



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS

CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

TEMA:

“PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE ACTINOMICETES AISLADOS DE LA RIZÓSFERA Y RIZOPLANO DEL TRÉBOL BLANCO (*Trifolium repens* L.) PARA EL CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS, BACTERIAS Y LEVADURAS”

Trabajo de Graduación, Modalidad Trabajo Estructurado de Manera Independiente, presentado como requisito previo a la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

RICARDO PAUL CAICEDO PARRA

Ambato – Ecuador

2012

APROBACION DEL TUTOR

En calidad de tutor del trabajo de investigación: “PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE ACTINOMICETES AISLADOS DE LA RIZÓSFERA Y RIZOPLANO DEL TRÉBOL BLANCO (*Trifolium repens* L.) PARA EL CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS, BACTERIAS Y LEVADURAS”, realizado por el Egado. Ricardo Paul Caicedo Parra, certifico que el trabajo fue realizado por la persona indicada, Considero que dicho informe investigativo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometidos a la evaluación del Tribunal del grado, que el Honorable Consejo Directivo designe, para su correspondiente estudio y calificación.

Ambato, Mayo del 2012

Dr. Carlos Rodriguez M.; Ph.D

TUTOR

AUTORIA

El presente trabajo de investigación: “PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE ACTINOMICETES AISLADOS DE LA RIZÓSFERA Y RIZOPLANO DEL TRÉBOL BLANCO (*Trifolium repens* L) PARA EL CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS, BACTERIAS Y LEVADURAS”, es absolutamente original, auténtico y personal, en tal virtud, el contenido, efectos legales y académicos que se deprenden del mismo son de exclusiva responsabilidad del autor.

Ambato, Mayo del 2012

Ricardo Paul Caicedo Parra

180414619-7

DEDICATORIA

A Dios, ser supremo que nos llena de bendiciones, que esta siempre a nuestro lado y esta pendiente de nuestro bienestar.

A mis Padres por el buen ejemplo, la educación, los valores, la protección, el cariño, afecto y apoyo que me han dado en mis años de vida.

A mis hermanos. En especial a mi hermano David por su apoyo incondicional, por su cariño y por ser mi mejor amigo, también a su esposa y sus hijos Valentina y Martin.

A mi Abuelita Mami Rosa por su infinito cariño, amor y por haberme educado como a su propio hijo de igual forma para el Papi Olmedo que desde el cielo esta pendiente de toda la familia.

A mis Tías y Tíos que han sido como padres para mí y para mis primos que han sido como mis hermanos.

Todos ustedes han sido mi mayor motivación para cada día salir adelante y ser una persona mejor.

AGRADECIMIENTO

A Dios por todas las bendiciones que me da cada día y haberme permitido conocer personas que han marcado de forma positiva mi vida.

A mis Padres por su confianza, su apoyo económico, psicológico y moral a lo largo de mis 25 años de vida, de igual forma para mis hermanos y sobrinos.

A la Universidad Técnica de Ambato, a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos especialmente a sus autoridades por las facilidades que se me brindaron para la realización de mi Tesis de grado en los Laboratorios de la Facultad.

Al Dr. Carlos Rodríguez que fue el Tutor de mi tesis, también mi Profesor y sobre todo el amigo que me brindo consejos muy importantes y me brindo el apoyo en momentos difíciles.

A las amigas(os) que hice durante toda mi carrera universitaria, a Gaby Vi, Rosita, Diana, Mafer, Verito, Axel, Mario.

A mis panas Gabriel, Manuel y Francisco por su amistad, su colaboración, su camaradería, su bondad, su sencillez, y sobretodo por haberme ayudado en el desarrollo de mi tesis y haberme dado su apoyo en momentos determinados de mi vida.

A mis Tías por haber sido un soporte importante no solo en mi etapa universitaria sino en cada etapa de mi vida, de igual forma a mis primas y primos.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

CAPITULO I

EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACION

Tema de la Investigación	1	
Planteamiento del problema		1
Contextualización	1	
Macro		1
Meso	2	
Micro	2	
Análisis Critico		2
1.2.2.1. Diagrama Causa – Efecto		3
1.2.2.2. Prognosis		3
1.2.2.3. Formulación del problema		3
1.2.2.4. Interrogantes		4
1.2.2.5. Delimitación		4
1.3. Justificación		4
1.4. Objetivos		5
1.4.1. General		5
1.4.2. Específicos		5

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1.	Antecedes investigativos	6	
2.1.1.	Generalidades		6
2.1.2.	Morfología de los actinomicetes		8
2.1.3.	Ecología de los actinomicetes	9	
2.1.4.	Actinomicetes aislados a la rizósfera y rizoplano de plantas	10	
2.1.5.	Aislamiento selectivo de actinomicetes	11	
2.1.6.	Aislamiento de colonias de actinomicetes del rizoplano de leguminosas	12	
2.1.7.	Aislamiento de colonias de actinomicetes de la rizósfera de leguminosas		12
2.1.8.	Producción de metabolitos secundarios		13
2.1.9.	Determinación de la producción de compuestos bioactivos	14	
2.1.9.1.	Antagonismo Microbiano	15	
2.1.9.1.1.	Técnicas de Antagonismo Microbiano	16	
2.1.10.	Características de los microorganismos usados en pruebas de antagonismo	18	
2.1.10.1.	Bacterias	18	
2.1.10.1.1.	Características de las bacterias Gram positivas		19
2.1.10.1.2.	Características de las bacterias Gram negativas	20	
2.1.10.2.	Hongos Fitopatógenos		20
2.1.10.2.1.	<i>Botrytis</i>	21	
2.1.10.2.2.	<i>Fusarium</i>	21	
2.1.10.2.3.	<i>Rhizoctonia</i>	22	
2.1.11.	Fundamentos de la taxonomía numérica microbiana	23	
2.2.	Fundamentación Filosófica	24	

2.3.	Fundamentación Legal	24
2.4.	Categorías fundamentales	25
2.5.	Hipótesis	27
2.5.1.	Hipótesis Nula	27
2.5.2.	Hipótesis Alternativa	27
2.6.	Señalamiento de variables de las hipótesis	27

CAPITULO III

METODOLOGÍA

3.1	Enfoque	28
3.2	Modalidad básica de la investigación	28
3.3	Nivel o tipo de investigación	28
3.4.	Población y muestra	28
3.5.	Operacionalización de variables	28
3.6.	Recolección de información	30
3.6.1.	Caracterización Físico – Química de las muestras de suelo	30
3.6.1.1.	Determinación del pH	30
3.6.1.2.	Determinación de la humedad	30
3.6.1.3.	Determinación del porcentaje de materia orgánica	30
3.6.2.	Aislamiento Selectivo de actinomicetes	31
3.6.2.1.	Determinación de la Población y Diversidad de actinomicetes	31
3.6.2.2.	Determinación del porcentaje de actinomicetes	32
3.6.3.	Aislamiento y Purificación de actinomicetes	32
3.6.3.1.	Almacenamiento y conservación de los cultivos puros de actinomicetes	33

3.6.4.	Caracterización macroscópica de los aislamientos	33
3.6.5.	Caracterización microscópica	33
	Tabla 1. Características de los diferentes tipos de morfología de las cadenas de esporas	33
3.6.6.	Determinación de la actividad microbiana	34
3.6.6.1.	Preparación de los platos con los microorganismos modelo	34
3.6.6.2.	Preparación de los cultivos de actinomicetes	35
3.6.6.3.	Instalación del experimento para determinar la capacidad antagónica	35
3.7.	Pruebas Fenotípicas de actinomicetes Productores de Metabolitos	35
3.7.1.	Rango de crecimiento en Función de la Temperatura	35
3.7.2.	Rango de crecimiento en Función del pH	36
3.7.3.	Perfil metabólico de uso de carbohidratos	36
3.7.4.	Aminoácidos como fuente de carbono y energía	36
3.8.	Procesamiento y análisis	37
3.8.1.	Población y diversidad de actinomicetes	37
	Tabla 2. Tratamientos en estudio	37
	Tabla 3. Factores en estudio	38
	Tabla 4. Esquema del análisis de varianza	38
3.7.3.	Formación de grupos de color	39
3.7.4.	Determinación de la actividad microbiana	39
3.7.5.	Taxonomía numérica de datos fenotípicos	39
	Tabla 5. Codificación de la información para las pruebas de taxonomía numérica de datos fenotípicos para los actinomicetes	39

CAPITULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1.	Análisis de resultados	43
4.1.1.	Caracterización Físico – Química de las muestras de suelo	43
4.1.2.	Aislamiento selectivo de actinomicetes	43
4.1.2.1.	Determinación de la población y diversidad de actinomicetes en la rizósfera y rizopiano del trébol blanco	43
4.1.2.2.	Determinación del porcentaje de actinomicetes en la rizósfera y rizopiano del trébol blanco	44
4.1.3.	Aislamiento y purificación de actinomicetes	45
4.1.3.1.	Caracterización macroscópica, microscópica y formación de grupos de color de actinomicetes aislados de la rizósfera y rizopiano	45
4.1.4.	Determinación de la actividad antimicrobiana	45
4.1.4.1.	Actividad en contra de <i>Botrytis</i>	46
4.1.4.2.	Actividad en contra de <i>Fusarium</i>	46
4.1.4.3.	Actividad en contra de <i>Rhizoctonia</i>	47
4.1.4.4.	Actividad en contra de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
4.1.4.5.	Actividad en contra de la bacteria Gram positiva	47
4.1.4.6.	Actividad en contra de la bacteria Gram negativa	47
4.1.5.	Pruebas Fenotípicas de los actinomicetes Productores de Metabolitos	48
4.1.5.1.	Rango de crecimiento en función de la temperatura	48
4.1.5.2.	Rango de crecimiento en función del pH	48
4.1.5.3.	Pruebas metabólicas de producción de enzimas y uso de aminoácidos como fuente de C y N	48
4.1.5.4.	Taxonomía numérica de datos fenotípicos	49
4.2.	Interpretación de datos	49

4.2.1.	Población y diversidad de actinomicetes	49
4.2.2.	Porcentaje de actinomicetes	50
4.2.3.	Determinación de grupos de color	51
4.2.4.	Determinación de la actividad antimicrobiana	51
4.2.5.	Taxonomía numérica de datos fenotípicos	51
4.3.	Discusión general del trabajo investigativo	52
4.4.	Verificación de hipótesis	53
4.4.1.	Hipótesis Nula (H_0)	53
4.4.2.	Hipótesis Alternativa (H_1)	53

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1.	Conclusiones	54
5.2.	Recomendaciones	54

CAPITULO VI

PROPUESTA

6.1.	Datos Informativos	56
6.1.1	Título	56
6.1.2.	Institución Ejecutora	56
6.1.3.	Beneficiarios	56

6.1.4.	Ubicación	56	
6.1.5.	Tiempo estimado para la ejecución	56	
6.1.6.	Equipo técnico responsable	56	
6.2.	Antecedentes de la propuesta	56	
6.3.	Justificación	57	
6.4.	Objetivos	57	
6.4.1.	General		57
6.4.2.	Específicos	57	
6.5.	Análisis de factibilidad	58	
6.6.	Fundamentación	58	
6.7	Metodología - modelo operativo		58
6.7.1.	Aislamiento selectivo de actinomicetes	58	
6.7.1.1.	Determinación de la población y diversidad de actinomicetes	58	
6.7.1.2.	Aislamiento y purificación de actinomicetes	59	
6.7.1.3.	Almacenamiento y conservación de los cultivos puros de actinomicetes	59	
6.7.1.4.	Caracterización macroscópica de los aislamientos	59	
6.7.1.5.	Caracterización microscópica	60	
6.7.2.	Taxonomía numérica de características fenotípicas	60	
6.7.2.1.	Rango de crecimiento en Función de la Temperatura	60	
6.7.2.2.	Rango de crecimiento en Función del pH		60
6.7.2.3.	Perfil metabólico de uso de carbohidratos	60	
6.7.3.	Determinación de la actividad microbiana	61	
6.7.3.1.	Preparación de los platos con los microorganismos modelo	61	
6.7.3.2.	Preparación de los cultivos de actinomicetes	61	
6.7.3.3.	Instalación del experimento para determinar la capacidad antagónica	62	

6.8.	Administración	62
6.9.	Previsión de la evaluación	63
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	64

ÍNDICE DE TABLAS

ANEXO A

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla A1. Características fisicoquímicas del suelo de la rizósfera del trébol blanco.

Tabla A2. Número de colonias de bacterias.

Tabla A3. Número de colonias de actinomicetes.

Tabla A4. Número de colonias diferentes de actinomicetes.

Tabla A5. Número de ufc/g suelo seco de actinomicetes.

Tabla A6. Porcentaje de actinomicetes.

Tabla A7. Codificación de actinomicetes aislados de la rizósfera del Trébol blanco.

Tabla A8. Codificación de actinomicetes aislados del rizoplano del Trébol blanco.

Tabla A9. Grupos de color de actinomicetes aislados de la rizósfera del Trébol blanco.

Tabla A10. Grupos de color formados por los actinomicetes aislados del rizoplano del Trébol blanco.

Tabla A11. Actinomicetes que no presentaron actividad antimicrobiana.

Tabla A12. Actinomicetes que presentaron actividad microbiana.

Tabla A13. Tipo de actividad y ubicación de los miembros respectivos.

Tabla A14. Diámetros de inhibición (mm) producidos por actinomicetes frente a *Botrytis*.

Tabla A15. Diámetros de inhibición (mm) producidos por actinomicetes frente a *Fusarium*.

Tabla A16. Diámetros de inhibición (mm) producidos por actinomicetes frente a *Rhizoctonia*.

Tabla A17. Diámetros de inhibición (mm) producidos por actinomicetes frente a la bacteria Gram positiva.

Tabla A18. Diámetros de inhibición (mm) producidos por actinomicetes frente a la bacteria Gram negativa.

Tabla A19. Actinomicetes usados en las pruebas fenotípicas.

Tabla A20. Número de actinomicetes que presentaron crecimiento de acuerdo a diferentes valores de temperatura.

Tabla A21. Numero de actinomicetes que presentaron crecimiento de acuerdo a diferentes valores de pH.

Tabla A22. Producción de enzimas y crecimiento en aminoácido como fuente única de C y N.

Tabla A23. Grupos especie formados luego del análisis de la taxonomía numérica de datos fenotípicos de los actinomicetes aislados de la rizósfera del Trébol blanco.

Tabla A24. Grupos especie formados luego del análisis de la taxonomía numérica de datos fenotípicos de los actinomicetes aislados del rizoplano del Trébol blanco.

ANEXO B

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tabla B1. Análisis de varianza para el número de ufc de actinomicetes por gramo de suelo seco (ufc/g).

Tabla B2. Separación de medias para el número de actinomicetes por gramo de suelo seco de la interacción A x B.

Tabla B3. Análisis de varianza para la diversidad de actinomicetes.

Tabla B4. Análisis de varianza para el porcentaje de actinomicetes.

- Tabla B5.** Análisis de varianza del diámetro de inhibición de actinomicetes contra *Botrytis*.
- Tabla B6.** Separación de medias para el diámetro de zona de inhibición en *Botrytis*.
- Tabla B7.** Análisis de varianza del diámetro de inhibición de actinomicetes contra *Fusarium*.
- Tabla B8.** Separación de medias para el diámetro de zona de inhibición en *Fusarium*.
- Tabla B9.** Análisis de varianza del diámetro de inhibición de actinomicetes contra *Rhizoctonia*.
- Tabla B10.** Separación de medias para el diámetro de zona de inhibición en *Rhizoctonia*.
- Tabla B11.** Análisis de varianza del diámetro de inhibición de actinomicetes contra bacteria Gram positiva.
- Tabla B12.** Separación de medias para el diámetro de zona de inhibición en la bacteria Gram positiva.
- Tabla B13.** Análisis de varianza del diámetro de inhibición de actinomicetes contra bacteria Gram negativa.
- Tabla B14.** Separación de medias para el diámetro de zona de inhibición en la bacteria Gram negativa.
- Tabla B15.** Matriz de código binario usada para taxonomía numérica de los actinomicetes aislados de la rizósfera y rizoplano del Trébol blanco.

ANEXO C

GRÁFICOS

- Figura C1.** Número de ufc/g de suelo seco de actinomicetes, diversidad y porcentaje de actinomicetes para el Factor A.
- Figura C2.** Número de ufc/g de suelo seco de actinomicetes, diversidad y porcentaje de actinomicetes para el Factor B.
- Figura C3.** Número de ufc/g de suelo seco de actinomicetes, diversidad y porcentaje de actinomicetes para la interacción AB.
- Figura C4.** Caracterización microscópica de actinomicetes.
- Figura C5.** Número de individuos por cada tipo de actividad.

Figura C6. Número de actinomicetes de acuerdo a su temperatura de crecimiento.

Figura C7. Número de actinomicetes de acuerdo al pH de crecimiento.

Figura C8. Producción de enzimas y crecimiento en aminoácidos como fuente única de C y N.

Figura C9. Dendrograma basado en la similaridad calculada con el coeficiente de simple coincidencia de 52 actinomicetes aislados de la rizósfera y rizoplaneo del trébol blanco.

ANEXO D

MEDIOS DE CULTIVO

MEDIOS DE CULTIVO.

Agar GYM.

Agar Nutriente.

Medio Basal para Fuentes de Carbono y Nitrógeno.

BUFERS.

Búfer de Fosfato di Básico de Sodio y Ácido Cítrico.

ANEXO E

FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1: pH 5,5 Rizósfera.

Fotografía 2: pH 8,5 Rizósfera.

Fotografía 3: pH 5,5 Rizoplaneo.

Fotografía 4: pH 8,5 Rizoplaneo.

Fotografía 5: pH 5,5 Rizósfera.

Fotografía 6: pH 8,5 Rizósfera.

Fotografía 7: pH 5,5 Rizoplaneo.

Fotografía 8: pH 8,5 Rizoplano.

Fotografía 9: Bacteria Gram positiva (+).

Fotografía 10: Bacteria Gram negativa (-).

Fotografía 11: *Botrytis*.

Fotografía 12: *Fusarium*.

Fotografía 13: *Rhizoctonia*.

Fotografía 14: Rizósfera (ATS-004, ATS-008).

Fotografía 15: Rizoplano (ATR-012, ATR-013).

Fotografía 16: Rizoplano (ATR-012, ATR-013).

Fotografía 16: Antagonismo frente a *Botrytis*.

Fotografía 17: Antagonismo frente a *Botrytis*.

Fotografía 18: Antagonismo frente a *Fusarium*.

Fotografía 19: Antagonismo frente a *Fusarium*.

Fotografía 20: Antagonismo frente a *Rhizoctonia*.

Fotografía 21: Antagonismo frente a *Rhizoctonia*.

Fotografía 22: Antagonismo frente a Levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Fotografía 23: Antagonismo frente a Levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Fotografía 24: Antagonismo frente a Bacteria Gram Positiva.

Fotografía 25: Antagonismo frente a Bacteria Gram Positiva.

Fotografía 26: Antagonismo frente a Bacteria Gram Negativa.

Fotografía 27: Antagonismo frente a Bacteria Gram Negativa.

Fotografía 28: Temperatura 4 °C.

Fotografía 29: Temperatura 37 °C.

Fotografía 30: Temperatura 50 °C.

Fotografía 31: Perfil metabólico de uso de carbohidratos. Almidón.

Fotografía 32: Perfil metabólico de uso de carbohidratos. Celulosa.

Fotografía 33: Perfil metabólico de uso de carbohidratos. Quitina.

Fotografía 34: Aminoácidos como fuente de carbono y energía. Acido aspártico.

Fotografía 35: Aminoácidos como fuente de carbono y energía. Glicina.

Fotografía 36: pH 4.5

Fotografía 37: pH 5.5

Fotografía 38: pH 6.5

Fotografía 39: pH 7.5

Fotografía 40: pH 8.5

Fotografía 41: pH 9.5

ANEXO F

TABLA DE COLORES

British Standard Specification for colours for identification, coding and special purposes.

RESUMEN

Durante la determinación de la diversidad biológica y metabólica de actinomicetes asociados a la rizósfera y rizoplano del trébol blanco (*Trifolium repens* L.), se lograron aislar en cultivo puro, noventa y tres actinomicetes, de los cuales sesenta y nueve fueron obtenidos de la rizósfera y veinte y cuatro del rizoplano. Fue evidente que las poblaciones de actinomicetes fueron marcadamente contrastantes, en la rizósfera se encontró $5.19E+07$ ufc/g y en el rizoplano $4.63E+03$ ufc/g, es decir la población de la rizósfera fue 11000 veces más. Así mismo el pH del medio de aislamiento también influyó en las poblaciones de actinomicetes, ya que a 8,5 la población fue más alta que a pH 5,5. Por otro lado en la determinación de la actividad antimicrobiana encontramos que, el 60% de actinomicetes estudiados, produjeron antibióticos que inhibieron el crecimiento de los microorganismos modelo, de los cuales, 29 presentaron capacidad antagónica para el control de hongos fitopatógenos *Botrytis*, *Fusarium* y *Rhizoctonia*. Ningún actinomicete fue capaz de inhibir el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Finalmente la taxonomía de datos fenotípicos permitió obtener un mayor número de grupos, que los obtenidos. En los grupos de color, basados en las pigmentaciones del micelio aéreo, sustrato y pigmento difusible, mostrando que la diversidad de los actinomicetes estudiados es bastante amplia, tanto desde el punto de vista morfológico como metabólico. Los resultados de la presente investigación demuestran que los actinomicetes aislados de una leguminosa como el trébol blanco, existe una gran biodiversidad sobretodo de productores de compuestos bioactivos útiles en biotecnología que podrían permitir el desarrollo de uno o varios productos útiles para el biocontrol de microorganismos patógenos en agricultura.

CAPITULO I

EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACION

Tema de la Investigación

Producción de Compuestos Bioactivos de Actinomicetes Aislados de la Rizósfera y Rizoplaneo del Trébol blanco (*Trifolium repens* L.) para el Control de Hongos Fitopatógenos, Bacterias y Levaduras.

Planteamiento del problema

1.2.1. Contextualización

1.2.1.1. Macro

Los actinomicetes son microorganismos procariotes parecidos a los hongos, de tamaño similar a las bacterias, generalmente son gram positivos, forman esporas. Las condiciones óptimas para su desarrollo son ambientes húmedos pero aeróbicos, pH neutro o alcalino. Al igual que otras bacterias estas carecen de núcleo, pero forman una estructura ramificada de filamentos. Se encuentran frecuentemente en el suelo, constituyen un componente sustancial de la microflora del suelo, abonos, capas superficiales de lagos y restos vegetales, registrándose más de un millón de unidades formadoras de colonias en un gramo de tierra fértil (Solans & Vobis, 2003). A estos microorganismos se los puede detectar en el suelo debido a una sustancia volátil conocida con el nombre de geosmina (Alexander, 1977), la que es responsable del olor a tierra húmeda o materia orgánica bien descompuesta.

1.2.1.2. Meso

Como muchos otros organismos del suelo, los actinomicetes son heterótrofos y saprófitos. La mayoría tiene un crecimiento máximo entre 25-30 °C, aunque también se encuentran representantes termotolerantes y termofílicos. Debido a una mayor capacidad para degradar materiales resistentes y tolerar condiciones de baja humedad que bacterias y hongos, se determina que conforme disminuye la disponibilidad de proteínas, carbohidratos y humedad, aumenta la población de actinomicetes. Se reproducen por fisión binaria mediante la producción de esporas (Alexander, 1977).

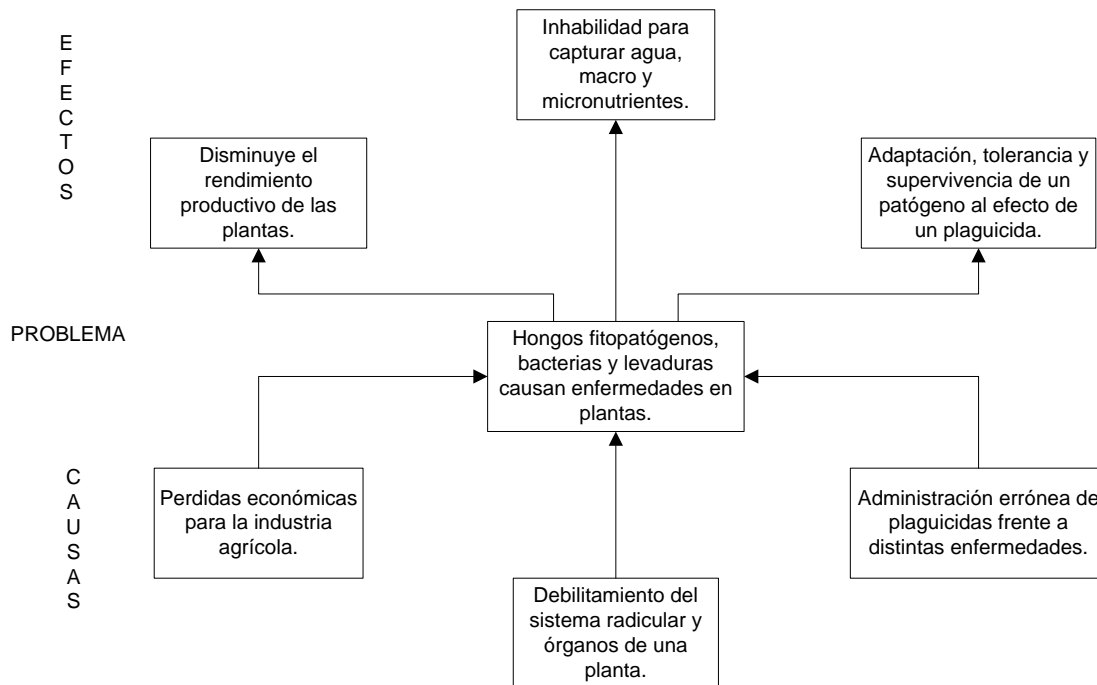
1.2.1.3. Micro

Los actinomicetes constituyen el reservorio más importante de agentes microbianos usados en la industria farmacéutica. La producción de metabolitos secundarios es una de sus principales características. La evidencia de la producción de antibióticos normalmente se observa en platos de agar, empleadas en el aislamiento de *Streptomyces*. Colonias adyacentes son inhibidas por la acción de biocompuestos. Producen un número amplio de antibióticos, Lazzarini *et al.* (2001) reportaron que hasta el año 2000, más del 40 % de antibióticos descubiertos, correspondían a metabolitos secundarios descubiertos en actinomicetes. Los antibióticos producidos por este tipo de microorganismos son aplicables al campo agrícola, terapéutico humano y veterinario, aunque también producen enzimas e inhibidores de enzimas que presentan actividades farmacológicas (Leveau y Bouix, 2000). Esto ha permitido el desarrollo significativo del estudio de los actinomicetes tanto en el descubrimiento de técnicas de aislamiento y cultivo, como en el descubrimiento de nuevos metabolitos producidos por estos microorganismos.

1.2.2. Análisis Crítico

1.2.2.1. Diagrama Causa – Efecto

Ver página siguiente.



1.2.2.2. Prognosis

Si el presente estudio no se llegara a culminar, se desconocería la biodiversidad de actinomicetes presentes en la rizósfera y rizoplasma del trébol blanco, como también el determinar si los microorganismos en cuestión producen compuestos bioactivos útiles para la industria farmacéutica y la agrobiotecnología. Al conocerse cada vez más reportes sobre el apareamiento de microorganismos resistentes a antibióticos y también sobre los problemas medioambientales causados por el uso indiscriminado de pesticidas, el no obtener actinomicetes que posean la capacidad de producir nuevos antibióticos y también el de brindar alternativas biológicas para el control de enfermedades de plantas no contribuiría a una mejor calidad de vida de los seres humanos y del medio ambiente que nos rodea.

1.2.2.3. Formulación del problema

¿Es posible que el control biológico de hongos fitopatógenos, bacterias y levaduras eviten daños en la producción agrícola?

1.2.2.4. Interrogantes

¿Cómo se aíslan actinomicetes de la rizósfera y rizoplano del trébol blanco?

¿Cómo se realiza la caracterización macroscópica y microscópica de los actinomicetes aislados?

¿Cómo se identifica los diferentes grupos de microorganismos capaces de producir compuestos bioactivos?

1.2.2.5. Delimitación

Campo: Investigación.

Área: Microbiología.

Sub aérea: Biotecnología.

Aspecto: Producción de compuestos bioactivos de actinomicetes.

Geográfica: Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Universidad Técnica de Ambato (UTA).

Temporal: Marzo 2010 – Septiembre 2010

Justificación

Las leguminosas se caracterizan por presentar un contenido alto de proteínas en sus tejidos y órganos. Esto se debe a la relación simbiótica que las raíces realizan con bacterias del género *Rhizobium* provocando que exista una mayor disponibilidad de nitrógeno para la planta. Indirectamente este fenómeno provoca que en la rizósfera se cree un hábitat rico en compuestos nitrogenados orgánicos e inorgánicos, disponible para los microorganismos del suelo. Se ha demostrado que la población de actinomicetes en la rizósfera de leguminosas es alta y diversa (*Sardi et al, 1992; Rodríguez, 1996*).

El presente estudio pretende aislar, caracterizar y determinar la producción de compuestos bioactivos por actinomicetes aislados de la rizósfera y rizoplano de trébol blanco (*Trifolium repens* L.)

El contenido alto de nitrógeno podría brindar condiciones especiales para el crecimiento de

actinomicetes nuevos, que sobretodo tengan la capacidad de producir compuestos bioactivos útiles para agrobiotecnología y la industria farmacéutica. Cada vez más se reporta el apareamiento de microorganismos resistentes a antibióticos, o de problemas medioambientales causados por el uso indiscriminado de pesticidas. Los resultados de la presente investigación pretenden aportar con conocimientos básicos que permitan el desarrollo de nuevos antibióticos, y de alternativas biológicas para el control de enfermedades de plantas, mejorando así las condiciones de vida de los seres humanos y contribuyendo a mejorar el medio ambiente que nos rodea.

1.4 Objetivos

1.4.1 General

Determinar la producción de compuestos bioactivos de actinomicetes aislados de la rizósfera y rizoplaneo del trébol blanco (*Trifolium repens* L.) frente a la presencia de hongos fitopatógenos, bacterias Gram positivas, Gram negativas y levaduras.

1.4.2 Específicos

Aislar selectivamente actinomicetes presentes en la rizósfera y rizoplaneo del trébol blanco.

Caracterizar macroscópica y microscópicamente a los actinomicetes obtenidos en el aislamiento selectivo.

Evaluar la capacidad antagónica que presenten los actinomicetes en la presente investigación.

CAPITULO II

MARCO TEORICO

2.1. Antecedentes Investigativos

2.1.1. Generalidades.

Trébol blanco.

El trébol blanco o también conocido como *Trifolium repens* L. es una especie de trébol nativa de Europa, norte de África, y Asia occidental. Es cosmopolita, al aparecer en distintos ambientes dentro del clima templado húmedo. Su nombre también se debe al color blanco de las flores y a que es una leguminosa vivaz, estolonífera: de tallos rastreros que al tocar el suelo enraízan. Es la leguminosa perenne más importante de todo el mundo para el pastoreo en zonas húmedas, y suele ir asociado a la ballaica o *Lolium perenne*, que es su gramínea complementaria. El trébol blanco es sensible a la sequía, probablemente por sus raíces superficiales, lo que obliga a cultivarla bajo riego en veranos secos. Sin embargo, puede vegetar en los suelos pobres, ácidos o arenosos, necesitando fuertes abonados fosfóricos, también requiere de fuentes como el potasio, el calcio y el magnesio al igual que casi todos los tréboles.

Existen tres grupos de variedades de trébol blanco:

De hoja pequeña. Son las más naturales y suelen tener su origen en ecotipos recogidos de prados antiguos. Sus foliolos son pequeños y su producción, menor, pero resisten bien el pastoreo y el frío y son muy persistentes.

De hoja grande. Originarios del mediterráneo, de porte más elevado, estolones gruesos y hojas e inflorescencias grandes. La variedad más importante es el trébol ladino, aconsejable para prados de siega, con riego, con alta producción aunque de persistencia relativamente baja.

De hoja común o intermedia, muy utilizadas en praderas de pastoreo de media y larga duración. La variedad más utilizada es la Grassland Huia. (Ayanz, 2007).

El Trébol blanco al ser una leguminosa forrajera y debido a su alto contenido de proteínas y minerales sirve como alimento para los animales, para este fin el trébol no se utiliza solo, sino que va como clásico acompañante de las ballicas en las praderas de pastoreo (Cofré, 2002). Otra de las propiedades nutricionales es que sus hojas se emplean como alimento en humanos pero deben ser

cocidas de 5 a 10 minutos, son empleadas en sopas y ensaladas. También son utilizadas en infusión como un saludable té (Menendez, 2006).

En la naturaleza existe un número indeterminado de asociaciones entre poblaciones microbianas, las que forman parte de la microbiota del suelo. Allí se encuentran representados los tres principales grupos de microbios del suelo: bacterias, hongos y actinomicetes. Muchas de estas interacciones ocurren en la rizósfera y rizoplano de las plantas. La rizósfera es una porción del suelo alrededor de la raíz de las plantas. Posee una actividad microbiana elevada debido a la alta concentración de carbono y otros nutrientes, por ello la densidad microbiana es 100 veces más abundante que fuera de ella (Acero, 1997). En cambio el rizoplano es considerado como la parte exterior de la raíz inmediatamente adyacente al suelo, es decir constituye la superficie de las raíces. La mayor o menor cantidad de microorganismos en estas áreas depende de la cantidad de nutrientes exudados por la raíz (Pérez, 1997).

Actinomicetes

Los actinomicetes son un grupo de bacterias filamentosas abundantes en el suelo, aunque también son encontrados en ambientes marinos. Estas bacterias son aerobias y heterótrofas por lo cual pueden utilizar fuentes de carbono simples, complejas y compuestos orgánicos tales como ácidos, azúcares, polisacáridos, lípidos, proteínas e hidrocarburos alifáticos. Son gram positivos, en su gran mayoría forman esporas, poseen filamentos ramificados. Debido a su crecimiento y ramificación forman una estructura denominada micelio. En algunos de ellos el micelio no se encuentra bien desarrollado y en otros se desintegra con facilidad en fragmentos bacilares, pero en las especies más desarrolladas el micelio es estable (Franco, 2008).

La similitud en la formación de micelio, como en la mayoría de hongos, es solamente superficial, ya que el pequeño diámetro de los filamentos, la apariencia homogénea del citoplasma y la ausencia de un núcleo hace que los actinomicetes sean considerados como miembros del dominio Bacteria y no entre los hongos o como un grupo independiente intermedio. La composición de bases en el ADN es de 63 a 78 % (mol de G + C), son completamente inmóviles excepto en el género *Actinoplanes* que produce diminutas esporas flageladas contenidas en esporangios. Los actinomicetos producen sustancias inhibitoras de otros microorganismos, como la estreptomina, y la aureomicina producidas por *Streptomyces griseus*, *Streptomyces venezuelae* y *Streptomyces aureofaciens*; las

que son comúnmente usadas como agentes bactericidas en medicina (Hawker, 1964; Brock *et al*, 1987).

2.1.2. Morfología de los actinomicetes.

Los actinomicetes se encuentran ubicados en el dominio Bacteria debido a que los análisis filogenéticos de la secuencia del gen del ARNr 16 S claramente muestran una línea filogenética bien diferenciada dentro de las bacterias gram positivas de alto contenido de guanina más citosina (mol G+C). Su pared celular está compuesta por un contenido alto de peptidoglicano (N-acetilglucosamina, ácido murámico, alanina y ácido glutámico), mientras que el diámetro de sus hifas es inferior al de los hongos ya que varía entre 0.5 hasta 1 μm (Sylvia, 2005). Varían desde bacilos y cocos relativamente simples a organizaciones miceliales altamente complejas (Carrillo, 2003).

Las hifas son un conjunto de una o más células rodeadas por una pared tubular, generalmente filamentosas y usualmente ramificadas, estas al encontrarse sobre un sustrato sólido se ramifican a intervalos y se dispersan radialmente, ya sea dentro del sustrato o a lo largo de la superficie. El conjunto de hifas llega a formar una estructura altamente organizada conocida con el nombre de micelio. En condiciones de laboratorio, cuando los actinomicetes son crecidos en medio sólido, las hifas forman dos tipos de micelio (Stanier, 1985).

El micelio del sustrato penetra el agar y solubiliza el material orgánico con lo cual aporta nutrientes para el crecimiento del organismo. Aquí se da el alargamiento y ramificación de las hifas que produce una colonia firme y compacta la cual posee una superficie lisa y húmeda ya sea dentro del sustrato o lo largo de la superficie (Phillips, 1993). A partir de este se forma el micelio aéreo que se forma cuando los nutrientes han sido totalmente extraídos, este micelio es parasítico del micelio del sustrato, situado sobre la superficie de la colonia. Antes de la formación de las hifas aéreas se acumulan los gránulos de almacenamiento en el citoplasma, también se producen proteínas asociadas con esporas y se liberan enzimas. Las hifas son hidrófobas y debido a esto son resistentes a la humedad (Phillips, 1993). El micelio aéreo madura y parte de este se transforma en estructuras reproductivas conocidas como esporas. Las esporas presentan tamaños entre 0.5 a 1 micrómetros de diámetro, se forman en el micelio aéreo mediante la fragmentación del ápice de la hifa dentro de la vaina, cuando maduran se separan unas de otras quedando cada una de ellas

encerradas en una porción de la vaina. También son resistentes a la desecación, proporcionan mecanismos de dispersión y propagación para los actinomicetes (Stanier, 1985).

2.1.3. Ecología de los actinomicetes.

Los actinomicetes son microorganismos que se encuentran presentes en la gran mayoría de sustratos naturales, ampliamente distribuidos en hábitats como: suelo, agua marina, agua dulce, estiércol, fango de los ríos y fondo de los lagos (Franco, 2008). Son microorganismos de crecimiento lento, los actinomicetes no compiten eficientemente con bacterias u hongos de rápido crecimiento por el carbono disponible en el suelo. Sin embargo son importantes en la mineralización del carbono y nitrógeno, como en la descomposición de materia orgánica presente en el suelo, el proceso es llevado a cabo gracias a la diversidad de enzimas hidrolíticas que son capaces de producir y por su capacidad de degradar compuestos recalcitrantes presentes en la materia orgánica mineralizada en el suelo (Sylvia, 2005). En suelos de tipo seco alcalino, arable, muy calizo y rico en materia orgánica, ubicados en la superficie como en niveles más profundos, es posible encontrar una gran cantidad de actinomicetes, siendo los más representativos especies pertenecientes a los géneros *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Streptomyces* (Hawker, 1964). El 95% de los actinomicetes aislados del suelo pertenecen al género *Streptomyces*, principalmente presentes en suelos alcalinos y neutros aunque ya se han reportado actinomicetes acidófilos, cuyo pH óptimo de crecimiento es 4.5. Algunos actinomicetes se pueden encontrar en aguas frescas y pocos habitan en el océano (Brock *et al*, 1987). Miembros del género *Frankia* se encuentran presentes en el suelo, y forman asociaciones simbióticas para fijar nitrógeno atmosférico, con raíces de plantas no leguminosas (Del Tridici, 1995; Valdes, 2003).

En ecosistemas marinos encontramos la presencia de actinomicetes, esto se debe a investigaciones realizadas para encontrar microorganismos productores de compuestos antimicrobianos, anticancerígenos y antiinflamatorios. Así se ha evidenciado una fuente alternativa de dichos microorganismos con propiedades antibióticas. Los actinomicetes acuáticos difieren notablemente de los terrestres por sus capacidades metabólicas y fisiológicas, esto determina que en su proceso de adaptación al ambiente acuático, desarrollaron habilidades estratégicas que les otorgan mayores probabilidades de supervivencia, entre las cuales la producción de metabolitos bioactivos en contra de otras bacterias, hongos y otros organismos es una probabilidad cierta. Las principales especies

encontradas en ambientes acuáticos son una variedad de *Micromonospora* y *Streptomyces*, siendo 20°C la temperatura óptima para el desarrollo de estos microorganismos (Leiva *et al.*, 2004). En los sedimentos de ríos, lagos y océanos se han encontrado cepas silvestres de actinomicetes los cuales producen metabolitos secundarios farmacológicamente activos, las familias presentes en estos ecosistemas son *Micromonosporaceae* y *Streptomycetaceae*. Complementariamente se ha evidenciado la capacidad de producir diversas enzimas extracelulares de interés biotecnológico (Piñero y Rivaz, 2004).

No todos los actinomicetes son beneficiosos en el ecosistema. Algunos son patógenos, sin embargo constituyen una fracción muy pequeña en comparación al número total de actinomicetes descubiertos hasta la actualidad. Entre las especies más importantes tenemos *Streptomyces scabies*, responsable de la sarna de la papa, *Actinomyces bovis*, responsable de la actinomicosis en el ganado, *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae*, agentes de la tuberculosis y lepra respectivamente (Leveau y Bouix, 2000).

2.1.4. Actinomicetes asociados a la rizósfera y rizoplano de plantas.

El hábitat principal de los actinomicetes constituye el suelo y materia orgánica bien descompuesta. Sin embargo, es posible encontrar un gran número y diversidad asociados a las raíces de las plantas, tanto en la rizósfera como en el rizoplano. Muchos grupos de plantas han mostrado favorecer la colonización de actinomicetes en sus raíces. Sardi, *et al.* (1992), mostró que cerca del 50% de raíces de varias plantas permitió el crecimiento de actinomicetes. Las plantas usadas correspondieron a un amplio rango que incluía tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. De 499 actinomicetes aislados, el 96.5 % correspondieron a miembros del género *Streptomyces*. El número restante estuvo representado por aislamientos de los géneros *Micromonospora*, *Nocardia* y *Streptosporangium*. Resultados similares han sido obtenidos con otros géneros de plantas, en donde el mayor número de aislamientos han sido identificados como pertenecientes al género *Streptomyces* (Solans y Bovis, 2003; Khamna, *et al.*, 2009).

Las leguminosas también han mostrado ser hospederos y favorecer el crecimiento de actinomicetes. En la rizósfera y rizoplano del árbol tropical *Paraserianthes falcataria*, Sembiring *et al.* (2000) fueron capaces de aislar gran número de actinomicetes, en su mayoría del género *Streptomyces*, del grupo con esporas rugosas asociadas a *Streptomyces violaceusniger*. Seis nuevas especies fueron

identificadas y caracterizadas, demostrando la gran diversidad encontrada en la rizósfera y rizoplasma de la planta. En un caso especial, que implicaría que los hábitats favorables para los actinomicetes es aún mayor de lo que se pensaba, gran número de microbios pertenecientes al género *Micromonospora* fueron aislados de nódulos esterilizados de las especies leguminosas fréjol (*Phaseolus vulgaris*), maní (*Arachis hipogea*) y chocho (*Lupinus sp.*) (Cerdeña, M, 2008). Muchos de los aislamientos conseguidos de la rizósfera o rizoplasma han mostrado poseer vías metabólicas asociadas a la producción de metabolitos secundarios útiles, como es el caso de antibióticos o promotores del crecimiento vegetal (Solans y Bovis, 2003; El-Mehalawy *et al.*, 2004; Cerdeña, 2008; Khammna, *et al.*, 2009).

2.1.5. Aislamiento selectivo de actinomicetes.

Existen diferentes variedades de medios de cultivo en función del objetivo del análisis. Una práctica habitual en el laboratorio es utilizar en las siembras diferentes medios de cultivo y condiciones de incubación para poder poner de manifiesto el mayor número de microorganismos que sea posible. La mayoría de las especies pueden utilizar como fuente de carbono: glucosa, maltosa, almidón y sacarosa, ciertos ácidos orgánicos, glicerina y proteínas. Otros requerimientos son fósforo, potasio, magnesio, cationes y además trazas de zinc y ciertos metales pesados (Hawker, 1964).

El crecimiento de colonias de actinomicetes en medio sólido se puede ver a los 3 o 4 días de incubación, pero el desarrollo de micelio aéreo maduro con esporas puede tardar entre 7 y 14 días. Algunas cepas de crecimiento lento recién presentan características maduras hasta 1 mes de incubación. El crecimiento en medios líquidos estacionarios se restringe a la formación de una película en la superficie o quizás un sedimento algodonoso dejando el medio líquido transparente. Por ello el crecimiento en medios líquidos se debe realizar usando agitación a velocidades entre 200 a 250 rpm para suministrar la mejor aireación posible. A diferencia de las bacterias no filamentosas, los actinomicetes pueden crecer formando esferas o bolas (Franco, 2008).

Para aislar estreptomicetes se debe realizar un pretratamiento a las muestras de suelo, así se eliminan otros microbios que pueden crecer como contaminantes. Es también importante que al medio de cultivo se añadan fuentes de carbono y de nitrógeno, en cantidad suficiente para permitir un crecimiento adecuado de los estreptomicetes. Los medios de cultivo más utilizados para el aislamiento de este grupo de actinomicetes y sus géneros relacionados son medios con quitina, agar

almidón caseína y agar glicerol arginina. Todos estos medios contienen elementos como fósforo, potasio, magnesio, azufre y hierro, más una solución de sales. A estos medios se añaden antibióticos, como la ciclohexamida, el nystatin o ácido nalidixico, para eliminar hongos y bacterias gram negativas. Además otro factor importante para el crecimiento de estos microorganismos es la temperatura de incubación de alrededor de 25 °C (Williams y Wellington, 1983).

2.1.6. Aislamiento de colonias de actinomicetes del rizoplaneo de leguminosas.

Rodríguez (1996) realizó el aislamiento de actinomicetes del rizoplaneo de varias especies de leguminosas. Luego de la recolección las raíces fueron secadas a temperatura ambiente antes de colocarlas en la estufa por 14 horas a 50 °C. A partir de éstas, se prepararon diluciones para inocular 1 mililitro sobre la superficie de agar almidón caseína (10 g de almidón soluble, 0.3 g de Caseína, 2.0 g de Nitrato de potasio, 2.3 g de K₂HPO₄, 0.05 g de MgSO₄.7H₂O, 2.0 de cloruro de sodio, 0.02 g de carbonato de calcio, 0.01 g de sulfato ferroso, 0.05 g de ciclohexamida, 0.05 g de nystatin, 0.05 g de ácido nalidixico, 18 g de agar y 1000 ml de agua destilada). Luego de un periodo de incubación de 2 – 3 semanas a 28 °C, más de 100 cultivos puros de actinomicetes fueron recuperados. La técnica de dispersión y centrifugación diferencial han permitido también aislar gran número de actinomicetes del rizoplaneo y rizósfera de leguminosas (Sembiring *et al.*, 2000). Los medios de cultivo más usados son agar almidón caseína, agar rafinosa histidina y agar extracto de levadura glicerol (Rodríguez, 1996; Sembiring *et al.*, 2000; Oskay *et al.*, 2004).

2.1.7. Aislamiento de colonias de actinomicetes de la rizósfera de leguminosas.

Oskay *et al.*, 2004, tomo una muestra de suelos agrícolas recogidos en la provincia de Manisa – Turquía su objetivo fue el aislar actinomicetes productores de antibióticos. La muestra de suelo recogida fue secada a temperatura ambiente. El medio de cultivo utilizado para este procedimiento fue el agar extracto de levadura – glicerol (1 g de glicerol, 0.4 g de extracto de levadura, 0.02 g de K₂HPO₄, 5 g de peptona, 3 g de agar y 200 ml de agua destilada) complementado con nistatyn 50 µg/ml. Para iniciar el procedimiento se tomo un gramo de suelo seco en 9 ml de agua destilada mismos que se agitó vigorosamente y se precalentó a 50 °C por 30 minutos. Luego se prepararon diferentes diluciones de la suspensión las cuales fueron aplicadas en platos petri con alrededor de 20 ml del medio de cultivo. Después los platos petri fueron incubados a una temperatura de 27 °C en 14 días. Para el aislamiento y la purificación de actinomicetes se tomó colonias de los platos petri

del procedimiento anterior las cuales se inocularon a nuevos platos petri con el agar extracto de levadura – glicerol a 27 ° C por 7 días, después de este tiempo se evidenció la presencia de cultivos puros, es decir 50 cepas de actinomicetes, el medio en el que se inocularon estos actinomicetes es específico debido a que contiene glicerol y estos microorganismos lo utilizan como fuente de carbono. Los actinomicetes obtenidos fueron caracterizados morfológicamente para lo cual se utilizó un microscopio, las esporas que fueron observadas se las comparó con la morfología de las esporas de actinomicetes de estudios anteriores siendo semejantes a *Streptomyces* en su gran mayoría.

2.1.8. Producción de metabolitos secundarios.

La genómica de actinomicetes ha sido una herramienta que debido a su potencial ha favorecido el descubrimiento de enzimas, así como también las rutas metabólicas (Barona, 2007). En el metabolismo de los actinomicetes se biosintetizan dos tipos de sustancias: metabolitos primarios y secundarios. Azúcares, aminoácidos, proteínas y grasas son considerados metabolitos primarios, se caracterizan por ser indispensables en los procesos de crecimiento y supervivencia de estos microorganismos. Los metabolitos secundarios corresponden a una gran variedad de compuestos biosintetizados a partir de metabolitos primarios. Su cantidad depende de estímulos externos como son competencia, infección o limitación de nutrientes. A los metabolitos secundarios el hombre ha encontrado diferentes aplicaciones para mejorar la calidad de vida. Son utilizados como agentes antibacterianos, antifúngicos, antitumorales, antioxidantes, antiparasitarios y antivirales. Principalmente se aplican en farmacología clínica para terapia humana. También son utilizados en terapia animal y en agricultura como plaguicidas (De la Rosa & Gamboa, 2004). El género más importante en el suelo es *Streptomyces* este microorganismo es pilar fundamental en el control biológico, su importancia deriva de su alto potencial metabólico y su capacidad comprobada como antagonista de hongos fitopatógenos (Borghi, *et al.*, 1990).

Los actinomicetes constituyen una de las principales fuentes de nuevos biocompuestos para la industria farmacéutica, principalmente para la producción de antibióticos. En 1999, la empresa farmacéutica italiana Biosearch, reportó el descubrimiento de nuevos antibióticos a partir del screening de una colección de cultivos de actinomicetes bastante grande, que sobrepasa a los 20000 (Lazzarini *et al.*, 2000). También recalcaron la importancia de buscar actinomicetes perteneciente al grupo de los “genes raros”, por ser menos estudiados y por requerir condiciones de

aislamiento diferentes a las que usan miembros del genero *Streptomyces*, el actinomicete más común y abundante en el suelo. Los principales géneros de actinomicetes productores de antibióticos llegan a los sesenta y tres, donde *Streptomyces* y *Micromonospora* son los más prolíficos. Ejemplos son la rifampicina y rifamicina producidas por *Streptomyces mediterranei*, la kanamicina en *Streptomyces kanamyceticus*, la clorotetraciclina en *Streptomyces aureofaciens* y la gentamicina por *Micromonospora* (De la Rosa y Gamboa, 2004).

2.1.9. Determinación de la producción de compuestos bioactivos.

Los mecanismos de inhibición del crecimiento y desarrollo de microorganismos, especialmente patógenos, no son siempre claros, y pueden involucrar factores bióticos y/o abióticos, incluso pueden variar de acuerdo al patógeno y al microorganismo que produce la inhibición. Lo que si está claro es que la presencia de uno o varios microorganismos antagonicos, permite la producción de antibióticos, por lo que evitan que poblaciones de microorganismos patógenos alcancen niveles suficientemente altos para causar enfermedad (You *et al.*, 1996; Mutitu *et al.*, 2008; Krishnaraj & Mathivanan, 2009).

La determinación de la capacidad antagonica de los actinomicetes ocurre en varias etapas. La inicial involucra identificar aquellos que son capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos modelo, que generalmente representan a los hongos filamentosos (*Aspergillus niger*), levaduras (especies no patogénicas de *Candida*), bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) y bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*). Una vez determinado el espectro de inhibición, es posible continuar con pruebas más elaboradas para elucidar la estructura química del compuesto bioactivo, junto con otros experimentos relacionados a la posibilidad de usarlo como un producto comercial (Vinueza, 2010).

2.1.9.1. Antagonismo Microbiano.

El antagonismo es considerado como una interacción útil en el control biológico de enfermedades. Tanto hongos como bacterias han sido estudiados por su capacidad para controlar patógenos en un gran número de cultivos. El control mediante el uso de actinomicetes es una medida económica relacionada a otros métodos de control, además es duradera y no causa contaminación ni disturbios ecológicos (Castillo *et al.*, 2001).

Vinueza (2010) manifiesta que la diversidad biológica de los actinomicetes se encuentra directamente relacionada con la diversidad metabólica. La gran mayoría de los actinomicetes presentan actividad específica es decir algunos solamente actúan como bactericidas y eso facilitaría el desarrollo de un producto farmacéutico, de igual forma los actinomicetes poseen propiedades fúngicas importantes en la agricultura, esto brindaría alternativas ecológicas para el control de patógenos. El ciclo de vida de muchos hongos fitopatógenos de plantas es tal que sus poblaciones son gobernadas por una continuidad de interacciones con varios componentes de la microflora. Si un microorganismo antagónico es manipulado correctamente reducirá la incidencia de la enfermedad por un periodo de tiempo, pero la misma no presentará una detención mantenida, para lo cual se deberá utilizar una combinación de antagonistas para efectivamente inhibir un organismo durante diferentes fases de su ciclo de vida. Es improbable que un solo microorganismo sea antagonista a diferentes estructuras morfológicas de un patógeno. Cuando se busca potenciales antagonistas su eficacia no deberá estar basada solamente en la capacidad del organismo candidato para reducir síntomas de enfermedades producidas por un patógeno mayor, sino asegurar el crecimiento adecuado de una planta (Borghi *et al.*, 1999).

Suarez (2008), demostró que a partir de muestras de la rizósfera y rizoplano del trébol blanco se pueden aislar actinomicetes mismos que fueron caracterizados de acuerdo a sus características macroscópicas y microscópicas, con identificación molecular se extrajo el ADN genómico y se realizó una amplificación por PCR del gen ARNr 16S, así se evidenció la presencia del género *Streptomyces* que presenta una alto potencial microbiológico y una gran capacidad como antagonista de hongos fitopatógenos.

Las cepas de *Streptomyces* también pueden controlar patógenos radiculares de árboles forestales, como: *Fomes annosus*, *Phytophthora cinnamomi* y *Phellinus weirii*, debido a los metabolitos secundarios producidos por miembros de este género, los que inhiben el desarrollo del patógeno, al no permitir la utilización de carbohidratos que forman parte del árbol e impedir el crecimiento de sus hifas (Rose *et al.*, 1980).

2.1.9.1.1. Técnicas de Antagonismo Microbiano.

Uno de los métodos más utilizado para pruebas preliminares de antagonismo, es el de los cilindros de agar. Consiste en hacer perforaciones cilíndricas con un instrumento estéril, en varias partes de

un medio sólido sobre el cual un cultivo de actinomicetes ha estado creciendo por varios días. Luego los cilindros son colocados sobre la superficie de un medio de cultivo en el cual se haya inoculado alguno de los microorganismos modelo. Debe hacerse de tal manera que la parte del cilindro que presente el crecimiento de actinomicetes este en contacto con el medio de cultivo en el que es colocado. Luego de un periodo de incubación que varía entre 48 – 72 horas, se observa si existen zonas de inhibición, las que serán más grandes mientras mayor sea la actividad antagónica (Phillips, 1993).

Un método alternativo es el de disco. Aquí se procede de igual forma que en el método anterior, pero en lugar de perforar el agar, se depositan discos de papel saturados con el organismo a ser evaluado, sobre la superficie de un medio de cultivo inoculado con los microorganismos modelo. Después de incubar, si hay actividad, alrededor de los discos aparecerán zonas de inhibición (Phillips, 1993).

Tipos de zona de inhibición.

Phillips (1993), menciona que existen cuatro tipos diferentes de zonas de inhibición.

Zona completamente clara

La actividad microbiana provoca la muerte del microorganismo modelo mediante la producción de un fungicida o bactericida, y por lo tanto, impide el crecimiento del microorganismo.

Zona opaca

Una proporción de la población del organismo a prueba es resistente al compuesto antimicrobiano. El compuesto solamente ha reducido el crecimiento del organismo a prueba.

Zona doble, la interna clara y la externa opaca

Existe una concentración en la cual la actividad microbiana del compuesto es letal para el organismo a prueba. Más allá de esta concentración una parte de la población es resistente y el crecimiento de la población es reducido.

Zona doble, la interna opaca y la externa clara

Este caso es muy improbable, pero puede ocurrir si, luego de que se ha iniciado la difusión del compuesto activo, se liberan enzimas degradadoras desde el bloque.

Dos zonas de diferente densidad

Existen dos niveles de concentración a los cuales diferentes proporciones de la población son sensibles.

Tamaño de zona de inhibición.

El tamaño de zona es una medida de la actividad que se utiliza para jerarquizar organismos en grupos que servirá para su estudio posterior. Sin embargo, cuando se trate de interpretar los resultados, debe tomarse en cuenta que se desconoce la potencia (cantidad del compuesto se requiere para lograr un efecto microbiano), cantidad, estructura química, modo de acción, y el posible número de compuestos producido por el actinomicete (Vinueza, 2010).

Factores que influyen el tamaño de la zona.

El tamaño de la zona se ve influenciado por varios factores, siendo la concentración de esporas o células en la suspensión que contiene el microorganismo modelo, una de las más importantes. Se debe mantener una concentración constante en la suspensión para minimizar cualquier pequeña variación (Hewitt & Vincent, 1989).

Otro factor importante es la densidad del inóculo del organismo antagónico potencial, ya que un inóculo inicialmente más pesado lleva una definición más precisa de la zona, aunque también resulta en zonas más pequeñas. Intervalos de tiempo de una hora o más entre la aplicación de la solución prueba a los platos y el inicio de la incubación permite la difusión del metabolito secundario antes que la multiplicación del organismo prueba se haga apreciable. Un periodo más largo de predifusión lleva a zonas más grandes y también a gradientes más pronunciadas. Si la predifusión tiene lugar en un refrigerador se minimiza el crecimiento durante este periodo, pero también se reduce la tasa de difusión. En una sola prueba puede haber diferencias de diez a veinte minutos entre el llenado del primero y el último de los reservorios (Hewitt & Vincent, 1989).

Tener un medio más rico da como resultado un crecimiento más rápido del organismo de prueba y una gradiente menos pronunciada de la línea de respuesta. La incubación a temperaturas no

óptimas llevara al crecimiento más lento del organismo prueba y consecuentemente zonas más grandes y gradientes más pronunciadas de la línea de respuesta. Es claro que cualquiera que sea la temperatura que se escoja para la incubación, su uniformidad y la uniformidad de la tasa de temperatura de los platos es más importante que el valor absoluto de la temperatura (Hewitt & Vincent, 1989).

2.1.10. Características de los microorganismos modelo usados en pruebas de antagonismo

2.1.10.1. Bacterias.

Las bacterias son microorganismos unicelulares que se reproducen por fisión binaria, en su mayoría son de vida libre excepto algunas que son de vida intracelular obligada como es el caso de *Chlamydia*s y *Rickettsia*s. Su tamaño oscila entre 0.5 y 3 μm , aunque algunas alcanzan los 10 μm , son visibles al microscopio óptico u electrónico.

La forma de las bacterias está determinada por su pared celular y se clasifican en cocos por ser esféricos, bacilos por su similitud a unos bastones, aunque algunos bacilos pequeños se denominan cocobacilos, espirales poseen forma de S o espiral y por último pleomórficas adoptan diferentes formas su aspecto es gelatinoso (Pirez, 2010).

Las bacterias poseen una pared celular que brinda rigidez estructural constituida por peptidoglicano el mismo está formado por residuos de carbohidratos y de N-acetil glucosamina y N-acetil ácido murámico (N-Ac.G, NAc.M), unidas por enlaces beta 1-4 y asociados a cortas cadenas peptídicas a través del N-acetil ácido murámico. Además la pared celular confiere la forma a la célula y crea una barrera física contra el medio ambiente externo (Lugo, 2008).

Además las bacterias poseen los mecanismos productores de energía y el material genético necesarios para su desarrollo y crecimiento. Las bacterias forman uno de los tres dominios en los que se dividen los seres vivos. Los organismos procariotes se dividen entre los dominios establecidos por análisis filogenéticos del gen del ARNr de la subunidad pequeña de ribosoma: Dominio Bacteria y Archaea. En el caso de las bacterias, la mayoría viven en el suelo, agua y organismos vivos. Por el contrario la mayoría de las arqueas habitan en medioambientes extremos como son las fumarolas en las profundidades del mar, aguas saladas y fuentes acidas (Pirez, 2000).

Las bacterias se dividen en dos grandes grupos, gram positivas y gram negativas, la diferenciación se lleva a cabo mediante la “tinción de Gram”. Esta es una tinción diferencial que se emplea para demostrar las propiedades de la pared celular de todo tipo de bacteria. El cristal violeta es utilizado como colorante primario y se une a la pared bacteriana, luego de un tratamiento con una solución débil de yodo. En medio acuoso el cristal violeta se disocia en iones Cl^- los que penetran la pared celular y la membrana citoplasmática de las bacterias gram positivas y negativas. Posteriormente se aplica una solución con alcohol, la que deshidrata la pared celular de las bacterias gram positivas, atrapando el colorante primario en el interior. En cambio en las gram negativas, el alcohol disuelve la capa de lipopolisacáridos de la membrana externa, y los lípidos de la membrana celular, permitiendo que el colorante escape al medio y provocando la decoloración de la célula. Por ello es que las bacterias gram negativas pueden teñirse fácilmente cuando se aplica el colorante secundario (generalmente safranina). Con esta técnica las bacterias gram positivas presentaran un color púrpura en tanto que las bacterias gram negativas presentan color rojo (Naab, 2005).

2.1.10.1.1. Características de las bacterias Gram positivas

La pared celular es gruesa y el exterior posee una apariencia lisa. El 90% es peptidoglicano aunque también se encuentra formada por pequeñas cantidades de ácidos teicoicos. Estos últimos, al ser polialcoholes unidos por esteres de fosfatos, aportan carga negativa a la superficie celular, lo que facilita el paso de iones a través de la pared, a pesar que algunos de estos ácidos se unen a los lípidos de la membrana. El grosor de la capa de peptidoglicano varía entre 20 a – 80 nm por esta razón estas células poseen gran sensibilidad a la acción de la penicilina, antibiótico utilizado para infecciones causadas por bacterias gram positivas. Este tipo de bacterias poseen varias capas de peptidoglicano (Naab, 2005). Entre las bacterias más representativas de este grupo tenemos a *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Listeria* y todos los miembros pertenecientes a la clase Actinobacteria (Lugo, 2008).

2.1.10.1.2. Características de las bacterias Gram negativas:

La pared celular se encuentra dividida en tres zonas claramente identificables. La membrana plasmática, el espacio periplásmico, donde se encuentra una fina capa de peptidoglicano, y la membrana externa. Esta última es una bicapa lipídica, que difiere de otras membranas, por su capa externa constituida por lipopolisacáridos.

También esta membrana contiene fosfolípidos y proteínas que la unen al peptidoglicano.

Además la membrana externa sirve como barrera protectora y es más permeable que la membrana plasmática, permitiendo el paso de pequeñas moléculas como glucosa y otros monosacáridos. Otra función de esta membrana es evitar la entrada de sustancias tóxicas que pueden causar daño a la membrana (Pirez, 2000). Especies de los géneros *Neisseria*, *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Enterobacter*, *Helicobacter*, *Bordetella* y *Escherichia*, pertenecen a este grupo (Lugo, 2008).

2.1.10.2. Hongos Fitopatógenos.

Existen probablemente más de 1 millón y medio de especies de hongos de los cuales solamente un 10 % han sido descritos. Son eucariotes, carecen de clorofila, sus estructuras vegetativas son filamentosas, y sus estructuras reproductivas son esporas (Elango, 2005).

Se encuentran en el Dominio Eukarya, adaptándose fácilmente a distintos ambientes. Una de sus funciones principales es el reciclaje de desechos orgánicos. Compuestos tan diversos como madera, lignina, quitina, grasas, aceites, ceras, huesos, etc, son fácilmente descompuestos por hongos. Compuestos orgánicos son usados como nutrientes, los mismos que son obtenidos por absorción. Su crecimiento se da entre 0 y 55 °C (Peña *et al* ,1998).

Son agentes causales de varias enfermedades en las plantas, provocando pérdidas en la producción de frutas y hortalizas, que son productos perecederos, susceptibles al ataque de microorganismos antes o después de la cosecha y durante su almacenamiento. Además son capaces de producir sustancias, como resultado de su metabolismo secundario, como las micotoxinas, que se distribuyen con facilidad en el sustrato y pueden llegar a ser perjudiciales, aun cuando se encuentran en concentraciones muy bajas, poniendo en entredicho su inocuidad. Se ha determinado que un 25 % de las cosechas de alimentos a nivel mundial están contaminadas con algún tipo de micotoxinas, lo cual representa un fuerte riesgo para la salud de la población de países importadores de alimentos que no controlan estos contaminantes (Ramírez, *et al*, 2008).

2.1.10.2.1. Botrytis.

Produce abundante micelio gris y varios conidióforos largos y ramificados. Sus células apicales redondeadas producen ramos de conidios ovoides, unicelulares en algunos casos son incoloros o

grises. Cuando el clima es húmedo libera fácilmente sus conidios los mismos que luego son diseminados por el viento. A menudo el hongo produce esclerocios cuyas formas son irregulares, planos, duros y de color negro. *Botrytis* requiere de una temperatura de 18 a 23 °C para que se desarrolle, esporule, libere y germinen sus esporas, aunque a temperaturas de 0 a 10 °C puede desarrollarse y demostrar actividad infecciosa.

Botrytis es el causante de las pudriciones grises de frutos y hortalizas, que suceden no solo cuando están siendo cultivados sino también al ser almacenados. En este último caso, no hay fruto fresco, hortaliza, bulbo u otro órgano que no sea atacado por dicho hongo. Bajo condiciones de humedad se desarrolla una capa de hongos, aterciopelada, granular y de color grisáceo o gris parduzco sobre el área de las superficies putrefactas, logrando desarrollarse y continuar su ciclo infeccioso (Agrios, 1991).

2.1.10.2.2. *Fusarium*.

Organismo de tipo saprófito que habita en el suelo o en restos de plantas. La forma y tamaño de sus esporas es su característica principal ya que se encuentran dispersas en el micelio aéreo. Las colonias de *Fusarium* presentan una diversidad de colores como blanco, rosa pálido, rojo anaranjado, púrpura, celeste, verde aceituna o pardo especialmente en el reverso de la colonia. Su micelio no es común posee una forma algodonosa, los pigmentos que se difunden en el agar suelen variar de color con el pH. Su temperatura de desarrollo se encuentra en un rango de 18 a 25 °C (Carrillo, 2003). A temperaturas bajas *Fusarium* deja de ser menos dañino.

Este hongo fitopatógeno es el causante de la pudrición café de las naranjas y limones que se mantienen almacenados durante mucho tiempo. En hortalizas y plantas de ornato origina los “hongos amarillos o rosados” especialmente en cultivos de raíces, tubérculos y bulbos. Plantas como las cucurbitáceas y de solanáceas también son afectadas. La contaminación puede producirse en el campo, antes durante la cosecha o en el almacenamiento de las mismas. Las pérdidas son considerables en el caso de cultivos de papa que son almacenados durante largos periodos. Los tejidos afectados por *Fusarium* presentan una apariencia ligeramente húmeda y muestran un color café claro, más tarde adquieren un color café oscuro y se secan un poco, al extenderse las áreas putrefactas las mismas se hunden, arrugándose la cascara del fruto y sobre la misma aparece una masa de moho de color blanco, rosa o amarillo. *Fusarium oxysporum* genera la pudrición de raíces,

tallos inferiores, coronas, cormos, bulbos, tubérculos, etc. Además causa la marchitez del tomate, plátano, camote entre otros (Agrios, 1991).

2.1.10.2.3. *Rhizoctonia*.

Es un hongo del suelo, produce micelio estéril ya que no todas las especies son capaces de producir esporas, ya sean de origen sexual o asexual. Su micelio al inicio es incoloro pero al madurar se torna amarillo o de color café claro. Además consta de células largas y produce ramificaciones que crecen en ángulo recto con respecto a la hifa principal. Comúnmente las características de la ramificación son los únicos medios disponibles para identificar a *Rhizoctonia*. Su temperatura óptima para que se produzca la infección es de 15 a 18 °C, aunque algunas especies de este hongo muestran una mayor actividad a temperaturas más altas es decir de 35 °C.

Este hongo fitopatógeno presenta enfermedades graves en muchos hospederos como el ahogamiento, la pudrición y la cancrrosis que afectan raíces, tallos, tubérculos y otros órganos de las plantas. *Rhizoctonia* en algunos hospederos causa también la pudrición de los órganos vegetales almacenados, así como tizones o manchas del follaje. En los pastos finos y en los prados produce la “mancha café” enfermedad conocida por su particularidad de presentarse severa en periodos de tiempo húmedo o cálido húmedo lo cual hace que las hojas del pasto al inicio se ennegrezcan y aparezcan húmedas. Con el tiempo se secan se marchitan y adquieren un color café claro. En la papa, *Rhizoctonia* causa síntomas conocidos como “costra negra” ya que aparecen pequeños esclerocios negros y endurecidos sobre la superficie del tubérculo, los que no se desprenden fácilmente mediante lavado. Estas costras se asemejan a la sarna común de la papa. Por otro lado *Rhizoctonia crocorum* ataca solo a los órganos subterráneos de muchas hortalizas y plantas de ornato. Las partes enfermas presentan una coloración violeta o roja debido al color purpura del micelio superficial del hongo, el mismo contiene muchos cuerpos de color obscuro y muy unidos asemejándose a esclerocios (Agrios, 1991).

2.1.11. Fundamentos de taxonomía numérica microbiana

La taxonomía es la ciencia de la clasificación constituida por dos sub disciplinas principales, la identificación y la nomenclatura. La taxonomía se basa en análisis fenotípicos para la clasificación, pero debido al pequeño tamaño de las bacterias y a su estructura, aporta relativamente poca información sobre sus raíces evolutivas. En microbiología la unidad taxonómica básica es la especie,

una especie procariote puede definirse de manera precisa a partir de las secuencias de ARNr, si dos procariotes cuyo ARNr 16S tenga un 97% o más de secuencias idénticas es muy probable que pertenezcan a la misma especie. Los géneros se agrupan en familias, las familias en órdenes, y los órdenes en divisiones hasta alcanzar el nivel taxonómico más alto que es el dominio. En taxonomía microbiana a los caracteres morfológicos se les puede añadir criterios bioquímicos, químicos y genéticos (Stanier *et al.*, 1996).

Con el objetivo de evaluar objetivamente la similaridad entre microorganismos es necesario establecer coeficientes numéricos que expresan los grados de proximidad entre las distintas unidades taxonómicas, estas unidades se denominan OTUs, o unidades operativas taxonómicas que pueden establecer coeficientes de similaridad o distancia. Los métodos numéricos son procedimientos matemáticos que permiten cuantificar el parecido entre unidades taxonómicas, tomando en cuenta los niveles de los caracteres observados. El más utilizado es el SSM, que es el coeficiente de concordancia simple, que se define como la proporción de características que coinciden entre dos OTUs. Este método se utiliza para variables cualitativas. Este índice toma valores de 0 o 1 indistintamente, donde cero significa ningún patrón en común y uno significa patrones idénticos (Stanier *et al.*, 1996).

Su fórmula es la siguiente:

$$SSM(x_1 - x_2) = \frac{a + d}{a + b + c + d}$$

Dónde:

$x_1 - x_2$ = Son las dos especies comparadas.

a= Número de características donde tanto x_1 como x_2 se ha encontrado.

b= Número de características donde x_1 se ha encontrado pero x_2 no.

c= Número de características donde x_2 se ha encontrado pero x_1 no

d= Número de características donde x_1 y x_2 no se ha encontrado.

2.2. Fundamentación Filosófica.

En esta investigación se considerará el paradigma positivista ya que este se rige por las leyes que permiten explicar, predecir y controlar los fenómenos del mundo natural y pueden ser descubiertas y descritas por los investigadores con métodos adecuados; además el objetivo que se obtiene se considera objetivo y factual, ya que se basa en la experiencia y es válido para todos los tiempos y lugares, con independencia de quien lo descubre. Y se utiliza la vía hipotético-deductiva como lógica metodológica válida.

El presente estudio surge como una oportunidad para determinar las capacidades que poseen los actinomicetes, organismos aptos para la producción de metabolitos secundarios los mismos que son efectivos para combatir las enfermedades causadas en áreas como la agrícola, médica y veterinaria. Para este caso el estudio se centra en el área agrícola, misma que ha sido afectada por la intervención de enfermedades y plagas causadas en su gran mayoría por Hongos Fitopatógenos y bacterias, los cuales generan grandes pérdidas en los cultivos. Cabe indicar que ha dichos organismos fitopatógenos se los controla de forma química con el uso de pesticidas o insecticidas los mismos que causan problemas medio ambientales, por esta razón los datos arrojados en la presente investigación brindarán alternativas orgánicas para evitar el uso de químicos y favorecer a la conservación de nuestro planeta.

2.3. Fundamentación Legal.

Basándonos en la Constitución de la República del Ecuador a continuación cito textualmente 3 artículos relacionados a la presente investigación:

Art.25.- Las personas tienen derecho a gozar de los beneficios y aplicaciones del progreso científico y de los saberes ancestrales.

Art.385.- El sistema nacional de ciencia, tecnología, innovación y saberes ancestrales, en el marco del respeto al ambiente, la naturaleza, la vida, las culturas y la soberanía tendrán como finalidad:

Generar, adaptar y difundir conocimientos científicos y tecnológicos.

Recuperar, fortalecer y potenciar los saberes ancestrales.

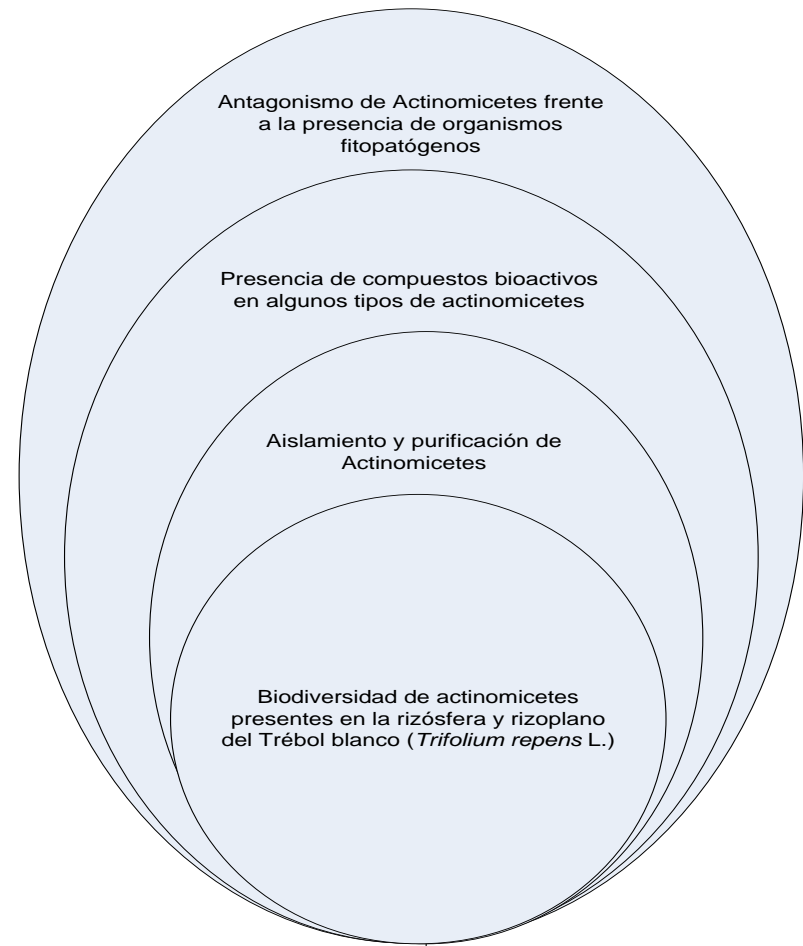
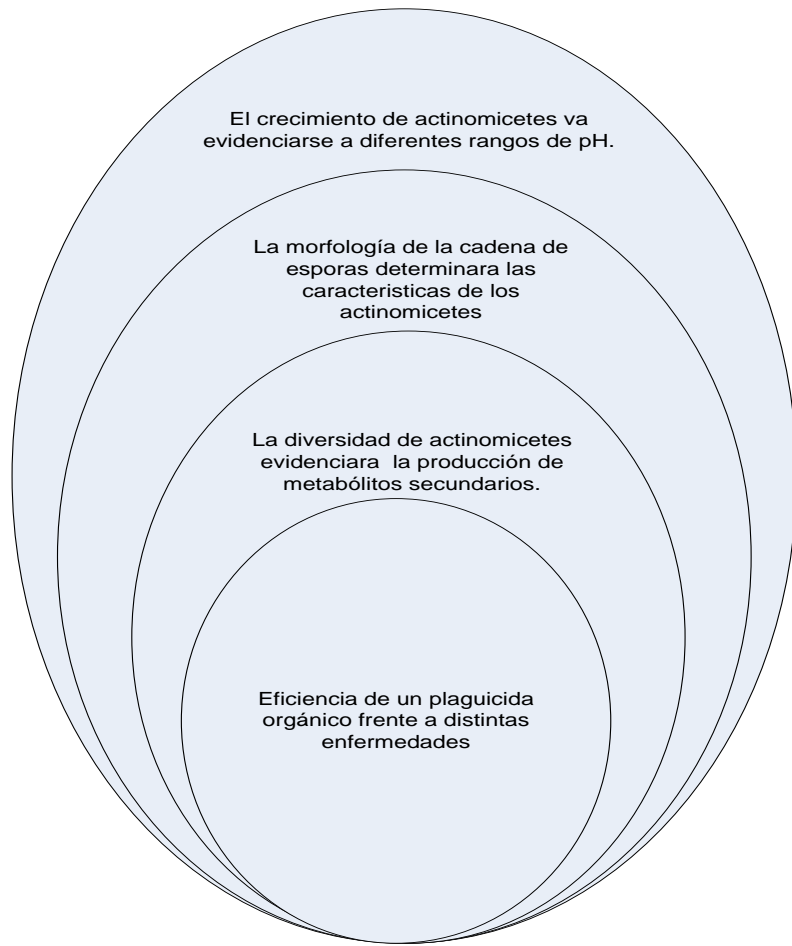
Desarrollar tecnologías e innovaciones que impulsen la producción nacional, eleven la eficiencia y productividad, mejoren la calidad de vida y contribuyan a la realización del buen vivir.

Art.387.- Sera responsabilidad del estado:

Garantizar la libertad de creación e investigación en el marco del respeto a la ética, la naturaleza, el ambiente, y el rescate de los conocimientos ancestrales.

2.4. Categorías fundamentales.

Página siguiente.



2.4.1. Variable Independiente



2.4.2. Variable Dependiente

2.5. Hipótesis.

2.5.1 Hipótesis Nula (H_0).

En la rizósfera y rizoplano del Trébol blanco (*Trifolium repens* L.) no existe una gran biodiversidad de actinomicetes productores de compuestos bioactivos útiles en biotecnología.

2.5.2 Hipótesis Alternante (H_1).

En la rizósfera y rizoplano del Trébol blanco (*Trifolium repens* L.) existe una gran biodiversidad de actinomicetes productores de compuestos bioactivos útiles en biotecnología.

2.6 Señalamiento de variables de la hipótesis.

Número de ufc de actinomicetes por gramo de suelo seco de la rizósfera.

Número de ufc de actinomicetes por gramo de raíz del rizoplano.

Número de colonias diferentes.

Porcentaje de actinomicetes.

Caracterización macroscópica y microscópica de los aislamientos.

Producción de compuestos bioactivos.

Características fenotípicas

METODOLOGIA

3.1. Enfoque.

La presente investigación tiene un enfoque predominante cuantitativo.

3.2. Modalidad básica de la investigación.

Experimental.

3.3. Nivel o tipo de investigación

Básica exploratoria.

3.4. Población y muestra.

Se usaron muestras individuales de suelo de la rizósfera y rizoplano del trébol blanco (*Trifolium repens* L.), de la colección de suelos del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, de la Universidad Técnica de Ambato. La muestra de suelo fue homogenizada mediante el uso de un mortero y pistilo, esterilizado con alcohol al 70 %. La muestra homogenizada fue almacenada en frascos estériles, hasta su utilización. Las muestras de las raíces fueron limpiadas con agua estéril, secadas, y colocadas en una funda de papel. Estas fueron dejadas en una estufa a una temperatura de 50 °C por 14 horas. Transcurrido este tiempo las raíces fueron cortadas en pedazos pequeños.

3.5. Operacionalización de variables

Página siguiente.

3.5 Operacionalización de variables

HIPOTESIS	VARIABLE	CONCEPTO	INDICADORES	INDICES	INSTRUMENTOS
La rizósfera y rizoplano del Trébol blanco no presenta biodiversidad de actinomicetes productores de compuestos bioactivos útiles en biotecnología.	Dependiente	Biodiversidad de actinomicetes presentes en rizósfera y rizoplano del Trébol blanco.	Población microbiana	Número de ufc/g	Calculadora
	Independientes	Características fenotípicas como producto de la expresión visible de los genes de cada individuo.	Características macroscópicas	Coloración del micelio del sustrato, esporas y cualquier producción de pigmento difusible	Microsoft Excel.
				Presencia o ausencia de micelio aéreo. Evaluación por código binario. Presencia =1. Ausencia = 0	Microsoft Excel.
			Características microscópicas	Tipo de morfología de las cadenas de esporas (Tabla 1).	Microscopio
			Características fisiológicas de crecimiento a diferentes rangos de temperatura y pH	Presencia o ausencia de crecimiento. Evaluación por código binario. Presencia =1. Ausencia = 0	
	Producción de compuestos bioactivos.	Antagonismo		Halo de inhibición en mm	

3.6. Recolección de información.

3.6.1 Caracterización Físico – Química de las muestras de suelo.

3.6.1.1. Determinación del pH.

Se colocaron 5 gramos de suelo en un vaso de precipitación y se añadió agua destilada hasta obtener una película de aproximadamente 1 cm de altura sobre el suelo. La suspensión se agitó por varios minutos y posteriormente se dejó reposar durante media hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, utilizando un pHmetro calibrado, y sin agitar la muestra, se tomaron cinco lecturas de pH, con las cuales se realizó el promedio y se obtuvo el valor final.

Determinación de la humedad.

Para la determinación de humedad, se pesó una cápsula de porcelana previamente esterilizada con alcohol (P_1). Utilizando las muestras homogeneizadas, se colocó una cierta cantidad de suelo en la cápsula (P_2), y se llevó a la estufa a 105°C por 24 horas. Para obtener el peso de la muestra de suelo tomada (P_3) se utilizó la siguiente expresión:

$$P_3 = P_2 - P_1$$

Una vez transcurrido el tiempo establecido se sacó la muestra de la estufa y se dejó enfriar al ambiente por unos minutos hasta obtener una temperatura uniforme.

Se pesó nuevamente la cápsula (P_4) y para obtener el valor del peso seco de la muestra (P_5), se realizó la siguiente operación:

$$P_5 = P_4 - P_1$$

Para calcular el porcentaje de humedad, utilizaremos la siguiente fórmula:

$$\%humedad = 100 - \left(\frac{P_5}{P_3} \times 100 \right)$$

Determinación del porcentaje de materia orgánica.

El envase obtenido en el paso anterior se llevó a la mufla a 400°C por dos horas. Una vez transcurrido este tiempo se sacó la muestra de la mufla y se dejó al ambiente hasta que se estableciera la temperatura y se volvió a pesar (P_6). Para obtener el valor del peso del suelo luego del tratamiento en la mufla, es decir sin materia orgánica (P_7), se realizó la siguiente operación:

$$P_7 = P_6 - P_1$$

Para conocer el peso de la materia orgánica (P_8) se utilizó la siguiente operación:

$$P_8 = P_5 - P_7$$

Para calcular el porcentaje de la materia orgánica, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%materia\ orgánica = \left(\frac{P_8}{P_7} \times 100 \right)$$

Aislamiento Selectivo de actinomicetes.

3.6.2.1. Determinación de la Población y Diversidad de actinomicetes.

En botellas con tapa rosca se colocaron 45 ml de agua de la llave estéril junto con aproximadamente 20 esferas de vidrio y se llevó a esterilización a 121°C por 20 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se dejó enfriar las botellas hasta una temperatura de 45°C. Posteriormente se pesaron 5 g de cada muestra compuesta tanto de suelo de rizósfera y la de raíces de rizoplaneo se añadieron a las botellas con agua de llave estéril (dilución 1/10), entonces las suspensiones fueron agitadas por 45 minutos. Una vez transcurrido éste tiempo se preparó la dilución 1/10². La suspensión de suelo fue colocada en un baño maría a 55°C por 6 minutos. A partir de esta se prepararon las diluciones 1/10³ y 1/10⁴. De la muestra de la rizósfera, cien microlitros (100µl) de las diluciones 1/10², 1/10³ y 1/10⁴, fueron colocados y extendidos por duplicado, sobre la superficie de cajas petri que contenían agar glucosa extracto de levadura extracto de malta (agar GYM, Anexo D). La muestra de rizoplaneo no fue colocada en baño maría, y se inoculó 100 µl de las diluciones 1/10 y 1/100. El medio de aislamiento fue suplementado con nystatin a una concentración de 75 µg/ml, y con rifampicina (5 µg/ml). Las inoculaciones se hicieron por duplicado, en cajas de GYM ajustadas a pH 5.5, y 8.5. Las cajas inoculadas fueron incubadas a 26°C por dos semanas. Luego de la incubación se procedió a contar el número total de colonias y el número de colonias diferentes de actinomicetes.

El número de ufc por gramo de suelo o raíz fue calculado para aquella dilución en la que el número de colonias se encuentren en un rango entre 30 hasta 300, usando la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/ g suelo} = \frac{N \times \text{FD} \times V_t}{V_i \times S}$$

Donde:

N= Número de colonias

FD= Dilución en la cual se contó N (Ej: conteo realizado en la dilución 1/10³, FD= 1x10³)

V_t= Volumen de la dilución 1/10, en mililitros

V_i= Volumen inoculado en mililitros

S= Cantidad de suelo seco o raíces utilizada para preparar la dilución 1/10

Determinación del porcentaje de actinomicetes.

Para determinar el porcentaje de actinomicetes se procedió a dividir el número de colonias de actinomicetes para el número total de colonias presentes en el plato y este resultado fue multiplicado por cien para obtener el porcentaje.

$$\% \text{ actinomicetes} = \frac{N \text{ total actinomicetes}}{N \text{ \#total bacterias}} * 100\%$$

3.6.3. Aislamiento y purificación de actinomicetes.

Los platos que presentaron crecimiento visible y diversidad de colonias de actinomicetes fueron escogidos para proceder con el aislamiento y purificación de las cepas. Con la ayuda de un palillo estéril se tomó parte de una colonia o micelio con esporas, para inocular mediante estría simple en platos tetrapetri que contenían agar GYM ajustado a pH 5.5 y 8.5. Los platos fueron incubados a 26°C por dos semanas. Aquellos cultivos que se encontraron puros fueron replicados en estría compuesta en nuevos platos petri con agar GYM. Todos los cultivos contaminados fueron replicados hasta obtener cultivo puro.

Almacenamiento y conservación de los cultivos puros de actinomicetes.

En primer lugar se prepararon suspensiones de esporas. Para ello, se usó un palillo de dientes estéril para raspar la superficie de las colonias con abundante crecimiento. El material obtenido fue transferido a un tubo que contenía 750 µl de agua de llave estéril. Las suspensiones de esporas fueron almacenadas en refrigeración a 4°C, hasta su posterior uso durante la realización de pruebas de taxonomía numérica.

La conservación a largo plazo de los actinomicetes aislados fueron realizada mediante la transferencia de material de cada colonia hacia un criovial que contenía 1 ml de glicerol al 20% (v/v). Los tubos preparados fueron almacenados en un congelador a - 20°C.

Caracterización macroscópica de los aislamientos.

Los cultivos puros obtenidos se agruparon de acuerdo a la coloración y morfología de las colonias. Para la determinación del color del micelio del sustrato, micelio aéreo y pigmento difusible se utilizó una tabla de colores (British Standard Specification for colours for identification, coding and special purposes, Anexo G), estableciéndose grupos de color mediante la determinación de similitud de pigmentaciones.

Caracterización microscópica.

Los microorganismos aislados fueron usados para preparar muestras que se observaron bajo el microscopio. Se determinó la morfología del micelio aéreo de acuerdo a las características que se muestran en la Tabla 1.

Página siguiente.

Tabla 1. Características de los diferentes tipos de morfología de las cadenas de esporas.

SIMBOLOGIA	FORMA	DESCRIPCION
S	Espiral	Cadenas de esporas formando espirales abiertas o cerradas en el micelio aéreo
R	Rectas	Cadenas de esporas rectas, cortas o largas.
RA	Incompletas	Cadenas de esporas en forma de ganchos, espirales incompletas, u onduladas.
E	Esporangios	Estructuras en forma de saco o bolsa que contiene en su interior esporas.
M	Esporas simples	Esporas individuales aparecen en las hifas del micelio aéreo.

3.6.6. Determinación de la actividad antimicrobiana.

3.6.6.1. Preparación de los platos con los microorganismos modelo.

Inicialmente, cultivos de los hongos fitopatógenos *Botrytis*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* y de dos bacterias, una gram positiva y la otra gram negativa, fueron inoculados en agar papa dextrosa (PDA, hongos) y agar nutritivo (AN, bacterias). En el caso de los hongos, los microorganismos fueron incubados a 28°C por 4 días. Una vez obtenido crecimiento visible se procedió a preparar los platos siguiendo la técnica detallada por Phillips (1994) y descrita a detalle por Vinueza (2010).

La primera etapa consistió en preparar suspensiones con las estructuras reproductivas de los hongos y bacterias. Para cada microorganismo, se raspó la superficie del medio de cultivo, para así transferir ya sea esporas o células, a un tubo de ensayo con 9 ml de solución salina estéril. Con la ayuda de un hemocitómetro, en el caso de hongos, y una placa para conteo de bacterias (Petroff – Hausser chamber), se determinó la concentración inicial de cada uno de los microorganismos en las suspensiones. Posteriormente, con estos valores se calculó el volumen de inóculo necesario para

obtener concentraciones finales de 1×10^5 células/ml para las bacterias, y 1×10^3 esporas/ml para los hongos fitopatógenos.

Preparación de los cultivos de actinomicetes.

Se tomaron representantes de los grupos-especie obtenidos al establecerse los grupos de color (caracterización macroscópica). Los microorganismos seleccionados fueron usados para determinar la capacidad de cada uno de uno para producir compuestos bioactivos de interés en Biotecnología. Los actinomicetes fueron crecidos en agar GYM, hasta que el crecimiento cubrió por completo la superficie del medio de cultivo. Los platos fueron incubados a 28°C por 10 a 15 días.

Instalación del experimento para determinar la capacidad antagónica.

Utilizando un sacabocados de 6mm de diámetro, se extrajeron bloques cilíndricos de parte del micelio de cada cultivo de actinomicete. La profundidad del medio donde se extrajeron los bloques fue el mismo en todos los casos. Luego se depositaron 4 bloques pertenecientes a cuatro actinomicetes diferentes, sobre la superficie de los platos de cultivo con los microorganismos modelo, colocando parte del crecimiento del actinomicete en contacto con el medio, para así permitir una difusión más rápida de los metabolitos producidos. Además se prepararon platos en los que se colocaron círculos de papel con nystatin ($75 \mu\text{g/ml}$) y rifampicina ($3.33 \mu\text{g/ml}$), como control experimental para los ensayos de hongos y bacterias, respectivamente. Los platos preparados fueron incubados a 26°C por 7 días, y los perfiles de actividad biológica se determinaron midiendo los diámetros, tanto polar como ecuatorial, de las zonas de inhibición, en milímetros, de aquellos actinomicetes que mostraron actividad antimicrobiana.

Pruebas Fenotípicas de actinomicetes Productores de Metabolitos.

Aquellos actinomicetes que presentaron actividad antimicrobiana fueron caracterizados en función de pruebas fisiológicas y metabólicas que se describen a continuación.

Rango de crecimiento en Función de la Temperatura.

Se inocularon $5 \mu\text{l}$ de las suspensiones de esporas previamente preparadas, sobre la superficie de agar GYM. Los platos inoculados fueron incubados a una temperatura de 50°C , 37°C y 4°C durante 2, 4 y 5 días. Transcurrido el tiempo de incubación se observó el crecimiento de los actinomicetes y se evaluó mediante código binario. Si el actinomicete presentó crecimiento, se asignó 1, en caso

contrario, es decir ausencia de crecimiento, 0. Un actinomicete fue considerado como mesófilo, si su rango de crecimiento fue entre 4 hasta 37°C. Los termófilos crecieron entre 28 hasta 50°C.

Rango de crecimiento en Función del pH.

Se inocularon 5 µl de las suspensiones de esporas en la superficie de agar GYM, ajustado a los pH 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5 y 9.5. El pH fue ajustado con la ayuda de sistemas de búferes para así evitar cambios en el pH debido al metabolismo de los microorganismos. Las cajas se incubaron a 26°C, durante 7 días. Transcurrido el tiempo de incubación se observó el crecimiento de los actinomicetes y se evaluó mediante código binario. Si el actinomicete presentó crecimiento, se asignó 1, en caso contrario, es decir ausencia de crecimiento, 0. Un actinomicete fue considerado como acidófilico si su rango de crecimiento esta entre 3.5 hasta 6.5, neutrotolerante si creció entre 4.5 hasta 7.5, y alcalitolerante para todos aquellos que crecieron sobre pH 7.5.

Perfil metabólico de uso de carbohidratos.

Se determinó la capacidad de producción de enzimas hidrolíticas para la utilización de ciertos carbohidratos. Se utilizó almidón, celulosa y quitina. Para la preparación de medio de cultivo se utilizó los polisacáridos mencionados anteriormente, los que fueron añadidos a agar GYM, a una concentración final de 1% (p/v) de cada uno de ellos. Sobre la superficie del medio estéril se inocularon 5 µl de las suspensiones de esporas. Las cajas se incubaron durante 7 días a 26°C. Posteriormente se cubrió la superficie de la caja con lugol para observar la producción de halo, indicativo de la transformación del polisacárido en mono o disacárido. La evaluación en código binario fue reportada de la siguiente manera, si el actinomicete presentó halo, se asignó 1, en caso contrario, es decir, ausencia de halo, 0.

Aminoácidos como fuentes de carbono y energía.

Se determinó la capacidad de utilización de distintos aminoácidos como fuentes de carbono y energía por los microorganismos. Se utilizaron los aminoácidos: ácido aspártico y glicina. Para la preparación del medio de cultivo se utilizó un medio basal (Anexo D). Sobre la superficie del medio se inocularon 5 µl de las suspensiones de esporas. Las cajas se incubaron durante siete días a 26°C. Posteriormente, se evaluaron las cajas tomando en cuenta la presencia o ausencia de

crecimiento. Al actinomicete o bacteria que presento crecimiento, se asignó 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0.

3.8. Procesamiento y análisis.

3.8.1. Población y diversidad de actinomicetes.

Con los números de ufc/g de muestra, con los datos de diversidad y porcentaje de colonias de actinomicetes, se procedió a realizar un análisis de varianza para establecer si existen diferencias significativas, en cuyo caso se procedió a realizar la separación de medias mediante la prueba de Tukey al 5% de significancia.

Tratamientos

Se estudiaron el origen de la muestra y el ph del medio de cultivo (Tabla 2). De igual forma se estableció 4 tratamientos, producto de la combinación de los dos factores en estudio (Tabla 3).

Tabla 2. Factores en estudio

Factor A: Origen de la muestra	
a0	Rizósfera de trébol
a1	Rizoplano de trébol
Factor B: pH del medio de cultivo	
b0	5.5
b1	8.5

Elaborado por Ricardo Caicedo, 2011

Tabla 3. Tratamientos en estudio

Tratamientos	Combinaciones	Factor A:	Factor B:
		Origen de la muestra	pH del medio de cultivo
T1	a0b0	Rizósfera de trébol	5.5
T2	a0b1	Rizósfera de trébol	8.5
T3	a1b0	Rizoplano de trébol	5.5
T4	a1b1	Rizoplano de trébol	8.5

Elaborado por Ricardo Caicedo, 2011

Diseño Experimental

Se implementó un diseño al azar con 2 repeticiones. Además, se realizó un análisis de varianza para la población de actinomicetes (ufc/g), porcentaje y diversidad de actinomicetes. En caso de encontrar diferencias significativas entre los tratamientos se procedió a separar las medias mediante la prueba de Tukey al 5% de significancia. El esquema del análisis de varianza se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Esquema del análisis de varianza.

Fuentes de variación	Grados de libertad
Factor A	$(a - 1)$
Factor B	$(b - 1)$
AB	$(a - 1)(b - 1)$
Error	$ab \times (r-1)$
Total	$(r \times t) - 1$

Elaborado por Ricardo Caicedo, 2011

3.7.3. Formación de grupos de color.

Los datos de color de la parte aérea, reverso de la colonia y pigmento difusible fueron usados para agrupar a todos los cultivos similares en los denominados grupos de color.

3.7.4. Determinación de la actividad antimicrobiana.

Los diámetros de las zonas de inhibición fueron usados para analizar los datos mediante análisis de varianza. En caso de existir diferencias significativas se procedió a realizar la separación de medias mediante la Prueba de Tukey al 5% de significancia.

3.7.5. Taxonomía numérica de datos fenotípicos.

Con los resultados de las pruebas fenotípicas se elaboró una base de datos, en código binario, con el número de pruebas o características estudiadas. Las codificaciones respectivas para los datos obtenidos de actinomicetes se encuentran reportadas en la Tabla 5, respectivamente. La información fue procesada en el software estadístico NTSys, en el que primeramente se calcularon los porcentajes de similitud entre los actinomicetes estudiados, usando el coeficiente de simple coincidencia (S_{SM}). Finalmente los porcentajes fueron utilizados para construir un dendrograma mediante el uso del algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) del mismo programa. Una vez obtenido éste gráfico, se identificó los grupos especie basados en un coeficiente de similitud mayor al 90.

Tabla 5. Codificación de la información para las pruebas de taxonomía numérica de datos fenotípicos para los actinomicetes.

Número de prueba	Prueba	Descripción	Código Matriz
1		4 °C	4 °C
2	Temperatura de crecimiento	28 °C	28°C
3		37 °C	37 °C
4		50 °C	50 °C

Elaborado por Ricardo Caicedo, 2011

Tabla 5. Continuación.

Número de prueba	Prueba	Descripción	Código Matriz
5		4.5	4.5
6		5.5	5.5
7		6.5	6.5
8	Crecimiento en diferentes pH	7.5	7.5
9		8.5	8.5
10		9.5	9.5
11		Almidón	Alm
12	Producción de enzimas	Quitina	Qui
13		Celúlosa	Cel
14	Aminoácidos como única fuente de C y N	Ácido aspártico	Asp
15		Glicina	Gli
16		<i>Rhizoctonia</i>	Rhi
17		<i>Botrytis</i>	Bot
18	Producción de antibióticos	<i>Fusarium</i>	Fus
19		<i>Gram +</i>	G+
20		<i>Gram -</i>	G-

Elaborado por Ricardo Caicedo, 2011

Tabla 5. Continuación.

Número de prueba	Prueba	Descripción	Código Matriz
21		627 Light aircraftgrey	ALai
22		389 Camouflage beige	ACfg
23	Color del micelio aéreo	694 Dove grey	ADg
24		White	AWhi
25		365 Vellum	Avel
26		677 Darkweather work grey	ADwg
27		388 Beige	SBei
28		358 Light buff	SLbu
29		367 Manilla	SMan
30		320(410) Light brown	SLbr
31		384 Light straw	SLst
32		541 Maroon	SMar
33	Color del micelio del sustrato	542 Ruby	SRub
34		361 Light stone	SLst
35		White	SWhi
36		677 Darkweather work grey	SDwg
37		106 Royal Blue	SRbl
38		414 Golden Brown	SGbr

Tabla 5. Continuación.

Número de prueba	Prueba	Descripción	Código Matriz
39		106 Royal blue	PRbl
40		361 Light stone	PLst
41	Color del pigmento difusible	105 Oxford Blue	PObl
42		320(410) Lightbrown	PLbr
43		Golden Brown	PGBr
44	Morfología de la cadena de esporas	Cadenas rectas	R
45		Cadenas incompletas	RA
46		Esporas individuales	S

Elaborado por Ricardo Caicedo, 2011

CAPITULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1. Análisis de los Resultados

4.1.1. Caracterización Físico – Química de las muestras de suelo.

En la Tabla A1 (Anexo A), se muestran los valores de pH, porcentaje de humedad y porcentaje de materia orgánica, del suelo de la rizósfera de trébol blanco.

Aislamiento selectivo de actinomicetes.

Determinación de la población y diversidad de actinomicetes en la rizósfera y rizoplano de trébol blanco.

Los resultados del conteo del número de colonias de bacterias, actinomicetes y colonias diferentes de actinomicetes se muestran en las Tablas A2, A3 y A4 (Anexo A). La Tabla A5 presenta el número de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco.

El análisis de varianza del número de ufc/g de suelo seco de actinomicetes se presenta en la Tabla B1 (Anexo B). El mismo reveló la existencia de diferencias altamente significativas para el factor A, factor B y la interacción AB. La separación de medias para el factor A (origen de la muestra), mostró que el mayor valor de ufc/g de suelo seco se obtuvo a partir de las muestras de la rizósfera (a_0 ; 5.19×10^7 ufc/g) que del rizoplano (a_1 ; 4.63×10^3 ufc/g). En lo que respecta al factor B (pH del medio), se logro recuperar un mayor número de actinomicetes en pH 8.5 (b_1 ; 3.62×10^7), que a pH 5.5 (1.57×10^7). En lo que respecta a la interacción AB, la separación de medias mediante la prueba de Tukey al 5% de significancia (Tabla B2, Anexo B), ubicó al tratamiento a_0b_1 (rizósfera + pH8.5) en el primer nivel, con 7.23×10^7 ufc/g, mientras que la población más baja fue encontrada para el tratamiento a_1b_1 (rizoplano + pH 8.5). El coeficiente de variación de éste experimento fue del 26.6%.

En lo que respecta a la diversidad de colonias de actinomicetes, el análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas solamente para el Factor A. Para el Factor B y la interacción AB no se encontraron diferencias estadísticas. La separación de medias para el factor A, mostró que la

mayor diversidad (a0; 18) que del rizoplano (a1; 3). En lo referente al pH del medio (Factor B), mayor diversidad se encontró a pH 8.5 (a1; 11 colonias diferentes), que a pH 5.5 (a0; 10 colonias diferentes), lo que comprueba los análisis estadísticos que afirman que no existen diferencias estadísticas significativas. Lo mismo se encontró para la interacción AB, aunque es importante resaltar que a pesar de no existir diferencias estadísticas, la diferencia matemática entre las medias de los tratamientos es larga. Por ejemplo, la mayor diversidad se encontró en el tratamiento a0b1 (rizósfera + pH 8.5; 18 colonias diferentes), y el valor más bajo en el tratamiento a1b0 (rizoplano + pH 5.5; 3 colonias diferentes). El coeficiente de variación fue del 31.4%.

No se incluyeron los datos de las poblaciones de bacterias por considerarse muy bajos, tal como se puede observar en la Tabla A2 (Anexo A).

Determinación del porcentaje de actinomicetes en la rizósfera y rizoplano del trébol blanco.

La Tabla A6 muestra el porcentaje de actinomicetes por origen de muestra y pH del medio de cultivo. El análisis de varianza (Tabla B4, Anexo B), muestra que solo existieron diferencias significativas para el Factor A (Origen de la muestra). Para el Factor B (pH del medio de cultivo) y para la interacción AB no se encontraron diferencias estadísticas. El coeficiente de variación fue del 5.31%. La separación de medias mostró que para el factor A, el porcentaje de actinomicetes fue mayor en la rizósfera (100%) que en el rizoplano (85.5%). En lo que respecta al pH del medio, se obtuvo un porcentaje mayor de actinomicetes en los medios a pH 5.5 (94.8%) que a pH 8.5 (90.8), y en lo que respecta a la interacción, los tratamientos a0b0 y a0b1 presentaron un 100% de actinomicetes en los platos de aislamiento. El valor más bajo fue reportado para el tratamiento a1b1 con el 81.5% de actinomicetes.

Los resultados del número de ufc/g de suelo seco de actinomicetes, diversidad y porcentaje de actinomicetes se muestran en forma de gráficos en las Figuras C1, C2 y C3 (Anexo C), para el Factor A (Origen de las muestras), Factor B (pH del medio de cultivo) y para la interacción AB.

Aislamiento y purificación de actinomicetes.

Noventa y tres actinomicetes fueron aislados y purificados a partir de los platos de cultivo del aislamiento selectivo. De los cuales 69 actinomicetes pertenecen a la rizósfera y 24 del rizoplano. Lo referente a la codificación y al origen de cada aislamiento se muestra en las Tablas A7 y A8 (Anexo A), para la rizósfera se utilizó el código ATS y para el rizoplano el código ATR.

4.1.3.1. Caracterización macroscópica, microscópica y formación de grupos de color de actinomicetes aislados de la rizósfera y rizoplano.

En la Tabla A9 (Anexo A) se muestra la caracterización macroscópica de los sesenta y nueve actinomicetes aislados de la rizósfera. Se obtuvieron diecinueve grupos de distinto color, el grupo 1 presenta el mayor número de miembros con 11 actinomicetes, le sigue el grupo 3 con 10 actinomicetes. Los grupos 7, 16, 17, 18, 19 solo presentan 1 actinomicete. Cinco grupos no presentaron micelio aéreo en sus colonias, lo que corresponde a 24 actinomicetes. En lo relacionado a la caracterización microscópica en la Figura C4 (Anexo C) encontramos 13 actinomicetes que presentan cadenas rectas, 6 presentan esporas individuales y 21 presentan cadenas incompletas siendo éste el número que domina en los actinomicetes de la rizósfera.

La Tabla A10 (Anexo A) muestra los 24 actinomicetes aislados del rizoplano a los cuales se los agrupo en 9 grupos de color, donde el color White es predominante como color del micelio aéreo, en el micelio del sustrato no existe un color predominante lo mismo sucede para el pigmento difusible. El grupo 5 es el predominante con 5 miembros, luego le siguen los grupos 1, 2 y 3 con 4 miembros, los grupos 6, 7, 8 y 9 presentan un miembro cada uno. En lo relacionado a la caracterización microscópica en la Figura C4 (Anexo C) encontramos 6 actinomicetes que presentan cadenas rectas, 2 presentan esporas individuales y 3 presentan cadenas incompletas.

Determinación de la actividad antimicrobiana.

Para esta parte de la investigación se utilizaron los 93 actinomicetes aislados los cuales corresponden a la rizósfera y rizoplano. De los cuales 37 actinomicetes en la Tabla A11 (Anexo A) no presentaron actividad antagonica en contra de los microorganismos modelos usados para esta parte de la investigación. 56 actinomicetes presentaron antagonismo como lo refleja la Tabla A12 (Anexo A). El tipo de actividad, junto con los códigos de los aislamientos que pertenecen a cada tipo se presentan en la Tabla A13 (Anexo A). Por otro lado, en la Figura C5 (Anexo C), se muestran los números de individuos relacionados a los resultados de actividad antimicrobiana. De los noventa y

tres, solamente 25 presentaron actividad antimicrobiana específica. De ellos, el grupo más grande correspondió a aquellos con características para el control de *Rhizoctonia*. En cambio, solamente se encontró un actinomicete con actividad fungicida, y uno de amplio espectro. El resto de actividades encontradas fueron para el control de *Fusarium* y *Botrytis*, anti-Gram positiva, anti-Gram negativa y bactericida. Al comparar el porcentaje de actinomicetes que presentaron actividad antimicrobiana en relación al total de aislamientos, no se encontraron mayores diferencias, ya que en la rizósfera, el 61% presentaron actividad, mientras que en el rizoplano, fue el 58%. Al tomar en cuenta el pH, la tendencia fue exactamente la misma, ya que el 58% de actinomicetes aislados en medio de cultivo al pH 5.5, mostraron actividad, mientras que a pH 8.5, el porcentaje fue del 62%.

Actividad en contra de *Botrytis*.

Veinte y cinco cultivos de actinomicetes presentaron antagonismo frente al hongo fitopatógeno *Botrytis* en la Tabla A14 (Anexo A). El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos en la Tabla B5 (Anexo B). La separación de medias por la prueba de Tukey al 5%, dividió a los tratamientos en 10 niveles como se muestra en la Tabla B6 (Anexo B). Los tratamientos 0 (ATS-009), 4 (ATS-026), 23 (ATR-011) y el 25 (Control) produjeron la zona más grande de inhibición con 39,00 mm de diámetro. El tratamiento 18 (ATS-067) presentó la zona más pequeña de inhibición con 10,00 mm.

Actividad en contra de *Fusarium*.

Dieciséis cultivos de actinomicetes presentaron actividad antagónica frente al hongo fitopatógeno *Fusarium* en la Tabla A15 (Anexo A). El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos en la Tabla B7 (Anexo B). La separación de medias por la prueba de Tukey al 5%, dividió a los tratamientos en 10 niveles como se muestra en la Tabla B8 (Anexo B). El tratamiento 13 (ATR-004), produjo la zona de inhibición más grande con 27,50 mm de diámetro. El tratamiento 16 (Control) produjo la zona más pequeña de inhibición con 7,50 mm de diámetro.

Actividad en contra de *Rhizoctonia*.

Veinte y seis cultivos de actinomicetes presentaron actividad antagónica frente al hongo fitopatígeno *Rhizoctonia* en la Tabla A16 (Anexo A). El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos en la Tabla B9 (Anexo B). La separación de medias por la prueba de Tukey al 5%, dividió a los tratamientos en 12 niveles como se muestra en la Tabla B10 (Anexo B). El tratamiento 26 (Control), produjo la zona de inhibición más grande con 36,00 mm de diámetro. El Tratamiento 4 (ATS-013) presento la zona más pequeña de inhibición con 10,50 mm de diámetro.

Actividad en contra de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Ningún actinomicete presentó actividad en contra de la levadura. Solamente se obtuvieron los datos del control experimental con nystatin (75 mg/ml), el que presentó un diámetro de inhibición de 26 mm.

Actividad en contra de la bacteria Gram positiva (G+).

Dieciséis cultivos de actinomicetes presentaron actividad antagónica en contra de la bacteria Gram positiva en la Tabla A17 (Anexo A). El análisis de varianza en la Tabla B11 (Anexo B) muestra diferencias altamente significativas entre los tratamientos. La separación de medias por la prueba de Tukey al 5% dividió a los tratamientos en 8 niveles como se muestra en la Tabla B12 (Anexo B). El tratamiento 16 (Control) presento la zona más grande de inhibición con 24,50 mm de diámetro. Los tratamientos 0 (ATS-020) y 12 (ATS-053) presentaron las zonas más pequeñas de inhibición con 8,00 mm de diámetro.

Actividad en contra de la bacteria Gram negativa (G-).

Veinte y dos actinomicetes presentaron actividad antagónica en contra de la bacteria Gram negativa en la Tabla A18 (Anexo A). El análisis de varianza en la Tabla B12 (Anexo B) muestra diferencias altamente significativas entre los tratamientos. La separación de medias por la prueba de Tukey al 5% dividió a los tratamientos en 6 niveles como se muestra en la Tabla B13 (Anexo B). El tratamiento 22 (Control) presento la zona más grande de inhibición con 36,50 mm de diámetro. Los tratamientos 4 (ATS-018) y 15 (ATS-056) presentaron las zonas más pequeñas de inhibición con 8,00 mm de diámetro.

Pruebas Fenotípicas de los actinomicetes Productores de Metabolitos.

De los 56 actinomicetes que presentaron actividad antimicrobiana, 52 fueron tomados en cuenta para las pruebas fenotípicas. Cuatro fueron excluidos debido a que la cantidad de micelio/esporas en las suspensiones fue muy pobre y no existió suficiente material para la realización de las pruebas. Los códigos de los cultivos usados se muestran en la Tabla A19 (Anexo A).

Rango de crecimiento en función de la temperatura.

Los resultados se muestran en la Tabla A20 (Anexo A). En los actinomicetes de la rizósfera se encontraron 24 mesófilos y 16 termófilos como se muestra en la Figura C6 (Anexo C). Para el rizoplano, 11 actinomicetes presentaron características mesófilas, mientras que uno solo fue termófilo.

Rango de crecimiento en función del pH.

La Tabla A21 (Anexo A) muestra los resultados del crecimiento en diferente pH. En la rizósfera se observaron más actinomicetes alcalitolerantes (20) que acidofílicos (11) o neutrotolerantes (9). En cambio, en el rizoplano no fue evidente que un tipo específico predomine sobre otro como lo muestra la Figura C7 (Anexo C). El mismo número de actinomicetes alcalitolerantes y acidofílicos fue encontrado (5), mientras que solamente 2 presentaron características neutrotolerantes. Ningún actinomicete aislado a pH 5.5 presento características alcalitolerantes, mientras que todos aquellos aislados a pH 8.5 fueron alcalitolerantes en la Tabla A21 (Anexo A). Ningún actinomicete creció a pH 3.5.

Pruebas metabólicas de producción de enzimas y uso de aminoácidos como única fuente de C y N.

La prueba de almidón tuvo que ser eliminada debido a problemas en la realización del experimento que provocaron que todos dieran un resultado negativo, y por lo tanto fueron sacados del análisis final. Los resultados de hidrólisis de celulosa y quitina, y uso de aminoácidos como fuentes únicas de carbono y nitrógeno se muestran en la Tabla A22 (Anexo A). En algunos cultivos no se pudo determinar las características y fueron reportados como prueba no determinada (nd). En relación a la producción de enzimas, muy pocos actinomicetes lo hicieron, ya que solamente 2 produjeron

quitinasas y 13 celulasas como lo muestra la Figura C8 (Anexo C). Todo lo contrario sucedió con los aminoácidos, ya que 46 crecieron en ácido aspártico y 44 en glicina, como únicas fuentes de carbono y nitrógeno en los medios de cultivo.

Taxonomía numérica de datos fenotípicos.

El dendrograma basado en el coeficiente de similaridad S_{SM} calculado a partir de las pruebas fenotípicas en la Tabla B15 (Anexo B), de los actinomicetes aislados de la rizósfera del Trébol blanco, se muestra en la Figura C9 (Anexo C). Se identificaron veinte y nueve grupos especie, en los cultivos aislados de la rizósfera del trébol blanco en la Tabla A23 (Anexo A). Nueve grupos presentaron más de un solo representante. El resto (20), fueron recuperados como cultivos individuales. En el caso de los actinomicetes del rizoplano, éstos formaron cuatro grupos multi-miembro, mientras que los restantes tres cultivos fueron recuperados individualmente. No se realizaron análisis separados, debido a que el dendrograma del total de cultivos, el que incluía miembros del rizoplano y rizósfera, no mostró grupos mixtos. Todos los grupos multi-miembro identificados en el dendrograma, resultaron ser ya sea de la rizósfera o rizoplano.

Interpretación de datos.

4.2.1. Población y diversidad de actinomicetes.

Los números de unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo de suelo seco, mostraron resultados contrastantes. En la rizósfera, la población fue más de 11000 veces más que en rizoplano del trébol blanco ($5.19E+07$ ufc/g y $4.63E+03$ ufc/g, respectivamente). Es evidente que las condiciones de crecimiento son completamente diferentes. En el suelo, las cantidades de nutrientes son mucho mayores y el espacio para desarrollarse también lo es. Los actinomicetes que crecen en el rizoplano tienen características endofíticas. Reportes anteriores han mostrado que los números de microbios endófitos de plantas son bajos, lo que estaría siendo demostrado en este trabajo. Además es importante notar que no existen muchos datos acerca de poblaciones en el rizoplano de leguminosas, según Mora (2006), esto se debe a que el suelo rizosférico tiene características bien diferentes al suelo distante de las raíces, pues en la rizósfera hay mayor concentración de nutrientes orgánicos provenientes de las raíces, los cuales favorecen el crecimiento de los microorganismos de manera general, el número de microorganismos en la rizósfera es mucho mayor que el número de microorganismos en el suelo no rizosférico.

El pH también fue un factor importante, que influyó en las poblaciones de actinomicetes. A pesar que la muestra de la rizósfera arrojó un pH relativamente ácido (6.1), el medio ajustado a pH 8.5 permitió poblaciones mayores que el medio a pH ácido (5.5). Esto dio como consecuencia, que el mejor tratamiento sea justamente aquel que combinó estos dos factores, es decir, la población más alta de actinomicetes fue recuperada de la rizósfera y en platos de aislamiento ajustados a pH 8.5.

En lo que respecta a la diversidad de colonias creciendo en los platos de aislamiento, solamente para el factor A (origen de la muestra), se encontraron diferencias marcadas. Una vez más, la diversidad fue mucho mayor en la rizósfera que en el rizoplano. Esto tiene sentido, si es que tomamos en cuenta que las poblaciones fueron completamente diferentes, por lo tanto, al ser mayor en la rizósfera, la probabilidad de encontrar más colonias diferentes se incrementa. Es evidente también que el pH del medio de cultivo no influyó en la diversidad, ya que los valores fueron casi similares. En el caso de la interacción AB, solamente se encontraron diferencias matemáticas, pero no estadísticas.

4.2.2. Porcentaje de actinomicetes.

En el presente estudio se encontró que la cantidad de bacterias no fue significativa, e incluso en los platos de aislamiento de la rizósfera, éstas no crecieron. Por ello, el porcentaje de actinomicetes en esos platos fue del 100%. Se ha reportado ampliamente que los actinomicetes resisten condiciones de sequía, debido a la producción de esporas, algo que las bacterias no pueden hacer, según Stanier (1985), esto se debe a que las esporas les brindan a los actinomicetes resistencia a la desecación proporcionando mecanismos de dispersión y propagación para su desarrollo y supervivencia.

El porcentaje de humedad de la muestra de suelo de la rizósfera es bajo, así que esta podría ser la explicación más probable de porque no se encontraron bacterias en los platos. Por otra parte, en el rizoplano las condiciones son un poco mejores, sobre todo a la exposición de agentes externos como los cambios de temperatura, lo que podría explicar la presencia de bacterias asociadas a las raíces.

4.2.3. Determinación de grupos de color.

Se encontró que más grupos de color fueron ubicados en los actinomicetes de la rizósfera que en los del rizoplano. Esto tiene sentido, ya que las poblaciones y diversidad fueron mucho mayores en los

platos de aislamiento de la rizósfera. Incluso, esto guarda coherencia con los datos de diversidad de colonias en los platos de aislamiento, ya que allí se habían reportado la existencia de 18 colonias diferentes para la rizósfera y 3 en el rizoplano, tendencia que al final se encontró en la formación de los grupos de color.

4.2.4. Determinación de la actividad antimicrobiana.

Los resultados encontrados demuestran la gran diversidad metabólica que los actinomicetes presentan. El 60% de actinomicetes aislados produjeron antibióticos que permitieron la inhibición del crecimiento de los microorganismos modelo usados en el presente estudio. Más importante aún 29 de éstos produjeron antibióticos con capacidad específica para el control de los hongos fitopatógenos *Botrytis*, *Fusarium* y *Rhizoctonia*. Estos resultados podrían constituir el primer paso en el desarrollo de un bioproducto para agricultura que permita la disminución de fungicidas. También es importante recalcar que ningún actinomicete fue capaz de inhibir el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Esto podría deberse a que la cepa estudiada haya desarrollado un mecanismo de resistencia horizontal a antibióticos. Sería necesario repetir las pruebas con un tipo diferente de levadura para probar ésta idea. Por otro lado, algunos actinomicetes produjeron antibióticos que se comportaron igual o mejor que el control, especialmente en los experimentos contra los hongos fitopatógenos.

4.2.5. Taxonomía numérica de datos fenotípicos.

Los grupos-especie, obtenidos del análisis de la taxonomía numérica, se incrementaron considerablemente, al compararlos con los grupos de color iniciales, basados solamente en las pigmentaciones del micelio aéreo, sustrato y pigmento difusible. Cuando se analizan muchas pruebas de tipo fenotípico, la formación de grupos se hace más específica, y por lo tanto más real. Además, hay que recordar que la taxonomía numérica solo se realizó para aquellos actinomicetes que presentaron actividad anti-microbiana. También es importante resaltar que la diversidad de los actinomicetes se demuestra una vez más, al encontrar tantos grupos-especie. Por otro lado, al comparar los datos de los grupos de la rizósfera con los del rizoplano, se observa que en la rizósfera hay una diversidad más grande. Esto es explicable ya que las condiciones de la rizósfera son más adecuadas para el desarrollo de más actinomicetes, de las que el rizoplano podría proveer. Hay más espacio, más nutrientes, y más oxígeno que evidentemente están a disposición de los microbios.

Discusión general del trabajo investigativo.

En la presente investigación se realizó un estudio en el que se determinó la capacidad antagonista de actinomicetes aislados de la rizósfera y rizoplaneo del Trébol blanco (*Trifolium repens* L.). Para lo cual se realizaron estudios de población, diversidad, actividad antagónica y taxonomía de los actinomicetes.

Al realizar una comparación del número de actinomicetes aislados tanto de la rizósfera como del rizoplaneo encontramos marcadas diferencias sobretodo en el número de ufc ya que la rizósfera posee valores más altos que los encontrados en el rizoplaneo, esto se debe a que el suelo rizosférico tiene características bien diferentes al suelo distante de las raíces, en la rizósfera existe mayor concentración de nutrientes orgánicos provenientes de las raíces, los cuales favorecen el crecimiento de los microorganismos de manera general, debido a esto se encuentra una mayor diversidad no solo de actinomicetes sino también de otro tipo de microorganismos en la rizósfera.

Para lo relacionado a la actividad antagónica se trabajó con los 93 actinomicetes aislados en esta investigación frente a microorganismos patógenos como *Botrytis*, *Fusarium* y *Rhizoctonia*, Bacterias del tipo Gram positivas (G+), Gram negativas (G-) y levadura. Los resultados que arrojo este procedimiento evidencian que la mayoría de los actinomicetes presentan actividad de tipo bactericida, fungicida, de amplio espectro y que contrarresta la acción de los patógenos utilizados, es decir el 60,21% de actinomicetes presentan actividad antagónica. Solo en la levadura fue el único caso en el que ningún actinomicete presento inhibición.

Los datos obtenidos en el antagonismo dan la apertura para continuar con el desarrollo de más investigaciones debido a que se demostró que los actinomicetes producen compuestos bioactivos mismos que estuvieron a la par y superaron en algunos casos a los antibióticos utilizados como control experimental principalmente con el nistatin, compuesto anti fúngico.

La investigación realizada facilita la continuidad de más estudios relacionados en este tema, sobretodo en la búsqueda de compuestos bioactivos útiles en la agricultura y biotecnología tomando en cuenta que los bioproductos que pueden realizarse serian un aporte alternativas ecológicas para evitar el uso de químicos que causan daños a los ecosistemas y a la naturaleza.

Verificación de hipótesis.

4.4.1. Hipótesis Nula (H_0).

En la rizósfera y rizoplano del Trébol blanco (*Trifolium repens* L.), no existe una gran biodiversidad de actinomicetes productores de compuestos bioactivos útiles en biotecnología.

Hipótesis Alternante (H_1).

En la rizósfera y rizoplano del Trébol blanco (*Trifolium repens* L.), existe una gran biodiversidad de actinomicetes productores de compuestos bioactivos útiles en biotecnología.

Después de analizar los resultados de la población de actinomicetes de la rizósfera y el rizoplano, número de colonias diferentes, porcentaje, producción de compuestos bioactivos y las características fenotípicas de los actinomicetes aislados de la rizósfera, y rizoplano del Trébol blanco, “se acepta la hipótesis alternante (H_1)” afirmando que en la rizósfera y rizoplano del Trébol blanco (*Trifolium repens* L.), existe una gran biodiversidad de actinomicetes productores de compuestos bioactivos útiles en biotecnología.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones.

Se determinó la producción de compuestos bioactivos de los actinomicetes aislados de la rizósfera y rizoplano del trébol blanco, la parte central de la presente investigación fue el realizar un control biológico de estos microorganismos frente a la presencia de hongos fitopatógenos como son *Botrytis*, *Fusarium* y *Rhizoctonia*.

Se aislaron 93 actinomicetes, de los cuales sesenta y tres fueron aislados en la rizósfera que es el 74,19% y veinte y cuatro en el rizoplano del trébol blanco que es el 25,80%, los mismos fueron incubados a una temperatura de 28 °C.

Las únicas diferencias estadísticas encontradas en el presente estudio se determinaron para la población de actinomicetes en función del origen. Mayor población se encontró en la rizósfera ($5.19E+07$ ufc/g), que en rizoplano ($4.63E+03$ ufc/g).

Se evaluó la capacidad antagónica de los actinomicetes. El 60,21%, es decir, 56 fueron antagónicos frente a los distintos patógenos con los cuales se realizaron las pruebas. *Botrytis* y *Rhizoctonia* fueron los hongos fitopatógenos contrarrestados por la acción de la mayoría de los actinomicetes estudiados. La levadura fue el único caso en el que ningún actinomicete presentó inhibición.

De los compuestos bioactivos que produjeron los actinomicetes de este estudio se evidenció que son iguales o más eficientes que los antibióticos que se utilizaron en el control experimental como fueron el sulfato de estreptomicina y el nystatin.

Recomendaciones.

Realizar análisis moleculares para cada uno de los actinomicetes que presentaron antagonismo, mismos que fueron utilizados para la taxonomía numérica.

Diseñar una alternativa ecológica, es decir un bioproducto que contenga los microorganismos que presentaron antagonismo para contrarrestar los efectos de patógenos que causan daño en la industria agrícola y generan pérdidas de tipo económico.

CAPITULO VI

PROPUESTA

6.1. Datos informativos

6.1.1. Título

Determinación de la producción de compuestos bioactivos de actinomicetes asociados al rizoplasma y rizósfera de leguminosas.

6.1.2. Institución ejecutora

Universidad Técnica de Ambato (UTA).

6.1.3. Beneficiarios

Investigadores y estudiantes de Universidades y Escuelas Politécnicas del país. Centros de Investigaciones en Biotecnología. Empresas privadas relacionadas a Agrobiotecnología.

6.1.4. Ubicación

UTA. Colombia S/N y Chile. Ciudadela Ingahurco. Ambato.

6.1.5. Tiempo estimado para la ejecución

Tres meses.

6.1.6. Equipo técnico responsable

Docentes, Investigadores y Estudiantes trabajando en experimentos de aislamientos selectivo para la búsqueda de microorganismos útiles en biotecnología.

6.2. Antecedentes de la propuesta

Los actinomicetes son microorganismos procariotes parecidos a los hongos, de tamaño similar a las bacterias. Una de sus características más importantes es la producción de metabolitos secundarios, la evidencia de producción de antibióticos como estreptomycin, terramicina, aureomicina, ciclohexamide, cloramfenicol y neomicina, no todos los actinomicetes producen metabolitos secundarios.

La investigación *“Producción de Compuestos Bioactivos de Actinomicetes Aislados de la Rizósfera y Rizoplano del Trébol Blanco (Trifolium repens L.) para el Control de Hongos Fitopatógenos, Bacterias y Levaduras”*, demostró que se puede determinar la producción de compuestos bioactivos provenientes de actinomicetes a través de la actividad antagónica ante microorganismos modelo. El 60,21 % de actinomicetes aislados de la rizósfera y rizoplano del Trébol blanco demostraron poseer capacidad antagónica inhibiendo el crecimiento total o parcial de otro microorganismo. Así se demostró que los actinomicetes aislados de la rizósfera y rizoplano del Trébol blanco son fuentes de metabolitos de interés en Biotecnología.

6.3. Justificación

El estudio *“Producción de Compuestos Bioactivos de Actinomicetes Aislados de la Rizósfera y Rizoplano del Trébol Blanco (Trifolium repens L.) para el Control de Hongos Fitopatógenos, Bacterias y Levaduras”*, demostró que los actinomicetes asociados al Trébol blanco poseen actividad antagónica ante microorganismos modelo. Por tanto la metodología utilizada facilitara la posible obtención de nuevos compuestos bioactivos de interés en agricultura. Los resultados de este estudio permitirán comparar el porcentaje, la diversidad y la capacidad antagónica de actinomicetes que se encuentran en la rizósfera y rizoplano de dos leguminosas diferentes.

6.4. Objetivos

6.4.1. General

Determinar la producción de compuestos bioactivos de actinomicetes aislados de la rizósfera y rizoplano de leguminosas frente a la presencia de hongos fitopatógenos, bacterias y levaduras.

6.4.2. Específicos

Aislar selectivamente actinomicetes presentes en la rizósfera y rizoplano de leguminosas.

Caracterizar macroscópica y microscópicamente a los actinomicetes obtenidos en el aislamiento selectivo.

Evaluar la capacidad antagónica que presenten los actinomicetes en la presente investigación.

6.5. Análisis de factibilidad

La viabilidad de la “*Determinación de la producción de compuestos bioactivos de actinomicetes asociados al rizoplasma y rizósfera de leguminosas.*” se asegura con los resultados obtenidos en la investigación “*Producción de Compuestos Bioactivos de Actinomicetes Aislados de la Rizósfera y Rizoplasma del Trébol Blanco (Trifolium repens L.), para el Control de Hongos Fitopatógenos, Bacterias y Levaduras*”. Además, el cumplimiento adecuado de los objetivos específicos planteados en ésta propuesta garantizará el cumplimiento del objetivo general.

Por otro lado, los siguientes resultados de la investigación en la que se basa la propuesta, permiten que los resultados de la presente propuesta sean alcanzados sin ningún inconveniente.

La parte de la fundamentación legal, que se ampara en la ley de Gestión Ambiental y en el Reglamento a la Ley de Gestión Ambiental para la prevención y control de la contaminación ambiental.

6.6. Fundamentación

La investigación “*Producción de Compuestos Bioactivos de Actinomicetes Aislados de la Rizósfera y Rizoplasma del Trébol Blanco (Trifolium repens L.) para el Control de Hongos Fitopatógenos, Bacterias y Levaduras*”, es la base científica que permite la formulación de la presente propuesta.

6.7. Metodología – modelo operativo

Aislamiento selectivo de actinomicetes.

Determinación de la población y diversidad de actinomicetes.

En botellas con tapa rosca se colocarán 90 ml de agua de la llave estéril junto con aproximadamente 20 esferas de vidrio y se llevara a esterilización a 121°C por 20 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se dejará enfriar las botellas hasta una temperatura de 45°C. Posteriormente se pesaran 10 g de cada una de las muestras compuestas y se añadirán a las botellas con agua de llave estéril (dilución 1/10), entonces las suspensiones de suelo serán agitadas por 45 minutos. Una vez transcurrido éste tiempo se preparará la dilución 1/10², la que será colocada en un baño maría a 55°C por 6 minutos. A partir de esta se prepararán las diluciones 1/10³ y 1/10⁴. Cien microlitros (100µl) de las diluciones 1/10², 1/10³ y 1/10⁴ serán colocados y extendidos por duplicado, sobre la superficie de cajas petri que contengan agar glucosa extracto de levadura extracto de malta (agar

GYM, Anexo1) suplementado con nistatin, a una concentración de 75 µg/ml, y con rifampicina (5 µg/ml). El pH de los medios de aislamiento se ajustará a 5.5, y 8.5. Las cajas inoculadas serán incubadas a 26°C por dos semanas. Luego de la incubación se procederá a contar el número de colonias diferentes de actinomicetes y de bacterias.

Aislamiento y purificación de actinomicetes.

Los platos que presenten crecimiento visible y diversidad de colonias de actinomicetes serán escogidos para proceder con el aislamiento y purificación de las cepas. Con la ayuda de un palillo estéril se tomará parte de una colonia o micelio con esporas, para inocular mediante estría simple en platos tetrapetri que contengan agar glucosa extracto de malta (GYM) ajustado a pH 5.5 y 8.5 en la forma descrita anteriormente. Los platos serán incubados a 26°C por dos semanas. Aquellos cultivos que se encuentren puros serán replicados en estría compuesta en nuevos platos petri con GYM. Todos los cultivos contaminados serán replicados hasta obtener en cultivo puro.

Almacenamiento y conservación de los cultivos puros de actinomicetes.

En primer lugar se prepararán suspensiones de esporas. Para ello, se usará un palillo de dientes estéril para raspar la superficie de las colonias con abundante crecimiento. El material obtenido será transferido a un tubo que contenga 750 µl de agua de llave estéril. Las suspensiones de esporas serán almacenadas en refrigeración a 4°C, hasta su posterior uso durante la realización de pruebas de taxonomía numérica. La conservación a largo plazo de los actinomicetes aislados será realizada mediante la transferencia de material de cada colonia hacia un criovial que contenga 1 ml de glicerol al 20% (w/v). Los tubos preparados serán almacenados en un congelador a -20°C.

Caracterización macroscópica de los aislamientos.

Los cultivos puros obtenidos se agruparán de acuerdo a la coloración y morfología de las colonias. Para la determinación del color del micelio del sustrato, micelio aéreo y pigmento difusible se utilizará una tabla de colores, estableciéndose grupos de color mediante la determinación de similitud de pigmentaciones.

Caracterización microscópica.

Los microorganismos aislados serán usados para preparar muestras que serán observadas bajo el microscopio. Se determinara la morfología del micelio aéreo de acuerdo a las características que se muestran en la Tabla 1.

Taxonomía Numérica de características fenotípicas.

Aquellos actinomicetes que presenten actividad antimicrobiana serán caracterizados en función de pruebas fisiológicas y metabólicas que se describen a continuación.

Rango de crecimiento en Función de la Temperatura.

Se inocularán 5 µl de las suspensiones de esporas previamente preparadas, sobre la superficie de agar GYM. Los platos inoculados serán incubados a una temperatura de 50°C, 37°C y 4°C durante 2, 4 y 5 días. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluarán las cajas para observar el crecimiento de los actinomicetes y se evaluara mediante código binario. Si el actinomicete presenta crecimiento, se asignará 1, en caso contrario, es decir ausencia de crecimiento, 0.

Rango de crecimiento en Función del pH.

Se inocularan 5 µl de las suspensiones de esporas en la superficie de agar GYM, ajustado a los pHs 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5 y 9.5. El pH será ajustado con la ayuda de sistemas de búferes para así evitar cambios en el pH debido al metabolismo de los microorganismos. Las cajas se incubarán a 26°C, durante 7 días. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluarán las cajas tomando en cuenta la presencia o ausencia de halos alrededor del sitio de inoculación. En el caso del almidón se deberá cubrir la superficie de la caja con lugol para observar la producción del halo. La evaluación en código binario será reportada de la siguiente manera, si el actinomicete presenta halo, se asignara 1, en caso contrario, es decir, ausencia de halo, 0.

Perfil metabólico de uso de carbohidratos.

Se determinará la capacidad de producción de enzimas hidrolíticas para la utilización de ciertos carbohidratos. Se utilizara almidón, celulosa, quitina y pectina. Para la preparación de medio de cultivo se utilizaran los polisacáridos mencionados anteriormente, los que serán añadidos a agar GYM, para una concentración final de 1% (p/v) de cada uno de ellos. Sobre la superficie del medio estéril se inocularán 5 µl de las suspensiones de esporas. Las cajas se incubarán durante 7 días a

26°C. Posteriormente, se evaluarán las cajas tomando en cuenta la presencia o ausencia de halos alrededor del sitio de inoculación. En el caso del almidón se deberá cubrir la superficie de la caja con lugol para observar la producción del halo. La evaluación en código binario será reportada de la siguiente manera, si el actinomicete presenta halo, se asignará 1, en caso contrario, es decir, ausencia de halo, 0.

Determinación de la actividad antimicrobiana.

Preparación de los platos con los microorganismos modelo.

Inicialmente, cultivos de los hongos fitopatógenos *Botrytis*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* y de dos bacterias, una Gram positiva y la otra Gram negativa, serán crecidos en PDA y AN, respectivamente. En el caso de los hongos, los microorganismos serán incubados a 28°C por 4 días. Una vez obtenidos los cultivos de cada microorganismo, serán preparados los platos siguiendo la técnica detallada por Phillips (1994).

La primera etapa consistirá en preparar suspensiones con las estructuras reproductivas de los hongos y bacterias. Para cada microorganismo, se raspará la superficie del medio de cultivo, para así transferir ya sea esporas o células, a un tubo de ensayo con 9 ml de solución salina estéril. Con la ayuda de un hemocitómetro, en el caso de hongos, y una placa para conteo de bacterias (Petroff – Hausser chamber), se determinará la concentración inicial de cada uno de los microorganismos en las suspensiones. Posteriormente, con estos valores se podrá calcular el volumen de inóculo necesario para obtener concentraciones finales 1×10^5 células/ml de AN para bacterias, y 1×10^3 esporas/ml de PDA para los hongos fitopatógenos.

Preparación de los cultivos de actinomicetes.

Se tomarán representantes de los grupos-especie visualizados en los dendogramas. El punto de corte será establecido entre el 80 y 90 % de similaridad. Los microorganismos seleccionados serán usados para determinar la capacidad de cada uno de uno para producir compuestos bioactivos de interés en Biotecnología. Los actinomicetes serán crecidos en agar GYM, de tal manera que el micelio cubra por completo la superficie del medio de cultivo. Para ello, los platos serán incubados a 28°C por 10 a 15 días.

Instalación del experimento para determinar la capacidad antagónica.

Utilizando un sacabocados de 6mm de diámetro, se extraerán bloques cilíndricos de parte del micelio de cada cultivo de actinomicete. La profundidad del medio donde se extraerán los bloques deberá ser la misma en todos los casos. Luego se depositaran 4 bloques sobre los platos de cultivo con los microorganismos modelos, colocando parte del crecimiento del actinomicete en contacto con el medio, para así permitir una difusión más rápida de los metabolitos producidos. Además se prepararán platos en los que se colocarán círculos de papel con nistatin (100ug/ml) y rifampicina (5µg/ml), como control experimental para los ensayos de hongos y bacterias, respectivamente. Los platos preparados serán incubados a 26 °C por 7 días, y los perfiles de actividad biológica se determinaran midiendo los diámetros, tanto polar como ecuatorial, de las zonas de inhibición, en milímetros, de aquellos actinomicetes que muestren actividad microbiana.

Administración

INDICADORES A MEJORAR	SITUACIÓN ACTUAL	RESULTADOS ESPERADOS	ACTIVIDADES	RESPONSABLES
Pruebas microbianas de actinomicetes aislados de la rizósfera y rizoplano de leguminosas.	Búsqueda de compuestos bioactivos a partir de actinomicetes aislados de la rizósfera y rizoplano.	Obtención de metabolitos secundarios a partir de actinomicetes.	Caracterización macroscópica de los aislamientos.	Docente
Capacidad antagónica de actinomicetes.		Ahorro de recursos económicos al utilizar bioproductos en lugar de productos químicos.	Caracterización microscópica de los aislamientos que presentan esporulación.	Pruebas antagonicas. Análisis de datos de inhibicion.

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Previsión de la evaluación

PREGUNTAS BÁSICAS	EXPLICACIÓN
¿Quiénes solicitan evaluar?	Docentes Investigador
¿Por qué evaluar?	Proporciona información de mecanismos antagónicos para la búsqueda de metabolitos de interés.
¿Para qué evaluar?	Para determinar la capacidad antagónica que permita obtener biocompuestos de amplio espectro.
¿Qué evaluar?	Datos obtenidos a partir de pruebas antagónicas.
¿Quién evalúa?	Docente.
¿Cuándo evaluar?	Al finalizar las pruebas de actividad antagónica.
¿Cómo evaluar?	Mediante análisis estadísticos.
¿Con qué evaluar?	Programa Stathgraphics.

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

ACERO, N; 1997. Estudio de las rizobacterias de *Vicia villosa* Roth: optimización de la productividad por técnicas biológicas. Biblioteca virtual Miguel de cervantes. Madrid, 43 - 44 p.

AGRIOS, G; 1991. Fitopatología. Editorial Limusa, México, 419 - 423, 440 – 447, 507 – 509, 428 – 433 p.

ALEXANDER, M; 1977. Introduction to soil microbiology. Vigésima segunda Edición. New York. Wiley. 467 p.

AYANS, A; 2007. Leguminosas de interés para la implantación de praderas. Madrid, 13 – 14 p.

BARONA, F; 2007. Actinomicetes, Bacterias patógenas y productoras de antibióticos. México DF, 50 – 51 p.

BORGHI, L; BRACALENTI, J; DELGADO, J; 1990. Poblaciones de *Streptomyces* en suelos con cultivos de cereales y leguminosas – Propiedades Antagonistas sobre cepas de *Fusarium Toxicogenicas*. Ciencia del suelo Vol.8, Rosario, 176 p.

BROCK, T; SMITH, D; y MADIGAN, M; 1987. Microbiología Prentice-Hall, Hispanoamerica S.A, México, 805 – 813 p.

CARRILLO, L; 2003. Microbiología Agrícola – Capitulo 1. 2 – 4 p.

CASTILLO, E; GALLEGOS, G; HERNANDEZ, F; CEPEDA, M; ZAMORA, V; 2001. Efectividad de Actinomicetes aislados sobre *Rhizoctonia solani* Kunh in vitro. Vol. 19, México, 203 – 204 p.

CERDA, M; 2008. Aislamiento de Micromonospora de nódulos de leguminosas tropicales y análisis de su interés como promotor del crecimiento vegetal. Salamanca, 26 -32 p.

COFRÉ, P; 2003. Pastoreo de Trébol blanco con ballica. Quilamapu, 1 – 2 p.

DE LA ROSA, S; GAMBOA, M; 2004. Microorganismos: Una farmacia por visitar. Ciencia Ergosum, Vol.11, Toluca, 187 – 188 p.

DEL TRIDICI, P; 1995. A Nitrogen Fixation: The Story of the Frankia Symbiosis. *Arnoldia* 1995 -1996 Winter, 27 – 31 p.

ELANGO, F; 2005. Manejo de plagas (Enfermedades). Costa Rica, 20 – 21 p.

EL-MEHALAWY, A; HASSAINEN, N; KHATER, H; EL-ZHARAA, A; EL-DIN, K; YOUSSEF, Y; 2004. Influence of maize root colonization by the rizosphere actinomicetes and yeast fungi on plant growth and on the biological control of late wilt disease. *International Journal of Agriculture and Biology*. Cairo, Egipto, 599 - 603p.

FRANCO, M; 2008. Evaluación de caracteres PGPR en Actinomicetes e Interacciones de Rizobacterias con Hongos formadores de micorrizas. *Granados*, 43 – 44 p.

HAWKER, L; 1964. Elementos de Microbiología General. Editorial Acribia, Zaragoza, 292 - 297 : 306 - 309 p.

HEWITT, W & VINCENT. S. 1989. Theory and application of microbiological assay. Academic Press in San Diego.

KHAMMNA, S; YOKOTA, A; LUMYONG, S; 2009. Actinomicetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole- 3- acetic acid and siderophore production. *World J Microbiol Biotechnol* (2009), Tokio, Japan; 649 – 654 p.

KRISHNARAK, M; MATHIVANAN, N; 2009. Antimicrobial potential or marine isolated from the bay of Bengal. Tamil Nadu, India.

LAZZARINNI, A; CAVALETTI, L; TOPPO, G, MARINELLI, F; 2000. Rare genera of Actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Ant van Leeuwenhoek*. 399 – 405p.

LEIVA, S; YAÑEZ, M; ZAROR L, RODRÍGUEZ, H; GARCIA, H; 2004. Actividad Microbiana de Actinomicetes aislados desde ambientes acuáticos del Sur de Chile. Revista Médica, Santiago, Chile. 132 : 151 – 159 p.

LEVEAU, J & BOUIX, M; 2000. Microbiología Industrial, Los microorganismos de interés industrial. Primera Edición. Editorial Acribia, España. 419 – 420 p.

LUGO, A; 2008. Tinción de Gram. Santiago, República Dominicana, 2 - 6 p.

MENENDEZ, 2006. Trébol blanco: Nomenclatura y Clasificación. Corvera, 2006.

MORA, R; 2006. La actividad microbiana: Un indicador integral de la calidad del suelo. Caldas, Colombia, 2 – 3 p.

MUTITU, W; MUIRU, M; MUKUNYA, D; 2008. Evaluation of antibiotic metabolites from actinomycete isolates for the control of late blight of tomatoes under greenhouse conditions. Asian Journals of Plants Sciences; Nairobi, Kenia; 284 – 287 p.

NAAB, O; 2005. Pared Celular en Procariotas. Santa Rosa, Argentina, 2 – 4 p.

OSKAY, M; USAME, A; AZERI, C; 2004. Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. African Journal of Biotechnology Vol. 3 (9), pp. 441-446, African Journal of Biotechnology Vol. 3 (9); Manisa, Turquía 441-446 p.

PEÑA, Q; SHAMUN, M; LUCANA, CH; MIRANDA, CH; GIMENEZ, T; 1998. Aislamiento, Identificación y perfil biológico de especies fúngicas de tierras. Vol. VI. La Paz, Bolivia. 17 – 18 p.

PÉREZ, C; PINEDA, J; ULACIO, D; 1997. Microflora asociada a las raíces de las plantas de Tabaco (*Nicotiana tabacum*) provenientes del Estado Portuguesa. Bioagro Vol 9. Barquisimeto, 2 p.

PÍREZ, M; 2000. Morfología y Estructura bacteriana. 23 -25 p.

PHILLIPS, L; 1993. Seminario sobre Actinomicetes, Versión traducida, Xenova, Ecuador. 1 - 2 : 18 - 19 p.

PIÑERO, J; RIVAS, N; 2004. Aislamiento y Caracterización de una cepa de Actinomicetes, celulolítico, termófilo moderado y acidófilo. Maracaibo - Venezuela.

RAMIREZ, K; SALINAS, A; TRIGOS A; 2008. Presencia de Hongos Fitopatógenos en frutas y Hortalizas. Revista Mexicana de Micología, Veracruz; 127 - 128 p.

RODRIGUEZ, 1996. Aislamiento y Caracterización de actinomicetes aislados de la rizósfera de leguminosas. 15 – 17 p.

ROSE, S; 1980. Astreptomycete antagonist to *Phellinus weirii*, *Fomes annosus*, and *Phytophthora cinnamomi*. Oregon State University, USA, 583 – 584 p.

SARDI, P; SARACCHI, S; QUARONI, B; PETROLINI, G; BORGONOV, E; 1992. Isolation of edopytic *Streptomyces* strains from surface – sterilized roots. Applied and Environmental Microbiology. Oregon, 583 – 584 p.

SEMBIRING, L; WARD, AC, GOODFELLOW, M; 2000. Selective isolation and characterization of members of the *Streptomyces violaceusniger* clade associated with the roots of *Paraserianthes flacataria*. Antonie Van Leeuwenhoek 78; 353 - 366 p.

SOLANS, M; VOBIS, G; 2003. Actinomicetes saprofíticos asociados a la rizósfera y rizoplano de *Discaria trinervis*. Ecologia Austrak Vol. 7, Bariloche, 97 – 98 p.

STANIER, R; E. ADELBERG, J; L INGRAHAM; BROCK; 1985. Microbiología; Cuarta Edición; Repla, S.A; Mexico D.F; 645 - 650 p.

SUAREZ, F; 2008. Evaluación e identificación de géneros de actinomicetes aislados a partir de suelo rizosférico no cultivado de trébol blanco (*Trifolium repens*) como promotores de crecimiento vegetal. Universitas Scientiarum Vol. 13. Bogota – Colombia. 88 – 90 p.

SYLVIA, DM; 2005. Principles and applications of soil microbiology. Segunda edición. Prentice Hall, New Jersey, 259 – 303 p.

VALDES, M; 2003. La bacteria filamentosa *Frankia*, Mexico DF, 4-5 p.

VINUEZA, G; 2010. Determinación de la relación entre las características fenotípicas y genotípicas de actinomicetes como mecanismo de de replicación de microorganismos útiles en biotecnología. Ambato 46 - 51 p.

WILLIAMS, S; WELLINGTON, E; 1983. Actinomicetes IN: Methods of soil analysis, Part 2, USA 969 – 970 p.

YOU, P; SIVASITHAMPARAM, K; KURTBOKE, I; 1996. Actinomycetes in organic mulch used in avocado plantations and their ability to suppress *Phytophthora cinnamomi*. Biol Fertil Soils, Nedlands, Australia; 238 – 241 p.

ANEXO A

DATOS EXPERIMENTALES

Tabla A1. Características fisicoquímicas del suelo de la rizósfera del Trébol blanco.

Prueba Físico - Química	Valor
pH	6.1
% Humedad	14.7
% Materia Orgánica	1.14

Elaborado por Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A2. Número de colonias de bacterias.

Tratamientos	Factor A	Factor B	R1	R2	Dilución
T1	Rizósfera	5.5	0	0	1,00E+04
T2	Rizósfera	8.5	0	0	1,00E+04
T3	Rizoplano	5.5	2	1	1,00E+01
T4	Rizoplano	8.5	1	2	1,00E+01

Elaborado por Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A3. Número de colonias de actinomicetes.

Tratamientos	Factor A	Factor B	R1	R2	Dilución
T1	Rizósfera	5.5	44	75	1,00E+04
T2	Rizósfera	8.5	147	127	1,00E+04
T3	Rizoplano	5.5	13	11	1,00E+01
T4	Rizoplano	8.5	7	6	1,00E+01

Elaborado por Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A4. Número de colonias diferentes de actinomicetes.

Tratamientos	Factor A	Factor B	R1	R2
T1	Rizósfera	5.5	13	21
T2	Rizósfera	8.5	16	20
T3	Rizoplano	5.5	3	2
T4	Rizoplano	8.5	3	3

Elaborado por Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A5. Número de ufc/g suelo seco de actinomicetes.

Tratamientos	Factor A	Factor B	R1	R2
T1	Rizósfera	5.5	2,32E+07	3,96E+07
T2	Rizósfera	8.5	7,76E+07	6,70E+07
T3	Rizoplano	5.5	6,86E+03	5,81E+03
T4	Rizoplano	8.5	3,69E+03	3,17E+03

Elaborado por Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A6. Porcentaje de actinomicetes.

Tratamientos	Factor A	Factor B	R1	R2
T1	Rizósfera	5.5	100%	100%
T2	Rizósfera	8.5	100%	100%
T3	Rizoplano	5.5	87%	92%
T4	Rizoplano	8.5	88%	75%

Elaborado por Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A7. Codificación de actinomicetes aislados de la rizósfera del Trébol blanco.

Código	Medio	pH	Dilución
ATS-001	GYM	5.5	1/10 ³
ATS-002	GYM	5.5	1/10 ³
ATS-003	GYM	8.5	1/10 ³
ATS-004	GYM	5.5	1/10 ⁴
ATS-005	GYM	8.5	1/10 ³
ATS-006	GYM	8.5	1/10 ⁴
ATS-007	GYM	8.5	1/10 ⁴
ATS-008	GYM	5.5	1/10 ⁴
ATS-009	GYM	5.5	1/10 ⁴
ATS-010	GYM	5.5	1/10 ⁴
ATS-011	GYM	5.5	1/10 ³
ATS-012	GYM	5.5	1/10 ³
ATS-013	GYM	8.5	1/10 ⁴
ATS-014	GYM	8.5	1/10 ⁴
ATS-015	GYM	5.5	1/10 ³
ATS-016	GYM	8.5	1/10 ³
ATS-017	GYM	5.5	1/10 ⁴
ATS-018	GYM	5.5	1/10 ³
ATS-019	GYM	8.5	1/10 ⁴
ATS-020	GYM	5.5	1/10 ⁴
ATS-021	GYM	5.5	1/10 ⁴

Elaborado por Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A7. Continuación.

Código	Medio	pH	Dilución
ATS-022	GYM	5.5	1/10 ³
ATS-023	GYM	5.5	1/10 ³
ATS-024	GYM	5.5	1/10 ⁴
ATS-025	GYM	8.5	1/10 ³
ATS-026	GYM	5.5	1/10 ⁴
ATS-027	GYM	5.5	1/10 ³
ATS-028	GYM	5.5	1/10 ³
ATS-029	GYM	8.5	1/10 ⁴
ATS-030	GYM	5.5	1/10 ³
ATS-031	GYM	8.5	1/10 ³
ATS-032	GYM	5.5	1/10 ³
ATS-033	GYM	8.5	1/10 ³
ATS-034	GYM	5.5	1/10 ³
ATS-035	GYM	8.5	1/10 ³
ATS-036	GYM	8.5	1/10 ⁴
ATS-037	GYM	8.5	1/10 ⁴
ATS-038	GYM	8.5	1/10 ⁴
ATS-039	GYM	8.5	1/10 ³
ATS-040	GYM	8.5	1/10 ⁴
ATS-041	GYM	8.5	1/10 ³

Elaborado por Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A7. Continuación.

Código	Medio	pH	Dilución
ATS-042	GYM	8.5	1/10 ³
ATS-043	GYM	5.5	1/10 ⁴
ATS-044	GYM	5.5	1/10 ⁴
ATS-045	GYM	8.5	1/10 ⁴
ATS-046	GYM	5.5	1/10 ⁴
ATS-047	GYM	8.5	1/10 ⁴
ATS-048	GYM	5.5	1/10 ³
ATS-049	GYM	5.5	1/10 ³
ATS-050	GYM	8.5	1/10 ⁴
ATS-051	GYM	8.5	1/10 ⁴
ATS-052	GYM	8.5	1/10 ⁴
ATS-053	GYM	8.5	1/10 ⁴
ATS-054	GYM	5.5	1/10 ³
ATS-055	GYM	8.5	1/10 ⁴
ATS-056	GYM	5.5	1/10 ⁴
ATS-057	GYM	5.5	1/10 ³
ATS-058	GYM	5.5	1/10 ⁴
ATS-059	GYM	5.5	1/10 ⁴
ATS-060	GYM	8.5	1/10 ³
ATS-061	GYM	5.5	1/10 ³

Elaborado por Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A7. Continuación.

Código	Medio	pH	Dilución
ATS-062	GYM	5.5	1/10 ³
ATS-063	GYM	5.5	1/10 ³
ATS-064	GYM	8.5	1/10 ³
ATS-065	GYM	5.5	1/10 ⁴
ATS-066	GYM	5.5	1/10 ⁴
ATS-067	GYM	5.5	1/10 ³
ATS-068	GYM	8.5	1/10 ³
ATS-069	GYM	8.5	1/10 ⁴

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A8. Codificación de actinomicetes aislados del rizoplano del Trébol blanco.

Código	Medio	pH	Dilución
ATR 001	GYM	8.5	1/10
ATR 002	GYM	8.5	1/10 ²
ATR 003	GYM	8.5	1/10 ²
ATR 004	GYM	8.5	1/10 ²
ATR 005	GYM	8.5	1/10
ATR 006	GYM	5.5	1/10 ²
ATR 007	GYM	5.5	1/10
ATR 008	GYM	5.5	1/10 ²

Elaborado por Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A8. Continuación.

Código	Medio	pH	Dilución
ATR 009	GYM	5.5	1/10
ATR 010	GYM	5.5	1/10
ATR 011	GYM	5.5	1/10 ²
ATR 012	GYM	8.5	1/10
ATR 013	GYM	8.5	1/10
ATR 014	GYM	8.5	1/10
ATR 015	GYM	8.5	1/10
ATR 016	GYM	8.5	1/10 ²
ATR 017	GYM	8.5	1/10 ²
ATR 018	GYM	8.5	1/10
ATR 019	GYM	8.5	1/10
ATR 020	GYM	5.5	1/10
ATR 021	GYM	5.5	1/10 ²
ATR 022	GYM	5.5	1/10
ATR 023	GYM	5.5	1/10
ATR 024	GYM	8.5	1/10

Elaborado por Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A9. Grupos de color de actinomicetes aislados de la rizósfera del Trébol blanco.

Grupo de color	Color			Miembros
	Micelio Aéreo	Micelio de Sustrato	Pigmento Difusible	
1	627 Light aircraftgrey	388 Beige	-	ATS-001, ATS-034, ATS-046,ATS-048, ATS-050,ATS-053, ATS-055, ATS-062, ATS-064,ATS-067, ATS-068
2	389 Camouflage beige	358 Light buff	-	ATS-002, ATS019
3	-	367 Manilla	-	ATS-003, ATS-012, ATS-013,ATS-020, ATS-027,ATS-031 ,ATS-041,ATS-052, ATS-057,ATS-066
4	-	320(410) Light brown	-	ATS-004,ATS-054
5	694 Dove grey	384 Light straw	-	ATS-005,ATS-010, ATS-025
6	627 Light aircraftgrey	358 Light buff	361 Light stone	ATS-006,ATS-021, ATS-029,ATS-030, ATS-035,ATS-037, ATS-040,ATS-047
7	-	541 Maroon	-	ATS-007
8	White	542 Ruby	106 Royal blue	ATS-009,ATS-028 ,ATS-038,ATS-045, ATS-060,ATS-063

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A9. Continuación.

Grupo de color	Color			Miembros
	Micelio Aéreo	Micelio de Sustrato	Pigmento Difusible	
9	-	361 Light stone	-	ATS-011,ATS-059
10	-	White	-	ATS-014,ATS-032, ATS-058,ATS-061, ATS-065,ATS-069
11	White	388 Beige	-	ATS-015,ATS-016, ATS-024
12	365 Vellum	384 Light straw	-	ATS-017,ATS-036
13	White	677 Darkweather work grey	105 Oxford Blue	ATS-018,ATS-039, ATS-044
14	627 Light aircraftgrey	106 Royal blue	-	ATS-022,ATS-049
15	677 Darkweather work grey	414 Golden Brown	105 Oxford Blue	ATS-023,ATS-026 ATS-043,ATS-056
16	627 Light aircraftgrey	642 Night	106 Royal blue	ATS-008
17	White	358 Light buff	-	ATS-033
18	White	352 Pale cream	-	ATS-042
19	White	367 Manilla	-	ATS-051

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A10. Grupos de color formados por los actinomicetes aislados del rizopiano del Trébol blanco.

Grupo de color	Color			Miembros
	Micelio Aéreo	Micelio de Sustrato	Pigmento Difusible	
1	389 Camouflage beige	361 Light stone	320(410) Lightbrown	ATR-007, ATR008, ATR009, ATR-010
2	White	320(410) Light brown	Golden brown	ATR-003, ATR015,ATR-018, ATR-019
3	627 Light aircraft grey	White	361 Light stone	ATR-004, ATR-011, ATR-022, ATR-023
4	-	557 Light orange	-	ATR-001, ATR-016, ATR-024
5	White	388 Beige	-	ATR-005, ATR- 006, ATR-012, ATR-013, ATR- 014
6	-	White	-	ATR-002
7	-	361 Light stone	-	ATR-017
8	White	320(410) Light brown	411 Middle brown	ATR-020
9	627 Light aircraft grey	367 Manilla	-	ATR-021

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Antagonismo de actinomicetes frente a hongos fitopatógenos, bacterias y levaduras

Tabla A11. Actinomicetes que no presentaron actividad antimicrobiana.

N°	Código	Origen
1	ATS 001	Rizósfera
2	ATS-002	Rizósfera
3	ATS-003	Rizósfera
4	ATS-004	Rizósfera
5	ATS-011	Rizósfera
6	ATS-012	Rizósfera
7	ATS-014	Rizósfera
8	ATS-015	Rizósfera
9	ATS-016	Rizósfera
10	ATS-019	Rizósfera
11	ATS-022	Rizósfera
12	ATS-024	Rizósfera
13	ATS-025	Rizósfera
14	ATS-032	Rizósfera
15	ATS-033	Rizósfera
16	ATS -036	Rizósfera
17	ATS-041	Rizósfera
18	ATS-046	Rizósfera

Tabla A11. Continuación.

N°	Código	Origen
19	ATS-049	Rizósfera
20	ATS-051	Rizósfera
21	ATS-054	Rizósfera
22	ATS-055	Rizósfera
23	ATS-057	Rizósfera
24	ATS-058	Rizósfera
25	ATS-059	Rizósfera
26	ATS-061	Rizósfera
27	ATS-062	Rizósfera
28	ATS-065	Rizósfera
29	ATS-069	Rizósfera
30	ATR-001	Rizoplano
31	ATR-002	Rizoplano
32	ATR-012	Rizoplano
33	ATR-013	Rizoplano
34	ATR-016	Rizoplano
35	ATR-020	Rizoplano
36	ATR-021	Rizoplano
37	ATR-024	Rizoplano

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A12. Actinomicetes que presentaron actividad microbiana.

N°	Código	<i>Botrytis</i> (inhibicion)	<i>Fusarium</i> (inhibicion)	<i>Rhizoctonia</i> (inhibicion)	Levadura (inhibicion)	Gram + (inhibicion)	Gram - (inhibicion)
1	ATS-005	-	-	+	-	-	+
2	ATS-006	-	+	+	-	-	+
3	ATS-007	-	-	+	-	-	+
4	ATS-008	-	-	+	-	-	-
5	ATS-009	+	-	-	-	-	-
6	ATS-010	+	-	-	-	-	-
7	ATS-013	-	+	+	-	-	-
8	ATS-017	+	-	-	-	-	+
9	ATS-018	+	-	-	-	-	+
10	ATS-020	-	+	-	-	+	+
11	ATS-021	-	-	-	-	+	-
12	ATS-023	-	+	+	-	-	-
13	ATS-026	+	-	-	-	-	+
14	ATS-027	+	+	-	-	-	+
15	ATS-028	-	-	-	-	+	-
16	ATS-029	+	+	-	-	-	-
17	ATS-030	-	-	-	-	+	+
18	ATS-031	+	-	-	-	-	-
19	ATS-034	-	+	-	-	-	-
20	ATS-035	+	+	-	-	+	-
21	ATS-037	-	-	+	-	-	-
22	ATS-038	-	-	-	-	+	-
23	ATS-039	+	-	-	-	+	+
24	ATS-040	+	+	+	-	+	+
25	ATS-042	+	-	-	-	-	-

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A12. Continuación.

N°	Código	<i>Botrytis</i> (inhibicion)	<i>Fusarium</i> (inhibicion)	<i>Rhizoctonia</i> (inhibicion)	Levadura (inhibicion)	Gram + (inhibicion)	Gram - (inhibicion)
26	ATS-043	-	-	+	-	+	+
27	ATS-044	-	-	+	-	+	+
28	ATS-045	+	-	+	-	+	-
29	ATS-047	+	+	-	-	-	-
30	ATS-048	-	-	+	-	+	-
31	ATS-050	-	-	+	-	-	-
32	ATS-052	-	-	-	-	-	+
33	ATS-053	+	-	-	-	+	+
34	ATS-056	+	-	-	-	-	+
35	ATS-059	-	+	-	-	-	-
36	ATS-060	+	-	+	-	+	-
37	ATS-063	+	-	-	-	-	-
38	ATS-064	-	+	-	-	-	+
39	ATS-066	-	-	-	-	-	+
40	ATS-067	+	-	-	-	-	+
41	ATS-068	-	-	+	-	-	-
42	ATS-069	+	-	-	-	-	+
43	ATR-003	+	+	+	-	-	-
44	ATR-004	+	+	-	-	-	-
45	ATR-007	-	+	+	-	-	-
46	ATR-008	-	-	+	-	-	-
47	ATR-009	-	+	+	-	-	-
48	ATR-010	+	-	+	-	-	-
49	ATR-011	+	-	+	-	-	-
50	ATR-014	-	-	-	-	+	+

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A12. Continuación.

N°	Código	<i>Botrytis</i> (inhibicion)	<i>Fusarium</i> (inhibicion)	<i>Rhizoctonia</i> (inhibicion)	Levadura (inhibicion)	Gram + (inhibicion)	Gram - (inhibicion)
51	ATR-015	-	-	+	-	-	-
52	ATR-017	-	-	-	-	+	+
53	ATR-018	-	-	+	-	-	-
54	ATR-019	-	-	+	-	-	-
55	ATR-022	+	-	+	-	-	-
56	ATR-023	-	-	+	-	-	-

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A13. Tipo de actividad y ubicación de los miembros respectivos.

Tipo de actividad	# de individuos	Códigos de los miembros
Amplio espectro	1	ATS-040
Fungicida	1	ATR-003
Anti- <i>Fusarium</i>	2	ATS-034,ATS-059
Anti-Gram negativa	2	ATS-052,ATS-066
Anti-Gram positiva	3	ATS-021,ATS-027,ATS-038
Bactericida	3	ATS-030,ATR-014,ATR-017
Anti- <i>Botrytis</i>	4	ATS-009,ATS-010,ATS-042,ATS-063
Anti- <i>Rhizoctonia</i>	9	ATS-008,ATS-037,ATS-050,ATS-068,ATR-008,ATR-015,ATR-018,ATR-019,ATR-023
Otro tipo de actividad	31	ATS-005,ATS-006,ATS-007,ATS-013,ATS-017,ATS-018,ATS-020,ATS-023,ATS-026,ATS-028,ATS-029,ATS-031,ATS-035,ATS-039,ATS-043,ATS-044,ATS-045,ATS-047,ATS-048,ATS-053,ATS-056,ATS-060,ATS-064,ATS-067,ATS-069,ATR-004,ATR-007,ATR-009,ATR-010,ATR-011,ATR-022

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A13. Continuación.

Tipo de actividad	# de individuos	Códigos de los miembros
Nula	37	ATS-001,ATS-002,ATS-003,ATS-004,ATS-011,ATS-012,ATS-014,ATS-015,ATS-016,ATS-019,ATS-022,ATS-024,ATS-025,ATS-032,ATS-033,ATS-036,ATS-041,ATS-046,ATS-049,ATS-051,ATS-054,ATS-055,ATS-057,ATS-058,ATS-061,ATS-062,ATS-065,ATR-001,ATR-002,ATR-005,ATR-006,ATR-012,ATR-013,ATR-016,ATR-020,ATR-021,ATR-024

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A14. Diámetros de inhibición (mm) producidos por actinomicetes frente a *Botrytis*.

Código	R1	R2
ATS-009	40	38
ATS-010	15	15
ATS-017	11	20
ATS-018	15	13
ATS-026	40	38
ATS-027	20	23
ATS-029	18	10
ATS-031	24	25
ATS-035	16	18
ATS-039	22	23
ATS-040	18	25

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A14. Continuación.

Código	R1	R2
ATS-045	22	25
ATS-047	14	14
ATS-053	17	19
ATS-056	24	17
ATS-060	19	16
ATS-063	26	17
ATS-067	10	10
ATS-069	14	11
ATR-003	18	15
ATR-004	26	29
ATR-010	33	28
ATR-011	40	38
ATR-022	24	23
Control	40	38

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A15. Diámetros de inhibición (mm) producidos por actinomicetes frente a *Fusarium*.

Código	R1	R2
ATS-006	15	14
ATS-013	10	9

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A15. Continuación.

Código	R1	R2
ATS-029	11	11
ATS-034	12	13
ATS-035	10	10
ATS-040	11	14
ATS-047	14	14
ATS-064	14	10
ATR-003	13	17
ATR-004	26	29
ATR-007	10	9
ATR-009	16	17
Control	6	9

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A16. Diámetros de inhibición (mm) producidos por actinomicetes frente a *Rhizoctonia*.

Código	R1	R2
ATS-005	23	16
ATS-006	19	28
ATS-007	19	20

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A16. Continuación.

Código	R1	R2
ATS-008	10	13
ATS-013	10	11
ATS-023	15	17
ATS-037	29	35
ATS-040	30	28
ATS-043	26	30
ATS-044	28	30
ATS-045	30	33
ATS-048	13	16
ATS-050	30	28
ATS-060	30	33
ATS-068	24	25
ATR-003	24	22
ATR-007	24	24
ATR-008	19	19
ATR-009	16	13
ATR-010	19	24
ATR-011	18	17
ATR-015	30	29

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A16. Continuación.

Código	R1	R2
ATR-018	30	30
ATR-019	20	16
ATR-022	20	23
ATR-023	20	23
Control	37	35

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A17. Diámetros de inhibición (mm) producidos por actinomicetes frente a la bacteria Gram positiva.

Código	R1	R2
ATS-020	9	7
ATS-021	16	15
ATS-028	14	14
ATS-030	8	12
ATS-035	16	18
ATS-038	11	14
ATS-039	10	10
ATS-040	14	11
ATS-043	9	14

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A17. Continuación.

Código	R1	R2
ATS-044	9	10
ATS-045	8	10
ATS-048	14	11
ATS-053	9	7
ATS-060	13	13
ATR-014	21	20
ATR-017	15	12
Control	25	24

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A18. Diámetros de inhibición (mm) producidos por actinomicetes frente a la bacteria Gram negativa.

Código	R1	R2
ATS-005	17	16
ATS-006	16	18
ATS-007	30	30
ATS-017	18	20
ATS-018	10	9
ATS-020	13	10

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A18. Continuación.

Código	R1	R2
ATS-026	15	15
ATS-027	14	15
ATS-030	8	12
ATS-039	13	13
ATS-040	15	10
ATS-043	14	12
ATS-044	15	10
ATS-052	15	9
ATS-053	13	10
ATS-056	10	9
ATS-064	16	14
ATS-066	14	15
ATS-067	16	10
ATS-069	31	31
ATR-014	21	20
ATR-015	0	0
ATR-016	0	0
ATR-017	15	12
Control	36	37

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A19. Actinomicetes usados en las pruebas fenotípicas.

Código	pH	Origen
ATS-008	5.5	Rizósfera
ATS-009	5.5	Rizósfera
ATS-010	5.5	Rizósfera
ATS-017	5.5	Rizósfera
ATS-018	5.5	Rizósfera
ATS-020	5.5	Rizósfera
ATS-021	5.5	Rizósfera
ATS-023	5.5	Rizósfera
ATS-026	5.5	Rizósfera
ATS-027	5.5	Rizósfera
ATS-028	5.5	Rizósfera
ATS-030	5.5	Rizósfera
ATS-034	5.5	Rizósfera
ATS-043	5.5	Rizósfera
ATS-044	5.5	Rizósfera
ATS-048	5.5	Rizósfera
ATS-056	5.5	Rizósfera
ATS-063	5.5	Rizósfera
ATS-066	5.5	Rizósfera

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A19. Continuación.

Código	pH	Origen
ATS-067	5.5	Rizósfera
ATR-007	5.5	Rizoplano
ATR-008	5.5	Rizoplano
ATR-009	5.5	Rizoplano
ATR-010	5.5	Rizoplano
ATR-011	5.5	Rizoplano
ATR-022	5.5	Rizoplano
ATR-023	5.5	Rizoplano
ATS-005	8.5	Rizósfera
ATS-006	8.5	Rizósfera
ATS-007	8.5	Rizósfera
ATS-013	8.5	Rizósfera
ATS-029	8.5	Rizósfera
ATS-031	8.5	Rizósfera
ATS-035	8.5	Rizósfera
ATS-037	8.5	Rizósfera
ATS-038	8.5	Rizósfera
ATS-039	8.5	Rizósfera
ATS-040	8.5	Rizósfera

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A19. Continuación.

Código	pH	Origen
ATS-042	8.5	Rizósfera
ATS-045	8.5	Rizósfera
ATS-047	8.5	Rizósfera
ATS-050	8.5	Rizósfera
ATS-052	8.5	Rizósfera
ATS-053	8.5	Rizósfera
ATS-060	8.5	Rizósfera
ATS-064	8.5	Rizósfera
ATS-068	8.5	Rizósfera
ATR-003	8.5	Rizoplano
ATR-004	8.5	Rizoplano
ATR-015	8.5	Rizoplano
ATR-018	8.5	Rizoplano
ATR-019	8.5	Rizoplano

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A20. Número de actinomicetes que presentaron crecimiento de acuerdo a diferentes valores de temperatura.

Código	4 °C	28 °C	37 °C	50 °C	Clasificación
ATS-005	0	1	0	0	Mesófilo
ATS-006	0	1	1	1	Termófilo
ATS-007	0	1	0	0	Mesófilo
ATS-008	0	1	1	0	Mesófilo
ATS-009	0	1	1	1	Termófilo
ATS-010	0	1	1	0	Mesófilo
ATS-013	0	1	1	1	Termófilo
ATS-017	0	1	1	0	Mesófilo
ATS-018	0	1	1	1	Termófilo
ATS-020	0	1	0	0	Mesófilo
ATS-021	0	1	1	0	Mesófilo
ATS-023	0	1	1	0	Mesófilo
ATS-026	0	1	0	0	Mesófilo
ATS-027	0	1	1	1	Termófilo
ATS-028	0	1	0	0	Mesófilo
ATS-029	0	1	1	1	Termófilo
ATS-030	0	1	1	1	Termófilo
ATS-031	0	1	1	1	Termófilo

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A20. Continuación.

Código	4 °C	28 °C	37 °C	50 °C	Clasificación
ATS-034	0	1	1	0	Mesófilo
ATS-035	0	1	1	1	Termófilo
ATS-037	0	1	1	1	Termófilo
ATS-038	1	1	1	0	Mesófilo
ATS-039	0	1	1	0	Mesófilo
ATS-040	0	1	1	0	Mesófilo
ATS-042	0	1	1	1	Termófilo
ATS-043	0	1	1	1	Termófilo
ATS-044	1	1	1	0	Mesófilo
ATS-045	0	1	1	1	Termófilo
ATS-047	0	1	1	1	Termófilo
ATS-048	0	1	0	0	Mesófilo
ATS-050	0	1	1	0	Mesófilo
ATS-052	0	1	0	0	Mesófilo
ATS-053	1	1	1	0	Mesófilo
ATS-056	0	1	1	0	Mesófilo
ATS-060	0	1	1	0	Mesófilo
ATS-063	0	1	1	1	Termófilo
ATS-064	0	1	0	0	Mesófilo

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A20. Continuación.

Código	4 °C	28 °C	37 °C	50 °C	Clasificación
ATS-066	0	1	1	0	Mesófilo
ATS-067	1	1	1	0	Mesófilo
ATS-068	0	1	1	1	Termófilo
ATR-003	0	1	1	1	Termófilo
ATR-004	0	1	1	0	Mesófilo
ATR-007	0	1	1	0	Mesófilo
ATR-008	0	1	1	0	Mesófilo
ATR-009	0	1	1	0	Mesófilo
ATR-010	0	1	1	0	Mesófilo
ATR-011	0	1	0	0	Mesófilo
ATR-015	0	1	1	0	Mesófilo
ATR-018	0	1	0	0	Mesófilo
ATR-019	0	1	0	0	Mesófilo
ATR-022	0	1	1	0	Mesófilo
ATR-023	0	1	0	0	Mesófilo

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A21. Numero de actinomicetes que presentaron crecimiento de acuerdo a diferentes valores de pH.

Código	pH medio aislamiento	3.5	4.5	5.5	6.5	7.5	8.5	9.5	Clasificación
ATS-005	8.5	0	0	0	0	1	1	1	alcalitolerante
ATS-006	8.5	0	0	0	0	1	1	1	alcalitolerante
ATS-007	8.5	0	0	0	0	1	1	1	alcalitolerante
ATS-008	5.5	0	0	1	0	0	0	0	acidofílico
ATS-009	5.5	0	1	1	1	1	0	0	neutrotolerante
ATS-010	5.5	0	1	1	1	1	0	0	neutrotolerante
ATS-013	8.5	0	0	0	0	1	1	1	alcalitolerante
ATS-017	5.5	0	0	1	1	0	0	0	acidofílico
ATS-018	5.5	0	0	1	0	0	0	0	acidofílico
ATS-020	5.5	0	0	1	0	0	0	0	acidofílico
ATS-021	5.5	0	1	1	1	1	0	0	neutrotolerante
ATS-023	5.5	0	1	1	1	0	0	0	acidofílico
ATS-026	5.5	0	0	1	0	0	0	0	acidofílico
ATS-027	5.5	0	1	1	1	1	0	0	neutrotolerante
ATS-028	5.5	0	0	1	1	1	0	0	neutrotolerante
ATS-029	8.5	0	0	0	0	1	1	0	alcalitolerante

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A21. Continuación.

Código	pH medio aislamiento								Clasificación
		3.5	4.5	5.5	6.5	7.5	8.5	9.5	
ATS-030	5.5	0	1	1	0	0	0	0	acidofílico
ATS-031	8.5	0	0	0	0	1	1	1	alcalitolerante
ATS-034	5.5	0	1	1	1	1	0	0	acidofílico
ATS-035	8.5	0	0	0	0	1	1	1	alcalitolerante
ATS-037	8.5	0	0	0	0	1	1	1	alcalitolerante
ATS-038	8.5	0	0	0	0	1	1	1	alcalitolerante
ATS-039	8.5	0	0	0	0	1	1	0	alcalitolerante
ATS-040	8.5	0	0	0	0	0	1	1	alcalitolerante
ATS-042	8.5	0	0	0	0	0	1	0	alcalitolerante
ATS-043	5.5	0	1	1	1	0	0	0	acidofílico
ATS-044	5.5	0	1	1	0	0	0	0	acidofílico
ATS-045	8.5	0	0	0	0	1	1	0	alcalitolerante
ATS-047	8.5	0	0	0	0	1	1	1	alcalitolerante
ATS-048	5.5	0	0	1	0	0	0	0	acidofílico
ATS-050	8.5	0	0	0	0	1	1	1	alcalitolerante
ATS-052	8.5	0	0	0	0	0	1	1	alcalitolerante
ATS-053	8.5	0	0	0	0	1	1	1	alcalitolerante

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A21. Continuación.

Código	pH medio aislamiento								Clasificación
		3.5	4.5	5.5	6.5	7.5	8.5	9.5	
ATS-056	5.5	0	1	1	1	1	0	0	neutrotolerante
ATS-060	8.5	0	0	0	0	1	1	1	alcalitolerante
ATS-063	5.5	0	1	1	1	1	0	0	neutrotolerante
ATS-064	8.5	0	0	0	0	1	1	1	alcalitolerante
ATS-066	5.5	0	1	1	1	1	0	0	neutrotolerante
ATS-067	5.5	0	1	1	1	1	0	0	neutrotolerante
ATS-068	8.5	0	0	0	0	1	1	1	alcalitolerante
ATR-003	8.5	0	0	0	0	1	1	1	alcalitolerante
ATR-004	8.5	0	0	0	0	1	1	1	alcalitolerante
ATR-007	5.5	0	1	1	1	0	0	0	acidofílico
ATR-008	5.5	0	1	0	0	0	0	0	acidofílico
ATR-009	5.5	0	1	1	1	1	0	0	neutrotolerante
ATR-010	5.5	0	1	1	0	0	0	0	acidofílico
ATR-011	5.5	0	1	1	1	1	0	0	neutrotolerante
ATR-015	8.5	0	0	0	0	1	1	1	alcalitolerante
ATR-018	8.5	0	0	0	0	1	1	1	alcalitolerante
ATR-019	8.5	0	0	0	0	0	1	1	alcalitolerante

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A21. Continuación.

Código	pH medio aislamiento								Clasificación
		3.5	4.5	5.5	6.5	7.5	8.5	9.5	
ATR-022	5.5	0	0	1	1	0	0	0	acidofílico
ATR-023	5.5	0	1	1	0	0	0	0	acidofílico

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A22. Producción de enzimas y crecimiento en aminoácido como fuente única de C y N.

Código	Producción de enzimas		Fuente única de Carbono y Nitrógeno	
	Quitina	Celúlosa	Ácido aspártico	Glicina
ATS-005	nd	nd	0	0
ATS-006	nd	0	1	1
ATS-007	0	0	1	1
ATS-008	0	0	1	1
ATS-009	0	0	1	1
ATS-010	nd	0	1	1
ATS-013	0	0	1	1
ATS-017	0	0	1	1
ATS-018	0	0	1	1

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A22. Continuación.

Código	Producción de enzimas		Fuente única de Carbono y Nitrógeno	
	Quitina	Celúlosa	Ácido aspártico	Glicina
ATS-020	0	0	1	0
ATS-021	0	0	1	1
ATS-023	0	0	1	1
ATS-026	nd	nd	0	0
ATS-027	0	0	1	1
ATS-028	0	1	1	1
ATS-029	0	0	1	1
ATS-030	0	0	1	1
ATS-031	0	0	0	1
ATS-034	0	0	1	1
ATS-035	0	1	1	1
ATS-037	1	1	1	1
ATS-038	0	0	1	1
ATS-039	0	1	1	1
ATS-040	1	1	1	1

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A22. Continuación.

Código	Producción de enzimas		Fuente única de Carbono y Nitrógeno	
	Quitina	Celúlosa	Ácido aspártico	Glicina
ATS-042	0	0	1	1
ATS-043	0	0	1	1
ATS-044	nd	nd	0	1
ATS-045	nd	0	1	1
ATS-047	0	1	1	1
ATS-048	nd	nd	0	0
ATS-050	0	1	1	1
ATS-052	0	0	1	1
ATS-053	0	0	1	1
ATS-056	0	0	1	1
ATS-060	0	0	0	1
ATS-063	0	1	1	1
ATS-064	nd	1	1	1
ATS-066	0	0	1	1

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A22. Continuación.

Código	Producción de enzimas		Fuente única de Carbono y Nitrógeno	
	Quitina	Celúlosa	Ácido aspártico	Glicina
ATS-067	0	0	1	1
ATS-068	nd	1	1	1
ATR-003	0	1	1	1
ATR-004	0	0	1	0
ATR-007	0	1	1	1
ATR-008	0	0	1	1
ATR-009	0	0	1	1
ATR-010	0	0	1	1
ATR-011	0	nd	1	0
ATR-015	0	0	1	0
ATR-018	0	0	1	0
ATR-019	0	0	1	1
ATR-022	0	1	1	1
ATR-023	0	0	1	1

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A23. Grupos especie formados luego del análisis de la taxonomía numérica de datos fenotípicos de los actinomicetes aislados de la rizósfera del Trébol blanco.

ID Grupo especie	Código
1	ATS-005
2	ATS-007, ATS-052
3	ATS-013, ATS-031
4	ATS-042
5	ATS-050, ATS-068
6	ATS-064
7	ATS-053
8	ATS-006, ATS-037
9	ATS-029, ATS-047, ATS-035
10	ATS-040
11	ATS-008
12	ATS-048
13	ATS-020
14	ATS-010
15	ATS-017
16	ATS-027, ATS-066
17	ATS-034
18	ATS-067
19	ATS-021, ATS-030

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A23. Continuación.

ID Grupo especie	Código
20	ATS-023
21	ATS-043
22	ATS-026
23	ATS-056
24	ATS-009, ATS-063
25	ATS-028
26	ATS-038, ATS-045, ATS-060
27	ATS-018
28	ATS-039
29	ATS-044

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A24. Grupos especie formados luego del análisis de la taxonomía numérica de datos fenotípicos de los actinomicetes aislados del rizoplaneo del trébol blanco.

ID Grupo especie	Código
1	ATR003
2	ATR015, ATR018, ATR019
3	ATR004
4	ATR011, ATR023

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla A24. Continuación.

ID Grupo especie	Código
5	ATR022
6	ATR007, ATR009
7	ATR008, ATR010

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

ANEXO B
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Tabla B1. Análisis de varianza para el número de ufc de actinomicetes por gramo de suelo seco (ufc/g).

Fuente de variación	g.l	SC	CM	Fc	Probabilidad
A: Origen de la muestra	1	5.38E+15	5.38E+15	112.8	0.000**
B: pH medio de cultivo	1	8.36E+14	8.36E+14	17.5	0.01**
AB	1	8.36E+14	8.37E+14	17.6	0.01**
Error	4	1.90E+14	4.77E+13		
Total	7				

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla B2. Separación de medias para el número de actinomicetes por gramo de suelo seco de la interacción A x B.

Tratamientos	Descripción	ufc/g suelo seco	Rango	
Interacción AB	a0b1	Rizósfera + pH 8.5	7.23E+07	a
	a0b0	Rizósfera + pH 5.5	3.14E+07	b
	a1b0	Rizoplano + pH 5.5	6.34E+03	c
	a1b1	Rizoplano + pH 8.5	2.93E+03	c

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla B3. Análisis de varianza para la diversidad de actinomicetes.

Fuente de variación	g.l	SC	CM	Fc	Probabilidad
A: Origen de la muestra	1	435.125	435.125	42.9753	0.000**
B: pH medio de cultivo	1	1.125	1.125	0.1111	ns
AB	1	0.125	0.125	0.0123	ns
Error	4	40.500	10.125		
Total	7				

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla B4. Análisis de varianza para el porcentaje de actinomicetes.

Fuente de variación	g.l	SC	CM	Fc	Probabilidad
A: Origen de la muestra	1	420.5	420.5	17.34	0.01**
B: pH medio de cultivo	1	32.0	32.0	1.32	ns
AB	1	32.0	32.0	1.32	ns
Error	4	97.0	24.25		
Total	7				

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla B5. Análisis de varianza del diámetro de inhibición de actinomicetes contra *Botrytis*.

Fuente de Variación	g.l	SC	CM	Fc	Probabilidad
Tratamientos	25	3962.31	158,492	18,82	0,0000**
Error	26	219.0	8,42308		
Total	51	4181.31			

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla B6. Separación de medias para el diámetro de zona de inhibición en *Botrytis*.

Tratamiento	Código	Diámetro (mm)	Rango
0	ATS-009	39,00	a
4	ATS-026	39,00	a
23	ATR-011	39,00	a
25	Control	39,00	a

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla B6. Continuación.

Tratamiento	Código	Diámetro (mm)	Rango
22	ATR-010	30,50	ab
21	ATR-004	27,50	abc
7	ATS-031	24,50	bcd
24	ATR-022	23,50	bcde
12	ATS-045	23,50	bcde
9	ATS-039	22,50	bcde
17	ATS-063	21,50	bcdef
10	ATS-040	21,50	bcdef
5	ATS-027	21,50	bcdef
15	ATS-056	20,50	bcdef
14	ATS-053	18,00	cdef
16	ATS-060	17,50	cdef
8	ATS-035	17,00	cdef
20	ATR-003	16,50	cdef
2	ATS-017	15,50	def
1	ATS-010	15,00	def

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla B6. Continuación.

Tratamiento	Código	Diámetro (mm)	Rango
3	ATS-018	14,00	def
13	ATS-047	14,00	def
6	ATS-029	14,00	def
19	ATS-069	12,50	ef
11	ATS-042	12,00	ef
18	ATS-067	10,00	f

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla B7. Análisis de varianza del diámetro de inhibición de actinomicetes contra *Fusarium*.

Fuente de Variación	g.l	SC	CM	Fc	Probabilidad
Tratamientos	16	815,765	50,9853	17,33	0,0000**
Error	17	50.0	2,94118		
Total	33	865,765			

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla B8. Separación de medias para el diámetro de zona de inhibición en *Fusarium*.

Tratamiento	Código	Diámetro (mm)	Rango
13	ATR-004	27,50	a
3	ATS-023	21,50	ab
15	ATR-009	16,50	bc
4	ATS-027	15,50	bcd
12	ATR-003	15,00	bcde
0	ATS-006	14,50	cde
9	ATS-047	14,00	cdef
8	ATS-040	12,50	cdef
6	ATS-034	12,50	cdef
11	ATS-064	12,00	cdef
5	ATS-029	11,00	cdef
7	ATS-035	10,00	cdef
10	ATS-059	9,50	def
14	ATR-007	9,50	def
1	ATS-013	9,50	def
2	ATS-020	8,50	ef
16	Control	7,50	f

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla B9. Análisis de varianza del diámetro de inhibición de actinomicetes contra *Rhizoctonia*.

Fuente de Variación	g.l	SC	CM	Fc	Probabilidad
Tratamientos	26	2412,0	92,7692	15,90	0,0000**
Error	27	157,5	5,83333		
Total	53	2569,5			

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla B10. Separación de medias para el diámetro de zona de inhibición en *Rhizoctonia*.

Tratamiento	Código	Diámetro (mm)	Rango
26	Control	36,00	a
6	ATS-037	32,00	ab
10	ATS-045	31,50	ab
13	ATS-060	31,50	ab
22	ATR-018	30,00	abc
21	ATR-015	29,50	abc
7	ATS-040	29,00	abcd
9	ATS-044	29,00	abcd
12	ATS-050	29,00	abcd
8	ATS-043	28,00	abcde
14	ATS-068	24,50	bcdef

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla B10. Continuación.

Tratamiento	Código	Diámetro (mm)	Rango
16	ATR-007	24,00	bcdefg
1	ATS-006	23,50	bcdefg
15	ATR-003	23,00	bcdefg
19	ATR-010	21,50	cdefg
24	ATR-022	21,50	cdefg
25	ATR-023	21,50	cdefg
2	ATS-007	19,50	defgh
0	ATS-005	19,50	defgh
17	ATR-008	19,00	efgh
23	ATR-019	18,00	fgh
20	ATR-011	17,50	fgh
5	ATS-023	16,00	fgh
18	ATR-009	14,50	gh
11	ATS-048	14,50	gh
3	ATS-008	11,50	h
4	ATS-013	10,50	h

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla B11. Análisis de varianza del diámetro de inhibición de actinomicetes contra bacteria Gram positiva.

Fuente de Variación	g.l	SC	CM	Fc	Probabilidad
Tratamientos	16	622,471	38,9044	13,64	0,0000**
Error	17	48,5	2,85924		
Total	33	670,971			

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla B12. Separación de medias para el diámetro de zona de inhibición en la bacteria Gram positiva.

Tratamiento	Código	Diámetro (mm)	Rango
16	Control	24,50	a
14	ATR-014	20,50	ab
4	ATS-035	17,00	bc
1	ATS-021	15,50	bcd
2	ATS-028	14,00	bcde
15	ATR-017	13,50	cde
13	ATS-060	13,00	cde
11	ATS-048	12,50	cde
5	ATS-038	12,50	cde
7	ATS-040	12,50	cde

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla B12. Continuación.

Tratamiento	Código	Diámetro (mm)	Rango
8	ATS-043	11,50	cde
3	ATS-030	10,00	ef
6	ATS-039	10,00	ef
9	ATS-044	9,50	ef
10	ATS-045	9,00	ef
12	ATS-053	8,00	f
0	ATS-020	8,00	f

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla B13. Análisis de varianza del diámetro de inhibición de actinomicetes contra bacteria Gram negativa.

Fuente de Variación	g.l	SC	CM	Fc	Probabilidad
Tratamientos	22	2225,22	101,146	24,75	0,0000**
Error	23	94,0	4,08696		
Total	45	2319,22			

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla B14. Separación de medias para el diámetro de zona de inhibición en la bacteria Gram negativa.

Tratamiento	Código	Diámetro (mm)	Rango
22	Control	36,50	a
19	ATS-069	31,00	a
2	ATS-007	30,00	a
20	ATR-014	20,50	b
3	ATS-017	19,00	bc
1	ATS-006	17,00	bcd
0	ATS-005	16,50	bcd
16	ATS-064	15,00	bcd
6	ATS-026	15,00	bcd
7	ATS-027	14,50	bcd
17	ATS-066	14,50	bcd
21	ATR-017	13,50	bcd
9	ATS-039	13,00	bcd
18	ATS-067	13,00	bcd
11	ATS-043	13,00	bcd
10	ATS-040	12,50	bcd

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla B14. Continuación.

Tratamiento	Código	Diámetro (mm)	Rango
12	ATS-044	12,50	bcd
13	ATS-052	12,00	cd
14	ATS-053	11,50	cd
5	ATS-020	11,50	cd
8	ATS-030	10,00	d
15	ATS-056	9,50	d
4	ATS-018	9,50	d

Elaborado por: Ricardo Caicedo, 2011.

Tabla B15. Matriz de código binario usada para taxonomía numérica de los actinomicetes aislados de la rizósfera y rizoplano del Trébol blanco.

Página siguiente.

ANEXO C

GRÁFICOS

Figura C1. Número de ufc/g de suelo seco de actinomicetes, diversidad y porcentaje de actinomicetes para el Factor A.

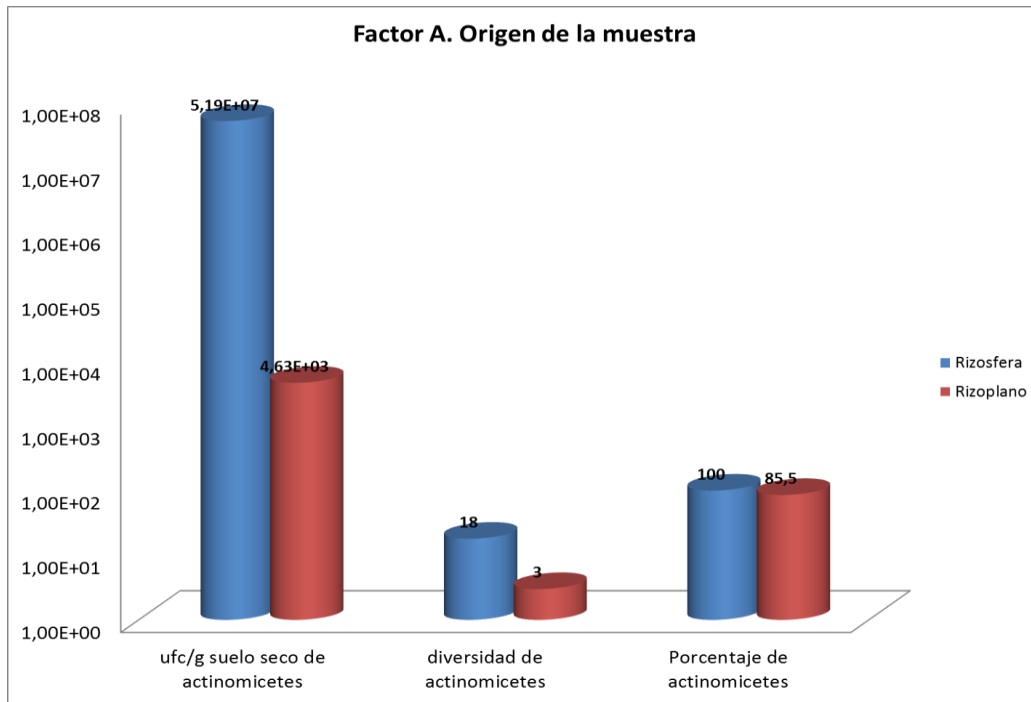


Figura C2. Número de ufc/g de suelo seco de actinomicetes, diversidad y porcentaje de actinomicetes para el Factor B.

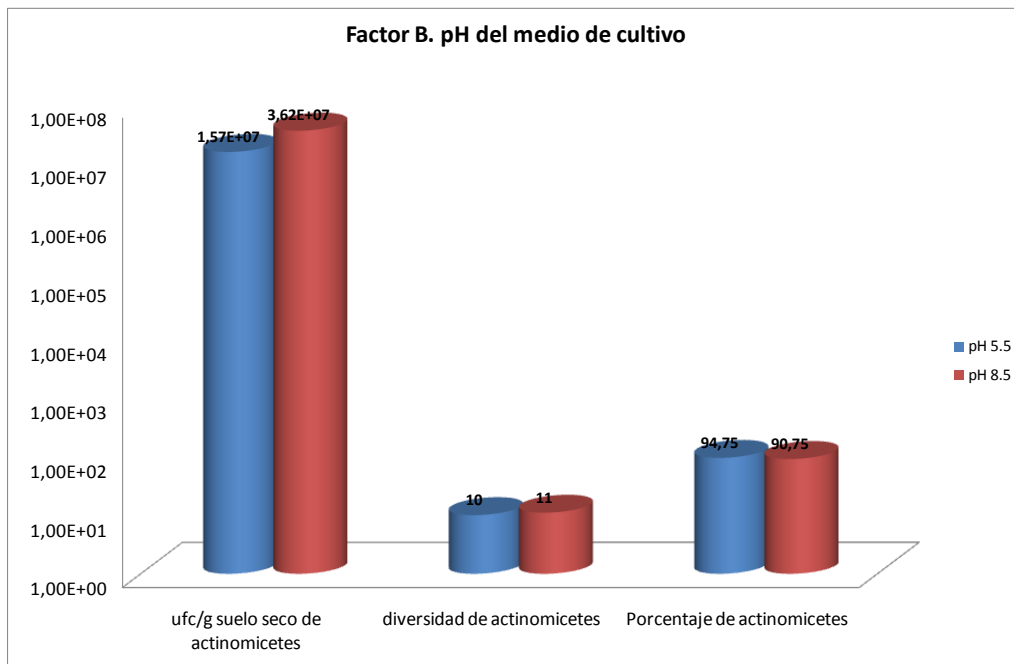


Figura C3. Número de ufc/g de suelo seco de actinomicetes, diversidad y porcentaje de actinomicetes para la interacción AB.

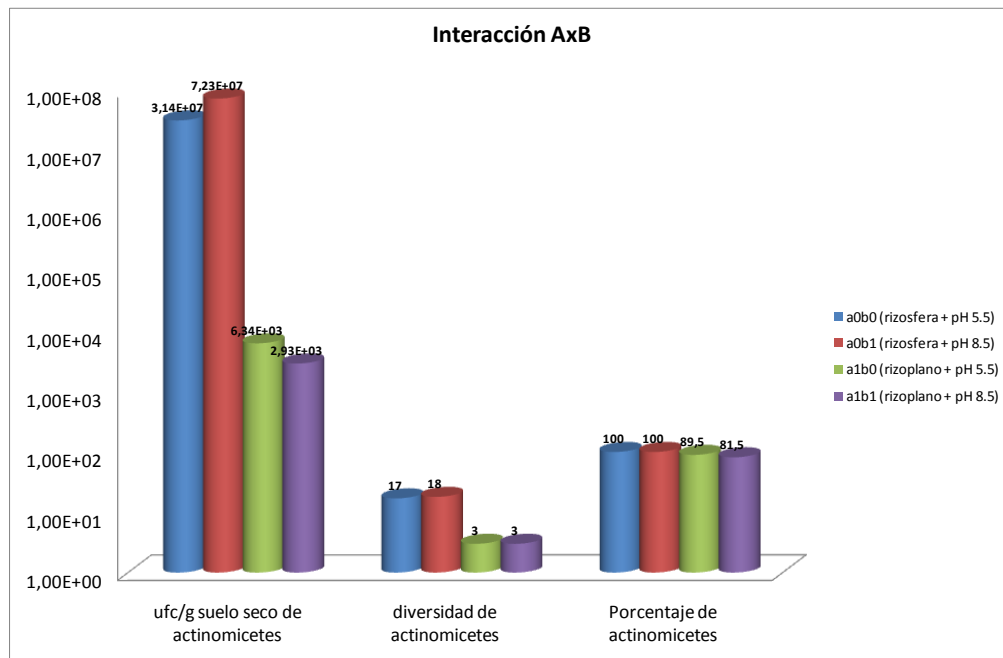


Figura C4. Caracterización microscópica de actinomicetes.

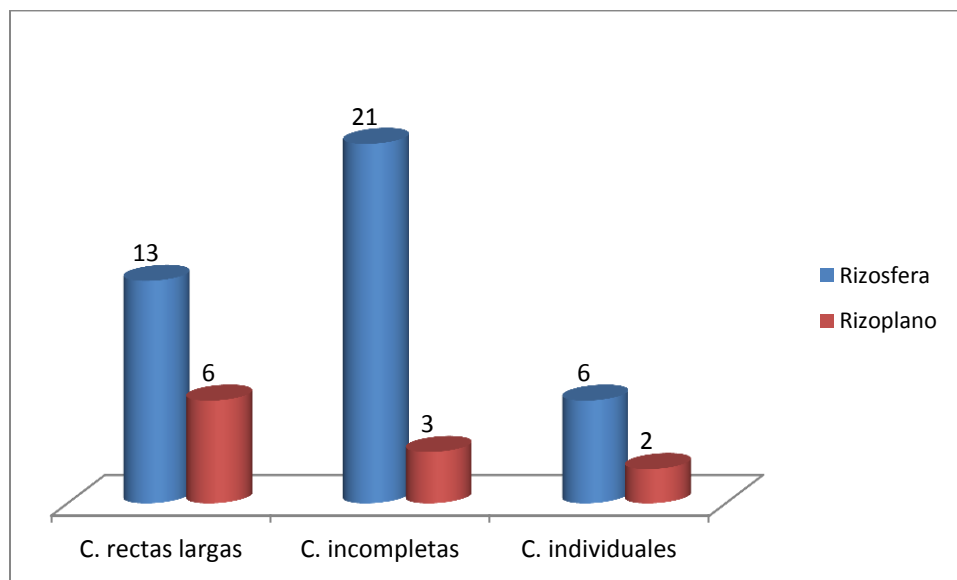


Figura C5. Número de individuos por cada tipo de actividad.

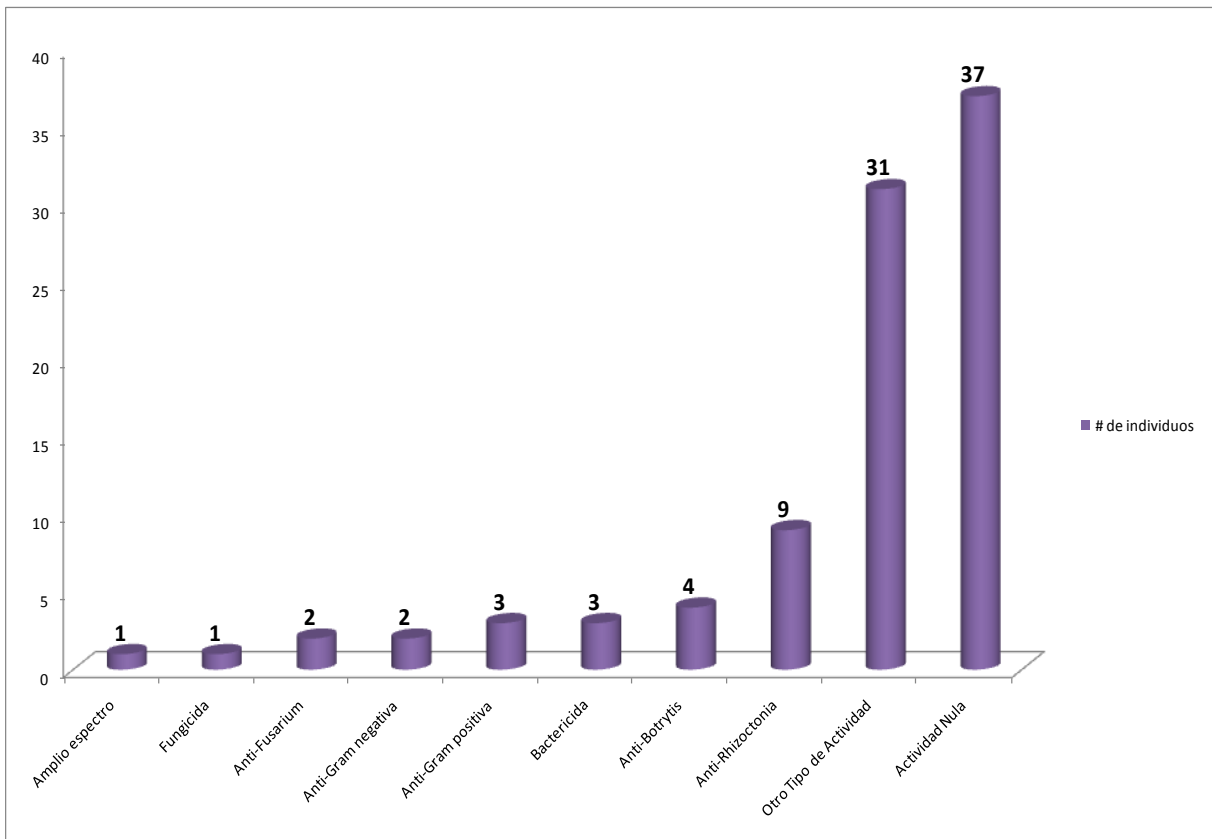


Figura C6. Número de actinomicetes de acuerdo a su temperatura de crecimiento.

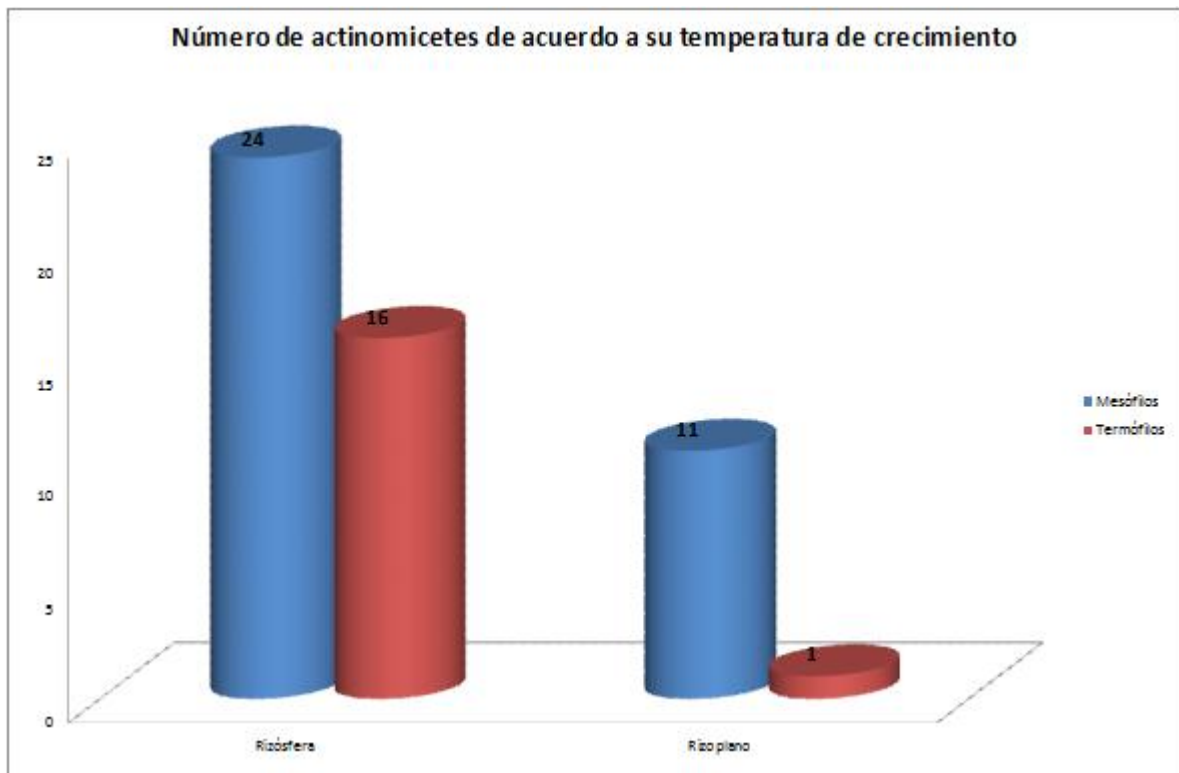


Figura C7. Número de actinomicetes de acuerdo al pH de crecimiento.

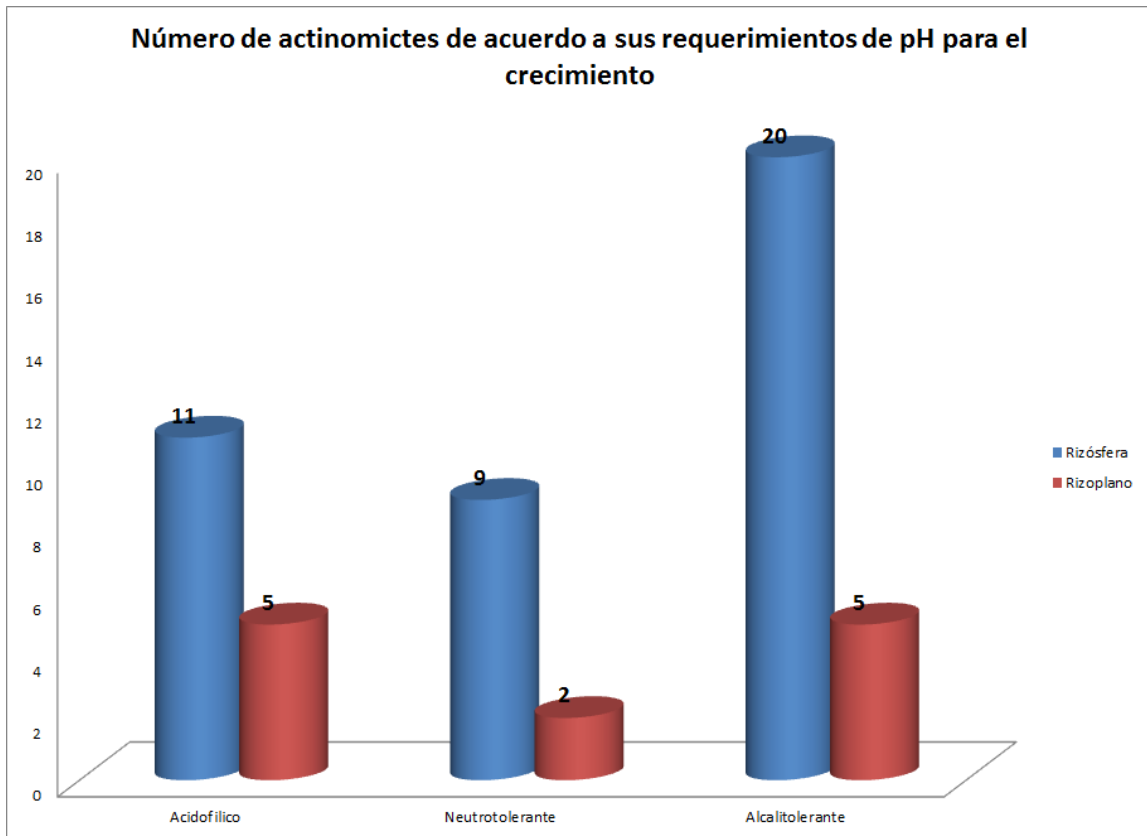


Figura C8. Producción de enzimas y crecimiento en aminoácidos como fuente única de C y N.

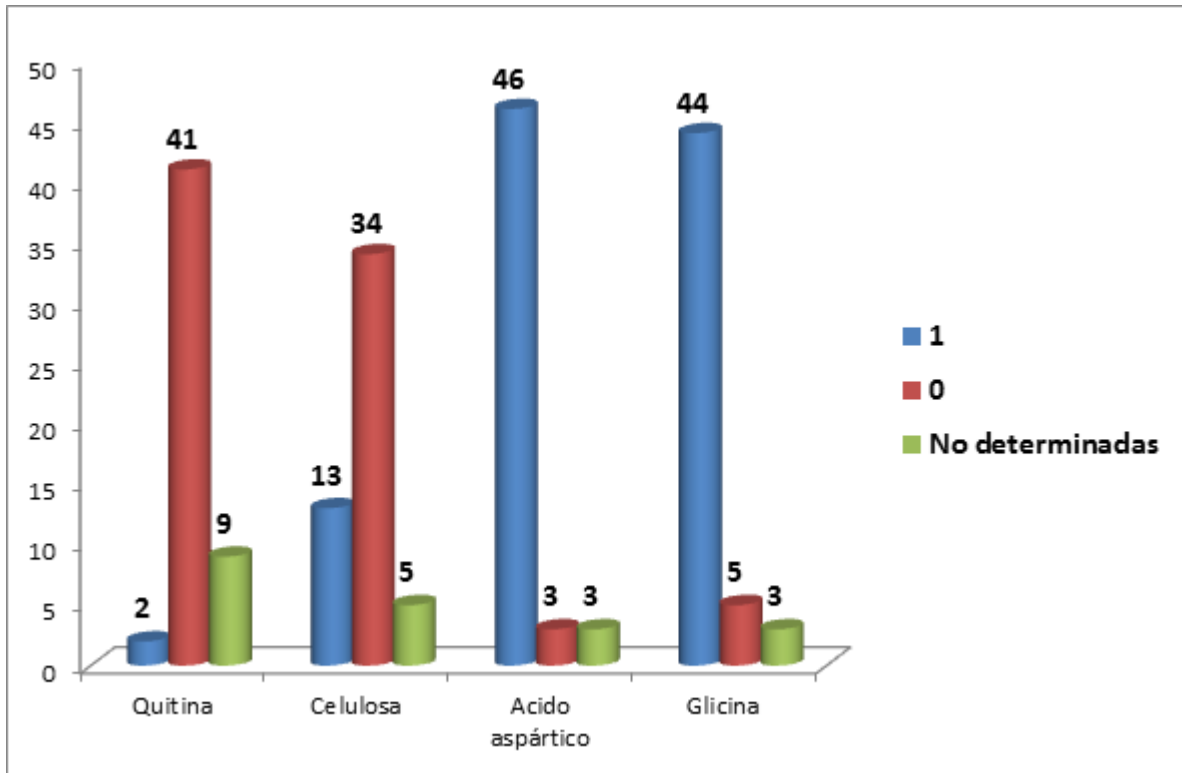
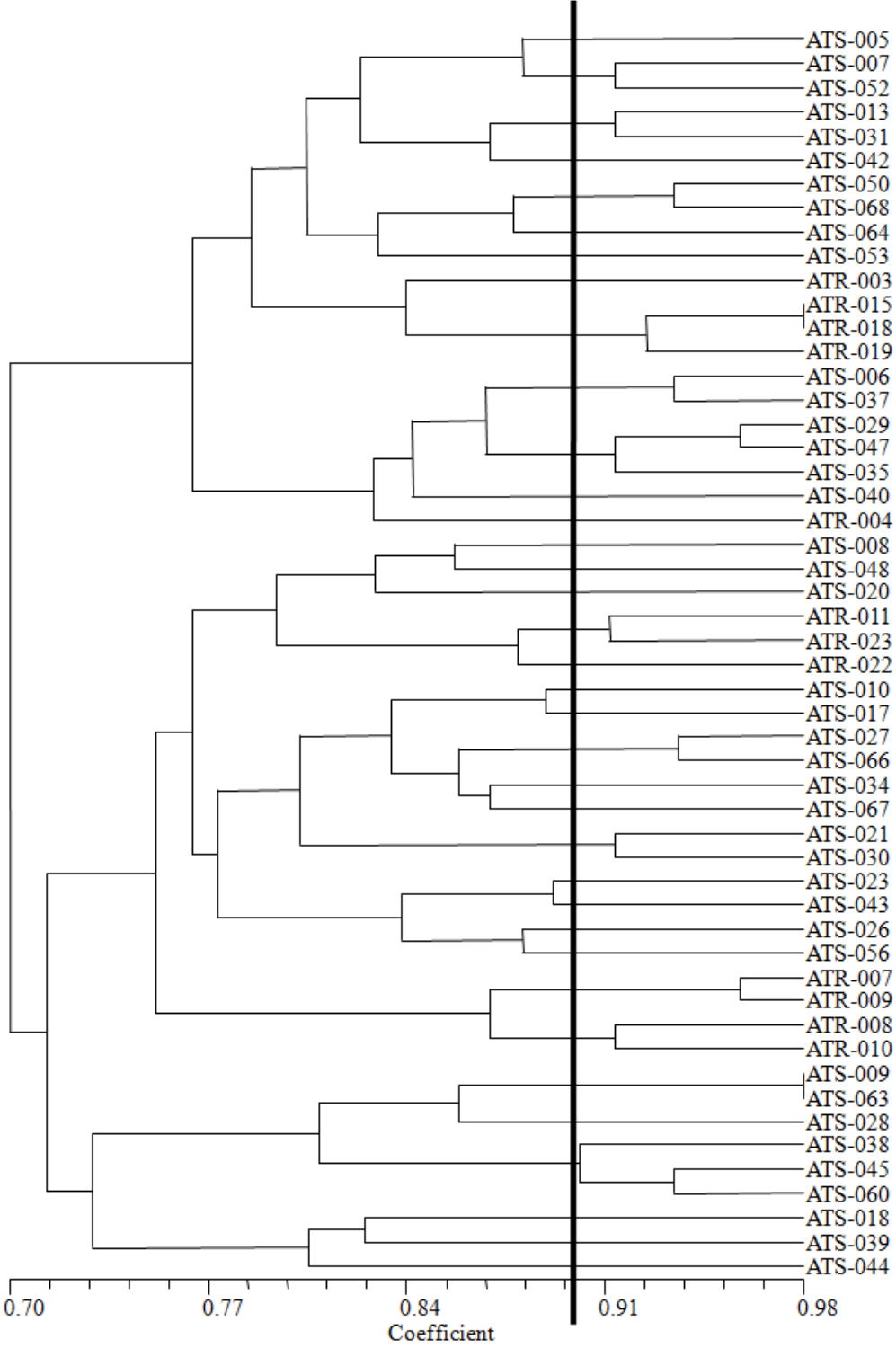


Figura C9. Dendrograma basado en la similitud calculada con el coeficiente de simple coincidencia de 52 actinomicetes aislados de la rizósfera y rizopiano del trébol blanco.



ANEXO D

MEDIOS DE CULTIVO Y

SOLUCIONES

MEDIOS DE CULTIVO

Agar GYM

Glucosa	4.00 g
Extracto de levadura	10.00 g
Extracto de malta	10.00 g
CaCO ₃	2.00 g
Agar	15.00 g
Agua	1000.00 ml

Agar nutriente

Agar nutriente	23.00 g
Agua	1000.00 ml

Medio Basal para Fuentes de Carbono y Nitrógeno

Aminoácido	1.00 g
K ₂ HPO ₄	0.50 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.50 g
Agar	15.00 g
Agua	1000.00 ml

BUFERS

Búfer de Fosfato di Básico de Sodio y Ácido Cítrico

Solución de Ácido cítrico 0.1 M (PM: 210.14 g)

Solución de Fosfato di básico de Sodio 0.2 M (PM: 141.98 g)

Se prepara un volumen final de 100 ml:

pH	0.1 M Ácido Cítrico (ml)	0.2 M Na₂HPO₄ (ml)
2.6	89.10	10.90
3.0	79.45	20.55
3.5	69.75	30.25
4.0	61.45	38.55
4.5	54.57	45.43
5.0	48.50	51.50
5.5	43.13	56.87
6.0	36.85	63.15
6.5	29.04	70.96
7.0	17.65	82.35
7.5	7.62	92.38

Búfer de Hidróxido de Sodio y Ácido Bórico

Solución de Hidróxido de Sodio 0.2 M (PM: 40.00 g)

Solución de Ácido Bórico 0.2 M (PM: 61.80 g)

Se prepara un volumen final de 100 ml:

pH	0.2 M Ácido Bórico (ml)	0.2 M NaOH (ml)
8.5	75.00	25.00
9.5	55.00	45.00

ANEXO C

GRÁFICOS

Figura C1. Número de ufc/g de suelo seco de actinomicetes, diversidad y porcentaje de actinomicetes para el Factor A.

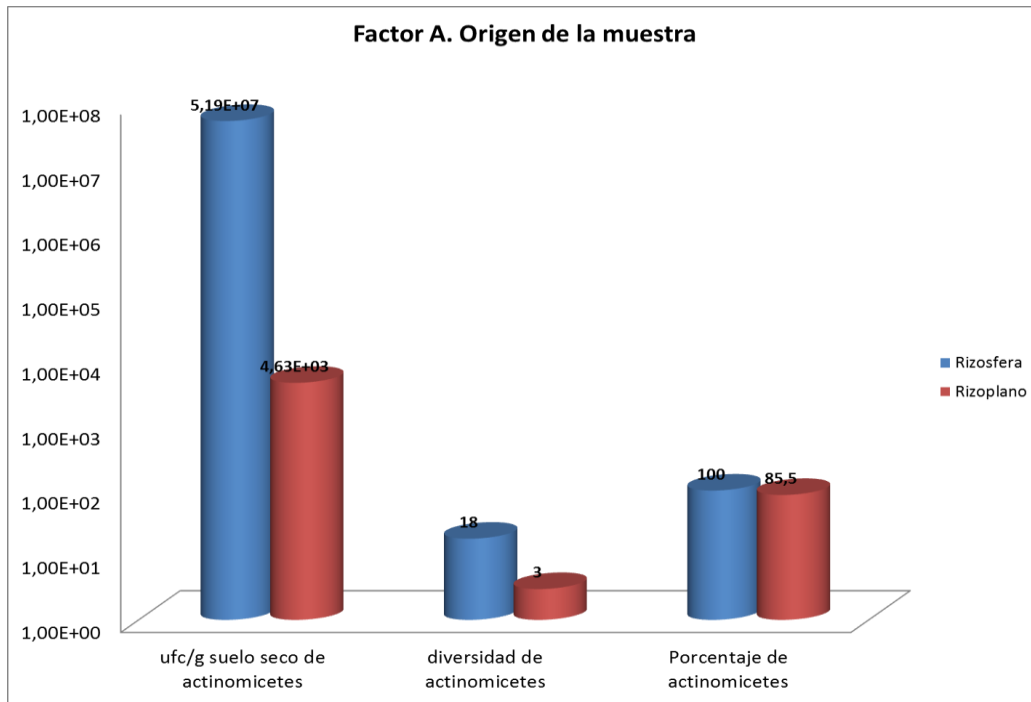


Figura C2. Número de ufc/g de suelo seco de actinomicetes, diversidad y porcentaje de actinomicetes para el Factor B.

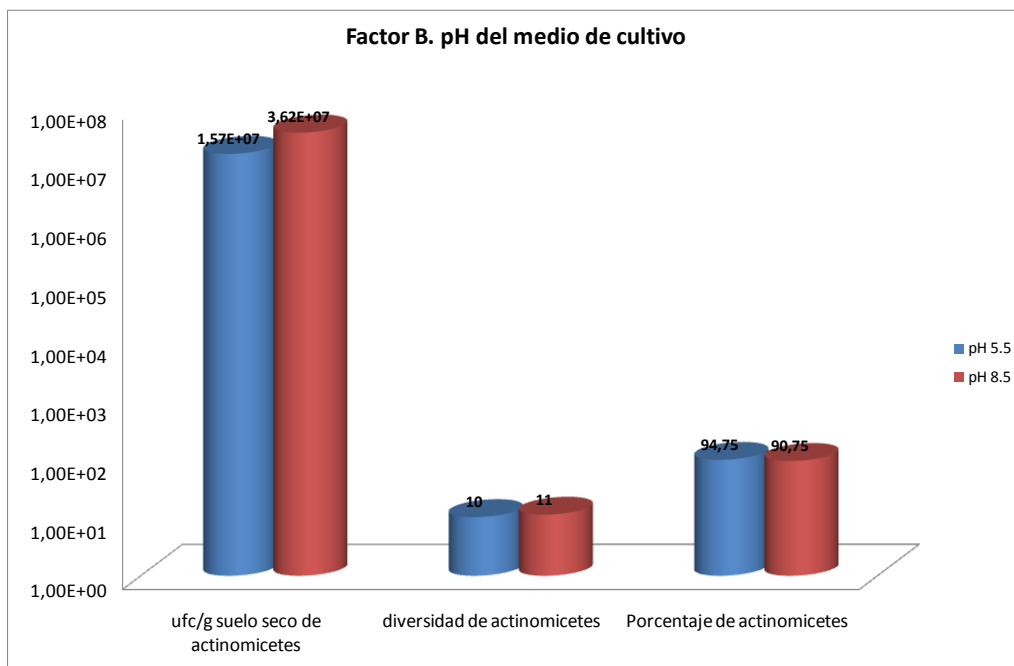


Figura C3. Número de ufc/g de suelo seco de actinomicetes, diversidad y porcentaje de actinomicetes para la interacción AB.

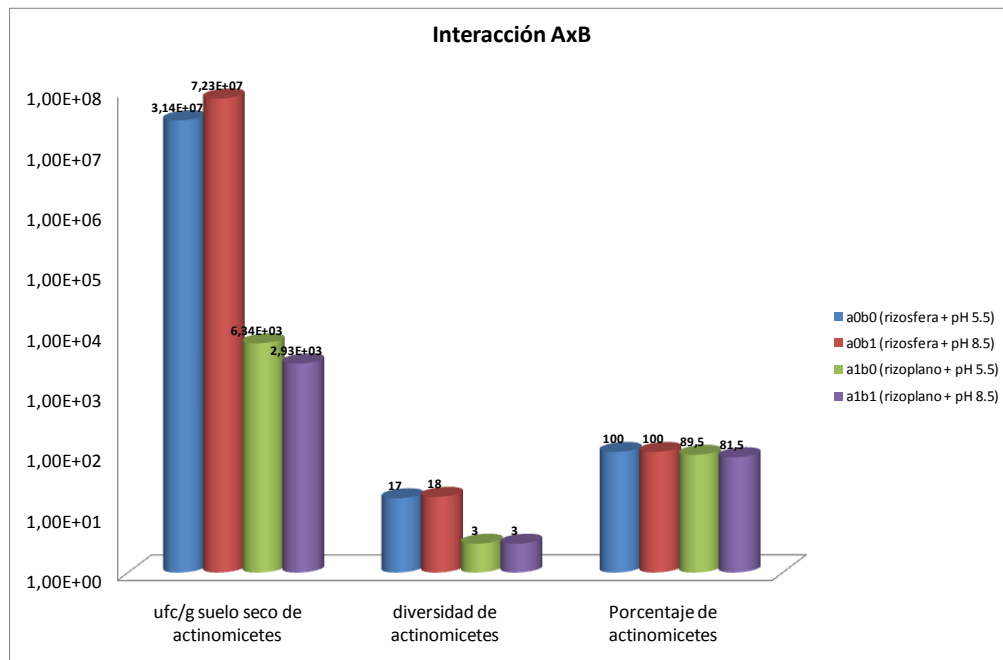


Figura C4. Caracterización microscópica de actinomicetes.

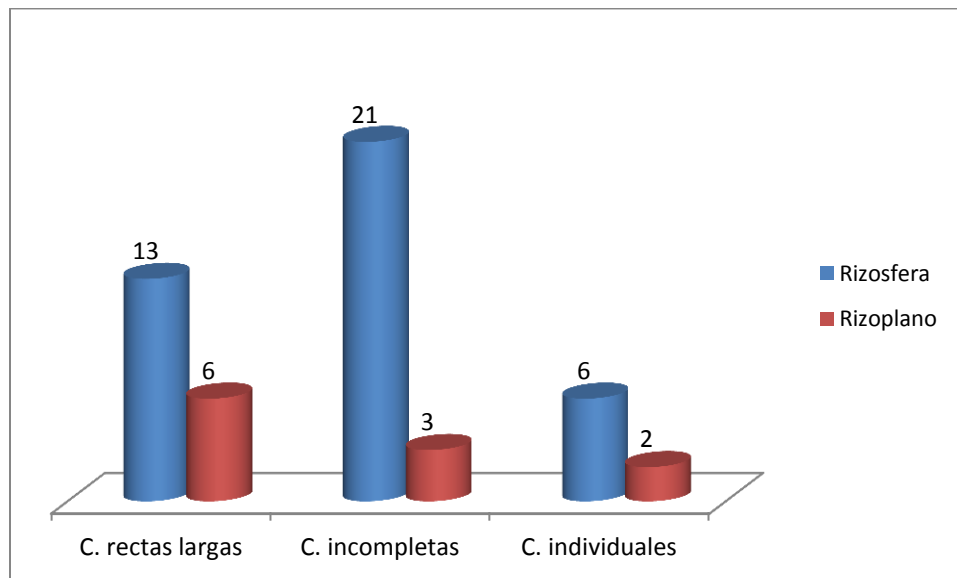


Figura C5. Número de individuos por cada tipo de actividad.

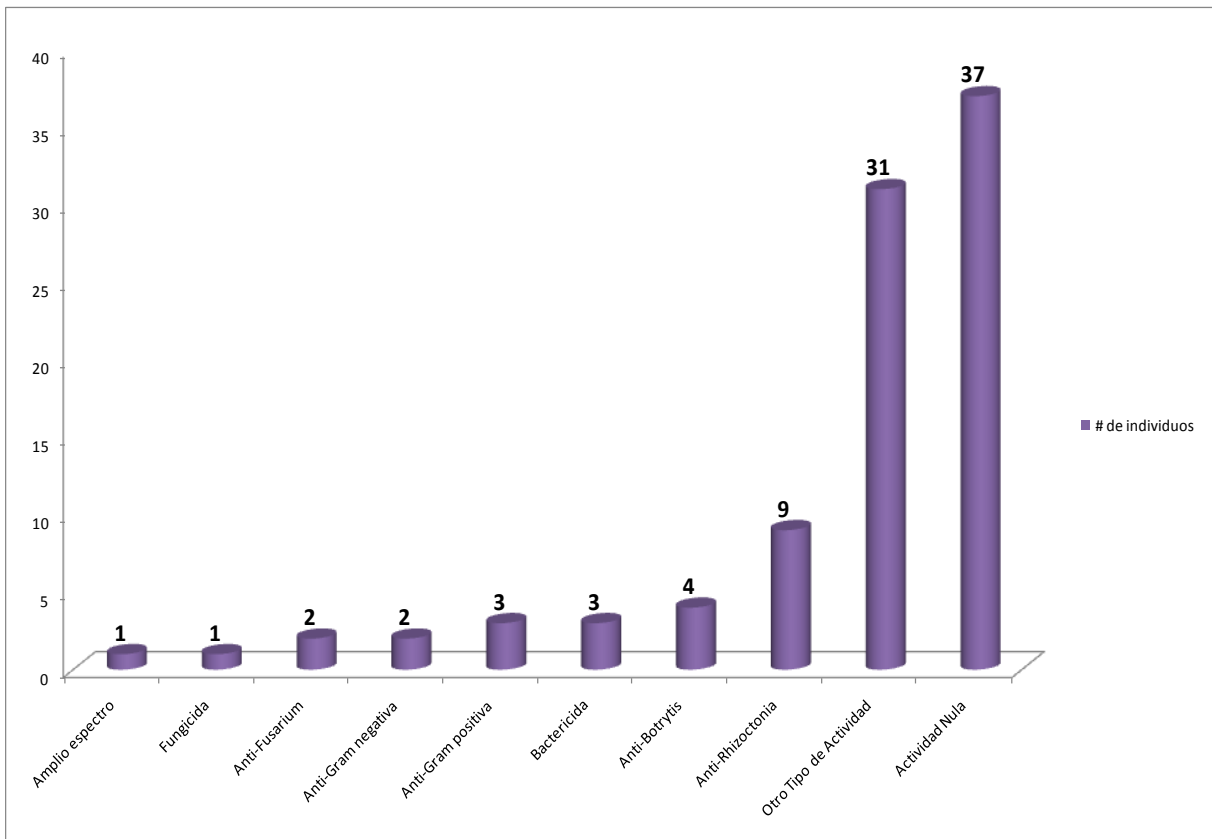


Figura C6. Número de actinomicetes de acuerdo a su temperatura de crecimiento.

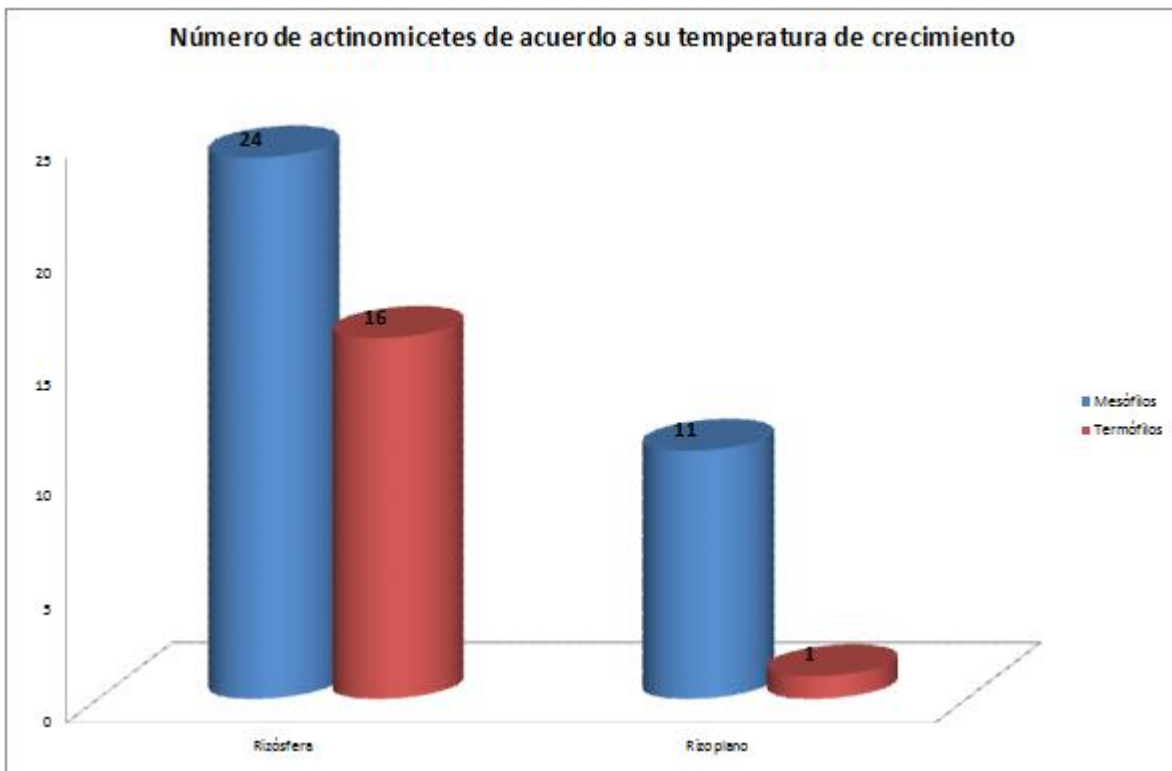


Figura C7. Número de actinomicetes de acuerdo al pH de crecimiento.

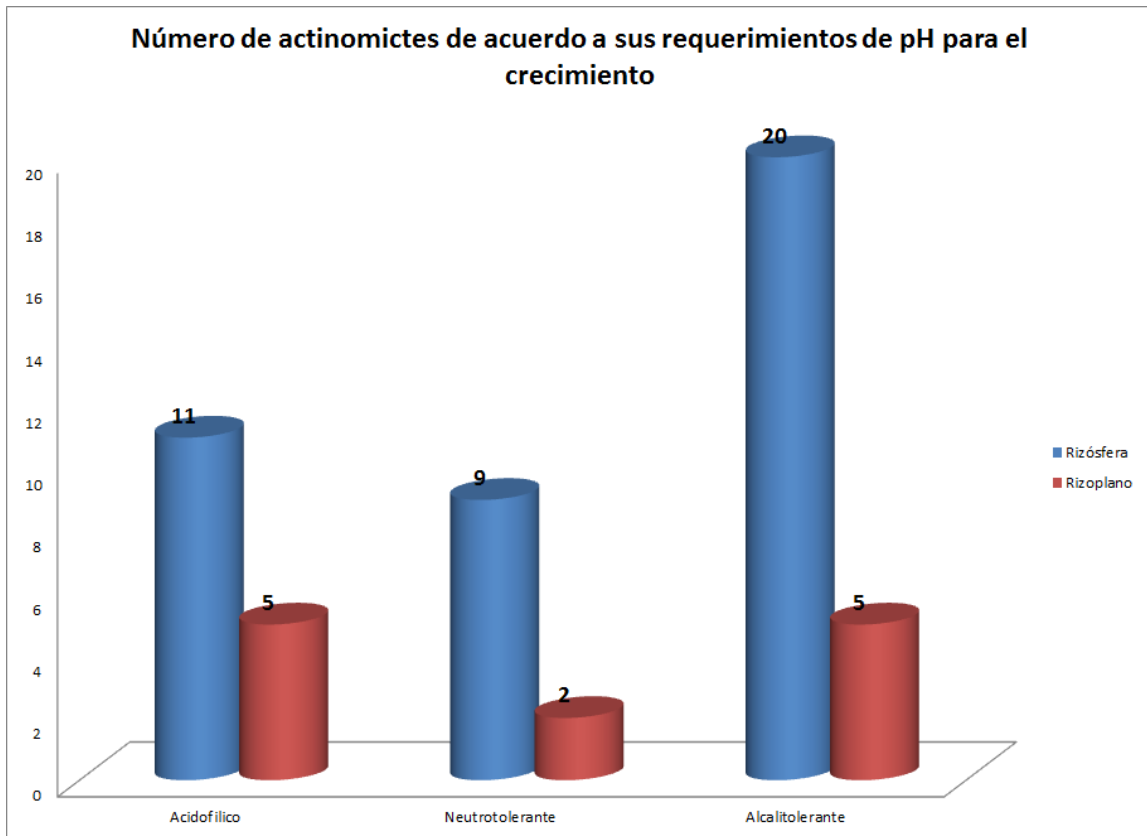


Figura C8. Producción de enzimas y crecimiento en aminoácidos como fuente única de C y N.

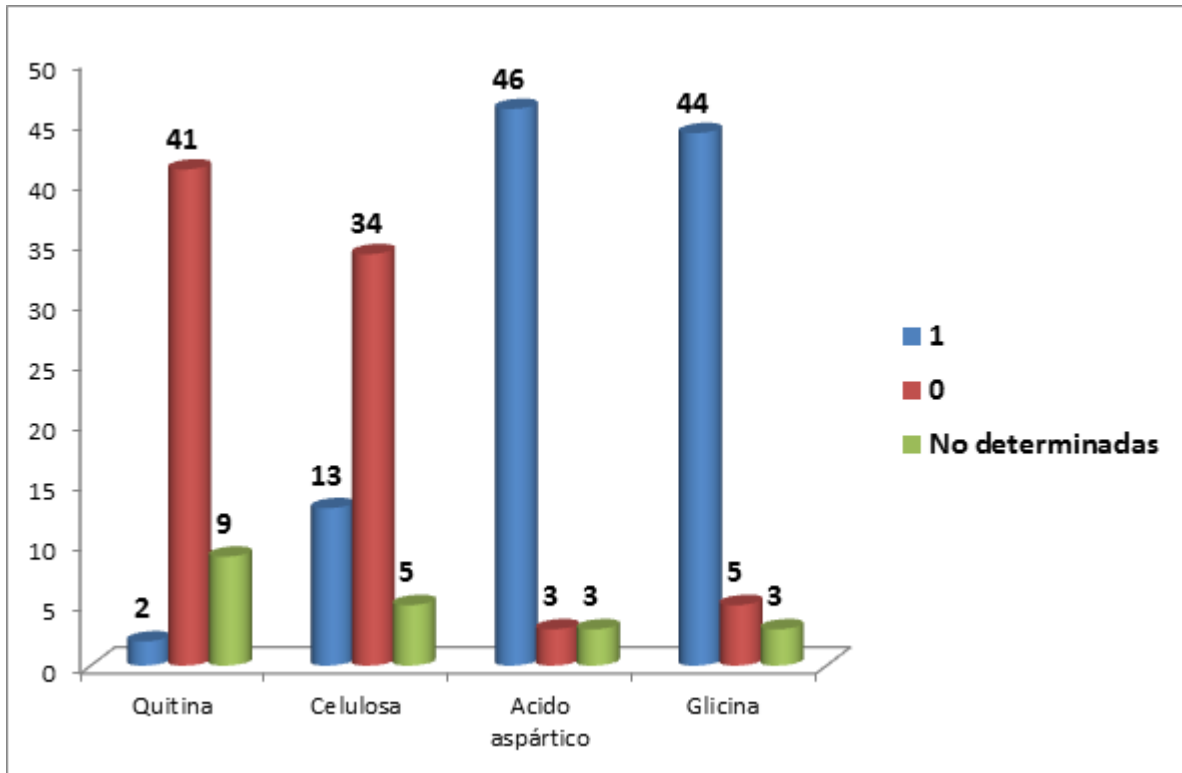
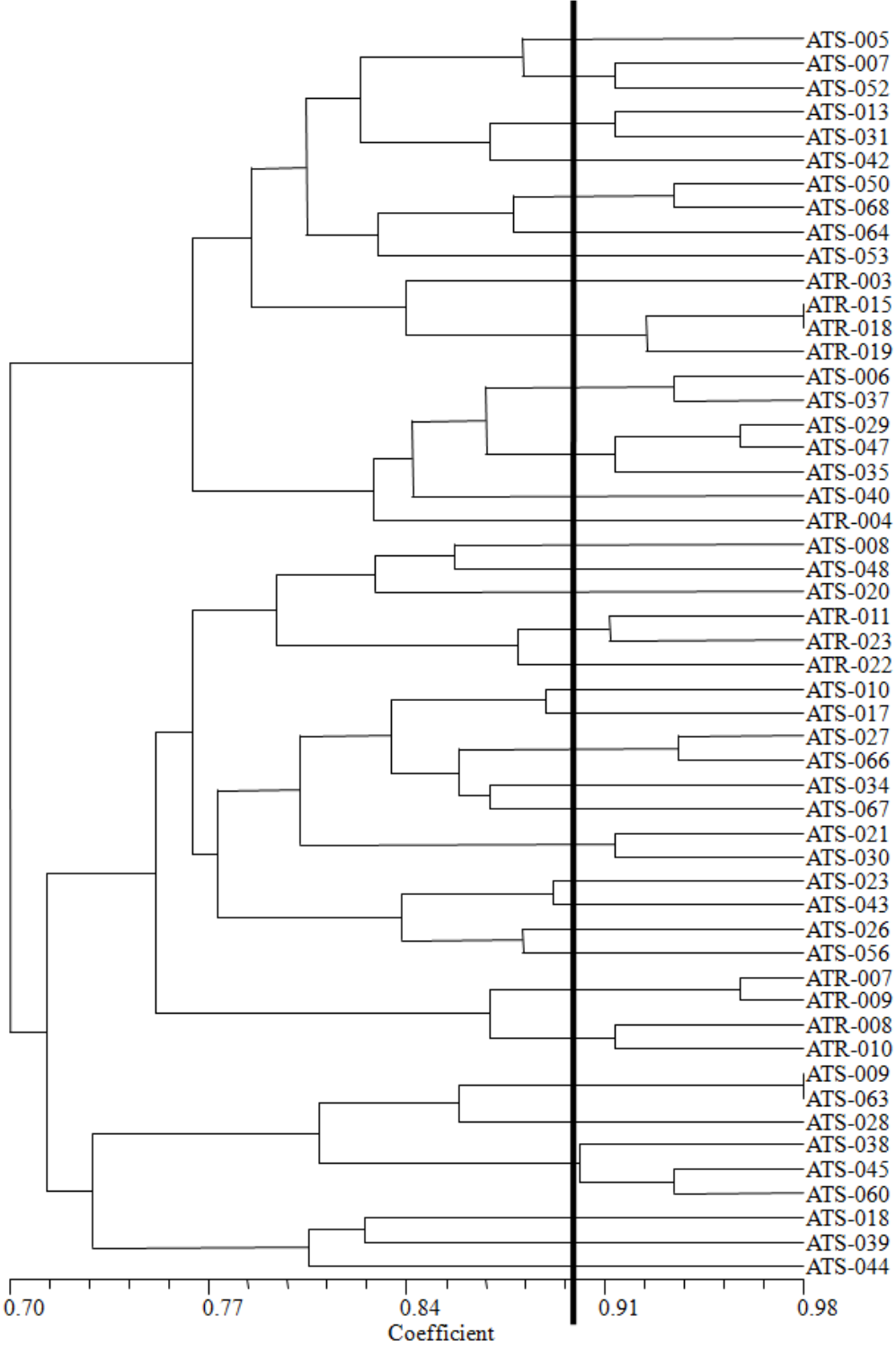
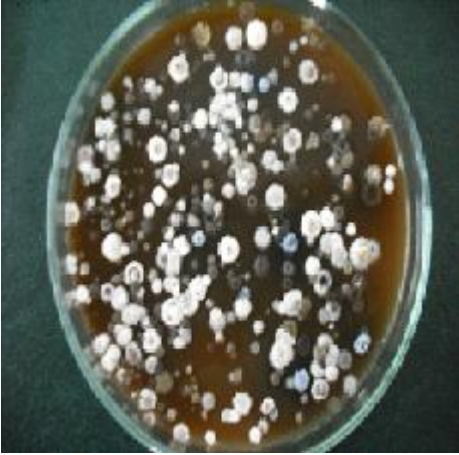


Figura C9. Dendrograma basado en la similaridad calculada con el coeficiente de simple coincidencia de 52 actinomicetes aislados de la rizósfera y rizopiano del trébol blanco.

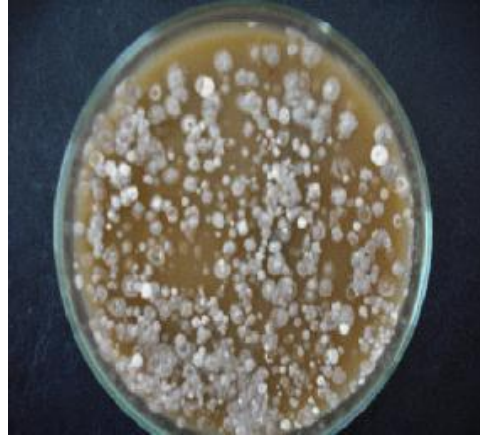


ANEXO E
FOTOGRAFIAS

Aislamiento de actinomicetes.



Fot. 1: pH 5,5 Rizósfera



Fot. 2: pH 8,5 Rizósfera



Fot. 3: pH 5,5 Rizoplano



Fot. 4: pH 8,5 Rizoplano

Aislamiento y purificación de actinomicetes.



Fot. 5: pH 5,5 Rizósfera



Fot. 6: pH 8,5 Rizósfera



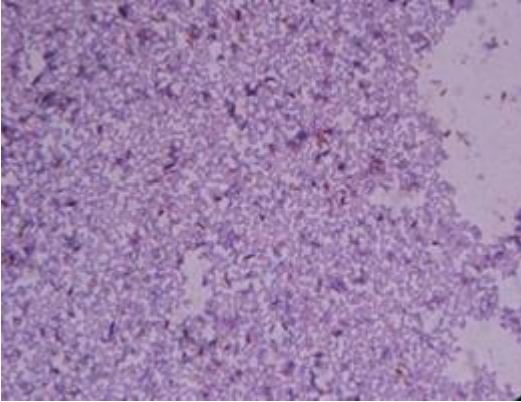
Fot. 7: pH 5,5 Rizoplano



Fot. 8: pH 8,5 Rizoplano

Antagonismo de actinomicetes frente a Hongos fitopatógenos, bacterias y levaduras.

Caracterización microscópica de Bacterias.



Fot. 9: Bacteria Gram positiva (+)

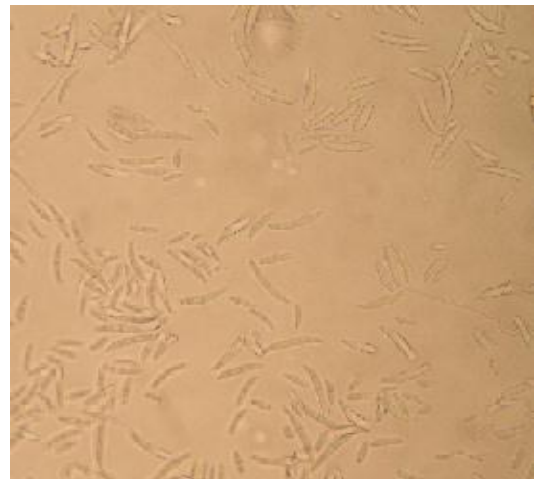


Fot. 10: Bacteria Gram negativa (-)

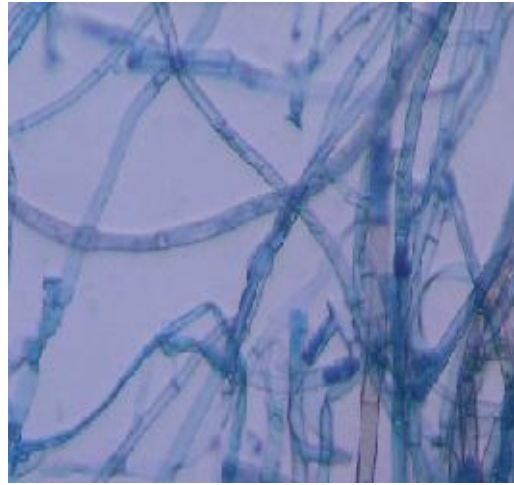
Caracterización microscópica de Hongos fitopatógenos.



Fot. 11: *Botrytis*



Fot. 12: *Fusarium*



Fot. 13: *Rhizoctonia*

Cultivos de actinomicetes utilizados para el antagonismo.



Fot. 14: Rizósfera (ATS-004, ATS-008)



Fot. 15: Rizoplano (ATR-012, ATR-013)

Antagonismo frente a *Botrytis*.



Fot. 16: ATS 010 - ATS 009 - ATS 018 - ATS 020

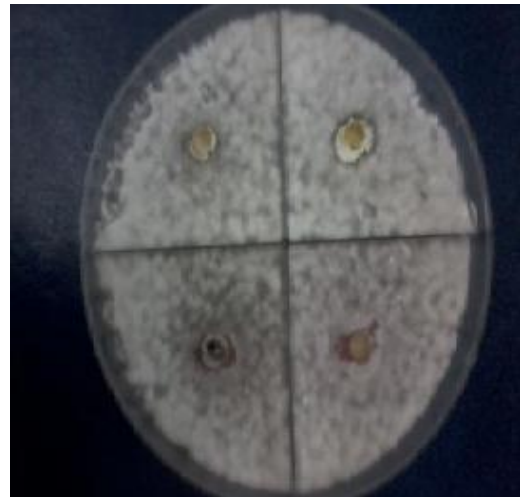


Fot. 17:ATS 036 - ATS 021 - ATS 033 – ATS 022

Fotografía 8: Antagonismo frente a *Fusarium*.



Fot. 18: ATS 008 - ATS 009 - ATS 010 - ATS 017



Fot.19: ATS 054 - ATS 057 - ATS 068 – ATR-007

Antagonismo frente a *Rhizoctonia*.



Fot. 20: ATS 028 - ATS 030 - ATS043 - ATS 044



Fot. 21: ATS 015 – ATS 069 – ATR 003 – ATR 006

Antagonismo frente a Levadura *Saccharomyces cerevisiae*.



Fot. 22: ATS 035 - ATS 036 - ATS 050 - ATS 051



Fot. 23: ATS 004 - ATS 008 - ATS 009 - ATS 010

Antagonismo frente a Bacteria Gram Positiva.

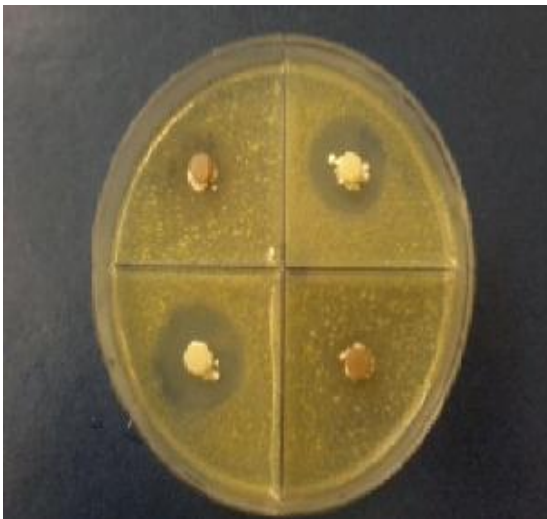


Fot. 24: ATS 007 - ATS 051 - ATS 069 - ATR 017



Fot. 25: ATR 009 - ATR 012 - ATR 020 - ATR 021

Antagonismo frente a Bacteria Gram Negativa.



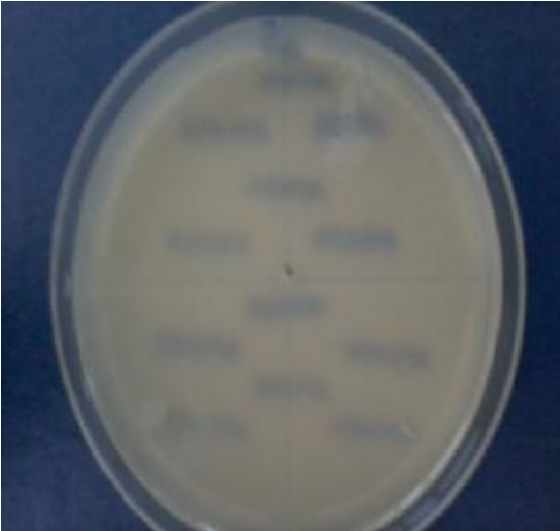
Fot. 26: ATS 063 - ATS 065 - ATS 067 - ATR 007



Fot. 27: ATS 022 - ATS 032 - ATR 014 - ATR 024

Taxonomía Numérica de Actinomicetes.

Temperatura



Fot. 28: 4 °C

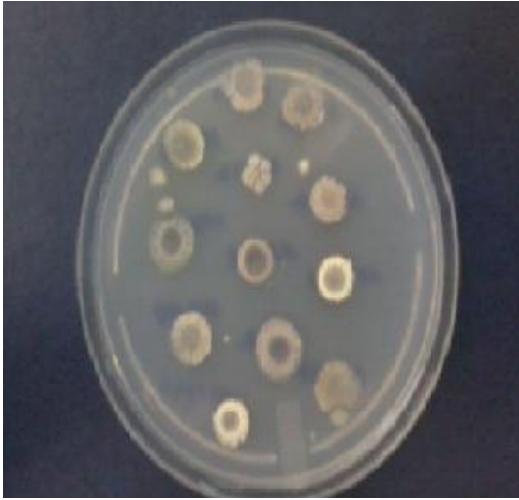


Fot. 29: 37 °C

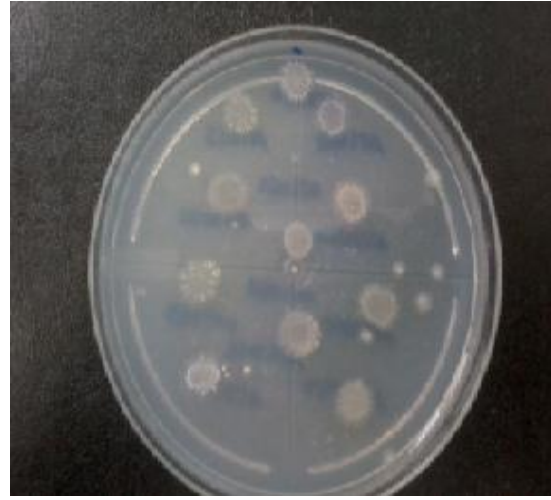


Fot. 30: 50 °C

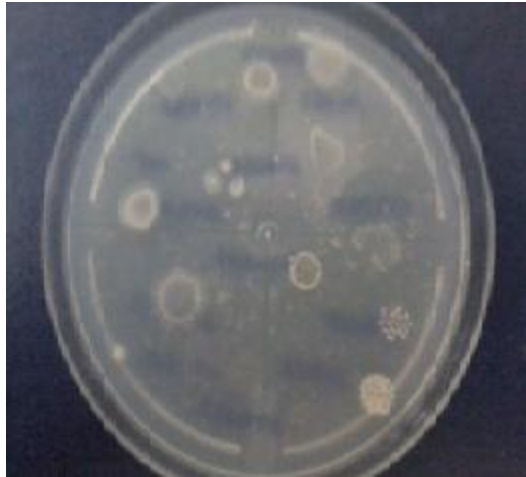
Perfil metabólico de uso de carbohidratos.



Fot. 31: Almidón

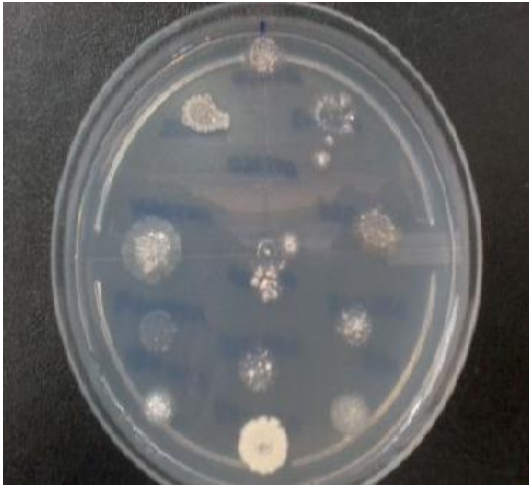


Fot. 32: Celulosa

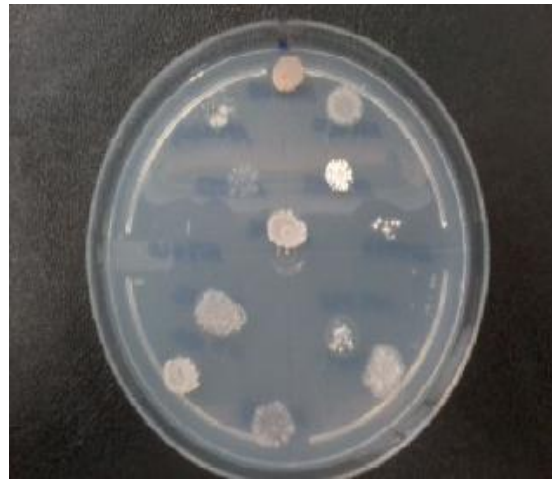


Fot. 33: Quitina

Aminoácidos como fuente de carbono y energía.



Fot. 34: Acido aspártico



Fot. 35: Glicina

pH



Fot. 36: 4,5



Fot. 37: 5,5



Fot. 38: 6,5



Fot. 39: 7,5



Fot. 40: 8,5



Fot. 41: 9,5

ANEXO F

TABLA DE COLORES

**(British Standard Specification
for colours for identification,
coding and special purposes)**

Table 1. Standard colours							
Ref. No.	Name	Surface finish of individual colour cards	Colorimetric values under CIE standard illumination D ₆₅			Approximate Munsell reference	Page with colour sample
			Chromaticity coordinates		Luminance factor, β		
			x	y			
101	Sky blue	gloss	0.287	0.351	0.345	5BG 6/4	7
103	Peacock blue	gloss	0.240	0.302	0.116	5B 3/6	7
104	Azure blue	gloss	0.226	0.233	0.083	5PB 3/6	7
		matt	0.218	0.223	0.073	5PB 3/6	—
105	Oxford blue	gloss	0.248	0.245	0.049	7.5PB 2/6	7
106	Royal blue	gloss	0.291	0.296	0.039	10PB 1/1	7
107	Strong blue	gloss	0.209	0.240	0.148	2.5PB 4/10	17
108	Aircraft blue	gloss	0.219	0.196	0.060	7.5PB 2/10	17
		matt	0.221	0.199	0.057	7.5PB 2.5/8	—
109	Middle blue	gloss	0.214	0.249	0.095	10B 3/8	7
110	Roundel blue	gloss	0.232	0.214	0.064	7.5PB 2/8	7
		matt	0.230	0.212	0.059	7.5PB 2.5/6	—
112	Arctic blue	gloss	0.246	0.300	0.314	7.5B 6/6	7
113	Deep Saxe blue	gloss	0.239	0.292	0.112	7.5B 3/6	7
166	French blue	gloss	0.205	0.195	0.120	7.5PB 3.5/12	17
		matt	0.202	0.190	0.115	7.5PB 3/12	—
172	Pale roundel blue	matt	0.265	0.287	0.431	2.5PB 7/4	7
175	Light French blue	gloss	0.215	0.227	0.191	5PB 4.5/12	17
210	Sky	gloss	0.331	0.366	0.426	5GY 7/2	9
		matt	0.331	0.368	0.437	5GY 7/2	—
216	Eau-de-Nil	gloss	0.335	0.405	0.444	7.5GY 7/4	9
217	Sea green	gloss	0.343	0.441	0.326	7.5GY 6/6	9
218	Grass green	gloss	0.328	0.459	0.177	7.5GY 4.5/8	17
220	Olive green	gloss	0.338	0.406	0.085	5GY 3/6	9
221	Brilliant green	gloss	0.309	0.457	0.136	10GY 4/8	17
		matt	0.307	0.457	0.133	10GY 4/8	—
223	Middle bronze green	gloss	0.334	0.383	0.078	5GY 3/2	9
224	Deep bronze green	gloss	0.324	0.368	0.061	2.5GY 2/4	9
		matt	0.323	0.365	0.063	2.5GY 2/2	—
225	Light Brunswick green	gloss	0.314	0.441	0.105	7.5GY 3.5/7	9
226	Middle Brunswick green	gloss	0.292	0.389	0.073	5G 2/6	9
227	Deep Brunswick green	gloss	0.294	0.364	0.060	10GY 2/4	9
228	Emerald green	gloss	0.259	0.414	0.173	7.5G 4/8	17
241	Dark green	gloss	0.330	0.361	0.090	10Y 3/2	9
		matt	0.331	0.360	0.086	10Y 3/2	—
262	Bold green	gloss	0.262	0.438	0.191	2.5G 5/8	17
267	Deep chrome green	gloss	0.288	0.391	0.104	2.5G 3/4	9
280	Verdigris green	gloss	0.283	0.403	0.251	5G 5/6	9
283	Aircraft grey green	gloss	0.322	0.376	0.207	7.5GY 5/2	9
		matt	0.321	0.379	0.195	7.5GY 5/2	—
285	NATO green	matt	0.334	0.362	0.091	10Y 3/1	9
298	Olive drab	gloss	0.341	0.375	0.078	10Y 3/2	9
		matt	0.339	0.375	0.075	10Y 3/2	—

Fuente: Rodríguez (2004)

Ref. No.	Name	Surface finish of individual colour cards	Colorimetric values under CIE standard illumination D ₆₅			Approximate Munsell reference	Page with colour sample
			Chromaticity coordinates		Luminance factor, β		
			x	y			
309	Canary yellow	gloss	0.447	0.483	0.624	5Y 9/14	17
		matt	0.448	0.487	0.657	5Y 9/14	—
310	Primrose	gloss	0.403	0.448	0.664	7.5Y 8.5/8	11
320	Light brown	gloss	0.429	0.398	0.179	7.5YR 4.5/6	11
337	Very dark drab	gloss	0.336	0.357	0.081	7.5Y 2/2	11
		matt	0.338	0.358	0.079	7.5Y 3/2	—
352	Pale cream	gloss	0.380	0.401	0.626	5Y 9/6	11
353	Deep cream	gloss	0.409	0.421	0.648	2.5Y 8.5/8	11
355	Lemon	gloss	0.471	0.471	0.532	2.5Y 8/12	17
		matt	0.467	0.468	0.553	2.5Y 8/12	—
356	Golden yellow	gloss	0.485	0.454	0.496	10YR 7/14	17
		matt	0.485	0.456	0.484	10YR 7/12	—
358	Light buff	gloss	0.415	0.407	0.470	10YR 7/6	11
		matt	0.416	0.406	0.459	10YR 7/6	—
361	Light stone	gloss	0.384	0.388	0.393	10YR 7/4	11
		matt	0.389	0.392	0.376	10YR 7/4	—
363	Bold yellow	gloss	0.471	0.475	0.615	2.5Y 8/14	17
365	Vellum	gloss	0.344	0.369	0.627	7.5Y 8.5/2	11
		matt	0.345	0.371	0.606	7.5Y 8.5/2	—
367	Manilla	gloss	0.354	0.371	0.681	2.5Y 8.5/2	11
368	(See 568)						
369	Biscuit	gloss	0.373	0.380	0.651	10YR 8/4	11
384	Light straw	gloss	0.360	0.381	0.569	5Y 8/4	11
388	Beige	gloss	0.370	0.382	0.495	2.5Y 7/4	11
389	Camouflage beige	matt	0.343	0.364	0.315	5Y 6/2	11
410	(See 320)						
411	Middle brown	gloss	0.413	0.380	0.100	7.5YR 3/6	13
412	Dark brown	gloss	0.382	0.351	0.068	5YR 2/4	13
414	Golden brown	gloss	0.461	0.397	0.163	5YR 4/8	13
436	Dark camouflage brown	matt	0.345	0.346	0.074	5YR 3/1	13
437	(See 337)						
445	Venetian red	gloss	0.451	0.350	0.094	10R 3/8	13
447	Salmon pink	gloss	0.400	0.361	0.421	2.5YR 7/6	13
454	Pale roundel red	matt	0.378	0.327	0.360	10RP 7/6	13
499	Service brown	gloss	0.360	0.357	0.074	10YR 2.5/4	11
		matt	0.365	0.360	0.069	10YR 2.5/2	—
537	Signal red	gloss	0.548	0.334	0.144	7.5R 4.5/16	17
		matt	0.555	0.331	0.149	7.5R 4.5/14	—
538	Cherry	gloss	0.529	0.322	0.104	5R 3.5/16	17
		matt	0.534	0.325	0.116	5R 3.5/14	—
539	Currant red	gloss	0.539	0.325	0.123	7.5R 4/14	17
541	Maroon	gloss	0.353	0.325	0.046	5R 2/8	13
542	Ruby	gloss	0.403	0.274	0.087	7.5RP 3/10	13

Fuente: Rodríguez (2004)

Ref. No.	Name	Surface finish of individual colour cards	Colorimetric values under CIE standard illumination D ₆₅			Approximate Munsell reference	Page with colour sample
			Chromaticity coordinates		Luminance factor, β		
			x	y			
557	Light orange	gloss	0.517	0.393	0.274	2.5YR 6/14	17
		matt	0.517	0.392	0.284	2.5YR 6/14	—
564	Bold red	gloss	0.553	0.330	0.147	8.75R 4/14	17
568	Apricot	gloss	0.502	0.421	0.334	7.5YR 6/14	17
592	International orange	gloss	0.545	0.355	0.184	10R 5/16	17
593	Rail red	gloss	0.561	0.345	0.181	8.75R 5/17	17
626	Camouflage grey	matt	0.304	0.328	0.321	10B 6/1	15
627	Light aircraft grey	gloss	0.317	0.338	0.435	N 7.25	15
		matt	0.319	0.339	0.428	N 7	—
630	French grey	gloss	0.323	0.356	0.327	5GY 6/1	15
631	Light grey	gloss	0.308	0.341	0.310	7.5G 6/1	15
		matt	0.308	0.342	0.314	7.5G 6/1	—
632	Dark Admiralty grey	gloss	0.299	0.321	0.149	10B 4/0.5	15
		matt	0.300	0.322	0.146	10B 4/0.5	—
637	Medium sea grey	gloss	0.301	0.324	0.273	10B 5.5/1	15
		matt	0.303	0.326	0.270	10B 6/1	—
638	Dark sea grey	gloss	0.300	0.318	0.142	5PB 4/1	15
		matt	0.299	0.316	0.139	2.5PB 4/2	—
641	(See 241)						
642	Night	gloss	0.310	0.327	0.047	N 1	15
		matt	0.310	0.326	0.039	N 1.75	—
676	Light weatherwork grey	gloss	0.300	0.325	0.382	2.5PB 6.5/2	15
677	Dark weatherwork grey	gloss	0.296	0.315	0.146	5PB 4/2	15
692	Smoke grey	gloss	0.272	0.303	0.237	10B 5/4	15
693	Aircraft grey	gloss	0.307	0.334	0.234	10BG 5/1	15
694	Dove grey	gloss	0.313	0.339	0.261	5GY 5/1	15
697	Light Admiralty grey	gloss	0.297	0.334	0.479	10BG 7.5/2	15
		matt	0.298	0.336	0.490	10BG 7.5/2	—
796	Dark violet	gloss	0.304	0.244	0.092	7.5P 3/7	17
797	Light violet	gloss	0.304	0.286	0.359	5P 6.5/6	13

Fuente: Rodríguez (2004)

Ref. No.	Name	Surface finish of individual colour cards	Colorimetric values under CIE standard illumination D ₆₅			Approximate Munsell reference
			Chromaticity coordinates		Luminance factor, β	
			x	y		
102	Turquoise blue	gloss	0.254	0.332	0.213	7.5BG 5/5
111	Pale blue	gloss	0.281	0.347	0.414	5BG 7/4
114	Rail blue	gloss	0.233	0.290	0.068	2.5B 2/6
115	Cobalt blue	gloss	0.236	0.250	0.221	5PB 5/8
174	Oriental blue	gloss	0.242	0.315	0.247	2.5B 5.5/6
222	Light bronze green	gloss	0.371	0.431	0.129	2.5GY 4/6
		matt	0.368	0.429	0.130	2.5GY 4/4
275	Opaline green	gloss	0.305	0.386	0.383	2.5G 7/6
278	Light olive green	gloss	0.352	0.413	0.232	5GY 5/4
350	Dark earth	gloss	0.367	0.370	0.145	10YR 4/2
		matt	0.374	0.374	0.141	10YR 4/2
359	Middle buff	gloss	0.435	0.413	0.349	10YR 6/8
360	(See 460)					
366	Light beige	gloss	0.371	0.385	0.593	2.5Y 8/4
446	Red oxide	gloss	0.428	0.348	0.081	10R 2.5/7
450	(See 350)					
453	Shell pink	gloss	0.335	0.332	0.594	10RP 8/3
460	Deep buff	gloss	0.420	0.394	0.270	7.5YR 5.5/6
473	Gulf red	gloss	0.429	0.335	0.073	10R 2/6
489	Leaf brown	gloss	0.421	0.367	0.120	5YR 3/6
540	Crimson	gloss	0.447	0.319	0.065	5R 2/8
633	RAF blue grey	gloss	0.291	0.315	0.073	7.5B 2/2
		matt	0.289	0.315	0.067	7.5B 2/2
634	Slate	gloss	0.325	0.358	0.146	5GY 4/1
635	Lead	gloss	0.309	0.344	0.010	5G 3/1
636	PRU blue	gloss	0.274	0.307	0.155	10B 4/3
		matt	0.273	0.308	0.151	10B 4/3
640	Extra dark sea grey	gloss	0.296	0.317	0.112	10B 3.5/1
		matt	0.296	0.315	0.108	10B 3.5/1
671	Middle graphite	gloss	0.303	0.323	0.092	10B 3/1

Fuente: Rodríguez (2004)



172 Pale roundel blue



112 Arctic blue



101 Sky blue



103 Peacock blue



104 Azure blue



109 Middle blue



113 Deep Saxe blue



110 Roundel blue



105 Oxford blue



106 Royal blue



216 Eau-de-Nil



210 Sky



217 Sea green



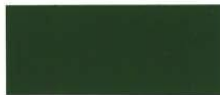
280 Verdigris green



283 Aircraft grey green



267 Deep chrome green



225 Light Brunswick green



285M NATO green



220 Olive green



241 (641) Dark green



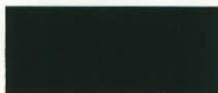
298 Olive drab



226 Middle Brunswick green



223 Middle bronze green



227 Deep Brunswick green



224 Deep bronze green



310 Primrose



367 Manila



365 Vellum



353 Deep cream



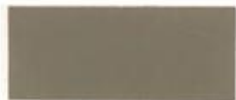
369 Biscuit



352 Pale cream



384 Light straw



389 Camouflage beige



388 Beige



358 Light buff



361 Light stone



320 (410) Light brown



337 (437) Very dark drab



499 Service brown



447 Salmon pink



797 Light violet



454 Pale roundel red



414 Golden brown



411 Middle brown



445 Venetian red



542 Ruby



436M Dark camouflage brown



412 Dark brown



541 Maroon



796 Dark violet



108 Aircraft blue



166 French blue



175 Light French blue



107 Strong blue



228 Emerald green



262 Bold green



221 Brilliant green



218 Grass green



309 Canary yellow



363 Bold yellow



355 Lemon



356 Golden yellow



568 (368) Apricot



557 Light orange



592 International orange



593 Rail red



537 Signal red



564 Bold red



539 Currant red



538 Cherry

