

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

Producción de compuestos antimicrobianos por actinomicetos aislados de
suelos Antárticos

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

BIÓLOGO

Presentado por:

Níckolas Anthony Roha Ochoa

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2022

DEDICATORIA

El presente proyecto lo dedico a las personas más importantes en mi vida y aquellos que me dieron la vida y son mis guías, mis padres Fernando Roha y Mireya Ochoa, sin ellos yo no sería la persona que soy ahora. Se lo dedico también a Dios que me brindó la fuerza, resistencia y salud para completar este ciclo de mi vida. Por último, se la dedico a cada maestro y educador que tuve durante mi período académico y de los cuales aprendí mucho.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento hacia todas personas que apoyaron directa o indirectamente a la realización de este proyecto e investigación, como a las instalaciones del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (Cibe), a mi tutora Ph.D. Nardy Diez, al ingeniero Jeffrey Vargas y demás colaboradores.

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, me(nos) corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *Níckolas Anthony Roha Ochoa* y doy mi consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Roha' followed by a stylized flourish.

Níckolas Roha

EVALUADORES

Mag. Diego Gallardo
PROFESOR DE LA MATERIA

Ph.D. Nardy Diez
PROFESOR TUTOR

RESUMEN

El presente estudio tiene como principal objetivo “Producir compuestos orgánicos con características antimicrobianas a partir de actinomicetos aislados de muestras de suelo de la Antártida para ser usados como tratamiento inhibitorio en contra del hongo *Fusarium oxysporum*”, por medio de la caracterización de ciertas moléculas como la producción de proteínas, la presencia del pigmento melanina, la cantidad de azúcares reductores, etc. Lo que nos dio como resultado en el análisis comparativo de las 2 cepas de *Streptomyces* previamente seleccionadas (K6 y E7), una mejor capacidad inhibitoria de la cepa K6, el sustrato que consigue proporcionar lo necesario para que la cepa K6 desarrolle sus antimicrobianos de mejor manera es el almidón y finalmente la capacidad inhibitoria del actinomiceto K6 se muestra constante en el tiempo y carece de una relación directa con las moléculas aquí analizadas.

Palabras clave: Antimicrobiano, Antártica, Actinomiceto, *Fusarium*

ABSTRACT

The main objective of the present study is "To produce organic compounds with antimicrobial characteristics from actinomycetes isolated from Antarctic soil samples to be used as inhibitory treatment against the fungus Fusarium oxysporum", through the characterization of certain molecules such as protein production, the presence of the pigment melanin, the amount of reducing sugars, etc. This resulted in the comparative analysis of the two previously selected Streptomyces strains (K6 and E7), a better inhibitory capacity of strain K6, the substrate that manages to provide what is necessary for strain K6 to develop its antimicrobials in a better way is starch and finally the inhibitory capacity of the actinomycete K6 is constant over time and lacks a direct relationship with the molecules analyzed here.

Keywords: *Antimicrobial, Antimicrobial, Antarctic, Actinomycete, Fusarium*

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
DECLARACIÓN EXPRESA.....	III
EVALUADORES.....	IV
RESUMEN.....	V
ABSTRACT	VI
ÍNDICE GENERAL	VII
ABREVIATURAS.....	IX
SIMBOLOGÍA	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABLAS.....	XII
CAPÍTULO 1.....	1
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Descripción del problema	2
1.2. Justificación del problema.....	2
1.3. Objetivos.....	2
1.3.1. Objetivo general	2
1.3.2. Objetivos específicos	3
1.4. Marco teórico	3
CAPÍTULO 2.....	5
2. METODOLOGÍA	5
2.1. Preparación y distribución de muestras	5
2.2. Registro y control de actividad enzimática	5
2.3. Determinación de la biomasa.....	6

2.4.	Definición de la densidad óptica	6
2.4.1.	Pigmento melanina.....	6
2.4.3.	Producción de proteínas por Bradford.....	7
2.4.4.	Cantidad de azúcares reductores por DNS	7
2.4.5.	Capacidad inhibitoria como Unidades arbitrarias (UA).....	7
2.5.	Determinación del mejor sustrato disponible	8
2.6.	Caracterización final de las moléculas de la cepa K6.....	8
CAPÍTULO 3.....		9
3.	RESULTADOS Y ANÁLISIS	9
3.1.	Primera caracterización de las moléculas de las cepas K6 y E7	9
3.2.	Gráfica de la caracterización de las moléculas	9
3.3.	Porcentaje de reducción del alamar blue por tipo de sustrato	12
3.4.	Degradación de amilasas	14
CAPÍTULO 4.....		15
4.	Conclusiones y recomendaciones	15
4.1.	Conclusiones	15
4.2.	Recomendaciones	15
BIBLIOGRAFÍA.....		16
ANEXOS.....		20

ABREVIATURAS

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
INACH	Instituto Antártico Chileno
Foc	Fusarium oxysporum f. sp. Cubense
R4T	Raza 4 Tropical
ADN	Ácido desoxirribonucleico
MPA	Medio de producción de antimicrobianos
MHB	Mueller Hilton Broth
MPE	Medio producción enzimática
UA	Unidades Arbitrarias
DNS	Ácido Dinitro-Salicílico

SIMBOLOGÍA

g	Gramo
mg	Miligramo
pH	Potencial de Hidrógeno
μL	Microlitro
mL	Mililitro

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1 Cepa K6 y sus azúcares reductores en niveles de absorbancia y porcentajes de reducción del alamar Blue para sus UA con respecto a los días.....	10
Figura 3.2 Cepa E7 y sus niveles de absorbancia y porcentajes de reducción del alamar Blue con respecto a los días.....	10
Figura 3.3 Cepa K6 y sus porcentajes de biomasa y niveles de absorbancia de la melanina y sus proteínas, todo con respecto al paso de los días.....	11
Figura 3.4 Cepa E7 y sus porcentajes de biomasa y niveles de absorbancia de la melanina y sus proteínas, todo con respecto al paso de los días.....	11
Figura 3.5 Cepa K6 desarrollada en diferentes tipos de sustratos como Almidón-Glucosa, Almidón, Glucosa y ninguno de estos	12
Figura 3.6 Prueba porcentaje de reducción del alamar Blue como Unidades Arbitrarias (UA)	13
Figura 3.7 Caracterización de la cepa K6 con sustrato almidón graficada	13
Figura 3.8 Degradación de amilasas por parte de la cepa K6 y su actividad enzimática	14

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1 Datos de la cepa K6 caracterizada para proteínas, azúcares reductores, biomasa, etc.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 3.3 Datos de la cepa E7 caracterizada para proteínas, azúcares reductores, biomasa, etc.	9
Tabla 3.4 Valores promedio de los resultados de la cepa K6 desarrollada en diferentes sustratos	12
Tabla 3.5 Valores promedio de la caracterización de la cepa K6 en el medio con almidón	13

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

Ecuador es de los mayores exportadores de banano alrededor del mundo y el número uno de Sudamérica, exportando 378.29 millones de cajas al cierre del año 2021 (ACORBANEC, 2022). Ecuador al contar con una latitud 0 y de un clima tropical estable durante los 365 días del año da paso a que el cultivo de banano se desarrolle sin problema sobre las más de 200 mil hectáreas distribuidas entre las regiones costa, sierra y oriente (León et al., 2018). Lastimosamente la planta de banano sufre el ataque de diferentes agentes patógenos que buscan aprovecharse o acabar con ella como lo es el caso de un hongo que desde hace décadas representa pérdidas monetarias gigantes para nuestro y todos los países productores de banano, estamos hablando de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* (Foc) también llamada “Enfermedad de Panamá” o marchitamiento por Fusarium (Maymon et al., 2020).

Como biólogos poseemos la preparación científica para descubrir opciones viables que sean capaces de combatir este y demás agentes patógenos, por medio de la investigación y el desarrollo de nuevas técnicas y metodologías, es que encontramos a los antimicrobianos que inhabilitan (detienen la multiplicación) o aniquilan (destruyéndolo por completo) a diferentes tipos de patógenos. Los antimicrobianos pueden clasificarse en: antibacteriales, antivirales, antimicóticos, antimicobacterianos, antiparasitarios y antirretrovirales (Girón, 2008). Los antimicrobianos ya sean de origen natural o no, son en gran medida usados en la industria alimenticia para proteger la materia prima y cubrir así efectivamente la demanda alimenticia nacional e internacional (Nereyda & Saucedo, 2011).

Es así como un grupo de investigadores viajaron hasta uno de los ambientes más extremos del mundo entero, la Antártida con el único objetivo de llevar a cabo estudios biotecnológicos con diferentes aplicaciones y nuevos descubrimientos. Microorganismos resistentes a condiciones extremas con producción natural de antimicrobianos (Gonçalves et al., 2015).

1.1. Descripción del problema

El marchitamiento por *Fusarium* causada específicamente por el hongo *Fusarium oxysporum f sp. Cubense* lleva acechando la industria bananera mundial en sus diversas razas por más de 100 años, aún a pesar de las diversas alternativas en las que se ha tratado de manejar la enfermedad y su propagación, pero lastimosamente no hemos sido capaces de acabar con esta plaga o el aumento en su distribución mundial (Martínez-Solórzano et al., 2020a). La raza 4 tropical (R4T) es en la actualidad la causante de pérdidas multimillonarias en esta industria, colocando en un estado de alerta máxima a países latinoamericanos como Ecuador, Panamá y Venezuela (Comunidad Andina, 2020).

1.2. Justificación del problema

Durante décadas Ecuador y el mundo entero han sido amenazados y afectados por culpa del hongo *Fusarium oxysporum f sp. Cubense* y sus diferentes razas, golpeando fuertemente la economía y la industria alimenticia de los países productores del banano o también llamado plátano, a pesar de los múltiples esfuerzos por combatir y acabar con esta plaga. Uno de los países más destacables en el sector agrícola es el Ecuador. Como investigador y futuro científico busqué una forma de ayudar a mi país y es así como llegué al desarrollo de una solución a este grave problema que nos afecta de primera mano. Al producir un antimicrobiano capaz de detener a este hongo permitirá brindar una reducir los riesgos y las pérdidas, así como también aumentar la calidad y cantidad del producto final que llega a los consumidores en sectores aledaños al igual que alrededor del mundo.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Producir compuestos orgánicos con características antimicrobianas a partir de actinomicetos recolectados de muestras de suelo de la Antártida para ser usados como tratamiento inhibitorio en contra del hongo *Fusarium oxysporum*.

1.3.2. Objetivos específicos

1. Diseñar una metodología que nos permita la caracterización de las moléculas de interés para con las cepas denominadas K6 y E7 en un período de 16 días.
2. Evaluar la presencia de enzimas en aislados del actinomiceto y su habilidad de degradación en diferentes medios.
3. Comprobar que sustrato sencillo presenta un mejor aporte para el desarrollo de la bacteria y su capacidad inhibitoria.

1.4. Marco teórico

La Antártida figura como un lugar recóndito con un clima extremo y donde existen varios misterios a resolver, por lo que científicos de todas partes del mundo se acercan ahí con el objetivo de encontrar las respuestas correspondientes. Lo anteriormente mencionado es posible gracias al Tratado Antártico que se instauró en el año 1963 y como resultado se crearon diferentes estaciones e institutos de investigación, entre ellos nuestro país vecino Chile creó su Instituto Antártico Chileno (INACH) (Bruna & Forlivesi, 2021). La Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), cuenta con un acuerdo en el que se le permite desarrollar estudios toxicológicos de metales pesados, microplásticos y la ecología microbiana del sector ya que posee un potencial biotecnológico inmenso (INOCAR, 2019).

La biotecnología busca desarrollar a través de distintas ciencias biológicas, tecnología que emplee los sistemas biológicos o sus derivados para hacer uso de los productos de manera específica. Uno de estos usos puede ser el control biológico de plagas a través de productos producidos por microorganismos (Moo-Young, 2019). Existen diferentes grupos de microorganismos que son empleados como control biológico, de todos estos el grupo que produce más de la mitad de los antibióticos naturales descubiertos y empleados hasta la fecha son los actinomicetos (Gonzalez-Franco & Robles-Hernández, 2022). Los actinomicetos son bacterias filamentosas anaerobias facultativas u obligatorias Gram positivas que poseen un alto contenido de guanina y citosina en su ADN, su hábitat natural es el suelo, sedimentos, lagos, agua marina, hasta entornos extremos como el himalaya, aguas termales y la Antártida (Lekhak et al., 2018). A lo largo de 70 años las bacterias actinomiceto del género *Streptomyces* han probado ser

candidatos idóneos para el desarrollo efectivo de antibióticos, habiendo descrito más de 10.000 compuestos bioactivos (Zhang et al., 2020).

Los hongos que afectan a las frutas del campo representan un peligro inminente para los consumidores y la economía de los productores, el *Fusarium oxysporum f sp. Cubense* (Foc) es una de estas grandes amenazas sin resolver (Meliani et al., 2022). Posee la capacidad de colonizar tanto malezas como otras plantas con el único objetivo de producir sus clamidosporas y esparcirse, adaptarse a condiciones extremas, incluso sobrevivir sin hospedero directamente en el suelo. Se diferencia en cuatro razas (R1, R2, R3, R4) (Martínez-Solórzano et al., 2020b). La raza 1 (R1) afecta al plátano “Gros Michel” y al Silk, Pome AAB y Pisang Awak ABB; por su parte la raza 2 (R2) enferma a los plátanos Bluggoe ABB; la raza 3 (R3) causa patogenicidad en *Heliconia spp.*; La raza tropical (RT4), la plaga más destructiva perjudica a los plátanos Cavendish, así como a las especies que son afectadas por las razas R1 y R2 (Mon et al., 2021).

Tomando en consideración lo anterior, los *Streptomyces* se reportan como grandes antagonistas de diversos hongos, gracias a su producción de metabolitos secundarios con actividad antifúngica (Rios-Hernández et al., 2021).

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

2.1. Preparación y distribución de muestras

Partiendo de cepas previamente seleccionadas y aisladas de actinomicetos, denominándose K6 y E7. Una vez escogidas se preparó dos repeticiones por cada uno obteniendo así 4 puntos de partida, junto a 1 punto de control que ayudó a verificar que el medio donde se desarrollarían al pasar del tiempo establecido no se encontraba contaminado. El medio de punto de partida por estudios previos fue Medio de producción de antimicrobianos (MPA) con adición de glucosa y almidón y un pH inicial de 7.0. Se conservaron todo el tiempo en agitación y temperaturas de $16\pm 1^{\circ}\text{C}$. A partir de la revisión bibliográfica se diseñó un experimento con una duración de 16 días, donde se dispuso a tomar muestras por cada dos días (denominando cada muestra como T0, T1, T2, etc.) para analizar por medio de estas muestras, el desarrollo de la bacteria al paso del tiempo y caracterizar sus moléculas (Caro Castro et al., 2019).

2.2. Registro y control de actividad enzimática

Se preparó múltiples cajas Petri que contenían medios de almidón y gelatina agar para el estudio de la producción de amilasa y proteasa respectivamente por cada cepa y su correspondiente repetición. Una vez tomada la muestra de 1 mL del día correspondiente se procedía a colocar 100 μL por cada pocillo en la placa y se rotulaba correspondientemente a la muestra, se dejaba reposar e incubar a temperatura ambiente las placas con las muestras un promedio de 7 horas, pasado este tiempo se procedió a teñir el agar de almidón con una solución de yodo+agua destilada, mientras que con una solución de Coomassie brilliant blue+agua destilada se usó para el agar de gelatina (Rathore & Singh, 2021). Por medio del sistema de imagen modular de alta sensibilidad Stella de la marca Raytest se obtuvo las imágenes de la degradación de almidón y gelatina agar, para posteriormente calcular el diámetro y área de la circunferencia formada (Mohseni et al., 2013).

2.3. Determinación de la biomasa

Para la determinación de la biomasa, producto del desarrollo con el pasar de los días, se esperó hasta el final del ensayo para comparar los valores durante el lapso establecido. En primer lugar, se rotuló correctamente los tubos a emplearse (34 tubos en total), se procedió a pesarlos vacíos por medio de una balanza analítica de alta precisión de la marca Kern y se registraron los valores con 4 decimales. Se transfirió la muestra de los tubos originales a los nuevos tubos vacíos y a continuación se centrifugaron en una centrifugadora refrigerada a 0°C, durante 10min a 14.000 RPM para así conseguir que la biomasa del tubo se precipite en la parte inferior y el sobrenadante quede en la parte superior, se regresó el líquido sobrenadante a los tubos originales y se dejó únicamente la biomasa en los nuevos tubos antes pesados y rotulados dependiendo de la muestra. Se procedió a una vez más pesar los tubos de forma ordenada determinando así la biomasa producida por la bacteria con respecto al tiempo transcurrido (Das et al., 2007).

2.4. Definición de la densidad óptica

Existen diferentes parámetros en donde necesitamos medir la densidad óptica de las muestras recolectadas cuidadosa y sistemáticamente, previamente trabajadas por metodologías dependiendo su característica para analizar.

2.4.1. Pigmento melanina

Por lo que en microplacas de ensayo de 96 pocillos colocamos 100µL de la muestra dependiendo su tiempo (T0, T1, ..., T8 además de un control), y dada su repetición por cada una, las muestras finales a analizar llegaron a 18 pocillos por cepa, 36 pocillos en total. Luego llevamos la placa al lector multimodo Synergy HT de la marca Biotek donde se sometió a las muestras a rayos UV de 400nm para conocer la capacidad de absorbancia del pigmento melanina que presenta el medio de las cepas, y para finalizar, una vez obtenidos los valores de absorbancia se procedió a realizar un promedio de estos. (Haag et al., 1996).

2.4.3. Producción de proteínas por Bradford

Posterior a esto en otra placa para conocer la concentración de proteínas por cada tiempo se colocó 10µL de muestra junto a 200µL de solución de Bradford, se dejó reaccionar unos minutos, se homogeneizó, se tomó 100µL y se lo colocó por cada pocillo, finalmente formando 18 por las muestras y sus repeticiones, así como también sus controles y una vez más se llevó al espectrofotómetro Synergy HT para la determinación de su absorbancia, el cual esta vez fue realizada a 595nm y de igual manera se hizo el cálculo para obtener valores promedio entre las repeticiones (Sunish et al., 2020).

2.4.4. Cantidad de azúcares reductores por DNS

Para verificar los azúcares reductores se colocó 50µL del sobrenadante de la muestra y 25µL del ácido dinitro-salicílico (DNS), se homogeneizó y se colocó en agua hirviendo durante 15 minutos hasta observar un cambio de coloración, al finalizar el tiempo se adicionó 225µL de agua destilada, se homogeneizó nuevamente y se colocó 100µL de esta solución en una microplaca por cada muestra a analizar y se llevó al espectrofotómetro una vez más, a 530nm y se calculó el promedio de los valores resultantes (Montañez, 2020).

2.4.5. Capacidad inhibitoria como Unidades arbitrarias (UA)

La capacidad inhibitoria fue caracterizada como unidades arbitrarias (UA), en placas de 96 pocillos para ser capaces de medir su absorbancia, de forma que se tomó 100µL de cada repetición por cepa (K6 y E7), al ser dos repeticiones, estas formaron 200µL y se añadió a esa solución 200µL de Mueller Hilton Broth (MHB) teniendo así una solución final de 400µL con una relación de 1 en 2 (primera dilución), se tomaron 200µL de esta solución, se colocaron 100µL en un pocillo y los otros 100µL en otro, luego continuamos diluyendo la solución de la misma forma hasta obtener una relación de 1 en 64 (sexta dilución) de la muestra original del sobrenadante. Todo este proceso lo llevamos a cabo para cada una de las muestras desde T0 hasta T8. Una vez conseguido esto se inoculó en cada pocillo una muestra del hongo *Fusarium* se dejó cultivar esta muestra a 28°C por 48 horas y se procedió a llevar al espectrofotómetro. Para conseguir el porcentaje de reducción del agente alamar Blue, se restó los valores de absorbancia con control

negativo, se lo divide todo para la diferencia entre el control positivo y el control negativo y el resultado de eso se multiplica por 100 para obtener el porcentaje, como a continuación y descrito por (BOSTER, 2020):

$$\frac{\text{Experimental RFU value} - \text{Negative control RFU value}}{100\% \text{ reduced positive control RFU value} - \text{Negative control RFU value}} \times 100$$

2.5. Determinación del mejor sustrato disponible

Debido a que la caracterización nos surgió la pregunta de, cual sustrato disponible en el MPA con glucosa y almidón había sido el que otorgaba a la bacteria de lo necesario para producir sus compuestos antimicrobianos de forma que formulamos el siguiente experimento (Ju et al., 2018).

Preparamos 100mL de MPA únicamente con glucosa (G), 100mL de MPA con almidón (A) y 100mL de MPA sin ningún sustrato adicional como nuestro control (C). Al cabo de 12 días, estudiamos el porcentaje de reducción de los medios con diferentes sustratos de la misma forma que fue previamente descrita en el punto 2.4.5 gracias al reactivo alamar blue.

2.6. Caracterización final de las moléculas de la cepa K6

Repetimos todos los pasos descritos en el apartado 2.4 para conseguir cumplir con nuestro principal objetivo, el producir un compuesto antimicrobiano a partir de un actinomiceto, escogiendo para ello la mejor cepa (entre K6 y E7) y el mejor sustrato (almidón, glucosa, o ninguno) y caracterizándolo analizaremos su comportamiento conforme al paso de los días. Cabe mencionar que hicimos un cambio en una metodología, anteriormente tendríamos un solo medio y al cabo de dos días se procedía retirar 1mL, hasta completar cumplir el período de 16 días para controlar así su desarrollo, por otra parte, en esta ocasión decidimos que en envases diferentes pero iguales y con la misma cantidad inicial de medio y sustrato se inocularía a la bacteria y cada 2 días se tomaría un recipiente y se congelaría a 4°C de forma que obtendríamos las mismas 9 muestras por los días correspondientes (Charousová et al., 2019).

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1. Primera caracterización de las moléculas de las cepas K6 y E7

A continuación, se muestra los valores obtenidos por cada cepa de cada una de las moléculas caracterizadas y paso con respecto al tiempo, luego de promediar sus resultados.

Tabla 3.1 Datos de la cepa K6 caracterizada para proteínas, azúcares reductores, biomasa, etc.

<i>Día</i>	<i>0</i>	<i>2</i>	<i>4</i>	<i>6</i>	<i>8</i>	<i>10</i>	<i>12</i>	<i>14</i>	<i>16</i>
<i>DNS</i>	0,084	0,140	0,155	0,159	0,130	0,105	0,101	0,104	0,100
<i>PIGMENTO</i>	0,168	0,380	0,397	0,456	0,472	0,456	0,500	0,537	0,544
<i>PROTEÍNAS</i>	0,303	0,319	0,354	0,428	0,421	0,531	0,563	0,638	0,653
<i>BIOMASA</i>	0,00	16,90	25,15	33,55	37,85	42,15	61,20	80,25	80,25
<i>AU/mL</i>	98,40	3,56	1,85	9,28	1,42	1,54	1,80	1,93	0,70

Tabla 3.2 Datos de la cepa E7 caracterizada para proteínas, azúcares reductores, biomasa, etc.

<i>Día</i>	<i>0</i>	<i>2</i>	<i>4</i>	<i>6</i>	<i>8</i>	<i>10</i>	<i>12</i>	<i>14</i>	<i>16</i>
<i>DNS</i>	0,084	0,140	0,160	0,164	0,139	0,100	0,098	0,098	0,087
<i>PIGMENTO</i>	0,150	0,337	0,373	0,410	0,497	0,481	0,500	0,550	0,667
<i>PROTEÍNAS</i>	0,269	0,303	0,323	0,336	0,390	0,427	0,422	0,409	0,457
<i>BIOMASA</i>	0,00	21,00	36,80	64,00	89,20	86,75	87,98	90,04	92,10
<i>AU/mL</i>	94,13	1,35	1,60	0,91	0,97	0,68	2,04	1,83	1,57

3.2. Gráfica de la caracterización de las moléculas

El presente estudio, al cabo de los 16 días establecidos se emplearon diferentes metodologías establecidas para evaluar los diferentes factores y se obtuvo las siguientes gráficas a continuación.

Figura 3.1 y 3.2 nos dan a conocer y comprobar que efectivamente las cepas K6 y E7 producen antimicrobianos que actúan en contra del hongo *Fusarium* y que por más que los niveles de azúcar se modifiquen, no resulta en ningún tipo de efecto sobre la capacidad inhibitoria de estos productos finales.

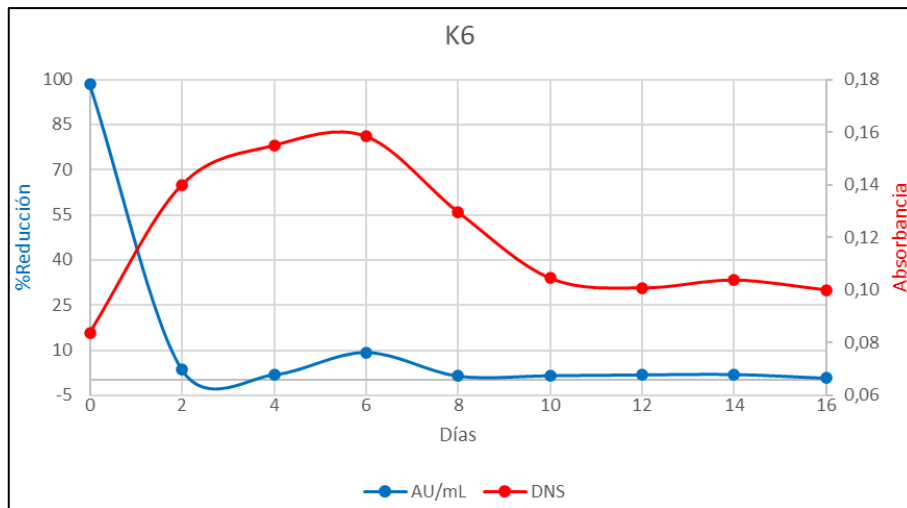


Figura 3.1 Ceba K6 y sus azúcares reductores en niveles de absorbancia y porcentajes de reducción del alamar Blue para sus UA con respecto a los días.

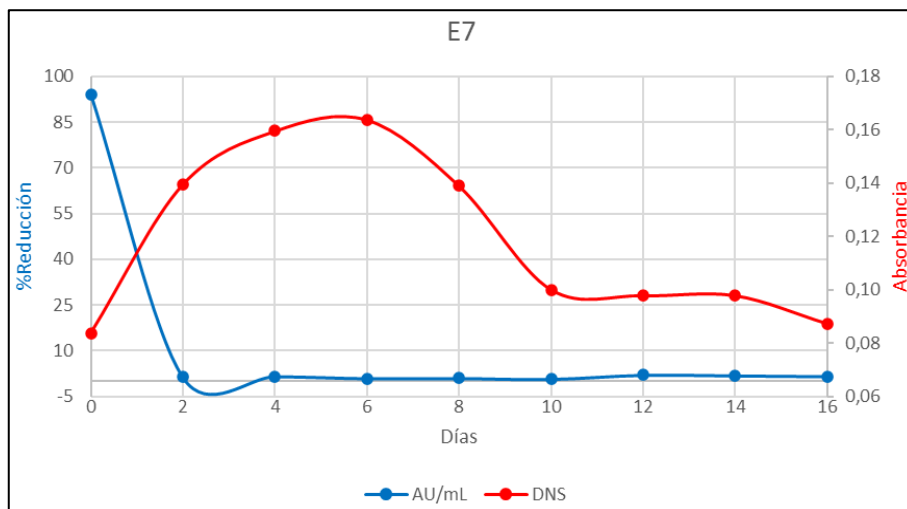


Figura 3.2 Ceba E7 y sus niveles de absorbancia y porcentajes de reducción del alamar Blue con respecto a los días

Lo que podemos observar a continuación es como se demuestra que la producción de proteínas no posee relación al nivel de biomasa y presencia de pigmentación melanina en ninguno de los siguientes casos, ya que como se puede observar en la Figura 3.3 la cepa K6 muestra unos niveles más altos de producción de proteínas a pesar de que sus

niveles de biomasa y pigmentación no son tan altos como si lo son en el caso de la cepa E7 en la Figura 3.4.

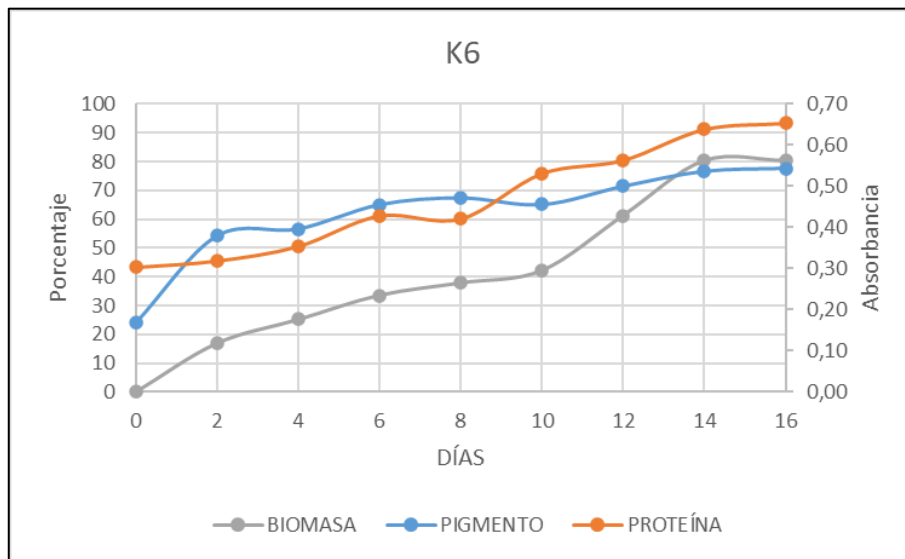


Figura 3.3 Ceba K6 y sus porcentajes de biomasa y niveles de absorbanca de la melanina y sus proteínas, todo con respecto al paso de los días

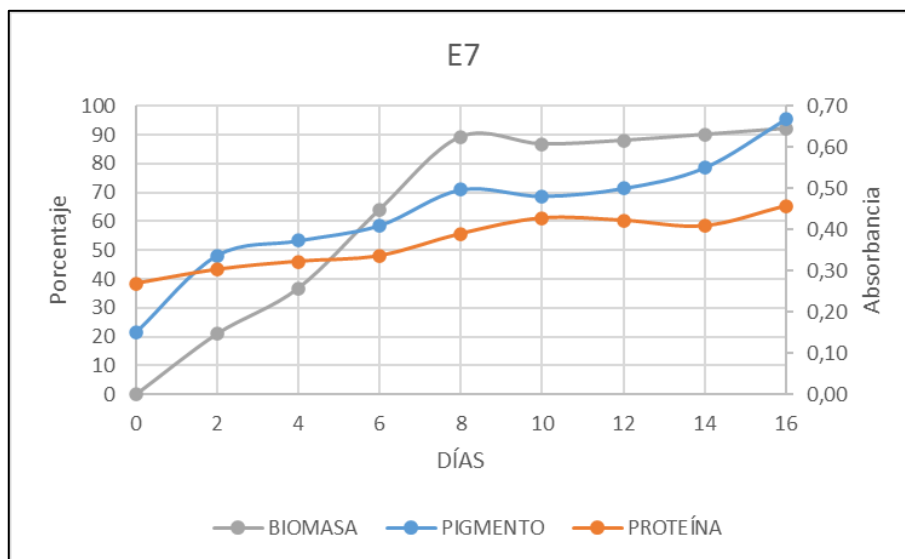


Figura 3.4 Ceba E7 y sus porcentajes de biomasa y niveles de absorbanca de la melanina y sus proteínas, todo con respecto al paso de los días

Esto significó decantarnos por la elección de la cepa K6 que consigue una inhibición y una mayor producción de proteínas sin la necesidad de desarrollar una mayor cantidad de biomasa.

3.3. Porcentaje de reducción del alamar blue por tipo de sustrato

Los datos mostrados a continuación son el resultado del cálculo promedio del porcentaje de reducción de alamar blue de los diferentes sustratos y diluidos en diferentes proporciones.

Tabla 3.3 Valores promedio de los resultados de la cepa K6 desarrollada en diferentes sustratos

Dilución	1	2	3	4	5	6
GLUCOSA	81,96	74,72	77,35	89,03	87,76	100
CONTROL	2,07	2,74	15,81	28,88	50,74	52,81
ALMIDÓN	1,35	4,34	5,14	4,92	4,94	5,67

Si graficamos los valores presentados por la tabla 3.3 entonces dará como resultado lo siguiente:

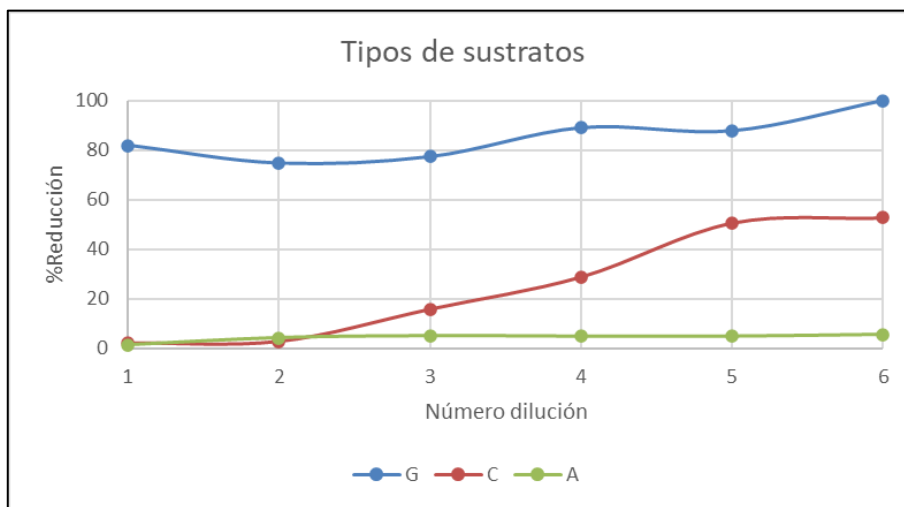


Figura 3.5 Cepa K6 desarrollada en diferentes tipos de sustratos como Almidón-Glucosa, Almidón, Glucosa y ninguno de estos

A partir de los valores obtenidos se puede notar como a medida que la muestra del compuesto se diluye más pierde efectividad en contra de la actividad de *Fusarium* a excepción del medio con almidón que mantiene su capacidad inhibitoria constante. Lo que nos da como resultado que el mejor sustrato para impulsar la actividad antimicrobiana de la cepa K6 es el almidón.

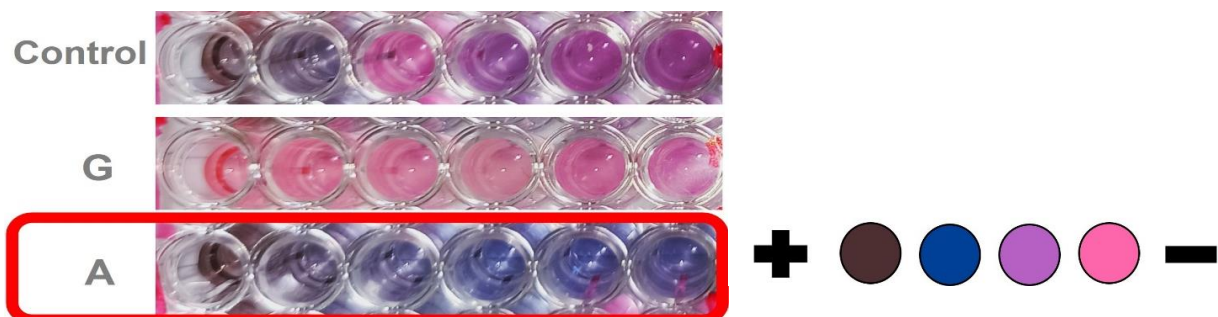


Figura 3.6 Prueba porcentaje de reducción del alamar Blue como Unidades Arbitrarias (UA)

Finalmente, procedimos a realizar la caracterización de las moléculas de la cepa denominada K6 en el medio con el sustrato almidón, de forma que juntamos la mejor cepa y el mejor sustrato para cumplir nuestro principal objetivo.

Esto nos dio como resultado los siguientes valores:

Tabla 3.4 Valores promedio de la caracterización de la cepa K6 en el medio con almidón

Día	0	2	4	6	8	10	12	14	16
DNS	0,088	0,104	0,096	0,116	0,136	0,089	0,082	0,074	0,077
PIGMENTO	0,382	0,432	0,390	0,423	0,641	0,549	0,502	0,516	0,614
PROTEÍNAS	0,163	0,209	0,196	0,236	0,258	0,236	0,243	0,236	0,237
BIOMASA	35,15	31,30	32,80	31,20	72,00	54,90	59,00	74,00	99,90
AU/mL	32,31	2,32	2,21	2,74	1,99	1,43	1,27	1,12	2,38

A continuación, mostraremos la gráfica resultante a partir de la tabla 3.5

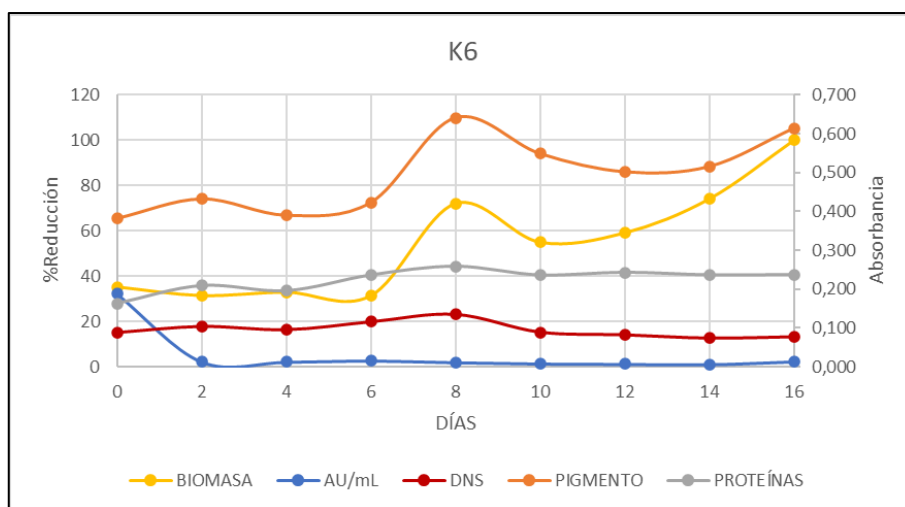


Figura 3.7 Caracterización de la cepa K6 con sustrato almidón graficada

A partir de la Figura 3.7 nos pudimos dar cuenta de la estrecha relación que se presenta entre la biomasa y el pigmento melanina, la producción de proteínas se mantiene relativamente constante en el tiempo, la cantidad de azúcares reductores se encuentran casi consumidos en su totalidad, los mayores valores de pigmentación, biomasa, proteínas y azúcares reductores se presentaron al cabo de 8 días. El porcentaje de reducción de alamar Blue que representa muy bien la capacidad inhibitoria nos muestra que la bacteria sigue conservando su capacidad inhibitoria y que ninguna de las características que fueron analizadas durante el estudio muestran relación ya que no se ve afectada por ninguna de estas.

3.4. Degradación de amilasas

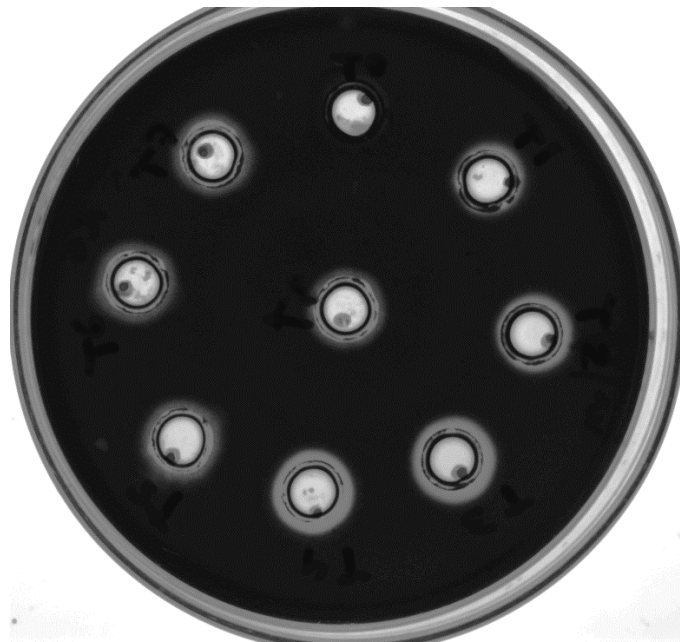


Figura 3.8 Degradación de amilasas por parte de la cepa K6 y su actividad enzimática

Lo que vemos en la Figura 3.1 es la muestra de la degradación de amilasas por parte de la cepa K6 y su caracterización conforme a los 16 días partiendo desde T0 en la posición superior y céntrica, y continua en sentido de las manecillas del reloj, T1, T2,... ,T8 la cual se encuentra en la posición central de la placa.

CAPÍTULO 4

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1. Conclusiones

- El *Streptomyces spp* K6, demuestra ser un antifúngico efectivo en contra del hongo *Fusarium oxysporum*, lo que puede ser usado como un método para controlar la enfermedad denominada como “Marchitamiento del banano”.
- Se descubrió una fuente barata de carbono como lo es el almidón que nos permitirá abaratar costos al producir este producto a gran escala y repetidas veces.
- Se demostró que el tiempo necesario para obtener los mejores resultados durante el desarrollo de esta bacteria se dan al cabo de 8 días en adelante.
- Este proyecto permitirá proteger a uno de los sectores más importantes de nuestro país como es la industria bananera en contra de una plaga la cual aún no se descubre una solución definitiva.

4.2. Recomendaciones

- Se recomienda desarrollar un análisis de superficie de respuesta que considere temperatura, pH, etc. Para conocer las condiciones óptimas en las que se puede desarrollar la cepa K6.
- Llevar a cabo una electroforesis de proteínas para obtener más información acerca de las proteínas que esta bacteria produce durante su desarrollo.
- Caracterizar las moléculas del actinomiceto por un mayor período de tiempo para conocer de mejor manera su comportamiento por más tiempo y si efectividad aumenta.

BIBLIOGRAFÍA

- ACORBANEC. (2022). *ANÁLISIS DE LAS EXPORTACIONES DE BANANO DEL ECUADOR DE ENERO A DICIEMBRE DEL 2021 1.-EVOLUCION MENSUAL DE LAS EXPORTACIONES DE BANANO.*
- BOSTER. (2020). *Instruction Manual AlamarBlue Cell Viability Assay Reagent.*
https://www.bosterbio.com/media/pdf/AR4002_DS.pdf
- Bruna, M., & Forlivesi, P. (2021). *CHILE EN LA ANTÁRTICA: LA CIENCIA COMO INSTRUMENTO SOBERANO.* Universidad de Chile.
- Caro Castro, J., Mateo Tuesta, C., Cisneros Moscol, J., Galindo Cabello, N., & León Quispe, J. (2019). Aislamiento y selección de actinomicetos rizosféricos con actividad antagonista a fitopatógenos de la papa (*Solanum tuberosum* spp. andigena). *Ecología Aplicada*, 18(2), 101–109.
<https://doi.org/10.21704/REA.V18I2.1329>
- Charousová, I., Medo, J., Hleba, L., Císarová, M., & Javoreková, S. (2019). Antimicrobial activity of actinomycetes and characterization of actinomycin-producing strain KRG-1 isolated from Karoo, South Africa. *J. Pharm. Sci*, 55, 17249.
<https://doi.org/10.1590/s2175-97902019000217249>
- Comunidad Andina. (2020). *Guía Andina para el diagnóstico de Fusarium Raza 4 Tropical (R4T).*
<https://www.comunidadandina.org/StaticFiles/202072181721Guia%20Andina%20Final.pdf>
- Das, M., Royer, T. v., & Leff, L. G. (2007). Diversity of fungi, bacteria, and actinomycetes on leaves decomposing in a stream. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(3), 756–767. <https://doi.org/10.1128/AEM.01170-06/ASSET/3D2CA438-A7FA-4ECC-9DC0-415DE5327D55/ASSETS/GRAPHIC/ZAM0020774790009.JPEG>
- Girón, W. (2008). Antimicrobianos. *Universidad Nacional Autónoma de Honduras.*
<http://cidbimena.desastres.hn/RFCM/pdf/2008/pdf/RFCMVol5-2-2008-11.pdf>
- Gonçalves, V. N., Carvalho, C. R., Johann, S., Mendes, G., Alves, T. M. A., Zani, C. L., Junior, P. A. S., Murta, S. M. F., Romanha, A. J., Cantrell, C. L., Rosa, C. A., & Rosa,

- L. H. (2015). Antibacterial, antifungal and antiprotozoal activities of fungal communities present in different substrates from Antarctica. *Polar Biology*, 38(8), 1143–1152. <https://doi.org/10.1007/S00300-015-1672-5/TABLES/2>
- Gonzalez-Franco, A. C., & Robles-Hernández, L. (2022). Antagonist activities and phylogenetic relationships of actinomycetes isolated from an Artemisia habitat. *Revista Argentina de Microbiología*. <https://doi.org/10.1016/J.RAM.2022.05.003>
- Haag, H., Gremlich, H. U., Bergmann, R., & Sanglier, J. J. (1996). Characterization and identification of actinomycetes by FT-IR spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods*, 27(2–3), 157–163. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(96\)00943-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(96)00943-8)
- INOCAR. (2019). *INFORME DE GESTIÓN ANUAL DE RENDICION DE CUENTAS 2019*. http://www.inocar.mil.ec/web/images/lotaip/2019/literal_m/M._Informe_gestion_INA_E_2019.pdf
- Ju, Y., Son, K. H., Jin, C., Hwang, B. S., Park, D. J., & Kim, C. J. (2018). Statistical optimization of culture medium for improved production of antimicrobial compound by *Streptomyces rimosus* AG-P1441. *Food Science and Biotechnology*, 27(2), 581. <https://doi.org/10.1007/S10068-017-0257-1>
- Lekhak, B., Singh, A., & Bhatta, D. R. (2018). Antibacterial and Antifungal Property of Actinomycetes Isolates from Soil and Water of Nepal. *Journal of Nepal Health Research Council*, 16(2), 136–139. <https://doi.org/10.3126/JNHRC.V16I2.20298>
- León, Lady, Arcaya, M., Barboto, N., & Bermeo, Y. (2018). *Ecuador: Análisis comparativo de las Exportaciones de banano orgánico y convencional e incidencia en la Balanza Comercial, 2018*. <https://doi.org/10.26423/rctu.v7i2.521>
- Martínez-Solórzano, G. E., Rey-Brina, J. C., Pargas-Pichardo, R. E., & Enrique-Manzanilla, E. (2020a). *Marchitez por Fusarium raza tropical 4: Estado actual y presencia en el continente americano 1 Fusarium wilt by tropical race 4: Current status and presence in the American continent*. <https://doi.org/10.15517/am.v31i1.37925>
- Martínez-Solórzano, G. E., Rey-Brina, J. C., Pargas-Pichardo, R. E., & Enrique-Manzanilla, E. (2020b). *Marchitez por Fusarium raza tropical 4: Estado actual y presencia en el continente americano 1 Fusarium wilt by tropical race 4: Current*

status and presence in the American continent.
<https://doi.org/10.15517/am.v31i1.37925>

Maymon, M., Sela, N., Shpatz, U., Galpaz, N., & Freeman, S. (2020). The origin and current situation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 in Israel and the Middle East. *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 1–11.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-58378-9>

Meliani, H., Makhoulfi, A., Cherif, A., Mahjoubi, M., & Makhoulfi, K. (2022). Biocontrol of toxinogenic *Aspergillus flavus* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* by two rare Saharan actinomycetes strains and LC-ESI/MS-MS profiling of their antimicrobial products. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(6), 103288.
<https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2022.103288>

Mohseni, M., Norouzi, H., Hamedi, J., & Roohi, A. (2013). Screening of Antibacterial Producing Actinomycetes from Sediments of the Caspian Sea. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 2(2), 64. /pmc/articles/PMC3920526/

Mon, Y. Y., Bidabadi, S. S., Oo, K. S., & Zheng, S. J. (2021). The antagonistic mechanism of rhizosphere microbes and endophytes on the interaction between banana and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 116, 101733. <https://doi.org/10.1016/J.PMPP.2021.101733>

Montañez, L. J. B. (2020). Cuantificación de azúcares reductores del sustrato en residuos de piña con el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico. *Revista de Investigación*, 13(1), 57–66. <https://doi.org/10.29097/23461098.308>

Moo-Young, M. (2019). *Comprehensive biotechnology* (Elsevier, Ed.; 3rd ed.). https://books.google.com/books/about/Comprehensive_Biotechnology.html?hl=es&id=6ysZwQEACAAJ

Nereyda, E., & Saucedo, R. (2011). *USO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS NATURALES EN LA CONSERVACIÓN DE FRUTAS Y HORTALIZAS*. 7. <https://www.redalyc.org/pdf/461/46116742014.pdf>

Rathore, D. S., & Singh, S. P. (2021). Kinetics of growth and co-production of amylase and protease in novel marine actinomycete, *Streptomyces lopnurensis* KaM5. *Folia*

Microbiologica, 66(3), 303–316. <https://doi.org/10.1007/S12223-020-00843-Z/TABLES/3>

Rios-Hernández, T. A., Uc-Varguez, A., Evangelista-Martínez, Z., Rios-Hernández, T. A., Uc-Varguez, A., & Evangelista-Martínez, Z. (2021). Control biológico de *Fusarium oxysporum*, agente causal de la pudrición del cormo en gladiolo, mediante estreptomicetos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 39(3), 391–413. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2105-3>

Sunish, K. S., Biji, M., Rosamma, P., Sudheer, N. S., Sreedharan, K., Mohandas, A., & Singh, I. S. B. (2020). Marine actinomycetes *Nocardiopsis alba* MCCB 110 has immunomodulatory property in the tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*, 102, 125–132. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2020.03.069>

Zhang, D., Lu, Y., Chen, H., Wu, C., Zhang, H., Chen, L., & Chen, X. (2020). Antifungal peptides produced by actinomycetes and their biological activities against plant diseases. *Journal of Antibiotics*, 73(5), 265–282. <https://doi.org/10.1038/S41429-020-0287-4>

ANEXOS

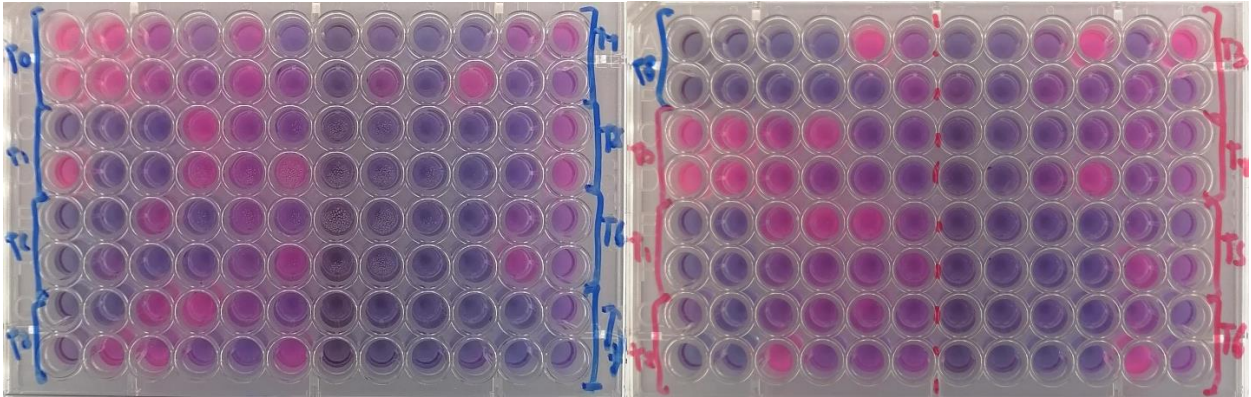


Imagen 1 Porcentaje de reducción del alamar blue como unidades arbitrarias

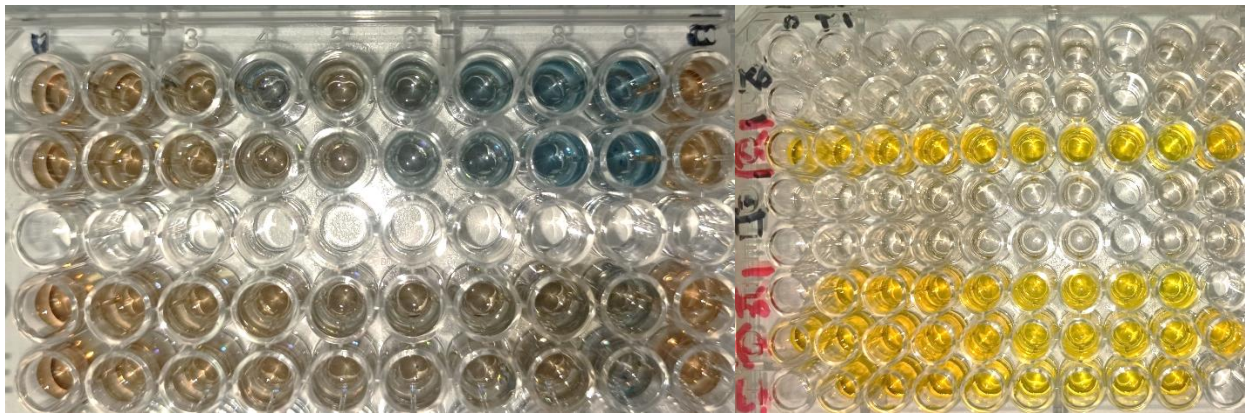


Imagen 2 Placa 96 pocillos para caracterizar proteínas, DNS y pigmentación



Imagen 3 Disposición de la cepa K6 en sus diferentes tiempos (T0 a T8) y su respectiva repetición, así como un control