuando creció en el medio con homogeneizado de larvas <sup>7</sup>.

*Bacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces* son los géneros más frecuentemente usados como biocontroladores contra insectos, hongos y nemátodos. Donde, *Bacillus thuringiensis* es el insecticida biológico más utilizado en el mundo para controlar diversos insectos y organismos plaga, que afectan la agricultura, la actividad forestal y transmiten patógenos a humanos y animales <sup>6</sup>.

*T.solanivora*, más conocida como polilla guatemalteca de la papa, es una de las plagas más importantes en la agricultura, debido al gran porcentaje de daños y pérdidas económicas que causa a los cultivos de papa, es por esto que se ha intentado crear un producto que combata esta plaga y sea amigable con el ambiente. En el 2012, se creó un producto biológico a base de *Baculovirus* y *Bacillus thuringiensis* contra *T. solanivora*; que al ser ingerido por la larva, las partículas virales, una vez en el tracto digestivo del insecto liberan los viriones y atraviesan la membrana peritrófica del intestino medio. Posteriormente los viriones entran en las células epiteliales del intestino medio hasta llegar al núcleo donde se produce la multiplicación viral y causa la lisis celular afectando todos los sistemas de la larva, causando así su muerte en un 98% <sup>8</sup>.

Gómez, demostró que *Baculovirus* proporciona un control efectivo de *T. solanivora* en cultivos de papa y, especialmente, en papas almacenadas. Para ello

se realizó un estudio con una formulación a base de carbonato de calcio. Los ensayos se llevaron a cabo, en condiciones de almacenamiento; para este estudio se realizaron dos ensayos, en la primera se trató a *T. solanivora* con carbonato de calcio, el cual se vio afectada por la humedad relativa y se redujo la mortalidad a 55.4% y otra con carbonato de calcio en combinación con *Baculovirus* y *B. thuringiensis* que causó 95.0–99.8% de mortalidad de *T. solanivora*; en los dos los tratamientos se redujo la infestación en tubérculos de papa en 83.6 % –91.0%. <sup>11</sup>.

Otro producto a base de *granulovirus*, es el denominado “*Baculovirus Corpoica*”, único registrado en Colombia, presentando una eficacia del 80% contra *T. solanivora*, compatible con otros productos y el medio ambiente <sup>9</sup>. Quiroga comprobó la estabilidad de formulación a base de granulovirus, demostrando que un almacenamiento a 20°C mantiene las características fisicoquímicas del producto además de reducir los costos de almacenamiento <sup>10</sup>.

Una rizobacteria que ha sido reportada como controladora de agentes fitopatógenos es *Raoultella* sp., Pantoja. L, en el 2018 en su trabajo manifiesta que *Raoultella* sp. es productora de sideróforos, proteasas, HCN y tiene movilidad tipo swarming, además de ser productora de AHLs. Anandhakumar y Zeller en el 2008, reportan que *Raoultella terrigena*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Pseudomonas fluorescens* presentaron el mayor efecto inhibitorio frente al crecimiento del micelio de *Phytophthora* spp, reduciendo la enfermedad hasta un 59%<sup>12</sup>. Para el 2009 Kotan et al, reportan que *Raoultella* sp. mostró un halo de inhibición de 16-18 mm contra *Aspergillus flavus*, fitopatógeno de limón <sup>13</sup>

Li, et. al <sup>14</sup> , caracterizaron bacterias endofíticas nematicidas frente al control de *Meloidogyne incognita* en tomate. Los resultados establecieron que *Raoultella terrigena* y *Pseudomonas reinekei* aplicado por separado o combinado con residuos de *Wasabia japonica* fresca son agentes de bioprotección contra *M. incognita* en plantas de tomate.

En una investigación hecha por Yu. VC, et al en el 2011, determinan que otra capacidad que se puede asociar a la actividad entomopatógena de *Raoultella* sp. es la producción de tetrodotóxina, una toxina que se encuentra en el pez globo, *Takifugu niphobles*, recogido de las aguas costeras de Hong Kong, se aisló del



intestino del pez globo y se demostró que producía tetrodotóxina (TTX) mediante bioensayo de ratón, ELISA y espectrometría de masas (MALDI-TOF) <sup>15</sup>.

Así mismo, existen antecedentes de *Raoultella* sp. como bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPR) en plantas de trigo. Metin T y Fikrettin S, en 2007 y 2008, llevaron a cabo un estudio de campo en dos lugares diferentes en la parte oriental de Turquía para investigar los efectos de cepas (*Azospirillum*, *Bacillus*, *Paenibacillus polymyxa*, *Raoultella terrigena*) de PGPR solubilizantes y de fijación de nitrógeno. Todas las aplicaciones de inoculaciones y fertilizantes aumentaron significativamente el rendimiento de granos, biomasa total y macro y micro nutrientes del trigo sobre el control. Todas las inoculaciones bacterianas, especialmente la inoculación mixta, aumentaron significativamente la absorción de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg y S) y micronutrientes (Fe, Mn, Zn y Cu) de la parte de granos, hojas y paja de la planta <sup>16</sup>.

La efectividad de un biocontrolador va ligado a la tecnología de aplicación utilizada, es por esto que se han estudiado diversos materiales como transportadores de una bioformulación. Pallo y Velasteguí <sup>17</sup>, hicieron una evaluación de soportes sólidos y líquidos, para la producción de un biofertilizante a base de *Azospirillum* spp. aplicable al cultivo de maíz. De acuerdo al análisis estadístico, a los 180 días de almacenamiento, el soporte sólido que mantiene mayor concentración bacteriana es turba con vermiculita, con  $5.52 \times 10^8$  UFC en un gramo. Con respecto al soporte líquido, el tratamiento con mayor población bacteriana es: solución de melaza al 2%, con una concentración de  $3.86 \times 10^8$  UFC en un ml.

En el 2016, Kumar et, al. estudiaron dos transportadores (carbón vegetal y ceniza) para la preparación de bioformulaciones, utilizaron dos rizobacterias *Bacillus* sp. A30 y *Burkholderia* cepa L2, y su efecto sobre el crecimiento de *Lycopersicon esculentum* Mill. (tomate); la viabilidad de las cepas se determinó en función del número de unidades de formación de colonias (ufc), en un intervalo de 60 días durante un período de 240 días. A través, de la investigación realizada, determinaron que el carbón vegetal como transportador inoculado con la cepa L2 tuvo un mayor recuento de unidades formadoras de colonias, además, presentó una mayor viabilidad de la cepa. Al realizar el estudio en el suelo observaron que ésta

bio-formulación mejora la fertilidad del suelo y promueve crecimiento de la planta de tomate <sup>18</sup>.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Cultivo de papa

La papa es un cultivo de importancia a nivel mundial y nacional, ya que constituye una de las fuentes vegetales más nutritivas, debido a su alto contenido de carbohidratos y proteínas superior al que se encuentra en los cereales, raíces y otros tubérculos <sup>19</sup>. El cultivo de papa es la principal actividad agrícola de clima frío, los sectores más adecuados para su respectivo cultivo se ubican desde los 2400 a 3700 metros sobre el nivel del mar <sup>20</sup>.

En Colombia, la más alta producción se concentra en los departamentos de Boyacá, Cundinamarca, Nariño y Antioquia <sup>21</sup>. De acuerdo a FEDEPAPA, en el país existen cerca de 40 variedades de papa cultivadas, pero sólo 12 de ellas cuentan con importancia comercial.

Las plagas que generan mayor impacto económico en el cultivo de papa en Colombia, en su mayoría están representadas por insectos, entre los cuales se encuentran: el gusano blanco de la papa (*Premnotrypes vorax*), la polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*), tiroteador (*Naupactus sp*), polilla pequeña o palomilla (*Phthorimaea operculella*), la chisa, mojoyoy o morrongo (*Ancognatha scarabaeoides*), *Phyllophaga obsoleta* y la babosa (*Milax gagates*). *Tecia solanivora* se considera la plaga de mayor impacto económico en el cultivo de la papa por los daños ocasionados al cultivo y en almacenamiento del tubérculo destinado al consumo fresco directo, industrialización o para semilla <sup>22</sup>.

#### 3.2 *Tecia solanivora*

*Tecia solanivora* es un insecto que hace parte del complejo de polillas pertenecientes a la familia Gelechiidae (Orden Lepidoptera) que ataca al cultivo de la papa (*Solanum tuberosum L.*). Se le conoce con varios nombres comunes: polilla gigante, palomilla grande, polilla centroamericana, gusano guatemalteco y, principalmente, como polilla guatemalteca <sup>23</sup>.

Se reportó su introducción a Venezuela en 1983. Dos años después, en 1985, se constató por primera vez su presencia en Colombia en el departamento de Norte de

Santander de donde se diseminó al resto de las zonas paperas del país. Finalmente, la polilla se propagó a las zonas paperas del Ecuador, en 1996 <sup>24</sup>.

El detrimento que esta ocasiona al cultivo genera grandes pérdidas económicas, debido a que el daño en el tubérculo va desde el deterioro de la apariencia hasta que los tubérculos severamente afectados no pueden ser utilizados como semilla, ni para consumo humano y animal <sup>25</sup>. Debido a esta problemática se han buscado alternativas para el control de *T. solanivora*, entre ellas se encuentran: la manipulación del suelo, la selección de la semilla, productos biológicos, trampas con feromonas sexuales y los más utilizados insecticidas de síntesis química con 12 a 24 aplicaciones por período de cultivo <sup>26</sup>, ocasionando que el cultivo de papa en Colombia sea uno de los cultivos agrícolas con mayor demanda de plaguicidas químicos <sup>27</sup>.







**Figura 1:** Daño típico de los tubérculos de papa ocasionado por *T. solanivora*.

### 3.3 Plaguicidas de síntesis química

Los plaguicidas o también llamados insecticidas, son sustancias químicas—orgánicas, inorgánicas o microbiológicas, líquidas o sólidas. Según la FAO, un plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como

reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte. Estos surgen debido a la necesidad de combatir poblaciones de organismos nocivos para la sanidad humana, de cultivos, o frutos almacenados y la de animales domésticos <sup>28</sup>.

Todos los plaguicidas pueden ser o no tóxicos para el ser humano y los animales, pero lo son en distintos grados, su toxicidad se da por encima de ciertos umbrales. A partir de los criterios de toxicidad aguda, crónica o de irreversibilidad del efecto, éstos se clasifican como: muy tóxico, tóxico o nocivo según la capacidad del producto químico de producir el daño. Éste podrá incluir efectos letales agudos, efectos irreversibles no letales o efectos graves tras exposición prolongada o repetida. La clasificación se basa tanto en los efectos agudos como a largo plazo que producen sustancias y preparados como consecuencia de una sola exposición o de exposiciones repetidas o prolongadas <sup>29</sup>.

| GHS                                | Categoría 1   | Categoría 2   | Categoría 3  | Categoría 4   | Categoría 5                           |
|------------------------------------|---|---|--|---|---------------------------------------|
| Símbolo de comunicación de peligro |  |  |  |  | Sin símbolo                           |
| Palabra de advertencia             | Peligro   | Peligro   | Peligro  | Atención  | Atención                              |
| Indicación de peligro              | Mortal en caso de ingestión   | Mortal en caso de ingestión   | Tóxico en caso de ingestión  | Nocivo en caso de ingestión   | Puede ser nocivo en caso de ingestión |
| DL <sub>50</sub> mg/Kg             | 5   | 50  | 300  | 2000  | 5000                                  |

**Figura 2.** Comparación entre intervalos de concentración de DL50 para toxicidad aguda. (Pitre L, 2008)

En este caso se analizaron tres plaguicidas utilizados en el cultivo de papa contra *T. solanivora*:

1. Karate Zeon: Grado 4 de toxicidad. Ingrediente activo: Lamdacialotrina: ácido ciano-3-fenoxibencil-3-(2-cloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enil)-2,2-dimetilciclopropano carboxilat <sup>30</sup>.

2. Fulminator 600EC: Grado 4 de toxicidad. Ingrediente activo: Profenofos + Cipermetrina <sup>30</sup>.
3. Lorsban 4E Grado 2 de toxicidad, Ingrediente activo: O, O -dietil-O-(3,5,6-tricloro-2-piridinil) organofosforados <sup>30</sup>.

### **3.4 Actividad Entomopat6gena**

El control biol6gico es la regulaci6n de un organismo como consecuencia de la actividad de otro, lograndose con ello un equilibrio poblacional. Esta actividad en el 6mbito de la agricultura, significa la regulaci6n de la poblaci6n de un organismo que est6 afectando al cultivo y generando p6rdidas econ6micas (plaga), mediante la acci6n de otro que naturalmente ha sido dise1ado para ejercer dicha funci6n. Se han definido tres tipos de controladores en el 6mbito entomol6gico: los depredadores, que son artr6podos (insectos y ar6cnidos) y que atrapan a su presa devor6ndola; los parasitoides, que de forma interna o externa se alimentan de un hospedante (la plaga) y limitan su estabilidad; y los entomopat6genos, que pueden ser hongos, bacterias, virus u otros microorganismos que provocan enfermedades en los insectos <sup>31</sup>. El t6rmino entomopat6geno se refiere al microorganismo que es capaz de causar una enfermedad al insecto plaga, conduciendo a su muerte despu6s de un corto per6odo de incubaci6n <sup>32</sup>.

La mayor6a de las bacterias entomopat6genas invaden a sus hospederos al ser ingeridas las esporas proteicas t6xicas, aparentemente se insertan en las membranas del intestino medio, aumentando la conductividad del potasio de las membranas apicales de c6lulas columnares; llevando a la ruptura de los gradientes el6ctricos de potasio y aumentando el pH de la hemolinfa, causando la destrucci6n parcial del intestino medio (mesenteron), sobreviviendo una septicemia consecuente, se paraliza el cuerpo y el intestino medio, en algunos casos da1ando la lignina, el cad6ver del insecto se torna oscuro, por la oxidaci6n de la hemolinfa y crecen gran cantidad de bacterias saprofitas provenientes de su tracto digestivo (flora intestinal y del alimento) como del medio que lo rodea, el cuerpo se descompone en forma floculenta con excepci6n del integumento (exoesqueleto), posteriormente se seca y endurece, la mortalidad resulta del desequilibrio del

contenido básico hipotónico del intestino medio y la hemolinfa; en algunos casos la muerte se da por la septicemia o disentería o ambas, después de la germinación de las esporas <sup>32</sup>.

### **3.5 *Raoultella* sp.**

*Raoultella* sp. es una bacteria gram negativa en forma de varilla, oxidasa negativa, aeróbica, encapsulada y no formadora de esporas. Se recuperó principalmente del suelo y se considera como una especie no patógena, aunque alberga numerosos factores de virulencia encontrados en *Klebsiella pneumoniae* <sup>33</sup>.

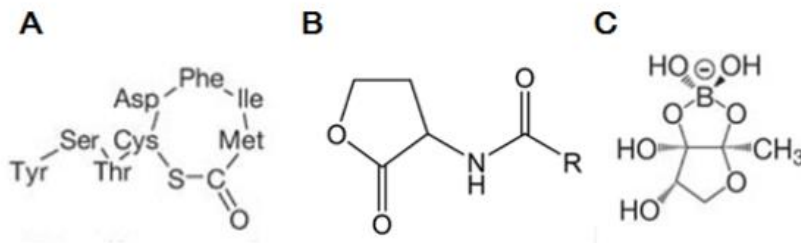
### **3.6 Mecanismos de acción de *Raoultella* sp.**

*Raoultella* sp como todos los seres vivos exhiben mecanismos biológicos, que las facultan para adecuarse a diversas presiones ambientales. Esta rizobacteria promotora del crecimiento de plantas, productora de AHLs y actividad entomopatógena, actúa mediante mecanismos como la supresión de enfermedades producidas por microorganismos patógenos mediante diversos mecanismos de acción como: producción de sideróforos, proteasas, ácido cianhídrico, y una movilidad de tipo *swarming* <sup>34</sup>.

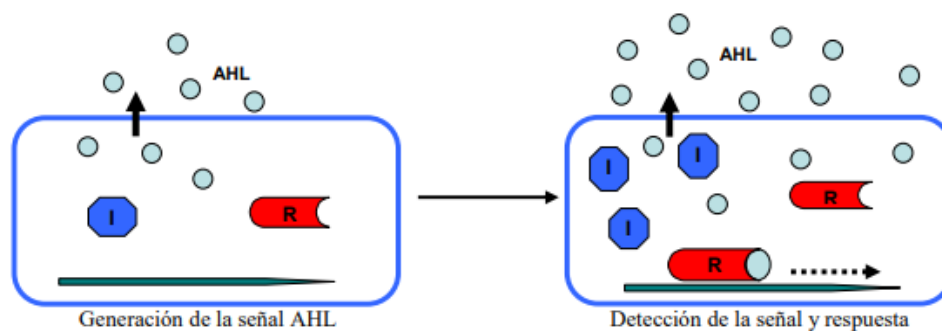
#### **3.6.1 Quorum sensing (QS)**

Quorum sensing (QS) es un mecanismo de comunicación celular a través del cual las moléculas de señal llamadas autoinductores activan receptores específicos asociados con señales de transcripción para controlar diversos procesos bioquímicos. Algunos de estos procesos son la formación de biofilms, la expresión de factores de virulencia, la luminiscencia, la producción de pigmentos y los mecanismos de resistencia a las condiciones de estrés, que son de gran importancia en la patogenia bacteriana <sup>35</sup>. Estos mecanismos han sido demostrados en varias

bacterias grampositivas y gramnegativas, representando señales inter e intracelulares que generan beneficios para grupos locales o poblaciones enteras de microorganismos basados en la difusión y detección de moléculas señal llamadas “Autoinductores” (AIs), las cuales por lo general son compuestos de bajo peso molecular (Acil Homoserina Lactonas) en bacterias gramnegativas y péptidos, en bacterias grampositivas <sup>36</sup>.



**Figura 3.** Estructura química de las moléculas involucradas en la comunicación celular bacteriana mediante el sistema de Quorum sensing. A. Péptidos autoinductores (AIP), B. N–acil homoserina lactonas (AHLs) C. Moléculas autoinducer-2 (AI-2). Fuente: (Schikora, 2016 <sup>[37]</sup>).



**Figura 4.** Mecanismos generales de quorum sensing microbiano mediado por AHLs. Fuente: (Acosta, J. 2011.<sup>[38]</sup>).

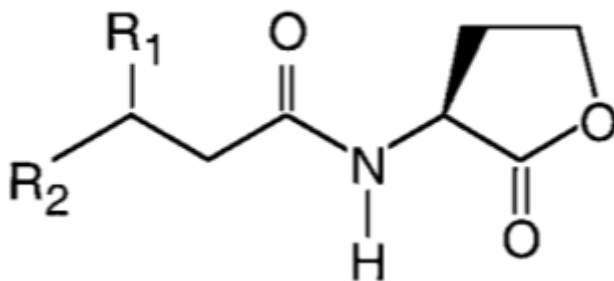
### 3.6.2 N - acil homoserina lactona

Se han caracterizado varios sistemas de señalización, pero el sistema predominante en bacterias Gram negativas se basa en N- acil- 1- homoserina lactonas (AHLs) <sup>39</sup>. Las AHLs son producidas por enzimas específicas, que se difunden libremente a través de las membranas bacterianas hasta alcanzar una concentración umbral,



siendo captadas por receptores determinados <sup>40</sup>. Estas contienen un anillo común de homoserina lactona, que difiere en su longitud de carbono (4 a 18 carbonos), el grado de saturación y la presencia de modificaciones de la cadena acilo C3. Las AHLs son moléculas multifuncionales que cuando se acumulan regulan funciones relevantes durante el crecimiento bacteriano, como la producción de enzimas extracelulares, bioluminiscencia, formación de biofilm y actividades celulares coordinadas asociadas con interacciones de patógenos del huésped <sup>41</sup>.

Las moléculas señal AHLs son derivadas de la síntesis de la proteína 1 que está regulada por el gen LuxI, de la familia de S-adenosil metionina y una proteína derivada de acilo, la señal se une a un gen regulador LuxR que tiene dos dominios de unión, un dominio N-terminal de AHL y un dominio C-terminal de unión al ADN, este complejo sirve como transcriptor de genes estructurales <sup>42</sup>.



**Figura 5.** Estructura química de las Moléculas N-acil-homoserina lactonas. N corresponde al enlace amida entre el anillo de lactona y la cadena acilo. R1 es un hidrógeno, oxígeno o hidroxilo y R2 corresponde a la cadena acilo que puede ser de 4 a 14 carbonos y presentar diferentes saturaciones. Fuente: (Acosta, J. 2011. <sup>[38]</sup>).

### 3.6.3 Proteasas

Se conocen como proteasas a las enzimas que catalizan la degradación de las proteínas (proteólisis) mediante la adición de una molécula de agua en los enlaces peptídicos <sup>43</sup>. Las proteasas catalizan la degradación de las proteínas al hidrolizar los enlaces peptídicos. Estas se clasifican según el tipo de reacción que catalizan y son de cinco clases: metaloproteasas, cisteína, serina, treonina proteasas y aspártico <sup>44</sup>.

### 3.6.4 Sideróforos

El mejor mecanismo por medio del cual las bacterias captan hierro son los sideróforos, los cuales son compuestos de bajo peso molecular que quelan el hierro con alta afinidad en presencia de otros metales, el hierro se encuentra en la naturaleza en forma  $Fe_3^+$  lo que lo hace poco soluble en ambientes acuosos, lo que hace los sideróforos es reducirlo a  $Fe_2^+$  permitiendo que sea así más soluble y facilite su uso <sup>45</sup>. Existen tres tipos principales de sideróforos: catecoles, hidroxamatos y un tercero que es una combinación de ambos. Los sideróforos son producidos por la bacteria y excretados al medio en el cual se unen al hierro y el complejo sideróforo-hierro se une a receptores para sideróforo en la superficie bacteriana, una vez que se ha internalizado el complejo sideróforo-hierro, éste es roto para que libere el hierro en el interior de la bacteria. Algunas bacterias no solo producen sus propios sideróforos sino también producen receptores capaces de unir sideróforos producidos por otras bacterias <sup>46</sup>.

### 3.6.5 Movilidad tipo *swarming*

El desplazamiento *swarming*, es un tipo de movilidad que presentan las bacterias en ambientes semi sólidos, donde intervienen, tanto una modificación morfológica (aumento de tamaño celular y producción de múltiples flagelos laterales), como la producción de sustancias, conocidas como bio-surfactantes, que ayudan a romper la tensión superficial <sup>47</sup>.

Las bacterias sufren alteraciones ultraestructurales e inician el desplazamiento a partir del borde de la colonia y luego de unas dos horas se da la fase de consolidación, donde se detienen o aminoran la velocidad, aumentando la densidad de la población en ese punto e inician nuevamente otro ciclo similar <sup>48</sup>.

Este fenómeno ocurre en tres fases: diferenciación, migración y consolidación. La fase de diferenciación está asociada con cambios morfológicos espectaculares, regulados genéticamente por la activación y desactivación de genes, condicionada por factores ambientales, como la disponibilidad de nutrientes y la incapacidad de

los flagelos para rotar cuando la bacteria está en un medio sólido. La fase de desplazamiento se da luego de la transfiguración. En ella los bacilos filamentosos del borde de la colonia se disponen paralelamente en grupos e inician un desplazamiento activo, a una velocidad de unas 10 a 15  $\mu\text{m}$  por segundo, que podría ser causado por el batir de los flagelos sobre una superficie sólida. La fase de consolidación se asocia al detenimiento o a una disminución de la velocidad de desplazamiento, durante la cual las bacterias filamentosas reinician la división activa para dar nuevamente las formas cortas; en este período la masa de bacterias aumenta en ese punto donde se detuvo la colonia, por lo que el borde se observa más grueso <sup>49</sup>.

### **3.6.6 Ácido Cianhídrico**

El ácido cianhídrico (HCN) es un metabolito secundario de varios microorganismos, este se puede producir directamente del metabolismo de la glicina y de glicósidos cianogénicos los cuales se encuentran en exudados de raíz <sup>50</sup>. Los precursores biológicos del cianuro son comúnmente aminoácidos. La tirosina, la fenilalanina, la valina o la isoleucina se metabolizan en glucósidos cianogénicos, que a su vez pueden degradarse a varios productos, incluido el HCN, plantas cianogénicas. La glicina generalmente ha sido el precursor indicado de cianuro en hongos y bacterias <sup>51</sup>.

Los glucósidos cianogénicos se componen de una aglicona de tipo alfa-hidroxinitrilo y de un resto de azúcar (principalmente D-glucosa). La producción de HCN depende tanto de la síntesis de glicósidos cianogénicos como de la existencia (o ausencia) de sus enzimas degradantes. La generación de HCN a partir de glicósidos cianogénicos es un proceso de dos pasos que implica una desglicosilación y una escisión de la molécula (regulada por beta-glucosidasa y alfa-hidroxinitrilasa) <sup>52</sup>.

### **3.7 Formulación**

El uso excesivo e indiscriminado de fertilizantes agroquímicos provoca un deterioro alarmante en la salud del suelo y la flora del mismo. La presencia continua de estos agroquímicos tiene una influencia negativa y perjudicial para el medio ambiente, lo

que puede inducir efectos tóxicos en la salud humana <sup>53</sup>. Por esta razón se están evaluando métodos alternativos al de los insecticidas, el uso de Agentes de Control Biológico, representa una alternativa importante y compatible como estrategia de manejo de plagas. Las formulaciones microbianas son preparaciones basadas en transportadores que contienen microorganismos beneficiosos en un estado viable destinado a la aplicación de semillas o al suelo <sup>15</sup>. La bio-formulación está basada generalmente en transportadores sólidos, suspensiones, talcos y líquidos <sup>16</sup>. Uno de los objetivos importantes de la formulación de inoculantes es proporcionar un microambiente más adecuado, combinado con protección física durante un período prolongado para prevenir una disminución rápida de las bacterias introducidas. El éxito de las formulaciones basadas en transportadores depende principalmente de la cepa bacteriana utilizada para el inoculante <sup>16</sup>.

Los transportadores también tienen un papel importante en la formulación, este se refiere al sustrato abiótico (sólido, líquido o gel) que se usa en el proceso de formulación. Los transportadores de inoculantes se pueden dividir en cinco categorías: (1) turba, carbón, carbón vegetal, arcillas y suelo inorgánico; (2) materiales de plantas de desecho de diversos orígenes industriales y agrícolas; (3) materiales inertes, polímeros y fragmentos de roca tratados, tales como vermiculita y perlita; (4) cultivos microbianos liofilizados simples y una mezcla de aceite y bacterias secas (estas preparaciones pueden incorporarse posteriormente en un vehículo sólido o usarse tal cual); y (5) inoculantes líquidos <sup>54</sup>.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Potenciar la actividad de *Raoultella* sp. como entomopatógena de *T. solanivora* mediante el uso de AHLs (Acil homoserin lactona), co-inoculaciones, una formulación preliminar y compatibilidad con insumos agrícolas.

### 4.2 Objetivos específicos

1. Definir los mecanismos asociados a la actividad entomopatógena de *Raoultella* sp. que se afectan mediante la suplementación de moléculas acil homoserin lactona exógenas.
2. Determinar la viabilidad del inóculo de *Raoultella* sp. mediante la formulación de tres transportadores.
3. Evaluar la co-inoculación entre *Raoultella* sp. y una rizobacteria promotora de crecimiento vegetal y productora de AHLs sobre la mortalidad de *T. solanivora*.
4. Determinar la compatibilidad de *Raoultella* sp. con los insumos de síntesis química más usados en el cultivo de la papa.

## 5. DISEÑO METODOLÓGICO

- **Tipo de investigación:** Descriptivo y transversal
- **Universo:** Rizobacterias con potencial entomopatógeno y productoras de moléculas señal tipo N-Acil Homoserina Lactona asociadas a cultivos de papa.
- **Población:** Rizobacterias con potencial entomopatógeno asociada a cultivos de papa.
- **Muestra:** *Raoultella* sp. con actividad entomopatógena asociada a cultivos de papa.

| OBJETIVO  | VARIABLE   | INDICADOR   |
|---|--|---|
| <p><b>Objetivo 1.</b><br/>Definir los mecanismos asociados a la actividad entomopatógena de <i>Raoultella</i> sp. que se afectan mediante la suplementación de moléculas acil homoserin lactona exógenas.</p> | <p><b>Variable dependiente:</b><br/>Mortalidad de <i>T. solanivora</i><br/><b>Variable independiente:</b><br/>Moléculas</p>  | Número de larvas de <i>T. solanivora</i> muertas  |
| <p><b>Objetivo 2.</b><br/>Determinar la viabilidad del inóculo de <i>Raoultella</i> sp. mediante la formulación de tres transportadores.</p>  | <p><b>Variable dependiente:</b><br/>Crecimiento de <i>Raoultella</i> sp.<br/><b>Variable independiente:</b><br/>Transportadores: turba, aserrín, medio líquido</p> | Viabilidad de <i>Raoultella</i> sp. en los transportadores utilizados.                    |
| <p><b>Objetivo 3.</b><br/>Evaluar la co-inoculación entre <i>Raoultella</i> sp. y una rizobacteria promotora de crecimiento vegetal y productora de AHLs sobre la mortalidad de <i>T. solanivora</i></p>      | <p><b>Variable dependiente:</b><br/>Mortalidad<br/><b>Variable independiente:</b><br/>Cepas de rizobacterias</p>   | Mortalidad de larvas de <i>T. solanivora</i> frente a la co-inoculación de rizobacterias. |

|  |   |   |
|--|---|---|
| <p><b>Objetivo 4.</b><br/>Determinar la compatibilidad de <i>Raoultella</i> sp. con los insumos de síntesis química más usados en el cultivo de la papa.</p> | <p><b>Variable dependiente:</b><br/>Resistencia</p> <p><b>Variable independiente:</b><br/>Insumos de síntesis química</p> | <p>Resistencia de <i>Raoultella</i> sp. a los insumos de síntesis química</p> |
|--|---|---|

### 5.1 Obtención de *Raoultella* sp.

*Raoultella* sp. fue obtenida del cepario de la Universidad Antonio Nariño la cual está conservada en glicerol al 20% a -70°C. Estas fueron aisladas de suelo rizosférico de papa según se describe en Botiva et al. <sup>55</sup> y caracterizadas por su actividad entomopatógena en Pantoja (2018) <sup>56</sup>.

### 5.2 Curva de crecimiento

La curva de crecimiento se realizó de acuerdo al protocolo de posgrado interfacultades de microbiología de la Universidad Nacional de Colombia (2005) <sup>57</sup>. El procedimiento se realizó por triplicado para comparar *Raoultella* sp. sin y suplementada con AHLs: N-butil-DL-homoserina lactona (C4-AHL) y N-Hexanoil-DL-homoserina lactona (C6-AHL) cada una con concentraciones de [25], [50] y [100] nM. Se inoculó la cepa en 5 ml de caldo LB en un falcon de 50 ml, se incubó a 30°C con agitación rotacional fuerte (200 rpm) durante 24 horas. Se tomó 1 ml de cultivo y se agregó en 50 ml de caldo LB estéril contenido en un frasco de 250ml. Para el caso del caldo que se suplementa con las AHLs: N-butil-DL-homoserina lactona (C4-AHL) y N-Hexanoil-DL-homoserina lactona (C6-AHL) se agregó las diferentes concentraciones antes de la inoculación. En el momento de la inoculación se retiró un volumen de 0,5 ml de cultivo para realizar la primera lectura a una longitud de onda de 600 nm. Luego de esto se incubó el resto de inóculo a 37°C con agitación de 200 rpm. Cada dos horas se retiró un volumen de 0,5 ml del cultivo para realizar

su respectiva lectura, esto por un periodo de tiempo de 30 horas. La gráfica se realizó con el promedio de la absorbancia de tres réplicas.

### **5.3 Proteasas**

Este ensayo se desarrolló basado en el protocolo de Suárez y Herrera (2012) con algunas modificaciones <sup>58</sup>. Para evaluar la producción de proteasas por parte *Raoultella* sp. se usaron las AHLs: N-butilil-DL-homoserina lactona (C4-AHL), N-Hexanoil-DL-homoserina lactona (C6-AHL) a tres concentraciones diferentes [25], [50] y [100] nM. El ensayo se realizó por triplicado, usando como control positivo *P. aeruginosa* PA01. Para esto se prepararon dos medios simultáneamente, medio Skin Milk y agar-agar, se autoclavaron por separado y se mezclaron por medio de agitación, para los medios que fueron suplementados con las AHLs exógenas: C4-AHL y C6-AHL, se dejó enfriar a una temperatura de 28°C antes de suplementar.

En el medio sin suplementar se sembró *Raoultella* sp. y *P. aeruginosa* 01, este último como control positivo. Los medios suplementados con las AHLs se sembraron con *Raoultella* sp. y se incubaron por 3 días a 30°C. Para la lectura, se midió la formación de un halo transparente (cm) alrededor de la colonia por medio del programa image J (National Institutes of Health de EEUU).

### **5.4 Motilidad tipo *swarming***

El ensayo de motilidad tipo *swarming* se realizó según Boyer (2008), con algunas modificaciones <sup>59</sup>, suplementando a *Raoultella* sp. con N-butilil-DL-homoserina lactona (C4-AHL), N-Hexanoil-DL-homoserina lactona (C6-AHL) en el medio. Para el ensayo se utilizó como control positivo *P. aeruginosa* PA01 y se realizó por triplicado. Se tomó una colonia bacteriana y se inoculó en un Eppendorf con 600 µl de caldo nutritivo (uno por muestra). Se agitó por 24 horas a 200 rpm. Se prepararon cajas con agar nutritivo al 0,85% con AHLs exógenas (C4-AHL y C6-AHL). Se tomó 10 µl de la suspensión bacteriana e inoculó en la mitad del medio semisólido. Se dejó secar el inóculo y se incubó durante 5 días a una temperatura de 30°C para su respectiva lectura. Las cepas positivas presentaron desplazamiento alrededor del inóculo.



## **5.5 Producción de ácido cianhídrico (HCN)**

Este procedimiento se realizó basado en Bakker et al. (1987) y Kumari-Jha et al. (2009) con algunas modificaciones <sup>59</sup>. Se sembró *Raoultella* sp. en medio King B, durante 24 horas a 30°C. Seguido se realizó una suspensión bacteriana en agua destilada estéril y se ajustó a una absorbancia de 0,02 a 500 nm. En los tubos de vidrio se inocularon 200 µl de la suspensión bacteriana en 800 µl de caldo nutritivo enriquecido con glicina y suplementados con las AHLs exógenas (C4-AHL y C6-AHL) a [25], [50] y [100] nM. Se tapó el tubo, suspendiendo del tapón la tira de papel picro-sódico sin que tuviera contacto con la muestra ni la pared del tubo, se incubó a 30°C durante 96 horas. Para la lectura se observaron los cambios de coloración producidos en el papel picro-sódico por efecto de los gases cianhídricos cada 24 horas, terminadas las 96 horas, se compararon las tiras con la escala colorimétrica de Guignard, donde un color rojo-marrón se considera positivo <sup>60</sup>.

## **5.6 Capacidad de retención de agua y pH del transportador**

La capacidad de retención de agua se midió por el contenido de humedad de cada vehículo en peso húmedo y en seco; el pH se midió en la relación de 1: 2,5 (material de soporte: agua). Se empacaron 30 g de los materiales de soporte en bolsas de polietileno y se sellaron, luego se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 121°C.

## **5.7 Método para el recuento de colonias en placa.**

Se sembró *Raoultella* sp. en caldo LB, se dejó crecer durante 24 horas a 28°C a 240 rpm. Se resuspendió y se dejó a una abs de 0,9 a 600 nm para realizar diluciones en base 10; una vez preparadas las diluciones del homogenizado de la muestra, se procedió a transferir por triplicado 300 µl de cada una de las respectivas diluciones consecutivas en cajas de petri y se llenaron con agar LB a una temperatura de 24°C, se incubó durante 24 horas a 30°C, este procedimiento se realizó cada 15 días, con el fin de, llevar a cabo la evaluación de la viabilidad del inóculo cada 15 días.

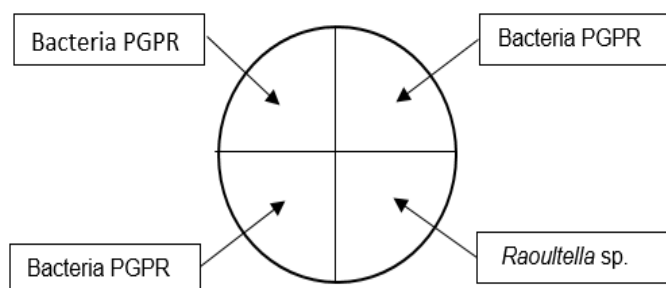
## 5.8 Preparación de la formulación

La formulación se realizó preparando buffer de fosfato a un pH 7,0, se adicionó glucosa al 1%, goma de xantano al 0.1%, triptófano al 0,03 mM, más el inóculo de *Raoultella* sp. a una absorbancia de 0,8 a 600 nm. Como control negativo se utilizó buffer de fosfato con los aditivos, pero sin inóculo. A cada uno de los transportadores se agregaron las mezclas descritas anteriormente. La turba y el aserrín se llevaron a una capacidad de retención de agua del 80% con el inóculo bacteriano. Los transportadores se sellaron para ser almacenados a temperaturas de 4°C y 18°C. Cada tratamiento se preparó con tres repeticiones. Cada quince días se determinó por series de diluciones la viabilidad del inóculo y se verificó el cambio del pH durante un periodo de 90 días.

## 5.9 Compatibilidad de bacterias PGPR y *Raoultella* sp.

Se escogieron 4 bacterias promotoras de crecimiento vegetal TN26, TN503, TN106 y TN33 evaluadas anteriormente como promotoras de crecimiento de tomate por Álvarez *et al*, en el 2018 <sup>61</sup>, para observar la compatibilidad *in vitro* con *Raoultella* sp. se utilizó la metodología empleada por Acosta *et al.*, (2007) con algunas modificaciones <sup>62</sup>, para determinar si es posible una co-inoculación entre una de las bacterias PGPR (TN 26, TN33, TN503) y *Raoultella* sp.

Se trazan dos líneas con sharpie dividiendo en cuatro partes iguales la caja de Petri en cada uno de los medios de cultivo, cada una de las bacterias se siembra enfrente de la otra, se incuba de 28 – 30°C por 24 horas. La lectura se realiza observando si hubo inhibición de crecimiento sobre *Raoultella* sp. o inhibición al lado de la misma.



**Figura 6.** Método de siembra para determinar la compatibilidad de dos o más bacterias.

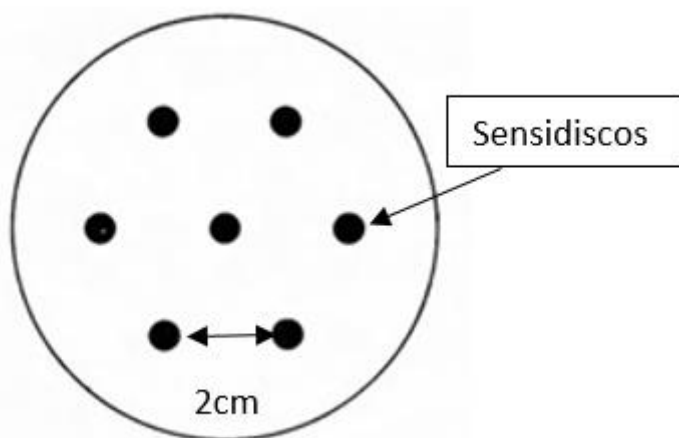
### **5.10 Bioensayo**

Este procedimiento se realizó de acuerdo al descrito por Camargo (2010) con algunas modificaciones <sup>63</sup>. Para este ensayo se utilizó co-inóculo de *Raoultella* sp. con *Serratia proteamaculans* (T503), CHAO como control positivo y como control negativo se utilizó una formulación sin inóculo. En botellas plásticas de un litro se colocó una capa de 5 cm de suelo, luego se colocaron dos papas, y se cubrió con cada uno de los transportadores y sus respectivas formulaciones descritas anteriormente. Luego se colocó una capa de suelo de 15 cm, profundidad a la que se encuentra normalmente sembrados los tubérculos en campo, sobre la capa de suelo se colocaron 50 huevos de *T. solanivora* y se recubrió con otra capa de suelo de 5 cm, y se almacena en condiciones de la cría (temperatura, humedad y luz). Se realizaron cinco repeticiones por cada uno de los inoculantes con sus respectivos transportadores (turba y aserrín). Su lectura se llevó a cabo a los 35 días de haber montado el ensayo. Este bioensayo se realizó con el fin de evaluar la capacidad entomopatógena de *Raoultella* sp. sola y co-inoculada con *Serratia proteamaculans* frente a *T. solanivora*.

### **5.11 Compatibilidad de *Raoultella* sp. con plaguicidas de síntesis química.**

Este procedimiento se realizó basado en la técnica de Kirby-Bauer (1984) <sup>64</sup>, con algunas modificaciones. En el bioensayo se utilizaron tres plaguicidas Lorsban, karate zeon y Furminator con diluciones de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-5}$ , se impregnaron en discos de papel filtro y se colocaron en agar nutritivo inoculado con *Raoultella* sp. donde se evidenció la inhibición del crecimiento de *Raoultella* sp. en las diferentes concentraciones. Para las diluciones se tomó como referencia las concentraciones utilizadas en campo (Karate Zeon 50 cm<sup>3</sup> / 100 litros/ha de agua, Lorsban 1.5 l 500-1000 litros/ha de agua, Fulminator 120 ml/ 200 L de agua) donde  $10^1$ , representa la concentración que sugiere el fabricante del plaguicida, a partir de este se hacen diluciones en base 10 hasta  $10^5$ . Para la preparación del inóculo se tomaron

colonias de *Raoultella* sp, para ajustarlo en NaCl hasta una turbidez equivalente a 0,5 de la escala de Macfarland, lo cual corresponde aproximadamente a  $10^8$  microorganismos viables por ml, o 0,074 absorbancias a 600nm, después se sembró el inóculo uniformemente sobre la superficie del medio con un aplicador de algodón estéril, haciendo esta siembra en tres direcciones. Se colocó los discos sobre la superficie del agar con un dispensador o con pinzas estériles, 6 discos en la periferia y 1 en el centro, dejando entre disco y disco un espacio uniforme (aproximadamente de 2 cm) como se muestra en la figura N° 7, para evitar que las zonas de inhibición queden superpuestas. Se incubó por 24 horas a 30°C. Para su lectura se midió la zona de inhibición de cada disco contra una superficie oscura bajo luz reflejada incluyendo los mm del disco, con una regla sobre el respaldo de la caja de Petri sin remover la tapa. Una lectura mayor a 15 mm indica que hay zona de inhibición.



**Figura 7.** Patrón de distribución de los discos en un medio de cultivo

### 5.12 Análisis estadístico

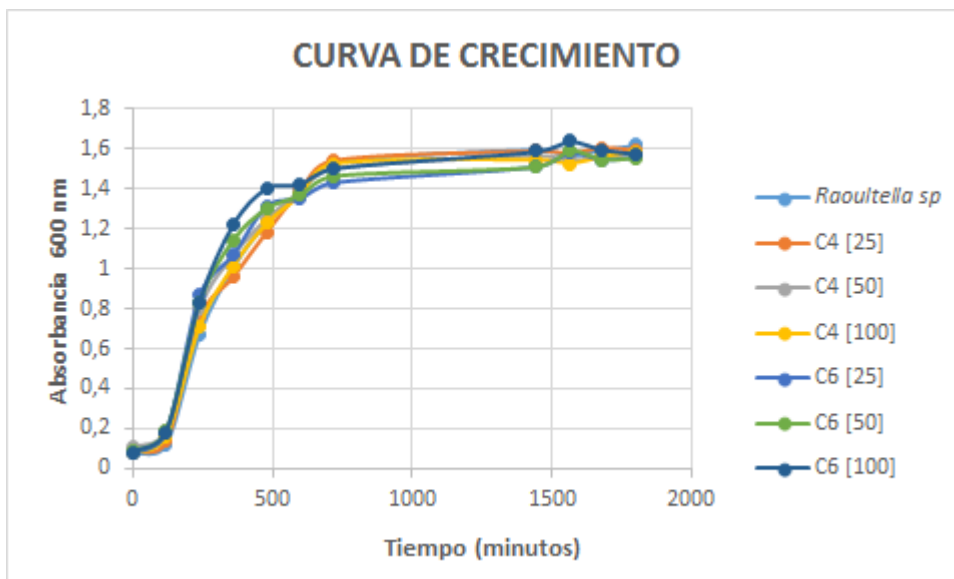
Se realizó un análisis de varianza en los parámetros evaluados, para determinar si existían diferencias significativas, mediante el software Statgraphic luego de validar los supuestos del ANOVA. Los ensayos que no cumplieron los supuestos del ANOVA, se evaluaron mediante estadística no paramétrica (prueba de Kruskal Wallis). Las varianzas de las medidas se mostraron por el error estándar y la comparación de medidas por la prueba de diferencias mínimas significativas tipo LSD o Tukey.

## 6. RESULTADOS

Con el fin de potenciar la actividad de *Raoultella* sp. como entomopatógena de *T. solanivora* mediante el uso de AHLs (Acil homoserin lactona), co-inoculaciones, una formulación preliminar y compatibilidad con insumos agrícolas se obtuvieron los siguientes resultados.

### 6.1 Efecto de las AHLs en el crecimiento de *Raoultella* sp.

El crecimiento de *Raoultella* sp. no se vio afectado después de la adición de AHLs exógenas (C4- AHL y C6-AHL) a concentraciones de [25], [50] y [100] nM (Figura N°8).



**Figura 8.** Curva de crecimiento de *Raoultella* sp. comparada con *Raoultella* sp. suplementada con AHLs exógenas (C4-AHL y C6-AHL) a concentraciones de [25], [50] y [100] nM. La fase exponencial termina a los 500 minutos en todas las concentraciones, donde se estabiliza hasta completar los 2000 minutos.

**Tabla 1.** Medida de la longitud con el error estándar y su índice de variabilidad (a,b,c,d) y el área de proteasas, sideróforos y motilidad tipo *swarming*.

| Concentración (nM) | Proteasas               |               | Sideróforos (cm <sup>2</sup> ) | <i>swarming</i> (cm <sup>2</sup> ) |
|--------------------|-------------------------|---------------|--------------------------------|------------------------------------|
|                    | Área (cm <sup>2</sup> ) | Longitud (mm) |                                |                                    |
| C47                | 0,71 (0,09) a           | 5,15 (1,23) b | 0,76 (0,23) d                  | 6,67 (1,57) c                      |
| C4 [25]            | 0,75 (0,16) a           | 3,91 (0,92) b | 2,07 (0,48) dc                 | 31,17 (4,92) cb                    |
| C4 [50]            | 0,67 (0,08) a           | 2,87 (0,29) b | 6,62 (0,4) c                   | -                                  |
| C4 [100]           | 0,63 (0,06) a           | 4,75 (1,56) b | 17,20 (1,77) b                 | 58,59 (7,84) a                     |
| C6 [25]            | 0,68 (0,08) a           | 4,21 (0,91) b | 15,94 (1,79) b                 | 36,81 (2,23) ba                    |
| C6 [50]            | 0,66 (0,08) a           | 3,29 (0,57) b | 4,66 (0,97) dc                 | 46,48 (5,47) ba                    |
| C6 [100]           | 0,72 (0,05) a           | 12,67(1,75) a | 30,25 (1,53) a                 | 6,75 (3,13) c                      |

## 6.2 Proteasas:

Se midió el área y la longitud del halo en la producción de proteasas de *Raoultella* sp. al suplementarse con AHLs exógenas (Tabla N°1). No se observaron diferencias de área en ninguno de los tratamientos. La longitud presentó aumentos significativos con C6-AHL a [100] nM. En este tratamiento *Raoultella* sp. presentó alta movilidad (Figura anexa N°1).

## 6.3 Sideróforos:

Se midió el área de la producción de sideróforos por parte de *Raoultella* sp. (Tabla N° 1), y se observó que su expresión fue mayor en el medio que se suplemento con AHLs exógenas (C4-AHL y C6-AHL) a concentraciones de [25], [50] y [100] nM

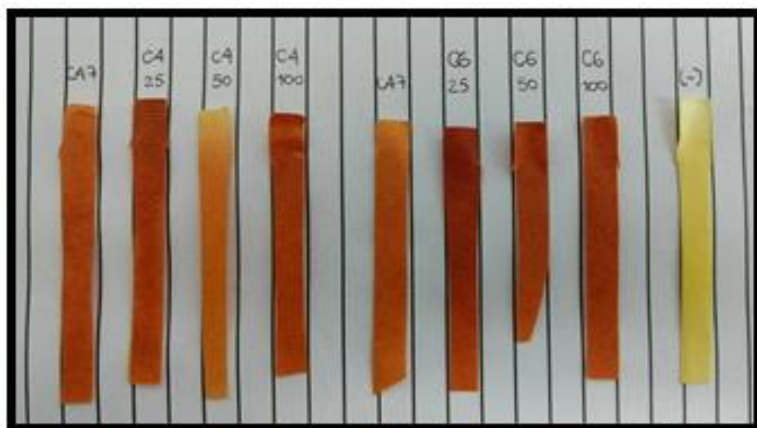
(Figura anexa N°2). Se observa las diferencias en la producción de sideróforos en las diferentes concentraciones de AHLs exógenas (C4-AHL Y C6-AHL), donde (a y b) representan la diferencia significativa en aumento respecto a *Raoultella* sp. (d).

#### 6.4 Motilidad tipo *swarming*:

Se midió el área de desplazamiento de *Raoultella* sp. alrededor del inóculo (Tabla N°1). Se determinó que el desplazamiento de *Raoultella* sp. es mayor cuando se suplementa el medio con AHLs exógenas (C4-AHL Y C6-AHL) a concentraciones de [25], [50] y [100] nM, con una excepción en C6-AHL a [100] nM, ya que su desplazamiento es similar cuando no se suplementa el medio (Figura anexa N° 4). Se observó diferencias en el área del desplazamiento siendo (a y b) el mayor desplazamiento respecto a las demás (c)

#### 6.5 Producción de Ácido Cianhídrico (HCN):

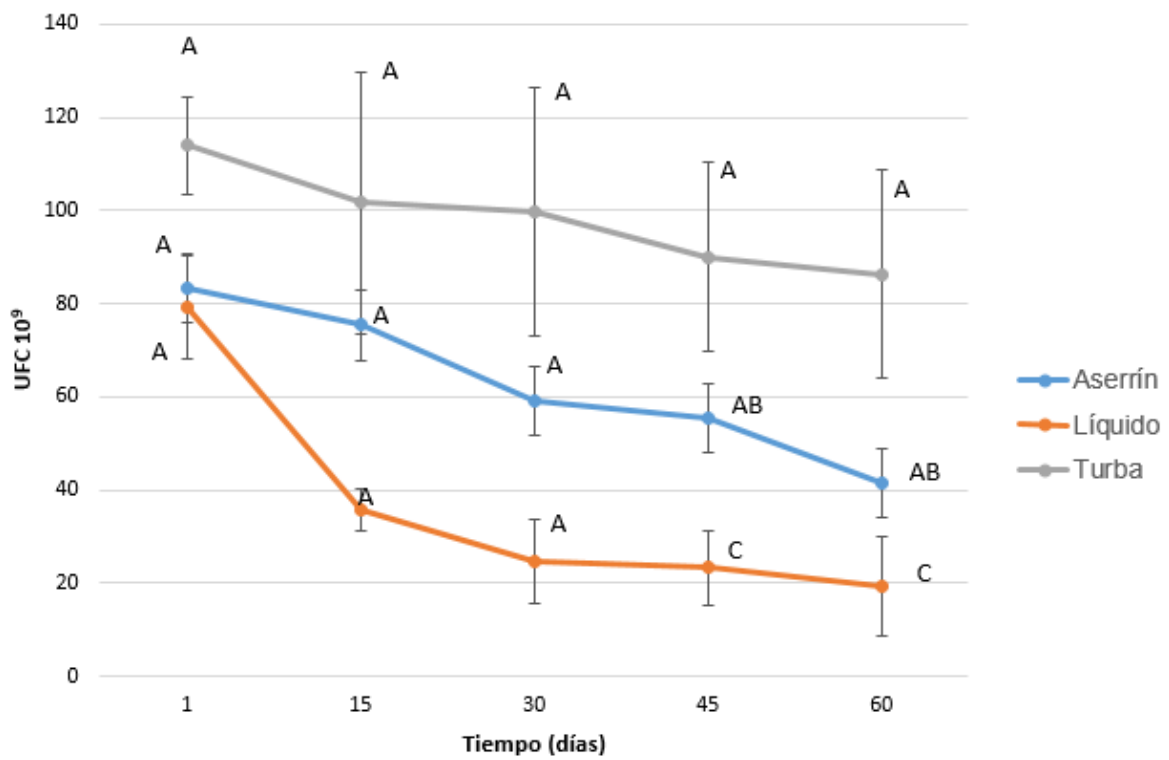
La producción de ácido cianhídrico se vio influenciada positivamente, esto se determinó comparando los resultados con la escala colorimétrica de Guignard para la expresión de HCN (Figura anexa N°3). Se observó que las tiras suplementas con C6-AHL tiene un contenido de HCN entre 85-115 ppm en sus tres concentraciones. Mientras los tratamientos con AHL -C4 [50] nM presentaron producciones entre 25-40 ppm. Los demás tratamientos tuvieron un contenido de HCN de 60 ppm.



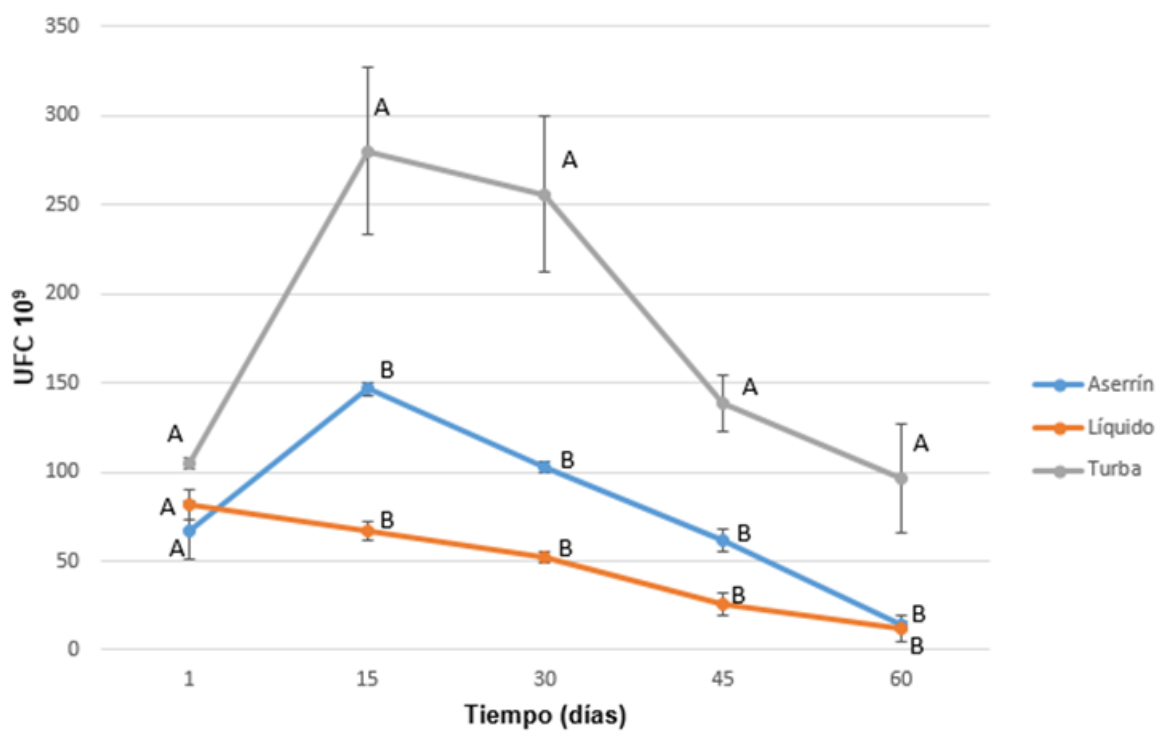
**Figura 9.** Producción de ácido cianhídrico con suplementación de AHLs C4 y C6 a tres concentraciones [25], [50] y [100] nM

## 6.6 Formulación.

### Transportadores a 4°C



### Transportadores a 18°C

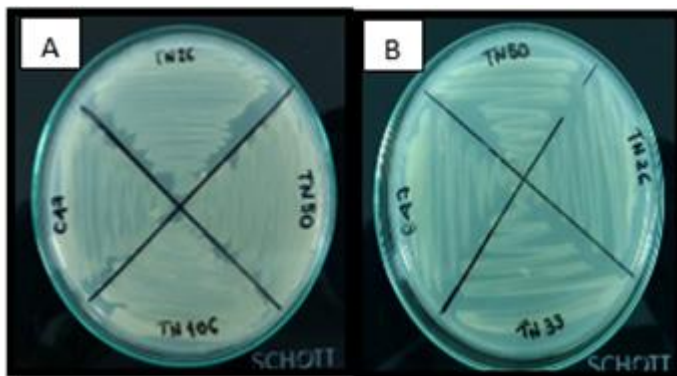




**Figura 10. Viabilidad de *Raoultella* sp. almacenada a 4 y 18°C:** Se representa la dilución  $10^9$  de los tres transportadores (turba, líquido y aserrín) almacenados a 4°C y 18°C.

Al comparar los tres transportadores inoculados (turba, aserrín y líquido) conservados a 4°C y 18°C, se observó que los conservados a 4°C tuvieron un descenso lento de biomasa durante los 60 días, además, la turba presentó mayor estabilidad y recuentos bacterianos a lo largo del ensayo, respecto a aserrín y líquido, éste último, tuvo un menor recuento bacteriano; los conservados a 18°C después de su inoculación y hasta los 15 días presentaron un aumento en la biomasa bacteriana, a partir de este último empezaron a descender hasta obtener una estabilidad, de igual manera, se observó que la turba presentó una diferencia significativa (A) frente a los otros dos transportadores (B), ya que, esta terminó con la misma cantidad de UFC con la que se inoculó, de igual forma durante todo el tiempo de almacenamiento esta presentó una mayor cantidad de biomasa que aserrín y líquido.

### 6.7 Enfrentamiento de *Raoultella* sp. con bacterias promotoras de crecimiento

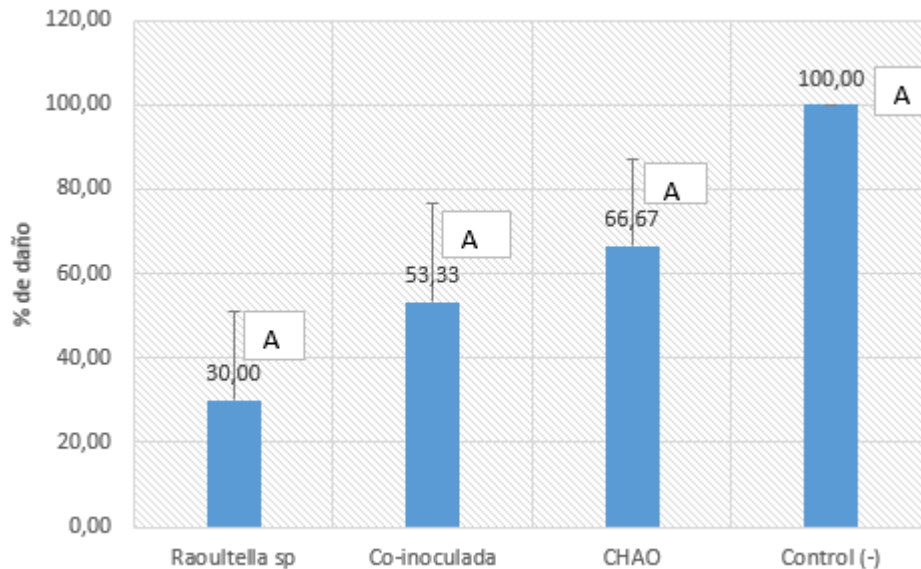


**Figura 11.** Enfrentamiento de bacterias promotoras de crecimiento y productoras de AHLs (A).TN26, TN503 Y TN106, (B) TN26, TN503 Y TN33 contra *Raoultella* sp.

En el enfrentamiento que se realizó entre *Raoultella* sp. (C47) y las cuatro bacterias promotoras de crecimiento (TN26, TN33, TN106 y TN503) para observar su inhibición se pudo determinar que con todas *Raoultella* sp. presentó compatibilidad. De acuerdo con este resultado la elección de la PGPR TN503 para la co-inoculación que se llevó a cabo en el bioensayo, se determinó, por los resultados obtenidos en el trabajo de Álvarez y Vaquero, (2018) de bacterias promotoras de crecimiento en tomate, donde esta presentó mayor promoción del crecimiento.

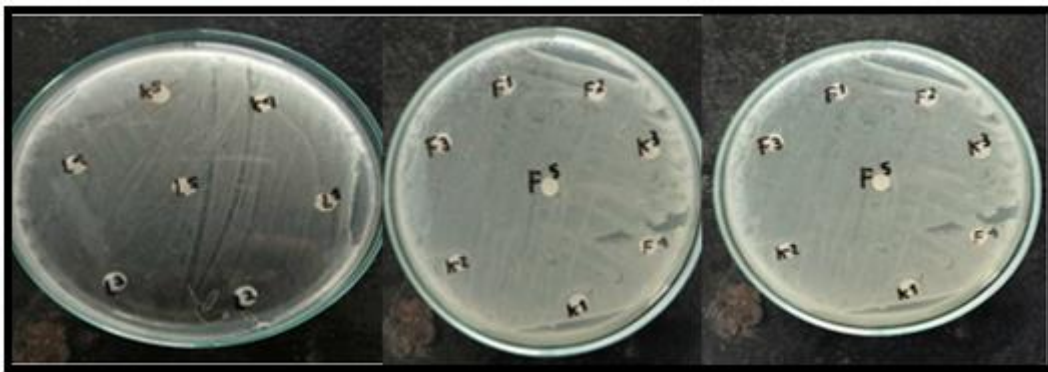
## 6.8 Bioensayo:

A pesar de no reportarse diferencias significativas en la reducción del daño con los microorganismos empleados se observaron reducciones en el daño con respecto al control negativo entre el 70 y 33% (Figura N° 9).

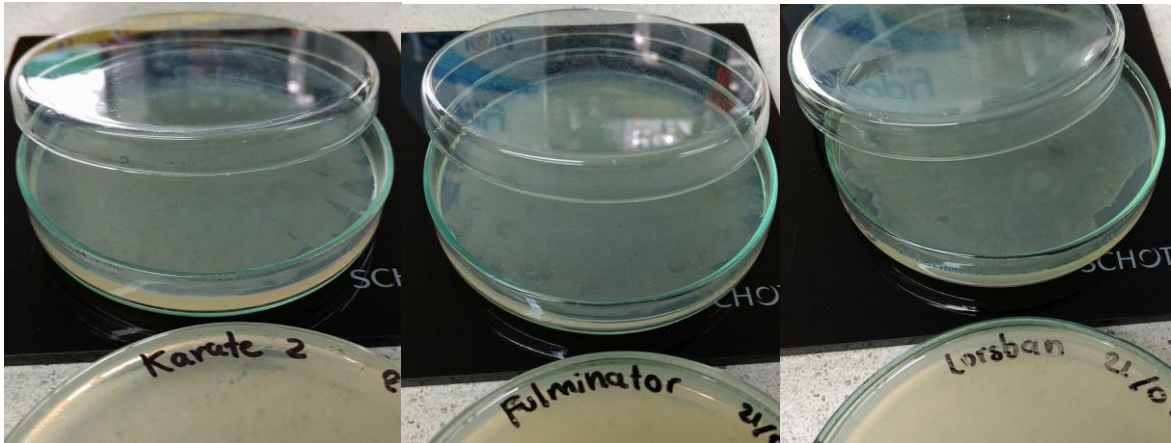


**Figura 12.** Disminución del porcentaje de daño respecto al control de papas, causado por *T. solanivora* utilizando como transportador turba inoculada a una absorbancia de 0,2

## 6.9 Crecimiento de *Raoultella sp.* en medio suplementado con plaguicidas de síntesis química



**Figura 13.** Sensidiscos impregnados con tres plaguicidas de síntesis química (L: Lorsban, K: Karate 2, F: Fulminator) a 5 concentraciones (diluciones en base 10), en agar nutritivo sembrado de forma masiva con *Raoultella sp.*



**Figura 14.** Agar nutritivo suplementado con tres plaguicidas de síntesis química (L: Lorsban, K: Karate 2, F: Fulminator) a una concentración del 100% (uso en campo), sembrado de forma masiva con *Raoultella* sp. por 24 horas incubados a 30°C.

Los plaguicidas de síntesis química empleados en campo contra *T. solanivora* y descritos a continuación no inhibieron el crecimiento de *Raoultella* sp.

Los insecticidas a base Lambdacialotrina como KARATE ® con tecnología ZEON, se aplican a una concentración de 50 cm<sup>3</sup> /ha, éste es un insecticida que actúa sobre las plagas por contacto e ingestión. La lambdacialotrina actúa sobre el sistema nervioso del insecto, alterando la permeabilidad de las membranas de las células nerviosas a los iones sodio. Esto produce el bloqueo de la conducción de los estímulos nerviosos, provocando hiperexcitación, convulsiones, parálisis y finalmente la muerte de los insectos <sup>30</sup>.

En el caso de los insecticidas a base de organofosforados como Lorsban™ 4 EC, se utilizan a una concentración de 1,5 L/ha, es un insecticida que actúa por contacto, ingestión e inhalación con un mecanismo de acción similar al de KARATE ® <sup>30</sup>.

Por otra parte, FULMINATOR 600 EC, insecticida a base de Cipermetrina y Profenofos actúa por contacto y acción estomacal. Es un Inhibidor de la colinesterasa. Los isómeros ópticos separados, debido al tomo de fósforo, presentan diferentes tipos de actividad insecticida y la habilidad de inhibir la acetilcolinesterasa, genera un desbalance electroquímico en el axón. Presenta un efecto translaminar <sup>30</sup>.

## 7. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

El crecimiento de *Raoultella* sp. no se afectó con la adición de AHLs exógenas (C4-AHL y C6-AHL) y sus respectivas concentraciones. Resultados similares reportaron Cheng et. al <sup>65</sup>; en *Paracoccus denitrificans* con la adición de 2  $\mu\text{mol/L}$  de C6-AHL en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, encontrando que no hubo diferencias significativas entre la adición de C6-AHL y el grupo control de crecimiento celular. De igual modo, Van et. al <sup>66</sup>, demostró que para *Escherichia coli* MG1655 a 30°C en caldo Luria Bertani (LB) suplementado con y sin C6-AHL a 0,5  $\mu\text{M}$ , el crecimiento de la bacteria no se vio afectado.

No se observó ninguna diferencia en la producción de proteasas al adicionar AHLs exógenas (C4-HL y C6-AHL) al medio Skin Milk. Resultados similares fueron

reportados por Ulrich et. al <sup>67</sup>, para *Burkholderia thailandensis* DW503 donde adicionaron AHLs exógenas (C6-AHL, C8-AHL y C10-AHL), encontrando que estas no tuvieron efecto en la secreción de proteasas. De igual forma, Diggle et. al <sup>68</sup>, adicionaron 10  $\mu$ M de C4-AHL y 3O-C12-AHL en *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT, dando como resultado reducida actividad proteolítica en comparación con PAO1 *lecA lux* sin suplementar.

La producción de sideróforos se vio afectado positivamente tras la adición de AHLs exógenas (C4-HL y C6-AHL) al medio. Según Ulrich et. al <sup>67</sup>, al adicionar de AHLs exógenas (C6-AHL, C8-AHL y C10-AHL) en placas de agar CAS con *Burkholderia thailandensis* DW503 luego de incubar hasta 48 horas a 37 °C presentó un efecto donde no se vio diferencia sobre la producción de sideróforos. Diggle et. al <sup>68</sup>, en una *Pseudomonas aeruginosa* MvaT analizaron en una selección de la Tn 5- Mutantes B21 (*Leca: lux, mutante rhIR, mutante rpoS, mutante mvaT*), para la producción de sideróforos al suplementarse con 10  $\mu$ M de C4-AHL y C12-AHL mostraron similares niveles en la producción de sideróforos.

La producción de ácido cianhídrico (HCN) suplementada de AHLs exógenas (C4-AHL y C6-AHL) mostró un notable aumento en su producción. Pessi et. al <sup>69</sup>, determinaron que en *Pseudomonas aeruginosa* la molécula rsmA (regulador de metabolitos secundarios) modula la producción de HCN a través del control de detección de quórum (AHLs). La sobreexpresión de rsmA dio como resultado una reducción sustancial en los niveles de productos de HCN, mientras que la inactivación de rsmA en *P. aeruginosa* tuvo sólo efectos menores sobre las enzimas extracelulares y la lectina PA-IL, la producción de HCN mejoró durante la fase exponencial.

En cuanto al desplazamiento *swarming* los resultados fueron positivos, ya que al agregar C4-AHL y C6-AHL en un medio semisólido, se observó un aumento del desplazamiento con referencia al control negativo. Un estudio realizado por Dávila <sup>70</sup>, obtuvo que *Vibrio LR6HC*, al producir moléculas AHLs (C4-AHL, C6-AHL y C8-AHL) se ve regulado su desplazamiento *swarming* en diferentes medios semisólidos. El desplazamiento *swarming* ha sido calificado como un factor de virulencia, siendo un mecanismo importante para invadir y colonizar rápidamente la rizósfera disponible, ganando espacio a otros microorganismos allí presentes.

La viabilidad de *Raoultella* sp. se afectó por la temperatura; a 18°C hay una mayor probabilidad de contaminación y de incremento bacteriano que a 4°C. Para determinar la influencia de la temperatura de almacenamiento en la supervivencia y las actividades biológicas del inoculante de *Azotobacter chroococcum*; El-Fattah et. al <sup>71</sup>, prepararon seis formulaciones con diferentes transportadores; turba de musgo, mezcla de turba y vermiculita, salvado de trigo, cáscara de arroz, arcilla y alginato de sodio almacenados a 8°C y 30°C. El recuento total de contaminantes en diferentes transportadores almacenados a 30°C fue mayor que los almacenados a 8°C, de igual modo, en salvado de trigo, cáscara de arroz y vermiculita se incrementó el recuento bacteriano a 30°C. Los recuentos totales más bajos de hongos y bacterias se registraron a 8°C después de 3 meses de almacenamiento con cáscara de arroz, turba y vermiculita. Por otra parte, Amer et. al <sup>72</sup>, define que la supervivencia de *B. subtilis* y *P. putida* en diversos transportadores fue afectada por la temperatura de almacenamientos. En todas las formulaciones de transportadores *B. subtilis* sobrevivió hasta 45 días. Después de 45 días de almacenamiento a temperatura ambiente (~22°C), las poblaciones de *B. subtilis* fueron significativamente mayor en vermiculita, caolín y caldo bacteriano en comparación con otros transportadores. Las poblaciones de *P. putida* fueron significativamente más altas en vermiculita, turba, salvado de trigo y caldo bacteriano que en otros transportadores cuando se almacenaron en refrigeración (~0°C) y/o temperatura ambiente (~22°C) durante 15 o 45 días.

De los tres transportadores analizados, la turba fue la que mejor mantuvo la viabilidad de *Raoultella* sp. Rabindran y Vidhyasekaran <sup>73</sup>, reportaron resultados similares en el desarrollo de una formulación para *Pseudomonas fluorescens* que inhibió el crecimiento de *Rhizoctonia solani*. En ensayos de campo, la aplicación de la formulación a base de turba controló eficazmente la enfermedad, aumentó el rendimiento y la eficacia en comparación al fungicida comercial. De igual modo Vidhyasekaran y Muthamilan <sup>74</sup>, realizaron formulaciones basadas en talco y turba para *Pseudomonas fluorescens* la bacteria sobrevivió incluso hasta 240 días de almacenamiento, aunque la población disminuyó desde los 30 días.

Alvarez y Vaquero <sup>61</sup>, de 30 aislamientos de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal, evaluaron el incremento de peso seco de vástago y raíz, donde tres aislamientos incrementaron más del 200% con respecto a los controles. Una de las

bacterias más eficientes como PGPR fue *Serratia proteamaculans* y también es productora de AHLs.

*Raoultella* sp. pudo controlar el daño de *T. solanivora* en tubérculos enterrados bajo tierra hasta en un 30%. Según López <sup>75</sup>, los aislamientos nativos son promisorios como agentes de biocontrol en el cultivo de papa, ya que podrían permitir el equilibrio entre las plagas y sus enemigos naturales en los agro ecosistemas.

Anandhakumar y Zeller <sup>76</sup>, realizaron estudios de campo donde *Raoultella terrigena* mostró un control del 55% hacia *Phytophthora fragariae*; en comparación al control químico Aliette con un 64.7% en cultivos de fresa. Factores como la colonización del tubérculo, la competencia con los microorganismos del suelo o la concentración de los patógenos pueden desempeñar un papel importante en los resultados del biocontrolador. Factores abióticos como el tipo de suelo, humedad y temperatura, así como las variaciones en la tecnología de aplicación también puede ser de importancia.

Al determinar la compatibilidad *in vitro* de *Raoultella* sp. con insecticidas que se utilizan con mayor frecuencia en cultivos de papa contra *T. solanivora*, se obtuvo un 100% de compatibilidad. *Raoultella* sp. creció en presencia del plaguicida a cinco concentraciones diferentes y a la dosis recomendada. Santos et al <sup>77</sup>, han comprobado la compatibilidad de bioplaguicida a base de *Lecanicillium lecanii* con nueve agroquímicos utilizados en los cultivos de algodón y berenjena, donde se demostró que el agroquímico que fue compatible en condiciones *in vitro* con *Lecanicillium lecanii* fue el producto Confidor®.

## 8. CONCLUSIONES

Las AHLs influyen en los mecanismos de acción de *Raoultella* sp como producción de sideróforos, motilidad tipo *swarming* y la producción de ácido cianhídrico.

El transportador más efectivo para mantener la viabilidad de *Raoultella* sp. es la turba, en especial cuando se almacena a 4°C.

La co-inoculación de la bacteria TN503 promotora de crecimiento vegetal y productora de AHLs, no tuvo ningún efecto en la actividad entomopatógena de *Raoultella* sp contra *T solanivora*.

Se evidencio que *Raoultella* sp. y los insumos de síntesis química Lorsban, Karate Zeon y Furminator son compatibles y podrían usarse de forma coordinada para el control de insectos plaga.



## 9. RECOMENDACIONES

De acuerdo con los resultados de este trabajo se recomienda:

Analizar la viabilidad de *Raoultella* sp. en los tres transportadores almacenados a 4°C por un tiempo mayor a 60 días y evaluar su actividad entomopatógena en el transcurso de este tiempo.

Evaluar la co-inoculación entre *Raoultella* sp con otras bacterias productoras de AHLs para determinar la actividad entomopatógena.

Evaluar los mecanismos asociados a la actividad entomopatógena de *Raoultella* sp. co-inoculada con una bacteria productora de AHLs en un medio suplementado con insumos de síntesis química.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GUÍA AMBIENTAL PARA EL CULTIVO DE LA PAPA [Internet]. Redjusticiaambientalcolombia.files.wordpress.com. 2004 [cited 1 June 2018]. Available from: <https://redjusticiaambientalcolombia.files.wordpress.com/2012/09/guia-ambiental-para-el-cultivo-de-la-papa.pdf>
2. Gonzalez Martinez TG, Martinez Olivas GM. No title. Evaluación de las características agronómicas y rendimiento productivo de tres variedades de papa (*Solanum tuberosum* L), tolerante a tizón tardío (*Phytophthora infestans* Mont de Bary) bajo condiciones de invernadero, Postrera en el Centro experimental San José de las Latas, Jinotega 2016 2017.
3. Sánchez G. La polilla guatemalteca de la papa en Colombia. Boletín de la papa. Corpoica 2000;11(4):239-243.
4. Ruiz LP, Hernández-Fernández J, Villegas JB. Toxicidad de  $\delta$ -endotoxinas recombinantes de *Bacillus thuringiensis* sobre larvas de la polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*)(Lepidóptera: Gelechiidae).
5. Badii MH, Abreu JL. Control biológico una forma sustentable de control de plagas (Biological control a sustainable way of pest control). Daena: international journal of good conscience 2006;1(1):82-89.
6. Carreras S. Aplicaciones de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* en el control de fitopatógenos. Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria 2011;12(2).
7. COTES A. Effect of culture conditions on the entomopathogenic activity of *Serratia marcescens* against *Tecla Solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). Revista Colombiana de Entomología 2004;30(1):87-92.
8. Suquillo J, Rodríguez P, Gallegos P, Orbe K. Manual para la elaboración del bioinsecticida Bacu-Turin a través de premezclas concentradas para el control de las polillas de la papa: *Tecia solanivora*, *Phthorimaea operculella* y *Symmetrischema tangolias*. 2012.
9. CORPOICA. [Internet] *Bioproductos Vaculovirus Corpoic* [cited 1 June 2018]. Available from: a. <http://www.corpoica.org.co/media/13626/baculovirus-bioproductos.pdf>

10. Quiroga I, Gómez M, Villamizar L. Stability of formulations based on granulovirus for controlling *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) in the field. *Revista Colombiana de Entomología* 2011;37(1):27-35.
11. Gómez-Bonilla Y, López-Ferber M, Caballero P, Murillo R, Muñoz D. Granulovirus formulations efficiently protect stored and field potatoes from *Phthorimaea operculella* and *Tecia solanivora* in Costa Rica. *Biocontrol* 2013;58(2):215-224
12. Anandhakumar J, Zeller W. Biological control of red stele (*Phytophthora fragariae* var. *fragariae*) and crown rot (*P. cactorum*) disease of strawberry with rhizobacteria. *Journal of Plant Diseases and Protection* 2008;115(2):49-56.
13. Kotan R, Dikbas N, Bostan H. Biological control of post harvest disease caused by *Aspergillus flavus* on stored lemon fruits. *African journal of biotechnology* 2009;8(2).
14. Li GJ, Dong QE, Ma L, Huang Y, Zhu ML, Ji YP, et al. Management of *Meloidogyne incognita* on tomato with endophytic bacteria and fresh residue of *Wasabia japonica*. *J Appl Microbiol* 2014;117(4):1159-1167.
15. Yu VC, Yu PH, Ho K, Lee FW. Isolation and identification of a new tetrodotoxin-producing bacterial species, *Raoultella terrigena*, from Hong Kong marine puffer fish *Takifugu niphobles*. *Marine drugs* 2011;9(11):2384-2396.
16. Metin T., Fikrettin S. The effect of PGPR strain on wheat yield and quality parameters. *Proceedings of the 19th World Congress of Soil Science: Soil solutions for a changing world, Brisbane, Australia, 1-6 August 2010. Symposium 2.3. 1 The soil-root interface: International Union of Soil Sciences (IUSS), c/o Institut für Bodenforschung, Universität für Bodenkultur; 2010.*
17. EVALUACIÓN DE SOPORTES SÓLIDOS Y LÍQUIDOS, PARA LA PRODUCCIÓN DE UN BIOFERTILIZANTE A BASE DE *Azospirillum* spp. APLICABLE AL .... Alimentos, ciencia e ingeniería [Internet]. 2018 [cited 20 February 2018];(22):34-39. Available from: [http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/24547/2/Alimentos\\_22\\_1\\_2\\_014.pdf#page=34](http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/24547/2/Alimentos_22_1_2_014.pdf#page=34)

18. Kumar A, Usmani Z, Kumar V. Biochar and flyash inoculated with plant growth promoting rhizobacteria act as potential biofertilizer for luxuriant growth and yield of tomato plant. *J Environ Manage* 2017;190:20-27.
19. Manual Técnico del cultivo de papa bajo buenas prácticas agrícolas [Internet]. 2018 [cited 20 February 2018]. Available from: [http://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/MANUAL%20PAPA\\_0.pdf](http://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/MANUAL%20PAPA_0.pdf)
20. Ministerio de Agricultura; Ganadería, Acuacultura y Pesca. Producción Orgánica de Cultivos Andinos. Manuel B; 2009 p. 9-10.
21. El cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) y un estudio de caso de los costos de producción de papa Pastusa Suprema [Internet]. Corpoica. 2017 [cited 20 February 2018]. Available from: <http://www.corpoica.org.co/noticias/generales/drones-cultivos/>
22. Plagas y enfermedades de la papa [Internet]. 2012 [cited 21 February 2018]. Available from: <http://jovenesrurales.minagricultura.gov.co/documents/10180/160303/Plagas+y+enfermedades+de+la+papa-Investigaci%C3%B3n/0a3abf4d-a4db-4be2-ae50-d86db3c8d2ec>
23. Mejía DFV, Benjumea CIS. *Tecia solanivora*, Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae): una revisión sobre su origen, dispersión y estrategias de control biológico. *Ingeniería y ciencia* 2013;9(18):197-214.
24. Alarcón J, Arévalo E, Díaz A, Galindo J, Rivero M, Tovar E. Manejo fitosanitario del cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* subsp. andigena y *S. phureja*), medidas para la temporada invernal. *Produmedios*, Bogotá DC 2011:5-16.
25. Cucunubá Ariza LE. Diagnóstico del manejo ambiental del cultivo de la papa pastusa, (*Solanum tuberosum*), en un ecosistema de alta montaña, del municipio de Guatavita departamento de Cundinamarca. 2014
26. Martínez Covalada HJ, Espinal CF, González Rodríguez FA. La cadena de la piscicultura en Colombia: una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. 2005.
27. Hernández-Fernández J, Ruiz LP, Villegas JB. Toxicidad de  $\delta$ -endotoxinas recombinantes de *Bacillus thuringiensis* sobre larvas de la polilla

- guatemalteca (Tecia solanivora)(Lepidóptera: Gelechiidae). Revista Colombiana de Biotecnología 2008;10(2):85-96.
28. FAO.org.[internet].Colombia: FAO ;2008. Gestión de las plagas y enfermedades. Available from: <http://www.fao.org/potato-2008/es/lapapa/plagas.html>
  29. Insht.es. [Internet]. Clasificación y etiquetado de productos químicos: comparación entre el GHS y la reglamentación europea. [2010] Available at: [http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NT P/Ficheros/701a750/ntp\\_727.pdf](http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NT P/Ficheros/701a750/ntp_727.pdf)
  30. Ficha Técnica del plaguicida. Insecticidas para protección de los cultivos.2018. Available from: <https://www.syngenta.es/productos/protection-cultivos/insecticida>
  31. Rodríguez A, Guillén C, Uva V, SEGURA R, LAPRADE S, Sandoval J. Aspectos a considerar sobre el control biológico. Proyecto demostrativo con implementación de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) en el cultivo de banano.Recuperado de: <http://cep.unep.org/repcar/proyectos-demostrativos/costa-rica-1/publicacionescorbana/HOJA%20DIVULGATIVA%20Nb02-2010> 2010.
  32. Intagri. [Internet]. Los Entomopatógenos, Control Biológico de Plagas. [2016] Available from: <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/los-entomopatogenos-control-biologico-de-plagas> [Accessed 16 Apr. 2018].
  33. Shaikh MM, Morgan M. Sepsis caused by Raoultella terrigena. JRSM short reports 2011;2(6):1-3.
  34. Intagri. [Internet].. *Mecanismos de Acción de Microorganismos para el control de Enfermedades en el Suelo*. [2016] Available from: <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/mecanismos-de-accion-de-microorganismos-para-el-control-de-enfermedades-en-el-suelo> [Accessed 18 Apr. 2018].
  35. STASHENKO E. Antiquorum sensing activity of essential oils isolated from different species of the genus Piper. Vitae 2011;18(1):77-82.
  36. Barreto AC. Quorum Sensing: Sistemas de comunicación bacteriana. Ciencia Actual 2013;2(1):43-50.

37. Schikora A, Schenk ST, Hartmann A. Beneficial effects of bacteria-plant communication based on quorum sensing molecules of the N-acyl homoserine lactone group. *Plant Mol Biol* 2016;90(6):605-612.
38. Acosta, J. E. D. (2011). Caracterización de la enzima acil homoserina lactonasa de una cepa de bacillus thuringiensis
39. Pedroza Padilla CJ. No title. Caracterización de la enzima acil homoserina lactonasa de una cepa de bacillus thuringiensis. 2010.
40. Van Houdt R, Moons P, Aertsen A, Jansen A, Vanoirbeek K, Daykin M, et al. Characterization of a luxI/luxR-type quorum sensing system and N-acyl-homoserine lactone-dependent regulation of exo-enzyme and antibacterial component production in *Serratia plymuthica* RVH1. *Res Microbiol* 2007;158(2):150-158.
41. M Florez A, Gonzalez A, Pedroza CJ, Correa E, Rueda NJ, Orduz S. Identification, cloning and lactonase activity of recombinant protein of N-acyl homoserine lactonase (AiiA) from *Bacillus thuringiensis* 147-115-16 strain. *Revista Colombiana de Biotecnología* 2014;16(1):153-162.
42. Golberg K, Eltzov E, Shnit-Orland M, Marks RS, Kushmaro A. Characterization of quorum sensing signals in coral-associated bacteria. *Microb Ecol* 2011;61(4):783-792.
43. Errasti ME. No title. Estudio de posibles aplicaciones farmacológicas de extractos de especies de bromeliáceas y su comparación con bromelina 2013.
44. Puente XS, Sánchez LM, Overall CM, López-Otón C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nature Reviews Genetics* 2003;4(7):544.
45. Taguchi F, Suzuki T, Inagaki Y, Toyoda K, Shiraishi T, Ichinose Y. The siderophore pyoverdine of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605 is an intrinsic virulence factor in host tobacco infection. *J Bacteriol* 2010;192(1):117-126.
46. Molina López, J., Factores de Patogenicidad Bacteriana. [online] Universidad Nacional Autónoma de México. Available at: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/patogenicidad.html> [Accessed 19 Apr. 2018].

47. Dávila Lule A. Participación de las moléculas señal acilo homoserina lactona, en la movilidad swarming en *Vibrio* spp, aislada de raíces del mangle negro *Avicennia germinans*. 2007.
48. Hernández F, Rodríguez E. El fenómeno de swarming y otros tipos de desplazamiento bacteriano. *Rev Costarric Cienc Med* 1993;14(1/2):39-45.
49. Bakker AW, Schippers B. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp-mediated plant growth-stimulation. *Soil Biol Biochem* 1987;19(4):451-457.
50. Castric PA. Glycine metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: hydrogen cyanide biosynthesis. *J Bacteriol* 1977;130(2):826-831
51. Vetter J. Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon* 2000;38(1):11-36.
52. Anon, (n.d.). *CAPÍTULO 4 - LOS PLAGUICIDAS, EN CUANTO CONTAMINANTES DEL AGUA*. [online] Available at: <http://www.fao.org/docrep/W2598S/w2598s06.htm> [Accessed 19 Apr. 2018].
53. Bashan Y, de-Bashan LE, Prabhu SR, Hernández J. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant Soil* 2014;378(1-2):1-33.
54. Mantilla Olaya J. *Manual de Técnicas Básicas en Biología Molecular*. Bogotá D.C; 2006
55. Anyelly Tatiana Botina Rodríguez, Carolina Ramírez Banguera, Jenny Carolina Dussan Molano. Actividad Entomopatógena de Aislamientos de Bacterias Productoras de Moléculas Señal Tipo Acil Homoserina Lactona Asociados a Cultivos de Papa sobre *Tecia solanivora*. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Nov 18 del 2016. 15 de Diciembre grados ( Soporte 17311857)
56. Luisa Fernanda Pantoja. Universidad Nacional de Colombia. Maestría en Biotecnología. Efecto de moléculas señal tipo N-Acil Homoserina Lactonas (AHLs) de rizobacterias provenientes de cultivos de papa en el control de *Tecia solanivora* (Lepidóptera: Gelichiidae). Código (161123847). Inicio Agosto 2016.
57. Mantilla J. *MANUAL DE TÉCNICAS BÁSICAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR*. Bogotá D.C.; 2006.
58. *Protocolos Estandarizado*. [ebook] pp.2,3. Available at: <https://trello.com/c/frzvvf6K/2-protocolos> [Accessed 19 Aug. 2018].

59. Boyer M, Bally R, Perrotto S, Chaintreuil C, Wisniewski-Dyé F. A quorum-quenching approach to identify quorum-sensing-regulated functions in *Azospirillum lipoferum*. *Res Microbiol* 2008;159(9-10):699-708.
60. Bakker AW, Schippers B. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas spp-mediated* plant growth-stimulation. *Soil Biol Biochem* 1987;19(4):451-457
61. Alvarez Ramirez J, Vaquero Ramirez A. Efecto de la inoculación de rizobacterias sobre plántulas de tomate (*Lycopersicum esculentum*) crecidas bajo estrés salino. Colegio Mayor de Cundinamarca; 2018.
62. Acosta, T., Avellaneda, A., Cuervo, J., & Sánchez, L. Evaluación de microbiota de tomillo (*thymus Vulgaris*), como aporte al manejo agroecológico de aromáticas en invernaderos de la universidad nacional En: Universidad Nacional de Colombia. Perspectivas del agronegocio de hierbas aromáticas culinarias y medicinales. Ed. 1. Bogotá p. 135 – 138
63. Gil CC, Rueda DFR, Valencia E. Localización de hospedero por larvas neonatas de *Tecia solanivora* (Lepidoptera-Gelechiidae). *Revista Corpoica: Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 2010;11(1):5-10
64. Bernal M, Guzmán M. El antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-Bauer. *Biomédica* 1984;4(3-4):112-121.
65. Cheng Y, Zhang Y, Shen Q, Gao J, Zhuang G, Zhuang X. Effects of exogenous short-chain N-acyl homoserine lactone on denitrifying process of *Paracoccus denitrificans*. *Journal of Environmental Sciences* 2017;54:33-39.
66. Van Houdt R, Aertsen A, Moons P, Vanoirbeek K, Michiels CW. N-acyl-L-homoserine lactone signal interception by *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 2006;256(1):83-89.
67. Ulrich RL, Hines HB, Parthasarathy N, Jeddloh JA. Mutational Analysis and Biochemical Characterization of the *Burkholderia thailandensis* DW503 Quorum-Sensing Network. *J Bacteriol* 2004;186(13):4350.
68. Diggle SP, Winzer K, Lazdunski A, Williams P, Cámara M. Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. *J Bacteriol* 2002;184(10):2576-2586.

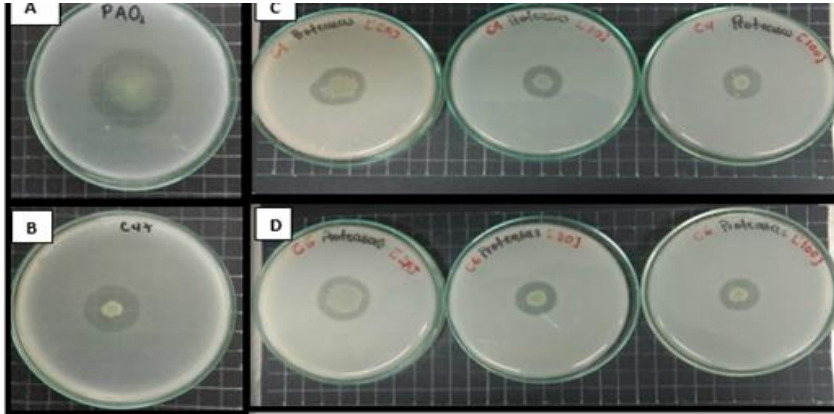


69. Pessi. G, et al "The Global Posttranscriptional Regulator RsmA Modulates Production of Virulence Determinants and N-Acylhomoserine Lactones in *Pseudomonas aeruginosa*." *Journal of bacteriology* 183.22 (2001): 6676-6683.
70. Dávila lule, Alfonso. Participación de las moléculas señal acilo homoserina lactona, en la movilidad swarming en *Vibrio* spp, aislada de raíces del mangle negro *Avicennia germinans*. 2007.
71. El-Fattah DAA, Eweda WE, Zayed MS, Hassanein MK. Effect of carrier materials, sterilization method, and storage temperature on survival and biological activities of *Azotobacter chroococcum* inoculant. *Annals of Agricultural Sciences* 2013;58(2):111-118.
72. Amer GA, Utkhede RS. Development of formulations of biological agents for management of root rot of lettuce and cucumber. *Can J Microbiol* 2000;46(9):809-816.
73. Rabindran R, Vidhyasekaran P. Development of a formulation of *Pseudomonas fluorescens* PfALR2 for management of rice sheath blight. *Crop protection* 1996;15(8):715-721
74. Vidhyasekaran P, Muthamilan M. Development of formulations of *Pseudomonas fluorescens* for control of chickpea wilt. *Plant disease (USA)* 1995.
75. López Avila A. Control biológico componente fundamental del MIP: origen, definiciones y conceptos básicos. 2002
76. Anandhakumar J, Zeller W. Biological control of red stele (*Phytophthora fragariae* var. *fragariae*) and crown rot (*P. cactorum*) disease of strawberry with rhizobacteria. *Journal of Plant Diseases and Protection* 2008;115(2):49-56.
77. Santos A, Grijalba E, Zuluaga MV, Gómez M, Villamizar L. In vitro compatibility of the biopesticide based on *Lecanicillium lecanii* (*Hypocreales: Clavicipitaceae*) with agrochemicals used in cotton and eggplant crops. *Revista Colombiana de Biotecnología* 2013;15(2):132-142



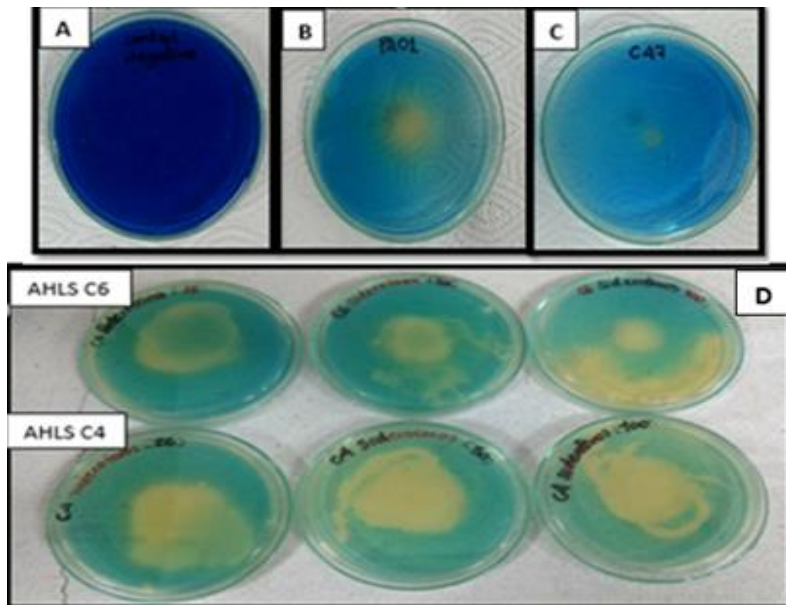
## 11. ANEXOS

### Anexo 1. Resultados proteasas.



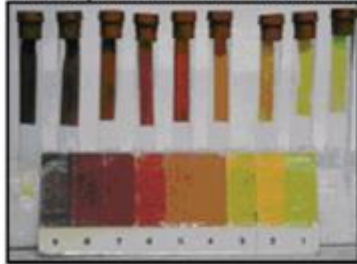
(A) control positivo PA01, (B) *Raoultella* sp. medio sin suplementar, (C) y (D) *Raoultella* sp. en medio suplementado con AHLs C4 y C6 a [25], [50] y [100] nM respectivamente.

### Anexo 2. Resultados sideróforos.



(A) Control negativo es agar sin inóculo (B) Control positivo: PAO1 (*Pseudomonas aeruginosa*) (C) C47 (*Raoultella* sp.), (D) Lectura de sideróforos con suplementación

Carta de colores para determinación cualitativa de HCN



Contenido aproximado de HCN según la escala de colores

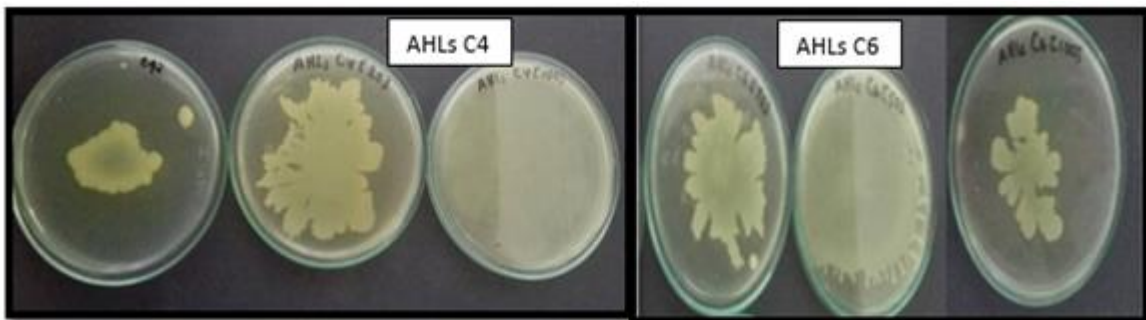
| Escala de color | Contenido de HCN (ppm) base húmeda |
|-----------------|------------------------------------|
| 1               | < 10                               |
| 2               | 10-15                              |
| 3               | 15-25                              |
| 4               | 25-40                              |
| 5               | 40-60                              |
| 6               | 60-85                              |
| 7               | 85-115                             |
| 8               | 115-150                            |
| 9               | > 150                              |

de  
AHL  
s  
exóg  
enas  
(C4-  
AHL

Y C6-AHL) a tres concentraciones [25], [50] y [100] nM.

**Anexo 3.** Escala colorimétrica de Guignard para la expresión de HCN

**Anexo 4.** Resultados Motilidad tipo *swarming*



Lectura de Motilidad tipo *swarming* suplementado con AHLs exógenas(C4-AHL Y C6-AHL) cada una con sus respectivas concentraciones de [25], [50] y [100] nM