

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO
VEGETAL DE MICROORGANISMOS AISLADOS A PARTIR DE RESIDUOS DE
HIGUERILLA (*Ricinus communis*), EN ZANAHORIA (*Daucus carota*)**

CLAUDIA PATRICIA VILLOTA CUÁSQUER

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES
CENTRO DE INVESTIGACIÓN, PROYECCIÓN Y DESARROLLO
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA
AGROINDUSTRIAL
ESPECIALIZACIÓN EN MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
MANIZALES
2013**

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO
VEGETAL DE MICROORGANISMOS AISLADOS A PARTIR DE RESIDUOS DE
HIGUERILLA (*Ricinus communis*), EN ZANAHORIA (*Daucus carota*)**

CLAUDIA PATRICIA VILLOTA CUÁSQUER

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:
Especialista en Microbiología Industrial**

**Director:
TERESA CABRA CENDALES M.Sc.
Codirectores
Microbiólogo
Narmer Fernando Galeano
Omar Tapasco Álzate M.Sc.**

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES
CENTRO DE INVESTIGACIÓN, PROYECCIÓN Y DESARROLLO
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA
AGROINDUSTRIAL
ESPECIALIZACIÓN EN MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
MANIZALES
2013**

Nota de aceptación

Firma de Director del Trabajo de Grado

Firma del presidente del Comité de Programa

Firma de integrante del Comité de Programa

Manizales, 15 de enero del 2013

DEDICATORIA

Dedico a:

Dios por ser mi guía y amigo en todos los momentos de mi vida.

La memoria de mi madre Olga María, quien en vida siempre me acompañó y me impulsó a realizar mis sueños.

A mi madrina Lourdes y mi hermano Oscar Dario por su cariño y apoyo incondicional.

A mi familia y amigos por su ánimo y comprensión.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, a mi familia y amigos que siempre me apoyan en todos los pasos que doy. Agradezco en especial a la Magistra Teresa Cabra Cendales y al Microbiólogo Narder Fernando Galeano por su constante guía y colaboración en los procedimientos que se realizaron en esta investigación, de igual manera al Magister Omar Alberto Tapasco quien nos asesoró en los análisis estadísticos, a Sandra Maulanda por todo su apoyo, un agradecimiento especial a todo el personal de CALER y a mi compañero Cristian Rodríguez.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	11
1. OBJETIVOS.....	12
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	12
1.2 OBJETIVO ESPECIFICOS.....	12
2. MARCO TEORICO.....	13
2.1 Generalidades de la zanahoria.....	13
2.2 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal.....	15
2.2.1 Reguladores del crecimiento vegetal.....	16
2.2.2 Auxinas.....	16
2.2.3 Giberelinas.....	18
2.2.4 Citocininas.....	19
2.2.5 Solubilización de fosfatos.....	19
2.3 Control Biológico.....	20
2.3.1 Microorganismos antagonistas.....	21
2.3.1.1 Competencia por espacio o por nutrientes.....	21
2.3.1.2 Interacciones directas con el patógeno.....	21
2.3.2 Bacterias antagonistas.....	22
2.4 Quitina.....	22
2.4.1 Bacterias quitinolíticas.....	24
2.5 Construcción de árboles filogenéticos.....	25
3. MATERIALES Y METODOS.....	28
3.1 Diseño metodológico.....	28
3.2 Determinación de ácido indol acético (AIA) por técnica colorimétrica de Salkowski.....	29
3.2.1 Desinfección de semillas.....	30
3.2.2 Esterilización de la turba.....	31
3.2.3 Preparación de inóculo bacteriano.....	31
3.2.4 Recuento de microorganismos en turba inoculada.....	31
3.2.5 Inoculación de semillas.....	31
3.2.6 Germinación de semillas.....	32
3.2.7 Medición de parámetros de crecimiento.....	32
3.3 Solubilización de fosfatos.....	33
3.4 Pruebas de antagonismo.....	34
3.5 Detección de quitinasas.....	35
3.5.1 Preparación de quitina coloidal.....	36
3.6 Construcción de árboles filogenéticos.....	36
3.6.1 Búsqueda y descarga de secuencias.....	36
3.6.2 Mapeo de secuencias.....	36

3.6.3 Alineamiento de secuencias.....	37
3.6.4 Eliminación de secuencias redundantes.....	37
3.6.5 Construcción de árboles filogenéticos.....	37
3.7 Análisis de datos.....	37
4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	38
4.1 Evaluación de la producción de ácido indol acético (AIA).....	38
4.2 Solubilización de fosfatos.....	40
4.3 Recuento de la concentración del microorganismo inoculado (<i>Bacillus subtilis</i>)	42
4.4 Efecto de <i>Bacillus subtilis</i> sobre la germinación de semillas de zanahoria (<i>Daucus carota</i>).....	43
4.5 Efecto promotor del crecimiento vegetal de <i>Bacillus subtilis</i> en zanahoria.....	44
4.6 Prueba de antagonismo.....	49
4.7 Detección de quitinasas.....	51
4.8 Árboles filogenéticos.....	52
CONCLUSIONES.....	58
RECOMENDACIONES.....	59
BIBLIOGRAFIA.....	60

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Lista de microorganismos y su respectivo código GIBI.....	28
Tabla 2. Lista de microorganismos evaluados.....	38
Tabla 3. Clasificación de Duncan para la producción de AIA de cada microorganismo.....	40
Tabla 4. Microorganismos que solubilizaron fosfatos en el medio PKV.....	40
Tabla 5. Matriz de correlaciones entre las variables estudiadas.....	46
Tabla 6. Resultado análisis de componentes principales.....	47
Tabla 7. Tabla porcentaje de inhibición.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rutas de síntesis de AIA dependientes del triptofano.....	17
Figura 2. Estructura del ácido 3-indol acético.....	18
Figura 3. Estructura química de las giberelinas.....	18
Figura 4. Estructura química de las citocininas.....	19
Figura 5. Estructura molecular de la quitina.....	23
Figura 6. Curva de calibración de AIA.....	39
Figura 7. <i>Pseudomona fluorescens</i> , control positivo utilizado en la prueba.....	41
Figura 8. <i>Bacillus subtilis</i> , solubilizando fosfatos en PKV.....	41
Figura 9. <i>Bacillus pumilus</i> , solubilizando fosfatos en PKV.....	42
Figura 10. Bandejas con semillas de zanahoria con y sin inóculo bacteriano....	43
Figura 11. Dispersograma de las variables estudiadas.....	45
Figura 12. Diagrama de sedimentación – valores.....	47
Figura 13. Gráfico Biplot del primer plano factorial.....	48
Figura 14. Inhibición de <i>Fusarium equiseti</i> por <i>Bacillus subtilis</i>	50
Figura 15. Control positivo con <i>Serratia marsescens</i>	51
Figura 16. Árbol filogenético basado en el gen ADNr 16s para 15 taxones bacterianos.....	54
Figura 17. Árbol filogenético basado en la región ITS para la levadura.....	56

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Medios de cultivo.....	66
--	-----------

INTRODUCCION

Las hortalizas representan el 85% del área sembrada en Colombia, entre ellas están la arveja, tomate, cebolla de bulbo, cebolla junca, arracacha, zanahoria, cilantro, habichuela, zapallo y repollo . Al ser atacadas por plagas y enfermedades, el agricultor realiza control químico alterando de esta manera la economía, la salud y el medio ambiente. El indiscriminado uso de fertilizantes y agroquímicos en las prácticas agrícolas, crea un desequilibrio microbiano del suelo perjudicando el crecimiento y buen desarrollo de las plantas, disminuyendo la mineralización de la materia orgánica, y propiciando el desarrollo de enfermedades radiculares y la contaminación ambiental.

En la actualidad el uso de fertilizantes orgánicos brinda soluciones más limpias y económicas para el agricultor y favorece la conservación de los microorganismos del suelo. Diversos microorganismos han sido utilizados como agentes promotores del crecimiento vegetal por la capacidad para producir fitohormonas: auxinas como el ácido indolacético y giberelinas, además algunos forman biopelículas que ofrecen protección contra diversos agentes fitopatógenos, contribuyendo indirectamente al crecimiento de la planta.

Hay que destacar el papel que desempeñan los microorganismos como controladores biológicos ya que pueden regular el desarrollo de patógenos por su capacidad antagonista o por la infestación de insectos como coleópteros que contiene un alto porcentaje de quitina en su cuerpo, este compuesto orgánico es degradado por enzimas quitinolíticas producidas por bacterias y hongos.

En este trabajo se evaluó la capacidad quitinolítica, antagónica y de promoción del crecimiento vegetal de 16 microorganismos aislados a partir de residuos de higuera y se identificó la filogenia de los mismos, proporcionando información para futuras investigaciones de las similitudes entre las cepas bacterianas autóctonas de la región.

OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial de promoción del crecimiento vegetal, de microorganismos aislados a partir de residuos de higuera (*Ricinus communis*)

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar en los microorganismos seleccionados, la capacidad de solubilización de fósforo y producción de ácido indol acético como inductores del crecimiento vegetal, en semillas de zanahoria (*Daucus carota*).
- Determinar la capacidad antagonista y quitinolítica de los microorganismos seleccionados a partir de aislamientos provenientes de residuos de higuera (*Ricinus communis*).
- Identificar la filogenia de los microorganismos evaluados.

- MARCO TEORICO

2.1 GENERALIDADES DE LA ZANAHORIA (*Daucus carota*).

La zanahoria es una de las hortalizas que más cultivadas nivel mundial, se reportan alrededor de un millón de hectáreas sembradas y China como el mayor país productor; es una planta bienal, de 15 cm a 1,2 m de alto, con tallo simple o poco ramificado. Tiene hojas basales con peciolo de 3 a 10 cm de largo, las hojas superiores son pequeñas y menos divididas. Posee flores blanquecinas pero con frecuencia una flor central de cada umbela es de color rosa o rojo oscuro. (Soto, 2010).

Esta hortaliza es un alimento con concentraciones bajas de grasas saturadas y colesterol, contiene tiamina, niacina, vitamina B6, ácido fólico y manganeso, compuestos importantes para la dieta humana; además es una buena fuente de vitamina A, vitamina C, vitamina K y potasio. (Soto, 2010).

Existen varios patógenos que afectan la producción mundial de la zanahoria, estos microorganismos reducen la cosecha y afectan las características del producto disminuyendo su valor económico. Algunas de las enfermedades más importantes causadas al cultivo de zanahoria por hongos filamentosos son:

- Enfermedades ocasionadas por hongos causantes de cenicillas, (*Oidium*)
- Tizón de la hoja por *Alternaria* (*Alternaria dauci*)
- Mildiú, ocasionada por *Plasmopara umbelliferorum*
- Pudrición negra de la raíz, (*Alternaria radicina*)
- Mancha hundida de la raíz, es causada por varias especies de *Pythium*. *P. violae*, *P. sulcatum*, *P. intermedium*, *P. irregulare*, *P. silvaticum*, y *P. ultimum*.

- Pudrición algodonosa de la raíz, (*Sclerotinia sclerotiorum*)

Enfermedades producidas por bacterias:

- Tizón bacteriano de la hoja, (*Xanthomonas campestris*)
- Pudrición blanda (*Erwinia carotovora*)

Enfermedades causadas por nematodos:

- Nematodo del quiste, es producida por el nematodo de la zanahoria *Heterodera carotae* . (Soto, 2010).

Existen también enfermedades producidas por virus y fitoplasmas, estas afecciones son más difíciles de manejar que las anteriores y ocasionan un mal desarrollo de la planta que a su vez lleva a la muerte de la hortaliza. (Soto, 2010).

Actualmente con la implementación de cultivos ecológicos, se han puesto a disposición del agricultor opciones de control biológico eficaces contra las enfermedades ocasionadas por patógenos de zanahoria, tal es el caso del uso de biopesticidas bacterianos formulados a base de *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis* entre otros, e insecticidas botánicos. (Urquiza, 2009).

Los biopesticidas formulados con cepas de *Bacillus subtilis* tienen los siguientes puntos a favor, no son tóxicos para el ser humano ni para el cultivo, no afectan a los organismos benéficos y controlan enfermedades foliares (Urquiza, 2009).

2.2 BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL (PGPB)

Estas bacterias tienen la capacidad de modificar el crecimiento de los tejidos vegetales, por medio de mecanismos en donde intervienen los metabolitos que permiten fijación de nitrógeno, producción de auxinas, giberelinas y citocininas, inhibición de síntesis de etileno y aumento en la permeabilidad de la raíz, siendo la producción de reguladores de crecimiento la acción directa más importante. (Celis y Gallardo, 2008)

En el caso de los mecanismos de acción indirecta la bacteria libera sus metabolitos y estos reaccionan con otros factores rizosféricos, como es el caso de la producción de sustancias con capacidad de movilizar nutrientes como aminoácidos, sideróforos o ácidos orgánicos. (Celis y Gallardo, 2008)

Ciertas bacterias como *Azotobacter* sp, *Azospirillum* sp, *Pseudomonas* sp, *Xantomonas* sp, *Enterobacter* sp, *Arthrobacter* sp, *Bacillus subtilis* tienen un alto grado de relación suelo planta, pues son las responsables del suministro de nutrientes y de la producción de factores de crecimiento como las fitohormonas. (Lara *et al.*, 2011)

La cantidad de bacterias que se encuentran alrededor de las raíces de las plantas (rizósfera), es mayor que la que se presenta en otras partes del suelo, el género *Bacillus* esta ampliamente distribuido en la naturaleza y es un microorganismo con alta resistencia a condiciones físicas extremas porque forma endosporas y posee genes que le permiten soportar diferencias de temperatura y colonizar fácilmente la rizósfera. Este género de microorganismos posee varios mecanismos que influyen en la promoción del crecimiento vegetal entre los cuales se resaltan:

- Solubilización de fosfato
- Síntesis de ácido indolacético (AIA)
- Capacidad de controlar hongos patógenos en la rizósfera .(Calvo y Zuñiga, 2010)

2.2.1 Reguladores del crecimiento vegetal

Los reguladores del crecimiento de las plantas más importantes son las auxinas, giberelinas y citocininas. Estas sustancias actúan en concentraciones muy bajas y no constantes, pueden aumentar con rapidez hasta un tope máximo a partir del cual disminuyen rápidamente debido a sistemas inhibitorios hormonales de la planta. (Agrios, 2002)

2.2.2 Auxinas: son compuestos que provocan en su mayoría la división celular y la formación de raíces, se encuentran por lo general en el ápice del tallo, pero emigran de esta parte hasta la base de la planta. Las auxinas se emplean en biofábricas, cultivos *in vitro* de material vegetal y en plantaciones. (Castillo *et al*, 2005)

La auxina más conocida es el Ácido indol acético (AIA), este contribuye a incrementar los pelos radiculares, ayudando a la planta a captar más cantidad de nutrientes que benefician su crecimiento y desarrollo. Estudios realizados han demostrado que los géneros *Azospirillum* sp y *Azotobacter* sp liberan auxinas y otras sustancias promotoras de crecimiento. (Lara *et al.*, 2011).

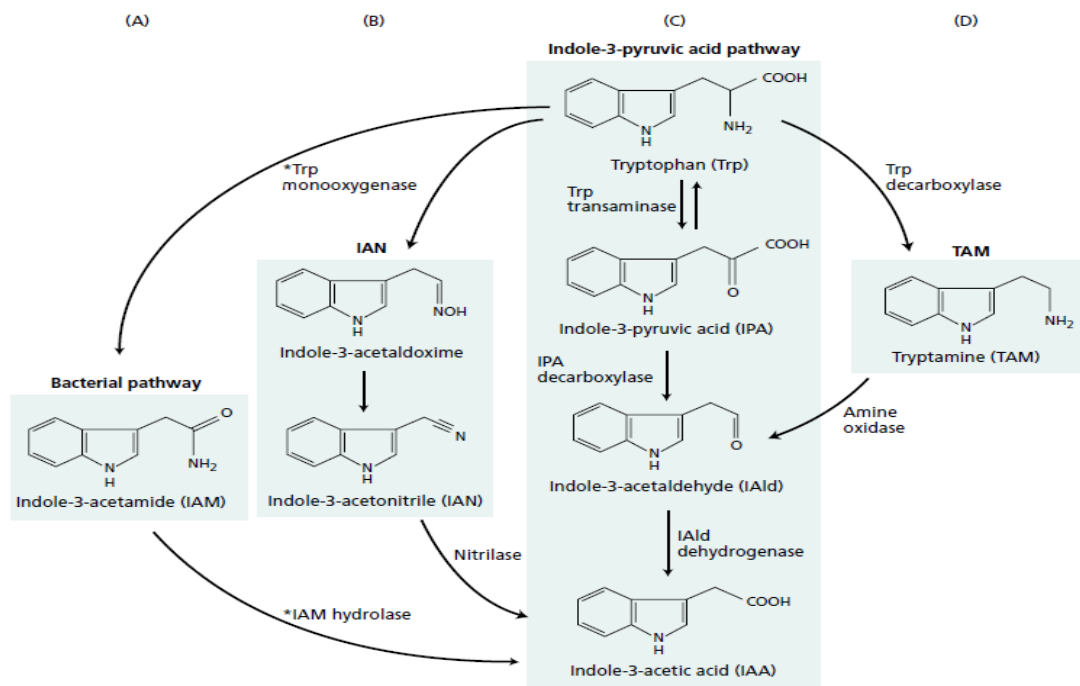
La síntesis del Ácido Indol acético (AIA) proviene del triptófano que está compuesto por un grupo indol presente en los tejidos vegetales, ya sea en forma libre o incorporada. Se han realizado ensayos en donde se observa que el triptófano es catabolizado por el tejido en ácido Indol acético aumentando su concentración. (Celis y Gallardo, 2008)

Hay tres rutas de síntesis de AIA dependientes del triptofano. 1). Ruta de tripatamina (TAM), aquí se obtiene el AIA gracias a la enzima IAA deshidrogenasa que oxida al indol 3-acetaldehído (IAAId) originado por la descarboxilación del triptófano a triptamina. 2). Ruta del indol 3-piruvato (IPA), en este proceso el (TAM) tripatamina, logra actuar como intermediario y es convertido primero en

(IAAId) indol 3-acetaldehído y de aquí es oxidado hasta ácido 3-indol acético. 3). Ruta del indol 3-acetonitrilo (IAN), en esta última ruta se descarboxila el triptofano en indol 3 acetaldoina (IAOx), posteriormente el (IAN) indol 3-acetonitrilo es convertido en ácido 3-indol acético. (Celis y Gallardo, 2008). Ver (Figura 1)

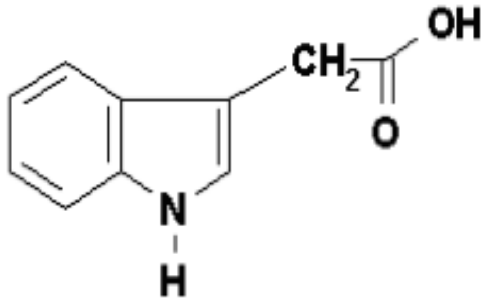
Figura 1: Rutas de síntesis de AIA dependientes del triptofano

Fuente: (Taiz y Zeiger, 2010)



El AIA produce un aumento general en la respiración de los tejidos vegetales y promueve la síntesis del RNA mensajero lo que a su vez impulsa la producción de proteínas, enzimas y proteínas estructurales. (Agris, 2002)

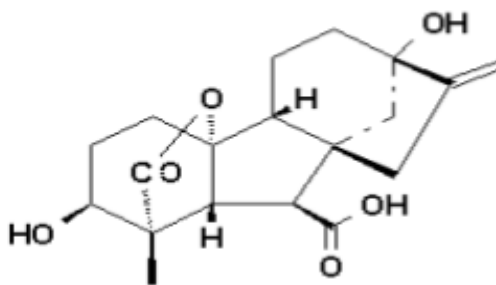
Figura 2: Estructura del ácido 3-indol acético



Fuente: (Celis y Gallardo, 2008)

2.2.3 Giberelinas: Se aislaron por primera vez a partir del hongo *Gibberella fujikurui*, organismo que origina la enfermedad bakanae en el arroz; la más conocida es el ácido liberólico, que actúa como regulador de crecimiento acelerando la elongación de las variedades enanas para que alcancen su altura normal, promoviendo la floración y la elongación del tallo y de la raíz, y ayudando al crecimiento del fruto. (Agrios, 2002).

Figura 3: Estructura química de las Giberelinas



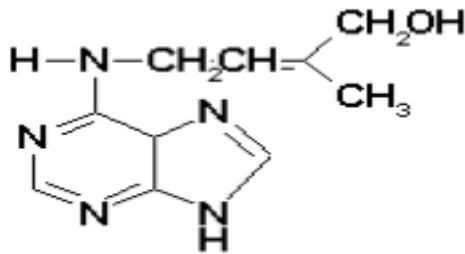
Fuente: (Celis y Gallardo, 2008)

Las bacterias de los géneros *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter*, y algunos hongos como *Gibberella fujikuroi*, *Fusarium moniliforme*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus flavus*, *F. oxysporium*, *Penicillium corylophilum*, *P.*

cyclopium y *Rhizopus stolonifer*, entre otros, son conocidas como productoras de giberelinas (Celis y Gallardo, 2008).

2.2.4 Citocininas: Actúan en la diferenciación y el crecimiento celular, inhiben el envejecimiento al impedir la degradación de las proteínas y de los ácidos nucleicos. Alcanzan su máxima concentración al dirigir el flujo de amino ácidos y varios nutrientes por toda la planta. Se encuentran en bajas concentraciones en plantas verdes pero se han podido aislar la zeatina y la isopentenil adenosina (IPA). (Agrios, 2002)

Figura 4: Estructura química de las citocininas



Fuente: (Celis y Gallardo, 2008)

2.2.5 Solubilización de fosfatos

El nutriente inorgánico más requerido por las plantas después del nitrógeno es el fósforo, este se encuentra en bajas concentraciones en el suelo debido a que el fósforo soluble reacciona con el calcio, el hierro o el aluminio y se precipita disminuyendo su disponibilidad para las plantas. Inclusive los fosfatos inorgánicos aplicados en forma de fertilizantes químicos también son inmovilizados en el suelo y no pueden ser absorbidos por las raíces de los diferentes cultivos. Por esto es importante que los microorganismos del suelo solubilicen rocas fosfatadas y otras fuentes de fósforo inorgánico. (Fernandez *et, al* 2005).

Los siguientes géneros de microorganismos se han aislado del suelo como solubilizadores de fosfatos: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium* y *Erwinia*. Estos microorganismos crecen en medios con fosfato tricálcico, apatita o materiales insolubles similares, como única fuente de fosfato y no solo asimilan el elemento sino que solubilizan una gran proporción del mismo, liberándolo en cantidades superiores a sus demandas nutricionales. El principal mecanismo microbiológico por el cual los compuestos fosfatados son movilizados es la disminución del pH del medio por la liberación de ácidos orgánicos. (Fernandez *et al* 2005).

2.3 CONTROL BIOLÓGICO

El control biológico es la reducción de las poblaciones de patógenos por medio de otros organismos, algunos patógenos no pueden colonizar las plantas debido a los microorganismos antagónicos presentes en el suelo que las protegen y evitan la infestación, también es posible que las plantas sean inoculadas de forma natural con el microorganismo antagonista antes o después del ataque del patógeno. (Agrios, 2002)

Algunos estudios demuestran que la capacidad de resistir ataques de fitopatógenos está ligada a las propiedades físicas, químicas y particularmente biológicas del suelo. Suelos con alto contenido de materia orgánica y una alta actividad biológica generalmente exhiben buena fertilidad, así como cadenas tróficas complejas y organismos benéficos abundantes que previenen la infección. Por otro lado el uso indiscriminado de fertilizantes causa una alteración en la ecología microbiana del suelo, aumentando la susceptibilidad a las infecciones por parte de la planta. (Nicholls *et al.*, 2008)

La utilización de microorganismos para el control biológico de enfermedades de las

plantas constituye una alternativa eficiente y ecológica que contribuye al desarrollo de una agricultura sostenible, ya que disminuye los efectos inherentes al uso de plaguicidas y productos químicos. Entre los agentes de control biológico más estudiados se encuentran los microorganismos pertenecientes a los géneros *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Trichoderma* y *Bacillus* (Reinoso *et al.*, 2006)

El control biológico evita plagas secundarias y ayuda a que el tratamiento con insecticidas se reduzca sustancialmente, siendo favorable para el productor en la relación costo/beneficio. (Guédez. C *et al.*, 2008)

2.3.1 Microorganismos Antagonistas

Existen diferentes mecanismos de acción empleados por los microorganismos antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos, entre ellos: antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo y lisis enzimática) e inducción de resistencia. No se han establecido los mecanismos utilizados por el microorganismo antagonista por lo general emplean más de uno, esta característica junto a su capacidad de multiplicación son importantes a la hora de seleccionarlos como agentes de control biológico. (Fernandez y Vega, 2001)

2.3.1.1 Competencia por espacio o por nutrientes: Competencia se refiere al comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización de este por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. Un factor esencial para que exista competencia es la escasez o limitación de un elemento. La competencia por espacio o por nutrientes es la más común (Fernandez y Vega, 2001)

2.3.1.2 Interacciones directas con el patógeno: Los microorganismos antagonistas utilizan al patógeno como su alimento, para esto emplean enzimas

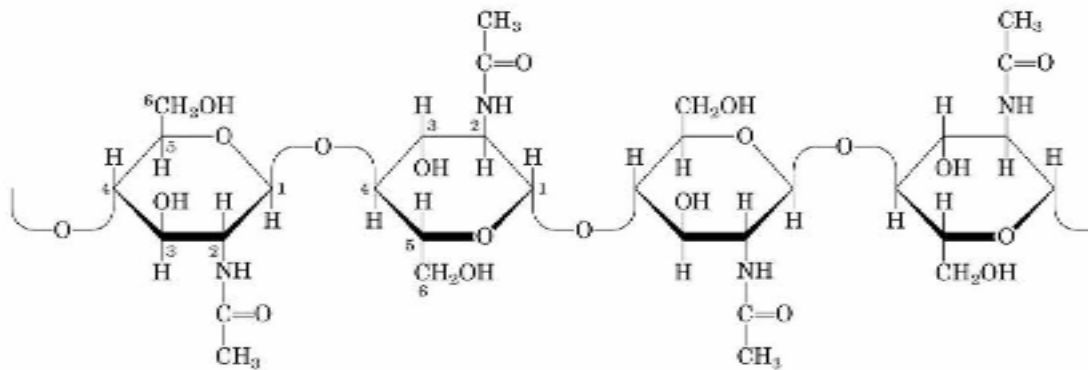
extracelulares (quitinasas, celulasas y proteasas, entre otras), que rompen las estructuras de los organismos parasitados. En el mercado existen formulaciones comerciales desarrolladas a partir del hongo *Trichoderma* y son utilizadas como antagonistas de patógenos como *Rhizoctonia solani* entre otros (Fernandez y Vega, 2001)

2.3.2 Bacterias antagonistas: Controlan las enfermedades foliares y de las raíces, dentro de las más eficaces están *Pseudomona fluorescens* y las del género *Bacillus*. Se han realizado estudios para evaluar el control de enfermedades fungosas concluyendo que las aplicaciones de *Bacillus subtilis* pre y poscosecha en aguacate tienen efectos similares al de los fungicidas comerciales. Los géneros *Pseudomona* y *Bacillus* han demostrado su capacidad para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos del suelo, tales como *Fusarium oxysporium*, *Pythium ultimum*, *R. solani*, *S. rolfsii*, *Phytophthora nicotianae*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium solani*. Se han reportado resultados de investigaciones en donde se confirma la acción de *B. subtilis* sobre la germinación y desarrollo de semillas de tomate infectadas con *Fusarium oxysporium*, este influye sobre el rendimiento del cultivo mediante la producción de sustancias promotoras de crecimiento, libera compuestos con propiedades antifúngicas como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las Iturinas, que actúan sobre la pared celular de los hongos. (Fernandez y Vega, 2001)

2.4 QUITINA

Es un compuesto orgánico que cumple la función de protección y resistencia en animales inferiores y hongos. Se halla distribuída extensamente en la naturaleza, el lugar donde posiblemente más abunda es el océano, siendo producida por varios organismos marinos como el zooplancton y otras especies de fitoplancton. (Sastoque, E. 2005) Es un polisacárido formado por el azúcar N-acetilglucosamina, unida mediante enlaces β -1.4. Ver figura 5.

Figura 5. Estructura molecular de la quitina



Fuente: (Farfán y Gutierrez, 2009)

La quitina posee tres formas naturales del polisacárido: alfa, beta, y gamma; estas se diferencian entre si por su estructura cristalina. La forma alfa, tiene cadenas antiparalelas, es la más rígida y cumple con las funciones esqueléticas. La beta quitina tiene las cadenas paralelas, la gamma quitina, es la más rara de las tres formas, por cada cadena dispuesta en un sentido, tiene dos que se orientan en sentido opuesto. Las dos últimas son capaces de hidratarse y así logran desarrollar cualidades semejantes a las del cartílago. (Sastoque, E. 2005)

La quitina es uno de los polisacáridos más insolubles que existen, lo que explica el grado de dificultad para establecer el tamaño de sus cadenas poliméricas. Muchos ciliados utilizan la quitina para construir estructuras protectoras a semejanza de los corales, las amebas parásitas de animales forman quistes de quitina. Por el contrario las bacterias no poseen quitina. (Sastoque, E. 2005)

2.4.1 Bacterias quitinolíticas: Existen microorganismos capaces de degradar la quitina por medio de su material enzimático, permitiéndoles acceder a esta como una fuente de energía. Entre las bacterias que sintetizan quitina están: *Vibrio sp*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio furnissii*, *Photobactrium sp*, enterobacterias, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces olivaceoviridis*, *Streptomyces lividans*, *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens*, clostridios y arqueobacterias. (Sastoque, E. 2005)

Existen pruebas de laboratorio que permiten determinar las bacterias quitinolíticas ya sea por la formación de zonas de aclaramiento en agares que contienen quitina, o por la hidrólisis de sustratos fluorogénicos análogos de la quitina. El primer ensayo que evalúa zonas de aclaramiento, indica que el 10% de las bacterias cultivables degradan quitina, en tanto que un 90% de la fracción cepas hidrolizan el sustrato análogo (Sastoque, E. 2005)

Las enzimas que degradan la quitina se denominan quitinasas, realizan la hidrólisis de los enlaces β 1- 4 de la **N-acetilglucosamina** en quitina y quitodextrinas. Estas enzimas han sido ordenadas por el sistema de clasificación de las glycosyl hidrolasas en dos familias denominadas 18 y 19 de acuerdo con la similitud de los dominios catalíticos y la secuencia de aminoácidos. (Sastoque, E. 2005)

Las quitinasas actúan en el control biológico de coleópteros, estos contienen una gran cantidad de quitina en su cuerpo, por esta razón son duros y resistentes a cambios físicos extremos. (Sastoque, E. 2005)

2.5 CONSTRUCCIÓN DE ARBOLES FILOGENÉTICOS

La filogenia es considerada la ciencia encargada de estimar la evolución de las especies, genes o genomas, en donde específicamente la filogenia molecular hace uso de las secuencias de ADN o proteínas para realizar las comparaciones evolutivas aprovechando las dependencias que existen desde el punto de vista estadístico entre las secuencias (Harvey y Nee, 1996).

La comparación de las secuencias del gen ADNr 16S permite establecer relaciones filogenéticas entre organismos procariotas, de forma similar la región ITS permite hacer lo mismo en eucariotas.

Esto ha traído una gran repercusión en la taxonomía microbiana, ya que ha dado lugar al sistema de clasificación actual que ha permitido la identificación rápida y precisa tanto de procariotas como de eucariotas. La identificación molecular que se basa en el análisis del gen ADNr 16S es comúnmente usada para la identificación de bacterias en donde otro tipo de técnica resulta imposible o simplemente requiere mucho tiempo. La amplificación del gen permite su posterior secuenciación y este proceso comienza preferentemente del ADN extraído de un cultivo puro bacteriano, aunque también puede conseguirse de una muestra proveniente de distintos tipos de fuente. Las moléculas de el ADNr 16S e ITS están presentes en todas las bacterias y en todos los eucariotas respectivamente, y su análisis es por tanto, un instrumento de identificación universal, una de las características que las hace tan útil es que su estructura y función han permanecido sin mayores alteraciones durante un tiempo muy largo, de modo que cualquier cambio en la secuencia refleja sobre todo cambios aleatorios que ocurren de una forma lo suficientemente lenta, de modo que puede aportar información acerca de todos los procariotas a través de la escala evolutiva (Rodicio y Mendoza, 2004)

Existen relaciones jerárquicas entre los microorganismos que surgen a través de la evolución, los árboles filogenéticos nos permiten esquematizar dichas relaciones. Estos árboles constan de nodos unidos entre sí por ramas, las longitudes de estas ramas pueden significar la distancia evolutiva que hay entre nodos. Los árboles agrupan los organismos, de manera que todo lo que hay alrededor de un nodo es considerado un grupo monofilético, es decir, que todo el grupo se origina de un único ancestro común y por tanto puede poseer rasgos comunes, cuando se presenta que un grupo excluye a algunos de sus descendientes se denomina parafilético (Baldauf, 2003).

Actualmente hay diversos métodos que permiten la construcción de árboles filogenéticos, que han sido categorizados en uno de los siguientes grupos (Sandria, 2003):

Basados en distancias: Realizan un cálculo de la distancia evolutiva para todos los pares de unidades taxonómicas operacionales o secuencias de ADN, de manera que el árbol filogenético finalmente se construye utilizando las relaciones entre estas distancias, entre los métodos más conocidos están;

Método de evolución mínima (ME), Método Neighbor-Joining (NJ) y UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means), sin embargo UPGMA asume siempre una tasa de evolución constante por esta razón no es recomendable usarlo para inferir árboles filogenéticos en aquellos casos en que el conjunto de secuencias no cumple con esta hipótesis, ya que podría no reflejar necesariamente una historia evolutiva.

Basados en caracteres discretos: realizan un análisis de los caracteres que forman las secuencias y no de las distancias entre pares de éstas. Estos métodos cuentan los eventos de mutación acumulados en las secuencias y por lo tanto es posible eliminar la pérdida de información que ocurre cuando los caracteres son transformados a distancias, entre estos métodos se incluye Método de máxima

parsimonia (MP), Método de parsimonia evolutiva (EP), Método de máxima probabilidad (ML)

- MATERIALES Y METODOS

3.1 DISEÑO METODOLÓGICO

Se utilizaron cultivos de cepas nativas aisladas de residuos lignocelulósicos de higuera (*Ricinus communis*) fruto y torta. Los microorganismos fueron suministrados por el Centro de recursos microbiológicos UCM, cada microorganismo posee un código de identificación. Ver tabla 1.

Tabla 1. Lista de microorganismos y su respectivo código GIBI

CODIGO	MICROORGANISMO
GIBI_000187_AG_B	<i>Bacillus pumilus</i>
GIBI_000188_AG_B	<i>Bacillus altitudinis</i>
GIBI_000189_AG_B	<i>Bacillus pumilus</i>
GIBI_000192_AG_B	<i>Bacillus pumilus</i>
GIBI_000193_AG_B	<i>Bacillus pumilus</i>
GIBI_000194_AG_B	<i>Bacillus</i> sp.
GIBI_000195_AG_B	<i>Bacillus</i> sp.
GIBI_000197_AG_B	<i>Bacillus</i> sp.
GIBI_000199_AG_B	<i>Bacillus</i> sp.
GIBI_000200_AG_B	<i>Bacillus subtilis</i>
GIBI_000201_AG_B	<i>Bacillus</i> sp.
GIBI_000203_AG_B	<i>Bacillus pumilus</i>
GIBI_000204_AG_B	<i>Bacillus pumilus</i>

GIBI_000206_AG_B	<i>Bacillus pumilus</i>
GIBI_000208_AG_B	<i>Bacillus sp.</i>
GIBI_000209_AG_Y	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>

3.2 Determinación de ácido indol acético (AIA) por la técnica colorimétrica de Salkowski.

El reactivo de Salkowski permite establecer la presencia de grupos indol en las soluciones que contengan entre otros compuestos, tejidos vegetales y extractos de cultivos microbianos. Este método se basa en la oxidación que produce el ácido perclórico a las moléculas de indol, generando una coloración entre la gama de los rosados a fucsias, evidenciando la presencia de moléculas con grupo indol presumibles como compuestos auxínicos (Celis y Gallardo, 2008)

Las cepas seleccionadas para evaluar el potencial de crecimiento vegetal, en semillas de zanahoria (*Daucus carota*), se cultivaron en agar nutritivo y la levadura *Rhodospiridium paludigenum* en agar papa dextrosa (PDA). Se realizó una curva de calibración para la detección de Acido Indol Acético (AIA), utilizando soluciones patrón de AIA preparadas a partir de una solución stock de 100 µg/ml de AIA a 5, 10, 15, 20 y 25µg/ml, posteriormente se mezcló 1ml de cada una de las soluciones patrón con 2 ml del reactivo de Salkowski que se preparó a partir ácido sulfúrico (H₂SO₄) 7,9 M y cloruro férrico (FeCL₃) 40 mM, se dejó reposar por 30 minutos a temperatura ambiente y se leyeron las absorbancias de los patrones a 530nm en un espectrofotómetro Pharo 300 de Merck, con los valores obtenidos se realizó la ecuación que relaciona la concentración de AIA en función de la absorbancia.

Luego de obtener la curva de calibración se procedió a realizar la medición de ácido indol acético producido por cada uno de los microorganismos, para esto se preparó una suspensión con una concentración de 10^8 cel/ml en solución salina al 0.85%, de esta suspensión se tomaron 455 μ l y se diluyeron en 45 ml de caldo tripticasa de soya, obteniendo una concentración de 10^6 cel/ml, este procedimiento se realizó por triplicado, las cepas bacterianas se incubaron a 30 °C y la levadura a temperatura ambiente durante 96 horas con una agitación constante a 120 rpm.

Pasadas las 96 horas de incubación, que es el tiempo en el cual se producen los picos máximos de ácido indol acético en los microorganismo (Celis y Gallardo, 2008), se tomaron 2 ml de cada caldo de cultivo se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos, luego se tomo 1 ml del sobrenadante y se mezcló con 2 ml del reactivo de Salkowski, se dejaron en reposo por 30 minutos a temperatura ambiente y se leyeron las absorbancias a 530 nm.

Con las absorbancias obtenidas de cada cepa se realizó un análisis estadístico con el programa SPSS versión 18.0 empleando la prueba de Duncan, la cual determinó el microorganismo con mayor producción de AIA.

3.2.1 Desinfección de semillas

Se desinfectaron 120 semillas de zanahoria (*Daucus carota*), durante un minuto con hipoclorito de sodio al 5%, luego con etanol al 70% durante un minuto y finalmente se realizaron cuatro lavados con agua destilada estéril de 5 minutos cada uno. (Castro y Roa 2006).

3.2.2 Esterilización de la turba.

Se emplearon 7 Kg de turba de la marca (Sphangnum) para evaluar el efecto del microorganismo sobre la germinación de las semillas de zanahoria; la turba fue esterilizada tres veces durante una hora a 121 °C. (Castro y Roa 2006).

3.2.3 Preparación de Inóculos bacterianos

En 150 ml de caldo tripticasa de soya se realizaron suspensiones de los microorganismos ajustadas al patrón 10 en la escala de McFarland (3×10^9 células/ml), luego se diluyeron con agua destilada estéril hasta obtener una concentración de 10^8 células/ml, se utilizaron 300 ml del inóculo por kilogramo de turba, la turba inoculada fue incubada por 96 horas a 30 °C;

3.2.4 Recuento de microorganismos en turba inoculada

Después de 96 horas de incubación de la turba, se hizo un recuento en placa del microorganismo, se preparó una solución madre con 90ml de agua peptonada estéril y 10gr de turba, se realizaron diluciones hasta 10^{-8} , se sembró por profundidad en agar nutritivo empleando 1ml de cada dilución y se incubó por 48 horas a 30 °C. (Castro y Roa 2006)

3.2.5 Inoculación de semillas

La solución con el microorganismo para la inoculación de las semillas se preparó a una concentración de 10^8 células/ml en caldo tripticasa de soya, se inocularon 60 semillas y 60 semillas se dejaron como blanco agregándoles únicamente agua

destilada estéril, se llevaron a agitación a 120 rpm por una hora. (Reyes *et al.*, 2008).

3.2.6 Germinación de semillas

Después de 12 días tiempo en el cual se obtuvo el número máximo de semillas germinadas tanto en el grupo con inóculo como en el grupo control, se procedió a escoger aleatoriamente 15 plantas con inóculo y 15 sin inóculo con dos hojas verdaderas y se midió a cada una la longitud radical, altura, peso húmedo y peso seco (Castro y Roa 2006).

3.2.7 Medición de parámetros de crecimiento.

Longitud radical

Se midió la longitud desde la base de la raíz hasta el punto de crecimiento más alto.

Altura.

Se midió la altura de la planta desde la base del tallo hasta el punto de crecimiento más alto.

Peso de materia seca.

Cada una de las plantas se fraccionó en dos partes, una con el tallo y las hojas y la otra con la raíz, se colocaron en crisoles de porcelana debidamente marcados y pesados con anterioridad y se pesaron para determinar de esta manera el peso húmedo, posteriormente se llevaron los crisoles a un horno HACEB a 80 ° C por un período de 72 horas, después de transcurrido este tiempo se pesaron nuevamente obteniendo de esta manera el cálculo de peso seco. (Castro y Roa 2006).

Se hizo un análisis de interdependencia por el método de componentes principales (ACP) con los datos obtenidos. El análisis de componentes principales es una

técnica estadística de análisis multivariado que tiene como objetivos la reducción de la dimensión del espacio de los datos, hace descripciones sintéticas y simplifica el problema de estudio, con el primer objetivo referente a la dimensión del espacio de los datos tiene cuidado de perder la menor cantidad de información obtenida del estudio pues puede transformar variables originales en un conjunto de componentes sin relación lineal o componentes no correlacionados que vendrían a ser los denominados componentes principales, que a su vez son una combinación lineal de variables independientes entre si, de estas se espera que una poca cantidad reúnan la mayor parte de la variabilidad de los datos, logrando así una reducción de la dimensión en los mismos. Con todo este proceso se logran los otros dos objetivos, las descripciones sintéticas y la simplificación del problema en estudio (León *et al*, 2008).

3.3 Solubilización de Fosfatos

Para determinar la capacidad de los microorganismos de solubilizar fosfatos se realizó una evaluación cualitativa.

Los microorganismos seleccionados se sembraron en medio Pikovskaya (PVK), se realizaron 3 réplicas por aislamiento, se incubaron a 30 °C durante 7 días. Este medio contiene como única fuente de fósforo, fosfato de calcio, una sustancia altamente insoluble, la formación de un halo alrededor de la colonia indica que el microorganismo posee potencial para solubilizar fósforo. Se utilizó como control positivo *Pseudomona fluorescens* (Patiño. C. 2010) .

La composición del medio se describe a continuación en g/L:

Extracto de levadura	0.50
Dextrosa	10.00
Fosfato de calcio	5.00
Sulfato de amonio	0.50
Cloruro de potasio	0.20
Sulfato de magnesio	0.10
Sulfato de manganeso	0.0001
Sulfato ferroso	0.0001
Agar	15.00

El fosfato de calcio se autoclava en seco, y se adiciona después de autoclavar el medio con los demás componentes (Franco. M. 2008).

3.4 Pruebas de Antagonismo

Para evaluar la capacidad antagónica de los microorganismos se sembró cada una de las cepas en estudio haciendo dos líneas paralelas a 2 cm del centro de la caja de Petri y se incubaron por 24 horas a 30°C.

Después de transcurrido este tiempo se sembró en el centro de las cajas de petri un disco de 0,5 cm de diámetro del hongo filamentoso *Fusarium equiseti* con una semana de crecimiento previo. Este ensayo se realizó por triplicado, se usó como control negativo *Escherichia coli* y un testigo en donde se sembró solamente el disco con el hongo filamentoso.

Como parámetros se midieron el crecimiento radial del hongo hacia el lado izquierdo y derecho para determinar la tasa de crecimiento, esta medición se realizó a los 12 días, tiempo que tardó el hongo en crecer totalmente en las cajas testigo.

Se midió la tasa de crecimiento micelial a partir de la siguiente fórmula (Benitez S. *et al.* 2007).

$$T.C = (Cf - Ci) / (Tf - Ti)$$

Cf: es el crecimiento final expresado en cm.

Ci: es el crecimiento inicial (día uno) expresado en cm.

Tf: es el tiempo, determinado por el tiempo que tarde el cultivo control en llenar la caja de petri.

Ti: es el tiempo inicial (día uno).

3.5 Detección de quitinasas

Se realizó la detección cualitativa de enzimas degradadoras de quitina, como mecanismo eficaz de algunos microorganismos de obtener energía a partir de la quitina como única fuente de carbono, y que permite seleccionarlos como posibles controladores biológicos. Para esto se sembró en el medio quitina coloidal (Lang *et al.*, 2002) (ver anexo 1).

Este medio contiene quitina coloidal como única fuente de carbono de manera que induce la producción de quitinasas por parte del microorganismo, si este la posee. (Nava, 2009)

Los microorganismos fueron sembrados por picadura en las cajas de Petri en el medio quitina coloidal, la prueba se considera positiva al observar crecimiento o un halo claro alrededor del crecimiento del microorganismo después de una semana de incubación a 30°C. Se utilizó como control positivo *Serratia marsescens*. (Pinto *et al.*, 2007).

3.5.1 Preparación de quitina coloidal

El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por (Castro *et al.*, 2011) y (Jin Wu *et al.*, 2009).

Se diluyeron 40 g de quitina en 400 ml de HCl concentrado y se colocó en agitación constante (150 rpm) durante 2 horas, posteriormente se agregaron 2 litros de agua destilada fría y se agitó la mezcla rápidamente para que se formara el precipitado de quitina, la solución resultante se filtro para obtener la pasta de quitina coloidal a la que se le realizaron lavados sucesivos con agua destilada (200ml), con el fin de eliminar los residuos de ácido.

La pasta obtenida, se esterilizó durante 15 min a 15 psi y se almacenó a 4 °C hasta su posterior uso.

3.6 Construcción de árboles filogenéticos.

3.6.1 Búsqueda y descarga de secuencias

Para la construcción de los árboles filogenéticos se utilizó el programa BLSTN (Zhang *et al.*, 2000) con el fin de buscar secuencias similares para cada una de las 16 cepas microbianas evaluadas (15 bacterianas y una levaduriforme), dichas secuencias fueron descargadas del Genbank por medio del programa NCBI Batch entrez. Todas las secuencias bacterianas analizadas corresponden al gen ADN_r 16S, en tanto que la secuencia de la levadura corresponde a la región ITS.

3.6.2 Mapeo de Secuencias

De las secuencias descargadas, cuatro secuencias que se iban a utilizar para la construcción de los árboles filogenéticos bacterianos, tenían más de tres millones de pares de bases, por lo cual se hizo un mapeo, que consistió en buscar la secuencia de la cepa con código GIBI_000187_AG_B dentro de cada una de las

secuencias de gran longitud, esto se realizó mediante el programa BLAT (Bhagwat et al., 2012), posteriormente las secuencias fueron editadas mediante el programa BioEdit (Hall, 1999)

3.6.3 Alineamiento de secuencias

Todos los alineamientos fueron realizados con Clustal W 2.0 (Thompson *et al.*, 1994), se utilizaron los parámetros por defecto para realizar los alineamientos.

Se realizó siempre un primer alineamiento con el fin de determinar que la orientación de las secuencias fuera correcta, en caso de no serlo, se buscó la secuencia reversa complementaria para realizar el alineamiento, y se editaron las secuencias para que al alinearlas quedaran del mismo tamaño (780 pb)

3.6.4 Eliminación de secuencias redundantes

Para la eliminación de secuencias redundantes se utilizó el programa CD-Hit 4.6 (Li y Godzik, 2006), que permitió eliminar las secuencias redundantes, para finalmente realizar la construcción de los árboles filogenéticos, el bacteriano y el levaduriforme.

3.6.5 Construcción de árboles filogenéticos

Se utilizó el programa MEGA 5.0 para la construcción de los árboles filogenéticos, usando Neighbor-Joining como método de construcción del árbol, y evaluando la confiabilidad haciendo bootstrapping de 10.000 repeticiones , teniendo en cuenta

que cada rama se repitiera como mínimo en el 50% de las veces (Tamura *et al*, 2011).

3.7 Análisis de datos

Para el análisis de los datos se empleó el programa SPSS versión 18.0

- RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Evaluación de la producción de Acido Indol Acético (AIA)

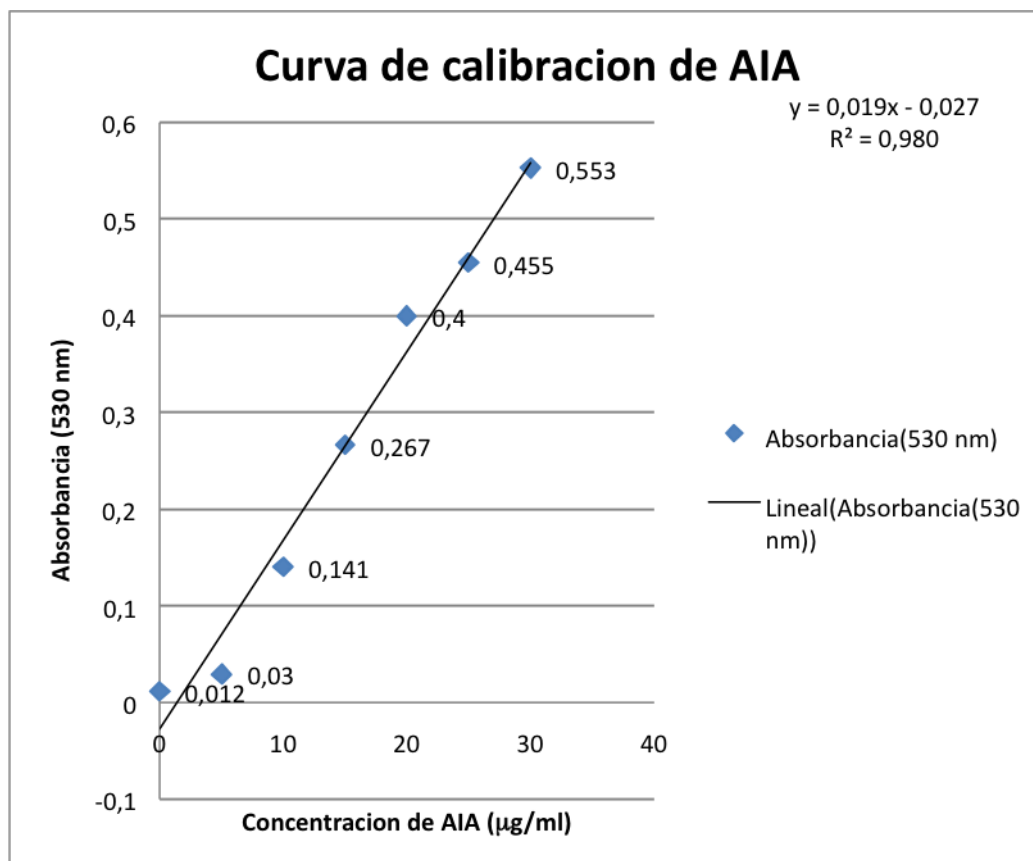
Se evaluó la producción de AIA de las 16 cepas descritas en la tabla 2, para ello se preparó un stock de soluciones de AIA, en las que a partir de las absorbancias obtenidas de los patrones de 0, 5, 10, 15, 20, 25, y 30 µg/ml de AIA se obtuvo la ecuación de la curva de calibración que relaciona la absorbancia en función de la concentración como muestra la figura 6, con un R^2 de 0,9804.

Tabla 2. Lista de microorganismos evaluados.

MICROORGANISMO	CODIGO
<i>Bacillus pumilus</i>	GIBI_000187_AG_B
<i>Bacillus altitudinis</i>	GIBI_000188_AG_B
<i>Bacillus pumilus</i>	GIBI_000189_AG_B
<i>Bacillus pumilus</i>	GIBI_000192_AG_B
<i>Bacillus pumilus</i>	GIBI_000193_AG_B
<i>Bacillus sp.</i>	GIBI_000194_AG_B
<i>Bacillus sp.</i>	GIBI_000195_AG_B
<i>Bacillus sp.</i>	GIBI_000197_AG_B
<i>Bacillus sp.</i>	GIBI_000199_AG_B
<i>Bacillus subtilis</i>	GIBI_000200_AG_B

<i>Bacillus sp.</i>	GIBI_000201_AG_B
<i>Bacillus pumilus</i>	GIBI_000203_AG_B
<i>Bacillus pumilus</i>	GIBI_000204_AG_B
<i>Bacillus pumilus</i>	GIBI_000206_AG_B
<i>Bacillus sp.</i>	GIBI_000208_AG_B
<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	GIBI_000209_AG_Y

Figura 6. Curva de calibración de AIA



Posteriormente con esta ecuación se determinó la concentración de AIA producida por cada microorganismo, cada cepa fue inoculada por triplicado en caldo

tripticasa de soya suplementado con triptófano e incubadas por 96 horas a 30°C tiempo que reporta la literatura en el que se da el pico máximo de producción de AIA para estos microorganismos.

A los datos obtenidos se les realizó un análisis estadístico por el método de Duncan, para clasificar los microorganismos de acuerdo con la producción de AIA, sin embargo no se hallaron diferencias estadísticas significativas para la producción de AIA ($p > 0,05$), aunque la clasificación de Duncan dejó ver que la cepa correspondiente a *Bacillus subtilis* (identificada con el código GIBI_000200_AG_B) obtuvo el mejor promedio de producción de AIA (Tabla 3), por lo cual se eligió para los ensayos in vivo con las plantas de zanahoria.

Tabla 3. Clasificación de Duncan para la producción de AIA de cada microorganismo

CONCENTRACION A.I.A					
	CEPA	N	Subconjunto		
			1	2	
Duncan ^{a, b}	209	3	2,4933		
	208	3	2,6767		
	204	3	2,9667	2,9667	
	193	3	3,2933	3,2933	
	203	3	3,3067	3,3067	
	199	3	3,4467	3,4467	
	188	3	3,5767	3,5767	
	187	3	3,9833	3,9833	
	194	3	4,0133	4,0133	
	201	3	4,0400	4,0400	
	189	3	4,1367	4,1367	
	197	3	4,1600	4,1600	
	206	3	4,2300	4,2300	
	192	3	4,3733	4,3733	
	195	3	5,0367	5,0367	
	200	3		5,4700	
	Sig.			,063	,067

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000

b. Alfa = ,05.

4.2 Solubilización de Fosfatos.

La prueba de solubilización de fosfatos realizada en el medio Pikovskaya (PKV), permitió evaluar de manera cualitativa los microorganismos con capacidad para solubilizar fosfatos, lo que se evidenció con un cambio de color del medio entre verde y amarillo, se utilizó *Pseudomonas fluorescens* como control positivo (Figura 7). Las cepas que solubilizaron fosfatos se relacionan en la siguiente tabla.

Tabla 4. Microorganismos que solubilizaron fosfato en el medio PKV

CODIGO	NOMBRE
GIBI_000200_AG_B	<i>Bacillus subtilis</i>
GIBI_000206_AG_B	<i>Bacillus pumilus</i> .

Figura 7. *Pseudomonas fluorescens*, control positivo utilizado en la prueba.

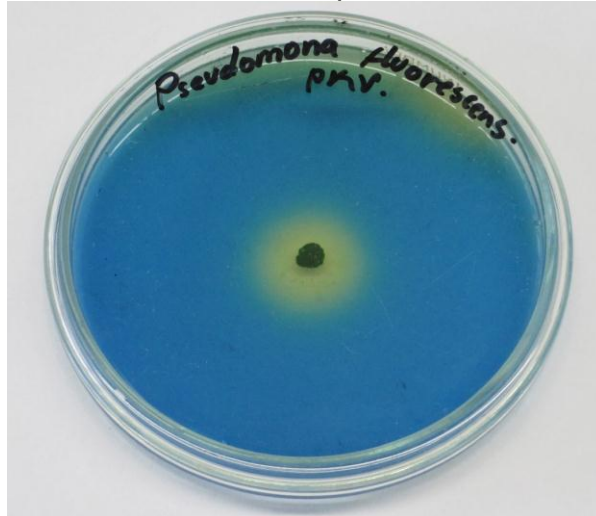


Figura 8. *Bacillus subtilis*, solubilizando fosfatos en PKV

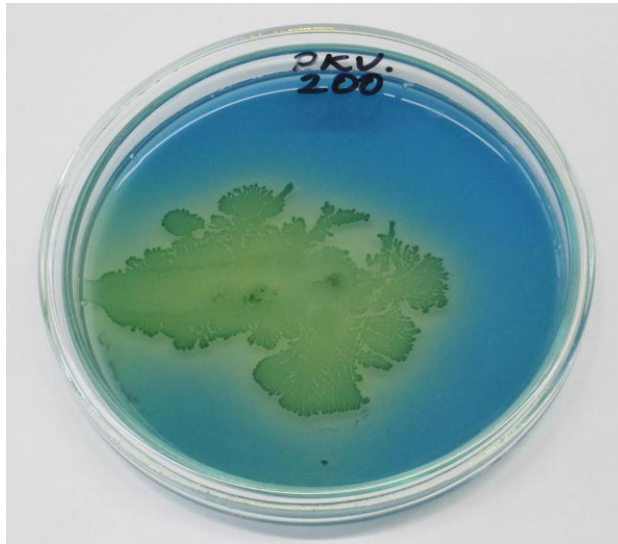
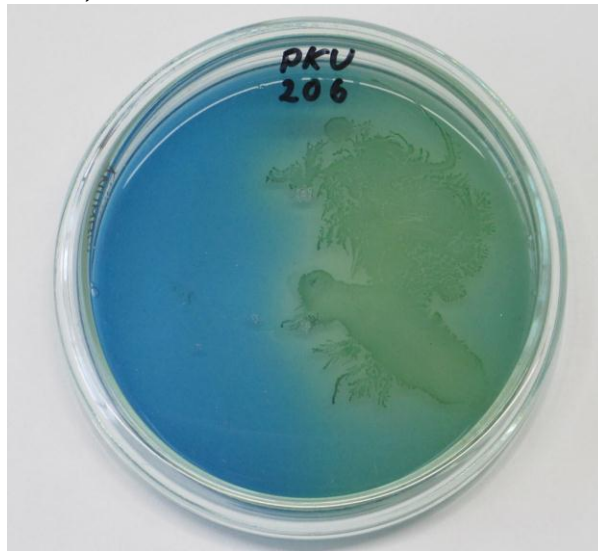


Figura 9. *Bacillus pumilus*, solubilizando fosfatos en PKV



El género *Bacillus* esta dentro del grupo de microorganismos solubilizadores de fosfatos, lo que les permite aumentar la disponibilidad de fósforo a las plantas; se destacan las especies *B. megaterium* y *B. subtilis* debido a que liberan al medio ácidos orgánicos como principal mecanismo de solubilización, también es común

la acción de enzimas como las fitasas. (Tejera *et al.*, 2011). La especie *B. pumilus* es conocida más por ser una bacteria con características de promoción de crecimiento vegetal, por su capacidad de liberar fitohormonas, pero actualmente se esta evaluando potencial como solubilizadora de fosfatos (Pérez, 2012).

4.3 Recuento de la concentración del microorganismo (*B. subtilis*) inoculado en turba

Se realizó un recuento en placa para establecer la concentración en UFC de *Bacillus subtilis* en la turba, todo esto con el fin de constatar la viabilidad del *Bacillus* en la turba durante todo el tiempo que duraron los ensayos.

Inicio del ensayo: 28×10^7 UFC/g

Final del ensayo: 61×10^7 UFC/g

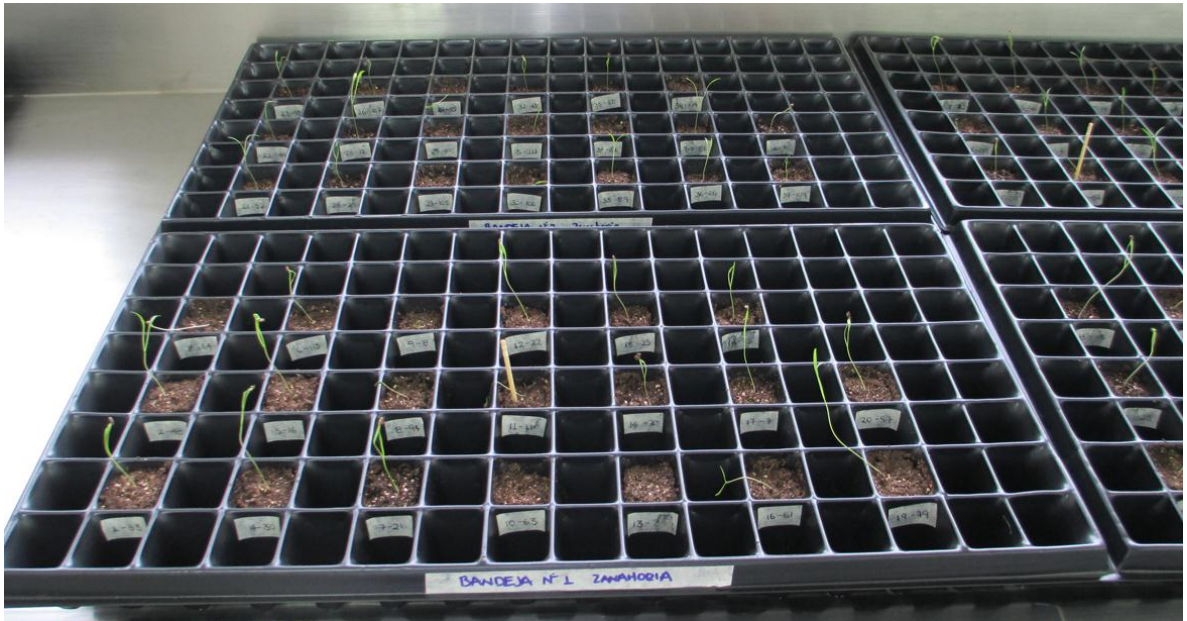
4.4 Efecto de *Bacillus subtilis* sobre la germinación de semillas de zanahoria (*Daucus carota*)

La germinación fue evaluada durante 12 días, tiempo en el cual se obtuvo el máximo número de semillas germinadas tanto en el control como en las semillas inoculadas. La germinación de las semillas fue realizada en turba, 60 semillas se dividieron en 6 grupos de 10 semillas cada uno, se sembraron aleatoriamente en bandejas de germinación (figura 10), de manera que 60 semillas fueron inoculadas y 60 sin inóculo se utilizaron como control. La turba inoculada fue preparada a partir de una solución que contenía 10^8 células/ml de *Bacillus subtilis*.

No se evidenciaron diferencias significativas entre el control y las semillas inoculadas con el microorganismo en lo concerniente al porcentaje de germinación por otro lado se observó una alta viabilidad de las plantas, la tasa de mortalidad fue muy baja y solo se presentó en las plantas sin inóculo, esto nos indica que

Bacillus subtilis ofreció protección a las plantas que estaban inoculadas, disminuyendo considerablemente la mortalidad.

Figura 10. Bandejas con semillas de zanahoria con y sin inóculo bacteriano.



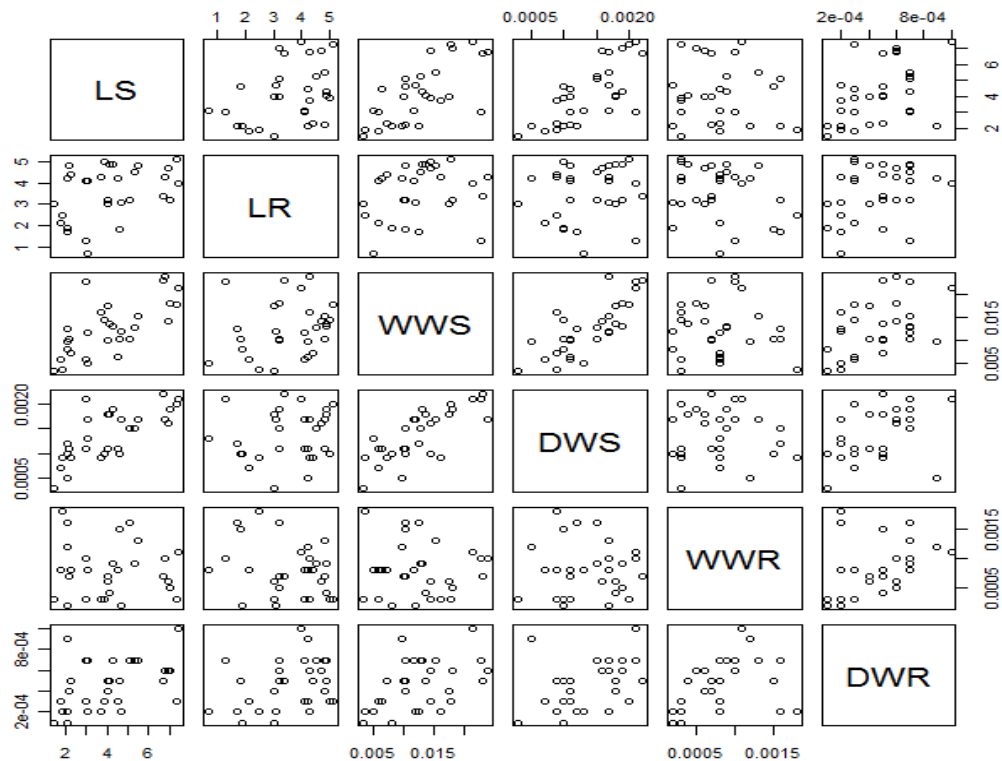
El *Bacillus subtilis* es empleado ampliamente en productos biológicos que fomentan el crecimiento vegetal y protegen diferentes cultivos de enfermedades, estudios reportan que este microorganismo es ampliamente eficaz en el control de patógenos que afectan la zanahoria, (Urquiza, 2009).

4.5 Efecto promotor del crecimiento vegetal de *Bacillus subtilis* en zanahoria

Pasados 12 días, los cuales fueron necesarios para la germinación de las semillas, se tomaron de las bandejas con turba 45 plantas de las 60 con inóculo y otras 45 sin inóculo, estas fueron llevadas hasta el día 40, al cabo del cual se tomaron 15 plantas de la turba con inóculo y 15 plantas de turba sin inóculo, se evaluó el peso seco y húmedo de raíz y tallos, y se determinó la longitud de las raíces y tallos.

En el dispersograma (figura 11) se observa cierta interrelación entre las variables. En particular, el diagrama pone en evidencia una fuerte correlación positiva entre las variables peso húmedo de tallo (WWS) y peso seco de tallo (DWS), lo que indica que para futuros estudios, no sería necesario medir ambas variables, ya que el conocer el valor de una fija el valor de la otra, y en términos económicos saldría más conveniente trabajar con los registros del peso húmedo del tallo.

Figura 11. Dispersograma de las variables estudiadas



Otro componente importante es la matriz de correlaciones (tabla 5), en esta tabla, se observa que las variables de más alta correlación son el peso húmedo y el peso seco del tallo, con un coeficiente de 0.817, tal y como se había evidenciado

anteriormente en el dispersograma. En general se observan correlaciones positivas, lo que indica que el incremento de los valores de una de las variables está relacionado con el incremento de los valores de las otras, a excepción del peso húmedo de la raíz, que aunque registra bajos valores del coeficiente de correlación, éstos son negativos con respecto a la longitud del tallo (LS), longitud de raíz (LR) y el peso seco del tallo.

Tabla 5. Matriz de correlaciones entre las variables estudiadas

	*LS	*LR	*WWS	*DWS	*WWR	*DWR
LS	1,0000					
LR	0,3798	1,0000				
WWS	0,7070	0,1936	1,0000			
DWS	0,7273	0,1590	0,8174	1,0000		
WWR	-0,0587	-0,2741	0,0140	-0,0216	1,0000	
DWR	0,4460	0,3351	0,5333	0,4548	0,3872	1,0000

*LS: Longitud tallo *LR: Longitud raíz *WWS: Peso húmedo tallo *DWS: Peso seco tallo *WWR: Peso húmedo raíz *DWR: Peso seco raíz

En el diagrama de sedimentación (figura 12), se observa que los únicos componentes que tienen valores propios superiores a la unidad son los dos primeros, lo que nos indica que el primer plano factorial (correspondiente a los dos primeros componentes) captura la información más relevante del estudio.

Figura 12. Diagrama de sedimentación- valores propios.

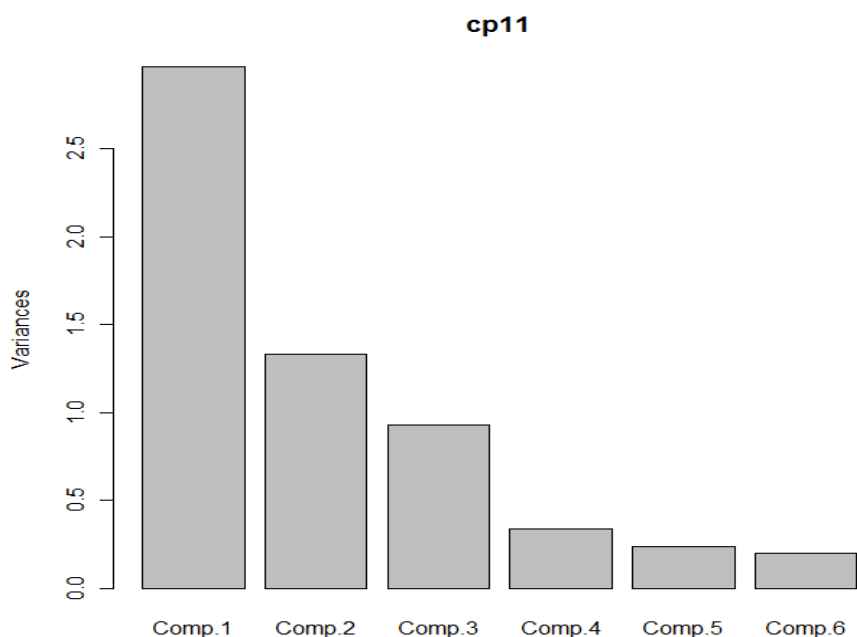


Tabla 6. Resultado del análisis de componentes principales

Resumen Análisis de Componentes Principales						
	Comp. 1	Comp. 2	Comp. 3	Comp. 4	Comp. 5	Comp. 6
Valores propios	1,722	1,153	0,963	0,583	0,486	0,451
Proporción de varianza explicada	0,494	0,222	0,154	0,057	0,039	0,034
Proporción Acumulada	0,494	0,716	0,870	0,927	0,966	1,000

En la (tabla 6) se muestra el resumen del ACP, aquí quedan registrados los valores propios de cada uno de los componentes, así como las varianzas explicadas por cada uno de ellos. Se observa que el primer componente retiene el 49.4 % de la variabilidad total de los datos, mientras que el segundo componente retiene solo el 22.2 % de la variabilidad total de los datos. En lo correspondiente al primer plano factorial se tiene que éste retiene el 71.6 % de la variabilidad total de

los datos, por lo que los dos primeros componentes dan cuenta de gran parte de la información estudiada.

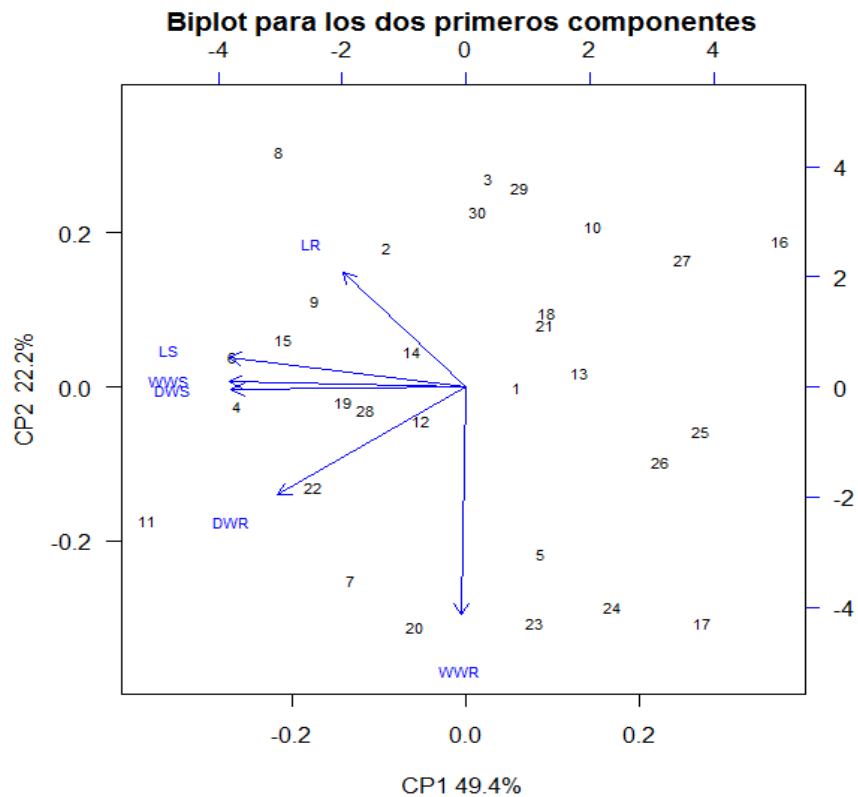


Figura 13 .Gráfico de Biplot del primer plano factorial

En primera instancia se observa en el plano factorial (Figura 13) que los vectores representativos de las variables estudiadas presentan una gran magnitud, lo que indica que en general todas las variables medidas quedan bien representadas en este primer plano factorial, por lo que no sería necesario recurrir al análisis de otros planos factoriales.

En el análisis de los componentes se encuentra que el primer componente da cuenta del tamaño en general de la zanahoria, registrándose que el mismo aumenta hacia el lado izquierdo del plano, por lo que las plantas ubicadas hacia la derecha son de tamaño pequeño, mientras que las ubicadas hacia la izquierda registran valores

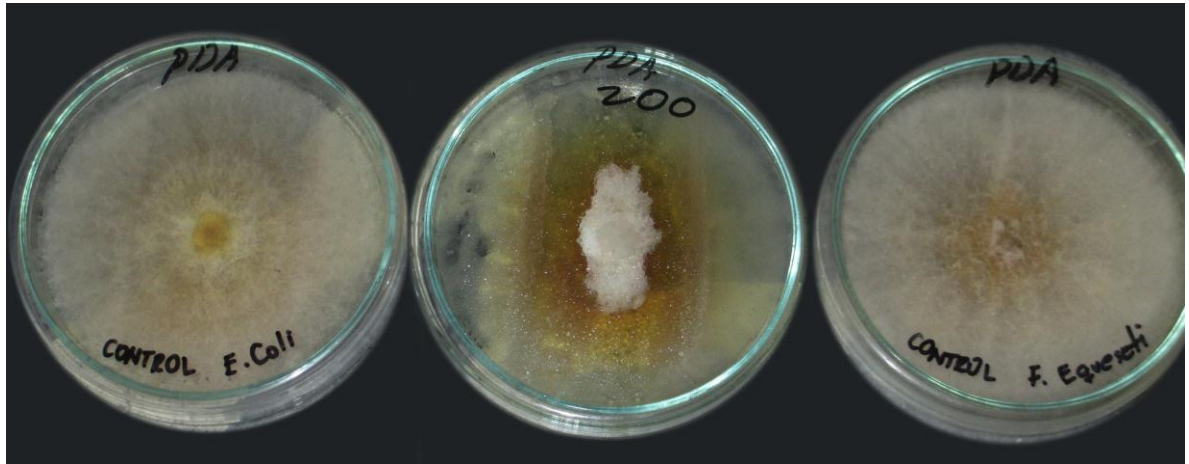
pequeños de las variables medidas. En relación al segundo componentes se observa que este es un indicador de forma de la planta, que contrapone a las variables peso húmedo de la raíz (WWR) y longitud de raíz (LR), obteniéndose que las plantas de altas longitudes de raíz y bajos pesos de raíz se ubican hacia el eje positivo de la ordenada, mientras que las plantas con altos pesos de raíz y bajas longitudes de raíz se ubican hacia el eje negativo de la ordenada.

Teniendo en cuenta que las plantas de zanahoria inoculadas con el microorganismo *Bacillus subtilis* se etiquetan en el mapa con los números del 1 al 15, mientras que las plantas empleadas como control se etiquetan con los números del 16 al 30, la lectura del plano nos deja en consecuencia que, las plantas que reportan los más altos grados de crecimiento en términos de las variables longitud de la raíz, peso y longitud del tallo se ubican en el segundo cuadrante (cuadrante superior izquierdo) el cual contiene únicamente plantas de zanahoria inoculadas (8, 2 ,9 ,15, 6 y 14), lo que se convierte en una evidencia objetiva del efecto positivo que tiene la inoculación del microorganismo en el crecimiento de la planta de zanahoria.

4.6 Prueba de antagonismo

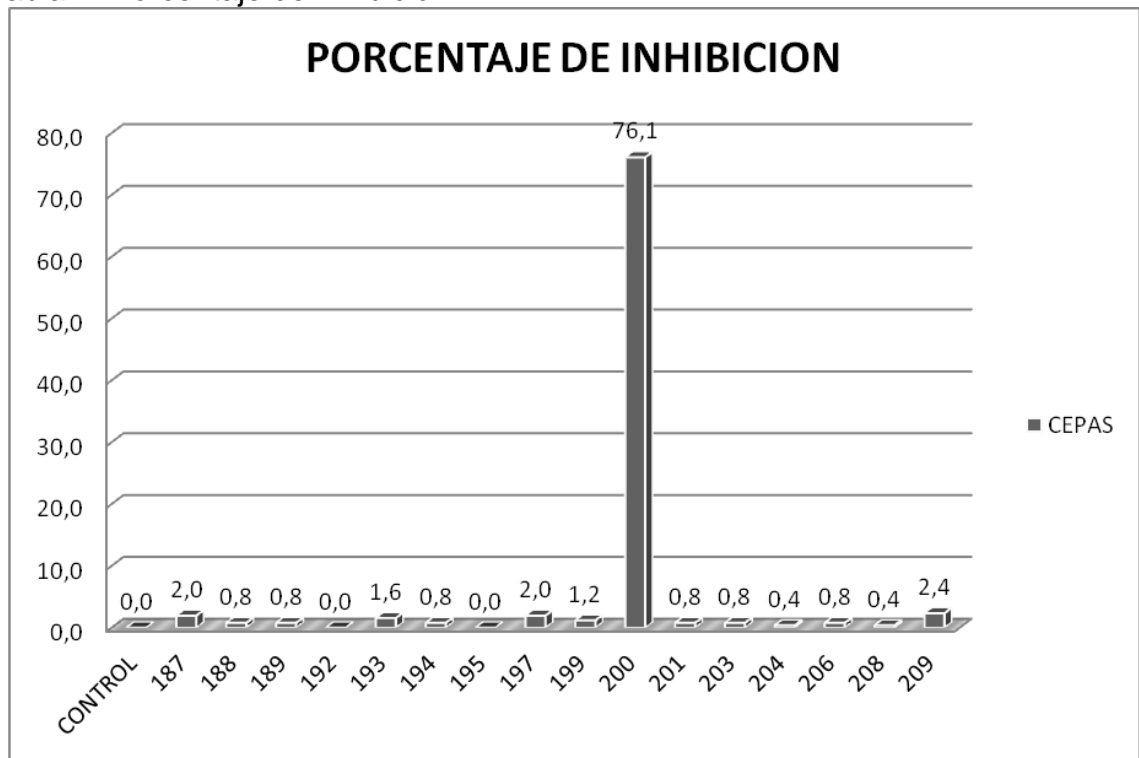
Se realizó una grafica, para comparar el porcentaje de inhibición de todas las cepas con respecto a un control negativo (*E. coli*), el porcentaje de inhibición mostró ser estadísticamente significativo solo para *Bacillus subtilis*, que obtuvo un porcentaje medio de inhibición del 76,080% con respecto al control negativo (tabla 7). Se ha demostrado que la actividad antifúngica del *Bacillus subtilis* es debido, a un metabolito termoestable extracelular que esta dentro de la familia de las iturinas (iturina A). (Basurto *et al*, 2010)

Figura 14. Inhibición de *Fusarium equiseti* por *Bacillus subtilis*.



Bacillus subtilis en el centro, los controles negativos a los extremos.

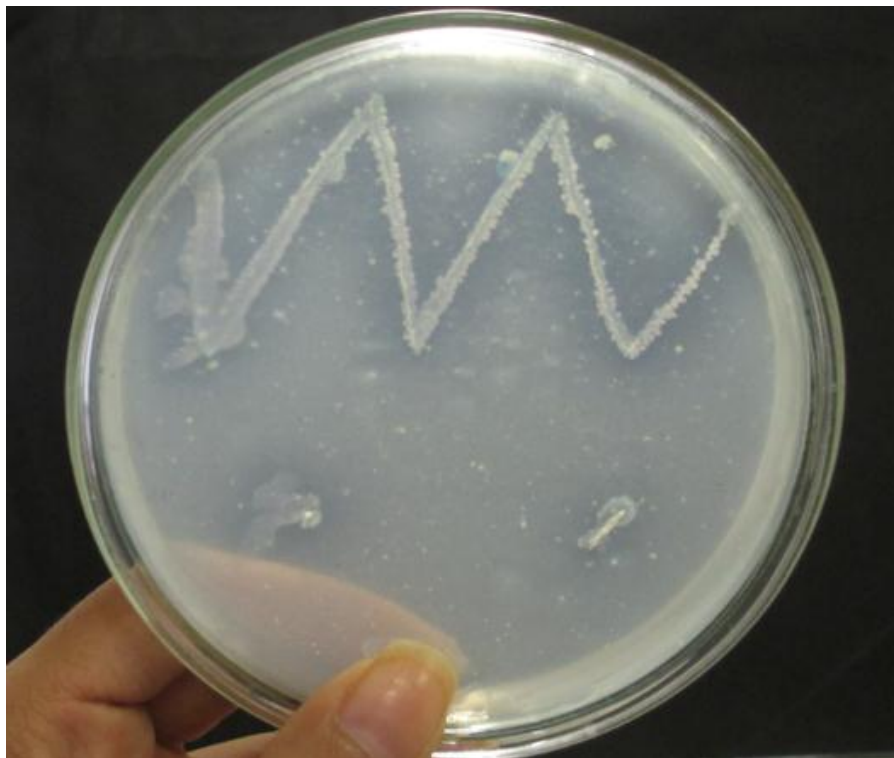
Tabla 7. Porcentaje de inhibición.



4.7 Detección de quitinasas

Después de sembrar las 16 cepas microbianas y el control positivo por estria y picadura en el medio quitina coloidal solo se pudo observar crecimiento microbiano y la formación de halo en el control realizado con *Serratia marsescens* (ver figura 15), esto nos indica, a parte de que la prueba se reliazo satisfactoriamente, que ninguna de las cepas evaluadas tiene la capacidad de degradar la quitina.

Figura 15. Control positivo con *Serratia marsescens*



4.8 Árboles filogenéticos

El análisis de las secuencias del gen ADNr 16S para las cepas bacterianas y de la región ITS para la levadura permitió obtener los árboles filogenéticos que se esquematizan en las figuras 16 y 17 respectivamente.

La cepa identificada como 200 AG B (*Bacillus subtilis*) fue agrupada con *Bacillus amyloliquefaciens* la cual fue aislada en plantas de maní (NCBI, 2011), de este microorganismo se han reportado cepas con uso potencial en biocontrol debido a que su capacidad de producir quitinasas que actúan frente a hongos fitopatógenos inhibiendo su crecimiento (Balvatín *et al.*, 2009). Gül y colaboradores reportaron en 2008 dos cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* (FZB24 y FZB42) promotoras del crecimiento vegetal, estas características al parecer conservadas, son también coherentes con los hallazgos obtenidos en este trabajo ya que la cepa 200, mostró actividad antagonista frente al fitopatógeno *Fusarium equiseti* y capacidad como promotor de crecimiento vegetal en las plantas de tomate.

La cepa bacteriana 203 aunque si bien es la más alejada del grupo, no obstante también fue agrupada con la cepa 200, este microorganismo fue identificado previamente como *Bacillus pumilus*, pero en este trabajo no mostró ningún tipo de actividad como promotor de crecimiento vegetal.

La cepa 188, fue agrupada de manera que muestra similitud con *Bacillus pumilus*, este microorganismo fue aislado en solventes orgánicos (NCBI, 2010), estos

microorganismos que presentan la característica de ser tolerantes a solventes orgánicos tienen un uso potencial en procesos de biorremediación y de biocatálisis en presencia de estas sustancias (Sardesai y Bhosle, 2004).

Las demás cepas evaluadas en este trabajo, no fueron agrupadas de manera que se puedan establecer inferencias a partir de los datos obtenidos y que se esquematizan en el árbol, debido a que probablemente no hay información suficiente dentro de la región amplificada para agruparlos o separarlos en diferentes grupos.

Figura 16. Árbol filogenético basado en el gen *ADNr* 16S para 15 taxones bacterianos. Para la construcción del árbol se empleó el método Neighbor-Joining con un *Bootstrap* de 10.000 réplicas. El árbol fue realizado en el programa MEGA 5.0, al código de acceso al GenBank se especifica al final del nombre del microorganismo.

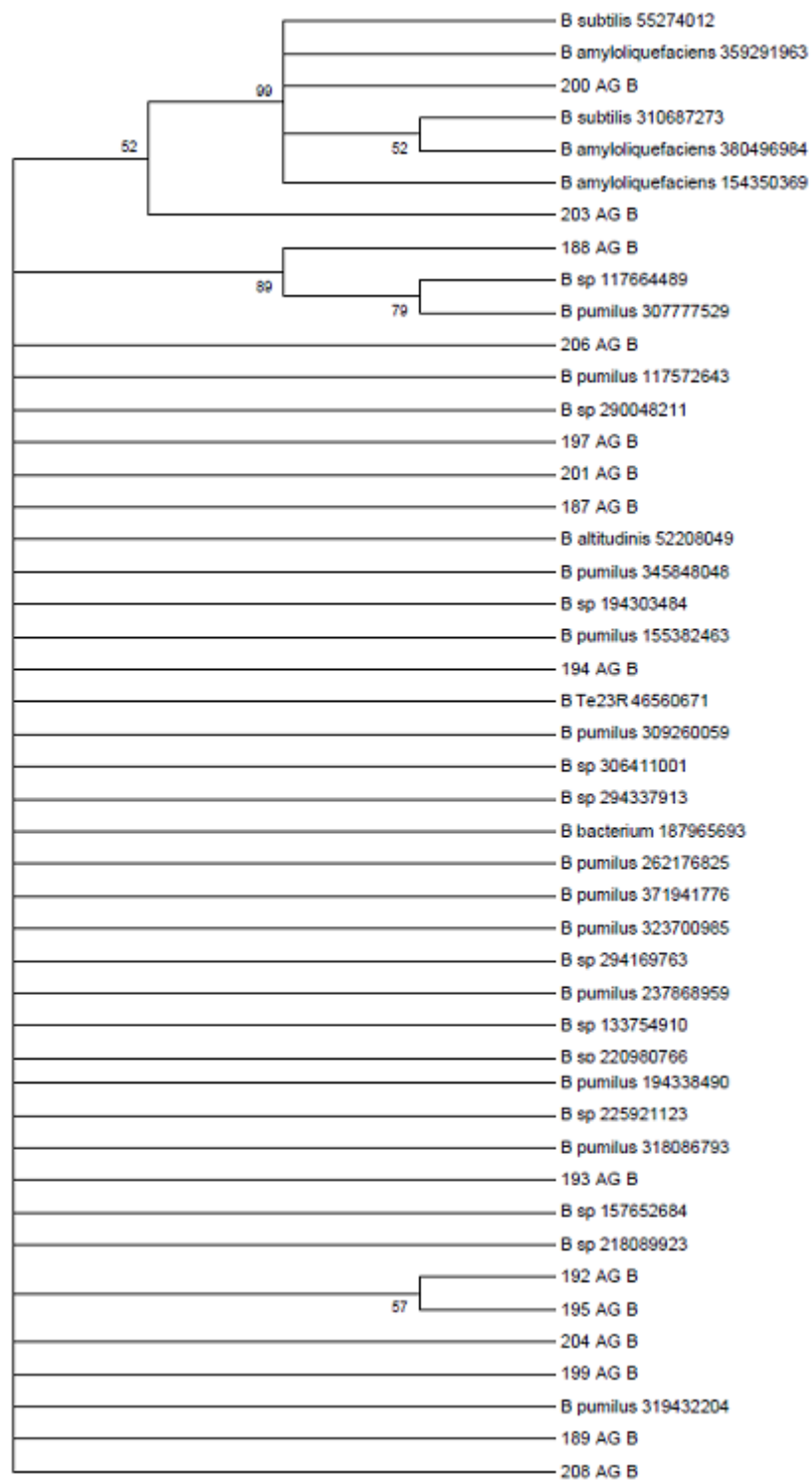
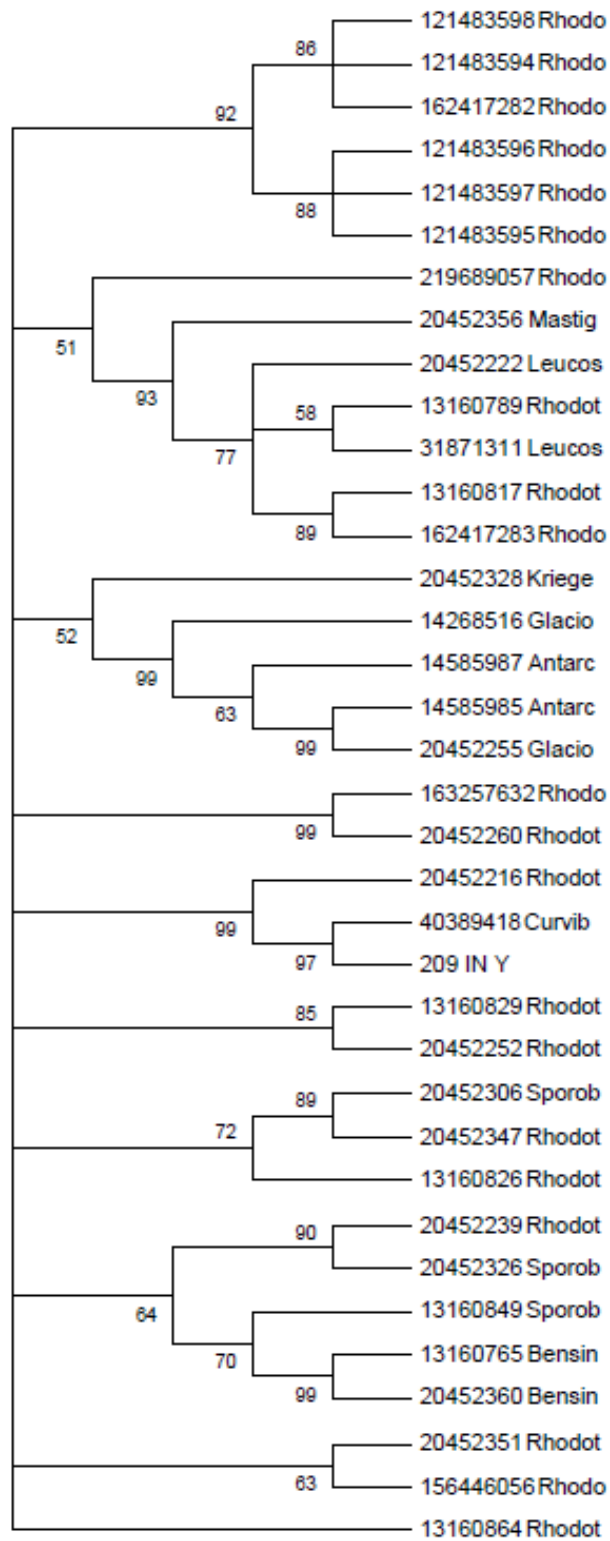


Figura 17. Árbol filogenético basado en la región ITS para la levadura. El código de acceso al GenBank se especifica al inicio del nombre del microorganismo.



En la figura 17, se observa que la levadura identificada con el código 209 IN Y, fue agrupada con el microorganismos 40389418 Curvib, que corresponde a *Curvibasidium pallidicorallinum*, este hongo se caracteriza por ser dimórfico, con hifas de 1,5 a 2,5 μm de diámetro, las hifas se forman después del apareamiento de cepas sexualmente compatibles, posee teliosporas generalmente esféricas aunque a veces pueden ser ovoides y las basidiosporas son de morfología baciliforme.

El microorganismo 20452216 Rhodot, corresponde a *Rhodotorula fujisanensis* y fue dispuesto en el mismo grupo con la levadura 209 IN Y y *Curvibasidium pallidicorallinum*, con respecto a este último comparte la capacidad de formar teliosporas, esporas de resistencia donde ocurre la cariogamia y cuya germinación induce la formación de un tubo germinal. Tras la meiosis generan basidiosporas haploides que germinan y que pueden dar origen a hifas que producen otros tipos de esporas o bien conidios, por tanto no generan cuerpos fructíferos.

Estos géneros de microorganismos no han sido reportados hasta ahora como promotores de crecimiento vegetal (Sampaio *et al.*, 2004), de igual manera en este trabajo la levadura 209 IN Y, no mostró potencial como promotora de crecimiento vegetal.

CONCLUSIONES

- De las 16 cepas evaluadas, la perteneciente al género *Bacillus subtilis* identificada con el código GIBI_000200_AG_B fue la que obtuvo mejor promedio (5,47ug/ml) en la producción de AIA. El inóculo de este microorganismo en semillas de zanahoria indujo el crecimiento de las plantas .
- Se encontraron en este estudio dos cepas bacterianas con capacidad para solubilizar fosfato, la cepa de *Bacillus subtilis* y la de *Bacillus pumilus*.
- El género *Bacillus subtilis* mostró un porcentaje de antagonismo muy alto (76.08%) frente al hongo fitopatógeno *Fusarium equiseti* , esto confirma su empleo como bioproducto para la defensa de cultivos contra hongos fitopatógenos.
- Ninguna de las cepas evaluadas posee capacidad para degradar quitina.
- En el árbol filogenético bacteriano se observa que *Bacillus subtilis* se agrupó con microorganismos que están reportados en la literatura como promotores de crecimiento.

RECOMENDACIONES

- El desempeño de la bacteria *Bacillus subtilis* debe ser estudiado en campo para verificar su comportamiento con condiciones mas extremas y durante todo el desarrollo de la planta de zanahoria.
- Realizar mediciones de fosfatasas de las cepas: *Bacillus subtilis* (GIBI_000200_AG_B) y *Bacillus pumilus* (GIBI_000206_AG_B) para evaluar su capacidad de solubilización de fostatos y asi ampliar su estudio como microorganismos promotores de crecimiento vegetal.
- Se deben seguir explorando los residuos lignocelulósicos de la región en búsqueda de microorganismos con características óptimas para desarrollar la producción de bioinsumos agrícolas.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. (2002). Fitopatología. México: Editorial Limusa, S.A de C.V.
- Baldauf S. (2003). Phylogeny for the faint of heart: a tutorial. *Trends in Genetics* .19(6): pp 345-351.
- Balvatín C., Cerda F., Lira R. (2009). Biotecnología en el control de microorganismos fitopatógenos. *CIENCIACIERTA*.19: pp 111-117
- Bhagwat. M., Young. L., Robinson R. (2012). Using BLAT to Find Sequence Similarity in Closely Related Genomes. *Current Protocols in Bioinformatics*. Mar;Chapter 10:Unit10.8.
- Basurto M., Font M., Garcia J., Vásquez M., (2010) Cambios en la estructura celular durante la actividad antagónica de *Bacillus subtilis* contra *Rhizoctonia solani* y *Fusarium verticillioides*. Universidad de Guanajuato, México – Universidad Politécnica de Valencia. *Acta Microscópica* Vol. 19: 138 – 144
- Bellaaj O., Younes I., Younes H., Hajji S., Nasri M.(2012).Chitin extraction from shrimp shell waste using Bacillus bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules* 51:1196– 1201.
- Benítez S, Bustamante J., Sánchez P., Corrales L. (2007). Aislamiento de los microorganismos cultivables de la rizosfera de *Ornithogalum umbellatum* y evaluación del posible efecto biocontrolador en dos patógenos del suelo. *Nova* [en línea], 5 (julio-diciembre) : [fecha de consulta: 20 de marzo de 2012] Disponible en:
<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=41150805>
- Calvo. P, Zuñiga. D. (2010). Caracterización fisiológica de cepas de *bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada*, Universidad Nacional Agraria La Molina. vol. 9, núm. 1, enero-junio, 2010, pp. 31-39

- Castañeda-Agulló M. (1956). Studies on the biosynthesis of extracellular proteases by bacteria. *J. Gen. Physiol.* 89: 369–373.
- Castillo G., Altunoa B., Michelena G., Sánchez J., Acosta M. (2005). Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. *Anales de Biología.* 27: 137-142.
- Castro. R., Álvarez. A., Machado E., Mendoza M., Gómez R., García P. (2011). Caracterización de una quitinasa extracelular producida por *Serratia* sp. BIOMI-363706 usando quitina coloidal como sustrato. *Rev Soc Quim Peru.* 77(2): 101-108.
- Castro. S, Roa C. 2006. Bacterias endófitas de *Cordia alliodora* Oken y *Tabebuia rosea* Bertold D.C: potencial como promotoras de crecimiento vegetal en la propagación de su hospedero. Carrera de Microbiología Agrícola y Veterinaria, Facultad de ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Celis. L, Gallardo. I. (2008). Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (Acido Indol Acético y Giberelinas) en cultivos microbianos. Carrera de Microbiología Agrícola y Veterinaria, Facultad de ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Farfán D., Gutierrez C. (2009). Determinación de la actividad quitinolítica de cepas nativas de actinomicetos y su efecto antagónico sobre microorganismos patógenos. Tesis de grado. *Pontificia Universidad Javeriana.* Bogotá.
- Fernández L., Zalba P., Gómez M., Sagardoy M. (2005). Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Cl. Suelo (Argentina).* 23 (1): 31-37.
- Fernández O., Vega L., (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Avances en el fomento de productos fitosanitarios No – Sintéticos. Manejo integrado de plagas. Costa Rica. No 62: 96 – 100

- Franco M., (2008) *Evaluación de caracteres PGPR en Actinomicetos e interacciones de estas Rizobacterias con hongos formadores de micorrizas*. Tesis doctoral. Universidad de Granada. Facultad de ciencias. España.
- García R., Rodríguez J., Tejeda G., Fernández R., Martínez A., Lamela C., Martínez R., Simanca M., Soca U., (2008) Contribución al desarrollo territorial de Boyeras mediante la aplicación de biofertilizantes obtenidos en el INIFAT. *Revista Agrotecnica de Cuba*.
- Guédez C., Castillo C., Cañizales L., Olivar R., (2008) Control biológico: una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. *Academia*. Vol. VII (13): 50 -74
- Harvey P., Nee S. (1993). New uses for new phylogenies. *European Review*.1: pp 11-19
- Hall. T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Jin. Y., Yu. C., Kuen Y. (2009). Cloning and expression of chitinase a from *serratia marcescens* for large-scale preparation of *n,n*-diacetyl chitobiose. *Journal of the Chinese Chemical Society*. 56: 688-695.
- Lang. W., lung. I., How. C. Choan K., Teish. W., Kuo. Y., Jon. J., Lu. C.(2002). Production of antifungal compounds from chitin by *Bacillus subtilis*. *Enzyme and microbial Tecnology*. 31: 321-328.
- Lara C., Oviedo L., Betancur C., (2001) Bacterias nativas con potencial en la producción de ácido indol acético para la mejora de los pastos. Universidad de Córdoba. *Zootecnia Tropical*. Vol. 29, num 2.
- Li. W., Godzik. A. (2006). Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*. 22 (13): 1658-1659.

- Liu Y., Tao Y., Yan Y., Li B., Li H., Li C.(2011).Biocontrol Efficiency of *Bacillus subtilis* SL-13 and Characterization of an Antifungal Chitinase. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 19(1) :128-134.
- NCBI. (2011). *Bacillus amyloliquefaciens* strain SWM1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. [en línea]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/359291963> (Consultada: 24 de Octubre de 2012)
- NCBI. (2010). *Bacillus pumilus* strain AK39674 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. [en línea]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/307777529> (Consultada: 24 de Octubre de 2012)
- Nicholls C. y Alteri M. (Septiembre 2008), revista de agroecología.
- Patiño C. (2010). Solubilización de fosfatos por poblaciones bacterianas aisladas de un suelo del valle del cauca. Estudio de biodiversidad y eficiencia. Trabajo de grado. *Universidad Nacional de Colombia*. Palmira.
- Pérez R. (2012). Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal en pepino (*Cucumis sativus* L.) . *Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas*. Tesis de maestría. Montecillo, Texcoco. México
- Rattanakit N, Plikomol A, Yano S, Wakayama M, Tachiki T, (2002), Utilization of Shrimp Shellfish Waste as a Substrate for Solid-State Cultivation of *Aspergillus* sp. S 1- 13: Evaluation of a Culture Based on Chitinase Formation Which Is Necessary for Chitin-Assimilation, vol 93, No. 6, 550-556
- Reinoso Y., Casadesús L., Garcia A., Gutierrez J., Pazos V., (2006) Aislamiento, selección e identificación de bacterias del género *Bacillus* antagonistas de *Pectobacterium carotovorum* . *FITOSANIDAD* vol. 10, num. 3.
- Reyes. I, Alvarez. L, El-Ayoubi. H, Valery. A. (2008). Selección y evaluación de rizobacterias promotoras de crecimiento en pimentón y maíz. *Bioagro*. Volumen 20, 37-48.
- Rinaudo M. (2006).Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* 31 603–632.

- Rodicio. M.R., Mendoza. M.C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicación en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 22 (4): pp 238-245.
- Sampaio. J., Golubev. W., Fell. J., Gadanho .M., Golubev. N. (2004) .*Curvibasidium cygneicollum* gen. nov., sp. nov. and *Curvibasidium pallidicorallinum* sp. nov., novel taxa in the Microbotryomycetidae (Urediniomycetes), and their relationship with *Rhodotorula fujisanensis* and *Rhodotorula nothofagi*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 54: pp 1401-1407.
- San L., Tzu W., Yue H., Hui F., Yu J .(2006). Bioconversion of shellfish chitin wastes for the production of *Bacillus subtilis* W-118 chitinase. *Carbohydrate Research.* 341: 2507–2515.
- San L., Tzu W., Yue H.(2011). Bioconversion of chitin-containing wastes for the production of enzymes and bioactive materials. *Carbohydrate Polymers.* 84:732–742
- Sandria J. (2003). Aplicaciones de la Inteligencia Artificial al análisis de Biosecuencias. Tesis de Maestría (maestría en inteligencia artificial). Universidad veracruzana. Veracruz, México.
- Sardesai Y., Bhosle S. (2008). Industrial potential of organic solvent tolerant bacteria. *Biotechnol Prog.* May-Jun; 20(3): pp 655-60.
- Sastoque E. (2005). Aislamiento y selección de microorganismos productores de quitinasas a partir de residuos de concha de camarón con potencial biocontrolador. Tesis de grado. *Pontificia Universidad Javeriana.* Bogotá.
- Soto A. (2010). Etiología de la cenicilla en zanahoria (*Daucus carota L.*). Tesis de grado. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia-Mexico.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum

Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.

- Tejera B., Rojas M., Heydrich M.(2011).Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*.42 (3): 131-138.
- Thompson J., Higgins D., Gibson T.(1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: pp 4673-4680.
- Urquiza D. (2009). Evaluación de la eficacia de los productos *Bacillus subtilis* (Rhapsody) y difenoconazole (score 250) para el control de *Alternaria (Alternaria dauci)* en dos cultivares de zanahoria (*Daucus carota L.*) Tesis de grado. *Escuela Superior Politecnica de Chimborazo*. Riobamba-Ecuador.
- Wang S, Yen Y, Tzeng G, Hsieh C, (2005), Production of antifungal materials by bioconversion of shellfish chitin wastes fermented by *Pseudomonas fluorescens* K-188, *Enzyme and Microbial Technology*, Journal of bioscience and bioengineering. Vol. 36 49–56
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L., and Miller W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 2000; 7(1-2):203-14

ANEXO 1. Medios de cultivo

AGAR NUTRITIVO

Extracto de carne	1 g/L
Extracto de levadura	2 g/L
Peptona	5 g/L
Cloruro de Sodio	5 g/L
Agar-agar	15 g/L
pH	7.0

AGAR PDA

Extracto de papa	500 ml/L
D (+) glucosa	10.0 g/L
Agar-agar	17.0 g/L
pH	7.0

CALDO TRIPTICASA DE SOYA

Peptona de caseína	17.0 g/L
Peptona de soya	3.0 g/L
Glucosa	2.5 g/L
Cloruro de sodio	5.0 g/L
Fosfato hidrogeno dipotásico	2.5 g/L
pH	7.0

MEDIO QUITINA COLOIDAL

Quitina coloidal	0.2%
K ₂ HPO ₄	0.1%
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.05%
Agar	2%
pH	7.0

MEDIO PIKOVSKAYA

Extracto de levadura	0.50
Dextrosa	10.00
Fosfato de calcio	5.00
Sulfato de amonio	0.50
Cloruro de potasio	0.20
Sulfato de magnesio	0.10
Sulfato de manganeso	0.0001
Sulfato ferroso	0.0001
Verde de bromocresol	0,022
Agar -agar	15.00
pH	7.0

