



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Producción y evaluación de metabolitos antifúngicos
excretados por el actinomiceto cepa MK-22 aislado de
cultivos de vid con potencial utilidad como biopesticida**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biotecnología

AUTOR

Mirko David LINO NAVARRO

ASESOR

Dr. Pedro Luis CASTELLANOS SÁNCHEZ

Lima, Perú

2022



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Lino M. Producción y evaluación de metabolitos antifúngicos excretados por el actinomiceto cepa MK-22 aislado de cultivos de vid con potencial utilidad como biopesticida [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2022.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Mirko David Lino Navarro
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	44109063
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-6747-2112
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Pedro Luis Castellanos Sánchez.
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	09649588
URL de ORCID	0000-0003-2965-174X
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Karim Lizeth Jimenez Aliaga
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	40957382
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Roberto Jhalver Vega Paulino
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	40556214
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Elizabeth Liz Chávez Hidalgo
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	41354431
Datos de investigación	

Línea de investigación	A.1.2.4 Desarrollo de productos biológicos
Grupo de investigación	No aplica.
Agencia de financiamiento	PNIA Programa Nacional de Innovación Agraria del Ministerio de desarrollo agrario y riego-MIDAGRI.
Ubicación geográfica de la investigación	Universidad Nacional Mayor de San Marcos Facultad de Ciencias Biológicas País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Calle: (según corresponda) 12.0562° S, 77.0845° W
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Julio 2017 -Feb 2020
URL de disciplinas OCDE	<p>Biología agrícola, Biología alimentaria https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.04.01</p> <p>Protección y nutrición de las plantas https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.01.07</p>



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado



**ACTA DE SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS PARA OPTAR
AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**

Siendo las **10:00 hrs. del 28 de diciembre de 2022** se reunieron mediante la plataforma de Google meet de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Evaluador de tesis, presidido por la Dra. Karim Lizeth Jiménez Aliaga e integrado por los siguientes miembros: PH.D. Pedro Luis Castellanos Sánchez (Asesor), Dr. Roberto Jhalver Vega Paulino Mg. Elizabeth Liz Chávez Hidalgo; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **"Producción y evaluación de metabolitos antifúngicos excretados por el actinomiceto cepa MK-22 aislado de cultivos de vid con potencial utilidad como biopesticida"**, presentado por el Bachiller en Microbiología y Parasitología **Mirko David Lino Navarro**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la Tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Biotecnología**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

A continuación, el Jurado Evaluador de Tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

Diecinueve (19) EXCELENTE

Luego, la Presidenta del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Bachiller en Microbiología y Parasitología **Mirko David Lino Navarro**, el Grado Académico de Magister en **Biotecnología**.

Siendo las ...11.55..... hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las ...12.00..... hrs. del 28 de diciembre de 2022.

.....
Dra. Karim Lizeth Jiménez Aliaga (P. Asoc., D.E.)
Presidenta

.....
PH.D. Pedro Luis Castellanos Sánchez (P. P., T.C.)
Miembro - Asesor

.....
Dr. Roberto Jhalver Vega Paulino (P. Asoc., T.C.)
Miembro

.....
Mg. Elizabeth Liz Chávez Hidalgo (P. Asoc., T.C.)
Miembro



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado



EL DIRECTOR DE LA UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS QUE SUSCRIBE DEJA,

CONSTANCIA

00008-FFB-UPG-2022

Que, mediante procedimiento de la evaluación de originalidad según Resolución Rectoral N° 043005-R-18, de la tesis intitulada: **Producción y evaluación de metabolitos antifúngicos excretados por el actinomiceto cepa MK-22 aislado de cultivos de vid con potencial utilidad como biopesticida**, presentado por **Mirko David Lino Navarro**, con fecha de recepción 27/12/2021, con fecha de aplicación al programa de similitud el 18/01/2022 con el software utilizado el TURNITIN, con la configuración de exclusión de textos entrecomillas, bibliografías y cadenas menores a 40 palabras, mediante el procedimiento de la evaluación de originalidad, el porcentaje de similitud según programa detector es **5%**, por lo que, cumple los criterios de originalidad sin observación, según informe adjunto.

Se expide la presente constancia para el trámite de expedito, según lo establecido en el Reglamento General de Estudios de Posgrado 2018, aprobado con RR. 04790-R-18.

Lima, 19 de enero de 2022



Firmado digitalmente por JAVE
NAKAYO Jorge Leonardo FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 19.01.2022 12:14:44 -05:00

DR. JORGE LEONARDO JAVE NAKAYO
DIRECTOR

JLJN/ecj

Jr. Puno 1002 – Lima 1
Apartado Postal 4559 Lima 1

Teléfono 619-7000 anexo 4812
Email: upg.farmacia@unmsm.edu.pe

Esta tesis está dedicada a la energía que atraviesa el universo que es Dios que nos guía, cuida y nos da la oportunidad de vivir en este pequeño espacio del cosmos.

Agradecimientos

A toda la energía y el tiempo que confabuló para mantenerme sano.

A mi compañera, amiga y esposa Margot Morales por su apoyo incondicional.

A toda mi familia mis padres Justo y Lucinda, así como a mis 7 hermanos Felix, Agustín, William, Martín, Milagros, Liz y Rosita por sus consejos y fraternidad.

A mi asesor Ph. D Pedro Castellanos Sánchez por todo su apoyo, seguimiento y recomendaciones para el desarrollo de la presente tesis.

A Dra. Mercedes Soberón Lozano por las facilidades brindadas en su laboratorio, así como asesoría en la ejecución y revisión de artículo.

Al Programa Nacional de Innovación Agraria (PNIA) del INIA-MINAGRI por el financiamiento otorgado para el desarrollo de la presente tesis. A Guiuliano Rojas, Luis Alba, Elizabeth Cabana, Sonia Rimachi, Liz Surco y todo el equipo que me brindo muchas facilidades.

A todos mis compañeros del laboratorio de Micología Aplicada por todos sus aportes y momentos compartidos.

A Sharmely Zanabria y Omar Santiago de la empresa SARTORIUS (Hasso group) por las facilidades para el uso del biorreactor Biostat A.

A los laboratorios Microbiología Ambiental y Biotecnología, Ecología microbiana e inmunología UNMSM por las facilidades para el uso de sus instalaciones.

A Ulrike Tarazona y Wilbert Serrano de UCSUR por el apoyo en la identificación molecular.

A Ing. Maritza Acosta de la empresa NOVAGRI por las facilidades para la obtención de las cepas actinomicetales y el intercambio de conocimientos.

A Ph.D José Mauricio Larrea, Verónica Sáenz y Luis Hoyos de la Cía. Pluspetrol Norte por todo su apoyo y recomendaciones.

Al equipo de AGROINDUSTRIAL LIMSA por las facilidades para la sustentación.

Índice

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Situación problemática	1
1.2 Formulación del problema	3
1.3 Justificación teórica	3
1.4 Justificación Práctica	4
1.5 Objetivos	8
1.5.1 Objetivo general	8
1.5.2 Objetivo específicos	8
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	9
2.1 Antecedentes de la investigación	9
2.2 Bases teóricas	10
2.2.1. Orden Actinomicetales: Crecimiento, morfología, diferenciación y clasificación	10
2.2.2. Actinobacterias PGPB	13
2.2.3. Actinobacterias como supresores de enfermedades en plantas	14
2.2.4. Producción de compuestos agroactivos (Antibióticos) y volátiles por Actinobacterias	15
2.2.5. Biopesticida o Plaguicida biológico de uso agrícola: Término genérico que incluye a los ACBM, EV, PM y SQ (MINAGRI 2015)	16
2.2.6. Formulación de biopesticidas basados en actinobacterias	17
CAPÍTULO III. Metodología	19
I.3 Aislamiento de actinomicetos y excreción enzimática	19
I.4 Cepas fúngicas Testigo	19
I.5 Evaluación de medios de cultivo	20
I.6 Pruebas de antagonismo	20
I.7 Evaluación de la capacidad PGPB de actinomicetos	21
I.7.1 Producción de sideróforos	21
I.7.2 Fijación de nitrógeno	21
I.7.3 Solubilización de fosfatos	21
I.7.4 Producción de ácido indol acético (AIA)	22
I.8 Producción de metabolitos antifúngicos	22
I.8.1.1 Elaboración del diseño experimental	22
I.8.2 Proceso fermentativo	23

I.8.3	Obtención de extractos crudos	23
I.8.4	Cuantificación de componentes proteicos totales y glucosa	24
I.8.5	Evaluación de la actividad antifúngica.....	24
I.8.6	Producción de metabolitos antifúngicos en Bioreactor.....	24
I.9	Análisis estadístico	26
I.9.1	Influencia de los medios de cultivo sobre la respuesta antifúngica y selección del más idóneo.....	26
I.9.2	Selección de nutrientes influyentes	26
I.10	Identificación molecular	27
CAPÍTULO IV.	Resultados	28
4.1	Aislamiento y caracterización enzimática de actinomicetos	28
4.2	Influencia de los medios de cultivo y antagonismo	28
4.3	Evaluación de la capacidad PGPB de actinomicetos	32
4.4	Producción de metabolitos antifúngicos.....	33
4.4.1	Elaboración del diseño experimental	33
4.4.2	Proceso fermentativo	34
4.4.3	Cuantificación de componentes proteicos totales y glucosa.....	36
4.7	Análisis estadístico	39
4.7.1	Influencia de los medios de cultivo sobre la respuesta antifúngica	39
4.7.2	Selección de factores influyentes	39
4.8	Producción de metabolitos antifúngicos en Bioreactor	45
4.9	Identificación molecular	48
CAPÍTULO V.	Discusión de resultados	49
Aislamiento de actinomicetos y excreción enzimática		49
5.4	Producción de metabolitos antifúngicos.....	52
5.5	Análisis estadístico	59
CAPÍTULO VI.	Conclusiones.....	68
CAPÍTULO VII.	Referencias bibliográficas.....	69
CAPÍTULO VIII.	Anexos	95

RESUMEN

La agricultura actual necesita de alternativas eficientes y eco-amigables para controlar agentes fitopatógenos causantes de plagas en cultivos de interés nacional y global. Los actinomicetos son un grupo bacteriano capaz de producir una gran diversidad de compuestos antifúngicos. 35 Actinomicetos fueron aislados de muestras de suelo de cultivos de “vid” *Vitis vinifera* (Vitaceae) en Ica. Se seleccionó la cepa 22 debido a que presentó la mejor respuesta antagonista en placa contra *Aspergillus* sp. Mediante un diseño factorial completo 2^K se evaluó la influencia de 3 factores tales como biomasa fúngica-sacarosa, una fuente nitrogenada y un conjunto de sales. La respuesta evaluada fue la producción/excreción de metabolitos antifúngicos contra *Aspergillus* sp. y *Streptomyces cinnamomi*. Además, se determinó la concentración de biomasa microbiana, así como de componentes proteicos totales y glucosa. Luego de seleccionar los factores más influyentes y las mejores concentraciones, se realizó la producción en biorreactor Biostat-A Sartorius, de 2.0 L de volumen de trabajo durante 6 días a 120 rpm y 30°C. Se midió el pH, % de saturación de oxígeno (% sat-O₂) y la producción de biomasa. La actividad antifúngica contra ambos fitopatógenos se evaluó en placa midiendo el efecto de los metabolitos antifúngicos sobre el crecimiento del hongo y comparándolo con placas controles negativos. El actinomiceto seleccionado cepa Mk -22 presentó un 99.7% de similitud con *Streptomyces variabilis*. Mediante el ANOVA se confirmó a un nivel de confianza del 95% que la biomasa fúngica-sacarosa y la fuente nitrogenada influyeron significativamente en la producción de metabolitos antifúngicos. Se detectó compuestos de naturaleza proteica en aquellos experimentos con mayor actividad antifúngica. Además, concentraciones de glucosa superiores a 70 mg/dL influyeron negativamente sobre la producción de metabolitos antifúngicos. Se confirmó que los compuestos antifúngicos presentaron su máxima concentración en el cuarto día de fermentación en el biorreactor con 92 % sat-O₂ y pH= 7.11. Se logró inhibir en su totalidad el crecimiento de *Phytophthora cinnamomi* mientras que contra *Aspergillus* sp. fue del 58.6 %. Se concluye que el actinomiceto *Streptomyces variabilis* cepa Mk-22, excreta metabolitos antifúngicos con potencial utilidad como biocontrolador de ambas cepas fitopatógenas y como un potencial biopesticida.

Palabras claves: Actinomicetos, antagonismo, antifúngicos, fitopatógenos, diseño factorial.

ABSTRACT

Current agriculture needs efficient and eco-friendly alternatives to control phytopathogens that cause pests in crops of national and global interest. Actinomycetes are a bacterial group capable of producing a wide variety of antifungal compounds. 35 Actinomycetes were isolated from soil samples of “vine” crops *Vitis vinifera* (Vitaceae) from Ica. Strain 22 was selected because it presented the best antagonist response against *Aspergillus sp.* Through a 2^k full factorial design, the influence of 3 factors such as fungal biomass-sucrose, a nitrogen source and a set of salts was evaluated. The response evaluated was the production / excretion of antifungal metabolites against *Aspergillus sp.* and *Phytophthora cinnamomi*. In addition, the concentration of microbial biomass was determined, as well as total protein components and glucose. After selecting the most influential factors and the best concentrations, production was carried out in a Biostat-A Sartorius bioreactor, with a 2.0 L working volume for 6 days at 120 rpm and 30°C. The pH, % oxygen saturation (% sat-O₂) and biomass production were measured. The antifungal activity against both phytopathogens was evaluated on a plate by measuring the effect of antifungal metabolites on the growth of the fungus and comparing it with negative control plates. The selected actinomycete strain Mk -22 showed a 99.7% similarity with *Streptomyces variabilis*. Through ANOVA, it was confirmed with a 95% confidence level that the fungal-sucrose biomass and the nitrogen source had a significant influence on the production of antifungal metabolites. Protein compounds were detected in those experiments with the highest antifungal activity. Furthermore, glucose concentrations higher than 70 mg / dL negatively influenced the production of antifungal metabolites. It was confirmed that the antifungal compounds presented their maximum concentration on the fourth day of fermentation in the bioreactor with 92% sat-O₂ and pH = 7.11. It was possible to completely inhibit the growth of *Phytophthora cinnamomi* while against *Aspergillus sp.* was 58.6%. It is concluded that the actinomycete *Streptomyces variabilis* strain Mk-22 excretes antifungal metabolites with potential utility as a biocontroller of both phytopathogenic strains and as a potential biopesticide.

Key words: Actinomycetes, antagonism, antifungal, phytopathogens, factorial design.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de principios activos producidos por Actinobacterias

Tabla 2. Resumen de los factores considerados para el diseño factorial completo FFD (2^3).

Tabla 3. Características fenotípicas de las cepas actinomicetales en diferentes sustratos.

Tabla 4. Tamaños (mm) obtenidos por la inhibición del crecimiento de *Aspergillus sp.*

Tabla 5. Evaluación de las características PGPB en los actinomicetos seleccionados

Tabla 6. Cantidades de cada componente utilizado en el diseño experimental (g/250 mL)

Tabla 7. Resumen de la biomasa obtenida durante el proceso fermentativo.

Tabla 8. Resumen de los % de inhibición obtenidos en cada experimento.

Tabla 9. Análisis ANOVA donde se confirma la influencia de los medios de cultivo sobre el antagonismo con un $p < 0.05$.

Tabla 10. Prueba de Tukey HSD para la variable Antagonismo. Df=68, MS=47.57

Tabla 11. ANOVA con todas las interacciones para %Antagonismo-*Aspergillus sp.* $R^2=0.97807$; Adj:0.92689 MS Residual=.0023922. En rojo los valores significativos (95% de confianza)

Tabla 12. ANOVA con las interacciones más influyentes para %Antagonismo-*Aspergillus sp.* $R^2 = 0.97197$; Adj:0.94394 MS Residual=0.0018344. En rojo los valores significativos (95% de confianza)

Tabla 13. ANOVA con todas las interacciones para %Antagonismo-*P.cinnamomi.* $R^2=.55237$; Adj:0.0 MS Residual=.3300669. (95% de confianza).

Tabla 14. ANOVA con las interacciones más influyentes para %Antagonismo-*P.cinnamomi.* $R^2=.55106$; Adj:0.35865 MS Residual= 0.1418714. En rojo los valores significativos (95% de confianza).

Tabla 15. Coeficientes de regresión para la respuesta Antagonismo-*Aspergillus sp.* $R^2=0.97197$; R^2 Adj: 0.94394 MS Residual=.0018344

Tabla 16. Parámetros obtenidos en biorreactor del actinomiceto cepa Mk-22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figure 1. Representación de posible interacción planta-microorganismo favoreciendo el crecimiento de las plantas y/o el biocontrol de fitopatógenos por los *Streptomycetos* Tomado de Sandhya V. *et al.*, (2017).

Figura 2. Bioreactor tipo BIOSTAT A de Sartorius

Figura 3. Respuestas antagonistas de actinomicetos en los 4 medios de cultivo. 1: PCA, 2: PDA, 3: ASMICO, 4: AN. Todas las B, indican los controles negativos.

Figura 4. Comparación de las medias de los antagonismos (valores en la parte superior) obtenidas en cada uno de los medios de cultivo. ASMICO se diferencia de los otros 3 medios.

Figura 5. Inhibición de *Phytophthora cinnamomi* por las 4 cepas de actinomicetos seleccionados. Prueba realizada sobre PCA. A: control negativo: 49 mm B: con actinomicetos, 10 mm.

Figura 6. Obtención de biomasa en cada experimento.

Figura 7. Determinación de proteínas totales en cada experimento.

Figura 8. Determinación de glucosa en cada experimento. (Valores iniciales enumerados)

Figura 9. Gráfica de Pareto sin retirar efectos.

Figura 10. Gráfica de Pareto incluida la curvatura el retiro de algunos efectos.

Figura 11. Gráfica de superficie respuesta (BH +AP) vs BH.

Figura 12. Gráfica de superficie respuesta BF vs BH

Figura 13. Gráfica de superficie respuesta ASMICO vs (BH+AP)

Figura 14. Modelo obtenido a partir de los coeficientes de regresión lineal

Figura 15. Parámetros físico-químicos obtenidos durante el proceso fermentativo.

Figura 16. Evolución de la producción de antifúngicos con respecto a los días transcurridos.

Figura 17. Inhibición de *Phytophthora cinnamomi* con los extractos crudos obtenidos en el 4to día.

Figura 18. Inhibición de *Aspergillus sp.* con los extractos crudos obtenidos en el 4to día.

Figura 19. Obtención de μ a partir de la biomasa obtenida fase exponencial.

Figura 20. Árbol filogenético para el actinomiceto cepa (MK-22).

Figura 21. Esquema representativo de la excreción de metabolitos antifúngicos

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Situación problemática

Los campos agrícolas son el sustento para una adecuada y sostenible alimentación de la población mundial. Sin embargo, la productividad de estos se ve fuertemente afectada por diversos agentes fitopatógenos causantes de diferentes plagas, de las cuales dos tercios de dichas enfermedades son causados por hongos (Goswami et al., 2016). Para minimizar los efectos de estrés bióticos y abióticos los agroquímicos han sido aplicados en los campos agrícolas con el objetivo de mejorar la producción. Sin embargo, su uso prolongado ha tenido efectos dañinos en el medio ambiente, la salud humana y también ha reducido la calidad de los cultivos (Islam et al., 2013). Para mejorar dicha productividad, los agricultores se han visto en la necesidad de utilizar grandes cantidades no solo de pesticidas sino también de fertilizantes químicos. Estos son sintetizados químicamente a partir de nitrógeno, fósforo y potasio principalmente los cuales al ser usados indiscriminadamente provocan contaminación del suelo, aire y agua ya sea directa o indirectamente (Galloway et al., 2008) (Youssef & Eissa, 2014). El continuo uso de fertilizantes, biocidas y pesticidas afectan negativamente la microflora natural la cual incluye bacterias, hongos, micorrizas, cianobacterias y protozoarios presentes en la rizósfera causando un desbalance en el ecosistema natural, afectando la promoción del crecimiento, control de enfermedades, tolerancia tanto a sales como al estrés por metales pesados (Dash et al., 2017) (Wani et al., 2016). En dicha fina capa de suelo adherida a la superficie de las raíces llamada rizósfera también se ven afectadas las reacciones benéficas plantas-microorganismos específicamente las bacterias asociadas al crecimiento de las plantas o también denominadas bacterias promotoras del crecimiento en plantas PGPB (Kumar et al., 2016) (Kumar et al., 2017).

En nuestro país, los pesticidas tales hexitiazox, acetamiprid, piridabeno, tiabendazol, miclobutanil, tebuconazol, carbendazim y fenil fenol han sido encontrados de forma excesiva y/o no permitida en diversos alimentos tales como naranjas, mandarinas, tomates y uvas. Además de la presencia de micotoxinas en paprika (Delgado *et al.*, 2018). Vale destacar que, de aquellas frutas afectadas, las uvas frescas, al año 2018 se han convertido en el primer producto de la agroexportación con una participación del

12% del total de las agroexportaciones (US\$ 7,033.4 millones), superando a otros productos tradicionales como el café, espárragos, mangos y cacao principalmente (MINAGRI, 2019). Sin embargo, este auge puede ser afectado por el uso indiscriminado de dichos agroquímicos y/o micotoxinas.

La selección de las cepas testigo en la presente investigación se basó en la evaluación de fitopatógenos de cultivos de importancia agrícola nacional, por ello una primera cepa fue *Erysiphe necator* “oídium de los cultivos de vid” sin embargo al ser un hongo parásito obligado no cultivable se eligió en su reemplazo a *Aspergillus* sp. ya que ambos pertenecen al grupo taxonómico Ascomycetes con la característica en común de poseer tanto quitina, así como β -glucanos en sus paredes celulares (Agrios, 2008). El segundo cultivo considerado fue la palta *Persea americana*. Uno de los principales fitopatógenos en este cultivo es *Phytophthora cinnamomi*, por lo que esta cepa también fue seleccionada para las evaluar el potencial antifúngico de los metabolitos excretados por la cepa actinomiceto Mk-22.

Además, diversas especies del género *Aspergillus* son toxigénicas y perjudicial debido a que producen agentes tipo poliquétidos como Aflatoxina B1 (AFB1), B2 (AFB2), G2 (AFG1), G2 (AFG2) y ácido ciclopiazónico (Picot *et al.*, 2017). Los cultivos agrícolas tales como semillas de algodón, maní y frutos secos son muy propensos a contaminación por aflatoxinas, las cuales son extremadamente carcinogénicas, teratogénicas, mutagénicas y supresoras del sistema inmune cuando son ingeridas incluso en pequeñas cantidades por animales y humanos (Cleveland *et al.*, 2003) (Mobeen *et al.*, 2011). Así también, el oomycete *Phytophthora* sp. representa a uno de los principales fitopatógenos en los cultivos hortícolas (Kunova *et al.*, 2016).

Los microorganismos antagonistas y sus metabolitos bioactivos representan una de las mejores alternativas a los pesticidas de síntesis química en el control de plagas en cultivos para una agricultura sustentable y seguridad alimentaria (Xu *et al.*, 2019). En general, los microorganismos controladores pueden interactuar con los fitopatógenos mediante diversos mecanismos incluyendo la producción de antibióticos y enzimas líticas, competición por nutrientes, detoxificación de toxinas y degradación de factores de virulencia (Berg *et al.*, 2006). Entre los candidatos como biocontroladores, las actinobacterias en especial los *Streptomyces* son de inmenso valor porque ellos son potentes productores de compuestos bioactivos con múltiples propiedades biológicas

sumado a sus propiedades filamentosas y de esporulación que les permiten sobrevivir bajo condiciones ambientales desfavorables (Vurukonda *et al* 2018). Es por ello la importancia y el objetivo del presente artículo, estudiar cepas actinomicetales aislados de cultivos de vid y evaluar su potencial utilidad como productores de antifúngicos.

1.2 Formulación del problema

¿Se podrá inducir la producción de metabolitos antifúngicos en una cepa seleccionada de actinomicetos que posea características del grupo de bacterias promotoras de crecimiento de plantas PGPB con potencial para ser utilizada como biopesticida?

1.3 Justificación teórica

Gran atención se ha dado a la agricultura orgánica y sobre todo a los microorganismos del suelo. Los cuales son uno de los más importantes componentes de la ecología o del proceso de restauración ecológica del suelo. Los microorganismos del suelo ahora son considerados como los ingenieros claves que pueden ser manipulados para reestablecer la biodiversidad y funciones en ecosistemas degradados (Young *et al.*, 2005; Heneghan *et al.*, 2008). Los diversos microorganismos presentes están involucrados en diferentes actividades bióticas y juegan un rol curial en el ecosistema del suelo (Ahemad *et al.*, 2009; Chandler *et al.*, 2008; Calderón *et al.*, 2016). Por lo tanto, el control biológico, así como el uso de antifúngicos de origen natural, son una alternativa ambientalmente saludable al uso de fungicidas de síntesis química.

Los actinomicetos, son microorganismos considerados de gran importancia entre otros, por su capacidad de producir diversos e interesantes compuestos bioactivos con actividad antibacteriana, antifúngica, plaguicida, herbicida y otros compuestos de interés industrial, etc., (Shivlata and Satyanarayana, 2017) (Berdy, 2005). Además, son potencialmente capaces de colonizar diversos nichos ecológicos incluyendo hábitats marinos (Harvey, 2000) con alta o baja disponibilidad de materia orgánica e incluso en donde las condiciones ambientales, podrían ser consideradas adversas para otros seres vivos (Leveav y Bovix, 2000; Doroshenko *et al*, 2005).

1.4 Justificación Práctica

Para los campos agrícolas la significancia e importancia de las actinobacterias radica en su capacidad para sintetizar un amplio rango de moléculas antibióticas bioactivas que suprimen el crecimiento y desarrollo de un amplio espectro de fitopatógenos. Algunas especies de actinomicetes, particularmente aquellos pertenecientes al género *Streptomyces*, son bien conocidos por sus propiedades antifúngicas (Gopalakrishnan et al., 2011; Al-Askar et al., 2014) y como agentes antibacterianos (Zhang et al., 2013a; Shrivastava et al., 2017). Se ha estimado que tres cuartas partes de todas las especies de actinomicetos son productores de antibióticos (Passari et al., 2017; Alexander, 1977).

En los últimos años el Ministerio de Agricultura de Perú, ha recomendado para algunos cultivos como la quinua atacados por hongos fitopatógenos el uso de diversos fungicidas de síntesis química como Homai BASF (Thiophanate methyl + Thiram), Revus® Syngenta (Mandipropamida), Acrobat® SC BASF-Nufarm (Dimethomorph); siendo el primero el único fungicida recomendado para su uso en semillas para el control de *Fusarium* y *Rhizoctonia*, y los demás para otros tipos de hongos fitopatógenos, pero todos difícilmente biodegradables, bioacumulables y contaminantes del medio ambiente, muy tóxicos para animales acuáticos y otros seres vivos. (Taylor et al., 2013).

Investigaciones previas han demostrado que los biocidas de síntesis química, son capaces de matar insectos benéficos del suelo y microorganismos simbióticos de la rizósfera (Bartlett et al., 2002). Así mismo su eficacia se ve disminuida en el tiempo por la frecuencia y sobredosificación en su uso, debido a la evolución de patógenos resistentes (Rosenberger y Meyer, 1981). En la tabla 1 se detalla una amplia variedad de metabolitos antifúngicos producidos por actinomicetos.

Tabla 1. Resumen de principios activos producidos por Actinobacterias

Metabolito/Antibiótico Agro-activo	Actinobacteria Productora	Activo contra	Referencias
Kasugamycin	<i>Streptomyces kasugaensis</i>	<i>Pyricularia oryzae</i>	Umezawa et al. (1965)
Polymixin B and D	<i>Streptomyces cacaoi</i> var. <i>Asoensis</i>	Amplio rango de hongos fitopatógenos incluyendo <i>Rhizoctonia Solani</i>	Isono et al. (1965)
Mildiomicin	<i>Streptoverticillium rimofaciens</i>	<i>Rhodotorula rubra</i> , Oídium en varios cultivos	Iwasa et al. (1978)
Geldanamycin	<i>Streptomyces hygrosopicus</i> var. <i>geldanus</i> , <i>Streptomyces griseus</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Rothrock and Gottlieb (1984)
Globopeptin	<i>Streptomyces</i> sp. MA-23	<i>Alternaria Kikuchiana</i> , <i>Pyricularia oryzae</i> , <i>Mucor racemosus</i>	Tanaka et al. (1987)
Faeriefungin	<i>Streptomyces griseus</i>	<i>Fusarium</i> spp.	Smith et al. (1990)
AC-1	<i>Streptomyces</i> sp. AB-88 M	<i>Pyricularia oryzae</i> , <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Fusarium roseum</i> f. <i>sp.cerealis</i>	Matsuyama (1991)
Gopalamicin	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	<i>Erysiphe cichoracearum</i> , <i>Puccinia recondite</i> , <i>Fusarium culmorum</i> y <i>Pyricularia oryzae</i>	M. Nair et al. (1994)
Tubercidin	<i>Streptomyces violaceusniger</i>	<i>Phytophthora infestans</i> , <i>Phytophthora capsici</i>	Hwang and Kim (1995)
Nigericin and Guanidylfungin A	<i>Streptomyces violaceusniger</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Trejo-Estrada et

	YCED9		al. (1998)
Daunomycin	<i>Actinomadura roseola</i> Ao108	<i>Phytophthora capsici</i> and <i>Rhizoctonia solani</i>	Kim et al. (2000)
RhizovitR	<i>Streptomyces rimosus</i>	<i>Alternaria brassicicola</i> , <i>Pythium spp.</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Phytophthora spp.</i> , <i>Botrytis sp.</i>	Marten et al. (2001)
Fungichromin	<i>Streptomyces padanus</i> strainPMS-702	<i>Rhizoctonia solani</i>	Shih et al. (2003)
2,3- dihydroxybenzoic acid, phenylacetic acid, cervinomycin A1 & A2	<i>Micromonospora</i> sp. M39	<i>Pyricularia oryzae</i>	Ismet et al. (2004)
Antimycin A17	<i>Streptomyces</i> sp. GAAS7310	<i>Colletotrichum Nigrum</i> , <i>Curvularia lunata</i> , <i>Rhizopus nigricans</i>	Chen et al. (2005)
Neopeptin A and B	<i>Streptomyces</i> sp. KNF2047	<i>Sphaerotheca fusca</i>	Kim et al. (2007)
Malayamycin	<i>Streptomyces malaysiensis</i>	<i>Stagonospora nodorum</i>	Li et al. (2008)
Metabolito/Antibiótico Agro-activo	Actinobacteria Productora	Active Against	Referencias
Natamycin	<i>Streptomyces lydicus</i> strain A01	<i>Monilinia laxa</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> ,	Lu et al. (2008)
Oligomycins A and C	<i>Streptomyces diastaticus</i>	<i>Phytophthora capsici</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Alternaria alternata</i>	Yang et al. (2010)
2-Furancarboxaldehyde	<i>Streptomyces cavourensis</i> subsp.cavourensis SY224	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Lee et al. (2012)

Antifungal mycin 702	<i>Streptomyces padanus</i> JAU4234	<i>Magnaporthe grisea</i>	Xiong et al. (2013)
Resistomycin and tetracenomycin D	<i>Streptomyces canus</i> BYB02	<i>Magnaporthe grisea</i>	Zhang et al. (2013b)
Bafilomycins B1 and C1	<i>Streptomyces cavourensis</i> NA4	<i>Fusarium spp.</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> y <i>Botrytis cinerea</i>	Pan et al. (2015)
10-(2,2-dimethyl-cyclohexyl)-6,9-dihydroxy-4,9-dimethyl-dec-2-enoic acid methyl ester (SH2)	<i>Streptomyces hydrogenans</i> strain DH16	<i>Alternaria brassicicola</i>	Kaur et al. (2016)
Producción de IAA, HCN y ACC deaminasa	<i>S. rochei</i> strain PTL2	<i>Rhizoctonia solani</i>	Zamoum et al. (2017)

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

- ✓ Obtener antifúngicos extracelulares, a partir de una cepa actinomicetal, capaces de inhibir el crecimiento de *Aspergillus* sp. y de *Phytophthora cinnamomi* con potencial biopesticida.

1.5.2 Objetivo específicos

- ✓ Realizar el *screening* de cepas de actinomicetos a partir del suelo de cultivos de vid que presenten propiedades como bacterias promotoras de crecimiento en plantas PGPB.
- ✓ Determinar los nutrientes influyentes en la producción de metabolitos antifúngicos mediante un diseño factorial completo.
- ✓ Producir los antifúngicos a nivel de biorreactor utilizando los nutrientes y la cepa seleccionada.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

Diversas investigaciones muestran los grandes aportes que las actinobacterias presentan como potenciales agentes de biocontrol para la salud del suelo y de las plantas, protegiéndolas de los fitopatógenos y estimulando su crecimiento (Compant et al., 2005; El-Tarabily and Sivasithamparam, 2006; Yekkour et al., 2012; Goudjal et al., 2014; Toumatia et al., 2016). Para el biocontrol de hongos fitopatógenos y la promoción del crecimiento en plantas, las actinobacterias pueden explorar una amplia variedad de mecanismos como exhibir actividad antifúngica (Zamoum et al., 2015), producción de compuesto antimicrobianos volátiles (De-Oliveira et al. 2010), producción de enzimas líticas (Passari et al., 2015) y sideróforos (Sadeghi et al., 2012), mejoramiento del consumo de potasio y fósforo (Hamdali et al., 2008), colonización interna de tejidos en las raíces con la producción de compuestos fisiológicamente activos tales como reguladores del crecimiento en plantas (El-Tarabily et al., 2009) y 1-aminociclopropano-1-carboliato deaminasa (ACC) (Glick, 2014), e inducir resistencia sistémica (Muzammil et al.2013). Aquellas interesantes características han sido reportadas tanto para actinobacterias rizósfericas como endofíticas, abriendo promisorias perspectivas para posibles exploraciones de productos formulados a base de esporas actinobacteriales como biopesticidas y/o agentes biofertilizantes in pro de una agricultura sostenible.

La aplicación de inoculantes microbianos han demostrado ser efectivos para la supresión del crecimiento de hongos patógenos en diferentes campos agrícolas (Toyota and Watanabe, 2013). Entre las bacterias del suelo, las actinobacterias son considerados como una de las más importantes comunidades bacterianas en la rizosfera del suelo para el crecimiento de las plantas y aquellas bacterias también producen potentes metabolitos secundarios que suprimen fitopatógenos (Benizri et al., 2001).

A continuación, en la tabla 1 se resumen los principales y diversos metabolitos antifúngicos producidos por actinobacterias.

2.2 Bases teóricas

El filo Actinobacteria, comprende bacterias Gram-positivas con alto contenido de GC en su DNA (Barka et al., 2015; Chandra and Chater,2014). Aproximadamente el 80% de los antibióticos conocidos en el mundo provienen de los actinomicetos, especialmente de los miembros del género *Streptomyces* (Passari et al., 2017; Hassan et al., 2011). Las enormes capacidades de actinobacterias para producir antibióticos revela su tremendo potencial y superioridad sobre otros biocontroladores.

2.2.1.Orden Actinomicetales: Crecimiento, morfología, diferenciación y clasificación

Las relaciones entre clases de las actinobacterias revelan la presencia de 9 ordenes basados en la comparación de la secuencia genética 16s del RNAr (LPSN-Bacterio.net,30-01-2017 <http://www.bacterio.net/classifphyla.html>). Cada orden tiene características específicas y el orden Actinomicetales es conocido por la producción de compuestos de importancia industrial tales como antibióticos y enzimas (Demain, 1988; Hopwood, 2007). El término “actinomicetales” también incluye a los órdenes *Frankiales*, *Geodermatophiales*, *Kineosporiales* y *Micrococcales* (LPSN-Bacterio.net,30-01-2017 <http://www.bacterio.net/classifphyla.html>).

Los miembros de los actinomicetos constituyen un diverso grupo bacteriano de Gram positivos, la mayoría con la habilidad para formas hifas ramificadas en algunos de sus estadios de desarrollo (Cross, 1982; Lechevalier & Lechevalier,1985).

En estudios anteriores, miembros de los actinomicetos fueron colocados dentro de dos grupos de desigual tamaño (Lechevalier & Lechevalier, 1985). El primer grupo compuesto de organismos fermentativos principalmente, los que usualmente están más asociados con cavidades naturales de hombres y animales. Por otro lado, el segundo y mayor grupo compuesto por organismos oxidativos para los cuales el suelo es mayormente el reservorio

básico y desde donde ellos fueron diseminados dentro de ambientes no indígenas (Cross, 1982; Kurtböke et al., 2017).

Las especies del primer grupo no producen características morfológicas mayores que un micelio ramificado. El desarrollo micelial puede ser transitorio, ocurriendo solamente durante el crecimiento activo e inmediatamente fragmentándose cuando la tasa de crecimiento es lenta; en casos extremos aparecen como células individuales ramificadas, o que pueden ocurrir bajo condiciones especiales de crecimiento. Sus paredes celulares no contienen ácido diaminopimélico (DAP). Mientras que el segundo grupo, en contraste, sí contienen DAP en sus peptidoglicano. Ellos principalmente desarrollan en estado micelial y se reproducen a través de la formación de esporas unicelulares, diferenciándose ya sea simplemente o en cadenas en las puntas de las hifas tales como *Streptomyces* y *Actinomadura*. Algunos de ellos son miembros formadores de esporangios con esporangiosporas flageladas, por ejemplo, *Actinoplanes*, mientras micromonosporae forma conidia simple sobre su micelio de sustrato. *Dermatophilus* y *Geodermatophilus* forma un micelio de sustrato el cual divide tanto transversal y longitudinalmente para dar forma a un esporangio multilocular. Este gran y complejo segundo grupo contiene algunos géneros distinguidos por una combinación de propiedades estructurales y químicas (Lechevalier and Lechevalier, 1985). Los géneros de mayor importancia industrial tales como *Streptomyces*, *Micromonospora*, y *Actinoplanes* se originan de este segundo grupo (Bérdy, 2005, 2012; Kurtböke,2012).

Phylum Actinobacteria

Clase Actinobacteria

Subclase Actinobacteridae

Orden Actinomycetales

1. Suborden Actinomycineae
 - Famila Actinomycetaceae
2. Suborden Actinopolysporineae
 - Famila Actinopolysporaceae
3. Suborden Catenulisporineae
 - Famila Actinospicaceae
 - Famila Catenulisporaceae
4. Suborden Corynebacterineae
 - Famila Corynebacteriaceae
 - Famila Dietziaceae
 - Famila Mycobacteriaceae
 - Famila Nocardiaceae
 - Famila Segniliparaceae
 - Famila Tsukamurellaceae
5. Suborden Glycomycineae
 - Famila Glycomycetaceae
6. Suborden Jiangellineae
 - Famila Jiangellaceae
7. Suborden Micromonosporineae
 - Famila Micromonosporaceae
8. Suborden Propionibacterineae
 - Famila Nocardiodaceae
 - Famila Propionibacteriaceae
9. Suborden Pseudonocardineae
 - Famila Pseudonocardaceae
10. Suborden Streptomycineae
 - Famila Streptomycetaceae
11. Suborden Streptosporangineae
 - Famila Nocardiosaceae
 - Famila Streptosporangiaceae
 - Famila Thermomonosporaceae

* Ipek (2017).

2.2.2. Actinobacterias PGPB

La rizósfera de las plantas es una fina capa de suelo adherida a la superficie de las raíces, allí es donde se llevan a cabo grandes reacciones benéficas plantas-microorganismos en donde las bacterias asociadas al crecimiento de las plantas son denominadas bacterias promotoras del crecimiento en plantas PGPB (Kumar et al., 2016) (Kumar et al., 2017). Las actinobacterias pueden tener, en general, un positivo rol en la nutrición mineral de plantas. Este es correlacionado tanto con la fijación de nitrógeno y la habilidad para la movilización de metales involucrados con los nutrientes minerales tales como Fe, Zn, y Se. Sin embargo, análisis metagenómicos no han probado que los *Streptomyces* estén involucrados en los procesos benéficos. (Sathya, A. 2017). Los análisis metagenómicos de la microbiota bacteriana en plantas han mostrado que la composición filogenética y taxonómica de tales comunidades microbianas está limitada a pocos phylum bacterianos, incluyendo actinobacterias.

La planta tiene un importante rol en la formación de su microbioma radicular a través de las interacciones nutricionales y la composición de sus exudados (quimiotaxis) (Bulgarelli, et al., 2013) & (Bais et al., 2006). Los exudados de las raíces de las plantas son una fuente de señales metabólicas (flavonoides, estrogolactonas y terpenoides) que tiene la habilidad para formar las comunidades microbianas en la rizósfera.

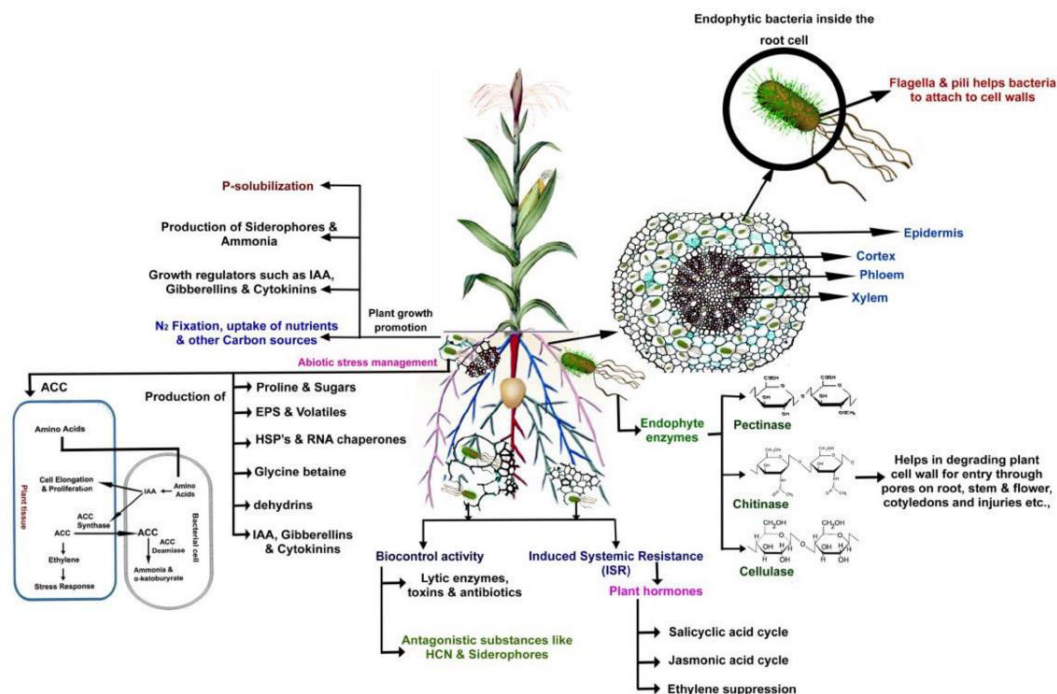


Figure 1. Representación de posible interacción planta-microorganismo favoreciendo el crecimiento de las plantas y/o el biocontrol de fitopatógenos por los *Streptomyces* Tomado de Sandhya V. *et al.*, (2017).

2.2.3. Actinobacterias como supresores de enfermedades en plantas

El fenómeno de la supresión de enfermedades en plantas ocurre debido a la competición entre microorganismos antagonistas y patógenos por espacio, nutrientes y supervivencia ya sea en la rizósfera o en los tejidos de la planta hospedera (Siddikee *et al.*, 2010; Palaniyandi *et al.*, 2013a). El antagonismo es la propiedad exhibida por un organismo debido a la cual crea un ambiente adverso para otro. Los microorganismos antagonistas exhiben varios mecanismos directos (producción de antibióticos, enzimas líticas y parasitismo) e indirectos (inducción de resistencia en hospedero) para

suprimir patógenos. Numerosas actinobacterias han sido encontradas para proteger plantas contra enfermedades a través de su potencial para servir como fuente de compuesto agroactivos, promotores de crecimiento en plantas y agentes de biocontrol (Doumbou *et al.*, 2001; Abdallah *et al.*, 2013). Los antagonistas que presentan múltiples modos para la supresión de enfermedades en plantas tienen una alta tasa de éxito y pueden servir como potenciales buenos agentes

Controladores (Palaniyandi *et al.*, 2013a).

2.2.4. Producción de compuestos agroactivos (Antibióticos) y volátiles por Actinobacterias

Los actinomicetos han servido como vasto reservorio de metabolitos agroactivos por varios años atrás (Doumbou *et al.*, 2001; Sharma, 2014; Passari *et al.*, 2015b). Los antibióticos son una importante clase de metabolitos secundarios producidos por los microorganismos, los cuales son perjudiciales para el crecimiento de otros a bajas concentraciones. Los antibióticos han sido reportados frecuentemente a partir de bacterias, siendo las actinobacterias los mayores productores, contando con cerca del 45% de los antimicrobianos recientemente usados. Interesantemente, de los 33500 metabolitos bioactivos reportados hasta ahora, cerca de 13 700 compuestos provienen de actinobacterias (Berdy, 2012).

Los primeros antibióticos, cicloheximide y estreptomycin, usados para el control de hongos y bacterias en plantas, son producidos por *Streptomyces griseus* (Leben and Keitt, 1954). Kasugamicina obtenida de *Streptomyces kasugaensis* es otro antibacteriano y metabolito antifúngico el cual inhibe la síntesis de proteínas en microorganismos, pero no en mamíferos (Umezawa *et al.*, 1965). Isono *et al.* (1965) aislaron 2 antibióticos, polimixina B y D a partir de *Streptomyces cacaoi* var. *asoensis*, el cual primariamente interfiere con la síntesis de la pared celular fúngica por inhibición específica de la enzima quitina-sintetasa (Endo and Misato, 1969). La Polimixina B se ha

implementado para el control de la enfermedad de la vaina del arroz causada por *Rhizoctonia solani* y también como un inhibidor de un amplio rango de patógenos causantes de enfermedades en vegetales, frutas y cultivos ornamentales. *Streptomyces diastaticus* produce antibióticos macrólidos tales como Oligomicina A y C, exhibiendo una fuerte actividad contra *Aspergillus niger*, *A. alternata*, *P. capsici*, y *Botrytis cinerea* (Yang et al., 2010). Algunos estudios demuestran la utilización de antibióticos producidos por actinobacterias con aplicación para el control de enfermedades foliares, como “la mancha de la hoja de alfalfa” (Samaca et al., 2003) y antracnosis en ocas (Palaniyandi et al., 2011).

2.2.5. Biopesticida o Plaguicida biológico de uso agrícola: Término genérico que incluye a los ACBM, EV, PM y SQ (MINAGRI 2015)

- Agente de control biológico microbiano (ACBM): Agente de control biológico que incluye, pero no está limitado a bacterias, nematodos, hongos, virus, protozoarios y algas.
- Preparados minerales (PM): Sustancias de origen mineral presentes en la naturaleza que poseen muy baja toxicidad, como por ejemplo los preparados de azufre y tierra de diatomeas; no se obtienen por síntesis química. A los efectos de la presente norma se excluyen las sustancias de origen mineral de elevada toxicidad.
- Extracto vegetal (EV): Extracto obtenido de la solución que resulta del tratamiento de las plantas o sus partes con un solvente. La solución se concentra por evaporación, destilación o algún otro proceso. En el marco de este Reglamento solo se considera la extracción suave con agua o etanol (se excluyen otros solventes). Las plantas usadas para la elaboración de productos de protección vegetal, acorde con el presente Reglamento, son plantas o partes de plantas vivas o secadas, incluyendo frutos y semillas.

- Preparados minerales (PM): Sustancias de origen mineral presentes en la naturaleza que poseen muy baja toxicidad, como por ejemplo los preparados de azufre y tierra de diatomeas; no se obtienen por síntesis química. A los efectos de la presente norma se excluyen las sustancias de origen mineral de elevada toxicidad.
- Semioquímicos (SQ) Químicos emitidos por una planta o animal que evocan una conducta o respuesta fisiológica en otro organismo. Cuando el semioquímico afecta un individuo de la misma especie, es denominado feromona. Cuando el semioquímico afecta un individuo de una especie diferente es denominado aleloquímico.

2.2.6. Formulación de biopesticidas basados en actinobacterias

El uso de cultivos microbianos frescos no es adecuado en el sector agrícola. Para eso, diferentes formas de formulaciones sólidas, líquidas y en polvo basadas en esporas actinobacterias han sido desarrolladas (Crawford *et al.*, 2005; Figueiredo *et al.*, 2010; Tamreihao *et al.*, 2016). El proceso de formulación juega un importante rol en la eficacia de productos, por el mejoramiento de la eficacia y supervivencia de los agentes microbianos (Martinez-Alvarez *et al.*, 2016). Inóculos actinobacterianos han sido preparados para aplicaciones en campos e invernaderos en una variedad de formas. Las formulaciones secas tales como las granuladas o en polvos, son preferidos sobre algunos líquidos debido a su facilidad de almacenamiento, transporte y extendido tiempo de vida útil. Además, la mayoría de formulaciones secas pueden ser transformadas en líquidas o suspensiones basadas en agua según sea necesario para aplicaciones de rociado, mojado o remojado de maíz (Lumsden *et al.*, 1995).

Formulaciones comerciales basadas en esporas actinomicetales como ingredientes activos son usados para el sector agrícola como una alternativa

a los pesticidas químicos. Formulaciones biofungicidas basadas en esporas de *Streptomyces griseoviridis* K61 o *Streptomyces lydicus* WYEC108 son comercializadas en forma de polvo húmedo bajo los nombres de Mycostops y Actinovates respectivamente (White *et al.*, 1990). Actino-iron S es un biofungicida bajo la forma granular, el cual está formulado a base de esporas de *S. lydicus*. Arzentt, un biofungicida basado en esporas de 4 cepas de *Streptomyces hygroscopicus* otro ejemplo de productos comerciales (Hamby and Crawford, 2000). Además, *S. hygroscopicus* (Bialaphoss) es comercializado como herbicida, *S. atrovirans* (Incides) y *Saccharopolyspora spinosa* (Tracers) como insecticidas (Reddy *et al.*, 2016). Cepas actinobacteriales aisladas de nichos ecológicos del Sahara en Argelia se comercializan con 3 cepas endofíticas de *Streptomyces spp.* bajo la forma de polvo húmedo y granulos.

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

I.3 Aislamiento de actinomicetos y excreción enzimática

Muestras de suelo fueron colectadas de 2 fundos de la ciudad de Ica ubicados según coordenadas: 14°05'00.1"S 75°43'58.5"W, las cuales se caracterizaban por presentar cuadros de "Oidiosis". Estas muestras fueron procesadas en el laboratorio de Micología Aplicada de la UNMSM tomando 10 g de suelo en 90 mL de solución salina, se diluyó hasta 10^{-1} y se sembró 1 mL por incorporación utilizando como medio el caldo Bushnell Hass (BH) suplementado con carboximetilcelulosa (CMC) al 0.5 % y agar agar 15 g/L. Se realizó por quintuplicado y se incubó a 30 °C durante 20 días (Lino *et al.*, 2020). Se aislaron las colonias que presentaron las características culturales típicas de actinomicetos (Holt JG *et al.*, 2000) y después de varios pasajes sucesivos en agar BH + CMC se purificaron y se criopreservaron en agar BH+CMC1% con glicerol al 20%. Para evaluar las características enzimáticas, las cepas fueron evaluadas por su crecimiento en 6 diferentes sustratos tales como: avena, lecitina, caseína, tween 81, almidón y carboximetilcelulosa. Además, se evaluó su crecimiento sobre Agar Nutritivo (AN), Plate count Agar (PCA), PDA (Agar papa dextrosa) y un nuevo medio denominado ASMICO el cual fue elaborado a partir del caldo Bushnell Hass, sacarosa y un aporte de biomasa fúngica de *Aspergillus sp.*

I.4 Cepas fúngicas Testigo

Se utilizaron 2 cepas fúngicas testigo, una de las cuales fue *Aspergillus sp.*, la cual se aisló a partir de muestras de suelo de los cultivos de vid, diluidas hasta 10^{-1} y sembradas en papa dextrosa agar (PDA). Se procedió a realizar pasajes sucesivos hasta la purificación de la cepa, la cual finalmente fue identificada como *Aspergillus sp.* en el Laboratorio de Micología Aplicada UNMSM. La otra cepa fue *Phytophthora cinnamomi* adquirida del banco de cepas del Instituto de fitopatología de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM).

I.5 Evaluación de medios de cultivo

Para la preparación del medio ASMICO se utilizó biomasa de la cepa de *Aspergillus* sp. la cual fue reactivada sembrando una asada en agar PDA, luego de 7 días de incubación se obtuvieron, con sacabocado, 5 discos de 8mm de diámetro y se colocaron en 5 matraces conteniendo caldo Czapeck y sacarosa 15 g/L. Se fermentó durante 7 días a 120 rpm y 30 °C. Los matraces fueron autoclavados a 121°C y 1.5 psi de presión, se tamizó utilizando gasa estéril para separar la biomasa de la fase líquida. Dicha biomasa fúngica obtenida por el proceso fermentativo fue secada en horno a 60 °C durante 3 horas. Finalmente se guardó en frasco estéril hasta su uso. Para preparar el medio de cultivo ASMICO se tomó biomasa seca (1.4 % p/Vol.) 1.4g/100 mL, cloruro de sodio 0.12g/L, cloruro de potasio 0,15g/L, citrato de sodio 0,29 g/L, sacarosa 4,0 g/L y se completó con 15 g/L de agar-agar. Los otros 3 medios de cultivo Papa Dextrosa agar o PDA, Plate count agar o PCA y Agar nutritivo o AN se elaboraron según su indicación comercial.

I.6 Pruebas de antagonismo

En cada uno de los 4 medios de cultivo se colocaron 4 cepas actinomicetales, sembradas por estriado y cada extremo, se incubaron a 30 °C durante 72 horas (Zhao et al., 2012). Luego se procedió a colocar la cepa testigo *Aspergillus* sp. en el centro de la placa. Se sembró también la cepa fúngica testigo sin actinomicetos como control negativo. Todas las placas se sembraron por triplicado y fueron incubadas a 30°C durante 7 días. Luego de este periodo se procedió a verificar cada placa y comparar con el control negativo para verificar la inhibición, el valor de antagonismo se calculó restando el tamaño del diámetro del hongo crecido en el control negativo menos el tamaño del diámetro del mismo *Aspergillus* sp. que fue enfrentado contra los actinomicetos. A partir de esos resultados se seleccionaron 18 cepas actinomicetales con los mejores resultados de antagonismo. Posteriormente, se escogieron las 4 cepas de mayor inhibición y con al menos 1 de las características PGPB (producción de sideróforos, fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos y producción de ácido indol acético AIA) y se enfrentaron contra *Phytophthora cinnamomi*. Estas pruebas fueron realizadas sobre agar PDA siguiendo la misma metodología contra *Aspergillus* sp.

I.7 Evaluación de la capacidad PGPB de actinomicetos

Del total de 35 cepas, se seleccionaron 18 actinomicetos que presentaron los mejores resultados de antagonismo, estos actinomicetales fueron evaluados para conocer sus características PGPB, tal como se detalla a continuación:

I.7.1 Producción de sideróforos

Las cepas fueron inoculadas en el medio descrito por S&T (Simon & Tessman, 1963), incubadas a 30°C con agitación de 120 rpm por 14 días. Se centrifugó 5 ml del cultivo a 4 000 rpm por 6 min, colocando 100 µL del sobrenadante de cada cultivo con 100 µL de la solución de 5 mM de perclorato férrico (SIGMA-ALDRICH) en 0.14 M de ácido sulfúrico. Para indicar presencia de sideróforos debió ocurrir el cambio de color de la mezcla anterior a un café rojizo.

I.7.2 Fijación de nitrógeno

Las cepas de los actinomicetos fueron sembradas por puntura en Agar NFB, se buscó determinar la capacidad de estos microorganismos para utilizar el N₂ como la única fuente nitrogenada. Se evaluó así la capacidad de estas actinobacterias para crecer en la superficie de dicho medio (Valdes et al., 2005). Las placas fueron incubadas a 30°C por 14 días, luego de este tiempo se verificó el crecimiento y tamaño de los halos obtenidos.

I.7.3 Solubilización de fosfatos

Las cepas aisladas de actinomicetos fueron reactivadas en caldo bushnell Hass + sacarosa 15%, posteriormente, se sembró cada cepa en placas con medio SRSM-1 (Vásquez et al., 2000) (Gunmarsson et al., 2004), evaluando la presencia de ácidos orgánicos por la variación de pH del medio, lo cual producirá un cambio de color de rojo a amarillo. Las placas fueron incubadas

por 14 días a 30°C, luego de este tiempo se midió el tamaño de los halos obtenidos.

I.7.4 Producción de ácido indol acético (AIA)

Los actinomicetos fueron colocados en el Caldo B suplementado con triptona e incubados a 30°C, agitación de 120 rpm durante 14 días. Luego de este tiempo se centrifugó 5 ml de cada cultivo a 3000 rpm por 15min, se retiró 100 µL del sobrenadante y en un tubo aparte se agregó 200 µL del reactivo de Salkowsky, finalmente se dejó en oscuridad durante 15 minutos. La lectura positiva para indicar presencia de AIA fue dada por el viraje de color, de amarillo a fucsia (Celis et al., 2007).

I.8 Producción de metabolitos antifúngicos

I.8.1.1 Elaboración del diseño experimental

Se realizó utilizando el software Statistica 10. Se consideraron 3 factores: Medio de cultivo Bushnell hass (BH) solo, BH más agua peptonada (AP) y ASMICO. En total 11 experimentos incluidos 3 puntos centrales (Tabla 2).

Tabla 2. Resumen de los factores considerados para el diseño factorial completo FFD (

#EXP	% BH	%(BH+AP)	ASMICO
1	1	1	1
2	10	1	1
3	1	10	1
4	10	10	1
5	1	1	10
6	10	1	10
7	1	10	10
8	10	10	10
9	5.5	5.5	5.5
10	5.5	5.5	5.5
11	5.5	5.5	5.5

* #Exp: Número de experimento, BH: Buhsnell haas; AP: Agua peptonada; BF: biomasa fúngica

I.8.2 Proceso fermentativo

De las 18 cepas de actinomicetos que presentaron inhibición en placa se seleccionó la cepa MK-22 o Act-22 debido a que fue la actinobacteria que presentó la mayor inhibición y además presentó 1 característica PGPB (producción de sideróforos).

. Esta cepa se utilizó para el proceso fermentativo. Para ello se reactivó dicha cepa tomando 1 asada del vial criopreservado con glicerol 20% y se trasegó al caldo BH +sacarosa 3% en tubos de 15 mL conteniendo c/u 5mL. Se mantuvo en agitación por 48h a 120rpm y 30 °C, luego se trasegó a un matraz estéril para hacer una sola solución madre, desde allí se dispensó 5 mL en cada matraz de 1L conteniendo 250 mL del medio de cultivo en la proporción que se indica según la tabla 2. Se mantuvo en agitación a 120 rpm y 30 °C durante 10 días.

Para cada uno de los 11 matraces se tomó las muestras iniciales y se guardaron como tiempo cero T_0 .

El medio de cultivo se preparó en base al caldo agua peptonada, las sales del Bushnell haas (g/L) sulfato de magnesio 0.2, cloruro férrico 0.05, sulfato dipotásico 1.0, sulfato monopotásico 1.0, cloruro de calcio 0.02 y nitrato de amonio 1.0 y la biomasa fúngica del hongo *Aspergillus sp.* al 1.4% p/v.

I.8.3 Obtención de extractos crudos

Los extractos se obtuvieron retirando en tubos de 15mL, 5 mL de cada uno de los 11 matraces para los tiempos de 3,5, 8 y 10 días. Luego se centrifugaron a 6000 rpm y se obtuvieron los sobrenadantes o extractos crudos. La biomasa obtenida también fue medida para cada experimento, por diferencia de pesos de cada tubo, pesando antes y después de cada experimento los tubos y secándolos a 60 °C por 12 h.

I.8.4 Cuantificación de componentes proteicos totales y glucosa

A cada extracto crudo se midió la concentración de proteínas totales utilizando el método colorimétrico de Qubit 3.0 fluorometer de Invitrogen life technologies el cual presenta mejor sensibilidad que los métodos de Biuret y Bradford. Para la realización de esta técnica se necesitó preparar una solución madre compuesta por el reactivo Qubit y el buffer Qubit mezclando en una proporción 1 en 199 respectivamente por cada muestra a analizar, esto quiere decir que si necesitamos realizar 10 pruebas el volumen final sería de 2000 μL . Luego de preparada la solución madre se agregó a los 190 μL , 10 μL de cada estándar (3 en total) y en el caso de las muestras se adicionó μL 5 a los 195 μL de solución madre, completando 200 μL por cada análisis. Luego de preparada cada muestra se homogenizó utilizando un vortex y se incubó por 15 min. a temperatura ambiente, finalmente se realiza la lectura en el espectrofotómetro portátil.

La concentración de glucosa se midió utilizando el espectrofotómetro semiautomático CM 50 Wiener Lab.

I.8.5 Evaluación de la actividad antifúngica

Se tomaron los extractos crudos de cada matraz previamente tamizados y filtrados a través de membranas de Nylon (Millipore) de tamaño de poro 0.25 μm y se colocaron en una proporción 1:1 con el medio de cultivo PDA el cual se aumentó su composición de agar agar en un 50%. Luego de preparada dicha mezcla se colocó en cada placa Petri y se dejó solidificar. Después de 15 minutos se procedió a colocar las cepas testigo de *Aspergillus sp.* y se incubaron por 5-7 días a 30 $^{\circ}\text{C}$.

I.8.6 Producción de metabolitos antifúngicos en Bioreactor

Se preparó 1.8 L del medio de cultivo tomando los componentes del experimento #3 (Tabla 2 y Figura 2) ya que allí se obtuvieron los mejores resultados.

Se utilizó el biorreactor tipo BIOSTAT A de Sartorius. El proceso se inició tomando el inóculo de 5 mL y llevándolo a un matraz conteniendo 195 mL del medio de cultivo #3. Se dejó incubando por 14 horas y luego se trasegó al biorreactor utilizando embudo estéril y mechero. Se configuró el equipo a 30 °C, 120 rpm y se dejó incubando por 7 días. El flujo de aire/oxígeno se realizó de forma externa mediante la utilización de una electrobomba marca RESUN, modelo ACO 003 de 240V.

Se tomaron muestras por triplicado de 5 mL de cada día para la obtención de biomasa y elaborar la curva de crecimiento.



Figura 2. Bioreactor tipo BIOSTAT A de Sartorius

I.9 Análisis estadístico

I.9.1 Influencia de los medios de cultivo sobre la respuesta antifúngica y selección del más idóneo

Mediante el análisis de varianza (ANOVA) utilizando el software Statistica 10, se comparó la influencia de los diferentes medios de cultivo en la producción de metabolitos antifúngicos verificando así si existe diferencias significativas entre los diferentes medios de cultivo. Para ello se estableció la siguiente hipótesis: H0: No hay diferencia significativa entre los grupos evaluados ($\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$) Es decir los medios de cultivo no influyen en la respuesta antagonista de los actinomicetos, H1: Al menos uno de los grupos evaluados es significativamente diferente ($\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4$). Es decir, los medios de cultivo sí influyen en la respuesta antagonista de los actinomicetos. Se utilizó un nivel de significancia de 0.05.

I.9.2 Selección de nutrientes influyentes

Con la finalidad de detectar los componentes estadísticamente influyentes en la producción de antifúngicos por parte de la cepa Mk 22, se realizó el análisis de las varianzas (ANOVA), efectos estimados, gráficos de Pareto, contornos y superficie respuesta (RSM) así como regresión lineal de los 11 experimentos se realizaron con el software STATISTICA 10.

I.10 Identificación molecular

La identificación molecular de la cepa Act-22 (MK22) se realizó mediante extracción del DNA, posterior amplificación mediante PCR del gen ribosomal 16s y el secuenciamiento respectivo. Se compararon dichas secuencias en el programa BLAST y se obtuvo el nivel de similitud. El árbol filogenético en donde se muestra la posición filogenética de la cepa MK22 fue construido usando secuencias del gen menor ribosomal 16S por el método máximo likelihood (ML) y bajo el modelo de sustitución de Hasegawa-Kisino-Yano (HKY). Los valores del bootstrap de los nodos fueron en todos los casos mayores al 80% las mismas que se verificaron estadísticamente mediante las pruebas approximate likelihood ratio test (aLRT) y SH-LRT en el programa PhyML v2.4.5. El árbol fue finalmente visualizado con el programa Mega 7 (Kumar et al., 2016). La especie *Intrasporangium calvum* fue utilizada como outgroup.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

4.1 Aislamiento y caracterización enzimática de actinomicetos

35 actinomicetos fueron aislados de suelos de cultivos de vid en Ica, Perú. Debido a sus características de crecimiento típicas en los diversos medios de cultivo, entre ellos el agar con CMC al 0.5%, que les permiten un crecimiento bien diferenciado con otros grupos microbianos, se pudo lograr un aislamiento sin demasiadas purificaciones, favoreciendo así la selección de cepas para un fin específico. En resumen, este estudio permitió confirmar que 31 cepas (88.6 %) fueron capaces de crecer degradando avena, 32 cepas (91.4 %) poseen lecitinasas, 29 cepas (82.9%) degradan caseína, 8 cepas (22.9 %) poseen esteraras, 33 (94.3%) cepas poseen amilasas y 30 cepas (85.7%) degradan CMC (Tabla 3).

4.2 Influencia de los medios de cultivo y antagonismo

Los 4 medios de cultivo evaluados permitieron evidenciar que el poder antagonista de los actinomicetos varía dependiendo del medio en el cual se desarrolla la prueba. Así se pudo comprobar que el medio ASMICO, elaborado con biomasa de *Aspergillus* sp., sales y sacarosa fue el que presentó los mejores resultados en comparación a PDA, PCA y AN. En la Figura 3 se muestra el poder antagonista de algunos actinomicetos seleccionados, en los diferentes medios de cultivo. Se confirmó que en los 4 medios de cultivo existe inhibición de *Aspergillus* sp., pero fue el medio de cultivo ASMICO en el cual se observaron los mejores resultados de antagonismo.

De las 35 cepas de actinomicetos aisladas, 18 fueron seleccionadas debido a que presentaron inhibición contra la cepa testigo *Aspergillus* sp. (Tabla 4). La respuesta antagonista en los 4 medios de cultivo utilizados se evidencia en la Figura 3. El medio de cultivo ASMICO fue el que presentó las medias más altas con 26.2 mm como tamaño promedio por la inhibición en el crecimiento del hongo testigo (Figura 4). En base a los mayores tamaños de inhibición provocado contra *Aspergillus* sp. 4 cepas de actinomicetos fueron seleccionadas Act-1, Act-11, Act-17 y Act-22. Estos 4 actinomicetos también fueron seleccionados debido a que provocaron la inhibición de *Phytophthora cinnamomi*, reduciendo su crecimiento hasta 10 mm de diámetro

en comparación a los 49 mm del control negativo, reduciendo en 39 mm el crecimiento del fitopatógeno testigo (Figura 5).

Tabla 3. Características fenotípicas de las cepas actinomicetales en diferentes sustratos.

Cepas	Avena	Lecitina	Caseína	Tween 81	Almidón	CMC 1%
Act-1	+	+	+	-	+	+
Act-2	+	+	+	-	+	+
Act-3	+	+	+	+	+	+
Act-4	+	+	+	-	+	+
Act-5	+	+	+	-	+	+
Act-6	+	+	+	-	+	+
Act-7	+	+	+	+	+	+
Act-8	+	+	+	-	+	+
Act-9	-	-	-	-	-	-
Act-10	+	+	+	-	+	+
Act-11	+	+	+	-	+	+
Act-12	+	+	+	-	+	+
Act-15	+	+	+	-	+	+
Act-16	+	+	+	-	+	+
Act-17	+	+	+	-	-	+
Act-18	+	+	+	-	+	+
Act-19	+	+	+	-	+	+
Act-20	+	+	+	-	+	+
Act-21	-	+	+	-	+	+
Act-22	+	+	+	-	+	+
Act-23	+	+	+	+	+	+
Act-24	+	+	+	-	+	+
Act-25	-	+	+	-	+	+
Act-26	+	-	+	-	+	+
Act-27	-	+	+	+	+	+
Act-28	+	+	-	-	+	+
Act-29	+	+	-	+	+	+
Act-30	+	+	-	-	+	-
Act-31	+	+	+	+	+	+
Act-32	+	+	+	+	+	+
Act-33	+	+	+	+	+	-
Act-34	+	+	-	-	+	-
Act-35	+	-	-	-	+	-
Act-36	+	+	+	-	+	+
Act-37	+	+	+	-	+	+

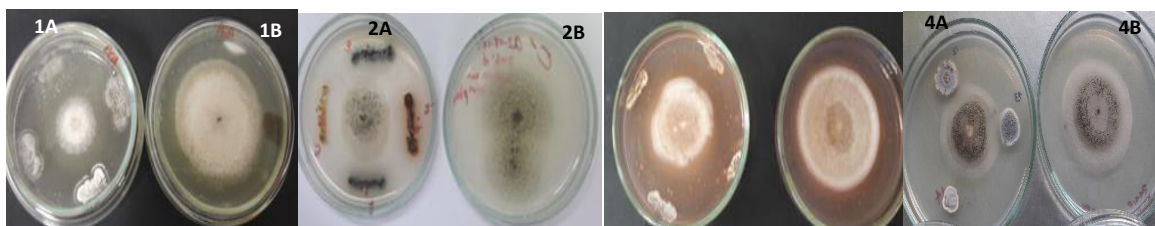


Figura 3. Respuestas antagonistas de actinomicetos en los 4 medios de cultivo. 1: PCA, 2: PDA, 3: ASMICO, 4:AN. Todas las B, indican los controles negativos.

Tabla 4. Tamaños (mm) obtenidos por la inhibición del crecimiento de *Aspergillus sp.*

*Los valores son el promedio de 3 repeticiones.

Cepas	ASMICO	PDA	PCA	AN
Act-1	27	27	21	24
Act-2	28	28	22	17
Act-3	30	29	20	18
Act-4	30	25	18	14
Act-5	29	20	18	19
Act-6	28	28	15	14
Act-7	29	5	7	8
Act-8	20	10	11	12
Act-9	20	11	14	13
Act-10	27	22	23	20
Act-11	28	27	24	21
Act-12	19	10	8	11
Act-13	27	27	20	22
Act-14	29	5	4	6
Act-15	25	22	17	18
Act-16	12	5	5	4
Act-17	28	25	24	21
Act-22	35	28	19	23

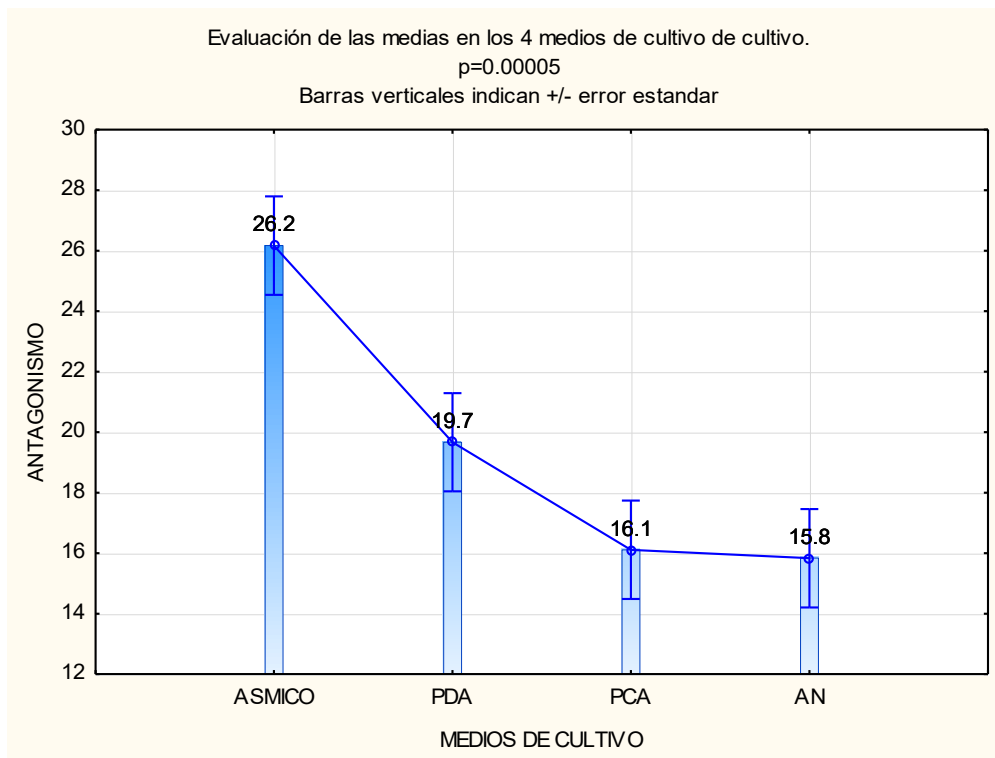


Figura 4. Comparación de las medias de los antagonismos (valores en la parte superior) obtenidas en cada uno de los medios de cultivo. ASMICO se diferencia de los otros 3 medios.

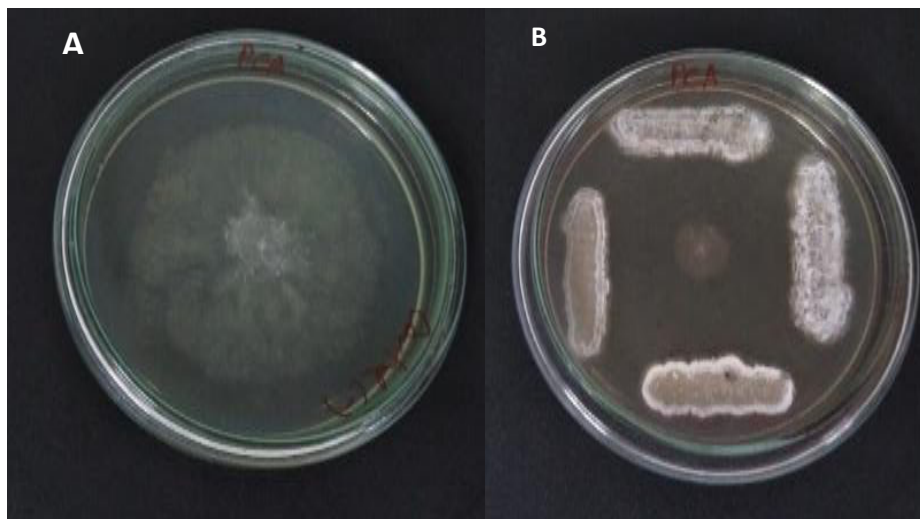


Figura 5. Inhibición de *Phytophthora cinnamomi* por las 4 cepas de actinomicetos seleccionados. Prueba realizada sobre PCA. A: control negativo: 49 mm B: con actinomicetos, 10 mm.

4.3 Evaluación de la capacidad PGPB de actinomicetos

Se confirmó que 8 actinomicetos presentaron capacidad para solubilizar fosfatos. 2 actinomicetos con capacidad para producir sideróforos fueron seleccionados, las cepas Act-1 y Act-22, y debido a que también presentaron poder antagonista, fueron seleccionadas. La cepa Act-11 fue seleccionada debido a la producción de AIA y por ser una cepa con poder antagonista. Y finalmente la cepa Act-17 presentó propiedades para fijar nitrógeno, por ello fue la última en ser seleccionada. Con estos resultados se seleccionaron las 4 cepas que presentaron tanto actividad antifúngica, así como al menos 1 de las propiedades PGPB. En la tabla 5 se resumen las características PGPB de las 18 cepas seleccionadas.

Tabla 5. Evaluación de las características PGPB en los actinomicetos seleccionados

Cepa	Fijac.N2 (cm)	Solubilizad. Fosfatos (cm)	AIA (color)	Sideróforos (color)
Act-1	-	1,4	-	+
Act-2	-	-	-	-
Act-3	-	-	-	-
Act-4	-	-	-	-
Act-5	-	-	-	-
Act-6	-	0,7	-	-
Act-7	-	1,2	-	-
Act-8	-	0,2	-	-
Act-9	-	0,5	-	-
Act-10	-	1	-	-
Act-11	-	2,3	+	-
Act-12	-	-	-	-
Act-13	-	-	-	-
Act-14	-	-	-	-
Act-15	-	-	-	-
Act-16	-	-	-	-
Act-17	0,8	3,1	-	-
Act-22	-	-	-	+

* En negrita las cepas antagonistas que presentaron al menos 1 característica PGPB.

4.4 Producción de metabolitos antifúngicos

4.4.1 Elaboración del diseño experimental

En la tabla 6 se resume las cantidades utilizadas en el diseño experimental mientras que en la tabla 7 se detalla la biomasa obtenida en cada experimento.

Tabla 6. Cantidades de cada componente utilizado en el diseño experimental (g/250 mL)

#Exp.	BH	(BH+H ₂ O PEPT)		ASMICO
		BH	H ₂ O PEPT	
1	0.00818	0.00818	0.03750	0.00350
2	0.08175	0.00818	0.03750	0.00350
3	0.00818	0.08175	0.37500	0.00350
4	0.08175	0.08175	0.37500	0.00350
5	0.00818	0.00818	0.03750	0.03500
6	0.08175	0.00818	0.03750	0.03500
7	0.00818	0.08175	0.37500	0.03500
8	0.08175	0.08175	0.37500	0.03500
9	0.04496	0.04496	0.20625	0.01925
10	0.04496	0.04496	0.20625	0.01925
11	0.04496	0.04496	0.20625	0.01925

- BH: caldo bushnell has (HiMedia)
- H₂O PEPT: Agua peptonada o también denominada AP (Merck)

Nota Importante: Estos valores fueron obtenidos a partir de las recomendaciones de un primer diseño factorial en donde el análisis de superficie respuesta nos indicaba que dichas concentraciones debían disminuirse para obtener mejores resultados de antagonismo. Por lo tanto, la tabla 6 es un segundo diseño factorial en donde sus concentraciones fueron reducidas en 10 veces.

Tabla 7. Resumen de la biomasa obtenida durante el proceso fermentativo.

	Biomasa (g/L)		
	76H (3d)	122h (5d)	192h (8d)
1	0.10	0.27	4.12
2	9.96	11.79	8.79
3	20.22	22.50	51.01
4	26.04	35.39	36.99
5	0.14	0.66	1.36
6	0.62	1.29	2.24
7	0.84	0.64	5.70
8	0.08	0.98	2.50
9	4.18	22.94	48.87
10	4.10	24.65	54.18
11	4.02	21.23	43.57

4.4.2 Proceso fermentativo

El proceso fermentativo mostró que la mayor biomasa se obtuvo en los experimentos del 2 al 4 así como en los puntos centrales (9,10 y 11) Figura 6. Esto estableció una relación inversamente proporcional con la concentración de glucosa ya que en aquellos experimentos donde se obtuvo las menores cantidades de dicho azúcar (mayor a cero) Figura 8, fue en donde se obtuvo la mayor biomasa.

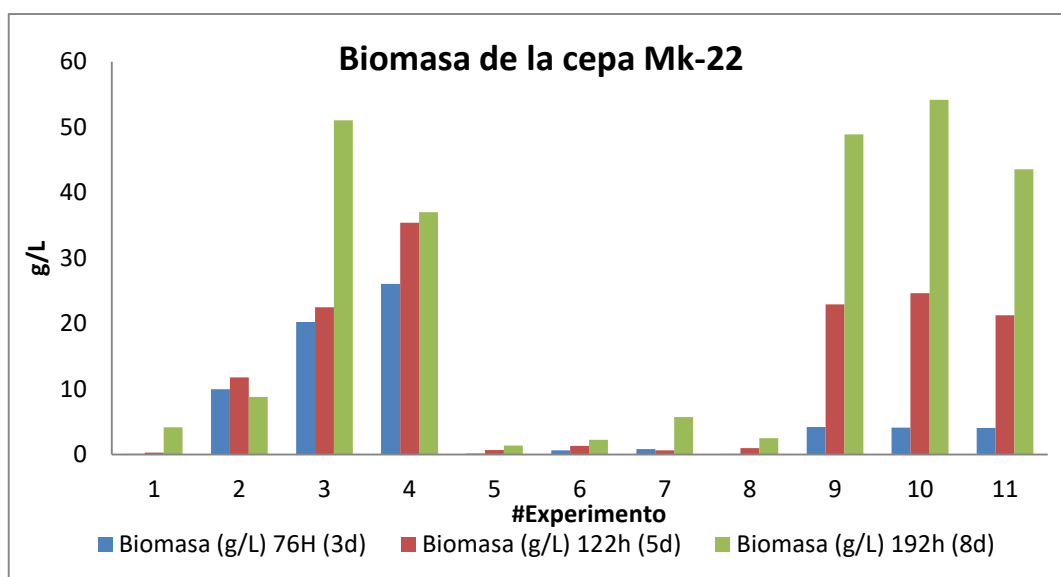


Figura 6. Obtención de biomasa en cada experimento.

4.4.3 Cuantificación de componentes proteicos totales y glucosa

Las concentraciones de proteínas totales (PT) y glucosa fueron determinadas para conocer la relación de dichos componentes y la producción de biomasa, sobre la producción de antifúngicos en cada uno de los 11 experimentos. La concentración de proteínas totales nos permitió conocer si existió excreción de metabolitos proteicos los cuales pudieran actuar como antifúngicos. Como se puede observar en las Figuras 7 y 8, fueron los experimentos 1, 3 y 4 en donde se pudo comprobar este comportamiento. Además, 3 y 4 evidenciaron la mejor respuesta antifúngica, lo cual se detallará posteriormente.

En cuanto a la concentración de glucosa, es importante conocer la concentración óptima para la máxima producción de antifúngicos. Esto es muy importante ya que en muchos de nuestros experimentos se evidenció inhibición del crecimiento de nuestra cepa por un exceso de dicha hexosa (Figura 8).

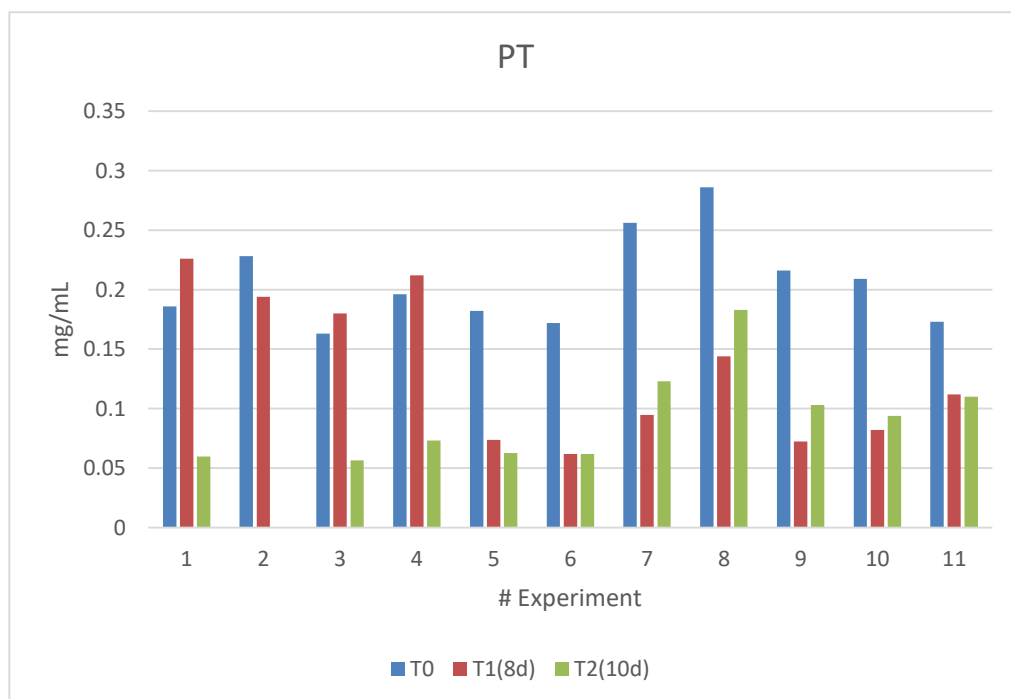


Figura 7. Determinación de proteínas totales en cada experimento.

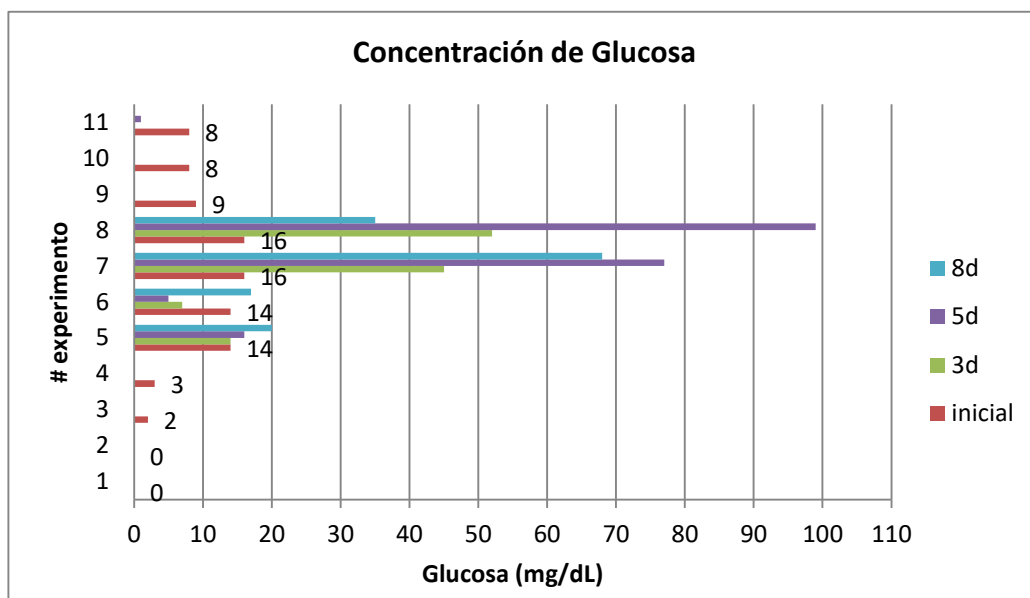


Figura 8. Determinación de glucosa en cada experimento. (Valores iniciales enumerados)

4.5 Evaluación de la actividad antifúngica

La actividad antifúngica de cada uno de los 11 experimentos varió considerablemente en cada uno de ellos. Los experimentos 3 y 4 presentaron la mayor inhibición contra la cepa testigo *Aspergillus sp.* y *Phytophthora cinnamomi* (Tabla 8).

Tabla 8. Resumen de los % de inhibición obtenidos en cada experimento.

#EXP	% BH	%(BH+AP)	% ASMICO	%Antag. <i>Aspergillus</i> sp.	%Antag. P.c
1	1	1	1	20.74%	12.6%
2	10	1	1	26.67%	18.3%
3	1	10	1	71.11%	99.8%
4	10	10	1	59.26%	99.8%
5	1	1	10	23.70%	3.2%
6	10	1	10	20.74%	7.5%
7	1	10	10	14.81%	10.6%
8	10	10	10	11.85%	8.0%
9	5.5	5.5	5.5	32.59%	99.8%
10	5.5	5.5	5.5	29.63%	99.8%
11	5.5	5.5	5.5	35.56%	99.8%

ASMICO: Mejor Medio de cultivo para la producción de antifúngicos

BH: Caldo de Bushnell haas

AP: Agua peptonada

4.7 Análisis estadístico

4.7.1 Influencia de los medios de cultivo sobre la respuesta antifúngica

Mediante un análisis de varianza (ANOVA) se confirmó la existencia de diferencias significativas entre los 4 medios evaluados ya que se obtuvo un valor $p < 0.05$ (Tabla 9), por lo cual se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa. La prueba de Tukey evidenció que el medio ASMICO es el único que muestra dicha diferencia (Tabla 10).

Tabla 9. Análisis ANOVA donde se confirma la influencia de los medios de cultivo sobre el antagonismo con un $p < 0.05$.

	Grades'/Lib.	SS	MS	F	p
Intercepto	1	27222,22	27222,22	572,2529	0
Medios de cultivo	3	1249	416,33	8,752	0,000055*
Error	68	3234,78	47,57		
Total	71	4483,78			

* Indica que la respuesta fue significativa, $p < 0,05$

Tabla 10. Prueba de Tukey HSD para la variable Antagonismo. Df=68, MS=47.57

	Medios de cultivo	{1} - 26,16	{2} - 19,68	{3} - 16,11	{4} - 15,83
1	ASMICO		0,030725*	0,000378*	0,000296*
2	PDA	0,030725*		0,415957	0,348863
3	PCA	0,000378*	0,415957		0,999429
4	AN	0,000296*	0,1348863	0,999429	

* Indican que la respuesta fue significativa, $p < 0,05$

4.7.2 Selección de factores influyentes

Los análisis de las varianzas nos permitieron determinar y seleccionar los nutrientes que influyeron significativamente en la producción de los metabolitos antifúngicos. A continuación, se detallan cada uno de ellos:

Tabla 11. ANOVA con todas las interacciones para %Antagonismo-*Aspergillus* sp. $R^2=0.97807$; Adj:0.92689 MS Residual=.0023922. En rojo los valores significativos (95% de confianza)

	SS	df	MS	F	p
(1)BH(%)	0.000184	1	0.000184	0.07705	0.799363
(2)BH+AP(%)	0.074459	1	0.074459	31.12639	0.011368
(3)ASMICO(%)	0.176062	1	0.176062	73.59941	0.003329
1 by 2	0.001196	1	0.001196	0.49980	0.530554
1 by 3	0.000800	1	0.000800	0.33443	0.603619
2 by 3	0.066139	1	0.066139	27.64813	0.013401
1*2*3	0.001196	1	0.001196	0.49980	0.530554
Error	0.007176	3	0.002392		
Total SS	0.327212	10			

Tabla 12. ANOVA con las interacciones más influyentes para %Antagonismo-*Aspergillus* sp. $R^2 =0.97197$; Adj:0.94394 MS Residual=0.0018344. En rojo los valores significativos (95% de confianza)

	SS	Df	MS	F	p
(1)BH(%)	0.000184	1	0.000184	0.10048	0.764064
(2)BH+AP(%)	0.074459	1	0.074459	40.59019	0.001409
(3)ASMICO(%)	0.176062	1	0.176062	95.97687	0.000189
2 by 3	0.066139	1	0.066139	36.05439	0.001840
1*2*3	0.001196	1	0.001196	0.65176	0.456155
Error	0.009172	5	0.001834		
Total SS	0.327212	10			

Tabla 13. ANOVA con todas las interacciones para %Antagonismo-*P.cinnamomi*. $R^2=.55237$; Adj:0.0 MS Residual=.3300669. (95% de confianza).

	SS	df	MS	F	p
(1)BH(%)	0.000675	1	0.000675	0.002044	0.966780
(2)BH+AP(%)	0.389848	1	0.389848	1.181118	0.356647
(3)ASMICO(%)	0.505590	1	0.505590	1.531780	0.303881
1 by 2	0.002000	1	0.002000	0.006059	0.942856
1 by 3	0.000205	1	0.000205	0.000620	0.981704
2 by 3	0.323540	1	0.323540	0.980225	0.395131
1*2*3	0.000020	1	0.000020	0.000060	0.994312
Error	0.990201	3	0.330067		
Total SS	2.212077	10			

Tabla 14. ANOVA con las interacciones más influyentes para %Antagonismo-*P.cinnamomi*. $R^2=.55106$; Adj:0.35865 MS Residual= 0.1418714. En rojo los valores significativos (95% de confianza).

	SS	df	MS	F	p
(2)BH+AP(%)	0.389848	1	0.389848	2.747897	0.141349
(3)ASMICO(%)	0.505590	1	0.505590	3.563720	0.101004
2 by 3	0.323540	1	0.323540	2.280516	0.174755
Error	0.993100	7	0.141871		
Total SS	2.212077	10			

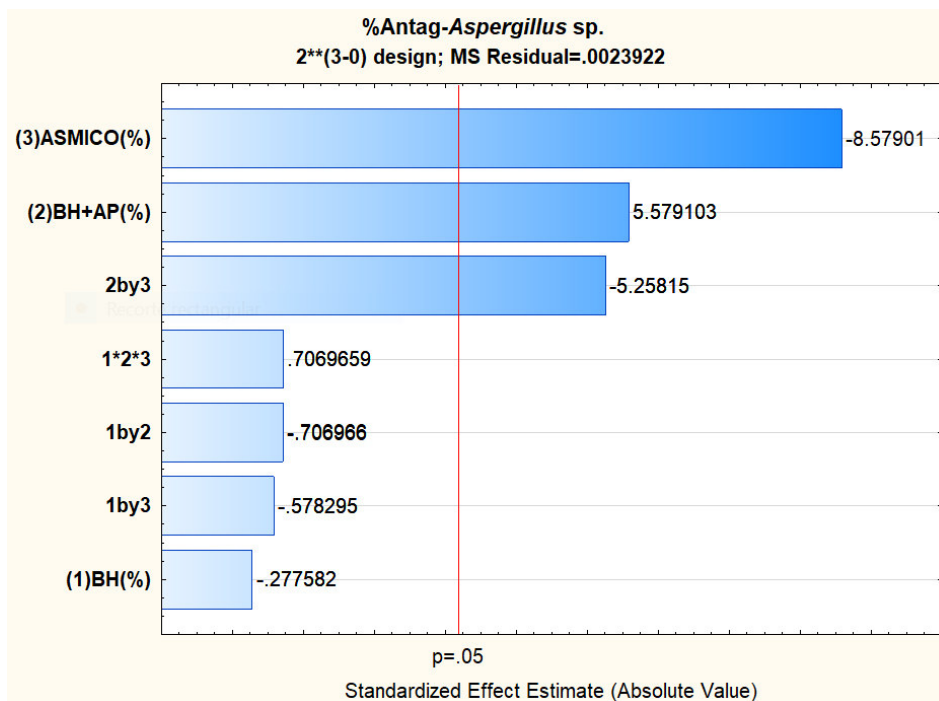


Figura 9. Gráfica de Pareto sin retirar efectos.

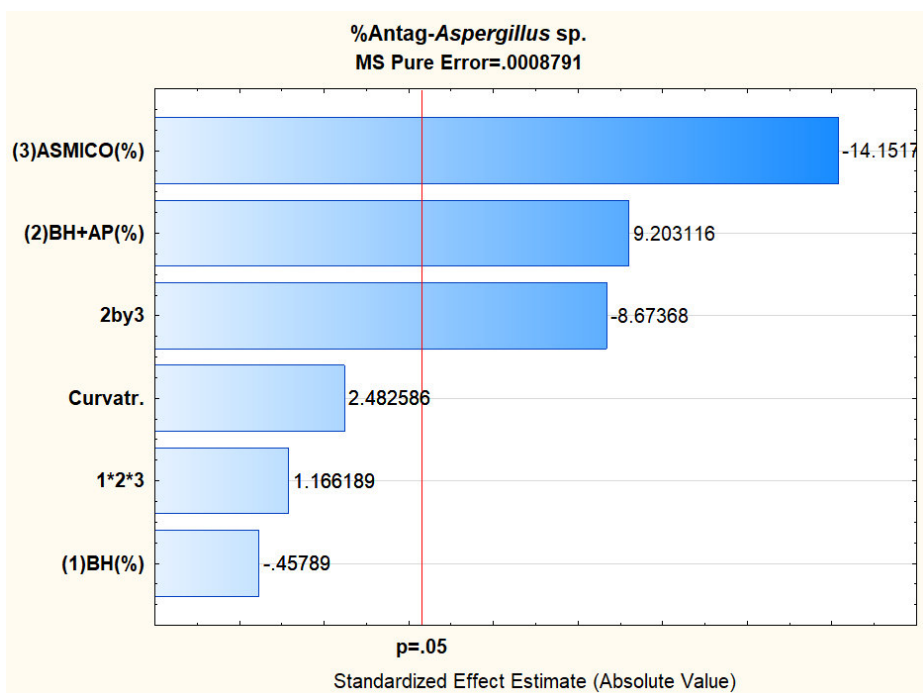


Figura 10. Gráfica de Pareto incluida la curvatura el retiro de algunos efectos.

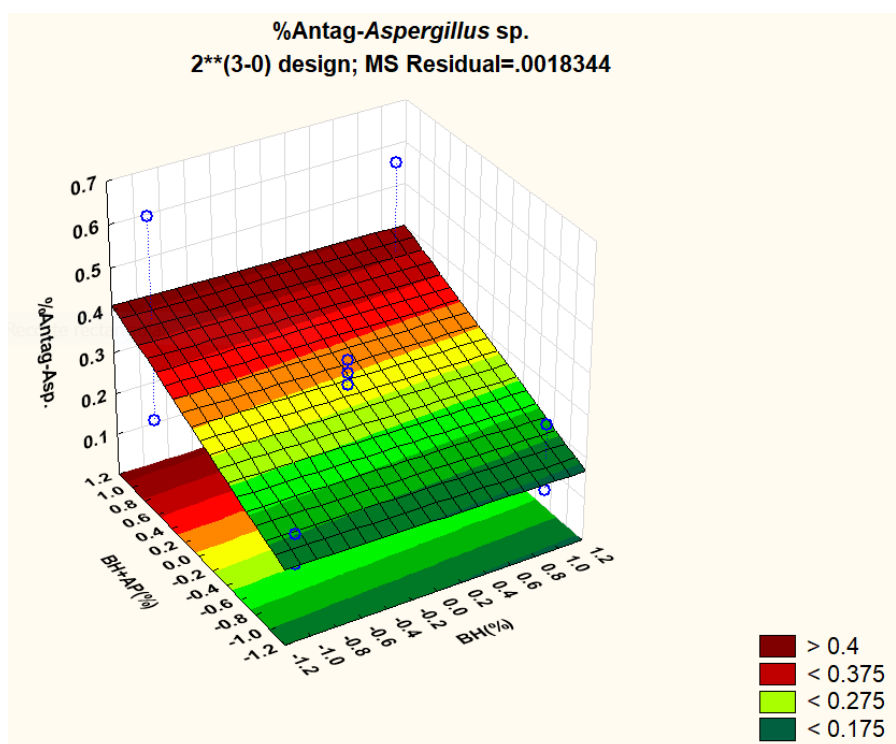


Figura 11. Gráfica de superficie respuesta (BH +AP) vs BH.

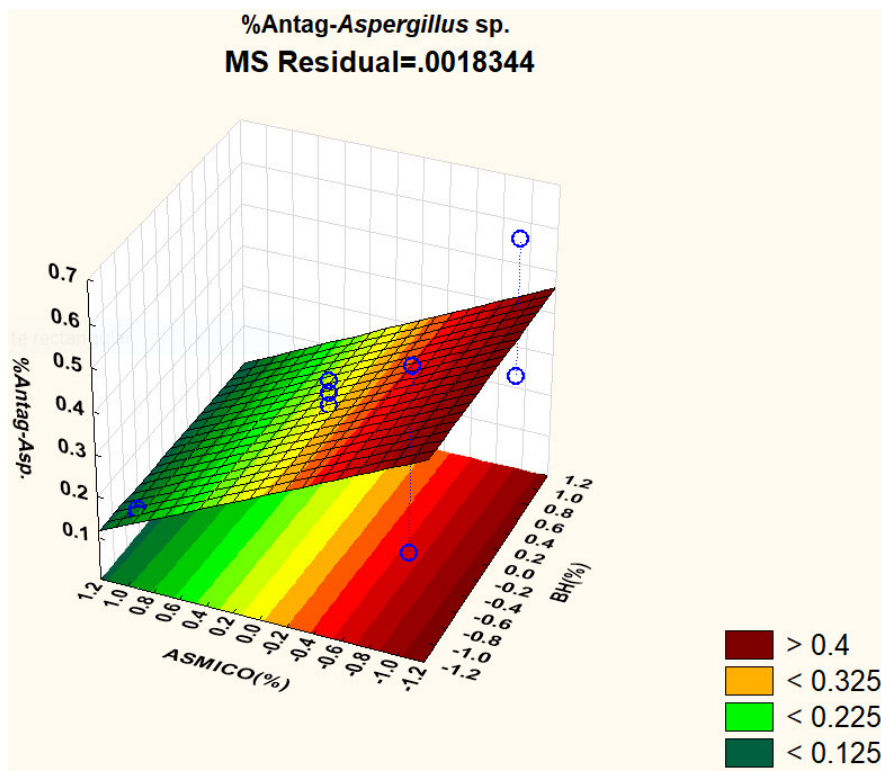


Figura 12. Gráfica de superficie respuesta BF vs BH

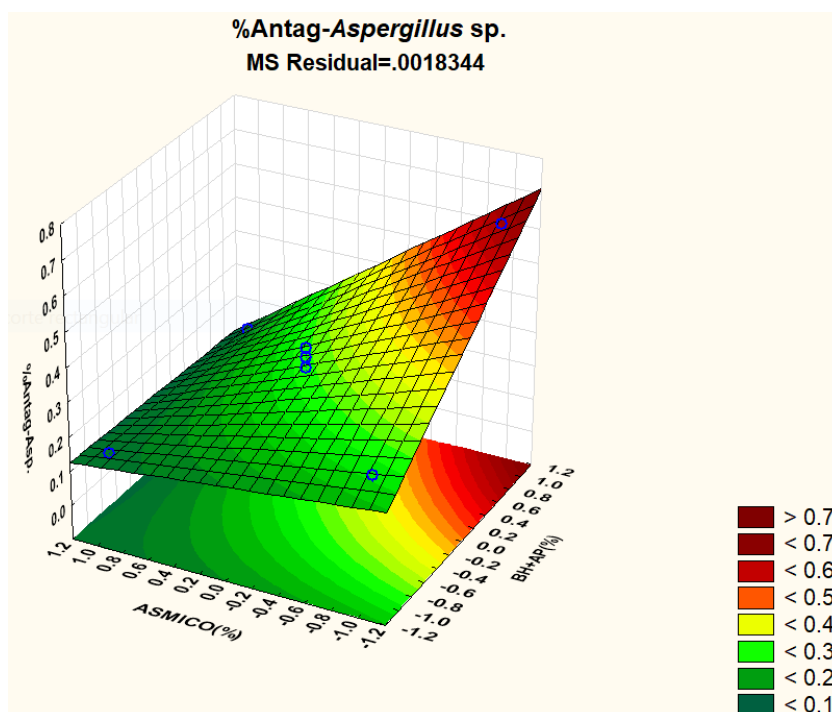


Figura 13. Gráfica de superficie respuesta ASMICO vs (BH+AP)

Tabla 15. Coeficientes de regresión para la respuesta Antagonismo-*Aspergillus sp.*
 R2=0.97197; R2 Adj: 0.94394 MS Residual=.0018344

	Regres	Std.Err.	t(5)	p	-95.%	+95.%
Mean/Interc.	0.2897	0.0129	22.4327	0.0000	0.2565	0.3229
(1)BH(%)	-0.0048	0.0151	-0.3170	0.7641	-0.0437	0.0341
(2)BH+AP(%)	0.0965	0.0151	6.3710	0.0014	0.0575	0.1354
(3)ASMICO(%)	-0.1484	0.0151	-9.7968	0.0002	-0.1873	-0.1094
2 by 3	-0.0909	0.0151	-6.0045	0.0018	-0.1299	-0.0520
1*2*3	0.0122	0.0151	0.8073	0.4562	-0.0267	0.0512

$$\% \text{ Antag-Aspergillus sp.} = ((0.2897 - (0.0048 * \text{BH}) + ((0.0965 * (\text{BH} + \text{AP}))) - (0.14835 * \text{ASMICO}) - ((0.090925 * (\text{BH} + \text{AP}) * (\text{ASMICO}))) + (0.0122 * \text{BH} * (\text{BH} + \text{AP}))$$

Figura 14. Modelo obtenido a partir de los coeficientes de regresión lineal

4.8 Producción de metabolitos antifúngicos en Bioreactor

La producción de metabolitos antifúngicos fue diferente a medida que transcurrieron los días del proceso fermentativo. Obteniéndose los mejores resultados de antagonismo en la parte final de la fase estacionaria, es decir entre el 4to y 5to día (Figuras 9,10 y 11). Los parámetros físico-químicos del proceso fermentativo se resumen en la Figura 12.

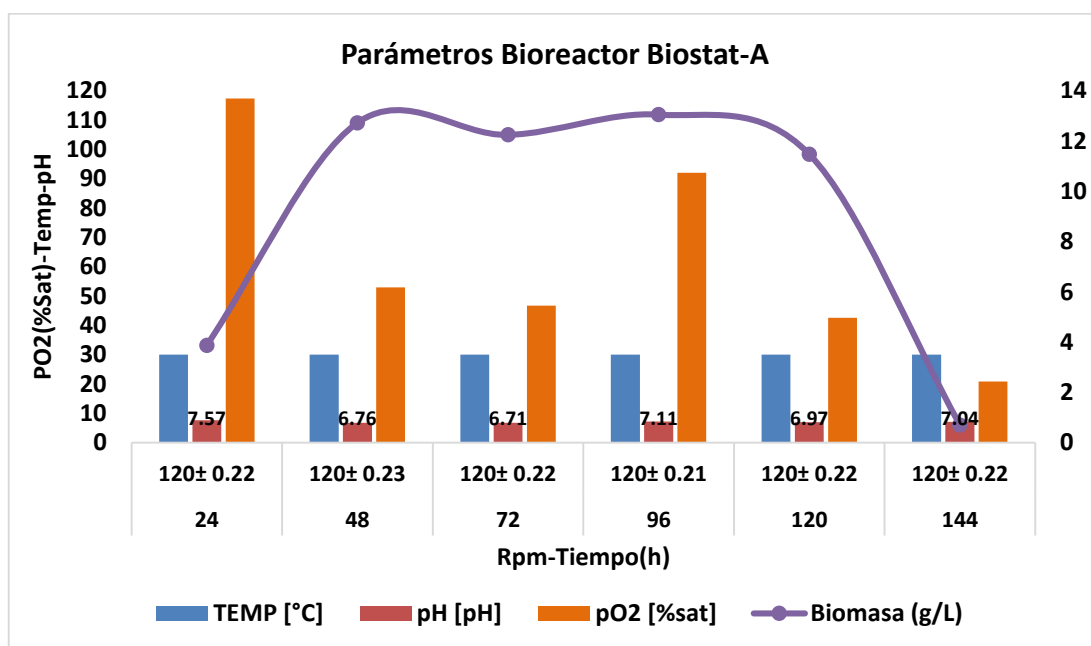


Figura 15. Parámetros físico-químicos obtenidos durante el proceso fermentativo.

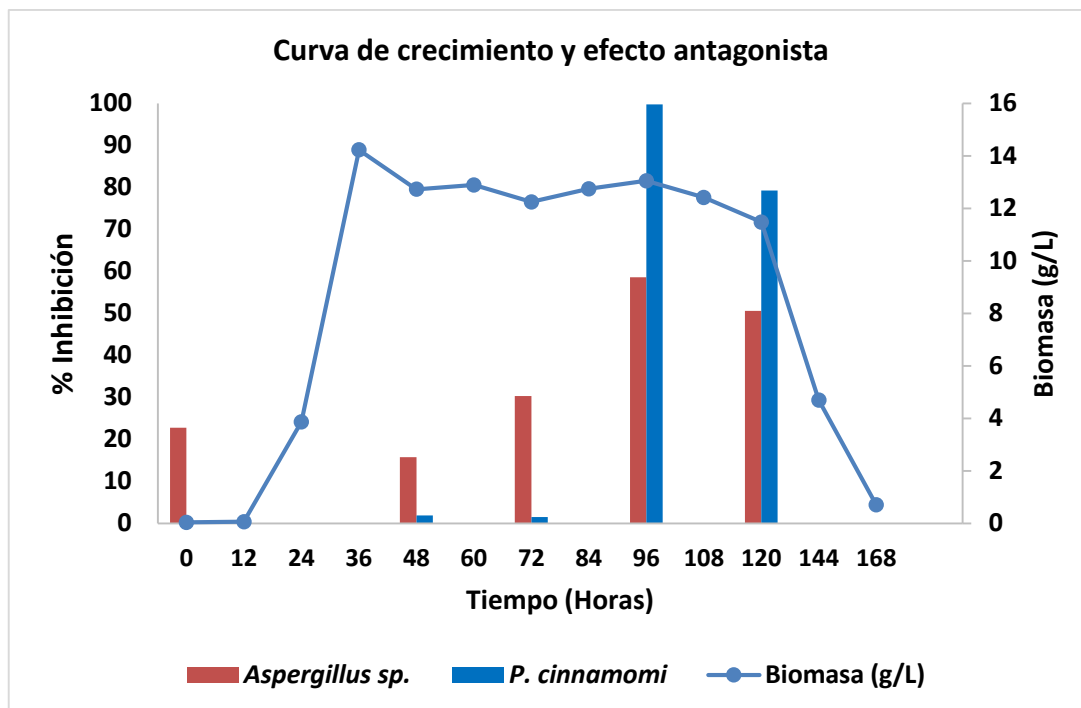


Figura 16. Evolución de la producción de antifúngicos con respecto a los días transcurridos.

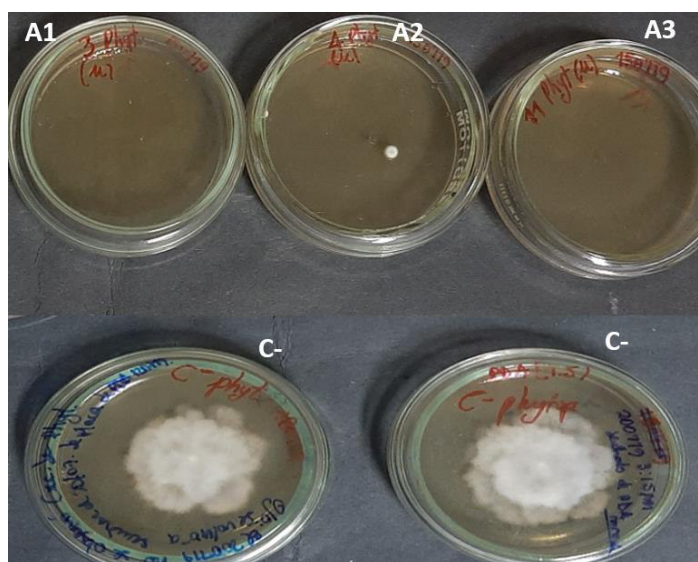


Figura 17. Inhibición de *Phytophthora cinnamomi* con los extractos crudos obtenidos en el 4to día.

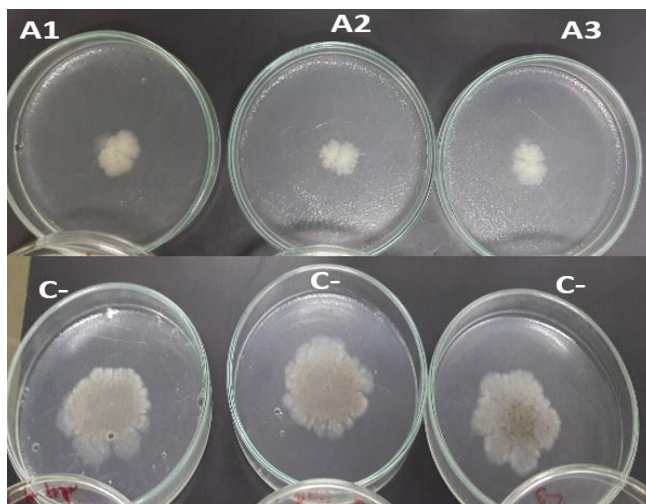


Figura 18. Inhibición de *Aspergillus* sp. con los extractos crudos obtenidos en el 4to día.

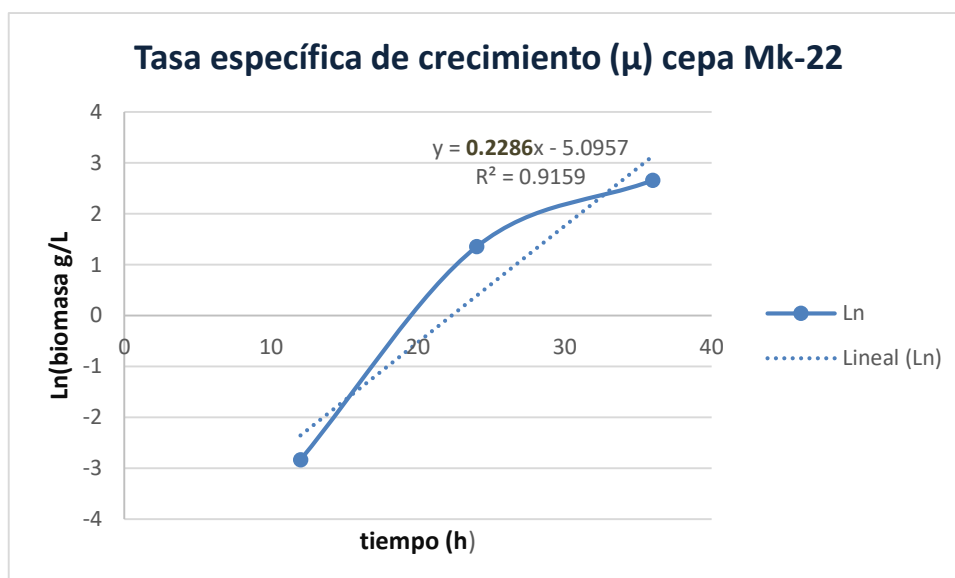


Figura 19. Obtención de μ a partir de la biomasa obtenida fase exponencial.

Tabla 16. Parámetros obtenidos en biorreactor del actinomiceto cepa Mk-22

Cinética microbiana de la cepa MK-22	
Concentrac biomasa inicial (g/L)	0.035
Concentrac biomasa final (g/L)	14.23
Concentrac inicial Glucosa* (g/L)	0.1
Concentrac final Glucosa (g/L)	0.0
μ (1/h)	0.23
g (T-duplicación) h	3.01

*Además de glucosa también hubo presencia de sacarosa, sin embargo, está no fue cuantificada.

4.9 Identificación molecular

La identificación molecular de la cepa Actinomiceto 22 (MK 22) arrojó una similitud del 99.7% con *Streptomyces variabilis*.

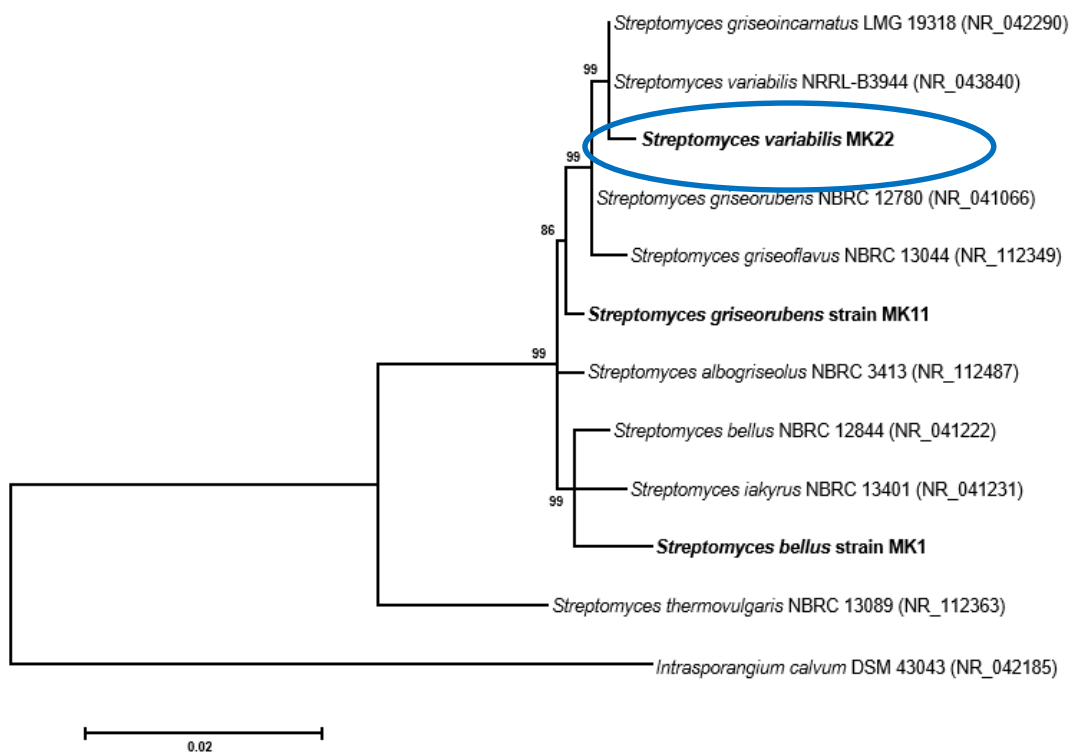


Figura 20. Árbol filogenético para el actinomiceto cepa (MK-22).

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Aislamiento de actinomicetos y excreción enzimática

Para el aislamiento de cepas actinomicetales se aprovechó las características del crecimiento de los actinomicetos en los diversos medios de cultivo, lo cual permite distinguirse notoriamente con cualquier otro grupo bacteriano. Además, se utilizó un medio de cultivo con baja concentración de nutrientes y una fuente de carbono de difícil degradación por parte de la mayoría de microorganismos no deseados como es la carboximetilcelulosa (CMC). Esto permitió disminuir la cantidad de microorganismos contaminantes sin necesidad de utilizar antibacterianos o antifúngicos. Para ello se utilizó el caldo Bushnell Haas el cual presenta en su composición un conjunto de sales tales como sulfato de magnesio, cloruro de calcio, fosfato monopotásico, fosfato dipotásico, cloruro férrico y nitrato de amonio como fuente de nitrógeno. Además, el CMC al 0.5% favoreció el aislamiento de cepas actinomicetales ya que es muy bien asimilado por este grupo bacteriano (Grigorevski *et al.*, 2005), mientras que limitó el crecimiento de gran parte de flora acompañante contaminante (esto lo dices con otras palabras arriba). Esto permitió el crecimiento y aislamiento de dichas cepas sin muchas etapas de purificación. En contraste, Sharma & Kumari (2020) aislaron cepas actinomicetales en un transcurso de 3 semanas.

Al utilizar un medio con baja concentración de nutrientes y una fuente carbonada de difícil degradación por la mayoría de flora bacteriana se pudo utilizar la dilución más concentrada 10^{-1} , lo que permitió trabajar con la mayor carga bacteriana, permitiéndose así una mayor posibilidad de encontrar actinomicetos. Mientras, otros autores como Ganesan *et al.* (2017) realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-4} ó 10^{-5} . Además, ellos utilizaron medios altamente enriquecidos con fuentes carbonadas y nitrogenadas e incluso antifúngicos, muy diferente al método empleado. La detección de enzimas líticas es muy importante para la bioprospección de actinomicetos con potencial biocontrolador ya que una elevada expresión y secreción de estos metabolitos puede favorecer una mejor respuesta antagonista interactuando directamente sobre fitopatógenos causando su inhibición (Pal *et al.*, 2006). Además, esta característica multienzimática les permite degradar mayor cantidad de sustratos presentes en el

suelo y así, sobrevivir y adaptarse mejor. La tabla 3 revela una gran capacidad por parte de los actinomicetos para excretar enzimas líticas.

Medios de cultivo y pruebas de antagonismo

Cuando se comparó la influencia de los 4 medios de cultivo sobre la respuesta antifúngica contra *Aspergillus* sp. se observó con claridad que el nuevo medio de cultivo ASMICO favorece la producción de antifúngicos a pesar que las colonias de los actinomicetos fueron más pequeñas en este medio en comparación a los otros 3. Esto indica claramente que la producción de biomasa microbiana sobre un medio de cultivo sólido no necesariamente nos indica una mayor producción de antifúngicos. Esto se puede explicar porque el metabolismo microbiano en un medio con alta cantidad de nutrientes se direcciona hacia el crecimiento y no hacia la excreción de antifúngicos. En un medio con baja cantidad de nutrientes se activan rutas metabólicas para la producción de metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas. Esto explicaría el mayor efecto antagonista en el nuevo medio de cultivo ASMICO ya que su formulación presenta concentraciones más bajas tanto de fuente carbonada y nitrogenada en comparación a los otros medios evaluados tales como papa dextrosa agar (PDA), plate count agar PCA y agar nutritivo (AN). Esta inhibición mostró diferentes comportamientos del hongo testigo ya que, aunque pudo crecer con facilidad en los 4 medios de cultivo estudiados fue en los medios ASMICO y PDA en donde el tamaño de sus colonias fue reducido con mayor notoriedad, minimizando incluso la altura del micelio aéreo. Estos resultados son congruentes con lo demostrado por Grahovac *et al.* (2014) quienes afirmaron que la producción de antifúngicos varía dependiendo de los nutrientes que se utilizan para el crecimiento.

Mediante HSD-Tukey se confirmó que el medio ASMICO fue el único que presentó diferencia significativa (Tabla 10), lo que indica que este medio de cultivo es un inductor en la producción de antifúngicos. Aquello también está directamente relacionado con un tipo de mecanismo provocado por una limitación o stress nutricional debido a la poca concentración de nutrientes lo que a su vez provoca la activación de rutas metabólicas que desencadenen en la

producción de antimicrobianos (Lino et al., 2016). Debido tal limitación de nutrientes tanto en variedad como en concentración en el medio ASMICO, se puede inferir que se favoreció el poder antagonista de la mayoría de cepas de actinomicetos evaluadas.

Las 4 cepas de actinomicetos seleccionadas produjeron compuestos antifúngicos capaces de inhibir también el crecimiento de *Phytophthora cinnamomi*. Este poder antagonista se hizo evidente con los 39 mm de reducción en el crecimiento de dicho fitopatógeno (Figura 5). El medio ASMICO fue el más idóneo para realizar dicha selección ya que permitió encontrar una mayor cantidad de cepas actinomicetales con potencial para excretar metabolitos antifúngicos. Es por ello que el medio ASMICO fue utilizado para el proceso fermentativo y la obtención de antifúngicos a nivel de bioreactor.

Evaluación de la capacidad PGPB de actinomicetos

En cuanto a las evaluaciones de las características PGPB, es decir bacterias promotoras de crecimiento en plantas, 8 cepas de actinomicetos presentaron capacidad para solubilizar fosfatos (44.4%), resultando en la característica PGPB más detectada. De esas 8 actinobacterias, 3 cepas presentaron los mejores resultados de antagonismo, por ello estas fueron seleccionadas debido a estas 2 propiedades benéficas. Sí bien los estudios de microorganismos solubilizadores de fosfatos son bastantes amplios y abarcan también a géneros como *Acinetobacter* sp. *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp, estos microorganismos benéficos tienen un gran potencial para su aplicación en campo ya que permiten mejorar la producción en diversos cultivos, así como reducir el consumo de fertilizantes sintéticos. La evaluación de sideróforos es un factor importante, ya que facilitan el ingreso de hierro a las plantas (Joe et al., 2016).

Al evaluar la producción de ácido indol acético AIA, nos permitió seleccionar cepas productoras de esta fitohormona la cual está directamente involucrada en la diferenciación celular, la división celular, así como en la elongación de las plantas (Goswami et al., 2016). Nuestros resultados confirmaron que la cepa Act-11 es un actinomiceto productor de AIA, por ello y por ser una cepa con poder antagonista esta cepa también fue seleccionada. El nitrógeno está presente

en el suelo de forma abundante, pero en forma no asimilable para las plantas, ya que las plantas lo consumen bajo la forma de amonio (NH_4) y nitrato (NO_3). La conversión de nitrógeno atmosférico N_2 hasta dichas formas asimilables NH_4 y NO_3 es conocido como la fijación de nitrógeno, dicha habilidad está presente en bacterias y arqueas (Das *et al.*, 2015). Los resultados permitieron aislar y seleccionar a la cepa Act-17 debido a que se le encontró esta característica y también produce metabolitos antifúngicos. En resumen, se seleccionaron 4 cepas actinomicetales las cuales se codificaron como Act-1, Act-11, Act-17 y Act-22 las cuales poseen propiedades como bacterias promotoras de crecimiento en plantas o también llamadas PGPB además de ser productoras de antifúngicos que inhiben tanto a *Aspergillus sp.* así como a *Phytophthora cinnamomi*.

5.4 Producción de metabolitos antifúngicos

Se seleccionó la cepa Act-22 (Mk-22) para continuar con la producción de metabolitos antifúngicos debido a que presentó los mejores resultados de antagonismo en placa y también dio positivo a la producción de sideróforos. Mediante un diseño factorial completo se utilizó al medio Bushnell Haas (BH), agua peptonada (AP) y ASMICO como los 3 factores para el desarrollo experimental, los cuales fueron tomados como factores independientes (Tabla 6), teniendo como respuesta el poder antagonista o capacidad de inhibición en mm. Es importante indicar que dichos factores, en base a su naturaleza, fueron resumidos en 3 para reducir el número de experimentaciones. En ese sentido se consideró 3 puntos centrales en vez de realizar 2 réplicas genuinas.

La utilización de los diseños experimentales como parte de los procesos de optimización de componentes para producir la mayor cantidad de antifúngicos es una técnica de mucha utilidad que nos permite reducir tiempos y costos de producción, ya que nos permite realizar el análisis desde su concepción, así como el seguimiento y la selección de aquellos factores que son significativos-influyentes. Esto nos permite eliminar aquellos factores que no lo son, lo cual nos permite optimizar tiempo y recursos. Diversas investigaciones han demostrado su utilidad, por ejemplo, Ahsan *et al.* (2017) evaluó mediante el método de superficie respuesta (RSM) la optimización de un medio de cultivo

para inhibir a *Rhizoctonia solani* AG-3 a partir de los fermentos obtenidos por el actinomiceto *Streptomyces diastatochromogenes* KX852460. Del mismo modo Bankar & Singhal (2010) también utilizaron RSM para la optimización de parámetros. En este punto es importante destacar que el medio ASMICO fue elegido como uno de los 3 factores a considerar ya que fue el que presentó las mejores respuestas de antagonismo en la fase de evaluación de medios de cultivo con las cepas actinomicetales. Este medio presentó en su composición 3 nutrientes de diferente naturaleza, primero la fuente carbonada aportada por la sacarosa (4 g/L) principalmente y glucosa (2mg/dL), segundo la fuente nitrogenada (3 g/L de proteínas totales) aportada por la biomasa fúngica de *Aspergillus* sp. y tercero las sales tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio y citrato de sodio dihidratado. El segundo factor fue el caldo bushnell haas y el tercero fue una mezcla de caldo Bushnell haas más agua peptonada.

El proceso fermentativo de la cepa MK-22 nos permitió obtener los metabolitos extracelulares en cada uno de los 11 experimentos. Como se puede observar en la tabla 7, la acumulación de biomasa tuvo un comportamiento muy variado ya que en los experimentos N^o 1 y en aquellos desde el N^o 5 al 8 la biomasa obtenida fue muy poca en comparación a los otros experimentos. Si analizamos estos resultados extrapolándolos con la concentración de proteínas totales (PT) (Figura 7) y glucosa (Figura 8) se observa que las PT al inicio y al final de los experimentos no representaron un factor influyente ya que mantuvo un comportamiento muy similar en casi todos los experimentos. Sin embargo, la glucosa sí tuvo un comportamiento diferenciado. En aquellos experimentos en donde se obtuvo muy poca biomasa, tanto la glucosa inicial como la residual al finalizar el proceso fermentativo, fue mucho mayor que en aquellos experimentos en donde las cantidades del monosacárido se mantuvo por debajo de los 10mg/dL. Esto tuvo un efecto muy importante ya que se infiere que pudo actuar como un inhibidor del crecimiento de la cepa Mk-22 y por ende no permitió la excreción de metabolitos extracelulares con capacidad para provocar inhibición. Esto se comprueba con los resultados de antagonismo mostrados en la tabla 8, ya que en aquellos experimentos en donde se obtuvo muy poca

biomasa, también se encontró elevada concentración de glucosa lo que a su vez repercutió en el bajo % de inhibición de la cepa en estudio.

Es importante destacar que la determinación de proteínas totales en el proceso fermentativo (Figura 7) para la optimización del medio de cultivo no solo sirvió como indicador del requerimiento nutricional de fuente nitrogenada sino también como una señal de la presencia de péptidos o enzimas que pudieron ser excretados por nuestra cepa Mk-22. Como se pudo ver en la figura 7, en donde los experimentos que presentaron un aumento en la concentración de proteínas totales después del día 1 de iniciado el proceso fermentativo, valores mayores a los 0.15mg/L, y que a la vez presentaron una producción de biomasa mayor a los 30g/L fueron los que evidenciaron los mayores porcentajes de inhibición tal como lo demuestra la tabla 8. En ese sentido fueron los experimentos #3 y #4 los que presentaron tales características y por ende alcanzaron los mayores porcentajes de inhibición tanto contra *Aspergillus* sp. así como contra *Phytophthora cinnamomi*. Esto es congruente con lo encontrado por diversos autores que indican que la inhibición de fitopatógenos puede darse por la acción de enzimas hidrolíticas excretadas por los microorganismos controladores tales como las actinobacterias.



Figura 21. Esquema representativo de la excreción de metabolitos antifúngicos.

Dichas enzimas tales como celulasas y quitinasas pueden actuar lisando estructuras presentes en las paredes de los hongos fitopatógenos, rompiendo enlaces tipo β -1, 3 de glucanos o β -1, 4 de celulosa y quitina (Kaur et al., 2013; Passari et al., 2016a, b; Singh, 2014). Esto también es concordante con Sanjivkuma et al (2020) quienes lograron inhibir a *Aspergillus brasiliensis* a

partir de una quitinasa producida por *Streptomyces olivaceus* (MSU3) y obtenida por un proceso de optimización previo, utilizando el diseño Box-Behnken. De forma similar, proteasas de *S. phaeopurpureus* se han reportado por su rol biocontrolador contra *Colletotrichum coccodes* (Palaniyandi et al., 2013) y *Streptomyces* sp. A6 contra *Fusarium udum* (Singh and Chhatpar, 2011). Además, microorganismos del género *Streptomyces* también producen exo- y endo-celulasas las cuales inhiben fitopatógenos como oomycetes, los cuales se caracterizan por poseer celulosa en su pared celular (Van Bruggen and Semenov, 2000).

De este análisis también se deduce que la glucosa en concentraciones iniciales entre 20 y 30 mg/L favoreció la producción de metabolitos antifúngicos en comparación a aquellos experimentos en donde las concentraciones de dicho azúcar iniciaron cero o superior a los 100 mg/L. Sin embargo, hay una observación importante que considerar ya que, si bien dichas concentraciones no son muy altas, sí se presentaron concentraciones superiores a los 340 mg/L y fue en aquellos experimentos donde el crecimiento microbiano fue insignificante (experimentos del 5 al 8), incluso en las experiencias 7 y 8 se llegó cerca de 1.0 g/L de glucosa a los 5 días de desarrollado el proceso fermentativo, lo cual afectó negativamente la producción de biomasa y por ende la excreción de metabolitos antifúngicos. Este aumento de la concentración de dicha hexosa a medida que transcurrió el proceso fermentativo pudo deberse a la degradación del disacárido sacarosa el cual es uno de los componentes del medio de cultivo evaluado. A pesar de que no hay un consenso acerca de la concentración de glucosa que debe usarse como fuente carbonada para la producción de antifúngicos y otros antimicrobianos, de nuestras experimentaciones se pudo inferir que para lograr los mayores porcentajes de antagonismo contra *Aspergillus* sp. y *P. cinnamomi* se debe iniciar el proceso fermentativo con concentraciones de glucosa de entre 2 y 3 % (2-3mg/dL) y además, dichos valores del monosacárido deben agotarse a medida que transcurra el proceso fermentativo. Esto es congruente con lo reportado por Smaoui *et al* (2018) quién logró los mayores valores de antagonismo contra *A. tumefaciens* evaluando *Streptomyces* sp. cepa TN7 con 2% de glucosa. Ellos se basaron en lo propuesto

por Raytapadar y Paul (2001) quienes propusieron para una máxima producción de antibióticos, concentraciones de glucosa y almidón de 2% and 4% (p/v), respectivamente. De forma similar, los resultados de Singh et al., (2009) y Vasavada et al. (2006) mostraron actividad anti *Staphylococcus aureus* producida por *Streptomyces tanashiensis* cepa A2D y *Streptomyces sannanensis* cepa RJT-1 respectivamente, lo cual se logró con 1% de glucosa (p/v). La producción de metabolitos secundarios en actinomicetes es usualmente estimulada por carbohidratos de asimilación lenta tales como almidón, pero es suprimida por fuentes de carbón de fácil asimilación tales como la glucosa (Shakeel et al., 2016). De hecho, alta concentración usualmente inhibe la biosíntesis de algunos antibióticos en Streptomyces (El-Naggar et al., 2015; Zhu et al., 2007).

Otro estudio realizado por Kalaiyarasi et al., (2020) demostraron que concentraciones al 1% de glucosa (p/v) y xilosa afectaron negativamente la producción de antibióticos por parte de la cepa *Streptomyces* sp. mientras que el almidón y sucrosa, a la misma concentración, provocaron un aumento en la producción de antibióticos. En dicho estudio se debe resaltar que no se evaluaron diversas concentraciones de cada sustrato como sí se realizó en la presente investigación. Además, ellos comprobaron que fuentes nitrogenadas tales como peptona favorecieron la excreción de antibióticos, lo que se asemeja a los resultados obtenidos en la presente tesis. Sin embargo, es importante indicar que a pesar de las evidencias explicadas acerca de la influencia negativa de glucosa a concentraciones elevadas, cada cepa actinomicetal tiene características fenotípicas y bioquímicas diferentes que sumado a los factores de agitación, temperatura, pH, nutrientes y otros pueden influir considerablemente sobre la producción de antimicrobianos.

En esta misma línea, Saravana et al., (2018) demostró que la peptona a una concentración de 5g/L provocó los mayores efectos antifúngicos contra cepas de *Aspergillus flavus* y *A. niger* con 17 y 14 mm de inhibición respectivamente. Esto es muy similar a nuestros resultados ya que en nuestra investigación se logró una reducción de hasta 24 mm en la inhibición del crecimiento de *Aspergillus* sp. sin embargo, nuestro método evaluado representa una mejora

sustancial en el proceso de producción de antifúngicos ya que no fue necesario el uso de solventes.

En cuanto a la inhibición de *P. cinnamomi* utilizando metabolitos antifúngicos producidos por bacterias benéficas, tenemos el ejemplo de Chirayu Sa-uth *et al.*, (2018) quién utilizó un diseño factorial fraccionado (FFD) para detectar los componentes más influyentes en la inhibición de dicho fitopatógeno. Llegando a porcentajes de inhibición de hasta 70%, lo cual ha sido menor a los valores obtenidos en la presente tesis, lo cual puede deberse tanto a las características fenotípicas de las cepas, en su caso fue *Xenorhabdus stockiae*, una gammabacteria ampliamente conocida para el biocontrol de insectos plagas, a diferencia de la presente investigación que se trata de una bacteria del genero *Streptomyces* perteneciente al grupo de actinomicetos. Además, los componentes utilizados en los medios de producción en ambos casos fueron diferentes ya que ellos obtuvieron sus mejores resultados en caldo tripticasa soya (TSB) un medio que a diferencia de los nutrientes elegidos en el presente estudio carece de sacarosa, peptona, cloruro de potasio, citrato de sodio y la biomasa fúngica de *Aspergillus* sp. Además de ello las condiciones de fermentación fueron diferentes tanto en la velocidad de agitación, temperatura, aireación y tiempo de fermentación.

Debido a que los nutrientes juegan un rol muy importante en la producción de antifúngicos (Figura 21), se deben evaluar diversas concentraciones de ellos para poder provocar un nivel de inhibición que nos permita seleccionar los mejores compuestos, así como las más óptimas concentraciones. En nuestras experimentaciones se eligió un medio base tal como Bushnell haas ya que es altamente soluble y balanceada con un pH para bacterias, además de no contener fuentes carbonadas nos permitió suministrar otros carbohidratos a necesidad de las experimentaciones. Además, el agua peptonada alcalina (AP) utilizada aportó la fuente nitrogenada en base a su contenido de peptona, lo cual ha sido ampliamente utilizado por varios autores. Como Smaoui S, *et al.* utilizó esta fuente nitrogenada como uno de los componentes del medio glucosa de Waksman para realizar un screening entre 5 medios de cultivo diferentes. Del

mismo modo Sajid, I. *et al.* utilizó este sustrato como componente de uno de los 6 medios de cultivo con el fin de seleccionar el más idóneo para producir antifúngicos con una cepa de *S. malachitofuscus* CTF9. En nuestro caso, la utilización de estos sustratos también tiene similitud con la metodología utilizada por los autores precedentes ya que al igual que ellos, se realizó un screening para seleccionar el medio más idóneo para ser utilizado en el proceso fermentativo. Nuestros resultados demostraron que el medio ASMICO compuesto a base de agua peptonada alcalina, sales del caldo Bushnell hass y biomasa fúngica de *Aspergillus* sp. mostró el mejor resultado de antagonismo evidenciándose con diferencias significativas, 95% de nivel de confianza, con respecto a medios como PDA, agar nutritivo y Plate count agar.

Si analizamos la tabla 8 en donde se detalla los porcentajes de inhibición en cada uno de los 11 experimentos contra *P. cinnamomi* y *Aspergillus* sp. Se puede observar claramente que los experimentos #3 y #4 obtuvieron los mejores resultados de antagonismo. Estos además fueron los 2 únicos experimentos en donde se pudo evidenciar aumento en la concentración de compuestos de naturaleza proteica (Figura 7). Esto refuerza la hipótesis que en estos extractos se han excretados enzimas u otros metabolitos proteicos capaces de causar inhibición contra los fitopatógenos evaluados. En todos los demás experimentos no hubo un aumento en la cantidad de compuestos proteínicos a excepción del experimento #1, sin embargo, en este no fue considerado debido a que los % de inhibición fueron bastante bajos. Además, se pudo evidenciar que para el caso de la inhibición de *P. cinnamomi* los puntos centrales (experimentos del 9 al 11) tuvieron un efecto mayor, esto explica en parte porque nuestro modelo arrojó coeficiente de determinación con un valor bajo 0.55, con lo cual se pudo inferir que nuestro modelo no puede explicar con precisión la respuesta % de inhibición de *P. cinnamomi*. Para este caso nuestras concentraciones no pudieron ajustarse a un modelo aceptable, como sí ocurrió con los valores obtenidos en la inhibición de *Aspergillus* sp. Sin embargo, dichas concentraciones elegidas en este diseño factorial 2^k (K=3) nos permitieron producir antifúngicos capaces de inhibir casi en su totalidad a *P. cinnamomi*. Esto lo detallaremos más adelante. Es importante precisar que debido a los valores tan bajos de los coeficientes de determinación y ajustado para *P. cinnamomi*, estos análisis no han sido incluidos

en los resultados como sí se ha hecho con los hallados contra *Aspergillus* sp. en donde a pesar que no se obtuvo un % de inhibición de la magnitud contra *P. cinnamomi*, el análisis demostró que las concentraciones elegidas permitieron recomendar un modelo matemático para lograr las mejores respuestas de inhibición.

Además, vale indicar que este análisis corresponde a un segundo diseño factorial ya que previamente se realizó un primer análisis con concentraciones casi diez veces mayor a las consideradas en la tabla 6 pero debido a que se obtuvo un modelo con coeficientes de determinación muy bajos (menor de 0.5 o 50%) solo se consideró las recomendaciones obtenidas en las gráficas de superficie respuesta y de contornos las cuales indicaban disminuir las concentraciones a partir de las cuales se elaboró el segundo diseño, del cual se discutirá en los párrafos posteriores.

5.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico es muy importante para poder determinar si los factores y las condiciones planteadas fueron los que provocaron la inhibición de los fitopatógenos y no fue producto del azar. En primer lugar, se pudo comprobar que sí existió diferencias significativas entre los 4 medios de cultivo evaluados (ASMICO, PDA, PCA Y AN) con respecto a su influencia sobre la producción de antifúngicos. Con ello se pudo comprobar que no todos los medios de cultivo evaluados permitían una buena excreción de metabolitos antifúngicos por parte de los actinomicetos seleccionados. La tabla 9 nos indica la existencia de tales diferencias entre los 4 medios de cultivo, sin embargo con este análisis de varianza (ANOVA) no se pudo verificar cuál de ellos tenía el mayor efecto sobre el resto $p < 0.05$, por lo cual fue necesario realizar la prueba de Tukey para confirmar si el medio ASMICO fue quien mostró diferencias significativas con respecto a los otros 3 medios (Tabla 10), es decir esto nos permitió verificar estadísticamente que el medio ASMICO fue el correcto para continuar el procesos de fermentación para la producción de antifúngicos.

Los diseños factoriales vienen siendo ampliamente utilizados en los procesos de bioingeniería ya que permiten estudiar los efectos individuales, así como las interacciones de diversos factores en una o varias respuestas (T. K. Gundogdu *et*

al., 2018). Además, este tipo de diseños nos permite reducir la cantidad de experimentos gracias a la aplicación de puntos centrales las cuales pueden reemplazar el uso de réplicas genuinas.

Martínez-Cárdenas *et al.*, 2012 aplicó un diseño factorial completo 3^3 para estudiar los efectos del pH, temperatura y tasa de agitación teniendo como respuestas el crecimiento microbiano y la producción de una bacteriosina en *Bacillus thuringiensis*, al igual que en nuestros experimentos se buscó cuantificar un antimicrobiano, en nuestro caso fue un antifúngico. En su análisis ellos detectaron que el pH fue el factor más importante para el crecimiento bacteriano y la producción de la bacteriosina. A diferencia de nuestros resultados, no se evaluaron parámetros físicos-químicos ni agitación sino los nutrientes más influentes en la producción de antifúngicos.

La cepa de *A. japonicus* URM5620 puede producir una b-glucosidasa (BG), celulosa y una endoglucanasa (CMCasa), para determinar el efecto de la cantidad de sustrato inicial, humedad inicial, pH y temperatura sobre la producción de esas enzimas; Herculano *et al.*, (2011) utilizaron un diseño factorial completo 2^4 en donde lograron encontrar las condiciones óptimas de producción y verificaron que los cuatro factores estudiados fueron influyentes. Mientras que en nuestros experimentos 2 de 3 factores fueron los significativos en la producción de antifúngicos.

En cuanto al análisis del diseño factorial ejecutado se pudo confirmar 2 resultados claramente diferenciados. Primero, los factores y concentraciones elegidos no permitieron ajustar un modelo adecuado para la inhibición de *P. cinnamomi*, sin embargo, se logró inhibir casi en su totalidad (más del 95% del crecimiento micelial de este fitopatógeno) con los antifúngicos obtenidos. Segundo, se obtuvo un buen modelo para la inhibición de *Aspergillus* sp. con valores de inhibición mayores al 70%.

La tabla 11 nos muestran los resultados del análisis de varianza (ANOVA) con un coeficiente de determinación (R^2) de 0,978 ó 97.8% lo cual nos indica que solo un 2.2% de la actividad antifúngica no puede ser predecible por nuestro modelo, esto es muy bueno ya que indica que con 97.8 % los factores y concentraciones elegidos pueden explicar la respuesta estudiada (inhibición de

Aspergillus sp.). Sumado a ello este ANOVA nos indica que 2 factores fueron influyentes (Bushnell Haas + agua peptonada y ASMICO) siendo BH +AP el que lo hizo con mayor intensidad con un $F=73.6$ fue el mayor de todos los factores evaluados.

Se confirmó que la interacción de estos nutrientes, también fue influyente en la producción de antifúngicos. La tabla 12 también hace referencia al análisis de ANOVA, pero con el retiro de 2 interacciones, ello permitió mejorar el R ajustado y subirlo de 0.926 a 0.944. Estos resultados se asemejan a lo obtenido por Managamuri *et al.*, (2018) quién obtuvo R^2 de 0.975 y 0.99 en la inhibición de *A. niger* y *A. flavus* respectivamente mientras que su R^2 -adj fue de 0.9574 y 0.983, valores muy cercanos a los obtenidos en el presente estudio. Sin embargo, es importante aclarar que a diferencia de Managamuri, en la presente tesis se aplicó un diseño factorial completo de 3 factores y 3 puntos centrales, es decir 11 corridas experimentales mientras que ellos utilizaron un diseño de composición central con 5 factores y 50 corridas experimentales. Además, dentro de sus 5 factores no solo estudiaron la influencia de nutrientes, sino que incluyeron condiciones físico-químicas-mecánicas tales como temperatura, pH y tiempo de incubación lo cual puede explicar los mejores resultados obtenidos ya que ellos sí obtuvieron buenos modelos para la inhibición de otros fitopatógenos tales como *F. oxysporum*, *F. solani*, así como en el antagonismo de *C. albicans*. Esto difiere con nuestros resultados ya que no se pudo obtener un modelo aceptable para la inhibición de *P. cinnamomi*. En cuanto a la inhibición obtenida en mm, también se pudo notar diferencias con respecto a los investigadores en cuestión, ya que nosotros obtuvimos zonas de inhibición de hasta 24 mm en el antagonismo de *Aspergillus* sp. mientras que Managamuri y su equipo logró reducciones de hasta 29 mm para el caso de *A. niger* y *A. flavus*, sin embargo es importante indicar que ellos no detallaron el procedimiento utilizado en la evaluación de los compuestos antifúngicos, ya que como se explicó anteriormente en este trabajo no se ha utilizado solventes orgánicos, lo cual lo hace una técnica más barata y eco-amigable en la producción de metabolitos antifúngicos con potencial inoculante microbiano o biopesticida.

Por lo anterior, según los valores obtenidos en la inhibición de *Aspergillus sp.* nuestro modelo ajusta muy cerca al 1, lo cual nos dice que nuestras concentraciones elegidas pueden ayudarnos a predecir correctamente la inhibición de este fitopatógeno ya que los valores de la respuesta predicha se acercan a los observados (Managamuri *et al.*, 2018). En cuanto al ANOVA que evaluó la inhibición de *P. cinnamomi*, se pudo comprobar que tanto el coeficiente de determinación cuadrado como el ajustado son muy bajos e insuficientes para ajustar un modelo correcto (Tablas 13 y 14). Sin embargo, este análisis nos sirvió para seleccionar la mejor condición experimental y llevarla a la producción en biorreactor.

Gracias a las gráficas de Pareto (Figuras 9 y 10), se pudo conocer los factores influyentes ($\alpha=0.05$) en el antagonismo de *Aspergillus sp.* así como aquellos factores y sus interacciones que no influyeron significativamente. Esto es importante ya que con esta información se pudo retirar aquellas condiciones que no influyeron estadísticamente y mejorar así nuestro modelo, con un R^2 y R^2 -adj. más cercano a 1. El análisis de la gráfica 13, nos indicó que las interacciones del factor 1 (BH) con factor 2 (BH+AP) así como factor 1 con 3 no fueron significativos por lo cual fueron retirados lo cual permitió ajustar mejor nuestros coeficientes de determinación. La figura 14 nos permitió verificar que la curvatura no es influyente por lo cual nuestro modelo ajusta los valores dentro del mismo plano, por lo que se aseguró un modelo confiable.

Las gráficas de superficie respuesta (Figuras 11 al 13) fueron muy importantes para conocer las concentraciones más idóneas para lograr la máxima inhibición de *Aspergillus sp.* Por ejemplo, la gráfica 15 evaluó como las concentraciones de BH al interactuar con las de BH+AP permitieron lograr un % de inhibición menor al 50%, en donde el factor 2 (AP+BH) requiere ser utilizado en sus concentraciones máximas para lograr los mayores porcentajes de antagonismo. En cambio, el BH al demostrarse que no fue un factor significativo, no importó a que concentración se utilizase.

La figura 12 interpreta el comportamiento del factor BH vs ASMICO y cómo sus concentraciones influyeron sobre el % de antagonismo del hongo en cuestión. Aquí se pudo demostrar que ASMICO requiere ser utilizado en sus

niveles de concentración más bajos, ya que así se obtienen los mejores porcentajes de inhibición, mientras que el factor 1 tuvo el mismo comportamiento que en la figura 11, es decir no influyó.

El último gráfico de superficie respuesta (Figura 13) evaluó los 2 factores significativos (2 y 3), en este se pudo comprobar que la interacción de ASMICO a su nivel más bajo y BH+AP al más alto lograron los mayores porcentajes de inhibición, es decir mayor al 70%, con lo cual se reafirma lo indicado en las gráficas de PARETO y el análisis de varianzas (ANOVA). Por lo tanto, estas interpretaciones permitieron conocer las concentraciones idóneas para lograr los máximos porcentajes de antagonismo de *Aspergillus* sp.

La tabla 15 resume los coeficientes de regresión lineal con el retiro de las interacciones no influyentes (1 con 2) y (1 con 3). Con estos valores se procedió a la elaboración del modelo matemático (Figura 14) el cual permitió resumir e interpretar la relación directa entre los factores influyentes (BH+AP y ASMICO) y los porcentajes de inhibición máximos y mínimos. Vale indicar que dicho modelo se ha elaborado a partir de los valores codificados (-1, 0 y 1) de los cuales se obtuvo que se debe trabajar en los valores máximos (mayores e iguales a 1) de BH+AP, es decir aumentar su concentración. Mientras que para ASMICO se recomendó disminuir sus concentraciones, es decir trabajar en la región -1 o menores. Con esto se resume que la actividad antifúngica de los metabolitos excretados por la cepa actinomicetal Mk-22 solo se ve influida significativamente por 2 factores, AP+BH y ASMICO, mientras que BH solo no influyó significativamente. Además, para mejorar la respuesta antifúngica se debe aumentar las concentraciones de BH a cantidades mayores de 0.03272 g/L, las de AP mayores de 0.15 g/L mientras que de ASMICO deben ser menores de 0.014g/L.

Luego del análisis del diseño factorial completo 2^3 que se ha explicado en los párrafos previos, se seleccionó la mejor condición experimental de un total de 11 para llevarla a la producción en biorreactor. Si bien un diseño factorial es de “screening” y ayudó a seleccionar los factores influyentes. Para continuar con un proceso de optimización es necesario utilizar otro diseño no lineal tipo de

composición central o Box Behnken con la finalidad de encontrar los óptimos de cada concentración utilizada. Sin embargo, ya que nuestro modelo obtenido no presentó una curvatura significativa, sumado a que los % de inhibición obtenidos en el experimento #3 contra los 2 fitopatógenos evaluados fueron mayores a 70; se seleccionó las concentraciones de dicha condición experimental para poder extrapolarlas a la producción de metabolitos antifúngicos en biorreactor BIOSTAT A de la marca Sartorius. Para este caso dichas cantidades fueron ajustadas para el volumen de trabajo de tal equipo es decir 1.8 L, en la figura 15 se detallan las condiciones de trabajo.

Es importante indicar que el sistema de oxigenación fue reemplazado por uno de aireación con la colocación de filtros, ya que no se pudo contar con oxígeno de alta pureza al momento de poner en funcionamiento el biorreactor.

Como se puede observar en la figura 16 la evolución de la producción de antifúngicos aumentó considerablemente en la fase estacionaria, a partir del 2do día y llegando a su pico máximo en el día 4to del proceso fermentativo, disminuyendo en los días posteriores. Esto nos da un alcance muy importante, ya que podremos realizar la fermentación en solo 4 días y no en 10 días como se había realizado en las evaluaciones con matraces, mejorándose considerablemente los tiempos de producción. Estos resultados son muy similares a los reportados por Mitrović et al., 2017 quienes obtuvieron la mayor concentración de antifúngicos, contra cepas de *A. alternata* y *F. avenaceum*, al 4to día de fermentación en biorreactor BIOSTAT A plus y utilizando una cepa actinomicetal de *S. hygroscopicus*. A pesar que dichos fitopatógenos fueron diferentes a los utilizados en el presente trabajo, se puede afirmar que las condiciones de fermentación, así como los nutrientes utilizados fueron claves para la obtención de compuestos antifúngicos.

Además, si comparamos la biomasa en nuestro proceso fermentativo se obtuvo un máximo que estuvo entre los 12 y 14 g/L en menos de 48 h, sin embargo, la mayor excreción de metabolitos antifúngicos se dio en el 4to día. Estos resultados se acercan mucho a lo reportado por Ahsan et al., 2017 quién utilizó la metodología de superficie respuesta mediante un diseño de composición central para optimizar los componentes nutritivos en la producción de

metabolitos secundarios contra *Rhizoctonia solani* AG-3, obteniendo 15.2 g/L al tercer día de fermentación.

En cuanto a los porcentajes de inhibición contra *P. cinnamomi* se pudo comprobar que esta cepa excreta metabolitos antifúngicos capaces de inhibir en más del 99% su crecimiento micelial. Aquí es importante indicar que dichos compuestos antifúngicos presentes en los extractos evaluados pueden incluir enzimas tipo glucanasas, celulasas y quitinasas capaces de lisar las paredes fúngicas y provocando su inhibición (El- Tarabily *et al.*, 2006), además de otras moléculas que pueden ingresar y afectar componentes de la membrana como el ergosterol, así como organelas citoplasmáticas (Qi D. *et al.*, 2019). Estos mismos investigadores comprobaron que un actinomiceto identificado como *Streptomyces sp.* cepa SCA3-4 excretó 21 compuestos entre fenoles, pirrolizidinas, ésteres y ácidos con potencial antifúngico contra 13 fitopatógenos incluyendo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza Tropical 4 (ATCC 76255).

Chirayu *et al.*, 2018 logró inhibir hasta en un 82% el crecimiento micelial de una cepa de *Phytophthora sp.* utilizando los metabolitos antifúngicos excretados por *Xenorabidus stockiae* cepa PB09, valores que se acercan a los obtenidos en la presente tesis. A diferencia de nuestra cepa, ellos obtuvieron dichos resultados con una cepa no actinomicetal y, además, en la presente tesis se utilizó un diseño factorial teniendo como factores fuente carbonada, nitrogenada y minerales bastante distante a los utilizados por Chirayu *et al.*, 2018. Por lo que esto pudo haber provocado cambios en la excreción de compuestos antifúngicos.

En cuanto a la inhibición de *Aspergillus sp.* con los extractos obtenidos en el biorreactor BIOSTAT A, se pudo lograr una reducción del crecimiento micelial de 71 % muy similar a lo obtenido por Saravana *et al.*, 2018 quienes inhibieron el crecimiento de *A. niger* y *A. flavus*, así como a otros hongos fitopatógenos utilizando los compuestos antifúngicos excretados por la cepa *Streptomyces collinus* BG4.

Otro estudio realizado por Verheecke *et al.*, 2014 demostraron que cocultivando cepas actinomicetales con *Aspergillus flavus* redujeron la producción de

aflatoxinas B1 y B2. De forma similar Cáceres *et al.*, 2018 demostraron que una cepa de *Streptomyces roseolus* co-cultivada con *A. flavus* indujo una regulación positiva de los genes involucrados en los procesos morfológicos de este último causando una reducción en la producción de aflatoxinas B1 y B2. Estas evidencias refuerzan nuestros resultados ya que confirman el potencial del género *Streptomyces* como productor de moléculas biocontroladoras de hongos fitopatógenos y/o aflatoxinas.

Las figuras 17 y 18 muestran los resultados de inhibición de los metabolitos antifúngicos producidos en biorreactor. En el caso de la inhibición de *P. cinnamomi* el crecimiento es casi imperceptible lo que demuestra la efectividad de los compuestos antifúngicos excretados. Contrario a la inhibición de *Aspergillus sp.* en donde sí se pudo apreciar un mayor crecimiento. Esto demuestra que los blancos de acción de los antifúngicos excretados por nuestra cepa actinomicetal Mk 22 son diferentes para ambos fitopatógenos evaluados. Además, se puede inferir que cada hongo en base a la composición de sus paredes, así como de sus mecanismos de defensa, resisten en diferente grado la acción de los antifúngicos.

La cinética microbiana nos permite entender las velocidades de crecimiento, los tiempos de duplicación, rendimiento de biomasa por sustrato, entre otras que permiten conocer las características intrínsecas de nuestra cepa Mk-22 y como se afectó su supervivencia bajo ciertas condiciones nutricionales y fisicoquímicas. En la figura 19 y tabla 16 se resumen parte de la cinética microbiana de nuestra cepa actinomicetal Mk-22, en esta parte se confirma que la velocidad específica de crecimiento (μ) de nuestra es similar a la reportada por Koepff *et al.*, 2018 con la cepa *Streptomyces lividans* TK24 en donde obtuvo valores de entre 0.22 a 0.17 h⁻¹. Sin embargo, debemos tener en cuenta que tanto las condiciones de cultivo (medios de cultivo) así como los volúmenes y parámetros físico-químicos fueron diferentes, lo cual influye considerablemente en la obtención de las tasas de crecimiento.

Identificación molecular

Finalmente, nuestra cepa actinomicetal al ser blastada presentó una similitud del 99.7% con *Streptomyces variabilis* (Figura 20). Respecto a esta especie actinomicetal, hay abundante información respecto a la capacidad para producir metabolitos bioactivos como antibióticos principalmente. Sin embargo, respecto a la producción de antifúngicos, aún hay mucho por seguir descubriendo. Por ejemplo, Shubha *et al.*, 2017 aislaron, a partir de sedimentos marinos, una cepa de *S. variabilis* capaz de inhibir *A. niger* y *A. flavus*.

Por todo lo explicado anteriormente, la cepa aislada de los cultivos de Vid e identificada como *S. variabilis* MK 22 representa un microorganismo con mucho potencial para la producción de antifúngicos contra cepas de *Aspergillus* sp. así como contra *P. cinnamomi*, por lo cual se sugiere seguir investigando en la caracterización de tales antifúngicos y su utilidad como potencial biopesticida.

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

- El actinomiceto 22, aislado de cultivos de vid en Ica, *se identificó como Streptomyces variabilis* cepa MK 22 y produjo metabolitos antifúngicos capaces de inhibir a *Aspergillus* sp. y *Phytophthora cinnamomi*.
- 4 actinobacterias (Act-1, Act-11, Act-17 y Act-22) aisladas y seleccionadas de los cultivos de vid poseen características del grupo de bacterias promotoras de crecimiento de plantas PGPB.
- Es importante utilizar diferentes medios de cultivo para evaluar el poder antagonista de las cepas actinomicetales aisladas ya que dicha capacidad inhibitoria mostró mayor o menor efecto en cuanto se varió el tipo y concentración de los nutrientes (fuente de carbono, nitrógeno y sales).
- El actinomiceto seleccionado *Streptomyces variabilis* cepa MK 22 excreta metabolitos antifúngicos con potencial utilidad para la elaboración de inoculantes microbianos y/o biopesticidas contra afectaciones causadas por fitopatógenos tales como *Aspergillus* sp. así como contra *Phytophthora cinnamomi*.

CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Goswami, D., Thakker, J.N., Dhandhukia, P.C., 2016. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), a review. *Cogent Food Agric.* 2, 119.
2. Islam, M.R., Sultana, T., Joe, M.M., Yim, W., Cho, J.C., Sa, T., 2013. Nitrogen-fixing bacteria with multiple plant growth-promoting activities enhance growth of tomato and red pepper. *J. Basic Microbiol.* 53, 10041015.
3. Galloway, J.; A. Townsend; J. Erisman; M. Bekunda & Z. Freney. 2008 *Science*; 320(5878), 889-892.
4. Youssef, M. & M. Eissa, 2014 *E3J Biotechnol Pharm Res* 5 (1), 1-6.
5. Dash, N.; A. Kumar; M. Kaushik; G. Abraham & P. Singh. 2017b. *J. Appl Phycol* 29 (2), 929-939.
6. Wani, S.; K. Vinay; S. Varsha & K. Saroj. 2016. *J Crop.* 4,162-176.
7. Kumar, A.; V. Singh; M. Singh; P. Singh; S. Singh & P. Singh. 2016b. Isolation of plant growth promoting rhizobacteria and their impact on growth and curcumin content in *Curcuma longa* L. *Biocatal Agric Biotechnol* 8, 1-7.
8. Kumar, A.; H. Verma; V. Singh; P. Singh; S. Singh & W. Ansari. 2017a. Role of *Pseudomonas* sp. in sustainable agriculture and disease management. In: Meena V., Mishra P., Bisht J., Pattanayak A. (Eds.),

Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture. Springer, Singapore, pp. 195-215.

9. Delgado-Zegarra J, Alvarez-Risco A, Yáñez JA. Uso indiscriminado de pesticidas y ausencia de control sanitario para el mercado interno en Perú. *Rev Panam Salud Publica*. 2018;42:e3.
<https://doi.org/10.26633/RPSP.2018.3>
10. MINAGRI MINISTERIO DE AGRICULTURA Y RIEGO Juan Carlos Moreyra Muñoz Diseño & Edición Digital Jenny Miriam Acosta Reátegui Lima, marzo, 2019.
<https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/419832/Informe-Uva-peruana.pdf>
11. Agrios, G.N. 2008. *Fitopatología* 5^a ed Elsevier Academic Press. 948p.
12. Picot, A.; M. Doster; M. Islam; K. Callicott; A. Ortega-Beltran & P. Cotty. 2017. Distribution and incidence of atoxigenic *Aspergillus flavus* VCG in tree crop orchards in California: a strategy for identifying potential antagonists, the example of almonds. *Int J Food Microbiol*; 265(16):55–64.
13. Cleveland, T.; P. Dowd; A. Desjardins; D. Bhatnagar & P. Cotty. 2003. United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service research on pre-harvest prevention of mycotoxins and mycotoxigenic fungi in US crops. *Pest Manag Sci*;59(6–7):629–42.
14. Mobeen, A. 2011. Aflatoxins B1 and B2 contamination of peanut and peanut products and subsequent microwave detoxification. *J Pharm Nut Sci*;1(1).

15. Kunova, A.; M. Bonaldi; M. Saracchi; C. Pizzatti, Ch. Xiaoyulong & P. Cortesi. 2016. Selection of *Streptomyces* against soil borne fungal pathogens by a standardized dual culture assay and evaluation of their effects on seed germination and plant growth. BMC Microbiology 16:272. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0886-1>
16. Xu, T.; L. Cao & J. Zeng. 2019. The antifungal action mode of the rice endophyte *Streptomyces hygroscopicus* OsiSh-2 as a potential biocontrol agent against the rice.
17. Berg, G & J. Hallmann. 2006. Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophyte, Microbial Root Endophytes.
18. Vurukonda, S.; D. Giovanardi & E. Stefani. 2018. Plant growth promoting and biocontrol activity of *Streptomyces* spp. as endophytes, Int J Mol Sci. 19. 1-26
19. Young, T.P., Petersen, D.A., Clary, J.J., 2005. The ecology of restoration, historical links, emerging issues and unexplored realms. Ecol. Lett. 8, 662-673.
20. Heneghan, L., Miller, S.P., Baer, S., Callahan Jr., M.A., Montgomery, J., et al., 2008. Integrating soil ecological knowledge into restoration management. Restor. Ecol. 16, 608-617.
21. Ahemad, M., Khan, M.S., Zaidi, A., Wani, P.A., 2009. Remediation of herbicides contaminated soil using microbes. In: Khan, M.S., Zaidi, A., Musarrat, J. (Eds.), Microbes in Sustainable Agriculture. Nova Science Publishers, New York, USA, pp. 261-284.

22. Chandler, D., Davidson, G., Grant, W.P., Greaves, J., Tatchell, G.M., 2008. Microbial biopesticides for integrated crop management, an assessment of environmental and regulatory sustainability. *Trends Food Sci. Technol.* 19, 275- 283.
23. Calderón, K., Spor, A., Breuil, M.C., Bru, D., Bizouard, F., Violle, C., et al., 2016. Effectiveness of ecological rescue for altered soil microbial communities and functions. *ISME* 16, 17517362.
24. Shivilata, L., Satyanarayana, T., 2017. Actinobacteria in agricultural and environmental sustainability. In: Singh, J.S., Seneviratne, G. (Eds.), "Agro Environmental Sustainability". Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 173218.
25. Berdy J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* 58, 1-26.
26. Harvey A. (2000). Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug discov Today.* 5:294-300.
27. Leveav J, Bovix, M. (2000). *Microbiología Industrial.* 1ª edición. Ed. Acribia. S.A. España.
28. Doroshenko, E., Zenova G., Zvyagintsev, D., Sudnitsyn, I. (2005). Spore Germination and Mycelial Growth of Streptomycetes at Different Humidity Levels ,*Microbiology.* 74, No. 6: 690–694.
29. Gopalakrishnan, S., Kiran, B.K., Humayun, P., Vidya, M.S., Deepthi, K., Rupela, O.P., 2011. Biocontrol of charcoal-rot of sorghum by actinomycetes isolated from herbal vermicompost. *Afr. J. Biotechnol.* 10 (79), 1814218152.

30. Al-Askar, A.A., Abdulkhair, W.M., Rashad, Y.M., Hafez, E.E., Ghoneem, K.M., Baka, Z.A., 2014. *Streptomyces griseorubens* E44G: A potent antagonist isolated from soil in Saudi Arabia. *J. Pure Appl. Microbiol.* 8 (Spl. Edn. 2), 221230.
31. Zhang, W., Wei, S., Zhang, J., Wu, W., 2013a. Antibacterial activity composition of the fermentation broth of *Streptomyces djakartensis* NW35. *Molecules* 18 (3), 27632768.
32. Shrivastava, P., Kumar, R., Yandigeri, M.S., 2017. In vitro biocontrol activity of halotolerant *Streptomyces aureofaciens* K20: A potent antagonist against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Saudi J. Biol. Sci.* 24, 192199.
33. Passari, A.K., Mishra, V.K., Singh, G., Singh, P., Kumar, B., Gupta, V.K., et al., 2017. Insights into the functionality of endophytic actinobacteria with a focus on their biosynthetic potential and secondary metabolites production. *Sci. Rep.* 7, 11809. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12235-4>.
34. Alexander, M., 1977. *Introduction to Soil Microbiology*. Wiley, Canada.
35. Taylor, M.J., Melton, L.M, Sharpa, E.A. and Watson, J.E. (2013). Liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry method for the determination of multiple pesticide residues involved in suspected poisoning of nontarget vertebrate wildlife, livestock and pets. *Analytical Methods*, 5, 248-259.

36. Bartlett DW, Clough JM, Godwin JR, Hall AA, Hamer M, Parr-Dobrzanski B (2002) The strobilurin fungicides. *Pest Manage. Sci.* 58: 649–662.
37. Rosenberger DA, Meyer FW (1981). Post-harvest fungicides for apples: development of resistance to benomyl vinclozolin and iprodione. *Plant Dis.* 65: 1010–1013.
38. Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Cle'ment, C., Barka, E.A., 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4951_4959.
39. El-Tarabily, K.A., Sivasithamparam, K., 2006. Nonstreptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biol. Biochem.* 38, 1505_1520.
40. Yekkour, A., Meklat, A., Bijani, C., Toumatia, O., Errakhi, R., Lebrihi, A., et al., 2015. A novel hydroxamic acid-containing antibiotic produced by a Saharan soil-living *Streptomyces* strain. *Lett. Appl. Microbiol.* 60, 589_596.
41. Goudjal, Y., Toumatia, O., Yekkour, A., Sabaou, N., Mathieu, F., Zitouni, A., 2014. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. *Microbiol. Res.* 169, 59_65.
42. Toumatia, O., Compant, S., Yekkour, A., Goudjal, Y., Sabaou, N., Mathieu, F., et al., 2016. Biocontrol and plant growth promoting properties of *Streptomyces mutabilis* strain IA1 isolated from a Saharan

- soil on wheat seedlings and visualization of its niches of colonization. S. Afr. J. Bot. 105, 234239.
43. Zamoum, M., Goudjal, Y., Sabaou, N., Barakate, M., Mathieu, F., Zitouni, A., 2015. Biocontrol capacities and plant growth-promoting traits of endophytic actinobacteria isolated from native plants of Algerian Sahara. J. Plant Dis. Prot. 122, 215_223.
44. De-Oliveira, M.F., Da Silva, M.G., Van Der Sand, S.T., 2010. Anti-phytopathogen potential of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in southern Brazil, and characterization of *Streptomyces* sp. R18, a potential biocontrol agent. Res. Microbiol. 161,565_572.
45. Passari, A.K., Mishra, V.K., Gupta, V.K., Yadav, M.K., Saikia, R., Singh, B.P., 2015. In vitro and in vivo plant-growth promoting activities and DNA fingerprinting of antagonistic endophytic actinomycetes associates with medicinal plants. PLoS ONE 10, e0139468.
46. Sadeghi, A., Karimi, J., Abaszadeh, D., Javid, M.G., Dalvand, Y., Askari, H., 2012. Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil conditions. World J. Microbiol. Biotechnol. 28, 1503 1509.
47. Hamdali, H., Hafidi, M., Virolle, M.J., Ouhdouch, Y., 2008. Growth promotion and protection against damping-off of wheat by two rock phosphate solubilizing actinomycetes in a P-deficient soil under greenhouse conditions. Appl. Soil Ecol. 40, 510_517.
48. GlickEl-Tarabily, K.A., Nassar, A.H., Hardy, G.E., Sivasithamparam, K., 2009. Plant growth promotion and biological control of *Pythium*

aphanidermatum, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes. *J. Appl. Microbiol.* 106, 13_26.

49. Glick, B.R., 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol. Res.* 169, 30_39.
50. Muzammil, S., Graillon, C., Saria, R., Mathieu, F., Lebrihi, A., Compant, S., 2013. The Saharan isolate *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* seedlings against *Botrytis cinerea*. *Plant Soil* 374, 423_434
51. Toyota, K., Watanabe, T., 2013. Recent trends in microbial inoculants in agriculture. *Microbes Environ.* 28, 403–404.
<https://doi.org/10.1264/jsme2.me2804rh>.
52. E. Benizri, E. Baudoin & A. Guckert (2001) Root Colonization by Inoculated Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, *Biocontrol Science and Technology*, 11:5, 557-574, DOI: 10.1080/09583150120076120.
53. Umezawa, H.T., Okami, Y., Hashimoto, T., Suhara, Y., Hamada, M., Takeuchi, T., 1965. A new antibiotic- kasugamycin. *J Antibiot.* 18, 101-103.
54. Isono, K., Nagatsu, J., Kawashima, Y., Suzuki, S., 1965. Studies on polyoxins, antifungal antibiotics. Part I. Isolation and characterization of polyoxins A and B. *Agric. Biol. Chem.* 29, 848-854.
55. Iwasa, T., Suetomi, K., Kusuka, T., 1978. Taxonomic study and fermentation of producing organism and antimicrobial activity of mildiomycin. *J.Antibiot.* 31, 511-518.

56. Rothrock, C.S., Gottlieb, D., 1984. Role of antibiosis in antagonism of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* to *Rhizoctonia solani* in soil. *Can. J. Microbiol.* 30, 1440-1447.
57. Tanaka, Y., Hirata, K., Takahashi, Y., Iwai, Y., Omura, S., 1987. Globopeptin, a new antifungal peptide antibiotic. *J. Antibiot.* 40, 242-244.
58. Smith, J., Putnam, A., Nair, M., 1990. In vitro control of *Fusarium* diseases of *Asparagus officinalis* L. with a *Streptomyces* or its polyene antibiotic, Faeriefungin. *J. Agric. Food. Chem.* 38, 1729-1733.
59. Matsuyama, N., 1991. Purification and characterization of antifungal substance AC-1 produced by a *Streptomyces* sp. AB-88 M. *Annu. Phytopathol. Soc. Jpn.* 57, 591-594.
60. Muraleedharan G. Nair, Amitabh Chandra, Deborah L. Thorogood, Eberhard Ammermann, Nigel Walker, and Karl Kiehs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1994 42 (10), 2308-2310
DOI: 10.1021/jf00046a04
61. Hwang, B.K., Kim, B.S., 1995. In vivo efficacy and in vitro activity of tubercidin, an antibiotic nucleoside, for control of *Phytophthora capsici* blight in *Capsicum annuum*. *Pest. Sci.* 44, 255-260.
62. Trejo-Estrada, S.R., Sepulveda, I.R., Crawford, D.L., 1998. In vitro and in vivo antagonism of *Streptomyces violaceusniger* YCED9 against fungal pathogens of turf grass. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14, 865-872.

63. Kim, B.S., Moon, S.S., Hwang, B.K., 2000. Structure elucidation and antifungal activity of an anthracycline antibiotic, daunomycin, isolated from *Actinomadura roseola*. *J. Agric. Food. Chem.* 48, 1875-1881.
64. Marten, P., Bruckner, S., Minkwitz, A., Luth, P., Bergm, G., 2001. RhizovitR: impact and formulation of a new bacterial product. In: Koch, E, Leinonen, P. (Eds.), *Formulation of microbial inoculants: proceedings of a meeting held in Braunschweig, Germany. COST Action 830/Microbial inoculants for agriculture and environment, Germany*, pp. 78-82.
65. Shih, H.D., Liu, Y.C., Hsu, F.L., Mulabagal, V., Dodda, R., Huang, J.W., 2003. Fungichromin: a substance from *Streptomyces padanus* with inhibitory effects on *Rhizoctonia solani*. *J. Agric. Food Chem.* 51, 95-99.
66. Ismet, A., Vikinesawary, S., Paramaswari, S., Wong, W.H., Ward, A., Seki, T., et al., 2004. Production and chemical characterization of antifungal metabolites from *Micromonospora* sp. M39 isolated from mangrove rhizosphere soil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20, 523-528.
67. Chen, G., Lin, B., Lin, Y., Xie, F.L.W., Fong, W.F., 2005. A new fungicide produced by a *Streptomyces* sp. GAAS7310. *J. Antibiot.* 58 (8), 519-522.
68. Kim, Y.S., Kim, H.M., Chang, C., Hwang, I.C., Oh, H., Ahn, J.S., et al., 2007. Biological evaluation of neopeptides isolated from a *Streptomyces* strain. *Pest. Manag. Sci.* 63, 12081214.

69. Li, W., Csukai, M., Corran, A., Crowley, P., Solomon, P.S., Oliver, R.P., 2008. Malayamycin, new streptomycete antifungal compound, specifically inhibits sporulation of *Stagonospora nodorum* (Berk) Castell and Germano, the cause of wheat glume blotch disease. *Pest. Manag. Sci.* 64 (12), 1294-1302.
70. Lu, C.G., Liu, W.C., Qiu, J.Y., Wang, H.M., Liu, T., Liu, W.D., 2008. Identification of an antifungal metabolite produced by a potential biocontrol Actinomyces strain A01. *Braz. J. Microbiol.* 39, 701-707.
71. Yang, P.W., Li, M.G., Zhao, J.Y., Zhu, M.Z., Shang, H., Li, J.R., et al., 2010. Oligomycins A and C, major secondary metabolites isolated from the newly isolated strain *Streptomyces diastaticus*. *Folia Microbiol.* 55, 10-16.
72. Lee, S.Y., Tindwa, H., Lee, Y.S., Naing, K.W., Hong, S.H., Nam, Y., et al., 2012. Biocontrol of anthracnose in Pepper using chitinase, beta-1,3 glucanase, and 2-furancarboxaldehyde produced by *Streptomyces cavourensis* SY224. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22 (10), 1359-1366.
73. Xiong, Z.Q., Tu, X.R., Wei, S.J., Huang, L., Li, X.H., Lu, H., et al., 2013. In vitro antifungal activity of antifungal mycin 702, a new polyene macrolide antibiotic, against the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Biotechnol. Lett.* 35, 1475-1479.
74. Zhang, Y.L., Li, S., Jiang, D.H., Kong, L.C., Zhang, P.H., Xu, J.D., 2013b. Antifungal activities of metabolites produced by a termite-associated *Streptomyces canus* BYB02. *J. Agric. Food. Chem.* 61, 1521-1524.

75. Pan, H.Q., Yu, S.Y., Song, C.F., Wang, N., Hua, H.M., Hu, J.C., et al., 2015. Identification and characterization of the antifungal substances of a novel *Streptomyces cavourensis* NA4. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 353-357.
76. Kaur, T., Kaur, A., Sharma, V., Manhas, R.K., 2016. Purification and characterization of a new antifungal compound 10-(2, 2-dimethyl-cyclohexyl)-6,9 dihydroxy-4, 9-dimethyl-dec-2-enoic acid methyl ester from *Streptomyces hydrogenans* strain DH16. *Front. Microbiol.* 7, 1004.
77. Zamoum, M., Goudjal, Y., Sabaou, N., Mathieu, F., Zitouni, A., 2017. Development of formulations based on *Streptomyces rochei* strain PTL2 spores for biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato seedlings. *Biocontrol Sci. Technol.* 27, 723-738.
78. Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez, L., et al., 2015. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80, 1–43.
79. Chandra, G., Chatterjee, K.F., 2014. Developmental biology of *Streptomyces* from the perspective of 100 actinobacterial genome sequences. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 345–379.
80. Passari, A.K., Mishra, V.K., Singh, G., Singh, P., Kumar, B., Gupta, V.K., et al., 2017. Insights into the functionality of endophytic actinobacteria with a focus on their biosynthetic potential and secondary metabolites production. *Sci. Rep.* 7, 11809. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12235-4>.

81. Hassan, A.A., El-Barawy, A.M., Mokhtar, El., Nahed, M., 2011. Evaluation of biological compounds of *Streptomyces* species for control of some fungal diseases. *J. Am. Sci.* 7, 752760.
82. Demain, A.L., 1988. Actinomycetes: what have you done for us lately? In: Okami, Y., Beppu, T., Ogawara, H. (Eds.), *Biology of Actinomycetes'88*. Japan Scientific Societies, Tokyo, Japan, pp. 288–293.
83. Hopwood, D. *Practical Streptomyces Genetics*. 2da Edición. Norwich, England: John Innes Foundation. 2000. ISBN 0-7084-023-8.
84. Cross, T., 1982. Actinomycetes: a continuing source of new metabolites. *Dev. Ind. Microbiol.* 23, 1–18.
85. Lechevalier, H.A., Lechevalier, M.P., 1985. Biology of actinomycetes not belonging to the genus *Streptomyces*. In: Demain, A.L., Solomon, N.A. (Eds.), *Biology of Industrial Microorganisms*. Benjamin/Cummings Publishing Company Inc, California, pp. 315–318.
86. Ipek Kurtböke. 2017. *Bioactive Actinomycetes: Reaching Rarity Through Sound Understanding of Selective Culture and Molecular Diversity*. University of the Sunshine Coast, Maroochydore DC, QLD 4558, Australia <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-804765-1.00003-5>.
87. Bérday, J., 2005. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* 58 (1), 1–26.

88. Bérdy, J., 2012. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *J. Antibiot.* 65, 385–395. Bomar, L., Maltz, M., Colston,
89. Kurtböke, D.I., 2012. Biodiscovery from rare actinomycetes: an ecotaxonomical perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93 (5), 1843–1852.
90. Kumar, A., Singh, V., Singh, M., Singh, P.P., Singh, S.K., Singh, P.K., et al., 2016b. Isolation of plant growth promoting rhizobacteria and their impact on growth and curcumin content in *Curcuma longa* L. *Biocatal Agric Biotechnol* 8, 1-7.
91. Kumar, A., Verma, H., Singh, V.K., Singh, P.P., Singh, S.K., Ansari, W.A., et al., 2017a. Role of *Pseudomonas* sp. in sustainable agriculture and disease management. In: Meena V., Mishra P., Bisht J., Pattanayak A. (Eds.), *Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture*. Springer, Singapore, pp. 195-215.
92. Sathya, A.; Vijayabharathi, R.; Gopalakrishnan, S. 2017. Plant growth-promoting actinobacteria: A new strategy for enhancing sustainable production and protection of grain legumes. *3 Biotech*, 7, 102.
93. Bulgarelli, D.; Schlaeppi, K.; Spaepen, S.; Ver, E.; Van Themaat, L.; Schulze-Lefert, P. 2013. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 807–838.
94. Bais, H.P, Weir, T.L.; Perry, L.G.; Gilroy, S.; Vivanco, J.M. 2006 The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Ann. Rev. Plant Biol.* 57, 233–266.

95. Sandhya, V., Shrivastava, M., Ali, S.Z., Prasad, V.S.K., 2017. Endophytes from maize with plant growth promotion and biocontrol activity under drought stress. *Russ Agric Sci.* 43, 22-34.
96. Siddikee, M.A., Chauhan, P.S., Anandham, R., Han, G.H., Sa, T., 2010. Isolation, characterization, and use for plant growth promotion under salt stress, of ACC deaminase-producing halotolerant bacteria derived from coastal soil. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20 (11), 1577-1584.
97. Palaniyandi, S.A., yang, S.H., Zhang, L., Suh, W.J., 2013a. Effect of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 9621-9636.
98. Doumbou, C.L., Hamby Salove, M., Crawford, D.L., Beaulieu, C., 2001. Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection* 82, 85-102.
99. Abdallah M.E, S.A. Haroun, A.A. Gomah, N.E. El-Naggar, H.H. Badr. 2013. Application of actinomycetes as biocontrol agents in the management of onion bacterial rot diseases. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.*, 46 (15) (2013), pp. 1797-1808.
100. Sharma, M, 2014. Actinomycetes: source, identification, and their applications. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 3, 801-832.
101. Passari, A.K., Mishra, V.K., Saikia, V., Gupta, V.K., Singh, B.P., 2015b. Isolation, abundance and phylogenetic affiliation of endophytic actinomycetes associated with medicinal plants and screening for their in vitro antimicrobial biosynthetic potential. *Front. Microbiol.* 6, 273. Available. from: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00273>.
102. Berdy, J., 2012. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *J. Antibiot.* 65, 385-395.

103. Leben, C., Keitt, G.W., 1954. Antibiotics and plant disease: effects of antibiotics in control of plant diseases. *J. Agric. Food. Chem.* 2, 234-239.
104. Endo, A., Misato, T., 1969. Polymixin D: A competitive inhibitor of UDP-N-acetylglucosaminyltransferase in *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 718-722.
105. Samaca, D.A., Willertc, A.M., McBrideb, M.J., Kinkel, L.L., 2003. Effects of antibiotic-producing *Streptomyces* on nodulation and leaf spot in alfalfa. *Appl. Soil Ecol.* 22, 55-66.
106. Palaniyandi, S.A., Yang, S.H., Cheng, J.H., Meng, L., Suh, J.W., 2011. Biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) in yam by *Streptomyces* sp. MJM5763. *J. Appl. Microbiol.* 111 (2), 443-455.
107. MINAGRI D.S N° 001-2015- Agricultura y riego, Decreto Supremo que aprueba el Reglamento del Sistema Nacional de Plaguicidas de Uso Agrícola. Normas Legales del 29.01.2015.
108. Crawford, D.L., Kowalski, M., Roberts, M.A., Merrel, G., Deobald, L.A., 2005. Discovery, development and commercialization of a microbial antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108: history of a decade long endeavour. *Soc. Ind. Microbiol. News* 55, 88-95.
109. Figueiredo, M.V.B., Seldin, L., Araujo, F.F., Mariano, R.L.R., 2010. Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications. In: Maheshwari, D.K. (Ed.), *Plant growth and health promoting bacteria*. Springer, Verlag, Berlin.

110. Tamreihao, K., Ningthoujam, D.S., Nimaichand, S., Singh, E.S., Reena, P., Singh, S.H., et al., 2016. Biocontrol and plant growth promoting activities of a *Streptomyces corchorusii* strain UCR3-16 and preparation of powder formulation for application as biofertilizer agents for rice plant. *Microbiol. Res.* 192, 260-270.
111. Lumsden, R.D., Lewis, J.A., Fravel, D.R., 1995. Formulation and delivery of biocontrol agents for use against soil-borne plant pathogens. In: Hall, F.R., Barry, J.W. (Eds.), *Biorational pest control agents*. Am Chem Soc, Washington DC.
112. White, J.G., Linfield, C.A., Lahdenpera, M.L., Uoti, J., 1990. Mycostop-a novel biofungicide based on *Streptomyces griseoviridis*, *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases*, vol. 1. British Crop Protection Council, pp. 221-226.
113. Hamby, M.K., Crawford, D.L., 2000. The enhancement of plant growth by selected *Streptomyces* species. *American Society for Microbiology, 100th general meeting*, Los Angeles, CA. Abstract N^o: 567.
114. Reddy, K.R.K., Jyothi, G., Sowjanya, C., Kusumanjali, K., Malathi, N., Reddy K.R.N., 2016. Plant growth-promoting actinomycetes: mass production, delivery systems, and commercialization. In: Subramaniam, G., Arumugam, S., Rajendran, V. (Eds.), *Plant growth promoting actinobacteria a new avenue for enhancing the productivity and soil fertility of grain legumes*, pp. 287-298. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-981-10-0707-1_19
115. Lino Navarro, Mirko et al. antifungal response and PGPB properties of actinomycetes isolated from “vid” *Vitis vinifera* (Vitaceae)

- crops. Arnaldoa [online]. 2020, vol. 27, n. 2, pp. 571-586. ISSN 1815-8242. [http://dx. doi. org/10.22497/arnaldoa. 272.27209](http://dx.doi.org/10.22497/arnaldoa.272.27209)
116. Holt, J.; N. Krieg; P. Sneath. J. Staley & S. Williams. 2000. Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
117. Zhao, J., Q. Xue ; G. Shen; L. Xue; J. Duan & D. Wang. 2012. Evaluation of *Streptomyces* spp. for biocontrol of gummy stem blight (*Didymella bryoniae*) and growth promotion of *Cucumis melo* L. Biocontrol Science and Technology Vol. 22, Issue 1. Disponible en <https://doi.org/10.1080/09583157.2011.636481>
118. Simon, P. & I. Tessman. 1963. Thymidine-requiring mutants of phage T4. Proc Natl. Acad Sci. USA. Vol. 50, pp. 526-532
119. Valdes, M.; N. Perez; P. Estrada. J. Caballero: J. Peña; P. Normand & A. Hirsch. 2005. Non-Frankia Actinomycetes Isolated from Surface-Sterilized Roots of *Casuarina equisetifolia* Fix Nitrogen. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 71, n° 1, pp. 445-446.
120. Vásquez, P.; C. Holguin & M. Puente. 2000. Phosphate solubilizing microorganisms associated with rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. Biol. Fertl. Soils. Vol. 30, pp. 460-468.
121. Gunmarsson, N.; U M. Sosio Mortensen & J. Nielsen. 2004. Identification of Entner Doudoroff pathway in an antibioticproducing actinomycetes species. Molec. Microbiol. Vol. 52, n° 3, pp. 895-902.
122. Celis, J. & I. Gallardo. 2007. Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético,

giberelinas) en cultivos microbianos. Microbiología Industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.

123. Kumar, S., Stecher, G., y Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.
124. Grigorevski, A; R. Nascimento; E. Bonb & R. Coelho. 2005. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use en the detergent and textile industries. *Enzyme and Microbial Technology*. 37:272-277.
125. Sharma Manish & Rajesh Kumari Manhas. Purification and characterization of salvianolic acid B from *Streptomyces* sp. M4 possessing antifungal activity against fungal phytopathogen. *Microbiological Research* Volume 237, August 2020, 126478. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126478>
126. Ganesan, P.; A. Rajendran; D. Appadurai; G. Munusamy; M. Paulraj; I. Savarimuthu & A. Naif. 2017. Isolation and molecular characterization of actinomycetes with antimicrobial and mosquito larvicidal properties. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* 6. 209-217.
127. Pal, K. & B. McSpadden. 2006. Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health*. Instructor DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-0.
128. Grahovac, J.; M. Grahovac; J. Dodic; B. Bajic & J. Balaz. 2014. Optimization of cultivation medium for enhanced production of antifungal metabolites by *Streptomyces hygroscopicus*. *Crop Protection* 65. 143e152

129. Lino, M., J. León & M. Huamán. 2016. Evaluación de la capacidad antagonista de un antimicrobiano producido por *Streptomyces* sp. cepa 13A-2 frente a microorganismos resistentes a B-Lactámicos de origen hospitalario. Revista Peruana de Investigación Materno Perinatal, 5: 28-34. DOI <https://doi.org/10.33421/inmp.201652>
130. Joe, M.; Devara, S.; A. Benson, A & T. Sa. 2016. Isolation of phosphate solubilizing endophytic bacteria from *Phyllanthus amarus* Schum & Thonn: evaluation of plant growth promotion and antioxidant activity under salt stress. J Appl Res Med Aromat Plants 3,71-77.
131. Goswami, D.; J. Thakker; P. Dhandhukia; M. Tejada, 2016. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. Cogent Food Agric 2, 1127500.
132. Das, N.; A. Kumar; P. Singh. 2015. Cyanobacteria, pesticides and rice interaction. Biodiverse Conserved 24 (4), 995_1005.
133. Ahsan T., Chen J., Wu Y and Irfan M., 2017. Application of response surface methodology for optimization of medium components for the production of secondary metabolites by *Streptomyces diastatochromogenes* KX852460. AMB Expr. Springer open DOI 10.1186/s13568-017-0388-z
134. Bankar SB, Singhal RS (2010) Optimization of poly- ϵ -lysine production by *Streptomyces noursei* NRRL 5126. Biores Technol 101:8370–8375. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.004
135. Kaur, T., Sharma, D., Kaur, A., Manhas, R.K., 2013. Antagonistic and plant growth promoting activities of endophytic and soil actinomycetes. Arch. Phytopathol. Plant Prot. 46, 1756-1768.
136. Passari, A.K., Chandra, P., Zothanpuia, Mishra, V.K., Leo, V.V., Gupta, V.K., et al., 2016a. Detection of biosynthetic gene and

- phytohormone production by endophytic actinobacteria associated with *Solanum lycopersicum* and their plant-growth-promoting effect. Res. Microbiol. 167, 692-705.
137. Singh, H.B., 2014. Management of plant pathogens with microorganisms. Proc. Indian Natl. Sci. Acad. 80 (2), 443-454.
138. Sanjivkumar, M. K. Vijayalakshmi, T. Silambarasan, et al., 2020. Biosynthesis, statistical optimization and molecular modeling of chitinase from crabshell wastes by a mangrove associated actinobacterium *Streptomyces olivaceus* (MSU3) using Box-Behnken design and its antifungal effects, Bioresource Technology Reports (2020), <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100493>.
139. Palaniyandi, S.A., Yang, S.H., Suh, J.W. (2013). Extracellular proteases from *Streptomyces phaeopurpureus* ExPro138 inhibit spore adhesion, germination and appressorium formation in *Colletotrichum coccodes*. J Appl Microbiol. 115, 207–217.
140. Singh, A.K., Chhatpar, H.S. (2011). Purification, characterization and thermodynamics of antifungal protease from *Streptomyces* sp. A6. J Basic. Microbial. 51, 424–432.
141. Van Bruggen, A.H.C., Semenov, A.M. (2000). In search of biological indicators for soil health and disease suppression. Appl Soil Ecol 15, 13–24
142. Smaoui S, Ennouri K, Chakchouk-Mtibaa A, Sellem I, Bouchaala K, Karray-Rebai I, Ben Ayed R, Mathieu F, Mellouli L. 2018. Modeling-based optimization approaches for the Development of Anti-Agrobacterium tumefaciens activity using *Streptomyces* sp. TN71, Microbial Pathogenesis, doi: 10.1016/j.micpath.2018.04.006.

143. Raytapadar, S & A.K. Paul. (2001). Production of an antifungal antibiotic by 469 *Streptomyces aburaviensis* IDA-28, Microbiol. Res. 155; 315–323.
144. Singh L. S, S. Mazumder, T.C. Bora, Optimisation of process 473 parameters for growth and bioactive metabolite produced by a salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete, *Streptomyces tanashiensis* strain A2D, J. Mycol. Med. 19(2009) 225–233.
145. Vasavada S.H., J.T. Thumar, S.P. Singh, Secretion of a potent antibiotic by salt tolerant and alkaliphilic actinomycete *Streptomyces sannanensis* strain RJT-1, Current Science, 91(2006) 1393–1397.
146. Shakeel Q, A. Lyu, J. Zhang, M. Wu, S. Chen, W. Chen, et al., (2016). Optimization of the cultural medium and conditions for production of antifungal substances by *Streptomyces platensis* 3-10 and evaluation of its efficacy in suppression of clubroot disease (*Plasmodiophora brassicae*) of oilseed rape, Biol. Control, 101: 59–68
147. El-Naggar N. E. A, H. Moawad, N. M. El-Shweihiy, S. M. El-Ewasy. (2015). Optimization of culture conditions for production of the anti-leukemic glutaminase free asparaginase by newly isolated *Streptomyces olivaceus* NEAE-119 using response surface methodology, Biomed Res Int. Article. Id 62703.
148. Zhu C. H., F. P. Lu, Y. N. He, Z. L. Han, L. X. Du, Regulation of avilamycin biosynthesis in *Streptomyces viridochromogenes*: effects of glucose, ammonium ion, and inorganic phosphate, Appl. Biochem. Biotechnol. 73(2007) 1031–1038.
149. Kalaiyarasi M, P. Ahmad and P. Vijayaraghavan, Enhanced production antibiotics using green gram husk medium by *Streptomyces*

sp. SD1 using response surface methodology, Journal of King Saud University – Science, <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.02.014>.

150. Saravana Kumar P, et al. (2018). Bio-prospecting of soil *Streptomyces* and its bioassay-guided isolation of microbial derived auxin with antifungal properties. Journal De Mycologie Me' dicale <https://doi.org/10.1016/j.myc-med.2018.05.009>
151. Smaoui S, Karim Ennouri, Ahlem Chakchouk-Mtibaa, Imen Sellem, Kameleddine, Bouchaala, Ines Karray-Rebai, Rayda Ben Ayed, Florence Mathieu, Lotfi Mellouli (2018). Statistical versus artificial intelligence -based modeling for the optimization of antifungal activity against *Fusarium oxysporum* using *Streptomyces* sp. strain TN71. Journal De Mycologie Médicale <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2018.07.003>
152. Sajid Imran; Khaled A, Shaaban; Shahida Hasnain. Identification, isolation and optimization of antifungal metabolites from the *Sreptomycetes malachitofuscus* CTF9. Brazilian Journal of Microbiology (2011) 42: 592-604 ISSN 1517-8382. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000200024>
153. Tugba Keskin Gundogdu, Irem Deniz, Gulizar Caliskan, Erdem Sefa Sahin, and Nuri Azbar. Experimental design methods for bioengineering applications. Crit Rev Biotechnol, Early Online: 1–21 ISSN:0738-8551(print),1549-7801 (electronic) 2014. Informa Healthcare USA, Inc. DOI: 10.3109/07388551.2014.973014

154. Martínez-Cárdenas JA, Norma M, Salcedo-Herna'ndez R, et al. (2012). Effects of physical culture parameters on bacteriocin production by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis* after cellular induction. *J Ind. Microbial Biotechnol*, 39, 183–9.
155. Herculano PN, Porto TS, Moreira KA, et al. (2011). Cellulase production by *Aspergillus japonicus* URM5620 using waste from castor bean (*Ricinus communis* L.) under solid-state fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 165, 1057–67.
156. Managamuri U, Vijayalakshmi M, Poda S, Venkat, Rama S, Ganduri K, Rajulapati S. B. 2017. Antifungal Metabolite Production By *Streptomonospora arabica* VSM 25 Using RSM. *J Young Pharm*; 9(3):399-409. DOI: 10.5530/jyp.2017.9.80
157. Mitrović Ivana Ž., Jovana A. Grahovac , Jelena M. Dodić , Mila S. Grahovac , Siniša N. Dodić, Damjan G. Vučurović, Vanja R. Vlajkov. Effect of agitation rate on the production of antifungal metabolites by *Streptomyces hygroscopicus* in a lab-scale bioreactor. *Acta Periodica Technologica* 2017 Issue 48, Pages: 231-244. <https://doi.org/10.2298/APT1748231M>
158. El-Tarabily, K.A., Sivasithamparam, K., 2006. Nonstreptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biol. Biochem.* 38, 1505_1520.
159. Qi D, Zou L, Zhou D, Chen Y, Gao Z, Feng R, Zhang M, Li K, Xie J and Wang W (2019) Taxonomy and Broad-Spectrum Antifungal Activity of *Streptomyces* sp. SCA3-4 Isolated From Rhizosphere Soil of

Opuntia stricta. *Front. Microbiol.* 10:1390.
doi: 10.3389/fmicb.2019.01390.

160. Chirayu Sa-uth, Paweena Rattanasena, Angsumarn Chandrapatya and Prapassorn Bussaman. Modification of Medium Composition for Enhancing the Production of Antifungal Activity from *Xenorhabdus stockiae* PB09 by Using Response Surface Methodology. *Hindawi International Journal of Microbiology*. Volume 2018, Article ID 3965851, 10 pages. <https://doi.org/10.1155/2018/3965851>
161. Saravana Kumar P, et al. (2018). Bio-prospecting of soil *Streptomyces* and its bioassay-guided isolation of microbial derived auxin with antifungal properties. *Journal De Mycologie Me' dicale* <https://doi.org/10.1016/j.myc-med.2018.05.009>
162. Verheecke, C.; Liboz, T.; Darriet, M.; Sabaou, N.; Mathieu, F. In vitro interaction of actinomycetes isolates with *Aspergillus flavus*: Impact on aflatoxins B1 and B2 production. *Lett. Appl. Microbiol.* 2014, 58, 597–603.
163. Cáceres Isaura, Selma P. Snini, Olivier Puel and Florence Mathieu. *Streptomyces roseolus*, A Promising Biocontrol Agent Against *Aspergillus flavus*, the Main Aflatoxin B1 Producer. *Toxins* 2018, 10, 442; doi:10.3390/toxins10110442.
164. Koepff J, Sachs CC, Wiechert W, Kohlheyer D, Nöh K, Oldiges M and Grünberger A (2018) Germination and Growth Analysis of *Streptomyces lividans* at the Single-Cell Level Under Varying Medium Compositions. *Front. Microbiol.* 9:2680. doi: 10.3389/fmicb.2018.02680

165. Shubha M, Ushashi B, Veena S, Bhaskara Rao KV. Antimicrobial activity of *Streptomyces variabilis* strain-VITUMVB03 isolated from kanyakumari marine sediments. Asian J Pharm Clin Res, Vol 10, Issue 9, 2017, 112-116. DOI: <http://dx.doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i9.19250>

CAPÍTULO VIII. ANEXOS



Figura 1. Toma de muestras de suelo y raíces en los campos de cultivo de Uva en Ica.



Figura 2. Visita al fundo Provid en Ica para conocer cómo se realiza la aplicación de productos biológicos en el control de “Oídium” sobre cultivos de Uva.

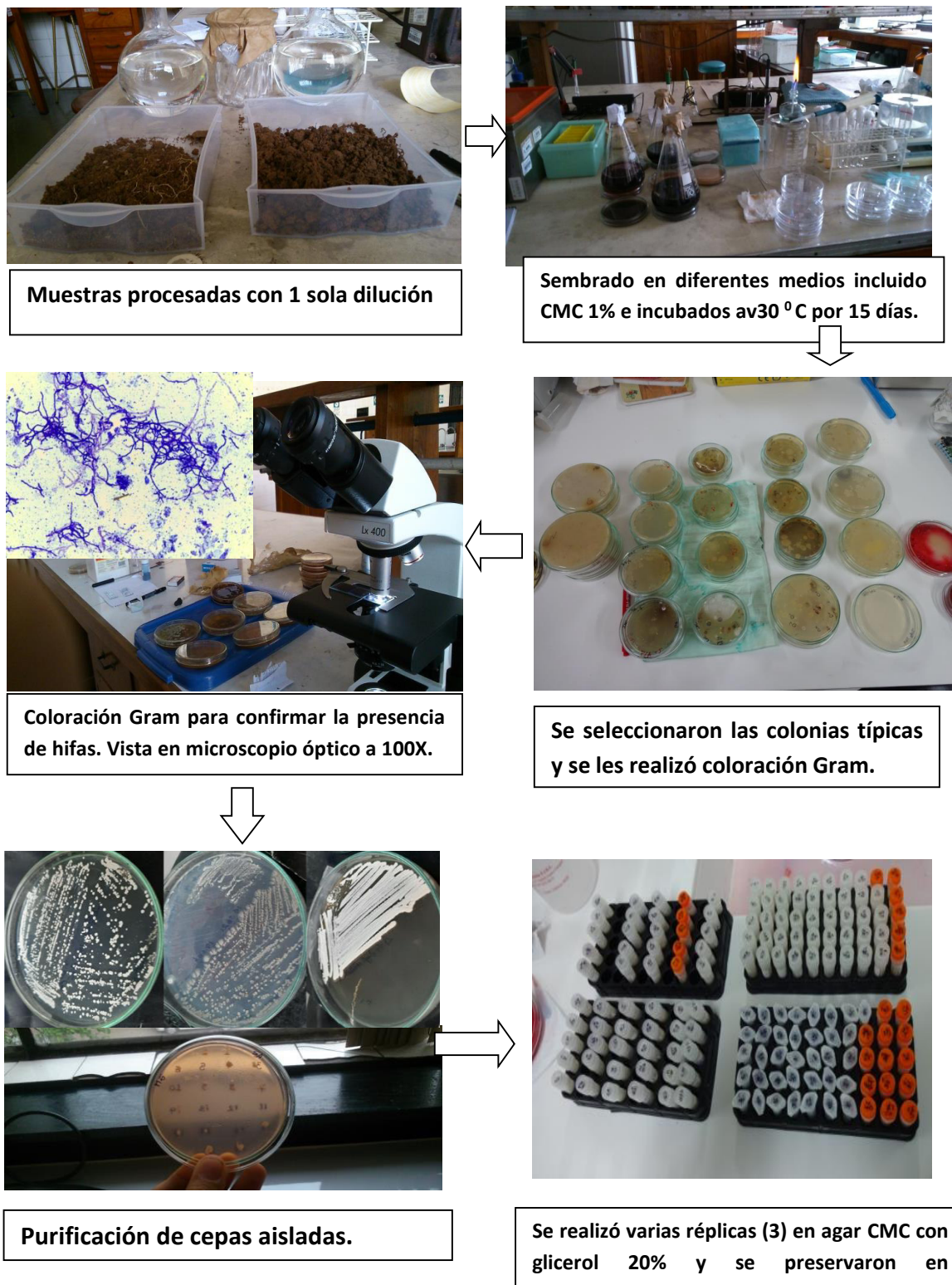
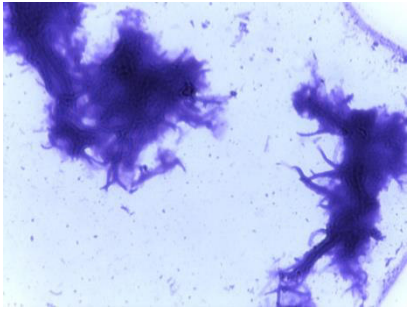
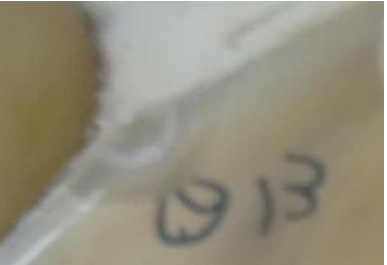
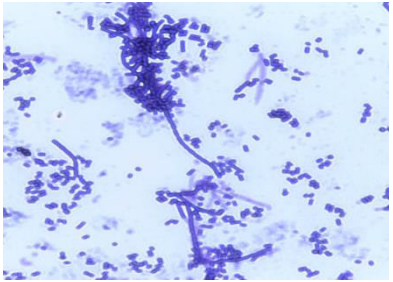

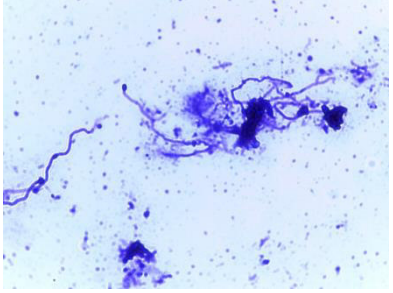

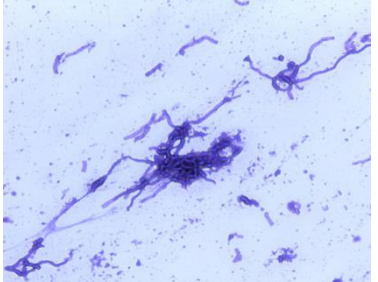



Figura 3. Secuencia utilizada para el aislamiento de actinomicetos de cultivos de Vid (suelos y raíces).

Imagen microscopio óptico-100x	Foto de la colonia (PCA agar)
	<p>Cepa 13 con crecimiento al borde de la placa de agar, se ve un halo blanquecino en su centro debido a la formación de micelios aéreos.</p> 
	<p>Cepa 12 con crecimiento típica de adherencia al agar.</p> 
	<p>Cepa 10 madura de 15 días de crecimiento se observa la formación de color blanco por el crecimiento de hifas aéreas.</p> 
	<p>Cepa 9 con la formación de micelios de sustrato y aéreo.</p> 

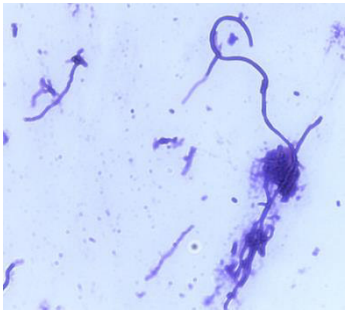

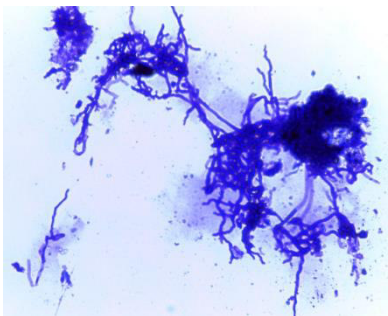



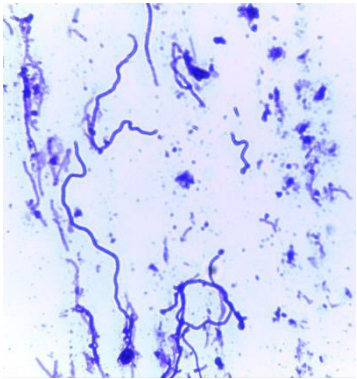

	<p>Cepa 29 con característica típica de actinomiceto.</p> 
	<p>Cepa 8: Colonia de 10 días con la aparición de hifas aéreas que empiezan a dar el color blanquecino.</p> 
	<p>cepa 6: Colonia de consistencia arenosa y bien adherida al agar, típica de Actinomicetos.</p> 
	<p>Cepa 5: Colonia empezando su etapa de maduración, con el color blanco sobre su superficie (10 días de crecimiento)</p> 

Figura 4. Observaciones microscópicas y características culturales de las colonias actinomicetales aisladas de los cultivos de Uva en Ica.

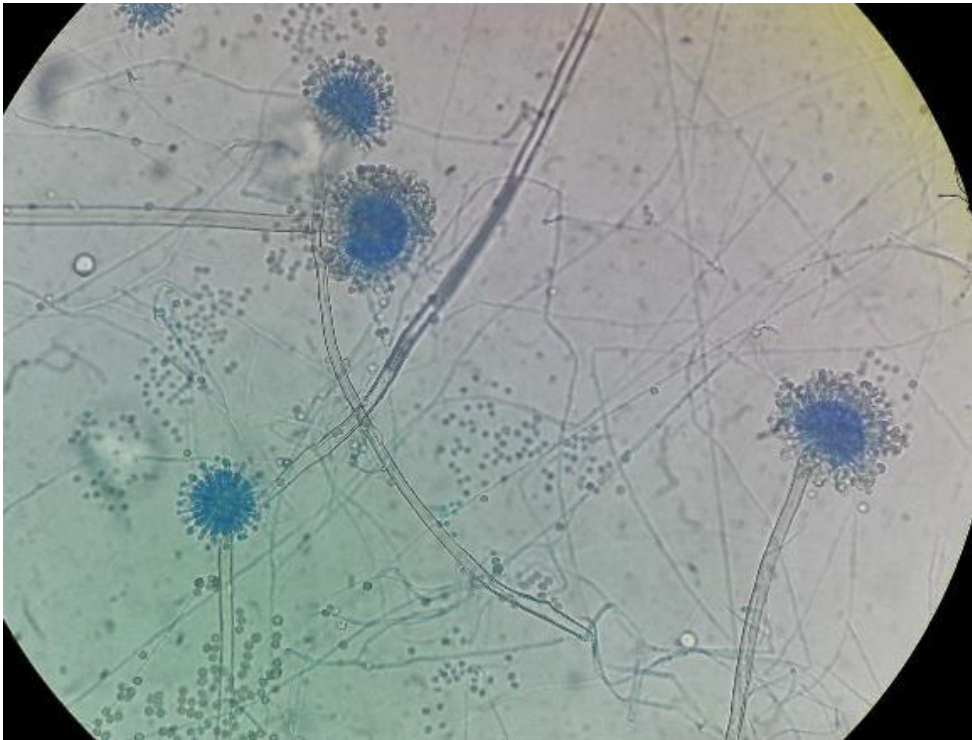
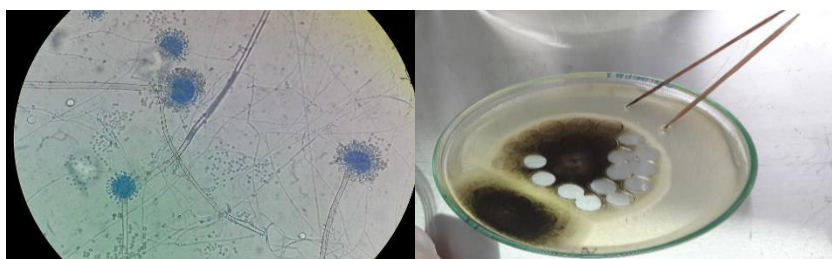


Figura 5. Imagen de la observación microscópica de *Aspergillus* sp. a 40X utilizando coloración azul de lactofenol. Nótese las vesículas, fialides y conidios típicos de este género.

1. Asilamiento y purificación de *Aspergillus sp.* de cultivos de uva, sobre PDA



2. Observación microscópica para confirmar presencia de *Aspergillus sp.* y toma de muestras con sacabocado para iniciar el proceso fermentativo.



3. Proceso fermentativo durante 7 días a 120 rpm y temperatura 28 a 30 °C



4. Autoclavar a 121 °C por 15 minutos, filtrado y secado de la biomasa obtenida.



5. Triturado hasta pulverizar la biomasa y pesado para ser agregado como sustrato.



Figura 6. Proceso realizado para la producción de biomasa fúngica a partir de *Aspergillus sp.*

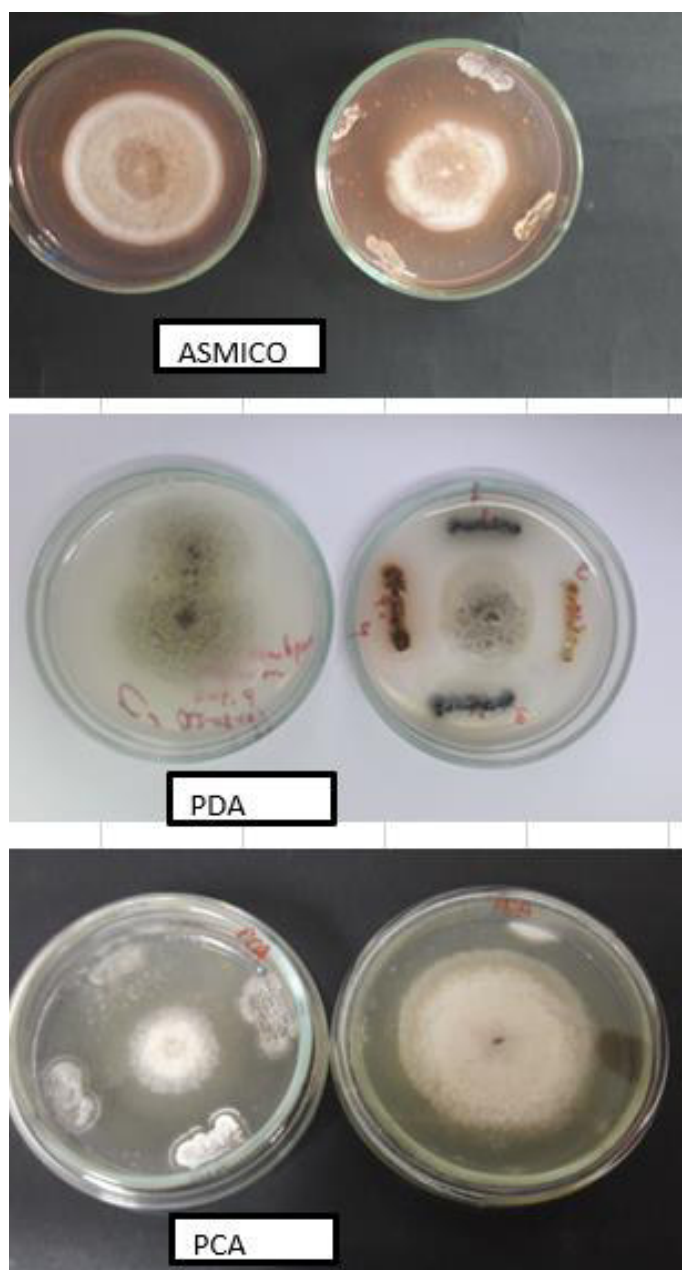


Figura 7. Pruebas de enfrentamiento en placa de los actinomicetos VS *Aspergillus* sp. en 3 medios de cultivo diferente. Nótese la diferencia con su control negativo (Sin actinomicetos).



Figura 8. Efecto inhibitorio de la cepa Mk-22 contra *Aspergillus* sp. Nótese que solo la cepa 22 causó inhibición y las otras 3 no lo hicieron.

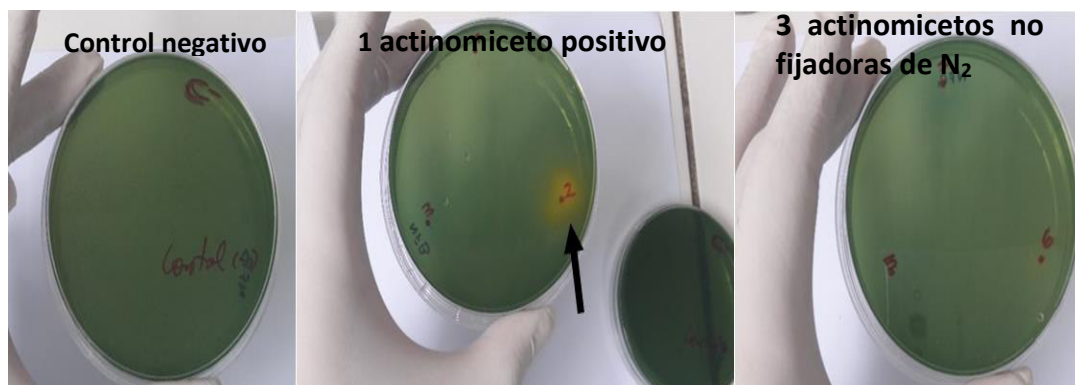


Figura 9. Fijación de nitrógeno en medio NFB. Nótese la zona amarilla indica la presencia de actinomiceto fijador de nitrógeno.



Figura 10. Actinomicetos solubilizadores de fosfato en medio SRSM. Nótese las zonas de amarillos indicador de reacción positiva.

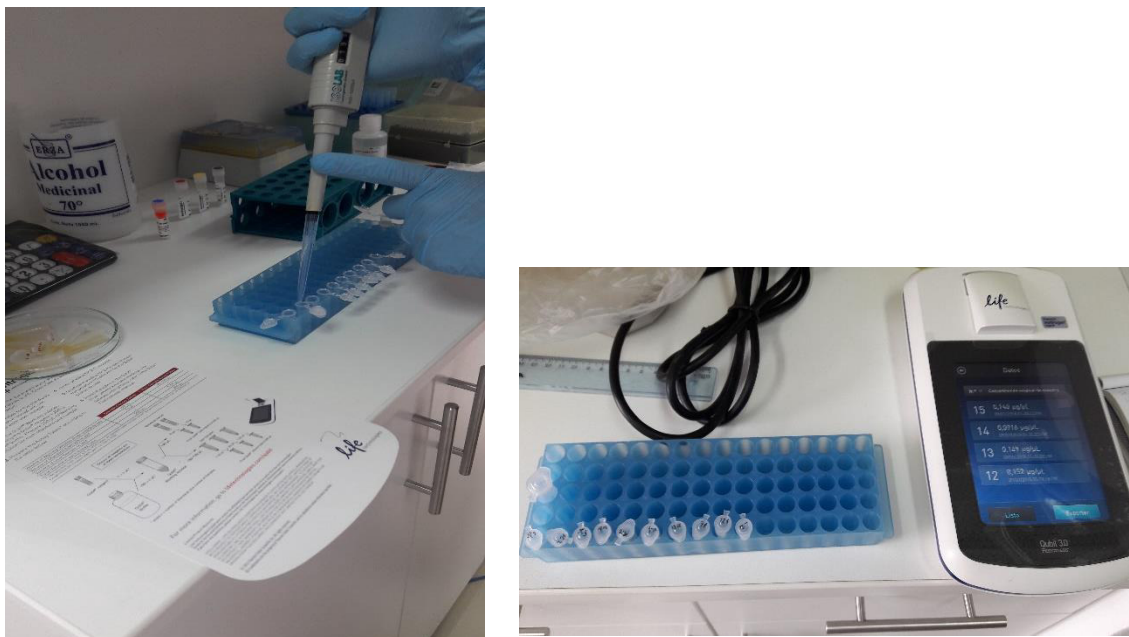


Figura 11. Cuantificación de proteínas utilizando en Kit Qubit 3.0 Fluorometer. En el lado izquierdo la preparación de diluciones y en el lado derecho la lectura. Pruebas realizadas gracias al apoyo del Laboratorio de Inmunología de la Fac.CC.BB-UNMSM.

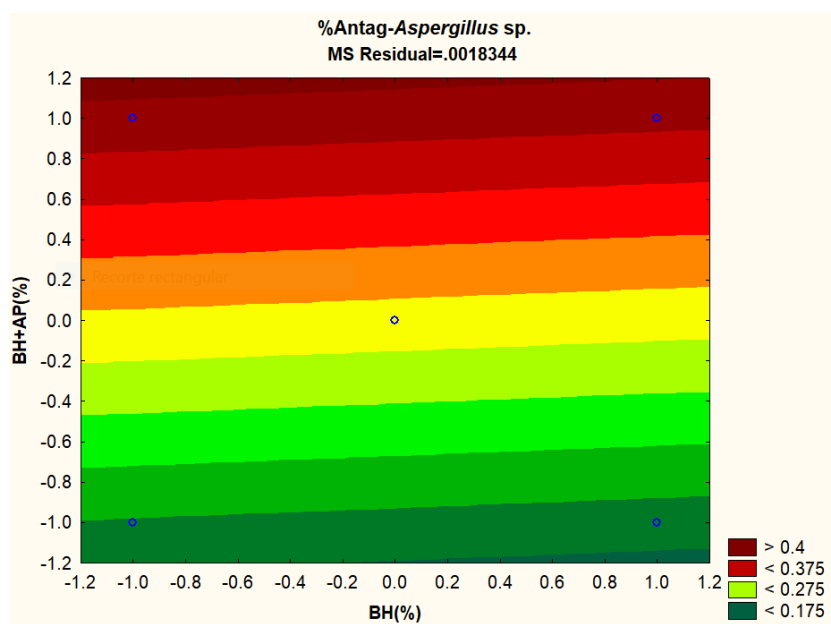


Figura 12. Gráfica de contornos BH vs (BH+AP).

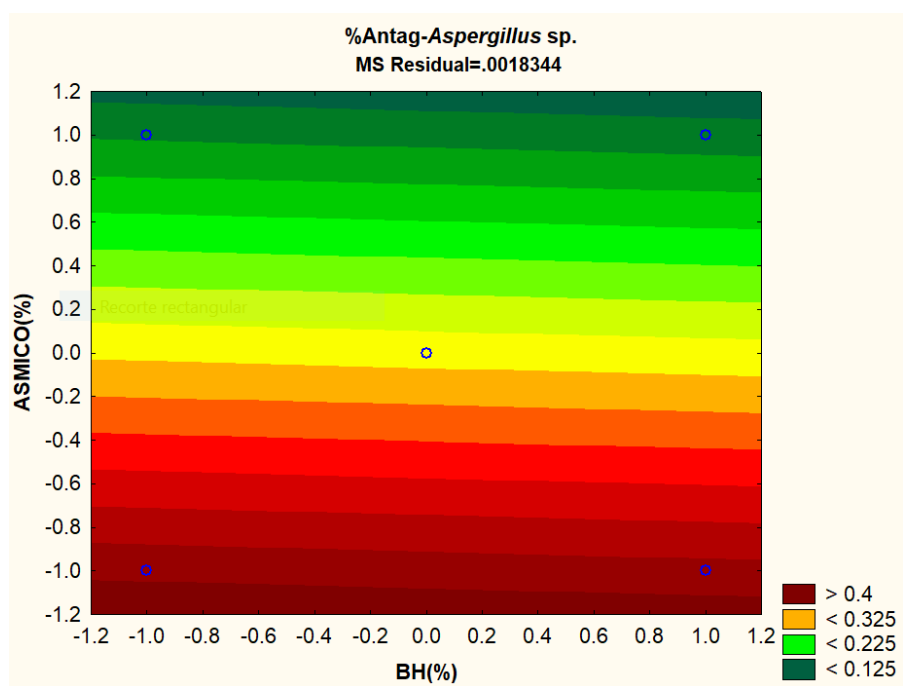


Figura 13. Gráfica de contornos ASMICO vs (BH+AP).

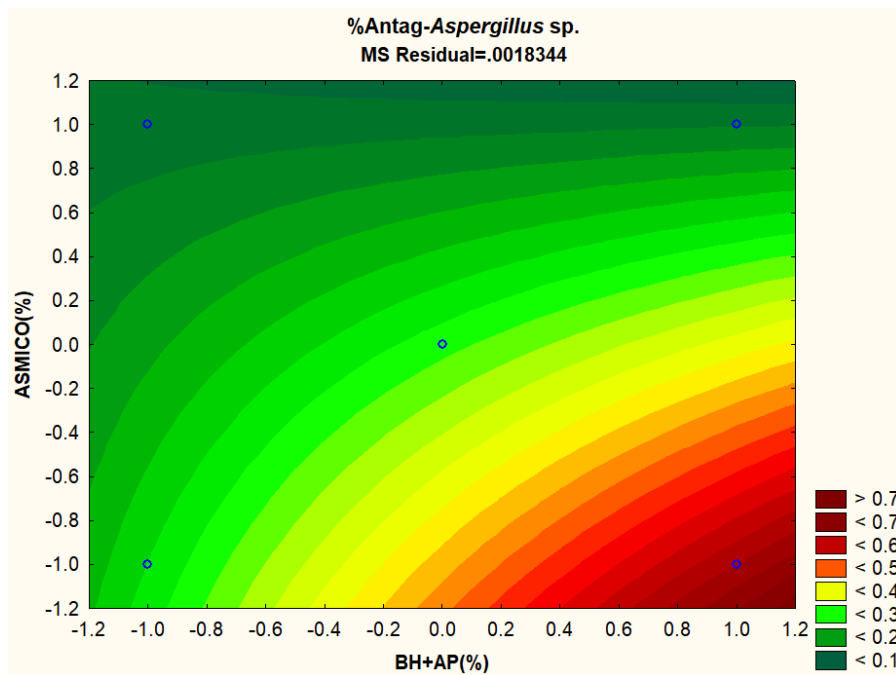


Figura 14. Gráfica de contornos ASMICO vs (BH+AP).

Composición del caldo **Bushnell Haas** (Himedia)

Ingredientes	g/L
Sulfato de Magnesio	0.200
Cloruro de Calcio	0.020
Fosfato monopotásico	1.000
Fosfato monopotásico	1.000
Nitrato de amonio	1.000
Cloruro férrico	0.050

pH final(25°C) 7.0±0.2 Suspender 23.27 g en 1000 ml de agua destilada. Calentar hasta disolver los componentes completamente. Esterilizar a 15 libras de presión (121°C) por 15 minutos.

Composición del medio **Plate count Agar** (PCA) Merck

Ingredientes	g/L
Triptona	5.000
Extracto levadura	2.500
Dextrosa (Glucosa)	1.000
Agar	15.000

pH final(25°C) 7.0±0.2 Suspender 23.5 g en 1000 ml de agua destilada. Calentar hasta disolver los componentes completamente. Esterilizar a 15 libras de presión (121°C) por 15 minutos.

Composición del medio **Agar nutritivo (AN)** Himedia

Ingredientes	g/L
Peptona	5.000
Cloruro de sodio	5.000
Peptona B	1.500
Extracto de levadura	1.500
Agar	15.00

pH final(25°C) 7.4±0.2 Suspender 28.0 g en 1000 ml de agua destilada. Calentar hasta disolver los componentes completamente. Esterilizar a 15 libras de presión (121°C) por 15 minutos.

Composición del medio **Agar papa Dextrosa (PDA)** Merck

Ingredientes	g/L
Dextrosa	20.000
Extracto de papa	4.000
Agar	15.00

pH final(25°C) 5.4- 5.8±0.2 Suspender 39.0 g en 1000 ml de agua destilada. Calentar hasta disolver los componentes completamente. Esterilizar a 15 libras de presión (121°C) por 15 minutos.

Composición del **medio NFB** (Dobereiner y Day, 1976).

Ingredientes	g/L
Sacarosa	5.000
KH_2PO_4	0.200
K_2HPO_4	0.800
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.500
CaSO_4	0.100
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.200
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.040
Azul de bromotimol al 0,5% en KOH al 0,2N	0.200
Agar	18.00

pH final(25°C) 7.6 ± 0.2 . Calentar hasta disolver los componentes completamente. Esterilizar a 15 libras de presión (121°C) por 15 minutos.

Composición del medio SRSM.

Ingredientes	g/L
Dextrosa	10.000
CaHPO_4	5.000
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.500
KCl	0.200
MgSO_2	0.200
FeSO_2	0.004
Extracto de levadura	0.500
Purpura de bromocresol	0.100
Agar	18.00

pH final(25°C) 7.2 ± 0.2 . Calentar hasta disolver los componentes completamente. Esterilizar a 15 libras de presión (121°C) por 15 minutos.