

Respuesta antifúngica y propiedades PGPB de actinomicetos aislados de cultivos de “vid” *Vitis vinifera* (Vitaceae)

antifungal response and PGPB properties of actinomycetes isolated from “vid” *Vitis vinifera* (Vitaceae) crops

Mirko Lino Navarro

Facultad de Ciencias Biológicas-Laboratorio de Micología Aplicada, Universidad Nacional Mayor de San Marcos Calle Germán Amézaga NO 375-Ciudad Universitaria, Lima 1. PERÚ
mirko.lino@unmsm.edu.pe // <https://orcid.org/0000-0002-6747-2112>

Ebeling Morales Tello

Facultad de Ciencias Biológicas-Laboratorio de Micología Aplicada, Universidad Nacional Mayor de San Marcos Calle Germán Amézaga NO 375-Ciudad Universitaria, Lima 1, PERÚ
<http://orcid.org/0000-0002-9131-9214>

Pedro Castellanos Sanchez,

Facultad de Ciencias Biológicas-Laboratorio de Micología Aplicada, Universidad Nacional Mayor de San Marcos Calle Germán Amézaga NO 375-Ciudad Universitaria, Lima 1, PERÚ
<http://orcid.org/0000-0003-2965-174X>

Maritza Acosta Román

Laboratorio de Producción, Novagri SAC. Santa Rita de Siguanas-Arequipa, Arequipa, PERÚ
<https://orcid.org/0000-0003-0397-5666>

Mercedes Soberon Lozano.

Facultad de Medicina-San Fernando, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, PERÚ
<https://orcid.org/0000-0001-5063-1407>

Resumen

Las bacterias promotoras de crecimiento en plantas (PGPB) promueven una agricultura limpia y sustentable, así como la reducción de agroquímicos. 35 Actinomicetos fueron aislados de muestras de suelo de cultivos de "vid" *Vitis vinifera* (Vitaceae), Ica. Estas 35 cepas fueron caracterizadas por su capacidad enzimática para degradar "avena", lecitina, almidón, caseína, tween-81 y carboximetilcelulosa. Se seleccionaron 18 cepas actinomicetales con la mejor respuesta antagonista contra *Aspergillus* sp. luego de ser evaluadas en diferentes medios de cultivo tales como agar nutritivo, plate count agar, agar papa dextrosa y un nuevo medio de cultivo denominado ASMICO. Se evaluó la capacidad PGPB cualitativamente mediante la solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno, producción de sideróforos y producción de ácido indol acético (AIA). Se seleccionaron 4 actinomicetos con mejor antagonismo y con al menos una de las características PGPB. Luego se enfrentaron contra el fitopatógeno *Phytophthora cinnamomi* al cual solo creció 10 mm en comparación a los 49 mm del control negativo. Mediante ANOVA utilizando el software Statistica 10, se confirmó que ASMICO posee el mayor efecto y difiere significativamente ($p < 0.05$) a los 3 otros medios utilizados. Se concluye que los actinomicetos aislados de suelos de cultivos de "vid" son una fuente potencial como productores de metabolitos antifúngicos, así como PGPB.

Palabras clave: Actinomicetos; "vid"; antifúngicos; antagonismo; PGPB.

Abstract

Plant growth-promoting bacteria (PGPB) are a tool that helps to have clean and sustainable agriculture as well as in the reduction of agrochemicals. 35 Actinomycetes were isolated from soil samples from vine, Ica crops. These 35 strains were characterized by their enzymatic ability to degrade different substrates such as oats, lecithin, starch, casein, tween 81 and carboxymethylcellulose. 18 actinobacteria strains were selected that had the best antagonistic response against *Aspergillus* sp. after being evaluated by bilayer technique in different culture media such as nutrient agar, plate count agar, potato dextrose agar and a new culture medium called ASMICO. To verify the PGPB capacity, phosphates solubilization, nitrogen fixation, siderophore production and acetic indole acid (AIA) production were qualitatively evaluated. 4 actinomycetes were selected with the best antagonism and with at least one of the PGPB characteristics. They then clashed against the phytopathogen *Phytophthora cinnamomi* which reduced their growth to 10 mm compared to 49 mm of negative control. Using ANOVA with the Statistica 10 software it was confirmed that the new ASMICO culture medium has the greatest effect and is significantly ($p < 0.05$) different compared to the 3 other media used. It is concluded that actinomycetes isolated from Vine crops soils are a potential source to be used as producers of antifungal metabolites as well as PGPB.

Keywords: Actinomycetes, vid, antifungal, antagonism, PGPB.

Citación: Lino, M.; E. Morales; P. Castellanos; M. Acosta & M. Soberón. 2020. Respuesta antifúngica y propiedades PGPB de actinomicetos aislados de cultivos de "vid" *Vitis vinifera* (Vitaceae). *Arnaldoa* 27 (2): 571-586 2020. <http://doi.org/10.22497/arnaldoa.272.27209>

Introducción

El cambio climático es una de las más severas preocupaciones para las políticas de los gobiernos y agricultores en las últimas 2 décadas. El cambio en las condiciones climáticas está directamente relacionado con el aumento poblacional,

lo cual a su vez crea la necesidad de mantener una alta productividad en los campos de cultivo y la seguridad alimentaria para estas poblaciones (Singh *et al.*, 2009). Sin embargo, esto lleva a los agricultores a utilizar grandes cantidades de fertilizantes químicos y pesticidas para aumentar los rendimientos de los cultivos.

Aquellos fertilizantes son sintetizados químicamente a partir de nitrógeno, fósforo y potasio principalmente los cuales al ser usados indiscriminadamente provocan contaminación del suelo, aire y agua ya sea directa o indirectamente (Galloway *et al.*, 2019) (Youssef & Eissa, 2014). El continuo uso de fertilizantes, biocidas y pesticidas afectan negativamente la microflora natural la cual incluye bacterias, hongos, micorrizas, cianobacterias y protozoarios presentes en la rizósfera causando un desbalance en el ecosistema natural, afectando la promoción del crecimiento, control de enfermedades, tolerancia tanto a sales como al estrés por metales pesados (Dash *et al.*, 2017) (Dash *et al.*, 2018) (Wani *et al.*, 2016). La rizósfera de las plantas es una fina capa de suelo adherida a la superficie de las raíces, allí es donde se llevan a cabo grandes reacciones benéficas plantas-microorganismos en donde las bacterias asociadas al crecimiento de las plantas son denominadas bacterias promotoras del crecimiento en plantas PGPB (Kumar *et al.*, 2016) (Kumar *et al.*, 2017). Los microorganismos antagonistas y sus metabolitos bioactivos representan una de las mejores alternativas a los pesticidas de síntesis química en el control de plagas en cultivos para una agricultura sustentable y seguridad alimentaria (Xu *et al.*, 2019). En general, los microorganismos controladores pueden interactuar con los fitopatógenos mediante diversos mecanismos incluyendo la producción de antibióticos y enzimas líticas, competición por nutrientes, detoxificación de toxinas y degradación de factores de virulencia (Berg *et al.*, 2006). Diversas especies del género *Aspergillus* son toxigénicas y perjudicial debido a que producen agentes tipo poliquétidos como Aflatoxina B1 (AFB1), B2 (AFB2), G2 (AFG1), G2 (AFG2) y ácido ciclopiazónico (Picot *et al.*, 2017). Los cultivos agrícolas tales como

semillas de “algodón”, “maní” y frutos secos son muy propensos a contaminación por aflatoxinas, las cuales son extremadamente carcinogénicas, teratogénicas, mutagénicas y supresoras del sistema inmune cuando son ingeridas incluso en pequeñas cantidades por animales y humanos (Cleveland *et al.*, 2003) (Mobeen *et al.*, 2011). Así también, el oomycete *Phytophthora* sp. representa a uno de los principales fitopatógenos en los cultivos hortícolas (Kunoba *et al.*, 2016). Entre los candidatos como biocontroladores, las actinobacterias en especial los *Streptomyces* son de inmenso valor porque ellos son potentes productores de compuestos bioactivos con múltiples propiedades biológicas sumado a sus propiedades filamentosas y de esporulación que les permiten sobrevivir bajo condiciones ambientales desfavorables (Vurukonda *et al.*, 2018). Es por ello la importancia y el objetivo del presente artículo, estudiar actinomicetales aislados de cultivos de “vid” y evaluar su potencial utilidad como PGPB.

Material y métodos

Aislamiento y caracterización enzimática de actinomicetos

Muestras compuestas de suelo fueron colectados de 2 fundos de la ciudad de Ica ubicados según coordenadas: 14°05'00.1”S 75°43'58.5”W, los cuales se caracterizaban por presentar cuadros de “Oidiosis”. Estas muestras fueron procesadas en el laboratorio de Micología Aplicada de UNMSM tomando 10 g de suelo en 90 mL de solución salina, se diluyó hasta 10⁻¹ y se sembró 1 mL por incorporación utilizando como medio el caldo Bushnell Hass (BH) suplementado con carboximetilcelulosa (CMC) al 0,5 % y agar agar 15 g/L. Se realizó por quintuplicado y se incubó a 30°C durante 20 días (Evangelista *et al.*, 2014).

Se aislaron las colonias que presentaron las características culturales típicas de actinomicetos (Holt JG *et al.*, 2000) y después de varios pasajes sucesivos en agar BH + CMC se purificaron y se criopreservaron a -20°C en agar BH+CMC1% con glicerol al 20%. Para evaluar las características enzimáticas, las cepas fueron evaluadas por su crecimiento en 6 diferentes sustratos tales como: avena, lecitina, caseína, tween 81, almidón y carboximetilcelulosa. Además, se evaluó su crecimiento sobre Agar Nutritivo (AN), Plate count Agar (PCA), PDA (Agar papa dextrosa) y un nuevo medio denominado ASMICO el cual fue elaborado a partir del caldo Bushnell Hass, sacarosa y un aporte de biomasa fúngica dado por el hongo *Aspergillus* sp.

Cepas fúngicas Testigo

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

Preparación de medios de cultivo

Para la preparación del medio ASMICO se utilizó biomasa de la cepa de *Aspergillus* sp. la cual fue reactivada sembrando una asada en agar PDA, luego de 7 días de incubación se tomaron con sacabocado 5 discos de 8 mm de diámetro y se colocaron en 5 matraces conteniendo caldo Czapeck y sacarosa 15 g/L. Se fermentó durante 7 días a 120 rpm y 30 °C. Los matraces fueron autoclavados a 121°C y 1,5 psi de presión,

se tamizó utilizando gasa estéril para separar la biomasa de la fase líquida. Dicha biomasa fúngica obtenida por el proceso fermentativo fue secada en horno a 60 °C durante 3 horas. Finalmente se guardó en frasco estéril hasta su uso. Para preparar el medio de cultivo ASMICO se tomó biomasa seca (1,4 % p/Vol.) 1,4g/100 mL, cloruro de sodio 0,12g/L, cloruro de potasio 0,15g/L, citrato de sodio 0,29 g/L, sacarosa 4,0 g/L y se completó con 15 g/L de agar-agar. Los otros 3 medios de cultivo se elaboraron según su indicación comercial.

Pruebas de antagonismo

En cada uno de los 4 medios de cultivo se colocaron 4 cepas actinomicetales, sembradas por estriado y cada extremo, se incubaron a 30° C durante 72 horas (Zhao *et al.*, 2018). Luego se procedió a colocar la cepa testigo *Aspergillus* sp. en el centro de la placa. Se sembró también la cepa fúngica testigo sin actinomicetos como control negativo. Todas las placas se sembraron por triplicado y fueron incubadas a 30° C durante 7 días. Luego de este periodo se procedió a verificar cada placa y comparar con el control negativo para verificar la inhibición, el valor de antagonismo se calculó restando el tamaño del diámetro del hongo crecido en el control negativo menos el tamaño del diámetro del mismo *Aspergillus* sp. que fue enfrentado contra los actinomicetos. A partir de esos resultados se seleccionaron 18 cepas actinomicetales con los mejores resultados de antagonismo. Posteriormente se escogieron las 4 cepas de mayor inhibición y con al menos 1 de las características PGPB y se enfrentaron contra *Phytophthora cinnamomi*. Estas pruebas fueron realizadas sobre agar PDA siguiendo la misma metodología contra *Aspergillus* sp.

Evaluación de la capacidad PGPB de actinomicetos

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

Producción de sideróforos

Las cepas fueron inoculadas en el medio descrito por S & T (Simon & Tessman, 1963), incubadas a 30°C con agitación de 120 rpm por 14 días. Se centrifugó 5 ml del cultivo a 4 000 rpm por 6 min, colocando 100 µL del sobrenadante de cada cultivo con 100 µL de la solución de 5 mM de perclorato férrico (SIGMA-ALDRICH) en 0,14 M de ácido sulfúrico. Para indicar presencia de sideróforos debió ocurrir el cambio de color de la mezcla anterior a un café rojizo.

Fijación de nitrógeno

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

Solubilización de fosfatos

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

rojo a amarillo. Las placas fueron incubadas por 14 días a 30°C, luego de este tiempo se midió el tamaño de los halos obtenidos.

Producción de ácido indol acético (AIA)

Los actinomicetos fueron colocados en el Caldo B suplementado con triptona e incubados a 30°C, agitación de 120 rpm durante 14 días. Luego de este tiempo se centrifugó 5 ml de cada cultivo a 3 000 rpm por 15min, se retiró 100 µL del sobrenadante y en un tubo aparte se agregó 200 µL del reactivo de Salkowsky, finalmente, se dejó en oscuridad durante 15 minutos. La lectura positiva para indicar presencia de AIA fue dada por el viraje de color, de amarillo a fucsia (Celis *et al.*, 2007).

Análisis estadístico

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

Resultados

Aislamiento y caracterización enzimática de actinomicetos

35 actinomicetos fueron aislados de suelos de cultivos de "vid" *Vitis vinifera* (Vitaceae) en Ica, Perú. Debido a sus

características culturales típicas en los diversos medios de cultivo, entre ellos el agar con CMC, que les permiten un crecimiento bien diferenciado con otros grupos microbianos, se pudo lograr un aislamiento sin demasiadas purificaciones, favoreciendo así un aislamiento más eficiente. En resumen, este estudio permitió confirmar que 31 cepas (88,6%) fueron capaces de degradar avena, 32 cepas (91,4%) poseen lecitinasas, 29 cepas (82,9%) degradan caseína, 8 cepas (22,9%) poseen esterases, 33 (94,3%) cepas poseen amilasas y 30 cepas (85,7%) degradan CMC. (Tabla 1)

Influencia de los medios de cultivo

Los 4 medios de cultivo evaluados permitieron evidenciar que el poder antagonista de los actinomicetos varía dependiendo del medio en el cual se desarrolla la prueba. Así se pudo comprobar que el medio ASMICO, elaborado con biomasa de *Aspergillus* sp., sales y sacarosa fue el que presentó los mejores resultados en comparación a PDA, PCA y AN. En la Figura 1 se puede apreciar el poder antagonista de algunos de los actinomicetos seleccionados, en los diferentes medios de cultivo. Se confirmó que en los 4 medios de cultivo existe inhibición de *Aspergillus* sp. sin embargo fue el medio de cultivo ASMICO el que permitió obtener los mejores resultados de antagonismo.

Pruebas de antagonismo

De las 35 cepas de actinomicetos aisladas, 18 fueron seleccionadas debido a que presentaron inhibición contra la cepa testigo *Aspergillus* sp. (Tabla 2). La respuesta antagonista en los 4 medios de cultivo utilizados se evidencia con la Figura 1. El medio de cultivo ASMICO fue el que presentó las medias más altas con 26,2 mm como tamaño promedio por

la inhibición en el crecimiento del hongo testigo (Figura 2). En base a los mayores tamaños de inhibición provocado contra *Aspergillus* sp. 4 cepas de actinomicetos fueron seleccionadas Act-1, Act-11, Act-17 y Act-22. Estos 4 actinomicetos provocaron la inhibición de *Phytophthora cinnamomi*, reduciendo su crecimiento hasta 10 mm de diámetro en comparación a los 49 mm del control negativo, reduciendo en 39 mm el crecimiento del fitopatógeno testigo (Figura 3).

Evaluación de la capacidad PGPB de actinomicetos

Se confirmó que 8 actinomicetos presentaron capacidad para solubilizar fosfatos. 2 actinomicetos con capacidad para producir sideróforos fueron seleccionados, las cepas Act-1 y Act-22, y debido a que también presentaron poder antagonista, fueron seleccionadas. La cepa Act-11 fue seleccionada debido a la producción de AIA y por ser una cepa con poder antagonista. Y finalmente la cepa Act-17 presentó propiedades para fijar nitrógeno, por ello fue la última en ser seleccionada. Con estos resultados se seleccionaron las 4 cepas que presentaron tanto actividad antifúngica, así como al menos 1 de las propiedades PGPB. En la tabla 3 se resumen las características PGPB de las 18 cepas seleccionadas.

Análisis estadístico

Mediante al análisis ANOVA se confirmó la existencia de diferencias significativas entre los 4 medios evaluados ya que se obtuvo un $p < 0.05$ (Tabla 3), por lo cual se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa. El análisis Tukey evidenció que el medio ASMICO es el único que muestra dicha diferencia (Tabla 4).

Discusión

Debido a las características culturales típicas de los actinomicetos en los diversos medios de cultivo, entre ellos el agar con CMC, que les permiten un crecimiento bien diferenciado con otros grupos microbianos, se pudo lograr un aislamiento sin demasiadas purificaciones, favoreciendo así un proceso más eficiente. Dichos aislamientos fueron favorecidos por la utilización de carboximetilcelulosa (CMC) al 0,5% ya que a pesar de ser una fuente carbonada que limita el crecimiento de gran parte de flora acompañante, sí es asimilable por los actinomicetos (Grigorevski *et al.*, 2005). Mientras que el nitrato de amonio y las demás sales (Sulfato de magnesio, cloruro de calcio, fosfato monopotásico, fosfato dipotásico y cloruro férrico) aportadas por el medio Bushnell Hass (BH) actuaron como fuente nitrogenada y suplemento de micronutrientes, respectivamente. Al utilizar un medio con baja concentración de nutrientes y una fuente carbonada de difícil degradación por la mayoría de flora bacteriana se pudo utilizar la dilución más concentrada 10^{-1} mejorando así los tiempos de aislamiento y purificación de las cepas. A diferencia de autores como Gansean *et al.* (2017), en donde realizó diluciones seriadas hasta 10^{-4} ó 10^{-5} además de utilizar medios altamente enriquecidos con fuentes carbonadas y nitrogenadas e incluso antifúngicos. La tabla 1 revela una gran capacidad por parte de los actinomicetos para excretar enzimas líticas. Estos resultados permiten confirmar una elevada expresión y secreción de enzimas lo cual favorece una mejor respuesta antagonista ya que muchas veces estos metabolitos pueden interactuar directamente sobre fitopatógenos causando su inhibición (Pal *et al.*, 2006). Además, esta característica multienzimática les permite degradar mayor cantidad de sustratos presentes en el suelo

y por lo tanto sobrevivir y adaptarse mejor.

Cuando se comparó la influencia de los 4 medios de cultivo sobre la respuesta antifúngica contra *Aspergillus* sp. se observó con claridad que el nuevo medio de cultivo ASMICO favorece la producción de antifúngicos a pesar que las colonias de los actinomicetos fueron más pequeñas en este medio en comparación a los otros 3. Esto indica claramente que la producción de biomasa microbiana no necesariamente nos indica una mayor producción de antifúngicos. Esto se puede explicar porque el metabolismo microbiano en un medio con alta cantidad de nutrientes se direcciona hacia el crecimiento sin embargo en un medio con baja cantidad de nutrientes se activan rutas metabólicas para la producción de metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas. Esto explicaría el mayor efecto antagonista en el nuevo medio de cultivo. Esta inhibición mostró diferentes comportamientos del hongo testigo ya que, aunque pudo crecer con facilidad en los 4 medios de cultivo estudiados fue en los medios ASMICO y PDA en donde el tamaño de sus colonias fue reducido con mayor notoriedad, minimizando incluso la altura del micelio aéreo. Estos resultados son congruentes con lo demostrado por Grahovac *et al.* (2014) quienes afirmaron que la producción de antifúngicos varía dependiendo de los nutrientes que se utilizan para el crecimiento. Mediante la prueba de HSD-Tukey se confirmó que de los 4 medios de cultivo evaluados fue el medio ASMICO el único que presentó diferencia significativa (Tabla 4), con lo cual se afirma que este nuevo medio de cultivo es un inductor en la producción de antifúngicos en mayor medida que los otros 3 medios comerciales utilizados. Lo cual también está directamente relacionado con el stress nutricional inducido por la

poca cantidad de nutrientes que a su vez provocan la activación de rutas metabólicas que desencadenen en la producción de antimicrobianos (Lino *et al.*, 2016). Debido a la limitación de nutrientes tanto en variedad como en concentración en el medio ASMICO se favoreció el poder antagonista de la mayoría de cepas actinomicetales evaluadas. Las 4 cepas actinomicetales seleccionadas nos permitieron afirmar que dichas cepas producen compuestos antifúngicos capaces de inhibir también el crecimiento de *Phytophthora cinnamomi*. Este poder antagonista se hizo evidente con los 39 mm de reducción en el crecimiento de dicho fitopatógeno. El medio ASMICO fue el más idóneo para realizar dicha selección ya que permitió encontrar una mayor cantidad de cepas actinomicetales con potencial para excretar metabolitos antifúngicos. Ya que si no se hubiese realizado las pruebas de antagonismo en este medio la cantidad de cepas seleccionadas hubiese sido menor.

El 44,4% de actinomicetos presentaron capacidad para solubilizar fosfatos, y fue esta la mejor respuesta de todas las 4 características PGPB evaluadas. Dentro de estas 8 actinobacterias, se encontraron 3 cepas que presentaron los mejores resultados de antagonismo, esto permitió seleccionarlas debido a que son productores de antifúngicos y son capaces de solubilizar fosfatos. Dentro de los microorganismos solubilizadores de fosfatos también se destacan *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. (Joe *et al.*, 2016). Estos microorganismos, así como un gran número de actinobacterias son consideradas promotoras del crecimiento en plantas por lo que es importante su estudio ya que permiten mejorar la producción, así como reducir el consumo de fertilizantes. La evaluación de sideróforos es un factor importante, ya que facilitan el

ingreso de hierro a las plantas. Al evaluar la producción de ácido indol acético AIA, nos permitió seleccionar cepas productoras de esta fitohormona que está directamente involucrada en la diferenciación celular, la división celular, así como en la elongación de las plantas (Goswami *et al.*, 2016). Nuestros resultados confirmaron que la cepa Act-11 es un actinomiceto productor de AIA, por ello y por ser una cepa con poder antagonista esta cepa también fue seleccionada. El Nitrógeno está presente en el suelo de forma abundante, pero en forma no asimilable para las plantas, ya que las plantas lo consumen bajo la forma de amonio (NH_4) y nitrato (NO_3). La conversión de nitrógeno atmosférico N_2 hasta dichas formas asimilables tales como amonio (NH_4) y nitrato (NO_3) es conocido como la fijación de nitrógeno, dicha habilidad está presente en bacterias y arqueas (Das *et al.*, 2015), nuestros resultados permitieron aislar y seleccionar a la cepa Act-17 debido a que se le encontró esta característica y también produce metabolitos antifúngicos. Debido a estos resultados los actinomicetos seleccionados fueron 4 y codificados como Act-1, Act-11, Act-17 y Act-22. Por lo anterior se afirma que es muy importante evaluar diferentes medios de cultivo para una buena selección de cepas actinomicetales productoras de antifúngicos que inhiben tanto a *Aspergillus* sp. así como a *Phytophthora cinnamomi* así como para seleccionarlas como potenciales bacterias promotoras de crecimiento en plantas o también llamadas PGPB. Finalmente, estos resultados nos brindan una técnica sencilla para aislar actinomicetos de cultivos de “vid” los cuales pueden ser utilizados tanto en el biocontrol de fitopatógenos así como estimulantes del crecimiento en plantas, en pro de una agricultura sustentable y con menos agroquímicos.

Conclusiones

Los actinomicetos aislados de cultivos de “vid” *Vitis vinifera* (Vitaceae) en Ica, producen metabolitos antifúngicos capaces de inhibir a *Aspergillus* sp. y *Phytophthora cinnamomi*. Además, estas actinobacterias poseen características que les confiere pertenecer al grupo de bacterias promotoras de crecimiento de plantas PGPB. Es importante utilizar diferentes medios de cultivo para evaluar el poder antagonista de las cepas actinomicetales ya que dicha inhibición puede verse aumentada o disminuida por el tipo y concentración de los nutrientes que se utilicen.

Agradecimiento

Al programa Nacional de Investigación Agraria (PNIA) Ministerio de Agricultura y Riego, por la beca otorgada como financiamiento para el desarrollo del presente trabajo.

A Armando Eneque Puicón por las facilidades brindadas para la obtención del financiamiento y por los aportes en el diseño experimental.

A José Mauricio Larrea, Verónica Sáenz y Luis Hoyos de la Cía. Pluspetrol Norte S.A por las facilidades brindadas para la obtención de la beca.

A los integrantes del Laboratorio de Micología Aplicada-UNMSM por los aportes y recomendaciones durante la etapa experimental y difusión de resultados.

Contribución de los autores

M.L: Diseño y ejecución experimental, análisis de datos, revisión bibliográfica, elaboración y redacción del artículo; EM: Realización de la fase experimental, análisis de datos, revisión y aprobación del artículo. PC: Diseño y seguimiento experimental,

identificación y caracterización de cepas fúngicas, efecto antifúngico, revisión y aprobación del artículo; MA: Recolección de muestras, conceptualización, análisis e interpretación de los resultados, revisión y aprobación del artículo; M.S: Diseño y seguimiento experimental, análisis e interpretación de datos, revisión y aprobación del artículo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses alguno.

Literatura citada

- Berg, G & J. Hallmann.** 2006. Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophyte, Microbial Root Endophytes.
- Celis, J. & I. Gallardo.** 2007. Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético, giberelinas) en cultivos microbianos. Microbiología Industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Cleveland, T.; P. Dowd; A. Desjardins; D. Bhatnagar & P. Cotty.** 2003. United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service research on pre-harvest prevention of mycotoxins and mycotoxigenic fungi in US crops. Pest Manag Sci;59(6-7):629-42.
- Das, N.; A. Kumar & P. Singh.** 2015. Cyanobacteria, pesticides and rice interaction. Biodiverse Conserved 24 (4), 995_1005.
- Dash, N.; A. Kumar; M. Kaushik; G. Abraham & P. Singh.** 2017b. J. Appl Phycol 29 (2), 929-939.
- Dash, N.; M. Kaushik; A. Kumar; G. Abraham & P. Singh.** 2018. J Appl Phycol., 30 (1), 483-493.
- Evangelista, Z.** 2014. Isolation and characterization of soil Streptomyces species as a potential biological control agent against fungal plant pathogens. World Journal of Microbiology and Biotechnology. Vol. 30. 1639 - 1647.
- Galloway, J.; A. Townsend; J. Erisman; M. Bekunda & Z. Freney.** 2008 Science; 320(5878), 889-892.
- Ganesan, P.; A. Rajendran; D. Appadurai; G. Munusamy; M. Paulraj; I. Savarimuthu & A. Naif.** 2017. Isolation and molecular characterization of actinomycetes with antimicrobial and mosquito

- larvicidal properties. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences 6. 209–217.
- Goswami, D.; J. Thakker; P. Dhandhukia; M. Tejada,** 2016. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. Cogent Food Agric 2, 1127500.
- Grahovac, J.; M. Grahovac; J. Dodic; B. Bajic & J. Balaz. 2014. Optimization of cultivation medium for enhanced production of antifungal metabolites by *Streptomyces hygroscopicus*. Crop Protection 65. 143e152.
- Grigorevski, A; R. Nascimento; E. Bonb & R. Coelho.** 2005. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use en the detergent and textile industries. Enzyme and Microbial Technology. 37:272-277.
- Gunmarsson, N.; U.; M. Sosio Mortensen & J. Nielsen.** 2004. Identification of Entner Doudoroff pathway in an antibioticproducing actinomycetes species. Molec. Microbiol. Vol. 52, n° 3, pp. 895-902.
- Holt, J.; N. Krieg; P. Sneath. J. Staley & S. Williams.** 2000. Bergey’s manual of determinative bacteriology, 9th edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Joe, M.; Devara, S.; A. Benson, A & T. Sa.** 2016. Isolation of phosphate solubilizing endophytic bacteria from *Phyllanthus amarus* Schum & Thonn: evaluation of plant growth promotion and antioxidant activity under salt stress. J Appl Res Med Aromat Plants 3,71-77
- Kumar, A.; V. Singh; M. Singh; P. Singh; S. Singh & P. Singh.** 2016b. Isolation of plant growth promoting rhizobacteria and their impact on growth and curcumin content in *Curcuma longa* L. Biocatal Agric Biotechnol 8, 1-7.
- Kumar, A.; H. Verma; V. Singh; P. Singh; S. Singh & W. Ansari.** 2017a. Role of *Pseudomonas* sp. in sustainable agriculture and disease management. In: Meena, V., Mishra P., Bisht J., Pattanayak A. (Eds.), Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture. Springer, Singapore, pp. 195-215.
- Kunova, A.; M. Bonaldi; M. Saracchi; C. Pizzatti, Ch. Xiaoyulong & P. Cortesi.** 2016. Selection of *Streptomyces* against soil borne fungal pathogens by a standardized dual culture assay and evaluation of their effects on seed germination and plant growth. BMC Microbiology 16:272. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0886-1>
- Lino, M., J. León & M. Huamán.** 2016. Evaluación de la capacidad antagonista de un antimicrobiano producido por *Streptomyce* sp. CEPA 13A-2 frente a microorganismos resistentes a B-Lactámicos de origen hospitalario. Revista Peruana de Investigación Materno Perinatal, 5: 28-34. DOI <https://doi.org/10.33421/inmp.201652>
- Mobeen, A.** 2011. Aflatoxins B1 and B2 contamination of peanut and peanut products and subsequent microwave detoxification. J Pharm Nut Sci;1(1).
- Pal, K. & B. McSpadden.** 2006. Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health. Instructor DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
- Picot, A.; M. Doster; M. Islam; K. Callicott; A. Ortega-Beltran & P. Cotty.** 2017. Distribution and incidence of atoxigenic *Aspergillus flavus* VCG in tree crop orchards in California: a strategy for identifying potential antagonists, the example of almonds. Int J Food Microbiol; 265(16): 55–64.
- Simon, P. & I. Tessman.** 1963. Thymidine-requiring mutans of phage T4. Procnatl. Acad Sci. USA. Vol. 50, pp. 526-532
- Singh, M.; D. Singh D; A Gupta, K Deo K; P Singh & A. Kumar.** 2009. “Plant Growth Promoting Rhizobacteria: PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture. Food Security and environmental Management”, Woodhead Publishing, Elsevier, 41. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815879-1.00003-3> 2019
- Valdes, M.; N. Perez; P. Estrada. J. Caballero: J. Peña; P. Normand & A. Hirsch.** 2005. Non-Frankia Actinomycetes Isolated from Surface-Sterilized Roots of *Casuarina equisetifolia* Fix Nitrogen. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 71, nº 1, pp. 445-446.
- Vásquez, P.; C. Holguin & M. Puente.** 2000. Phosphate solubilizing microorganisms associated with rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. Biol. Fertl. Soils. Vol. 30, pp. 460-468.
- Vurukonda, S.; D. Giovanardi & E. Stefani.** 2018. Plant growth promoting and biocontrolactivity of *Streptomyces* spp. as endophytes, Int J Mol Sci. 19. 1-26
- Wani, S.; K. Vinay; S. Varsha & K. Saroj.** 2016. J Crop. 4,162-176.
- Xu, T.; L. Cao & J. Zeng.** 2019. The antifungal action mode of the rice endophyte *Streptomyces hygroscopicus* OsiSh-2 as a potential biocontrol agent against the rice blast pathogen, Pesticide Biochemistry and Physiology. Disponible en:

<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.06.015>.

Acceso: fecha????

Youssef, M. & M. Eissa, 2014. E3J Biotechnol Pharm Res 5 (1), 1-6.

Zhao, J., Q. Xue; G. Shen; L. Xue; J. Duan & D. Wang. 2012. Evaluation of *Streptomyces* spp. for biocontrol of gummy stem blight (*Didymella bryoniae*) and growth promotion of *Cucumis melo* L. Biocontrol Science and Technology Vol. 22, Issue 1. Disponible en <https://doi.org/10.1080/09583157.2011.636481>

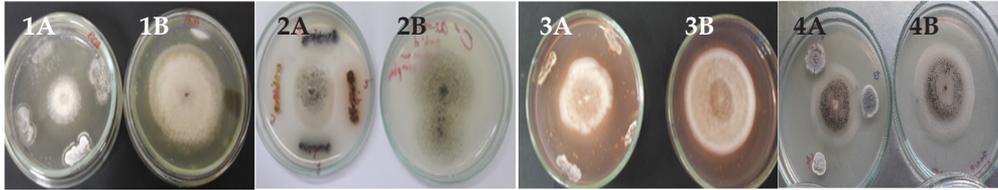


Fig. 1. Respuestas antifúngicas de actinomicetos contra *Aspergillus* sp. en los 4 medios de cultivo. 1: PCA, 2: PDA, 3: ASMICO, 4: AN. Todas las B, indican los controles negativos.

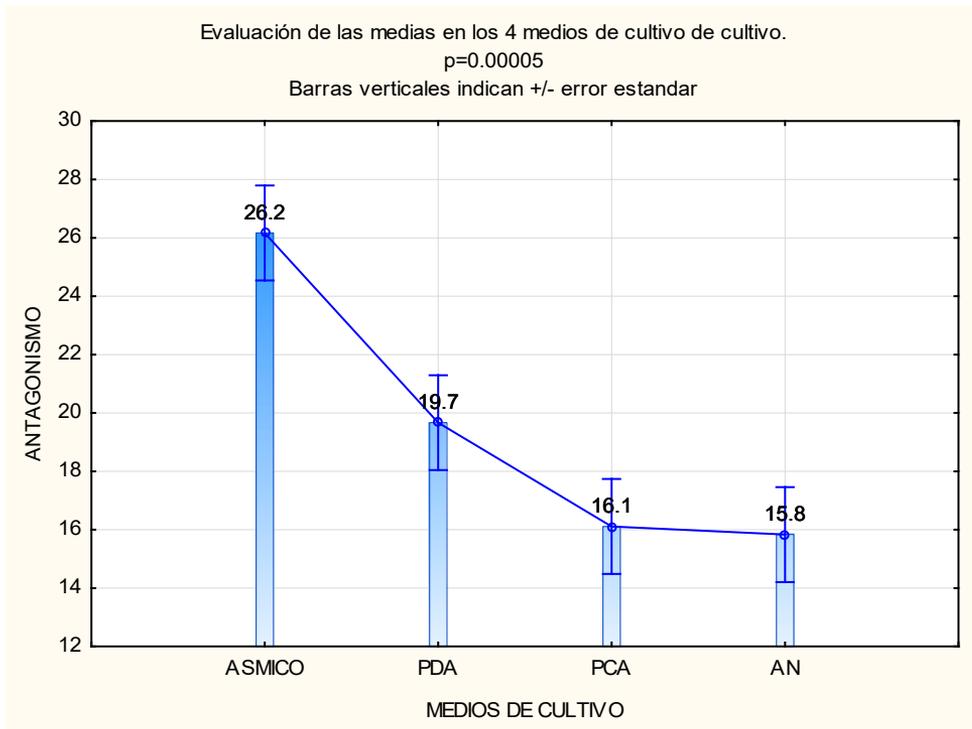


Fig. 2. Comparación de las medias de los antagonismos (parte superior de las barras) obtenidas en cada uno de los medios de cultivo. ASMICO se diferencia de los otros 3 medios comerciales.

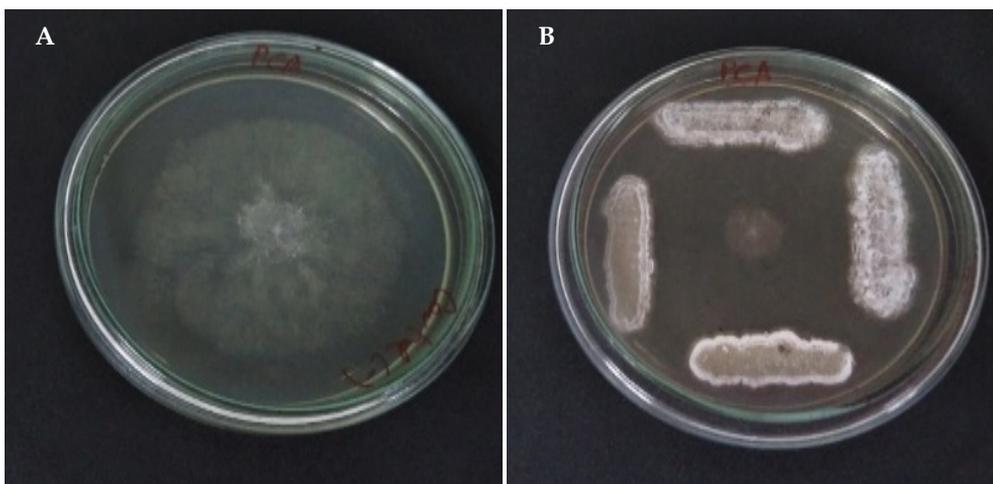


Fig. 3. Inhibición de *Phytophthora cinnamomi* por las 4 cepas de actinomicetos seleccionados. Prueba realizada sobre PCA. A: control negativo: 49 mm B: con actinomicetos, 10 mm.

Tabla 1. Características fenotípicas de las cepas actinomicetales en diferentes sustratos

Cepa	Avena	Lecitina	Caseína	Tween 81	Almidón	CMC 1%
Act-1	+	+	+	-	+	+
Act-2	+	+	+	-	+	+
Act-3	+	+	+	+	+	+
Act-4	+	+	+	-	+	+
Act-5	+	+	+	-	+	+
Act-6	+	+	+	-	+	+
Act-7	+	+	+	+	+	+
Act-8	+	+	+	-	+	+
Act-9	-	-	-	-	-	-
Act-10	+	+	+	-	+	+
Act-11	+	+	+	-	+	+
Act-12	+	+	+	-	+	+
Act-15	+	+	+	-	+	+
Act-16	+	+	+	-	+	+
Act-17	+	+	+	-	-	+
Act-18	+	+	+	-	+	+
Act-19	+	+	+	-	+	+
Act-20	+	+	+	-	+	+
Act-21	-	+	+	-	+	+
Act-22	+	+	+	-	+	+
Act-23	+	+	+	+	+	+

Act-24	+	+	+	-	+	+
Act-25	-	+	+	-	+	+
Act-26	+	-	+	-	+	+
Act-27	-	+	+	+	+	+
Act-28	+	+	-	-	+	+
Act-29	+	+	-	+	+	+
Act-30	+	+	-	-	+	-
Act-31	+	+	+	+	+	+
Act-32	+	+	+	+	+	+
Act-33	+	+	+	+	+	-
Act-34	+	+	-	-	+	-
Act-35	+	-	-	-	+	-
Act-36	+	+	+	-	+	+
Act-37	+	+	+	-	+	+

Tabla 2. Tamaños (mm) obtenidos por la inhibición del crecimiento de *Aspergillus* sp.

*Los valores son el promedio de 3 repeticiones.

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

Tabla 3. Análisis ANOVA donde se confirma la influencia de los medios de cultivo sobre el antagonismo con un $p < 0.05$.

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

* Indica que la respuesta fue significativa, $p < 0,05$ **Tabla 4.** Prueba de Tukey HSD para la variable Antagonismo. Df=68, MS=47.57

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

* Indican que la respuesta fue significativa, $p < 0,05$ **Tabla 5.** Evaluación de las características PGPB en los actinomicetos seleccionados

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

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

