



**GÉNERO *Bacillus* COMO ALTERNATIVA DE MANEJO DE PLAGUICIDAS  
COMERCIALES PARA EL CONTROL DE *Tecia solanivora*, EN CULTIVO DE  
*Solanum tuberosum* cv Parda pastusa**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
BOGOTÁ, D.C., JUNIO DE 2019**



**GÉNERO *Bacillus* COMO ALTERNATIVA DE MANEJO DE PLAGUICIDAS  
COMERCIALES PARA EL CONTROL DE *Tecia solanivora*, EN CULTIVO DE  
*Solanum tuberosum* cv Parda pastusa**

**Presentado por:**

**ANGIE CAROLINA ACEVEDO LOPEZ  
LAURA CAMILA BERMUDEZ HERRERA**

**Asesora**

**LIGIA CONSUELO SÁNCHEZ LEAL M.Sc**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
BOGOTÁ, D.C., JUNIO DE 2019**

## **DEDICATORIA:**

Principalmente queremos dedicar este trabajo a nuestros padres, por ser motivo de inspiración, de apoyo incondicional y ser lo promotores de la oportunidad de ir finalizando otro ciclo en nuestro camino académico. A los que ya no están en cuerpo, pero que dejaron su luz, aquella que ha servido como guía y como motivo de inspiración.

A todos los profesores que a lo largo de estos diez semestres nos han aportado los conocimientos necesarios para poder hacer posible este proyecto, y ser ayuda incondicional durante este proceso. Y en esencia a todas las personas que de una u otra manera hicieron posible el desarrollo de este trabajo de grado, como amigos, familiares, conocidos, que con una palabra de aliento, un gesto, una sugerencia, lograron aportar.

“La humanidad necesita hombres prácticos, que sacan el mayor provecho de su trabajo, y, sin olvidar el interés general, salvaguardar sus propios intereses. Pero la humanidad también necesita soñadores, para quienes el desarrollo de una tarea sea tan cautivante que les resulte imposible dedicar su atención a su propio beneficio.”

Marie Curie

## **AGRADECIMIENTOS**

Le agradecemos a Dios la oportunidad de crecer académica y profesionalmente durante este proceso, de brindarnos la sabiduría para ir culminando de la mejor manera esta etapa mediante este trabajo de investigación. A nuestros padres por su apoyo y confianza incondicional a lo largo de estos 5 años.

A nuestra asesora la docente Ligia Consuelo Sánchez por su voto de confianza al creer en este trabajo, y aún más en nosotras, y por su asesoramiento a lo largo del desarrollo del mismo. A la entidad Agrosavia por apoyar la investigación y aportarnos la cría de la plaga de Tecia solanivora, además de orientarnos acerca de las condiciones necesarias para el desarrollo de esta, también a la docente Ruth Páez quien fue pieza clave para lograr la evolución de la cría.

Mil gracias a todas las personas que han aportado en nuestro desarrollo como próximas profesionales y han forjado en nosotras un carácter de compromiso, responsabilidad y disciplina.

## TABLA DE CONTENIDO:

RESUMEN.....	12
INTRODUCCIÓN.....	13
OBJETIVOS.....	15
OBJETIVO GENERAL.....	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
2. MARCO REFERENCIAL.....	20
2.1 Tecia solanivora .....	20
2.3 Ciclo de vida:.....	21
2.3.1 Adulto:.....	22
2.3.2 Huevos:.....	22
2.3.3 Larvas primer instar: .....	23
2.3.4 Larvas segundo instar:.....	23
2.3.5 Larvas tercer instar: .....	23
2.3.6 Larvas cuarto instar:.....	23
2.3.7 Prepupas:.....	23
2.3.8 Pupas:.....	23
2.4 Afectación en los cultivos de papa.....	24
2.5 Género Bacillus sp .....	25
2.7 Pesticidas.....	27
2.8 Bioproductos utilizados actualmente para el control de plagas en cultivos. ....	28
3. DISEÑO METODOLÓGICO.....	30
3.1 Tipo de Estudio.....	30
3.2 Hipótesis:.....	30
3.3 Variables del estudio .....	30
3.3 Técnicas y Procedimientos .....	31
3.3 1. Fase 1. Activación de las cepas de Bacillus .....	31
3.3 2. Fase 2: Obtención de biomasa quitinolítica y biomasa con capacidad de producción de endospora terminal.....	33
3.3 3 Fase 3. Bioensayos de biomasa bacteriana vs huevos y larvas de Tecia solanivora. ....	34
Bioensayos en huevos .....	38
Bioensayos sobre larvas .....	39
4. RESULTADOS.....	42

4.1 Fase 1. Desarrollo y viabilidad de las cepas de Bacillus sp empleadas en la investigación.....	42
4.2 Fase 2: Obtención de biomasa quitinolítica de las cepas de Bacillus sp .....	47
Tabla 7. Evaluación cualitativa de crecimiento de Bacillus sp en Medio quitina (MQ). .....	47
Figuras 27 y 28. Visualización macroscópica de crecimiento en el Medio Quitina (MQ).....	48
4.3 Fase 3. Bioensayos de concentrados de Bacillus sp contra huevos y larvas de Tecia solanivora.....	48
Cepas de Bacillus vs larvas de Tecia solanivora.....	49
Semana 1 .....	49
Semana 2 .....	52
Semana 3 .....	55
Semana 4 .....	58
5. DISCUSIÓN .....	64
6. CONCLUSIONES .....	68
RECOMENDACIONES .....	69

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>Tecia solanivora</i> .....	21
Tabla 2. Taxonomía <i>Bacillus sp</i> .....	24
Tabla 3. Tipos de variables del estudio.....	28
Tabla 4. Nomenclatura de cepas de <i>Bacillus sp</i> empleadas en la investigación.....	30
Tabla 5. Lectura macroscópica de colonias formadas de <i>Bacillus sp</i> en el medio BH.....	44
Tabla 6. Revisión microscópica en 100x, de cada una de las cepas, en frotis teñidos con Gram CEPA GRAM.....	45
Tabla 7. Evaluación cualitativa de crecimiento de <i>Bacillus sp</i> en Medio quitina (MQ).....	47
Tabla 8. Porcentaje de larvas desarrolladas respecto a la cepa utilizada en huevos de <i>Tecia solanivora</i> .....	62
Tabla 9. Porcentaje de mortalidad respecto a la cepa utilizada en larvas de <i>Tecia solanivora</i> .....	63

## TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida <i>Tecia solanivora</i> .....	20
Figura 2. Mecanismos de acción <i>Bacillus subtilis</i> .....	24
Figura 3 Descongelación de viales de las cepas de <i>Bacillus sp</i> .....	30
Figuras 4,5,6. Cepas de <i>Bacillus sp</i> en Caldo BHI.....	31
Figura 7. Caja de Petri con huevos de <i>Tecia solanivora</i> .....	33
Figura 8. Larva 1 de <i>Tecia solanivora</i> .....	33
Figura 9. Montaje de larvas de <i>Tecia solanivora</i> sobre papa <i>Solanum tuberosum</i> para el desarrollo de la cría.....	34
Figura 10. Daño total causado por las larvas una vez caen a la arena para empupar.....	35
Figura 11. Montaje de cámara para recolección y clasificación de adultos de <i>Tecia solanivora</i> .....	35
Figura 12. Cámara ovopositora con adultos de <i>Tecia solanivora</i> para recolección de nuevos huevos.....	36
Figura 13. Visualización de huevos de <i>Tecia solanivora</i> .....	36
Figura 14, 15 Huevos de <i>Tecia solanivora</i> a punto de eclosionar.....	38
Figura 16 digrama de procesos para el desarrollo de este estudio.....	41
Figuras de la 17 a 27.....	43
Figuras 28 y 29. Visualización macroscópica de crecimiento en el Medio Quitina (MQ).....	48
Figura 30. Cadáver de larva de <i>T.solanivora</i> tras exposición a la cepa BPG04.....	48
Figura 31. Huevos sin eclosionar tras exposición a la cepa BPG055.4 Cepas de <i>Bacillus</i> vs larvas de <i>Tecia solanivora</i> .....	49
Figura 32. Exposición de las larvas en la papa frente al agroquímico comercial Fipronil.....	49
Figura 33 Cámara de cría de larvas de <i>Tecia solanivora</i> .....	50
Figura 34. Efectos físicos de la exposición de las cepas de <i>Bacillus</i> en la papa Semana1.....	51
Figura 35. Tinción de Gram de la parte superficial de la rodaja de papá cubierta con la cepa BPG11.....	52
Figura 36. Larva de <i>Tecia solanivora</i> inmovilizada.....	49
Figura 37. Exposición de la papa cubierta por larvas frente al agroquímico comercial Fipronil.....	53
Figura 38. Efectos físicos de la exposición de las cepas de <i>Bacillus</i> en la papa Semana.....	54
Figuras 39 y 40. Larva de <i>Tecia solanivora</i> inmovilizada.....	55
Figura 41. Daños causados en la papa por la formación de túneles hechos por las larvas durante su desarrollo.....	56
Figura 42. Efecto físicos de la exposición de las cepas de <i>Bacillus</i> en la papa tercera semana.....	57



Figura 43 y 44. Cadáveres de larvas de <i>Tecia solanivora</i> totalmente cubiertas por el <i>Bacillus</i> . BPG 01 yBPG11.....	58
Figura 45. Efectos físicos generados sobre la papa Semana4.....	59
Figura 46 Prepupa de <i>Tecia solanivora</i> ,.....	56
Figura47 Pupade <i>Teciasolanivora</i> .....	56
Figura 48. Larva L3 y su daño sobre la papa pastusa.....	60
Figura 49. Larva L3 de <i>Tecia solanivora</i> encontrada en la papa con la cepa de <i>Bacillus</i> BPG07 concentración 1.0.....	61
Figura 50. Larva L2 de <i>Tecia solanivora</i> dentro del tubérculo recubierto con la cepa de <i>Bacillus</i> BPG04 concentración 2.0.....	61



## **GÉNERO *Bacillus* COMO ALTERNATIVA DE MANEJO DE PLAGUICIDAS COMERCIALES PARA EL CONTROL DE *Tecia solanivora*, EN CULTIVO DE *Solanum tuberosum* cv Parda pastusa**

### **RESUMEN**

La papa, *Solanum tuberosum* es uno de los principales cultivos de Colombia, en zonas de clima frío, que beneficia aproximadamente 110.000 familias. Este cultivo es afectado por diferentes plagas, y una que genera mayores pérdidas por el daño ocasionado sobre el tubérculo lo produce el insecto *Tecia solanivora*. Actualmente, su único control es por medio de plaguicidas químicos que al ser esparcidos en el aire generan efectos tóxicos sobre los humanos y el ambiente. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar *in vitro* la capacidad de seis cepas de *Bacillus* spp: BPG01, BPG02, BPG05, BP05, BPG07, y BPG11 correspondientes a las especies *B. pumilus*, *B. sphaericus*, y *B. subtilis* consideradas agentes biocontroladores sobre larvas L1 de *Tecia solanivora*. Se utilizó una metodología de inmersión en 2 trozos de papa sobre dos concentraciones de cada cepa 1.0 y 2.0 en la escala de McFarland. Posteriormente, se infectaron con 12 larvas L1 de *Tecia solanivora* cada una de las 12 rodajas de papa. Los resultados se evaluaron por cuatro semanas, donde las cepas que inhibieron el desarrollo de las larvas fueron BPG01 en concentraciones 1.0 y 2.0 y BPG11 concentraciones 1.0 y 2.0 interpretando el efecto protector por el crecimiento de la bacteria sobre la larva cubriendo el 90% de su cuerpo a la tercera semana de estudio, impidiendo completamente su movilidad dentro del tubérculo y evitando así los daños en la papa. A futuro se espera realizar este estudio en condiciones *in vivo* controladas, para confirmar su capacidad insecticida.

**Palabras clave:** *Bacillus spp*, *Tecia solanivora*, Control biológico, insecticida

**Estudiantes:** Angie Carolina Acevedo López, Laura Camila Bermudez Herrera

**Docente:** Ligia Consuelo Sanchez Leal

**Fecha:** abril 2019

**Institución:** Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

## INTRODUCCIÓN

La papa es uno de los principales tubérculos cosechados en el mundo, “es originario de las regiones montañosas de los Andes, en América del Sur; ha sido cultivado por más de 10.000 años, desde la época del imperio Inca”<sup>1</sup>. Este producto agrícola hace parte del género *Solanum*, el cual está conformado por aproximadamente 2000 especies, entre las más utilizadas están: tuquerreña o sabanera, parda pastusa y pastusa suprema.<sup>2</sup> Colombia actualmente se posiciona como uno de los países con mayor producción de papa a nivel mundial, ocupando el puesto 24 y el tercer puesto en Sudamérica después de Perú y Brasil.<sup>3</sup> Este cultivo se destaca en el ámbito agropecuario por la alta demanda que genera además de “la variedad de actividades que se generan en torno a este producto”.<sup>2</sup> Cundinamarca se reporta como el departamento con el mayor número de hectáreas sembradas de este producto, teniendo una producción proyectada en el año 2018 de 1,077,222 Toneladas, además de ser el cultivo que más genera empleo en zonas de clima frío donde se benefician 110.000 familias según el Boletín Regional de la Federación de Papa.<sup>4</sup>

Los cultivos de papa sufren grandes afectaciones por diferentes tipos de plagas, entre los más mencionados y con grandes implicaciones se encuentra el insecto plaga *Tecia solanivora*, comúnmente conocido como polilla Guatemalteca, teniendo una afectación del 11,2% con respecto a las demás plagas de la papa como la Mosca blanca 16%, Virus del amarillamiento de las venas de las hojas de la planta 36.1%,

Roña 5.1%, Rizhoptonia 6,6 % y Gusano blanco 1,6 %.<sup>5</sup> Diferentes factores como las condiciones climáticas en temporadas secas y la movilización de los tubérculos, han contribuido a la diseminación de la plaga, “situación que se agrava debido a la poca información técnica que tienen los productores para el oportuno reconocimiento y adecuado manejo de la polilla”.<sup>2</sup>

En Colombia, el uso de plaguicidas ha sido y es el principal método para controlar la polilla guatemalteca, se estima que para su control en la papa, demanda la mayor cantidad de agroquímicos, después del café con un aproximado del 12% del consumo nacional.<sup>6</sup> Ante el ICA están registrados los insecticidas Pirestar , Orthene , Lorsban .Trapper y Curacron , cuyos ingredientes activos son clorpirifos, permetrina y profenofos de categoría toxicológica I y II, que corresponden a categorías extremadamente tóxicas para el hombre.<sup>7</sup>

Debido a la alta demanda de productos químicos para controlar la afectación de plagas en este cultivo, se han generado diversos efectos colaterales, principalmente en el ambiente y en insectos polinizadores como las abejas (*Apis mellifera*), animales encargados de “ayudar en la polinización de aproximadamente el 80% de los cultivos, que, a escalas globales, son aproximadamente 153 mil millones de hectáreas”<sup>8</sup>. Como alternativa, en la última década, se han buscado bioplaguicidas a base de microorganismos que presenten potencial entomopatógeno, para el control de plagas, con el fin de disminuir los efectos negativos en el ambiente, en la salud, y las consecuentes resistencias que se han generado como consecuencia del uso de estos plaguicidas químicos.

Diferentes estudios han demostrado la efectividad de los plaguicidas a base de microorganismos, que además de ser amigables con el ecosistema, permiten la conservación de diferentes insectos polinizadores y en esencia, la polinización, beneficiando así el incremento de la productividad agrícola.

Por esta razón, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar la acción controladora, de bacterias del género *Bacillus* y su posible uso frente al insecto *Tecia solanivora*, plaga que causa las principales pérdidas económicas a los cultivadores de papa (*Solanum tuberosum* cv. Parda pastusa)

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la acción entomopatógena de cepas del género *Bacillus* para el control de insectos plaga *Tecia solanivora*, presentes en cultivos de *Solanum tuberosum* cv Parda pastusa.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar bacterias del género *Bacillus* con potencial acción entomopatógena
- Evaluar mediante bioensayos la eficacia de *Bacillus* para el control de la polilla Guatemalteca de la papa.
- Establecer en qué estadio de desarrollo de *Tecia solanivora*, se observa el mayor número de daño o muerte por parte de cepas del género *Bacillus*

## 1. ANTECEDENTES

Según Pollet y Barragan año, la Polilla Guatemalteca en la actualidad es una de las plagas más peligrosas para la papa en Sudamérica, teniendo mayor afectación en la papa (*Solanum tuberosum*) ya que es uno de los cultivos más importantes de Colombia. Las larvas de la polilla guatemalteca de la papa, *Tecia solanivora* Povolny causan daños directos a los tubérculos, produciendo pérdidas económicas e incremento en el uso de agroquímicos.<sup>9</sup>

Actualmente, se utilizan diferentes estrategias de control biológico para el manejo de *Tecia solanivora*. Bosa F, Osorio P, et al, año hablan del uso de semioquímicos, incluidas las feromonas sexuales que no representan riesgo toxicológico, ambiental o para la salud humana. Para el caso de *T.solanivora* la primera descripción de la feromona fue realizada por Nesbitt et al. en 1985 donde identificaron como únicos isómeros E(3)- dodecenil acetato (E3-12 Ac) y (Z)3- dodecenil (Z3-12Ac ). En 2005, Bosa et al. identifica un tercer compuesto el dodecil acetato (12Ac) que combinado con los isómeros en proporciones 100:1:20 origina mayores capturas de machos.<sup>10</sup>

Martinez W, Uribe D, Ceron J en 2003, evaluaron el efecto tóxico de las proteínas CryI de *Bacillus thuringiensis* sobre larvas del insecto *Tecia solanivora*, a partir de una cría obtenida en condiciones de laboratorio. Los bioensayos se realizaron utilizando tres tipos de cepas bacterianas: una cepa Bt de referencia, una cepa nativa y siete cepas recombinantes de *Escherichia coli* que poseen genes CryI individuales. Se utilizaron tres tipos de métodos: El primero consistió en la inmersión de pequeños trozos de la papa sobre concentraciones de la cepa HDI de 25 y 100 ug/ml; en el segundo se delimitó la superficie de alimentación del insecto con parafina, y en el último se empleó una dieta artificial preparada con puré de papa casero o puré comercial. Los valores promedios de mortalidad en el método de inmersión fueron 68.3ug/ml y 91.4 ug/ml respectivamente, en los ensayos con parafina la preservación de la dieta fue buena obteniéndose un coeficiente de variación del 9,0% donde no se observaron diferencias entre las dosis evaluadas 2,5 y 25 ug de proteína/cm<sup>2</sup>; en los bioensayos que emplearon puré de papa dieron

resultados muy variables, situación que evidencia baja reproducibilidad entre las repeticiones.<sup>11</sup>

Entre el 2004 y el 2005 en el Norte de Santander, Cundinamarca y Nariño; se realizaron técnicas con *Baculovirus (Baculoviridae)* para el control de *T. solanivora*. Aislaron y evaluaron 5 diferentes aislamientos de *Granulovirus* procedentes de larvas de *T. solanivora*. Algunas formulaciones que contenían GV con un aditivo que los protegía frente a los rayos UV, después de 6 meses de almacenamiento a diferentes temperaturas, demostraron que conservaban las propiedades fisicoquímicas de las formulaciones, siendo afectadas las que se mantuvieron a temperaturas superiores a 28°C. Se determinó que el aislamiento PhopGV-CR1, protegió tubérculos de papa en condiciones de almacenamiento, reduciendo el daño hasta en un 70 %, lo que permite postular el Baculovirus como una alternativa para el Manejo Integrado de *T. solanivora*. Adicionalmente, identificó el aislamiento PhopGV-CR3 como potencialmente promisorio para el control de insectos de *T. solanivora* y *P. operculella* en cultivos de papa.<sup>11</sup>

En 2009 Salazar C y Betancourth C describen el uso de extractos de plantas como eucalipto (*Eucalyptus globulus* L'Her., Mirtacea) y ruda (*Ruta graveolens* L.), donde se tomaron hojas y ramas de plantas jóvenes para el control de *Tecia solanivora* en cultivos de papa, en Nariño, Colombia. Las plantas recolectadas pasaron por un proceso de limpieza, con el fin de eliminar partes afectadas por hongos y plagas. Posteriormente se eliminó la humedad para facilitar su pulverización, y se procedió a preparar los extractos en calentamiento con agua destilada. Se seleccionaron dos lotes de 756 m<sup>2</sup> en los municipios de La empalizada y Contero. En los resultados se pudo observar que en las dos localidades se reflejaba un manejo inadecuado de residuos de cosecha y condiciones de almacenamiento de los tubérculos cosechados; sin embargo, el mejor rendimiento por parte de los extractos de plantas lo obtuvo eucalipto, aunque es necesario utilizar metodologías que determinen la eficiencia biológica del eucalipto en la mortalidad de la plaga.<sup>12</sup>

En 2011 Layton C, Maldonado E, et al, revisaron el efecto controlador de *Bacillus subtilis* y *Bacillus brevis* contra hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum*. Demostraron que la capacidad controladora del género está mediada por su perfil bioquímico con la producción de múltiples metabolitos como Iturin A y fengycin en

*Bacillus subtilis* y *gramicidina* S (1-5) en *Bacillus brevis*. Se concluyó que la relación antagónica que se presenta entre el hongo y la bacteria activa la producción de *Iturin A*, *Fengycin* y *Gramicidina* S, generando un control en la propagación del hongo.<sup>13</sup>

Kheder S, Feki O, Dammak M, et al, en 2015, en su publicación “Efficacy of *Bacillus subtilis* V26 as biological control agent against *Rhizoctonia solani* on potato” estudian el efecto de control biológico de las tres familias de lipopeptidos segregados por *Bacillus subtilis*; Surfactina, Iturrinas y Fengicinas, siendo la más estudiada Surfactina que induce resistencia sistémica en las plantas y tiene la capacidad de favorecer la ploriferación bacteriana, para permitir la colonización de la rizosfera teniendo una acción protectora. En cultivos de papa *Solanum tuberosum* se evalúa su efecto sobre *Rhizoctonia solani*, donde rodajas de papa fueron tratadas con la cepa *Bacillus subtilis* V26 antes y después de inocular el hongo para verificar si V26 desarrolla actividades curativas y de protección. Aunque los dos tratamientos fueron efectivos en reducir la infección fúngica, el control más efectivo se fue alcanzado cuando V26 fue aplicado 24 horas antes de la inoculación generando una acción de protección. Esto puede ser debido al hecho que las endosporas de *Bacillus subtilis* necesitan tiempo para germinar antes de poder lograr la inhibir la germinación de *Rhizoctonia solani*. Además del efecto protector las cepas de *Bacillus* mejoraron significativamente el crecimiento de las plantas.<sup>14</sup>

Castañeda E, Sánchez L en 2016, evaluaron las condiciones de crecimiento de cuatro especies de *Bacillus sp* para entender su acción controladora sobre Fusarium. Se aislaron cepas UCMC TB1, TB2, TB3 y TB4, el Fusarium se sembró en Agar Papa Dextrosa durante 7 días a 25°C. Se utilizaron discos de 4mm de diámetro por 2mm de alto de la zona micelial de Fusarium y se fijaron en 2 extremos opuestos en placa de agar papa dextrosa; después se inocularon 20 µl de cada tratamiento en línea recta central y equidistante a los discos del hongo sembrado. La inhibición del crecimiento de Fusarium pudo ser visible en todos los tratamientos, posiblemente por la acción antagónica mediada por antibiosis, característico de estas especies biocontroladoras.<sup>15</sup>



Chinheya, et al, en 2017, en su publicación “Accepted Manuscript Biological control of the rootknot nematode, *Meloidogyne javanica* (Chitwood) using *Bacillus* isolates, on soybean Cleopas” donde se realizaron 70 aislamientos bacterianos de raíces de cultivos y pasto de alimento para cabras. El inóculo de *Meloidogyne javanica* se obtuvo de la Universidad de North West y se mantuvieron en tomate *Solanum lycopersicum*. La corteza compostada se inoculó con larvas J2 y se mantuvo en el invernadero a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ . Después de 4 semanas de inoculadas, las raíces de tomate se arrancaron y se extrajeron los huevos agitando las raíces en hipoclorito de sodio al 1%. La suspensión se lavó por medio de una serie de tamices (1000  $\mu\text{m}$ , 330  $\mu\text{m}$ , 190  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$  y 38  $\mu\text{m}$ ) y se recogieron los huevos del tamiz inferior (38  $\mu\text{m}$ ). Los huevos son bien lavados para eliminar el hipoclorito de sodio residual. Las larvas se recogieron de 3 a 5 días después. Una suspensión de esporas bacterianas se preparó mediante la adición de 1.0 g de carboximetilcelulosa (CMC) a 50 ml de suspensión de esporas. Se añadió un lote de 120 semillas a cada matraz y sumergidas en la suspensión de calcomanías de esporas durante aproximadamente una hora con movimientos constantes.<sup>16</sup>

Viviana Yáñez-Mendizábal, César E. Falconí en el 2018, en su publicación “Efficacy of *Bacillus* spp. to biocontrol of anthracnose and enhance plant growth on Andean lupin seeds by lipopeptide production” propuso como objetivo evaluar cuatro cepas de *Bacillus* con capacidades de controlar la antracnosis en semillas de lupino. Se realizó ensayo *in vitro* con la técnica de enfrentamiento dual, donde se evidencia un efecto antifúngico. La inhibición ocurrió sobre el crecimiento micelial y la germinación conidial de *C. acutatum*. Además, se realizó identificación de lipopeptidos que indicó la antibiosis que funcionó como biocontrolador y los butanólicos de los compuestos libres muestran que las cepas de *Bacillus* producen antifúngicos. Finalmente, siembran semillas tratadas con *Bacillus* las cuales mostraron una mejor producción de clorofila, proteínas y enzimas de defensa como la peroxidasa y la catalasa. Las cepas de *Bacillus spp* son agentes controladores para la infección por antracnosis en las semillas de altramuz andino ya que los lipopeptidos afectan el proceso fisiológico de manera positiva.<sup>17</sup>

## 2. MARCO REFERENCIAL

Las primeras papas fueron cultivadas aproximadamente 6.000 y 10.000 años atrás, al norte del lago Titicaca, en los Andes del sur del Perú. Allí a partir de las especies silvestres *Solanum bukasovii*, *S. canasense*, *S. multissectum*, pertenecientes al complejo *S. brevicaulis*, se cree que se originó *S. stenotomum*, que es considerada la primera papa domesticada.<sup>18</sup>

El género *Solanum* familia Solanaceae está conformado por aproximadamente 2.000 especies. En Colombia las variedades más utilizadas son: tuquerreña o sabanera, parda pastusa, pastusa suprema, rubí, salentuna, carriza, diacol capiro, ICA única, ICA nevada, ICA Nariño, milenio-1, diacol Monserrate y yema de huevo (papa criolla)<sup>2</sup>

El cultivo de papa es la principal actividad de clima frío, se localiza entre 2.000 y 3.500 m.s.n.m. Su cultivo se encuentra en la zona andina donde se cultivan aproximadamente 133.865 hectáreas en el país al año, entre los departamentos que se destacan por la producción de papa se encuentra Cundinamarca y Boyacá. Este es el producto agrícola que demanda la mayor cantidad de fungicidas e insecticidas con un aproximado de 160.000 hectáreas, después del arroz y el segundo con la mayor demanda de fertilizantes después del café.<sup>19</sup>

Según la entidad responsable de la planeación, levantamiento, procesamiento, análisis y difusión de las estadísticas oficiales de Colombia DANE, en su último reporte del consumo aparente de plaguicidas químicos que abarca un estudio desde el año 2000 que registra un valor de 5,816 toneladas hasta el año 2015 donde en este último el valor anual de estos químicos fue de 47,475 toneladas, durante los 15 años de seguimiento se observa un incremento del 71,6% en el uso de plaguicidas.<sup>20</sup>

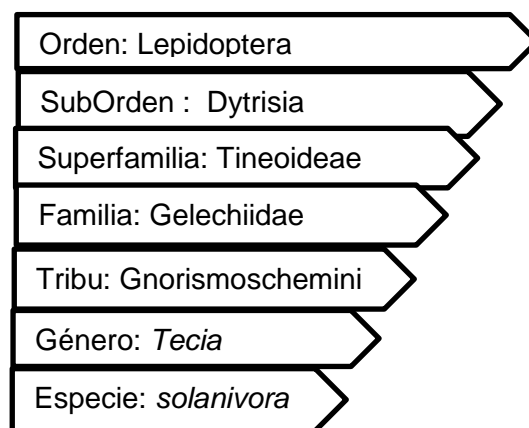
### 2.1 *Tecia solanivora*

Es una pequeña mariposa de color café oscuro a gris que presenta manchas claras y oscuras en las alas anteriores. Los adultos son activos en horas muy tempranas,

es decir, en la madrugada y en horas de la noche. Sus vuelos son cortos. Las hembras ponen los huevos cerca de los tubérculos de papa o sobre ellos.<sup>5</sup>

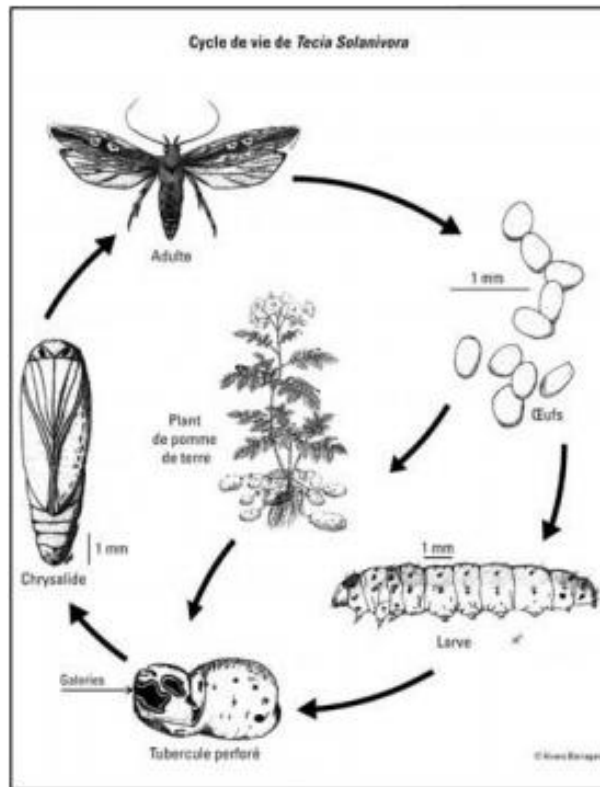
### Clasificación Taxonómica

Tabla 1. Taxonomía de *Tecia solanivora*.<sup>21</sup>



### 2.3 Ciclo de vida:

Durante su ciclo de vida estos insectos pasan por cuatro estadios de desarrollo: huevo, larva, pupa y adulto, la duración de este ciclo está entre 54 a 96 días y cada estado está determinado por las condiciones del medio ambiente, principalmente la temperatura y humedad. La polilla puede depositar de 150 a 360 huevos y puede dar hasta seis generaciones al año, dependiendo de las condiciones ambientales.<sup>22</sup>



**Figura 1. Ciclo de vida *Tecia solanivora*.**<sup>23</sup>

### 2.3.1 Adulto:

Es una polilla con cabeza, tórax y tégula de color pardo oscuro en los machos y pardo claro en las hembras. El abdomen es filiforme en los machos y abultado en las hembras. Son muy sensibles a luz, por lo cual durante el día permanecen ocultos, tiene hábitos nocturnos y su vuelo es corto y bajo.

### 2.3.2 Huevos:

Son de forma ovoide o casi redonda, de color blanco aperlado recién puestos, luego crema, amarillo intenso y oscuros cuando van a eclosionar. Son colocados en grupos cuando hay presencia de tubérculos y en los primeros días de ovipostura. En campo se encuentran sobre las hojas bajas de la planta, en el cuello de la raíz, base del tallo y sobre el área de tuberización. En este estado duran de 8 a 10 días en condiciones ambientales de laboratorio.

### **Pasa por cuatro estadios larvales:**

### 2.3.3 Larvas primer instar:

Son muy pequeñas de color blanco transparente y cabeza de color marrón oscuro, penetran en el tubérculo haciendo orificios casi imperceptibles; este estado es muy susceptible a la luz solar, al agua y polvos finos que se le puedan pegar y envolver en su cuerpo ocasionando su deshidratación.

Larvas segundo instar: Son de color blanco crema y hacen minas superficiales en el tubérculo.

### 2.3.4 Larvas segundo instar:

Son de color blanco crema y hacen minas superficiales en el tubérculo.

### 2.3.5 Larvas tercer instar:

Se caracterizan por tener una coloración crema verdosa, hacen galerías profundas y es el estado más voraz.

### 2.3.6 Larvas cuarto instar:

Se caracterizan por el color verdoso en la parte ventral y el color púrpura en la parte dorsal, en este instar alcanza a medir de 14 a 16 mm de longitud.

### 2.3.7 Prepupas:

Una vez abandonado el tubérculo la larva busca el sitio de empupamiento. Disminuye de tamaño y conserva el color de cuarto instar. Este estado dura de 2 a 3 días.

### 2.3.8 Pupas:

La prepupa se envuelve en un capullo de seda dentro del cual se forma la pupa. A la parte externa del capullo se le adhieren partículas de suelo y otros materiales que están a su alrededor formando el cocón pupal. Este estado puede durar de 15 a 18 días bajo las condiciones ambientales. La pupa hembra es más abultada y grande.

## 2.4 Afectación en los cultivos de papa

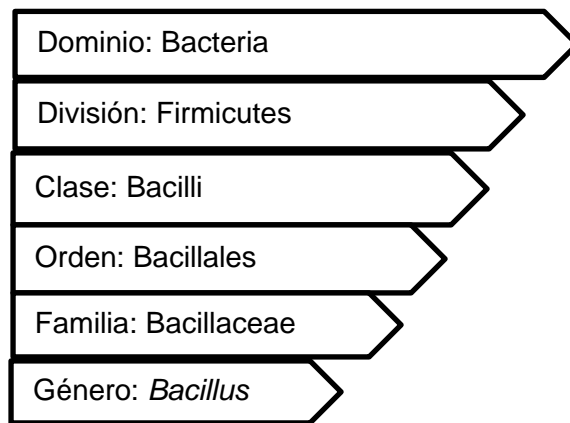
Los primeros casos de afectación por parte de la polilla Guatemalteca (*Tecia solanivora*) se registraron desde el año 1956 en Guatemala de donde origina su nombre. El Servicio Interamericano de Desarrollo Agrícola de este país estableció que esta plaga ocasiona daños de hasta un 25% en las siembras. Debido a la movilización de tubérculos de papas en diferentes países centroamericanos, la plaga se dispersó y adaptó. La presencia de esta plaga en Colombia tuvo origen en el año 1985, en el departamento de Norte de Santander, posteriormente en 1994 se reportaron daños en otros departamentos paperos. Finalmente, la región Antioqueña determinó que la polilla Guatemalteca causaba pérdidas entre el 50 y el 100% de la producción del cultivo, afectando indiscriminadamente a la semilla almacenada y a los tubérculos en campo.<sup>24</sup>

Entre los principales daños que ocasiona la Polilla Guatemalteca, además de deterioro de la calidad, está el de facilitar la penetración de microorganismos y pudrición del tubérculo, causando perjuicios económicos por la disminución en el precio de venta. Los tubérculos afectados no se pueden utilizar para semilla, ni para consumo humano o animal.<sup>25</sup>

La Polilla Guatemalteca ataca únicamente al cultivo de papa causando daños solo a los tubérculos. La larva al nacer se dirige a ellos, raspa la superficie y penetra debajo de la epidermis, luego va hacia su interior abriendo galerías y dañando la apariencia de los mismos. Las larvas son capaces de alimentarse de tubérculos en estado de descomposición y puede encontrarse gran cantidad de ellas en un solo tubérculo. La polilla y el daño que ésta ocasiona aumentan en épocas secas.<sup>26</sup>

## 2.5 Género *Bacillus* sp

Tabla 2. Taxonomía *Bacillus* sp.<sup>27</sup>



### **Generalidades:**

El género *Bacillus*, pertenece a la familia Bacillaceae, una de las familias bacterianas con mayor actividad bioquímica. Son bacilos aerobios y anaerobios facultativos, Gram positivos, productores de endosporas con morfología oval o cilíndrica, que le brindan resistencia a condiciones desfavorables en el ambiente. Las esporas poseen la capacidad de diseminarse en el aire, por tanto, pueden migrar grandes distancias y ser ubicuas en el medio ambiente hasta encontrar condiciones óptimas para su crecimiento. Estos microorganismos son móviles por la presencia de flagelos laterales, presentan la enzima catalasa; generan hemólisis variable y crecimiento activo en un rango de pH entre 5.5-8.5. Este tipo de bacterias por lo general crecen bien en agar sangre, produciendo colonias blanquecinas, grandes, extendidas e irregulares. Son organismos ampliamente distribuidos en el ambiente y pueden encontrarse en el suelo, agua dulce y salada, materia vegetal en descomposición, desiertos y la Antártida.<sup>27</sup>

## 2.6 Propiedades como organismo entomopatógeno:

Se considera mecanismo de biocontrol al uso del conjunto de reacciones metabólicas, bioquímicas y/o físicas que de manera natural se desarrollan y desencadenan la inhibición de la expresión un organismo patógeno por parte de otro en un ambiente determinado con el fin de lograr su eliminación total o parcial, sin causar efectos adversos. El género *Bacillus* al ser un tipo de bacteria esporulante posee una gran persistencia en el ambiente, y son altamente virulentas con capacidad invasiva y de producción de toxinas.<sup>28</sup>

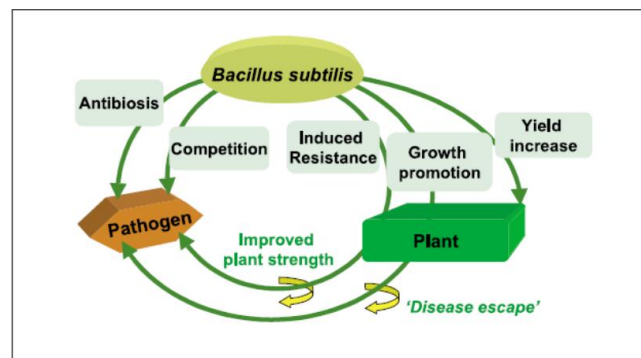


Figura 2. Mecanismos de acción *Bacillus subtilis*.<sup>29</sup>

*Bacillus thuringiensis*, se describió por primera vez en Japón en el año 1904, y sus primeras preparaciones comerciales se realizaron hacia los 60's en Francia y Estados Unidos, para el manejo de Lepidópteros. Esta bacteria se emplea sola o en combinación con pesticidas químicos, para la protección de especies vegetales, agricultura comercial y contra vectores de enfermedades humanas (malaria, dengue, fiebre amarilla, filariasis. Representa aproximadamente el 90% del mercado de biopesticidas el cual asciende a 600 millones de dólares. Por medio de la ingeniería genética se ha introducido genes de esta bacteria en cultivos, con el fin de garantizarles resistencia frente a diferentes tipos de plagas. Estos tipos de cultivos han reducido el uso de agroquímicos un 60 a 80%, aproximadamente 21.000 toneladas.<sup>30</sup>



## 2.7 Pesticidas

La introducción de los agroquímicos se evidencia a finales del siglo XX. En 1922, cuando se emplearon diferentes aceites insecticidas y poco más tarde los primeros productos sintéticos. El señor Paul Hermann Müller, en 1940 descubre las propiedades insecticidas del dicloro-difeniltricloroetano, mejor conocido como DDT. 6 A partir de 1946 las multinacionales productoras de pesticidas y agroquímicos toman auge, así como el nacimiento los grandes centros de investigación agrícola que ven la luz en los años 1950, 60 y 70.<sup>31</sup>

La formulación de plaguicidas en Colombia inicia en el año 1963, con el despegue del sector agrícola, especialmente de productos como el algodón y exportaciones de arroz y azúcar. Dichos químicos fueron autorizados en 1964 y reglamentados con el Decreto 219 de 1966. Los principales insecticidas utilizados, eran los derivados del DDT y mezclas con organofosforados. Su uso no estaba restringido, por lo tanto cualquier persona podía adquirirlo sin conocer las implicaciones a corto y largo plazo hacia la salud y el medio ambiente.<sup>32</sup>

Aunque los plaguicidas son sustancias químicas beneficiosas para los alimentos agrícolas, en Colombia, según el Banco Mundial, desde hace 20 años se incrementó el uso en toneladas y la importación de plaguicidas en un 360 %. Esto a la vez aumentó los reportes de intoxicaciones en las salas de urgencias por consumo de alimentos que no han tenido un manejo adecuado en el lavado o la cocción.<sup>33</sup>

Pimentel en 2005 habla de los costos generados a nivel ambiental y económico, derivados de la aplicación de plaguicidas en Estados Unidos, estos eran del tipo organoclorados, organofosforados y carbamatos. Este tipo de sustancias a pesar de aplicarse en dosis recomendadas para eliminar diferentes tipos de plagas, solo destruía el 37% de las mismas, donde por cada dólar invertido en el control de plaguicidas solo genera 4 dólares por cultivos protegidos, de 500 kg de pesticida que se utiliza a cada año en el país, con un equivalente monetario de 10 mil millones de dólares. Esto ha generado que el uso se incremente, teniendo afectación a nivel de salud en los trabajadores, y en diferentes ecosistemas

ambientales. Una de las mayores afectaciones se analiza en las abejas melíferas y silvestres, encargadas de polinizar un tercio de los cultivos teniendo un aporte económico de 40 mil millones al año. Debido a que la mayoría de insecticidas utilizados, tienen afectación negativa sobre esta población de abejas, se estima que un 20% de todas las colonias de abejas melíferas son afectadas.<sup>34</sup>

Los plaguicidas organofosforados son altamente tóxicos, son potentes Inhibidores de la acetilcolinesterasa por fosforilación de este enzima, cuyos efectos son, entre otros, broncoconstricción, hipersecreción bronquial, espasmos de laringe, cefaleas, náuseas, vómitos, confusión, pudiendo llegar al coma y a la muerte. Existe la posibilidad de que se produzca neurotoxicidad retardada, son utilizados en nuestro país como insumos agrícolas, comenzó hacia 1950 y en Colombia su empleo como insumos agrícolas se inició hace unos 20 años empezando el proceso de formulación en el año de 1963 En la década 64-74 el consumo de plaguicidas creció a un ritmo de 10% anual, en tanto que el crecimiento de la producción agrícola solo lo hizo al 4.5%, en el año de 1978 se calcula que fueron aplicadas en el país unas 17.000 toneladas métricas de plaguicidas (lo cual equivale al 60% del total de los plaguicidas aplicados en el grupo andino.<sup>35</sup> Estos mismos son Inhibidores de la acetilcolinesterasa por fosforilación de este enzima, cuyos efectos son, entre otros, broncoconstricción, hipersecreción bronquial, espasmos de laringe, cefaleas, náuseas, vómitos, confusión, pudiendo llegar al coma y a la muerte. Existe la posibilidad de que se produzca neurotoxicidad retardada.<sup>36</sup>

2.8 Bioproductos utilizados actualmente para el control de plagas en cultivos.

**Bacillus pumilus:** Es un fungicida actualmente patentado en México por AgraQuest, donde la cepa QST 2808 de *Bacillus pumilus*, produce proteasas y otras enzimas que permiten degradar variedad de sustratos naturales. Además impide la germinación de esporas por la formación de una barrera física, actúa interrumpiendo el metabolismo celular destruyendo las paredes celulares de los patógenos. Actualmente se utiliza como fungicida en cultivos de Calabaza, Melón, Papa, y Trigo.<sup>37</sup>

**Plaguicidas Botánicos:** Son derivados de algunas partes o ingredientes activos de plantas, donde se ha demostrado que gran variedad afectan a las poblaciones de insectos, disminuyendo la supervivencia de desarrollo y la tasa de reproducción por medio de la producción de fitoquímicos tales como: saponinas, taninos, alcaloides, di y triterpenoides, entre otros, los cuales presentan alta actividad insecticida, bactericida, fungicida, nematocida y repelente. Debido a su amplio campo de aspecto se ha utilizado en diferentes cultivos incluyendo la papa.<sup>38</sup>

**Micoinsecticidas:** El hongo invade la hemolinfa donde la muerte del insecto se genera por combinación de daños mecánicos producidos por el crecimiento del hongo, desnutrición y por la acción de los metabolitos secundarios o toxinas que el hongo produce. Durante la infección, se producen hifas y protoplastos que carecen de pared celular, haciendo que los hemocitos del insecto no lo detecten, facilitando la dispersión del hongo sobre el insecto.

#### 2.9 Microorganismos utilizados para el control de *Tecia solanivora*.

**Baculovirus:** Son una familia de virus de ADN de doble cadena que infectan insectos y crustáceos. Al igual que los demás virus necesitan de células huésped para poder multiplicarse. Tiene una gran desventaja y es que es relativamente lento para matar los insectos hospedantes, depende de la edad del mismo, las condiciones ambientales, la dosis viral, la especie del virus y la susceptibilidad del huésped.<sup>39</sup>

El bioplaguicida comercializado por la corporación Colombiana de investigación agropecuaria para el control de *Tecia solanivora* se aplica por medio de espolvoreo a los tubérculos de papa antes de iniciar el periodo de almacenamiento 2,5 kg por tonelada de papa. Tiene un rendimiento de aproximadamente 80%.

**Proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*:** Este microorganismo ha sido ampliamente utilizado durante un siglo como opción de manejo de insectos plaga, tiene actividad hacia insectos del orden Lepidóptera, Coleóptera y Díptera. Las toxinas Cry constituyen el factor de virulencia más importante de *Bacillus thuringiensis*. En el control de *Tecia solanivora* se ha encontrado que las toxinas Cry1Ac (Base para variedades transgénicas) y Cry1B tienen actividad tóxica frente

al insecto y la tóxina híbrida (Cry1B-Cry1I) que presento una alta letalidad sobre *Tecia solanivora*.<sup>40</sup>

### 3. DISEÑO METODOLÓGICO

#### 3.1 Tipo de Estudio

El presente trabajo tiene un enfoque cuantitativo exploratorio

#### 3.2 Hipótesis:

Algunas cepas de *Bacillus sp* pueden tener efecto quitinolítico frente a huevos y larvas de la plaga de insectos *Tecia solanivora*,

#### 3.3 Variables del estudio

Tabla 3. Tipos de variables del estudio

TIPO DE VARIABLE	NOMBRE DE LA VARIABLE	DEFINICIÓN TEÓRICA	CLASIFICACIÓN DE LA VARIABLE
<b>Independiente</b>	Cepas Quitinolíticas	La elección de las cepas se basa en revisión bibliográfica y la capacidad es estas en su actividad productora de biomasa quitinolítica y endospora	Cualitativa
<b>Independiente</b>	Temperatura (27- 30°C)	La temperatura es de gran importancia en el crecimiento y producción de biomasa quitinolítica y endosporas de las cepas en estudio. El control de temperatura se realiza en la incubadora.	Cuantitativa
<b>Independiente</b>	Huevos de <i>Tecia solanivora</i>	Se seleccionaron debido al daño que causa en las cosechas de papa, esto se hace con el fin de ejercer un control biológico sobre ellos.	Cualitativa
<b>Independiente</b>	Larvas estar 1 de <i>Tecia solanivora</i>	Se seleccionan larvas en estadio 1 para controlar la plaga y mitigar el uso de plaguicidas	Cualitativa
<b>Dependiente</b>	Porcentaje de reducción	Se evalúa el porcentaje de reducción de huevos y larvas en todos los ensayos in vitro, con el fin de obtener un porcentaje que sea significativo.	Cuantitativa

### 3.3 Técnicas y Procedimientos

#### 3.3 1. Fase 1. Activación de las cepas de *Bacillus*

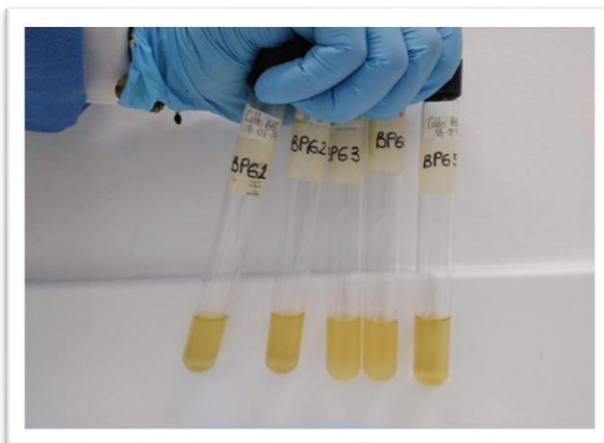
Se activaron 11 cepas de *Bacillus sp.* pertenecientes a las especies *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus sphaericus* ya identificados por métodos moleculares y provenientes del banco de cepas de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, las cuales se encontraban congeladas en caldo BHI y 10% de glicerol. A continuación, en la Tabla.4 donde se enuncia la nomenclatura de las cepas de *Bacillus* que se emplearon en el estudio.

**Tabla 4. Nomenclatura de cepas de *Bacillus sp* empleadas en la investigación.**

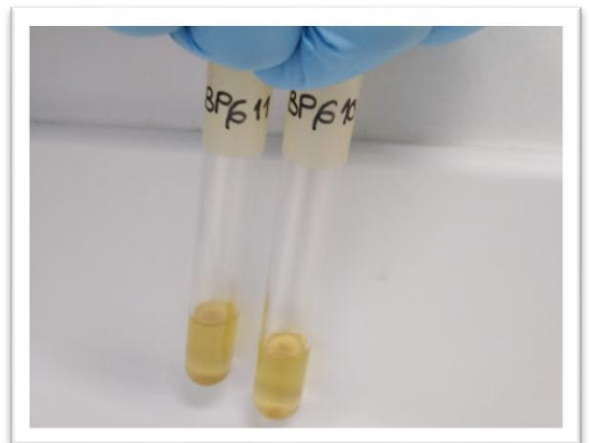
<b>CEPA</b>	<b>GÉNERO-ESPECIE</b>	<b>NOMENCLATURA ASIGNADA</b>
<b>Bp01</b>	<i>Bacillus pumilus</i> nativo del suelo	<b>BPG01</b>
<b>BpC01</b>	<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 4884	<b>BPG02</b>
<b>Bs01</b>	<i>Bacillus sphaericus</i> nativo del suelo	<b>BPG03</b>
<b>BSC01</b>	<i>Bacillus sphaericus</i> ATCC 4525	<b>BPG04</b>
<b>BI07</b>	<i>Bacillus subtilis</i> aislada de cultivos de <i>Solanum quitoense</i>	<b>BPG05</b>
<b>CH4</b>	<i>Bacillus subtilis</i> aislada de chimeneas de restaurante de pollo	<b>BPG06</b>
<b>U2-01</b>	<i>Bacillus pumilus</i> aislada de plantas de cultivos de uchuva	<b>BPG07</b>
<b>CH7B</b>	<i>Bacillus pumilus</i> aislada de chimeneas de restaurantes de pollo	<b>BPG08</b>
<b>BIO10</b>	<i>Bacillus subtilis</i> aislada de cultivos de <i>Solanum quitoense</i>	<b>BPG09</b>
<b>TB2</b>	<i>Bacillus subtilis</i> con actividad antagónica frente a <i>Fusarium</i>	<b>BPG10</b>
<b>Control TB2</b>	<i>Bacillus subtilis</i> nativo del suelo	<b>BPG11</b>

- La descongelación se realizó según el protocolo de Sánchez y Corrales (2005)<sup>41</sup>, donde se seleccionan las cepas a trabajar que se encuentran almacenadas a -70°C. La descongelación se realizó a temperatura ambiente, luego el contenido se vierte en tubos con caldo BHI (Brain Heart Infusion), y se incuba a 27°C durante 24 horas.

**Figura 3 Descongelación de viales de las cepas de *Bacillus sp***



*Figura 1. BPG 1,2,3,4,5*



*Figura 2 BPG 10,11.*

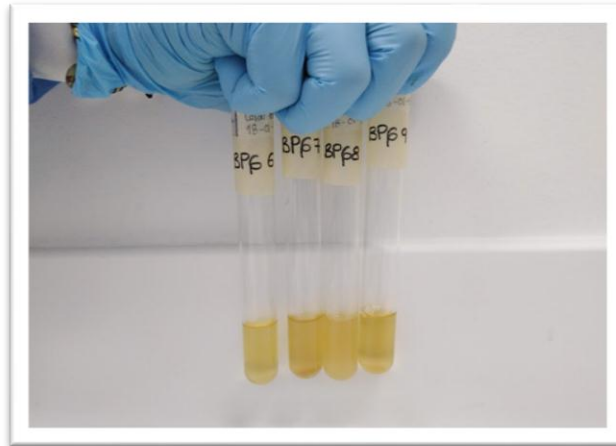


Figura 3.BPG 6,7,8,9

### **Figuras 4,5,6. Cepas de *Bacillus* sp en Caldo BHI.**

Finalizado el tiempo de incubación, se realizó una siembra por agotamiento del crecimiento en los tubos, en agar BHI. Posteriormente, se llevaron a incubar por 24 horas a 27°C. Después se verificaron las siembras en el agar BHI para confirmar su viabilidad y pureza, mediante la observación de las características macroscópicas de las colonias, y microscópicas por medio de la tinción de Gram.

### **3.3 2. Fase 2: Obtención de biomasa quitinolítica y biomasa con capacidad de producción de endospora terminal.**

#### **❖ Activación de la biomasa con capacidad quitinolítica**

Se preparó el Agar quitina (MQ) para comprobar la efectividad quitinolítica que tienen las diversas cepas de *Bacillus*. Esto se evidencia por crecimiento, mediante la capacidad del microorganismo de utilizar la quitina como única fuente de energía para generar su crecimiento. Se hicieron las respectivas siembras de las bacterias por medio de la técnica de agotamiento y se incubaron a una temperatura de 27°C durante 24, 48 y 72 horas para evaluar el crecimiento.

El crecimiento se evaluó cualitativamente de la siguiente manera:

- ✓ Sin crecimiento (-)
- ✓ Crecimiento débil (+)
- ✓ Crecimiento moderado (++)
- ✓ Crecimiento abundante (+++)

Para su posterior confirmación se realizó tinción de Gram a las 72 horas.

#### ❖ **Suspensiones Bacterianas**

Se tomaron 12 tubos de 10 x 100 y se les adicionó a cada uno 3ml de solución salina posterior a esto se esterilizaron en autoclave. Por cada cepa bacteriana se realizaron dos concentraciones, la primera de 1.0 y la segunda de 2.0 se inoculo cada tubo tratando de asemejar la turbidez representada de manera visual en la escala de Mcfarland por cada concentración.

### **3.3 3 Fase 3. Bioensayos de biomasa bacteriana vs huevos y larvas de *Tecia solanivora*.**

#### ❖ **Desarrollo de la cría**

Se solicitaron 2000 huevos al centro de investigación de la Corporación Colombia de Investigación Agropecuaria AGROSAVIA .



**Figura 7. Caja de Petri con huevos de *Tecia solanivora***

De acuerdo con el protocolo sugerido en la visita a AGROSAVIA para el manejo y el desarrollo de la cría junto con el Manual Integrado de la Polilla Guatemalteca de la papa *Tecia solanivora*<sup>37</sup>, los pasos para el desarrollo de la cría de *Tecia solanivora* fueron:



1. Se ubicó la logística de la cría en el invernadero del grupo Ceparium en las instalaciones de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, donde los huevos se dejaron en la caja de Petri por 8 días en completa oscuridad y en cámara húmeda para su correcta eclosión, a una temperatura de 16-19°C y humedad de 42 a 52%.
2. Con ayuda del estereoscopio se observó la presencia de larvas L1, como indicativo de la eclosión de los huevos.



**Figura 8. Larva 1 de *Tecia solanivora***

3. Se utilizó una cubeta plástica para recrear la cámara de cría con una rejilla en medio donde se ubicaron las papas y arena sobre la base para brindar humedad durante el proceso de desarrollo.
4. Con ayuda de una jeringa de bisel muy delgado se trasladaron las larvas L1 sobre las papas, para que penetraran el tubérculo y una vez adentro, puedan cumplir su desarrollo al pasar por los cuatro estadios larvales y su posterior desarrollo a pupa. De igual forma, las servilletas que contenían huevos por eclosionar se dejaron sobre las papas hasta el momento en que ya no se observó el desarrollo de larvas.



**Figura 9. Montaje de larvas de *Tecia solanivora* sobre papa *Solanum tuberosum* para el desarrollo de la cría.**

5. Pasadas tres semanas de haber realizado el montaje, se observaron los daños causados sobre el tubérculo durante el desarrollo larval de *Tecia solanivora*. Interpretando los daños por la formación de perforaciones sobre la papa asociados a los túneles ocasionados por las larvas en el último estadio larval L4.



**Figura 10. Daño total causado por las larvas una vez caen a la arena para empupar.**

6. Completado el desarrollo larval, la larva L4 abandona el tubérculo y busca el sitio de empupamiento en este caso es la arena. Allí se formó una prepupa que se envolvió en un capullo de seda y formó la pupa.
7. Se diseñó una cámara de recolección de adultos, la cual era de vidrio y estaba cubierta con un velo suizo para favorecer el aire y evitar que no se escapen, allí se dispuso la arena con pupas para el desarrollo de los adultos. 10 días después, salieron los adultos de las pupas.



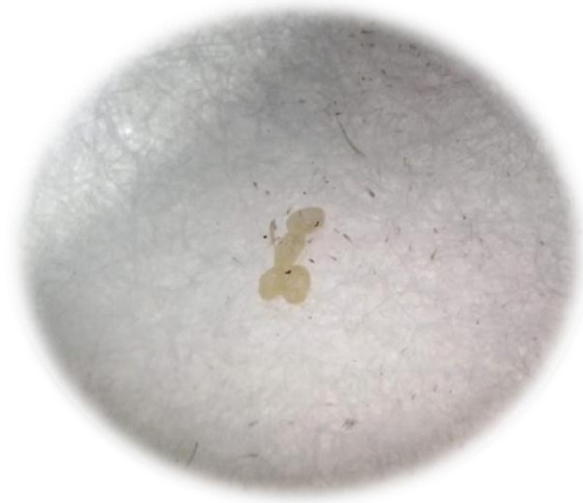
**Figura 11. Montaje de cámara para recolección y clasificación de adultos de *Tecia solanivora*.**

8. Se separaron los adultos en cámara ovopositora, en donde se hizo una proporción 50/50 de machos y hembras, identificándose por su anatomía; las hembras poseen un abdomen pletórico y el de los machos es filiforme, con el fin de generar una nueva cría. La alimentación se hizo por medio de un taco de algodón impregnado con agua miel, y se dejaron a la luz de una ventana para favorecer su copulación.



**Figura 12. Cámara ovopositora con adultos de *Tecia solanivora* para recolección de nuevos huevos.**

9. Pasados 5 días se observaron en las servilletas los nuevos huevos de *Tecia solanivora* los cuales son utilizados para los Bioensayos



**Figura 13. Visualización de huevos de *Tecia solanivora***

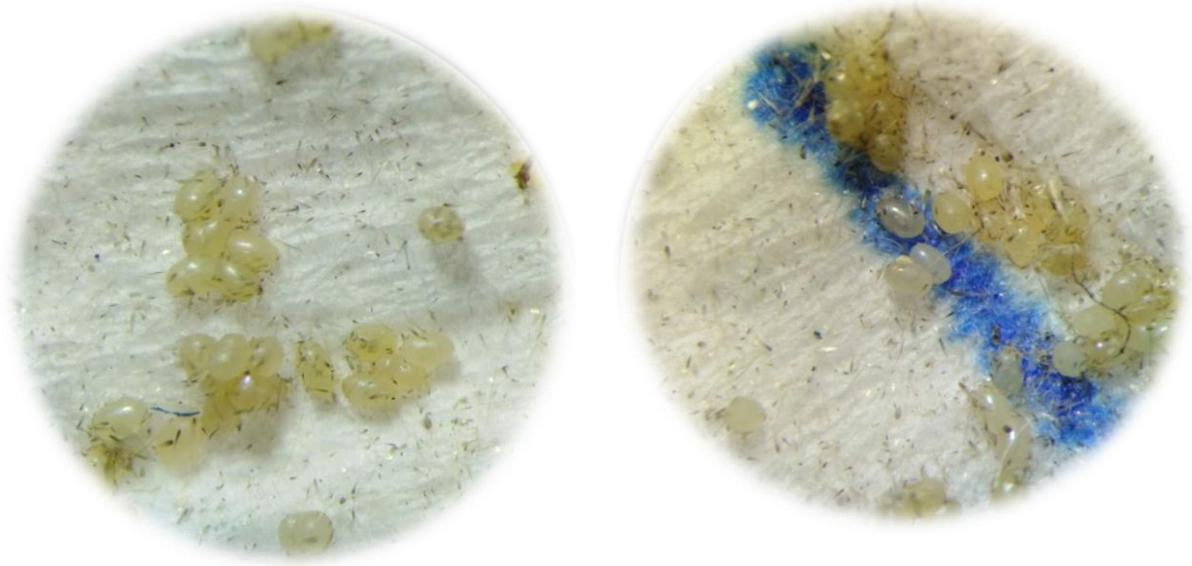
### ***Bioensayos en huevos***

230 huevos producto de la cría se dispusieron de la siguiente manera:

1. Se formaron nuevas cámaras de incubación en cajas Petri y servilletas, y con ayuda de un pincel y en observación sobre el estereoscopio de la caja Petri que contenía los 230 huevos se extrajo un aproximado de 20 huevos.
2. Los 20 huevos se separaron, 10 en una cámara de incubación y 10 en otra, como este estadio debe estar en constante humedad se generó una cámara húmeda con papel filtro humedecido por las cepas de *Bacillus BPG04* y *BPG05* respectivamente en concentraciones de 2.0 a la escala de McFarland. El bioensayo se dejó por 8 días a temperatura de ambiente y en completa oscuridad.

## Bioensayos sobre larvas

Los 210 huevos restantes se dejaron 8 días, igualmente, en cámara húmeda, pero sobre agua destilada, dando tiempo para su eclosión.



**Figura 14, 15 Huevos de Tecia solanivora a punto de eclosionar.**

Una vez se visualizó la presencia de larvas neonatas se dispusieron de la siguiente manera:

**Control positivo:** Se sumerge la rodaja de papa sobre el plaguicida comercial a base de Fipronil durante 2 minutos, se dejó secar y sobre la papa se colocaron 12 larvas L1 de *Tecia solanivora*.

**Control Negativo:** 12 larvas de *Tecia solanivora* sobre 2 papas *Solanum tuberosum* en cámara de cría.

Los bioensayos en las papas se realizaron según el protocolo empleado por Martínez y colaboradores en el año 2003 en su publicación “Efecto tóxico de proteínas CryI de *Bacillus thuringiensis* sobre larvas de *Tecia solanivora* (Lepidoptera Gelechiidae)”.

En este ensayo, se utilizaron 12 rodajas de papas de *Solarum tuberosum*, que se dispusieron de la siguiente manera:

1. Se colocaron dos rodajas por cada cepa
2. Para el método de inmersión, cada una de las rodajas de papa seleccionada para cada cepa se sometieron a concentración de 1.0 y 2.0 respectivamente en la escala de McFarland de las cepas de *Bacillus* BPG01, BPG02, BPG04, BPG05, BPG07 y BPG11, por 5 minutos en agitación constante.
3. Se dejaron secar a temperatura ambiente por diez minutos
4. Se colocaron 12 larvas en cada una de las rodajas de papa
5. El experimento se llevó a una cámara de incubación para observar los efectos de las diferentes cepas de *Bacillus* a temperatura de 19 -22°C
6. Se realizó seguimiento por 4 semanas para mirar los cambios físicos presentes en la papa y el efecto del *Bacillus* sobre las larvas.

Para evaluar el índice de mortalidad, se empleó la siguiente formula:

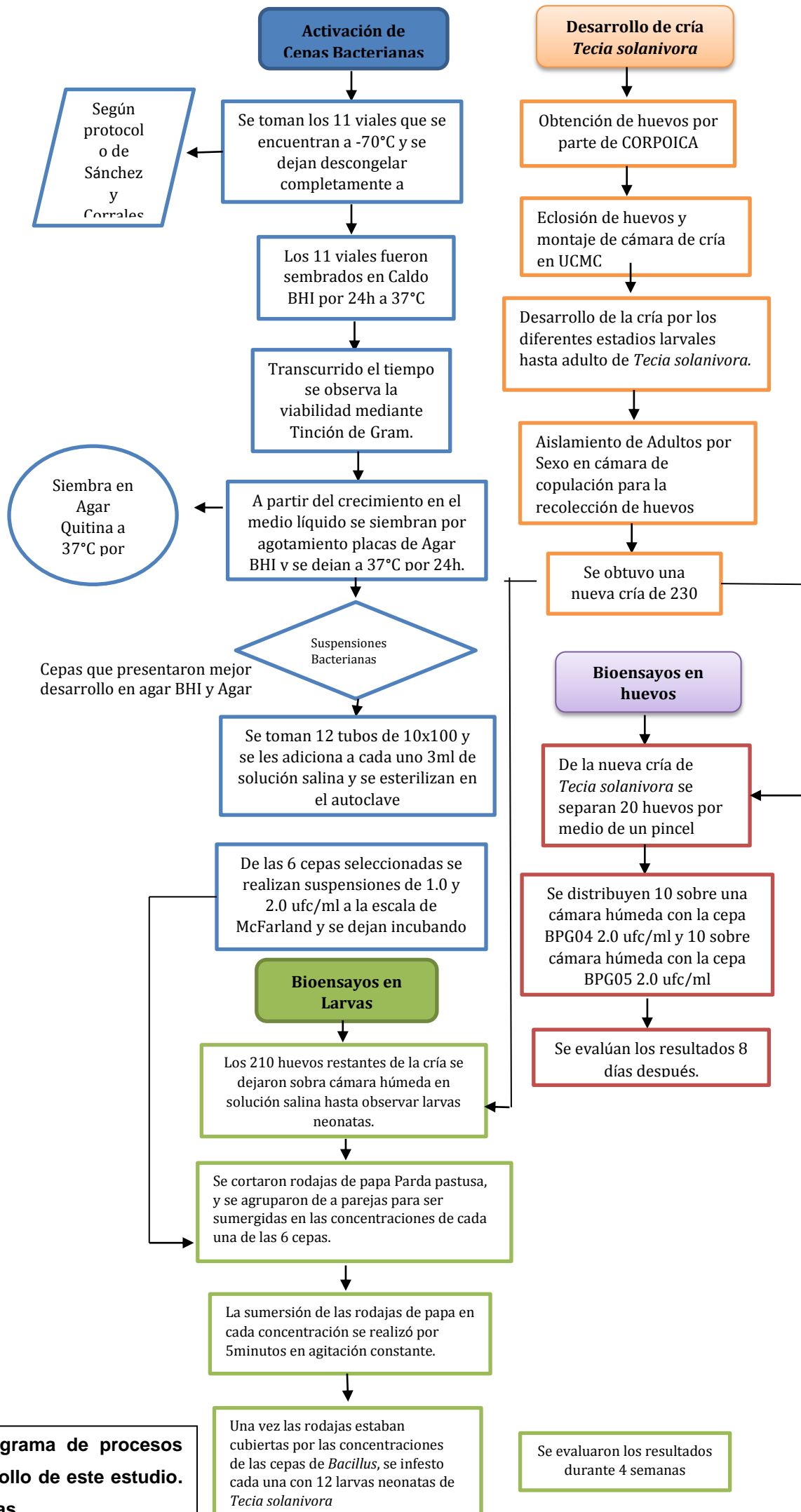
**Para huevos:**

$$\% \text{ Huevos Eclosionados} = \frac{\text{Numero de huevos eclosionados}-\text{Huevos sin eclosionar}}{\text{Número huevos colocados sobre cada servilleta}} \times 100$$

**Para larvas:**

$$\% \text{ de Larvas desarrolladas} = \frac{\text{Número de larvas vivas}-\text{Número de larvas muertas}}{\text{Número de larvas colocadas sobre cada rodaja de papa}} \times 100$$

A continuación en la Figura 16 se sintetiza los diferentes pasos que se siguieron para el desarrollo de este estudio:



**Figura 16** diagrama de procesos para el desarrollo de este estudio.


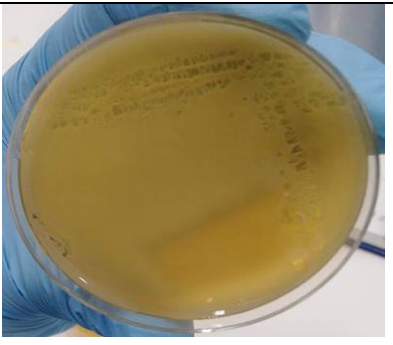
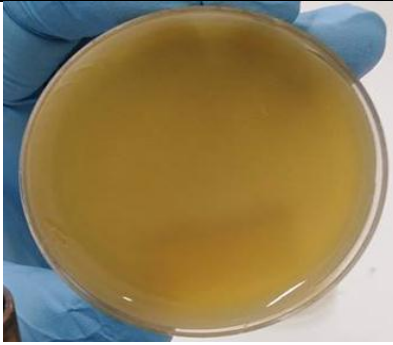
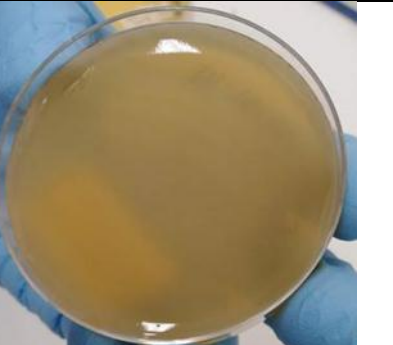
Fuente: Autoras

## 4. RESULTADOS





### 4.1 Fase 1. Desarrollo y viabilidad de las cepas de *Bacillus sp* empleadas en la investigación.

La viabilidad de las cepas se interpretó mediante la lectura macroscópica de las colonias formadas post incubación de las nuevas siembras realizadas en caldo BHI y en agar BHI. En general, la recuperación de todas las cepas descongeladas fue buena, por el crecimiento y desarrollo de cada una de las cepas, como se interpreta en la siguiente tabla:

Tabla 5. Lectura macroscópica de colonias formadas de *Bacillus sp* en el medio BHI Figuras de la 17 ala 27

CEPA	CRECIMIENTO	CEPA	CRECIMIENTO
<b>BPG01</b>	 <p><b>Figura 17.</b> Se observan colonias blancas, planoconvexas, puntiformes de borde redondo, textura lisa y brillante</p>	<b>BPG02</b>	 <p><b>Figura 18.</b> Se observan Colonias irregulares, con bordes ondulados, planas, textura lisa y brillantes</p>
<b>BPG03</b>		<b>BPG04</b>	 <p><b>Figura 20.</b></p>



	<p><b>Figura 19.</b> Se observan colonias traslucidas Planas de textura lisa y brillante</p>		<p>Se observan colonias traslucidas Planas, de borde irregular, de textura lisa y brillante</p>
<p><b>BPG05</b></p>	 <p><b>Figura 21.</b> Se observan colonias blancas de bordes circulares, planoconvexas, puntiformes de textura mucoide</p>	<p><b>BPG06</b></p>	 <p><b>Figura 22.</b> Se observan colonias blancas opacas irregulares, de borde ondulado planas de textura rugosa</p>
<p><b>BPG07</b></p>	 <p><b>Figura 23.</b> Se observan colonias blancas opacas, planas irregulares de bordes ondulados de textura rugosa</p>	<p><b>BPG08</b></p>	 <p><b>Figura 24.</b> Se observan colonias blancas de bordes circulares, planoconvexas, puntiformes de textura mucoide</p>

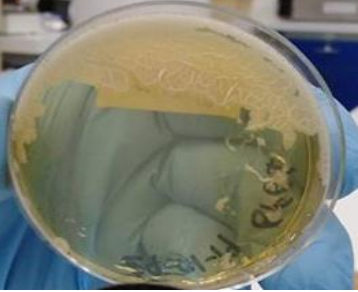
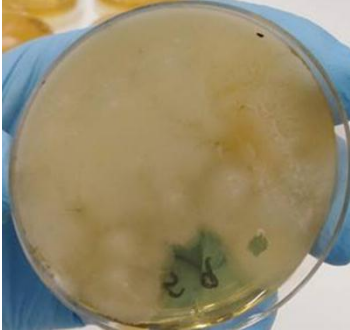

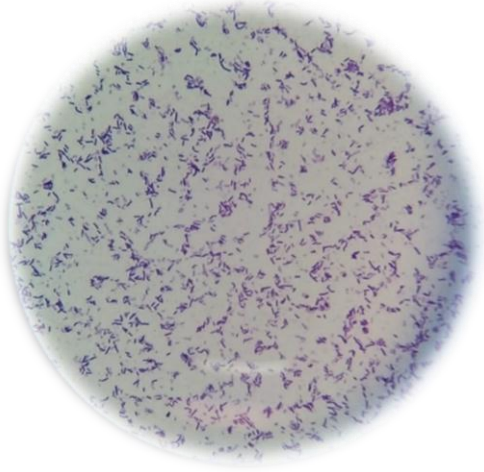
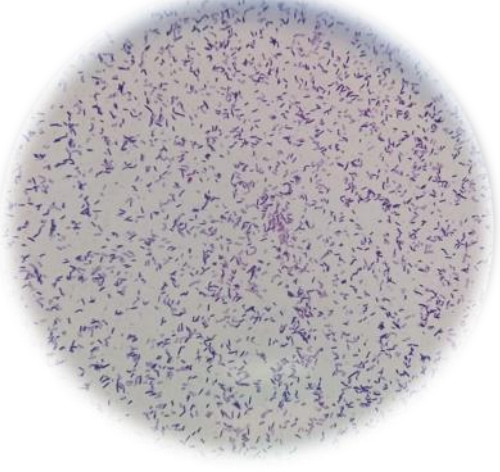
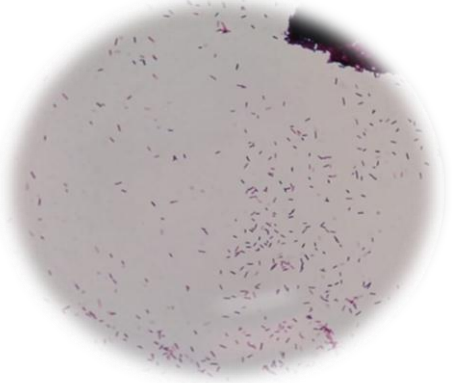
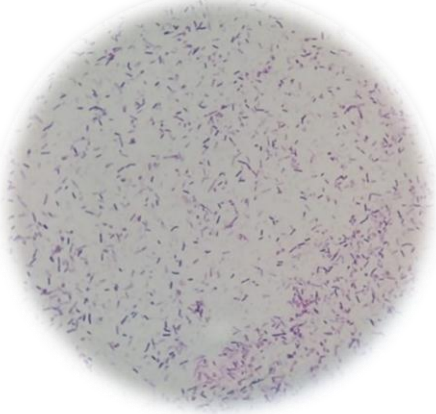
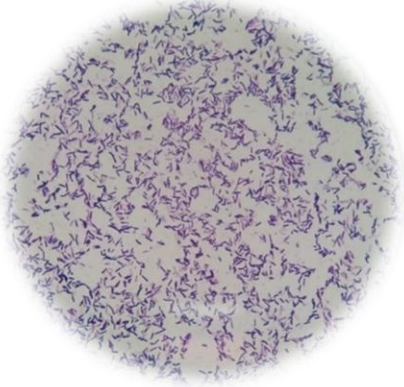
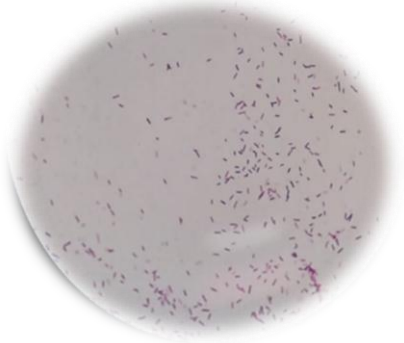
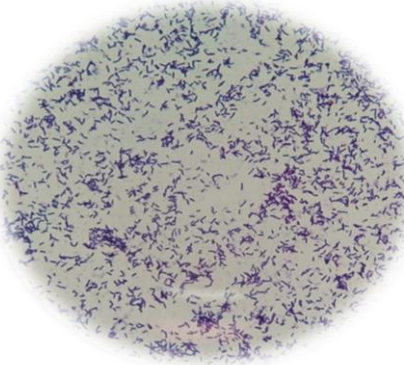
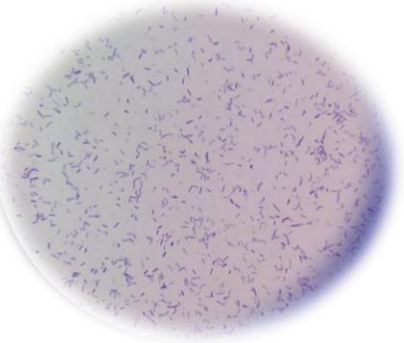
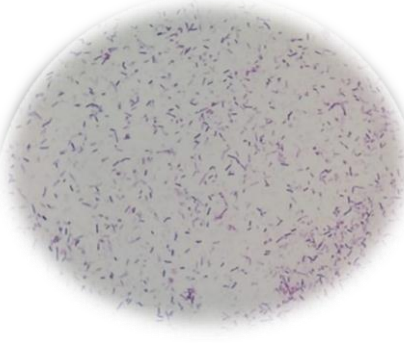
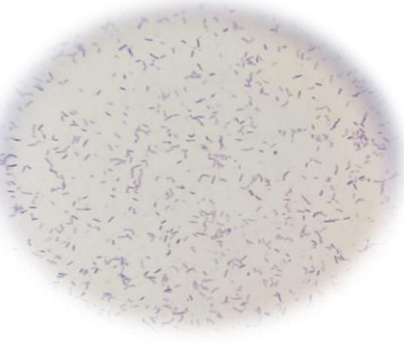
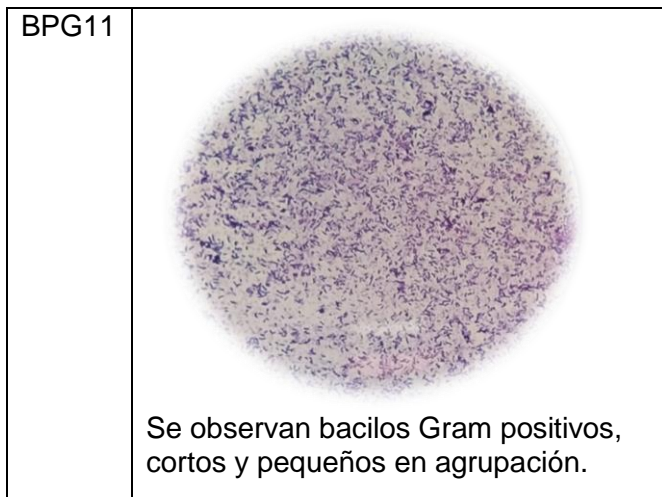
<p><b>BPG09</b></p>	 <p><b>Figura 25.</b> Se observan colonias blancas opacas irregulares, de borde ondulado planas de textura rugosa</p>	<p><b>BPG10</b></p>  <p><b>Figura 26.</b> Se observan colonias blancas opacas homogéneas, de borde ondulado planas de textura rugosa</p>
<p><b>BPG11</b></p>	 <p><b>Figura 27</b> Se observan colonias blancas opacas homogéneas, de borde lobulado planas de textura rugosa</p>	

Tabla 6 . Revisión microscópica en 100x, de cada una de las cepas, en frotis teñidos con Gram CEPA GRAM

CEPA	GRAM	CEPA	GRAM
<b>BPG01</b>	 <p>Se observan bacilos Gram positivos, agrupados cortos y pequeños</p>	<b>BPG02</b>	 <p>Se observan bacilos Gram positivos, agrupados y en parejas cortos y pequeños</p>
<b>BPG03</b>	 <p>Se observan bacilos Gram positivos, presentados individualmente, de aspecto corto y pequeño.</p>	<b>BPG04</b>	 <p>Se observan bacilos Gram positivos , presentados individualmente y agrupados, algunos presentan formación de endospora la cual es visible ya que deforma el bacilo dando apariencia de raqueta</p>

<p><b>BPG05</b></p>	 <p>Se observan bacilos Gram positivos, agrupados, de aspecto cortos y pequeños.</p>	<p><b>BPG06</b></p>	 <p>Se observan bacilos Gram positivos, presentados individualmente, de aspecto corto y pequeño.</p>
<p><b>BPG07</b></p>	 <p>Se observan bacilos Gram positivos, agrupados, de aspecto cortos y pequeños.</p>	<p><b>BPG08</b></p>	 <p>Se observan bacilos Gram positivos, agrupados en pareja de aspecto cortos y pequeños</p>
<p><b>BPG09</b></p>	 <p>Se observan bacilos Gram positivos, en parejas cortos y pequeños.</p>	<p><b>BPG10</b></p>	 <p>Se observan bacilos Gram positivos, presentados individualmente, de aspecto corto y pequeño.</p>



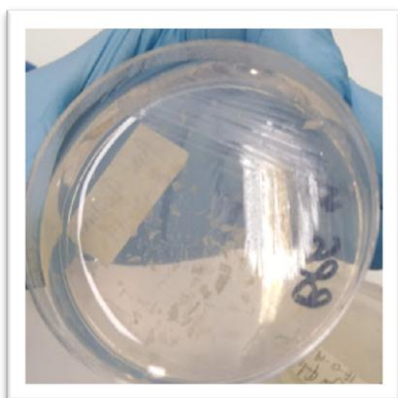
#### 4.2 Fase 2: Obtención de biomasa quitinolítica de las cepas de *Bacillus sp*

Se evalúa cualitativamente el crecimiento de cada una de las cepas empleadas en el estudio en el Medio Quitina (MQ) a las 24,48 y 72 horas de incubación. Como se muestra a continuación:

BPG	BPG1	BPG2	BPG3	BPG4	BPG5	BPG6	BPG7	BPG8	BPG9	BPG10	BPG11
24 H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48 H	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
72 H	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-

Tabla 7. Evaluación cualitativa de crecimiento de *Bacillus sp* en Medio quitina (MQ).

Como se observa en la tabla, solo se obtuvo crecimiento por parte de 2 cepas BPG 04 y BPG 05, siendo en las únicas que se observa formación de colonias (figura 28 y 29 )

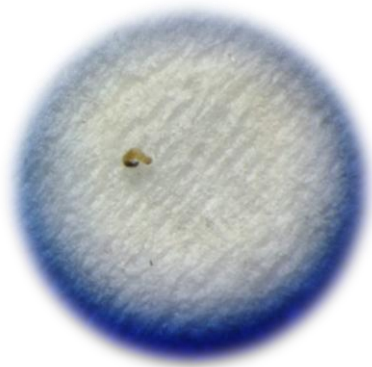


**Figuras 28 y 29. Visualización macroscópica de crecimiento en el Medio Quitina (MQ)**

**4.3 Fase 3. Bioensayos de concentrados de *Bacillus sp* contra huevos y larvas de *Tecia solanivora*.**

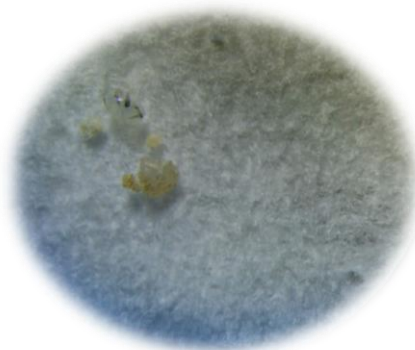
**❖ Bioensayos sobre huevos**

Pasados 8 días, se obtuvo la eclosión de 1 de los 12 huevos colocados en cámara húmeda sobre las servilletas impregnadas con las cepas de *Bacillus* BPG4 (Figura 30)



**Figura 30. Larva muerta de *T.solanivora* tras eclosión de huevo expuestos a la cepa BPG04.**

En la servilleta humedecida con la cepa de *Bacillus* BPG05 no eclosiono ninguno de los huevos (Figura 31 ).



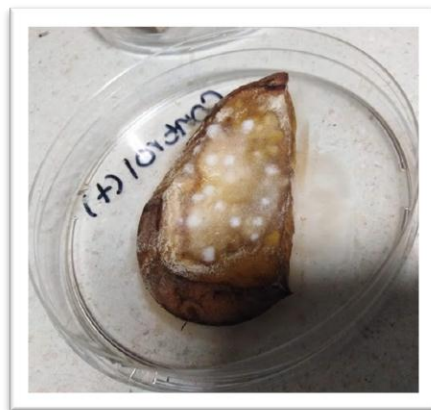
**Figura 31. Huevos sin eclosionar tras exposición a la cepa BPG05**

**Cepas de *Bacillus* vs larvas de *Tecia solanivora***

❖ **Bioensayos sobre larvas:**

Semana 1

**Control Positivo:** Macroscópicamente se observa la descomposición de la papa por la acción química que genera el fipronil sobre la materia vegetal, y la aparición de moho (Figura 32).



**Figura 32. Exposición de las larvas en la papa frente al agroquímico comercial Fipronil.**

En la observación de la papa pastusa al estereoscopio no se evidencian larvas en la superficie o actividad que indique supervivencia de alguna.

**Control Negativo:** Se dejaron las servilletas con 12 larvas L1 de *Tecia solanivora* cada una sobre las papas, en la cámara de cría para permitir su metamorfosis a una temperatura promedio de 16 a 18°C. (Figura 33 ).

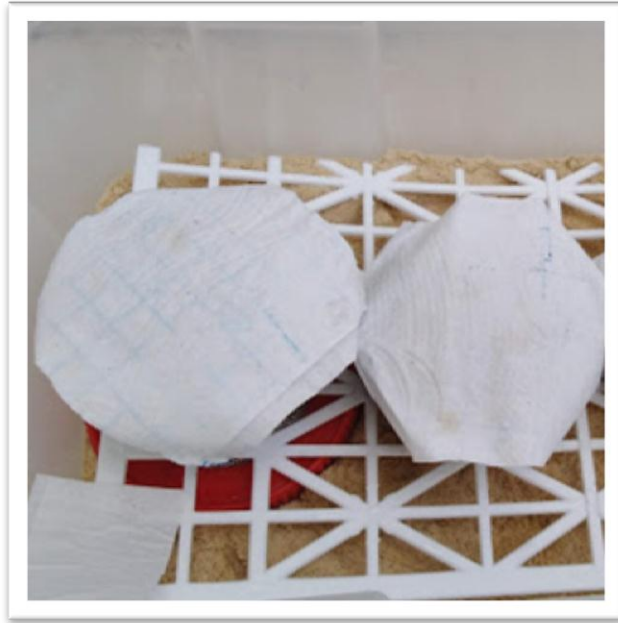
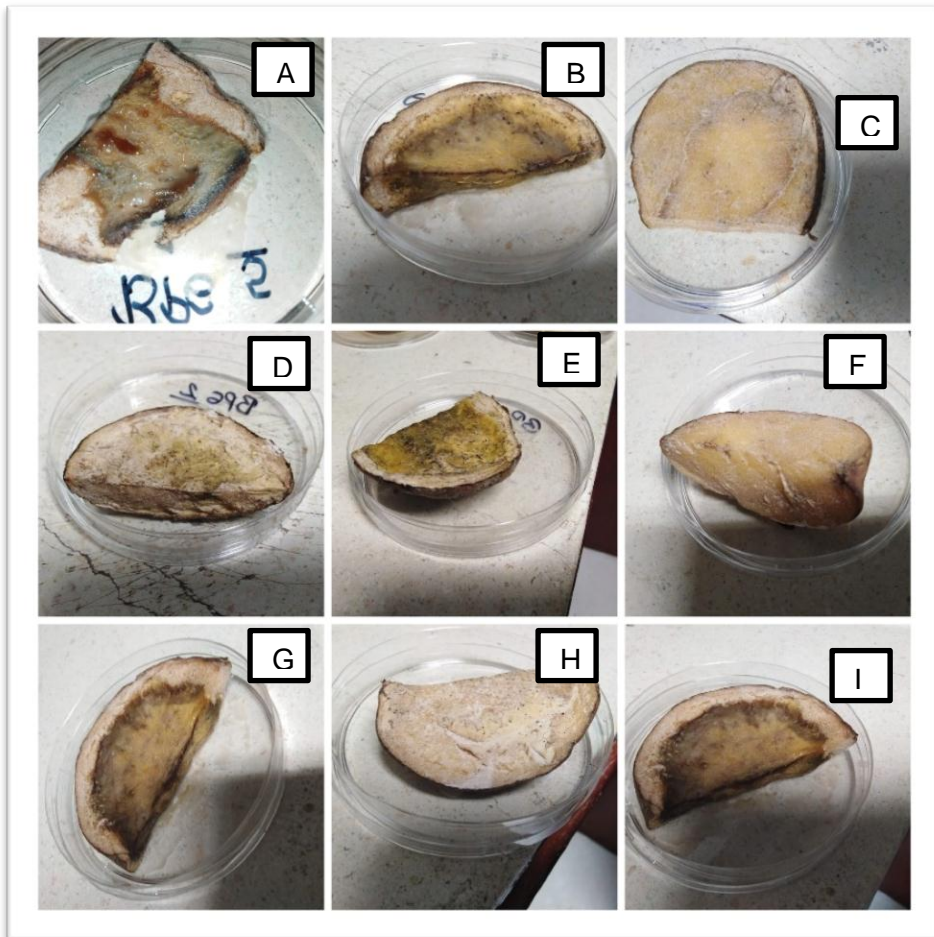


Figura 33 Cámara de cría de larvas de *Tecia solanivora*

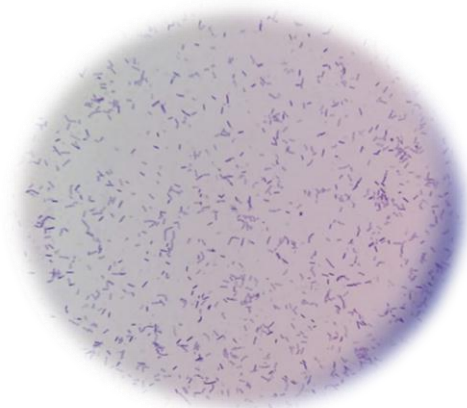




**Figura 34. Efectos físicos de la exposición de las cepas de *Bacillus* en la papa Semana 1.**

**Efectos físicos de la exposición de las cepas de *Bacillus* en la papa primer semana.**

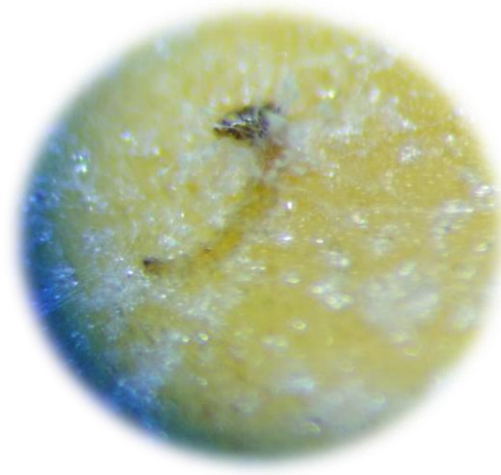
Las cepas BPG 01, BPG 02, BPG 04, BPG 05, BPG07 y BPG 11 a diferencia del control positivo no generaron putrefacción de la papa. Sin embargo, con la cepa BPG05 concentraciones 1.0 y 2.0 se observa la formación de un líquido viscoso del cual se realiza un Gram. Al microscopio no se observan características asociadas a microorganismos. En las demás cepas BP01, BPG02, BPG04, BPG07 y BPG11 se observa que la superficie de la papa toma una apariencia arenosa en cada una de las concentraciones, de lo cual también se decide hacer un Gram donde se observan Bacilos Gram positivos. Figura 35



**Figura 35. Tinción de Gram de la parte superficial de la rodaja de papá cubierta con la cepa BPG11**

En las 12 rodajas de papa al observar en el estereoscopio, se evidenció la formación de una especie de malla sobre las larvas (figura 36) que impedían su movilidad en las trozos de papa asociados a las cepas BPG01 y BPG11 tanto en la concentración 1.0 como 2.0, al parecer en una acción física para evitar que haya penetración de la larva a la papa y ocasionarle algún daño. De las 12 larvas sobrepuestas en la papa, solo se observan 4 y 6 respectivamente en la superficie

con el efecto ya mencionado. En el resto de trozos, no se encontró este fenómeno durante el control semanal.



**Figura 36. Larva de *Tecia solanivora* inmovilizada**

Se observan las larvas vivas de *Tecia Solanivora* inmovilizadas tras exposición a las cepas de *Bacillus sp*,

## **Semana 2**

### **Control Positivo:**



**Figura 37. Exposición de la papa cubierta por larvas frente al agroquímico comercial Fipronil.**

Macroscópicamente se observa que la putrefacción y deshidratación de la papa por la acción química que genera el fipronil sobre la materia vegetal ha aumentado produciendo un olor fétido.

**Control negativo:** No se evidencian cambios físicos sobre la papa, ni penetración de las larvas sobre los tubérculos.

**Efectos físicos de la exposición de las cepas de *Bacillus* en la papa segunda semana.**

En esta segunda semana, se observó que las cepas BPG 01, BPG 02, BPG 04, BPG07 y BPG 11 no generaron putrefacción de la papa ni deshidratación, la cepa BPG 05-1 evidencia una descomposición en el centro mientras que en sus lados se observa la misma textura arenosa que en las demás cepas, que según resultados anteriores del Gram se asocia con el género *Bacillus*. Sin embargo, se observa mayor cantidad de la bacteria en la superficie de la papa BPG11 concentraciones 1.0 y 2.0

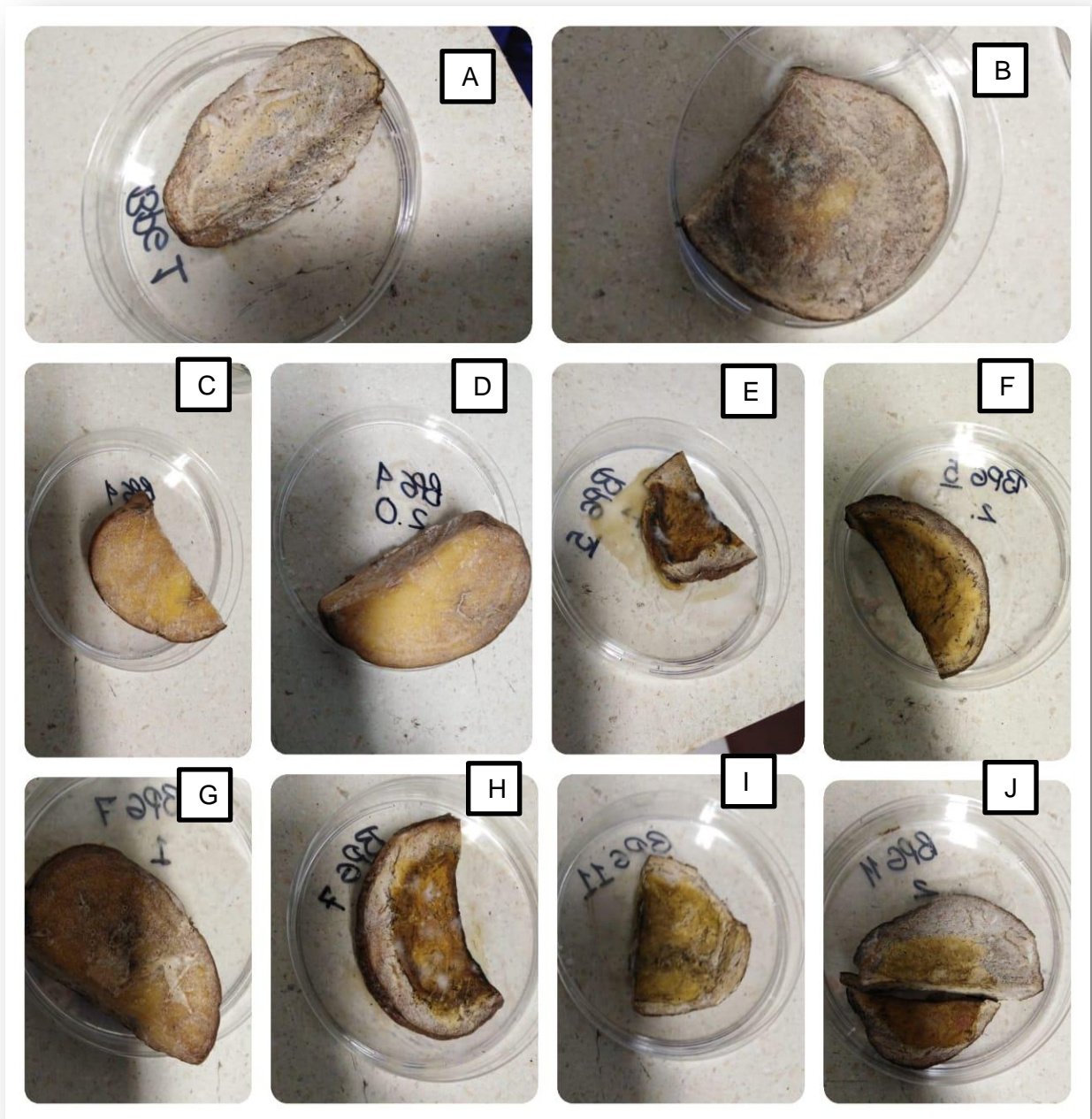
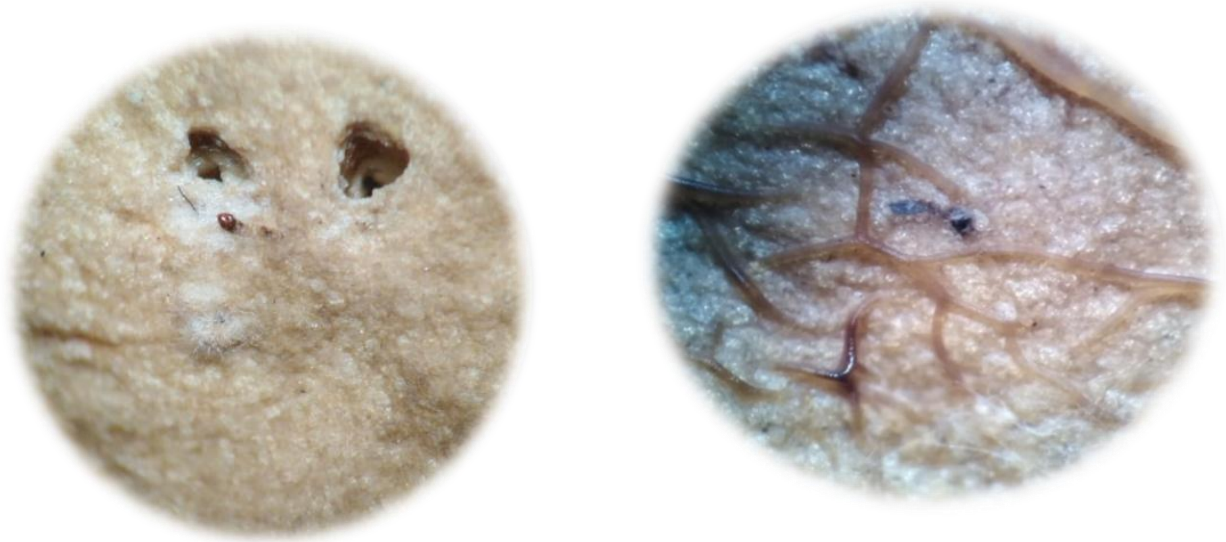


Figura 38. Efectos físicos de la exposición de las cepas de *Bacillus* en la papa segunda semana.

Al estereoscopio, en esta segunda semana, se observan larvas muertas totalmente inmóviles y cubiertas el 70% de su cuerpo, de esta manera, se puede interpretar que las cepas de *Bacillus BPG01* y *BG11* evitaron que se produjera daño en la papa por parte de las larvas.



**Figuras 39 y 40. Larva de *Tecia solanivora* inmovilizada**

### **Semana 3**

**Efectos físicos de la exposición de las cepas de *Bacillus* en la papa tercera semana.**

**Control positivo:** Se mantuvo la putrefacción y deshidratación de la papa.

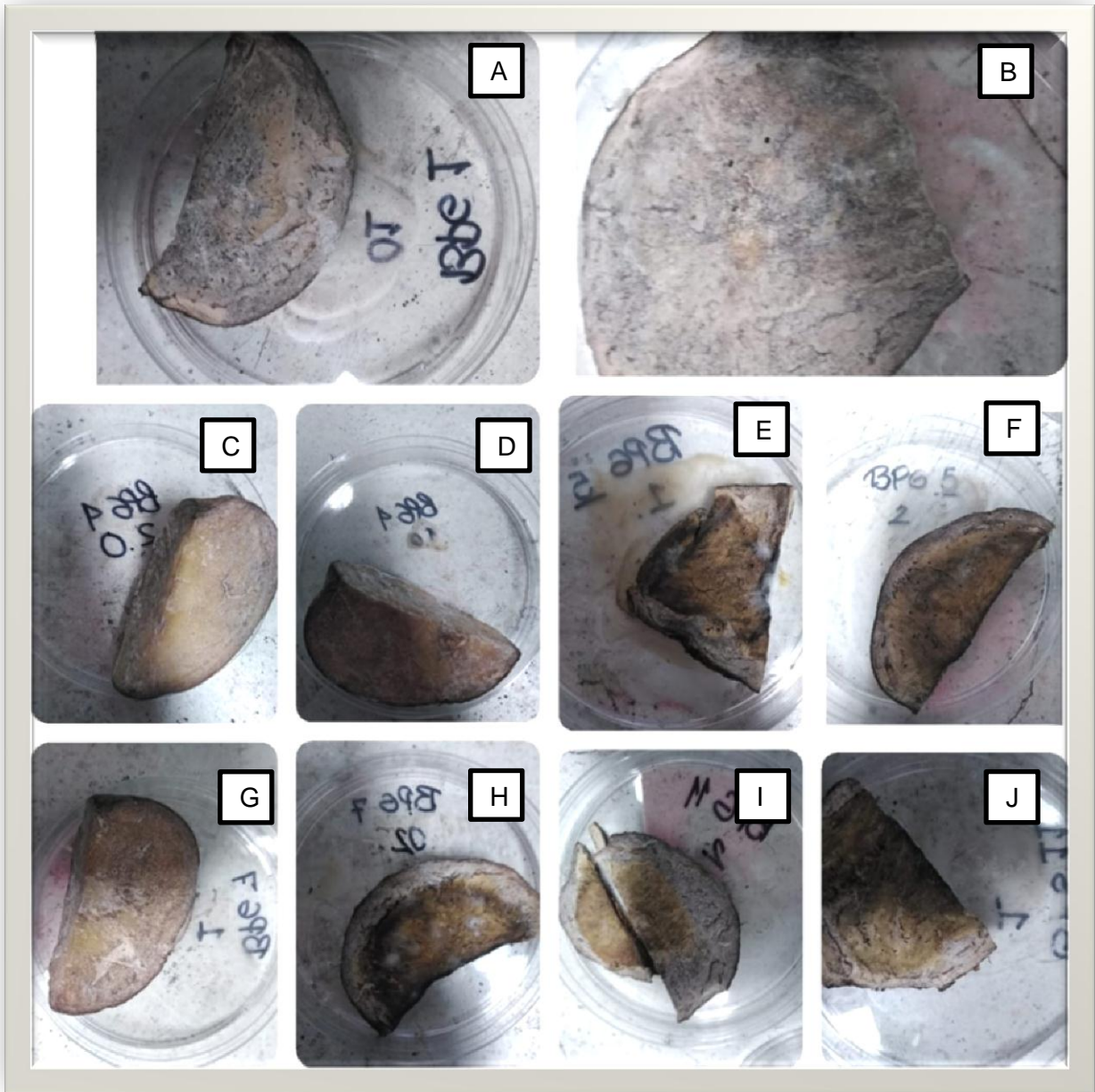
**Control negativo:** Se observaron las perforaciones hechas por la larva durante su desarrollo Figura 41.



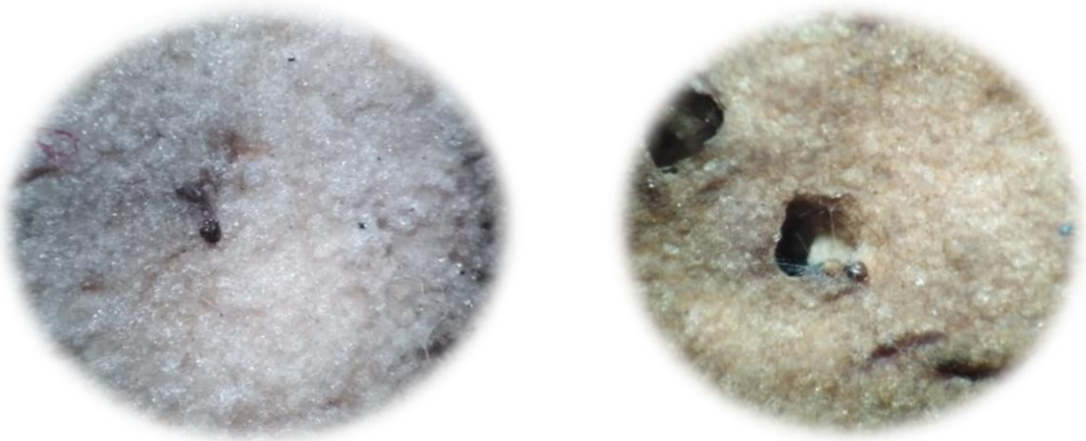
**Figura 41. Daños causados en la papa por la formación de túneles hechos por las larvas durante su desarrollo.**

En la tercera semana se observó las cepas BPG 01 y BPG 11 no generaron putrefacción de la papa ni deshidratación, las colonias observadas nuevamente fueron confirmadas por medio de coloración de Gram siendo compatibles con el género *Bacillus* al observarse bacilos Gram positivos. La cepa BPG 05-1 tuvo descomposición total y el trozo con la cepa BPG05-2 presenta una deshidratación en la parte central mientras que en sus lados se observan colonias de *Bacillus* donde no se observa descomposición.

Se evidenció mayor cantidad el desarrollo de colonias de *Bacillus* en la superficie de la papa y sobre las larvas.



**Figura 42. Efectos físicos de la exposición de las cepas de Bacillus en la papa tercera semana**



**Figura 43 y 44. Cadáveres de larvas de *Tecia solanivora* totalmente cubiertas por el *Bacillus*. BPG 01 y BPG11.**

Al estereoscopio se observaron en esta tercera semana, larvas muertas inmóviles y cubiertas en un 90% de su cuerpo con las cepas BPG01 Y BPG 11 en las concentraciones 1.0 y 2.0 respectivamente como se presenta en la figura 43. De esta manera, la cepa de *Bacillus* evitó que Las larvas dañaran los trozos de papa.

#### **Semana 4**

**Control positivo:** La rodaja se mantuvo con putrefacción y presentó sobreinfección con moho.

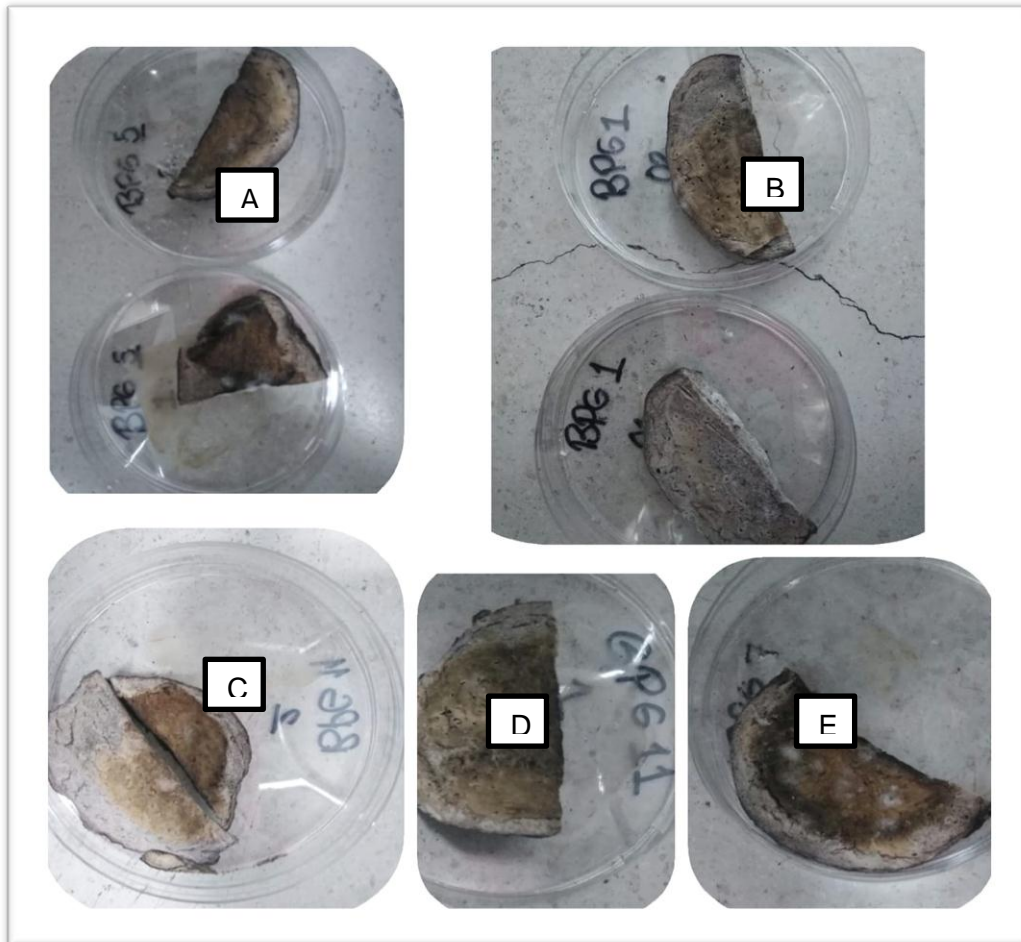
**Control negativo:** La larvas L4 abandonaron la papa y comienzan a empujar sobre la arena.

#### **Efectos físicos de la exposición de las cepas de *Bacillus* en la papa cuarta semana.**

En la cuarta semana, se observó que los trozos con las cepas BPG 01-1 y BPG 01-2, y BPG 11-1 Y BPG 11-2, no generaron putrefacción de la papa, sin embargo se observa una deshidratación parcial, además nuevamente se confirmó que la presencia de colonias fuera por *Bacillus* y no por sobreinfección con otro



microorganismo. En el trozo de papa con la cepa BPG 05-1 se evidencia una descomposición total y con la cepa BPG05-2 presenta una deshidratación en la parte central, mientras que en sus lados se observan colonias de *Bacillus* donde no está descompuesta. En el trozo de papa con la cepa BPG 07 1 y 2, se observa una deshidratación en la parte central acompañado de colonias de moho .Figura 45



**Figura 45. Efectos físicos generados sobre la papa Semana 4**

En la papa con la cepa BPG 02-1 se observó deshidratación total, dos pre pupas y una pupa. En la papa con la cepa BPG 02-2 se observó deshidratación total y presenta una pre pupa Figuras 46 y 47 .



**Figura 46. Prepupa de Tecia solanivora**



**Figura 47. Pupa de Tecia**

En el trozo de papa con la cepa BPG 04 concentración 1.0, se evidenció una larva en estadio tres en movimiento al interior de la papa y el daño causado sobre la papa con la formación de túneles. Figura 48



**Figura 48. Larva L3 y su daño sobre la papa pastusa**

En el trozo de papa con cepa BPG 04-2, se evidenció un agujero y en el trozo de papa que contiene cepa BPG 07 concentración 1 y 2 se observaron cuatro agujeros

respectivamente característicos de los daños causados por *Tecia Solanivora*. Estas papas fueron abiertas para verificar la presencia de larvas y los efectos que producen sobre las papas. Se encontraron 2 larvas L3 en la rodaja de papa BPG07 con concentración 1.0 Figura 49. En la rodaja de papa asociada a la cepa BPG04 con concentración de 2.0 se observó al interior de la papa, dos larvas L2 Figura 50.



**Figura 49. Larva L3 de *Tecia solanivora* encontrada en la papa con la cepa de *Bacillus* BPG07 concentración 1.**



**Figura 50. Larvas L2 de *Tecia solanivora* dentro del tubérculo recubierto con la cepa de *Bacillus* BPG04 concentración 2.0**

❖ **Porcentaje de Huevos eclosionados de *Tecia solanivora***

Cepa	Porcentaje de Eclosión
<b>BPG04 [2]</b>	6.2%
<b>BPG05 [2]</b>	0%

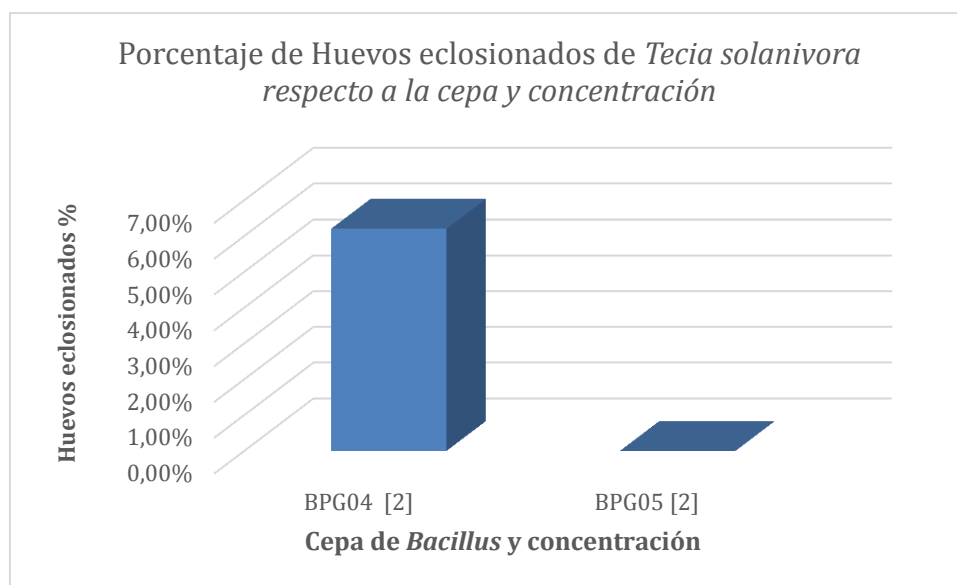


Tabla 8. Porcentaje de larvas desarrolladas respecto a la cepa utilizada en huevos de *Tecia solanivora*

❖ **Porcentaje de desarrollo de Larvas de *Tecia solanivora***

Cepa	Porcentaje de Desarrollo
<b>BPG01 [1.0]</b>	0%
<b>BPG01 [2.0]</b>	0%
<b>BPG02 [1.0]</b>	40%
<b>BPG 02 [2.0]</b>	30%
<b>BPG 04 [1.0]</b>	13%
<b>BPG 04 [2.0]</b>	20%
<b>BPG 05[1.0]</b>	0%
<b>BPG 05 [2.0]</b>	0%
<b>BPG 07 [1.0]</b>	26%
<b>BPG 07 [2.0]</b>	26%
<b>BPG 11 [1.0]</b>	0%

<b>BPG 11 [2.0]</b>	0%
<b>Control Positivo</b>	0%

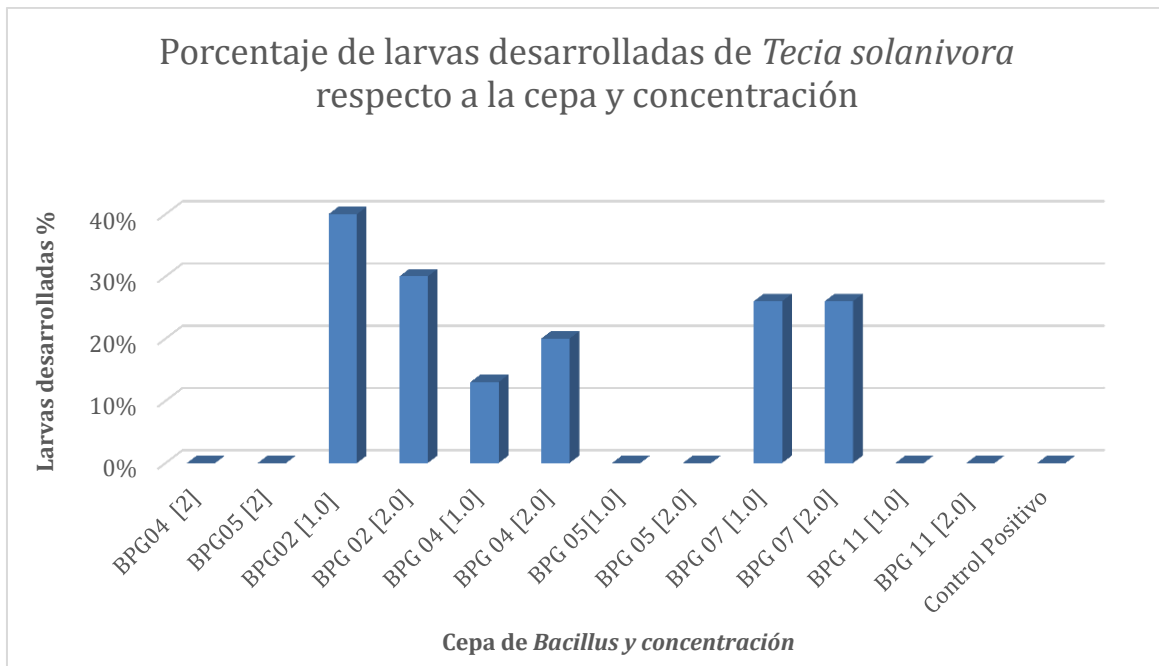


Tabla 9. Porcentaje de mortalidad respecto a la cepa utilizada en larvas de *Tecia solanivora*

## 5. DISCUSIÓN

Son muchos los estudios e investigaciones que se han desarrollado para dar solución a los problemas de pérdidas económicas que causa este insecto en los cultivos de papa. Algunos investigadores han obtenido resultados promisorios, otros no, sin embargo es importante resaltar algunos de ellos que apoyan o contradicen los resultados obtenidos en el presente estudio.

D. Villanueva y C.I. Saldamando en el 2013, realizaron un estudio del origen, la dispersión y las estrategias de control sobre *Tecia solanivora* mostrando el impacto económico que la plaga causa en cultivos de *Solanum tuberosum* ya que esta es una de las principales plagas presentes en el cultivo en países del área Andina, donde en Colombia representa pérdidas en la producción tanto en campo como en almacén del 50%. Esto es de gran magnitud debido a que la papa es un importante alimento básico de las familias y es el segundo cultivo con más desarrollo en el país. Para su control los insecticidas químicos son los más utilizados con 12 a 24 aplicaciones por periodo de cultivo, generando una gran afectación ambiental.<sup>42</sup>

Por otra parte, el uso indiscriminado de plaguicidas químicos se evidencia como uno de los mayores problemas tanto económicos por el incremento de costos en la producción de diferentes cultivos, como ambientales por la contaminación generada sobre aire, agua y suelos teniendo gran incidencia en problemas de salud para las personas y afectación sobre diferentes insectos polinizadores.

Al respecto, Narváez J, Palacio J, Molina F en 2012 hablan de la persistencia de los plaguicidas en el ambiente y su ecotoxicidad mediante la evaluación de la propiedad fisicoquímica  $\log K_{ow}$  un indicador de la afinidad lipídica relacionado con el fácil transporte a través de las membranas biológicas siendo el indicativo de bioacumulación en donde se evaluaron los plaguicidas más utilizados en Colombia Carbofuran, Cipermetrina, Clorpirifos, Diazinón, Glifosato, Malatión, Mancozeb, Paratión, donde los valores más altos son por parte de la Cipermetrina, Clorpirifios y el Diazinon, reflejando el daño en la biota por la dispersión<sup>43</sup>.

En los últimos años se han venido implementando tecnologías limpias para la producción de plaguicidas a base de microorganismos, alternativas amigables con el

ambiente y las personas. Las bacterias del genero *Bacillus* han sido de las más estudiadas en el biocontrol de diferentes tipos de plagas por la producción que tiene de diferentes metabolitos que ejercen un efecto de protección sobre el cultivo, por su capacidad quitinolítica, producción de endosporas, además de favorecer el suelo y producir un mayor crecimiento en las plantas. .

En el año 2011, Tasharofi N, Adrangie S, Fazelia M, Rastegarc H, Khoshayandd M, Faramarz M, examinaron y optimizaron los factores más importantes que afectan la producción de quitinasas de *Bacillus pumilus*, donde se encontró que la producción de enzimas quitinolíticas se ve afectada por los intervalos de concentración de los compuestos MgSO<sub>4</sub> y FeSO<sub>4</sub> en el medio, donde pequeñas variaciones pueden dar efectos diferentes en el crecimiento del microorganismo<sup>44</sup>.

En el presente estudio, los bioensayos realizados sobre los huevos, se utilizaron dos cepas BPG04 y BPG05 debido a que fueron las únicas en presentar crecimiento sobre el Medio Quitina (MQ) es decir las únicas capaces de utilizar la quitina como fuente de energía, este carbohidrato presente en los huevos de *Tecia solanivora*, es el encargado de brindar resistencia. Los efectos se evaluaron respecto al porcentaje de huevos eclosionados como se observa en la tabla 10, donde la larva encontrada en la servilleta humedecida con la cepa BPG04 representa solo el 6.2% sobre el 100% donde resultados por debajo del 10% representan una baja incidencia de eclosión, lo que indica un buen resultado por parte de la cepa al inhibir el desarrollo de los huevos. Sin embargo, los resultados se recomiendan evaluar la viabilidad de los huevos para poder confirmar que los huevos no eclosionaran por acción del *Bacillus*.

Martinez W, Uribe D, Ceron J en 2003, evaluaron el efecto tóxico de las proteínas CryI de *Bacillus thuringiensis* sobre larvas del insecto *Tecia solanivora*, .Los bioensayos se realizaron utilizando tres tipos de cepas bacterianas: una cepa Bt de referencia, una cepa nativa y siete cepas recombinantes de *Escherichia coli* que poseen genes CryI individuales. El método de inmersión de pequeños trozos de la papa sobre concentraciones de la cepa HDI de 25 y 100 ug/ml. Los valores promedios de mortalidad en el método de inmersión fueron 68.3ug/ml y 91.4 ug/ml respectivamente, donde no hubo diferencias significativas entre las réplicas pero si

asociadas a la dosis, sin embargo fue el método de bioensayo presento buenas perspectivas, por esta razón fue el método de elección en el presente trabajo.<sup>45</sup>

Durante las 4 semanas de estudio, se observó que las cepas BPG01, BPG02, BPG04, y BPG11 no presentaron pudrición por el contrario se forma una capa protectora de textura arenosa que al realizar el Gram salió compatible con el género *Bacillus* donde se observó Bacilos Gram positivos.

En la observación al estereoscopio, las cepas BPG01 a concentraciones de 1.0 y 2.0 patron Macfarland. y BPG11 concentraciones 1.0 y 2.0 evidenciaron el efecto de inmovilización hecho por el *Bacillus* en las larvas durante las 4 semanas, como se puede observar en la Tabla 9 el porcentaje de larvas desarrolladas fue de 0% representando los mejores resultados en el estudio; la cepa BPG11 hace referencia al *Bacillus subtilis*.

Kheder S, Feki O, Dammak M, et al, en 2015, en su publicación “Efficacy of *Bacillus subtilis* V26 as biological control agent against *Rhizoctonia solani* on potato” estudian el efecto de control biológico de las tres familias de lipopeptidos segregados por *Bacillus subtilis*; Surfactina, Iturrinas y Fengicinas, En cultivos de papa *Solanum tuberosum* se evalúa su efecto sobre *Rhizoctonia solani*, donde rodajas de papa fueron tratadas con la cepa *Bacillus subtilis* V26 antes y después de inocular el hongo para verificar si V26 desarrolla actividades curativas y de protección. Aunque los dos tratamientos fueron efectivos en reducir la infección fúngica, el control más efectivo se fue alcanzado cuando V26 fue aplicado 24 horas antes de la inoculación generando una acción de protección. El presente trabajo no realizo una exposición de la papa frente a las cepas de *Bacillus* con tanto tiempo de anterioridad, factor a tener en cuenta ya que se menciona que las endosporas necesitan tiempo para germinar antes de generar un efecto inhibitorio sobre las plagas.<sup>46</sup>

En las demás cepas BPG02, BPG04 y BPG07 en ambas concentraciones se desarrolló los diferentes estadios de desarrollo de *Tecia solanivora* esto se ve reflejado en la Tabla 9 donde se obtuvieron los porcentajes de desarrollo más altos



oscilando entre 13 y 40%, esto puede ser debido a que las cepas de *Bacillus* necesitan una mayor concentración para ejercer un control sobre las plagas.

Villareal M, Villa E, Estrada M, et al en 2017 Hablan del Género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola donde por la presencia de endosporas el género *Bacillus* tiene la capacidad de dispersión y resistencia para sobrevivir en diferentes ecosistemas incluso frente a condiciones extremas. En el estudio indican que además de la producción que tiene este género de lipopeptidos con acción antibacteriana también presenta acción antifúngica como los de las familias iturinas, fengicinas y surfactinas para su acción biocontroladora y segrega enzimas líticas capaces de degradar la pared celular de agentes fitopatogenos como las quitinasas, producción de sideroforos los cuales permiten la captación de hierro  $Fe^{3+}$ , actuando como agentes quelantes de hierro, evitando que otros microorganismos patógenos lo utilicen para su crecimiento, otro proceso es la respuesta sistémica inducida *Bacillus* produce una gran diversidad de moléculas elicitoras que inducen respuestas sistémicas en las plantas, los cuales activan genes *PR*, que protegen de la invasión de agentes patógenos; en plantas de tabaco donde *PR2* codifica por una  $\beta$ -1,3 glucanasa y *PR3* codifica para una quitinasa, fueron activados en respuesta a compuestos volátiles de *Bacillus sp* confiriendo resistencia ante *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora nicotianae*., además de activar otros mecanismos de protección como cambios estructurales en la pared celular mediante la acumulación de lignina.<sup>47</sup>

Por lo anterior, se evidencia que la actividad del género *Bacillus* como controlador de plagas ha sido ampliamente investigado y documentado, siendo una alternativa biotecnológica a plaguicidas químicos convencionales. Sin embargo, en el control de lepidópteros como *Tecia solanivora* no ha sido estudiada a profundidad frente a los diferentes géneros de *Bacillus*. Por lo tanto este estudio es un precursor al control de *Tecia solanivora* por parte de cepas de *Bacillus* como *B. sphaericus*, *B. pumilus*, y *B. subtilis* por medio de su actividad quitinolítica y mediación por endosporas, ya que los resultados obtenidos permitieron al disminuir el porcentaje de metamorfosis de las polillas, hasta inhibirlo completamente con cepas puntuales. De esta manera este género de bacterias se convierte en una alternativa para el control de este insecto, que ha generado tantas pérdidas en el cultivo de papa y en el ambiente

debido a la alta demanda de dispersión de sustancias tóxicas para su control, que además están generando resistencias.

## 6. CONCLUSIONES

- Se logró producción de biomasa quitinolítica en dos de las once cepas *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus sphaericus* BPG04 y BPG05 por medio de su crecimiento en el Medio Quitina (MQ).
- El control generado por parte de las cepas con producción de biomasa quitinolítica BPG4 y BPG05 en huevos de *Tecia solanivora* representa el 86% y 100% respectivamente al impedir su eclosión.
- De las seis cepas seleccionadas para los bioensayos, BPG01 y BPG11 representaron los mejores resultados, teniendo un 100% de efectividad, al impedir la metamorfosis de los insectos sobre el tubérculo y la acción protectora sobre la papa impidiendo su pudrición. De esta manera, se demostró que hay un efecto bioinsecticida presentado por *Bacillus* que podría estar relacionado con la producción de algún metabolito, posiblemente por una enzima quitinasa.
- Los resultados obtenidos confirman el uso de bacterias del género *Bacillus* como posible alternativa para el control de *Tecia solanivora*.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda implementar nuevos estudios que permitan confirmar el uso de *Bacillus spp* como agente insecticida, sin generar efectos colaterales en el cultivo o durante su manejo en el agricultor.

Por otra parte, implementar bioensayos que permitan un control adecuado desde el estadio de huevos de *Tecia solanivora*, con el fin de controlar el desarrollo de esta plaga sobre los cultivos de papa pastusa.

## REFERENCIAS

1. Tuberculos [Internet]. España; c2019 [citado 09 de septiembre de 2018]. Disponible en: <https://www.tuberculos.org/papa-patata/>
2. Federación de papa, Boletín Regional de papa [Internet]. Colombia: Revista papa; 2017-2018 [citado 09 de septiembre de 2018]. Disponible en: <https://fedepapa.com/boletines-regionales/>
3. El mundo de la papa: América Latina - Año Internacional de la Papa 2008 [Internet]. Fao.org. 2008 [citado 09 de Septiembre 2018]. Disponible en: [http://www.fao.org/potato-2008/es/mundo/america\\_latina.html](http://www.fao.org/potato-2008/es/mundo/america_latina.html)
4. Boletín Mensual Regional N.01 [Internet]. Bogotá: Fondo Nacional de Fomento de la Papa; 2018 [citado 09 de Septiembre 2018]. Disponible en: <https://fedepapa.com/wp-content/uploads/2017/01/BOLETÍNREGIONALCUNDINAMARCA-18.pdf>
5. Instituto Colombiano Agropecuario. Informe especial: Polilla Guatemalteca o Polilla de la Papa [Internet]. Bogotá; 2016. [citado 11 de Septiembre de 2018]. Disponible: <https://www.ica.gov.co/noticias/todas/2016/informe-especial-polilla-guatemalteca-o-polilla-de>
6. IDEAM. USO Y APLICACIÓN DE PLAGUICIDAS [Internet]. Bogotá; 2016.[citado 11 de septiembre de 2018]. Disponible en : [http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/005247/HTM/CAPITULO\\_4.HTM](http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/005247/HTM/CAPITULO_4.HTM)
7. Cotes A, López-Ávila, A. Uso De Los Compuestos Volátiles De La Papa En El Control De La Polilla Guatemalteca. 1st ed. Bogotá: Felipe Borrero, Hugo Rivera,; 2010.[Internet] 2012. [citado 13 de septiembre de 2018]. Disponible en: [https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/12458/44967\\_60390.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/12458/44967_60390.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

8. Guzman E, Correa A, et al. Colonización, impacto y control de las abejas melíferas en México. Revista scielo. [citado 2 de septiembre de 2018]. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-50922011000200005](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-50922011000200005)
9. Pollet A, Barragan A. Predicción de daños de la polilla guatemalteca *Tecia solanivora* (Povolny) 1973 (Lepidoptera: Gelechiidae) en el Ecuador [Internet]. Quito; 2003 [citado 15 de Septiembre 2018]. Disponible en: <https://www.miteco.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/plagas/BSVP-29-02-233-242.pdf>
10. Bosa F, Osorio P, Cortes A, et al. Control de *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) mediante su feromona para la interrupción del apareamiento. Revista Colombiana de Entomología. [Internet]. 2008. [citado 17 de Septiembre de 2018]. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-04882008000100009&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882008000100009&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
11. Martínez O Wilson, Uribe V Daniel, Cerón S Jairo. Efecto tóxico de proteínas CryI de *Bacillus thuringiensis* sobre larvas de *Tecia solanivora* (Lepidoptera Gelechiidae) Rev. Colomb. Entomol. [Internet]. 2003 [citado 20 de Septiembre 2018]; 29(1): 89-93. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-04882003000100014&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882003000100014&lng=en).
12. Salazar C, Betancourth C. Evaluación de extractos de plantas para el manejo de polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*) en cultivos de papa en Nariño, Colombia. Revista Universidad Nacional. [Internet]. 2009. [citado 15 de septiembre de 2018]. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/11197/37768>
13. Martínez O Wilson, Uribe V Daniel, Cerón S Jairo. Efecto tóxico de proteínas CryI de *Bacillus thuringiensis* sobre larvas de *Tecia solanivora* (Lepidoptera

- Gelechiidae) Rev. Colomb. Entomol. [Internet]. 2003 [citado 20 de Septiembre 2018]; 29(1): 89-93. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-04882003000100014&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882003000100014&lng=en).
14. Layton C, Maldonado E, et al. Bacillus spp., perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. Revista Nova. [Internet]. 2011. [citado 25 de Septiembre 2018]. Disponible en: <http://unicolmayor.edu.co/publicaciones/index.php/nova/issue/view/17>
15. Ben Khedher S, Kilani-Feki O, Dammak M, Jabnoun-Khiareddine H, Daami-Remadi M, Tounsi S. Efficacy of Bacillus subtilis V26 as a biological control agent against Rhizoctonia solani on potato. Comptes Rendus Biologies. [Internet] 2015. [Citado 26 de enero de 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S163106911500236X>
16. Castañeda E, Sanchez L. Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género Bacillus sp., primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre Fusarium sp [Internet]. Bogotá: Nova; 2016 [citado 25 de Septiembre 2018]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v14n26/v14n26a06.pdf>
17. Chinheya C, Yobo K, Laing M. Biological control of the rootknot nematode, Meloidogyne javanica (Chitwood) using Bacillus isolates, on soybean. Biological Control. 2017;109:37-41. [citado 25 de enero de 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964417300592>
18. Yáñez-Mendizábal V, Falconí CE. Efficacy of Bacillus spp. to biocontrol of anthracnose and enhance plant growth on Andean lupin seeds by lipopeptide production. Biological Control [Internet]. Elsevier BV; 2018 [citado 28 de Noviembre 2018]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.04.004>

19. Tinjica S, Rodriguez E. Catálogo de papas nativas de Nariño, Colombia [Internet]. Bogotá; 2015 [citado 5 de Enero 2019]. Disponible en: [http://www.seguridadalimentarianarino.unal.edu.co/sites/default/files/pdf-componentes/C.Mej-Gen\\_Catalogo%20papas%20Nativas.pdf](http://www.seguridadalimentarianarino.unal.edu.co/sites/default/files/pdf-componentes/C.Mej-Gen_Catalogo%20papas%20Nativas.pdf)
20. Dane. Sistema de información del medio ambiente de los países de la comunidad Andina (SIMA).[Internet].Bogotá;2015. Disponible en: <http://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/ambientales/indicadores-ambientales-iaii/iniciativa-sima>
21. Manual Técnico del Buenas Prácticas Cultivo de Papa bajo Agrícolas [Internet]. Medellín; 2012 [citado 18 de Enero 2019]. Disponible en: [https://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/MANUAL%20PAPA\\_0.pdf](https://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/MANUAL%20PAPA_0.pdf)
22. Iniap. Sistematización de tecnologías desarrolladas para el control de Teciá solanivora, dentro de un programa de manejo integrado de plagas. [Internet]. 2003 [citado 3 de Enero 2019]. Disponible en: <http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/418/4/iniapscbt4s.pdf>
23. Dane. Polilla guatemalteca (Teciá solanivora), plaga de gran impacto económico en el cultivo de la papa [Internet]. Bogotá; 2014. Disponible en: [https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/insumos\\_factores\\_de\\_produccion\\_jul\\_2014.pdf](https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/insumos_factores_de_produccion_jul_2014.pdf)
24. Gobierno del Principado de Asturias. Ciclo de vida Teciá solanivora [Internet]. 2016 [citado 15 de Enero 2019]. Disponible en: [https://www.asturias.es/Asturias/descargas/PDF\\_TEMAS/Agricultura/sanidad%20vegetal/avisos/Boletin\\_2016\\_01\\_Polillas\\_Patata.pdf](https://www.asturias.es/Asturias/descargas/PDF_TEMAS/Agricultura/sanidad%20vegetal/avisos/Boletin_2016_01_Polillas_Patata.pdf)
25. D. Villanueva, C.I. Saldamando *Teciá solanivora*, Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae): a Review of its Origin, Dispersion and Biological Control Strategies [Internet]. 2013 [citado 30 de julio de 2018]. Disponible en:

[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1794-91652013000200012](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-91652013000200012)

26. Torres F. Biología y Manejo integrado de la polilla Centroamericana de la papa *Tecia solanivora* en Venezuela [Internet]. Caracas; 1998 [citado el 22 de Enero de 2019]. Disponible en: <http://repositorio.iica.int/bitstream/11324/2745/1/BVE17048775e.pdf>
27. Contreras R. El género *Bacillus*. La guía de Biología. 2014 [citado 11 Febrero 2019] Disponible en: <http://biologia.laguia2000.com/microbiologia/el-genero-bacillus>
28. Layton C, Monroy E, Corrales L. *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos [Internet]. Imbiomed.com.mx. 2016 [citado 17 de Enero de 2019]. Disponible en: [http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id\\_articulo=84150&id\\_seccion=3075&id\\_ejemplar=8294&id\\_revista=187](http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=84150&id_seccion=3075&id_ejemplar=8294&id_revista=187)
29. Infive Conicet. Mecanismo de Acción *Bacillus subtilis* [Internet]. 2014 [citado 5 de Enero de 2019]. Disponible en: [https://inta.gob.ar/sites/default/files/lic\\_lopez\\_bacillus.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/lic_lopez_bacillus.pdf)
30. Rosas-García N. Avances en el desarrollo de formulaciones insecticidas a base de *Bacillus thuringiensis* [Internet]. Revistas.unal.edu.co. 2008 [citado 6 de Enero de 2019]. Disponible: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/1395>
31. Herrera G, Polanco H. Los Plaguicidas Utilizados en los últimos cuarenta y cinco años en Colombia. *Agronomía Colombia* [Internet]. 1995. [citado 5 de febrero de 2018]. 102:113. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/42199/1/28041-99370-1-PB.pdf>



32. Torrado Pacheco, A. USO DE PLAGUICIDAS Y EXIGENCIAS DEL MERCADO AGROALIMENTARIO. [ citado 5 de febrero de 2018] Disponible en:[https://www.ica.gov.co/getdoc/d3eecf95-6146412bbe83e1e507db9cd6/articulo\\_usodeplaguicidas.aspx](https://www.ica.gov.co/getdoc/d3eecf95-6146412bbe83e1e507db9cd6/articulo_usodeplaguicidas.aspx)
33. Buitrago C, Gomez M. USO APARENTE DE PLAGUICIDAS EN COLOMBIA DURANTE LOS AÑOS 2004 – 2007. [Internet]. 13th ed. Colombia: RepCar; 2018 [citado 30 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://cep.unep.org/repcar/informaciondepaises/colombia1/COL%20importacion%20y%20exportacion%202004-2007.pdf>
34. Restrepo M, Guerrero E. Los plaguicidas organofosforados [Internet] [ citado 2 de abril de 2018]. Disponible <http://www.actamedicacolombiana.com/anexo/articulos/01-1979-04.pdf>
35. Gómez Álvarez Lilliam Eugenia. La problemática con los pesticidas en Colombia [Internet]. 05 DE SEPTIEMBRE DE 2010 [citado 10 de abril de 2018]. Disponible en: <http://www.es.lapluma.net/index.php/articulos/economia-de-la-naturaleza/926-conferencia-la-problematica-con-los-pesticidas-en-colombia.html>
36. Benfenati E, et al. Predicting acute contact toxicity of pesticides in honeybees (*Apis mellifera*) through a k-nearest neighbor model. *Chemosphere* [Internet]. 2017 [Citado 10 de marzo de 2018]. 438:444. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653516312930>
37. *Bacillus pumilus*: Agroquímicos de México [Internet]. Terralia.com. [citado 12 de Junio de 2019]. Disponible en: [https://www.terralia.com/agroquimicos\\_de\\_mexico/view\\_composition?composition\\_id=14833](https://www.terralia.com/agroquimicos_de_mexico/view_composition?composition_id=14833)
38. Nava E, García C, et al. Bioplaguicidas: Una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai* [Internet]. 2012. [citado 12 de Junio de 2019]. Disponible en:

<http://www.redalyc.org/busquedaArticuloFiltros.oa?q=Bioplaquicidas:%20Una%20opci%C3%B3n%20para%20el%20control%20biol%C3%B3gico%20de%20plagas.&idp=1>

39. Controle la polilla que afecta la papa cuando está almacenada [Internet]. Agrosavia. [citado 12 de Junio de 2019]. Disponible en : <http://www.agrosavia.co/noticias/generales/baculovirus/>
40. Pitre L, Hernández J, Bernal J. Toxicidad de  $\delta$ -endotoxinas recombinantes de *Bacillus thuringiensis* sobre larvas de la polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*) (Lepidóptera: Gelechiidae). Rev. colomb. biotecnología [Internet]. 2008 [citado 12 de Junio de 2019]. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-34752008000200010&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752008000200010&lng=en)
41. Sánchez L, Corrales L. Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Revista. NOVA. 2005. [citado 02 febrero del 2019]; 3(4). Disponible en: [http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id\\_articulo=48253&id\\_seccion=3074&id\\_ejemplar=4893&id\\_revista=187](http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=48253&id_seccion=3074&id_ejemplar=4893&id_revista=187)
42. Araque C, García J. Manual Integrado de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Povolny). Corpoica. Biblioteca digital agronet. 1999. [citado 02 febrero de 2019]. Disponible en: <http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11348/6283/1/MIP%20de%20la%20polilla%20guatemalteca%20en%20papa.pdf>
43. Villanueva D, Saldamando C. *Tecia solanivora*, Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae): una revisión sobre su origen, dispersión y estrategias de control biológico. Ingeniería y ciencia [Internet]. 2013.[citado 10 de febrero de 2019]. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1794-91652013000200012](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1794-91652013000200012)

44. Narváez J, Palacio J, Molina F Environmental persistence of pesticides and their ecotoxicity [Internet]. 2012.[citado 18 de febrero de 2019]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/35839/1/36278-151112-1-PB.pdf>
45. Tasharrofi N, Adrangie S, Fazelia M, Rastegarc H, Khoshayandd M, Faramarz M,examinaron exploring and optimizing the potential of chitinase production by isolated bacillus spp[Internet] 2013.[citado 22 de febrero de 2019]. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/1f26/92069cc5a0bd32186918fddefc0b2fd7fccd.pdf>
46. Martínez W, Cerón J. Distribution and diversity of cry genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia [Internet] 2003 . [ citado 26 de febrero de 2019 ]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12623312>
47. Kheder S, Feki O, Dammak M, Efficacy of *Bacillus subtilis* V26 as biological control agent against *Rhizoctonia solani* on potato [ Internet ] 2015. [ citado 11 de marzo de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26563555>
48. VILLARREAL-DELGADO, María Fernanda et al. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola [Internet]. 2018 [citado 15 de marzo de 2019] Disponible en: <http://dx.doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>.
49. Pinto N, de Castro L, de Almeida Capella G, Motta T, de Souza Stori de Lara A, de Moura M et al. Controlling gastrointestinal nematodes in cattle by *Bacillus* species. *Veterinary Parasitology* [Internet]. 2017 [Citado 25 de enero de 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401717303400>

50. Guo Q, Dong W, Li S, Lu X, Wang P, Zhang X et al. Fengycin produced by *Bacillus subtilis* NCD-2 plays a major role in biocontrol of cotton seedling damping-off disease. *Microbiological Research* [Internet]. 2014 [citado 27 de Enero 2019] Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501313001948>

