

**EVALUACIÓN “*in - vitro*” DEL POTENCIAL BIOLÓGICO DE LOS  
ACTINOMICETOS AISLADOS DEL SUELO DEL JARDÍN BOTÁNICO DE LA  
UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA FRENTE AL CONTROL DEL  
FITOPATÓGENO EN BANANO *Ralstonia solanacearum*.**

**KATHERINE PEÑA PÉREZ  
LUISA MARÍA CASTAÑO PULGARÍN**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA  
FACULTAD DE TECNOLOGIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
PEREIRA  
2013**

**EVALUACIÓN “*in - vitro*” DEL POTENCIAL BIOLÓGICO DE LOS  
ACTINOMICETOS AISLADOS DEL SUELO DEL JARDÍN BOTÁNICO DE LA  
UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA FRENTE AL CONTROL DEL  
FITOPATÓGENO EN BANANO *Ralstonia solanacearum*.**

**KATHERINE PEÑA PÉREZ  
LUISA MARIA CASTAÑO PULGARÍN**

**Trabajo de grado requisito parcial para optar al título de Químico Industrial**

**Directora  
LILIANA BUENO LÓPEZ  
Lic. Biología y Educación Ambiental  
© Ms.c. en Ecotecnología**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA  
FACULTAD DE TECNOLOGIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
PEREIRA  
2013**

## NOTA DE ACEPTACIÓN

**EVALUACIÓN “*in - vitro*” DEL POTENCIAL BIOLÓGICO DE LOS ACTINOMICETOS AISLADOS DEL SUELO DEL JARDÍN BOTÁNICO DE LA UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA FRENTE AL CONTROL DEL FITOPATÓGENO EN BANANO *Ralstonia solanacearum*.**

**KATHERINE PEÑA PEREZ  
LUISA MARIA CASTAÑO PULGARIN**

El suscrito director y jurados del presente trabajo de grado, una vez revisada la versión escrita y presenciado la sustentación oral, decidimos otorgar la nota de:

\_\_\_\_\_

Con la connotación:

Para la constancia se firma en la ciudad de Pereira hoy \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Directora: \_\_\_\_\_

Lic. Liliana Bueno López  
© Ms.c. en Ecotecnología

Asesor: \_\_\_\_\_

Esp. José Rafael Rodríguez Núñez  
© Ms.c. en Microbiología Agroindustrial

A aquellas personas que sin saberlo, con una palabra o una sonrisa me dieron la motivación para seguir adelante de la mejor forma, a esas personas que siempre me dieron a conocer el orgullo que sentían de cada uno de mis logros y a las personas que con sus criticas sacaron de mi interior las fuerzas para demostrar que muchos de los errores se convierten en las mayores motivaciones.

Grazie a te, mio cuore per essere la persona che ogni donna vuole avere al suo fianco, per essere la luce che ha illuminato la mia strada e per avermi dato una ragione per amare, grazie per ogni sorriso

Katherine

Gracias infinitas a todos aquellos que estuvieron presentes en mi proceso de formación. En especial a mis padres por su apoyo y comprensión en cada paso que di; a mi colega y amiga Stefanya Velásquez por hacer de estos años una experiencia mucho más valiosa; al “Amore” por estar a mi lado en cada uno de los momentos felices y hacer menos difícil cada obstáculo que encontré en el camino. Y finalmente a todos en mi pequeña familia por su compañía incondicional.

Luisa

## **AGRADECIMIENTOS**

Especial agradecimiento a Liliana Bueno López y José Rafael Rodríguez Núñez por sus consejos, dedicación y acompañamiento, que finalmente permitieron el desarrollo de este trabajo

A nuestras compañeras en el macroproyecto por acompañarnos en cada uno de los momentos de nuestro proceso.

A nuestras familias y amigos por su apoyo y compañía incondicional en cada momento.

Al Grupo de Estudio Agrícola (GEA) y todos sus integrantes por acompañarnos en el proceso durante los últimos tres años y ayudarnos a aumentar el gusto y el amor por lo que hacemos.

A la Escuela de Química, porque su apoyo aportó a nuestra formación académica y humana los últimos años.

## LISTA DE TABLAS

	<b>pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Clasificación de actinomicetos según la composición de su pared celular.	20
<b>Tabla 2.</b> Clasificación del género <i>Musa spp.</i>	25
<b>Tabla 3.</b> Pesticidas más empleados en cultivos de banano.	27
<b>Tabla 4.</b> Clasificación de <i>Ralstonia solanacearum</i> según su hospedero.	29
<b>Tabla 5.</b> Tiempos de siembra, ensayos de antagonismo.	35
<b>Tabla 6.</b> Concentración de pesticidas a evaluar.	47
<b>Tabla 7.</b> Morfología cepas de actinomicetos.	51
<b>Tabla 8.</b> Resultados antagonismo 1.	54
<b>Tabla 9.</b> Resumen antagonismo 1.	56
<b>Tabla 10.</b> Porcentajes de interacción por temperatura, antagonismo 1.	57
<b>Tabla 11.</b> Resultados antagonismo 2.	58
<b>Tabla 12.</b> Resumen antagonismo 2.	61
<b>Tabla 13.</b> Porcentajes de interacción por temperatura, antagonismo 2.	62
<b>Tabla 14.</b> Resultados antagonismo 3.	63
<b>Tabla 15.</b> Resumen antagonismo 3.	65
<b>Tabla 16.</b> Porcentajes de interacción por temperatura, antagonismo 3.	66
<b>Tabla 17.</b> Resultados antagonismo 4.	67
<b>Tabla 18.</b> Resumen antagonismo 4.	70

	<b>pág.</b>
<b>Tabla 19.</b> Porcentajes de interacción por temperatura, antagonismo 4.	71
<b>Tabla 20.</b> Recuento de unidades formadoras de colonia, (UFC/mL).	78
<b>Tabla 21.</b> Concentración de la solución madre en UFC/mL.	78
<b>Tabla 22.</b> Prueba de susceptibilidad a pesticidas. Método de Kirby-Bauer.	80
<b>Tabla 23.</b> Prueba de susceptibilidad a pesticidas. Método de Pozos.	81
<b>Tabla 24.</b> Porcentaje de la prueba de susceptibilidad a pesticidas.	84



## LISTA DE FIGURAS

	<b>pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Interacciones microbianas	23
<b>Figura 2.</b> Metodología de aislamiento y clasificación de actinomicetos.	32
<b>Figura 3.</b> Diagrama general antagonismo directo.	37
<b>Figura 4.</b> Recuento de unidades formadoras de colonia (UFC/mL).	40
<b>Figura 5.</b> Metodología, antibiograma método disco – placa.	43
<b>Figura 6.</b> Metodología, antibiograma por el método de pozos.	45
<b>Figura 7.</b> Preparación mezcla de pesticidas a evaluar.	47
<b>Figura 8.</b> <i>Ralstonia solanacearum</i> en medio de cultivo SMSA, vista al estereoscopio.	49
<b>Figura 9.</b> <i>Ralstonia solanacearum</i> en agar nutritivo, vista al estereoscopico.	50
<b>Figura 10.</b> Concurrencia de interacciones microbianas en la temperatura, (SPSS 11.5).	72
<b>Figura 11.</b> Incidencia de las interacciones microbianas con respecto a las colonias en estudio, (SPSS 11.5)	74
<b>Figura 12.</b> Influencia del tiempo de inoculación en la interacción microbiana, (SPSS 11.5)	76
<b>Figura 13.</b> Prueba de susceptibilidad para pesticidas, método de pozos	82

## LISTA DE ANEXOS

	<b>pág.</b>
<b>Anexo A.</b> Preparación de cepas. Vista al estereoscopio.	91
<b>Anexo B.</b> Tipos de interacciones entre poblaciones microbianas.	96
<b>Anexo C.</b> Antagonismo 1.	97
<b>Anexo D.</b> Antagonismo 2.	105
<b>Anexo E.</b> Antagonismo 3.	110
<b>Anexo F.</b> Antagonismo 4.	115
<b>Anexo G.</b> Análisis de contingencia, SPSS 11.5	122

## RESUMEN

En el presente trabajo se establece el potencial de control biológico de los actinomicetos aislados de los ecosistemas guadual y humedal del suelo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira por el Grupo de Estudio Agrícola (GEA).

La marchitez bacteriana o “Moko” del plátano y banano causado por *Ralstonia solanacearum* (Raza 2), es la enfermedad bacteriana más importante de este cultivo en Colombia.

El objetivo de este trabajo de investigación fue evaluar el comportamiento de trece diferentes cepas de actinomicetos previamente aisladas del suelo e identificadas según género, frente al fitopatógeno mencionado con el fin de conocer las interacciones microbianas existentes y su correlación en cuanto a variaciones en la temperatura y tiempo de crecimiento.

Para este fin, se debió realizar un proceso de adaptación de las diferentes cepas a un medio de cultivo sintético, agar nutritivo, con el fin de obtener resultados sin alteraciones en cuanto a la fuente nutricional. Seguido de este proceso, se llevaron a cabo cuatro ensayos de antagonismo directo de la bacteria frente a cada una de las cepas de actinomicetos en estudio, a tres temperaturas diferentes (28°C, 35°C y temperatura ambiente) y cuatro tiempos de inoculación del fitopatógeno diferentes en relación con los actinomicetos. A su vez se considera una duración media de cada ensayo equivalente a doce días en los que la siembra del fitopatógeno se realizó pasados 0,2, 5 y 7 días del crecimiento de cada una de las cepas de los actinomicetos evaluados.

Finalmente se evaluaron dos métodos de antibiograma en dos diferentes densidades microbianas a una temperatura de 28°C, de cada una de las cepas de actinomicetos, con el fin de determinar la susceptibilidad de estos, a los pesticidas que se encuentren insertos en el medio como Mancozeb - Manzate, Lorsban y Roundop, sin tener en cuenta los parámetros ambientales que puedan afectar la resistencia de estas poblaciones a agroquímicos comúnmente usados en el campo de la agroindustria.

## TABLA DE CONTENIDO

	pág.
RESUMEN .....	11
INTRODUCCIÓN.....	15
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....	16
1. MARCO TEÓRICO.....	20
1.1 ACTINOMICETOS.....	20
1.1.1 Generalidades.....	20
1.1.2 Morfología y características .....	20
1.1.3 Importancia de los Actinomicetos.....	22
1.2 CONTROL BIOLÓGICO CON ACTINOMICETOS.....	22
1.2.1 Generalidades.....	22
1.2.2 Tipos de Interacciones Microbianas.....	23
1.3 BANANO, <i>Musa acuminata</i> colla .....	25
1.3.1 Cultivo de Banano en Colombia.....	25
1.3.2 Generalidades y Clasificación .....	25
1.3.3. Mecanismos de Defensa.....	27
1.4 <i>Rashtonia solanacearum</i> “Moko” .....	28
1.4.1 Generalidades.....	28
1.4.2 Morfología .....	29
1.4.3 Clasificación Taxonómica.....	29
1.4.3 Mecanismos de infección.....	31
2. METODOLOGÍA. ....	32
2.1 INFORMACIÓN GENERAL .....	32
2.1.1 Tipo de Investigación .....	32
2.1.2 Ubicación.....	32
2.1.3 Duración.....	32
2.2 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS .....	32

	pág.
2.2.1	Material vegetal y biológico..... 32
2.2.2	Materiales y Equipos..... 34
2.2.3	Medios de Cultivo y Reactivos ..... 34
2.2.4	Pesticidas..... 35
2.3	OBTENCIÓN DE CEPAS ..... 35
2.3.1	Área de Estudio..... 35
2.3.2	Actinomicetos..... 35
2.3.3	<i>Ralstonia solanacearum</i> ..... 35
2.4	PREPARACIÓN DE CEPAS..... 36
2.5	ACTIVIDAD ANTAGONICA ..... 36
2.5.1	Porcentaje de Concurrencia ..... 39
2.6	VIABILIDAD DE LOS ACTINOMICETOS CON RESPECTO A LOS PESTICIDAS EMPLEADOS ..... 40
2.6.1	Recuento de Unidades Formadoras de Colonia (UFC/mL)..... 40
2.6.2	Antibiograma ..... 42
2.5.3	Concentración de pesticidas a emplear en la prueba de sensibilidad .... 47
3.	RESULTADOS Y DISCUSIONES .....50
3.1	PREPARACIÓN DE CEPAS..... 50
3.1.1	<i>Ralstonia solanacearum</i> ..... 50
3.1.2	Actinomicetos..... 51
3.2	ACTIVIDAD ANTAGONICA ..... 54
3.2.1	Antagonismo 1 ..... 54
3.2.2	Antagonismo 2 ..... 59
3.2.3	Antagonismo 3 ..... 64
3.2.4	Antagonismo 4 ..... 68
3.2.5	Análisis estadístico - Actividad antagónica..... 72
3.3	RECUESTO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA (UFC/mL) ..... 78
3.3.1	Recuento de las UFC/mL de la dilución $10^{-5}$ ..... 78

**pág.**

3.4 VIABILIDAD DE LOS ACTINOMICETOS CON RESPECTO A LOS PESTICIDAS EMPLEADOS .....	80
3.4.1 Antibiograma .....	80
CONCLUSIONES .....	86
RECOMENDACIONES .....	87
BIBLIOGRAFÍA .....	88
ANEXOS .....	92

## INTRODUCCIÓN

La microfauna presente en el suelo, entre los que se encuentran grupos de microorganismos como bacterias, hongos y actinomicetos, son responsables de importantes transformaciones físico – químicas dentro de los ciclos naturales de elementos como carbono, oxígeno, azufre, nitrógeno, entre otros, haciéndolos disponibles en el suelo y favoreciendo el crecimiento de las plantas, así como aportando en el control de plagas y enfermedades [1]. En este punto es de resaltar el control biológico, considerado como una alternativa importante dentro del manejo integrado de enfermedades. Tanto hongos como bacterias se han estudiado por su capacidad para controlar patógenos en un gran número de cultivos [2], resaltando especialmente El “moko” en banano, causado por *Ralstonia solanacearum*, enfermedad bacteriana más representativa de este cultivo en Colombia, cubriendo un amplio rango de hospederos y de fácil diseminación.

Tomando la anterior consideración y resaltándola amplia participación de los microorganismos del tipo actinomicetos en la degradación de materia orgánica, promoción de crecimiento vegetal, fijación de nitrógeno en plantas, control biológico de fitopatógenos y procesos de biorremediación natural en suelo [3]; se establecen como materia de estudio en el aislamiento y clasificación según género, en suelos del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira para la posterior búsqueda del potencial de estos organismos en el control biológico de fitopatógenos, como *Ralstonia solanacearum* que a mediano plazo permitan la generación de un inoculante microbiano efectivo para este fin; mediante ensayos de antagonismo directo que evalúen los tipos de interacción microbiana posibles teniendo en cuenta las variables de temperatura - tiempo de crecimiento y finalmente ensayos de viabilidad frente a la presencia de pesticidas propios de un cultivo como el banano de gran influencia económica en el país. De este modo encontrar finalmente una posible solución al uso excesivo de pesticidas en el control de plagas disminuyendo así el impacto ambiental consecuencia de esta actividad agrícola.

## PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Debido a la necesidad de minimizar el impacto ambiental que genera el uso de agroquímicos en el control de plagas y enfermedades, se busca determinar una alternativa de bio - control viable por medio de microorganismos que brinden al cultivo la protección necesaria sin incurrir en la contaminación en agua, suelo y aire ocasionada actualmente por agroquímicos. De acuerdo a esto, se considera entonces la posibilidad de encontrar un grupo de actinomicetos dentro de los aislados del suelo del JBUTP, que pueda ser utilizado en el control biológico del fitopatógeno *Ralstonia solanacearum* en cultivos de interés económico como *Musa acuminata* colla (Banano).

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Se encontrarán poblaciones del grupo de actinomicetos previamente aislados del suelo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira (JBUTP), resistentes a los pesticidas empleados en cultivos de banano, con los cuales se pueda realizar control biológico de forma “*in – vitro*” frente al fitopatógeno *Ralstonia solanacearum*, causante del Moko en banano?



## JUSTIFICACIÓN

La agricultura sostenible permite el uso de técnicas biotecnológicas basadas en el manejo y uso de microorganismos que usualmente viven asociados a plantas [3]. Entre los microorganismos del suelo con un amplio rango de funciones, como la estimulación de los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes, mejoramiento de la salud de la planta y la calidad estructural del suelo, factores claves de la fertilidad del mismo, se encuentran las bacterias filamentosas denominadas actinomicetos; microorganismos que se desarrollan en asociación con las raíces, en la llamada rizósfera y que además están involucrados en la promoción de crecimiento vegetal y juegan un papel fundamental en el control de plagas en gran número de cultivos [3].

La descomposición de la materia orgánica por parte de los actinomicetos, la degradación de compuestos recalcitrantes, de productos químicos agrícolas; así como su importante y representativo uso en el control biológico de plantas y animales, ha sido una de las razones por las que se ha incrementado el control biológico con el fin de disminuir el consumo de agroquímicos altamente contaminantes en la producción de diferentes cultivos, dentro de los cuales se encuentran las musáceas, solanáceas y hortalizas [4].

La importancia de los actinomicetos debido a la amplia gama de metabolitos secundarios que producen los cuales pueden ser empleados para el control de organismos que afecten cultivos de importancia económica como las musáceas (banano), hace que el desarrollo de este trabajo de investigación sea una herramienta de gran importancia, debido a que proporciona información sobre las interacciones microbianas existentes entre una bacteria de alto grado de patogenicidad en plantas y cada una de las poblaciones presentes en una colección representativa de actinomicetos aislados del suelo frente al cambio de variables determinantes en dichas interacciones, como lo son: Temperatura y tiempo de crecimiento de cada uno de los organismos evaluados, puesto que se trabaja con grupos microbianos de diferentes características en cuanto a su desarrollo (morfología, temperatura ideal y velocidad de crecimiento).

El conocimiento de dichas interacciones y la resistencia del grupo de actinomicetos frente a pesticidas de uso normal en los cultivos de banano tipo exportación, facilitan el estudio y permite contemplar la factibilidad, en un futuro a mediano plazo del uso de dichos géneros para la producción de inoculantes microbianos que ejerzan control biológico frente a *Ralstonia solanacearum*.

La escases de antecedentes de investigación de la microfauna presente en el guadual y el humedal del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira (JBUTP), revelo la necesidad de llevar una investigación que arroje información novedosa con respecto a la diversidad microbiana de estos suelos y que permita

establecer sus posibles aplicaciones en procesos productivos en el campo de la agroindustria.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar de forma “*in – vitro*” el potencial de los actinomicetos aislados del suelo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira, como controladores biológicos frente al fitopatógeno en banano *Ralstonia solanacearum*.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar el potencial biocontrolador de los actinomicetos aislados por medio de la evaluación directa de su comportamiento frente al fitopatógeno *Ralstonia solanacearum*; teniendo en cuenta las variables temperatura y tiempo de crecimiento.
- Establecer la viabilidad de los actinomicetos que presentan resistencia, ante la presencia de pesticidas propios del cultivo afectado, obteniendo así los géneros con mayor potencial de sobrevivencia en ambientes contaminados y su posibilidad de control.

## 1. MARCO TEÓRICO.

### 1.1 ACTINOMICETOS

#### 1.1.1 Generalidades

Los actinomicetos son microorganismos procariotas (bacterias), oxigénicos (aeróbios), ácido resistentes y Gram positivos que tienen un rango de temperatura óptima para su desarrollo que reside entre 28 y 37 °C; presentan crecimiento ramificado, el cual sigue el modelo cúbico propio de los hongos y se caracterizan por su morfología filamentosa debido a la capacidad de formación de agregados filiformes, es decir tienden a formar hifas de aproximadamente 0.5 a 1,0 µm de diámetro, que se asemejan a los filamentos fúngicos. El diámetro de los actinomicetos varía entre 0.5 y 2.0 µm (generalmente es menor a 1,0 µm) y forman micelios ramificados que presentan pseudohifas, las cuales pueden subdividirse en células bacterianas aisladas [3].

Los actinomicetos menos evolucionados tienen un desarrollo micelial incompleto, el cual se presenta solo en el crecimiento activo mientras que los más evolucionados presentan dos tipos de micelios: micelio de sustrato (rizoides) y micelio fuera del sustrato (aéreos); cuando presentan esporas, estas se sitúan en el extremo de los micelios aéreos [5].

#### 1.1.2 Morfología y características

Los actinomicetos, presentan una pared celular formada por peptidoglicano, lipoproteínas, lipopolisacáridos, ácidos teicoicos (polímeros de glicerol o ribitol), entre otros. Presentan un porcentaje de guanina – citosina (GC) entre 63% y 75% constituyéndose como el grupo de bacterias con mayor porcentaje en este par de bases nitrogenadas [6], [7].

Los Actinomicetos se dividen en 8 clases diferentes atendiendo a la composición de su pared celular, tabla 1 [6], [7].

Tabla 1. Clasificación de actinomicetos según la composición de su pared celular.

CLASIFICACIÓN	ALGUNOS GÉNEROS
Nocardiformes	<i>Nocardia, Rhodococcus, Nocardioides, Pseudonocardia, Oerskovia, Faenia, Actinopolyspora</i> , entre otros.
Actinomicetos con esporagio multilocular	<i>Geodermatophilus, Dermatophilus y Frankia</i>
Actinoplanetos	<i>Actinoplane, Ampuralliella, Pilimelia, Dactylosporangium y Micromonospora</i>
Streptomicetos	<i>Streptomyces, Kineosporia, Soprichtya y Streptoverticillium</i>
Maduromicetos	<i>Actinomadura, Planobispora, Microbispora, Spirillospora, Microtetraspora, Planomonospora y Streptosporangium</i>
Termomonospora y géneros relacionados	<i>Thermomonospora, Actinosysmna, Nocardiosis y Streptoalloteichus</i>
Termoactinomicetos	<i>Thermoactinomyces</i>
Otros géneros	<i>Glycomyces, Saccharotrix, Kitasatosporia y Kibdelosporangium</i>

Referencia: [6], [7].

Presentan un olor característico a “tierra húmeda”, el cual se debe a compuestos volátiles sintetizados por ellos mismos como el metabolito secundario geosmina; adicionalmente presentan una actividad metabólica alta debido a que producen terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares con las que degradan la materia orgánica de origen vegetal y animal; a su vez son capaces de producir metabolitos secundarios, dentro de los que se incluyen diferentes tipos de compuestos de gran importancia económica como los antibióticos, pigmentos, toxinas, hormonas, inhibidores enzimáticos, agentes inmunomoduladores, antagonistas y agonistas de receptores, agentes antitumorales, y promotores del crecimiento [8], [1].

### 1.1.3 Importancia de los Actinomicetos

Como es mencionado por Franco (2009) [8], este grupo de microorganismos, también ha sido descrito como agentes de biocontrol, por la capacidad de producir enzimas biodegradativas como quitinasas, glucanasas, peroxidasas y otras involucradas en el papel del micoparasitismo que llevan a cabo estos microorganismos.

La alternativa de biocontrol de patógenos que hace parte de la ecología microbiana, según lo mencionado por Farfán y Gutiérrez (2009) [9], está dividida en efectos directos e indirectos. Dentro de los efectos directos del control biológico, se presenta la competencia por nutrientes o por espacio, producción de enzimas líticas, antibióticos y parasitismo, mientras que los efectos indirectos involucran cambios biológicos y bioquímicos en las plantas tales como tolerancia al estrés y mayor absorción de nutrientes inorgánicos; esta última clase de efectos incrementan la resistencia por parte de la planta ante el patógeno [9].

Los estudios de potencial de biocontrol de microorganismos en especial del grupo de actinomicetos, comprenden el conocimiento de características como: competencia significativa en la rizósfera, mantener *in situ* un tamaño poblacional considerable, colonización rápida de la raíz, capacidad de antagonizar patógenos de rápido crecimiento y producción estable de agentes antibacterianos, como es el caso observado en el género *Streptomyces spp*, el cual ha sido descrito como colonizador de la rizósfera, siendo capaz de ejercer biocontrol sobre hongos fitopatógenos, producir sideróforos, sustancias promotoras del crecimiento vegetal *in vitro*, promover la nodulación y ayudar a las bacterias del tipo *Rhizobium spp* a la asimilación de hierro en la fijación de nitrógeno en las leguminosas, constituyendo de forma indirecta la promoción de crecimiento vegetal [9], [8].

## 1.2 CONTROL BIOLÓGICO CON ACTINOMICETOS

### 1.2.1 Generalidades

De acuerdo a Sastoque (2005) [7], los actinomicetos son microorganismos capaces de producir un amplio espectro de antibióticos como metabolitos secundarios y una variedad de enzimas degradadoras de la pared celular de los hongos, tales como: Celulasas, hemicelulasas, quitinasas, amilasas, glucanasas, entre otras.

Dentro de los géneros más estudiados y representativos de este tipo de microorganismos, se encuentran: *Microbispora spp*, *Micromonospora spp*, *Nocardia spp* y *Streptomyces spp* [10].

### 1.2.2 Tipos de Interacciones Microbianas

Las interacciones posibles entre poblaciones microbianas pueden identificarse como interacciones negativas (competencia y amensalismo); positivas (comensalismo, sinergismo y mutualismo); o positivas para una población pero negativas para la otra (parasitismo y depredación) [11].

Entre los mecanismos de acción que utilizan los microorganismos antagonistas para el control biológico, se encuentran: antibiosis, competencia, parasitismo, lisis celular y resistencia inducida en el hospedero [9].

Según Farfán y Gutiérrez (2009) [9], el proceso de antibiosis es el fenómeno mediante el cual un organismo antagonista inhibe o destruye a otro organismo por medio de la producción metabólica de pequeñas moléculas tóxicas volátiles y de enzimas líticas, las cuales disuelven o dañan polímeros estructurales como quitina y  $\beta$ -1,3- glucanos de la pared celular en la mayoría de los hongos fitopatógenos, produciendo un efecto adverso sobre su desarrollo, actividad metabólica y diferenciación.

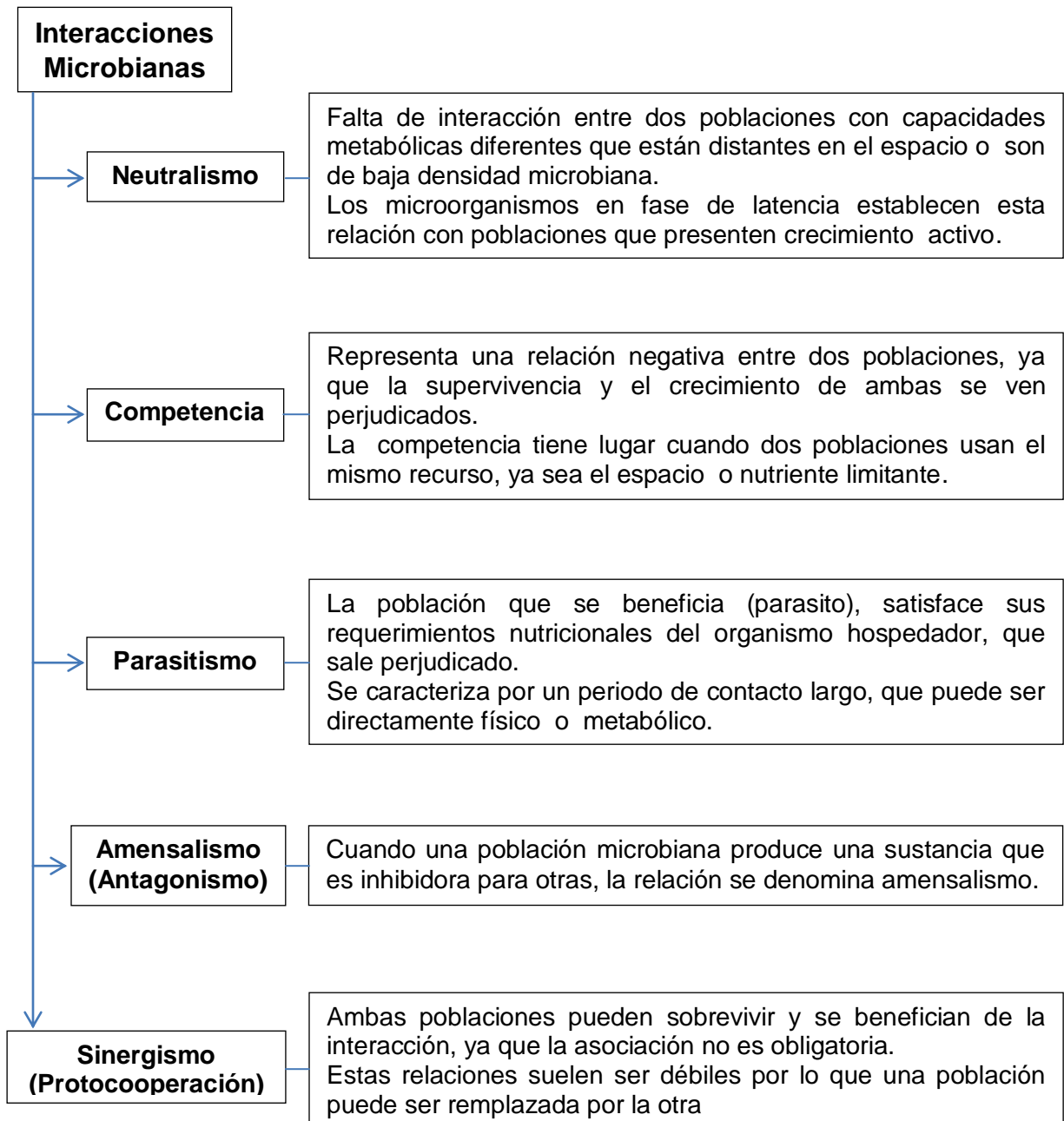
En la antibiosis no se requiere contacto directo entre el microorganismo antagonista y el patógeno, debido a que el efecto negativo que se ejerce es generado por la molécula de antibiótico, razón por la cual la inhibición del crecimiento del fitopatógeno puede continuar incluso después de la muerte del antagonista [9].

Por el contrario el parasitismo involucra un contacto directo entre el hospedero y el parásito, este último sustrae todos los nutrientes necesarios para su desarrollo a partir del albergador e involucra la producción de enzimas hidrolíticas que degradan la pared celular del hospedero [9].

La lisis celular genera la degradación enzimática total o parcial de la pared celular del patógeno, como producto de la actividad enzimática, causando la inhibición de crecimiento microbiano. Así mismo, las plantas también pueden sintetizar enzimas hidrolíticas, las cuales suelen ser inducidas por el ataque de hongos fitopatógenos o por la presencia de sustancias químicas como el etileno. Los hongos también secretan de manera consecutiva o inducida enzimas de este tipo, generando la hidrólisis de la pared celular de otros hongos o de su propia pared, cuando en el medio de cultivo se encuentran como única fuente de carbono [9].

Dentro de las interacciones microbianas de interés en este trabajo tenemos:

Figura 1. Interacciones microbianas



Referencia: [11]



Estudios han demostrado que el género *Streptomyces spp* presenta actividad inhibitoria frente a *Rhizoctonia solani*, *F. oxysporum* y *Ralstonia solanacearum*, lo que convierte a dicho género en una alternativa para el control de fitopatógenos [10], [12].

### **1.3 BANANO, *Musa acuminata* colla**

#### **1.3.1 Cultivo de Banano en Colombia**

Según lo mencionado por FINAGRO (2012) [13], Colombia tiene una larga tradición en la producción de banano en sus dos tipos, criollo o de consumo interno y de tipo exportación; siendo el más representativo para el comercio exterior, el tipo Cavendish Valery.

El banano de exportación, es cultivado en las regiones del Golfo de Urabá comprendido por los departamentos de Antioquia, Córdoba, Chocó y el Tapón del Darién en la frontera con Panamá; en el llamado eje o corredor bananero el cual está conformado por los municipios de Chigorodó, Carepa, Apartadó y Turbo; Esta región representa el 70% de la producción bananera en Colombia, mientras que el 30% de dicha producción está representada por el nororiente del departamento de Magdalena, comprendido por los municipios de Aracataca, Ciénaga, Dibulla, El Reten, Fundación, Riohacha y Santa Marta [13], siendo Santa Marta la primera y principal área de cultivo del banano en Colombia.

El banano criollo o de consumo interno, se produce principalmente en el Valle del Cauca, Tolima y Antioquia, siendo su área cosechada y producción significativamente menor al banano tipo exportación [13].

#### **1.3.2 Generalidades y Clasificación**

Como parte de los cultivos de importancia económica que presentan mayor vulnerabilidad al ataque de fitopatógenos, como la bacteria *Ralstonia solanacearum*, se encuentra el banano, que pertenece al orden Scitamineae, Familia Musaceae cuyos géneros son *Musa spp* y *Ensete spp*.

Según Román et al. [14], el género *Ensete spp*, está representado por siete u ocho especies monocárpicas, con plantas muy vigorosas similares al plátano, principalmente en el sistema foliar, pero a diferencia de estas presenta ramificaciones en el cormo y como consecuencia no produce hijos. Se desarrolla por semillas y su uso es netamente ornamental.

Por otro lado existe una gran diversidad en el género *Musa spp.* Muchas de sus especies son utilizadas tanto en la alimentación humana como en la animal; sin embargo, las fibras y pulpas de algunos bananos silvestres, como *Musa velutina* y *Musa sanguínea* son empleadas en las industrias papeleras y de cordería [14], tabla 2.

Tabla 2. Clasificación del género *Musa spp.*

GENERO	SECCIÓN	ESPECIES
<i>Musa</i>	Australimusa	<i>Musa textilis</i>
	Callimusa	<i>Musa coccines</i>
	Rhodochlamys	<i>Musa omata</i>
	Eumusa	<i>Musa acuminata</i>
		<i>Musa balbisiana</i>
Eumasa x Australimusa	<i>Musa balbisiana x Musa textilis</i>	

Referencia: [14]

Los bananos son plantas herbáceas perennes que requieren una temperatura promedio de 25°C, con una precipitación de (100 -180) mm; necesitan suelos profundos, bien drenados, que retengan humedad como los suelos de textura franca arcillosa a franco arenoso, arcillas livianas friables y drenadas con un pH entre (6.0-7.5) [13]. Pueden alcanzar 6.0 m de altura, sus tallos aéreos están sostenidos por la vainas foliares, formando un pseudotallo de forma cilíndrica, con hojas compuestas, un cormo y un sistema radicular fibroso.

Las raíces brotan en grupos de cuatro, en la superficie del cilindro central del cormo y tienen de 5.0 a 8.0 mm de espesor; varían considerablemente en número, según el estado de salud de la planta encontrándose de 200 a 500 raíces [14].

Las hojas se desarrollan en el centro del pseudotallo y surgen de él en un estado de arrollamiento sumamente apretado, pero en completo desarrollo en el momento de emerger. Aumentan de tamaño hasta un máximo y después declinan bruscamente, poco antes de que el punto vegetativo se transforme en inflorescencias [14].

Las flores son ebracteadas y están dispuestas en fascículos biseriados sobre protuberancias nodales, recubierto cada fascículo por una bráctea decidua. Los nódulos basales de la inflorescencia tienen flores femeninas y los nódulos distales

masculinas; a menudo, uno o más fascículos de flores neutras o intermedias se encuentran presentes, entre las zonas masculinas y femeninas [14].

El eje que sustenta normalmente a las flores masculinas continúa creciendo, mientras los frutos se desarrollan. Las flores femeninas tienen ovarios inferiores triloculares y funcionales así como estaminidios y las flores masculinas tienen ovarios abortivos y estambres bien desarrollados. Los frutos son partenocárpicos y la pulpa se desarrolla principalmente a partir de la pared del ovario, producto de las inducciones de las sustancias del crecimiento [14].

La esterilidad es en parte independiente de la partenocarpia; muchos plátanos comestibles resultan algo fértiles si se les poliniza. Los plátanos silvestres tienen frutos con semillas que se desarrollan únicamente si son polinizados de manera efectiva. Los frutos del plátano, por lo general, son negativamente geotrópicos y la forma del fruto adulto refleja la postura del racimo y la posición de los frutos en este último [14].

La mayoría de los plátanos son estériles, lo que puede estar determinado por la presencia de genes de esterilidad femenina y/o por cambios numéricos o estructurales de los cromosomas, así como por su nivel de ploidía [14].

### **1.3.3. Mecanismos de Defensa**

Dentro de los mecanismos de acción que impiden infecciones en la planta por diferentes patógenos, se encuentran la competencia y la inducción de resistencia sistemática en la planta, los saprofitos que compiten por los nutrientes disponibles en la rizósfera mientras que los patógenos lo hacen por zonas de infección en la raíz. Mediante la resistencia sistemática se induce una respuesta de defensa en la planta por agentes bióticos o abióticos; la raíz puede ser colonizada por microorganismos que desencadenan una secuencia de reacciones de defensa contra el patógeno [9].

Dentro de las formas más empleadas actualmente para el control de plagas que atacan los cultivos de banano, se encuentra el uso de plaguicidas (insecticidas, fungicidas, herbicidas y nematocidas) [15], tabla 3.

Tabla 3. Pesticidas más empleados en cultivos de banano.

PESTICIDA	No. CAS
Clorpirifos	2921 - 88 - 2
Clorotalonil	1897 - 45 - 6
Glifosato	1071 - 83 - 6
Glufosinato de amonio	77182 - 82 - 2
Imidazol / Imidazil	4685 - 14 - 7
Mancozeb	8018 - 01 - 7
Paraquat	4685 - 14 - 7
Propiconazole	60207 - 90 - 1
Tiabendazol	148 - 79 - 8
Tridemorf	24602 - 86 - 6
Zineb	12122 - 67 - 7

Referencia: [15]

## 1.4 *Ralstonia solanacearum* “Moko”

### 1.4.1 Generalidades

*Ralstonia solanacearum* fue descrita en 1896 por Smith [16] como *Bacillus solanacearum* y desde entonces ha tenido diferentes sinónimos como *Pseudomonas solanacearum* [16] y *Burkholderia solanacearum*.

Inicialmente fue descrita causando daño en tomate pepino y patata, y en la actualidad se conoce que afecta a más de 200 especies de plantas que están representadas en 50 familias muy diversas, entre dicotiledóneas y monocotiledóneas, anuales, árboles y arbustos. [16]

Esta bacteria, es causante de la enfermedad denominada “Moko” o “Madura viche”, en cultivos de banano; de acuerdo a lo mencionado en el documento Manejo integrado de plagas de Plátano y Banano [17], la variabilidad en los aislamientos de dicha bacteria, al parecer cambia también su comportamiento epidemiológico y manejo.

Esta bacteria puede infectar todos los órganos de la planta desde las raíces hasta el escapo floral y los síntomas de esta enfermedad pueden variar, según la edad de la planta, medio de transmisión y órgano afectado [17].

En plantas en activo crecimiento, un síntoma inicial es el amarillamiento de las hojas más jóvenes de la planta, seguido por marchitez y secamiento; los síntomas son progresivos desde las hojas más jóvenes hasta las más viejas[17].

#### **1.4.2 Morfología**

En cuanto a su morfología se constituye como un bacilo Gram (-) que macroscópicamente presenta colonias de textura cremosa, forma circular, superficie convexa y borde redondeado cuyo color varía según el medio de cultivo [18].

Como es mencionado por Rodríguez (2007), en cuanto a su morfología esta bacteria puede presentar dos clases de colonias, una fluida (mucoide) debido a la abundante producción de un polisacárido extracelular (EPS), de consistencia lisa, irregular y redonda; mientras que la otra clase, es una colonia de apariencia seca, forma redondeada, translúcida, rugosa no fluida.

#### **1.4.3 Clasificación Taxonómica**

*Ralstonia solanacearum*, es un patógeno de gran importancia en las zonas tropicales y subtropicales. Considerado del género *Ralstonia spp* y ubicado en el dominio bacteria, división Gracillicutes, clase Proteobacteria y subclase  $\beta$  [19], hace referencia a que este fitopatógeno es una especie heterogénea que debe considerarse como un complejo, es decir como un grupo de aislamientos relacionados cuyos miembros individuales pueden representar más de una especie [19].

**Dominio:** Bacteria

**Phyllum:** Proteobacteria

**Clase:** Betaproteobacteria

**Orden:** Burkholderiales

**Familia:** Burkholderiaceae

**Género:** *Ralstonia*

**Especie:** *Ralstonia solanacearum*

## Clasificación Infraespecífica

Este patógeno difiere en el rango de hospederos que ataca debido a su compleja variación en grupos, razas, biovares, biotipos, sub - razas y cepas; también en la distribución geográfica, patogenicidad, relaciones epidemiológicas y propiedades fisiológicas [20].

De acuerdo a su hospedero, se han utilizado las razas y los biovares, como una clasificación informal a nivel subespecífico, tabla 4.

Tabla 4. Clasificación de *Ralstonia solanacearum* según su hospedero.

RAZA	BIOVARES	CULTIVOS QUE ATACA
1	1, 3 o 4	Batata, tomate y solanáceas en general a una temperatura óptima de 35 a 37 °C
2	1 o 3	Plátano, banano triploide y heliconias a una temperatura similar con respecto a la raza 1
3	2	Específica de batata y asociada a algunas solanáceas como <i>S. dulcamara</i> , <i>S. nigrum</i> y <i>S. cinereum</i> (Australia)
4	4	Jengibre
5	-	Mora

Referencia: [21]

Los biovares mencionados son empleados, según la capacidad de producir ácido de varios disacáridos y alcoholes de azúcar.

*Ralstonia solanacearum* es transmitido por el suelo y es causante del “Moko” en diversos cultivos de importancia económica como el banano y el plátano. Según Wei et al (2011) [22], es una enfermedad sistémico – vascular que puede ser controlada por diversos microorganismos benéficos como *Bacillus spp*, *Pseudomona spp*, *Acinetobacter spp* y *Enterobacter spp*, *Stenotrophomonasmaltophilia* y Actinomicetos.

### 1.4.3 Mecanismos de infección

La infección causada en cultivos de tomate y en general a la mayoría de las hortalizas debida a este fitopatógeno, ocurre por medio de la interacción entre el nematodo y la bacteria *Ralstonia solanacearum*, debido a que durante su ataque, dicho fitoparásito causa heridas en el cultivo, facilitando de este modo el ingreso de la bacteria a través de las mismas. La bacteria va progresivamente colonizando los tejidos hasta lograr acceder al sistema vascular, donde se reproduce rápidamente diseminándose por toda la planta y produciendo los típicos síntomas de marchitez. El ciclo se cierra cuando la bacteria vuelve al suelo, en donde se mantiene como organismo saprofito (organismos que obtienen su alimento de materia orgánica en descomposición), hasta que vuelve a infectar a un nuevo hospedero susceptible o mantenerse inadvertida en algún hospedero asintomático durante varios años [23].

Como es mencionado por Guzmán (2011) [24], en plantaciones con varios años de establecidas, es común encontrar comunidades poliespecíficas de nematodos, compuestas por:

- Endoparásitos migratorios como *Radopholus similis* (Cobb) Thorne y *Pratylenchus coffeae* (Sher & Allen).
- Ecto-endoparásitos como *Helicotylenchus multicinctus* (Cobb) y *H. dihystreria* (Cobb).
- Endoparásitos sedentarios como *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood y *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood.
- Semi-endoparásito como *Rotylenchulus reniformis*.

Sin embargo, la frecuencia y abundancia de cada una de estas especies puede cambiar según sea la culti-variedad de banano o plátano y las condiciones agroecológicas [24].

## **2. METODOLOGÍA.**

### **2.1 INFORMACIÓN GENERAL**

#### **2.1.1 Tipo de Investigación**

Aplicación del conocimiento

#### **2.1.2 Ubicación**

El proceso investigativo fue desarrollado en las instalaciones de la Universidad Tecnológica de Pereira, Escuela de Química, Laboratorio de Microbiología.

#### **2.1.3 Duración**

Este proyecto de investigación fue llevado a cabo en un lapso de tiempo de 1 año, comprendido entre Diciembre del 2011 y Noviembre de 2012.

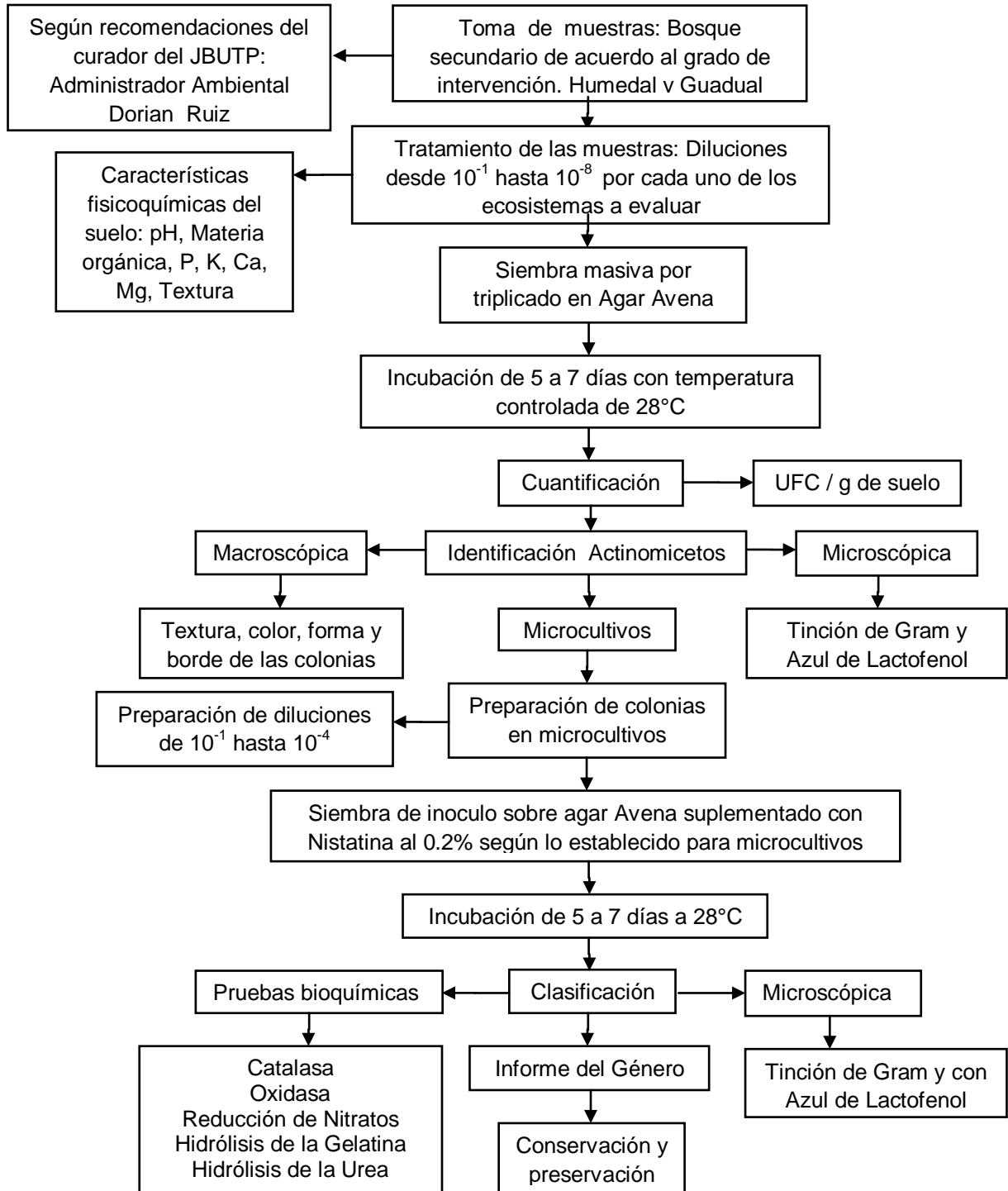
### **2.2 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS**

#### **2.2.1 Material vegetal y biológico**

Las cepas de actinomicetos evaluadas fueron obtenidas a partir del suelo de los ecosistemas gradual y humedal del JBUTP, mediante un proceso previo de aislamiento y clasificación según género en el proyecto “Clasificación de actinomicetos aislados del suelo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira para usos en biorremediación” a cargo del Grupo de Estudio Agrícola (GEA) y financiado por la Vicerrectoría de Investigaciones, Innovación y Extensión [2]. El cual se desarrolló siguiendo la metodología especificada en la figura 2.



Figura 2. Metodología de aislamiento y clasificación de actinomicetos.



Referencia: [2]

El fitopatógeno *Ralstonia solanacearum* fue proporcionado por el Centro de Investigaciones del Banano (CENIBANANO) - Asociación de Bananeros de Colombia (AUGURA); Carepa, Antioquia, identificada con los códigos M5P y M10P de acuerdo al protocolo interno.

### **2.2.2 Materiales y Equipos**

Los equipos son suministrados por el Laboratorio de Microbiología adscrito a la Escuela de Química de la Universidad Tecnológica de Pereira.

- Balanza analítica OHAUS, modelo PA214 (Lindavista, México D.F, México).
- Cabina de seguridad biológica C4, modelo FLC 120 (Cali, Valle del Cauca; Colombia).
- Incubadora con temperatura controlada de 28°C, VELP Scientifica, modelo FOC 225 i (Usmate, Monza and Brianza, Italia)
- Vortex Fisher Scientific (Barrington, Illinois, USA).
- Incubadora con temperatura controlada de 35°C, MLW, NURFÜR 110 v~, Tipo BSU 3, Numero 74089
- Estereoscopio UNICO ZM181HF
- Microscopio LEICA DM500, CH-9435 Heerbrugg (Switzerland)
- Autoclave JP SELECTA, Número de Serie 0464704
- Autoclave MODEL 25X-1

### **2.2.3 Medios de Cultivo y Reactivos**

Los reactivos fueron suministrados por la Escuela de Química de la Universidad Tecnológica de Pereira y el Grupo de Estudio Agrícola GEA.

- Agar Nutritivo para microbiología, Merck KGaA
- Caldo Nutritivo, Merck KGaA
- Peptona de Caseína, Merck KGaA, 64271 Darmstadt.

#### **2.2.4 Pesticidas**

- Mancozeb – Manzate: Uniphos Colombia PlantLimited
- Lorsban: Dow AgroSciences de Colombia
- Roundop: Bayer Cropscience

### **2.3 OBTENCIÓN DE CEPAS**

#### **2.3.1 Área de Estudio**

El aislamiento de las cepas de actinomicetos se desarrolló a partir del suelo de los ecosistemas guadua y humedal del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira; para este proceso se llevó a cabo una toma de muestra compuesta a una profundidad de 20 cm y una distancia mínima de 3m de cualquier sendero peatonal. De acuerdo a la topografía observada para el ecosistema guadua ly teniendo en cuenta la cantidad de individuos por hectárea, se obtuvieron 3 subecosistemas: G1 (Densidad alta plano), G2 (Densidad baja inclinado) y G3 (Densidad alta inclinado); como es observado en el proyecto “Clasificación de los actinomicetos aislados del suelo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira para usos en biorremediación” [2].

#### **2.3.2 Actinomicetos**

Las 13 cepas de actinomicetos evaluadas fueron tomadas del cepario conformado a partir del proyecto “Clasificación de los actinomicetos aislados del suelo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira para usos en biorremediación” [2].

#### **2.3.3 *Ralstonia solanacearum***

La cepa fue entregada por el Centro de Investigaciones del Banano (CENIBANANO)- Asociación de Bananeros de Colombia (AUGURA; Carepa, Antioquia, en el medio de cultivo Brilliant Green (BG) / Verde Brillante (VB) seleccionado para su conservación e identificada con los códigos M - 5P y M - 10P de acuerdo a protocolo interno de la entidad.

## 2.4 PREPARACIÓN DE CEPAS

Teniendo en cuenta que los ensayos de antagonismo directo se desarrollan en un medio común a ambos organismos se establecen repiques de cada una de las cepas en un medio no selectivo (Agar nutritivo para microbiología, Merck KGaA), con el objetivo de eliminar cualquier ventaja en cuanto a la disponibilidad de nutrientes [25]. Este procedimiento se realiza aproximadamente con un mes de anticipación al inicio de los ensayos de bio – control para lograr de este modo una adaptación a las condiciones de incubación.

## 2.5 ACTIVIDAD ANTAGONICA

Con el fin de establecer los tipos de interacción microbiana posibles entre cada una de las trece cepas de actinomicetos a evaluar y el fitopatógeno *Ralstonia solanacearum*, se realiza un total de cuatro ensayos de antagonismo por un tiempo aproximado de doce días; donde se tendrán en cuenta las variables de temperatura y tiempo de crecimiento considerando la favorabilidad de cada uno de los microorganismos y un ambiente común a estos: 28°C (Temperatura de crecimiento ideal para actinomicetos), 35°C (Temperatura de crecimiento ideal para *Ralstonia solanacearum*) y temperatura ambiente [25].

En cuanto al tiempo de siembra se establecen diferencias con respecto a los resultados de cada interacción, teniendo en cuenta el desarrollo metabólico acelerado del fitopatógeno que puede alterar su capacidad infectante en el tiempo, en comparación a los actinomicetos evaluados [25], tabla 5.

Tabla 5. Tiempos de siembra, ensayos de antagonismo.

Tiempo de siembra		
Antagonismo	Actinomicetos (Días)	<i>Ralstonia solanacearum</i> (Días)
1	0	0
2	0	2
3	0	5
4	0	7

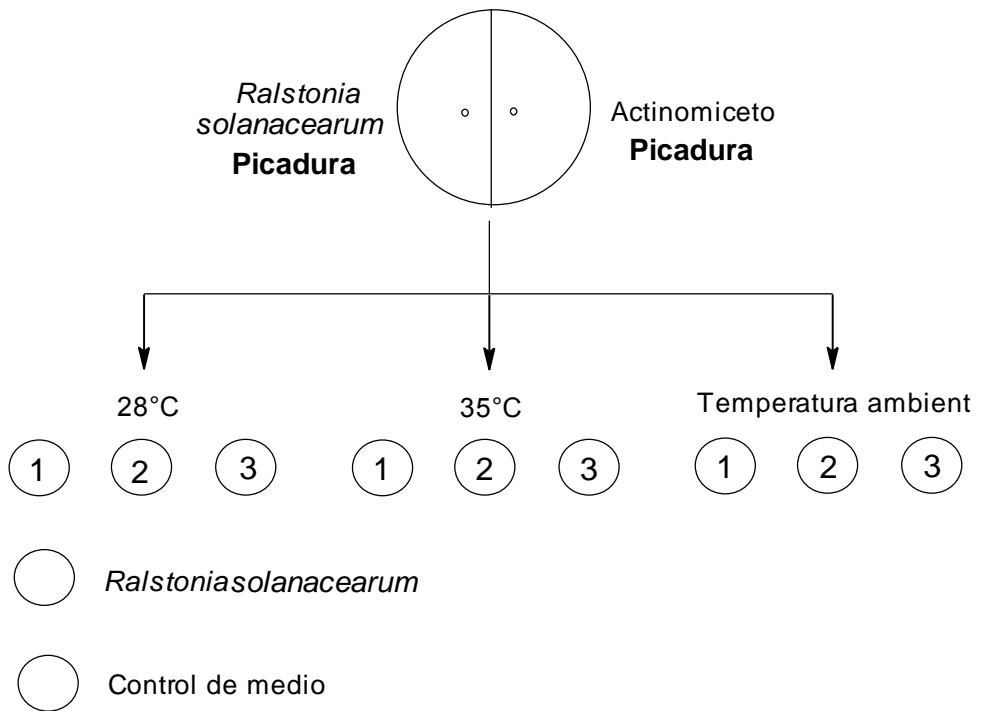
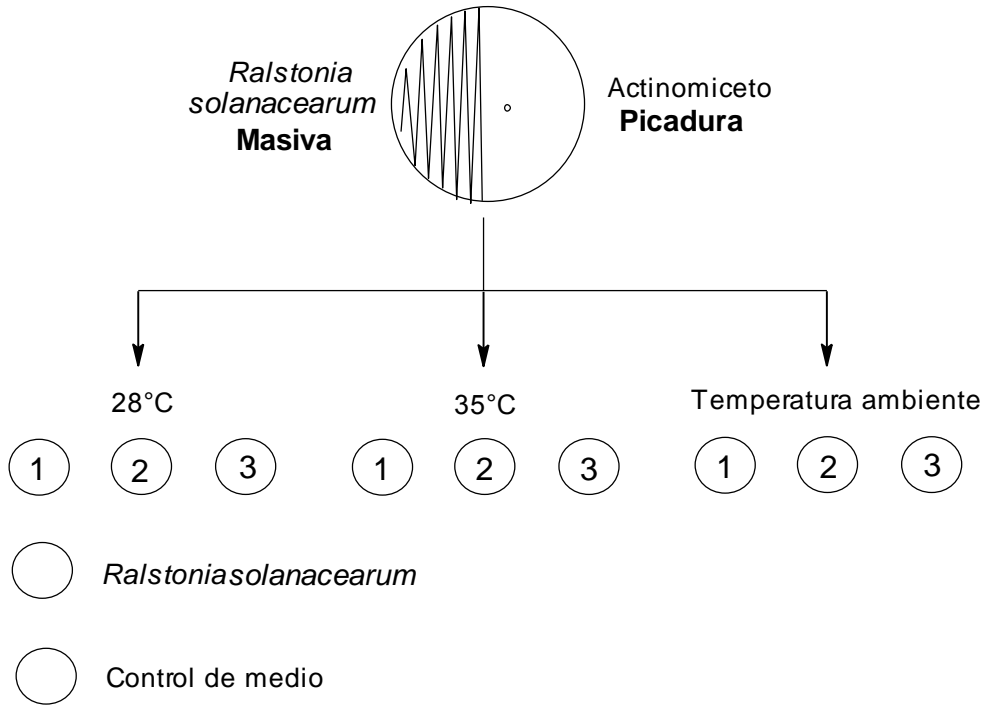
En cada caso, la caja de Petri es fraccionada a la mitad y el actinomiceto es sembrado mediante la técnica de picadura en un fragmento de la misma; mientras

que el fitopatógeno (*Ralstonia solanacearum*) es sembrado en forma masiva y picadura con el fin de establecer el tipo de interacción con la mayor claridad posible en el segmento restante.

Igualmente se establece una caja control de crecimiento de *Ralstonia solanacearum*, con el fin de establecer sus características bajo las condiciones de cada ensayo.

Cada uno de los ensayos se realiza por triplicado con cada colonia en cada una de las variables a evaluar, tal y como se muestra en la figura 3.

Figura 3. Diagrama general antagonismo directo.



Referencia: Autoras

### 2.5.1 Porcentaje de Concurrencia

El número de veces que se repite cada una de las interacciones microbianas presentes en las temperaturas evaluadas para cada una de las poblaciones microbianas estudiadas se determina por medio del porcentaje de concurrencia, teniendo en cuenta que:

$$13 \text{ Colonias} = 100 \%$$

De esta forma, se determina el porcentaje de colonias que presenten algunas de las interacciones microbianas evaluadas en cada una de las temperaturas en estudio, así:

$$\textit{Amensalismo, } 28^{\circ}\text{C} = 6 \text{ Colonias}$$

$$\% \textit{ Concurrencia} = 6 \text{ Colonias} \times \frac{100 \%}{13 \text{ Colonias}}$$

$$\% \textit{ Concurrencia} = 46.15 \%$$

$$\textit{Competencia, } 28^{\circ}\text{C} = 3 \text{ Colonias}$$

$$\% \textit{ Concurrencia} = 3 \text{ Colonias} \times \frac{100 \%}{13 \text{ Colonias}}$$

$$\% \textit{ Concurrencia} = 23.08 \%$$

$$\textit{Neutralismo, } 28^{\circ}\text{C} = 4 \text{ Colonias}$$

$$\% \textit{ Concurrencia} = 4 \text{ Colonias} \times \frac{100 \%}{13 \text{ Colonias}}$$

$$\% \textit{ Concurrencia} = 30.77 \%$$

Teniendo en cuenta el procedimiento anterior, se continúa realizando el cálculo de los porcentajes de concurrencia de cada integración microbiana en las temperaturas evaluadas (35°C y temperatura ambiente).

## **2.6 VIABILIDAD DE LOS ACTINOMICETOS CON RESPECTO A LOS PESTICIDAS EMPLEADOS**

Después de establecer las cepas de actinomicetos con potencial de biocontrol frente al fitopatógeno *Ralstonia solanacearum*, se debe conocer la densidad de población de cada una de las cepas, con el fin de determinar cuantitativamente y cualitativamente el efecto que ejercen diferentes concentraciones de pesticida sobre una densidad microbiana previamente establecida. De esta forma, se determina una concentración en términos de UFC/mL de suspensión de microorganismos, en la cual los actinomicetos con potencial de biocontrol puedan coexistir en un ambiente en el que exista presencia de pesticidas.

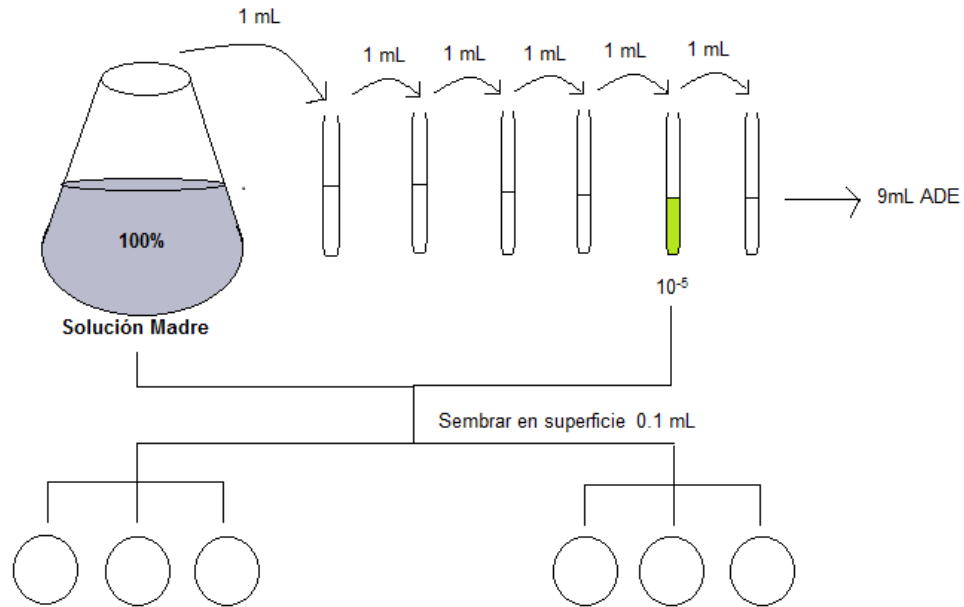
Para la determinación de la densidad microbiana de cada una de las cepas de actinomicetos, se emplea como técnica de cuantificación el recuento de unidades formadoras de colonia (UFC/mL), debido a la tendencia de estos microorganismos a formar pellets al ser inoculados en medios de cultivo líquido, por lo que no es recomendable emplear métodos espectrofotométricos ya que no se determina la turbidez como producto de un conglomerado de organismos sino como la interferencia producida por uno solo en suspensión, dificultando así la cuantificación y la determinación de la longitud de onda correspondiente a la mayor absorbancia por parte del organismo [25].

### **2.6.1 Recuento de Unidades Formadoras de Colonia (UFC/mL)**

Se desarrolla el recuento de unidades formadoras de colonia (UFC/mL) de las 13 cepas de actinomicetos evaluadas, con el fin de conocer la concentración de la población microbiana a emplear en la prueba de sensibilidad frente a diferentes concentraciones de mezcla de pesticidas, siguiendo la metodología mostrada en la figura 4.



Figura 4. Recuento de unidades formadoras de colonia (UFC/mL).



Referencia: Autoras

Pasados 5 días de incubación, con el valor del recuento en dicha dilución, se procede a determinar la concentración en la solución madre empleada haciendo uso de la ecuación 1, la cual es demostrada haciendo uso del concepto de equivalencia entre un ácido y una base o entre una especie oxidante y una especie reductora, así:

$$Eq_{ox} = Eq_{red} \text{ ó } Eq_{ac} = Eq_{base}$$

Teniendo en cuenta que el concepto de Normalidad es el número de equivalente de la especie por litro de solución, se tiene que:

$$N_{ox} \times V_{S,ox} = N_{red} \times V_{S,red}$$

Siendo la Normalidad una forma de expresar la concentración de una solución, se puede reemplazar por C, de la siguiente forma:

Ecuación 1. Determinación de la concentración con respecto al volumen empleado.

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

En donde:

$C_1$  y  $C_2$ , son las concentraciones expresadas en cualquier unidad, como Normalidad, Molaridad, etc.

$V_1$  y  $V_2$ , son los respectivos volúmenes de las soluciones empleadas.

Para el fin del recuento empleado, las variables presentan el siguiente significado:

$V_1$ = Volumen de la solución Madre

$V_2$ = Volumen adicionado en la siembra

$C_1$ = Concentración en UFC/mL de la suspensión madre (Concentración de interés)

$C_2$ = Concentración de la dilución  $10^{-5}$

El recuento de unidades formadoras de colonia, se realiza en la dilución  $10^{-5}$  para cada una de las cepas de actinomicetos con el fin de determinar la concentración de la solución madre a partir de esta, haciendo uso de la ecuación 1.

La determinación de la concentración de cada una de las colonias en términos de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL) para la dilución evaluada, se lleva a cabo por medio de la ecuación 2.

Ecuación 2. Determinación de concentración en UFC/mL

$$\text{Concentración} = \frac{(\text{Promedio recuento}) \times (\text{Inverso del factor de Dilución})}{0.1}$$

## 2.6.2 Antibiograma

La determinación de la sensibilidad de las cepas de actinomicetos evaluadas frente a pesticidas, fue desarrollada por medio de dos métodos de antibiograma (Método disco-placa o Kirby Bauer y el Método de pozos) y a dos densidades microbianas diferentes,  $10^{-5}$  y solución madre (100%), respectivamente.

Las diferentes concentraciones de microorganismo empleadas se establecieron con el fin de evidenciar hasta qué punto interfiere dicha densidad en el medio, con respecto a la resistencia de estas poblaciones frente a una mezcla de pesticidas en proporciones 1:1:1, haciendo uso de métodos con procedimientos diferentes.

### Método de antibiograma Disco- Placa (Kirby Bauer)

En este método de antibiograma, el microorganismo es inoculado en la superficie de una caja de Petri con agar, en donde se ubican discos impregnados con una

concentración conocida de antibiótico o para el caso particular de este ensayo, mezcla de los tres pesticidas a evaluar. Durante el periodo de incubación, el antibiótico se difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del mismo [26].

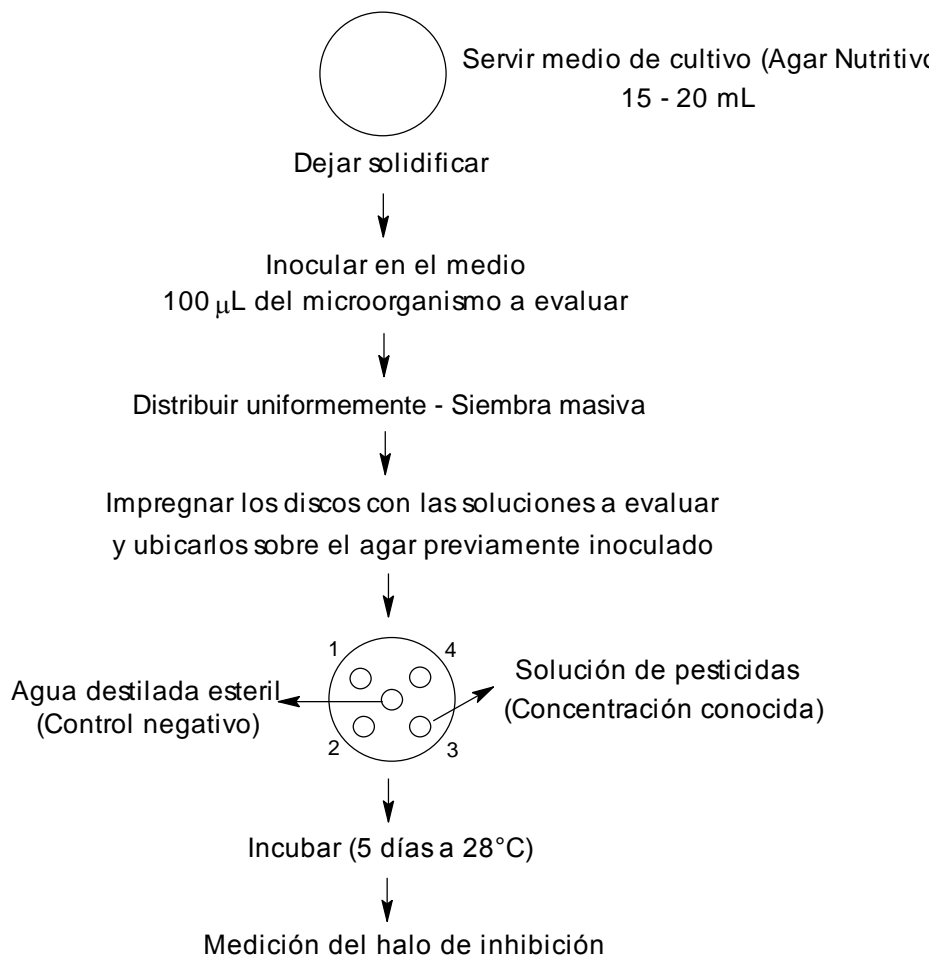
## **Metodología**

Se adiciona un volumen de 15 a 20mL de agar nutritivo en una caja de Petri, para posteriormente sembrar por superficie 0.1 mL de la suspensión de microorganismos correspondiente a la dilución  $10^{-5}$ , realizada a partir de la solución madre a la cual se le determinó con antelación la concentración expresada como UFC/mL.

Se ubican finalmente 5 discos sobre la caja de Petri previamente inoculada, empleando pinzas estériles. Cuatro de los discos a emplear son impregnados con la mezcla de pesticidas en diferentes concentraciones y uno es utilizado como blanco, el cual se humedece con agua destilada estéril.

Finalmente se oprimen los discos suavemente con la pinza para asegurar un buen contacto con el medio, tal y como se muestra en la figura 5.

Figura 5. Metodología, antibiograma método disco – placa.



Referencia: Autoras

### Método de antibiograma por pozos

Se basa en la difusión de una solución compuesta en proporción 1:1:1 de tres pesticidas diferentes desde el pozo a través de una capa de agar que ha sido inoculada con una población microbiana de densidad específica.

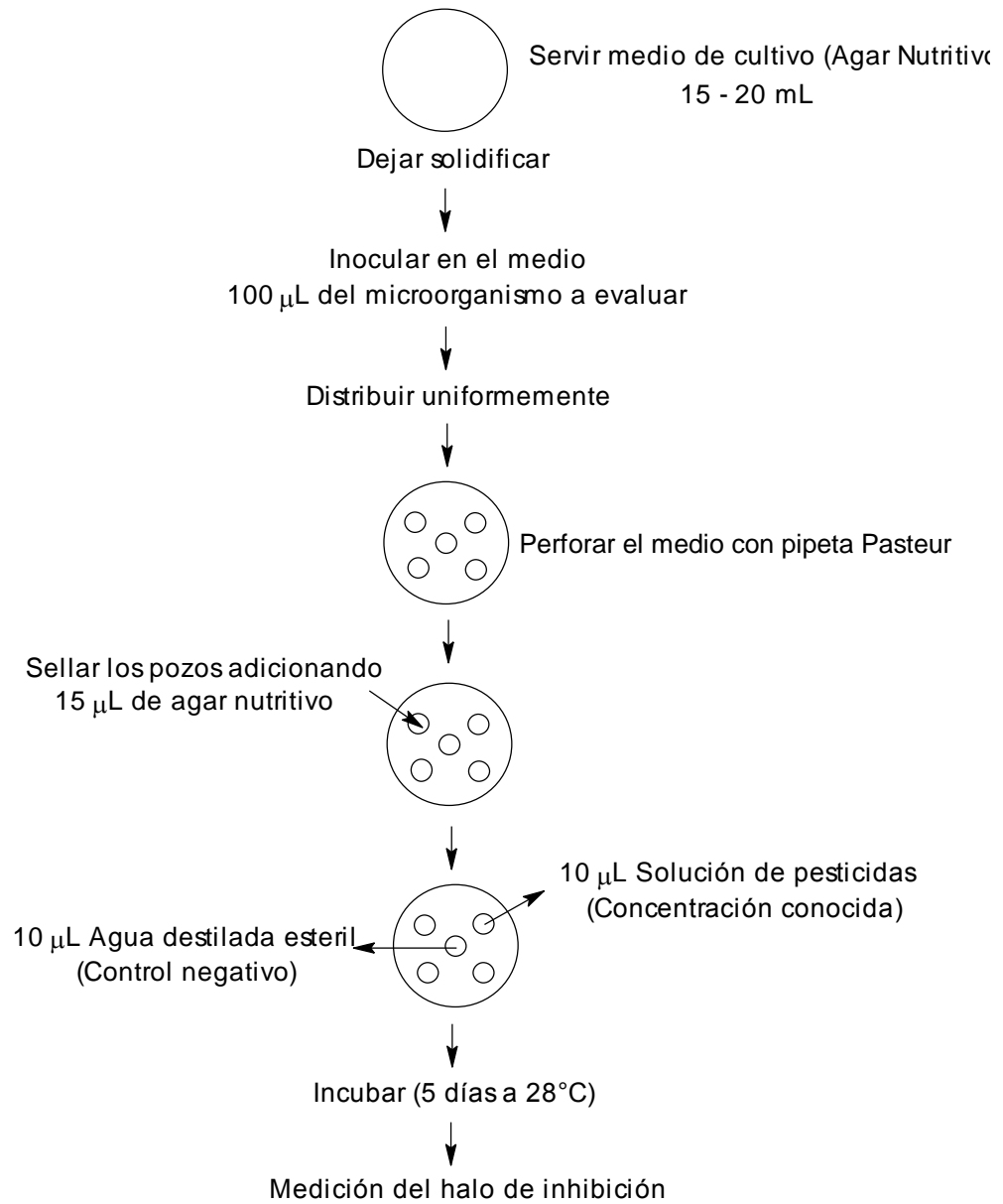
La respuesta obtenida en el ensayo es una zona clara o halo de inhibición del crecimiento en torno a los pozos. La base cuantitativa del ensayo es la relación entre el diámetro de la zona de inhibición y lo establecido por la NCCLS – M24 para actinomicetos [18], [27].

## **Metodología**

Adicionar un volumen de 15 a 20mL de agar nutritivo en una caja de Petri, posteriormente sembrar en superficie 0.1 mL de suspensión de microorganismo a la cual se le determinó con antelación su concentración expresada en UFC/mL.

Realizar sobre el agar sólido 5 perforaciones (pozos), con pipeta Pasteur previamente estéril, adicionar 15 $\mu$ L de medio con el fin de sellar los pozos y posteriormente agregar 10 $\mu$ L de solución de pesticidas de acuerdo a las concentraciones a evaluar, tal y como se muestra en la figura 6.

Figura 6. Metodología, antibiograma por el método de pozos.



Referencia. Autoras

A continuación se establecen parámetros generales para ambos métodos:

**Medio de Cultivo:** Agar nutritivo

**Inóculo:** Para la prueba de sensibilidad a pesticidas para el método de pozos, se siembra una suspensión madre de microorganismo empleada en la cuantificación de la densidad microbiana equivalente al 100 %.

En el ensayo con el método Disco – Placa se trabaja con una suspensión correspondiente a la dilución  $10^{-5}$  producto del consecutivo realizado a partir de la solución madre.

**Incubación:** Se lleva a cabo durante 12 días con una temperatura controlada de 28°C, establecida para el crecimiento óptimo de actinomicetos.

No se hace necesario llevar a cabo el ensayo con temperaturas de incubación diferentes ya que la acción de los pesticidas a evaluar no depende de esta variable.

**Lectura:** Después de 5 días de incubación a 28°C, se mide el diámetro del halo de inhibición correspondiente a la circunferencia formada alrededor del pozo o disco con mezcla de pesticidas generado como consecuencia a la ausencia de crecimiento de la población evaluada. La longitud obtenida y expresada en milímetros (mm), es comparada posteriormente con los estándares; los cuales determinaran si el pesticida permite o no el crecimiento del organismo en los cultivos. La interpretación de los resultados puede realizarse en función de los estándares NCCLS – M24 para actinomicetos [27].

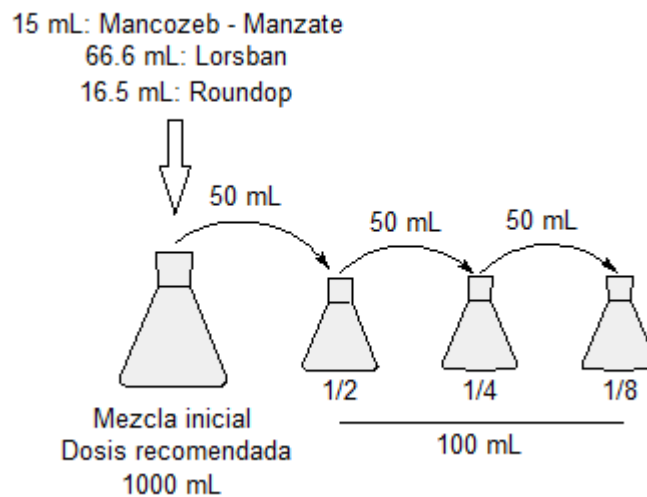
### **2.5.3 Concentración de pesticidas a emplear en la prueba de sensibilidad**

De acuerdo a los principios activos y a los usos más frecuentes de los diferentes pesticidas en cultivos de banano, se establece trabajar con una mezcla de tres de estos, a cuatro concentraciones diferentes, de acuerdo a la tabla 6:

Tabla 6. Concentración de pesticidas a evaluar.

Pesticida	Dosis recomendada
Mancozeb - Manzate	2.0 - 2.5 Kg/Ha
Lorsban	3.0 – 5.0 mL/L H <sub>2</sub> O
Roundop	3.0 – 5.0 L/Ha

Figura 7. Preparación mezcla de pesticidas a evaluar.



Referencia: Autoras

La solución de pesticidas empleada como mezcla inicial se compone de las dosis recomendadas por el fabricante para el cultivo en estudio por hectárea; fue preparada con el objetivo de observar la resistencia de cada uno de los 13 actinomicetos frente a las condiciones normalmente encontradas en un suelo cultivado; de igual forma se establecieron 3 diluciones a partir de esta, para determinar la influencia del gradiente de concentración con respecto a la resistencia de cada cepa.



## Preparación soluciones de pesticidas

De acuerdo a las concentraciones de pesticidas a evaluar, se prepara una solución madre correspondiente a 1 L de cada uno por separado con el fin de ajustar las concentraciones en mezcla posteriormente.

Las mezclas fueron preparadas en agua destilada estéril, inicialmente a una concentración dos veces mayor a la dosis recomendada para el cultivo de banano, de acuerdo a los cálculos:

$$1 \text{ ha} = 10000 \text{ m}^2$$

$$V_{(\text{ha de suelo}-20 \text{ cm profundidad})} = 10000 \text{ m}^2 \times 0.2 \text{ m}$$

$$V_{(\text{ha de suelo}-20 \text{ cm profundidad})} = 2000 \text{ m}^3$$

- **Manzate – Mancozeb:** (Doble de concentración recomendada)

$$1000 \text{ mL} \times \frac{5.0 \text{ kg}}{2000 \text{ m}^3} \times \frac{1 \text{ m}^3}{1000 \text{ L}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{1000 \text{ g}}{1 \text{ Kg}} = 2.5 \times 10^{-3} \text{ g}$$

- **Lorsban:** (Un medio de la concentración recomendada)

$$1000 \text{ mL} \times \frac{2.5 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} = 2.5 \text{ mL}$$

- **Roundop:** (Doble de concentración recomendada)

$$1000 \text{ mL} \times \frac{10.0 \text{ L}}{2000 \text{ m}^3} \times \frac{1 \text{ m}^3}{1000 \text{ L}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \times \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} = 5 \mu\text{L}$$

Para la preparación de la mezcla inicial de pesticidas, se toman volúmenes de cada una de las diluciones a 1 L previamente preparadas de acuerdo a la tabla 6, con el fin de obtener una solución en la cual cada uno de los pesticidas a emplear se encuentre la dosis recomendada.

Posteriormente se realizan diluciones sucesivas de la mezcla, hasta obtener las diferentes concentraciones a evaluar en ensayos de sensibilidad.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 3.1 PREPARACIÓN DE CEPAS

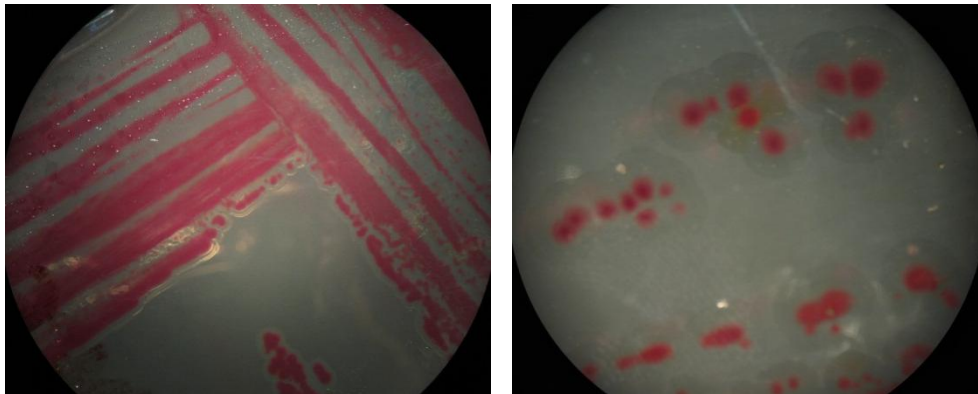
Al establecer una serie de repiques de cada una de las cepas objeto de estudio en un medio de cultivo generalizado (Agar nutritivo), se evidencian cambios en cuanto a la morfología macroscópica de cada población consecuencia del cambio en la fuente nutricional. Dentro de estas encontramos variaciones en el color, forma y textura, por lo que se hizo necesaria la confirmación parcial de las cepas por medio de tinción de gram, estableciendo de nuevo la morfología de cocos Gram (+) para los actinomicetos y de bacilos Gram (-) para el fitopatógeno.

A continuación se presentan imágenes en donde se evidencia la morfología macroscópica de cada una de las cepas antes y después del cambio en la fuente nutricional.

##### 3.1.1 *Ralstonia solanacearum*

Las colonias del fitopatógeno en estudio sembradas en el medio selectivo SMSA muestran crecimiento en forma circular con superficie convexa y de borde redondeado que presenta un color rosa oscuro, de apariencia cremosa y con formación de un halo de tono blanquesino alrededor de la misma, figura 8.

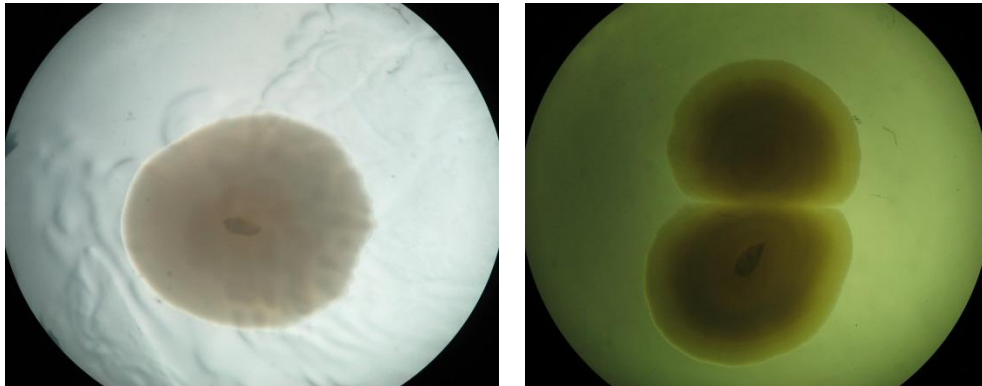
Figura 8. *Ralstonia solanacearum* en medio de cultivo SMSA, vista al estereoscopio.



Referencia: Autoras

Al realizar el cambio de *Ralstonia solanacearum* a un medio de cultivo generalizado (Agar nutritivo) se obtienen colonias en forma circular, con superficie plana convexa, de borde redondeado, color amarillo claro y textura cremosa, figura 9.

Figura 9. *Ralstonia solanacearum* en agar nutritivo, vista al estereoscópico.



Referencia: Autoras

### 3.1.2 Actinomicetos

A continuación se muestran imágenes al estereoscopio de cada una de las cepas en estudio, sembradas en un medio de cultivo selectivo (**Agar avena suplementado con nistatina 0.2% - A**), tomadas del proyecto [2], junto a imágenes al estereoscopio de las cepas sembradas en un medio de cultivo generalizado (**Agar nutritivo - B**).

Cada cepa de actinomicetos evaluada presenta un código específico que aclara su procedencia. Tomando como ejemplo:

#### Colonia JBUTP\_GEA\_G\_A000

**JBUTP:** Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira.

**GEA:** Grupo de Estudio Agrícola – Adscrito a la Escuela de Química.

**G - H:** Ecosistema de procedencia (Guadual o Humedal).

**A000:** Actinomiceto, seguido de la numeración correspondiente para cada cepa.

Tabla 7. Morfología cepas de actinomicetos

G_A011	<b>Avena</b>				
	<b>Borde</b>	<b>Color</b>	<b>Apariencia</b>	<b>Superficie</b>	<b>Forma</b>
	Ondulado	Abano	Seca	Umbilicada	Irregular
	<b>Nutritivo</b>				
	<b>Borde</b>	<b>Color</b>	<b>Apariencia</b>	<b>Superficie</b>	<b>Forma</b>
Ondulado	Amarillo	Seca	Umbilicada	Irregular	
G_A023	<b>Avena</b>				
	<b>Borde</b>	<b>Color</b>	<b>Apariencia</b>	<b>Superficie</b>	<b>Forma</b>
	Ondulado	Abano	Seca	Umbilicada	Irregular
	<b>Nutritivo</b>				
	<b>Borde</b>	<b>Color</b>	<b>Apariencia</b>	<b>Superficie</b>	<b>Forma</b>
Espiculado	Amarillo	Seca	Plana	Fusiforme	
G_A012	<b>Avena</b>				
	<b>Borde</b>	<b>Color</b>	<b>Apariencia</b>	<b>Superficie</b>	<b>Forma</b>
	Filamentosa	Negro	Seca	Plana	Filamentosa
	<b>Nutritivo</b>				
	<b>Borde</b>	<b>Color</b>	<b>Apariencia</b>	<b>Superficie</b>	<b>Forma</b>
Ondulado	Café claro	Seca	Plana	Irregular	
G_A013	<b>Avena</b>				
	<b>Borde</b>	<b>Color</b>	<b>Apariencia</b>	<b>Superficie</b>	<b>Forma</b>
	Ondulado	Negro	Seca	Plana	Irregular
	<b>Nutritivo</b>				
	<b>Borde</b>	<b>Color</b>	<b>Apariencia</b>	<b>Superficie</b>	<b>Forma</b>
Ondulado	Amarillo	Seca	Plana	Irregular	
G_A014	<b>Avena</b>				
	<b>Borde</b>	<b>Color</b>	<b>Apariencia</b>	<b>Superficie</b>	<b>Forma</b>
	Redondeado	Blanco con gris	Fluida	Convexa	Circular
	<b>Nutritivo</b>				
	<b>Borde</b>	<b>Color</b>	<b>Apariencia</b>	<b>Superficie</b>	<b>Forma</b>
Lobulado	Amarillo	Corrugada	Plana	Irregular	

Tabla 7. Morfología de las cepas de actinomicetos (Continuación)

G_A015	<b>Avena</b>				
	<b>Borde</b>	<b>Color</b>	<b>Apariencia</b>	<b>Superficie</b>	<b>Forma</b>
	Ondulado	Habano	Seca	Plana	Irregular
	<b>Nutritivo</b>				
	<b>Borde</b>	<b>Color</b>	<b>Apariencia</b>	<b>Superficie</b>	<b>Forma</b>
	Ondulado	Habano	Seca	Plana	Irregular
H_A016	<b>Avena</b>				
	<b>Borde</b>	<b>Color</b>	<b>Apariencia</b>	<b>Superficie</b>	<b>Forma</b>
	Redondeado	Negro	Seca	Plana	Irregular
	<b>Nutritivo</b>				
	<b>Borde</b>	<b>Color</b>	<b>Apariencia</b>	<b>Superficie</b>	<b>Forma</b>
		Amarillo	Cremosa	Plana	Irregular
H_A017	<b>Avena</b>				
	<b>Borde</b>	<b>Color</b>	<b>Apariencia</b>	<b>Superficie</b>	<b>Forma</b>
	Redondeado	Negro	Seca	Plana	Circular
	<b>Nutritivo</b>				
	<b>Borde</b>	<b>Color</b>	<b>Apariencia</b>	<b>Superficie</b>	<b>Forma</b>
	Lobulado	Amarillo	Cremosa	Plana y rugosidad en el centro	Irregular
H_A018	<b>Avena</b>				
	<b>Borde</b>	<b>Color</b>	<b>Apariencia</b>	<b>Superficie</b>	<b>Forma</b>
		Negro	Seca	Plana	Puntiforme
	<b>Nutritivo</b>				
	<b>Borde</b>	<b>Color</b>	<b>Apariencia</b>	<b>Superficie</b>	<b>Forma</b>
	Ondulado	Amarillo	Cremosa	Plana-Convexa	Circular
H_A019	<b>Avena</b>				
	<b>Borde</b>	<b>Color</b>	<b>Apariencia</b>	<b>Superficie</b>	<b>Forma</b>
	Lobulado	Blanco	Seca	Plana	Irregular
	<b>Nutritivo</b>				
	<b>Borde</b>	<b>Color</b>	<b>Apariencia</b>	<b>Superficie</b>	<b>Forma</b>
	Ondulado	Amarillo	Seca	Umbilicada	Irregular
H_A020	<b>Avena</b>				
	<b>Borde</b>	<b>Color</b>	<b>Apariencia</b>	<b>Superficie</b>	<b>Forma</b>
	Filamentoso	Gris	Seca	Plana	Puntiforme
	<b>Nutritivo</b>				
	<b>Borde</b>	<b>Color</b>	<b>Apariencia</b>	<b>Superficie</b>	<b>Forma</b>
	Lobulado	Gris claro	Seca	Plana-Convexa	Irregular

Tabla 7. Morfología de las cepas de actinomicetos (Continuación)

H_A021	<b>Avena</b>				
	<b>Borde</b>	<b>Color</b>	<b>Apariencia</b>	<b>Superficie</b>	<b>Forma</b>
	Ondulado	Gris	Seca	Plana-Convexa	Circular
	<b>Nutritivo</b>				
	<b>Borde</b>	<b>Color</b>	<b>Apariencia</b>	<b>Superficie</b>	<b>Forma</b>
Ondulado	Amarillo	Seca	Plana-Convexa	Circular	
H_A022	<b>Avena</b>				
	<b>Borde</b>	<b>Color</b>	<b>Apariencia</b>	<b>Superficie</b>	<b>Forma</b>
	Redondeado	Negro	Seca	Plana-Convexa	Circular
	<b>Nutritivo</b>				
	<b>Borde</b>	<b>Color</b>	<b>Apariencia</b>	<b>Superficie</b>	<b>Forma</b>
Redondeado	Café	Fluida	Plana-Convexa	Circular	

Las imágenes representativas de cada colonia en los medios evaluados se encuentran en el anexo A.

## 3.2 ACTIVIDAD ANTAGONICA

Dentro de las interacciones microbianas de interés en este trabajo y encontradas en los diferentes ensayos tenemos:

Neutralismo, sinergismo (Protocooperación), competencia, amensalismo (Antagonismo) y parasitismo, cuya influencia positiva o negativa para las poblaciones involucradas se establece en el anexo B, [11].

### 3.2.1 Antagonismo 1

Teniendo en cuenta las variables, tiempo y temperatura de crecimiento ideal para cada uno de los microorganismos en estudio, así como una simulación en ambiente real. Se establece el primero de cuatro ensayos de antagonismo directo bajo el siguiente parámetro:

**Tiempo de siembra:** Día cero para ambos microorganismos.

Los resultados obtenidos para este ensayo se ordenan en la tabla 8.

Tabla 8. Resultados antagonismo 1.

<b>Antagonismo 1</b>		
<b>Colonia</b>	<b>Género</b>	<b>Tipo de Interacción</b>
<b>28°C</b>		
JBUTP_GEA_G_A011	<i>Actinopolyspora spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_G_A023	<i>Actinopolyspora spp.</i>	Amensalismo
JBUTP_GEA_G_A012	<i>Nocardia spp.</i>	Amensalismo
JBUTP_GEA_G_A013	<i>Nocardia spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_G_A014	<i>Nocardia spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_G_A015	<i>Actinobispora spp.</i>	Amensalismo
JBUTP_GEA_H_A016	<i>Nocardia spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A017	<i>Streptomyces spp.</i>	Amensalismo
JBUTP_GEA_H_A018	<i>Streptomyces spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A019	<i>Streptomyces spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A020	<i>Streptomyces spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_H_A021	<i>Nocardiopsis spp.</i>	Amensalismo
JBUTP_GEA_H_A022	<i>Nocardia spp.</i>	Amensalismo
<b>Temperatura Ambiente</b>		
JBUTP_GEA_G_A011	<i>Actinopolyspora spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_G_A023	<i>Actinopolyspora spp.</i>	Amensalismo
JBUTP_GEA_G_A012	<i>Nocardia spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_G_A013	<i>Nocardia spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_G_A014	<i>Nocardia spp.</i>	Amensalismo
JBUTP_GEA_G_A015	<i>Actinobispora spp.</i>	Sinergismo
JBUTP_GEA_H_A016	<i>Nocardia spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A017	<i>Streptomyces spp.</i>	Amensalismo
JBUTP_GEA_H_A018	<i>Streptomyces spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_H_A019	<i>Streptomyces spp.</i>	Amensalismo
JBUTP_GEA_H_A020	<i>Streptomyces spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A021	<i>Nocardiopsis spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_H_A022	<i>Nocardia spp.</i>	Neutralismo
<b>35°C</b>		
JBUTP_GEA_G_A011	<i>Actinopolyspora spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_G_A023	<i>Actinopolyspora spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_G_A012	<i>Nocardia spp.</i>	Competencia

Tabla 8. Resultados antagonismo 1 (Continuación).

JBUTP_GEA_G_A013	<i>Nocardia spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_G_A014	<i>Nocardia spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_G_A015	<i>Actinobispora spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_H_A016	<i>Nocardia spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_H_A017	<i>Streptomyces spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_H_A018	<i>Streptomyces spp.</i>	Amensalismo
JBUTP_GEA_H_A019	<i>Streptomyces spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A020	<i>Streptomyces spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A021	<i>Nocardiosis spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_H_A022	<i>Nocardia spp.</i>	Amensalismo

**Neutralismo:** El comportamiento neutral observado para un grupo de cepas de actinomicetos en cada una de las temperaturas evaluadas, muestra una escasa interacción entre las dos colonias, observándose que la presencia de estos en el medio, no ocasiona ningún tipo de alteración en cuanto al crecimiento de la otra. Sin embargo, se observa que las colonias JBUTP\_GEA\_H\_A013 y JBUTP\_GEA\_H\_A016, en el ensayo llevado a cabo a la temperatura de 35°C presentan una formación de metabolitos secundarios evidenciado por un cambio en la coloración del medio, el cual visualmente no afecta el crecimiento de las colonias. Esto puede deberse a las diferencias en las características metabólicas de los organismos, a la densidad de cada una de las poblaciones participantes o a su ubicación en el espacio [11].

**Amensalismo:** En las temperaturas evaluadas se observa que esta relación microbiana se evidencia por medio del crecimiento de cada una de las colonias de actinomicetos en el espacio anteriormente colonizado por el fitopatógeno. Observándose una disminución en el crecimiento de la bacteria por efecto de la presencia del actinomiceto en el medio, sin descartar la posibles producción de metabolitos secundarios que faciliten o aceleren el resultado de la relación y a su vez la satisfacción de los requerimientos nutricionales del actinomiceto gracias al contacto directo con el organismo hospedador [11].

En esta relación microbiana se observa que la temperatura a la cual fueron llevados los ensayos no interfiere en el resultado de la relación microbiana, puesto que en las tres diferentes temperaturas el patrón de respuesta de los microorganismos es el mismo.



**Competencia:** Se establece una competencia por espacio, evidenciándose una relación negativa para ambos microorganismos puesto que la supervivencia y crecimiento de una se ve afectada por la presencia de la otra [11].

Como consecuencia de dicha competencia se observa una deformación en el crecimiento de las colonias, encontrándose que a 28°C la colonia JBUTP\_GEA\_H\_A020 y a 35°C la colonia JBUTP\_GEA\_G\_A015, presentan una competencia desfavorable para el actinomiceto puesto que el fitopatógeno evidencia un crecimiento mayor al contacto con las cepas anteriormente mencionadas.

**Sinergismo:** Tanto el fitopatógeno como el actinomiceto presentan crecimiento positivo sin dejar evidencias de diferenciación entre una población y otra, lo que implica una posible relación de sinergismo en donde ambos organismos puedan verse beneficiados. Teniendo en cuenta que normalmente estas relaciones son débiles y a menudo alguna de las poblaciones puede verse remplazada por otra [11].

De acuerdo a lo anterior se establecen finalmente las colonias de actinomicetos con mayor potencial de actividad antagónica bien sea por competencia, amensalismo o parasitismo teniendo en cuenta que ambos organismos se inocularon al mismo tiempo y se evaluaron en tres temperaturas diferentes, tabla 9.

Tabla 9. Resumen antagonismo 1.

Antagonismo 1			
Colonia	Tipo de interacción		
	28°C	Ambiente	35°C
JBUTP_GEA_G_A011	Neutralismo	Competencia	Competencia
JBUTP_GEA_G_A023	Amensalismo	Amensalismo	Neutralismo
JBUTP_GEA_G_A012	Amensalismo	Neutralismo	Competencia
JBUTP_GEA_G_A013	Competencia	Neutralismo	Competencia
JBUTP_GEA_G_A014	Competencia	Amensalismo	Neutralismo
JBUTP_GEA_G_A015	Amensalismo	Sinergismo	Competencia
JBUTP_GEA_H_A016	Neutralismo	Neutralismo	Competencia
JBUTP_GEA_H_A017	Amensalismo	Amensalismo	Competencia
JBUTP_GEA_H_A018	Neutralismo	Competencia	Amensalismo
JBUTP_GEA_H_A019	Neutralismo	Amensalismo	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A020	Competencia	Neutralismo	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A021	Amensalismo	Competencia	Competencia
JBUTP_GEA_H_A022	Amensalismo	Neutralismo	Amensalismo

Teniendo en cuenta que en la producción de un inoculante microbiano, que permita la eliminación del fitopatógeno en estudio posterior a su colonización en el cultivo de interés (banano) [25]. La interacción microbiana de mayor impacto en la erradicación del organismo sería el amensalismo por lo cual las colonias de mayor potencial de control en este tipo de actividad antagonica para este ensayo son JBUTP\_GEA\_G\_A023, JBUTP\_GEA\_H\_A017y JBUTP\_GEA\_H\_A022 por evidenciar la misma reacción frente a *Ralstonia solanacearum* en dos de las temperaturas evaluadas; siendo estas 28°C y temperatura ambiente para JBUTP\_GEA\_G\_A023 - JBUTP\_GEA\_H\_A017 y 28°C - 35°C para JBUTP\_GEA\_H\_A022.

A su vez las colonias JBUTP\_GEA\_H\_A012, JBUTP\_GEA\_H\_A014, JBUTP\_GEA\_H\_A018, JBUTP\_GEA\_G\_A015 y JBUTP\_GEA\_G\_A021 presentan un potencial de biocontrol intermedio al mostrar interacciones tanto de amensalismo como de competencia por espacio [11], en al menos una de las temperaturas en estudio.

Finalmente las colonias JBUTP\_GEA\_G\_A011, JBUTP\_GEA\_G\_A013, JBUTP\_GEA\_G\_A016 y JBUTP\_GEA\_G\_A020 no demuestran actividad significativa al presentar únicamente interacciones de competencia y neutralismo que no mostrarían una eficiencia significativa en el control del fitopatógeno [25] más allá de un uso estrictamente preventivo que permita al actinomiceto ejercer un dominio previo del espacio disponible antes de la llegada del fitopatógeno.

De acuerdo a la tabla 9, se observa que las mayores interacciones por amensalismo se dieron a 28°C, el mayor número de interacciones de tipo competencia por espacio se encontraron a una temperatura de 35°C, finalmente la mayor cantidad de relaciones de neutralismo estuvo concentrada en el ensayo a temperatura ambiente, interacción que no representa un valor significativo con respecto al control biológico de *Ralstonia solanacearum*, al no establecer efecto alguno en su desarrollo en el medio.

Los porcentajes de concurrencia de cada interacción microbiana a las temperaturas evaluadas, se presentan en la tabla 10.

Tabla 10. Porcentajes de interacción por temperatura, antagonismo 1.

Interacción directa		
Amensalismo	28°C	46.15%
	35°C	15.38%
	T. Ambiente	30.77%

Tabla 10. Porcentajes de interacción por temperatura, antagonismo 1 (Continuación).

<b>Competencia</b>	<b>28°C</b>	23.08%
	<b>35°C</b>	53.85%
	<b>T. Ambiente</b>	23.08%
<b>Neutralismo</b>	<b>28°C</b>	30.77%
	<b>35°C</b>	30.77%
	<b>T. Ambiente</b>	38.46%
<b>Sinergismo</b>	<b>28°C</b>	0%
	<b>35°C</b>	0%
	<b>T. Ambiente</b>	7.69%

### 3.2.2 Antagonismo 2

Teniendo en cuenta las variables, tiempo y temperatura de crecimiento ideales para cada uno de los microorganismos en estudio, así como una simulación en ambiente real. Se establece el segundo ensayo de antagonismo directo bajo los siguientes parámetros:

**Tiempo de siembra:** Día cero para las colonias de actinomicetos y día dos para *Ralstonia solanacearum*.

Las interacciones observadas en el ensayo se ordenan en la tabla 11.

Tabla 11. Resultados antagonismo 2.

<b>Antagonismo 2</b>		
<b>Colonia</b>	<b>Género</b>	<b>Tipo de Interacción</b>
<b>28°C</b>		
JBUTP_GEA_G_A011	<i>Actinopolyspora spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_G_A023	<i>Actinopolyspora spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_G_A012	<i>Nocardia spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_G_A013	<i>Nocardia spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_G_A014	<i>Nocardia spp.</i>	Neutralismo

Tabla 11. Resultados antagonismo 2 (Continuación).

JBUTP_GEA_G_A015	<i>Actinobispora spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A016	<i>Nocardia spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A017	<i>Streptomyces spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A018	<i>Streptomyces spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A019	<i>Streptomyces spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A020	<i>Streptomyces spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A021	<i>Nocardiosis spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_H_A022	<i>Nocardia spp.</i>	Neutralismo
<b>Temperatura Ambiente</b>		
JBUTP_GEA_G_A011	<i>Actinopolyspora spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_G_A023	<i>Actinopolyspora spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_G_A012	<i>Nocardia spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_G_A013	<i>Nocardia spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_G_A014	<i>Nocardia spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_G_A015	<i>Actinobispora spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A016	<i>Nocardia spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_H_A017	<i>Streptomyces spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A018	<i>Streptomyces spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A019	<i>Streptomyces spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A020	<i>Streptomyces spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A021	<i>Nocardiosis spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_H_A022	<i>Nocardia spp.</i>	Amensalismo
<b>35°C</b>		
JBUTP_GEA_G_A011	<i>Actinopolyspora spp.</i>	Amensalismo
JBUTP_GEA_G_A023	<i>Actinopolyspora spp.</i>	Amensalismo
JBUTP_GEA_G_A012	<i>Nocardia spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_G_A013	<i>Nocardia spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_G_A014	<i>Nocardia spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_G_A015	<i>Actinobispora spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A016	<i>Nocardia spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A017	<i>Streptomyces spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_H_A018	<i>Streptomyces spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A019	<i>Streptomyces spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A020	<i>Streptomyces spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A021	<i>Nocardiosis spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A022	<i>Nocardia spp.</i>	Amensalismo

## **Neutralismo**

No se observa ningún tipo de interacción directa ni alteración en el crecimiento de entre las colonias evaluadas y el fitopatógeno *Ralstonia solanacearum*; se observó que a 28°C, la colonia JBUTP\_GEA\_G\_A022 presenta contacto con la bacteria sin presentar algún tipo de efecto negativo para ninguno de los dos microorganismos. Sin embargo, se observó que a 35°C se presenta el mayor número de relaciones neutralistas, sin ningún tipo de interacción directa o indirecta por generación de algún tipo de compuesto tóxico producto del desarrollo normal de cada organismo.

## **Competencia**

Se observa que a 28°C, para la colonia JBUTP\_GEA\_G\_A011 y el fitopatógeno, la relación es por espacio pues se evidencia claramente una alteración del borde típico de las colonias que interactúan; siendo para el fitopatógeno un borde redondeado y para el actinomiceto rizoide. De igual forma, se observa que a esta misma temperatura la colonia JBUTP\_GEA\_G\_A021 presenta una relación por espacio, en la cual el fitopatógeno muestra un crecimiento más extendido a lo largo del medio con una mayor densidad de colonia en el centro, que al encuentro con el organismo antagonista se deforma ubicándose solo en el espacio disponible alrededor del mismo.

Así mismo, se logra evidenciar que a 35°C, las colonias JBUTP\_GEA\_G\_A011, JBUTP\_GEA\_G\_A023 y JBUTP\_GEA\_G\_A016 empiezan a ocupar el espacio alrededor del fitopatógeno. Lo que representa la posterior inhibición en su crecimiento [11]. Para las colonias JBUTP\_GEA\_G\_A021 y JBUTP\_GEA\_G\_A014 se evidencia como ambas colonias alteran la forma típica de sus colonias al momento de la interacción, ver anexo D.

## **Amensalismo**

Este tipo de interacción microbiana solo se observa a Temperatura Ambiente y a 35°C; observándose que la colonia JBUTP\_GEA\_G\_A022 es la única que presenta la misma relación microbiana a estas condiciones; evidenciándose como un comportamiento desfavorable para *Ralstonia solanacearum*, puesto que las colonias de actinomicetos continúan su crecimiento en el espacio anteriormente colonizado por la bacteria y a temperatura ambiente, se genera una inhibición total del crecimiento de esta, seguida de la muerte al no contar con el espacio ni la fuente de nutrientes necesaria para continuar con su proceso metabólico.

Para las colonias JBUTP\_GEA\_G\_A011 y JBUTP\_GEA\_G\_A023, se observa que el actinomiceto rodea parcialmente al fitopatógeno para finalmente ocupar el espacio colonizado por este.

Finalmente se establecen las colonias de actinomicetos con mayor potencial de actividad antagónica bien sea por competencia, amensalismo o parasitismo teniendo en cuenta que ambos organismos se inocularon a tres temperaturas distintas y con dos días de diferencia iniciando con el actinomiceto pues se encuentra en el momento más marcado de su fase exponencial de desarrollo y actividad metabólica más prolongada que *Ralstonia solanacearum* con una necesidad de solo 48 horas para un desarrollo completo y máximo de su capacidad infectante, tabla 12.

Tabla 12. Resumen antagonismo 2.

Antagonismo 2			
Colonia	Tipo de interacción		
	28°C	Ambiente	35°C
JBUTP_GEA_G_A011	Competencia	Competencia	Amensalismo
JBUTP_GEA_G_A023	Neutralismo	Competencia	Amensalismo
JBUTP_GEA_G_A012	Neutralismo	Neutralismo	Neutralismo
JBUTP_GEA_G_A013	Neutralismo	Neutralismo	Neutralismo
JBUTP_GEA_G_A014	Neutralismo	Competencia	Neutralismo
JBUTP_GEA_G_A015	Neutralismo	Neutralismo	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A016	Neutralismo	Competencia	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A017	Neutralismo	Neutralismo	Competencia
JBUTP_GEA_H_A018	Neutralismo	Neutralismo	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A019	Neutralismo	Neutralismo	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A020	Neutralismo	Neutralismo	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A021	Competencia	Competencia	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A022	Neutralismo	Amensalismo	Amensalismo

La interacción microbiana de mayor impacto en la eliminación del fitopatógeno en estudio como se ha mencionado anteriormente sería el amensalismo de acuerdo a [11]. Por lo que la colonia de mayor potencial de control en este tipo de actividad antagónica para este ensayo es JBUTP\_GEA\_G\_A022, ya que evidencia la misma reacción frente a *Ralstonia solanacearum* en dos de las temperaturas evaluadas (Temperatura ambiente y 35°C).

A su vez las colonias JBUTP\_GEA\_H\_A011 y JBUTP\_GEA\_H\_A023 presentan un potencial de biocontrol intermedio al mostrar interacciones tanto de amensalismo como de competencia por espacio en al menos una de las temperaturas en estudio.

Del mismo modo las colonias JBUTP\_GEA\_G\_A014, JBUTP\_GEA\_G\_A016, JBUTP\_GEA\_G\_A017 y JBUTP\_GEA\_G\_A021 presentan actividad poco

significativa al mostrar únicamente interacciones de competencia y neutralismo que no representarían gran eficiencia en el control del fitopatógeno más allá de un uso estrictamente preventivo que permita al actinomiceto ejercer un dominio previo del espacio disponible antes de la llegada del fitopatógeno. Finalmente las colonias JBUTP\_GEA\_G\_A012, JBUTP\_GEA\_G\_A013, JBUTP\_GEA\_G\_A018, JBUTP\_GEA\_G\_A019 y JBUTP\_GEA\_G\_A020 no muestran ningún tipo de actividad significativa en aplicaciones de control biológico al prevalecer una relación de neutralismo entre ellas y *Ralstonia solanacearum* para cualquiera de las temperaturas evaluadas

Considerando lo anterior se observa que las mayores interacciones por amensalismo se dieron a 35°C, así como el mayor grado de interacciones de competencia por espacio se encontraron a temperatura ambiente y finalmente el mayor grado de relaciones de neutralismo se concentra a una temperatura de 28°C, esto reflejado en los porcentajes de concurrencia mostrados en la tabla 13.

Tabla 13. Porcentajes de interacción por temperatura, antagonismo 2.

<b>Interacción directa</b>		
<b>Amensalismo</b>	<b>28°C</b>	0%
	<b>35°C</b>	23.08%
	<b>T. Ambiente</b>	7.69%
<b>Competencia</b>	<b>28°C</b>	15.38%
	<b>35°C</b>	7.69%
	<b>T. Ambiente</b>	38.46%
<b>Neutralismo</b>	<b>28°C</b>	84.62%
	<b>35°C</b>	69.23%
	<b>T. Ambiente</b>	53.85%

Cabe resaltar que la relación de neutralismo sobrepasa ampliamente en porcentaje de recurrencia a los demás tipos de interacción en cualquiera de las temperaturas del ensayo, lo que indica que la diferencia de tiempo al momento de la inoculación de cada población microbiana represento una disminución en la capacidad de generar algún tipo de actividad biológica representativa para este ensayo. Esto debido a que en la naturaleza la mayoría de poblaciones microbianas presentes en algún ecosistema específico tienen entre si relaciones de neutralismo [11].

### 3.2.3 Antagonismo 3

Teniendo en cuenta nuevamente las variables, tiempo y temperatura de crecimiento ideal para cada uno de los microorganismos en estudio, así como una simulación en ambiente real. Se establece el tercer ensayo de antagonismo directo bajo los siguientes parámetros:

**Tiempo de siembra:** Día cero para las colonias de actinomicetos y día cinco para *Ralstonia solanacearum*.

Las interacciones observadas en este ensayo se ordenan en la tabla 14.

Tabla 14. Resultados antagonismo 3.

Antagonismo 3		
Colonia	Género	Tipo de Interacción
<b>28°C</b>		
JBUTP_GEA_G_A011	<i>Actinopolyspora spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_G_A023	<i>Actinopolyspora spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_G_A012	<i>Nocardia spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_G_A013	<i>Nocardia spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_G_A014	<i>Nocardia spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_G_A015	<i>Actinobispora spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_H_A016	<i>Nocardia spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_H_A017	<i>Streptomyces spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A018	<i>Streptomyces spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A019	<i>Streptomyces spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_H_A020	<i>Streptomyces spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_H_A021	<i>Nocardiosis spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A022	<i>Nocardia spp.</i>	Neutralismo
<b>Temperatura Ambiente</b>		
JBUTP_GEA_G_A011	<i>Actinopolyspora spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_G_A023	<i>Actinopolyspora spp.</i>	Amensalismo
JBUTP_GEA_G_A012	<i>Nocardia spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_G_A013	<i>Nocardia spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_G_A014	<i>Nocardia spp.</i>	Amensalismo



Tabla 14. Resultados antagonismo 3 (Continuación).

JBUTP_GEA_G_A015	<i>Actinobispora spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_H_A016	<i>Nocardia spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_H_A017	<i>Streptomyces spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_H_A018	<i>Streptomyces spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_H_A019	<i>Streptomyces spp.</i>	Amensalismo
JBUTP_GEA_H_A020	<i>Streptomyces spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_H_A021	<i>Nocardiosis spp.</i>	Amensalismo
JBUTP_GEA_H_A022	<i>Nocardia spp.</i>	Neutralismo
<b>35°C</b>		
JBUTP_GEA_G_A011	<i>Actinopolyspora spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_G_A023	<i>Actinopolyspora spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_G_A012	<i>Nocardia spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_G_A013	<i>Nocardia spp.</i>	Amensalismo
JBUTP_GEA_G_A014	<i>Nocardia spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_G_A015	<i>Actinobispora spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A016	<i>Nocardia spp.</i>	Amensalismo
JBUTP_GEA_H_A017	<i>Streptomyces spp.</i>	Amensalismo
JBUTP_GEA_H_A018	<i>Streptomyces spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_H_A019	<i>Streptomyces spp.</i>	Amensalismo
JBUTP_GEA_H_A020	<i>Streptomyces spp.</i>	Amensalismo
JBUTP_GEA_H_A021	<i>Nocardiosis spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_H_A022	<i>Nocardia spp.</i>	Amensalismo

### Neutralismo

Se observa que a pesar de que no se logra evidenciar algún tipo de interacción entre la mayoría de las colonias de actinomicetos y fitopatógeno al no producirse contacto directo entre ellas, las colonias JBUTP\_GEA\_G\_A014, JBUTP\_GEA\_G\_A017 y JBUTP\_GEA\_G\_A018 no generaron efectos desfavorables en el desarrollo de ninguno de los organismos participantes a pesar de su encuentro en el medio. (Anexo D.)

### Competencia

Para cada una de las colonias de actinomicetos en estudio se observa una clara interacción con *Ralstonia solanacearum* en la que se observa una alteración en su morfología evidenciándose en un cambio en la forma de crecimiento de ambos organismos al contacto, lo que indica una relación de competencia por espacio.

## Amensalismo

Se evidencia en cada caso un claro desarrollo de la colonia antagonista sobre el espacio ya colonizado por *Ralstonia solanacearum*, observándose un crecimiento más representativo de las colonias JBUTP\_GEA\_G\_A023, JBUTP\_GEA\_G\_A014 y JBUTP\_GEA\_G\_A019 a 28°C. A la temperatura correspondiente a 35°C la colonia JBUTP\_GEA\_G\_A013 muestra una interacción de amensalismo con el fitopatógeno en estudio al ocupar con una menos densidad poblacional el espacio colonizado por *Ralstonia solanacearum* mientras que para las demás colonias de actinomicetos es estudio, a su vez la relación microbiana se da en forma más directa y con crecimiento completo del organismo antagonista sobre el microorganismo plaga que para las otras colonias que presentan este tipo de interacción (Anexo E).

Finalmente se determinan las colonias de actinomicetos con mayor potencial de biocontrol bien sea por competencia, amensalismo o parasitismo teniendo en cuenta que ambos organismos se inocularon a tres temperaturas distintas y con cinco días de diferencia. Iniciando con el actinomiceto dada su mayor actividad metabólica en el tiempo en comparación con *Ralstonia solanacearum* con una necesidad de solo 48 horas para un desarrollo completo y máximo de su capacidad infectante, tabla 15.

Tabla 15. Resumen antagonismo 3.

Antagonismo 3			
Colonia	Tipo de interacción		
	28°C	Ambiente	35°C
JBUTP_GEA_G_A011	Neutralismo	Neutralismo	Neutralismo
JBUTP_GEA_G_A023	Competencia	Amensalismo	Competencia
JBUTP_GEA_G_A012	Neutralismo	Neutralismo	Competencia
JBUTP_GEA_G_A013	Competencia	Competencia	Amensalismo
JBUTP_GEA_G_A014	Neutralismo	Amensalismo	Competencia
JBUTP_GEA_G_A015	Competencia	Competencia	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A016	Competencia	Competencia	Amensalismo
JBUTP_GEA_H_A017	Neutralismo	Competencia	Amensalismo
JBUTP_GEA_H_A018	Neutralismo	Competencia	Competencia
JBUTP_GEA_H_A019	Competencia	Amensalismo	Amensalismo
JBUTP_GEA_H_A020	Competencia	Competencia	Amensalismo
JBUTP_GEA_H_A021	Neutralismo	Amensalismo	Competencia
JBUTP_GEA_H_A022	Neutralismo	Neutralismo	Amensalismo

Teniendo en cuenta que la relación microbiana de mayor interés para efectos de control biológico es el amensalismo. Se establece que la colonia con mayor potencial de biocontrol al presentar dos interacciones de amensalismo en las tres temperaturas evaluadas para este ensayo es la colonia JBUTP\_GEA\_G\_A019.

Del mismo modo las colonias JBUTP\_GEA\_H\_A023, JBUTP\_GEA\_H\_A013, JBUTP\_GEA\_H\_A014, JBUTP\_GEA\_H\_A016, JBUTP\_GEA\_H\_A017, JBUTP\_GEA\_H\_A020, JBUTP\_GEA\_H\_A021 y JBUTP\_GEA\_H\_A022 presentan un potencial intermedio al mostrar al menos una relación de amensalismo durante el ensayo, dándole a este el mayor potencial con respecto a los diferentes tiempos de inoculación evaluados en este proyecto.

Finalmente con actividad poco significativa se encuentran las colonias JBUTP\_GEA\_H\_A011, JBUTP\_GEA\_H\_A012, JBUTP\_GEA\_H\_A015 y JBUTP\_GEA\_H\_A018 que mostraron a lo largo del ensayo relaciones microbianas solo de competencia por espacio y neutralismo.

Tomando en consideración lo anterior se observa que las mayores interacciones por amensalismo se dan para este ensayo a 35°C, la mayor proporción de competencia por espacio se encuentra a temperatura ambiente y finalmente el mayor grado de relaciones de neutralismo se ve concentrado a 28°C, tabla 16.

Tabla 16. Porcentajes de interacción por temperatura, antagonismo 3

<b>Interacción directa</b>		
<b>Amensalismo</b>	<b>28°C</b>	0%
	<b>35°C</b>	46.15%
	<b>T. Ambiente</b>	30.77%
<b>Competencia</b>	<b>28°C</b>	46.15%
	<b>35°C</b>	38.46%
	<b>T. Ambiente</b>	46.15%
<b>Neutralismo</b>	<b>28°C</b>	53.85%
	<b>35°C</b>	15.38%
	<b>T. Ambiente</b>	23.08%

Se puede destacar que las interacciones microbianas de amensalismo y competencia presentan una mayor influencia en los resultados de este ensayo, lo que permite inferir que el tiempo de inoculación para *Ralstonia solanacearum* equivalente a cinco días representa una clara desventaja al permitir una instalación previa de los actinomicetos en el medio y un desarrollo metabólico en plena fase

exponencial, lo cual produce posteriores limitaciones en el desarrollo del fitopatógeno en cuanto a fuente nutricional y espacio disponible.

### 3.2.4 Antagonismo 4

Estableciendo nuevamente como variables de estudio el tiempo y la temperatura de crecimiento ideal para cada uno de los microorganismos a evaluar, así como una simulación en ambiente real. Se establece el cuarto ensayo de antagonismo directo bajo los siguientes parámetros:

**Tiempo de siembra:** Día cero para las colonias de actinomicetos y día siete para *Ralstonia solanacearum*.

Las interacciones observadas en el ensayo se ordenan en la tabla 17.

Tabla 17. Resultados antagonismo 4.

Antagonismo 4		
Colonia	Género	Tipo de Interacción
<b>28°C</b>		
JBUTP_GEA_G_A011	<i>Actinopolyspora spp.</i>	Amensalismo
JBUTP_GEA_G_A023	<i>Actinopolyspora spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_G_A012	<i>Nocardia spp.</i>	Amensalismo
JBUTP_GEA_G_A013	<i>Nocardia spp.</i>	Amensalismo
JBUTP_GEA_G_A014	<i>Nocardia spp.</i>	Amensalismo
JBUTP_GEA_G_A015	<i>Actinobispora spp.</i>	Amensalismo
JBUTP_GEA_H_A016	<i>Nocardia spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_H_A017	<i>Streptomyces spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A018	<i>Streptomyces spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_H_A019	<i>Streptomyces spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_H_A020	<i>Streptomyces spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_H_A021	<i>Nocardiosis spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_H_A022	<i>Nocardia spp.</i>	Competencia
<b>Temperatura Ambiente</b>		
JBUTP_GEA_G_A011	<i>Actinopolyspora spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_G_A023	<i>Actinopolyspora spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_G_A012	<i>Nocardia spp.</i>	Neutralismo

Tabla 17. Resultados antagonismo 4 (Continuación).

JBUTP_GEA_G_A013	<i>Nocardia spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_G_A014	<i>Nocardia spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_G_A015	<i>Actinobispora spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_H_A016	<i>Nocardia spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A017	<i>Streptomyces spp.</i>	Amensalismo
JBUTP_GEA_H_A018	<i>Streptomyces spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_H_A019	<i>Streptomyces spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_H_A020	<i>Streptomyces spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_H_A021	<i>Nocardiosis spp.</i>	Amensalismo
JBUTP_GEA_H_A022	<i>Nocardia spp.</i>	Amensalismo
<b>35°C</b>		
JBUTP_GEA_G_A011	<i>Actinopolyspora spp.</i>	Amensalismo
JBUTP_GEA_G_A023	<i>Actinopolyspora spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_G_A012	<i>Nocardia spp.</i>	Amensalismo
JBUTP_GEA_G_A013	<i>Nocardia spp.</i>	Amensalismo
JBUTP_GEA_G_A014	<i>Nocardia spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_G_A015	<i>Actinobispora spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_H_A016	<i>Nocardia spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_H_A017	<i>Streptomyces spp.</i>	Amensalismo
JBUTP_GEA_H_A018	<i>Streptomyces spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A019	<i>Streptomyces spp.</i>	Competencia
JBUTP_GEA_H_A020	<i>Streptomyces spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A021	<i>Nocardiosis spp.</i>	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A022	<i>Nocardia spp.</i>	Amensalismo

### Neutralismo

A pesar de la cercanía entre las colonias de los organismos presentes en el medio no se da un encuentro directo entre ninguna de estas poblaciones, lo que permite establecer que estas pueden hacer uso de los nutrientes sin producir efecto negativo alguno en el desarrollo de la colonia contigua.

### Competencia

Se observa claramente cómo se altera el borde de las colonias participantes de la interacción al contacto directo con el fitopatógeno en estudio, evidenciándose de este modo la relación de competencia por espacio; en la cual se ven ampliamente favorecidas las cepas de actinomicetos al presentar un tamaño de colonia mucho

mayor que *Ralstonia solanacearum*, lo que permite una mayor asimilación de nutrientes en el tiempo.

### **Amensalismo**

Se evidencia que a 28°C, las colonias JBUTP\_GEA\_H\_A011, JBUTP\_GEA\_H\_A013 y JBUTP\_GEA\_H\_A014 presentan una marcada interacción microbiana en la que el actinomiceto empieza a ocupar el espacio colonizado por el fitopatógeno siguiendo en forma idéntica su trayectoria de crecimiento. Sin embargo, las colonias JBUTP\_GEA\_H\_A012 y JBUTP\_GEA\_H\_A015 muestran la misma relación que las anteriores colonias pero con un potencial considerablemente menor al mostrar escaso crecimiento sobre *Ralstonia solanacearum*.

A temperatura ambiente, las colonias JBUTP\_GEA\_H\_A017 y JBUTP\_GEA\_H\_A022 presentan un crecimiento o expansión natural sobre la población del fitopatógeno; mientras que la colonia JBUTP\_GEA\_H\_A021 presenta un desarrollo que cubre exactamente el espacio en donde se realizó el inóculo del patógeno implicando algún tipo de deformación en su morfología macroscópica.

Este mismo comportamiento es observado a 35°C para las colonias JBUTP\_GEA\_H\_A012, JBUTP\_GEA\_H\_A013, JBUTP\_GEA\_H\_A017, JBUTP\_GEA\_H\_A022 y JBUTP\_GEA\_H\_A011; las cuales continúan con su crecimiento normal afectando de este modo el desarrollo del fitopatógeno aunque no se desarrolle a lo largo y ancho del espacio ocupado por el mismo, lo que reduce de este modo su capacidad infectante en el tiempo.

Finalmente se establecen las colonias de actinomicetos con mayor potencial de biocontrol bien sea por competencia, amensalismo o parasitismo teniendo en cuenta que ambos organismos se inocularon a tres temperaturas distintas y con siete días de diferencia iniciando con el actinomiceto dada su mayor actividad metabólica en el tiempo en comparación con *Ralstonia solanacearum* con una necesidad de solo 48 horas para un desarrollo completo y máximo de su capacidad infectante, tabla 18.

Tabla 18. Resumen antagonismo 4.

<b>Antagonismo 4</b>			
<b>Colonia</b>	<b>Tipo de interacción</b>		
	<b>28°C</b>	<b>Ambiente</b>	<b>35°C</b>
JBUTP_GEA_G_A011	Amensalismo	Neutralismo	Amensalismo
JBUTP_GEA_G_A023	Competencia	Competencia	Neutralismo
JBUTP_GEA_G_A012	Amensalismo	Neutralismo	Amensalismo
JBUTP_GEA_G_A013	Amensalismo	Competencia	Amensalismo
JBUTP_GEA_G_A014	Amensalismo	Competencia	Competencia
JBUTP_GEA_G_A015	Amensalismo	Competencia	Competencia
JBUTP_GEA_H_A016	Competencia	Neutralismo	Competencia
JBUTP_GEA_H_A017	Neutralismo	Amensalismo	Amensalismo
JBUTP_GEA_H_A018	Competencia	Competencia	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A019	Competencia	Competencia	Competencia
JBUTP_GEA_H_A020	Competencia	Competencia	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A021	Competencia	Amensalismo	Neutralismo
JBUTP_GEA_H_A022	Competencia	Amensalismo	Amensalismo

Teniendo en cuenta que la relación microbiana de mayor interés para efectos de biocontrol es el amensalismo, se establece que las colonias con mayor potencial al presentar dos de estas interacciones en las tres temperaturas evaluadas para este ensayo son las colonias JBUTP\_GEA\_G\_A011, JBUTP\_GEA\_G\_A012, JBUTP\_GEA\_G\_A013, JBUTP\_GEA\_G\_A017 y JBUTP\_GEA\_G\_A022.

Del mismo modo las colonias JBUTP\_GEA\_H\_A014, JBUTP\_GEA\_H\_A015 y JBUTP\_GEA\_H\_A021 presentan un potencial intermedio al mostrar al menos una relación de amensalismo durante el ensayo.

Finalmente con actividad poco significativa se encuentran las colonias JBUTP\_GEA\_H\_A023, JBUTP\_GEA\_H\_A016, JBUTP\_GEA\_H\_A018, JBUTP\_GEA\_H\_A019 y JBUTP\_GEA\_H\_A020 que mostraron a lo largo del ensayo relaciones microbianas solo de competencia por espacio y neutralismo.

Tomando en consideración lo anterior se observa que las mayores interacciones por amensalismo se dan para este ensayo a 28°C y temperatura ambiente, la mayor proporción de competencia por espacio se encuentra a 28°C y 35°C y finalmente el mayor grado de relaciones de neutralismo se concentra a temperatura ambiente, tabla 19.

Tabla 19. Porcentajes de interacción por temperatura, antagonismo 4.

Interacción directa		
Amensalismo	28°C	38.46%
	35°C	38.46%
	T. Ambiente	23.08%
Competencia	28°C	53.85%
	35°C	30.77%
	T. Ambiente	53.85%
Neutralismo	28°C	7.69%
	35°C	30.77%
	T. Ambiente	23.08%

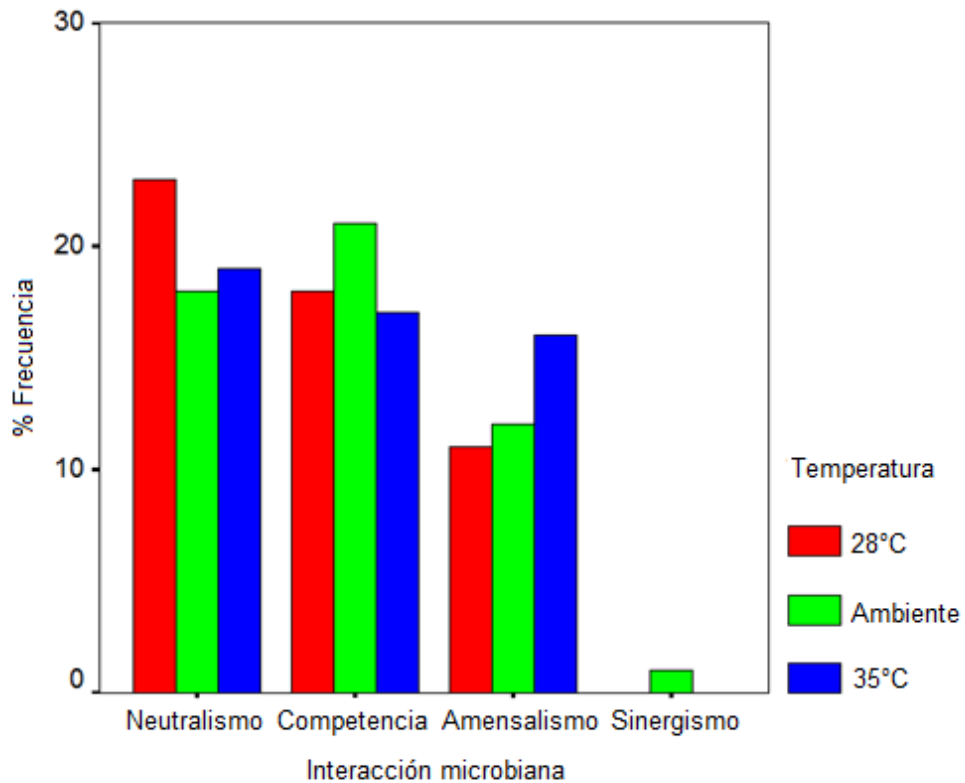
Se puede destacar que la interacción microbiana de competencia por espacio presenta una mayor influencia en los resultados de este ensayo, lo que permite inferir que el tiempo de inoculación para *Ralstonia solanacearum* equivalente a siete días representa una situación en donde ambas poblaciones pueden obtener un punto óptimo de desarrollo lo que facilita la relación de competencia.

### 3.2.5 Análisis estadístico - Actividad antagónica

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en cada uno de los ensayos realizados y sometiendo los datos a un análisis de contingencia por tablas de frecuencias en el software estadístico SPSS 11.5, se logran establecer comportamientos y tendencias específicas para el presente trabajo, reflejadas en graficas de barras con respecto a las variables en estudio (Temperatura y tiempo de siembra) presentadas a continuación.



Figura 10. Concurrencia de interacciones microbianas en la temperatura, (SPSS 11.5)



En la figura se observa claramente como cada una de las temperaturas en estudio presenta una relación microbiana dominante, lo que indica la influencia de esta, en el tipo de interacción para la cantidad de datos obtenidos en este trabajo. Viendo de esta forma que para una posterior aplicación en control biológico se favorece una relación de amensalismo a 35°C lo cual para el cultivo en estudio es óptimo considerando las temperaturas relativamente altas (superiores a 28°C) que se presentan en las zonas de cultivo de banano en Colombia [28], sin embargo se resalta que aunque para actinomicetos esta no es la temperatura ideal de crecimiento, su actividad antagónica frente al fitopatógeno aumenta. No obstante para las temperaturas de 28°C y 35°C se presenta en mayor porcentaje la interacción microbiana de neutralismo y en menor proporción el amensalismo, lo que indica que aunque el porcentaje de poblaciones que presentan una relación microbiana de amensalismo es mayor en 35°C no representa un porcentaje significativo en comparación con el grado de concurrencia de otras interacciones en esta temperatura.

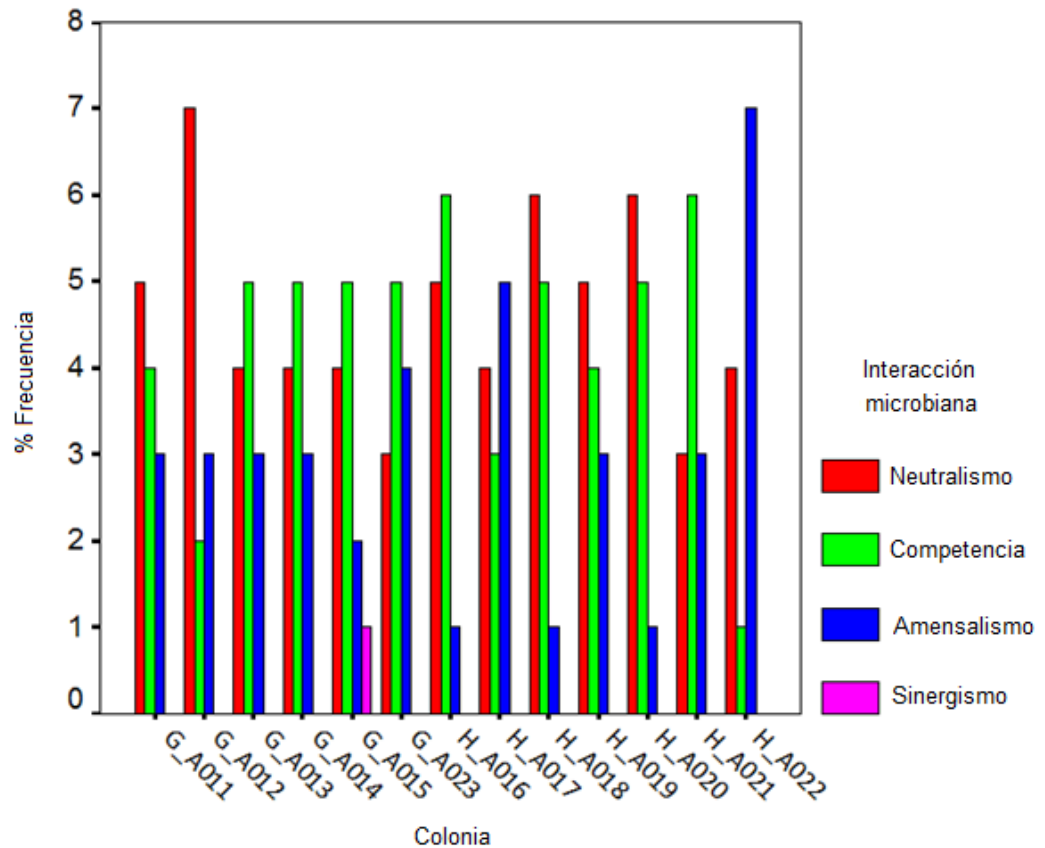
Todas las temperaturas en estudio presentan un buen porcentaje de relaciones de competencia en comparación a las demás interacciones, no obstante esta relación

presento su mayor incidencia a temperatura ambiente, lo que denota una mayor resistencia ante los gradientes naturales de temperatura representando así un mayor potencial en la producción de un inoculante microbiano de tipo preventivo que permita la colonización del suelo y el cultivo por parte de los actinomicetos, previa a la llegada del fitopatógeno y que a su vez permanezca en el entorno a pesar de los cambios en las condiciones climáticas (gradientes de temperatura) que puedan presentarse; esto referido a los cambios en las condiciones ambientales propios de la zona en donde se realiza el estudio y cuya temperatura media no supera 25°C.

En cuanto al neutralismo tal y como es natural en ecosistemas con amplia flora microbiana como la rizosfera, es la interacción que más se presenta en este trabajo [11].

A continuación se establece el potencial de cada una de las colonias en estudio de presentar una interacción microbiana específica, sin tener en cuenta la temperatura. Esto debido a que cada una representa una población independiente con características metabólicas que no necesariamente dependen de las condiciones del medio, figura 11.

Figura 11. Incidencia de las interacciones microbianas con respecto a las colonias en estudio, (SPSS 11.5)



Para cada una de las interacciones en estudio se destacan colonias con mayor porcentaje de concurrencia, siendo para neutralismo la colonia JBUTP\_GEA\_G\_A012, mientras que para la relación de competencia fueron obtenidas las colonias JBUTP\_GEA\_G\_A016 y JBUTP\_GEA\_G\_A021 pertenecientes al ecosistema de guadual con igual y mayor afluencia que las demás y finalmente para el amensalismo se establece que las colonias JBUTP\_GEA\_H\_A017 y JBUTP\_GEA\_H\_A022 pertenecientes a los géneros *Streptomyces spp* y *Nocardia spp* apropiables al ecosistema humedal con un porcentaje de frecuencia superior al 50% como las de mayor potencial biológico frente al control del fitopatógeno *Ralstonia solanacearum*.

Del mismo modo se puede observar que la totalidad de poblaciones en estudio presentaron mínimo una vez cada una de las relaciones encontradas, a excepción del sinergismo que solo tuvo representación en la colonia JBUTP\_GEA\_G\_A015, lo que indica que sin importar la tendencia de cada una de las colonias en cuanto a su

relación con el entorno y otras poblaciones es posible que su comportamiento varíe según la influencia de otras variables como el momento de inoculación en el medio y la temperatura de crecimiento. Esto debido al estadio metabólico en el que cada población se encuentre al instante en el que se inicie el contacto, ya que la capacidad infectante de *Ralstonia solanacearum* disminuye más rápido en comparación a la de los actinomicetos al constituirse como organismos con curvas de crecimiento diferentes en el tiempo [25], siendo la del fitopatógeno equivalente a 48 horas por su naturaleza de bacteria y la de los actinomicetos enmarcada en un rango de 7 a 10 días por sus características fisiológicas de hongo y bacteria simultáneamente [6], [7].

Teniendo en cuenta lo anterior se establece que las colonias JBUTP\_GEA\_G\_A011, JBUTP\_GEA\_G\_A012, JBUTP\_GEA\_H\_A018, JBUTP\_GEA\_H\_A019 y JBUTP\_GEA\_H\_A020 se destacan por su alto porcentaje de neutralismo, lo que representa un 38.46 % de las colonias evaluadas tomando como referencia que las 13 colonias en estudio equivalen al 100%, valor que concuerda con la alta concurrencia de este tipo de interacción microbiana en la naturaleza [11].

Las colonias JBUTP\_GEA\_G\_A013, JBUTP\_GEA\_G\_A014, JBUTP\_GEA\_G\_A015, JBUTP\_GEA\_G\_A023, JBUTP\_GEA\_H\_A016 y JBUTP\_GEA\_H\_A021 denotan su porcentaje mayoritario en las relaciones de competencia, lo cual establece un alto potencial para la futura generación de un inoculante microbiano de tipo preventivo. Esto debido a que se hace necesario para su acción, la presencia de este en el medio previa a la llegada del patógeno y así permitir una correcta colonización del espacio y la fuente nutricional generando así otra alternativa de control biológico. Este tipo de relación microbiana es tan común como el mismo neutralismo por lo que también representa un alto porcentaje de las colonias en estudio, 46.15 %.

Finalmente teniendo en cuenta lo anterior se establece que para la aplicación en estudio las colonias con mayor potencial, al presentar relaciones de amensalismo sin tener en cuenta la temperatura de evaluación son JBUTP\_GEA\_H\_A017, JBUTP\_GEA\_H\_A022 y JBUTP\_GEA\_G\_A023 de los géneros *Streptomyces spp*, *Nocardia spp* y *Actinopolyspora spp* lo que amplía el espectro en el estudio de microorganismos como los actinomicetos, ya que nuevamente se demuestra que pueden ser empleados como alternativa en la búsqueda de una agricultura ecológica y sostenible que permita la eliminación de pesticidas sintéticos para el tratamiento de plagas y enfermedades en cultivos de interés económico como el banano.

En el caso de una interacción microbiana que permita el control biológico de tipo preventivo al colonizar previamente el medio y posterior a eso establecer relaciones de competencia con el fitopatógeno en estudio, se encontró que las colonias JBUTP\_GEA\_H\_A016 y JBUTP\_GEA\_H\_A021 pertenecientes a los géneros *Nocardia spp* y *Nocardiosis spp* respectivamente, muestran el mayor potencial para este fin.

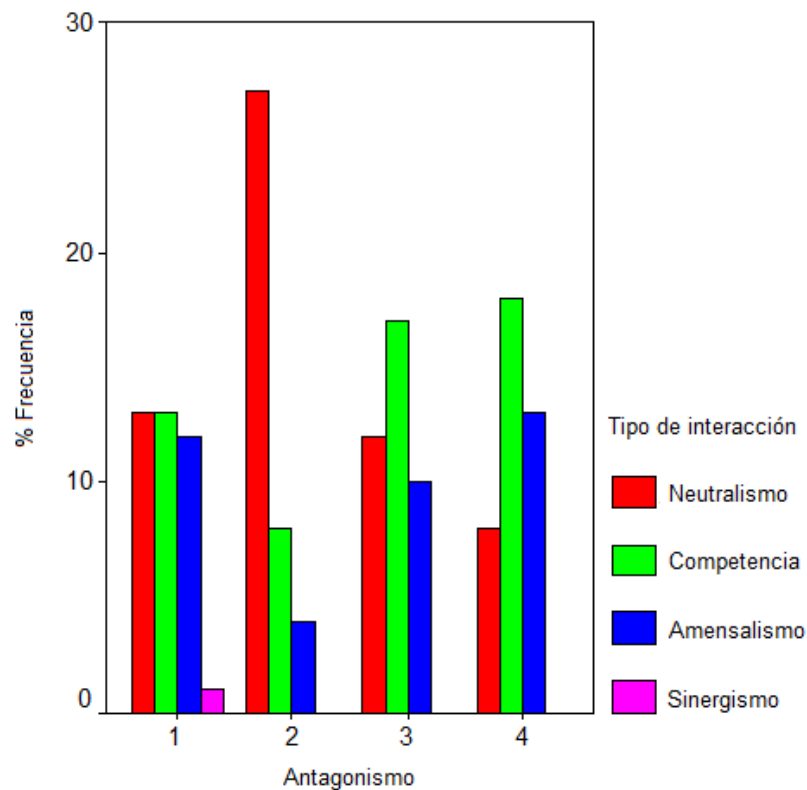
Sin embargo cabe resaltar que las poblaciones JBUTP\_GEA\_G\_A013, JBUTP\_GEA\_G\_A014, JBUTP\_GEA\_G\_A015, JBUTP\_GEA\_G\_A023, JBUTP\_GEA\_H\_A018 y JBUTP\_GEA\_H\_A020 mostraron considerables valores para esta misma actividad (Frecuencia = 50%), tal y como se muestra en la figura 11, lo que indica que la mayoría de colonias en estudio pueden presentar este tipo de relación frente a *Ralstonia solanacearum*.

Es importante resaltar que teniendo en cuenta que la significancia bilateral (p) obtenida para el análisis en el software empleado es superior a 0.05 [29], se puede inferir que las interacciones microbianas obtenidas no dependen necesariamente de la temperatura para la cantidad total de los datos obtenidos, ya que este parámetro indica que los resultados no son estadísticamente significativos para esta variable.

En el anexo G se puede observar el resultado obtenido para chi cuadrado que entrega el análisis de contingencia; en el cual se tiene un valor de  $p > 0.05$ .

Por último se establece la influencia de la variable “tiempo de siembra” en las interacciones encontradas para cada ensayo de antagonismo, tal y como se muestra en la figura

Figura 12. Influencia del tiempo de inoculación en las interacciones microbianas.



Para el antagonismo 1 se observa semejanza entre los porcentajes de frecuencia de las interacciones microbianas mayoritarias encontradas, teniéndose que para un tiempo de siembra equivalente al día 0 para ambas poblaciones no se observa una tendencia o favorabilidad para alguna relación microbiana específica.

Sin embargo para los ensayos de actividad antagónica 2, 3 y 4 correspondientes a los tiempos de siembra en el día 2, 5 y 7 respectivamente para el fitopatógeno, se logra establecer una tendencia marcada; ya que mientras la interacción de neutralismo disminuye su porcentaje de frecuencia en la medida que los días de inoculación se distancian en el tiempo, las relaciones de competencia y amensalismo aumentan su concurrencia en cada ensayo. Esto indica que al permitir un mayor desarrollo de las colonias de actinomicetos en el medio se incrementa el potencial biológico de control frente a *Ralstonia solanacearum*, resultado que permite inferir que para cada interacción microbiana posible entre las poblaciones en estudio, si existe una dependencia directa con respecto al momento de inoculación y que al someterse al análisis de frecuencia por tablas de contingencia arrojo una significancia  $p = 0.002$ , tal y como se muestra en el anexo G, lo que indica que para las posibles interacciones microbianas si existe una dependencia estadísticamente significativa a dicha variable.

Esto permite concluir que para la generación de un inoculante microbiano que busque impedir el “moko” ocasionado por *Ralstonia solanacearum* en plantaciones de banano, es crucial considerar el tiempo de aplicación como un parámetro importante que influirá directamente en el grado de control que se obtenga.

### **3.3 RECUENTO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA (UFC/mL)**

#### **3.3.1 Recuento de las UFC/mL de la dilución $10^{-5}$**

Este recuento se realizó en la dilución  $10^{-5}$ , debido a que es aquella en la que se presenta el mayor número de colonias con población cuantificable, lo que se ve reflejado en la tabla 19, obteniéndose solo una colonia con resultado incontable.

Caso contrario para la colonia JBUTP\_GEA\_G\_A016 que a pesar de presentar crecimiento positivo en la solución madre, no permite determinar su concentración debido a la ausencia de colonias visibles en el medio sólido.

Los resultados del ensayo (UFC/mL) determinados por medio de la ecuación 2, se registran en la tabla 20.

Tabla 20. Recuento de unidades formadoras de colonia, (UFC/mL).

Colonias	Recuento Dilución $10^{-5}$			UFC/mL ( $10^6$ )
	1	2	3	
JBUTP_GEA_G_A011	79	56	62	65
JBUTP_GEA_G_A023	INC	INC	INC	INC
JBUTP_GEA_G_A012	4	0	1	2
JBUTP_GEA_G_A013	0	0	1	1
JBUTP_GEA_G_A014	23	4	5	11
JBUTP_GEA_G_A015	11	2	0	4
JBUTP_GEA_H_A017	9	3	0	4
JBUTP_GEA_H_A018	1	3	7	4
JBUTP_GEA_H_A019	15	17	13	15
JBUTP_GEA_H_A020	163	220	170	184
JBUTP_GEA_H_A021	14	12	16	14
JBUTP_GEA_H_A022	9	5	2	5

Posterior a la determinación de las concentraciones de cada una de las colonias de actinomicetos en estudio para la dilución empleada ( $10^{-5}$ ), se establecen las concentraciones de la solución madre de cada población, teniendo en cuenta la ecuación 1, cuyos resultados se registran en la tabla 21.

Tabla 21. Concentración de la solución madre en UFC/mL.

Colonias	Solución Madre
	UFC/mL ( $10^3$ )
JBUTP_GEA_G_A011	65
JBUTP_GEA_G_A023	INC
JBUTP_GEA_G_A012	2
JBUTP_GEA_G_A013	1
JBUTP_GEA_G_A014	11
JBUTP_GEA_G_A015	4
JBUTP_GEA_H_A017	4
JBUTP_GEA_H_A018	4
JBUTP_GEA_H_A019	15
JBUTP_GEA_H_A020	184
JBUTP_GEA_H_A021	14
JBUTP_GEA_H_A022	5

El recuento realizado en la dilución  $10^{-5}$  para las colonias JBUTP\_GEA\_G\_A023 y JBUTP\_GEA\_H\_A016, no permite la determinación de las concentraciones de la solución madre debido a que se obtuvo un recuento demasiado elevado para la colonia JBUTP\_GEA\_G\_A023 representado con INC (Incontable) y un recuento de cero para JBUTP\_GEA\_H\_A016, debido a que la densidad poblacional de la cepa es menor en comparación a las demás colonias evaluadas, por tal razón en esta dilución no se observa crecimiento alguno, como se muestra en la tabla anterior.

### **3.4 VIABILIDAD DE LOS ACTINOMICETOS CON RESPECTO A LOS PESTICIDAS EMPLEADOS.**

#### **3.4.1 Antibiograma**

El análisis de susceptibilidad de cada una de las cepas de actinomicetos frente a tres de los pesticidas comunes en el cultivo de banano a diferentes concentraciones, se realiza con el fin de determinar la viabilidad del consorcio de actinomicetos estudiados. Los cuales fueron previamente clasificados con potencial de biocontrol. Para este fin, se establecen cuatro diferentes concentraciones de pesticidas en mezcla, empleando diluciones correspondientes a  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{8}$  de la dosis recomendada para cultivos de banano.

De igual forma, se emplean dos métodos para el análisis de susceptibilidad a dos diferentes densidades microbianas con el objetivo de realizar una comparación en cuanto a concentración de microorganismo y método de análisis. Los resultados de la prueba de sensibilidad se categorizan de acuerdo a los estándares NCCLS [27], [30].

**Susceptible (S):** Indica que el microorganismo aislado es inhibido por una concentración conocida del agente antimicrobiano empleado.

**Intermedio (I):** En esta categoría se pueden encontrar las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs).

**Resistente (R):** Indica que un microorganismo no es inhibido por una concentración conocida del agente antimicrobiano.



### Método de antibiograma Disco- Placa (Kirby Bauer)

Pasados cinco días de incubación, a una temperatura controlada de 28°C, se observa crecimiento uniforme del microorganismo en la placa, lo que permite evidenciar resistencia por parte de cada uno de los actinomicetos en estudio frente al gradiente de concentración empleado en dicho ensayo para la mezcla de pesticidas elegidos. (Tabla 6).

De esta forma se concluye que a una densidad microbiana aproximada a la correspondiente a un bioinsumo ( $10^8$  UFC/mL) [25], se logra obtener resultados de resistencia significativos por parte de cada una de las colonias de actinomicetos analizadas, lo cual indica que una mezcla compuesta por las dosis recomendadas de los tres pesticidas, para el cultivo objeto de estudio no interfieren en el crecimiento microbiano de las colonias y por ende en su actividad biocontroladora.

Tabla 22. Prueba de susceptibilidad a pesticidas. Método de Kirby-Bauer.

Colonias	Interpretación
JBUTP_GEA_G_A011	Resistente
JBUTP_GEA_G_A023	Resistente
JBUTP_GEA_G_A012	Resistente
JBUTP_GEA_G_A013	Resistente
JBUTP_GEA_G_A014	Resistente
JBUTP_GEA_G_A015	Resistente
JBUTP_GEA_H_A016	Resistente
JBUTP_GEA_H_A017	Resistente
JBUTP_GEA_H_A018	Resistente
JBUTP_GEA_H_A019	Resistente
JBUTP_GEA_H_A020	Resistente
JBUTP_GEA_H_A021	Resistente
JBUTP_GEA_H_A022	Resistente

## Método de pozos

Para este método, se observó un crecimiento positivo en la totalidad del medio de cultivo excepto al interior de cada pozo inoculado con la mezcla de pesticidas en las diferentes concentraciones evaluadas.

Sin embargo, se evidencio la formación de un halo de inhibición en la colonia JBUTP\_GEA\_G\_A012, con un diámetro aproximado de 1.2 cm en el pozo correspondiente a la concentración denominada como 12 y el cual no presenta un diámetro significativo, concluyéndose que esta y las colonias restantes, son resistentes frente a la mezcla de pesticidas en sus diferentes concentraciones tal y como se observa en la figura 12, siendo este resultado netamente cualitativo al no ser posible cuantificar dicho diámetro.

Tabla 23. Prueba de susceptibilidad a pesticidas. Método de Pozos.

Colonias	Interpretación
JBUTP_GEA_G_A011	Resistente
JBUTP_GEA_G_A023	Resistente
JBUTP_GEA_G_A012	Resistente
JBUTP_GEA_G_A013	Resistente
JBUTP_GEA_G_A014	Resistente
JBUTP_GEA_G_A015	Resistente
JBUTP_GEA_H_A016	Resistente
JBUTP_GEA_H_A017	Resistente
JBUTP_GEA_H_A018	Resistente
JBUTP_GEA_H_A019	Resistente
JBUTP_GEA_H_A020	Resistente
JBUTP_GEA_H_A021	Resistente
JBUTP_GEA_H_A022	Resistente

Figura 13. Prueba de susceptibilidad para pesticidas, método de pozos.

Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A011



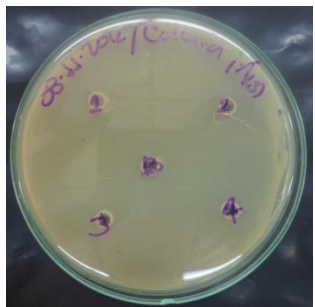
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A023



Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A012



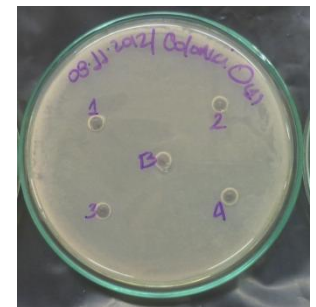
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A013



Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A014



Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A015



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A016



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A017



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A018



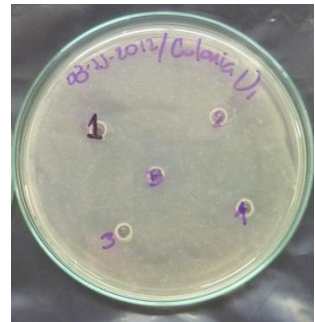
Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A019



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A020



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A021



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A022



Referencia: Autoras

De acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo realizado para cada método, se observa que la totalidad de las colonias evaluadas presentan resistencia frente a los pesticidas en sus diferentes concentraciones, tomándose este resultado como un parámetro cualitativo, interpretado como un 100% puesto que se ve reflejado en la ausencia de crecimiento al interior de los pozos en los cuales se encuentra la mezcla de pesticidas, caso contrario con el control positivo empleado.

Tabla 24. Porcentaje de la prueba de susceptibilidad a pesticidas

<b>Sensibilidad a pesticidas</b>		
<b>Categorías</b>	<b>Método</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>Susceptible (S)</b>	Pozos	0%
	Disco-Placa	0%
<b>Intermedio (I)</b>	Pozos	0%
	Disco-Placa	0%
<b>Resistente (R)</b>	Pozos	100%
	Disco-Placa	100%

De acuerdo a lo observado en los métodos empleados para la prueba de susceptibilidad, la cual fue desarrollada a dos densidades microbianas diferentes se observa que la resistencia presentada por las colonias evaluadas no se ve afectada por la concentración de organismo empleada.

La resistencia a los pesticidas empleados, por parte de las colonias en estudio evidencia una capacidad degradativa frente a diferentes tipos de compuestos dentro del grupo de los agroquímicos tanto organofosforados como organoclorados, con lo que se concluye que es un comportamiento razonable; el hecho de que las concentraciones de pesticidas utilizadas en los ensayos no alteren o inhiban su crecimiento en el medio a nivel “*in-vitro*”.

## CONCLUSIONES

De acuerdo al estudio de las interacciones presentes frente a *Ralstonia solanacearum* con respecto a la temperatura, se observa que el mayor porcentaje de interacciones amensalistas se encuentra a 35°C, relación que se ve favorecida considerando la temperatura promedio de las regiones con mayor porcentaje de cultivos de banano en Colombia. Las interacciones de competencia muestran su mayor incidencia a temperatura ambiente y en su mayor proporción se encuentran interacciones de neutralismo a 28°C.

El mayor potencial de control biológico frente al fitopatógeno *Ralstonia solanacearum* por interacciones de amensalismo pertenece a los géneros *Streptomyces spp.* y *Nocardia spp.* de colonias pertenecientes al ecosistema humedal.

En su mayoría las poblaciones evaluadas que presentaron algún tipo de actividad significativa para la aplicación en estudio (amensalismo o competencia) pertenecen al ecosistema de humedal.

Se establece que la interacción microbiana de amensalismo se vio claramente favorecida en un tiempo de inoculación con una diferencia de siete días entre ambas poblaciones, ya que se garantiza un desarrollo avanzado de las colonias de actinomicetos al momento del encuentro con el patógeno.

Teniendo en cuenta el análisis realizado en el software estadístico SPSS versión 11.5 se establece que para la cantidad de datos evaluados no existe una dependencia entre las interacciones microbianas y la temperatura pero si es significativo para los ensayos el tiempo de inoculación del patógeno.

La prueba de susceptibilidad realizada para las colonias estudiadas muestra un porcentaje de resistencia del 100%, frente a la mezcla de pesticidas en sus diferentes concentraciones; lo que indica que las poblaciones de actinomicetos en estudio pueden ser evaluadas como inoculantes microbianos en medios contaminados con el tipo de agroquímicos evaluados, teniendo en cuenta que las condiciones ambientales son un factor determinante en futuros ensayos.

## RECOMENDACIONES

Establecer un mayor número de ensayos y variables que permitan determinar una verdadera significancia de los datos con respecto al cambio de parámetros dependientes e independientes y de este modo finalmente establecer las condiciones y poblaciones microbianas más eficientes para la evaluación de esta actividad biológica.

Realizar ensayos posteriores de viabilidad de los actinomicetos en plántulas de banano; considerando que son organismos propios de la rizosfera donde las condiciones ambientales difieren y *Ralstonia solanacearum* un fitopatógeno de posible ataque foliar, lo que puede inferir en problemas de interacción microbiana.

Continuar con la identificación por especie de los actinomicetos que presentaron potencial en este trabajo, para determinar finalmente las características de cada cepa.

Evaluar la patogenicidad de cada una de las cepas de actinomicetos en estudio con el fin de establecer los efectos de su aplicación como inoculante microbiano en la planta y/o el consumidor.

Determinar las formas de interacción exactas encontradas, con el fin de establecer si se constituyen como relaciones directas o por la generación de metabolitos secundarios que puedan ser extraídos para maximizar su efecto en campo.

Realizar nuevos ensayos de viabilidad, a diferentes temperaturas y densidades microbianas, con el fin de recopilar la información necesaria que sustente un comportamiento de resistencia, puesto que para este grupo de microorganismo no se encuentra documentación suficiente con la que sea posible confrontar valores cuantitativos.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. Z. Evangelista y E. A. Moreno, «Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producidos por actinomicetos,» *Bio Tecnología*, vol. 11, nº III, 2007.
- [2] L. Bueno, L. M. Castaño, D. Hernandez, K. Peña, C. A. Ordoñez, J. R. Rodriguez y A. M. Salazar, «Clasificación de actinomicetos aislados del suelo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira para usos en biorremediación.,» Pereira, 2012.
- [3] M. Franco, «Evaluación de carecteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de Micorrizas,» 2008.
- [4] G. Cardona, C. Peña y M. Ruiz, «Comunidades de hongos actinomicetos en tres tipos de vegetación de la Amazonia colombiana; abundancia, morfotipos y el gen 16s ADNr,» *Revista Biología Tropical* , vol. 57, nº IV, pp. 1119 - 1139.
- [5] «SCRIBD,» [En línea]. Available: <http://es.scribd.com/doc/25194077/26/TEMA-26-ACTINOMICETOS>. [Último acceso: 2012].
- [6] L. Carrillo, Microbiología agrícola, Salta, Argentina: Universidad Nacional de Salta, 2003.
- [7] E. Sastoque, «Aislamiento y selección de microorganismos productores de quitinasas a partir de residuos de concha de camarón con potencial biocontrolador,» Facultad de ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C, 2005.
- [8] M. Franco, «Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización,» Bogotá D.C, 2009.
- [9] D. Farfán y C. Gutiérrez, «Determinación de la actividad quitinolítica de cepas nativas de actinomicetos y su efecto antagónico sobre microorganismos fitopatógenos,» Bogotá D.C, 2009.



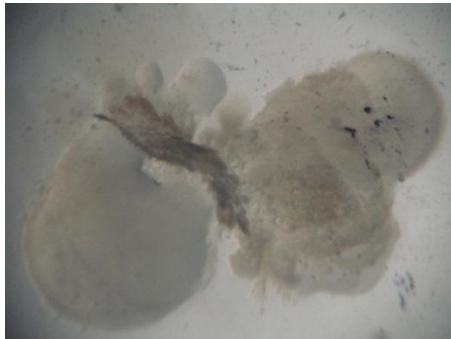
- [10] M. Fialho de Oliveira, M. Germano da Silva y S. T. Van Der Sand, «Potencial antifitopatógico de actinobacterias endofíticas aisladas para plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) del sur de Brasil y caracterización de *Streptomyces* sp. R18(6), un agente potencial de biocontrol,» *Research in Microbiology*, vol. 161, pp. 565 - 572, 2010.
- [11] R. M. Atlas y R. Bartha, *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*, IV ed., P. A. Wesley, Ed., Madrid, 2008.
- [12] H. J. Patil, A. K. Srivastava, D. P. Singh, B. L. Chaudhari y D. K. Arora, «Medición de la respuesta bioquímica de actinomicetos en tomate (*Solanum lycopersicum*) en la mejora de la bioprotección contra *Rizoctonia solani*,» 2011.
- [13] Fondo para el financiamiento del sector agropecuario, 2012. [En línea]. Available: [http://www.finagro.com.co/html/i\\_portals/index.php](http://www.finagro.com.co/html/i_portals/index.php).
- [14] M. Román, M. Alonso y A. Barrios, «Marcadores de la variabilidad genética en el género *Musa*,» Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales. Facultad de Biología U.H.
- [15] INSTITUTO NACIONAL DE ECOLOGÍA Y CAMBIO CLIMÁTICO, 2012. [En línea]. Available: <http://www2.ine.gob.mx/sistemas/plaguicidas/busquedas.html>.
- [16] F. Smith E, «A bacteria disease of tomato, pepper, eggplant and irish potato (*Bacillus solanacearum* nov. sp),» United State Department of Agriculture. Division of Vegetable Physiology and Pathology .
- [17] V. Merchan Vargas, *Manual integrado de plagas del platano y del banano*, Cartagena de Indias: Asociación de Bananeros de Colombia (AUGURA), 2002.
- [18] ESCUELA DE QUÍMICA - UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA, *Manual de Microbiología*, Pereira, 2012.
- [19] C. Cardozo, P. Rodríguez y J. Cortes, «Variabilidad genética de la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Burkholderiales burkholderiaceae) en la zona bananera de Urabá (Colombia),» *Revista Biología Tropical*, vol. 58, nº I, pp. 31 - 44, 2009.
- [20] Y. Tejeda Gomez, «Caracterización de *Ralstonia solanacearum* a través del estudio de su diversidad genética,» *Red de Revistas Científicas de America Latina, El Caribe, España y Portugal*, vol. 10, nº IV, 2006.

- [21] V. Obregón, «Caracterización de la variabilidad poblacional de *Ralstonia solanacearum* en cultivos de solanáceas del noreste argentino,» Universidad Nacional del Litoral. Facultad de Ciencias Agrarias, Santa Fé. Argentina, 2009.
- [22] Z. Wei, X. Yang, S. Yin, Q. Shen, W. Ran y Y. Xu, «Efficacy of *Bacillus* sp. fortified organic fertilizer in controlling bacterial wilt of tomato in the field,» *Applied soil ecology*, vol. 48, pp. 152 - 159, 2011.
- [23] RALSTOP, «Aislamiento, identificación y detección de la bacteria *Ralstonia solanacearum* agente causal de marchitez bacteriana,» Montevideo, 2009.
- [24] Ó. A. Guzmán Piedrahita, «EL NEMATODO BARRENADOR (*Radopholus similis* [COBB],» *Scielo*, vol. I, nº 33, pp. 137 - 153, 2011.
- [25] J. R. Rodríguez Nuñez y P. E. Vélez, «Evaluación de etapas del proceso productivo de un bioinsumo dirigido a la degradación de materiales orgánicos y regulación sanitaria de cultivos,» *UCM. Revista de investigaciones*, vol. I, nº 17, pp. 87 - 100, Mayo 2011.
- [26] M. Pedrique de Aulacio, «Determinación de la sensibilidad de las bacterias a los antimicrobianos (Antibiograma),» Universidad Central de Venezuela, Caracas, 2002.
- [27] National Committee for Clinical Laboratory Standards. NCCLS. M24 para actinomicetos, Octubre 2012. [En línea]. Available: <http://www.acronymfinder.com/National-Committee-for-Clinical-Laboratory-Standards-%28NCCLS%29.html>.
- [28] G. W. Guarín G., Impacto en la variabilidad climática en la producción de banano en el Urabá antioqueño, Medellín, 2011, p. 7.
- [29] L. Bueno L, Interviewee, *Software estadístico SPSS 11.5*. [Entrevista]. Noviembre 2012.
- [30] Ministerio de Salud del Perú , «Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión,» *Instituto Nacional de Salud*, vol. 30, 2012.
- [31] D. H. Bergey, «Bergey's Manual of Systematic Bacteriology,» de *Growth and Examination of Actinomycets - Some Guidelines*, pp. 2340 - 2343.

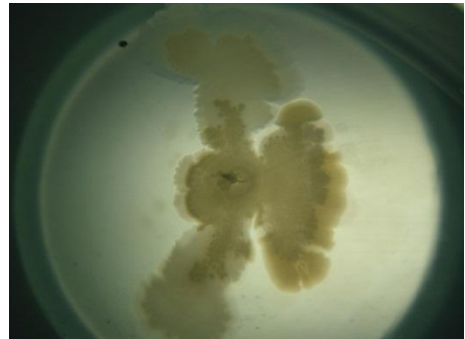
[32] INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACIÓN,  
Documentación, presentación de tesis, trabajos de grado y otros trabajos de  
investigación. NTC 1486., Bogotá D.C: INSTITUTO COLOMBIANO DE  
NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACIÓN (ICONTEC), 2008.

## ANEXOS

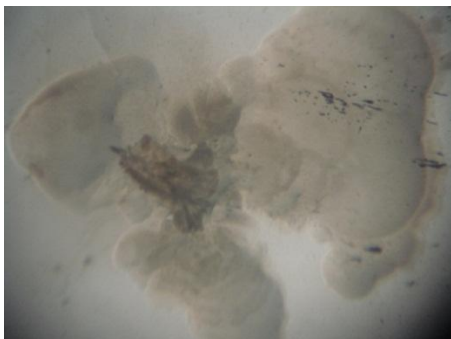
### Anexo A. Preparación de cepas. Vista al estereoscopio.



Colonia JBUTP\_GEA\_G\_A011  
*Actinopolyspora* spp.



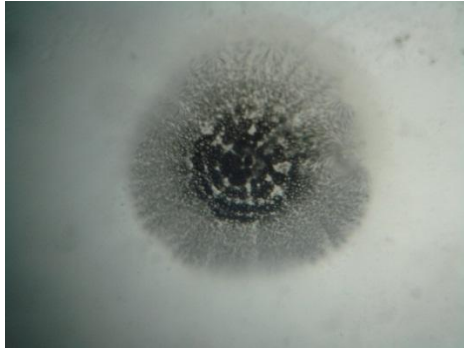
Colonia JBUTP\_GEA\_G\_A011  
*Actinopolyspora* spp.



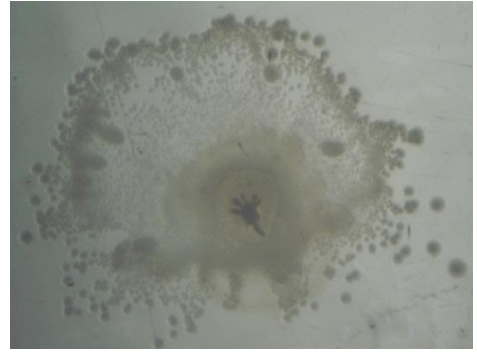
Colonia JBUTP\_GEA\_G\_A023  
*Actinopolyspora* spp.



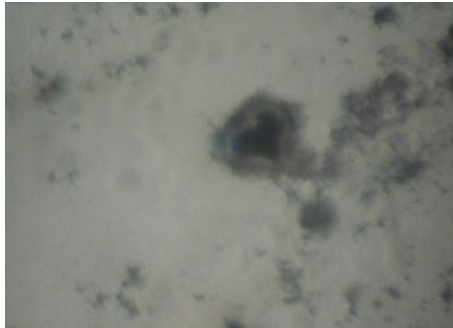
Colonia JBUTP\_GEA\_G\_A023  
*Actinopolyspora* spp.



Colonia JBUTP\_GEA\_G\_A012  
*Nocardia spp.*



Colonia JBUTP\_GEA\_G\_A012  
*Nocardia spp.*



Colonia JBUTP\_GEA\_G\_A013  
*Nocardia spp.*



Colonia JBUTP\_GEA\_G\_A013  
*Nocardia spp.*



Colonia JBUTP\_GEA\_G\_A014  
*Nocardia spp.*



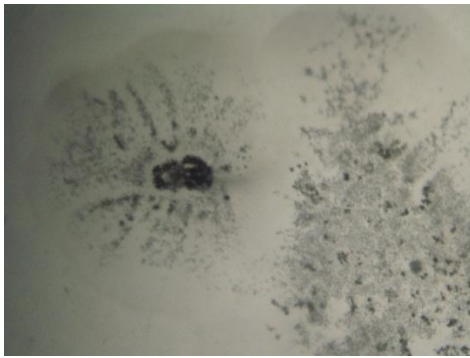
Colonia JBUTP\_GEA\_G\_A014  
*Nocardia spp.*



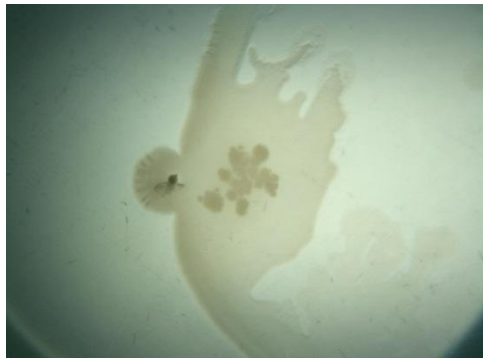
Colonia JBUTP\_GEA\_G\_A015  
*Actinobispora* spp.



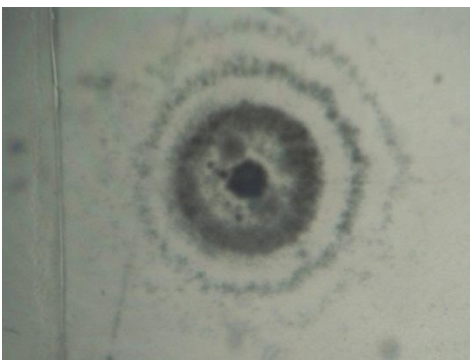
Colonia JBUTP\_GEA\_G\_A015  
*Actinobispora* spp.



Colonia JBUTP\_GEA\_H\_A016  
*Nocardia* spp.



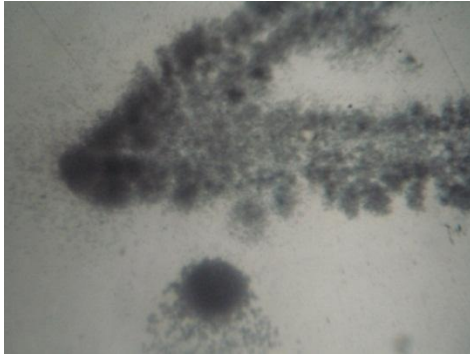
Colonia JBUTP\_GEA\_H\_A016  
*Nocardia* spp.



Colonia JBUTP\_GEA\_H\_A017  
*Streptomyces* spp.



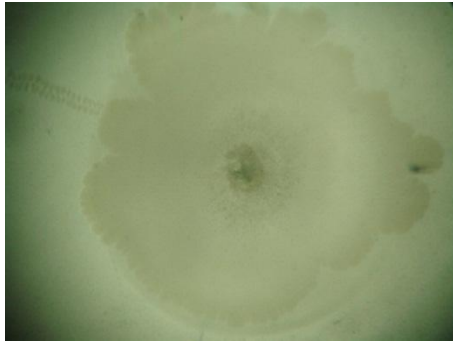
Colonia JBUTP\_GEA\_H\_A017  
*Streptomyces* spp.



Colonia JBUTP\_GEA\_H\_A018  
*Streptomyces* spp.



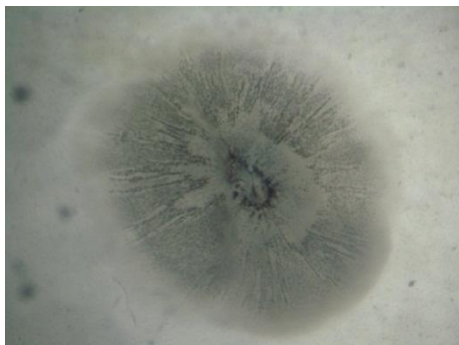
Colonia JBUTP\_GEA\_H\_A018  
*Streptomyces* spp.



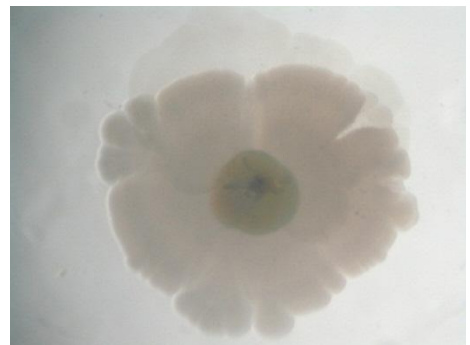
Colonia JBUTP\_GEA\_H\_A019  
*Streptomyces* spp.



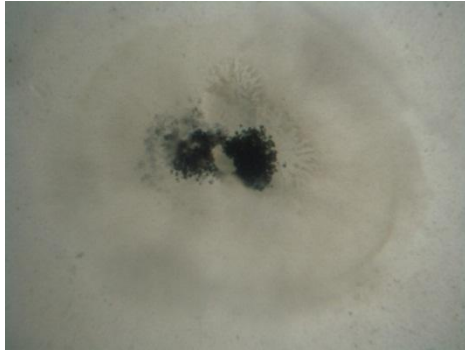
Colonia JBUTP\_GEA\_H\_A019  
*Streptomyces* spp.



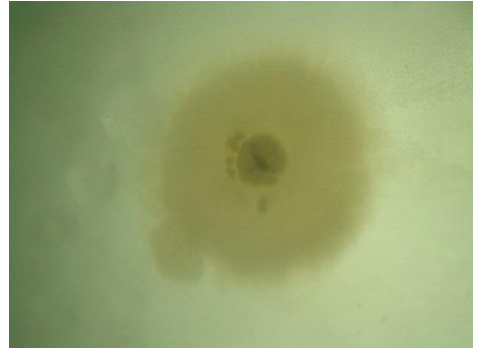
Colonia JBUTP\_GEA\_H\_A020  
*Streptomyces* spp.



Colonia JBUTP\_GEA\_H\_A020  
*Streptomyces* spp.



Colonia JBUTP\_GEA\_H\_A021  
*Nocardiosis spp.*



Colonia JBUTP\_GEA\_H\_A021  
*Nocardiosis spp.*



Colonia JBUTP\_GEA\_H\_A022  
*Nocardia spp.*



Colonia JBUTP\_GEA\_H\_A022  
*Nocardia spp.*

El anexo anterior muestra la morfología de cada una de las 13 cepas de actinomicetos evaluadas en dos medios de cultivo diferentes; siendo las fotos de la columna de la izquierda, las correspondientes al agar avena (Específico para Actinomicetos) y las encontradas en la columna derecha, el medio general ideal para la realización de los ensayos (Agar Nutritivo).



## Anexo B. Tipos de interacciones entre poblaciones microbianas.

**Tabla 3.1**

Tipos de interacciones entre poblaciones microbianas

Nombre de la interacción	Efecto de la interacción	
	Población A	Población B
Neutralismo	0	0
Comensalismo	0	+
Sinergismo (protooperación)	+	+
Mutualismo (simbiosis)	+	+
Competencia	-	-
Amensalismo	0 o +	-
Depredación	+	-
Parasitismo	+	-

0 = sin efecto

+ = efecto positivo

- = efecto negativo

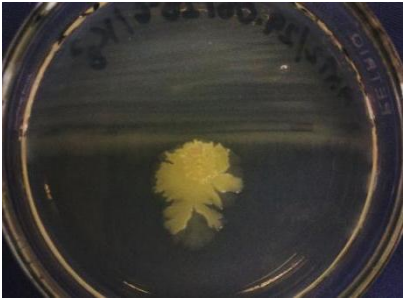
Referencia: [11]

**Anexos C. Antagonismo 1 – Referencia: Autoras**

**TEMPERATURA: 28°C**

**Colonias con interacciones de neutralismo**

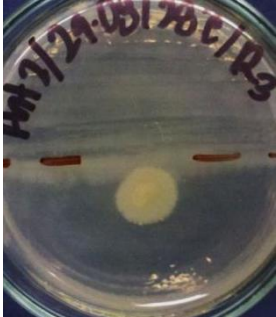
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A011



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A016



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A018



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A019

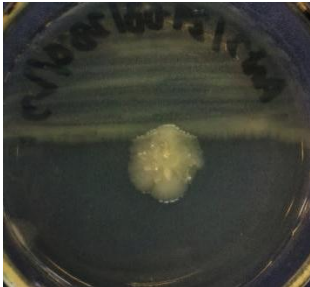


**Colonias con interacciones de amensalismo**

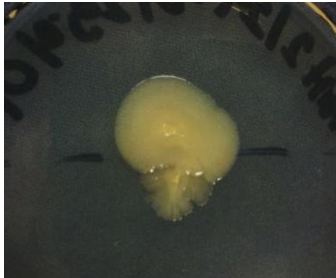
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A023



Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A012



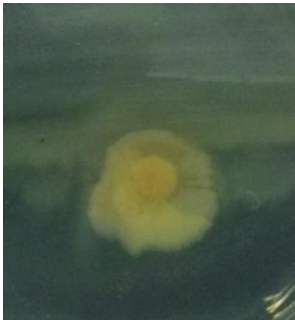
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A015



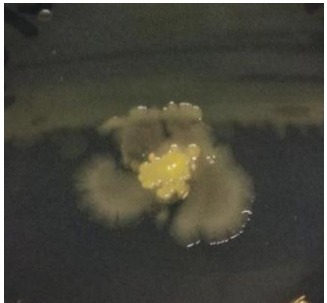
Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A017



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A021

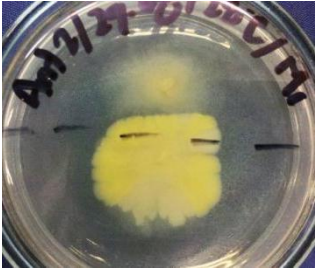


Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A022



**Colonias con interacciones de competencia**

Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A013



Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A014



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A020



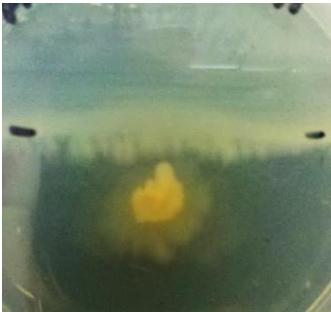
**TEMPERATURA AMBIENTE**

**Colonias con interacciones de neutralismos**

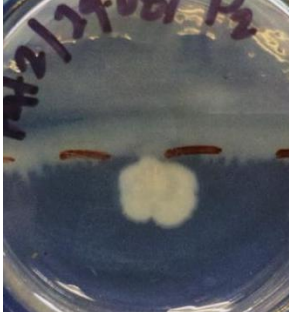
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A012



Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A013



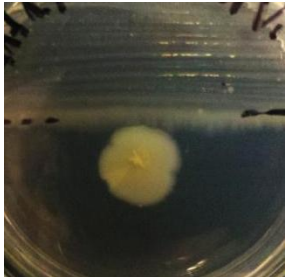
Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A016



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A020

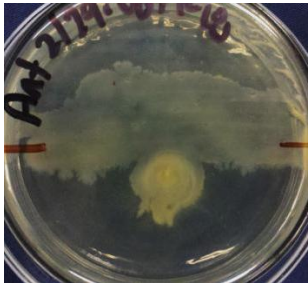


Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A022

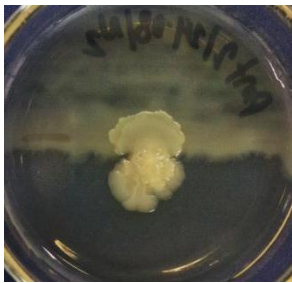


**Colonias con interacciones de amensalismo**

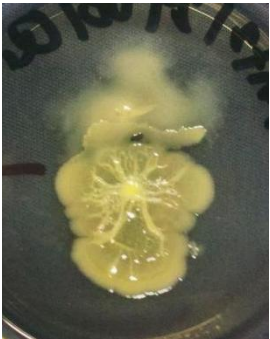
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A023



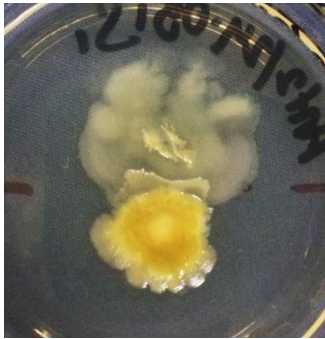
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A014



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A017



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A019



**Colonias con interacciones de competencia**

Colonia JBUTP\_GEA\_G\_A011      Colonia JBUTP\_GEA\_H\_A018

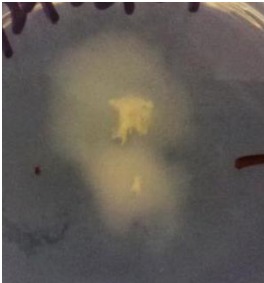


Colonia JBUTP\_GEA\_H\_A021



**Colonia con interacciones de Sinergismo**

Colonia JBUTP\_GEA\_G\_A015



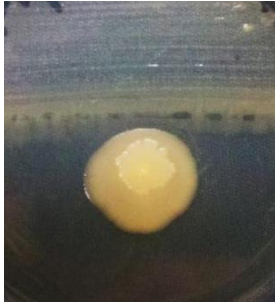
**TEMPERATURA: 35°C**

**Colonias con interacciones de Neutralismo**

Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A023



Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A014



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A019

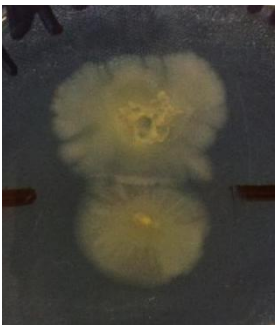


Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A020



**Colonias con interacciones de Amensalismo**

Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A015



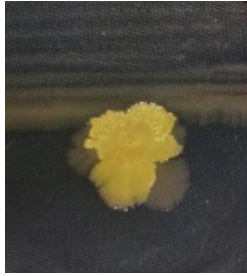
Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A022



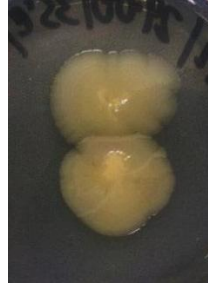


**Colonias con interacciones de competencia**

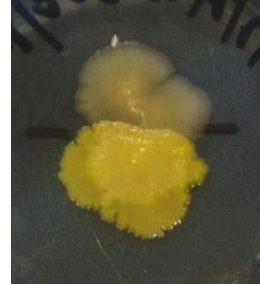
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A011



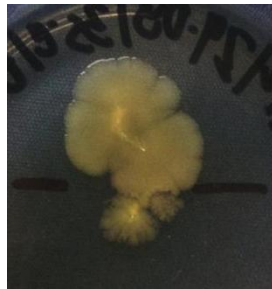
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A012



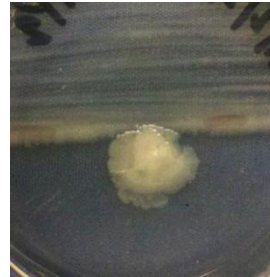
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A013



Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A015



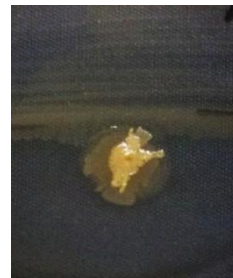
Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A016



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A017



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A021

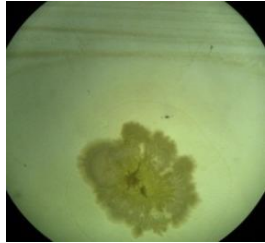


**Anexo D. Antagonismo 2 – Referencia: Autoras**

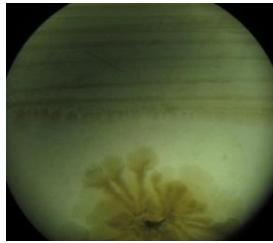
**TEMPERATURA: 28°C**

**Colonias con interacciones de neutralismo**

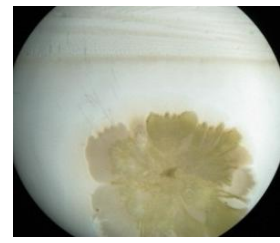
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A023



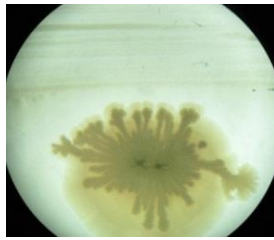
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A012



Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A013



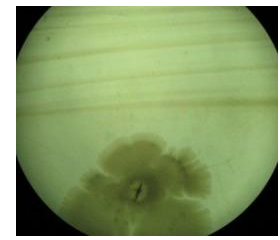
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A014



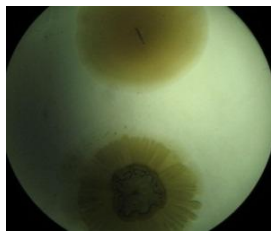
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A015



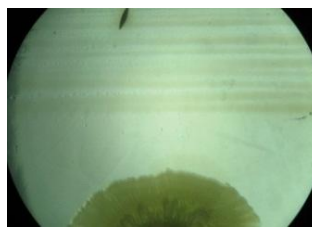
Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A016



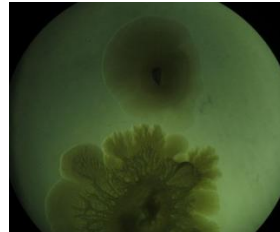
Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A017



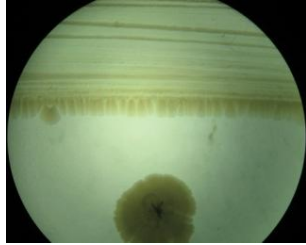
Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A018



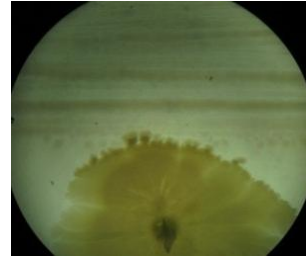
Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A019



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A020

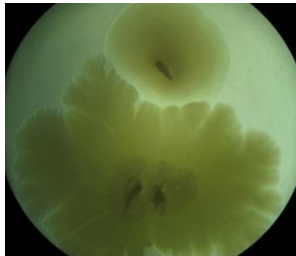


Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A022

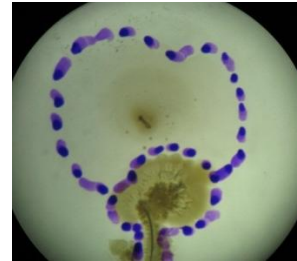


### Colonias con interacciones de competencia

Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A011



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A021



### TEMPERATURA AMBIENTE

#### Colonias con interacciones de neutralismo

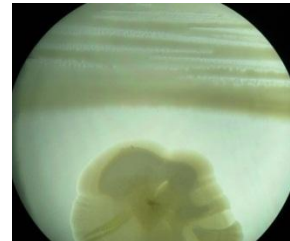
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A012



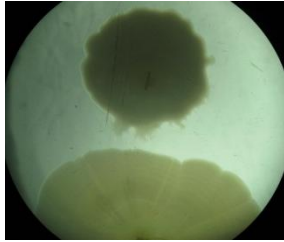
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A013



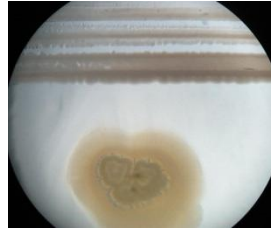
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A015



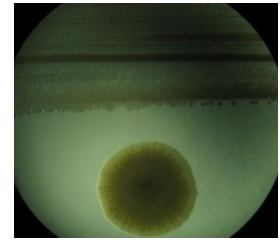
Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A017



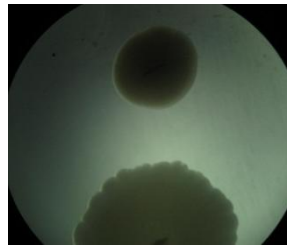
Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A018



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A019

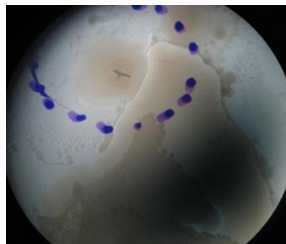


Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A020

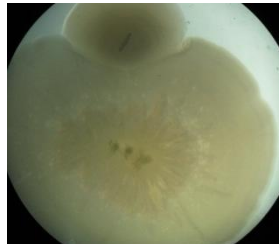


### Colonias con interacciones de competencia

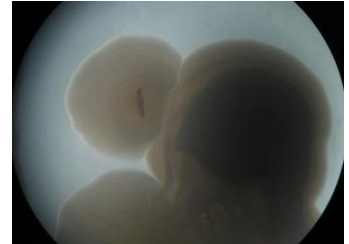
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A011



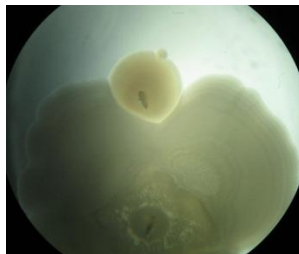
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A023



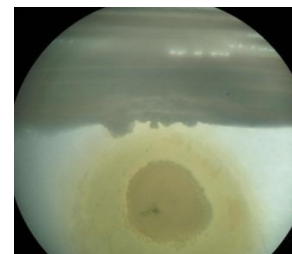
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A014



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A016



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A021



**Colonias con interacciones de amensalismo**

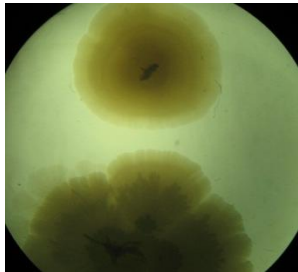
Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A022



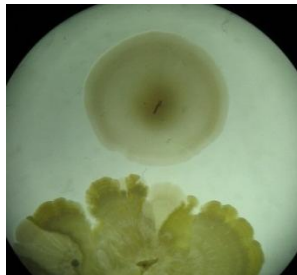
**TEMPERATURA: 35°C**

**Colonias con interacciones de neutralismo**

Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A012



Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A013



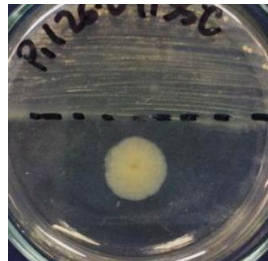
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A014



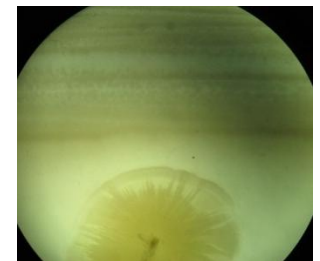
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A015



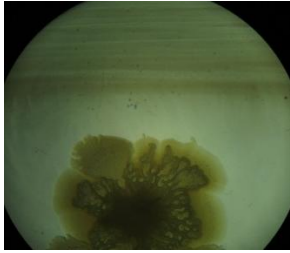
Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A016



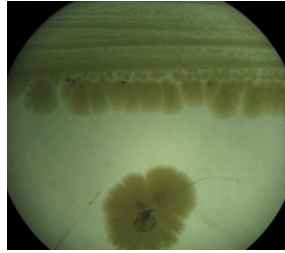
Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A018



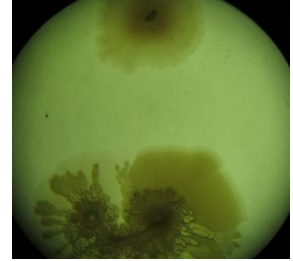
Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A019



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A020

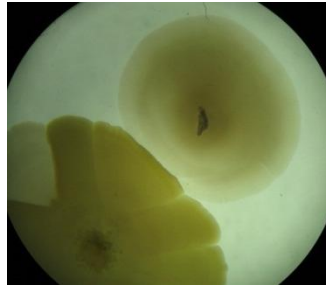


Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A021



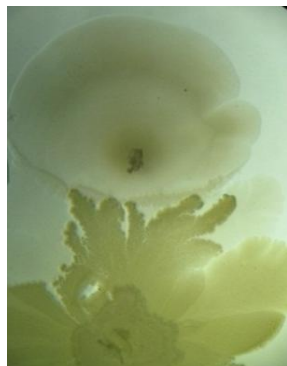
### Colonias con interacciones de competencia

Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A017



### Colonias con interacciones de amensalismo

Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A011



Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A023



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A022

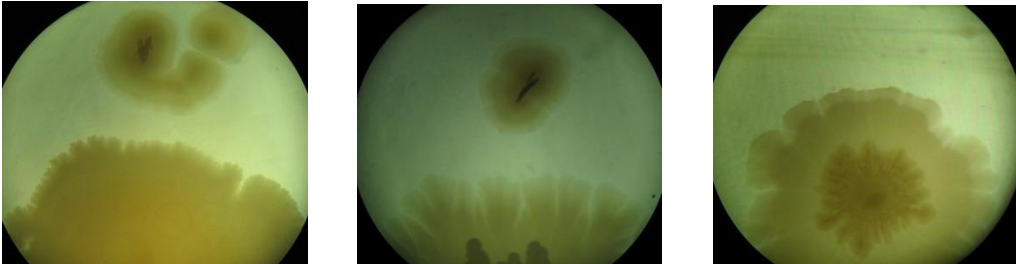


**Anexo E. Antagonismo 3 – Referencia: Autoras**

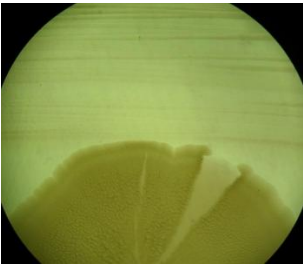
**TEMPERATURA: 28°C**

**Colonia con interacciones de neutralismo**

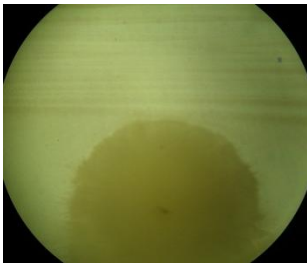
Colonia JBUTP\_GEA\_G\_A011      Colonia JBUTP\_GEA\_G\_A012      Colonia JBUTP\_GEA\_G\_A014



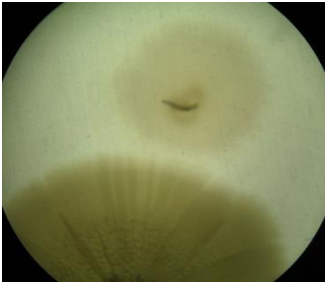
Colonia JBUTP\_GEA\_H\_A017



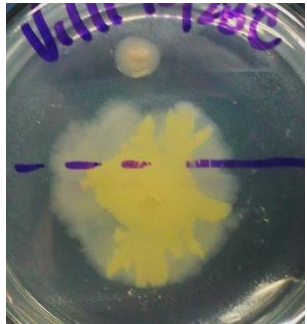
Colonia JBUTP\_GEA\_H\_A018



Colonia JBUTP\_GEA\_H\_A021

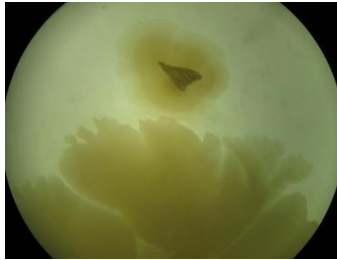


Colonia JBUTP\_GEA\_H\_A022



## Colonias con interacciones de competencia

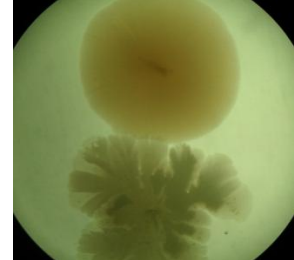
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A023



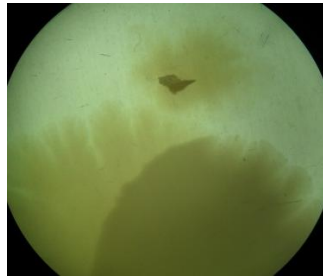
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A013



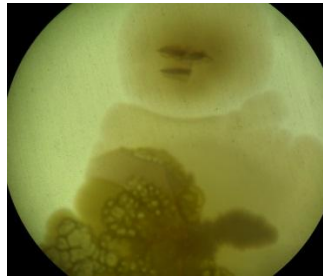
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A015



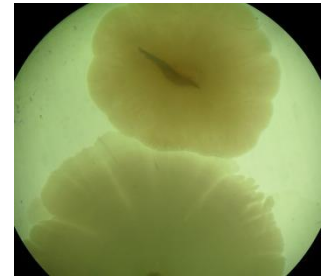
Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A016



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A019



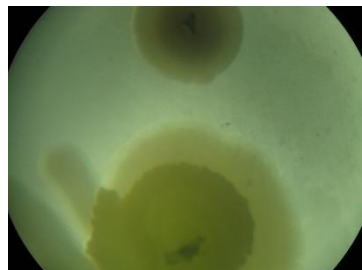
Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A020



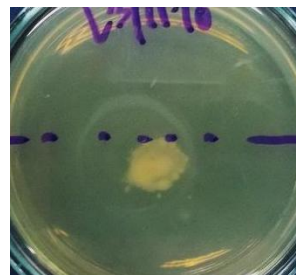
## TEMPERATURA AMBIENTE

### Colonias con interacciones de neutralismo

Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A011



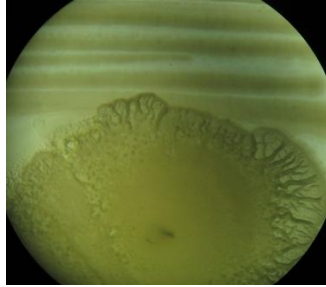
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A012



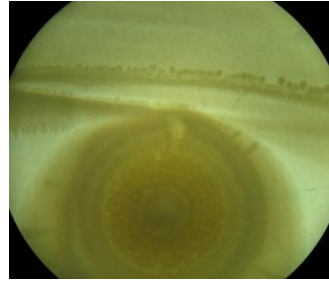


**Colonias con interacciones de amensalismo**

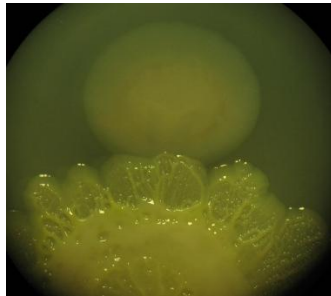
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A023



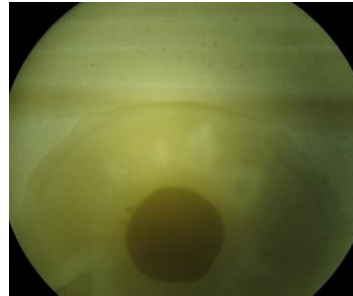
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A014



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A019

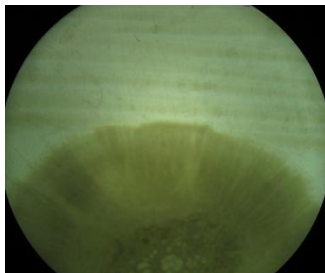


Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A021

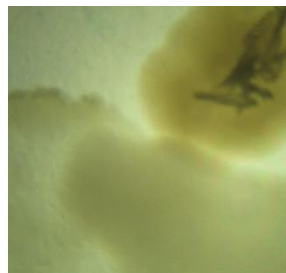


**Colonias con interacciones de competencia**

Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A013



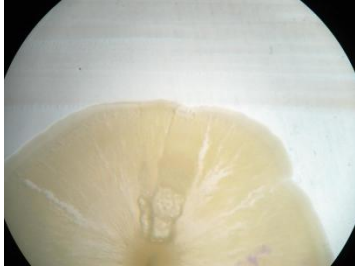
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A015



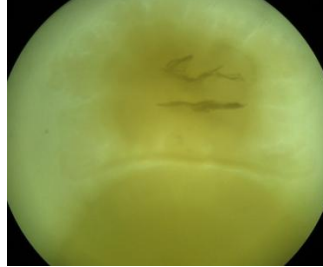
Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A016



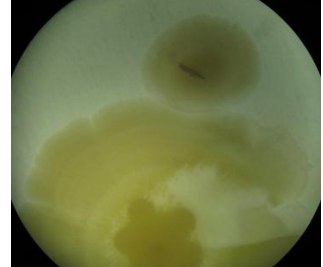
Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A017



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A018



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A020



**TEMPERATURA:35°C**

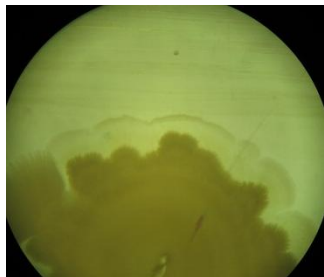
**Colonias con interacciones de neutralismo**

Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A015

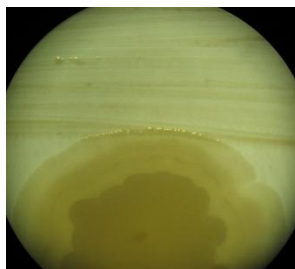


**Colonias con interacciones de amensalismo**

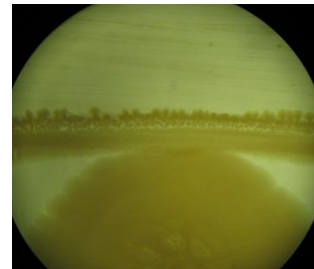
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A013



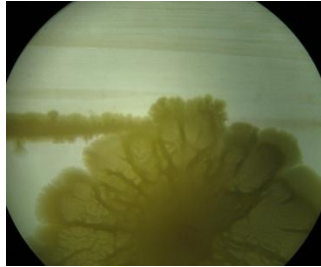
Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A016



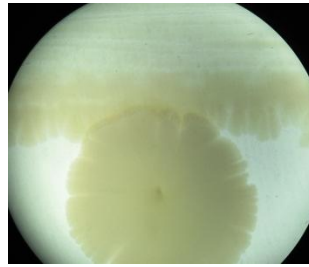
Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A017



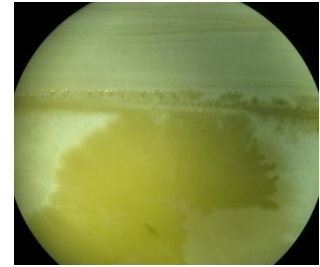
Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A019



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A020

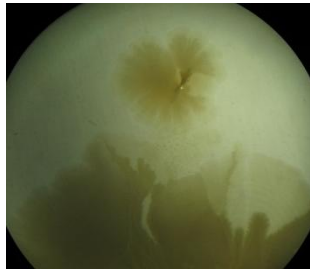


Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A022

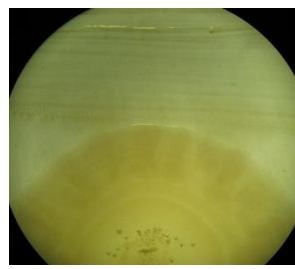


**Colonias con interacciones de competencia**

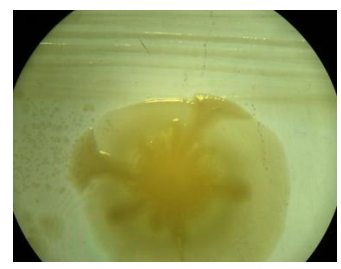
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A023



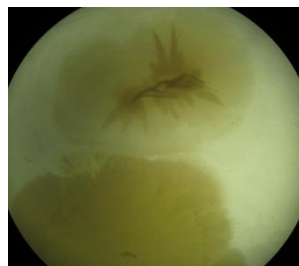
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A012



Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A014



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A018



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A021

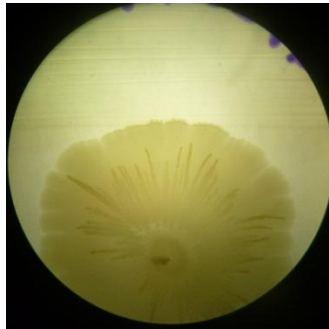


**Anexo F. Antagonismo 4 – Referencia: Autoras**

**TEMPERATURA: 28°C**

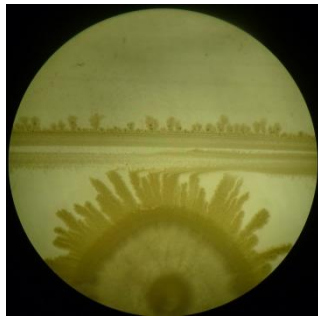
**Colonias con interacciones de neutralismo**

Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A017



**Colonias con interacciones de amensalismo**

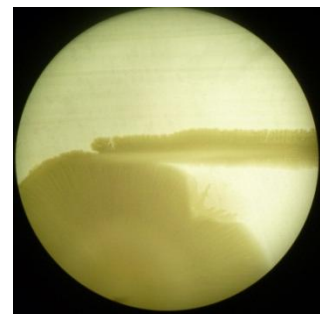
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A011



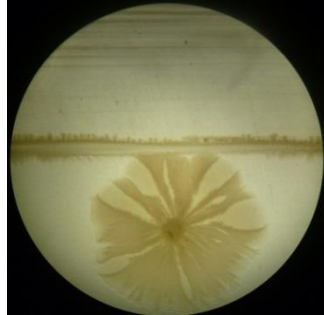
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A012



Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A013



Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A014

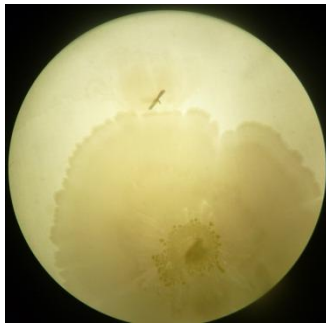


Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A015

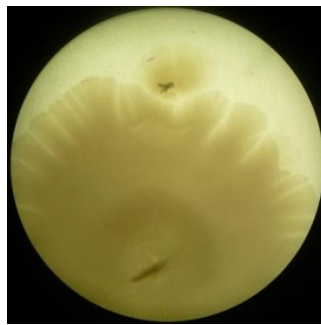


**Colonias con interacciones de competencia**

Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A023



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A016



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A018



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A019



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A020



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A021



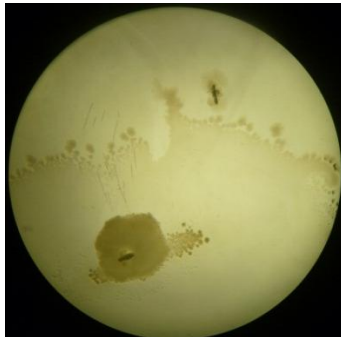
Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A022



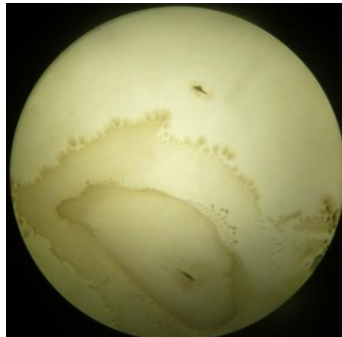
## TEMPERATURA AMBIENTE

### Colonias con interacciones de neutralismo

Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A011



Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A012

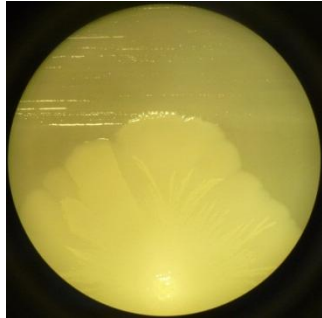


Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A016

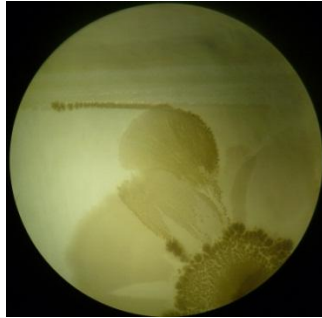


**Colonias con interacciones de amensalismo**

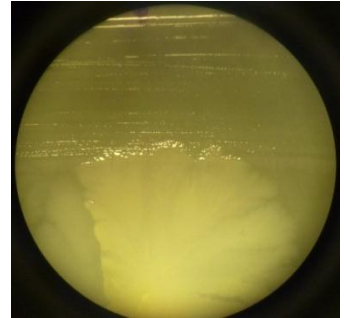
Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A017



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A021



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A022

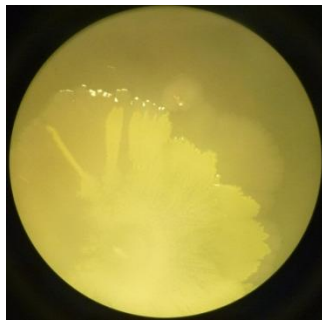


**Colonias con interacciones de competencia**

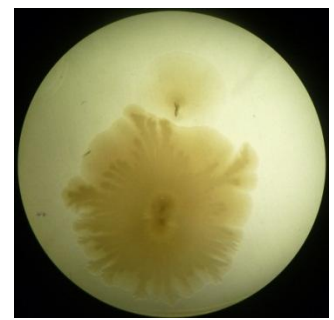
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A023



Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A013



Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A014



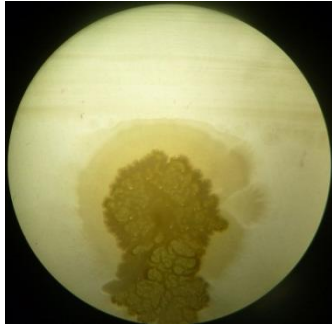
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A015



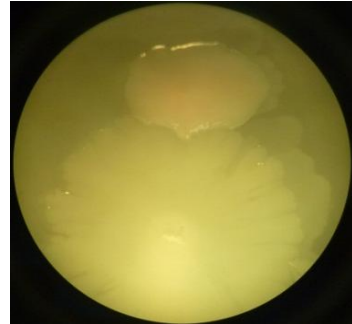
Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A018



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A019



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A020



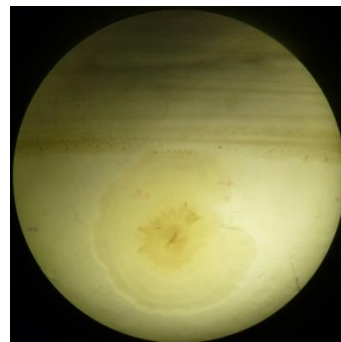
**TEMPERATURA: 35°C**

**Colonias con interacciones de neutralismo**

Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A023

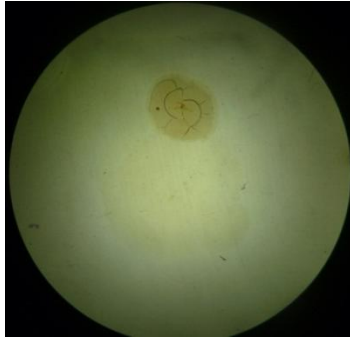


Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A018





Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A020



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A021



**Colonias con interacciones de amensalismo**

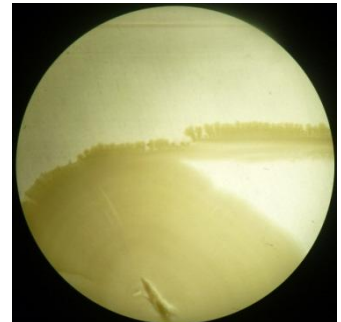
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A011



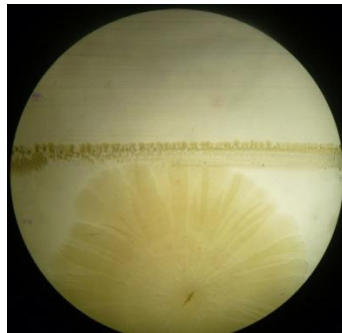
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A012



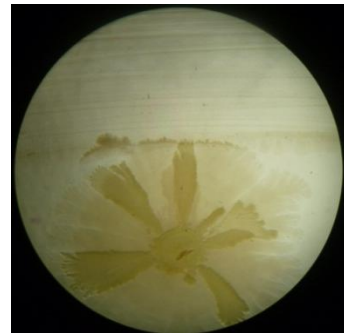
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A013



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A017



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A022



**Colonias con interacciones de competencia**

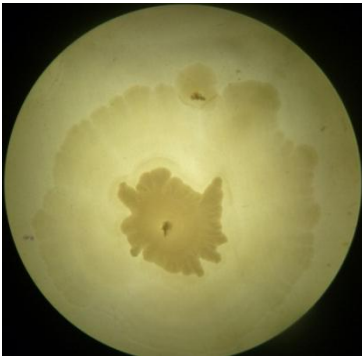
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A014



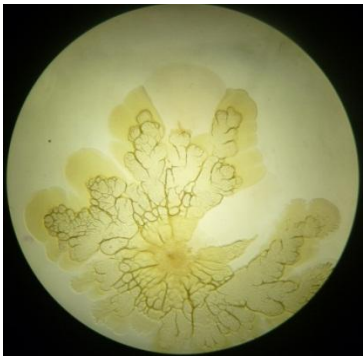
Colonia  
JBUTP\_GEA\_G\_A015



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A016



Colonia  
JBUTP\_GEA\_H\_A019



**Anexo G. Análisis de contingencia, SPSS 11.5**

**Resultados análisis de contingencia, SPSS 11.5**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
<b>Chi-cuadrado de Pearson</b>	33,248(a)	36	,600
<b>Razón de verosimilitud</b>	27,372	36	,849
<b>N de casos válidos</b>	156		

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
<b>Chi-cuadrado de Pearson</b>	33,248(a)	36	,600
<b>Razón de verosimilitud</b>	27,372	36	,849
<b>N de casos válidos</b>	156		

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
<b>Chi-cuadrado de Pearson</b>	26,162(a)	9	,002
<b>Razón de verosimilitud</b>	25,989	9	,002
<b>N de casos válidos</b>	156		

## Notas análisis de contingencia, SPSS 11.5

<b>Resultados creados</b>		09-DEC-2012 12:55:46
<b>Comentarios</b>		
<b>Entrada</b>	Datos	C:\Users\lili\Desktop\antagonismos2.sav
	Filtro	<ninguna>
	Peso	<ninguna>
	Segmentar archivo	<ninguna>
	Núm. de filas del archivo de trabajo	156
<b>Tratamiento de los valores perdidos</b>	Definición de los perdidos	Los valores perdidos definidos por el usuario serán tratados como perdidos.
	Casos utilizados	Los estadísticos de las tablas se basan en todos los casos con datos válidos en los rangos especificados para todas las variables de las tablas.
<b>Sintaxis</b>		CROSSTABS /TABLES=tipointe BY colonia /FORMAT= AVALUE TABLES /STATISTIC=CHISQ /CELLS= COUNT /BARCHART .
<b>Recursos</b>	Tiempo transcurrido	0:00:00,00
	Dimensiones solicitadas	2
	Casillas disponibles	87380

<b>Resultados creados</b>		09-DEC-2012 13:05:27
<b>Comentarios</b>		
<b>Entrada</b>	Datos	C:\Users\lili\Desktop\antagonismos2.sav
	Filtro	<ninguna>
	Peso	<ninguna>
	Segmentar archivo	<ninguna>
	Núm. de filas del archivo de trabajo	156
<b>Tratamiento de los valores perdidos</b>	Definición de los perdidos	Los valores perdidos definidos por el usuario serán tratados como perdidos.
	Casos utilizados	Los estadísticos de las tablas se basan en todos los casos con datos válidos en los rangos especificados para todas las variables de las tablas.
<b>Sintaxis</b>		CROSSTABS /TABLES=colonia BY temperattipointe /FORMAT=AVALUE TABLES /STATISTIC=CHISQ /CELLS=COUNT /BARChart .
<b>Recursos</b>	Tiempo transcurrido	0:00:00,02
	Dimensiones solicitadas	2
	Casillas disponibles	95324

<b>Resultados creados</b>		09-DEC-2012 13:06:06
<b>Comentarios</b>		
<b>Entrada</b>	Datos	C:\Users\lili\Desktop\antagonismos2.sav
	Filtro	<ninguna>
	Peso	<ninguna>
	Segmentar archivo	<ninguna>
	Núm. de filas del archivo de trabajo	156
<b>Tratamiento de los valores perdidos</b>	Definición de los perdidos	Los valores perdidos definidos por el usuario serán tratados como perdidos.
	Casos utilizados	Los estadísticos de las tablas se basan en todos los casos con datos válidos en los rangos especificados para todas las variables de las tablas.
<b>Sintaxis</b>		CROSSTABS /TABLES=temperat BY tipointe /FORMAT= AVALUE TABLES /STATISTIC=CHISQ /CELLS= COUNT /BARChart .
<b>Recursos</b>	Tiempo transcurrido	0:00:00,02
	Dimensiones solicitadas	2
	Casillas disponibles	116508

<b>Resultados creados</b>		30-JAN-2013 14:22:25
<b>Comentarios</b>		
<b>Entrada</b>	Datos	C:\Users\lili\Desktop\antagonismos2.sav
	Filtro	<ninguna>
	Peso	<ninguna>
	Segmentar archivo	<ninguna>
	Núm. de filas del archivo de trabajo	156
<b>Tratamiento de los valores perdidos</b>	Definición de los perdidos	Los valores perdidos definidos por el usuario serán tratados como perdidos.
	Casos utilizados	Los estadísticos de las tablas se basan en todos los casos con datos válidos en los rangos especificados para todas las variables de las tablas.
<b>Sintaxis</b>		CROSSTABS /TABLES=antagoni BY tipointe /FORMAT= AVALUE TABLES /STATISTIC=CHISQ /CELLS= COUNT /BARChart .
<b>Recursos</b>	Tiempo transcurrido	0:00:00,01
	Dimensiones solicitadas	2
	Casillas disponibles	87380

## Resumen del procesamiento de los casos, análisis de contingencia SPSS 11.5

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
<b>TIPOINTE * COLONIA</b>	156	100,0%	0	,0%	156	100,0%

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
<b>COLONIA * temperatura</b>	156	100,0%	0	,0%	156	100,0%
<b>COLONIA * TIPOINTE</b>	156	100,0%	0	,0%	156	100,0%

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
<b>antagonismo * TIPOINTE</b>	156	100,0%	0	,0%	156	100,0%



## Tablas de contingencia, SPSS 11.5

Tipo de interacción \* Colonia

		COLONIA						
		G_A011	G_A012	G_A013	G_A014	G_A015	G_A023	H_A016
TIPOINTE	Neutralismo	5	7	4	4	4	3	5
	Competencia	4	2	5	5	5	5	6
	Amensalismo	3	3	3	3	2	4	1
	Sinergismo	0	0	0	0	1	0	0
<b>Total</b>		12	12	12	12	12	12	12
		COLONIA						Total
		H_A017	H_A018	H_A019	H_A020	H_A021	H_A022	
TIPOINTE	Neutralismo	4	6	5	6	3	4	60
	Competencia	3	5	4	5	6	1	56
	Amensalismo	5	1	3	1	3	7	39
	Sinergismo	0	0	0	0	0	0	1
<b>Total</b>		12	12	12	12	12	12	156

Colonia \* Temperatura

		Temperatura			Total
		28°C	Ambiente	35°C	
COLONIA	G_A011	4	4	4	12
	G_A012	4	4	4	12
	G_A013	4	4	4	12
	G_A014	4	4	4	12
	G_A015	4	4	4	12
	G_A023	4	4	4	12
	H_A016	4	4	4	12
	H_A017	4	4	4	12
	H_A018	4	4	4	12
	H_A019	4	4	4	12
	H_A020	4	4	4	12
	H_A021	4	4	4	12
	H_A022	4	4	4	12
<b>Total</b>		52	52	52	156

Antagonismo \* Tipo de interacción

		TIPOINTE				Total
		neutralismo	competencia	amensalismo	sinergismo	
antagonismo	1	13	13	12	1	39
	2	27	8	4	0	39
	3	12	17	10	0	39
	4	8	18	13	0	39
<b>Total</b>		60	56	39	1	156