

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO

ESCUELA DE POSTGRADO



**IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL POTENCIAL
ANTIFÚNGICO DE CEPA DE *Streptomyces spp.* AISLADA DE SUELO
DESÉRTICO CONTRA *Colletotrichum spp.***

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS AGRARIAS,
MENCION PROTECCIÓN DE CULTIVOS.**

AUTOR:

Leiva Piedra Jorge Luis.

ASESOR:

Gonzales Cabeza José.

F-Sust: 18 de enero 2019.

**Trujillo – Perú
2019**

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO

ESCUELA DE POSTGRADO



**IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL POTENCIAL
ANTIFÚNGICO DE CEPA DE *Streptomyces spp.* AISLADA DE SUELO
DESÉRTICO CONTRA *Colletotrichum spp.***

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS AGRARIAS,
MENCIÓN EN PROTECCIÓN DE CULTIVOS**

AUTOR:

Leiva Piedra, Jorge Luis.

ASESOR:

Gonzales Cabeza, José.

F-Sust: 18 de enero 2019.

**Trujillo – Perú
2019**

DEDICATORIA

La presente investigación, está dedicada a mis padres CARLOS Y CARLOTA que con todo su esfuerzo y apoyo me han ayudado para el logro de mis objetivos y metas profesionales, así mismo a mi querida esposa ROSA ALICIA, que con toda su comprensión y cariño brindado me ayudo y apoyo para cumplir esta importante etapa de mi vida profesional.

AGRADECIMIENTO

Agradezco ante todo a Dios y a mi madre la Virgen, por darme la fuerza y sabiduría para poder culminar con éxito mi maestría y la presente investigación con la más grande satisfacción.

Agradezco a mis padres Carlota Piedra Rojas y Carlos Orlando Leiva Oliva, por su apoyo, palabras de aliento y empuje para seguir cosechando éxitos en mi vida profesional.

Agradezco a mi querida esposa Rosa Alicia Valeriano Calixto por su apoyo incondicional, su comprensión y cariño; que hizo sea mi empuje para culminar mi maestría y tesis; y a mi adorada hija Alicia Luana Leiva Valeriano por ser el motivo más grande y bonito que tengo ahora para seguir adelante.

Agradezco al Dr. José Guillermo González Cabezas, por su apoyo y respaldo en el desarrollo y éxito de mi trabajo de Tesis.

Agradezco al Dr. Juan Carlos Cabrera La Rosa, por su apoyo y respaldo durante el desarrollo y éxito de mi maestría.

Agradezco al Programa Nacional de Innovación Agraria (PNIA) quien a través del Banco Interamericano de Desarrollo (BID), me permitieron postular y obtener la beca

para poder llevar y desarrollar con éxito mi maestría y el desarrollo de mi trabajo de investigación.

RESUMEN

Las *Streptomyces* spp, tienen potencial para inhibir la incidencia de fitopatógenos fúngicos en los cultivos debido a su actividad enzimática y la producción de metabolitos secundarios. La presente investigación buscó identificar y evaluar *in vitro* el potencial antifúngico de 5 cepas de *Streptomyces* spp. aislada de suelo desértico contra *Colletotrichum* spp. Las cepas aisladas son *Streptomyces* spp, para determinar sus % de inhibición, se usaron las pruebas de enfrentamiento dual y difusión en pozos, se aplicó un DCA con 3 repeticiones. Las capacidades inhibitorias de las 5 cepas frente a *Colletotrichum* spp variaron considerablemente; las cepas Q – 84 y Q – 60 mostraron los % de inhibición más alto en el enfrentamiento dual con 92% y 88% respectivamente y en la prueba de difusión en pozo el C.B.C que mostró el % de inhibición más alto fue la de la cepa Q – 84 con 56%, en comparación con los fungicidas (AmistarTop® y Opera®) con % de inhibición de 84% y 100% respectivamente; mostrando además presencia de lipasas, celulasas y proteasas; genéticamente, resultó tener similitud a *S. maritimus* y *S. rochei*. En conclusión, la cepa Q – 84 mostró tener un potencial para convertirse en una alternativa en el control sobre *Colletotrichum* spp.

Palabras Clave: *Streptomyces* spp, inhibición, *Colletotrichum* spp.

ABSTRACT

Streptomyces spp, have potential to inhibit the incidence of fungal phytopathogenic in crops due to their enzymatic activity and the production of secondary metabolites. This research sought to identify and evaluate *in vitro* the antifungal potential of 5 strains of *Streptomyces* spp. Isolated from desert soil against *Colletotrichum* spp. Isolates are *Streptomyces* spp, to determine their % inhibition, dual confrontation and well diffusion tests were used, a DCA was applied with 3 replicates. The inhibitory capacities of the 5 strains compared to *Colletotrichum* spp varied considerably; Strains Q – 84 and Q – 60 showed the highest % inhibition in dual confrontation with 92% and 88% respectively and in the test of diffusion in well the C.B. C which showed the% of inhibition higher was that of the strain Q-84 with 56%, compared to fungicides (AmistarTop® and Opera®) with % inhibition of 84% and 100% respectively, showing also the presence of lipases, cellulases and proteases; genetically, it turned out to have similarity to *S. maritimus* and *S. rochei*. In conclusion, the Q – 84 strain showed a potential to become an alternative to control over *Colletotrichum* spp.

Key Words: *Streptomyces* spp, inhibición, *Colletotrichum* spp.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
I. INTRODUCCIÓN	17
II. MARCO TEÓRICO	20
2. 1 El género <i>Colletotrichum</i> spp.	20
2. 2 Los Actinomicetos	21
2. 3 El género <i>Streptomyces</i>	22
2. 4 Potenciales usos de las bacterias del género <i>Streptomyces</i> spp	22
2. 5 Uso de compuestos bioactivos de <i>Streptomyces</i> spp. para el control de plagas.	24
2. 6 Química de los compuestos bioactivos de bacterias del género <i>Streptomyces</i> spp y sus potenciales usos en el control de plagas agrícolas.	25
III. MATERIALES Y MÉTODOS	32
3.1 Material	32
3.1.1 Población	32
3.1.2 Muestra	32
3.1.3 Unidad de Análisis	32
3.2 Método	33
3.2.1 Tipo de estudio	33
3.2.2 Diseño de investigación	33

3.2.3	Variables y operacionalización de variables	33
3.2.4	Procedimiento y técnicas	34
	A. Aislamiento de las bacterias del género <i>Streptomyces</i> spp	34
	B. Aislamiento del hongo fitopatógeno <i>Colletotrichum</i> spp	34
	C. Enfrentamiento dual entre cepas del género <i>Streptomyces</i> spp y el hongo fitopatógeno <i>Colletotrichum</i> spp, para selección de la cepa bacteriana con potencial antifúngico	35
	D. Caracterización morfológica de las 5 cepas bacteriana del género <i>Streptomyces</i> spp aisladas.	37
	a) Caracterización macroscópica	37
	b) Caracterización microscópica	37
	E. Caracterización genética de la cepa de <i>Streptomyces</i> spp mediante ampliación de 16S ARNr por PCR.	41
	a) Extracción de ADN	41
	b) Obtención y secuenciamiento de amplicones del gen 16S ARNr de la cepa Q-84	42
	F. Pruebas químicas para determinar su actividad enzimática	43
	a) Producción de Quitinasas.	43
	- Preparación de quitina coloidal.	43
	- Evaluación cualitativa de la actividad quitinasa	44

b) Prueba para proteasa	44
c) Prueba para lipasas.	45
d) Prueba para celulasa.	45
G. Producción de extracto crudo	46
H. Extracción de metabolitos secundarios	46
I. Prueba <i>in vitro</i> del extracto crudo vs 2 fungicidas de síntesis química comercial frente a <i>Colletotrichum</i> spp	47
3.2.5 Plan de análisis de datos	48
IV. RESULTADOS	49
4.1 Prueba de enfrentamiento dual (<i>Streptomyces</i> spp frente a <i>Colletotrichum</i> spp)	49
4.2 Prueba de extracto crudo de 5 cepas bacterianas del género <i>Streptomyces</i> spp vs. 2 fungicidas comerciales (amistar top y opera) frente a <i>Colletotrichum</i> spp).	51
4.3 Caracterización macroscópica de las 5 cepas bacterianas del género <i>Streptomyces</i> spp.	53
4.4 Caracterización microscópica de las 5 cepas bacterianas del género <i>Streptomyces</i> spp.	57
4.5 Pruebas bioquímicas (lipasa, proteasa, quitinasas y celulasa) de las 5 cepas bacterianas del género <i>Streptomyces</i> spp.	60
4.6 Identificación genética	61
V. DISCUSIÓN	62

5.1	Prueba de enfrentamiento dual frente a <i>Colletotrichum</i> spp.	62
5.2	Prueba de inhibición, compuesto bioactivo crudo vs 2 fungicidas comerciales de síntesis química frente a <i>Colletotrichum</i> spp.	64
5.3	Características microscópicas y macroscópicas de las cepas bacterianas del género <i>Streptomyces</i> spp.	65
5.4	Pruebas enzimáticas (lipasa, proteasa, quitinasas y celulasa) a las 5 cepas bacterianas del género <i>Streptomyces</i> spp.	67
5.5	Identificación genética de la cepa Q – 84	69
VI.	CONCLUSIONES	70
VII.	RECOMENDACIONES	71
VIII.	BIBLIOGRAFIA	72
	ANEXO	77

ÍNDICE DE TABLAS.

	Pág
Tabla 1. Características físico – químicas del suelo de donde se aislaron las cepas bacterianas de <i>Streptomyces</i> spp.	32
Tabla 2. Operacionalización de variables.	33
Tabla 3. Porcentaje de inhibición de las cepas bacterianas frente a <i>Colletotrichum</i> spp, prueba de enfrentamiento dual.	49
Tabla 4. Porcentaje de inhibición de los extractos crudos de las 5 cepas bacterianas vs. dos fungicidas comerciales frente a <i>Colletotrichum</i> spp, por difusión en pozo.	51
Tabla 5. Descripción de las características macroscópicas de las cepas bacterianas del género <i>Streptomyces</i> spp.	54
Tabla 6. Descripción de las características microscópicas de las cepas bacterianas del género <i>Streptomyces</i> spp.	57
Tabla 7. Pruebas enzimáticas de las cepas bacterianas del género <i>Streptomyces</i> spp.	60
Tabla 8. Identificación genética de la cepa bacteriana Q - 84.	61
Tabla 9. Análisis de varianza de enfrentamiento dual entre 5 cepas bacterianas del género <i>Streptomyces</i> spp frente al hongo fitopatógeno <i>Colletotrichum</i> spp.	77
Tabla 10. Prueba de Tukey de enfrentamiento dual entre 5 cepas bacterianas del género <i>Streptomyces</i> spp frente al hongo fitopatógeno <i>Colletotrichum</i> spp.	77

- Tabla 11.** Prueba de TUKEY de enfrentamiento dual entre 5 cepas bacterianas del género *Streptomyces spp* frente al hongo fitopatógeno *Colletotrichum spp*. 79
- Tabla 12.** ANVA de prueba de extracto crudo de 5 cepas bacterianas del género *Streptomyces spp*. y 2 fungicidas comerciales (Amistar top ® y Opera ®) frente a *Colletotrichum spp*). 80
- Tabla 13.** Prueba de Tukey para prueba de extracto crudo de 5 cepas bacterianas del género *Streptomyces spp*. vs 2 fungicidas comerciales (Amistar top ® y Opera ®) frente a *Colletotrichum spp*). 81
- Tabla 14.** Prueba de Tukey para prueba de extracto crudo de 5 cepas bacterianas del género *Streptomyces spp*. vs 2 fungicidas comerciales (Amistar top ® y Opera ®) frente a *Colletotrichum spp*). 83

ÍNDICE DE FIGURAS E ILUSTRACIONES

	Pág
Figura 1. Prueba de enfrentamiento dual para prueba de inhibición.	36
Figura 2. Prueba de enfrentamiento dual y evaluación del porcentaje de inhibición de la <i>Streptomyces</i> spp frente a <i>Colletotrichum</i> spp.	36
Figura 3. Esquema de la preparación de las láminas cubre objetos sobre medios agarizados para la visualización del crecimiento del micelio aéreo y de sustrato de los actinomicetos.	38
Figura 4. Diagramas del crecimiento micelial aéreo y de sustrato de géneros de Actinomicetos. (a) grupos 20 y 22. (b). grupos 26 y 29. (c). grupos 22, 23 y 24; Bergey et al. (2000).	41
Figura 5. Esquema de metodología de difusión por pozos para determinar porcentaje de inhibición de los extractos crudos vs los fungicidas comerciales de síntesis química frente a <i>Colletotrichum</i> spp.	48
Figura 6. Porcentajes de Inhibición de las cepas bacterianas del género <i>Streptomyces</i> spp frente a <i>Colletotrichum</i> spp por enfrentamiento dual.	50
Figura 7. Porcentajes de Inhibición de los extractos crudos de las 5 cepas del género <i>Streptomyces</i> spp vs. 2 fungicidas comerciales, frente a <i>Colletotrichum</i> spp por difusión en pozo.	52
Figura 8. Secuencia genética de la cepa Q - 84: 1472pb.	84
Figura 9. Resultados de alineamiento b102 de la cepa Q – 84.	85
Figura 10. Secuenciamiento genético obtenido de la cepa bacteriana Q – 84.	86

Figura 11. Secuenciamiento genético obtenido de la prueba a cepa bacteriana Q – 84.	87
Figura 12. Aislamiento de las 5 cepas bacterianas del género <i>Streptomyces</i> spp para la realización del estudio.	88
Figura 13. Prueba <i>In vitro</i> enfrentamiento dual cepa bacteriana (Q-45B) del género <i>Streptomyces</i> spp, frente a <i>Colletotrichum</i> spp.	88
Figura 14. Prueba <i>In vitro</i> enfrentamiento dual cepa bacteriana (Q-60) del género <i>Streptomyces</i> spp, frente a <i>Colletotrichum</i> spp.	89
Figura 15. Prueba <i>In vitro</i> enfrentamiento dual cepa bacteriana (Q-84) del género <i>Streptomyces</i> spp, frente a <i>Colletotrichum</i> spp.	89
Figura 16. Prueba <i>In vitro</i> enfrentamiento dual cepa bacteriana (Q-32) del género <i>Streptomyces</i> spp, frente a <i>Colletotrichum</i> spp.	90
Figura 17. Comparación de inhibición <i>In vitro</i> , prueba de enfrentamiento dual entre cepa Q-84 y testigo.	90
Figura 18. Siembra en agar avena + nistatina de las cepas bacterianas del género <i>Streptomyces</i> spp, para su identificación macroscópica y microscópica.	91
Figura 19. Identificación microscópica de las cepas bacterianas del género <i>Streptomyces</i> spp.	91
Figura 20. Prueba <i>In vitro</i> de compuesto bioactivo y fungicida de síntesis química frente a <i>Colletotrichum</i> spp.	92
Figura 21. Extractos crudos obtenidos de las 5 cepas bacterianas del género <i>Streptomyces</i> spp.	92

- Figura 22.** Pruebas enzimáticas (lipasa, proteasa, quitinasa y celulasa) de las 5 cepas bacterianas del género *Streptomyces* spp (Q-84, Q-85, Q-32, Q-60 y Q-45B). 93
- Figura 23.** Prueba enzimática (Lipasa) de las cepas bacterianas del género *Streptomyces* spp. 93
- Figura 24.** Prueba enzimática (Celulasa) de las cepas bacterianas del género *Streptomyces* spp. 94
- Figura 25.** Prueba enzimática (Proteasa) de las cepas bacterianas del género *Streptomyces* spp. 94
- Figura 26.** Prueba enzimática (Quitinasa) de las cepas bacterianas del género *Streptomyces* spp. 95

I. INTRODUCCIÓN

Los hongos fitopatógenos son un serio problema en muchos cultivos de importancia económica, a nivel mundial. Uno de los hongos fitopatógenos que ocasiona graves pérdidas económicas en diversos cultivos de regiones tropicales y subtropicales, es la antracnosis producida por el hongo *Colletotrichum* spp. (Prusky *et al.*, 2000).

Colletotrichum, género que comprende un gran número de especies que se encuentran entre los patógenos fúngicos más prevalentes y causantes de enfermedades económicamente significativas en casi todos los cultivos del mundo, es considerado como el octavo grupo más importante de hongos fitopatógenos, por su importancia científica y económica, y por ser reconocido como uno de los principales fitopatógenos poscosecha a nivel mundial (Dean *et al.*, 2012) (Perfect *et al.* 1999).

Actualmente en el mundo, desde hace mucho tiempo los fungicidas químicos son usados ampliamente en la agricultura en busca de mejorar la productividad de los cultivos y evitar las pérdidas económicas durante los procesos de pre y post cosecha, con el fin de combatir las plagas que se encuentran afectándolos. Sin embargo, existen grandes vacíos en cuanto a los efectos negativos que estos causan, ya que su uso excesivo en la agricultura ha llevado al deterioro de la salud humana, la contaminación ambiental y el desarrollo de resistencias, al ser suministrados en concentraciones por debajo o encima de las recomendadas, convirtiéndose el producto final en un producto tóxico para el consumidor final (Ara *et al.*, 2012).

Para el control de *Colletotrichum* sp los fungicidas triazoles han mostrado tener una excelente actividad inhibidora, *in vitro*; sin embargo, el alto riesgo de fitotoxicidad ha limitado su uso (Chen et al., 2014). Además, algunas especies de *Colletotrichum* sp. han demostrado ser resistentes a benomyl y otros fungicidas de bencimidazol (Nar et al., 2002) (Talhinhas et al., 2002). Los síntomas de la enfermedad causados por *Colletotrichum* spp. a menudo son devastadores y conducen a importantes pérdidas poscosecha, en cultivos como papaya, mango y aguacate, pitahaya, entre otras. La naturaleza altamente perecedera de estas frutas resalta la necesidad urgente de desarrollar tecnologías que puedan reducir su deterioro y también extender su vida útil para impartir valor al comprador o consumidor. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar compuestos seguros y efectivos para el manejo exitoso *Colletotrichum* spp. (Gao et al., 2018).

Debido al incremento de los problemas en el control de enfermedades fúngicas, se hace necesario la búsqueda seria para identificar métodos alternativos al de los productos químicos para la protección de cultivos, los cuales sean más amigables con el medio ambiente (Ara et al., 2012). Las investigaciones sobre el control biológico de las enfermedades poscosecha se ha llevado a cabo durante mucho tiempo, con discusiones sobre sus éxitos, y proyección a futuro. Sin embargo ha sido aceptado por la industria hortofrutícola como independiente o combinada con otros tratamientos comerciales, dependiendo de frutas y verduras.(Prusky & Gullino, 2013).

Por otro lado, la creciente necesidad por la búsqueda de sustancias naturales con capacidad antimicrobiana, antifúngica, entre otras; ha hecho que nazca la necesidad de buscar e identificar nuevos compuestos naturales, que reemplacen a los de síntesis química, pues cada vez los mercados son más exigentes en el consumo de productos inocuos, es por ello que el control de las enfermedades de las plantas es una necesidad urgente de una agricultura sostenible.

Los productos naturales han jugado un importante rol en la historia del descubrimiento nuevas sustancias, de hecho, muchos de ellos han expresado actividad biológica y características estructurales únicas (Michael, 2006). Los trabajos de investigación realizados entre 1950 y 2000 descubrieron 10 mil productos naturales derivados de fuentes microbianas, principalmente de especies del género *Streptomyces* -familia Actinomicetaceae (Bérdy, 2005); estos microorganismos son conocidos como importantes productores de metabolitos secundarios bioactivos con gran diversidad estructural, los cuales son ampliamente usados en medicina, veterinaria, agricultura y otras áreas (Strohl, 2004). Por lo tanto, la búsqueda de cepas bioactivas de *Streptomyces* y de sus metabolitos secundarios, es un campo de investigación activo. Los antagonistas microbianos son ampliamente utilizados para el control biológico de enfermedades fúngicas de los cultivos (Ara *et al.*, 2012).

Es por ello que el presente trabajo de investigación, busca identificar y evaluar *in vitro* el potencial antifúngico de una cepa de *Streptomyces* spp. aislada de suelo desértico contra *Colletotrichum* spp.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 El género *Colletotrichum* spp: *Colletotrichum* es un género amplio que comprende una serie de especies importantes que se encuentran entre los patógenos fúngicos más prevalentes y causan enfermedades en casi todos los cultivos que se cultivan en el mundo. Este género está asociado con enfermedades económicamente significativas, y es considerado como el octavo grupo más importante de hongos fitopatógenos en el mundo, con base en la percepción de importancia científica y económica (Dean *et al.*, 2012).

La predominancia de *Colletotrichum* spp y la enfermedad de antracnosis en los productos hortofrutícolas representan una amenaza creciente para la agricultura mundial. Más del 50% de las pérdidas de frutas y verduras frescas son causadas por *Colletotrichum* spp. (Awang *et al.*, 2011).

Los síntomas de la enfermedad causados por *Colletotrichum* spp. a menudo son devastadores y conducen a importantes pérdidas poscosecha, en cultivos como papaya, mango y aguacate, entre otros. Recientemente, también se ha encontrado que afecta a la pitahaya (Siddiqui & Ali, 2014).

En general, los síntomas de la enfermedad causados por *Colletotrichum* spp (antracnosis), se caracterizan por ser lesiones pequeñas, deprimidas y húmedas, son sub-circulares o angulares con márgenes marrón claro translúcidos, y la

producción de enzimas (poligalacturonasa y pectactasa) que degradan las paredes celulares del órgano afectado, causando pérdidas económicas significativas (Rodríguez-López et al., 2009) (Alvarez and Nishijima, 1987). A medida que la infección avanza en estas lesiones circulares hundidas, se desarrollan masas conidiales de color naranja a rosa, presentándose en anillos concéntricos. El tejido interno es firme con una decoloración blanca grisácea, que luego se vuelve marrón (Masyahit et al., 2009).

2.2 Los actinomicetos: Los actinomicetos son un grupo importante de bacterias filamentosas gram positivas que producen un enorme número de metabolitos agro-activos (Tanaka y Omura, 1993), desempeñando un papel importante en la agricultura como agentes de control biológico. Se ha informado sobre el antagonismo contra una amplia variedad de patógenos de plantas (Bressan, 2003; Chamberlain y Crawford, 1999; Doumbou y otros, 2002; Tahvonen y Avikainen, 1987; Yuan y Crawford, 1995).

Aguilar *et al.* (2016) nos mencionan que cuando se aíslan actinomicetos de suelo usando medios de cultivo sólidos, el género predominante suele ser *Streptomyces* sp con el 70 al 90% de las colonias, seguido por *Nocardia* sp con 10 a 30%, y el tercero puede ser *Micromonospora* sp que constituye del 1 al 15% de actinomicetos. Muchas especies de actinomicetos, particularmente las que pertenecen al género *Streptomyces* sp, son comercialmente muy atractivas porque son conocidos como agentes de control biológico de varios hongos fitopatógenos

y porque producen una amplia gama de productos naturales con actividad biológica (Errakhi et al., 2007; Joo, 2005; Xiao et al., 2002).

2.3 El género *Streptomyces* spp: La clasificación de este género se inicia en 1964 con el proyecto internacional de *Streptomyces* (ISP) para introducir un criterio estándar en la determinación de especies de este género. Mediante la utilización de varias características fenotípicas se consiguió reducir la cantidad de especies de *Streptomyces* de 463 a 142 de la versión del Manual de Sistemática Bacteriológica de Bergey (1972 – 1989). Adicionalmente, existían aislamientos que no concordaban con las matrices de identificación. Actualmente, la clasificación de especies de *Streptomyces*, se realiza mediante técnicas de quimio-taxonómicas y moleculares, junto con los métodos de taxonomía numérica basados en criterios fenotípicos (Wellington & Anderson, 2001).

El género *Streptomyces* ha sido descrito como colonizador de la rizosfera, capaz de ejercer biocontrol sobre hongos fitopatógenos, producir sideróforos, sustancias promotoras del crecimiento vegetal *in vitro*, promover la nodulación y ayudar a los bacteriodes de *Rhizobium* sp a la asimilación del hierro en la fijación de nitrógeno en leguminosas, lo cual contribuye indirectamente a la promoción de crecimiento vegetal (Tokala *et al.*, 2002).

2.4 Potenciales usos de las bacterias del género *Streptomyces* sp: Así mismo Aguilar *et al.* (2016) nos mencionan que las expectativas sobre la aplicación

biotecnológica de los actinomicetos son muy grande debido al desarrollo de antibióticos y la potencialidad de los actinomicetos en la biorremediación, debido a que son candidatos para continuar proporcionando productos naturales novedosos sobre todo si se encuentran nuevas cepas de *Streptomyces* sp y otros géneros de actinomicetos que provengan de ambientes no explorados, que den como resultado especies capaces de sintetizar nuevos antibióticos. Igualmente, en la agricultura, los actinomicetos pueden ser usados en la protección de los cultivos contra enfermedades. Por ello, se requiere de formulaciones a base de microorganismos que puedan ser inoculadas en el suelo con la finalidad de controlar plagas y que además contribuyan a mejorar el rendimiento de los cultivos, lo que contribuiría también a disminuir el consumo de productos químicos.

Por otro lado, Saxena (2014) nos dice que, entre los microbios del suelo, los actinomicetos ocupan una posición importante, ya que producen un amplio espectro de sustancias biológicamente activas ya comercializadas como productos farmacéuticos y agroquímicos. Hoy en día los actinomicetos, principalmente el grupo Streptomycetes, proporcionan agentes bioactivos utilizados como herbicidas, fungicidas, bactericidas, insecticidas y acaricidas.

(Chatzipavlidis *et al.*, 2013), nos mencionan que ciertas cepas *Streptomyces* spp previene el desarrollo de enfermedades de las plantas mediante la competencia

de patógenos en la rizosfera, produciendo compuestos antifúngicos y promoviendo el crecimiento de las plantas y raíces.

Todas las propiedades exhibidas por los actinomicetos, especialmente aquellos que pertenecen al género *Streptomyces* sp, como agentes de control biológico de hongos fitopatógenos, no solo nos dan una mejor comprensión de sus beneficios ambientales y ecológicos, sino también en su impacto como una alternativa atractiva para su uso en la agricultura (Ara *et al.*, 2012).

2.5 Uso de compuestos bioactivos de *Streptomyces* sp para el control de plagas:

Aguilar *et al.*, (2016) nos mencionan que diversas especies de actinomicetos muestran actividad como promotores de crecimiento vegetal, lo que los hace candidatos para la elaboración de biofertilizantes y que, además, protegen a las plantas contra enfermedades. Algunos representantes del grupo también pueden hacer frente a insectos plaga que afectan a las plantas, siendo importantes los que presentan elevada actividad quitinolítica.

Los actinomicetos tienen la capacidad de inhibir y reducir la incidencia de patógenos de plantas debido a su actividad enzimática a través de metabolitos secundarios antifúngicos producidos por ellos. Aproximadamente 23.000 metabolitos secundarios microbianos bioactivos han sido reportados, de los cuales más de 10.000 son producidos por actinomicetos, que es casi el 45% de todos los metabolitos microbianos bioactivos. El género *Streptomyces* spp se

sabe que produce cerca de 7.600 compuestos (Berdy, 2005) citado por Sinha *et al.*, (2014).

La actividad antagonista de los actinomicetos frente a hongos fitopatógenos está generalmente relacionada con la producción de compuestos antifúngicos (Getha y Vikineswary, 2002; Ouhdouch *et al.*, 2001; Trejo-Estrada y otros, 1998) y las enzimas hidrolíticas extracelulares (Mukherjee y Sen, 2006); Prapagdee, 2008; Valois *et al.*, 1996). Se considera que la quitinasa y la β -1,3-glucanasa son enzimas hidrolíticas importantes en la lisis de las paredes de las células fúngicas, por ejemplo, las paredes celulares de *F. oxysporum*, *Sclerotinia minor* y *Sclerotium rolfsii* (El-Katatny *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 1999).

2.6 Química de los compuestos bioactivos de bacterias del género *Streptomyces* sp y sus potenciales usos en el control de plagas agrícolas:

En cuanto a las fuentes de productos naturales que se han considerado, están las plantas, microorganismos (hongos, bacterias y actinomicetos), organismos marinos (algas, hongos acuáticos, esponjas) y sustancias defensivas provenientes de insectos y otros artrópodos.

Los trabajos de investigación realizados entre 1950 y 2000 permitieron el descubrimiento de 10 mil productos naturales derivados de fuentes microbianas.

Los antibióticos descubiertos en este lapso se aislaron principalmente de especies

del género *Streptomyces* -familia Actinomycetaceae (Bérdy, 2005) citado por Moreno *et al.*, (2012); estos microorganismos son conocidos como importantes productores de metabolitos secundarios bioactivos con gran diversidad estructural, los cuales son ampliamente usados en medicina, veterinaria, agricultura y otras áreas (Strohl, 2004) citado por Moreno *et al.*, (2012). Por lo tanto, la búsqueda de cepas bioactivas de *Streptomyces* sp. y de sus metabolitos secundarios, es un campo de investigación activo Moreno *et al.*, (2012).

Como los actinomicetos son el grupo principal de bacterias que habitan todos los tipos de suelos, y se conoce que han desarrollado mecanismos inherentes para luchar contra las condiciones de estrés mediante la producción de los metabolitos secundarios que podrían ser explotados como agroquímicos, es que se han identificado metabolitos con características químicas con potencial en la agricultura. Los actinomicetos son también prolíficos productores de agentes insecticidas. La tasa de éxito de los metabolitos secundarios de los actinomicetos es mucho mejor y/o similar a los agroquímicos convencionales. La ventaja de estos compuestos sobre los productos químicos es la acción selectiva y el efecto residual mínimo (Saxena, 2014).

Muchos metabolitos aislados de *Streptomyces* spp. presentan el grupo amida en su estructura. Por ejemplo, las acetamidas participan en los procesos biosintéticos de otras sustancias, como ocurre en *S. violaceus* que, a través de la Indolacetamida, sintetiza auxinas en la superficie de plantas a las cuales se

encuentra asociado simbióticamente (Manulis *et al.*, 1994) citado por Moreno *et al.*, (2012).

Los actinomicetos tienen la capacidad de inhibir y reducir la incidencia de patógenos de plantas debido a su actividad enzimática a través de metabolitos secundarios antifúngicos producidos por ellos. Aproximadamente 23.000 metabolitos secundarios microbianos bioactivos han sido reportados, de los cuales más de 10.000 son producidos por actinomicetos, que es casi el 45% de todos los metabolitos microbianos bioactivos. El género *Streptomyces* spp. se sabe que produce cerca de 7.600 compuestos (Berdy, 2005) citado por Sinha *et al.*, (2014).

El uso de compuestos bioactivos obtenidos a partir de bacterias del género *Streptomyces* spp., y su uso en el control de agentes fitopatógenos, cada vez van tomando mayor importancia. Aguilar *et al.*, (2016) mencionan que la expectativa sobre la aplicación biotecnológica de los actinomicetos es muy grande debido al desarrollo de antibióticos y su potencialidad en la biorremediación, convirtiéndolos en candidatos para continuar proporcionando productos naturales novedosos, sobre todo las nuevas cepas de *Streptomyces* spp. que provengan de ambientes no explorados y aporten como resultado especies capaces de sintetizar nuevos antibióticos. Así mismo (Strohl, 2004), nos dice que estos microorganismos son conocidos como productores de metabolitos secundarios bioactivos con gran diversidad estructural, los cuales vienen siendo

usados en medicina, veterinaria, agricultura y otras áreas. Por lo tanto (Moreno *et al.*, 2012), nos dice que la búsqueda de cepas bioactivas de *Streptomyces* spp. y de sus metabolitos secundarios, es un campo de investigación activo.

El uso de compuestos bioactivos para el control de plagas ha ido creciendo con el tiempo. Tal es así que (Aguilar *et al.*, 2016) y (Chatzipavlidis *et al.*, 2013) mencionan que diversas especies de actinomicetos han mostrado potencial como promotores de crecimiento vegetal y agentes de control de plagas en muchos cultivos, siendo importantes los que presentan actividad quitinolítica. Asimismo, Saxena (2014) argumenta que las *Streptomyces* spp. producen un amplio espectro de sustancias biológicamente activas que vienen siendo usadas como herbicidas, fungicidas, bactericidas, insecticidas y acaricidas.

Por otra parte, Ara *et al.*, (2012) mencionan que estas propiedades exhibidas, como agentes de control biológico, aportan una mejor comprensión de sus beneficios ambientales y ecológicos, convirtiéndolos en una alternativa atractiva para su uso en la agricultura. Del mismo modo, Berdy (2005) citado por (Sinha *et al.*, 2014) nos dicen que los actinomicetos tienen la capacidad de inhibir y reducir la incidencia de patógenos de plantas debido a su actividad enzimática a través de metabolitos secundarios antifúngicos producidos por ellos. Casi el 45% de todos los metabolitos microbianos bioactivos son producidos por actinomicetos, ya que se sabe que 10.000 de los 23.000 metabolitos secundarios

microbianos bioactivos reportados, son producidos por el género *Streptomyces* spp.

La actividad antagonista de los actinomicetos frente a hongos fitopatógenos está generalmente relacionada con la producción de compuestos antifúngicos (Getha y Vikineswary, 2002; Ouhdouch *et al.*, 2001), y las enzimas hidrolíticas extracelulares. Se considera que la quitinasa y la -1,3-glucanasa son enzimas hidrolíticas importantes en la lisis de las paredes de las células fúngicas (Mukherjee y Sen, 2006; Prapagdee, 2008).

Estudios como el realizado por (Marathe *et al.*, 2016), en India, en donde purificaron y caracterizaron un nuevo heterodímero de *Streptomyces* spp. VL J2 inhibidor de proteasa con potencial actividad biopesticida contra *H. armígera*, bajo condiciones de laboratorio, logrando determinar la concentración que inhibía el crecimiento larval de *H. armígera* en un 20% (EC20), el cual estaba en una concentración de 120 – 150 ppm y un control de 50% (EC50) entre 300 - 360 ppm en relación con los controles. La alimentación con el compuesto inhibidor purificado mostró una disminución significativa y retraso en larvas (51%), pesos y períodos de pupa, respectivamente, anormalidades físicas prominentes e índices nutricionales reducidos en función del tratamiento en comparación con la dieta control (sin inhibidor), lo que indica su potencial actividad pesticida.

Otro estudio en India realizado por (Kaur *et al.*, 2016), donde evaluaron el potencial nematocida de *Streptomyces hydrogenans* cepa DH16 “*in vivo*” e “*in*

vitro” sobre *Meloidogyne incognita*, usando un compuesto antifúngico purificado en concentraciones (12,5, 25, 50, 100 y 200 µg/ml), sobre masas de huevos y suspensión de juvenil (200 J2s / 50l), para 1 ml de solución de muestra en placa petri de 30 mm. La mortalidad de los juveniles aumentó al incrementar la concentración y el tiempo de exposición, siendo el máximo control de 95%, después de 96 horas a una concentración de 100 µg / ml. Asimismo, sobre los huevos de nematodos, después de 160 h de incubación se observó una reducción en la eclosión en un 16% a una concentración de 100 µg/ml en comparación con el control donde se logró el 100% de eclosión. Por otra parte, a una concentración más alta del compuesto (200 µg / ml), se observó una mortalidad del 100% de J2 y 0% de eclosión del huevo después de 72 y 160 h de incubación.

Además, se han explorado cepas de actinomicetos nativos y se evaluaron su potencial contra patógenos fúngicos en plantas, trabajo en el cual se aisló una cepa nativa potencial de *Streptomyces plicatus* del suelo aplicado con compost de estiércol de caballo. Los estudios de su actividad enzimática realizados demostraron su actividad de quitinasa, celulasa, gelatinasa y lipasa. En este estudio se mezcló un gramo de cada muestra con 10 ml de agua destilada estéril y se agitaron adecuadamente, y se diluyeron en serie hasta una concentración de 10^{-6} . Los resultados obtenidos arrojaron que el extracto de metabolito de *Streptomyces plicatus* podría inhibir *Phytophthora infestans* y *Sclerotium rolfsii* en un 80% y 100% usando una concentración de 2000 y 5000 ppm (Sinha *et al.*, 2014).

En la Universidad de Malaya (Getha y Vikineswary, 2002), se realizó un estudio de la cepa G10 de *Streptomyces violaceusniger* como agente antifúngico frente a *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense, en un intento por comprender su modo de acción y la interacción entre ellos. Para esto se estudió primero su comportamiento mediante la técnica de enfrentamiento dual “in vitro” demostrando la cepa G10 zonas de inhibición en las placas de ensayo, observándose microscópicamente lisis en los extremos de las hifas en las colonias fúngicas inhibidas. Para la extracción de los metabolitos secundarios producidos por la cepa G10 se usaron medios líquidos, que también mostraron efectos antagonistas “in vitro”, observándose hinchazón, distorsión y excesiva ramificación de hifas, e inhibición de la germinación de esporas. Este estudio sugiere el potencial de la cepa G10 para el control biológico hongos fitopatógenos en el cultivo de banano.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material:

Las bacterias del género *Streptomyces* spp, se aislaron de un suelo de desierto del distrito de Reque - Chiclayo, el cual tiene las siguientes características:

Tabla1. Características físico – químicas del suelo de donde se aislaron las cepas bacterianas de *Streptomyces* spp.

Muestra	Extracto Saturado		M.O (%)	P (ppm)	K (ppm)	CaCO ₃ (%)	Textura (%)			Tipo de suelo
	Conduct. Eléctrica (mhos/cm)	pH					Ao	Lo	Ar	
M-1	24.9	7.5	0.7	6.8	287	0.6	70	13	17	Fo Ao

Fuente: Propia.

3.2.1 Población: La población el cepario de bacterias del género *Streptomyces* spp del laboratorio de Agrobiotecnología de la Universidad Señor de Sipán.

3.2.2 Muestra: 6 cepas bacterianas del género *Streptomyces* spp del laboratorio de Agrobiotecnología de la Universidad Señor de Sipán.

3.2.3 Unidad de análisis: Cepa bacteriana del género *Streptomyces* spp.

3.2 Método:

3.2.1 Tipo de estudio: Descriptivo – Experimental.

3.2.2 Diseño de investigación: Para las pruebas inhibición por enfrentamiento dual y difusión en pozo se usará un Diseño de Bloques Completamente al azar (D.B.C.A).

3.2.3 Variables y operacionalización de variables

Tabla 2. Operacionalización de variables

Tipo de variable	Variable	Indicadores	Instrumento
Dependiente	Porcentaje de inhibición	Porcentaje del radio de Inhibición	Pie de rey
Independiente	Hongo Fitopatógeno <i>Colletotrichum</i> spp	Características morfológicas (Microscópicas y macroscópicas)	Microscópio
	Cepas de <i>Streptomyces</i> spp.	Características morfológicas (Microscópicas y macroscópicas) y secuenciamiento genético	Microscópio y PCR

Fuente: Propia.

3.2.4 Procedimientos y técnicas

Los procedimientos y técnicas realizadas para cada ensayo fueron:

A. Aislamiento de las bacterias del género *Streptomyces* sp:

Los microorganismos antagónicos del género *Streptomyces* sp fueron aislados del cepario del laboratorio de Agrobiotecnología del Parque Científico Tecnológico de la Universidad Señor de Sipán. Las colonias de *Streptomyces* sp se cultivaron en agar de extracto de malta de extracto de levadura de glucosa (GYMA), y se incubaron a 28 ± 2 °C.

B. Aislamiento del hongo fitopatógeno *Colletotrichum* spp:

El aislado del hongo patógeno *Colletotrichum* spp se obtuvo mediante el método de aislamiento de esporas de frutos infestados, para esto los frutos fueron puestos en cámara húmeda, a los 5 días con la ayuda de un bisturí se hicieron cortes, en el área con presencia del hongo patógeno y fueron puestas sobre una solución de agua e hipoclorito de sodio al 1%, luego fueron lavadas tres veces con agua destilada estéril, y fueron sembradas en PDA a 25°C por 7 días (Agrios, 2012).

C. Enfrentamiento dual entre cepas del género *Streptomyces* sp y el hongo fitopatógeno *Colletotrichum* spp, para selección de la cepa bactriana con potencial antifúngico:

De los cuatro aislamientos de microorganismos del género *Streptomyces* sp (Q-84, Q-60, Q-56 y Q-32) uno fue seleccionado por su elevada capacidad para inhibir el crecimiento micelial de *Colletotrichum* spp *in vitro* mediante la técnica de enfrentamiento dual. Para esto, las esporas se alinearán en una línea en un lado de las placas con PDA y se incubaron a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$., después de 7 días de incubación, se cortó un tapón micelial de 5 mm de diámetro de una colonia de *Colletotrichum* spp de 5 días de edad y se transfirió al otro lado de cada una de las placas con PDA, a 5 cm de cada una de las colonias de *Streptomyces* sp. Se colocó el complemento micelial de *Colletotrichum* spp en una placa de PDA no inoculada la cual sirvió de control. Las placas de doble cultivo se incubarán a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 5 días.

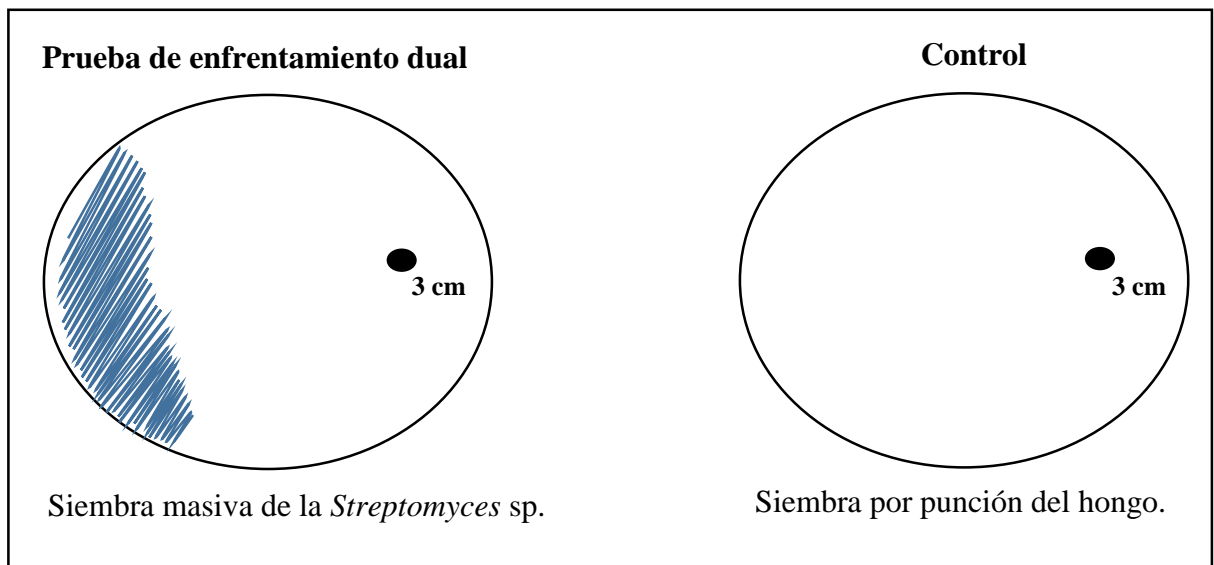


Figura 1. Prueba de enfrentamiento dual para prueba de inhibición.

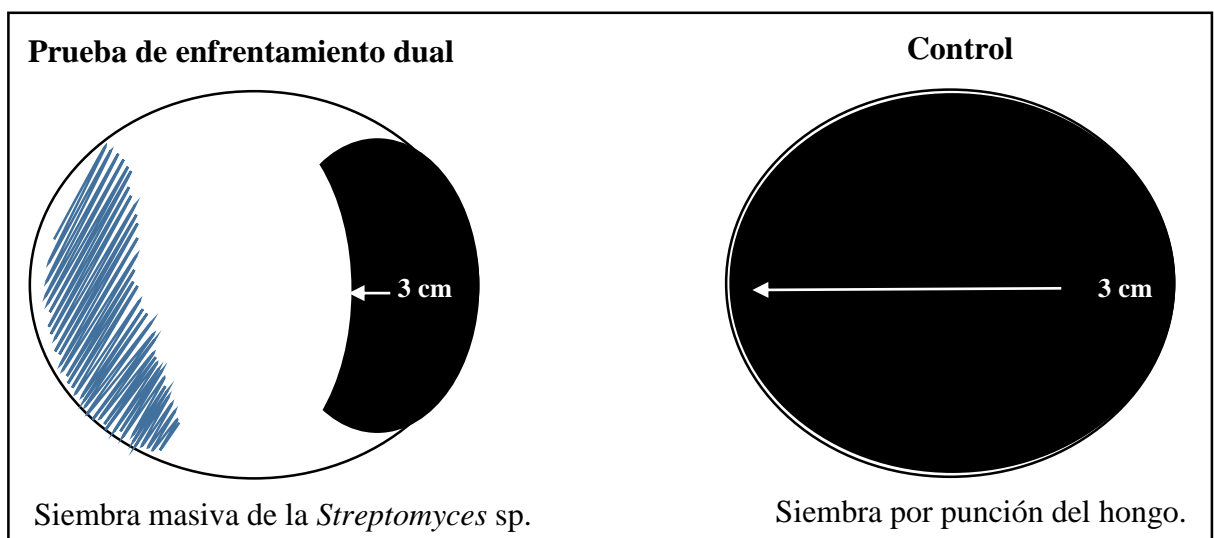


Figura 2. Prueba de enfrentamiento dual y evaluación del porcentaje de inhibición de la *Streptomyces* spp, frente a *Colletotrichum* spp.

El porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PIRG) se calculó usando la fórmula:

$$IR (\%) = (Dc - Dt / Dc) \times 100$$

Donde:

IR= rango de inhibición (%);

Dc= diámetro de control negativo (mm) y

Dt= diámetro de tratamiento o control positivo.

(Ahmed *et al.*, 2007).

D. Caracterización morfológica de las 5 cepas bacteria del género *Streptomyces* spp, aisladas:

Los caracteres morfológicos principales tomados en consideración fueron, el modo de septación de los filamentos, la presencia y la disposición del micelio inmerso en el sustrato o del micelio aéreo, para realizar esta caracterización morfológica, se siguieron los siguientes protocolos:

a) Caracterización macroscópica: Se observaron las características a nivel macroscópico de cada una de las cepas crecidas en agar avena durante 8 días. Para dicha caracterización, se tuvo en cuenta la textura de la colonia, color del anverso y producción de pigmentos difusibles al medio (Bergey *et al.*, 2000).

b) Caracterización microscópica: Las diferentes cepas de actinomicetos aislados se sembraron en forma masiva en agar

avena suplementado con nistatina al 0.1% al mismo tiempo se introdujeron en el medio laminillas (cubre-objetos) estériles con una inclinación de 45° aproximadamente con respecto a la superficie del agar. Las placas se incubaron a 22°C durante 15 días, al cabo de los cuales se tomaron las laminillas y se colocaron sobre una lámina portaobjetos con cristal violeta para la observación al microscopio del micelio aéreo, micelio de sustrato y los propágulos formados (Bergey *et al.*, 2000).

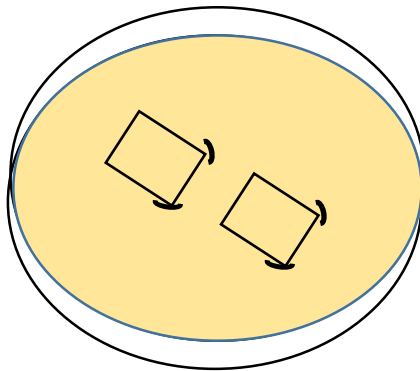


Figura 3. Esquema de la preparación de las láminas cubre objetos sobre medios agarizados para la visualización del crecimiento del micelio aéreo y de sustrato de los actinomicetos (Nguyễn *et al.*, 2006).

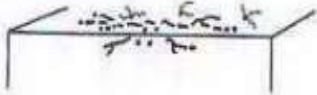
El Manual de Determinación Bacteriológica de (Bergey *et al.*, 2000) agrupa a los actinomicetos según su crecimiento en 8 grupos como se muestran en la Figura 4.

Group 20



Actinomyces
Rothia
Agromyces

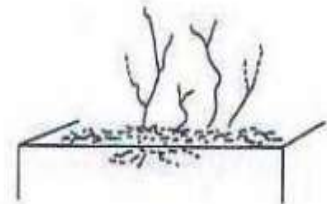
Group 22



Jonesia



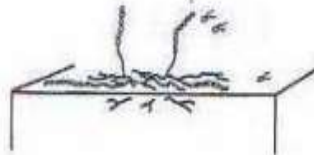
Gordona
Rhodococcus
Tsukamurella



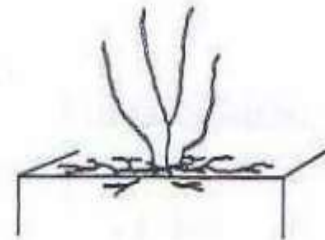
Nocardia



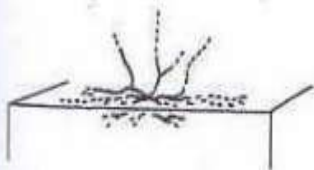
Actinobispora



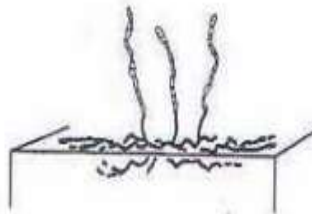
Actinokineospora



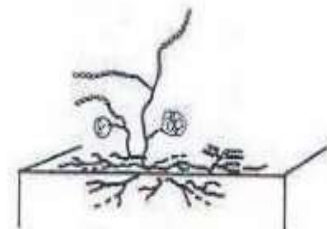
Actinopolyspora



Amycolata
Amycolatopsis
Pseudomycolata



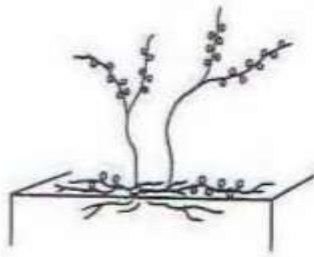
Pseudonocardia



Kibdelosporangium

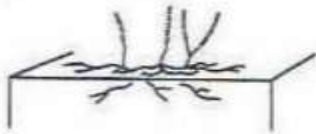
(a)

Group 28

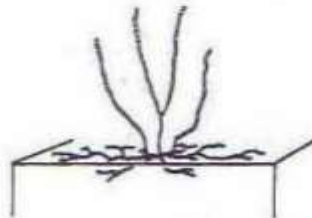


Thermoactinomyces

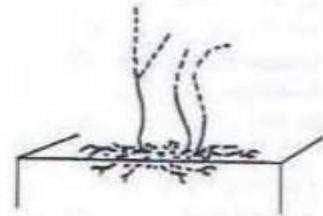
Group 29



Glycomyces

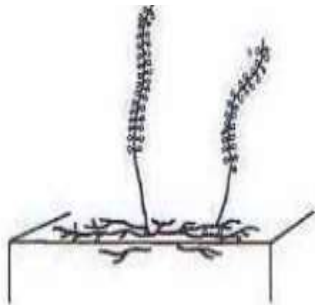


Kitasatospora

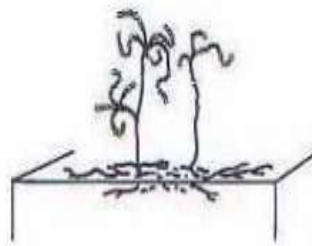


Saccharothrix

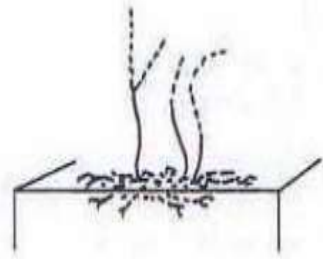
(b)



Saccharomonospora



Saccharopolyspora



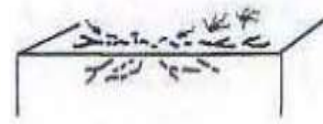
Nocardioides



Terrabacter



Promicromonospora



Oerskovia

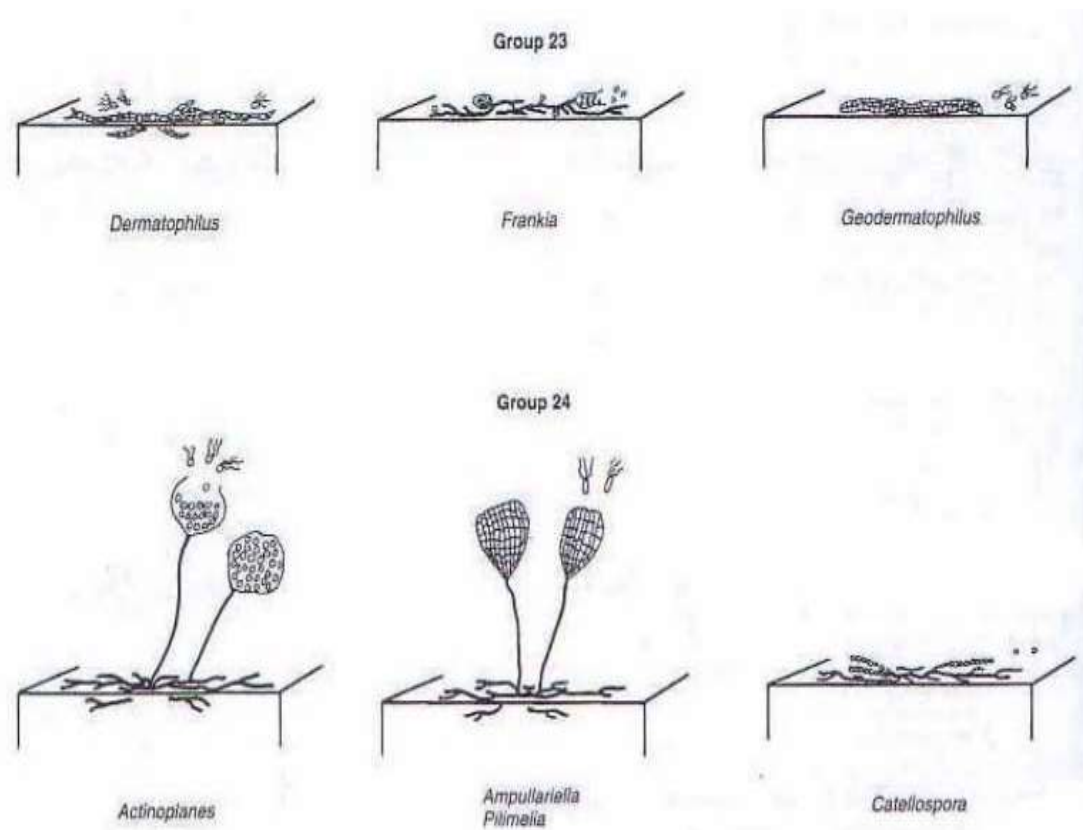


Figura 4. Diagramas del crecimiento micelial aéreo y de sustrato de géneros de Actinomicetos. (a) grupos 20 y 22. (b). grupos 26 y 29. (c). grupos 22, 23 y 24; Bergey *et al.*, (2000).

E. Caracterización genética de la cepa de *Streptomyces* spp mediante ampliación de 16S ARNr por PCR:

- a) **Extracción de ADN:** Se extrajo el ADN de la bacteria purificada de la cepa Q-84, siguiendo el método de extracción C.T.A.B descrito por (William y Feil, 2012). La concentración del ADN obtenido fue determinada por lectura de absorbancia

a 260 nm y la pureza evaluada utilizando los ratios A260/280 por espectrofotometría (Eppendorf biophotometer model AG) utilizando únicamente muestras de ADN que presentaban un ratio de 1.8-2.

b) **Obtención y secuenciamiento de amplicones del gen 16S**

ARNr de la cepa Q-84: La región 16S ARNr fue amplificada mediante PCR utilizándose los iniciadores universales 27F (5'-AGAGTTTAGTCMTGGCTCAG-3) - 1492R (GGYTACCTTGTTACGACTT) que generan un producto de alrededor de 1500 pb.

El mix de PCR de un volumen final de 25 µl, consistió en 2,5 µl buffer 10X, 2,5 µl de MgCl₂ a 25 mM, 0,6 µl dNTPs a 10 mM y 2 U de Taq DNA polymerase de alta fidelidad (Platinum) Thermo scientific®. Las condiciones de la PCR fueron una desnaturalización inicial de 95 °C por 5 min, seguidos por 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, hibridación a 55 °C por 45 s, elongación a 72 °C por 1 min y una elongación final a 72 °C por 10 min.

Los productos de PCR se visualizaron en un gel de electroforesis a una concentración de 1,5 % de agarosa y 0,2

µg/ml de bromuro de etidio. Los amplicones con tamaño esperado fueron secuenciados en MACROGEN USA usándose los iniciadores internos 518F (CCAGCAGCCGCGGTAATACG) - 800R (TACCAGGGTATCTAATCC).

Las secuencias forward y reverse fueron reconstruidas mediante la herramienta CAP contig assembly program de BIOEDIT 7.1.9 y alineadas en BLAST para su identificación (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

F. Pruebas químicas para determinar su actividad enzimática:

Para las pruebas enzimáticas, se siguieron los siguientes protocolos:

a) Producción de quitinasas:

- **Preparación de quitina coloidal:** Se preparó quitina coloidal a partir de quitina (Merck- Aldrich). Se usó el método modificado de Hsu y Lockwood (1975) usado por Rocio *et al* (2011); para esto se disolvió 10 gr de quitina en 100 ml de HCL concentrado y se puso en agitación constante durante 50 min, posteriormente se añadieron 0.5 lt de agua destilada fría, y la muestra fue dejada por 12 horas

en constante agitación. Después se procedió a filtrar al vacío, al precipitado obtenido se le realizaron lavados sucesivos con agua destilada de acuerdo al volumen inicial, con el fin de eliminar el ácido, luego se esterilizó por 15 min a 15 psi, antes de su posterior uso.

- **Evaluación cualitativa de la actividad quitinasa:** Los actinomicetos se sembraron en medio mínimo que se preparó a partir de soluciones “stock” de: (1) K_2HPO_4 y KH_2PO_4 30 g·l⁻¹, (2) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 15 g·l⁻¹, (3) $CaCl_2$, $FeCl_3$ y $NaCl$ a una concentración de 5 g·l⁻¹, 0.6 g·l⁻¹ y 5 g·l⁻¹ (p/v) respectivamente, suplementado con quitina coloidal al 1%. Como control se utilizó el medio mínimo suplementado con glucosa a una concentración de 10 g·l⁻¹, se incubaron a 22°C de 5 a 8 días. Pasado el tiempo de incubación se evaluaron los halos de hidrólisis producidos en el medio sólido, permitiendo una selección primaria de las cepas de actinomicetos, mediante la cuantificación del tamaño del halo.

b) Prueba para proteasas: Las cepas de *Streptomyces* spp, se sembraron en medio mínimo que se preparó a partir de soluciones “stock” con: 1 gr de peptona, 0.5 gr de $NaCl$, 0.5 gr

de extracto de carne, 0.24 gr de gelatina, 1.5 gr de agar y 100 ml de agua destilada; y se incubaron a 22°C de 5 a 8 días. Pasado el tiempo de incubación se evaluaron los halos de hidrólisis producidos en el medio sólido, permitiendo una selección primaria de las cepas de *Streptomyces* spp, mediante la cuantificación del tamaño del halo.

c) Prueba para lipasas: Las cepas de *Streptomyces* spp, se sembraron en medio mínimo que se preparó a partir de soluciones “stock” de: 1 ml de Tween 20, 1 gr de bactopectona, 0.5 gr de NaCl, 0.01 gr de CaCl₂ 2H₂O, 1.5 gr de agar y 100 ml de agua destilada; y se incubaron a 22°C de 5 a 8 días. Pasado el tiempo de incubación se evaluaron los halos de hidrólisis producidos en el medio sólido, permitiendo una selección primaria de las cepas de *Streptomyces* spp, mediante la cuantificación del tamaño del halo.

d) Prueba para celulasa: Las cepas de *Streptomyces* spp, se sembraron en medio mínimo que se preparó a partir de soluciones “stock” de: 1.0 gr de CMC, 1.5 gr de agar y 100 ml de agua destilada; y se incubaron a 22°C de 5 a 8 días. Pasado el tiempo de incubación se evaluaron los halos de hidrólisis producidos en el medio sólido, permitiendo una selección

primaria de las cepas de *Streptomyces* spp, mediante la cuantificación del tamaño del halo.

G. Producción de extracto crudo:

La producción de metabolitos bioactivos, de los actinomicetos seleccionados, se hará usando el medio de cultivo ISP 1 (International Streptomyces Project), modificado, La reactivación de los actinomicetos se realizará a 28 °C durante 3 días en 3 ml de caldo tripticasa soja (TS), posteriormente el contenido se utilizará para inocular sobre el medio líquido ISP 1. Una vez sembrado el inóculo se incubará en constante agitación (150 rpm) durante 7 días. Posteriormente el cultivo se centrifugará a 4.000 rpm durante 20 min, para obtener el sobrenadante libre de células que se conservará a -20 °C hasta su uso.

H. Extracción de metabolitos secundarios:

La extracción de metabolitos secundarios de las cepas bacterianas del género *Streptomyces* spp (Q-84, Q-85, Q-60, Q-45B Y Q-32) se llevaron a cabo según lo descrito por Kaur y Manhas (2014). Para esto, después de la fermentación, el caldo de cultivo fue centrifugado durante 20 min a 4 °C a 6000 rpm. Al sobrenadante

libre de células estériles se le agregó acetato de etilo en una proporción (1:1) y se lo agitó fuertemente por dos horas, transcurrido ese periodo, se tomó la fase del acetato de etilo y se dejó evaporar en el rotavapor a una temperatura de 40°C, obtenido el residuo del rotavapor, se le incorporó metanol al 10%; esta solución fue refrigerada para después ser usada en la determinación de la actividad antifúngica sobre *Colletotrichum* spp.

I. Prueba *in vitro* del compuesto bioactivo vs 2 fungicidas de síntesis química comercial frente a *Colletotrichum* spp:

Para la evaluación y comparación de la actividad antagónica, se preparó medio PDA y se sirvió en placas Petri y se dejó enfriar en la cabina de bioseguridad en un baño de luz UV por un espacio de 15 minutos, una vez solidificado el medio, se usó la técnica de difusión por pozo, para esto, con la ayuda de un sacabocado de 0.2 cm se hicieron 3 pozos en cada placa, en cada uno de estos pozos se le agregó 40 µl del compuesto bioactivo extraído crudo de las 5 cepas seleccionada (Q-84, Q-85, Q-60, Q-45B Y Q-32), para después colocar al medio de la placa, un disco con el hongo fitopatógeno *Colletotrichum* spp, dicho procedimiento se hizo por triplicado, así mismo se usaron dos fungicidas de síntesis química comerciales (Amistar Top y Opera), con la finalidad de evaluar comparativamente

el espectro de acción y grado de competitividad de los compuestos bioactivos crudos de *Streptomyces* spp, frente a fungicidas de síntesis química.

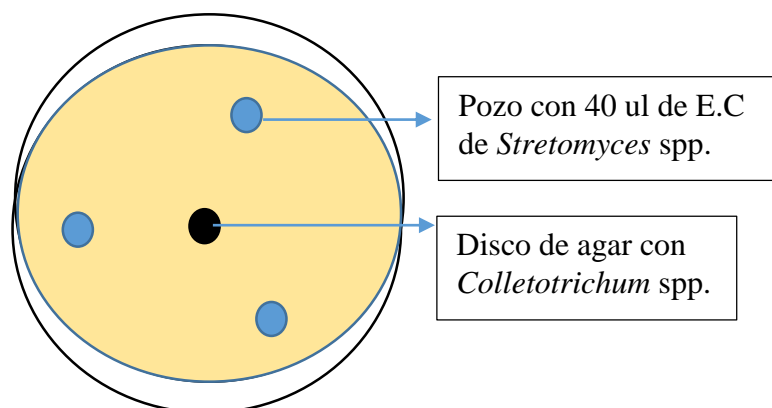


Figura 5. Esquema de metodología de difusión por pozos para determinar porcentaje de inhibición de los extractos crudos vs los fungicidas comerciales de síntesis química frente a *Colletotrichum* spp.

3.2.5 Plan de análisis de datos:

Para el análisis de los datos obtenidos en las pruebas de enfrentamiento dual y difusión por pozo, para determinar los porcentajes de inhibición tanto de las bacterias como de los extractos crudos obtenidos, el diseño estadístico que se usó, fue un diseño completamente al azar (DCA) y según el valor de P valor obtenido en el Análisis de Varianza (ANVA), se realizó la prueba de comparación de medias (TUKEY $p < 0.05$).

IV. RESULTADOS

4.1 Prueba de enfrentamiento dual (*Streptomyces spp* frente a *Colletotrichum spp*)

Las pruebas de enfrentamiento dual se realizaron siguiendo la técnica propuesta por (Franco, 2008) y cuyos resultados se presentan en la tabla 01.

Tabla 3. Porcentaje de inhibición de las cepas bacterianas frente a *Colletotrichum spp*, prueba de enfrentamiento dual.

Ensayo	Rango de inhibición (%) (*)				
	Q-84	Q-60	Q-32	Q-85	Q-45B
1	94	87	24	71	73
2	89	87	33	73	68
3	92	89	32	68	71
4	91	87	29	67	73
Promedio	92 ^a	88 ^a	30 ^c	71 ^b	71 ^b

(*) % de inhibición de acuerdo a (Ahmed *et al.*, 2007)

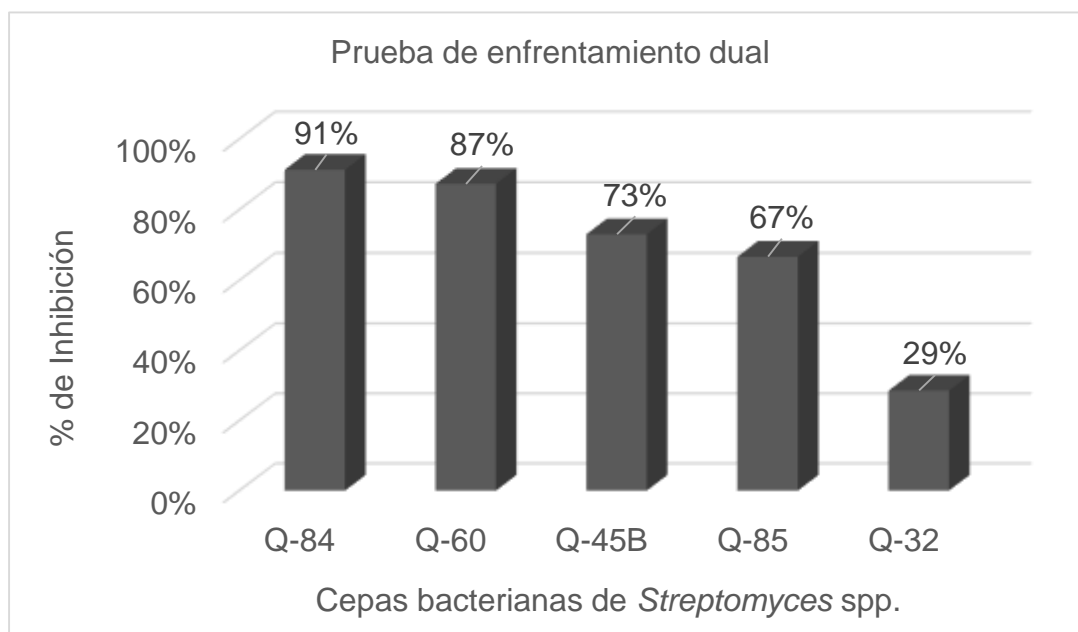


Figura 6. Porcentajes de Inhibición de las cepas bacterianas del género *Streptomyces* spp frente a *Colletotrichum* spp por enfrentamiento dual.

En la tabla 3, podemos observar que entre las 5 cepas en estudio hubo diferencias significativas en su capacidad antifúngica frente a *Colletotrichum* spp, (ver anexo 1). De ello podemos deducir que las cepas bacterianas del género *Streptomyces* spp, tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Colletotrichum* spp.

Así mismo, de los resultados de la prueba de Tukey ($p < 0.05$), para la prueba de enfrentamiento dual, podemos observar que, entre las cepas bacterianas en estudio, no hubo diferencia significativa, sin embargo, las cepas bacterianas Q-84 y Q - 60 fueron las que mostraron el porcentaje de inhibición más alto frente a *Colletotrichum* spp, con un 91% y 87% de inhibición respectivamente.

La cepa bacteriana que mostro el porcentaje de inhibición, más bajo fue la cepa Q-32 con un 29% de inhibición (Ver figura 06).

4.2 Prueba de extracto crudo de 5 cepas bacterianas del género *Streptomyces spp* vs. 2 fungicidas comerciales (amistar top y opera) frente a *Colletotrichum spp*.

Las pruebas por difusión en pozo se realizaron siguiendo la técnica propuesta por (Franco, 2008) y cuyos resultados se presentan en la tabla 02.

Tabla 4. Porcentaje de inhibición de los extractos crudos de las 5 cepas bacterianas vs. 2 fungicidas comerciales frente a *Colletotrichum spp*, por difusión en pozo.

Rango de Inhibición (%) (*)							
Ensayo	AMISTAR	OPERA	Q-84	Q-60	Q-32	Q-85	Q-45B
1	100	100	54	43	43	57	34
2	71	100	54	43	37	46	40
3	80	100	60	46	37	51	29
Promedio	84 ^a	100 ^a	56 ^b	44 ^{bc}	39 ^{bc}	51 ^{bc}	34 ^c

(*) % de inhibición de acuerdo a (Ahmed *et al.*, 2007)

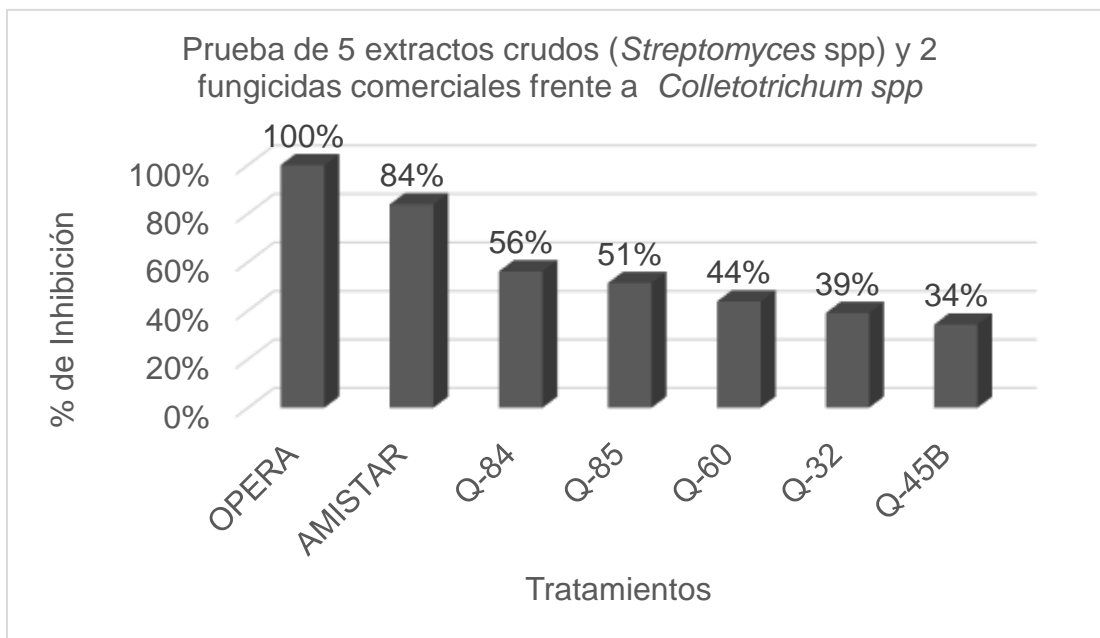


Figura 7. Porcentajes de Inhibición de los extractos crudos de las 5 cepas del género *Streptomyces spp* vs. 2 fungicidas comerciales, frente a *Colletotrichum spp* por difusión en pozo.

En la tabla 4, podemos observar que los extractos crudos de las 5 cepas bacterianas del género *Streptomyces spp* y los 2 fungicidas comerciales (Amistar top ® y Opera ®) frente a *Colletotrichum spp*; hubo una diferencia significativa en su capacidad antifúngica frente a dicho agente fitopatógeno. De ello podemos deducir que los tratamientos en estudio, mostraron tener un efecto inhibitorio sobre el crecimiento del hongo fitopatógeno *Colletotrichum spp*.

Así mismo, de los resultados de la prueba de Tukey ($p < 0.05$), para la prueba de los compuestos bioactivos, podemos observar que, entre las cepas bacterianas en

estudio, no hubo diferencia significativa, sin embargo, las cepas Q-84 y Q - 85 fueron las que mostraron los porcentajes de inhibición más altos frente a *Colletotrichum* spp, con 56% y 51% de inhibición respectivamente.

Las cepas bacterianas que mostraron los porcentajes de inhibición más bajos fueron las cepas Q-32 y Q-45B con, 39% y 34% de inhibición respectivamente, en comparación con los fungicidas de síntesis química (Opera y Amistar-Top) quienes mostraron porcentajes de inhibición de 100% y 84% respectivamente (Ver figura 2).





4.3 Caracterización macroscópica de las 5 cepas bacterianas del género *Streptomyces* spp.





Transcurrido el periodo de incubación, las colonias presuntivas de *Streptomyces* spp fueron identificadas teniendo en cuenta las características macroscópicas que los diferencian de las bacterias no filamentosas y los hongos.

La caracterización macroscópica de los 05 aislados de *Streptomyces* spp se realizó teniendo en cuenta la textura de las colonias, la coloración del micelio aéreo y de sustrato, la forma, el tamaño y la producción de pigmentos difusibles en el medio de cultivo. Las colonias presentaron un olor a suelo húmedo, olor característico de este grupo bacteriano, por su capacidad de producción de geosmina; estas características fueron determinantes para su identificación (Sylvia, 2005).

A continuación, se presenta la tabla 3, donde se resumen las características macroscópicas de los actinomicetos aislados.

Tabla 5. Descripción de las características macroscópicas de las cepas bacterianas del género *Streptomyces* spp. (Crecimiento en agar avena)

Cepa Q - 84	
	
Descripción: Colonia pequeña, seca, pulverulenta, anverso de color gris, el reverso de color naranja oscuro.	
Cepa Q - 60	
	

<p>Descripción: Colonia seca, el anverso color gris con bordes blancos, reverso color gris oscuro.</p>	
<p>Cepa Q - 45B</p>	
	
<p>Descripción: Colonia de aspecto cremoso, el anverso color gris oscuro, el reverso color café claro.</p>	
<p>Cepa Q - 32</p>	
	
<p>Descripción: Colonia seca, pulverulenta, reverso de la colonia oscura, anverso de color inicial blanca, esporulación blanca.</p>	

Cepa Q - 85




Descripción: Colonia seca, pulverulenta, el anverso de color blanco gris que al pasar el tiempo se torna café.

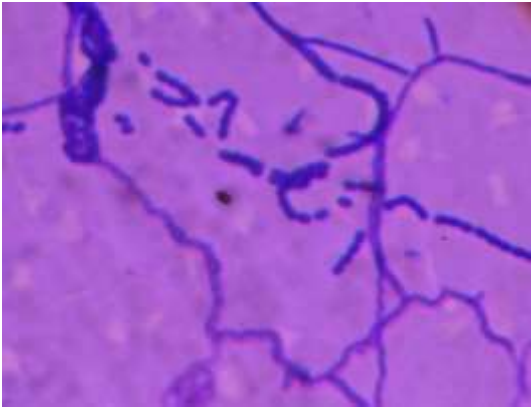
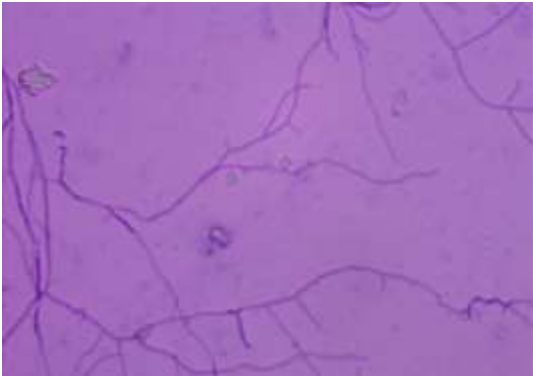
4.4 Caracterización microscópica de las 5 cepas bacterianas del género *Streptomyces spp.*

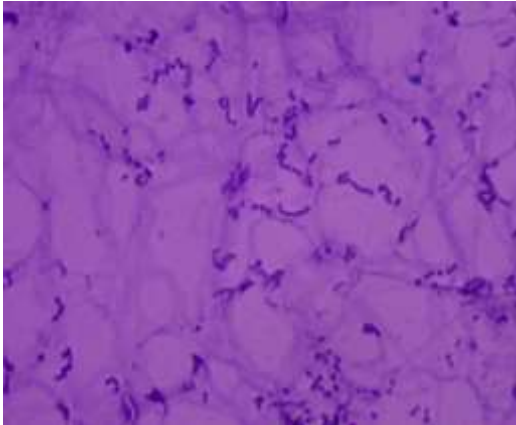
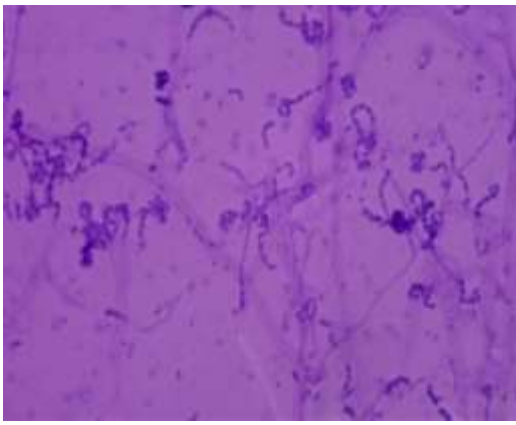
Transcurrido el periodo de incubación, las colonias presuntivas de *Streptomyces spp* fueron identificadas teniendo en cuenta las características microscópicas que los diferencian de las bacterias no filamentosas y los hongos.

A continuación, se presenta la tabla 4, donde se resumen las características macroscópicas de las 5 cepas bacterianas del género *Streptomyces spp.*

Tabla 6. Descripción de las características microscópicas de las cepas bacterianas del género *Streptomyces spp.*, encontradas (Coloración gran).

CEPA Q - 84	DESCRIPCIÓN
 <p data-bbox="467 1711 734 1745">Actinomiceto. 100 x</p>	<p data-bbox="915 1413 1382 1665">Micelio vegetativo sin fragmentación cadena de conidios (sencillos) si formación de espirales. Posible género: <i>Streptomyces sp.</i></p>

CEPA Q - 60	DESCRIPCIÓN
 <p data-bbox="467 718 727 751">Actinomiceto. 100 x</p>	<p data-bbox="922 474 1380 653">Micelio aéreo fragmentado, micelio vegetativo con fragmentación, conidios en cadena o en espiral.</p>
CEPA Q - 45B	DESCRIPCIÓN
 <p data-bbox="467 1320 727 1354">Actinomiceto. 100 x</p>	<p data-bbox="922 1056 1380 1239">Filamentos, ramificados, pocos conidios, en su mayoría simples. No hay presencia de cadenas.</p>

CEPA Q - 32	DESCRIPCIÓN
 <p data-bbox="467 747 734 779">Actinomiceto. 100 x</p>	<p data-bbox="938 453 1383 632">Filamentos largos y fragmentados, micelio tortuoso, cadena de conidios cortas, sin espiral.</p>
CEPA Q -85	DESCRIPCIÓN
 <p data-bbox="467 1335 734 1367">Actinomiceto. 100x</p>	<p data-bbox="922 1003 1383 1182">Micelio vegetativo no fragmentado, micelio aéreo fragmentado, cadenas de conidios largos. Posible género:</p> <p data-bbox="1042 1224 1263 1255"><i>Streptomyces</i> sp.</p>

4.5 Pruebas bioquímicas (lipasa, proteasa, quitinasa y celulasa) de las 5 cepas bacterianas del género *Streptomyces* spp.

Las pruebas enzimáticas (lipasa, proteasa, quitinasa y celulasa) a las 5 cepas bacterianas del género *Streptomyces* spp., se realizaron siguiendo la técnica propuesta por (Franco, 2008) y cuyos resultados se presentan en la tabla 03.

Tabla 7. Pruebas enzimáticas de las cepas bacterianas del género *Streptomyces* spp.

CEPA BACTERIANA	LIPASA	PROTEASA	QUITINASA	CELULASA
Q - 84	+	+	-	+
Q - 60	+	+	-	+
Q - 85	+	+	-	+
Q - 45B	+	-	-	+
Q - 32	+	-	-	+

4.6 Identificación genética

Comparación de secuencias altamente similares (Megablast)

Tabla 8. Identificación genética de la cepa bacteriana Q - 84.

Descripción	<u>Max</u> <u>Score</u>	<u>Total</u> <u>Score</u>	<u>Query</u> <u>cover</u>	<u>E</u> <u>Value</u>	<u>Ident</u>	Accession
<i>Streptomyces maritimus</i> Strain MML1710 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	2702	2702	99%	0	99%	MH084716.1
<i>Streptomyces</i> sp. Strain RKBH-B124 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	2702	2702	99%	0	99%	KY362382.1
<i>Streptomyces rochei</i> Strain Sal35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	2702	2702	99%	0	99%	KX440952.1

Resultado final de identificación BL02: Organismo *Streptomyces* sp.

Clasificación taxonómica: Bacteria; Actinobacteria; Streptomycetales;
Streptomycetaceae; Streptomyces.

V. DISCUSIÓN

A pesar de que se conoce el potencial que tienen las *Streptomyces* spp., como microorganismos productores de metabolitos secundarios de importancia biotecnológica, tales como los fungicidas (Arasu et al., 2008), aún en nuestro país, existen muy pocos estudios de investigación sobre los grandes aportes que nos pueden proporcionar estos microorganismos, como es la de su uso en el control biológico de hongos fitopatógenos. En la primera etapa de la presente investigación se logró reactivar 5 cepas bacterianas del género *Streptomyces* spp provenientes de suelos de desierto de la región Lambayeque, siendo las pruebas realizadas, las que se describen a continuación.

5.1 Prueba de enfrentamiento dual frente a *Colletotrichum* spp.

Para el caso de la capacidad antagónica de los actinomicetos frente a *Colletotrichum* spp., mediante la técnica de enfrentamiento dual tal como se muestra en la tabla 3, se puede observar que todas las cepas evaluadas mostraron tener un grado de inhibición positiva frente a este hongo fitopatógeno, sin embargo solo dos cepas (Q – 84 y Q – 60) fueron las que mostraron los porcentajes de inhibición más altos, con valores de 92% y 88%, respectivamente, las cuales además mostraron ser estadísticamente similares; la cepa Q – 32 fue la que dio el porcentaje de inhibición más bajo con un 30%.

Muharram et al., (2013) nos dicen que, la capacidad inhibitoria de los *Streptomyces* spp., contra una amplia variedad de fitopatógenos, entre ellos los hongos, ha sido reportada en varios estudios. Tal es así que, Castillo (2004) evaluó la efectividad de 90 actinomicetos, encontrando 24 cepas con buena actividad antifúngica, alcanzando porcentajes de inhibición de hasta 87,05%. Del mismo modo, Dávila *et al.* (2008) aislaron un total de 70 actinomicetos, quienes demostraron altos niveles de inhibición (61,57%) frente a *Colletotrichum* spp. Del mismo modo (Franco-Correa, 2008) nos dice que en las pruebas de antagonismo entre cepas de *Streptomyces* spp contra los hongos fitopatógenos, usando la técnica de enfrentamiento dual, se observó que estas presentaban una inhibición generalizada, alta, media o baja, aun frente a cepas fúngicas muy resistentes, ya que estos microorganismos ejercen su acción antagónica mediante la producción de antibióticos (antibiosis), los cuales se difunden por el medio inhibiendo el crecimiento del hongo fitopatógeno. Así mismo Molano et al. (2000) determinaron que la inhibición in vitro de los *Streptomyces* spp., sobre hongos fitopatógenos, se da por la producción de la actinomicina, un antibiótico producido por estos microorganismos, metabolito secundario tóxico para la mayoría de los hongos fitopatógenos. Según Demain & Piret (1983), los antibióticos producidos por las *Streptomyces* spp se forman durante la transición de las células vegetativas a propágulos, haciendo que se encuentre en el interior de las esporas, cumpliendo la función de autoinhibir su germinación hasta la presencia de condiciones favorables, pasada esta fase, se presenta un rápido desarrollo seguido de la segunda fase de crecimiento la cual se relaciona con la síntesis de antibióticos.

5.2 Prueba de inhibición, compuesto bioactivo crudo vs 2 fungicidas comerciales de síntesis química frente a *Colletotrichum* spp.

Para determinar la capacidad inhibitoria de los extractos crudos obtenidos de las 5 cepas bacterianas del género *Streptomyces* spp., versus 2 fungicidas comerciales de síntesis química, mediante la técnica por difusión en pozo, tal como se muestra en la tabla 4, se logró determinar que el extracto crudo de la cepa Q – 84 fue la que mostró el porcentaje de inhibición más alto entre todos los demás extractos, con un porcentaje de inhibición de 56%, seguido de las cepas Q – 85 y Q – 60 con valores de 51,33% y 44,0% respectivamente, mostrando además se estadísticamente similares en su efecto inhibitorio frente a *Colletotrichum* spp, en comparación a los porcentajes de inhibición mostrados por los fungicidas comerciales de síntesis química (Opera® y Amistar top®) con 100% y 84% respectivamente.

Los fungicidas de síntesis química, se han utilizado ampliamente para controlar diversos agentes fitopatógenos, sin embargo, su uso ha traído muchos problemas, como contaminación ambiental, deterioro de la salud humana, desarrollo de resistencia por parte de los patógenos y fitotoxicidad (Dubey *et al.*, 2008). Es por ello que muchos estudios se han enfocado en el descubrimiento de nuevos compuestos de origen natural que den los mismos resultados, pero que no dañen ni afecten al medio ambiente, tal es así que, Kim *et al.*, (2014) demostraron el potencial de la cepa de *Streptomyces* spp. A1022 contra *Colletotrichum* spp., llegando a tener un porcentaje de control de 61.6%, en comparación a un tratamiento con Azoxistrobin (fungicida

comercial) con un porcentaje de control de 68% en frutos de pimiento. Del mismo modo Palaniyandi *et al.*, (2011), demostró que el extracto crudo de la cepa de *Streptomyces* spp. MJM5763, fue eficaz para el control de *Colletotrichum* spp. en el cultivo de *Dioscorea* sp, con reducciones de los índices de severidad e incidencia a nivel foliar de hasta 88% y 81% respectivamente; en ambos casos de estudio, las cepas de *Streptomyces* spp. estudiadas, se convirtieron en potenciales alternativas al uso de los fungicidas de síntesis químico para el control de *Colletotrichum* spp. Corroborando así lo que (Schlatter *et al.*, 2009) mencionan, que la diversidad de metabolitos secundarios producidos por las *Streptomyces* spp., ofrecen un tremendo potencial para el control de hongos en diversos cultivos, convirtiéndolos en una nueva alternativa para el control de plagas.

5.3 Características microscópicas y macroscópicas de las cepas bacterianas del género *Streptomyces* spp.

Transcurrido el periodo de incubación, las colonias de las 5 cepas bacterianas presuntivas del género *Streptomyces* spp., fueron identificadas teniendo en cuenta las características morfológicas tanto microscópicas y macroscópicas. Mediante la técnica de microscopía se confirmó que las 5 cepas aisladas, tal como se muestran en la tabla 5 y 6; fueron Gram positivos, arrojando los ensayos, características morfológicas típicas que confirman que son bacterias del género *Streptomyces* spp., tal es así que:

La cepa Q – 84 presentó, como característica macroscópica, una colonia pequeña, seca, pulverulenta, anverso de color gris, el reverso de color naranja oscuro; y como característica microscópica, un micelio vegetativo sin fragmentación y cadena de conidios (sencillos) sin formación de espirales.

La cepa Q – 60, presentó, como característica macroscópica, una colonia seca, el anverso color gris con bordes blancos, reverso color gris oscuro; y como característica microscópica, un micelio aéreo fragmentado, con micelio vegetativo fragmentado y conidios en cadena o en espiral.

La cepa Q – 45B presentó como característica macroscópica, una colonia de aspecto cremoso, el anverso color gris oscuro, el reverso color café claro; y como característica microscópica, filamentos, ramificados, pocos conidios, en su mayoría simples y sin presencia de cadenas.

La cepa Q – 32 presentó como característica macroscópica, una colonia seca, pulverulenta, reverso de la colonia oscura, anverso de color inicial blanca, con esporulación blanca; y como característica microscópica, filamentos largos y fragmentados, un micelio tortuoso, con cadenas de conidios cortas, sin espiral.

La cepa Q – 85 presentó como característica macroscópica, una colonia seca, pulverulenta, el anverso de color blanco gris, el cual al pasar el tiempo se torna de color café; y como característica microscópica, un micelio vegetativo no

fragmentado, pero el micelio aéreo si mostraba fragmentación, con cadenas de conidios largos.

Los resultados obtenidos de las observaciones macroscópicas y microscópicas, fueron bastante claras, lo que permitió poder identificarlas con claridad, como pertenecientes al género *Streptomyces* sp., ya que las cinco cepas presentaron características microscópicas como, la no fragmentación del micelio de sustrato, la fragmentación del micelio aéreo y la formación de cadenas de conidias en forma de cocos o bacilos en disposición de espiral. Por otro lado, a nivel macroscópico, las colonias fueron de aspecto pulverulento en la superficie del medio de cultivo, con colores de blanco, a blanco grisáceo, consistencia dura y pigmento difusible variado, así mismo, la mayoría de estas colonias presentan una característica en particular, que era la de un olor a tierra húmeda, indicador de producción de geosmina (Goodfellow *et al.*, 2012).

5.4 Pruebas enzimáticas (lipasa, proteasa, quitinasa y celulasa) a las 5 cepas bacterianas del género *Streptomyces* spp.

Después de transcurrido los días de incubación en los diferentes medios de cultivo para determinar su capacidad enzimática (lipasa, proteasa, quitinasa y celulasa), se procedió a observar la presencia de halos de degradación en cada uno de los medios, según esta evaluación, tal como se muestra en la tabla 7, se logró determinar que las 5 cepas bacterianas no produjeron quitinasa, sin embargo las cepas Q – 84, Q – 60 y

Q – 85, lograron producir lipasa, celulasas y proteasa, mientras que la Q – 45B y Q – 60 solo produjeron lipasa y celulasa; cabe mencionar que las cepas Q – 84, Q – 60 y Q – 85, mostraron los % de inhibición más altos, tanto en las pruebas de enfrentamiento dual, como en la prueba de difusión en pozo.

Sinha, Hegde, & Kush, (2014), nos dicen que en estudios anteriores se han reportado que las *Streptomyces* spp., son muy buenos productores de enzimas extracelulares capaces de degradar compuestos orgánicos tales como celulosa, lignina, quitina y proteínas. Así mismo Getha *et al.*, (2005) y Errakhi *et al.*, (2007) informan que las enzimas producidas por los *Streptomyces* spp., degradan la pared celular fúngica compuesta de quitinas, sin embargo en este estudio las 5 cepas bacterianas en estudio, no mostraron tener dicha capacidad enzimática, aun mostrando buenos porcentajes de inhibición, tal como lo corrobora Lima *et al.*, (1998) quienes informaron de que no solo los microorganismos productores de quitinasa han demostrado ser buenos agentes de control biológico sobre hongos fitopatógenos, sino también los productores de proteasa, ya que la pared celular de muchos de estos agentes patógenos contienen proteínas, tal como lo demostraron en su estudio contra *Phytophthora* spp y *Pythium* spp. con porcentajes de inhibición de 80% y 86% respectivamente. Gopalakrishnan *et al.* (2011) y Kavitha *et al.* (2010), nos dicen que ciertos metabolitos producidos por los actinomicetos podrían tener un efecto antifúngico, al inhibir su crecimiento hifal, teniendo un comportamiento de metabolito específico.

5.5 Identificación genética de la cepa Q – 84.

En el caso de la identificación de género de la cepa Q-84, la microscopia, la secuenciación del ADN y las pruebas bioquímicas coinciden que pertenece al género *Streptomyces* spp. siendo según el análisis de BLAST, similar a las especies de *Streptomyces maritimus* Strain MML1710, *Streptomyces sp* Strain RKBH-B124 y *Streptomyces rochei* Strain Sal35; ambas especies reconocidas por su capacidad de inhibición frente a hongos fitopatógenos Ezziyyani., et al (2004) y Xiang y Moore (2003), sin embargo y por la característica edáfica de donde fue aislada la cepa Q – 84, zona de desierto salino (C.E = 24.0 mhos), podríamos sugerir que la Q – 84, es *S. maritimus*, ya que dicha especie ha sido aislada de zonas edáficas con similares características a las nuestras (suelos salinos).

VI. CONCLUSIONES

- 6.1 Se logró identificar y evaluar *in vitro* el potencial antifúngico de cinco cepas de *Streptomyces* spp aisladas de suelo desértico frente a *Colletotrichum* spp, resultando ser la cepa Q-84 la que mostró los porcentajes de inhibición más altos en sobre *Colletotrichum* spp, con porcentajes de inhibición en el enfrentamiento dual de 91.5% y de su compuesto bioactivo mediante la técnica de difusión en pozo de 56%.
- 6.2 La cepa Q-84, mostró los valores más altos y tener un gran potencial antifúngico frente a *Colletotrichum* spp, sin embargo, en las pruebas de Tukey ($p < 0.05$), tanto para la prueba de enfrentamiento dual como para la de difusión en pozo, entre las cepas bacterianas de *Streptomyces* spp en estudio, no hubo diferencia significativa, siendo similares estadísticamente.
- 6.3 Según las características macroscópicas y microscópicas de las 5 cepas bacterianas, se logró determinar que pertenecían al género *Streptomyces* spp.
- 6.4 La cepa Q-84, fue identificada genética. mediante la técnica de 16S ARNr – por PCR, resultando ser tres posibles especies (*Streptomyces maritimus* Strain MML1710, *Streptomyces* sp Strain RKBH-B124 y *Streptomyces rochei* Strain Sal35), con 99% de similitud en todos ellos.

VII. RECOMENDACIONES

- 7.1 Seguir realizando estudios con la cepa Q-84 y las otras cuatro, frente a otros hongos fitopatógenos y nematodos de importancia económica.
- 7.2 Impulsar el uso de las bacterias del género *Streptomyces* sp como una nueva alternativa dentro del manejo integrado de plagas.
- 7.3 Realizar estudios para la producción en masa del compuesto bioactivo extraídos de la cepa bacteriana Q – 84 para su uso como agente de control de plagas.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, E. Martínez, Z. y Enríquez, G. (2016). Los Actinomicetos y su aplicación biotecnológica. México. 59 - 64 pp. www.elementos.buap.mx.
- Agrios, G. (2004). "Plant pathology". 5th ed. Elsevier Academic Press. USA.
- Bergey, J. Hendricks, D. (1984). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Vol. 2. Editorial Willian & Wilkins. Baltimore Philadelphia, USA.
- Baniasadi F, Bonjar GHS, Baghizadeh A, Karimi Nik A, Jorjandi M, Aghighi S, Farokhi PR (2009) "Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum*, causal agent of sunflower head and stem rot disease, by use of soil borne actinomycetes isolates". *Agric Biol Sci* 4:146–151.
- Dávila, M., Gallegos, M., Hernández, C., Ochoa, F., Flores, O., (2015). "Antagonistic actinomycetes against phytopathogenic fungi of agricultural importance". Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro-Departamento de Parasitología. Coahuila – México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrarias*. Vol.4 No.8 Texcoco nov. /dic. 2013.
- Delgado, J. Alvarez, A. y Yañes, A. (2018). "Uso indiscriminado de pesticidas y ausencia de control sanitario para el mercado interno en Perú". *Review Pan American Journal of Public Health*. 6 pp.
- Demain A., Piret J. (1983). Why secondary metabolism Genetics of industrial microorganisms. *Journal of Food Safety*. 5:361-362.
- Errakhi, R., Bouteau, F., Lebrihi, A., Barakate, M. 2007. Evidences of biological control capacities of *Streptomyces* spp. against *Sclerotium rolfsii* responsible

- for damping-off disease in sugar beet. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 23: 1503-1509.
- Ezziyani, M., Pérez Sánchez, C., Requena, M. E., Rubio, L., & Candela, M. E. (2005). Biocontrol por *Streptomyces rochei* –Ziyani–, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología*, 26, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.laa.2011.10.007>.
- Fernández, H. (2004). “Diagnóstico y evaluación de plagas”. Curso taller. SENASA. Lima, Perú.
- Franco-Correa, M. (2008). Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Retrieved from <http://hera.ugr.es/tesisugr/17716093.pdf>.
- Getha, K., Vikineswary, S., Wong, W.H., Seki, T., Ward, A., Goodfellow, M. 2005. Evaluation of *Streptomyces* sp. strain g10 for suppression of *Fusarium* wilt and rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 32(1): 24-32.
- Gonzalo, C., Rosana, G., Manuel, A., Fernando, F., (2012). “Isolation and identification of actinomycetes from a compost-amended soil with potential as biocontrol agents”. Departamento de Biotecnología e Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia – España. *Journal of Environmental Management*. Vol. 95, Supplement, March 2012, Pág. 280 – 284.
- Gopalakrishnan, S., Pande, S., Sharma, M., Humayun, P., Keerthi Kiran, B., Sandeep, D., Vidya, M., Deepthi, K., Rupela, O. 2011. Evaluation of actinomycetes

- isolates obtained from herbal vermicompost for the biological control of Fusarium wilt chickpea. *Crop Prot.*, 30: 1070-1078.
- Horna, D. H., Sialer, C. A., Hernández, A. A., Incio, M. E., Leiva, J. L. (2014). Antifúngicos de origen natural frente a los de síntesis química para el control de hongos fitopatógenos en *Chenopodium quinoa* "QUINUA" – *Rev. Ingeniería: Ciencia, Tecnología e Innovación* Vol. 1/N°1.
- Howell, C.R. (2003). "Mechanisms employed by Trichoderma species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts". *Plant Disease* 87(1): 4-10.
- Kavitha, A., Vijayalakshmi, M., Sudhakar, p., Narasimha, G. 2010. Screening of actinomycete strains for the production of antifungal metabolites. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 4(1): 27-32.
- Kim, H. J., Lee, E. J., Park, S. H., Lee, H.-S., & Chung, N. (2014). Biological Control of Anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) in Pepper and Cherry Tomato by *Streptomyces* sp. A1022. *Journal of Agricultural Science*, 6(2). <https://doi.org/10.5539/jas.v6n2p54>.
- Lima, L.H.C., Marco, J.L., Felix, C.R. 1998. Enzimas hidrolíticas involucradas no controle biológico por microparasitismo. In: Melo, I.S., Azevedo, J.L. (Eds.), *Controle Biológico*. Jaguariuna: EMBRAPA- Meio Ambiente., Vol. 11, Pp. 263-304.
- Molano A, Algecira N, Bernal J, Franco-Correa M. (2000). Evaluación y Selección de un Medio de Cultivo a partir de Actinomicetes. En: *Memorias del II Congreso Internacional de Microbiología Industrial*, Pontificia Universidad Javeriana,

Mayo 10– 12.

Nantawanit, N., Chanchaichaovivat, A., Panijpan, B., Ruenwongsa, P., (2010).

“Induction of defense response against *Colletotrichum capsici* in chili fruit by the yeast *Pichia guilliermondii* strain R13”. *Biol. Control* 52, 145 e 152.

Smith J., Putnam A, y Nair M. (1990). “In Vitro Control of *Fusarium* Diseases of

Asparagus officinalis L. with a *Streptomyces* or Its Polyene Antibiotic, Faeriefungin”. Natural Products Chemistry Laboratory, Department of Horticulture, Michigan State University. *Food Chem.* 38, 7729-7733.

Sinha, K., Hegde, R., & Kush, A. (2014). Exploration on native actinomycetes strains and their potential against fungal plant pathogens, 3(11), 37–45.

Sistema Integrado de Estadística Agraria – MINAGRI. (2018). Boletín estadístico de comercio exterior – Mes enero. 52 pp.

Peréz, R., León, Q., Galindo, C., (2015). “Actinomicetos aislados del compost y su actividad antagonista a fitopatógenos de la papa (*Solanum tuberosum* spp. Andígena Hawkes)”. Laboratorio de Ecología Microbiana, Facultad de Ciencias Biológicas - Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Vol.33 No.2.

Schlatter, D.C., Fubuh, A., Xiao, K., Hernandez, D., Hobbie, S.E., Kinkel, L.L., 2009.

Resource amendments influence density and competitive phenotypes of *Streptomyces* in soil. *Microb. Ecol.* 57, 413e420.

Tokala K, Strap C, Jung D, Crawford L, Salove L, Deobald F, Bailey J, Morra J. (2002).

Novel plant- microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus*

- WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Applied and Environmental Microbiology*. 68:2161–2171.
- Yin GL Wang WM, Sha S, Liu L, Yu XP. (2010). “Inhibition and control effects of the ethyl acetate extract of *Trichoderma harzianum* fermented broth against *Botrytis cinerea*”. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2010; 15: 1647-1653.
- Vaiyapuri, R. P., Narayanasamy, M., Kandasamy, M., (2006). “Control of blast and sheath blight diseases of rice using antifungal metabolites produced by *Streptomyces* sp. PM5”. *Biocontrol and Microbial Metabolites Lab, Centre for Advanced Studies in Botany, University of Madras – India. Biological Control.* Vol. 39, Issue 3, December 2006, Pág. 313–319.
- Wellington E, Anderson A. (2001). The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51:797-814.
- Xiang, L., & Moore, B. S. (2003). Characterization of benzoyl coenzyme A biosynthesis genes in the enterocin-producing bacterium “*Streptomyces maritimus*.” *Journal of Bacteriology*, 185(2), 399–404.
<https://doi.org/10.1128/JB.185.2.399-404.2003>

ANEXOS

Anexo 1

Análisis estadístico de prueba de enfrentamiento dual

Tabla 9. Análisis de varianza de enfrentamiento dual entre 5 cepas bacterianas del género *Streptomyces spp* frente al hongo fitopatógeno *Colletotrichum spp*.

Fuente de Variación	suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
cepas	9722.300	4	2430.575	296.111	.000
Repetición	1.750	3	.583	.071	.974
Error	98.500	12	8.208 ^b		
Total	9822.550	19			
CV = 2.6		R ² = 99.8		X = 1.7	

Tabla 10. Prueba de Tukey de enfrentamiento dual entre 5 cepas bacterianas del género *Streptomyces spp* frente al hongo fitopatógeno *Colletotrichum spp*.

(I) Cepas Bacterianas	(J) Cepas Bacterianas	Diferencia de medias (I-J)	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Q - 32	Q - 45B	-42.000*	.000	-48.457	-35.543
	Q - 60	-58.250*	.000	-64.707	-51.793

	Q - 84	-62.250*	.000	-68.707	-55.793
	Q - 85	-40.500*	.000	-46.957	-34.043
Q - 45B	Q - 32	42.000*	.000	35.543	48.457
	Q - 60	-16.250*	.000	-22.707	-9.793
	Q - 84	-20.250*	.000	-26.707	-13.793
	Q - 85	1.500	.943	-4.957	7.957
Q - 60	Q - 32	58.250*	.000	51.793	64.707
	Q - 45B	16.250*	.000	9.793	22.707
	Q - 84	-4.000	.333	-10.457	2.457
	Q - 85	17.750*	.000	11.293	24.207
Q - 84	Q - 32	62.250*	.000	55.793	68.707
	Q - 45B	20.250*	.000	13.793	26.707
	Q - 60	4.000	.333	-2.457	10.457
	Q - 85	21.750*	.000	15.293	28.207
Q - 85	Q - 32	40.500*	.000	34.043	46.957
	Q - 45B	-1.500	.943	-7.957	4.957
	Q - 60	-17.750*	.000	-24.207	-11.293
	Q - 84	-21.750*	.000	-28.207	-15.293

Tabla 11. Prueba de TUKEY de enfrentamiento dual entre 5 cepas bacterianas del género *Streptomyces spp* frente al hongo fitopatógeno *Colletotrichum spp*.

	Cepas Bacterianas	N	Subconjunto		
			1	2	3
HSD Tukey ^{a,b,c}	Q - 32	4	29.250		
	Q - 85	4		69.750	
	Q - 45B	4		71.250	
	Q - 60	4			87.500
	Q - 84	4			91.500
	Sig.			1.000	.943

Anexo 2

Análisis estadístico de prueba de extracto crudo vs fungicidas comerciales de síntesis química

Tabla 12. ANVA de prueba de extracto crudo de 5 cepas bacterianas del género *Streptomyces spp* y 2 fungicidas comerciales (Amistar top ® y Opera ®) frente a *Colletotrichum spp*).

Fuente de Variación	suma de	gl	Media	F	Sig.
	cuadrados		cuadrática		
Tratamientos	10762.667	6	1793.778	43.431	.000
Observaciones	120.381	2	60.190	1.457	.271
Error	495.619	12	41.302 ^b		
Total	11278.667	20			
CV = 5.8			R ² = 93.8		X = 1.5

Tabla 13. Prueba de Tukey para prueba de extracto crudo de 5 cepas bacterianas del género *Streptomyces spp* vs 2 fungicidas comerciales (Amistar top® y Opera®) frente a *Colletotrichum spp*).

(I)	(J)	Diferencia de medias (I- J)	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
AMISTAR	OPERA	-16.3333	.100	-34.8268	2.1602
	Q - 32	44.6667*	.000	26.1732	63.1602
	Q - 45B	49.3333*	.000	30.8398	67.8268
	Q - 60	39.6667*	.000	21.1732	58.1602
	Q - 84	27.6667*	.002	9.1732	46.1602
	Q - 85	32.3333*	.001	13.8398	50.8268
OPERA	AMISTAR	16.3333	.100	-2.1602	34.8268
	Q - 32	61.0000*	.000	42.5065	79.4935
	Q - 45B	65.6667*	.000	47.1732	84.1602
	Q - 60	56.0000*	.000	37.5065	74.4935
	Q - 84	44.0000*	.000	25.5065	62.4935
	Q - 85	48.6667*	.000	30.1732	67.1602
Q - 32	AMISTAR	-44.6667*	.000	-63.1602	-26.1732
	OPERA	-61.0000*	.000	-79.4935	-42.5065

	Q - 45B	4.6667	.973	-13.8268	23.1602
	Q - 60	-5.0000	.962	-23.4935	13.4935
	Q - 84	-17.0000	.081	-35.4935	1.4935
	Q - 85	-12.3333	.318	-30.8268	6.1602
Q - 45B	AMISTAR	-49.3333*	.000	-67.8268	-30.8398
	OPERA	-65.6667*	.000	-84.1602	-47.1732
	Q - 32	-4.6667	.973	-23.1602	13.8268
	Q - 60	-9.6667	.577	-28.1602	8.8268
	Q - 84	-21.6667*	.017	-40.1602	-3.1732
	Q - 85	-17.0000	.081	-35.4935	1.4935
Q - 60	AMISTAR	-39.6667*	.000	-58.1602	-21.1732
	OPERA	-56.0000*	.000	-74.4935	-37.5065
	Q - 32	5.0000	.962	-13.4935	23.4935
	Q - 45B	9.6667	.577	-8.8268	28.1602
	Q - 84	-12.0000	.346	-30.4935	6.4935
	Q - 85	-7.3333	.816	-25.8268	11.1602
Q - 84	AMISTAR	-27.6667*	.002	-46.1602	-9.1732
	OPERA	-44.0000*	.000	-62.4935	-25.5065
	Q - 32	17.0000	.081	-1.4935	35.4935
	Q - 45B	21.6667*	.017	3.1732	40.1602
	Q - 60	12.0000	.346	-6.4935	30.4935
	Q - 85	4.6667	.973	-13.8268	23.1602

Q - 85	AMISTAR	-32.3333*	.001	-50.8268	-13.8398
	OPERA	-48.6667*	.000	-67.1602	-30.1732
	Q - 32	12.3333	.318	-6.1602	30.8268
	Q - 45B	17.0000	.081	-1.4935	35.4935
	Q - 60	7.3333	.816	-11.1602	25.8268
	Q - 84	-4.6667	.973	-23.1602	13.8268

Tabla 14. Prueba de Tukey para prueba de extracto crudo de 5 cepas bacterianas del género *Streptomyces spp* vs 2 fungicidas comerciales (Amistar top® y Opera®) frente a *Colletotrichum spp*).

Tratamientos	N	Subconjunto		
		1	2	3
Q - 45B	3	34.33		
Q - 32	3	39.00	39.00	
Q - 60	3	44.00	44.00	
HSD Tukey ^{a,b,c} Q - 85	3	51.33	51.33	
Q - 84	3		56.00	
AMISTAR	3			83.66
OPERA	3			100.0
Sig.		.081	.081	.100

Anexo 3

Secuenciamiento genético de la cepa bacteriana del género *Streptomyces* spp Q -84

Figura 8. Secuencia genética de la cepa Q - 84: 1472pb.

ACCCCTGTTACGACTTCGTCCCAATCGCCAGTCCCACCTTTCGACAGCTCC
CTCCCACAAGGGGTTGGGCCACCGGCTTCGGGTGTTACCGACTTTCGTGA
CGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAAT
GCTGATCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGA
CCCCAATCCGAAGTGAAGACCGGCTTTTTGAGATTCGCTCCACCTCGCGGT
ATCGCAGCTCATTGTACCGGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGACAT
AAGGGGCATGATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCC
GGCGGTCTCCCGTGAGTCCCCAGCACCACAAGGGCCTGCTGGCAACACGG
GACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGA
GCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCGACCACAAGGGGGACCCT
GTCTCCAGGGTTTTCCGGTGTATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTT
GCGTCGAATTAAGCCACATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATT
CCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTAATCCCCAGGCGGGGCACTTAATGC
GTTAGCTGCGGCACGGACAACGTGGAATGTTGCCACACCTAGTGCCAC
CGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTCCCCACGCT
TTCGCTCCTCAGCGTCAGTATCGGCCAGAGATCCGCCTTCGCCACCGGT
GTTCTCCTGATATCTGCGCATTTCACCGCTACACCAGGAATTCCGATCTC
CCCTACCGAAGTCTAGCCTGCCCGTATCGACTGCAGACCCGGGGTTAAGC

CCCGGGCTTTCACAACCGACGTGACAAGCCGCCTACGAGCTCTTTACGCC
CAATAATTCCGGACAACGCTTGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGC
ACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTTTCGCTTCTTCC
CTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTC
GCTGCATCAGGCTTTCGCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCG
TAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCGCCCTCTCAG
GCCGGCTACCCGTCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTG
ATAGGCCGCGGGCTCATCCTGCACCGCCGGAGCTTTCGAACCTCGCAGAT
GCCTGCGAGGATCAGTATCCGGTATTAGACCCCGTTTCCAGGGCTTGTCC
CAGAGTGCAGGGCAGATTGCCACGTGTTCTCACCCGTTCCGCCACTAATC
CCCACCGAAGTGGTTCATCGTTCGACTTGCATGTGTTAAGCACGCCGCC
AGCGTTCGTCCTGAGCC

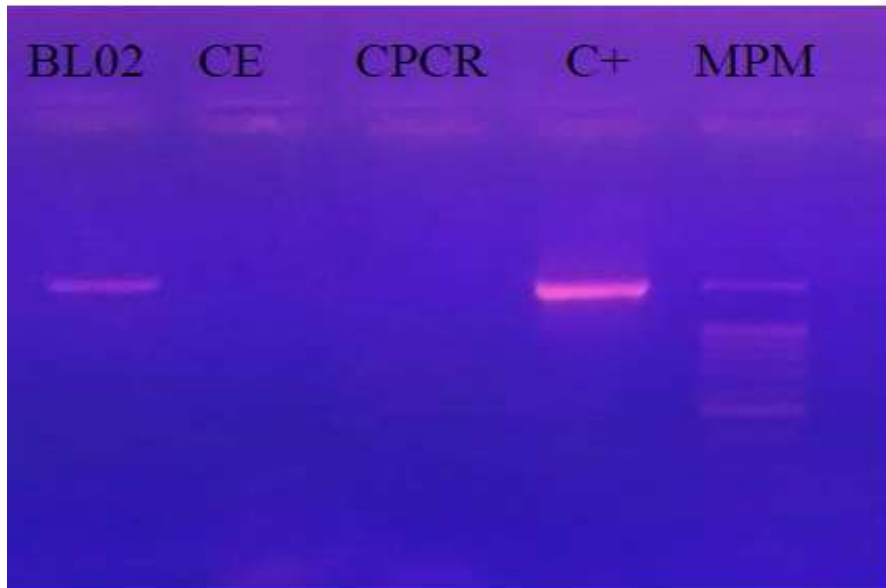


Figura 9. Resultados de alineamiento bl02 de la cepa Q – 84.

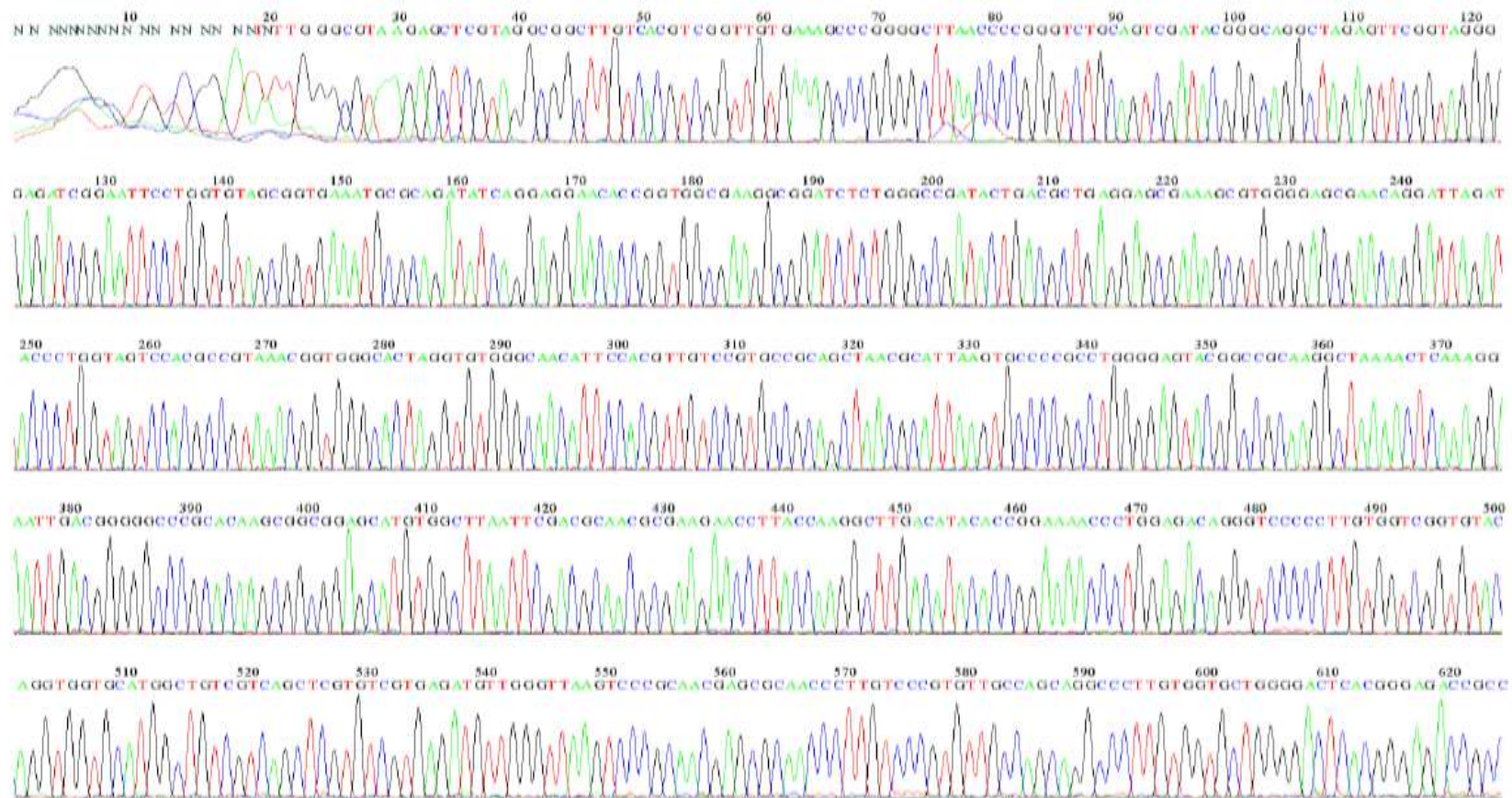


Figura 10. Secuenciamiento genético obtenido de la cepa bacteriana Q – 84.

File: st32_BLO2_518F.ab1 Run Ended: 2018/7/23 20:19:54 Signal G:1459 A:1168 C:999 T:970
Sample: st32_BLO2_518F Lane: 79 Base spacing: 15.057401 982 bases in 16606 scans Page 2 of 2

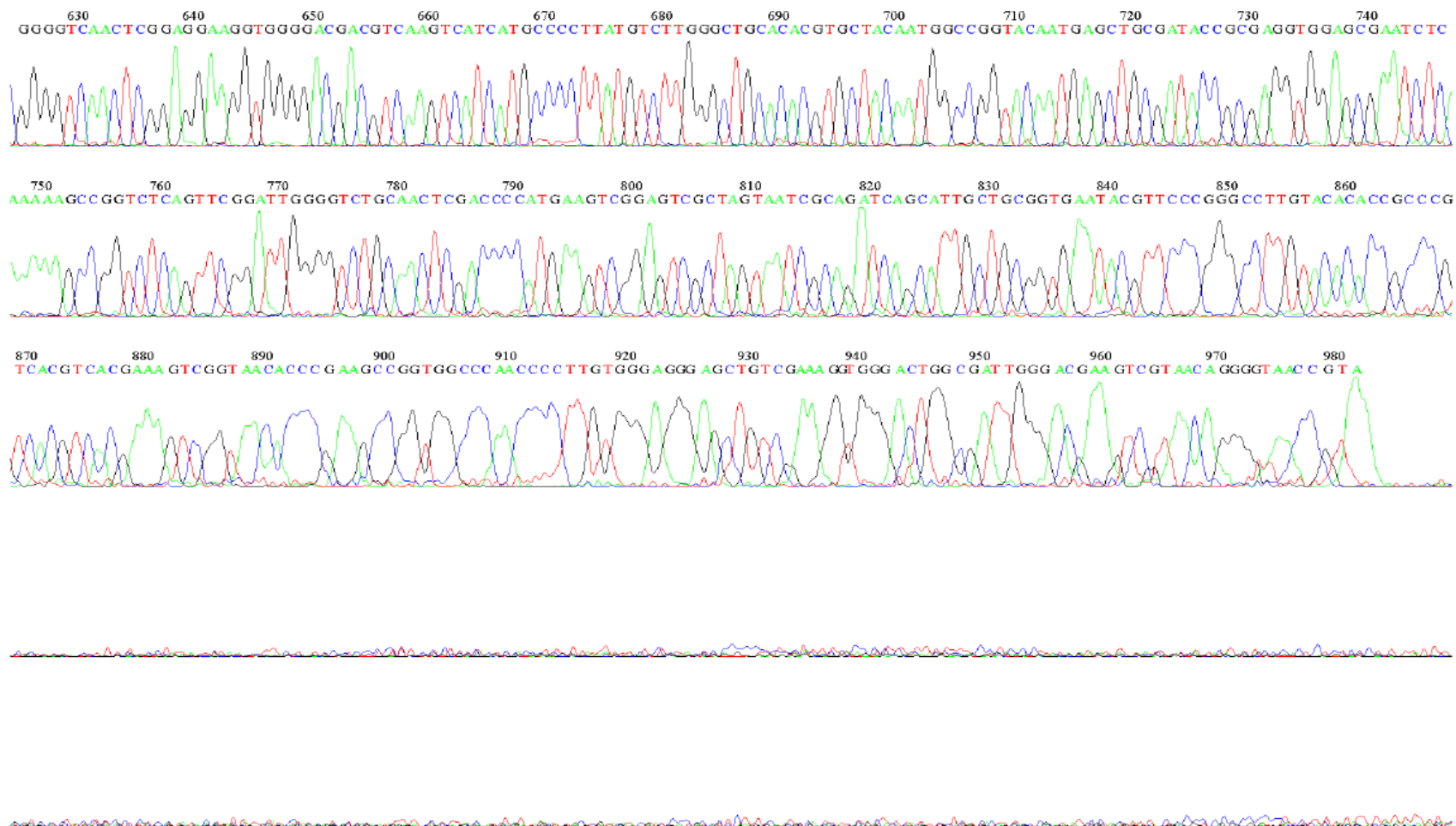


Figura 11. Secuenciamiento genético obtenido de la prueba a cepa bacteriana Q – 84.

Anexo 4

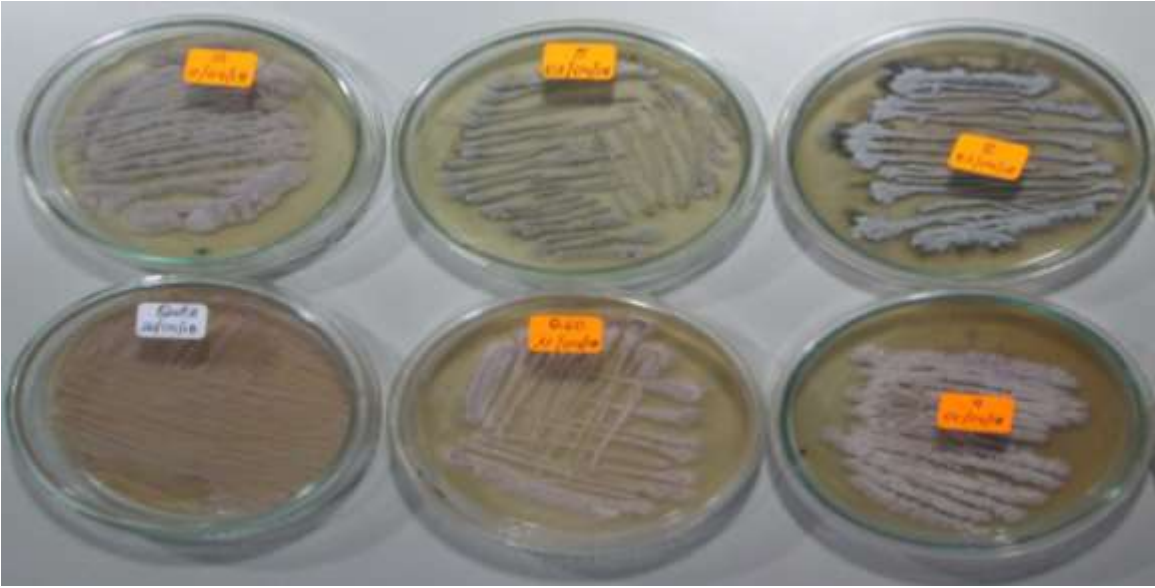


Figura 12. Aislamiento de las 5 cepas bacterianas del género *Streptomyces* spp para la realización del estudio.

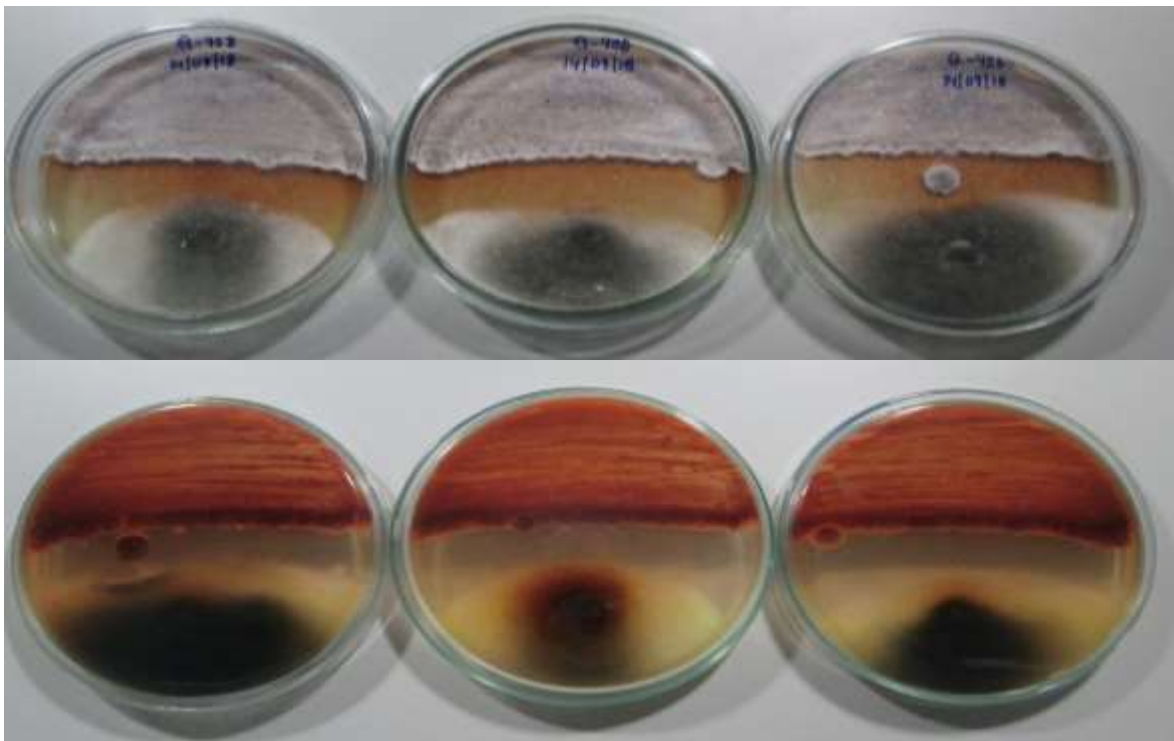


Figura 13. Prueba *In vitro* enfrentamiento dual cepa bacteriana (Q-45B) del género *Streptomyces* spp, frente a *Colletotrichum* spp.

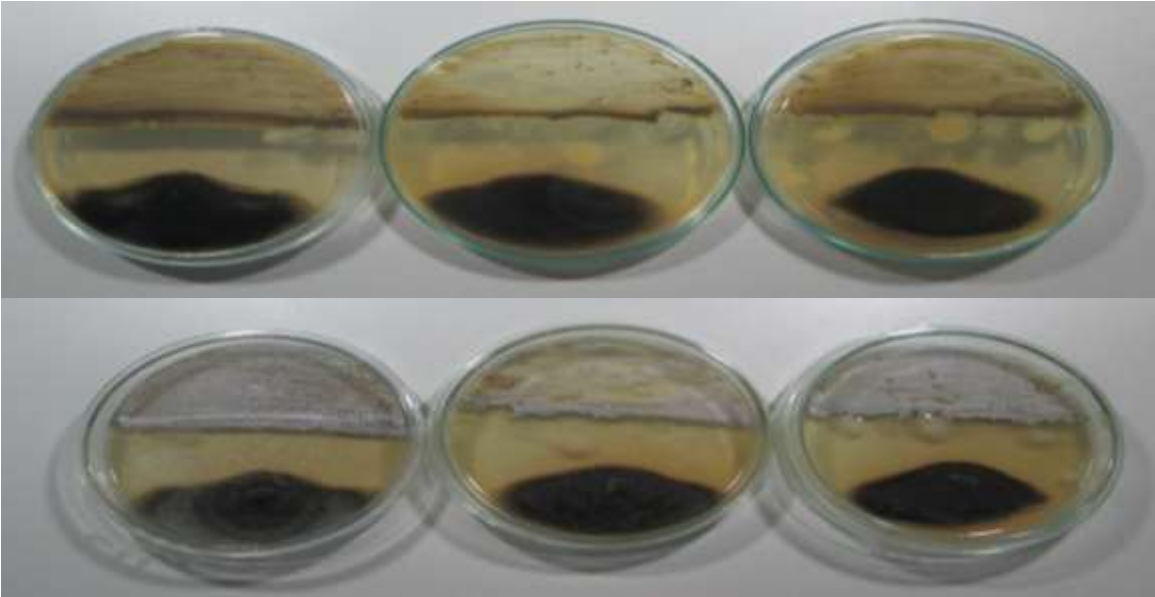


Figura 14. Prueba *In vitro* enfrentamiento dual cepa bacteriana (Q-60) del género *Streptomyces* spp, frente a *Colletotrichum* spp.

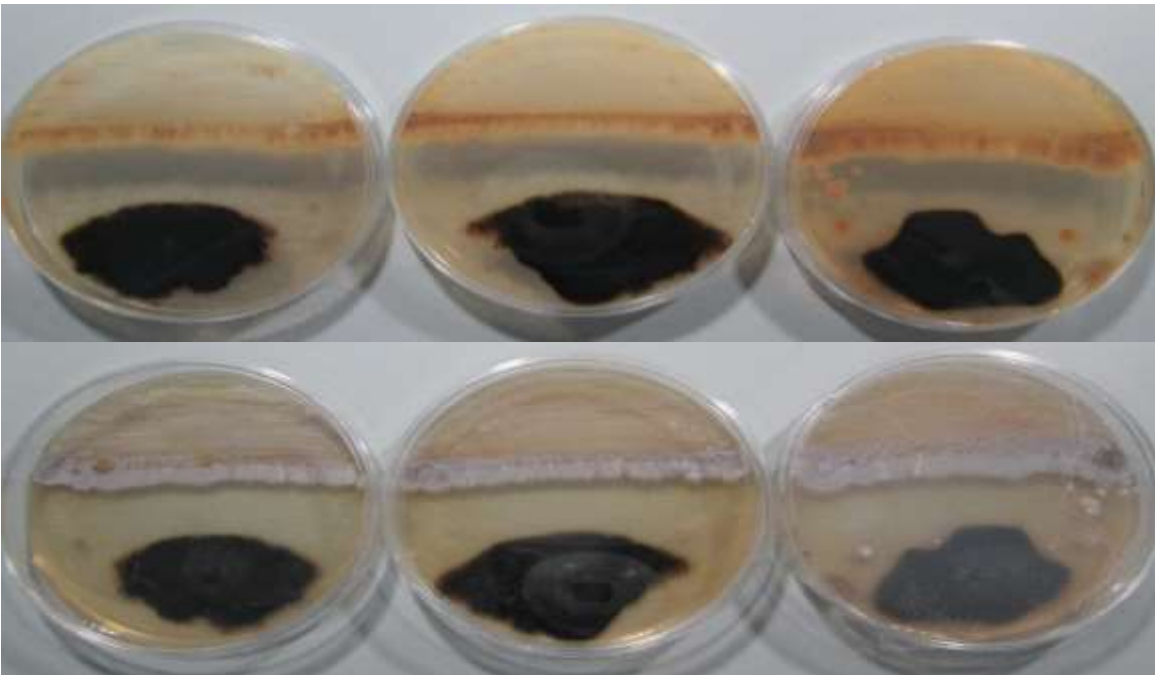


Figura 15. Prueba *In vitro* enfrentamiento dual cepa bacteriana (Q-84) del género *Streptomyces* spp, frente a *Colletotrichum* spp.

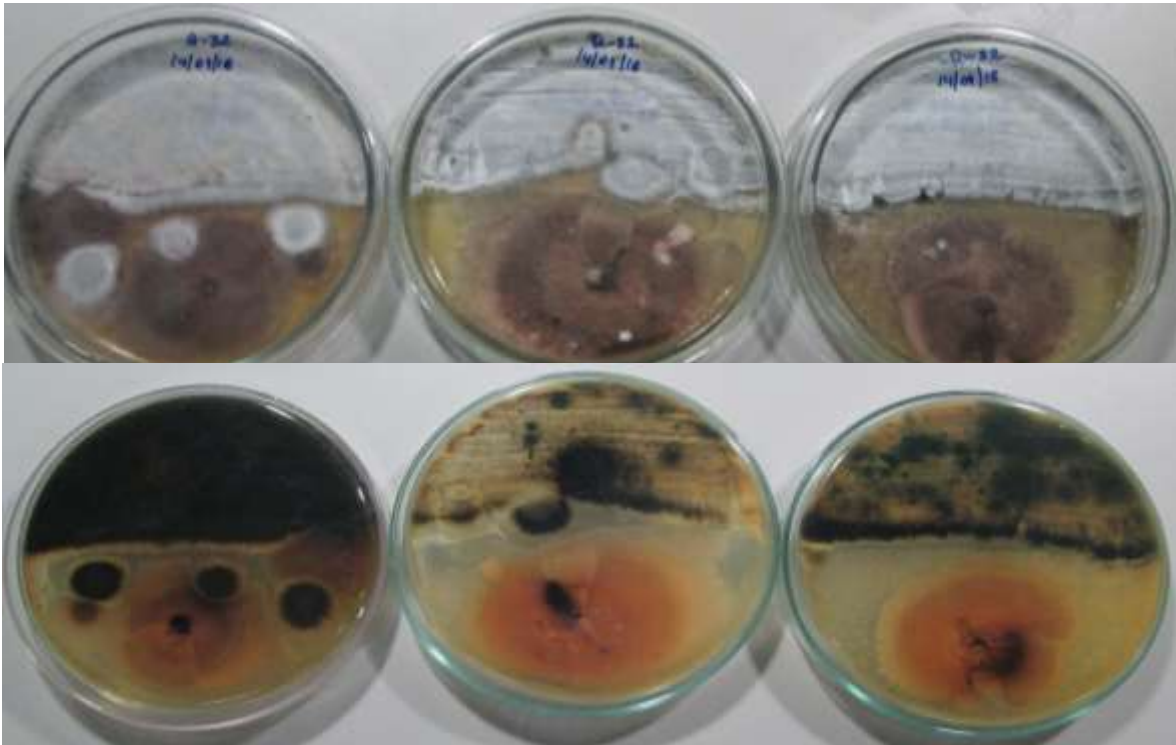


Figura 16. Prueba *In vitro* enfrentamiento dual cepa bacteriana (Q-32) del género *Streptomyces* spp, frente a *Colletotrichum* spp.



Figura 17. Comparación de inhibición *In vitro*, prueba de enfrentamiento dual entre cepa Q-84 y testigo



Figura 18. Siembra en agar avena + nistatina de las cepas bacterianas del género *Streptomyces* spp, para su identificación macroscópica y microscópica.



Figura 19. Identificación microscópica de las cepas bacterianas del género *Streptomyces* spp.

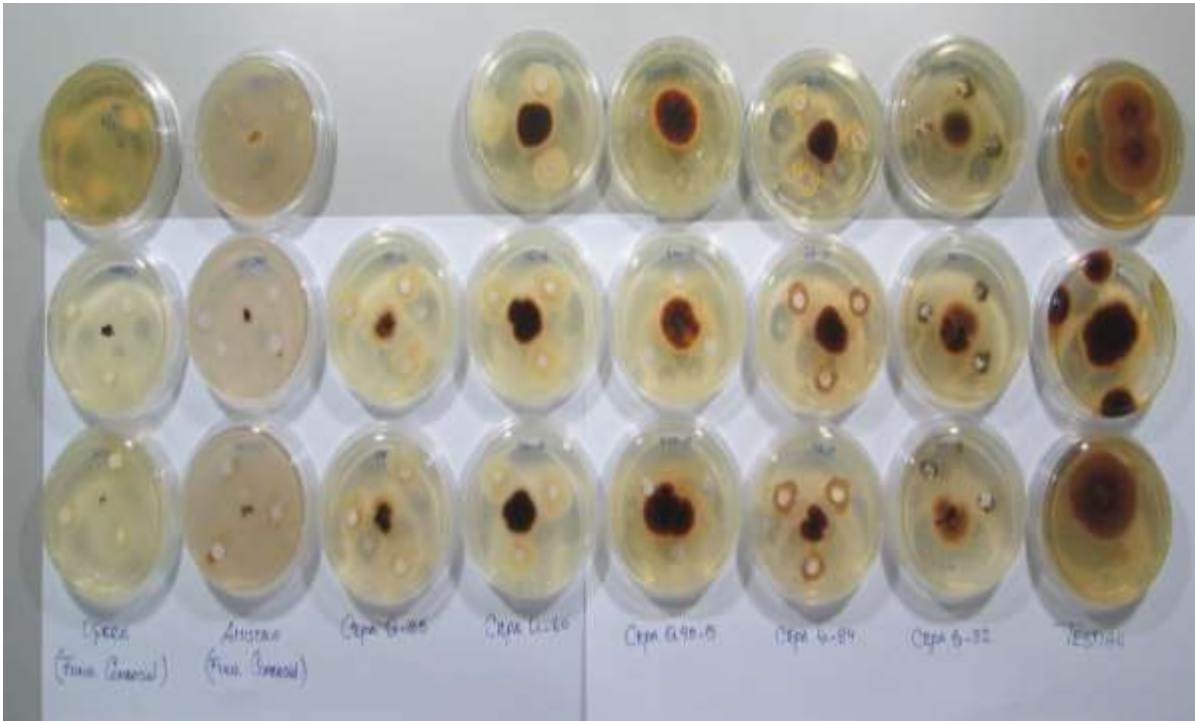


Figura 20. Prueba *In vitro* de compuesto bioactivo y fungicida de síntesis química frente a *Colletotrichum* spp.



Figura 21. Extractos crudos obtenidos de las 5 cepas bacterianas del género *Streptomyces* spp.

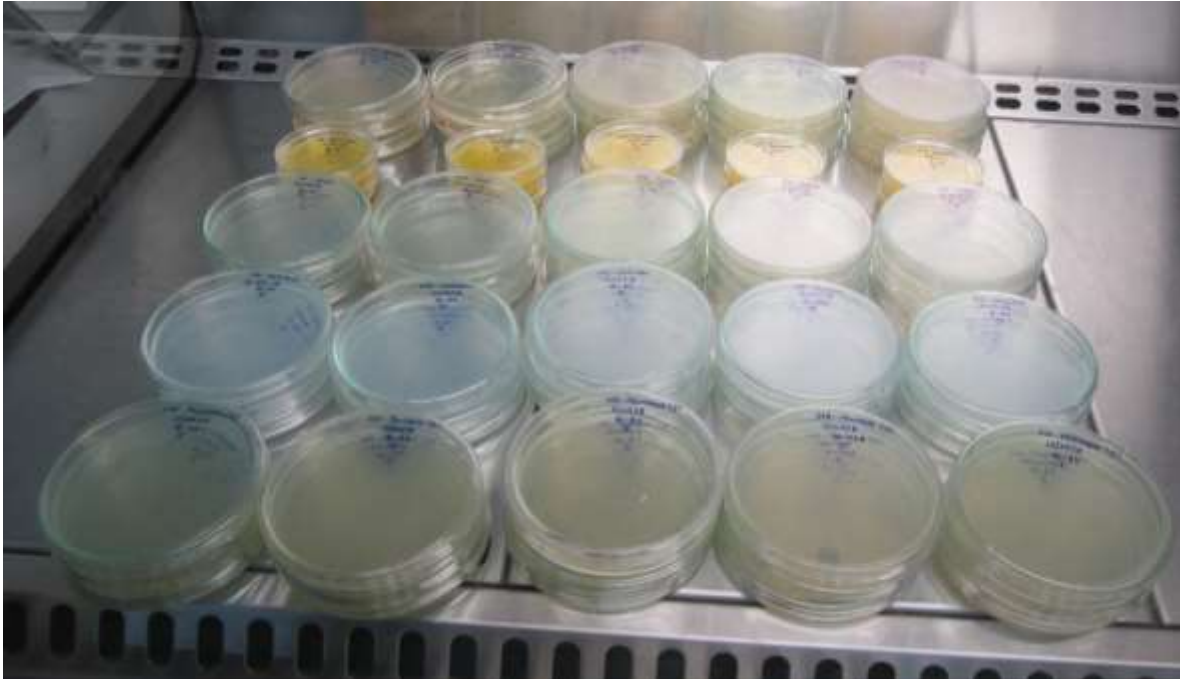


Figura 22. Pruebas enzimáticas (lipasa, proteasa, quitinasa y celulasa) de las 5 cepas bacterianas del género *Streptomyces* spp (Q-84, Q-85, Q-32, Q-60 y Q-45B)

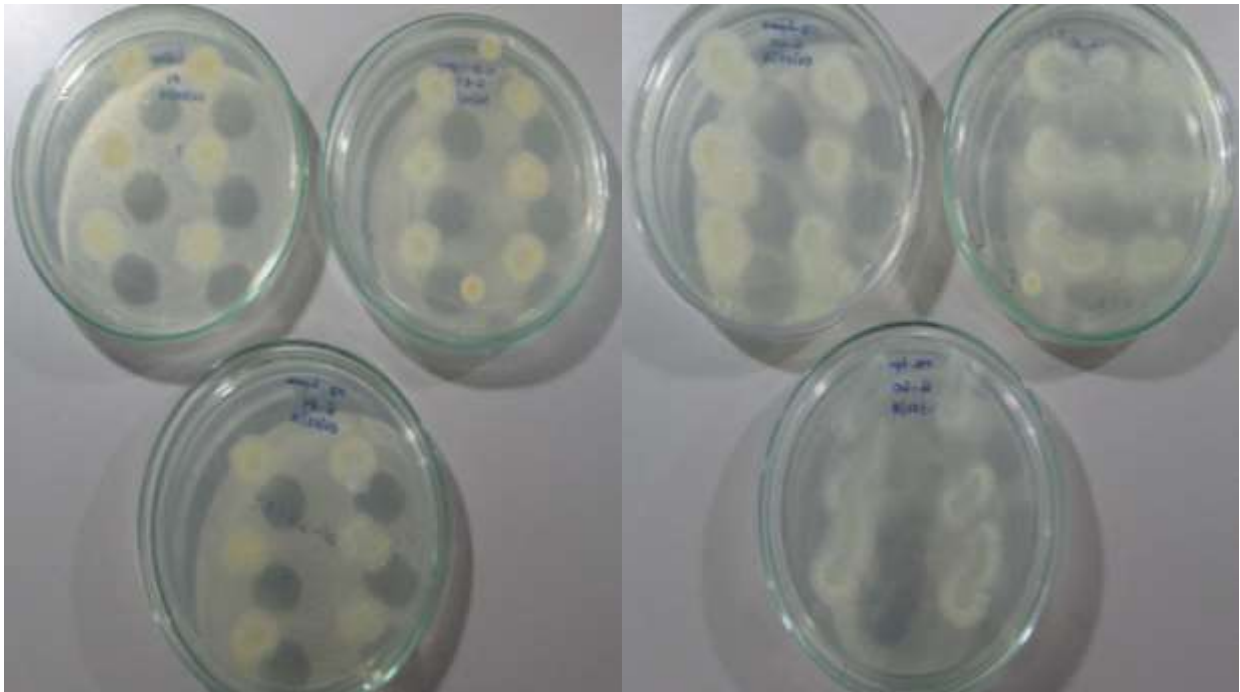


Figura 23. Prueba enzimática (Lipasa) de las cepas bacterianas del género *Streptomyces* spp.

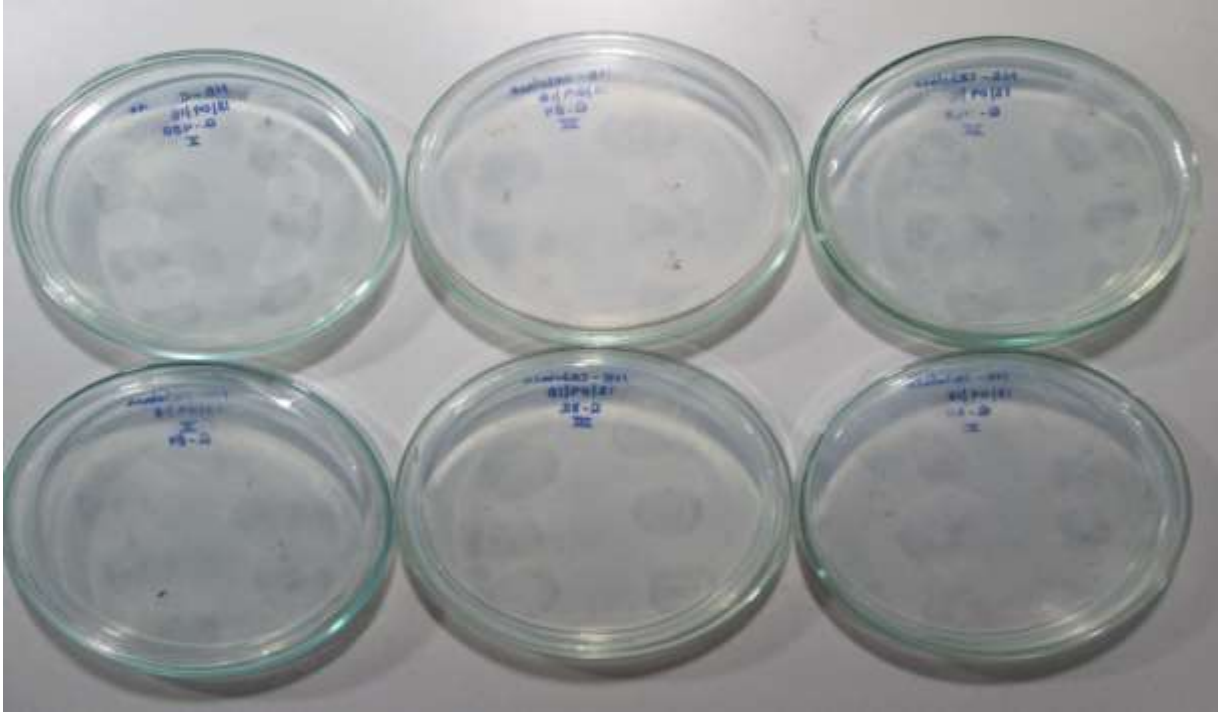


Figura 24. Prueba enzimática (Celulasa) de las cepas bacterianas del género *Streptomyces* spp.

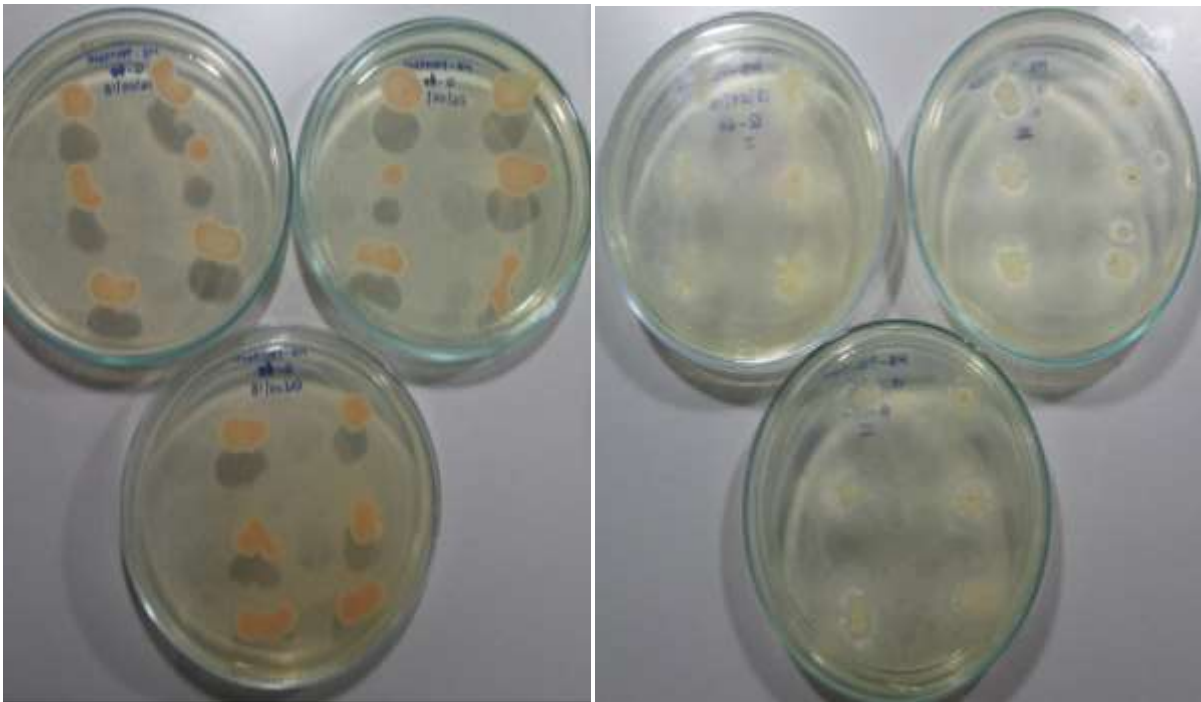


Figura 25. Prueba enzimática (Proteasa) de las cepas bacterianas del género *Streptomyces* spp.

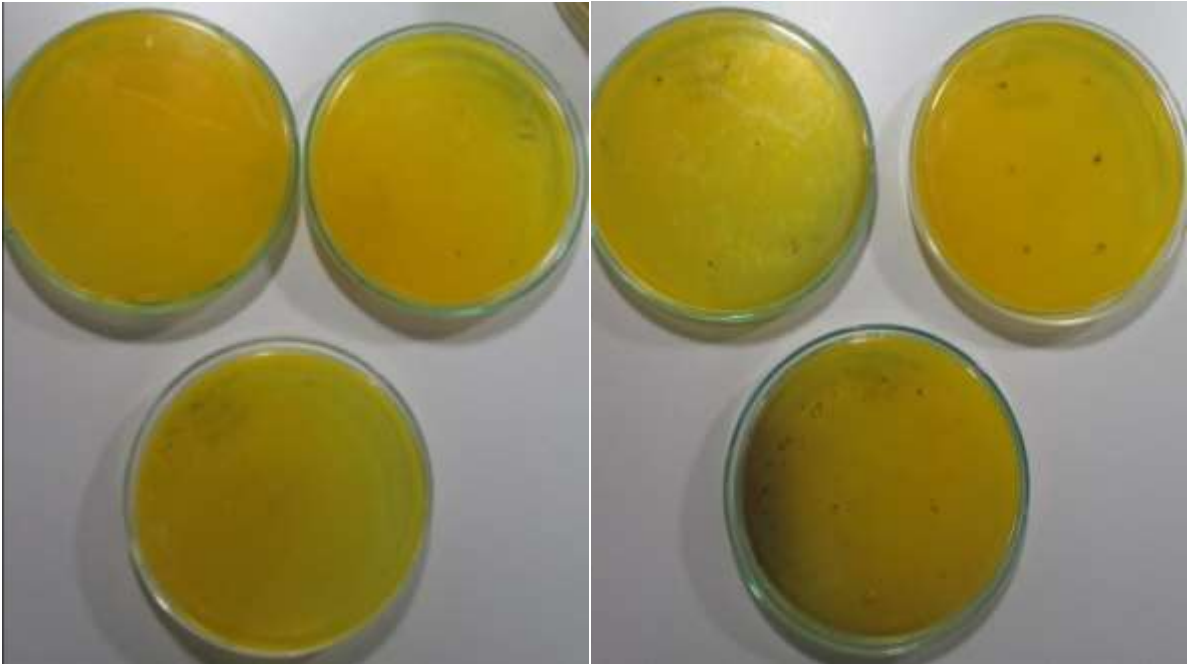


Figura 26. Prueba enzimática (Quitinasa) de las cepas bacterianas del género *Streptomyces* spp.