

Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia
Escuela de Biología
Programa de Experiencias Docentes con la Comunidad -
EDC-

INFORME FINAL

Práctica de Experiencias Docentes con la Comunidad
-EDC-
Laboratorio Soluciones Analíticas Febrero 2002 -
Junio 2003

Silvia Anaité López Alquijay
Carné: 9617625

INDICE

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
CUADRO DE ACTIVIDADES	5
DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES	
DOCENCIA	7
SERVICIO	9
INVESTIGACIÓN	13
INFORME FINAL DE INVESTIGACIÓN	17

RESUMEN

Las prácticas del Programa de Experiencias Docentes con la Comunidad EDC de la carrera de Biología comprende tres unidades Servicio, Docencia e Investigación. La unidad de Práctica fue el Laboratorio de Fitopatología del Laboratorio Agrícola Soluciones Analíticas, en el cual se realizaron las tres actividades que comprende el programa de EDC. En el Laboratorio de Fitopatología se ingresan muestras de plantas que se procesan para el diagnóstico de enfermedades en plantas ocasionadas por nematodos, hongos y bacterias fitopatógenas, se emite un resultado que se entrega a la persona responsable de la muestra en un reporte, el cual incluye el diagnóstico de la enfermedad, agente causal y recomendaciones de manejo para el control de la enfermedad en el cultivo. Estas actividades se realizaron en el período del mes de marzo del 2002 al mes de mayo del 2003.

La unidad de Servicio consistió en aprender las técnicas y métodos utilizados en el Laboratorio de Fitopatología en el procesamiento de muestras para la extracción de nematodos y para el aislamiento de hongos y bacterias, así como el reconocimiento de síntomas y diagnóstico de enfermedades ocasionadas por nematodos, hongos y bacterias.

La unidad de Docencia comprendió en el entrenamiento del asistente técnico de laboratorio, que consistió en el apoyo al técnico de laboratorio en la enseñanza del procesamiento de muestras para la extracción de nematodos, así como para el aislamiento de hongos y bacterias fitopatógenas.

Para la unidad de Investigación se utilizó el producto fungicida RootGuard Plus hecho a base de tres especies de bacterias del género *Streptomyces*, al cual se le realizaron varias pruebas de laboratorio in vitro para evaluar la acción fungicida en contra del hongo fitopatógeno del género *Rhizoctonia*.

INTRODUCCIÓN

El siguiente documento es el Informe Final de las actividades de Docencia, Servicio y del informe Final de Investigación realizado en el Laboratorio de Fitopatología del Laboratorio Agrícola Soluciones Analíticas, para las prácticas del Programa de Experiencias Docentes con la Comunidad EDC de la Escuela de Biología, en el período del mes de marzo del año 2002 al mes de mayo del año 2003.

En el Informe Final se presentan las actividades realizadas para cada una de las unidades del Programa EDC, se presentan cuadros que contienen el nombre de la actividad, la fecha en que se realizó y el número de horas que se utilizaron para realizarla, también se presenta el Informe Final de Investigación.

Las unidades que comprenden el Programa de Prácticas se realizaron en una sola unidad de práctica, el Laboratorio de Fitopatología, por que las tres unidades están íntimamente ligadas y enfocadas principalmente a las enfermedades de las plantas (agentes que las ocasionan, síntomas que presentan las plantas, y el manejo necesario para contrarrestar la enfermedad). La Fitopatología es la ciencia que estudia las enfermedades de las plantas, en el informe final de investigación se aborda el tema de control biológico relacionado con el control de organismos fitopatógenos con un producto hecho a base de organismos antagónicos a estos, este es un campo en el cual el Biólogo puede incursionar, ya que es de gran interés que con el uso del control biológico se da la posibilidad de disminuir el uso de agroquímicos que ocasionan daño a los humanos, animales así como al medio ambiente.

CUADRO DE ACTIVIDADES

No.	Actividad	Tipo	Fecha	Horas
1	Herbario BIGUA (USAC)	Servicio	Febrero	60
2	Extracción de Nematodos	Servicio	8-31 de julio, 12-29 de agosto	132
3	Charla específica: Análisis fitopatológico en plantas	Docencia	1 de agosto	4
4	Identificación de síntomas causados por hongos y bacterias fitopatógenas	Docencia	2 de agosto	4
5	Aislamiento de hongos y bacterias fitopatógenas (I Fase)	Servicio	5-8 de agosto, 1-18 de octubre	76
6	Preparación de medios de cultivo (NA y PDA)	Servicio	9 de agosto	4
7	Realización de Informe de Avance	Servicio	18 de agosto, 25 de mayo, 4 de junio	24
8	Identificación de géneros de nematodos	Docencia	2-20 de septiembre	60
9	Conteo de nematodos	Servicio	23-27 de septiembre	20
10	Preparación de medios de cultivo (YDC, KB, HL)	Servicio	21-25 de octubre	20
11	Aislamiento de hongos y bacterias fitopatógenas (II Fase)	Servicio	4-29 de noviembre	80

No.	Actividad	Tipo	Fecha	Horas
------------	------------------	-------------	--------------	--------------

12	Realización del Protocolo	Investigación	8-19 de abril del 2002	40
13	Construcción del invernadero	Investigación	2-13 de diciembre	40
14	Entrenamiento técnico	Docencia	6 de enero al 18 de febrero	160
15	Aislamiento del hongo Rhizoctonia	Investigación	10-21 de marzo	40
16	Pruebas in-vitro hongo-producto	Investigación	31 de marzo al 7 de abril	24
17	Pruebas microbiológicas del producto	Investigación	8-18 de abril	40
18	Búsqueda de medios de cultivo	Investigación	21-25 de abril	20
19	Preparación de medios de cultivo (YME y suero de leche)	Investigación	28 de abril a 2 de mayo	20
20	Aislamiento de bacterias de RootGuard	Investigación	5-23 de mayo	60
21	Pruebas a las colonias aisladas	Investigación	25-29 de mayo	20
22	Realización del Informe Final EDC	Investigación	9-26 de junio	54

DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES

DOCENCIA:

Análisis fitopatológico en plantas:

- **Objetivo:** Conocer los síntomas en las plantas ocasionados por los diferentes agentes fitopatógenos como nemátodos, hongos y bacterias y la utilización de los diferentes métodos para su aislamiento.
- **Descripción:** En esta charla se presentaron los diferentes síntomas en las plantas y porque agente fitopatógeno son ocasionados, y también se explicó cuales son los métodos utilizados en el aislamiento. Para la extracción de nemátodos el método más utilizado es el de centrifugado-tamizado, y se realiza en suelos y raíces; para el aislamiento de hongos se utiliza el medio de cultivo PDA (Papa, Dextrosa, Agar), y para el aislamiento de bacterias se utiliza el medio de cultivo NA (Agar Nutritivo) y luego una serie de pruebas diferenciales, para este aislamiento se utilizan solamente tejidos vegetales.
- **Resultados parciales:** Adquisición del conocimiento de las diferentes manifestaciones o síntomas que presentan las plantas debido al agente que las ataque y como poder extraer estos agentes en las muestras enviadas a laboratorio.
- **Porcentaje de avance:** 50%

Identificación de síntomas causados por hongos y bacterias fitopatógenas:

- **Objetivo:** Conocer cuales son los síntomas que ocasionan los hongos y bacterias fitopatógenas.
- **Descripción:** Antes de ingresar al laboratorio, la planta es observada por el personal de laboratorio y se pregunta al personal responsable del cultivo cuales son los síntomas que presenta en el campo, entonces se determina que análisis se le realizará; al ingresar al laboratorio la planta es lavada y se localizan los síntomas que presenta, generalmente las bacterias ocasionan lesiones acuosas, mientras que los hongos lesiones secas. Estas lesiones se observan al estereoscopio y luego al microscopio, para identificar presencia de micelio o cuerpo fructífero o de flujo bacterial, y así poder determinar por observación directa si es un hongo o una bacteria el causante del daño.
- **Resultados parciales:** identificación de algunos síntomas ocasionados por hongos y bacterias fitopatógenas.
- **Porcentaje de avance:** 50%.

Identificación de géneros de Nematodos:

- **Objetivo:** Conocer los diferentes géneros de nematodos fitopatógenos que afectan a los cultivos agrícolas en Guatemala.
- **Descripción:** De los 40 ml. de solución extraídos en el proceso de extracción, se toman 2 ml y se vierten a una placa de conteo, luego se observa al microscopio. Se detecta un nematodo en el objetivo 4X, luego se observa en el de 10X para poder observar la forma de la cabeza, el estilete, posición de la vulva y espícula (aparatos sexuales de la hembra y el macho) y la forma de la cola; estas partes son las más utilizadas para la diferenciación entre géneros. La observación del espécimen va acompañada de la consulta de libros y manuales de laboratorio para corroborar las características y poder determinar el género al que pertenece el nematodo observado.
- **Resultados parciales:** Los géneros de nematodos causantes de daños a cultivos en Guatemala son varios, pero de acuerdo a las prácticas realizadas en laboratorio para lograr el dominio de la identificación, se requiere de mucha práctica y estudio detenido de cada género en particular. Durante la práctica de este método, se logró el dominio de identificación de 4 géneros: *Pratylenchus*, *Meloidogyne*, *Paratylenchus*
- **Porcentaje de avance:** Se observaron e identificaron todos los géneros de nemátodos presentes en las muestras procesadas en el laboratorio, por lo que se cubrió el 100%.

Capacitación a técnico asistente del Laboratorio de Fitopatología:

- **Objetivo:** Colaborar en la capacitación del nuevo técnico asistente del laboratorio de Fitopatología.
- **Descripción:** Enseñar el procesamiento de muestras para la extracción de nematodos, así como para el aislamiento de hongos y bacterias fitopatógenas.
- **Resultados parciales:** Se han realizado conjuntamente con el técnico asistente, los análisis utilizados en el laboratorio para el procesamiento de muestras.
- **Porcentaje de avance:** 100%

SERVICIO:

Herbario BIGUA:

- **Objetivo:** Conocer el proceso que lleva cada especie vegetal para ingresar a la colección del Herbario BIGUA.
- **Descripción:** Las especies vegetales se colectan en el campo, luego se herborizan en la secadora del herbario, luego de herborizadas se montan en cartulina especial color blanco, para identificar la planta se utiliza la Flora de Guatemala y se utiliza una etiqueta pegada en el lado derecho inferior de la cartulina donde se incluye familia a la que pertenece, nombre científico de la planta, lugar de colecta, nombre de la persona que la colectó y fecha; después de ser identificadas a las plantas se les coloca un número correlativo y se anotan en el archivo. Después de identificarla y registrarla, la planta es ubicada por familia en uno de los diferentes armarios de la colección.
- **Resultados parciales:** Conocimiento de todo el proceso anteriormente descrito, a excepción de la colecta de campo.
- **Porcentaje de avance:** 100%

Extracción de Nemátodos:

- **Objetivo:** Conocer y Manejar el método tamizado-centrifugado utilizado para la extracción de nemátodos en suelos y raíces.
- **Descripción:** En una muestra de suelos se requiere un volumen de 100ml. de suelo, el cual se mezcla en una palangana con 2lts. de agua, se mezcla y se deja reposar por 20seg., luego esta solución se pasa por dos tamices uno sobre otro, (1 de 80mesh y el otro de 400mesh), esto se hace dos veces; agrega bastante agua para tratar que capturen la mayor cantidad de nemátodos en el tamiz de 400mesh, lo que queda en el tamiz de 400mesh es colectado con una pizeta que contiene agua en un tubo de centrifuga de 100ml., a esta solución se le agrega 2gramos de kaolín y se centrifuga durante 3min. Las partículas de suelo y los nemátodos se sedimentan, entonces se desecha el sobrenadante, y al precipitado se le agrega una solución de azúcar, y se centrifuga por minuto y medio, la solución de azúcar por tener mayor densidad que el kaolín extrae a los nemátodos y por lo tanto el sobrenadante se vierte en el tamiz de 400mesh y se lava con bastante agua de chorro, para eliminar la solución azucarada, y por último se colecta en un beacker plástico de 100ml.

En una muestra de raíces el procedimiento es el mismo que para los suelos, con excepción de que para las raíces se

pesan 10 gramos de la muestra o 25gramos si son de plátano o banano, y luego se licuan por 1min.

- **Resultados parciales:** el manejo del método es bastante eficiente, con la realización de 6 a 7 muestras por día.
- **Porcentaje de avance:** 100%

Aislamiento de Hongos y Bacterias (I Fase):

- **Objetivo:** Conocer los métodos utilizados para el aislamiento e identificación de los diferentes géneros de hongos y bacterias fitopatógenas.
- **Descripción:** El método de aislamiento de hongos y bacterias fitopatógenas se divide en dos fases.
La Fase I consiste en el conocimiento de los síntomas que causan estos agentes, así como su aislamiento en medios de cultivo, NA para bacterias y PDA para hongos. La Fase II consiste en la transferencia de colonias puras de bacterias a medios diferenciales, e identificar a que género pertenece. Si los hongos no forman cuerpo fructífero en PDA, estos se transfieren a medios especiales que permitan la esporulación, para después identificarlos.
- **Resultados parciales:** El medio de cultivo PDA es utilizado para el aislamiento de hongos y el medio de cultivo NA es utilizado para el aislamiento de bacterias fitopatógenas.
- **Porcentaje de avance:** 100%.

Preparación de medios de cultivo:

- **Objetivo:** Conocer el proceso de preparación de medios de cultivo NA y PDA.
- **Descripción:** Para la preparación de NA se utiliza 12gramos de NA en polvo y se le agregan 300ml de agua destilada. Para la preparación de PDA se utilizan 6 gramos en 250ml. de agua destilada. Ambos medios se hacen en un beacker de 500ml. debidamente identificado con el nombre del medio, se mezcla y se mete al microondas aprox. dos minutos y medio, hasta que la solución sea homogénea, luego se introduce en la autoclave, y se esteriliza a 15lbs. de presión durante 20min. Después de esterilizado, se deja que se enfríe un poco, como a temperatura ambiente para poder manipularlo, en la cámara de siembra se vierte en cajas petri, las cuales se identifican y guardan en el refrigerador.
- **Resultados parciales:**se prepararon los medios de cultivo PDA (Papa, Dextrosa, Agar) y NA (Agar Nutritivo)
- **Porcentaje de avance:** 100%.

Realización de Informe de Avance:

- **Objetivo:** Presentar un cronograma y descripción de las actividades realizadas en el Laboratorio de Fitopatología durante las prácticas de EDC
- **Descripción:** En el informe se presenta un cronograma de las actividades realizadas en el laboratorio, así como de las horas utilizadas en cada una de ellas; cada una de estas actividades también se describen más adelante.
- **Resultados parciales:** se entregaron cuatro informes de avance, enlistando las actividades realizadas durante la práctica y el total de horas utilizadas en las mismas.

Conteo de Nematodos:

- **Objetivo:** Conocer la cantidad de nematodos fitopatógenos presentes en una muestra de suelo o de raíces.
- **Descripción:** Después de extraer los 40 ml de solución en el proceso de extracción, con una pipeta se toman 2ml y se vierte en un placa de conteo, se observa al microscopio, se identifican los diferentes géneros de nematodos presentes y se inicia el conteo para determinar el número de nematodos por placa. Para determinar la cantidad de nematodos presentes en la muestra analizada se lleva a cabo la siguiente fórmula (número de nematodos en placa de conteo X 40ml de solución total / 2ml) esto nos da el número de nematodos en 10 gramos de muestra procesada.
- **Resultados parciales:** el conteo e identificación de los nematodos requiere del pleno conocimiento por parte del técnico, por lo que se necesita más práctica.
- **Porcentaje de avance:** 100%.

Preparación de medios de cultivo:

- **Objetivo:** Conocer el proceso de preparación de medios de cultivo diferenciales para bacterias: YDC, KB y HL.
- **Descripción:** Para la preparación de YDC se utiliza 2.5 gramos de extracto de levadura, 5.0 gramos de carbonato de calcio y 5.0 gramos de agar y se agregan 125ml de agua desmineralizada, en otro beaker se agregan 5.0 gramos de dextrosa y disolverlo en 125ml de agua desmineralizada, se esterilizan por separado y luego se mezclan las dos soluciones antes de verterlas en las cajas de petri. Para la preparación de KB se utilizan 9.0 gramos de medio KB en polvo, agregar 2.5ml de glicerina y 250ml de agua desmineralizada. Para la preparación de HL se utiliza 1.0 gramos de medio basal HL en polvo y agregar 100ml de agua desmineralizada, en otro beaker se añade 1.0 gramos de dextrosa en 10ml de agua desmineralizada, estos se esterilizan por separado y luego se mezclan. Los tres medios se hacen en un beaker de 500ml.

debidamente identificado con el nombre del medio, se mezcla y se mete al microondas aprox. dos minutos y medio, hasta que la solución sea homogénea, luego se introduce en la autoclave, y se esteriliza a 15lbs. de presión durante 20min. Después de esterilizado, se deja que se enfríe un poco, a temperatura ambiente para poder manipularlo, luego en la cámara de siembra se vierte en cajas petri, las cuales se identifican y guardan en el refrigerador.

- **Resultados parciales:** se ha prepararon cinco medios de cultivo y fueron utilizados en el laboratorio.
- **Porcentaje de avance:** 100%.

Aislamiento de hongos y bacterias fitopatógenas (II Fase):

- **Objetivo:** Identificación de los diferentes géneros de hongos y bacterias fitopatógenas.

Descripción: Para determinar el género de un hongo fitopatógeno, luego de aislarse en el medio de cultivo PDA, se extraen pequeñas secciones del área de avance del crecimiento del hongo, luego se colocan en un portaobjetos con una gota de agua, enseguida se coloca un cubreobjetos, luego se observa al microscopio en los objetivos 10X y 40X para poder observar la forma del micelio, presencia, forma y tamaño de las esporas, para poder identificar el género al que pertenece el hongo aislado.

Para determinar el género de una bacteria fitopatógena, luego de aislarse en medio de cultivo NA, se lleva a cabo la transferencia de colonias puras de bacterias a medios de cultivos diferenciales: KB- determina fluorescencia, HL- determina aerobiosis y anaerobiosis, YDC- color amarillo de la colonia, y también incluye la realización de pruebas complementarias como Tinción de Gram, oxidasa y catalasa, para la determinación final del género de la bacteria aislada.

En la determinación de géneros de hongos, la observación de la forma del cuerpo fructífero, tamaño y forma de las esporas, y en bacterias la observación de los resultados de las pruebas, va acompañada de la consulta de libros y manuales de laboratorio.

- **Resultados parciales:** se identificaron los hongos de los géneros: Fusarium, Rhizoctonia, Alternaria, Colletotrichum y las bacterias de los géneros: Pseudomonas, Xantomonas, Erwinia.
- **Porcentaje de avance:** 100%.

INVESTIGACIÓN:

Realización del Protocolo:

- **Objetivo:** Tener las bases para realizar el tema de investigación.
- **Descripción:** En el Protocolo se presenta la descripción completa de las etapas que se llevarán a cabo en el trabajo de investigación.
- **Resultados parciales:** Obtener las bases suficientes para dar inicio al trabajo de investigación.
- **Porcentaje de avance:** 100%

Construcción del invernadero:

- **Objetivo:** Construir un ambiente adecuado para la observación de síntomas en las plántulas en estudio.
- **Descripción:** El invernadero tiene un área de aprox. 2m de largo, 1.5m de ancho y 3m de alto. La estructura base (esqueleto) del invernadero es de madera, en la parte inferior (1m aprox.) está cubierto con malla metálica de 1mm, mientras que la parte superior está cubierta con plástico transparente de 5mm de grueso.
- **Resultados parciales:** El invernadero ya fue construido.
- **Porcentaje de avance:** 100%

Aislamiento del hongo del género Rhizoctonia:

- **Objetivo:** Obtención de la cepa pura del hongo Rhizoctonia para realizar las pruebas del producto RootGuard+
- **Descripción:** El hongo se aisló de una muestra de brócoli (*Brassica oleracea L. var. botrytis*): en la base del tallo afectado, se hicieron pequeños cortes en el área de avance del tejido enfermo, luego, se sembraron en el medio PDA, al observar crecimiento del micelio (aprox. 3 días) se transfirió a otra caja de PDA, para obtener únicamente el micelio de Rhizoctonia sin la presencia de otro hongo. Al observar el crecimiento de micelio en la nueva caja a donde fue trasladado, se tomó un fragmento de micelio y se observaron al microscopio las características del micelio para corroborar si pertenecía al género Rhizoctonia. Luego de determinar que pertenecen al género Rhizoctonia, se transfirió cada semana a una nueva caja de PDA, para que el hongo obtuviera los nutrientes necesarios para su desarrollo.
- **Resultados parciales:** Después de varios intentos de aislamiento del hongo Rhizoctonia de varios cultivos, finalmente se aisló el hongo del género Rhizoctonia en el cultivo del brócoli.
- **Porcentaje de avance:** 100%

Pruebas in vitro hongo-producto:

- **Objetivo:** Determinar el efecto fungicida del producto RootGuard+ contra el hongo del género Rhizoctonia.
- **Descripción:** Se prepara el medio de cultivo PDA (6gr de PDA/150ml de agua destilada). Se prepara una solución stock de RootGuard+ (6gr/10ml de agua destilada esterilizada), esta cantidad esta basada en las recomendaciones de uso del producto. Se prepararon cuatro tratamientos, el primero es el doble de la dosis recomendada (2ml de sol. stock/18ml de PDA), el segundo es la dosis recomendada (1ml de sol. stock/19ml de PDA), el tercero es la mitad de la dosis recomendada (0.5ml de sol. stock/19.5ml de PDA), y el cuarto es 10 veces menos de la dosis recomendada (dilución de 1ml de sol stock/19ml de agua, tomar 2ml de sol. stock/18ml de PDA). Todos los tratamientos tienen un volumen de 20ml porque es lo utilizado para verter en una caja petri, el medio PDA se encuentra líquido para poder mezclar totalmente con el producto. Luego se almacenan en el refrigerador. Cuando el medio y el producto se han solidificado, se toman pequeñas secciones de PDA con micelio de Rhizoctonia y se inoculan en la caja de petri PDA-RootGuard+, se colocan en la cámara de incubación por 7 días, luego se observa si hay o no crecimiento de micelio de Rhizoctonia.
- **Resultados parciales:** Se observó crecimiento de micelio de Rhizoctonia en los cuatro tratamientos, esto es un indicativo que el efecto fungicida del producto ha disminuido.
- **Porcentaje de avance:** 100%

Pruebas microbiológicas del producto:

- **Objetivo:** Determinar la viabilidad de las bacterias contenidas en el producto RootGuard+
- **Descripción:** Las pruebas microbiológicas se realizaron en el laboratorio de Microbiología de Soluciones Analíticas. Estas pruebas consisten en tomar 10gramos del producto y se disuelven en 100ml de agua peptonada, de esta solución se hacen cuatro diluciones (1/10, 1/100, 1/1,000 y 1/10,000), se toma 1ml de cada dilución y se vierten en cajas petri, a las cuales se les añade 19ml de medio de cultivo PC (Plate Count) = (Conteo en placa) líquido. Luego se dejan reposar hasta que el medio se solidifica, al solidificarse se dejan las cajas de petri en la incubadora de 4 a 5 días. Al quinto día se observa si hay crecimiento de colonias, entonces se cuentan, y por fórmulas matemáticas se llega a determinar el número de UFC (Unidades Formadoras de Colonias) por gramo de producto.
- **Resultados parciales:** Los resultados de las pruebas microbiológicas realizadas al producto RootGuard + me fueron entregados.
- **Porcentaje de avance:** 100%

Búsqueda de medios de cultivo:

- **Objetivo:** Encontrar un medio de cultivo adecuado que permita el crecimiento de bacterias del género *Streptomyces*, para tratar de rescatar la viabilidad de las bacterias contenidas en el producto RootGuard+.
- **Descripción:** Se consultó literatura para llevar a cabo el aislamiento y reproducción de las bacterias del género *Streptomyces*, la literatura indica que el medio YME (Yeast Malt Extract) = (Levadura y Extracto de Malta Agar), es el medio de cultivo utilizado en los laboratorios de microbiología para la determinación de este género de bacterias. Otra opción es la utilización del suero de leche, el cual se escogió para llevar a cabo las pruebas, ya que en las instrucciones del producto dice que las bacterias se encuentran preservadas en suero de leche deshidratado.
- **Resultados parciales:** Se hicieron las conversiones necesarias de la formula original para preparar las cantidades de medio de cultivo a utilizar en el laboratorio.
- **Porcentaje de avance:** 100%

Preparación de medios de cultivo (YME-Suero de leche):

- **Objetivo:** Preparar los medios de cultivo para observar el crecimiento de las bacterias del producto.
- **Descripción:** Para el medio de cultivo YME se utilizaron 0.4grs de levadura, 1.0grs de malta, 0.4grs de dextrosa y 2.0grs de agar en 100ml de agua destilada. Para el suero de leche se utilizó 2.0grs de agar en 100ml de suero de leche. Ambos medios de cultivo se mezclaron, y se esterilizaron en la autoclave a 121°C, y 15lbs de presión por 20min. Luego de esterilizados se vertieron en cajas de petri. Al solidificar el medio las cajas de petri se almacenaron en la refrigeradora.
- **Resultados parciales:** Se preparó un solo medio de cultivo con la unión de los medios YME y el suero de leche.
- **Porcentaje de avance:** 100%

Aislamiento de Bacterias del producto RootGuard+:

- **Objetivo:** Aislar y reproducir las bacterias contenidas en el producto RootGuard+.
- **Descripción:** Del crecimiento observado en las placas de conteo utilizadas (pruebas microbiológicas), se observaron tres diferentes morfologías de colonias de bacterias, cada una de estas se aisló en el medio de cultivo YME-Suero de leche.
- **Resultados parciales:** Se observó crecimiento de las tres colonias aisladas en el medio de cultivo.
- **Porcentaje de avance:** 100%

Pruebas a las colonias de bacterias aisladas:

- **Objetivo:** Determinara si las colonias de bacterias aisladas pertenecen al género Streptomyces.
- **Descripción:** A las colonias de bacterias aisladas se le realizaron las pruebas de oxidasa, Tinción de Gram y observación de reacciones en medios de cultivos diferenciales (YDC, KB y HL), para determinar si los resultados coinciden con los que presentan las bacterias del género Streptomyces. Las pruebas se hicieron a cada una de las colonias de bacterias aisladas.
- **Resultados parciales:** Se realizaron las pruebas a cada colonia de bacteria. Falta verificar si los resultados coinciden con los de las bacterias del género Streptomyces.
- **Porcentaje de avance:** 100%

Realización del Informe Final de EDC:

- **Objetivo:** Presentar un cronograma y descripción de todas las actividades realizadas en el laboratorio de Fitopatología así como el Informe Final de Investigación.
- **Descripción:** En el Informe Final se presentan cuadros resumen de las actividades realizadas y de las horas utilizadas en cada una de ellas, así como su descripción y el Informe Final de Investigación, realizados durante del mes de febrero del 2002 al mes de junio del 2003.
- **Resultados parciales:** En el Informe Final de EDC se enlistan todas la actividades y horas utilizadas para realizarlas durante el período del mes de febrero del 2002 al mes de junio del 2003, en este Informe se reportan un total de 1,002 horas.
- **Porcentaje de avance:** 100%

Universidad San Carlos de Guatemala
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia
Escuela de Biología

Informe Final de Investigación

Evaluación del producto RootGuard+ en la inhibición del
hongo fitopatógeno Rhizoctonia en condiciones de
Laboratorio

Silvia Anaité López Alquijay
Carné: 9617625

INDICE

<i>RESUMEN</i>	3
INTRODUCCIÓN.....	4
JUSTIFICACIÓN.....	5
ANTECEDENTES.....	6
OBJETIVOS.....	11
HIPÓTESIS.....	11
PROCEDIMIENTO Y METODOLOGÍA.....	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	15
CONCLUSIONES.....	19
RECOMENDACIONES.....	19
BIBLIOGRAFÍA.....	20
ANEXO 1.....	21
ANEXO 2.....	22
ANEXO 3.....	23

RESUMEN

El siguiente trabajo es la evaluación del producto fungicida RootGuard Plus el cual es una mezcla de tres especies diferentes de bacterias Streptomyces, que son bacterias saprófitas colonizadoras de la rizosfera y productores de potentes metabolitos antifungicos. Esta evaluación se realiza para determinar la efectividad de la acción fungicida contra el hongo fitopatógeno del género Rhizoctonia en semillas y plántulas de brócoli. Se realizan pruebas in vitro previo a la aplicación del producto a las semillas y plántulas, las pruebas in vitro consisten en la preparación de cuatro diluciones del producto RootGuard y la mezcla de las mismas con el medio de cultivo PDA el cual se utiliza como sustrato para la siembra del hongo Rhizoctonia que previamente ha sido aislado de plantas de brócoli infectadas con este hongo. En estas pruebas in vitro se observa la fuerza fungicida del producto al inhibir el crecimiento del micelio del hongo Rhizoctonia. Al observar los resultados in vitro se realizan pruebas microbiológicas para determinar la concentración de bacterias que contiene el producto al momento de su utilización, el producto tiene una concentración original de 10000 millones de UFC/gramo, y el resultado de las pruebas microbiológicas indica que la concentración de bacterias ha disminuido notablemente a 580 UFC/gramo de producto, con estos resultados la acción fungicida del producto se ha anulado casi en su totalidad y las pruebas no pueden realizarse. Se toma la decisión de realizar la recuperación del producto, que consiste en el aislamiento de las tres especies de bacterias contenidas en el producto RootGuard Plus, este procedimiento se realiza con las colonias de bacterias observadas en las pruebas microbiológicas y la transferencias de estas a un medio de cultivo específico para las bacterias del género Streptomyces contenidas en el producto, la obtención de los resultados indican que las colonias aisladas pueden ser del género Streptomyces pero no se sabe si son las especies de las cuales está formado este producto, esta respuesta no se sabe con certeza porque la obtención o aislamiento de microorganismos utilizados para el control biológico es un procedimiento bastante sistematizado como delicado, y la determinación de especies de bacterias es un tema bastante amplio el cual requiere de equipo de laboratorio específico y del conocimiento del técnico que lo realice.

INTRODUCCIÓN:

La humanidad necesita de las plantas y del producto de éstas para proveerse de alimentación y abrigo (Flores,1967), por lo que el punto de partida de cualquier actividad humana son las plantas.

Debido a su gran importancia, la salud de las plantas ha sido objeto de preocupación para el hombre, quien para resolver los problemas causados por los factores adversos al cultivo de los vegetales, se vale de la Patología Vegetal o Fitopatología, que es la ciencia que estudia las enfermedades de las plantas.

Referencias sobre la existencia de las enfermedades de las plantas se pueden encontrar aún en los más antiguos escritos sobre cultivos. Sin embargo, sólo a mediados del siglo XX se comenzó a reconocer la importancia de los hongos como agentes causales de enfermedades en las plantas.

Actualmente la Micosis(enfermedades causadas por hongos), representa el grupo de enfermedades de mayor importancia y de mayor distribución en las plantas.(FAO,1985).

Desde el año 1900 se han acumulado una serie de conocimientos fitopatológicos, entre los cuales se pueden mencionar, la determinación de la naturaleza de la resistencia de las enfermedades vasculares, modo de distribución de los patógenos, incorporación de los fungicidas orgánicos al combate de las enfermedades, la inducción de mutaciones como una herramienta útil en la búsqueda de material resistente a las enfermedades, así como la manufactura de fungicidas sistemáticos y otros. La información que hasta ahora se tiene acerca de los síntomas, causas y mecanismos del desarrollo de las enfermedades de las plantas, es de gran utilidad ya que permite el diseño adecuado de métodos para combatirlas, entre éstos métodos se encuentran el Control Biológico (Agrios, 1985).

En el siguiente trabajo se evaluó la efectividad del producto RootGuard Plus en la inhibición del hongo fitopatógeno Rhizoctonia. El hongo fitopatógeno Rhizoctonia se aisló de plantas de brócoli infectadas, luego se aisló en cajas de petri con el medio de cultivo PDA; para evaluar la efectividad del producto se hicieron cuatro diluciones en agua destilada, se mezclaron con el medio de cultivo YME/Suero de leche y se inoculó el micelio del hongo Rhizoctonia. Para determinar la efectividad del producto se observó durante ocho días el crecimiento del hongo.

JUSTIFICACIÓN:

Debido a la gran importancia que representa la agricultura para la humanidad, el hombre ha buscado diferentes formas para combatir las enfermedades de las plantas. La mayor cantidad de enfermedades en las plantas es causada por hongos, por lo que la demanda de productos efectivos en el combate de las mismas es bastante alto.

La mayoría de fungicidas disponibles en el mercado son compuestos químicos, y por, razones de seguridad y de prevención de efectos colaterales negativos sobre el medio ambiente, se están implementando productos hechos a partir de microorganismos antagónicos a los hongos fitopatógenos, los cuales requieren de varias pruebas en laboratorio para determinar su efectividad y posteriormente ser utilizados en el campo.

En la presente investigación, las pruebas de laboratorio realizadas al producto RootGuard+ nos indicará su efectividad fungicida contra el hongo fitopatógeno Rhizoctonia, esta efectividad será de gran beneficio a los agricultores porque utilizarán un producto que es efectivo, fácil de aplicar, no es tóxico y lo más importante su precio es bajo.

ANTECEDENTES:

Historia de la Fitopatología:

El hombre ha sabido de las enfermedades de las plantas desde los primeros días de la antigüedad. Esto se comprueba en el Antiguo Testamento, donde los mildius y tizones se mencionaban junto con la guerra y las enfermedades humanas, como los grandes azotes del pueblo.

El filósofo Teofastro (370-268 A. de C.) fue el primero en estudiar y escribir acerca de las enfermedades de árboles, cereales y leguminosas, aunque su estudio se basó en observaciones y especulaciones más que experimentos(Agrios,1985).

La fitopatología, también llamada Patología Vegetal, es la ciencia que estudia las enfermedades de las plantas. El término proviene de varias palabras griegas: Phytón = planta, Pathos = enfermedad, y Logos = estudio. (Jauch, 1976).

La Fitopatología es relativamente una ciencia joven que principió a dar sus primeros pasos firmes a mediados del siglo XIX, con las contribuciones de Anthon de Bary y Julius Kuhn, quienes estudiaron la relación parasítica entre el hospedero y el patógeno(Flores,1967).

Importancia de las enfermedades de las plantas:

Las enfermedades de las plantas son importantes para el hombre debido a que perjudican a las plantas y a sus productos. Para millones de personas que habitan la Tierra y cuya existencia depende de los productos vegetales, las enfermedades de las plantas pueden marcar la diferencia entre una vida normal y una acosada por el hambre.

En países donde el alimento es abundante, las enfermedades de las plantas tienen gran importancia, ya que provocan que los agricultores tengan pérdidas económicas, y propician el aumento del precio en los productos.

Las enfermedades en las plantas reducen la variedad de plantas que pueden desarrollarse en una determinada zona geográfica al destruir a todas las plantas de ciertas especies que son muy susceptible a una enfermedad en particular. El tipo de y monto de pérdidas ocasionadas por las enfermedades de las plantas varía de acuerdo a la especie de planta o los productos que produce la misma, así como el agente patógeno, la localidad, el medio ambiente, las medidas de control practicadas o el conjunto de estos factores(Agrios,1985).

Enfermedades de las plantas ocasionadas por hongos:

Los hongos son pequeños organismos, generalmente microscópicos, que carecen de clorofila y de tejidos conductores. La mayoría de las 100,000 especies de hongos son estrictamente saprofitas y viven sobre la materia orgánica muerta, a la que descomponen.

Alrededor de 50 especies de hongos producen enfermedades en el hombre y casi el mismo número causa enfermedades en los animales. Sin embargo, más de las 8,000 especies de hongos producen enfermedades en las plantas. Todas las plantas son atacadas por algún tipo de hongo, y cada uno de los hongos ataca a más de una planta. Algunos hongos crecen y se reproducen sólo cuando establecen cierta asociación con la planta hospedera durante todo su ciclo de vida(parásitos obligados), otros requieren de una planta hospedera durante cierta etapa de su ciclo de vida(parásitos no obligados) (Agrios,1985).

Sintomatología:

La sintomatología estudia los síntomas de las enfermedades. Síntoma, es la manifestación en la planta del proceso de la enfermedad. Puede haber variaciones dentro del mismo síntoma, que depende de la raza del parásito y de la variedad de la planta y su susceptibilidad(Jauch,1976).

Los síntomas que producen los hongos sobre los hospederos son del tipo local o general y puede aparecer por separado en hospederos distintos, en un mismo hospedero o aparecer uno después de otro en un mismo hospedero. En general, los hongos producen una necrosis local o general o la muerte de los tejidos que infectan, hipertrofia e hipoplasia o atrofia de plantas completas o de sus órganos, e hiperplasia o crecimiento excesivo de ellas o de sus órganos.

Características de los hongos fitopatógenos:

a) Morfología:

La mayoría de los hongos tienen un soma vegetativo que consta de filamentos continuos más o menos alargados que pueden o no tener paredes transversales(denominados septos). Al soma del hongo se le denomina micelio, y las bifurcaciones individuales del micelio se le denominan hifas. Cada hifa o micelio puede tener un grosor uniforme o puede terminar en porciones más delgadas o más anchas. La longitud de las hifas va de tan sólo 0.5 μm hasta 100 μm ., y la longitud del micelio va de unas cuantas micras hasta varios metros(depdiendo el género del hongo).

En algunos hongos, el micelio está constituido por células que contienen uno o dos núcleos por célula; en otros el núcleo es cenocítico(contiene muchos núcleos). El crecimiento del micelio se produce en las puntas de las hifas(Agrios,1985).

b) Reproducción:

Los hongos se reproducen principalmente mediante esporas. Las esporas son estructuras reproductoras o especializadas para la propagación del hongo, que constan de una o varias células. Estas estructuras pueden formarse asexualmente o ser el resultado de un proceso sexual.

En los hongos inferiores, las esporas asexuales se forman en el interior de un saco denominado esporangio y son diseminadas en el momento en que éste se rompe. Algunas de esas esporas se mueven mediante flagelos y se les llaman zoosporas. Otros hongos producen esporas asexuales denominadas conidias, que se desprenden de hifas especializadas llamadas conidióforos. La reproducción sexual se presenta en la mayoría de los grupos de hongos. En algunos de ellos, un par de células (gametos) de tamaño y forma semejante se fusionan y producen un cigoto (denominado zigospora). En otros, los gametos son distintos y al cigoto que se forma se le denomina oospora.

La fusión de los núcleos sexuales del cigoto produce un núcleo diploide ($2N$). Por lo común, las primeras divisiones de este núcleo son meióticas, de ahí que el hongo contenga núcleos haploides ($1N$) durante todo su ciclo de vida, excepto en el momento en que se han fusionado los núcleos gaméticos.

En la mayoría de los hongos, los gametos masculino y femenino se forman en un mismo micelio (hongo hermafrodita). Cuando los gametos masculinos fecundan a los femeninos del mismo micelio, al hongo se le denomina homotálico. Sin embargo, en la mayoría de los casos, los gametos masculinos fecundan a los gametos femeninos de otro micelio, por lo que se dice que el hongo es heterotálico. (Agrios, 1985).

c) Ecología y Diseminación:

La mayoría de los hongos fitopatógenos pasan parte de su ciclo de vida en las plantas que le sirven de hospedero, y otra parte en el suelo. La supervivencia y función de la mayoría de los hongos fitopatógenos depende ampliamente de las condiciones predominantes de temperatura y humedad o de la presencia de agua en su medio ambiente. Un micelio libre sólo vive entre cierto rango de temperatura; sin embargo, la mayoría de las esporas resisten amplios rangos de temperatura y humedad.

En la mayoría de los hongos, la diseminación de las esporas se efectúa en forma pasiva, aunque su liberación inicial en algunos hongos es enérgica; la distancia a la que las esporas son diseminadas varía con el agente diseminador. Es muy probable que el viento sea el principal agente diseminador de esporas en la mayor parte de hongos; en algunos otros, agentes como el agua y los insectos son mucho más importantes que el viento (Agrios, 1985).

Control de las enfermedades de las plantas:

No podemos sobrevivir sin las plantas que nos alimentan y nos dan abrigo. Cosechas sembradas adyacentes facilitan la diseminación de enfermedades e insectos dañinos.

Los pesticidas impiden que las cosechas sean dañadas por estos organismos; los químicos son los más usados para controlar a los organismos nocivos.

Los métodos de control varían considerablemente de una enfermedad a otra, dependiendo del tipo de patógeno, del hospedero, y de la interacción que se establece entre ellos. Una de las clasificaciones de estos métodos es el Control Biológico, el cual se logra mediante selección y producción de plantas resistentes a ciertos patógenos o mediante la utilización de otros microorganismos que sean antagónicos a ellos o que los parasiten. En los últimos años ha cobrado un alto interés el uso de hiperparásitos o microorganismos antagónicos para controlar las enfermedades de las plantas; éste tipo de control crea una epidemia que se riega rápidamente pero solamente mata a los organismos fitopatógenos, sin dañar a la planta; el organismo que hace el control biológico muere cuando su objetivo es obtenido([HYPERLINK](#))

En Guatemala el estudio y aplicación de productos de control biológico es muy poco, generalmente se utilizan para la eliminación de insectos, y generalmente para la elaboración de insecticidas se utilizan hongos. El fungicida RootGuard+ es un producto hecho a base de tres especies de bacterias del género *Streptomyces*, por lo que es bastante interesante comprobar contra que géneros de hongos fitopatógenos es efectivo. Uno de los géneros de hongos fitopatógenos del suelo que más dañan cultivos en Guatemala es *Rhizoctonia*.

Clasificación:

- Hongos Superiores
- Clase: Deuteromycetes
- Orden: Mycelia
- Género: *Rhizoctonia*

Como infecta a la planta: pasan su ciclo inactivo como esporas en el suelo. El hongo penetra por las heridas que sufre la raíz de la planta, subiendo por los vasos del xilema y sus estructuras se desarrollan dentro de las plantas que ataca. El crecimiento del hongo se ve favorecido por la humedad del suelo.

Síntomas que producen: pudriciones de la raíz, base de los tallos de las plantas anuales y mancha parda de los céspedes.

Cultivos que afectan: tomate, aguacate, ajonjolí, alfalfa, algodón, apio, arroz, arveja, cacao, café, camote, cebolla, cítricos, frijol, higo, y otros. (Finch,1974) (Agrios1985).

- Actinomicetos filamentosos:

Los actinomicetos son un gran grupo de bacterias filamentosas, generalmente Gram-positivas, que forman filamentos ramificados. Como resultado de un adecuado crecimiento, se forma una estructura ramificada de filamentos, denominada micelio. (David,1978)

- Género: Streptomyces

El género Streptomyces es un patógeno de las plantas en las cuales son procariotes filamentosos. Al contrario de otras bacterias productoras de esporas, las especies de Streptomyces producen esporas que son su principal método de dispersión. Cadenas de esporas son formadas a través de la fragmentación de hifas aéreas que se producen sobre el sustrato del micelio. El género Streptomyces es diferenciado fácilmente del reino Fungi por sus hifas y esporas pequeñas. Solo un número muy pequeño de más de 400 especies de Streptomyces descritos se conocen como patógenos de plantas y los aislados del tejido y suelo generalmente son saprofitos.(Schaad, 2001)

- Producto RootGuard Plus:

RootGuard+ es una mezcla de tres especies diferentes de bacterias del género Streptomyces, que son bacterias saprofitas colonizadoras de la rizósfera. Estos son microorganismos que producen potentes metabolitos antifúngicos. RootGuard+ ha demostrado ser efectivo en la inhibición un amplio rango de patógenos del suelo los cuales ocasionan grandes pérdidas económicas a los agricultores.

OBJETIVOS:

General:

Evaluar la efectividad el producto RootGuard+ a nivel de laboratorio en la inhibición del hongo fitopatógeno Rhizoctonia.

Específicos:

Determinar la efectividad fungicida de RotGuard+ contra el hongo Rhizoctonia en pruebas in vitro

Determinar la efectividad fungicida de RootGuard+ contra el hongo Rhizoctonia, en semillas y plántulas de brócoli

HIPOTESIS:

Las bacterias del género Streptomyces contenidas en el producto RootGuard+ son un fungicida efectivo contra el hongo fitopatógeno Rhizoctonia.

PROCEDIMIENTO Y METODOLOGÍA:

Universo de estudio:

El hongo fitopatógeno *Rhizoctonia* aislado de plantas de brócoli, en el medio de cultivo PDA, se realizarán cuatro tratamientos, el medio de cultivo PDA con cuatro diluciones diferentes del producto RootGuard Plus y un control (medio de cultivo PDA), con una réplica, utilizando un total de 10 unidades muestrales.

Materiales:

Medios de cultivo PDA, YME/Suero de leche
Hongo fitopatógeno: *Rhizoctonia*
Producto: RootGuard Plus
Cajas petri
Tubos de ensayo
Pipetas de 1ml.
Autoclave
Cámara de siembra

Método:

- Aislamiento del hongo *Rhizoctonia*:

Se aisló el hongo fitopatógeno *Rhizoctonia* de una planta de brócoli infectada con este hongo, se cortan secciones de 1 X 1cm de tejido infectado y se siembran en una caja de petri con medio de cultivo PDA (Papa, Dextrosa, Agar), se deja en la cámara de incubación por cinco o seis días, se observa si hay crecimiento, si hay crecimiento se toma una sección pequeña del micelio y se observa al microscopio para determinar si hay desarrollo de estructuras reproductoras, y si son del hongo del género *Rhizoctonia*.

- Acción fungicida del producto contra Rhizoctonia in vitro:

Para determinar la efectividad fungicida del producto RootGuard Plus, se preparó la solución recomendada en la etiqueta del producto (0.6gr/1ml de agua = 6gr/10ml). A partir de esta solución se preparó cuatro diluciones:

1. Dilución: 1ml de solución recomendada/19ml de agua. 2ml de la dilución + 18ml de PDA líquido.
2. 0.5ml de solución recomendada + 19.5ml de PDA líquido
3. 1ml de solución recomendada+ 19ml de PDA líquido
4. 2ml de solución recomendada + 18ml de PDA líquido

Al solidificarse el medio de cultivo/producto se sembró el hongo aislado en cada una de las cajas de petri con cada una de las cuatro diluciones y como control se sembró el hongo aislado en el medio de cultivo sin producto.

Después de permanecer ocho días en la cámara de incubación se observó la acción fungicida del producto contra el hongo.

- Pruebas microbiológicas del producto RootGuard+:

Para determinar la viabilidad del producto RootGuard+, se le realizaron pruebas microbiológicas en el Laboratorio de Microbiología de Soluciones Analíticas. Se toman 10 gramos del producto y se añaden 100ml de agua peptonada 0.1%, a partir de esta solución se hacen cuatro diluciones (1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000). De estas diluciones se se toma 1ml y se mezcla con 19ml de medio de cultivo PC (Placa de Conteo) líquido, al solidificar el medio se deja en la incubadora a 35°C \pm 0.5 por cinco días. Se revisaron las cajas de petri y no se observó crecimiento de ninguna colonia bacterial.

Se realizó de nuevo la prueba de viabilidad, ahora con un volumen mayor y una mayor cantidad de producto, pero manteniendo siempre una relación 1/10. Se utilizaron 25 gramos de producto en 225ml de agua peptonada 0.1%, se hicieron cuatro diluciones, al igual que en las pruebas anteriores, solo que en esta prueba se utilizaron dos medios de cultivo PC y PDA, PC es el medio utilizado para este tipo de pruebas y PDA porque es un medio rico en nutrientes. Se toman 1ml de las diluciones y se mezclan con 19ml del medio de cultivo, al solidificar las cajas con PC se incuban a 35°C y las cajas con PDA se dejan en la cámara de incubación a temperatura ambiente, ambos medios se incubaron por cinco días.

- Recuperación del producto RootGuard+:

1. Aislamiento de bacterias contenidas en el producto:

Con el crecimiento de colonias bacterianas en los medios de cultivo utilizados para las pruebas microbiológicas (PC y PDA) , en PC se observaron tres formas y colores diferentes de colonias. Para aislar las colonias observadas en PC, se buscó un medio ideal para el crecimiento de bacterias del género *Streptomyces* contenidas en RootGuard+, se eligió el medio YME (Yeast malt extract agar) que es un medio de cultivo específico para bacterias *Streptomyces*, a parte se eligió al suero de leche, ya que el producto indica que las bacterias están contenidas en suero de leche deshidratado, para ser aún más específicos se decidió mezclar el medio YME con el suero de leche para crear un medio de cultivo adecuado para las bacterias *Streptomyces* contenidas en el producto RootGuard+. Se prepararon cajas de petri con este medio de cultivo; se transfirieron las tres formas de colonias observadas en las cajas de PC al medio de cultivo (YME+suero de leche). Se dejaron en la cámara de incubación por dos semanas.

2. Pruebas a las colonias aisladas:

Al observarse crecimiento de las colonias bacterianas aisladas, se observó que la forma de las colonias no concordaban con la forma del crecimiento colonial de las bacterias del género *Streptomyces* (filamentoso), por lo que para poder determinar si las colonias aisladas pertenecían al género *Streptomyces* se realizaron varias pruebas a las colonias aisladas comparándolas con los resultados que presenta la bibliografía para las bacterias del género *Streptomyces*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS:

- Acción fungicida del producto contra Rhizoctonia in vitro:

Después de ocho días de incubación se obtuvo la siguiente tabla de resultados, y fotografías (Ver Anexo 1)

Dilución	Crecimiento del hongo (radio-cms-)
Control	caja completa
2ml de sol. recomendada diluida/18ml PDA	4.5cms
0.5 ml de sol.recomendada/19.5ml PDA	4.2cms
1ml de sol. recomendada/19ml de PDA	3.8cms
2ml de sol. recomendada/18ml de PDA	3.0cms

Tabla 1. Datos de laboratorio

Al analizar lo la tabla de resultados obtenida en la prueba de la acción fungicida del producto RootGuard+ contra el hongo Rhizoctonia in vitro, se determina que la acción del fungicida ha disminuido o ya no es efectiva, esto es en base a las observaciones y mediciones del crecimiento del hongo en el medio de cultivo YME/Suero de leche con el producto RootGuard+. Es notorio que conforme aumenta la concentración del producto en el medio disminuye el crecimiento del hongo, la mayor dilución presenta el mayor crecimiento del hongo y la menor dilución presenta el menor crecimiento del hongo, esto se determina comparándolo con el control, en la caja de petri control se observa que el hongo ocupa toda el área de la caja. En el área donde no hay crecimiento del hongo se observa una barrera o un área de color claro, este es el antibiótico que liberan las bacterias el cual actúa como fungicida impidiendo el crecimiento del hongo en esta área. Se realizaron cuatro diluciones para poder comparar la actuación del producto conforme aumenta su concentración; al no actuar en la supresión total del crecimiento del hongo, aún en la dilución del doble de la dosis recomendada, se pueden inferir dos cosas, la primera que en el procedimiento de dilución del producto, preparación del medio de cultivo y la siembra del hongo hubo una contaminación que anuló la acción fungicida del producto RootGuard+ y favoreció el crecimiento del hongo Rhizoctonia o que el medio de cultivo no era el adecuado para el desarrollo del producto, y la segunda es que el producto no era viable.

De estas dos opciones la más razonable es la segunda, ya que para la realización de las diluciones del producto, preparación del medio y la siembra del hongo se hicieron bajo la campana de siembra, que es un ambiente estéril, y el medio de cultivo es un medio rico en nutrientes específico para el desarrollo de las bacterias del género *Streptomyces* contenidas en el producto.

- Pruebas microbiológicas del producto RootGuard+:

Después de cinco días de incubación se obtuvieron los siguientes resultados. (Ver Anexo 2).

Estas pruebas se hicieron dos veces, debido a que en las primeras pruebas no se observó crecimiento de colonias bacterianas, se tomó la decisión de realizar la segunda prueba utilizando una mayor cantidad de producto. En la segunda prueba sí se obtuvo crecimiento de colonias bacterianas, y se logró determinar la cantidad de UFC que contenía el producto. Los resultados determinaron que el producto contenía 580 UFC/gramo de producto, este es un resultado bajísimo casi nulo en comparación a la concentración de bacterias que el producto debería de tener que es de 10,000 millones UFC/gramo de producto. De esta manera se determinó que el producto no era viable. La disminución en la concentración de bacterias contenidas en el producto puede deberse a la forma de almacenar el producto, y a el tiempo que se almacenó después de haberlo abierto. El producto se abrió un año antes de ser utilizado en estas pruebas y se almacenó sin ningún cuidado especial, ya que en las indicaciones del producto no se menciona que requiera condiciones especiales para su almacenamiento o que su tiempo de expiración sea tan corto. A pesar que en la etiqueta del producto no se menciona ningún cuidado especial para el producto, al observar el producto se puede decir que la humedad es el factor que ocasionó la disminución de la concentración de bacterias, la presentación original del producto es un polvo fino de color amarillo crema, y cuando se realizaron estas pruebas el producto en su mayoría era grumos compactos de color amarillo con pequeñas manchas de color negro, la compactación puede deberse a la humedad. También es importante recordar que el producto está hecho a base de microorganismos, por lo que después de abierto el producto debe utilizarse todo o utilizarlo en un corto plazo, para no perder su acción fungicida.

- Recuperación del producto RootGuard+:

1. Aislamiento de bacterias contenidas en el producto:

Después de dos semanas de incubación, observando a diario si presentaban crecimiento, obteniéndose los siguientes resultados. (Ver Anexo 3)

Al determinar que el producto propuesto para esta investigación no era viable, se trató la manera de recuperación del producto. La recuperación del producto se basa en el aislamiento de las tres especies de bacterias del género *Streptomyces* contenidas en el producto RootGuard+. Para el aislamiento de estas bacterias, se utilizaron las colonias de bacterias que se obtuvo en los medios de cultivos utilizados para las pruebas microbiológicas, en el medio de cultivo PC (Placa de Conteo) se observaron tres formas de bacterias diferentes. Se consultó bastante bibliografía de bacterias para encontrar el medio de cultivo adecuado para el crecimiento de bacterias del género *Streptomyces*. Basado en el género de bacterias y en las condiciones en las que están contenidas en el producto se determinó que el medio YME es específico para las bacterias del género *Streptomyces*, y que el suero de leche es la forma en que las bacterias están contenidas en el producto. Debido a estas dos razones se tomó la decisión de preparar un solo medio de cultivo, uniendo estos dos medios de cultivo YME + Suero de leche. Después de la preparación del medio de cultivo se realizó el aislamiento de las bacterias, se tomaron las tres formas de colonias bacterianas y se aisló cada una en una caja de petri con el medio de cultivo YME/Suero de leche, se dejaron en la cámara de incubación por dos a tres semanas, hasta que se observó el crecimiento de las colonias, el crecimiento fue bastante lento. Luego se hizo una purificación a las colonias de bacterias, se transfirieron a otra caja con el mismo medio de cultivo para obtener una colonia pura, y de nuevo se espero el crecimiento, tomó el mismo tiempo que el desarrollo de colonias en el aislamiento.

2. Pruebas a las colonias aisladas:

Colonia	Aeróbico	Anaeróbico	KB	YDC	Gram	Oxidasa
Streptomyces	+	-	-	amarillo o naranja	+	+
Blanca	-	-	-	blanca	-	-
Amarilla	-	-	-	crema	+	+
Salmón	-	-	-	salmón	+	+

Tabla 2. Datos de laboratorio

Al observar el crecimiento las bacterias se diferenciaron por los colores que presentaban las colonias, blanca, amarilla y salmón. Al observar la forma del crecimiento se comparó con el crecimiento de una colonia de *Streptomyces*, el crecimiento de las tres colonias aisladas no era parecido al de *Streptomyces*.

Para poder determinar que las bacterias aisladas pertenecían al género *Streptomyces* era necesario realizar varias pruebas, a parte de la forma y color de la colonia. Se consultaron varios textos y se determinó cuales eran las pruebas necesarias para determinar si las colonias bacterianas eran del género *Streptomyces*, pruebas que se muestran en la Tabla 2. Las pruebas que se presentan para *Streptomyces* son datos textuales, y los datos de las pruebas de las colonias aisladas fueron obtenidos en el laboratorio.

Los resultados muestran que las colonias aisladas concuerdan en ciertas pruebas con las de *Streptomyces*, la que presenta mayor similitud con *Streptomyces* es la colonia amarilla que a su vez comparte las mismas características con la colonia salmón, pudiendo decir que es la misma bacteria solo que el color es diferente, mientras que la colonia blanca es la de menor similitud con las *Streptomyces*. La interpretación de estos datos es un poco confusa debido a que comparten varias características (resultados a las pruebas) pero difieren en el color que presentan en el medio YDC y en la forma de crecimiento de la colonia. Las bacterias *Streptomyces* presentan color amarillo o naranja en el medio YDC y su crecimiento es filamentoso y generalmente hay liberación de antibióticos en el medio de cultivo; la colonia de color blanca es de crecimiento costroso, y las colonias amarilla y salmón es crecimiento es acuoso o gelatinoso, y en ninguna de las tres se observa liberación de antibióticos. Se determina que las colonias de bacterias aisladas no pertenecen a las especies de bacterias del género *Streptomyces* contenidas en el producto RootGuard+, la identificación de especies bacterianas es bastante complicado porque no hay suficiente información para hacerlo, y lo complica aún más no saber que especies son las que contiene el producto, al igual que los procedimientos de laboratorio requeridos para este tipo de estudio son muy específicos y hay muy pocos, debido a que la técnica de elaborar productos hechos a base de microorganismos es casi nueva.

CONCLUSIONES:

1. La concentración de bacterias en el producto RootGuard Plus es menor que la concentración original del producto.
2. La acción fungicida del producto RootGuard Plus contra el hongo Rhizoctonia es muy baja.
3. Las tres colonias de bacterias aisladas del producto no pertenecen a las bacterias del género Streptomyces

RECOMENDACIONES:

1. Verificar la fecha de expiración del producto a utilizar.
2. Obtener la mayor información posible a cerca del tema a investigar antes de realizar la investigación.
3. Buscar mayor información sobre los métodos de laboratorio utilizados para recuperación de productos utilizados como Control Biológico.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Flores, Marco Antonio. **Patología Vegetal y Cuarentena**. 1967. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria México Centroamérica y Panamá OIRSA. El Salvador.
2. Jauch, Clotilde. **Patología Vegetal**. 1976. Editorial El Ateneo. Argentina.
3. Oficina Regional de la FAO para América Latina y El Caribe. **Manual para Patólogos Vegetales**. 1986. Lima, Perú.
4. Agrios, George. **Fitopatología**. 1985. Editorial Limusa. Primera Edición. México.
5. Finch, H.C. **Los hongos comunes que atacan cultivos en América Latina**. 1974. Editorial Trillas. Primera Edición. México.
6. Schaad, Jones & Chun. **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**. 3er. Edition. APS Press. Minnesota, USA.
7. Molina, Mario. **Microbiología de Suelos y Técnicas Fitopatológicas**. 1957. Editorial Universitaria. Guatemala.
8. David et all. **Tratado de Microbiología con inclusión en Inmunología y Genética Molecular**. 1978. Segunda Edición. Salvat Editores, S.A. Barcelona, España.
9. Volk, Wesley A. **Microbiología Básica**. 1996. Séptima Edición. Industria Editorial. México,D.F.
10. <http://www.herb.lsa.umich.edu/KIDPAGE/Spanish/BiocontrolSP.htm>

ANEXO 1



Hongo Rhizoctonia en el medio de cultivo PDA

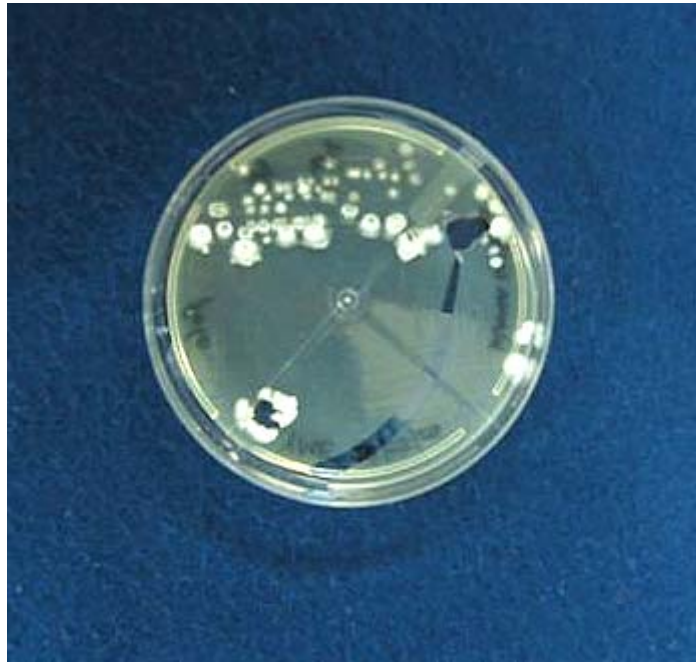


Hongo Rhizoctonia en PDA con dosis recomendada de RootGuard+

ANEXO 2

- **Hoja de resultados de pruebas microbiológicas:**

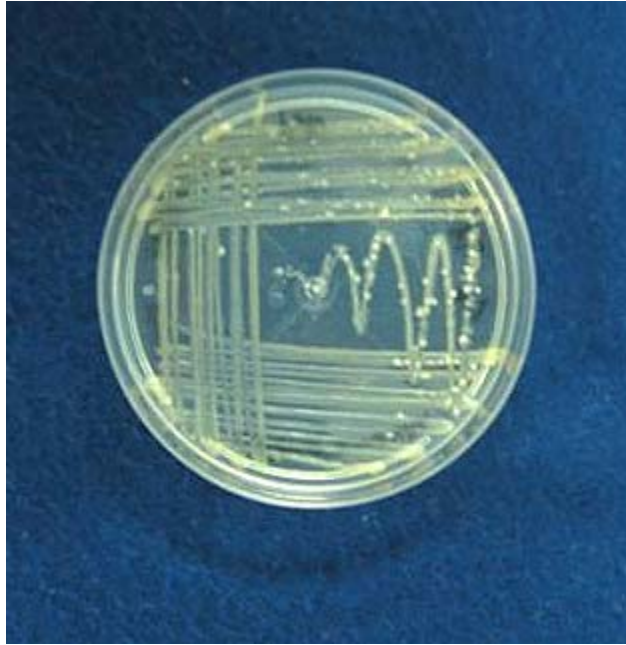
ANEXO 3



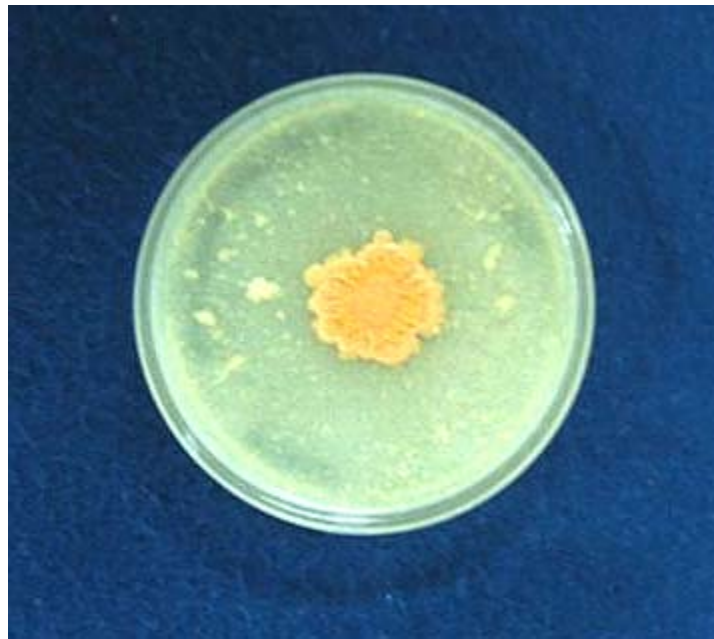
Colonia Blanca en el medio de cultivo PC



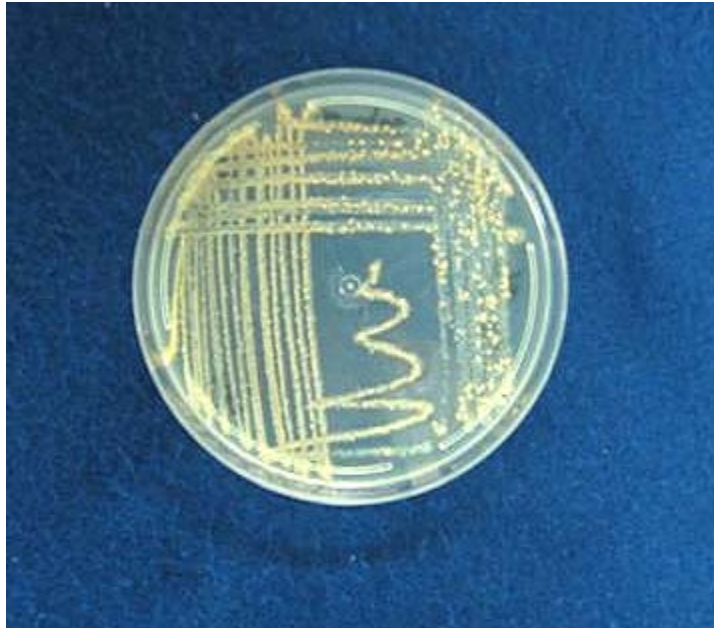
Colonia Blanca Pura en el medio de cultivo YME/Suero de leche.



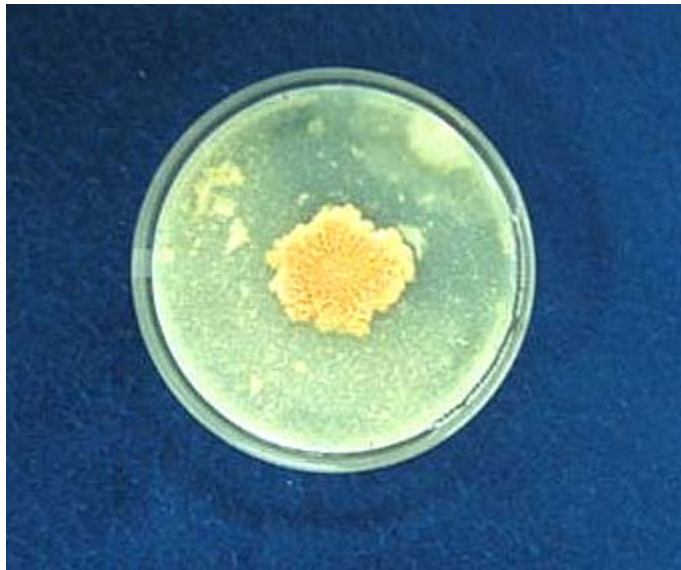
Colonia Amarilla en el medio de cultivo PC



Colonia Amarilla Pura en el medio de cultivo YME/Suero de leche



Colonia Salmón en el medio de cultivo PC



Colonia Salmón Pura en el medio de cultivo YME/Suero de leche