



**UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**CARRERA INGENIERÍA AGRONÓMICA**

Proyecto de Investigación previo  
a la obtención del título de  
Ingeniero Agrónomo.

**Título del Proyecto de Investigación:**

Evaluación de la cinética de crecimiento de PGPR y su actividad antagonista hacia  
*Meloidogyne incognita* "in vitro"

**Autor:**

**Rodríguez Acosta Jorge Luis**

**DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:**

**Hayron Fabricio Canchignia Martínez PhD.**

**Quevedo – Los Ríos - Ecuador.**

**2018**

## **DECLARACIÓN DE AUTORIA Y SESIÓN DE DERECHOS**

Yo, **RODRIGUEZ ACOSTA JORGE LUIS** declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, y por la normatividad institucional vigente.

---

**RODRIGUEZ ACOSTA JORGE LUIS**

## **CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

El suscrito, Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que la Egresado **Rodríguez Acosta Jorge Luis**, realizó el proyecto de investigación previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo titulado Evaluación de la cinética de crecimiento de PGPR y su actividad antagonista hacia *Meloidogyne incognita* “*in vitro*”, bajo mi dirección, habiendo cumplido con todas las disposiciones reglamentarias establecidas.

---

**Dr. Hayron Canchignia Martínez**  
**DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

# CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO



## Urkund Analysis Result

**Analysed Document:** Jorge Luis Rodríguez.docx (D42727898)  
**Submitted:** 10/18/2018 2:59:00 PM  
**Submitted By:** hcanchignia@uteq.edu.ec  
**Significance:** 6 %

### Sources included in the report:

Marco Teorico.docx (D36794224)  
tesisurkum.docx (D24626157)  
PGPR (listo).docx (D16540555)  
TESIS Doctorado HFCM ter.pdf (D9920834)  
GUERRA PROYECTO DE INVESTIGACION 25-02-2016.docx (D18180626)  
Oñate exámen final\_mayo23.docx (D14560167)  
tesiskarenchavezurkum-1.docx (D23242491)  
<http://www.labamerex.com/novedad028.htm>



**UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**TÍTULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:**

**Evaluación de la cinética de crecimiento de PGPR y su actividad antagonista hacia *Meloidogyne incognita* “in vitro”.**

Presentado a la Comisión Académica como requisito previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo.

**Aprobado por:**

---

Biol Fernando Abasolo Pacheco PhD.

**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

---

Ing. Agr. Cesar Varas Maenza MSc.

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

---

Ing. Agr. Freddy Sabando Ávila MSc.

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

**Quevedo – Los Ríos- Ecuador**

**2018**

## **DEDICATORIA**

Agradezco a Dios porque a pesar de las dificultades, me permitió lograr esta meta en mi vida, también por darme una familia maravillosa, ya que, con sus esfuerzos, confianza, amor y apoyo incondicional, permitieron culminar mis estudios y poder ser un profesional. Este logro se los dedico a.

A mi padre Jorge Rodriguez , tíos y abuelos que siempre me apoyaron y estuvieron pendientes de mí y especialmente a mi madre Ana Acosta Moyano por ser un pilar fundamental en mi vida en todo momento.

A mis compañeros y amigos por ese apoyo muy especial en mi vida.

***Jorge Rodríguez Acosta***

# AGRADECIMIENTO

El autor de la presente investigación quiere dejar constancia de su sincero agradecimiento a las personas que hicieron posible la culminación de la misma.

A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, institución digna que me acogió como estudiante y forjó mis conocimientos.

Le agradezco a mi Director de tesis, Dr. Hayron Canchignia Martínez, por su enseñanza, apoyo y motivación para la exitosa culminación de este trabajo de investigación.

Al Ing. Antonio Mendoza por brindarme su amistad y confianza en el tiempo que estuve en el laboratorio.

Al ingeniero Cesar Varas por la ayuda brindada durante el proceso de formación académica, a mi tío Efrén Chiriguaya así como al Magister Guillermo Reyes Torres por la motivación brindada.

A los Ing. Agrónomos Ricardo Romero, Harón Engracia, Antonio Solórzano, Javier Auhing, Ivo Sabando, Angel Verdesoto, Sergio Macías y especialmente a Ángel Cedeño Moreira por sus enseñanzas y apoyo incondicional que hizo posible la culminación exitosa de este proyecto.

También a mis demás compañeros de aula que han formado parte de mi vida profesional a los que me encantaría agradecerles su amistad, apoyo ánimo y compañía en los buenos y malos momentos.

A mis compañeros de investigación por esa amistad y confianza brindada en este tiempo.

## RESUMEN

El principal propósito de esta investigación fue de encontrar un medio de cultivo alternativo para la producción de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés) que ejerzan un potencial control de biocontroladores de nematodos *Meloidogyne incognita*, plaga de gran importancia en diversos cultivos del país. Una de las principales limitantes para producción de biocontroladores es el alto costo de los medios de cultivo que se emplean en su crecimiento así como la falta de información acerca de los parámetros cinéticos que son fundamentales para iniciar su producción a gran escala. En esta investigación fueron utilizadas PGPR aisladas de musas endémicas pertenecientes al laboratorio de Microbiología de la Universidad Técnica de Quevedo. El objetivo fue determinar la cinética y parámetros de crecimiento en medio sintético King B y en tres medios de cultivo alternativo se obtuvo como resultado que el Medio 3 fue el más promisorio para la obtención de extractos celulares para realizar los ensayos antagonistas por presentar la mayor concentración celular entre los medios alternativos. Realizado los ensayos antagonistas con las PGPR se obtuvo los siguientes resultados: *Pseudomonas veronii* RE4 y *Pseudomonas protegens* Cha0 en King B alcanzó el mayor porcentaje de mortalidad a *Meloidogyne incognita* con 75,4 % a las 24 horas, a las 48 horas los tratamientos no presentaron diferencia estadística con porcentajes de control entre 87,8 y 61,3 %. A las 72 horas se destacó que no existió diferencia estadística entre las bacterias *Pseudomonas veronii* RE4 y *Pseudomonas protegens* Cha0 crecidas en King B y Medio 3 con porcentajes de control entre 99,1 y 86,2 % lo cual indica que las concentraciones celulares obtenidas en un medio alternativo son suficientes para ejercer un control eficiente del nematodo *Meloidogyne incognita*. “*in vitro*”, además de usar dicho medio para producción masiva en un biofermentador.

**Palabras claves:** PGPR, medios de cultivo alternativos, ensayos antagonistas, *M. incognita*.

## ABSTRACT

The main purpose of this research was to find an alternative culture medium for the production of PGPR that exert a potential control of biocontrollers of *M. incognita* nematodes, plague of great importance in various plant species in the country. One of the main limitations for the production of biocontrollers is the high cost of the growing media used in their growth as well as the lack of information about the kinetic parameters that are fundamental to start their production on a large scale. In this research PGPR were used isolated from endemic muses belonging to the Microbiology laboratory of the Universidad Técnica Estatal de Quevedo. The kinetics and growth parameters were determined in synthetic medium King B and in three alternative culture media, it was obtained that the Medium (3) was the most promising for the extraction of cellular extracts to perform the antagonistic tests for having the highest concentration. cellular among the alternative media. Performed the antagonistic tests with the PGPR the following results were obtained: *Pseudomona veronii* RE4 and *Pseudomona protegens* Cha0 in King B reached the highest percentage of mortality to *Meloidogyne incognita* with 75.4% at 24 hours, at 48 hours the treatments they did not present statistical difference with control percentages between 87.8 and 61.3%. At 72 hours it was noted that there was no statistical difference between the bacteria *Pseudomona veronii* RE4 and *Pseudomona. protegens* Cha0 grown in King B and Medium 3 with control percentages between 99.1 and 86.2%, which indicates that the concentrations Cells obtained in an alternative medium are sufficient to exercise an efficient control of the nematode *Meloidogyne. incognita*.

**Keywords:** PGPR, alternative culture media, antagonistic tests, *M. incognita*.

## INDICE

PORTADA.....	1
DECLARACIÓN DE AUTORIA Y SESIÓN DE DERECHOS.....	2
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN .....	3
CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO .....	4
DEDICATORIA .....	6
AGRADECIMIENTO .....	7
RESUMEN.....	8
INDICE.....	1
0	
ÍNDICE DE FIGURAS .....	14
INDICE DE ANEXOS .....	16
CÓDIGO DUBLÍN .....	18
INTRODUCCIÓN.....	19
CAPITULO I. CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	
1.1. Problema de Investigación.....	20
1.1.1. Planteamiento del problema .....	20
1.1.1.1. Diagnóstico del Problema .....	20
1.1.1.2. Planteamiento del Problema.....	20
1.1.1.3. Formulación del Problema .....	20
1.2. Objetivos .....	22
1.1.2. Objetivo general .....	22
1.1.3. Objetivos específicos .....	22
1.3. Justificación .....	23
CAPITULO II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN	

2.1.	Marco conceptual .....	25
2.1.1.	Requerimientos nutricionales para microorganismos .....	25
2.1.1.1.	Fuente de Carbono.....	26
2.1.1.2.	Fuente de nitrógeno .....	27
2.1.2.	Medio de cultivo King B o <i>Pseudomonas</i> Agar B.....	27
2.1.2.1.	Composición.....	27
2.1.2.2.	Funcionamiento .....	27
2.1.3.	Medios de cultivo alternativo .....	28
2.3.2.	Melaza de caña de azúcar .....	28
2.3.2.	Curva de crecimiento microbiano .....	29
2.3.3.	Nematodo <i>Meloidogyne incognita</i> .....	30
2.3.3.1.	Taxonomía.....	30
2.3.3.2.	Generalidades .....	30
2.3.3.3.	Biología .....	31
2.3.3.4.	Síntomas .....	31
2.3.3.5.	Control.....	31
2.3.4.	Rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas (PGPR) en la agricultura ....	32
2.3.4.1.	<i>Pseudomonas</i> spp. ....	33
2.3.4.2.	<i>Enterobacter</i> spp. ....	34
2.3.4.3.	<i>Acinetobacter</i> spp. ....	34
2.3.4.4.	<i>Serratia</i> spp. ....	35

### CAPITULO III. MÉTODOLÓGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.3.	Localización del Experimento .....	37
3.4.	Tipo de Investigación .....	37
3.5.	Método de la Investigación.....	37
3.6.	Fuente de recopilación de información .....	37

3.7.	Instrumentos de la investigación.....	37
3.7.1.	Materiales de Laboratorio .....	37
3.7.2.	Equipos de laboratorio.....	38
3.7.3.	Materiales de Oficina.....	39
3.7.4.	Material Genético.....	39
3.8.	Diseño de la Investigación.....	40
3.8.1.	Diseño para determinación de cinética de crecimiento en distintos medios de cultivo .....	40
3.8.2.	Diseño para ensayos antagonistas de las PGPR´S contra <i>Meloidogyne incognita</i> in vitro .....	41
3.9.	Manejo del experimento.....	42
3.9.1.	Determinar la cinética de crecimiento de PGPR en distintos medios de cultivo....	42
3.9.2.	Establecer la capacidad antagonista de PGPR hacia <i>Meloidogyne incognita</i> “in vitro” .....	45
3.9.3.	Elaborar un modelo piloto de biofermentador de PGPR para su producción masiva.....	47
3.9.4.	Datos a registrar en la investigación.....	47

#### CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.7.	Resultados .....	49
4.7.1.	Determinar la cinética de crecimiento de PGPR en distintos medios de cultivo....	49
4.7.1.1.	Cinética de crecimiento de <i>Enterobacter absuriae</i> PM3-14.....	49
4.7.1.2.	Cinética de crecimiento de <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> PM2-12.....	50
4.7.1.3.	Cinética de crecimiento de <i>Serratia marcescens</i> PM3-8 .....	51
4.7.1.4.	Cinética de crecimiento de <i>Pseudomonas protegens</i> CHA0.....	53
4.7.1.5.	Cinética de crecimiento de la bacteria <i>Pseudomona veronii</i> RE4.....	54
4.7.2.	Establecer la capacidad antagonista de PGPR hacia <i>M. incognita</i> in vitro.....	56
4.7.2.1.	Ensayos antagonistas con Nematodos J2 (juveniles 2) .....	56

4.7.3.	Elaborar un modelo piloto de biofermentador de PGPR para su producción masiva.....	58
4.7.3.1.	Esquema del biofermentador.....	58
4.8.	DISCUSIÓN.....	59
4.8.1.	Cinética de crecimiento de PGPR en distintos medios de cultivo.....	59
4.8.2.	Ensayos antagonistas hacia M. incognita “ <i>in vitro</i> ”.....	60

## CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.7.	Conclusiones.....	63
5.8.	Recomendaciones.....	64

## CAPITULO VI. BIBLIOGRAFÍA

## CAPITULO VII. ANEXOS

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Cinética de crecimiento de *Enterobacter absuriae* PM3/14 en diferentes medios de cultivos, el eje de la (y)= Concentración celular; (x)= Horas transcurridas .....49
- Figura 2.** Cinética de crecimiento de *Acinetobacter calcoaceticus* PM2-12 en diferentes medios de cultivos, el eje de la (y)= Concentración celular; (x)= Horas transcurridas.....50
- Figura 3.** Cinética de crecimiento de *Serratia marescens* PM3/8 en diferentes medios de cultivos, el eje de la (y)= Concentración celular; (x)= Horas transcurridas.....52
- Figura 4.** Cinética de crecimiento de *Pseudomonas protegens* CHA0 en diferentes medios de cultivos, el eje de la (y)= Concentración celular; (x)= Horas transcurridas. ....53
- Figura 5.** Cinética de crecimiento de *Pseudomona veronii* RE4 en diferentes medios de cultivos, el eje de la (y)= Concentración celular; (x)= Horas transcurridas. ....55
- Figura 6.** Porcentaje de mortalidad con sobrenadantes a las 24 horas contra *M. incognita* J2. Los valores con letras similares no representan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ). Las barras indican el porcentaje de mortalidad correspondiente de cada tratamiento, las bacterias crecieron en dos medios diferentes. ....56
- Figura 7.** Porcentaje de mortalidad con sobrenadantes a las 48 horas contra *M. incognita* J2. Los valores con letras similares no representan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ). Las barras indican el porcentaje de mortalidad correspondiente de cada tratamiento, las bacterias crecieron en dos medios diferentes. ....57

<b>Figura 8.</b> Porcentaje de mortalidad con sobrenadantes a las 72 horas contra <i>M. incognita</i> J2. Los valores con letras similares no representan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ). Las barras indican el porcentaje de mortalidad correspondiente de cada tratamiento, las bacterias crecieron en dos medios diferentes. ....	58
<b>Figura 9.</b> Manguera de salida de aire. 3.- Filtro de Carbón activado. 4.- Varilla de cobre perforada encargada de oxigenación. 5.- Tanque (20 l de capacidad) 6.- Manguera de salida de gases producto de la fermentación 7.- Filtro antirretorno o Airlock.....	58

### ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Esquema del Análisis de Varianza de cinética de crecimiento bacteriana en distintos medios de cultivos alternativos.....	40
Tabla 2. Esquema de Tratamientos de la cinética de crecimiento bacteriana en distintos medios de cultivos alternativos .....	40
Tabla 3. Esquema del Análisis de Varianza de los ensayos antagonistas de PGPR contra <i>M. incógnita</i> in vitro .....	41
Tabla 4. Esquema de tratamientos para evaluación de ensayos antagonista con sobrenadantes bacterianos contra nematodos juveniles 2 (J2) de <i>M. incognita</i> en dos medios de cultivos.....	33
Tabla 5. Parámetros cinéticos de <i>Enterobacter absuriae</i> cepa PM3-14.....	49
Tabla 6. Parámetros cinéticos de <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> cepa PM2-12.....	51
Tabla 7. Parámetros cinéticos de <i>Serratia marescens</i> cepa PM3-8.....	52
Tabla 8. Parámetros cinéticos de <i>Serratia marescens</i> cepa PM3-8.....	54

Tabla 9. Parámetros cinéticos de <i>Pseudomona veronii</i> RE4.....	55
---	----

## INDICE DE ANEXOS

Anexo.1 Metodología para determinación de concentración celular y Densidad óptica ..	72
Anexo 2. Curva de calibración entre D.O. y UFC/ml de <i>Enterobacter absuriae</i> PM3-14.....	72
Anexo 3. Curva de calibración entre D.O. y UFC/ml de <i>Acinetobacter Calcoaceticus</i> PM2-12 .....	73
Anexo 4. Curva de calibración entre D.O. y UFC/ml de <i>Serratia Marescens</i> PM 3-8.....	73
Anexo 5. Curva de calibración entre D.O. y UFC/ml de <i>Pseudomona protegens</i> CHA0 .....	74
Anexo 6. Curva de calibración entre D.O. y UFC/ml de <i>Pseudomona Veronii</i> RE4.....	74
Anexo 7. Determinación de los parámetros cinéticos de las PGPR mediante software Statistica y modelo matemático de Gompertz.....	75
Anexo 8 . Proceso de Correlación entre O.D. y concentración celular .....	75
Anexo 9. Técnica de microgota en distintos medios de cultivo .....	76
Anexo 10. Placa de inhibición de <i>M. incognita</i> J2 .....	76
Anexo 11. Estimulación de nematodos con cabello (magnificación x 10) .....	77

Anexo 12. Efectos de las PGPR 72 horas después de la exposición a los extractos celulares obtenidos en Medio (3) (magnificación x 10) .....	77
Anexo 13. Instalación de biorreactor.....	78

## CÓDIGO DUBLÍN

Título:	“Evaluación de la cinética de crecimiento de PGPR y su actividad antagonista hacia <i>Meloidogyne incognita</i> “in vitro””		
Autor:	Rodríguez Acosta Jorge Luis		
Palabras clave:	Cinética de crecimiento , parámetros cinéticos	<i>Meloidogyne incognita</i> , PGPR, <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Eterobacter sp.</i> , <i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Serratia sp.</i> Biorreactor	Actividad antagonista
Fecha de publicación:			
Editorial:	Quevedo: UTEQ 2018		
Resumen: (hasta 300 palabras)	<p>El principal propósito de esta investigación fue de encontrar un medio de cultivo alternativo para la producción de PGPR que ejerzan un potencial control de de nematodos <i>M. incognita</i> , plaga de gran importancia en diversas especies de plantas en el país. Una de las principales limitantes para producción de biocontroladores es el alto costo de los medios de cultivo que se emplean en su producción así como la falta de información acerca de los parámetros cinéticos que son fundamentales para iniciar su producción a gran escala. En esta investigación fueron utilizadas PGPR aisladas de musas endémicas pertenecientes al laboratorio de Microbiología de la Universidad Técnica de Quevedo. Se determinó la cinética y parámetros de crecimiento en medio sintético King B y en tres medios de cultivo alternativo se obtuvo como resultado que el Medio (3) fue el más promisorio para la obtención de extractos celulares para realizar los ensayos antagonistas por presentar la mayor concentración celular entre los medios alternativos. Realizado los ensayos antagonistas con las PGPR se obtuvo los siguientes resultados: <i>P veronii</i> RE4 y <i>P. protegens</i> Cha0 en King B alcanzó el mayor porcentaje de mortalidad a <i>M. incognita</i> con 75,4 % a las 24 horas, a las 48 horas los tratamientos no presentaron diferencia estadística con porcentajes de control entre 87,8 y 61,3 %. A las 72 horas se destacó que no existió diferencia estadística entre las bacterias <i>P veronii</i> RE4 y <i>P. protegens</i> Cha0 crecidas en King B y Medio (3) con porcentajes de control entre 99,1 y 86,2 % lo cual indica que las concentraciones celulares obtenidas en un medio alternativo son suficientes para ejercer un control eficiente del nematodo <i>M. incognita</i> “in vitro”</p>		
Descripción:	Hojas : dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM 6162		
URI:			

## INTRODUCCIÓN

La determinación de la cinética de crecimiento de un microorganismo en particular, en este caso PGPR con actividad antagonista al nematodo agallador de raíces *Meloidogyne incógnita*, sirve como punto de partida para la producción de bacterias antagonistas a gran escala o con un enfoque industrial, ya que al estudiar su cinética de crecimiento se puede conocer factores como evolución de un cultivo, consumo de sustrato y acumulación de productos del cultivo.

La producción de PGPR con un enfoque masivo no busca solo obtener datos de crecimiento, sino más bien usar los modelos de crecimiento obtenidos en laboratorio para poder diseñarlos. Además, dichos modelos ayudaran a determinar el medio de cultivo más idóneo para ser usado en un biofermentador, y posteriormente usar el producto de la fermentación para ensayos antagonistas a nivel *in vivo* en cultivos de interés.

Los Nemátodos del género *Meloidogyne spp*, Al alimentarse del sistema de raíces afectan directamente la nutrición de la planta haciéndola más susceptible al ataque de otros patógenos. Además, estos tienen una expansión muy rápida debido a su corto ciclo de vida (alrededor de 28 días), su alta incidencia de infestación y su capacidad para reducir el rendimiento de los cultivos hasta en un 68%. Los daños causados no solo reducen el número de frutos de diversos cultivos, sino que también afecta la calidad de los mismos afectando los ingresos del agricultor, además de los reportes de resistencia a moléculas nematicidas toxicas para el medio ambiente

La importancia del uso de PGPR como biocontrolador hacia *Meloidogyne incognita* surge como una alternativa de control ante el uso de nematicidas químicos perjudiciales para el medio ambiente y la salud humana , además de estar respaldada dicha efectividad con diversos estudios realizados que corroboran el antagonismo por producción de metabolitos secundarios con actividad proteolítica o antibióticos además de favorecer el crecimiento de las plantas por la producción de fitohormonas aprovechables por las mismas .

## **CAPÍTULO I**

### **CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**

## **1.1. Problema de Investigación.**

### **1.1.1. Planteamiento del problema**

#### **1.1.1.1. Diagnóstico del Problema**

El desconocimiento de la cinética de crecimiento de PGPR con actividad antagonista, así como el alto costo de los medios de cultivo sintéticos para su producción masiva es un factor limitante para iniciar su producción a mayor escala.

El nematodo *Meloidogyne incógnita* ocasiona grandes pérdidas en diferentes cultivos, causando baja calidad, disminución de la productividad en los cultivos que infecta, llegando incluso en ocasiones a la pérdida total de las plantas.

El uso excesivo de nematicidas con el fin de minimizar los daños ocasionadas por nematodos agalladores, ha propiciado que el impacto ambiental sea cada vez mayor, debido a que los nematicidas químicos empleados en su mayoría no son selectivos contribuyendo a la contaminación de los recursos naturales, así como al desequilibrio microbiológico del suelo al afectar las poblaciones de los mismos.

#### **1.1.1.2. Planteamiento del Problema**

La falta de investigaciones que determinen la cinética de crecimiento de PGPR de interés, así como el deficiente estudio de medios de cultivo económicos para su producción masiva limita su producción a gran escala para posteriores ensayos a nivel in vivo.

#### **1.1.1.3. Formulación del Problema**

En base a la problemática abordada anteriormente se plantean las siguientes directrices:

- ¿En qué medio de cultivo alternativo se obtendrá una concentración celular más cercana al medio sintético?
- La concentración celular alcanzada en los medios alternativos ¿Serán suficiente para alcanzar un porcentaje de antagonismo mayor o igual a los extractos celulares obtenidos en King B?

- ¿Cuál de las PGPR y en qué medio de cultivo se presentará mayor efecto antagónico sobre nematodos *Meloidogyne incognita* en estadio J2 in vitro?

## **1.2. Objetivos**

### **1.1.2. Objetivo general**

Evaluar la cinética de crecimiento de PGPR en 4 medios de cultivo, base para su producción masiva y su actividad antagonista hacia *Meloidogyne incognita* “*in vitro*”

### **1.1.3. Objetivos específicos**

- Determinar la cinética de crecimiento de PGPR en distintos medios de cultivo.
- Establecer la capacidad antagonista de PGPR hacia *Meloidogyne incognita* in vitro.
- Elaborar un modelo piloto de biofermentador de PGPR para su producción masiva.

### 1.3. Justificación

El conocimiento de la cinética de crecimiento de microorganismos de interés, como PGPR ayuda a obtener datos de importancia tales como evolución de cultivo, consumo de sustrato, acumulación de productos del cultivo, comparación de crecimiento en distintos medios los cuales posibilitan la producción a mayor escala.

El empleo de PGPR minimiza o reduce el impacto que tiene el uso de nematicidas químicos, ya que poseen capacidad antagonista hacia un amplio rango de patógenos, entre ellos el nematodo *Meloidogyne incognita* por la producción de metabolitos secundarios además de la producción de fitohormonas que favorecen el desarrollo de las plantas.

Esta investigación pretende la utilización de PGPR como biocontroladores ya que estos se presentan como una opción viable para el control de *Meloidogyne incognita* así también como promotores del crecimiento de las plantas sin alterar el equilibrio microbiológico del suelo, además esta investigación sirve como punto de partida para llegar a la aplicación de biocontroladores a nivel de campo y así contribuir a solucionar los problemas que los agricultores presentan en dicha área.

## **CAPITULO II**

# **FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN**

## 2.1. Marco conceptual

### 2.1.1. Requerimientos nutricionales para microorganismos

Los microorganismos requieren una serie nutrientes para su desarrollo, crecimiento y formación de nueva biomasa. Estos nutrientes pueden ser los macronutrientes, que son requeridos en grandes cantidades, como C, N y P; y micronutrientes que se requieren en pequeñas cantidades como el K, Cu, Ni y Mo (Atlas & Bartha, 2001).

Para el cultivo de los microorganismos es importante proveer una fuente de nitrógeno, como el amonio, el nitrato o aminoácidos. El nitrógeno es utilizado por las bacterias para formar aminoácidos y bases nitrogenadas, entre otras moléculas ( Sylvie, D., Fuhrmann, J., Hartel, P., & Zuberer, D. 2005).

De igual forma, elementos como P, S, K y Mg, son requeridos por los microorganismos para la síntesis de moléculas, como ácidos nucleídos, vitaminas, coenzimas, entre otras. Además, desempeñan funciones importantes como cofactores enzimáticos, como es el caso de Mg (Madigan, Martiko, & Parker, 2001).

Elementos como el Cu, Ni, Cr, Mn, Mo, Se y Zn se conocen como micronutrientes o elementos traza, que son requeridos en bajas concentraciones y desempeñan un rol estructural en las enzimas; por ejemplo, el  $\text{Mo}^{6+}$  se necesita en la nitrogenada que es el enzima que cataliza la conversión del nitrógeno atmosférico en amoníaco en la fijación biológica de nitrógeno.(Atlas & Bartha, 2001)

Los microorganismos como cualquier ser vivo, requieren de una serie de sustancias que les permitan realizar sus funciones metabólicas; básicamente lo que necesitan es:

- Agua
- Energia
- Carbono
- Nitrogeno
- Minerales
- Vitaminas

- Oxígeno (en el caso de los aerobios) (Hernández, Alfaro, & Arrieta, 1988)

La mayoría de los microorganismos de importancia industrial son organotrofos y aprovechan los compuestos de carbono (carbohidratos , lípidos y proteínas ) como fuente de energía ( Hernández, Alfaro, & Arrieta, 1988).

### 2.1.1.1. Fuente de Carbono

El carbono interviene en la composición de los seres vivos y forma parte de la atmósfera, hidrosfera y litosfera. En la atmósfera se encuentra mayoritariamente en forma de anhídrido carbónico (CO<sub>2</sub>), que constituye el 0.03% de la misma. En la hidrosfera, el carbono se encuentra en forma de ion bicarbonato (HC –O<sub>3</sub>) y de ion carbonato (C 2-3 O). En la litosfera se encuentra en tres maneras diferentes: formando rocas carbonatadas, silicatos cálcicos o en forma de combustibles fósiles (Navarro & Navarro, 2000).

El carbono se transfiere por el CO<sub>2</sub> de la atmosfera mediante el proceso de la fotosíntesis y vuelve a ella a través de la respiración de los animales, este compuesto es utilizado como fuente de energía y en la formación de moléculas , en el caso de muchos heterótrofos, difiriendo en la concentración y tipo de compuestos orgánicos que necesitan como fuente de carbono de acuerdo a su metabolismo(Madigan et al., 2001).

Compuestos como los aminoácidos, ácidos grasos y compuestos aromáticos pueden ser usados por los microorganismos como fuente de carbono (Latorre, 2007).

Las más empleadas fuentes de carbono las constituyen los carbohidratos que además son fuente de oxígeno, hidrogeno y energía metabólica .Los carbohidratos participan en la biosíntesis del material celular así como en la formación de productos o metabolitos ( Hernández et al.,1988).

Los microorganismos suelen clasificarse en base a su capacidad para asimilar el carbono en:

- **Autotrofos** .- su única fuente de Carbono es el CO<sub>2</sub>
- **Heterotrofos** .-Los compuestos orgánicos constituyen su fuente de carbono , son los de mayor importancia comercial (Hernández et al., 1988).

### **2.1.1.2. Fuente de nitrógeno**

Después del carbono y el oxígeno, el nitrógeno es el elemento más abundante en la composición de los microorganismos. Algunos son capaces de utilizar el nitrógeno de origen orgánico (el que se encuentra en los aminoácidos, las proteínas, la urea, las pirimidinas y las purinas), mientras que otros utilizan el nitrógeno inorgánico

A escala industrial se utilizan fuentes complejas de nitrógeno como, por ejemplo; el licor de la maceración de maíz, la harina de soya, los frijoles de soya, extractos de levadura, harina de maíz, salvado de arroz entre otros (Hernández, Alfaro, & Arrieta, 1988)

### **2.1.2. Medio de cultivo King B o *Pseudomonas* Agar B**

Es un Medio de cultivo utilizado para el aislamiento, la detección y la diferenciación de especies de *Pseudomonas* en base a la producción de fluoresceína, es también conocido como medio King B y Flo Agar. (King, Ward, & Raney, 1954)

#### **2.1.2.1. Composición**

- Tripteína
- Peptona de carne
- Fosfato Dipotásico
- Sulfato de Magnesio
- Agar

#### **2.1.2.2. Funcionamiento**

En este medio de cultivo, la tripteína y la peptona de carne aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la glicerina favorece la producción de pigmentos, la concentración de fosfato dipotásico estimula la producción de fluoresceína e inhibe la producción de piocianina y piorrubina. El sulfato de magnesio provee los cationes necesarios que incrementan la producción de fluoresceína y el agar es el agente solidificante. (King, et al., 1954)

### **2.1.3. Medios de cultivo alternativo**

El crecimiento de los microorganismos no se puede estudiar individualmente debido a su tamaño tan pequeño, por lo que es necesario recurrir a medios nutritivos artificiales donde se los pueda estudiar (Olivas E. Evangelina, 2004).

Normalmente se utilizan medios sintéticos de alta pureza y alto costo, los cuales, para la producción masiva de determinado microorganismo de interés resulta en algo no viable económicamente. Esto hace conveniente analizar la sustitución de estas materias primas por equivalente de menor costo, tomándose en cuenta que la menor pureza de los constituyentes del medio puede ocasionar variaciones en el proceso en ocasiones de manera positiva (Quintero Ramírez & López-Munguía Canales, 1993).

La importancia de la sustitución de los medios sintéticos por medios de bajo costo radica en que estos suelen representar entre el 50 y el 70% de los costos de producción (Quintero Ramírez & López-Munguía Canales, 1993).

### **2.3.2. Melaza de caña de azúcar**

La melaza, subproducto del proceso de refinación del azúcar, constituye una fuente rica de carbono (Osorio, Gómez, & Sánchez, 2008). Las melazas, mieles finales o melazas “blackstrap”, suele ser definidas, por muchos autores como los residuos de la cristalización final del azúcar de los cuales no se puede obtener más azúcar por métodos físicos (Fajardo & Sarmiento, 2007).

La melaza contiene componentes fermentables como la glucosa, sacarosa, fructosa y rafinosa, así mismo, contiene componentes no fermentables como los caramelos libres de nitrógeno, que se obtienen por el calentamiento en el proceso de la obtención de azúcar refinada (Fajardo & Sarmiento, 2007).

Ya hay reportes sobre el potencial uso de la melaza como nematostático, incluso, además de reducir la población de nematodos en el suelo, produce un aumento significativo en el rendimiento de cultivos como el tomate (Santana, Y., Busto, A., Aguiar, I., & Palomino, L. 2010.)

Por otra parte, el uso de esta Permite incorporar nutrientes al suelo y mediante su descomposición se liberan sustancias que tienen efecto nematocida. Además, se estimula la actividad microbiana del suelo, favoreciendo la presencia de microorganismos antagonistas de *Meloidogyne* spp. (Santana, Busto, Aguiar, & Palomino. 2010.)

### **2.3.2. Curva de crecimiento microbiano**

La curva del crecimiento microbiano representa la evolución del número de células viables presente en un cultivo microbiano líquido a lo largo del tiempo de estudio. Se estudia el número de células viables por mililitro de un cultivo de volumen limitado y con una cantidad de nutrientes limitada, como por ejemplo un medio de cultivo líquido en un matraz que ha sido inoculado con una cantidad inicial de microorganismos o inóculo

En la curva de crecimiento se diferencian cuatro fases, la fase de retraso (a veces llamada fase de latencia), la fase de crecimiento exponencial o logarítmico, la fase estacionaria y la fase de muerte celular

De las cuatro fases de la curva de crecimiento, habitualmente la fase de crecimiento exponencial o logarítmico es la que presenta mayor interés por ser la fase en la que el incremento del número de microorganismos es máximo. Durante esta fase el tiempo de generación ( $g$ ) de los microorganismos (el tiempo que la población de microorganismo necesita para duplicar su número) se mantiene constante (Universidad del País Vasco, 2014)

Cuando una fracción de células de un cultivo puro es inoculada en un determinado volumen de medio fresco Después de una incubación, se produce un incremento de la biomasa hasta un valor máximo denominado crecimiento total. Este crecimiento se da debido a la auto duplicación celular (Parés I. Farrás, 1997).

Para cuantificar el aumento del número de células de la población, es importante limitarse a microorganismos que se dividen por división binaria, tal y como sucede con la mayoría de las bacterias y se lo suele aplicar a hongos y levaduras (Parés I. Farrás, 1997).

Todo el proceso de determinación de cinética de crecimiento y parámetros cinéticos se hace con el objetivo de producción a gran escala, esta tiene lugar en grandes tanques

denominados fermentadores con volúmenes de hasta 1000m<sup>3</sup>, y generalmente aeróbicos, con sistemas de aireación para mantener una concentración constante de oxígeno adecuada para el crecimiento del organismo. Los medios de cultivo suelen contener sales inorgánicas y materias primas renovables a veces procedentes de residuos de las industrias azucareras y alimentarias, como melazas, almidón, granos de soya, productos solubles de destilería entre otras. Dado que lo que se busca es el máximo rendimiento y menores costes de producción.(Castillo Rodríguez & Roldán Ruiz, 2005)

### **2.3.3.Nematodo *Meloidogyne incognita***

#### **2.3.3.1. Taxonomía**

- Reino: *Animalia*
- Filo: *Nematoda*
- Clase: *Secernentea*
- Orden: *Tylenchida*
- Familia: *Heteroderidae*
- Género: *Meloidogyne*
- Especie: *M. incognita*

#### **2.3.3.2. Generalidades**

Los nematodos formadores de agallas (*Meloidogyne spp.*) constituyen una de las plagas más importantes que afectan el cultivo de hortalizas debido a las pérdidas que provocan anualmente ( Santana et al., 2010).

*Meloidogyne spp.* es uno de los géneros de nematodos más importantes debido a las pérdidas que produce en los cultivos, ya que induce alteraciones en las raíces provocando agallas (Doucet, 1993). Para esto, rompe las células de la planta, disuelve las paredes celulares o induce cambios fisiológicos en los tejidos radicales como resultado de la inyección de sustancias fitotóxicas a través de su estilete. Este órgano induce a deformaciones a nivel radicular y obstrucción del transporte de sabia debido a la hipertrofia e hiperplasia causada a nivel radicular (Melakeberhan & Ferris, 1989).

### **2.3.3.3. Biología**

Generalmente pasan el invierno en suelo en forma de huevos. En primavera conforme la temperatura del suelo se incrementa, los juveniles de segundo estado J2s, eclosionan, emigran a través del suelo y penetran en las raíces de las plantas hospedadoras, donde establecen sitios de alimentación. Durante el crecimiento, los juveniles van engrosando y mudando hasta convertirse en hembras adultas o machos (Rubia, 2003).

Las hembras son redondeadas e inmóviles, los machos filiformes y generalmente abandonan la raíz pues no se alimentan. Las hembras producen hasta 3000 huevos envueltos en una masa gelatinosa. Generalmente los nemátodos agalladores completan su ciclo en menos de un mes dependiendo de la temperatura del suelo y por tanto puede tener varias generaciones durante un cultivo (Rubia, 2003).

### **2.3.3.4. Síntomas**

Como otros muchos nematodos no causan síntomas característicos en el follaje de la planta. Las plantas infectadas por *Meloidogyne spp.* Muestran amarillamientos, marchitamientos y reducciones en la producción.

La infección de las raíces produce engrosamientos característicos o agallas que pueden ser de varios tamaños dependiendo del número de hembras que alberguen (Rubia, 2003).

### **2.3.3.5. Control**

En primer lugar, es necesaria la prevención de la entrada del nematodo, pues una vez éste se ha establecido es virtualmente imposible erradicarlo, por lo que es importante el uso de semilla y plántones certificados y material limpio de nematodos. Aquellas parcelas en las que se encuentre *Meloidogyne* deberían mantenerse al margen de la producción hortícola por un periodo entre 2 y 4 años.

Cultivos no hospedadores o resistentes pueden cultivarse para reducir las poblaciones. Las malas hierbas deben ser eliminadas para evitar que sirvan como hospedadores alternativos a los nematodos. En general, aquellas parcelas donde se vayan a cultivar hortícolas

Susceptibles al nematodo deberían ser analizadas regularmente para la presencia de nematodos agalladores. Si los niveles detectados están por encima del umbral económico de daño se recomienda el uso de un nematicida (Rubia, 2003).

El control químico ha sido el método utilizado con mayor frecuencia, pues es indudable el efecto eficaz que estos productos tienen sobre las diferentes especies de nematodos fitoparásitos. Sin embargo, su empleo ha sido restringido, y en muchos países prohibido, por los efectos nocivos al ambiente y la salud humana, así como el deterioro de la capa de Ozono (Santana et al., 2010).

#### **2.3.4. Rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas (PGPR) en la agricultura**

El uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR (por sus siglas en inglés Plant Growth Promoting Rhizobacteria) representa una estrategia biotecnológica sostenible para contrarrestar los efectos detrimentales del uso exagerado de fertilizantes químicos y pesticidas en la agricultura, ya que otorgan beneficios a las plantas como la movilización de nutrientes y la producción de reguladores del crecimiento vegetal, entre otros (Soto, 2013).

Las rizobacterias son una alternativa que ha demostrado no generar resistencia en los fitopatógenos. Cepas de *Pseudomonas* cumplen un rol importante en el biocontrol, por su amplia diversidad de compuestos bioactivos hacia el control de patógenos de plantas (Canchignia, Cruz, Barrera, & Peñafiel 2015).

Las PGPR están asociadas con las raíces de las plantas y aumentan la productividad y la inmunidad de las plantas; sin embargo, el trabajo reciente de varios grupos muestra que PGPR también provoca la llamada "tolerancia sistémica inducida" a la sal y la sequía (Yang, Kloepper, & Ryu, 2009).

PGPR también podría aumentar la absorción de nutrientes de los suelos, reduciendo así la necesidad de fertilizantes y evitando la acumulación de nitratos y fosfatos en los suelos agrícolas (Yang et al., 2009).

El rendimiento de PGPR ha sido exitoso contra ciertas plagas de patógenos, insectos y nematodos bajo condiciones de campo (Ramamoorthy, Raguchander, & Samiyappan, 2002).

Aunque los intentos de utilizar PGPR para el control de nematodos son limitados, se ha informado del uso de agentes de control biológico de PGPR de nematodos fitoparásitos, especialmente para remolacha azucarera y nematodos del quiste de la patata (Ramamoorthy et al., 2002).

#### **2.3.4.1. *Pseudomonas* spp.**

Rizobacterias del género *Pseudomonas* se han estudiado como agentes importantes de biocontrol por su capacidad de inhibición en el crecimiento de ciertos patógenos, como bacterias, hongos, nematodos y virus, los cuales podrían llegar a reducir considerablemente las cosechas en los cultivos establecidos tanto en invernadero como en campo (Bunterngsook et al., 2012).

Estos organismos ejercen ciertos mecanismos de acción antagonista que involucran la producción de compuestos bacterianos, como sideróforos, ácido cianhídrico (HCN) y antibióticos (Bunterngsook et al., 2012).

En cuanto al control de nematodos, cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *P. putida* han demostrado actividad antagonista contra *Radopholus similis* y *Meloidogyne* spp. en banano, maíz y tomate (Becker et al., 1988).

Por otra parte, se ha comprobado que en algunos casos inducen un sistema de resistencia en las plantas que hace que puedan tolerar el ataque de diversos patógenos del suelo, este fenómeno se reconoce como Resistencia sistémica inducida el cual es un fenómeno de prealerta por parte de la planta mediante la activación de genes de defensa la cual ocurre por la ruta del metil jasmonato. (Kloepper & Ryu, 2006).

Un aislamiento endofítico de *P. aeruginosa* produjo compuestos tóxicos in vitro que resultó en alta mortalidad de los estadios juveniles de *M. javanica* (Ali Siddiqui & Ehteshamul-Haque, 2001).

Asimismo, el compuesto 2,4- diacetylpholoroglucinol producido por *P. fluorescens* redujo la eclosión de huevos de *M. javanica*. Cabe mencionar que la respuesta de los nematodos a los antibióticos varía entre especies (Siddiqui & Shaukat, 2003).

#### **2.3.4.2. *Enterobacter* spp.**

Cepas del género *Enterobacter* interactúan y ejercen beneficiosos efectos sobre el crecimiento de las plantas.

El fomento del crecimiento de las plantas los efectos de las bacterias beneficiosas pueden ocurrir a través de mecanismos directos o indirectos que incluyen la producción de fitohormonas o enzimas que promueven el crecimiento de las plantas, aumento de la absorción de nutrientes y prevención de daños fitopatógenos incluido nematodos (Glick, Paten, Holguin & Penrose 1999).

Inclusive, cepas de *Enterobacter absuriae* y *Enterobacter cloacae* pueden degradar compuestos insecticidas organoclorados como el Endosulfan ,además *Enterobacter absuriae* JAS5 y E. JAS7 cepas también mostraron la capacidad de los rasgos que promueven el crecimiento de las plantas, como la producción de ácido indol-3-acético (IAA), producción de ácidos orgánicos y solubilizarían de diversos fosfatos inorgánicos (Abraham & Silambarasan, 2015).

#### **2.3.4.3. *Acinetobacter* spp.**

*Acinetobacter* es un género bacteriano omnipresente ampliamente distribuido en ambientes de suelo y agua y actualmente incluye 17 especies válidamente descritas y 14 especies genómicas sin nombre (Gerischer, 2008).

Un aislado recientemente identificado de esta especie a partir de una muestra de tejido vegetal de escarcha, a saber, *Acinetobacter johnsonii* MB44, mostró una actividad nematicida significativa contra el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Tian, Ali, Xie, & Li, 2016).

Técnicas moleculares corroboran que la actividad nematicida está relacionada a un total de 108 proteínas de virulencia potenciales además de un grupo de genes de biosíntesis de sideróforos y polisacárido capsular (Tian et al., 2016).

Además *Acinetobacter calcoaceticus* es un Novedosa PGPR por su capacidad para promover el crecimiento de las plantas causando una mejora por ABA y GAs endógenos,

aminoácidos y crudo Además de la producción de varios giberlinas fisiológicamente activas e inactivas (Kang et al., 2012).

#### **2.3.4.4. *Serratia* spp.**

*Serratia* spp. es un bacilo gramnegativo de la familia *Enterobacteriaceae*. Existen estudios donde *Serratia marcescens* actúan como PGPR para activar el crecimiento en plantas para el control de *P. parasitica* en cítricos, donde redujo el 50% de la incidencia al activar la ISR de la planta (Queiroz & Melo, 2006).

Rizobacterias del género *Serratia* han sido eficientes para reducir poblaciones de nematodos parásitos de plantas. Algunas especies pueden producir un pigmento rojo llamado prodigiosina que ha mostrado ser antagonista de diferentes organismos (Valdez, 2016).

La evidencia hasta la fecha ha demostrado que *S. marcescens* es capaz de inducir el crecimiento de las plantas y suprime *P. parasitica*, y también de establecerse en la rizosfera. Por lo tanto, todos estos criterios lo convierten en un potencial agente de control biológico (Queiroz & Melo, 2006).

## **CAPÍTULO III**

# **MÉTODOLÓGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

### **3.3. Localización del Experimento**

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), localizado en el campo universitario “Manuel Haz Álvarez” ubicado en el km 1.5 vía Quevedo – Santo Domingo. Las coordenadas geográficas 01° 00 ' 737 " de latitud Sur y 79° 28 ' 162 " de longitud Occidental, ubicada a una altura de 73 msnm

### **3.4. Tipo de Investigación**

Se empleó el método empírico-analítico que parte de la experimentación y lógica empírica apoyado de la información bibliográfica y antecedentes relacionados a la determinación de cinética de crecimiento de microorganismos y antagonismos de estos contra *M. incógnita*.

### **3.5. Método de la Investigación**

Se utilizó el método comparativo, donde se comparó información existente en la literatura e investigaciones previas sobre agentes antagonistas, dicho método fue utilizado para la identificación de los medios de cultivos donde las PGPR posean un mayor desarrollo y porcentaje de mortalidad contra el nematodo *M. incógnita*.

### **3.6. Fuente de recopilación de información**

La información recopilada se la obtuvo a partir de revistas científicas, libros, boletines, etc., así mismo la información recopilada en la investigación se la realizó por registro de datos.

### **3.7. Instrumentos de la investigación**

#### **3.7.1. Materiales de Laboratorio**

- Puntas Blancas de micro-pipeta (0.2-10 $\mu$ l)
- Puntas amarillas de micro-pipeta (2-20 $\mu$ l y 20-200  $\mu$ l)
- Puntas azules de micro-pipeta (100-1000 $\mu$ l)
- Papel Toalla
- Papel Kleenex

- Botellas esterilizables de 500 ml
- Vidrio de reloj
- Juego de Micro-pipetas (0.2-10 $\mu$ l, 2-20 $\mu$ l, 20-200 $\mu$ l y 100-1000 $\mu$ l)
- Tamices (criba de 475 $\mu$ m, 90 $\mu$ m y 25 $\mu$ m)
- Frascos Chopp de vidrio (500 ml)
- Tubos de Eppendorf (0.6 ml y 1.5 ml)
- Tubo PCR individual 0.2 ml. Cs/1000.
- Papel Parafilm
- Vasos de precipitación (50 ml, 250 ml y 500ml)
- Cajas Petri
- Guantes Quirúrgicos talla M
- Sacabocado
- Piceta de 500 ml
- Tijeras Quirúrgicas
- Frascos de vidrio tapa amarilla de 250 ml
- Embudos simples de vidrio
- Llave de paso metálica

### **3.7.2. Equipos de laboratorio**

- Balanza de 0,001 gr
- Cámara de flujo Laminar
- Microscopio
- Cámara de microscopio
- Microondas
- Licuadora
- Nevera
- Vortex
- Destilador de agua
- Autoclave
- Estufa
- Centrifuga

- UV transiluminador
- Incubadora
- Agar noble
- Agua ultra pura
- Agua miliq
- Cloro
- Etanol 95%
- King B
- Sulfato de magnesio hepta-hidratado
- Bacto™ Peptona
- Fosfato de Potasio Dibásico
- Glicerol

### **3.7.3. Materiales de Oficina**

- Cuaderno
- Computador
- Lapicero
- Lápiz
- USB – Pendrive
- Escritorio
- Silla

### **3.7.4. Material Genético**

Para los ensayos antagonistas in-vivo se utilizaron PGPR de los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia* y *Enterobacter*.

- *Pseudomonas protegens*, cepa CHA0
- *Pseudomonas veroni* cepa RE4
- *Enterobacter absuriae* cepa PM3-14
- *Acinetobacter calcoaceticus* cepa PM2-12
- *Serratia Marescesens* cepa PM3-8

### 3.8. Diseño de la Investigación

#### 3.8.1. Diseño para determinación de cinética de crecimiento en distintos medios de cultivo

Para la evaluación del crecimiento de las bacterias (5) en los medios de cultivo (4), se empleó el diseño completamente al azar con arreglo factorial 4x5 considerando el factor A los medios de cultivo y el factor B constituido por las Rizobacterias.

Con la combinación de los dos factores se establecieron 20 tratamientos en tres repeticiones. Todas las variables fueron sometidas a la prueba de Duncan al 95% de probabilidad para establecer la diferencia entre las medias de los tratamientos.

**Tabla 1.** Esquema del Análisis de Varianza de cinética de crecimiento bacteriana en distintos medios de cultivos alternativos.

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	59
Tratamientos	19
Error	40

- **Tratamientos de cinética de crecimiento en varios medios de cultivos alternativos y el control**

**Tabla 2.** Esquema de Tratamientos de la cinética de crecimiento bacteriana en distintos medios de cultivos alternativos

TRATAMIENTOS	
1	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 + King B
2	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 + Medio 1
3	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 + Medio 2
4	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 + Medio 3
5	<i>Pseudomonas veroni</i> RE4 + King B
6	<i>Pseudomonas veroni</i> RE4 + Medio 1

7	<i>Pseudomonas veroni</i> RE4 + Medio 2
8	<i>Pseudomonas veroni</i> RE4 + Medio 3
9	<i>Enterobacter asburiae</i> PM3-14 + King B
10	<i>Enterobacter asburiae</i> PM3-14 + Medio 1
11	<i>Enterobacter asburiae</i> PM3-14 + Medio 2
12	<i>Enterobacter asburiae</i> PM3-14 + Medio 3
13	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> BMR2-12 +King B
14	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> BMR2-12 +Medio 1
15	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> BMR2-12 +Medio 2
16	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> BMR2-12 +Medio 3
17	<i>Serratia marcescens</i> PM3-8 + King B
18	<i>Serratia marcescens</i> PM3-8 + Medio 1
19	<i>Serratia marcescens</i> PM3-8 + Medio 2
20	<i>Serratia marcescens</i> PM3-8 +Medio 3

---

### 3.8.2. Diseño para ensayos antagonistas de las PGPR'S contra *Meloidogyne incógnita* in vitro

Se empleó un diseño completamente al azar DCA, evaluando 12 tratamientos en cuatro repeticiones. Todas las variables a evaluar fueron sometidas al análisis de varianza y a la prueba de Duncan al 95% de probabilidad para establecer la diferencia entre las medias de los tratamientos.

**Tabla 3.** Esquema del Análisis de Varianza de los ensayos antagonistas de PGPR contra *M. incógnita* in vitro

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	47
Tratamientos	11
Error	36

- **Tratamientos para evaluación de ensayos antagonistas con sobrenadantes bacterianos contra nematodos juveniles (J2) *M. incognita* en dos medios de cultivo**

**Tabla 4.** Esquema de tratamientos para evaluación de ensayos antagonista con sobrenadantes bacterianos contra nematodos juveniles 2 (J2) de *M. incognita* en dos medios de cultivos

<b>TRATAMIENTOS</b>	
1	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 + King B
2	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 + Medio 3
3	<i>Pseudomonas veroni</i> RE4 + King B
4	<i>Pseudomonas veroni</i> RE4 + Medio 3
5	<i>Enterobacter asburiae</i> PM3-14 + King B
6	<i>Enterobacter asburiae</i> PM3-14 + Medio 3
7	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> BMR2-12 + King B
8	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> BMR2-12 + Medio 3
9	<i>Serratia marcescens</i> PM3-8 + King B
10	<i>Serratia marcescens</i> PM3-8 + Medio 3
11	Control + King B
12	Control + Medio 3

### **3.9. Manejo del experimento**

#### **3.9.1. Determinar la cinética de crecimiento de PGPR en distintos medios de cultivo**

##### **a) Preparación de Pre-inóculo en medio King B**

Para la preparación del pre inóculo se procedió a tomar con ayuda de una micropipeta de precisión 20 µl de las PGPR en estudio contenidas en el banco de germoplasma del

laboratorio de microbiología molecular de la UTEQ y se procedió a incubar en un matraz Erlenmeyer conteniendo 50 ml de medio de cultivo King B líquido, (King *et al.* 1954) [(g/L): peptona, 20.0; glicerol, 15 ml; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5; MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 1.5; agua destilada (pH 7.2)], esto se incubo en un shaker Benchmark incushaker® a 150 rpm en agitación constante a 26 °C por 16 horas.

**b) Medición de la Densidad óptica(OD) y unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml) de PGPR en medio King B**

Del pre inoculo obtenido en el punto anterior, se tomó con una micropipeta de precisión 1 ml de cada una de las bacterias y se colocaron individualmente en un matraz Erlenmeyer con 99 ml de medio de cultivo King B (1% v/v), (King *et al.* 1954) [(g/L): peptona, 20.0; glicerol, 15 ml; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5; MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 1.5; agua destilada (pH 7.2)], este procedimiento se repitió para cada una de las bacterias en estudio.

Se incubaron las bacterias a 26<sup>0</sup> C a 150 rpm en un shaker Benchmark incushaker® y se determinó la O.D. (Densidad óptica) y la concentración celular o células por mililitro (UFC unidades formadoras de colonia/ml) con intervalos de dos horas durante 24 horas.

La O.D. se determinó mediante el uso de un espectrofotómetro marca Unico® bw-54 a 600 nm de longitud de onda (OD<sub>600</sub> nm), se utilizaron cubetas de cuarzo en las cuales en una cabina de flujo laminar se colocaron con la ayuda de una micropipeta 3 ml de la muestra del medio incubado, usando como control medio de cultivo King B sin inoculante. Se repitió este proceso para cada una de las bacterias en estudio.

Debido a que la determinación de la O.D. es un método indirecto que solo indica la presencia de crecimiento bacteriano pero no así la concentración celular, se realizó conteo de microorganismos viables en placa o determinación de las UFC/ml (unidades formadoras de colonia por mililitro), el cual se determinó mediante el método de recuento en placa por siembra de gotas en superficie descrito por (Miles y Misra, 1938; Sharpe y Kilsby, 1971) o técnica de la microgota, para lo cual se preparó una serie progresiva de diluciones, en donde se colocaron 270 µl de H<sub>2</sub>O estéril y 30 µl del cultivo incubado en tubos eppendorf , y se repitió este procedimiento hasta el factor de dilución -6.

Las placas fueron divididas en 6 sectores numerados donde se colocó cada una de las diluciones. Se surtieron 10 µl distribuidos en microgotas de cada una de las diluciones en una placa petri conteniendo 20 ml de medio de cultivo King B solido (King *et al.* 1954) [(g/L): peptona, 20.0; glicerol, 15 ml; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5; MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 1.5; agua destilada, agar 15.0 (pH 7.2)].

La microgota se colocó desde una altura de 2,5 cm; y se dispersó aproximadamente en un área de 1.5 a 2.0 cm de diámetro. Este procedimiento se lo realizó por triplicado, las placas se las dejó en incubación por 24 horas y se realizó el conteo de colonias en las diluciones que formaron entre 30 y 300 colonias. Para determinar el número de células viables por ml se usó la siguiente formula:

$$UFC/ml = \frac{\text{Colonias enumeradas}}{\text{ml sembrados}} \times \text{Factor de dilucion}$$

Se realizó la cinética de crecimiento en función de la O.D. , UFC/ml y las horas transcurridas, se correlacionaron los valores obtenidos entre los dos parámetros cinéticos empleados y mediante el método de mínimos cuadrados con el programa estadístico Excel 2013 se procedió a la elaboración de una curva de calibración entre ambos parámetros cinéticos.

Mediante el software Statistica six sigma y con el uso del modelo de la ecuación de Gompertz se determinó parámetros cinéticos como: velocidad específica de crecimiento ( $\mu$  max) tiempo de generación(G), y duración de la fase de latencia ( $\lambda$ ), Además de la concentración celular durante la fase estacionaria. Este proceso se repitió para cada una de las bacterias en estudio

### c) **Elaboración de medios alternativos para el desarrollo de la PGPR**

Se procedió a realizar diferentes medios de cultivos en base a los requerimientos nutricionales de la PGPR, se realizó tres medios de cultivos descritos a continuación:

#### **Medio 1**

- Melaza: 1% (P/V)
- Agua de arroz: 0,25%
- fosfato de potasio Dibásico: 0,75g/l

- Sulfato de magnesio: 0,75g/l
- Ph inicial: 6,52

### **Medio 2**

- Melaza: 0,5% (P/V)
- Agua de arroz: 0,50%
- sal en grano: 0,50%
- glicerina: 15ml/l
- Ph inicial: 7.5

### **Medio 3**

- Melaza: 5%(P/V)
- Harina de maíz: 20g/l
- Sal en grano: 0,50%
- Glicerina: 15ml/l
- Ph inicial: 6,5

Se determinó parámetros cinéticos al igual como se hizo en el medio de cultivo King B para todos los medios alternativos y con cada una de las bacterias. Los valores de cada uno de los parámetros cinéticos fueron sujetos a ANOVA incluido los obtenidos en medio de cultivo King B y los promedios fueron separados por Tukey (nivel de significancia del 5%).

### **3.9.2. Establecer la capacidad antagonista de PGPR hacia *Meloidogyne incognita* “in vitro”.**

#### **a) Preparación de placas de inhibición con sobrenadantes bacterianos.**

Los aislados bacterianos se incubaron en King B líquido y en el medio alternativo que mayor concentración celular presento con respecto a los demás, durante el tiempo que tardaron en llegar a fase estacionaria de acuerdo al objetivo anterior.

Se colocó el producto de incubación en tubos falcon y Con ayuda de una centrifuga a 13000 rpm se procedió a la obtención del sobrenadante de cada una de las bacterias.

Tres Tapas de tubos eppendorf de 1,5 ml fueron adheridas a placas de petri de 9mm de diámetro con ayuda de pegamento instantáneo, las placas fueron envueltas con papel aluminio y esterilizadas en autoclave durante 2 horas a 121 C° cada placa se la considera como una unidad experimental con 3 sub unidades experimentales.

#### **b) Evaluación de la Mortalidad Nematodos J2 (%)**

Se tomaron plantas de tomate de la plataforma de reproducción de *Meloidogyne incógnita* del laboratorio de microbiología de la UTEQ. Previo a la extracción de los nematodos las raíces fueron lavadas con agua destilada por triplicado con el objetivo de eliminar el exceso de suelo .

Con ayuda de un estereoscopio (10X) se capturaron masas de huevos desde las raíces con jeringas de insulina estériles, cinco masas de huevos de *M. incognita* se ubicaron dentro de tubos eppendorf de PCR con 100 µl de agua estéril, estas se dejaron en incubación a 28 grados centígrados.

A los 6 días se recuperó 5 µl el cual contenía en promedio 20 nematodos en estadio J2 los cuales fueron homogenizados en 145 µl de agua estéril y transferidos con una micropipeta a cada uno de las tapas de los tubos eppendorf de 1 ml previamente esterilizados en autoclave , las cuales se encontraban adheridas mediante pegamento instantaneo por triplicado en las placas Petri.

Se obtuvieron los sobrenadantes bacterianos de cada una de las bacterias, se utilizaron al 10% de concentración y se procedió a dejar en incubación a 28 °C para su posterior evaluación a las 24, 48 y 72 h. Luego de este periodo se procedió a la evaluación , se esperó 10 minutos bajo observación del microscopio y se estimuló cada uno de los nemátodos con una fibra de cabello de brocha para verificar su movilidad y confirmar la muerte delos mismos .

Los nematodos degradados y los que aparentemente estaban íntegros pero que no reaccionaban ante los estímulos con la cerda de brocha y carecían de movilidad se los consideró como muertos.

### **3.9.3.Elaborar un modelo piloto de biofermentador de PGPR para su producción masiva.**

#### **a) Diseño de Biofermentador**

Se tomó un recipiente de 20 litros de capacidad, se realizó dos perforaciones de 1,5 cm de diámetro en la tapa, en uno de ellos se introdujo una varilla la cual se acoplo mediante una manguera de hule de 1,5 cm de diámetro previamente esterilizada a una bomba de aire de pecera con adaptaciones, el cual suministra el oxígeno necesario para el desarrollo bacteriano.

La perforación realizada en el otro extremo de la tapa se acoplo una manguera de hule de 1,5 cm de diámetro y se le adapto un filtro airlock, el cual permitió desechar los gases producto de la fermentación sin dejar que ingrese aire por el mismo. El medio de cultivo utilizado en el biofermentador fue el que presento mayor concentración celular entre los medios alternativos y mortalidad contra *M. incognita*. L periodo de funcionamiento para cada una de las PGPR fue de 24 horas.

### **3.9.4.Datos a registrar en la investigación**

- a) Densidad Óptica (OD) a 600nm
- b) Unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml)
- c) Efectos de sobrenadantes bacterianos contra juveniles (J2) de *M. incognita* (%)

## **CAPITULO IV**

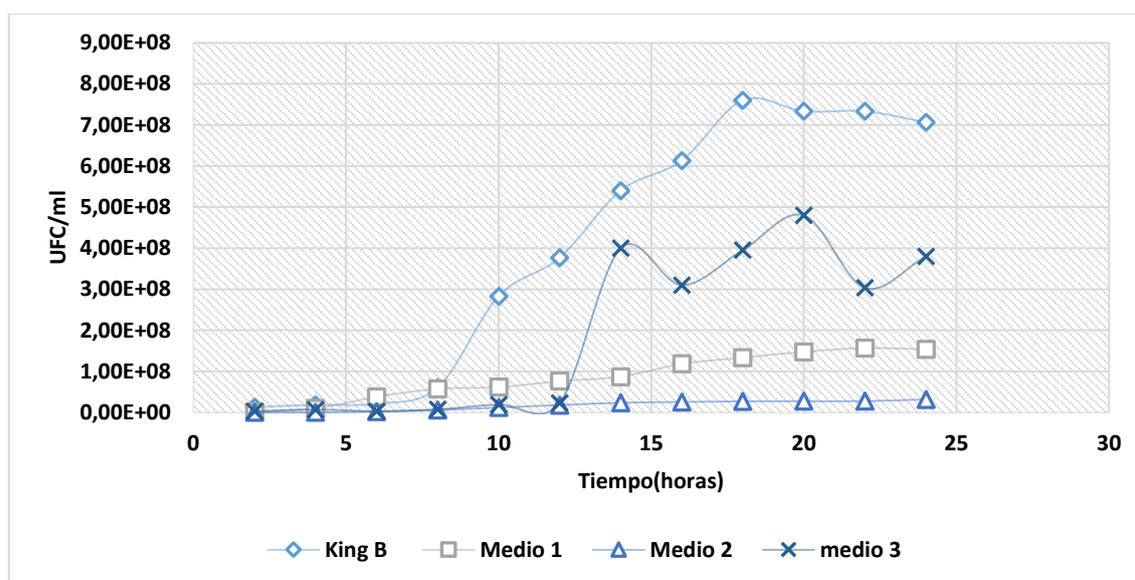
### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 4.7. Resultados

### 4.7.1. Determinar la cinética de crecimiento de PGPR en distintos medios de cultivo

#### 4.7.1.1. Cinética de crecimiento de *Enterobacter absuriae* PM3-14

Se determinó la cinética de crecimiento de la cepa PM3-14 en cuatro medios de cultivo, se realizó una curva de calibración de los parámetros D.O. y UFC/ml en medio sintético, Medio 1 y Medio 2, en el Medio 3 no fue posible debido a que la turbidez del medio generaba errores en la lectura por parte del espectrofotómetro (Anexo 2). La mayor concentración celular al inicio de la fase estacionaria fue en medio de cultivo King B con  $7,60 \times 10^8$  UFC/ml, seguido del Medio 3 que alcanzó una concentración de  $4,80 \times 10^8$  UFC/ml. Los Medios 1 y 2 presentaron las más bajas concentraciones celulares. (Figura 1)



**Figura 1.** Cinética de crecimiento de *Enterobacter absuriae* PM3/14 en diferentes medios de cultivos, el eje de la (y)= Concentración celular; (x)= Horas transcurridas

En la tabla 5 se muestran los parámetros cinéticos de *Enterobacter absuriae* PM3-14. La menor fase de latencia  $\lambda$  (h) que corresponde a la adaptabilidad de la bacteria al medio de cultivo se logró en el Medio 2 con una duración de 1,77 horas. El Medio 3 mostró la mayor duración con 7.6 horas, a su vez en este se dio la mayor velocidad específica de crecimiento  $\mu_{max}$  ( $h^{-1}$ ) 2.96 y por ende el menor tiempo de generación G (h) 0.93 debido a que estos parámetros son inversamente proporcionales. Superando a los demás tratamientos.

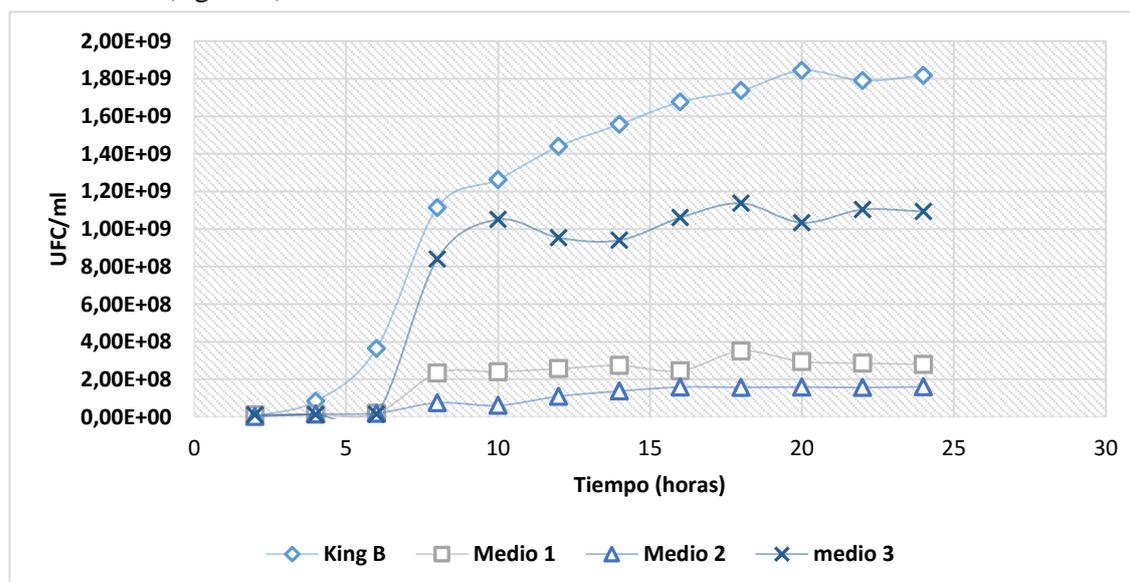
**Tabla 5.** Parámetros cinéticos de *Enterobacter absuriae* cepa PM3-14.

Medio	$\mu$ max (h <sup>-1</sup> )	$\lambda$ (h)	G(h)	UFC/ml fase estacionaria
King B	2,20 <b>b</b>	3,22 <b>a</b>	0,78 <b>ab</b>	5,40E+08 <b>a</b>
Medio 1	1,73 <b>c</b>	2,83 <b>c</b>	0,40 <b>b</b>	1,79E+08 <b>c</b>
Medio 2	0,63 <b>d</b>	1,77 <b>d</b>	1,10 <b>a</b>	5,10E+07 <b>d</b>
Medio 3	2,96 <b>a</b>	7,61 <b>b</b>	0,23 <b>b</b>	3,97E+08 <b>b</b>

Los valores con letras similares no representan diferencias estadísticas significativas al nivel de confianza del 95%, por el procedimiento de comparación múltiple de Duncan.  $\mu$  max (h<sup>-1</sup>)= Velocidad específica de crecimiento,  $\lambda$  (h)=duración de la fase de latencia, G(h)=Tiempo de generación, UFC/ml fase estacionaria=Unidades formadoras de colonias por mililitro.

#### 4.7.1.2. Cinética de crecimiento de *Acinetobacter calcoaceticus* PM2-12

Se realizó una curva de calibración de los parámetros D.O. y UFC/ml en medio sintético, Medio 1 y Medio 2, en el Medio 3 no fue posible debido a que la turbidez del medio generaba errores en la lectura por parte del espectrofotómetro (Anexo 3). El registro de los parámetros cinéticos de esta cepa dio como resultado que la mayor concentración celular en fase estacionaria se obtuvo en el medio de cultivo King B con un promedio de  $1,84 \times 10^9$  UFC/ml, seguida del Medio 3 evidenciando una concentración de  $1,14 \times 10^8$  UFC/ml, las concentraciones más bajas se hallaron en el Medio 1 y 2 con promedios inferiores a  $3,51 \times 10^8$  UFC/ml (figura 2).



**Figura 2.** Cinética de crecimiento de *Acinetobacter calcoaceticus* PM2-12 en diferentes medios de cultivos, el eje de la (y)= Concentración celular; (x)= Horas transcurridas.

En la tabla 6 se muestran los parámetros cinéticos de *Acinetobacter calcoaceticus* PM2-12. La mayor velocidad específica de crecimiento  $\mu_{\max}$  ( $\text{h}^{-1}$ ) y menor tiempo de generación se logró en el medio de cultivo King B con 1.78 generaciones por hora y un tiempo de generación de 0,39 horas respectivamente siendo superior a los demás tratamientos.

La fase de latencia  $\lambda$  (h) más prolongada se dio en los Medios 2 y 3, la cual fue de 2.14 y 2.13 horas respectivamente, mientras que el medio de cultivo en el que se dio una más rápida adaptación e iniciación de la fase exponencial fue el Medio 1 con una fase de latencia de 0,46 horas. El medio de cultivo King B mostro una duración intermedia entre los medios de cultivo con 1,74 horas.

**Tabla 6.** Parámetros cinéticos de *Acinetobacter calcoaceticus* cepa PM2-12.

Medio	$\mu_{\max}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$\lambda$ (h)	G(h)	UFC/ml fase estacionaria
King B	1,78 <b>a</b>	1,74 <b>b</b>	0,39 <b>d</b>	1,84E+09 <b>a</b>
Medio 1	0,69 <b>c</b>	0,46 <b>c</b>	1,00 <b>a</b>	3,50E+08 <b>b</b>
Medio 2	0,78 <b>c</b>	2,14 <b>a</b>	0,89 <b>b</b>	1,60E+08 <b>c</b>
Medio 3	1,07 <b>b</b>	2,13 <b>a</b>	0,65 <b>c</b>	1,14E+09 <b>d</b>

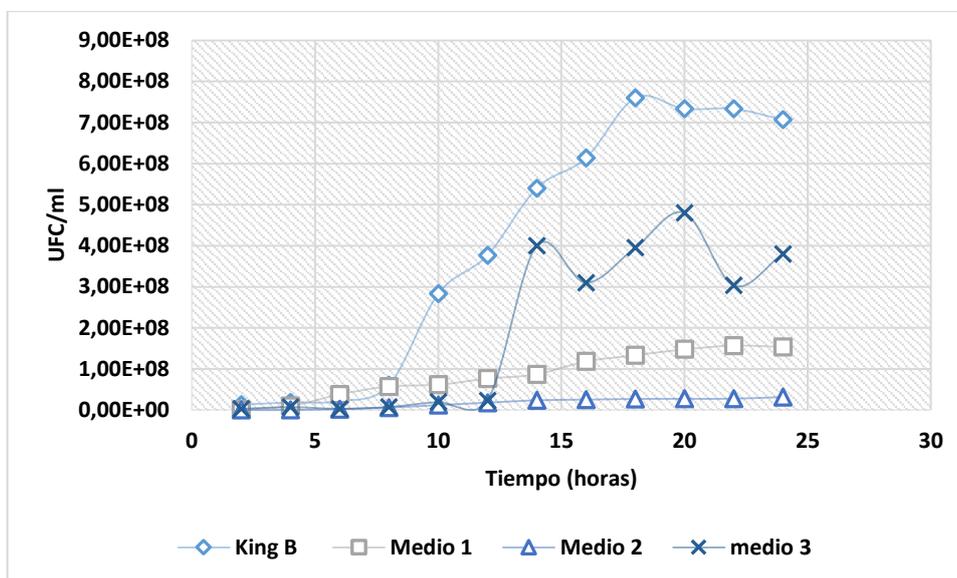
Los valores con letras similares no representan diferencias estadísticas significativas al nivel de confianza del 95%, por el procedimiento de comparación múltiple de Duncan.  $\mu_{\max}$  ( $\text{h}^{-1}$ )= Velocidad específica de crecimiento,  $\lambda$  (h)=duración de la fase de latencia, G(h)=Tiempo de generación, UFC/ml fase estacionaria=Unidades formadoras de colonias por mililitro.

#### 4.7.1.3. Cinética de crecimiento de *Serratia marcescens* PM3-8

Se realizó una curva de calibración de los parámetros D.O. y UFC/ml en medio sintético, Medio 1 y Medio 2, en el Medio 3 no fue posible debido a que la turbidez del medio generaba errores en la lectura por parte del espectrofotómetro (Anexo 4).

Se determinó la cinética de crecimiento bacteriano para esta cepa (Figura 3). El desarrollo de ésta en el Medio 3 presentó la etapa de latencia  $\lambda$  (h) más larga con una duración de 11.80 horas, la mayor velocidad específica de crecimiento  $\mu_{\max}$  ( $\text{h}^{-1}$ ) se dio en el Medio 2 con 1.38 generaciones por hora con el menor tiempo para tardar en duplicarse con una

media de 0.50 horas, mientras que el Medio 1 presento la menor velocidad especifica de crecimiento y por ende el mayor tiempo de duplicación con  $0.49 \mu \text{ max (h}^{-1}\text{)}$  y  $1.41 \text{ G(h)}$  respectivamente.



**Figura 3** Cinética de crecimiento de *Serratia marcescens* PM3-8 en diferentes medios de cultivos, el eje de la (y)= Concentración celular; (x)= Horas transcurridas.

En la tabla 7 se muestran los parámetros cinéticos *Serratia marcescens* PM3-8. Esta cepa desarrollada en el Medio 3 mostro un crecimiento diauxico hacia la fase estacionaria, destacándose entre los medios alternativos con una concentración celular de  $4,80 \times 10^8$  UFC/ml solo siendo superado por el medio sintético el cual alcanzo un promedio de  $7,60 \times 10^9$ . Los Medios 1 y 2 mostraron las concentraciones celulares más bajas con  $1,57 \times 10^7$  y  $3,17 \times 10^7$  UFC/ml respectivamente.

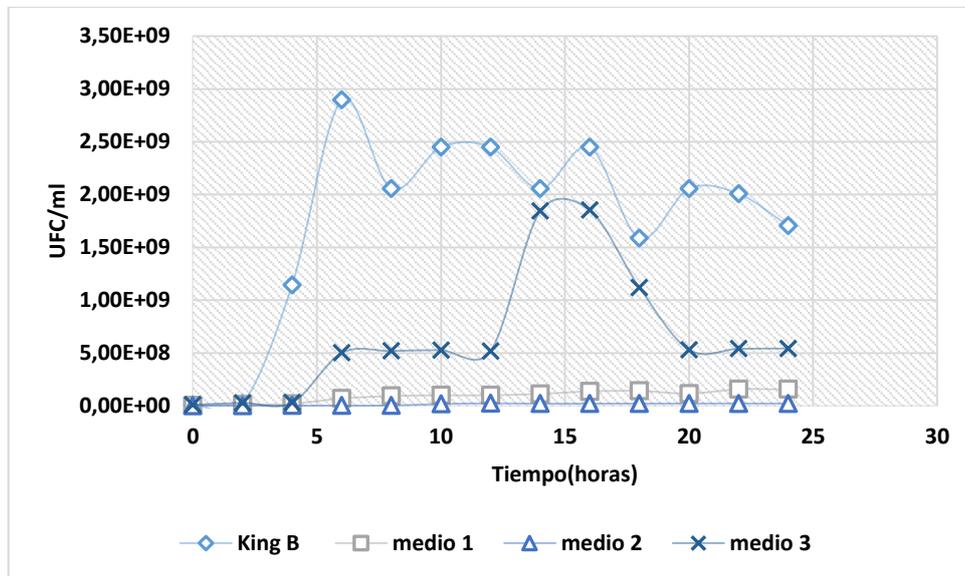
**Tabla 7.** Parámetros cinéticos de *Serratia marcescens* cepa PM3-8.

Medio	$\mu \text{ max (h}^{-1}\text{)}$	$\lambda \text{ (h)}$	$\text{G(h)}$	UFC/ml fase estacionaria
King B	0,66 <b>b</b>	4,12 <b>b</b>	1,05 <b>c</b>	7,60E+08 <b>a</b>
Medio 1	0,49 <b>d</b>	3,60 <b>d</b>	1,41 <b>a</b>	1,57E+08 <b>d</b>
Medio 2	1,38 <b>a</b>	3,78 <b>c</b>	0,50 <b>d</b>	3,17E+07 <b>c</b>
Medio 3	0,56 <b>c</b>	11,80 <b>a</b>	1,23 <b>b</b>	4,80E+08 <b>b</b>

Los valores con letras similares no representan diferencias estadísticas significativas al nivel de confianza del 95%, por el procedimiento de comparación múltiple de Duncan.  $\mu \text{ max (h}^{-1}\text{)}$ = Velocidad especifica de crecimiento,  $\lambda \text{ (h)}$ =duración de la fase de latencia,  $\text{G(h)}$ =Tiempo de generación, UFC/ml fase estacionaria=Unidades formadoras de colonias por mililitro.

#### 4.7.1.4. Cinética de crecimiento de *Pseudomonas protegens* CHA0

Se realizó una curva de calibración de los parámetros D.O. y UFC/ml en medio sintético, Medio 1 y Medio 2, en el Medio 3 no fue posible debido a que la turbidez del medio generaba errores en la lectura por parte del espectrofotómetro (Anexo 5). La mayor concentración celular en fase estacionaria se obtuvo en el medio de cultivo King B con un promedio de  $2,90 \times 10^9$  UFC/ml, seguida del Medio 3 en el cual se evidencio una concentración de  $1,85 \times 10^9$  UFC/ml, la curva de crecimiento en este medio mostro una fase estacionaria muy inestable (Figura 4). Las concentraciones más bajas se obtuvieron en el Medio 1 y 2 con promedios inferiores a  $1,27 \times 10^8$  y  $2,24 \times 10^7$  UFC/ml tal y como se evidencia en la curva de crecimiento.



**Figura 4.** Cinética de crecimiento de *Pseudomonas protegens* CHA0 en diferentes medios de cultivos, el eje de la (y)= Concentración celular; (x)= Horas transcurridas.

En la tabla 8 se muestran los parámetros cinéticos de *Pseudomonas protegens* CHA0. En esto se evidencia que los parámetros cinéticos estudiados difieren entre un medio de cultivo a otro destacándose que el menor tiempo de generación y la mayor velocidad específica de crecimiento se logró en el medio de cultivo King B con  $1.16(G)$  y  $0.60 \mu \max (h^{-1})$  generaciones por hora respectivamente, mientras que el Medio 1 presento el mayor tiempo de generación y por ende una menor velocidad específica de crecimiento con  $0.21(G)$  y  $3.29 \mu \max (h^{-1})$  generaciones por hora.

La bacteria tardo más en adaptarse e iniciar la fase exponencial en el Medio 2 con una fase de latencia  $\lambda$  (h) de 7.39 , mientras que el medio sintético, el Medio 1 y el Medio 3 mostraron una más rápida adaptación con fases de latencia de 1.73, 0.26 y 1.57  $\lambda$  (h) respectivamente.

**Tabla 8.** Parámetros cinéticos de *Serratia marescens* cepa PM3-8

<b>Medio</b>	<b><math>\mu</math> max (h-1)</b>	<b><math>\lambda</math> (h)</b>	<b>G(h)</b>	<b>UFC/ml fase estacionaria</b>
King B	3,29 <b>a</b>	1,73 <b>b</b>	0,21 <b>d</b>	2,90E+09 <b>a</b>
Medio 1	0,60 <b>d</b>	0,26 <b>d</b>	1,16 <b>a</b>	1,57E+08 <b>c</b>
Medio 2	1,72 <b>b</b>	7,39 <b>a</b>	0,40 <b>c</b>	2,24E+07 <b>d</b>
Medio 3	0,94 <b>c</b>	1,57 <b>c</b>	0,74 <b>b</b>	1,85E+09 <b>b</b>

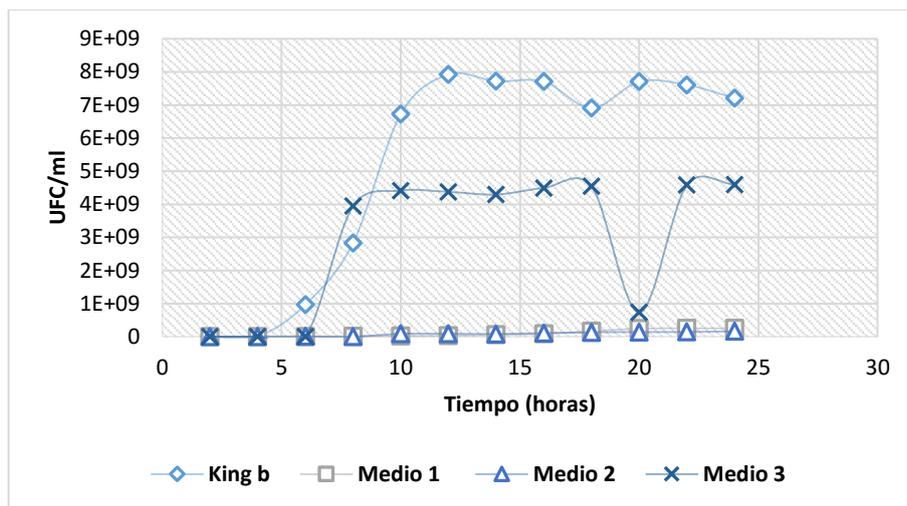
Los valores con letras similares no representan diferencias estadísticas significativas al nivel de confianza del 95%, por el procedimiento de comparación múltiple de Duncan.  $\mu$  max (h<sup>-1</sup>)= Velocidad específica de crecimiento ,  $\lambda$  (h)=duración de la fase de latencia, G(h)=Tiempo de generación , UFC/ml fase estacionaria=Unidades formadoras de colonias por mililitro.

#### 4.7.1.5. Cinética de crecimiento de la bacteria *Pseudomona veronii* RE4

Se realizó una curva de calibración de los parámetros D.O. y UFC/ml en medio sintético, Medio 1 y Medio 2, en el Medio 3 no fue posible debido a que la turbidez del medio generaba errores en la lectura por parte del espectrofotómetro esto debido a que la máxima longitud de onda por parte del espectrofotómetro es de aproximadamente 950 nm , medios demasiado turbios propician a que el equipo de lectura genere errores de incluso dando valores negativos (Anexo 6).

Con respecto a las concentraciones celulares en cada uno de los medios de cultivo difirieron entre si encontrándose que la mayor concentración celular en fase estacionaria se obtuvo en el medio de cultivo King B con un promedio de  $8.00 \times 10^9$  UFC/ml.

Por su parte el Medio 3 en el cual se evidencio una concentración de  $5.00 \times 10^9$  UFC/ml, las concentraciones más bajas se obtuvieron en el Medio 1 y 2 con promedios inferiores a  $3,00 \times 10^8$  y  $2,00 \times 10^8$  UFC/ml tal y como se evidencia en la curva de crecimiento (Figura 5).



**Figura 5.** Cinética de crecimiento de *Pseudomonas veronii* RE4 en diferentes medios de cultivos, el eje de la (y)= Concentración celular; (x)= Horas transcurridas.

En la tabla 9 se muestran los parámetros cinéticos de *Pseudomonas veronii* RE4. El menor tiempo de generación y la mayor velocidad específica de crecimiento se obtuvo en el Medio 3 con 0,02 (G) y 29,60  $\mu$  max ( $h^{-1}$ ) generaciones por hora respectivamente, En el medio sintético se obtuvieron 0,38 (G) y 1,31  $\mu$  max ( $h^{-1}$ ). Las menores velocidades específicas de crecimiento y tiempos de generación se obtuvieron en el Medio 1 y 2 con valores por debajo de 0,63 para  $\mu$  max ( $h^{-1}$ ) y 1,17 para (G)

El medio de cultivo en el cual tardo más la bacteria en adaptarse e iniciar la fase exponencial fue el Medio 3 con una fase de latencia  $\lambda$  (h) de 5,96 horas mientras que el medio sintético, el Medio 1 y 2 mostraron fases de latencia de 0,91, 0,26 y 0,92 respectivamente.

**Tabla 9.** Parámetros cinéticos de *Pseudomonas veronii* RE4.

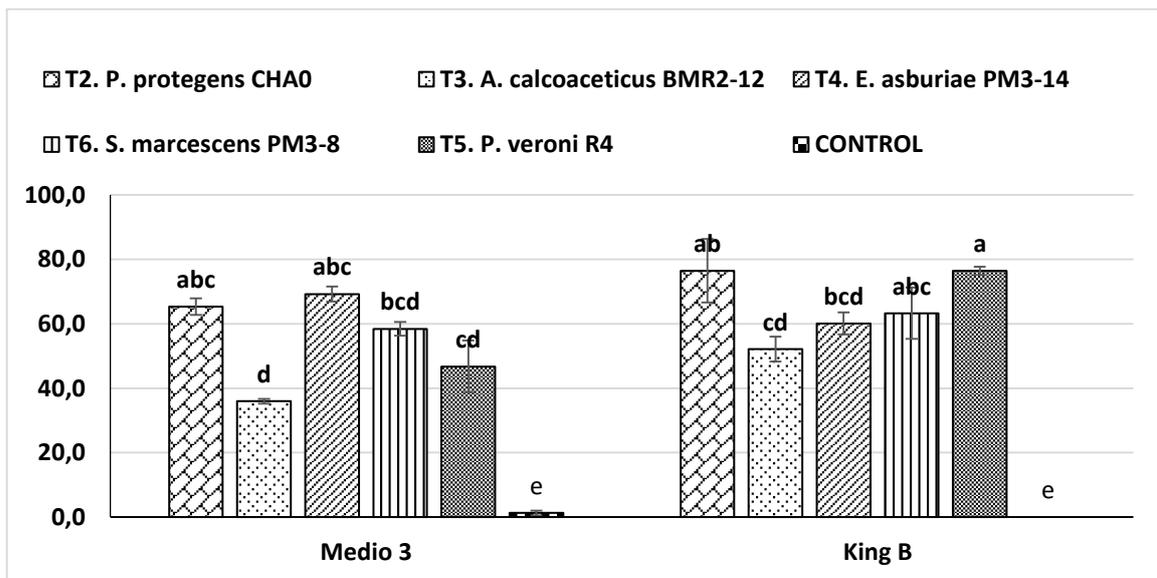
Medio	$\mu$ max ( $h^{-1}$ )	$\lambda$ (h)	G(h)	UFC/ml fase estacionaria
King B	1,81 <b>b</b>	0,91 <b>b</b>	0,38 <b>c</b>	8E+09 <b>a</b>
Medio 1	0,60 <b>d</b>	0,26 <b>d</b>	1,16 <b>a</b>	3E+08 <b>c</b>
Medio 2	0,62 <b>c</b>	0,92 <b>b</b>	1,12 <b>b</b>	2E+08 <b>c</b>
Medio 3	29,60 <b>a</b>	5,96 <b>a</b>	0,02 <b>d</b>	5E+09 <b>b</b>

Los valores con letras similares no representan diferencias estadísticas significativas al nivel de confianza del 95%, por el procedimiento de comparación múltiple de Duncan.  $\mu$  max ( $h^{-1}$ )= Velocidad específica de crecimiento,  $\lambda$  (h)=duración de la fase de latencia, G(h)=Tiempo de generación, UFC/ml fase estacionaria=Unidades formadoras de colonias por mililitro.

## 4.7.2. Establecer la capacidad antagonista de PGPR hacia *M. incognita* in vitro.

### 4.7.2.1. Ensayos antagonistas con Nematodos J2 (juveniles 2)

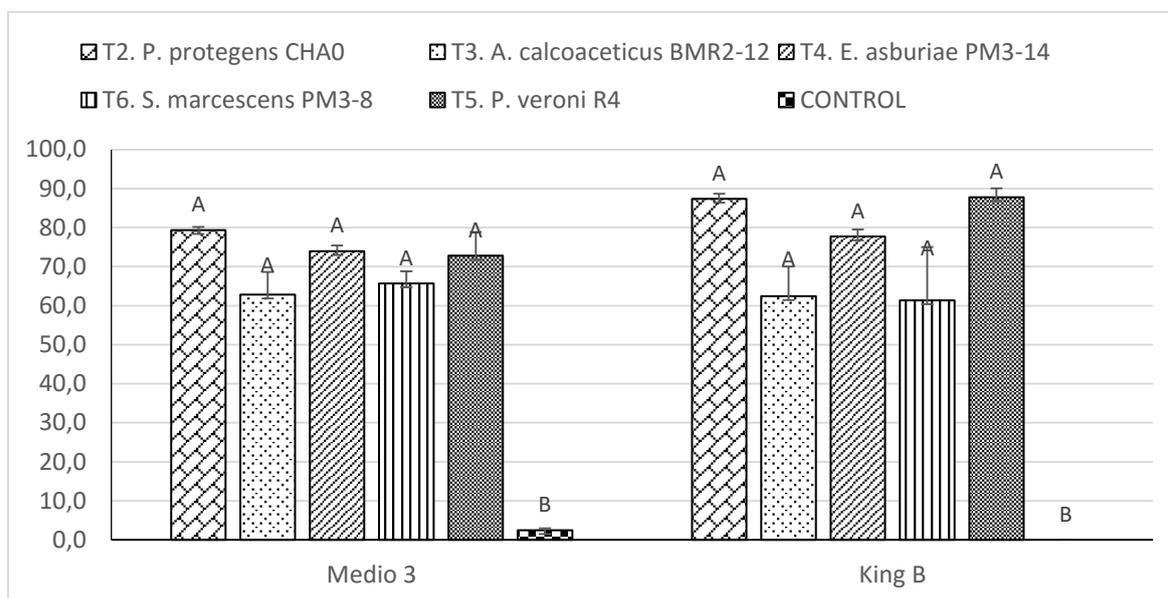
Las aplicaciones de los extractos celulares en dos medios de crecimientos distintos (King B y Medio 3), a poblaciones de nematodos a las 24 horas de la exposición dieron como resultado que *Pseudomona veronii* RE4 en King B alcanzó el mayor porcentaje de mortalidad a *M. incognita* con 76,5%, sin diferir estadísticamente de *Pseudomona protegens* CHA0 en King B con 76.5%, *Enterobacter asburiae* PM3-14 en medio 3 con 69.2% y *Serratia marcescens* PM3-8 con 63.3% en King B, respectivamente. El menos porcentaje de mortalidad fue de 36,0% correspondiente a la rizobacteria *Acinetobacter calcoaceticus* BMR2-12 en medio 3.



**Figura 6.** Porcentaje de mortalidad con sobrenadantes a las 24 horas contra *M. incognita* J2. Los valores con letras similares no representan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ). Las barras indican el porcentaje de mortalidad correspondiente de cada tratamiento, las bacterias crecieron en dos medios diferentes.

Las aplicaciones de los extractos celulares en dos medios de crecimientos distintos (King B y Medio 3), a poblaciones de nematodos a las 48 horas de la exposición dieron como resultado que *Pseudomona veronii* RE4 en King B alcanzó el mayor porcentaje de

mortalidad a *M. incognita* con 87,8%, sin diferir estadísticamente de los demás tratamientos que oscilan entre 87,4% y 61,3%, respectivamente.

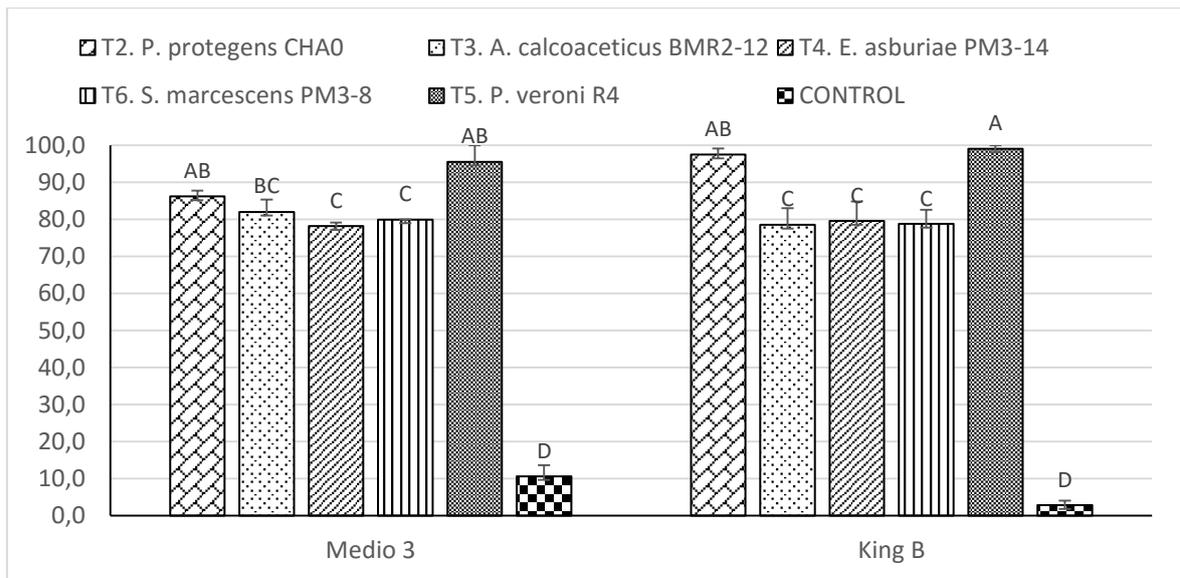


**Figura 7.** Porcentaje de mortalidad con sobrenadantes a las 48 horas contra *M. incognita* J2. Los valores con letras similares no representan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ). Las barras indican el porcentaje de mortalidad correspondiente de cada tratamiento, las bacterias crecieron en dos medios diferentes.

Las aplicaciones de los extractos celulares en dos medios de crecimientos distintos (King B y Medio 3), a poblaciones de nematodos a las 72 horas de la exposición dieron como resultado que *Pseudomonas veronii* RE4 en King B, alcanzo el mayor porcentaje de mortalidad a *M. incognita* con 99,1%, sin diferir estadísticamente de *Pseudomonas protegens* CHA0 en King B con 97,5%, *Pseudomonas veronii* RE4 en Medio 3 con 95,6% y *Pseudomonas protegens* CHA0 en medio 3 con 86,2%, respectivamente.

Las cepa *Pseudomonas protegens* CHA0 en King B con 97,5%, *Pseudomonas veronii* RE4 en Medio 3 con 95,6% y *Pseudomonas protegens* CHA0 en medio 3 con 86,2% corroboran que la producción de metabolitos secundarios precisamente la producción de proteasa extracelular incide directamente en estos porcentajes de control

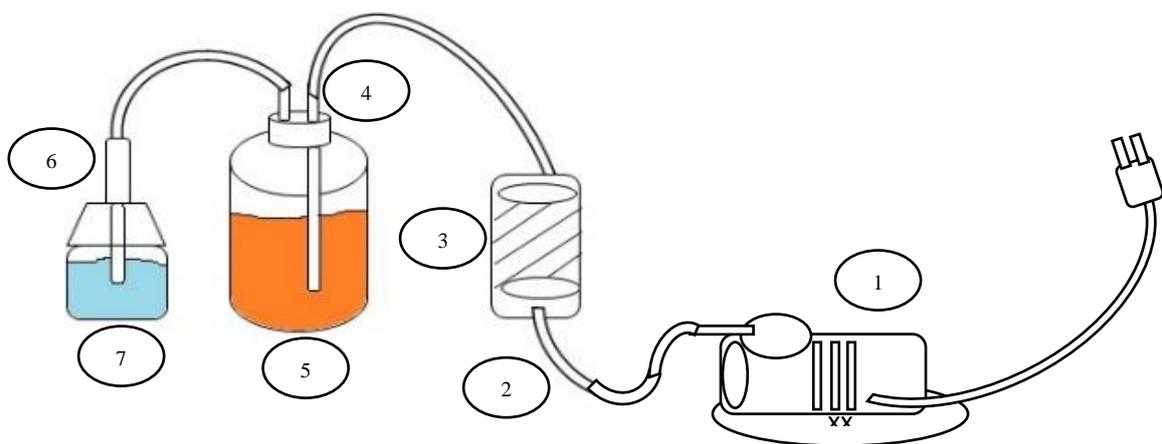
El menor porcentaje de mortalidad fue de 78,2% correspondiente a la rizobacteria *Enterobacter asburiae* PM3-14 en Medio 3.



**Figura 8.** Porcentaje de mortalidad con sobrenadantes a las 72 horas contra *M. incognita* J2. Los valores con letras similares no representan diferencia estadística, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ). Las barras indican el porcentaje de mortalidad correspondiente de cada tratamiento, las bacterias crecieron en dos medios diferentes.

#### 4.7.3. Elaborar un modelo piloto de biofermentador de PGPR para su producción masiva.

##### 4.7.3.1. Esquema del biofermentador



**Figura 9.** 1.-Bomba de suministro de oxígeno (0.5 bar de presión) 2.-Manguera de salida de aire. 3.- Filtro de Carbón activado. 4.- Varilla de cobre perforada encargada de oxigenación. 5.- Tanque (20 l de capacidad) 6.- Manguera de salida de gases producto de la fermentación 7.- Filtro antirretorno o Airlock

## 4.8. DISCUSIÓN

### 4.8.1. Cinética de crecimiento de PGPR en distintos medios de cultivo

La cinética de crecimiento en todos los medios de cultivo para cada una de las bacterias se obtuvo como resultado que ninguno supero al medio sintético King B. Los medios de cultivo para estudios de microorganismos en laboratorio son de alta pureza y representan una fuente rica de nutrientes para el óptimo desarrollo de microorganismos. Esto coincide con lo descrito por Moreno, Carroll E. Cortés Castillo, Padilla, & Otero-Paternina, (2011) que en su estudio de identificar el medio de cultivo que permitiera un máximo crecimiento de la alga *C. sorokiniana* para su producción masiva encontraron que ninguno de los medios propuestos supero al medio sintético. En contra parte Guerra Lopez y Zúñiga Dávila (2018) al modificar el medio sintético LMC por fuentes comerciales de sacarosa y glutamato para producción de *Pseudomonas sp.* Encontraron hasta un 48% de concentración celular más respecto al medio control LMC.

De acuerdo a los resultados obtenidos en lo que respecta a la concentración celular hallada en los medios de cultivos alternativos se estableció que a mayores concentraciones de melaza como fuente de carbono la concentración celular aumenta de manera significativa, esto coincide con lo investigado por Vanegas y Ramírez (2016) quienes al evaluar el crecimiento de *Pseudomonas sp.* en producción de polihidroxicarboxilatos de cadena media usando como fuente de carbono melaza determinaron que la concentración y fuente de carbono empleada en los medios de cultivo tienen una influencia estadísticamente significativa sobre la concentración de biomasa obtenida.

En contraste a los resultados obtenidos en esta investigación, Fajardo y Sarmiento (2007) al evaluar diferentes concentraciones para producción de *Lactobacillus plantarum* determinaron que solo hasta de un 25% de melaza (p/v) usada como fuente de carbono propiciaba a una alta producción de biomasa ya que concentraciones mayores a esto se reflejaba en una menor cantidad de UFC/ml. Según el autor las bacterias alcanzan la fase estacionaria más rápido, antes de consumir todo el sustrato, lo que hace que el microorganismo no produzca más biomasa, por el estado de saturación del sustrato, respecto a la concentración microbiana.

*P. protegens* CHA0 y *P. veronii* RE4 desarrolladas en el Medio (3) mostraron una fase estacionaria muy inestable, para el caso de *P. protegens*, esta pasó de  $1,84 \times 10^9$  a  $5,30 \times 10^8$  UFC/ml en solo 4 horas, Por su parte *P. veronii* RE4 descendió drásticamente de  $4,54 \times 10^9$  a  $7,33 \times 10^8$  UFC/ml respectivamente en solo 2 horas, esto coincide con lo reportado por Vanegas y Ramírez (2016) quienes encontraron que la melaza a concentraciones entre el 1 y el 4% (P/V) promueven el crecimiento y producción de Polihidroxicanoatos de cadena media, pero que en concentraciones mayores al 4% (P/V) se lograba inestabilidad en las fases de crecimiento incluso una baja concentración celular esto debido a la presencia de componentes como los fenoles se lograba inestabilidad en las fases de crecimiento incluso una baja concentración celular esto debido a la presencia de componentes como los fenoles que actúan como bactericidas y se derivan de los ácidos hidroxinámico y parahidroxibenzóico.

#### **4.8.2. Ensayos antagonistas hacia *M. incognita* “in vitro”**

Los más altos porcentajes de control del nematodo *M. incognita* en estadio J2 a las 24 horas fueron logrados con las cepas *P. protegens* CHA0 y *P. veronii* RE4 con un 76,5 % de control cada una, esto coincide con lo descrito por Altamira (2017) quien manifiesta que La PGPR *P. protegens* CHA0 ejerce actividad antagonista sobre el nemátodo *M. incognita* y que está mediada por la secreción de la proteasa extracelular AprA y de los metabolitos secundarios, HCN y 2,4-DAPG. Por su parte Verdesoto (2018) al evaluar el porcentaje de control sobre *Radophulus similis* en estadio j2 con los extractos celulares encontró que a las 24 horas de la exposición el mayor porcentaje de control se logró con la cepa *A. calcoaceticus* BMR2-12, con el 32,1% mientras que con *P. veroni* R4 y *P. protegens* CHA0 obtuvo 29,5% Y 26,6% de control respectivamente.

El Medio 3, alcanzó una concentración celular suficiente de tal manera que al obtener extractos celulares de las PGPR crecidas en él y al usarlos en ensayos antagonistas contra juveniles j2 de *M. incognita* se obtuvo un control bastante eficiente del mismo siendo a las 48 horas todos los tratamientos estadísticamente iguales al King B con promedios de control que oscilaron entre 62,4 y 87,8 % respectivamente y a las 72 horas estadísticamente igual los tratamientos conformados por las bacterias *P. protegens* CHA0 quien presentó un control de 92,5% en King B y 87,12% en el Medio 3. Mientras que *P. veronii* RE4 presentó un control de 99,1 y 95,6 % respectivamente. Esto concuerda con lo descrito por Valarezo (2017) quien al evaluar siete PGPR de las cuales cinco coincidían con las evaluadas en esta

investigación para el control de *M. incognita* J2 , a las 24 horas obtuvo como resultado que *P. protegens* CHA0 Y *P. veronii* RE4 mostraron los más altos porcentajes de mortalidad con 87,5 y 71,6 % de control respectivamente.

A evaluar el porcentaje de mortalidad obtenida en los controles se encontró que los nematodos sometidos al sobrenadante del medio de cultivo a base de melaza presentaron una mortalidad de 10% y en el sobrenadante en medio King B un 2% alas 72 horas de exposición a los mimsos . Esto bien puede deberse a que al pasar varios días sin una fuente de alimento , estos comenzaron a morir , coincidiendo con lo descrito por Peraza, Orozco, & Esquivel ,( 2014) quien al realizar ensayos antagónicos *in vitro* con el nematodo *M. javanica* con hongos nematofagos , encontraron que los nematodos pertenecientes al control perdían movilidad y posteriormente morían .Por otra parte Santana et al., (2010) al evaluar la aplicación de melaza sola para reducir las poblaciones de *M.incognita* en tomate encontró diferencias significativas con respecto al control hasta de un 70 %. La melaza mediante su descomposición libera sustancias que tienen efecto nematicidas,lo cual podría explicar por qué el control a base de sobrenadantes de melaza presenta mayor porcentaje de mortalidad con respecto al King B.

#### **4.8.3.Elaborar un modelo piloto de biofermentador de PGPR para su producción masiva**

Segun lo evaluado por Fajardo y Sarmiento,(2007) lo ideal al evaluar medios de cultivo es determinar las concentraciones celulares y los parámetros cinéticos del microorganismo de interes tanto a nivel de matraz , y una vez determinados dichos parámetros llevarlo a nivel de biofermentador y determinar también las concentraciones celulares y los parámetros cinéticos en un tiempo determinado para observar la relación entre ambos. En esta investigación se diseñó un biofermentador de 20 litros de capacidad, pero no fue posible determinar las concentraciones celulares debido a que los factores de dilución empleados fueron muy bajos para obtener las UFC necesarias para determinar las concentraciones celulares.

## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## 5.7. Conclusiones

- El medio de cultivo con 5% (p/v) de melaza, 20 g de Harina de maíz 0.5% de sal en grano y 15 ml de glicerina (Medio 3) fue el más destacado entre los medios de cultivos alternativos evaluados con  $3.97 \times 10^8$  UFC/ml para *E. absuriae* PM3-14,  $1.14 \times 10^9$  UFC/ml para *A.calcoaceticus* PM2-12,  $4.80 \times 10^8$  UFC/ml para *S. marescens* ,  $1,85 \times 10^8$  UFC/ml para *P.protegens* CHA0 y  $5,00 \times 10^9$  UFC/ml para la cepa *P.veronii* RE-4 la más alta concentración celular bacteriana.
- Las concentraciones altas de melaza influyen sobre la cinética de crecimientos de las *Pseudomonas*, provocando un crecimiento diaúxico.(crecimiento inestable).
- Las rizobacterias promotoras de crecimiento *P. protegens* CHA0 y *P. veronii* RE-4 crecidas en el medio 3 presentaron un alto porcentaje de mortalidad a las 72 horas de exposición con 86,2% y 95,6%, respectivamente.
- La determinación de las concentraciones celulares son necesarias para diseño de un biorreactor.

## 5.8. Recomendaciones

- Determinar la cinética de crecimiento de las PGPR a nivel de biofermetador.
- Evaluar otras concentraciones de Melaza y fuentes de proteína sobre el crecimiento de PGPR.
- Realizar ensayos antagonistas de PGPR incubadas en Medio 3 para el control de eclosión de huevos de *M. incognita* (J1).
- Determinar la capacidad antagonista de PGPR contra *M. incognita* “*in vivo*”

## **CAPÍTULO VI**

## **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, J., & Silambarasan, S. (2015). Plant Growth Promoting Bacteria *Enterobacter asburiae* JAS5 and *Enterobacter cloacae* JAS7 in Mineralization of Endosulfan. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(7), 3336–3348. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1504-7>
- Ali Siddiqui, I., & Ehteshamul-Haque, S. (2001). Suppression of the root rot-root knot disease complex by *Pseudomonas aeruginosa* in tomato: The influence of inoculum density, nematode populations, moisture and other plant-associated bacteria. *Plant and Soil*, 237(1), 81–89. <https://doi.org/10.1023/A:1013313103032>
- Altamira, F. (2017). *BASES MOLECULARES DE LA ACTIVIDAD BIOCONTROLADORA DE LA BACTERIA Pseudomonas veronii R4 SOBRE EL NEMÁTODO Xiphinema index* Director de Tesis : Dr . Michael Seeger Pfeiffer. UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO PROGRAMA. Recuperado de [http://repositorio.conicyt.cl/bitstream/handle/10533/214488/Tesis\\_23\\_08\\_17.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.conicyt.cl/bitstream/handle/10533/214488/Tesis_23_08_17.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Atlas, M., & Bartha, R. (2001). Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental (Spanish version of the 4th edn). *International Microbiology*, 4(4), 239–240. <https://doi.org/10.1007/s10123-001-0045-9>
- Becker, J. O., Zavaleta-Mejia, E., Colbert, S. F., Schroth, M. N., Weinhold, A. R., Hancock, J. G., & Van Gundy, S. D. (1988). *Effects of rhizobacteria on root-knot nematodes and gall formation [1988]*. *Phytopathology (USA)*. [American Phytopathological Society].
- Bunternngsook, B., Mhuantong, W., Champreda, V., Thamchaipenet, A., Eurwilaichitr, L., Bacon, C. W., ... Cassells, A. C. (2012). Control of Plant Pathogenic Fungi with Bacterial Endophytes. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 9(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1575-2>
- Canchignia Martínez, H., Cruz Rosero, N., Barrera Álvarez, A., Morante Carriel, J., Canchignia Malagón, G., & Peñafiel Jaramillo, M. (2015). Applying Plant Growth Promoting Rizobacteria (PGPR) of the Genus *Pseudomonas* ssp as Biological Controllers of Insects and Plague Nematodes. *Ciencias Agrarias*, 8(1), 25–35.

- Castillo Rodríguez, F., & Roldán Ruiz, M. D. (2005). *Biotecnología ambiental*. Editorial Tébar.
- Doucet, M. E. (1993). Consideraciones acerca del género Tylenchida ) y su situación en Argentina . Asociaciones y distribución, X, 63–80.
- Fajardo, E., & Sarmiento, S. (2007). Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. *Universidad Pontificia Javeriana*, (Tesis doctoral), 24–25.
- Gerischer, U. (2008). *Acinetobacter molecular microbiology*. Caister Academic Press.
- Glick, B. R., Patten, C. L., Holguin, G., & Penrose, D. M. (1999). *Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria*. PUBLISHED BY IMPERIAL COLLEGE PRESS AND DISTRIBUTED BY WORLD SCIENTIFIC PUBLISHING CO. <https://doi.org/10.1142/p130>
- Guerra Lopez, M., & Zúñiga Dávila, D. (2018). Producción de *Pseudomonas* sp. LMTK32 en medio modificado para peletizar semillas de maca (*Lepidium meyenii* Walp.). *Revista Peruana de Biología*, 25(2), 161. <https://doi.org/10.15381/rpb.v25i1.14034>
- Hernández, A., Alfaro, I., & Arrieta, D. (1988). *Microbiología Industrial* - Google Books. Editorial Universidad Estatal a Distancia. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=KFq4oEQQjdEC&pg=PA159&dq=fermentacion+alcoholica&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwj1w7u8-bzXAhVDSSYKHZI7ALMQ6AEIOjAE#v=onepage&q=fermentacionalcoholica&f=false%0Ahttps://books.google.com.mx/books?id=KFq4oEQQjdEC&pg=PA44&dq=t>
- Kang, S. M., Khan, A. L., Hamayun, M., Shinwari, Z. K., Kim, Y. H., Joo, G. J., & Lee, I. J. (2012). *Acinetobacter Calcoaceticus* ameliorated plant growth and influenced gibberellins and functional biochemicals. *Pakistan Journal of Botany*, 44(1), 369. Recuperado de [http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/44\(1\)/55.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/44(1)/55.pdf)
- King, E. O., Ward, M. K., & Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44(2), 301–307. <https://doi.org/10.5555/URI:PII:002221435490222X>
- Kloepper, J. W., & Ryu, C. M. (2006). Bacterial Endophytes as Elicitors of Induced

Systemic Resistance. *Soil Biology, Volume 9. Microbial Root Endophytes*, 9, 33–52.  
[https://doi.org/10.1007/3-540-33526-9\\_3](https://doi.org/10.1007/3-540-33526-9_3)

Latorre, N. E. (2007). Evaluación De Medios De Cultivo Altos Y Bajos En Nutrientes Para La Recuperación De Heterótrofos Edáficos En La Ecorregión Cafetera De Los Andes. *Ciencia e investigación agraria*, 104.

Madigan, M., Martiko, J., & Parker, J. (2001). *Biología de los Microorganismos* - Brock 10ed.pdf.

Melakeberhan, H., & Ferris, H. (1989). Impact of *Meloidogyne incognita* on Physiological Efficiency of *Vitis vinifera*. *Journal of nematology*, 21(1), 74–80.

Moreno, M. L. O.-, , Caroll E. Cortés - Castillo, J. S.-V., Padilla, J., & Otero-Paternina, A. M. (2011). STRUCTURAL STRENGTH AND SAFETY - THE PROFESSION AT A CROSSROAD. *Concrete International*, 6(10), 42–45.

Navarro, S., & Navarro, G. (2000). *Química agrícola: el suelo y los elementos químicos esenciales para la vida ...* - Simón Navarro Blaya, Ginés Navarro García - Google Books.

Olivas E. Evangelina. (2004). *Manual de practicas de Microbiología I y II y Parasitología* - Google Libros. Mexico. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=HjvScF2tFJoC&pg=PA17&dq=medios+de+cultivo+alternativo+para+microorganismos&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwi6mdiy7jdAhUEwFkKHcJYCqQQ6AEIJTAA#v=onepage&q=medios de cultivo alternativo para microorganismos&f=false>

Osorio, A., Gómez, N., & Sánchez, C. (2008). Evaluación de diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno para la producción de renina a partir del moho *Mucor miehei*. *Revista Facultad de Ingeniería*, (45), 19–26. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/rfiua/n45/n45a02.pdf>

Farras, P. I., & Juarez Gimenez, A. (1997). *Bioquímica de los microorganismos* (No.- 148. P37 1997)

Peraza- Padilla, W., Orozco Aceves, M., & Esquivel Hernández, A. (2014). Evaluación in Vitro De Hongos Nematófagos En Zonas arroceras de Costa Rica contra el nematodo agallador *Meloidogyne*. *Agronomía Costarricense* 38(2):, 38(2), 19–32. Recuperado

de <https://www.researchgate.net/publication/268817655>

- Queiroz, B. P. V. de, & Melo, I. S. de. (2006). Antagonism of *Serratia marcescens* towards *Phytophthora parasitica* and its effects in promoting the growth of citrus. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(4), 448–450. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000400008>
- Quintero Ramírez, R., & López-Munguía Canales, A. (1993). *Biotechnología alimentaria*. Limusa.
- Ramamoorthy, V. (2001). Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection*, 20(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00056-9](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00056-9)
- Ramamoorthy, V., Raguchander, T., & Samiyappan, R. (2002). Induction of Defense Related Proteins in Tomato Roots Treated with *Pseudomonas fluorescens* Pf1 and *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Plant Soil*, 239: 55-68, 55–68.
- Rubia, M. (2003). *Manual de Nematología Agrícola*. Recuperado de <http://www.caib.es/sacmicrofront/archivopub.do?ctrl=CONTSP722ZI4569&id=4569>
- Santana, Y., Busto, A., Aguiar, I., & Palomino, L. (2010). Efecto de enmiendas orgánicas y *Trichoderma* spp. en el manejo de *Meloidogyne* spp. *Revista brasilera de agroecología*, 5(2), 224–233. Recuperado de [http://orgprints.org/24512/1/Baños\\_Efecto.pdf](http://orgprints.org/24512/1/Baños_Efecto.pdf)
- Siddiqui, I. A., & Shaukat, S. S. (2003). Suppression of root-knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: Importance of bacterial secondary metabolite, 2,4-diacetylphloroglucinol. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(12), 1615–1623. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2003.08.006>
- Soto, N. L. (2013). Efecto de aislados de los géneros *S treptomycetes* y *Bacillus* como promotores de crecimiento vegetal en frijol ( *Phaseolus vulgaris* L. ). *INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL*, 1–100. Recuperado de [https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/13163/Nataly López Soto.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/13163/Nataly_López_Soto.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Sylvie, D., Fuhrmann, J., Hartel, P., & Zuberer, D. (2005). Handbook of Seed Physiology : Applications to Agriculture — Nondetects and Data Analysis : Statistics for Censored

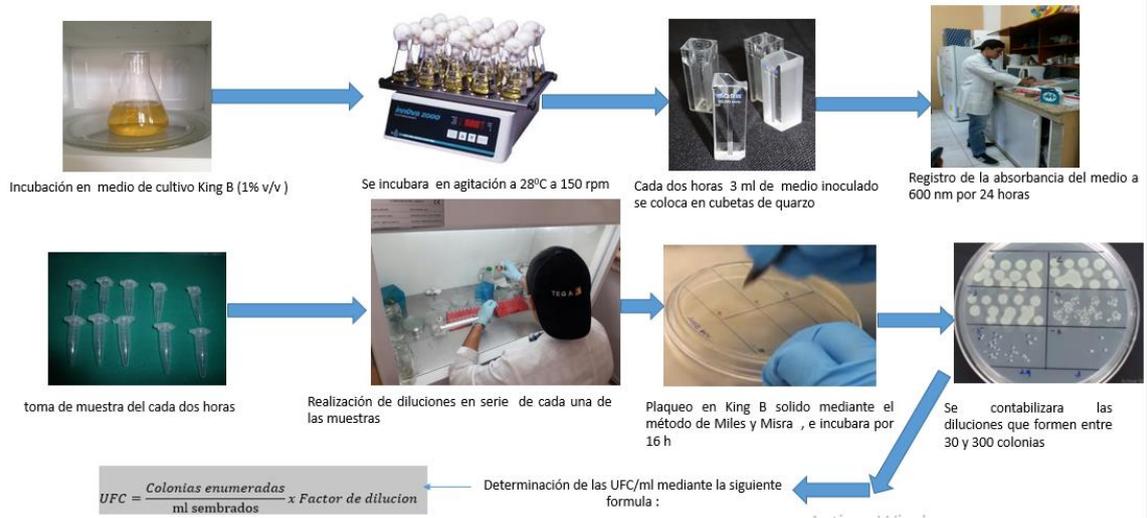
- Envi- Venomous Earth: How Arsenic Caused the World ' s Worse. *Waste Management*, 729–734.
- Tian, S., Ali, M., Xie, L., & Li, L. (2016). Genome-sequence analysis of *Acinetobacter johnsonii* MB44 reveals potential nematode-virulent factors. *SpringerPlus*, 5(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2668-5>
- Universidad del país Vasco. (2014). *DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA, MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA FACULTAD DE FARMACIA IMMUNOLOGIA, MIKROBIOLOGIA ETA PARASITOLOGIA SAILA FARMAZIA FAKULTATEA Cinética de la fase exponencial de la curva de crecimiento microbiano*. Recuperado de [www.ehu.es](http://www.ehu.es)
- Valarezo, R. (2017). *"Efecto de Pseudomonas spp fluorescens con actividad antagonista hacia Meloidogyne spp en el cultivo de tomate ( Lycopersicum esculentum")* (tesis de pregrado) Universidad Tecnica Estatal de Quevedo, Quevedo Ecuador.
- Valdez, L. G. (2016). *No Title*. Universidad Nacional de Córdoba Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales Carrera de Ciencias Biológicas TESINA. Recuperado de [https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/5466/Gómez Valdez%2CLaura.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/5466/Gómez_Valdez%2CLaura.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Vanegas, D. M., & Ramírez, M. E. (2016). Correlación del crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* en la producción de polihidroxicanoatos de cadena media (PHAMCL) mediante modelos primarios de Gompertz, logístico y baranyi. *Informacion Tecnologica*, 27(2), 87–96. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000200011>
- Verdesoto, A. (2018). *"Evaluacion del efecto de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) con actividad antagonista hacia el nematodo Radophulus similis en el cultivo de banano in vitro."* (tesis de pregrado) Universidad Tecnica Estatal de Quevedo, Quevedo Ecuador.
- Yang, J., Kloepper, J. W., & Ryu, C. M. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*, 14(1), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.10.004>

## **CAPÍTULO VII**

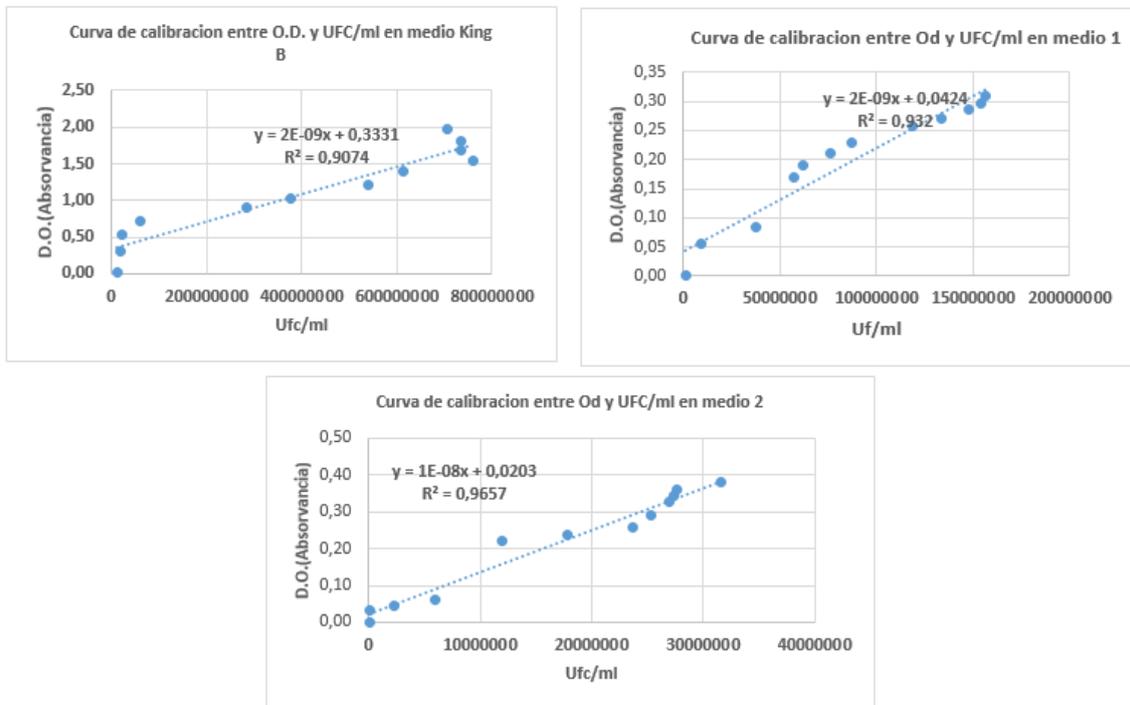
### **ANEXOS**

# ANEXOS

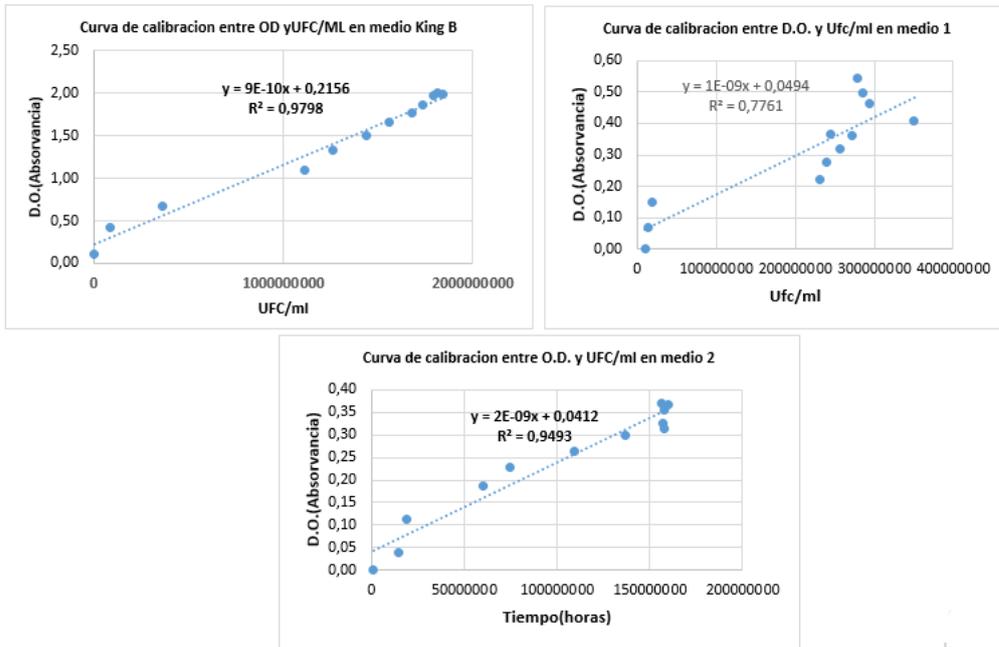
## Anexo.1 Metodología para determinación de concentración celular y Densidad óptica



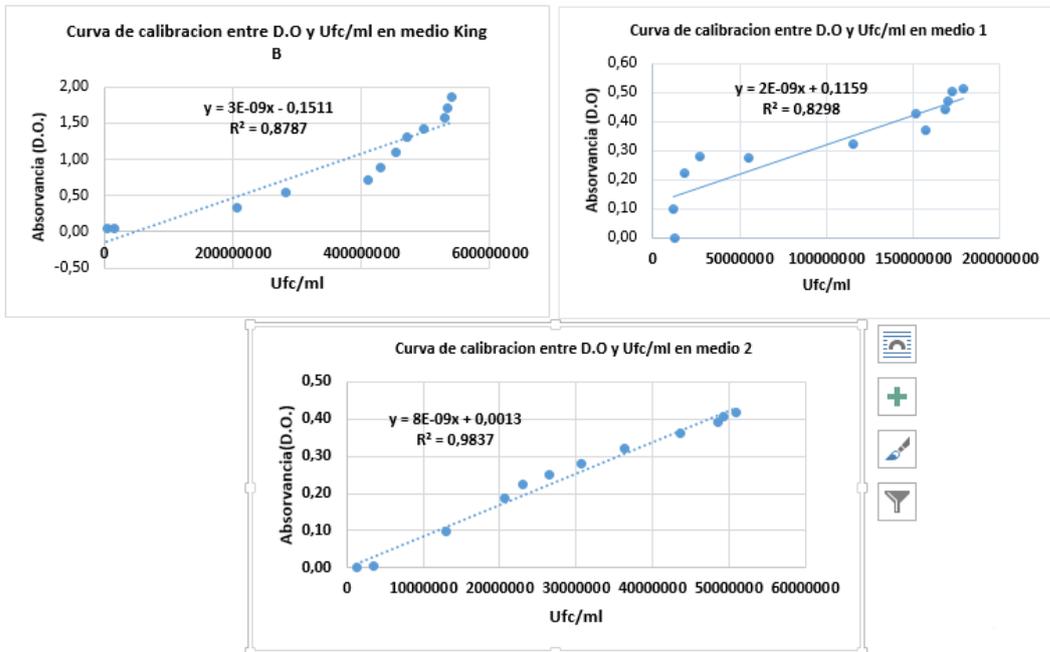
## Anexo 2. Curva de calibración entre D.O. y UFC/ml de *Enterobacter absuriae* PM3-14



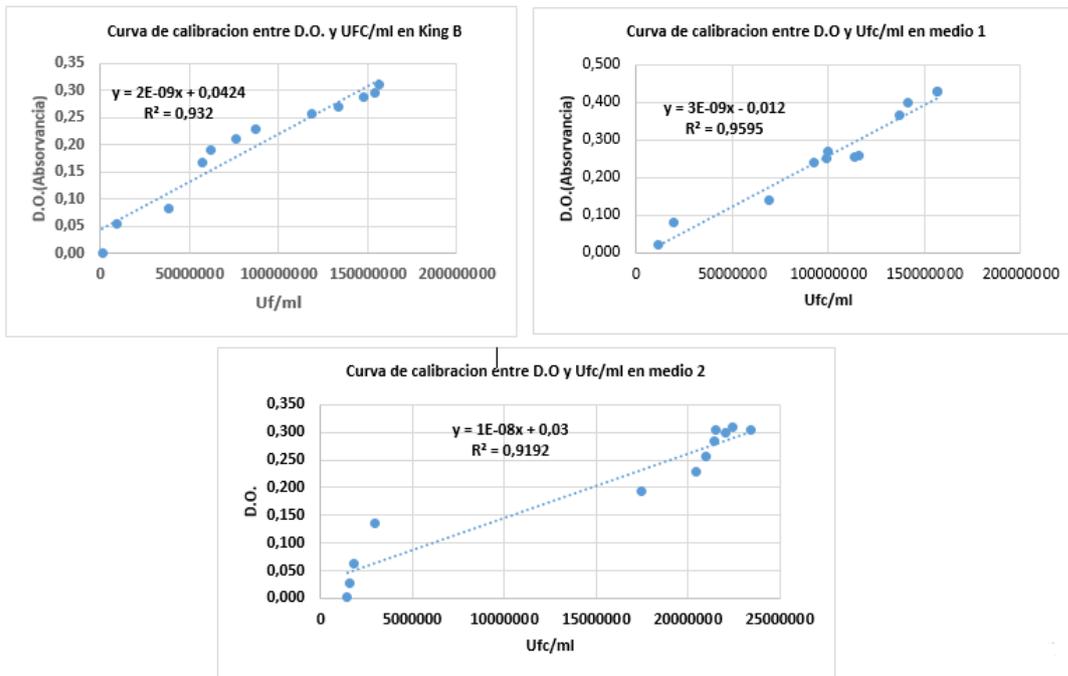
Anexo 3. Curva de calibración entre D.O. y UFC/ml de *Acinetobacter Calcoaceticus* PM2-12



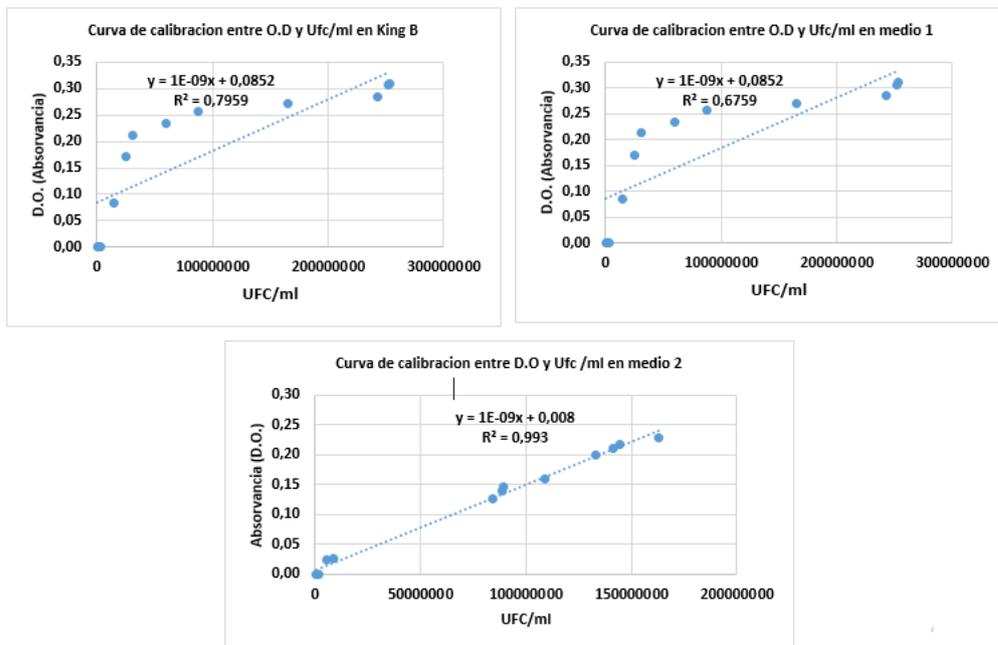
Anexo 4. Curva de calibración entre D.O. y UFC/ml de *Serratia Marescens* PM 3-8



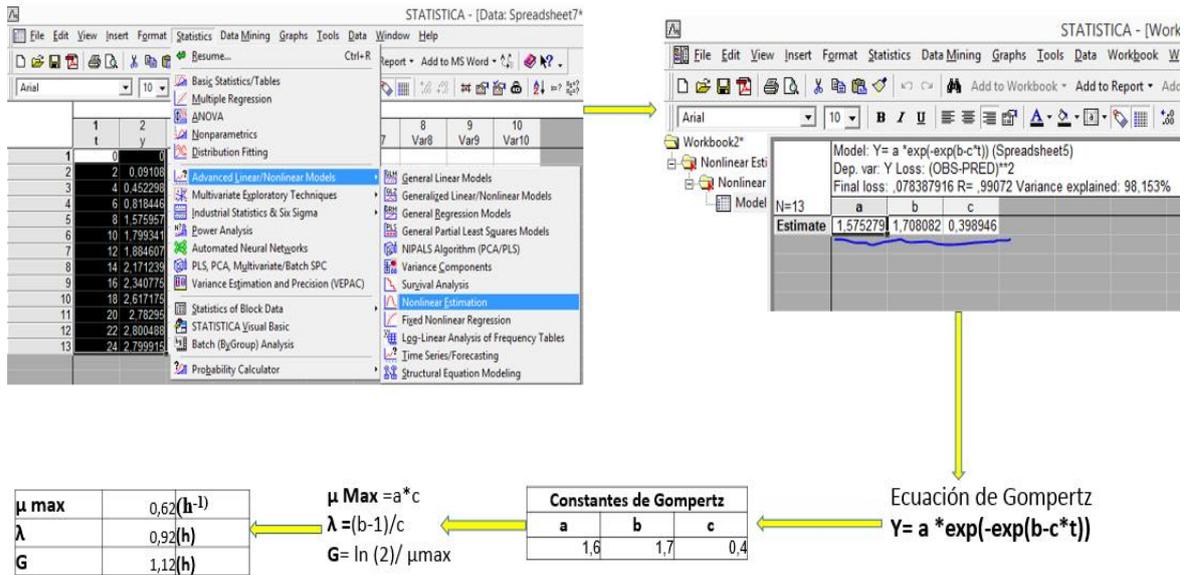
Anexo 5. Curva de calibración entre D.O. y UFC/ml de *Pseudomona protegens* CHA0



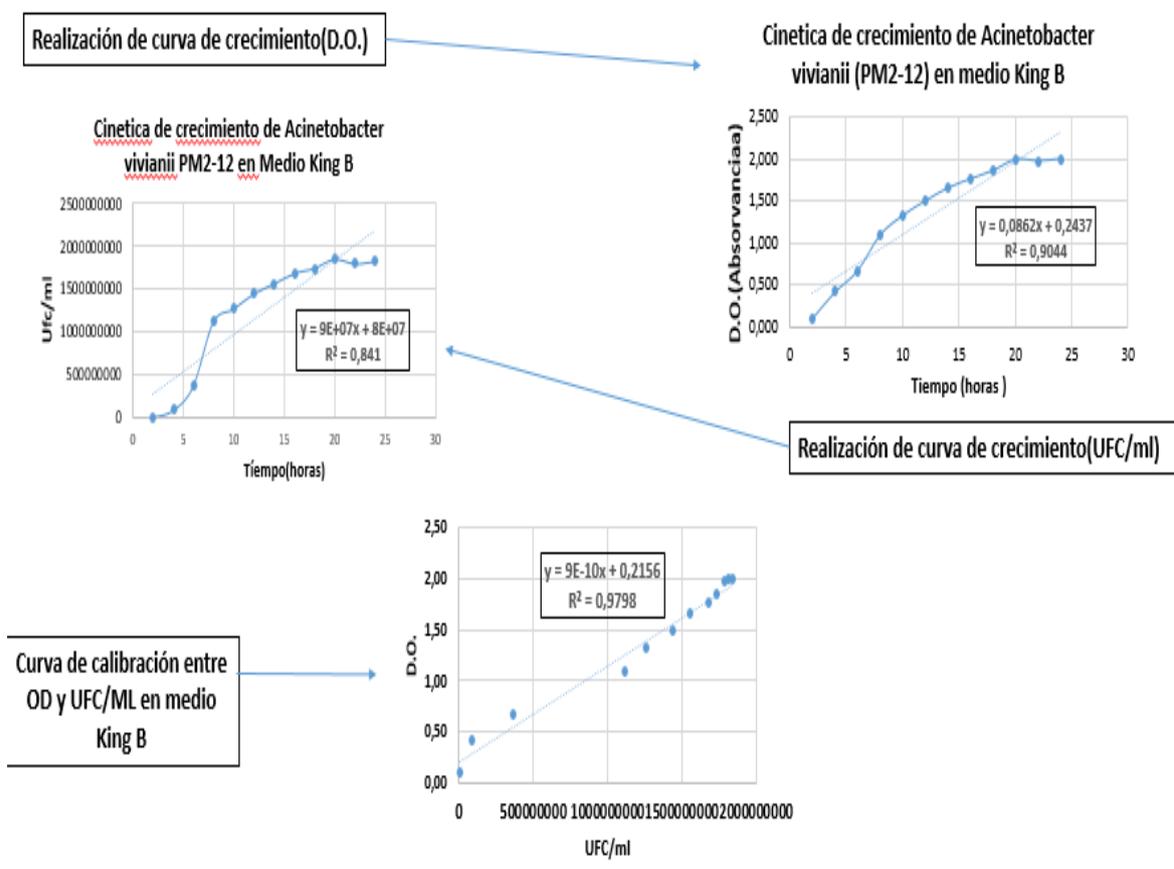
Anexo 6. Curva de calibración entre D.O. y UFC/ml de *Pseudomona Veronii* RE4



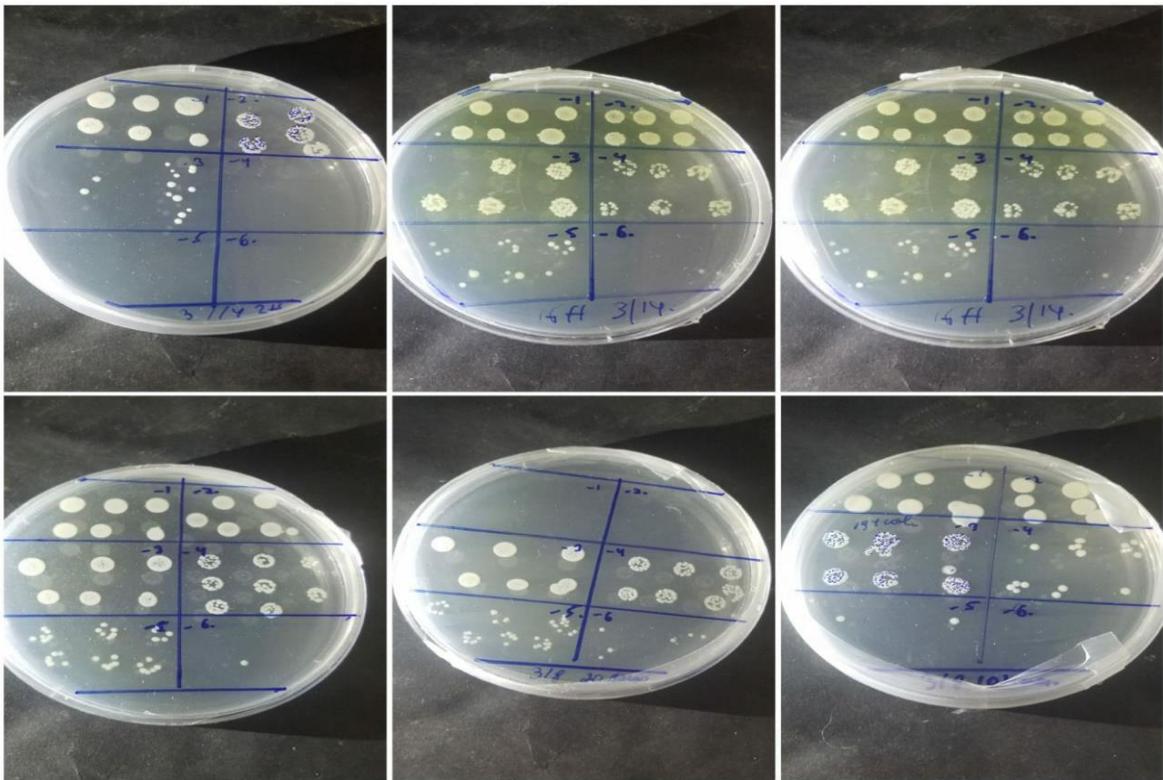
## Anexo 7. Determinación de los parámetros cinéticos de las PGPR mediante software Statistica y modelo matemático de Gompertz



## Anexo 8 . Proceso de Correlación entre O.D. y concentración celular



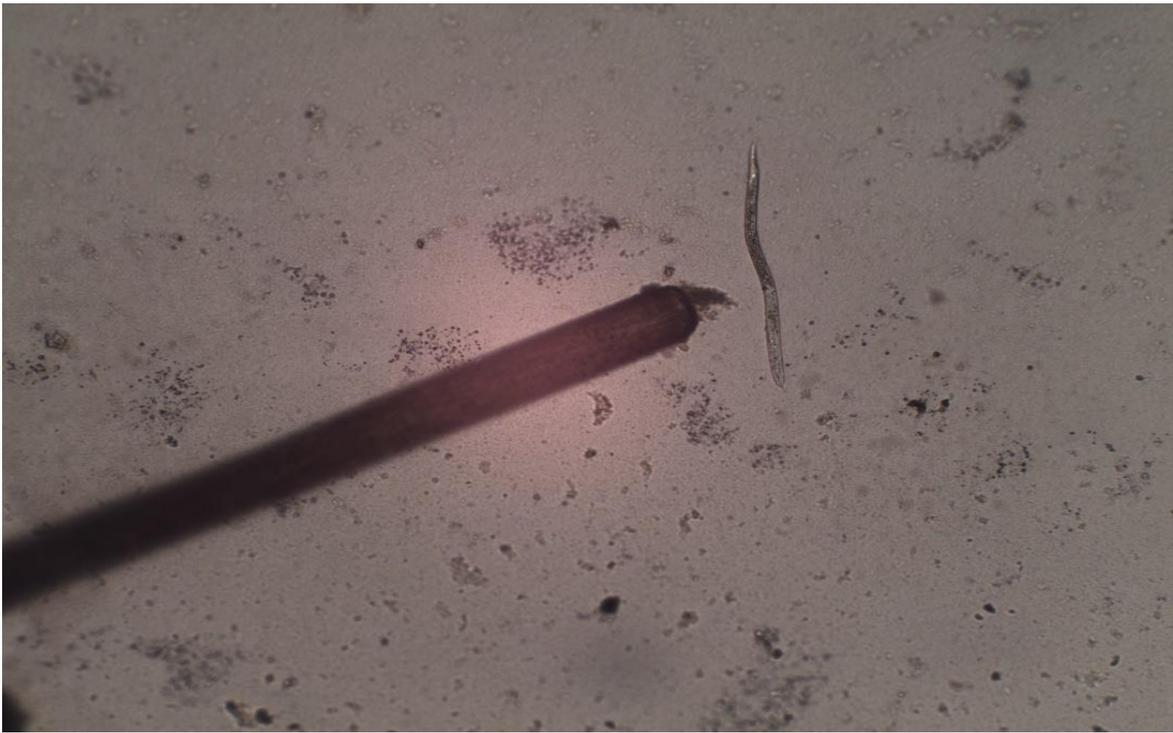
Anexo 9. Técnica de microgota en distintos medios de cultivo



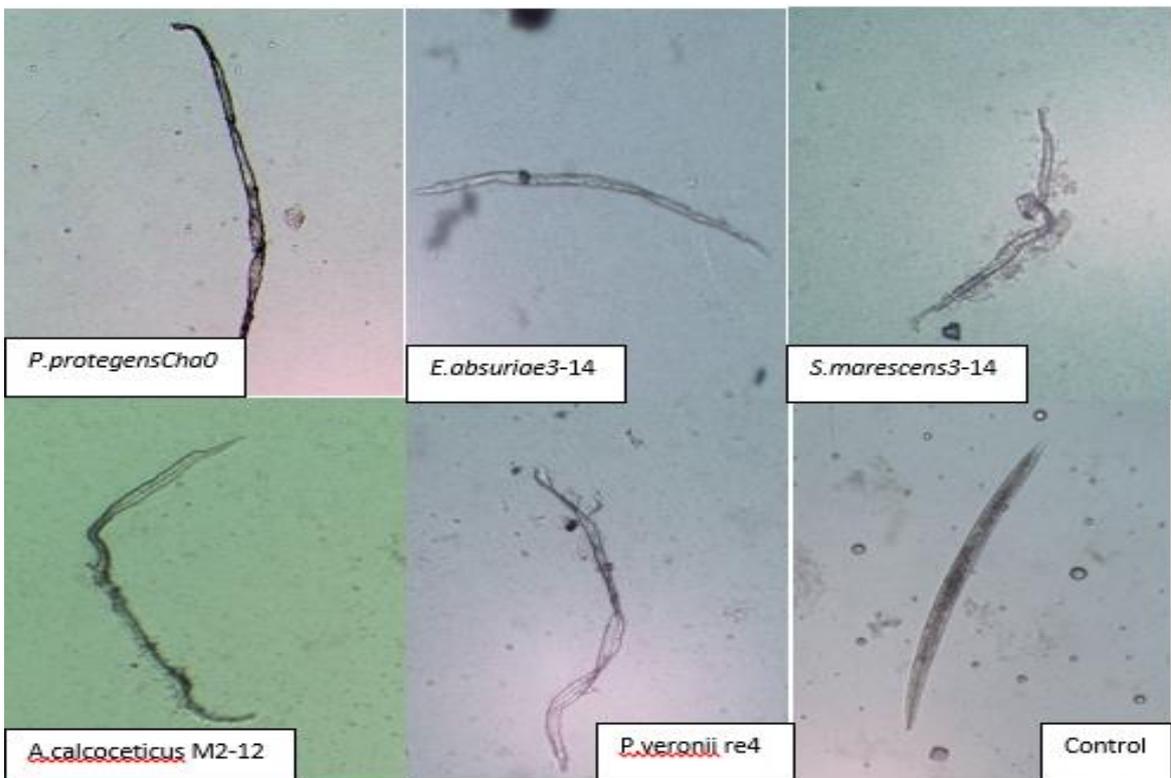
Anexo 10. Placa de inhibición de *M. incognita* J2



Anexo 11. Estimulación de nematodos con cabello (magnificación x 10)



Anexo 12. Efectos de las PGPR 72 horas después de la exposición a los extractos celulares obtenidos en Medio (3) (magnificación x 10)



Anexo 13. Instalación de biorreactor



## **Financiamiento**

El trabajo se financió por el Proyecto de FONDO COMPETITIVO DE INVESTIGACION CIENTIFICA Y TECNOLÓGICA FOCICYT (UTEQ-AGRICOLA-2-FCA-IAGR-2017-18), otorgado por la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, de la investigación: Evaluación de la cinética de crecimiento de PGPR y su actividad antagonista hacia *Meloidogyne incognita* “*in vitro*” CONVOCATORIA EXTRAORDINARIA # 4