



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LA MICROFLORA ASOCIADA A RIZÓSFERA
DE PIMENTÓN (*Capsicum annuum* L.) EN PUERTO DE LA MADERA,
CUMANÁ, ESTADO SUCRE (Modalidad: Tesis de Grado)

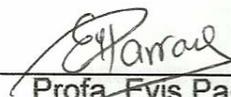
JAIME ANTONIO MORA AZA

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOANÁLISIS

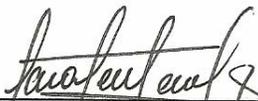
CUMANÁ, 2013

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LA MICROFLORA ASOCIADA A RIZÓSFERA
DE PIMENTÓN (*Capsicum annuum* L.) EN PUERTO DE LA MADERA,
CUMANÁ, ESTADO SUCRE

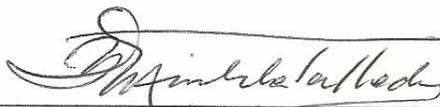
APROBADO POR:



Profa. Evis Parra
Asesora



Profa. Sara Centeno
Jurado



Profa. Isabel Mimbela
Jurado

ÍNDICE

DEDICATORIA	5
AGRADECIMIENTO	6
LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
METODOLOGÍA	22
Recolección de la muestra	22
Aislamiento de microorganismos rizosféricos de <i>Capsicum annuum</i> L.	23
Identificación morfológica y bioquímica de las bacterias	23
Identificación de las cepas fúngicas	24
Determinación de la actividad antagónica de los microorganismos rizosféricos	24
Preparación del inóculo bacteriano.....	24
Método de enfrentamientos duales.....	24
Actividad antifúngica <i>in vitro</i> de <i>Pseudomonas fluorescens</i> contra hongos ambientales	25
Cepas fúngicas ambientales.....	25
Evaluación de la actividad antifúngica <i>in vitro</i> de las cepas de <i>P. fluorescens</i>	25
Cálculo del porcentaje de inhibición.....	26
Producción y extracción de metabolitos de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	26
Actividad antifúngica <i>in vitro</i> del extracto metabólico de <i>Pseudomonas fluorescens</i> contra hongos ambientales	27
Determinación de la actividad antifúngica <i>in vitro</i> del extracto metabólico de <i>P. fluorescens</i>	28
Prueba de susceptibilidad antimicrobiana de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	28
Control de calidad.....	29
Análisis estadístico	30
RESULTADOS	31
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES	43

RECOMENDACIONES	44
BIBLIOGRAFÍA	45
APÉNDICE 1	58
ANEXOS	59
ANEXO 2	60

DEDICATORIA

A

Dios, por la darme la dicha de vivir y entregarme su amor incondicional.

Mis padres, Jaime y Anaely, por dame un excelente educación y ser unos ejemplos a seguir.

Mis hermanos, Kike y Jesse, quienes son mis ojos y están ahí en cualquier momento.

Mis abuelos, Ana y Jesús, por ser más que abuelos unos padres ejemplares.

Mi novia Yaiza, por estar conmigo en todo momento y ser mi principal apoyo y motivación

Mis tíos y primos, por todo su apoyo.

AGRADECIMIENTO

A

La Profesora Evis Parra, por haberme adoptado como hijo, darme excelente e incondicional apoyo y por mostrarme con dedicación y esmero, a través de conocimientos y experiencia, lo extraordinaria e interesante que es la micología. Muchísimas gracias por todo apoyo Madre.

A Maylim Mundaray y Dayana Pérez, por toda su colaboración y valiosa ayuda en toda la realización de este trabajo.

A Fernando Ortiz y Eduardo Higuerey, hermanos que me ayudaron y acompañaron durante gran parte de la tesis.

Y a todas aquellas personas que de alguna u otra forma contribuyeron en la realización de este trabajo.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Recuento de unidades formadoras de colonias bacterianas por gramo de peso seco (UFC/g) aisladas de rizósfera de pimentón (<i>Capsicum annum</i> L.) en 5 unidades de muestreo. Puerto de la Madera, Cumaná, estado Sucre. Mayo-junio de 2010.....	33
Tabla 2. Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC/g) y porcentaje de colonización fúngica por gramo de peso seco, de rizósfera de pimentón (<i>Capsicum annum</i> L.) en Puerto de la Madera, Cumaná, estado Sucre. Mayo-junio de 2010.....	34
Tabla 3. Características bioquímicas de las cepas bacterianas aisladas de rizósfera de pimentón (<i>Capsicum annum</i> L.) en Puerto de la Madera, Cumaná, estado Sucre. Mayo-junio de 2010.....	26
Tabla 4. Características fotomicrográficas de las cepas fúngicas aisladas de rizósfera de pimentón (<i>Capsicum annum</i> L.) en Puerto de la Madera, Cumaná, estado Sucre. Mayo-junio. 2010.....	27
Tabla 5. Enfrentamiento <i>in vitro</i> de bacterias y hongos aislados de (<i>Capsicum annum</i> L.) en Puerto de la Madera, Cumaná, estado Sucre. Mayo-junio de 2010.	29
Tabla 6. Porcentaje de inhibición del desarrollo micelial de <i>Fusarium solani</i> , <i>Trichoderma viride</i> y <i>Penicillium expansum</i> por diferentes cepas de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (A 3.1, A 3.2 y B 3.1) aislados de rizósfera (<i>Capsicum annum</i> L.) en Puerto de la Madera, Cumaná, estado Sucre. Mayo-junio de 2010.....	31
Tabla 7. Actividad inhibitoria del extracto de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (A 3.1) y controles sobre <i>Fusarium solani</i> , <i>Trichoderma viride</i> y <i>Penicillium expansum</i> ..	32
Tabla 8. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (A 3.1).	33

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Frecuencia de aislamientos de bacterias en rizósfera de de pimentón (*Capsicum annum* L.) en Puerto de la Madera, Cumaná, estado Sucre. Mayo-junio de 2010. 31
- Figura 2.** Frecuencia de aislamientos de hongos filamentosos en rizósfera de pimentón (*Capsicum annum* L.) en Puerto de la Madera, Cumaná, estado Sucre. Mayo-junio de 2010. 32
- UFC/g: unidades formadoras de colonias por gramo de peso; %: porcentaje. ANOVA $p > 0,05$ 34
- Figura 3.** Enfrentamientos duales de *Pseudomonas fluorescens* frente a diferentes hongos rizosféricos aislados de pimentón (*Capsicum annum* L.) en Puerto de la Madera, Cumaná, estado Sucre. Mayo-junio de 2010..... 30
- Figura 4.** Comparación entre los enfrentamientos duales de *Pseudomonas fluorescens* ante *Fusarium moniliforme* (1), *Fusarium solani* (2), *Penicillium expansum* (3) y *Trichoderma viride* (4) frente a los controles de cada hongo fitopatógeno (A, B, C y D) respectivamente. 31
- Figura 5.** Enfrentamientos duales de extracto metabólico de *Pseudomonas fluorescens* ante *Fusarium moniliforme* (A), *Fusarium solani* (B), *Penicillium expansum* (C) y *Trichoderma viride* (D). 32
- Figura 6.** Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de *Pseudomonas fluorescens*..... 34

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar la actividad antifúngica de la microflora asociada a rizósfera de pimentón (*Capsicum annuum* L.) en 5 unidades de muestreo de una población de Puerto de la Madera, Cumaná, estado Sucre. Para ello, se recolectaron muestras de *C. annuum* L., durante los meses de mayo y junio de 2011. El aislamiento de los microorganismos rizosféricos, así como también, la posterior identificación de las cepas bacterianas y fúngicas, fueron realizadas utilizando los métodos convencionales. Las especies de hongos identificadas fueron: *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Cunninghamella* sp., *Mycelia sterlia*, *Mucor* sp., *Rhizomucor pusillus* y *Rhizopus oryzae*. Se encontraron 18 diferentes aislados de bacterias asociadas de rizósfera de *C. annuum* L., de los cuales 3 aislados poseen potencial antagonico contra hongos y pertenecen a las especie *Pseudomonas fluorescens*. Se evaluó la actividad antifúngica *in vitro* de las cepas de *P. fluorescens* aisladas, contra hongos fitopatógenos, para ello se empleó el método directo de enfrentamientos duales y el extracto crudo, con acetato de etilo, de la cepa A 3.1. Las pruebas se elaboraron por duplicado, se midió el diámetro de los halos de inhibición formados y se aplicó análisis de varianza de una vía con un nivel de confianza del 95,00%. Las 3 cepas aisladas (A 3.1, A 3.2 y B 3.1) mostraron una actividad antifúngica similar sobre todos los hongos aislados de rizósfera de *C. annuum* L., así como sobre los hongos fitopatógenos *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Trichoderma viride* y *Penicillium expansum*, utilizando el método directo de enfrentamientos duales, sin embargo, no se obtuvo inhibición del crecimiento de *T. viride* con el extracto crudo, con acetato de etilo, de la cepa A 3.1. El efecto antifúngico de las cepas bacterianas aisladas sugiere la presencia de posibles metabolitos, además, corrobora el potencial de la misma para el control biológico de los hongos fitopatógenos.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades ocasionadas por hongos fitopatógenos, causan pérdidas millonarias en la agricultura; además, algunos de ellos producen metabolitos secundarios que son tóxicos al consumidor (micotoxinas). Cada año, estos microorganismos patógenos de las plantas son responsables de la pérdida de 10,00 a 20,00% de la producción agrícola a nivel mundial, a pesar de los millones de dólares invertidos en productos químicos (fungicidas) para su control (McSpadden, 2001).

El uso de estos compuestos químicos o fungicidas ha sido restringido en muchos países debido a efectos carcinógenos, teratogénicos, de contaminación ambiental y otras consecuencias negativas sobre alimentos y humanos. Por otro lado, la aplicación intensa de estos productos sintéticos ha generado resistencia en los microorganismos fitopatógenos (Tripathi y Dubey, 2004). Los problemas ambientales causados por la utilización de biopesticidas representan una preocupación a nivel mundial, y las investigaciones relacionadas con alternativas básicas que guíen políticas de manejo de estas sustancias han sido infructuosas (Fraire *et al.*, 2003; Hernández *et al.*, 2007).

Desde los comienzos de la microbiología, se ha reconocido que el suelo está habitado por microorganismos, los cuales influyen de diversas maneras en la producción agrícola. En la mayoría de los casos, esta influencia es positiva, ya que participan en la descomposición de la materia orgánica, transformándola en sustancias asimilables para las plantas, oxidan los constituyentes minerales del suelo como el amonio y azufre, hasta nitratos y sulfatos, respectivamente. De igual forma, intervienen en la fijación del nitrógeno libre, en la producción de sustancias de crecimiento para las plantas y, además, tienen influencia en la formación de una estructura estable del suelo (Sulca, 2005). Entre los

microorganismos habitantes del suelo, los más abundantes son las bacterias, pues se les encuentra presentes en un rango aproximado de 10^6 a 10^8 células por gramo de suelo, lo que equivale a 10 000 kg/ha, aproximadamente, lo que representa el 5,00% del total de materia orgánica seca presente en el suelo. Con respecto a los hongos, dada su menor abundancia, pero mayor tamaño, constituyen la biomasa más significativa (Alexander, 1994), representando un 10,00 a 20,00% de la microbiota total, ésto es, aproximadamente, 10^5 a 10^6 células por gramo de suelo (Tate, 1995).

La cantidad de microorganismos a encontrar va a depender de muchos factores, como son: tipo de suelo, vegetación, contenido de humedad, tipo de labranza y fertilización (Killian *et al.*, 2001). Al hacer referencia al hábitat específico de hongos y bacterias, éstos se pueden encontrar adheridos a la superficie de las partículas de suelo como agregados o interactuando, específicamente, con las raíces de las plantas. La concentración de microorganismos por gramo de suelo que se encuentra alrededor de las raíces de las plantas, en la llamada rizósfera, es mucho mayor que en el resto del suelo; debido a los altos niveles de nutrientes que se encuentran en la zona que rodea a las raíces y que permiten el desarrollo de poblaciones microbianas (Lynch, 1990; Glick, 1995; Ranjeet *et al.*, 2002).

En 1904, Hiltner definió rizósfera como el volumen de suelo influenciado por la presencia de raíces de una planta viva, cuya extensión varía de acuerdo al tipo de suelo, la especie de planta, su edad, entre otros factores (Foster, 1988). En la rizósfera, la interacción entre los microorganismos y las raíces de las plantas es beneficiosa, considerándose ésta como una zona de amortiguación microbiológica, donde la microbiota sirve de protección a la planta frente a patógenos (Krupa y Dommergues, 1981). Se ha comprobado que algunos exudados rizosféricos pueden llegar a contener entre 10,00 y 44,00% del carbono asimilado, lo que contribuye a un incremento de las

poblaciones microbianas (Primavesi, 1984). La rizósfera es considerada como la mayor fuente de mantenimiento de endófitos (Hallmann *et al.*, 1997; Sturtz *et al.*, 2000; Compant *et al.*, 2005; Gray y Smith, 2005). Hoy en día, se conoce que las raíces de las plantas superiores no sólo mantienen un contacto fisicoquímico con el suelo, sino que también, en este último, se encuentran microorganismos con los que la planta sostiene una relación interdependiente, mutua y vital (Miller *et al.*, 1989).

Numerosos trabajos han sido realizados con el fin de identificar los microorganismos (hongos y bacterias) que habitan en las raíces de las plantas, destacándose, los estudios de Curl y Truelove (1986) quienes encontraron diferentes cepas de *Pseudomonas* presentes en la rizósfera de tomate en Alemania y México. Ogata y Zúñiga (2005) aislaron 4 cepas de rizobios, 2 pertenecientes al género de *Rhizobium* y 2 al género de *Bradyrhizobium*. Además se obtuvieron 3 cepas de *Azotobacter* sp, 8 de actinomicetos y 13 de *Pseudomonas* sp, provenientes de la rizósfera de tara (*Caesalpinia spinosa*), en suelos de Huánuco, Peru. En Colombia, García *et al.* (2009), identificaron los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Cunninghamella* y *Mucor*, todos formando parte de la rizósfera. Se estima que entre el 90,00 y el 95,00% de las plantas terrestres presentan micorrizas de forma habitual, las cuales son una relación simbiótica entre un hongo y las raíces de las plantas (Wang y Qiu, 2006).

Dada su abundancia, el componente microbiano del suelo es importante para la salud de los ecosistemas. Los procesos agrícolas, así como el manejo de los recursos vegetales, inciden sobre este componente, lo cual afecta tanto a su biodiversidad como a la densidad de las poblaciones microbianas implicadas, trayendo como resultado, a mediano y largo plazo, la pérdida de fertilidad de los suelos y una progresiva debilidad de las plantas (Olalde y Aguilera, 1998).

A nivel mundial, los fitopatógenos originan pérdidas muy elevadas por año en la agricultura, sin embargo, el daño que ocasionan no sólo se refiere a las pérdidas de producción económica, sino también a las pérdidas en la producción biológica, es decir, a la alteración que existe en el crecimiento y desarrollo de las plantas hospedantes atacadas por estos microorganismos (Lauzardo *et al.*, 2007). Entre los diversos microorganismos que atacan a las plantas, se encuentran virus, hongos, bacterias, nemátodos, fitoplasmas y viroides; siendo los hongos, el grupo que más enfermedades ocasionan, por lo tanto, sobre el que más investigación se ha realizado. Se conocen, aproximadamente, 8 000 especies de hongos que pueden causar enfermedades en las plantas. Una especie de hongo puede atacar a más de una especie de plantas superiores, y todas las plantas pueden ser infectadas y dañadas por más de una especie de hongo fitopatógeno (Rodríguez, 1996; Martínez *et al.*, 2009)

Los hongos fitopatógenos se encuentran ocasionando daño en todos los suelos de los ecosistemas y agroecosistemas del mundo. Algunos géneros y especies presentan una gran capacidad de adaptación y se encuentran ampliamente distribuidos, mientras que otros presentan características de adaptación más limitadas o bien son sumamente especializados, lo cual restringe su distribución. Esta capacidad adaptativa de los hongos fitopatógenos va a depender en gran medida del grado de relación que han desarrollado con sus plantas hospedantes, es decir, si son parásitos obligados, parásitos facultativos, o saprófitos facultativos. La cantidad de estudios e investigaciones en algunos grupos depende en gran parte de la importancia económica de los cultivos (Guigón *et al.*, 1995).

La importancia de los hongos fitopatógenos, no se limita sólo al daño que ocasionan en las plantas hospedantes, sino también debe considerarse el papel que juegan dentro de las cadenas tróficas y en las diversas relaciones que

establecen con otros microorganismos del suelo (Agrios, 1988; Lumsden, 1981). Pocos son los trabajos que se han realizado bajo un enfoque ecológico, sobre la relación fitopatógenos-plantas-hospedantes tanto en los sistemas naturales como en los agroecosistemas (Alexander, 1990; Augspurger, 1990; Harper, 1990), a nivel de poblaciones o de comunidades, y que analicen los cambios en su dinámica temporal y espacial debido a las diferentes actividades de perturbación y manejo de los sistemas (Dinoor y Eshed, 1990).

Dentro de los hongos fitopatógenos más incidentes, se encuentran especies de *Fusarium* y *Penicillium*, entre otros, las cuales son de gran relevancia por su capacidad de atacar diversos cultivos, por las representativas lesiones y el daño generado en la planta y su facilidad de propagación (Arias y Jerez, 2008).

El género *Trichoderma* está constituido por un grupo de hongos presentes en forma natural en casi todos los suelos y hábitats del planeta. Son Deuteromicetes pertenecientes al grupo de los Hifomicetes, y se caracterizan por desarrollarse rápidamente y emitir una gran cantidad de esporas. Se encuentran con frecuencia sobre la madera y tejidos vegetales en descomposición (Soriano, 2007). Además, por su capacidad de micoparasitar a otros hongos, este género ha sido uno de los más estudiados (Howell y Stipanovc, 1995). *T. viride* y *T. harzianum* pertenecen al grupo de cepas de *Trichoderma* que ejercen parasitismo necrotrópico. Se caracterizan por tener un comportamiento muy agresivo frente a un amplio rango de hongos fitopatógenos y debido a la capacidad de sobrevivir como saprófitos, pueden mantener colonizados, indefinidamente, una gran variedad de sustratos (Gachomo y Kotchoni, 2008).

Los hongos pertenecientes al género *Fusarium* están ampliamente distribuidos, tanto en suelos como en sustratos orgánicos. Este género presenta especies fitopatógenas, que causan grandes enfermedades, principalmente, en

los cereales, aunque también se ha encontrado afectando a otros vegetales y frutas (Izzeddin y Medina, 2011). Su importancia no se debe tan sólo a la pérdida de las cosechas, sino también a la elaboración de micotoxinas, las cuales pueden estar presentes en los cereales y sus productos, ocasionando síndromes de intoxicación en animales y humanos. Se considera a *F. moniliforme* como la especie productora de toxina de mayor prevalencia en las regiones templadas del hemisferio norte y se encuentra, habitualmente, en cereales cultivados en regiones templadas de América, Europa y Asia. Las toxinas más comunes elaboradas por especies del género *Fusarium* son la fumonisina y la zearalenona, pero se han encontrado otras especies produciendo moniliformina y tricotecenos (toxina T, vomitoxina) (Garcés *et al.*, 2001).

Algunas especies de *Fusarium* también causan podredumbre de la raíz, corona y tallo de las plantas y enfermedades de marchitamiento vascular sistémico, caracterizadas en primer lugar, por amarillamiento de las hojas basales que, posteriormente, se marchitan pero permanecen adheridas a la planta. Esta sintomatología va progresando produciendo necrosis vascular en las raíces principales y la base del tallo. Cuando se corta el tallo se observa el sistema vascular de color marrón (Manning *et al.*, 1973).

Las especies de *Penicillium* son considerados como contaminantes habituales de diferentes sustratos y presentan la capacidad de producir diversas micotoxinas, dentro de este género, *P. expansum* es considerada la especie productora, más importante de patulina, micotoxina que se ha encontrado en una amplia variedad de alimentos como distintos tipos de frutas (manzanas, albaricoques, melocotones, peras, uvas, entre otras) y derivados (jugos de frutas) y también en cereales y ensilados. Igualmente, presenta la capacidad de elaborar citrinina, la cual se ha detectado en algunos alimentos como el arroz, maíz, trigo y cebada (Soriano, 2007).

Algunas de las estrategias que se han implementado para el control de microorganismos productores de enfermedades en las plantas son, la rotación de cultivos, el retiro de soca y el uso de semillas libres de patógenos y/o tratadas con fungicidas; sin embargo, los resultados han sido poco satisfactorios. El desarrollo de plantas con resistencia genética, ofrece la mejor estrategia práctica y económica para el manejo de enfermedades; no obstante, la presencia de nuevas razas limita esta última estrategia. Otra alternativa para el control de enfermedades de plantas, es el control biológico utilizando microorganismos como hongos y bacterias (Hervas *et al.*, 1998).

El biocontrol con microorganismos antagonistas comenzó a ser investigado de forma constante a partir de los años 80, donde fue definido como “la acción de enemigos naturales o depredadores que mantienen las poblaciones de otros organismos a un nivel más bajo de lo que pudiera ocurrir en su ausencia”. Este se diferencia de otros tipos de control de plagas ya que actúa de forma densodependiente, esto es, los enemigos naturales se incrementan y destruyen gran parte de la población cuando la densidad de esta población aumenta (DeBach y Rosen, 1991).

Pérez *et al.* (2002), hacen una definición más reciente de control biológico en la cual expresan que “el control biológico es el uso de parasitoides, depredadores, patógenos, antagonistas y poblaciones competidoras para suprimir una población de plagas haciendo ésta menos abundante y, por tanto, menos dañina que en ausencia de éstos”, esta definición es bastante amplia e incluye todos los grupos de organismos con capacidad para mantener y regular poblaciones de organismos fitopatógenos, por lo tanto, todos pueden considerarse agentes de control biológico y estar incluidos en la categoría de enemigos naturales por ser considerados parásitos, depredadores o patógenos, entre otros.

Entre las ventajas del control biológico están, su bajo costo y que no

presenta problemas de residuos ni contaminación, la resistencia de las plagas al biocontrol es muy rara y reduce de manera sustancial el tratamiento con insecticidas (FAO, 1990; Guédez, 2009). Sin embargo, la mayoría de los resultados disponibles han sido obtenidos *in vitro* y bajo condiciones controladas. El éxito del control biológico es difícil de medir, desde el punto de vista ecológico, aunque puede considerarse un éxito cuando la especie introducida logra establecerse por sí misma sin dañar el ecosistema. Mientras tanto, desde el punto de vista de control de plagas, la única forma de medir el éxito es la economía (Bautista, 2006). En términos económicos, cuando hay beneficios, éstos son tan buenos como los ecológicos. Se ha calculado que existe un retorno aproximado por cada dólar invertido en biocontrol de fitopatógenos en relación 30:1, mientras que para el control químico la relación es de 5:1. Esta relación beneficio/costo para un control biológico exitoso demuestra ser muy alta, mostrando que los programas de control biológico son beneficiosos (Guédez *et al.*, 2008).

Alrededor del mundo, se han reportado ejemplos de control biológico, como es el caso del trabajo realizado por Sivamani y Gnanamanickam, en 1988, quienes emplearon *Pseudomonas fluorescens* para el control de la enfermedad del “mal de Panamá” en plátanos (*Musa* sp.), causada por *Fusarium oxysporum* en el sur de la India. Igualmente, Anuratha y Gnanamanickam (1990), realizaron una investigación utilizando cepas de *Bacillus* sp. y *P. fluorescens* como biocontrol de pudriciones provocadas por *Rhodococcus solanacearum* en plátano (*Musa* sp.), en la India y parte del pacífico sur.

Diversos autores han encontrado resultados favorables al aplicar rizobacterias como agentes de control biológico en otros sistemas planta-patógeno. Por ejemplo, Hernández *et al.* (2008) al aplicar las cepas de *P. fluorescens* al cultivo del frijol, lograron disminuir la cantidad de lesiones

provocadas por *Colletotrichum lindemuthianum*. Pujol *et al.* (2005), aplicaron la cepa de *P. fluorescens* para controlar los altos índices de afectación provocados por *Erwinia amylovora* en plantas de pera, obteniendo resultados satisfactorios.

Igualmente, Paredes *et al.* (2008) aislaron e identificaron cuatro cepas de la rizósfera de garbanzo (*Trichoderma lignorum*, *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens*) las cuales, posteriormente, presentaron actividad antagónica frente *Fusarium* sp. mostrando porcentajes de inhibición entre 27,30 y 76,80%.

En biotecnología, la aplicación de microorganismos rizosféricos es una alternativa a los quimiotóxicos que, además de ser altamente contaminantes y peligrosos a la salud, resultan ser costosos, principalmente, para países en vías de desarrollo (Anuratha y Gnanamanickam, 1990). Hasta ahora, se han empleado sustancias antimicrobianas de origen sintético para controlar patógenos postcosecha. No obstante, se ha demostrado que estos compuestos han causado resistencia en microorganismos, destacando los hongos que representan un potencial riesgo para la seguridad del medio ambiente y la salud humana (Guédez *et al.*, 2010).

Los microorganismos antagonistas son capaces de ejercer un efecto de control biológico sobre distintos patógenos de interés y son utilizados para prevenir o atacar diversas enfermedades en frutos y vegetales (Lauzardo *et al.*, 2007). Estos antagonistas se preservan ya que colonizan de forma benéfica generando cambios fisicoquímicos, proporcionando beneficios al hospedero y previniendo el crecimiento de microorganismos causantes de pudriciones. Algunas especies de *Pseudomonas* se encuentran entre las más estudiadas, debido a que son capaces de producir reguladores del crecimiento vegetal así como también metabolitos con efecto antagónico y represivo del crecimiento de patógenos en la rizósfera (Validov *et al.*, 2005). Barea *et al.* (1998), reportaron

que cepas de *Pseudomonas* productoras del antibiótico 2-4 diacetilfloroglucinol, incrementan la germinación y biomasa de las semillas de tomate. También este género constituye un excelente ejemplo de la combinación de múltiples mecanismos para ejercer un efectivo control biológico (Hass y Keel, 2003).

Smilanick y Denis (1992) y Janisciewicz y Korsten (2002) demostraron que una cepa de *Pseudomonas cepacia* era capaz de sintetizar la pirrolnitrina e inhibir el crecimiento de *P. expansum* y *Botrytis cinerea*, causantes de la pudrición agria en limones, manzanas y peras. Igualmente, *P. syringae* produce el compuesto nombrado siringomicina que inhibe la germinación de *P. digitatum* y controla las pudriciones ocasionadas por este hongo en varios cítricos (Bull *et al.*, 1998). Otros autores demostraron que una cepa de *Pseudomonas* tuvo una producción tres veces mayor de la enzima $\text{exo-}\beta$, 1-3 glucanasa en presencia de una suspensión de esporas de *Botrytis cinerea* (Jijakli y Lepoivre, 1998).

No se conoce en su totalidad el modo de acción antimicrobiano que poseen diversos antagonistas. Janisciewicz y Roitman (2000), describieron varios mecanismos involucrados en el biocontrol por antagonistas, la antibiosis, producción de enzimas líticas, parasitismo, inducción de resistencia y competencia por nutrientes y espacio. Sin embargo, estos autores mencionan que, por lo general, más de un mecanismo puede estar implicado en el biocontrol.

El pimentón, *Capsicum annum* L., es una solanácea perenne, cultivada todo el año en Venezuela, ocupa el cuarto lugar en relación a otras hortalizas. La producción nacional se incrementó de 43 290 a 82 994 toneladas durante el período 1994-2000. Su tasa de crecimiento tuvo un promedio de 12,80%, con una participación del 4,40% de la producción de hortalizas, raíces y tubérculos en el año 2000, siendo su producción para el año 2005 de 88 000 toneladas métricas (CCI, 2010).

En el estado Sucre, la agricultura intensiva incluye la horticultura con rubros como tomate, pimentón, berenjena, ají, entre otros, y requieren de uso intensivo de riego, maquinarias, fertilizantes y plaguicidas o fungicidas (CCI, 2010). La producción y la superficie sembrada ha disminuido en los últimos años; sin embargo, el rendimiento se ha incrementado, principalmente, por la utilización de materiales híbridos y por mejoras en el riego y fertilización (Anzola, 2007; FAO, 2010).

A pesar de esto, el problema que se diagnostica con mayor frecuencia en los cultivos de pimentón es la marchitez de la planta, enfermedad que puede presentarse en cultivos de cualquier edad y causar pérdidas de hasta un 100% en la cosecha. Los hongos *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp. y *Phytophthora capsici* han sido asociados con la marchitez del pimentón en muchos países (Pérez *et al.*, 2002; Escalona *et al.*, 2006). Igualmente, las bacterias *Ralstonia solanacearum* y *Erwinia caratovora* han sido aisladas de diversas especies de *Capsicum* (Fiori y Shaffino, 2004).

Frente a la necesidad de buscar nuevas alternativas a los quimiotóxicos, en cuanto a productos que puedan ser utilizados en los cultivos agrícolas, que puedan ejercer una buena acción antimicrobiana, garanticen un mínimo efecto sobre la salud y el ambiente, y además, sean de fácil alcance para los agricultores, donde los problemas generados por agentes biológicos son muchos y los recursos pocos; en Latinoamérica, se han venido realizando diferentes investigaciones sobre este tema, principalmente, en aquellas naciones donde la agricultura es un factor importante de su economía. En Venezuela, se han realizado diferentes trabajos en los cuales se han utilizado microorganismos rizosféricos para el control de hongos (Páez y Sanabria, 2007; Parra *et al.*, 2009).

De esta manera, el propósito del presente trabajo de investigación fue

evaluar la microflora fúngica y bacteriana existente en la rizósfera de plantas de pimentón (*Capsicum annuum* L.) cultivadas en “Puerto de la Madera”, Cumaná, estado Sucre, en la búsqueda de microorganismos con actividad antagónica *in vitro* contra hongos fitopatógenos, que puedan ser utilizados para tratar enfermedades agrícolas postcosecha.

METODOLOGÍA

Recolección de la muestra

Para la realización de este trabajo se recolectaron muestras de rizósfera de pimentón (*Capsicum annuum* L.) en una plantación ubicada en el sector Puerto de la Madera, en Cumaná, parroquia Santa Inés, municipio Sucre, estado Sucre, Venezuela, durante los meses de mayo y junio de 2011.

La recolección de las muestras se realizó siguiendo la técnica descrita por López y López (1990) en una parcela de aproximadamente 210 m². La parcela fue dividida en cinco unidades de muestreo de 42 m², cada una, las cuales consistieron en un conjunto de plantas, visualmente parecidas, con el mismo vigor, tiempo de desarrollo, ubicadas en el mismo tipo de suelo y a las que se les practicaron las mismas prácticas culturales. Se recolectaron dos plantas representativas de cada unidad de muestreo en cuanto a color, textura, tratamiento y cultivos (apéndice 1). Las muestras fueron tomadas utilizando la técnica en zig-zag.

Se tomaron muestras de rizósfera en plantas de pimentón visualmente sanas y en el mismo estadio de su desarrollo. Para ello, se removió la tierra cerca de la raíz de las plantas, cavando un área de 3 cm alrededor del tallo y hasta 10 cm de profundidad. Las raíces de las plantas se sacudieron suavemente para eliminar el suelo en exceso, quedando presente el suelo rizosférico y el del rizoplano (en contacto con la raíz) (López y López, 1990). Luego, cada muestra se colocó en bolsas estériles, por separado, y fueron transportadas al Laboratorio de Micología del Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente-Sucre (UDO-Sucre) para su posterior procesamiento.

Aislamiento de microorganismos rizosféricos de *Capsicum annuum* L.

Para el aislamiento de las cepas microbianas, se siguió el método descrito por Di Cello *et al.* (1997). Se agregaron 10 g de cada muestra de rizósfera en un erlenmeyer que contenía 90 ml de solución isotónica de cloruro de sodio (NaCl) al 0,85%; luego, fueron mezcladas en un mezclador (Precision Scientific) a 240 rpm durante 10 minutos. Seguidamente, se prepararon tubos con 9 ml de solución de NaCl al 0,85% y se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-4} (anexo 1).

Las siembras se realizaron por agotamiento en superficie. Se tomaron 100 μ l, de cada dilución y se dispensaron en placas de Petri con agar nutritivo (AN) y agar MacConkey (MCK) para el aislamiento y conteo total de bacterias Gram positivas y Gram negativas, respectivamente. De igual manera y con la misma finalidad, fue utilizado agar Sabouraud dextrosa (ASD) para el aislamiento de hongos. Todas las placas se incubaron a una temperatura de 30°C durante 24 horas para el cultivo de las bacterias y hasta 96 horas, para los hongos filamentosos. Pasado el tiempo de incubación, se procedió a realizar el recuento de colonias para establecer las unidades formadoras de colonias por gramo de peso seco (UFC/g).

Identificación morfológica y bioquímica de las bacterias

Las colonias bacterianas aisladas fueron caracterizadas morfológicamente según el color, consistencia, tamaño, margen y presencia de pigmento difusible. Se realizó coloración de Gram a cada colonia. Luego, se purificaron transfiriéndolas a placas con AN.

A todas las colonias aisladas se les realizó la prueba de la oxidasa (diclorhidrato de tetrametil -*p*- fenilendiamina 1,00%), y se siguieron los

esquemas y métodos para la identificación de bacterias Gram negativas y Gram positivas, descritas por Koneman *et al.* (1999) y McMenamin *et al.* (2000).

Identificación de las cepas fúngicas

Cada colonia fue sometida a un estudio de la morfología macro y microscópica para su identificación, mediante el método de preparados por disgregación, usando azul de lactofenol (Koneman *et al.*, 1999). También, se utilizó la técnica de microcultivo de Ridell, para observar las estructuras finas de la esporulación, con el propósito de que la manipulación no destruyera las estructuras y pudieran ser identificadas con mayor facilidad (Bonifaz, 2002). Posteriormente, se purificaron en tubos con ASD.

Determinación de la actividad antagónica de los microorganismos rizosféricos

Preparación del inóculo bacteriano

A partir de cepas reconstituidas en agar de tripticasa de soya (TSA) e incubadas por 48 horas a temperatura ambiente, se realizaron suspensiones en solución de NaCl al 0,85% por cada cepa aislada; esta suspensión se llevó a una absorbancia de 0,2 a 540 nm, equivalente a 10^8 células/ml.

Método de enfrentamientos duales

Se realizó la técnica de enfrentamiento dual (Guédez *et al.*, 2010) en placas de Petri con medio agar papa dextrosa (PDA), sembrando el inóculo de las bacterias antagonistas, preparado de la manera descrita anteriormente. Se realizó una siembra masiva de 100 μ l de la suspensión celular, la cual ocupó 2 cm del borde de la placa al centro. Posteriormente, se sembró un disco agar,

con cada uno de los hongos aislados de rizósfera de pimentón, a 3 cm del borde de la placa al centro, frente a la cepa antagonista. Como testigo, se sembró cada hongo por separado, en una sola placa, sin antagonista, como control (anexo 2).

Para proceder a realizar prueba de antibiosis en placa y la técnica de extracción de metabolitos activos, se escogieron las cepas bacterianas (A3.1, A3.2 y B3.1) que mostraron mayores porcentajes de inhibición micelial de hongos, las mismas fueron identificadas como *Pseudomonas fluorescens*.

Actividad antifúngica *in vitro* de *Pseudomonas fluorescens* contra hongos ambientales

Cepas fúngicas ambientales

Se utilizaron las cepas de *Fusarium solani*, *Fusarium moniliforme*, *Penicillium expansum* y *Trichoderma viride*, pertenecientes al cepario del Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas del Departamento de Bioanálisis, UDO-Sucre, las cuales fueron aisladas de muestras de diferentes ambientes. Estas cepas fueron conservadas en tubos con medio PDA hasta su posterior utilización.

Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* de las cepas de *P. fluorescens*

La prueba de antibiosis en placas, reportada por Orberá *et al.* (2009), fue la utilizada para determinar efecto antagónico de *P. fluorescens* sobre los hongos ambientales. Ésta consistió en preparar placas de Petri con PDA, las cuales se dividieron en cuatro cuadrantes por medio de un trazado de dos líneas perpendiculares a lo largo del diámetro que se interceptan en el centro de la placa. En la intersección de las líneas se sembró el hongo. Las bacterias se

inocularon a razón de 1 ml, a una concentración equivalente a 0,5 en la escala de McFarland, sobre las líneas, en cuatro puntos periféricos equidistantes, a 20 mm del centro de la placa. Además, se preparó un control consistente en la siembra del hongo en ausencia de bacterias. La incubación se realizó a temperatura ambiente y la observación y medición del crecimiento radial de las colonias se realizó cada 24 h durante 7 días (anexo 2). Las pruebas fueron realizadas por duplicado.

Cálculo del porcentaje de inhibición

El porcentaje de inhibición del antagonista se calculó utilizando el método reportado por Ezziyyani *et al.* (2004), mediante el cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los hongos (PICR), según la siguiente fórmula:

$$\text{PICR} = \frac{r_1 - r_2}{r_1} \times 100$$

donde:

r1= distancia de crecimiento del microorganismo patógeno.

r2= distancia de crecimiento del microorganismo patógeno frente al antagónico.

Producción y extracción de metabolitos de *Pseudomonas fluorescens*

La separación de metabolitos secundarios es un método que se estableció para la identificación de nuevas moléculas biológicamente activas. La preparación se basó en una separación biológica simple de extractos en fermentaciones microbianas. Para ello, se requirió, primeramente, de condiciones de crecimiento, lo cual promueve la síntesis de metabolitos

secundarios, y posteriormente, se utilizaron procedimientos de extracción química (Higgs *et al.*, 2001), ya que las cepas de *P. fluorescens* estudiadas presentaron un efecto inhibitorio similar, fue escogida, al azar, la cepa A 3.1, la cual fue sembrada en 6 placas con AN. Una vez crecida la bacteria, se procedió a cortar el medio en cuadros de 1 x 1 cm, aproximadamente, los cuales se agregaron en un erlenmeyer con 200 ml de caldo Luria-Bertani (LB) y fueron mezclados en mezclador por 72 horas. Transcurrido el tiempo, se filtró el caldo, luego fue centrifugado a 5 000 rpm por 20 min. El sobrenadante obtenido se acidificó con ácido sulfúrico (H₂SO₄) 4 mol/l hasta un pH 2 y luego, se mezcló con acetato de etilo al 80,00% en una proporción de 1:1,5. Se extrajo la fase orgánica, la cual fue esterilizada y mezclada con etanol en una proporción de 1:1,5. Luego, fue sometida a rotaevaporación donde se obtuvo un concentrado o extracto puro.

Actividad antifúngica *in vitro* del extracto metabólico de *Pseudomonas fluorescens* contra hongos ambientales

Los sobrenadantes obtenidos de *P. fluorescens* con los posibles metabolitos activos fueron enfrentados con los hongos filamentosos (ambientales), siguiendo la técnica de cilindro placa-cultivo (Mitidieri, 1998), modificada en el laboratorio.

Preparación de las suspensiones de conidios

Los cultivos de los hongos ambientales estudiados fueron subcultivados en tubos de ensayo con medio PDA e incubados a temperatura ambiente durante 5 días. Posteriormente, se preparó una suspensión de conidios, agregando 10 ml de solución NaCl 0,85% y se procedió a agitar vigorosamente para facilitar el desprendimiento de los conidios. La suspensión obtenida se filtró a través de una doble gasa estéril, eliminando de esta forma otras

estructuras fúngicas y obtener sólo conidios en la suspensión. Se determinó el número de conidios por ml de suspensión con el uso de una cámara de Neubauer y se ajustó la concentración a 10^6 conidios/ml (Rasooli *et al.*, 2008).

Determinación de la actividad antifúngica *in vitro* del extracto metabólico de *P. fluorescens*

Para la preparación del medio PDA con la suspensión de hongos ambientales, por cada 100 ml de medio PDA fundido y mantenido a 45°C en baño de María, se agregó 1,0 ml de la suspensión del inóculo previamente preparada, agitando suavemente el matraz, hasta homogeneizar la suspensión. Se dispusieron placas de Petri estériles para las suspensiones de cada hongo (ambiental) a probar. Se agregaron en forma aséptica, en cada placa, 25 ml del medio PDA inoculado y se dejó solidificar. Seguidamente, utilizando sacabocados de vidrio, de 6 mm de diámetro, se abrieron pozos en el agar, a cada uno de los cuales se agregó el extracto crudo del microorganismo con actividad antagónica. Para ello, se procedió a colocar, con ayuda de una micropipeta, 100 μ l del extracto de *P. fluorescens* en los pocitos respectivos. Se realizó un tratamiento control agregando a un pocito la mezcla etanólica y a otro H_2SO_4 . Se dejó difundir la sustancia activa durante 20 a 30 min, luego, se incubaron las placas durante 72 horas a temperatura ambiente, haciendo observaciones cada 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se midieron los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento del hongo ambiental, usando una regla graduada; los resultados fueron expresados en milímetros (Mitidieri, 1998).

Prueba de susceptibilidad antimicrobiana de *Pseudomonas fluorescens*

Se determinó la susceptibilidad frente a antimicrobianos en las cepas de *P. fluorescens* con actividad antifúngica, aisladas de la rizósfera de pimentón,

utilizando el método de difusión en disco (Bauer *et al.*, 1966), siguiendo las especificaciones del Instituto para estándares de Laboratorios Clínicos (CLSI, 2012). Para ello, se inocularon 4 ml de solución estéril de NaCl al 0,85% estéril, con 5 colonias de la cepa bacteriana y se incubaron a 35°C, hasta observar una turbidez ajustada al patrón 0,5 en la escala de McFarland (correspondiente a $1,5 \times 10^8$ UFC/ml); luego, se humedeció un hisopo estéril en la suspensión bacteriana, haciéndolo girar contra las paredes del tubo, se diseminó uniformemente en tres direcciones sobre la superficie de la placa con agar Mueller Hinton (MH), girando la placa, aproximadamente 60°. Se dejó secar durante 5 minutos, luego, se colocaron discos de antibióticos de la casa comercial OXOID: cefalixina (CL) 10 µl, amikacina (AN) 30 µl, aztreonam (ATM) 30 µl, oxaciclina (OX) 1 µl, 30 µl, ceftazidima (CAZ) 30 µl, imipenem (IPM) 10 µl, meropenem (MEM) 10 µl, piperacilina/tazobactam (TZP) 100/10 µl, ciprofloxacina (CIP) 5 µl, ceftriaxona (CRO) 30 µl, cefepima (FEP) 30 µl, cefoxitina (FOX) 30 µl, gentamicina (GM) 10 µl, trimetropin sulfametoxazol (SXT) 25 µl y ampicilina sulbactam (SAM) 20 µl, a una distancia de 15 a 20 mm entre los discos. Las placas se incubaron en aerobiosis, durante 24 horas a 37°C. Luego, se realizó la lectura de los diámetros de los halos de inhibición, alrededor de los discos de antibióticos, con una regla milimetrada.

Las medidas obtenidas se correlacionaron con las tablas de referencia del CLSI (2012), las cuales permitieron interpretar el comportamiento de las cepas frente a los antibióticos probados, según los halos de inhibición, como sensible (S) y resistente (R).

Control de calidad

Para el control de calidad de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, se utilizaron las cepas certificadas pertenecientes al Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM), Caracas, Venezuela:

Escherichia coli CVCM 765, *Pseudomonas aeruginosa* CVCM 938.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados y representados en tablas y figuras. Las pruebas se realizaron por duplicado, con el fin de controlar las diferencias en los efectos antifúngicos, se midió el diámetro de los halos de inhibición formados y se aplicó análisis de varianza (ANOVA) de una vía con un nivel de confianza del 95% (Jiménez, 2000). Para ello, se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 15.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago IL, USA).

RESULTADOS

La figura 1 refleja la distribución porcentual de las especies bacterianas aisladas de la rizósfera de plantas de pimentón (*Capsicum annum* L.), la cual muestra que la mayor frecuencia de aislamiento fue para *Enterobacter cloacae* (18,70%).

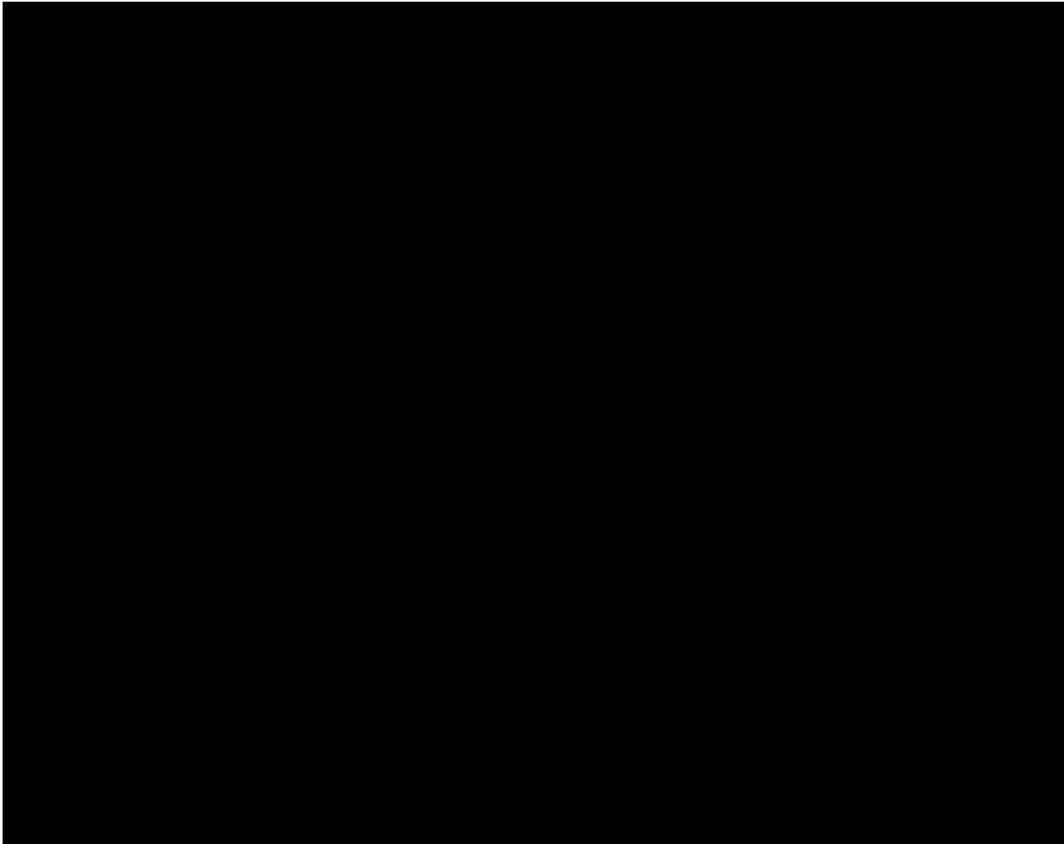


Figura 1: Frecuencia de aislamientos de bacterias en rizósfera de de pimentón (*Capsicum annum* L.) en Puerto de la Madera, Cumaná, estado Sucre. Mayo-junio de 2010.

De las especies de hongos encontradas, *Cunninghamella* sp. (21,00%), *Aspergillus glaucus* (15.00%) y *Mucor* sp.(15,00%) fueron las que se aislaron con mayor frecuencia (figura 2). En general, la mayoría de las especies aisladas de la rizósfera pertenecen al género *Aspergillus* (43,00%).

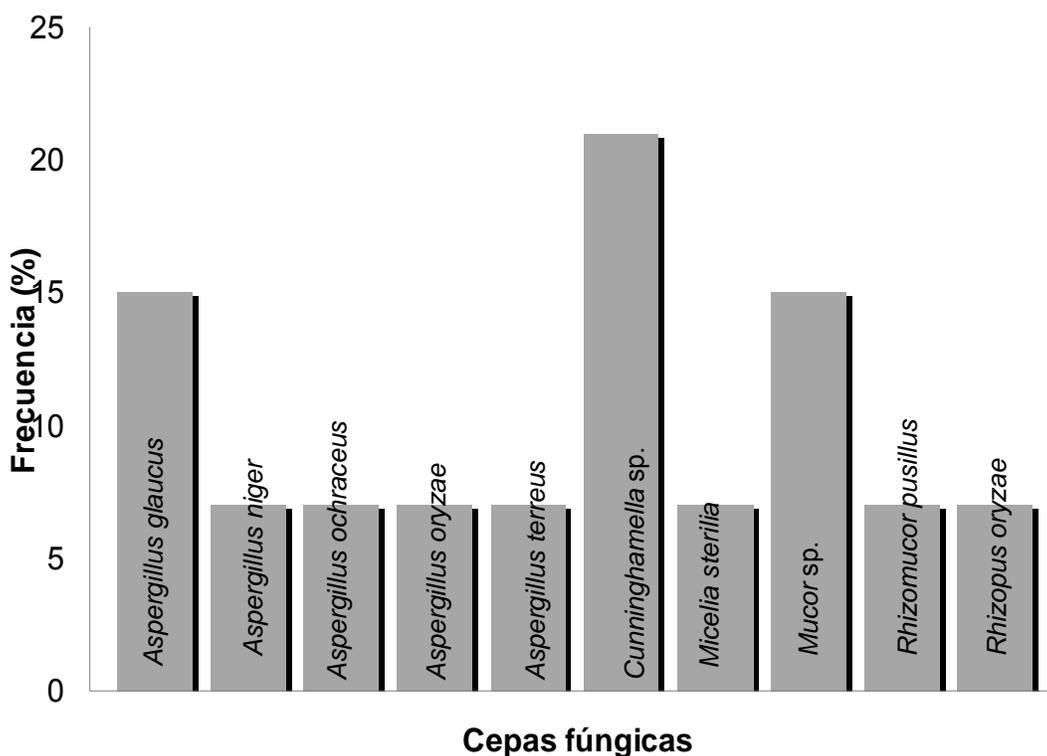


Figura 2. Frecuencia de aislamientos de hongos filamentosos en rizósfera de pimentón (*Capsicum annum* L.) en Puerto de la Madera, Cumaná, estado Sucre. Mayo-junio de 2010.

En la tabla 1 se reflejan los niveles poblacionales de los géneros bacterianos presentes en la rizósfera de pimentón (*Capsicum annum* L.) y el porcentaje de colonización bacteriana en las 5 unidades de muestreo estudiadas. De las especies bacterianas encontradas destacaron, con el mayor porcentaje de UFC/g, *Pseudomonas fluorescens* (35,20%), seguido por *Enterobacter cloacae* (15,60%) y *Acinetobacter sp.* (13,70%).

A su vez, los niveles poblacionales de los géneros fúngicos aislados y la flora fúngica total son presentados en la tabla 2, donde se muestra el predominio de *Cunninghamella sp.* (22,30%), seguido de *Mucor sp.* (14,80%) y de *Aspergillus glaucus* (14,80%) en las 5 unidades de muestreo.

Tabla 1. Recuento de unidades formadoras de colonias bacterianas por gramo de peso seco (UFC/g) aisladas de rizósfera de pimentón (*Capsicum annum* L.) en 5 unidades de muestreo. Puerto de la Madera, Cumaná, estado Sucre. Mayo-junio de 2010.

Bacterias	Recuentos de UFC/g					TOTAL	
	1	2	3	4	5	UFC/g	%
Acinetobacter sp.	3x10 ⁵	4x10 ⁵	-	-	-	7x10 ⁵	13,7
Bacillus sp.	-	-	2x10 ⁵	2x10 ⁵	-	4x10 ⁵	7,8
Citrobacter koseri	1x10 ⁵	-	-	2x10 ⁵	-	3x10 ⁵	5,9
Enterobacter cloacae	2x10 ⁵	3x10 ⁵	-	-	3x10 ⁵	8x10 ⁵	15,7
Klebsiella sp.	-	3x10 ⁵	-	-	1x10 ⁵	4x10 ⁵	7,8
Pantoea agglomerans	-	2x10 ⁵	-	-	2x10 ⁵	4x10 ⁵	7,8
Pseudomonas fluorescens	-	-	18x10 ⁵	-	-	18x10 ⁵	35,4
Sphingomonas sp.	-	1x10 ⁵	-	-	2x10 ⁵	3x10 ⁵	5,9
Total flora	6x10 ⁵	13x10 ⁵	20x10 ⁵	4x10 ⁵	8x10 ⁵	51x10 ⁵	100

UFC/g: unidades formadoras de colonias por gramo de peso; %: porcentaje; 1, 2, 3, 4 y 5: zonas de muestreo. ANOVA p>0,05.

Tabla 2. Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC/g) y porcentaje de colonización fúngica por gramo de peso seco, de rizósfera de pimentón (*Capsicum annum* L.) en Puerto de la Madera, Cumaná, estado Sucre. Mayo-junio de 2010.

Hongos	Recuentos de UFC/g					TOTAL	
	1	2	3	4	5	UFC/g	%
<i>Aspergillus glaucus</i>	3x10 ⁵	-	-	1x10 ⁵	-	4x10 ⁵	14,8
<i>Aspergillus niger</i>	-	1x10 ⁵	-	-	-	1x10 ⁵	3,7
<i>Aspergillus ochraceus</i>	-	-	2x10 ⁵	-	-	2x10 ⁵	7,4
<i>Aspergillus oryzae</i>	-	-	-	-	2x10 ⁵	2x10 ⁵	7,4
<i>Aspergillus terreus</i>	-	-	-	2x10 ⁵	-	2x10 ⁵	7,4
<i>Cunninghamella</i> sp.	2x10 ⁵	2x10 ⁵	-	-	2x10 ⁵	6x10 ⁵	22,2
<i>Micelia sterilia</i>	-	-	-	-	3x10 ⁵	3x10 ⁵	11,1
<i>Mucor</i> sp.	2x10 ⁵	-	2x10 ⁵	-	-	4x10 ⁵	14,8
<i>Rhizomucor pusillus</i>	-	2x10 ⁵	-	-	-	2x10 ⁵	7,4
<i>Rhizopus oryzae</i>	-	-	1x10 ⁵	-	-	1x10 ⁵	3,7
Total flora	7x10 ⁵	5x10 ⁵	5x10 ⁵	3x10 ⁵	7x10 ⁵	27x10 ⁵	100

UFC/g: unidades formadoras de colonias por gramo de peso; %: porcentaje. ANOVA p>0,05.

Las características bioquímicas y la identificación de las 18 cepas bacterianas aisladas, son presentadas en la tabla 3. A cada bacteria le fue asignado un código al azar para facilitar su estudio. El análisis de los resultados de las pruebas bioquímicas utilizadas demostró que los aislamientos A 3.1, A 3.2 y B 3.1, los cuales presentaron el mayor efecto antagónico, pertenecen a la especie *Pseudomonas fluorescens*.

Tabla 3. Características bioquímicas de las cepas bacterianas aisladas de rizósfera de pimentón (*Capsicum annum* L.) en Puerto de la Madera, Cumaná, estado Sucre. Mayo-junio de 2010.

Cepa	K	C	M	Mot	I	O	A	L	RM	OX	Identificación
A 1.1	+/-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	<i>Citrobacter koseri</i>
A 2.1	+/-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	<i>Pantoea agglomerans</i>
A 3.1	-/-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ACT (-)
A 3.2	-/-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ACT (-)
A 5.1	+/-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	<i>Pantoea agglomerans</i>
B 1.1	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Acinetobacter</i> sp.
B 1.2	+/-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	<i>Enterobacter cloacae</i>
B 2.1	+/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Klebsiella</i> sp.
B 2.2	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Acinetobacter</i> sp.
B 2.3	+/-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	<i>Enterobacter cloacae</i>
B 3.1	-/-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ACT (-)
B 3.2	+/-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	<i>Sphingomonas</i> sp. (Esculina +)
B 4.1	+/-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	<i>Citrobacter koseri</i>
B 4.2	+/-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	<i>Sphingomonas</i> sp. (Esculina +)
B 5.1	+/-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	<i>Enterobacter cloacae</i>
B 5.2	+/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Klebsiella</i> sp.
C 2.1	N	+	N	N	N	N	N	N	N	N	<i>Bacillus</i> sp. *
C 5.1	N	+	N	N	N	N	N	N	N	N	<i>Bacillus</i> sp. *

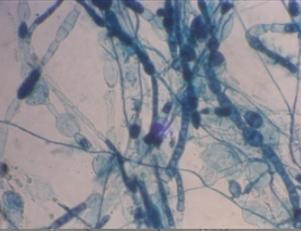
K: kligler; C: citrato; M: manitol; Mot: motilidad; I: indol; O: ornitina; A: alanina; L: lisina; RM: rojo metilo; OX: oxidasa; ACT: acetamida.*: Bacterias Gram positivas que presentaron hemólisis en agar Sangre.

La tabla 4 muestra las características principales y microfotografías de las catorce cepas fúngicas aisladas de la rizósfera de pimentón (*Capsicum annum* L.). Para facilitar el manejo de cada cepa fúngica, a cada hongo se le asignó un código al azar.

Tabla 4. Características fotomicrográficas de las cepas fúngicas aisladas de rizósfera de pimentón (*Capsicum annum* L.) en Puerto de la Madera, Cumaná, estado Sucre. Mayo-junio. 2010.

Especie	Características principales	
<i>Aspergillus glaucus</i>	Conidióforos hialinos; vesículas globosas; conidios redondas, rugosos y agrupados en cadena.	
<i>Aspergillus niger</i>	Conidióforos lisos y rugosos; vesícula globosa, conidios amarillos y marrón oscuro.	
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Conidióforos vesiculares; conidios abundantes y relativamente grandes.	
<i>Aspergillus oryzae</i>	Conidióforo de pared rugosa; vesículas globosas; conidios redondos y elípticos de paredes lisas.	
<i>Aspergillus terreus</i>	Vesículas pequeñas en forma de cápsula, fialides biseriadas; conidios lisos, elípticos, en cadenas largas.	

Tabla 4. Continuación.

Especie	Características principales	
<i>Mycelia sterilia</i>	Hifas septadas, hialinas, paredes lisas.	
<i>Mucor sp.</i>	Esporangióforas largas sin ramificar, tallos cortos ramificados (simpodial); esporangios color marrón; esporangioportas elipsoidales de paredes lisas.	
<i>Rhizomucor pusillus</i>	Esporangios oscuros, redondos; rizoides cortos y finos, esporangióforo de color marrón, ramificado; esporangiosporas pequeñas, incoloras, lisas y redondas.	
<i>Rhizopus oryzae</i>	Micelio cenocítico; esporangióforo no ramificado en cuya base se sitúan los rizoides; esporangios esféricos; columela subesférica.	
<i>Cunninghamella sp.</i>	Esporangióforo de tallo largo; vesícula grande, redondeada que terminan en vesículas más pequeñas con tallos cortos; esporangiosporas ovaladas, lisas.	

Los resultados de los enfrentamientos entre bacterias y hongos aislados de la rizósfera de *Capsicum annum* L., utilizando el método de enfrentamientos duales en medio PDA, se presentan en la tabla 5. La inhibición del crecimiento

Tabla 5. Enfrentamiento *in vitro* de bacterias y hongos aislados de (*Capsicum annum* L.) en Puerto de la Madera, Cumaná, estado Sucre. Mayo-junio de 2010.

Bacterias	Hongos													
	F 1.1	F 1.2	F 1.3	F 2.1	F 3.1	F 4.1	F 4.2	F 5.1	F 5.2	F 6.1	F 6.2	F 7.1	F 7.2	F 7.3
B 1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 1.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 2.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 2.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 2.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 3.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B 3.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 4.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 4.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 5.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 5.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A 1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A 2.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A 3.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A 3.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A 5.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 2.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 5.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: hubo inhibición; -: no hubo inhibición

más importante, fue demostrado por las cepas bacterianas A 3.1, A 3.2 y B 3.1 (figura 3), identificadas como *Pseudomonas fluorescens*, las cuales inhibieron el crecimiento micelial de todos los hongos rizosféricos aislados de *Capsicum annum* L.

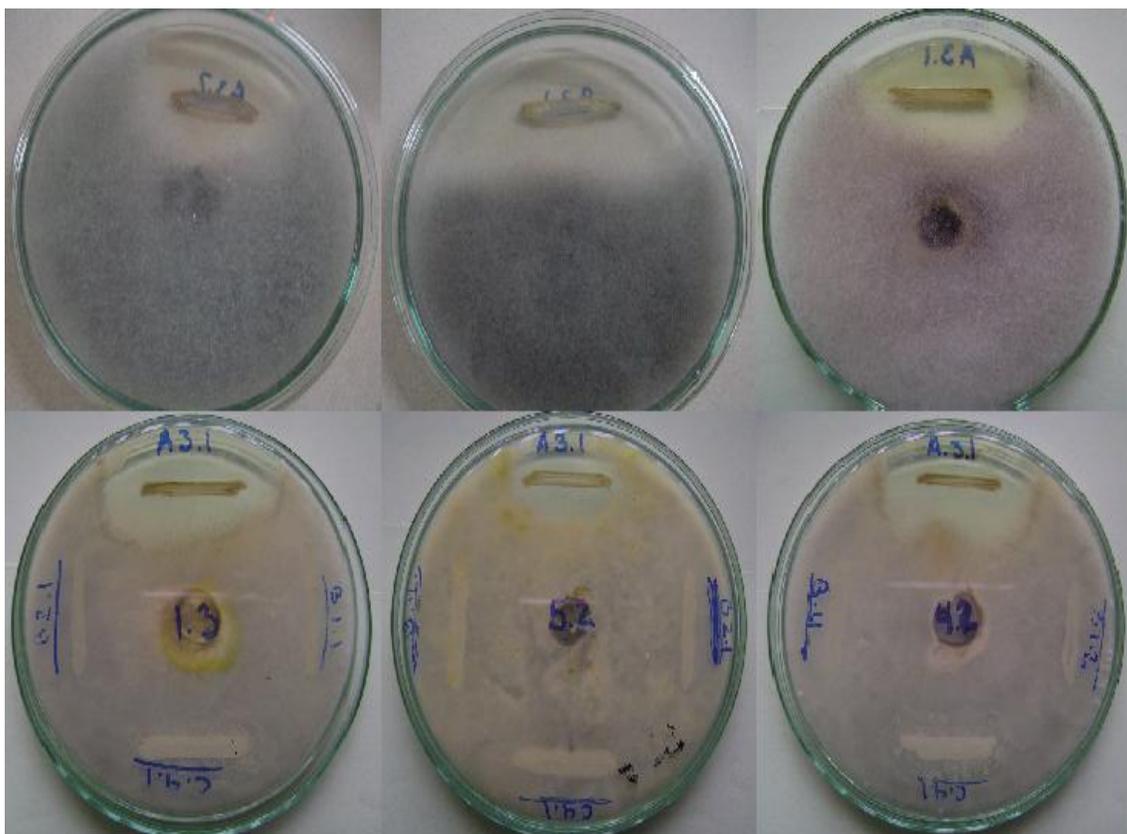


Figura 3. Enfrentamientos duales de *Pseudomonas fluorescens* frente a diferentes hongos rizosféricos aislados de pimentón (*Capsicum annum* L.) en Puerto de la Madera, Cumaná, estado Sucre. Mayo-junio de 2010.

Las cepas de *Pseudomonas fluorescens* presentaron efecto antagónico frente a los tres hongos ambientales que enfrentaron, mostrando halos de inhibición bien definidos, los cuales fueron medidos y reflejados en la tabla 6. *Pseudomonas fluorescens* presentó entre un 46,00 y 85,00% de porcentaje de inhibición sobre los hongos fitopatógenos, ejerciendo mayor antibiosis sobre *Fusarium moniliforme*.

Tabla 6. Porcentaje de inhibición del desarrollo micelial de *Fusarium solani*, *Trichoderma viride* y *Penicillium expansum* por diferentes cepas de *Pseudomonas fluorescens* (A 3.1, A 3.2 y B 3.1) aislados de rizósfera (*Capsicum annum* L.) en Puerto de la Madera, Cumaná, estado Sucre. Mayo-junio de 2010.

Cepas	Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (%)		
	A 3.1	A 3.2	B 3.1
<i>F. solani</i>	46	46	53
<i>F. moniliforme</i>	85	78	85
<i>T. viride</i>	62	62	60
<i>P. expansum</i>	56	60	60

ANOVA $p > 0,05$; %: porcentaje.

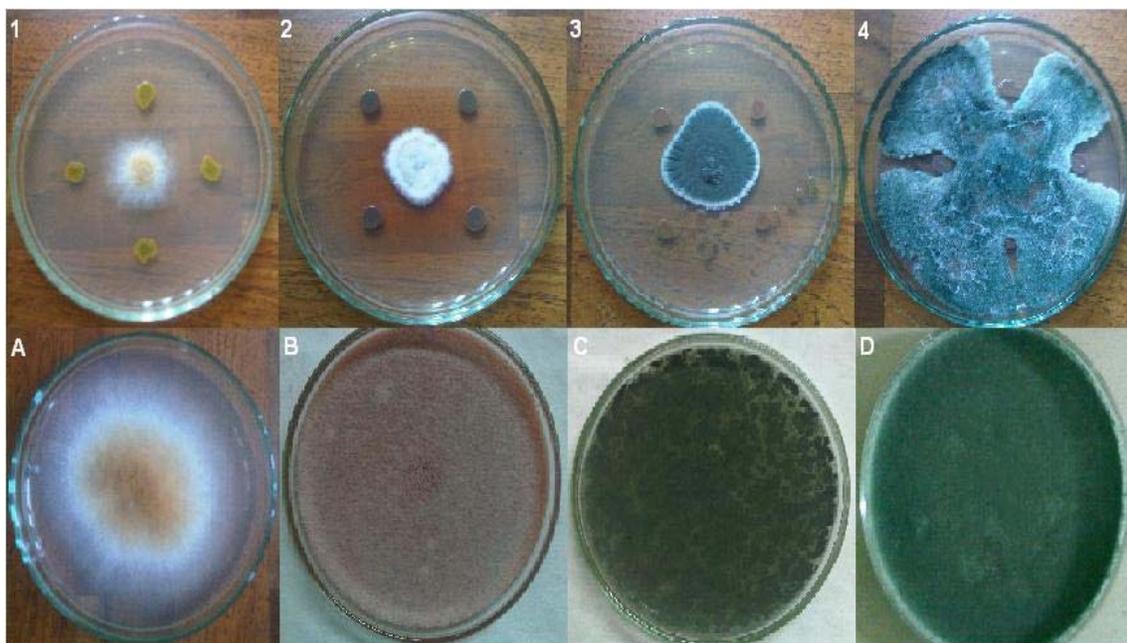


Figura 4. Comparación entre los enfrentamientos duales de *Pseudomonas fluorescens* ante *Fusarium moniliforme* (1), *Fusarium solani* (2), *Penicillium expansum* (3) y *Trichoderma viride* (4) frente a los controles de cada hongo fitopatógeno (A, B, C y D) respectivamente.

El efecto antagónico del extracto de *P. fluorescens* se muestra en la tabla 7, destacando que sólo con el extracto puro y la primera dilución se logró inhibir el crecimiento micelial de *Fusarium solani*, *Fusarium moniliforme* y *Penicillium expansum*; sin embargo, contra *Trichoderma viride*, no se obtuvo inhibición del crecimiento fúngico con el extracto.

Tabla 7. Actividad inhibitoria del extracto de *Pseudomonas fluorescens* (A 3.1) y controles sobre *Fusarium solani*, *Trichoderma viride* y *Penicillium expansum*.

Cepas	Diámetro promedio del halo de inhibición (mm)					
	EP	dil 1/2	dil 1/4	Ac Et	Et	H ₂ SO ₄
<i>F. solani</i>	35	15	-	-	-	-
<i>F. moniliforme</i>	50	21	-	-	-	-
<i>T. viride</i>	-	-	-	-	-	-
<i>P. expansum</i>	25	11	-	-	-	-

EP: extracto puro; dil: diluciones; Ac Et: acetato de etilo; Et: etanol; H₂SO₄: ácido sulfúrico ANOVA p>0,05

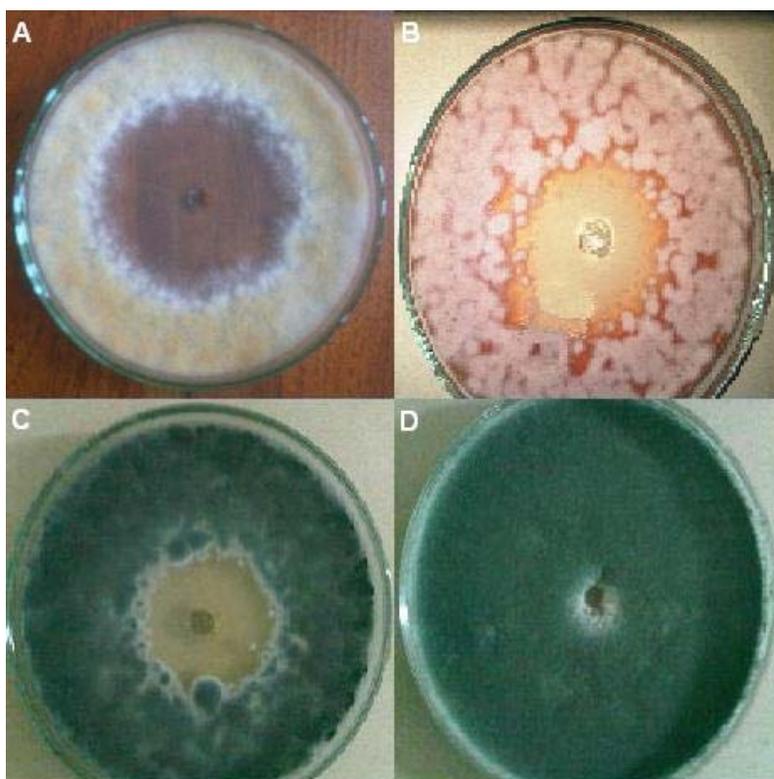


Figura 5. Enfrentamientos duales de extracto metabólico de *Pseudomonas fluorescens* ante *Fusarium moniliforme* (A), *Fusarium solani* (B), *Penicillium expansum* (C) y *Trichoderma viride* (D).

En la tabla 8, se observan los resultados de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana, *in vitro* en *P. fluorescens*, éstos demuestran que presenta resistencia frente a ceftriaxona, cefalixina, cefoxitina, ampicilina-sulbactam, oxacilina, y trimetropin-sulfametoxazol.

Tabla 8. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de *Pseudomonas fluorescens* (A 3.1).

Antibióticos	Halos de inhibición promedio (mm)	
	Sensible	Resistente
Amikacina	20	-
Ampicilina- sulbactam	-	6
Aztreonam	30	-
Cefalexina	-	12
Cefepima	25	-
Cefoxitin	-	6
Ceftriaxona	-	6
Ceftazidima	25	-
Ciprofloxacina	35	-
Gentamicina	12	-
Imipenem	20	-
Meropenem	22	-
Oxacilina	-	12
Piperaciclina- tazobactam	30	-
Trimetropin- sulfametaxol	-	6

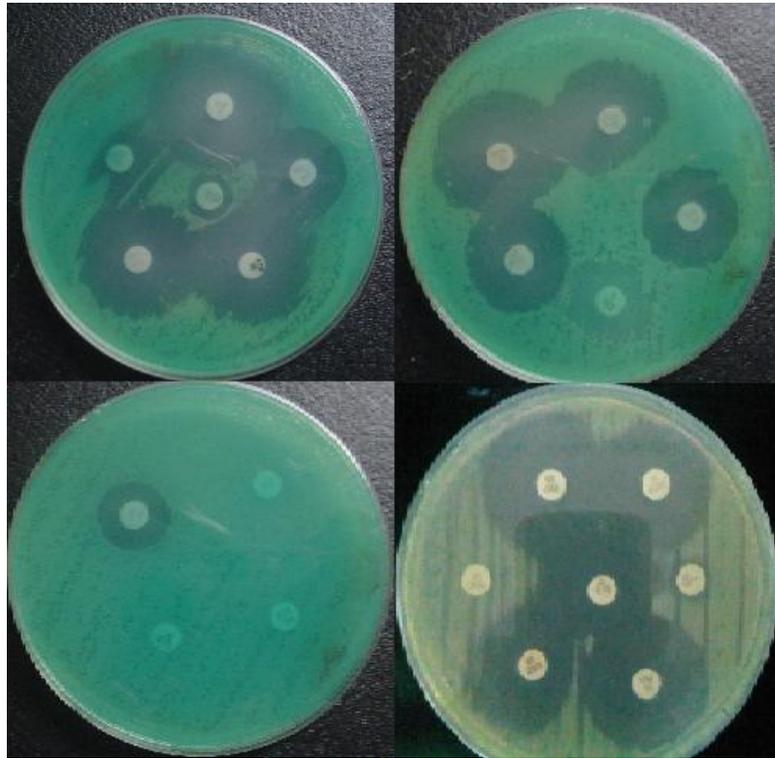


Figura 6. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de *Pseudomonas fluorescens*.

DISCUSIÓN

El análisis de la disposición de la comunidad bacteriana de la rizósfera de pimentón (*Capsicum annum* L.) en Puerto de la Madera, Cumaná, estado Sucre, demostró que en este espacio se encuentran varios microorganismos de distintos géneros bacterianos, donde, *Enterobacter cloacae* constituye una población dominante con relación a las demás bacterias. Este resultado concuerda con Schoebitz (2006), quien afirma en su estudio que dentro de la familia *Enterobacteriaceae* existen varias especies que se encuentran comúnmente asociadas a las raíces de las plantas, entre ellas, *Enterobacter cloacae*, la cual es uno de los rizobios aislados con mayor frecuencia.

En cuanto a la cantidad de unidades formadoras de colonias y porcentaje de colonización de las bacterias (tabla 3), *Pseudomonas fluorescens* fue el microorganismo dominante y es frecuente que constituya poblaciones sobresalientes en la rizósfera de este cultivo, debido a que poseen un corto período de latencia, rápida velocidad de crecimiento y metabolismo versátil, además de producir una amplia gama de metabolitos secundarios, lo que permite asociarse frecuentemente a las raíces de las plantas y multiplicarse con facilidad (Hernández *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2004; Loredó *et al.*, 2004).

En investigaciones similares, Pérez *et al.* (2001), aislaron *Pseudomonas* fluorescentes de suelos uruguayos y la población encontrada varió entre 6×10^4 y 1×10^6 UFC/g de suelo. Asimismo, Soroa *et al.* (2009), al caracterizar la rizósfera de gerbera reportó el predominio de *Pseudomonas* sobre otros géneros alcanzando el 30,00% del total de UFC, corroborando el resultado obtenido en esta investigación. De la misma manera, Hernández *et al.* (2008), en la rizósfera de distintos cultivos en tres localidades edafoclimáticas diferentes, reportó que *Pseudomonas* constituye el género más común en las tres localidades. Rodríguez y Martín (2009), en su estudio de aislamiento y

selección de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal y con capacidad antagonica, hallaron que *Pseudomonas* predominaba en las raíces de las plantas.

El estudio de la población de hongos aislados de la rizósfera de pimentón, reflejó que *Aspergillus* constituye el género dominante, encontrándose 5 especies ampliamente distribuidas en toda la zona muestreada. De Sousa *et al.* (2003) estudiaron, de forma similar, la flora fúngica perteneciente a la rizósfera de girasol y hallaron que el género *Aspergillus* fue el más frecuente. *Cunninghamella* fue el género codominante y esto es avalado por Arenas *et al.* (2005) quien en su estudio de hongos rizosféricos encontró una alta frecuencia de *Cunninghamella* en plantaciones de frijol. El género *Aspergillus* junto a *Mucor* y *Rhizopus*, son considerados con alta capacidad saprofitica competitiva y abundantes en los suelos, a nivel mundial (Domsch *et al.*, 1980)

El porcentaje de colonización y el recuento de unidades formadoras de colonias de los hongos también estuvieron dominados por el género *Aspergillus*, seguido de *Cunninghamella*. Se confirma que *Aspergillus* es un género que está distribuido en el ambiente, al igual que *Cunninghamella*, y eso se pudo correlacionar con los resultados de Jiménez *et al.* (2009), quienes aislaron diferentes especies de *Aspergillus* de la rizósfera de plantas de ajo, en el estado Lara. Noveriza y Quimio (2004), señalaron que de todos los hongos aislados de rizósfera de pimienta negra, el más abundante de los pertenecientes a la subdivisión *Zygomycotina* fue el género *Cunninghamella*. A pesar de esto, la distribución fue homogénea y gran parte de los hongos encontrados son los mas comúnmente aislados en suelos tropicales, de acuerdo a los resultados obtenidos en investigaciones realizadas por Pfenning y Abreu (2006), sobre microorganismos comunes en suelos tropicales.

Investigaciones realizadas por Zehnder *et al.* (2001), Srivastava (2009), Izzeddin y Medina (2011), han demostrado que *Pseudomonas fluorescens* posee actividad antagónica frente a hongos fitopatógenos. Esta propiedad ha determinado que los investigadores se interesen por esta bacteria como posible agente de control biológico, para inhibir el desarrollo de hongos patógenos humanos (De Sousa, 2002). En la presente investigación se demostró la actividad antagónica de *P. fluorescens* contra los hongos fitopatógenos estudiados.

Pseudomonas fluorescens se encuentra dentro del grupo de las *Pseudomonas* fluorescentes, son bacterias Gram negativas, no entéricas, aerobias, en forma de bacilos rectos o ligeramente curvos, son no fermentadores y móviles, que pertenecen a las glico-proteobacterias (Galli *et al.*, 1992). Son comunes habitantes de la tierra, el agua y la filósfera pero predominantes en la rizósfera de plantas, debido a la exudación de ácidos orgánicos, azúcares y aminoácidos (Lugtenberg y Dekkers, 1999). *Pseudomonas* fluorescentes son el grupo más prometedor de las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR) que participan en el biocontrol de enfermedades ocasionadas por fitopatógenos (Rodríguez y Martín, 2009).

Este grupo de bacterias también incluye algunos patógenos y biodegradadores, además, son saprofiticos y habitantes típicos de los suelos agrícolas y de campo, rizósfera de plantas y, además, están involucradas en varias interacciones con las plantas (Schroth *et al.*, 2006). Son capaces de utilizar los exudados de muchos vegetales como nutrientes y son conocidas por poseer características importantes como la capacidad de adherirse a las partículas del suelo y del rizoplano, la motilidad y prototrofia (Lugtenberg *et al.*, 1999). Los miembros del género *Pseudomonas* tienen requerimientos nutricionales simples y crecen bien en condiciones normales en poblaciones

mixtas, con otros tipos de microorganismos (Foster, 1988). Ellos poseen diversidad metabólica y funcionalmente son capaces de promover el crecimiento de plantas, de manera directa, por la solubilización del fósforo, el secuestro del hierro para las plantas a través de sideróforos, la producción de fitohormonas (Salisbury, 1994; Ayyadurai *et al.*, 2006, Ravindra y Sakthivel, 2006; Ravindra *et al.*, 2008), y la reducción de los niveles de etileno en la planta (Glick, 1995; Glick *et al.*, 1999), e indirectamente, por la supresión de microorganismos patógenos a través de la producción de antibióticos (Thomashow *et al.*, 1990; Ravindra y Sakthivel, 2006; Ayyadurai *et al.*, 2007, Ravindra *et al.*, 2008, Jha *et al.*, 2009), la reducción de hierro disponible a los fitopatógenos de la rizósfera (Scher y Baker, 1982), síntesis de enzimas de degradación de la pared celular de hongos, y competencia con los microorganismos patógenos en las raíces de las plantas. Además, *Pseudomonas* fluorescentes son capaces de inducir una resistencia sistémica en plantas contra diferentes fitopatógenos (Van Loon *et al.*, 1998). Todas estas características hacen que estas bacterias sean una alternativa como agentes de control biológico (Pieterse *et al.*, 2001).

El grupo de *Pseudomonas* fluorescentes comprenden *P. aeruginosa*, la especie tipo del género; *P. aureofaciens*, *P. chlororaphis*, *P. putida* (dos biotipos), *P. fluorescens* (cuatro biotipos), y las especies patógenas de plantas *P. cichorii* y *P. syringae* (Leisinger y Margraff, 1979). Las cepas de *Pseudomonas* se caracterizan sobre la base de sus propiedades nutricionales, así como por otras características fenotípicas de las especies (Stainer *et al.*, 1966). *P. fluorescens* biovar III ha sido reportado como grupo dominante entre las *Pseudomonas* fluorescentes asociada a la rizósfera del arroz, el alimento más importante los cultivos del mundo (Sakthivel y Gnanamanickam, 1989). *P. fluorescens* biovar V constituye más del 75% de *Pseudomonas* fluorescentes al menos en algunas áreas del mundo (Barrett *et al.*, 1986) y representan el grupo predominante en suelos de Australia y la rizósfera del trigo (Sands y Rovira,

1971). *P. putida* representa casi el 90% de los *Pseudomonas* fluorescentes en Colombia (Hernández *et al.* 1986). Por lo tanto, la diversidad microbiana entre *Pseudomonas* fluorescentes de diferentes orígenes geográficos es extensa y de este grupo de bacterias se presentan una gran variedad de mecanismos que median el control biológico de patógenos y la promoción del crecimiento.

Entre los mecanismos de control biológico mediados por *P. fluorescens* ampliamente reconocidos se encuentran: la competencia por un nicho ecológico o sustrato (Matiru y Dakora, 2004); la producción de sideróforos que, al secuestrar el hierro, quedarían no disponibles para el fitopatógeno (De Sousa *et al.*, 2003); la producción de distintos metabolitos de naturaleza antibiótica, como el 2,4-diacetilfluoroglucinol, el ácido fenazin-1-carboxílico, la pyoluteorina y la pyrrolnitrina (Mirleau *et al.*, 2001; Landa *et al.*, 2002); la producción de enzimas celulares que degradan la pared de los hongos (Lim *et al.*, 1991; Nielsen *et al.*, 1998; Nielsen *et al.*, 1999; Ellis *et al.*, 2000), así como la inducción de resistencia sistemática en la planta (Ryu *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos en este estudio evidencian que las cepas pertenecientes al complejo *P. fluorescens*, aisladas de la rizósfera de *Capsicum annum* L. (A 3.1, A 3.2 y B 3.1), inhibieron el crecimiento de *T. viride*, *F. moniliforme*, *F. solani* y *P. expansum*, a través de la producción de compuestos antifúngicos difusibles en el medio, y además, probablemente la producción de sideróforos no esté implicada en el antagonismo de las cepas bacterianas ya que no se observó asociación entre la presencia de halos de inhibición y la pigmentación de las mismas.

El porcentaje de inhibición del crecimiento de los hongos ambientales estuvo ente 46,00 y 85,00%. Estos resultados son similares a los reportados por Tran *et al.* (2008), quienes demostraron que cepas de *Pseudomonas fluorescens* aisladas de la rizósfera del cultivo de pimentón negro en Vietnam,

tienen actividad zoosporicida sobre las estructuras reproductivas de microorganismos pertenecientes al género *Phytophthora capsici*. Igualmente, Hernández *et al.* (2010), revelaron en su investigación que cepas aisladas de plantaciones de arroz y que posteriormente fueron identificadas como *P. fluorescens* tienen capacidad de ejercer efecto antagónico con valores del 64,00% hasta un 83,00%, del crecimiento de *Curvularia pallescens* y *Curvularia trifolli*, especies que son reconocidas como patógenos causantes del manchado del grano de arroz.

P. fluorescens ha sido considerada como un posible agente de control biológico en la industria agrícola (Kai *et al.*, 2006); debido a que puede antagonizar y reprimir microorganismos fitopatógenos, así se le ha encontrado inhibiendo *Phytophthora infestans*, causante del tizón tardío en la papa, y reducir el nivel de severidad de la enfermedad en un 79,90%. Confirmando lo antes mencionado, Rives *et al.* (2009), aislaron cepas autóctonas de *Pseudomonas*, potencialmente eficientes en la promoción del crecimiento vegetal y control de patógenos, y demostraron que inhibieron en un 82,00 a 86,00% el crecimiento de *Pyricularia grisea*.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que el extracto metabólico de *P. fluorescens* tuvo actividad antifúngica frente a *F. moniliforme*, *F. solani* y *P. expansum*. Se obtuvo inhibición de crecimiento fúngico sólo con el extracto puro y con la primera dilución. Ésto se compara con el trabajo de Tran *et al.* (2007), quienes en su estudio lograron obtener biosurfactantes, producidos por *P. fluorescens* que tienen actividad zoosporicida sobre *P. capsici*. Igualmente, Valencia *et al.* (2005), concluyeron en su investigación que *P. fluorescens*, produce compuestos, distintos a los sideróforos, que poseen actividad antagónica frente *Fusarium oxysporum*.

El extracto metabólico de *P. fluorescens* no presentó efecto inhibitorio

frente a *T. viride*, lo que demuestra que la actividad antagónica que posee la bacteria sobre el fitopatógeno está dada por una vía de biocontrol distinta a la evaluada en este trabajo. Es probable que mecanismo de inhibición esté causado por un compuesto cuya extracción no se logró con la metodología utilizada, o también puede ser que *P. fluorescens* inhiba el crecimiento del hongo mediante la competición por nutrientes. Además, sabe que *T. viride* ejerce efecto antagónico sobre diversos patógenos de interés y por lo tanto, es utilizado como agente de control biológico, es decir, que entre *T. viride* y *P. fluorescens* no existe ningún efecto inhibitorio debido a que ambas son capaces de formar parte de un mismo ecosistema habitando la rizófora de las plantas (Villa *et al.*, 2005).

Es evidente que los metabolitos activos de origen bacteriano desempeñan un función vital en las interacciones microbianas. Sin embargo, se ha señalado que los antagonistas microbianos no poseen un único modo de acción, y que no es fácil determinar con precisión los mecanismos que interviene en las interacciones entre los antagonistas y los fitopatógenos (Villa *et al.*, 2005).

En este trabajo se observó efecto diferencial de las cepas bacterianas ante los patógenos fúngicos estudiados, ya que *P. fluorescens* causó mayor efecto antagónico frente a *F. moniliforme* que ante *F. solani*, *T. viride* y un efecto aun menor frente a *P. expansum*, a pesar de que, estadísticamente no hubo diferencia significativa, esto lo explican en sus trabajos, Jaiganesh *et al.* (2007) y Acebo (2009), quienes señalaron que al establecerse la interacción entre los antagonistas y los fitopatógenos, existía una variedad de respuestas en función de las cepas, lo que podría estar dado por las características propias de cada microorganismo, que responden con diferentes niveles de resistencia ante el antagonista aplicado.

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana realizadas a las cepas de *P. fluorescens* revelan que las cepas sólo presentan resistencia natural a los antibióticos y ninguna adquirida. *P. fluorescens* es resistente de forma natural a aminopenicilinas con o sin inhibidores de beta-lactamasas y a cefalosporinas de primera y segunda generación (SADEBAC, 2005).

P. fluorescens representa a un grupo predominante de rizobacterias con diversidad metabólica y múltiples mecanismos que median su capacidad para suprimir fitopatógenos y promover el crecimiento de cultivos (Jaiganesh *et al.*, 2007). Cepas específicas de *Pseudomonas* fluorescentes se podrían utilizar como agentes de biocontrol y biofertilizantes en la agricultura sostenible. Los efectos beneficiosos de *Pseudomonas* fluorescentes en el crecimiento de las plantas es el resultado de la competencia, el potencial de colonización de las raíces, la solubilización de fosfato, la retención de hierro, la producción de reguladores del crecimiento de plantas y vitaminas, la producción de antibióticos, la síntesis de enzimas que degradan la pared celular de hongos, la supresión de microorganismos patógenos o nocivos, y la inducción de sistémica resistencia contra fitopatógenos (Compant *et al.*, 2005; Gray y Smith, 2005). Las cepas que presentan mecanismos de biocontrol y de promoción del crecimiento de las plantas, podrían ser utilizadas para lograr el control biológico de fitopatógenos. La selección y utilización de cepas adecuadas y el conocimiento de los diferentes mecanismos involucrados en el crecimiento de plantas es esencial para el control biológico en la agricultura sostenible.

CONCLUSIONES

En este estudio se recuperaron 18 diferentes aislados de bacterias asociadas a la rizósfera de las plantas de pimentón (*Capsicum annuum* L.), y que pertenecen a los géneros *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Pantoea*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* y *Klebsiella*.

La mayoría de los hongos aislados corresponden a géneros saprofiticos tales como: *Aspergillus*, *Cunninghamella*, *Mycelia*, *Mucor*, *Rhizomucor* y *Rhizopus*.

Los resultados en las pruebas de antagonismo demostraron que las mejores cepas de los aislamientos fueron A 3.1, A 3.2 y B 3.1, alcanzando porcentajes de inhibición que van de 46,00 al 85,00%.

Se corroboró la actividad antifúngica *in vitro* del extracto crudo con acetato de etilo de *P. fluorescens* sobre los hongos fitopatógenos *F. solani*, *F. moniliforme* y *P. expansum*; sugiriendo que la actividad antagónica se debe, en parte, a la excreción de compuestos extracelulares con actividad antifúngica por parte de la bacteria.

RECOMENDACIONES

Completar los estudios para la extracción y aislamientos de los componentes con actividad antifúngica en esta cepa ambiental y su concentración individual con el fin de conocer los componentes que poseen una mayor actividad antifúngica.

Determinar el mecanismo implicado en la inhibición de los hongos por las cepas que presentaron actividad.

Se recomienda evaluar otros tipos de actividad *in vitro* para ampliar el rango de acción de los metabolitos obtenidos utilizando diferentes concentraciones del mismo, y así, posteriormente, realizar las pruebas *in vivo*.

BIBLIOGRAFÍA

Acebo, Y. 2009. Aislamiento y caracterización de cepas de *Pseudomonas fluorescens* con actividad antagónica ante *Pyricularia grisea*. Trabajo de postgrado. Departamento de Microbiología y Virología. Facultad de Biología. Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.

Agrios, G. 1988. *Plant Pathology*. Tercera edición. Academic Press. Nueva York, EEUU.

Alexander, M. 1990. Dynamics of plant-pathogen interactions in natural plant communities. *Blackwell Scientific Communities*, 1: 31-45.

Alexander, M. 1994. *Introducción a la Micología de los Suelos*. AGT Editorial, S. A. México.

Anuratha, C. y Gnanamanickam, S. 1990. Biological control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* in India with antagonistic bacteria. *Plant and Soil*, 124: 109-116.

Anzola, L. 2007. *Índice agropecuario*. Edición 32. Maracay, Venezuela.

Arenas, J.; Carpio, F. y Guillermo, J. 2005. Flora fúngica de la rizósfera de *Phaseolus lunatus* en Ica, Perú. *The Peruvian Journal of Biology*, 12: 441-444.

Arias, J. y Jerez, A. 2008. Elaboración de un atlas para la descripción macroscópica y microscópica de hongos fitopatógenos de interés en especies de flores cultivadas en la sabana Bogotá. Trabajo de pregrado. Departamento de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

Augspurger, C. 1990. Spatial pattern of damping-off disease during seedling recruitment in tropical forest. *Blackwell Scientific Communities*, 1: 131-144.

Ayyadurai, N.; Ravindra, P. y Sakthivel, N. 2007. Functional characterization of antagonistic fluorescent pseudomonads with rhizospheric soil of rice (*Oryza sativa* L.). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 17: 919-927.

Ayyadurai, N.; Ravindra, P.; Screehari, M.; Sunish, R.; Samrat, S.; Manohar, M. y Sakthivel, N. 2006. Isolation and characterization of a novel banana rhizosphere bacterium as fungal antagonist and microbial adjuvant in micropropagation of banana. *Applied Microbiology*, 100: 926-937.

Barea, J.; Andrade, G.; Bianciotto, V.; Dowling, D.; Lohrke, S.; Bonfante, P.; O'Gara, F. y Azcon, C. 1998. Impact on arbuscular mycorrhiza of *Pseudomonas* strains used as inoculants for biocontrol of soil-borne fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 2304-2307.

Barret, E.; Solanes, R.; Tang, J. y Palleroni, N. 1986. *Pseudomonas fluorescens* biovar. *Journal of General Microbiology*, 132: 2709-2721.

Bauer, A.; Kirby, W.; Sherris, J. y Turck, M. 1966. Antibiotics susceptibility testing by standardized single disk method. *The American Journal of Pathology*, 45: 493-496.

Bautista, S. 2006. El control biológico en la reducción de enfermedades postcosecha en productos hortofrutícolas: uso de microorganismos antagonicos. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 8: 1-6.

Bonifaz, A. 2002. *Micología Médica Básica*. Méndez Editores. México.

Bull, C.; Wadsworth, K.; Sorenson, K.; Takemoto, J.; Austin, R. y Sminalick, J. 1998. *Syringomycin E* produced by biological agents controls green mold on lemons. *Biological Control*, 12: 89-95.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement*, 32(3): 1-179.

Compant, S.; Duffy, B.; Nowak, J.; Clement, C. y Barka, A. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 4951-4959.

Corporación Colombiana Internacional (CCI). 2010. *Inteligencia de Mercados. Venezuela*. Entorno Social, económico y demográfico. Perfil de mercadeo, N° 5. Abril-Junio.

Curl, E. y Truelove, R. 1986. *The Plant Root and the Rhizosphere*. Springer-Verlag. Berlin, Alemania.

DeBach, P. y Rosen, D. 1991. *Biological control by natural enemies*. Segunda edición. Cambridge University Press. Gran Bretaña.

De Sousa, J. 2002. Distribution, Diversity, and Activity of Antibiotic Production of *Pseudomonas* spp. Tesis doctoral. Wageningen University. Holanda.

De Sousa, C.; Queiroz, M.; dos Santos, M.; Massa, D.; Nascimento, J. y Laranjeira, D. 2003. Identification and characterization of filamentous fungi isolated from the sunflower (*Helianthus annuus* L.) rhizosphere according to their capacity to hydrolyse inulin. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34: 273-280.

De Sousa, J.; Weller, D. y Raaijmakers, J. 2003. Frequency, diversity and activity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in dutch take-all decline soils. *Phytopathology*, 93 :54-63.

Di Cello, F.; Bevivino, A.; Chianni, L.; Fani, R.; Paffetti, D.; Tabacchioni, S. y Dalmastri, C. 1997. Biodiversity of *Burkholderia cepacia* population isolated from the Maize rhizosphere all different plant growth states. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 4485-4493.

Dinoor, A. y Eshed, N. 1990. Plant diseases in natural populations of wild barley (*Hordeum spontaneum*). *Blackwell Scientific Communities*, 1: 131-144.

Domsch, K.; Gams, W. y Anderson, T. 1980. *Compendium of Soil Fungi*. Editorial Academic Press. Nueva York, EEUU.

Ellis, R.; Timms, T. y Bailey, M. 2000. Identification of conserved traits in fluorescent pseudomonads with antifungal activity. *Environmental Microbiology*, 2: 274-284.

Escalona, E.; Rodríguez, D.; Contreras, N. y Jiménez, N. 2006. Patógenos del suelo en el cultivo de pimentón en la zona baja del Municipio Jiménez, Estado Lara, Venezuela. *Bioagro*, 18: 1-4.

Ezziyyani, M.; Pérez, C.; Requena, M.; Sid, A. y Candela, M. 2004. Evaluación del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimentón (*Capsicum annuum* L.) por tratamiento de *Burkholderia cepacia*. *Anales de Biología*, 26: 61-68.

Fiori, M. y Schaffino, A. 2004. Bacterial stem rot in greenhouse pepper (*Capsicum annuum* L.) in Sardinia (Italy): Occurrence of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Journal of Phytopathology*, 152: 28-33.

Foster, R. 1988. Microenvironments of soil microorganisms. *Biology and Fertility of Soils*, 6: 189-203.

Fraire, M.; Yanes, M. y Nieto, D. 2003. Hongos patógenos del fruto de fresa (*Fragaria ananassa* Duch.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21: 285-291.

Gachomo, E. y Kotchoni, S. 2008. The use of *Trichoderma harzianum* and *T. viride* as potential biocontrol agents against peanut microflora and their

effectiveness in reducing aflatoxin contamination of infected kernels. *Biotechnology*, 7: 439-447.

Galli, E.; Silver, S. y Wiltholt, B. 1992. *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*. American Society for Microbiology. Washinton, EEUU:

Garcés, E.; Orozco, M.; Bautista, G. y Valencia, H. 2001. *Fusarium oxysporum* el hongo que nos faltaba conocer. *Acta Biológica Colombiana*, 6: 12-15.

García, T.; Lotero, L.; Leguízamo, M.; Sánchez, M.; Jiménez, J. y Parada, J. 2009. *Hongos nematofagos en tomate en el Valle del Cauca*. Congreso Sociedad Colombiana de Fitopatología. Medellín, Colombia.

Glick, B. 1995. The enhancement of plant growth by freeliving bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41: 109-117.

Glick, B.; Patten, C.; Holguin, G. y Penrose, D. 1999. *Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria*. Imperial College. Londres, Inglaterra.

Gray, E. y Smith, D. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinction ecological in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 395-412

Guédez, C. 2009. Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria* spp). *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29: 34-38.

Guédez, C.; Castillo, C.; Cañizales, L. y Olivar, R. 2008. Control Biológico: Una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. *Academia*, 7: 50-74.

Guédez, C.; Castillo, C.; Cañizales, L.; Olivar, R. y Maffei, M. 2010. Alternativas para el control de hongos postcosecha en naranjas valencia (*Citrus sinensis*). *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 30: 43-47.

Guigón, L.; Sánchez, A.; Frías, T.; Flores, O.; Hernández, C. y Parga T. 1995. Epidemiología de las Enfermedades de la Papa causadas por Hongos Fitopatógenos del suelo en el sur de Coahuila y Nuevo León. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 12: 1-6.

Hallmann, J.; Quadt, A.; Mahafee, W. y Klopper, J. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43: 895-914.

Harper, J. 1990. Pests, Pathogens and plant communities: an introduction.

Blackwell Scientific Publications, 1: 3-14.

Hass, D. y Keel, C. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annual Review of Phytopathology, 41: 117-153.*

Hernández, A.; Bautista, S. y Velásquez, M. 2007. Uso de microorganismos antagonistas en el control biológico de enfermedades postcosecha en frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología, 25: 66-74.*

Hernández, A.; Heydrich, M.; Acebo, Y. y Velásquez, M. 2008. Antagonistic activity of Cuban native rhizobacteria against *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. in maize (*Zea mays* L.). *Applied Soil Ecology, 36: 184-186.*

Hernández, J.; Laberry, R. y Lozano, J. 1986. Observation on the effect of inoculating cassava (*Manihot esculenta*) plantlets with fluorescens *Pseudomonas*. *Phytopathology, 117: 17-25.*

Hernández, A.; León, D.; Rives, N.; Diaz, A.; Almaguer, M. y Acebo, Y. 2010. Identificación de aislamientos autóctonos de *Pseudomonas* fluorescentes con actividad antagónica ante *Curvularia* spp. *Revista de Protección Vegetal, 25: 31-42.*

Hernández, A.; Rives, N.; Caballero, A.; Hernández, A. y Heydrich, M. 2004. Caracterización de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz en la producción de metabolitos del tipo AIA, sideróforos y ácido salicílico. *Revista Colombiana de Biotecnología, 6: 6-13.*

Hernández, A.; Rives, N.; Heydrich, M. 2004. *Caracterización de la comunidad microbiana y endófito asociada al cultivo del arroz variedad J-104.* Congreso Científico del INCA. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. La Habana, Cuba.

Hervas, A.; Landa, B.; Datnoff, L. y Jiménez, R. 1998. Effects of commercial and indigenous microorganisms on *Fusarium* wilt development in chickpea. *Biological Control, 13: 166-176.*

Higgs, R.; Zahn, J.; Gigy, J. y Hilton, M. 2001. Rapid method to estimate the presence of secondary metabolites in microbial extracts. *Applied and Environmental Microbiology, 67: 371-376.*

Howell, C. y Stipanovic, R. 1995. Mechanisms in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*-induced cotton seedling diseases by *Gliocladium virens*. *Phytopathology, 85: 496-472.*

Izzeddin, N. y Medina, L. 2011. Efecto del control biológico por antagonistas sobre fitopatógenos en vegetales de consumo humano. *Salus Online*, 15: 8-18.

Jaiganesh, V.; Eswaran, A.; Balabaskar, P. y Kannan, C. 2007. Antagonistic activity of *Serratia marcescens* against *Pyricularia oryzae*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 35: 48-54.

Janisciewicz, W. y Korsten, L. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruit. *Annual Review of Phytopathology*, 40: 411-441.

Janisciewicz, W. y Rotman, J. 2000. Biological control of bluo mould and gray mould with *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathology*, 78: 1697-1700.

Jha, B.; Pragash, M.; Cletus, J.; Raman, G. y Sakthivel, N. 2009. Simultaneous phosphate solubilization potential and antifungal activity of new fluorescent pseudomonad strains, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. plecoglossicida* and *P. mosselli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 25: 573-581.

Jijakli, M. y Lepoivre, P. 1998. Characterization of a β -1,3 glucanase produced by *Pichia anomala* strain, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. *Phytopathology*, 88: 335-343.

Jiménez, R. 2000. *Bioestadística. Métodos estadísticos descriptivos*. Universidad de los Andes. Merida, Venezuela.

Jiménez, M.; Ulacio, D.; Perdomo, W. y Briceño, E. 2009. Micobriota y nematodos asociados con la rizósfera y raíz en el cultivo de ajo (*Allium sativum* L.). *Bioagro*, 21: 209-216.

Kai, M.; Effmert, U.; Berg, G. y Piechulla, B. 2006. Volatiles of bacterial antagonist inhibit mycelia growth of the plant pathogen *Rhizoctonia colani*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 1053-1057.

Killian, M.; Steiner, U.; Krebs, B.; Junge, H.; Schmiedeknecht, G. y Hain, R. 2001. FZB24® *Bacillus subtilis* – Mode of Action of Microbial Agent Enhancing Plant Vitality. *Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer*, 1: 72-93.

Koneman, E.; Alien, S.; Janda, W.; Schreckenberger, P. y Winn, W. 1999. *Diagnóstico Microbiológico*. Texto y Atlas a Color. Quinta Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.

Krupa, S. y Dommergues, Y. 1981. *Ecology of root pathogens*. Segunda Edición. Elsevier Scientific Publishing Company. EEUU.

Landa, B.; Mavrodi, O.; Raaijmakers, J.; McSpadden, B.; Thomashow, L. y Weller, D. 2002. Differential ability of genotypes of 2,4-diacetylphloroglucinol-

producing *Pseudomonas fluorescens* strains to colonize the roots of pea plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 3226–3237.

Lauzardo, A.; Bautista, S.; Velázquez, M. y Hernández, A. 2007. Uso de microorganismos antagonistas en el control postcosecha en frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25: 66-74.

Leisinger, T. y Margraff, R. 1979. Secondary metabolites of fluorescent pseudomonads. *Microbiological Reviews*, 43: 422-442.

Lim, H.; Kim, Y. y Kim, S. 1991. *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 genetic transformation and antifungal mechanisms against *Fusarium solani*, and agent of plant root rot. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 510-516.

Loredo, O.; López, L. y Espinoza, D. 2004. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramínea. *Terra Latinoamericana*, 22: 225-239.

López, R. y López, M. 1990. *El diagnóstico de suelos y Plantas – Métodos de campo y laboratorio*. Cuarta Edición. Mundi-Prensa. Madrid, España.

Lugtenberg, J. y Dekkers, L. 1999. What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent?. *Environmental Microbiology*, 1: 9-13.

Lugtenberg, J.; Kravchenko, L. y Simons, M. 1999. Tomato seed and root exúdate sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization. *Environmental Microbiology*, 1: 439-446.

Lumsden, R. 1981. Ecology of Mycoparasitism. *Mycology Series*, 2: 295-318.

Lynch, J. 1990. *The Rhizosphere Interactions*. Editorial Wiley. Winchester, Inglaterra.

Manning, W.; Vandaro, P. y Cox, E. 1973. Root and stem rot of germanium cutting caused by *Rhizoctonia* and *Fusarium*. *Plant Disease*, 57: 177-178.

Martínez, B. Pérez, S. y Plana, R. 2009. Principal fungi diseases in triticales and wheat in San José de las Lajas - Havana. *Revista de Protección Vegetal*, 24: 134-146.

Matiru, V. y Dakora, F. 2004. Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. *African Journal of Biotechnology*, 3: 1-7.

McMenamin, J.; Zacccone, T.; Coenye, T.; Bañadme, P. y Li, J. 2000. Misidentification of *Bulkholderia cepacia* in US cystic fibrosis treatment centres: an analysis of 1051 recent sputum isolates. *Chest*, 117: 1661-1665.

McSpadden, G.; Mavrodi, L.; Thomashow, L. y Weller, D. 2001. A rapid polymerase chain reaction-based assay characterizing rhizosphere populations of 2,4-DAPG-producing bacteria. *Phytopathology*, 91: 44-54.

Miller, H.; Henken, G. y Van Veen, J. 1989. Variation and composition of bacterial populations in the rhizosphere of maize, wheat, and grass cultivars. *Canadian Journal of Microbiology*, 35: 656-660.

Mirleau, P.; Philippot, L.; Corberand, T. y Lemanceau, P. 2001. Involvement of nitrate reductase and pyoverdine in competitiveness of *Pseudomonas fluorescens* strain c7r12 in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2627-2635.

Mitidieri, L. 1998. Control biológico de hongos del suelo con *Trichoderma*. *IDIA XXI*, 44: 45-49.

Nielsen, M.; Christophersen, C.; Anthoni, U. y Sorensen, J. 1999. Viscosinamida, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal of tensin. *Applied and Environmental Microbiology*, 86: 80-90.

Nielsen, M.; Sorensen, J.; Fels, J. y Pedersen, H. 1998. Secondary metabolite and endochitinase dependent antagonism toward plant-pathogenic microfungi of *Pseudomonas fluorescens* isolates from sugar beet rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3563-3569.

Noveriza, R. y Quimio, T. 2004. Soil mycoflora os black pepper rhizosphere in the philippines and their *in vitro* antagonism against *Phytophthora capsici* L. *Indonesian Journal of Agricultural Science*, 5: 1-10.

Ogata, K. y Zúñiga, D. 2005. Estudio de la microflora de la rizósfera de *Caesalpinia spinosa* en la provincia de Huanuco. Trabajo de postgrado. Departamento de Biología. Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú.

Olalde, P. y Aguilera, L. 1998. Microorganismos y Biodiversidad. *Terra*, 16: 289-292.

Orberá, T.; Serrat, M. y González, Z. 2009. Potencialidades de bacterias aerobias formadoras de endosporas para el biocontrol en plantas ornamentales. *Fitosanidad*, 13: 1-5.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO). 1990. *Plagas de las hortalizas*. Manual de manejo integrado. Santiago de Chile.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO). 2006. "Índices de producción". "Datos agrícolas de FAOSTAT". <<http://faostat.fao.org/faostat/colections?subset=agriculture&language>>. (01-12-2010).

Páez, M. y Sanabria, N. 2007. Evaluación de la capacidad antagónica de *Trichoderma koningii* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 1: 27-31.

Paredes, J.; Carrillo, J.; García, R.; Allende, R.; Sañudo, J. y Valdez, J. 2008. Microorganismos Antagonistas para el Control del Complejo de Hongos Causantes de la Rabia del Garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el Estado de Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 27: 27-35.

Parra, E.; Centeno, S. y Araque, Y. 2009. Actividad antifúngica de *Burkholderia cepacia* aislada de maíz amarillo (*Zea mays* L.) bajo diferentes condiciones de cultivo. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29: 103-109.

Pérez, C.; De La Fuente, L.; Arias, A. y Altier, N. 2001. Uso de *Pseudomonas* fluorescentes nativas para el control de enfermedades de implantación en *Lotus corniculatus* L. *Agrociencia* 4: 41-47.

Pérez, L.; Duran, L. y Sanchez, J. 2002. *Identification of fungi that cause "pepper wilt" in the Bajío Region*. 16th International Pepper Conference. Tampico. Tamaulipas, Mexico.

Pfenning, L. y Abreu, L. 2006. Diversity of Microfungi in Tropical Soils. *CABI*, 1: 394-395.

Pieterse, C.; Van pelt, J.; Van Wees, J.; Ton, S.; Leon, K.; Keurentijes, J.; Verhagen, B.; van Knoester, M.; Bakker, P. y Van Loon. 2001. Rhizobacteria mediated induced systemic resistance triggering, signaling and expression. *European Journal of Plant Pathology*, 107: 51-61.

Primaversi, A. 1984. *Manejo Ecológico del Suelo*. Editorial El Ateneo. Buenos Aires, Argentina.

Pujol, M.; Badosa, E.; Cabrefiga, J. y Montesinos, E. 2005. Development of a strain-specific quantitative method for monitoring *Pseudomonas fluorescens* EPS62e, a novel biological control agent of fire blight. *FEMS Microbiology Letters*, 249: 343-352.

Ranjeet, K.; Strap, J.; Jung, M.; Crawford, D.; Deobald, L. y Biley, J. 2002. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC 108 and pea plant (*Pisum sativum*). *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 2161-2171.

Rasooli, I.; Hadi, M.; Yadegarinia, D.; Gachkar, L.; Allameh, A. y Bagher, M. 2008. Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 122: 135-139.

Ravindra, P.; Raman, G.; Badri, K. y Sakthivel, N. 2008. Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. *BMC Microbiology*, 8: 230.

Ravindra, P. y Sakthivel, N. 2006. Functional characterization of a novel hydrocarbonoclastic *Pseudomonas* sp. strain PUP with plant-growth-promoting traits and antifungal potential. *Research in Microbiology*, 157: 538-546.

Rives, N.; Acebo, Y.; Almaguer, M.; García, J. y Hernández, A. 2009. Actividad antagónica frente a *Pyricularia grisea* y fitoestimulación en el cultivo del arroz de cepas autóctonas de *Pseudomonas putida*. *Revista de Protección Vegetal*, 24: 1-4.

Rodríguez, C. y Martín, M. 2009. Aislamiento y selección de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en cultivos de Uchuva (*Physalis peruviana* L.) con capacidad antagónica frente a *Fusarium* sp. Trabajo de Grado. Departamento de Microbiología. Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia.

Rodríguez, M. 1996. Biodiversidad de los hongos fitopatógenos del suelo de México. Trabajo de postgrado. Instituto de Fitosanidad Colegio de Postgraduados. Montecillos Chapingo, Edo. de México, México.

Rodríguez, V. 2002. Efecto antagónico y biocontrolador de algunos microorganismos saprofitos contra *Rhizoctonia solani* un fitopatógeno en placas de tomate. Trabajo de postgrado. Departamento de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor San Marcos. Perú.

Ryu, C.; Murphy, J.; Mysore, K. y Kloepper, J. 2004. Plant growth-promoting rhizobacterial systemically protect *Arabidopsis thaliana* against *Cucumber mosaic virus* by a salicylic acid and NPR1-independent and jasmonic acid-dependent signaling pathway. *The Plant Journal*, 39: 381-392

Sakthivel, N. y Gnanamanickam, S. 1989. Incidence of different biovars of *Pseudomonas fluorescens* in flooded rice rhizosphere in India. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 53: 2056-2059.

Salisbury, F. 1994. The role of plant hormones. En: *Plant environment interactions*. Wilkinson, R. (ed). Marcel Dekker, Nueva York, EEUU. Págs. 39-81.

Sands, F. y Rovira, A. 1971. *Pseudomonas fluorescens* biotype G, dominant fluorescent pseudomonads in south Australian soils and wheat rhizosphere, *Journal of Applied Bacteriology*, 34: 261-275.

Scher, F. y Baker, R. 1982. Phytopathogenic pseudomonads and related plant-associated pseudomonads. En: *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria*. Balows, A.; Truper, H.; Dworkin, M.; Harder, W. y Schleifer, K. (eds). Springer, Nueva York, EEUU. Págs. 3104-3131.

Schoebitz, M. 2006. Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de *Lolium perenne* L. de suelo volcánico. Trabajo de pregrado. Escuela de Agronomía. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.

Schroth, M.; Hidebrand, D. y Panapoulos, N. 2006. Phytopathogenic pseudomonads and related plant-associated pseudomonads. *Prokaryotes*, 6 714-740.

Sivamani, E. y Gnanamanickam, S. 1988. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* in banana by inoculation with *Pseudomonas fluorescens*. *Plant and Soil*, 107: 3-9.

Smilanick, J. y Denis, R. 1992. Control of green mold of lemons with *Pseudomonas* species. *Plant Disease*, 76: 481-485.

Srivastava, S. 2009. Antifungal Activity of *Pseudomonas fluorescens* Against Different Plant Pathogenic Fungi. *The Internet Journal of Microbiology*, 7: 6-11.

Sociedad Argentina de Bacteriología Clínica (SADEBAC). 2005. *Consenso sobre el criterio de ensayo, interpretación e informe de las pruebas de sensibilidad en los BNNF de importancia clínica*. Manual de manejo integrado. Buenos Aires, Argentina.

Soriano, J. 2007. *Micotoxinas en alimentos*. Ediciones Díaz de Santos. Madrid, España.

Soroa, M.; Hernández, A.; Soto, F. y Terry, E. 2009. Identificación de algunas especies de microorganismos benéficos en la rizósfera de *Gerbera* y su efecto en la productividad. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 15: 41-48.

Stanier, R. Palleroni, N. y Doudoroff, M. 1966. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *Journal of General Microbiology*, 43: 159-217.

Sturtz, A.; Christie, B. y Nowak, J. 2000. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Plant and Soil*, 19: 1-30.

Sulca, L. 2005. Estudio de la microflora presente en la rizósfera de plantaciones de olivo (*Olea europea* L.) con muerte regresiva en la zona "La Yarada" del Departamento de Tacna. *Revista Ciencia y Desarrollo*, 9: 33-36.

Tate, R. 1995. *Soil Microbiology*. Editorial J. Wiley. New York, EEUU.

Thomashow, L.; Weller, D.; Bonsall, R. y Pierson, L. 1990. Production of antibiotic phenazine 1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 908-912.

Tran, H.; Ficke, A.; Asimwe, T.; Hofte, M. y Raijmakers, J. 2007. Role of the cyclic lipopeptide massetolide A in biological control of *Phytophthora infestans* and in colonization of tomato plants by *Pseudomonas fluorescens*. *New Phytologist*, 175: 731-742.

Tran, H.; Kruijt, M. y Raaijmakers, J. 2008. Diversity and Activity of Biosurfactant-Producing *Pseudomonas* in the Rhizosphere of Black Pepper in Vietnam. *Journal of Applied Microbiology*, 104: 839-851.

Tripathi, P. y Dubey, K. 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 32: 235-245.

Valencia, E.; Villegas, J.; Sánchez, J.; Peña, J. y Farías, R. 2005. Inhibición de *Fusarium oxysporum* por cepas mutantes de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 incapaces de producir sideróforos. *Terra Latinoamericana*, 23: 81-88.

Validov, S.; Mavrodi, O.; De La Fuente, L.; Boronin, A.; Weller, D. y Thomashow, L. 2005. Antagonistic activity among 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *FEMS Microbiol Lett*, 242: 249-256.

Van Loon, L.; Bakker, P. y Pieterse, C. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36: 453-483.

Villa, P.; Frías, A. y González, G. 2005. Evaluacion de cepas de *Pseudomonas* sp para el control de hongos fitopatógenos que afectan cultivos de interés económico. *Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azucar, Sobre los Derivados de la Caña de Azucar*, 3: 40-44.

Wang, B. y Qiu, Y. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhizahello*, 16: 299-363.

Zehnder, G.; Murphy, J.; Sikora, E. y Kloepper, J. 2001. Application of rhizobacteria for induced resistance. *European Journal of Plant Pathology*, 107: 39-50.

APÉNDICE 1

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

HOJA DE MUESTREO

Nº: _____

Cultivo: _____

Variedad: _____

Tiempo de cosecha: _____

Tiempo de cultivo: _____

Fungicidas: _____ Especificar: _____

Extensión de tierras cultivadas: _____

Ubicación: _____

ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE LA PLANTA

Altura: _____ cm Tiempo de desarrollo: _____

Diámetro del tallo: _____ cm

Área foliar (diámetro): _____ cm²

Ancho: _____ cm Largo: _____ cm

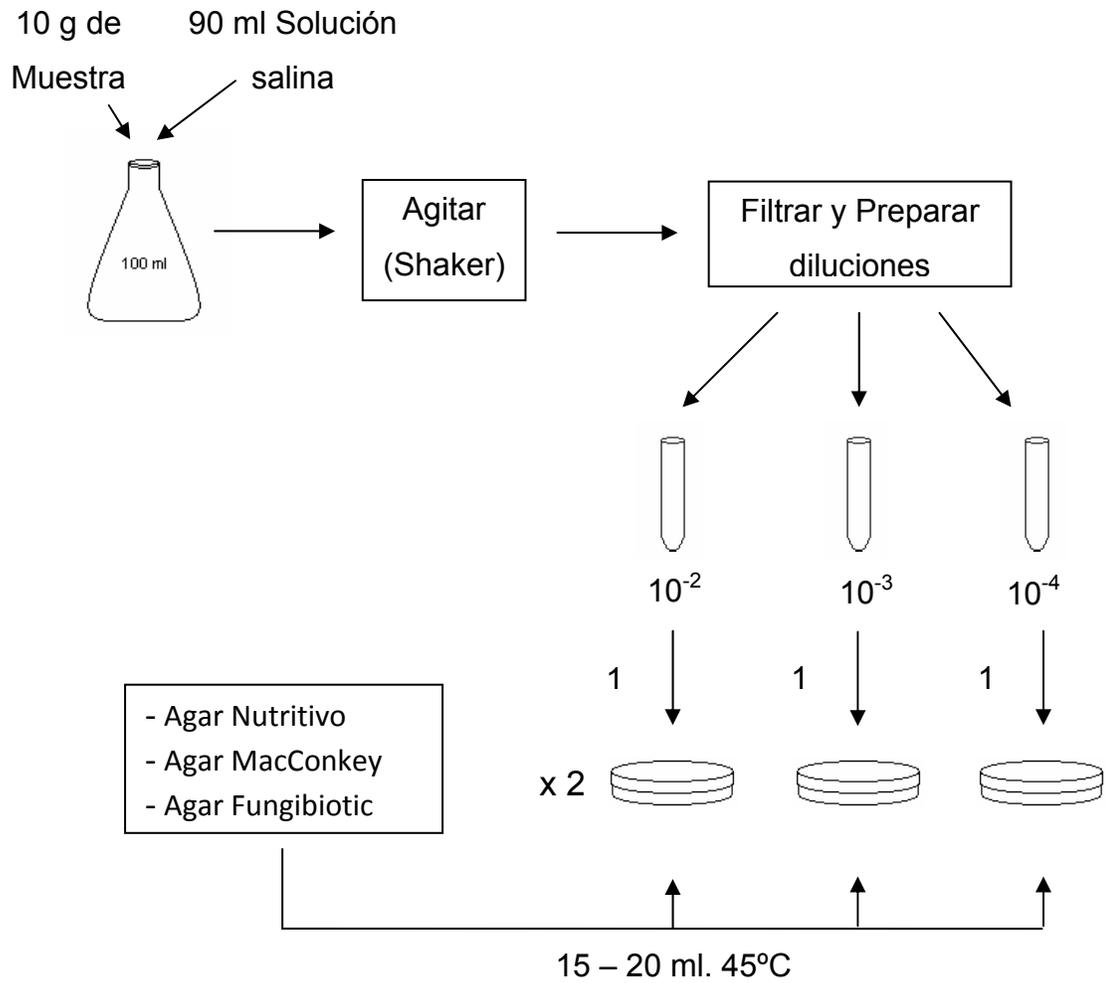
DENSIDAD DE LA POBLACIÓN

Distancia entre hileras: _____ cm

Distancia entre plantas: _____ cm

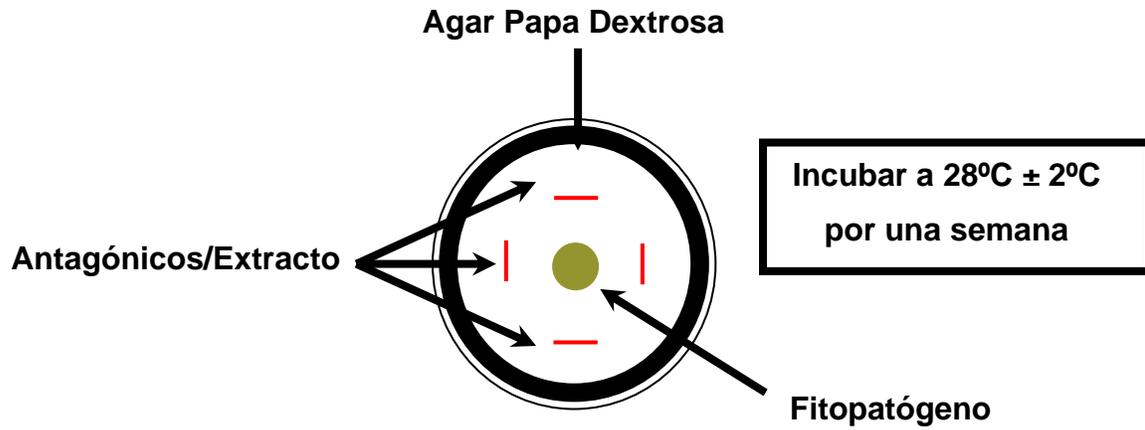
Nº de la hilera: _____ Nº de plantas por hilera: _____

ANEXOS



Anexo 1. Procesamiento de las muestras recogidas (Di Cello *et al.*, 1997)

ANEXO 2



Anexo 2. Método de enfrentamiento dual (Rodríguez, 2002)

HOJA DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

Título	Actividad antifúngica de la microflora asociada a rizósferade pimentón (<i>Capsicum annuum</i> L.) en puerto de la madera, Cumaná, Estado Sucre
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
	Mora A., Jaime A.	CVLAC
e-mail		moraaza.j@gmail.com
e-mail		
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Antagonismo
Rizófora
Microflora
<i>Pseudomonas fluorescens</i>

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencia	Bioanálisis
	Micología
	Bacteriología

Resumen (abstract):

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar la actividad antifúngica de la microflora asociada a rizósfera de pimentón (*Capsicum annuum* L.) en 5 unidades de muestreo de una población de Puerto de la Madera, Cumaná, estado Sucre. Para ello, se recolectaron muestras de *C. annuum* L., durante los meses de mayo y junio de 2011. El aislamiento de los microorganismos rizosféricos, así como también, la posterior identificación de las cepas bacterianas y fúngicas, fueron realizadas utilizando los métodos convencionales. Las especies de hongos identificadas fueron: *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Cunninghamella* sp., *Mycelia sterilia*, *Mucor* sp., *Rhizomucor pusillus* y *Rhizopus oryzae*. Se encontraron 18 diferentes aislados de bacterias asociadas de rizósfera de *C. annuum* L., de los cuales 3 aislados poseen potencial antagónico contra hongos y pertenecen a la especie *Pseudomonas fluorescens*. Se evaluó la actividad antifúngica *in vitro* de las cepas de *P. fluorescens* aisladas, contra hongos fitopatógenos, para ello se empleó el método directo de enfrentamientos duales y el extracto crudo, con acetato de etilo, de la cepa A 3.1. Las pruebas se elaboraron por duplicado, se midió el diámetro de los halos de inhibición formados y se aplicó análisis de varianza de una vía con un nivel de confianza del 95,00%. Las 3 cepas aisladas (A 3.1, A 3.2 y B 3.1) mostraron una actividad antifúngica similar sobre todos los hongos aislados de rizósfera de *C. annuum* L., así como sobre los hongos fitopatógenos *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Trichoderma viride* y *Penicillium expansum*, utilizando el método directo de enfrentamientos duales, sin embargo, no se obtuvo inhibición del crecimiento de *T. viride* con el extracto crudo, con acetato de etilo, de la cepa A 3.1. El efecto antifúngico de las cepas bacterianas aisladas sugiere la presencia de posibles metabolitos, además, corrobora el potencial de la misma para el control biológico de los hongos fitopatógenos.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Parra, Evis	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input checked="" type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	eviespin@hotmail.com
	e-mail	
Centeno, Sara	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	sara.centeno@gmail.com
	e-mail	
Mimbela, Isabel	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	isamimbela@hotmail.com
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2013	03	21

Lenguaje: spa

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-MoraJaime.doc	Aplication/ Word

Alcance:

Espacial: _____ **Nacional**
(opcional)

Temporal: _____ **Temporal**
(opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo: Licenciado en Bioanálisis

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciado

Área de Estudio: Bioanálisis

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Universidad de Oriente

Hoja de metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CU N° 0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI - 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
SISTEMA DE BIBLIOTECA
RECIBIDO POR *[Firma]*
FECHA 5/8/09 HORA 5:30

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

[Firma]
JUAN A. BOLAÑOS CUNDELS
Secretario



C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

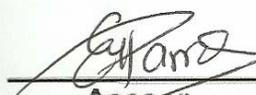
JABC/YGC/maruja

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 6/6

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009): “Los trabajos de grados son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y solo podrá ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Concejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Concejo Universitario, para su autorización”.



Autor
Mora Aza, Jaime A.



Asesor
Parra, Evis